บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

1. อุปกรณ์

1.1. เครื่องมือ

1.1.1. เครื่องนึ่งความดัน (Autoclave)

1.1.2. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven)

1.1.3. ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Laminar air flow)

1.1.4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

1.1.5. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

1.1.6. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.1.7. ขวดแก้วพร้อมฝาพลาสติกสีขาวแบบเกลียว

1.1.8. Petri-dish ขนาด 100 x 15 มม.

และอุปกรณ์มาตรฐานสำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั่วไป

1.2. อุปกรณ์สำหรับการทดลองปลูกพืชในแปลงทดลอง

1.2.1. กระถาง

1.2.2. ดิน

1.2.3. ขุยมะพร้าว

1.2.4. ปุ๋ยคอก

1.2.5. ทราย

1.2.6. ไม้ไผ่

1.2.7. จอบ

1.2.8. เสียม

1.2.9. สายวัด

1.2.10. ป้ายฉลาก

2. พืชทดลอง

2.1. พืชที่ใช้ในการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ใช้ต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดกวาวเครือขาว จาก อ. ดอยเต่า จ. เชียงใหม่ ในสภาพปลอดเชื้อ อายุประมาณ 30-45 วัน

2.1.1. การกระตุ้นให้เกิดแคลลัส

ใช้ส่วนยอดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จากต้นที่ได้ในข้อ 2.1

2.1.2. การกระตุ้นให้เกิดต้นจำนวนมาก

ใช้ส่วนข้อของพืชจากข้อ 2.1

2.1.3. การกระตุ้นให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ

ใช้แคลลัสที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.1.1

2.1.4. การกระตุ้นให้เกิดราก

ใช้ต้นพืชจากข้อ 2.1 ที่มียอดและข้อประมาณ 4-5 ข้อ

2.2. พืชที่ใช้ในแปลงทดลอง

ต้นกวาวเครือขาวที่ได้จากการชักนำให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้ออายุ 1 เดือน และ 1 ปี

3. สารเคมี

3.1. สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่

สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตามสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) และ WPM (Lloyd and Mc Cown, 1980)

3.2. สารควบคุมการเจริญเติบโต

3.2.1. BAP (6- Benzylaminopurine)

3.2.2. NAA (α-Napthaleneacetic acid)

3.3. สารประกอบอินทรีย์

สารอินทรีย์เสริม(Organic additives) ได้แก่ กล้วยสุกพันธุ์หอมทอง มะเขือเทศสุก มันฝรั่งและน้ำมะพร้าว

3.4. สารเคมีที่ใช้ในการทำให้ปลอดเชื้อและสารลดแรงตึงผิว

3.4.1. เอทธิลแอลกอฮอล์ 95%

3.4.2. เอทธิลแอลกอฮอล์ 70%

3.4.3. คลอรอกซ์ (โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5.25%)

3.4.4. ทวีน-20 (Tween-20)

3.5. สารเคมีที่ใช้ในแปลงทดลอง

3.5.1. ปุ๋ยเคมีสูตร N-P-K :15-15-15

3.5.2. ปุ๋ยเคมีสูตร N-P-K :8-24-24

3.6. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในรากสะสมอาหาร

3.6.1. เอทธิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์

3.6.2. เมทธิลแอลกอฮอล์

3.6.3. คลอโรฟอร์ม

3.7. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ค่าออร์แกนิกแมทเทอร์ในดิน

3.7.1. $K_2Cr_2O_7$ (Potassium dichromate solution) 1N

ละลาย $K_2Cr_2O_7$ (อบที่ 105 $^{\circ}$ ซ)49.04 กรัม ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร

3.7.2. กรดซัลฟูริก เข้มข้น (95-97% Sulfuric acid)

3.7.3. กรดฟอสฟอริกเข้มข้น (concentrated H_3PO_4)

3.7.4. O-Phenanthroline-ferrous complex 0.025 M

ละลาย O-Phenanthroline monohydrate 14.85 กรัม และ ferrous sulfate - heptahydrate ($FeSO_4.7H_2O$) 6.95 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

3.7.5. สารละลาย Ferrous ammonium sulfate $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 0.5 N

