

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

กิจกรรมที่ 1 การศึกษาทดสอบพันธุ์กระเทียมที่เหมาะสมสำหรับปลูกบนพื้นที่สูง

- พื้นที่ดำเนินการทดสอบ:
1. ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงเลอตอ อ.แม่ระมาด จ.ตาก
 2. โครงการขยายผลฯ ป่าเกียะใหม่ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
 3. บ้านป่าพลู อ.บ้านโฮ่ง จ.ลำพูน

วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วยกระเทียม 20 พันธุ์ จำนวน 3 ซ้ำ

- 1) เตรียมกลีบพันธุ์กระเทียมที่รวบรวมจากแหล่งปลูกสำคัญในเขตจังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ลำพูน อุตรดิตถ์ เพชรบูรณ์ จำนวน 20 พันธุ์
- 2) เก็บตัวอย่างดินเพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีดิน ได้แก่ ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (OM) ปริมาณธาตุอาหารในดิน (N P K)
- 3) ปลูกทดสอบพันธุ์กระเทียมทั้ง 20 พันธุ์ บนพื้นที่สูงที่ 3 ระดับความสูงจากน้ำทะเล ได้แก่ 400, 800 และ 1,000 MSL โดยใช้ระยะ 20x20 เซนติเมตร จำนวน 1 กลีบต่อหลุม
- 4) บันทึกข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของกระเทียมแต่ละพันธุ์ก่อนนำไปปลูกทดสอบบนพื้นที่สูงทั้ง 3 ระดับความสูง ได้แก่ ภาพสัณฐานวิทยาหัว กลีบ ขนาดหัว น้ำหนักหัวเฉลี่ย จำนวนกลีบต่อหัว ขนาดกลีบ สีเปลือกหุ้ม จำนวนชั้นเปลือก
- 5) บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต ผลผลิตน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของกระเทียมแต่ละพันธุ์ และลักษณะสัณฐานวิทยาหัวพันธุ์กระเทียมแต่ละพันธุ์ที่ทดสอบในแต่ละพื้นที่ ได้แก่
 - สีเปลือกทั้งหัว
 - ขนาดหัว (เส้นผ่าศูนย์กลาง x หัว)
 - น้ำหนักต่อหัวเฉลี่ย (กรัม)
 - จำนวนกลีบต่อหัว
 - ขนาดกลีบ (ความสูง x ความกว้างด้านข้าง x ความกว้างด้านนอกถึงด้านใน)
 - สีเปลือกหุ้มกลีบ
 - จำนวนชั้นของเปลือกหุ้มกลีบ
 - บันทึกภาพของลักษณะหัวพันธุ์ สีเปลือก สีกลีบของกระเทียมแต่ละลักษณะจากแต่ละแหล่งปลูก
- 6) วิเคราะห์ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาสารกลุ่ม Organosulfur compounds ของกระเทียมแต่ละพันธุ์ที่ปลูกใน 3 ระดับความสูงจากน้ำทะเล
- 7) ประมวลข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยา ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ผลผลิตของกระเทียมแต่ละพันธุ์ที่ปลูกในแต่ละระดับความสูง
- 8) คัดเลือกพันธุ์กระเทียมที่เหมาะสมสำหรับปลูกบนพื้นที่สูง

กิจกรรมที่ 2 การทดสอบและสาธิตการปลูกกระเทียมที่เหมาะสมสำหรับพื้นที่สูง โดยมุ่งเน้นให้เกษตรกรบนพื้นที่สูงมีกระเทียมบริโภคในครัวเรือน

- พื้นที่ดำเนินการทดสอบ:
1. ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงเลอตอ อ.แม่ระมาด จ.ตาก
 2. โครงการขยายผลฯ ขุนตี่น้อย อ.อมก๋อย จ.เชียงใหม่

- 1) ประชุมและอบรมให้ความรู้เรื่องการปลูกกระเทียมให้แก่เกษตรกรบนพื้นที่สูง ที่มีความต้องการปลูกกระเทียมเพื่อบริโภคในครัวเรือน
- 2) คัดเลือกพื้นที่และเกษตรกรเข้าร่วมทดสอบสาธิต พร้อมทั้งชี้แจงการดำเนินงาน
 - เก็บตัวอย่างดินจากแปลงของเกษตรกรก่อนปลูกกระเทียม วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของดิน ได้แก่
 - ความเป็นกรดเป็นด่าง - (pH)
 - ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (OM)
 - ปริมาณธาตุอาหารในดิน)N P K)
 - ปริมาณธาตุแมกนีเซียม (Mg) แคลเซียม (Ca)
 - ทดสอบและสาธิตปลูกกระเทียมในแปลงร่วมกับเกษตรกรบนพื้นที่สูง จำนวน 5 ชุมชน
 - เตรียมแปลงกว้างประมาณ 1.20 เมตร ความสูงของแปลงประมาณ 20 เซนติเมตร ยกแปลงเพื่อทำร่องน้ำหากพื้นที่ค่อนข้างชัน หรือทำร่องน้ำรอบๆ ขอบแปลงเพื่อระบายน้ำ
 - สาธิตการแกะ คัดเลือกกลีบพันธุ์กระเทียม
 - ปลูกกระเทียมหลุมละ 1 กลีบ ลึกประมาณ 2/3 ของกลีบ
 - ระยะปลูก 20 x 20 เซนติเมตร
 - หลังปลูกกระเทียมแล้วคลุมฟางหนา 2-3 นิ้ว เพื่อควบคุมการงอกของวัชพืช และควบคุมความชื้นในดินให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของกระเทียม (สาธิตและฝึกให้เกษตรกรคลุมฟางที่ถูกต้อง เพื่อลดปัญหาการงอกกระเทียมที่ไม่สามารถไถ่ฟันฟางข้าวได้)
 - ช่วงเดือนแรกก่อนระยะสร้างหัว หากเกิดวัชพืชขึ้นในแปลงควรถอนกำจัดด้วยแรงงานคน
 - การให้น้ำ โดยให้น้ำขังรอบแปลงและตัดรดทุก 3-5 วัน/ครั้ง โดยสังเกตจากใบกระเทียม ถ้าเริ่มเหี่ยวให้ตักน้ำรดทันที หรือให้น้ำท่วมแปลงแล้วระบายออกหรือปล่อยให้ไหลไปยังพื้นที่ที่มีระดับต่ำ หากปลูกบนพื้นที่ดอน ให้น้ำแบบสปริงเกอร์ต้องให้น้ำอย่างทั่วถึง วงการกระจายของน้ำต้องสม่ำเสมอ
 - การเก็บเกี่ยว อายุการเก็บเกี่ยวสำหรับกระเทียมขึ้นอยู่กับพันธุ์ และสภาพอากาศของพื้นที่ปลูก
 - สาธิตวิธีการตากกระเทียมก่อนเก็บแขวน เนื่องจากบนพื้นที่สูงมีความชื้นของอากาศสูงจึงต้องตากให้แห้งในระดับหนึ่งก่อน ไม่เช่นนั้นจะทำให้ใบกระเทียมเน่าเกิดเชื้อรา
 - บันทึกข้อมูลพื้นฐานวิทยาและผลผลิตของกระเทียมแต่ละกรรมวิธีทดสอบ ได้แก่ น้ำหนักสด ขนาดหัว สีเปลือก สีกลีบ ฯลฯ
 - หลังเก็บเกี่ยวแขวนเก็บกระเทียมในที่โล่ง ปลอดภัย และสาธิตวิธีการทำความสะอาดและมัดจุกกระเทียม
- 3) เก็บเกี่ยวกระเทียม บันทึกน้ำหนักกระเทียมสด

กิจกรรมที่ 3 การศึกษาวิธีการผลิตหัวพันธุ์กระเทียมคุณภาพ โดยการลดการใช้ปุ๋ยเคมีและศึกษาอายุการเก็บรักษาหัวพันธุ์กระเทียม

พื้นที่ดำเนินการทดสอบ:

1. โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงห้วยเป้า อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
2. บ้านป่าพลู อ.บ้านโฮ้ง จ.ลำพูน

- 1) วางแผนการทดสอบแบบ RCBD จำนวน 3 กรรมวิธี 3 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ใช้ปุ๋ยเคมี หรือแบบเดิมของเกษตรกร (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับปุ๋ยเคมี

กรรมวิธีที่ 3 ใช้ปุ๋ยอินทรีย์

- 2) คัดเลือกพื้นที่และเกษตรกรเข้าร่วมทดสอบสาธิต พร้อมทั้งชี้แจงการดำเนินงาน

- 3) เก็บตัวอย่างดินในแปลงของเกษตรกรก่อนปลูกกระเทียม วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของดิน ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (OM) ปริมาณธาตุอาหารในดิน (N P K) และปริมาณธาตุแมกนีเซียม (Mg)

- 4) ปลูกทดสอบกระเทียมตามแผนการทดสอบร่วมกับเกษตรกร โดยใช้ระยะปลูก 20x20 เซนติเมตร

- 5) ใส่ปุ๋ยตามแผนการทดสอบให้สอดคล้องกับการใส่ปุ๋ยของเกษตรกรในแต่ละพื้นที่

- 6) การป้องกันกำจัดโรคแมลง สามารถใช้สารเคมีได้ตามความจำเป็น

- 7) การดูแลรักษา (การให้น้ำ กำจัดวัชพืช) ดำเนินการตามการปฏิบัติของเกษตรกร

- 8) การบันทึกข้อมูล

ระยะเก็บเกี่ยว - บันทึกข้อมูลน้ำหนักสดกระเทียมจากแต่ละกรรมวิธี

หลังเก็บเกี่ยว - ผึ่งกระเทียมให้แห้ง ทำความสะอาดมัดจุกหัวพันธุ์กระเทียมของแต่ละกรรมวิธีทดสอบ แขนหัวพันธุ์ไว้ในโกดัง

- บันทึกน้ำหนักกระเทียมจากแต่ละกรรมวิธีการทดสอบเดือนละ 1 ครั้ง จนถึงฤดูปลูกถัดไป

- แกะกลีบพันธุ์ของกระเทียมจากแต่ละกรรมวิธีเพื่อบันทึกน้ำหนักกลีบพันธุ์

- 9) เก็บข้อมูลต้นทุนการปลูกกระเทียมตลอดฤดูกาลปลูก

- 10) สรุปผลการทดสอบร่วมกับเกษตรกร และเลือกกรรมวิธีที่ดีที่สุดสำหรับปลูกเพื่อผลิตหัวพันธุ์ที่มีคุณภาพ

วิธีการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาในกระเทียม

1. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดกระเทียม (ส่วนมีหัว)

การเตรียมตัวอย่างของสารสกัดกระเทียมเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมและการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่ละลายน้ำได้ (วิตามินบีหนึ่ง วิตามินบีสองและวิตามินซี) นั้นทำการเตรียมตัวอย่างสารสกัดดังขั้นตอนต่อไปนี้

ชั่งตัวอย่างกระเทียมสด 100 กรัม



บดให้ละเอียด



สกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สกัดทั้งหมด 3 รอบ



นำสารละลายที่ได้จากการสกัดมารวมกัน



ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยโดยการลดความดัน



ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้

2. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดกระเทียม (ส่วนไม่มีหัว)

การเตรียมตัวอย่างของสารสกัดกระเทียมเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ Diallyl disulfide และ Diallyl trisulfide ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ Allicin ที่ละลายได้ในไขมัน รวมทั้งวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันนั้น ทำการเตรียมตัวอย่างสารสกัดดังขั้นตอนต่อไปนี้