ละลาย $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 .6H_2O$ 196.1 กรัม ในน้ำ 800 มล. ซึ่งมีกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มล. ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การศึกษาแหล่งธรรมชาติของกวาวเครือขาว

ใช้สองสถานีทดลองได้แก่ อ. ดอยเต่า จ. เชียงใหม่ และ อ. ไทรโยคน้อย จ. กาญจนบุรี

ศึกษาแหล่งธรรมชาติ สภาพแวดล้อมและภูมิอากาศ ของกวาวเครือขาว บริเวณสถานี-ทดลอง อ. ดอยเต่า ในช่วงเดือนมีนาคม และบริเวณสถานีทดลอง อ.ไทรโยคน้อย ในเดือนเมษายน โดยใช้วิธีเดินสำรวจในบริเวณที่ศึกษา และศึกษาการกระจายของกวาวเครือขาวในบริเวณนั้น ระยะการเจริญเติบโต ให้ดอกและติดฝัก ลักษณะของช่อดอก ฝัก และเมล็ดภายใน รวมทั้งจำนวนเมล็ดต่อฝัก และศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของสภาพแวดล้อมระหว่างสองสถานีทดลอง

2. การเตรียมพืชทดลอง

2.1. การเตรียมพืชเพื่อใช้ในการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1.1. เตรียมต้นพืชปลอดเชื้อ

นำเมล็ดกวาวเครือขาวมาทำให้ปลอดเชื้อโดยแช่ในเอทธิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 50% ที่เติมทวีน-20 2-3 หยด เป็นเวลา 40 นาที เขย่าเป็นครั้งคราว จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง เพาะเมล็ดที่ฆ่าเชื้อแล้วในอาหารสูตร WPM ที่มีธาตุเหล็ก 2 เท่า ใน petri dish เมื่อเมล็ดงอกย้ายเมล็ดลงเลี้ยงในอาหารสูตร WPM ที่มีธาตุเหล็ก 2 เท่า โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25$\pm$ 2 $^{\circ}$ ซ. ช่วงแสง 16 ชม.ต่อวัน ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 30-45วัน เพื่อใช้เป็นพืชทดลองต่อไป

2.1.2. ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการทดลอง

2.1.2.1. การพัฒนาการชักนำให้เกิดแคลลัส

จากการทดลองของกนกพร (2538) ใช้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชสี่ส่วนคือ ยอด ข้อ ราก และใบ เพื่อเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการทดลอง เลี้ยงในอาหารสูตร MS พบว่าเนื้อเยื่อส่วนยอดได้ผลดีที่สุดจึงได้เลือกใช้ปลายยอดยาวประมาณ 1 ซ.ม. ที่ได้จากต้นพืชปลอดเชื้อ เลี้ยงในอาหารสูตรทดลอง ที่อุณหภูมิ 25$\pm$2 $^{\circ}$ ซ. ช่วงแสง 16 ชม.ต่อวัน ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ใช้ 10 ซ้ำต่อ 1 สูตรทดลอง

2.1.2.2. การพัฒนาการชักนำให้เกิดต้นจำนวนมาก

จากการทดลองของกนกพร (2538) ใช้เนื้อเยื่อส่วนข้อและยอดเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการทดลองเลี้ยงในอาหารสูตร WPM ที่มี BAP 0.25 และ 0.5 มก. ต่อลิตร พบว่าเนื้อเยื่อส่วนข้อตอบสนองต่ออาหารได้ดี ต้นที่เกิดขึ้นมีคุณภาพดี จึงเลือกใช้ส่วนข้อยาวประมาณ

1-1.5 ซ.ม. ที่ได้จากต้นพืชปลอดเชื้อ เลี้ยงในอาหารสูตรทดลอง ที่อุณหภูมิ 25±2 ° ซ. ช่วงแสง 16 ชม.ต่อวัน ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ใช้ 10 ซ้ำต่อ 1 สูตรทดลอง

2.1.2.3. การพัฒนาการชักนำให้เกิดโซมาติก เอมบริโอ

ใช้แคลลัสที่ได้จากการชักนำให้เกิดแคลลัสในการทดลองข้างต้น โดยเลือกแคลลัสที่มีคุณภาพดี คือเป็น friable callus สีเขียวปนเหลือง เลี้ยงในอาหารสูตรทดลอง ที่อุณหภูมิ 25±2 ° ซ. ช่วงแสง 16 ชม.ต่อวัน ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ใช้ 10 ซ้ำต่อ 1 สูตรทดลอง

2.1.2.4. การพัฒนาการชักนำให้เกิดราก

ใช้ต้นที่มีข้อประมาณ 4-5 ข้อ ที่ได้จากต้นพืชปลอดเชื้อ เลี้ยงในอาหารสูตรทดลอง ที่อุณหภูมิ 25±2 ° ซ. ช่วงแสง16 ชม.ต่อวัน ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ใช้ 10 ซ้ำต่อ 1 สูตรทดลอง

2.2. การเตรียมพืชเพื่อใช้ทดลองในแปลงปลูก

2.2.1. ต้นกวาวเครือขาวที่มีอายุ 1 เดือน

นำต้นกวาวเครือขาวที่ชักนำให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อจำนวน 26 ต้น ออกปลูกในเรือนเพาะชำ โดยใช้วัสดุปลูกคือ ดิน : ขุยมะพร้าว : ทราย : ปุ๋ยคอก ในอัตราส่วน 1:1:1:1

2.2.2. ต้นกวาวเครือขาวที่มีอายุ 1 ปี

ต้นกวาวเครือขาวที่ปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 1 ปี จำนวน 12 ต้น ใช้วัสดุปลูกเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1

3. สูตรอาหาร

3.1. สูตรอาหารสำหรับพัฒนาการชักนำให้เกิดแคลลัส

ในการทดลองของกนกพร (2538) ชักนำให้เกิดแคลลัสคุณภาพดี สีเขียวปนเหลืองโดยใช้สูตรอาหาร MS ร่วมกับ NAA BAP และสารอินทรีย์เสริมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 ภาคผนวก ก

3.2. สูตรอาหารสำหรับพัฒนาการชักนำให้เกิดต้นจำนวนมาก

จากการทดลองของกนกพร (2538) ได้ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อในอาหารสูตร MS SH และ WPM ที่เติม BAP 0-2 มก.ต่อลิตรพบว่า อาหารสูตร WPM ได้ผลดีที่สุดจึงเลือกใช้อาหารสูตร WPM แต่เนื่องจากพบว่ายอดที่เกิดขึ้นมีอาการขาดธาตุเหล็ก จึงใช้สารอาหารที่มีความเข้มข้นของ ธาตุเหล็กเป็น 2 เท่า และเติมฮอร์โมน BAP และสารอินทรีย์เสริมที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงใน ตารางที่ 3 ในภาคผนวก ก

3.3. สูตรอาหารสำหรับพัฒนาการชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ

จากการทดลองของกนกพร (2538) ได้ทดลองเลี้ยง friable callus ที่มีคุณภาพดี ในอาหารสูตร MS ระดับความเข้มข้นของธาตุอาหาร 0.5 0.75 1.0 1.25 และ 1.5 เท่าของอาหารปกติ ร่วมกับ NAA และ BAP พบว่าในอาหารสูตร 1.25xMS มีแนวโน้มที่จะชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอได้ จึงเลือกใช้อาหารสูตร 1.25xMS เติม NAA BAP และสารอินทรีย์เสริมที่ความเข้มข้นต่างๆดังแสดงในตารางที่ 2 ภาคผนวก ก

3.4. สูตรอาหารสำหรับพัฒนาการชักนำให้เกิดราก

ในการทดลองของกนกพร (2538) ใช้ต้นที่มีข้อ 3-4 ข้อ เลี้ยงในอาหารสูตร MS SH และ WPM ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA 1 และ 2 mg/l ในสูตร MS และ WPM ได้ทดลองลดธาตุอาหารลง 0.5 และ 0.75 เท่า พบว่า อาหารสูตร WPM ที่เติม NAA 1.0 mg/l ชักนำให้เกิดรากคุณภาพดี จึงเลือกใช้อาหารสูตร WPM ที่มีธาตุเหล็ก 2 เท่า เติมฮอร์โมน NAA และสารอินทรีย์เสริม ดังแสดงในตารางที่ 4 ภาคผนวก ก