ชั่งตัวอย่างกระเทียมสด 100 กรัม



บดให้ละเอียด



สกัดด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สกัดทั้งหมด 3 รอบ



นำสารละลายที่ได้จากการสกัดมารวมกัน



ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยโดยการลดความดัน



ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้

3. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมนั้นใช้วิธี Folin-Ciocalteu (Saenjum *et al.*, 2010) ซึ่งอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบฟีนอลิก ในการเปลี่ยนสารละลาย Folin-Ciocalteu ที่มีสีเหลือง (Molybdotung-stophosphoric heteropolyanion reagent) ในสถานะที่เป็นต่างให้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน (Molybdotungstophosphate blue) ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

เตรียม Folin-Ciocalteu stock solution และ Saturated sodium bicarbonate



เตรียม Gallic acid ซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐานสำหรับการทดสอบ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน



Reaction mixture ประกอบด้วยน้ำปราศจากไอออน 1.5 มิลลิลิตร สารละลาย Saturated sodium bicarbonate 300 ไมโครลิตร สารละลาย Folin-Ciocalteu 100 ไมโครลิตรและตัวอย่าง หรือสารมาตรฐาน 100 ไมโครลิตร



วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร



คำนวณหาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกรวมของสารสกัดตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน Gallic acid โดยคำนวณโดยใช้ Gel หรือ Cream base เป็นกลุ่มควบคุม

4. การตรวจวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมจะใช้เทคนิค UV/Vis-Spectrophotometry โดยดัดแปลงวิธีของ Shen *et al.*, 2010 โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

ชั่งตัวอย่างสารสกัด 0.1 กรัม เติมน้ำ 4 มิลลิลิตร



เติม 5% NaNO_2 0.3 มิลลิลิตร



ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติม 10% AlCl_3 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร



ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติม 1M NaOH 2 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร



ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร



คำนวณหาปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยรวมของสารสกัดจากกราฟมาตรฐาน Quercetin

5. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีหนึ่ง บีสองและวิตามินซี

นอกจากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหยาดกระเทียมที่เตรียมด้วยเอทานอลแล้ว จะทำการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีหนึ่ง บีสองและวิตามินซี ด้วยเทคนิค Reversed-phase HPLC ผลการวิเคราะห์ปริมาณปริมาณวิตามินบีหนึ่ง บีสองและวิตามินซี ในสารสกัดกระเทียม

6. การวิเคราะห์ปริมาณ Diallyl disulfide และ Diallyl trisulfide ในสารสกัดกระเทียม

Diallyl disulfide และ Diallyl trisulfide เป็นสารอนุพันธ์ที่เกิดจากการสลายตัวของ Allicin ในกระเทียม เนื่องจาก Allicin เป็นสารที่มีความคงตัวต่ำ นอกจากนั้นยังมีรายงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของ Diallyl disulfide และ Diallyl trisulfide นำตัวอย่างสารสกัดกระเทียมจากข้อ 1 มาวิเคราะห์ปริมาณ Diallyl trisulfide ด้วยเทคนิค Ion-pair reversed-phased HPLC โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Diallyl trisulfide ซึ่งสั่งซื้อจากบริษัท Sigma, Co., Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา ผลการวิเคราะห์ Diallyl trisulfide

7. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน

นำตัวอย่างสารสกัดกระเทียมจากข้อ 2 มาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันด้วยเทคนิค GLC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Caproic acid, Caprylic acid, Capric acid, Lauric acid, Myristic acid, Myristoleic acid, Palmitic acid, Palmitoleic acid, Stearic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Gamma linolenic acid, Linolenic acid, Arachidic acid, Eicosaenoic acid, Eicosadienoic acid, Eicosatrienoic acid, Arachidonic acid, Erucic acid, และ Nervonic acid โดยผลตรวจชนิดและปริมาณของกรดไขมัน

สถานที่ดำเนินการวิจัย

1. ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงเลอตอ อ.แม่ระมาด จ.ตาก
2. โครงการขยายผลฯ ป่าเกี้ยวใหม่ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
3. โครงการขยายผลฯ ขุนตื้นน้อย อ.อมก๋อย จ.เชียงใหม่
4. โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงห้วยเป้า อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
5. บ้านป่าพลู อ.บ้านโฮ้ง จ.ลำพูน