3.5. สูตรอาหารสำหรับการพัฒนาการเลี้ยงกวาวเครือขาวในสภาพปลอดเชื้อ

จากการทดลองของกนกพร (2538) ได้เลี้ยงกวาวเครือขาวในอาหารสูตร MS เพิ่มธาตุเหล็ก 0.5 เท่า ต้นที่เกิดขึ้นยังคงพบอาการขาดธาตุเหล็กที่ปลายยอดและไม่ค่อยแข็งแรง จึงได้มีการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงกวาวเครือขาวในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้อาหารสูตรต่างๆ ดังนี้

3.5.1. ใช้อาหารสูตร MS ร่วมกับ เนื้อมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร กล้วยหอมดิบ 100 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 150 มล.ต่อลิตร และผงถ่าน 0.3 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร

3.5.2. ใช้อาหารสูตร MS ที่มีธาตุเหล็ก 2 เท่า ร่วมกับ เนื้อมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร กล้วยหอมดิบ 100 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร และผงถ่าน 0.3 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร

3.5.3. ใช้อาหารสูตร 0.5 × MS ร่วมกับ เนื้อมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร กล้วยหอมดิบ 100 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ใช้น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร

3.5.4. ใช้อาหารสูตร 0.5 × MS ร่วมกับ เนื้อมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร กล้วยหอมดิบ 100 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร และผงถ่าน 0.3 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาล 15 กรัมต่อลิตร

3.5.5. ใช้อาหารสูตร WPM ที่มีธาตุเหล็ก 2 เท่า ร่วมกับ เนื้อมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร กล้วยหอมดิบ 100 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร และผงถ่าน 0.3 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร

ทุกสูตรอาหารปรับ pH เป็น 5.6 นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่องนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121^{0} ซ. ความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรเป็นเวลา 15 นาที

4. แปลงทดลอง

4.1. สถานที่ทดลอง

ใช้สถานที่ทดลองสองแห่งคือ สถานีทดลอง อ.บ้านโป่ง จ. ราชบุรี และสถานีทดลอง อ.พนัสนิคม จ. ชลบุรี ลักษณะดินที่สถานีทดลอง อ.บ้านโป่งเป็นดินร่วน ความชื้นค่อนข้างสูง ส่วนดินที่สถานีทดลอง อ.พนัสนิคม เป็นดินร่วนปนทราย ไม่อุ้มน้ำ ซึ่งดินต่างชนิดกันอาจมีผลต่อการเกิดรากสะสมอาหาร และอัตราการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาวได้ แต่เมื่อถึงฤดูกาลปลูก พบว่า สถานีทดลอง อ. พนัสนิคม เกิดน้ำท่วมสองปีติดต่อกัน ทำให้ไม่สามารถทำการทดลองตามแผนงานเดิมได้ ดังนั้นสถานที่ที่จะใช้เป็นแปลงทดลองจึงมีเพียงบริเวณ อ. บ้านโป่งเท่านั้น

4.2. การเตรียมดินก่อนปลูก

เตรียมแปลงทดลองโดยกำจัดวัชพืช ทำแปลงให้แต่ละแปลงห่างกัน 1.1 เมตร ในแต่ละแปลงปลูกต้นกวาวเครือขาวให้ห่างกัน 1.1 เมตร แถวละ 6 ต้น ทดสอบอิทธิพลของปุยสองชนิดที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต และการเกิดรากสะสมอาหาร โดยใช้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 และสูตร 8-24-24 โดยให้ต้นละ 12 กรัม ทุกเดือน

4.3. การดูแลรักษา

รดน้ำทุก 1-2 วัน กำจัดวัชพืชและศัตรูพืชโดยไม่ใช้สารเคมี

4.4. การวัดผลการทดลอง

4.4.1. การเจริญเติบโตของรากสะสมอาหาร

ศึกษารูปร่างลักษณะของรากสะสมอาหารใต้ดิน จำนวนต่อต้น น้ำหนักสดของราก และลักษณะการเจริญเติบโต

4.4.2. ลักษณะทางกายภาพของดิน

4.4.2.1. ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ชั่งดิน 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 มล. คนให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที คนเป็นครั้งคราว จากนั้นวัดด้วย pH meter

4.4.2.2. ค่าความชื้นในดิน

การวัดปริมาณน้ำในดิน คำนวณจากสูตร

$$\text{ระดับความชื้น(\%)} = \frac{(\text{น.น.ของน้ำในดิน}) \times 100}{\text{น.น.ของดินแห้ง}}$$

4.4.2.3. เนื้อดิน

การหาชนิดของเนื้อดินทำได้โดยชั่งดินแห้ง 50 กรัม เติมน้ำกลั่น 150 มล. คนแล้วปล่อยทิ้งไว้ 10 นาทีให้ตกตะกอน ตะกอนนี้คือ sand (นำตะกอนไปอบให้แห้งแล้วชั่งน้ำหนัก) รินส่วนที่เป็นน้ำและสารแขวนลอยลงในบีกเกอร์ ปล่อยไว้ 24 ชั่วโมงให้ตกตะกอน ตะกอนนี้คือ silt (นำตะกอนไปอบให้แห้งแล้วชั่งน้ำหนัก) นำน้ำหนักของ sand รวมกับ silt ลบออกจาก 50 กรัม ค่าที่ได้คืออนุภาค clay

4.4.2.4. การหา% Organic matter (OM)

ใช้วิธีของ Walkley-Black Method (M.C. Jackson, 1973)

- บดดินและร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาด sieve 0.5 ม.ม. ชั่งดินที่ร่อนแล้ว 0.5 กรัม ใส่ลงใน Erlenmeyer flask 250 มล.
- เติม 1 N $K_2Cr_2O_7$ 10 มล. เขย่าเบาๆ
- เติม H_2SO_4 เข้มข้น ปริมาตร 20 มล. อย่างรวดเร็ว เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
- เติมน้ำกลั่น 200 มล. กรองตะกอนออกเพื่อให้สารละลายใสมองเห็นจุดยุติได้ชัดเจน
- เติม O-Phenanthroline indicator 3-4 หยด
- ไตเตรตสารละลายด้วย 0.5 N $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ เมื่อใกล้ถึงจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเขียวเข้ม ค่อยๆหยด $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 .6H_2O$ ลงไปทีละหยดจนสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงเลือดนก บันทึกปริมาณ $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 .6H_2O$ ที่ใช้ไป
- ทำ Blank โดยใช้วิธีเดียวกันแต่ไม่ต้องใช้ดิน
- คำนวณค่า OM โดยใช้สูตร

$$\%OM = 10\ (1-T/S) \times 1.34$$

เมื่อ S = ปริมาณ $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 .6H_2O$ ที่ใช้ไป (มล.)ในการไตเตรตกับดินตัวอย่าง

1.34 = conversion factor หาได้จากการคำนวน

$1.0\ N \times (12/4000) \times (1.72/0.77) \times (100/0.5)$

เมื่อ 12/4000 = meq. weight of C

1.72 = factor for organic matter from C

0.5 = sample weight

4.4.3. การวิเคราะห์ทางเคมี

หั่นรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวออกเป็นชิ้นบางๆ ผึ่งแดดให้แห้งจากนั้นนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 40-50 ^{O} ซ. เก็บไว้ในที่แห้งเพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่อไป

5. การวิเคราะห์สารทุติยภูมิเบื้องต้นในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว

5.1. การสกัดสาร

นำหัวกวาวเครือขาวแห้ง 10 กรัม มาบดให้ละเอียดแล้วแช่ลงในเอทธานอลบริสุทธิ์ 20 มล. ในขวดแก้วปิด เป็นเวลา 7 วัน กรองกากออกด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) นำสารละลายที่ได้มาทำให้เข้มข้นโดยระเหยในหม้ออังไอน้ำ (water bath) จนเหลือสารละลายเข้มข้น 2 มล.

5.2 การตรวจสอบทางเคมี โดยวิธีโครมาโตกราฟีแผ่นบาง

นำสารละลายมาจุด (spot) บนแผ่นโครมาโตกราฟีขนาด 10 × 20 ซม.^{2} แล้วแยกในภาชนะปิดที่มีสารคลอโรฟอร์ม : เมทธานอล ในอัตราส่วน 90:10 เมื่อแนวของตัวทำละลายเคลื่อนที่จนเกือบถึงด้านบนสุด นำแผ่นโครมาโตกราฟีไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร และคำนวณค่าคงที่ Rf