บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1.1 หลอด LED สีต่าง ๆ

1.1.2 สายวัด

1.1.3 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง

1.1.4 เครื่องอัลตราโซนิค

1.1.5 ขวดรูปชมพู่

1.1.6 กระดาษกรอง (Whatman No.1)

1.1.7 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Evaporator)

1.1.8 หลอดทดลอง

1.1.9 เครื่องเขย่า

1.1.10 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

1.1.11 ปิเปต

1.1.12 ตู้อบลมร้อน

1.1.13 เครื่องแก้ววิทยาศาสตร์ต่างๆ

1.1.14 เครื่องชั่งทศนิยม 2, 3 และ 4 ตำแหน่ง

1.1.15เครื่องกวนสารโดยใช้แม่เหล็ก (stirrer) ยี่ห้อ MAGNETIC STIRRER รุ่น SM-10

1.1.16 เครื่องวัดค่าสี (Color meter) Konice Minolta รุ่น CR – 400 series

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

1.1.17 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) ยี่ห้อ MERTRO USA รุ่น pH/lon

1.1.18 เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (Penetrometer) ยี่ห้อ FACCHINI – 48011 ALFONSINE

1.1.19 เตาไฟฟ้า (Hot plate) รุ่น 285416373 ยี่ห้อ Schoft

1.1.20 เครื่องเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotory evaporator) ยี่ห้อ Buchi

1.1.21 เครื่องวัดความหวาน (Brix) ยี่ห้อ ATAGO รุ่น MASTER Series

1.2 สารเคมี

1.2.1 เอทานอล

1.2.2 สาร Folin–Ciocalteu

1.2.3 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต

1.2.4 สารละลายมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin)

1.2.5 สารละลาย DPPH radical scavenging

1.2.6 Dimethyl sulfoxide ยี่ห้อ RCI Labsan (AR grade)

1.2.7 ฟีนอฟทาลีน ยี่ห้อ Qrec (AR grade)

1.2.8 โซเดียมไฮดรอกไซด์ ยี่ห้อ Ajix (AR grade)

1.2.9 มอลโตเดกตริน (Food grade)

1.2.10 กรดอะซีติก (AR grade)

1.2.11 แคลเซียมคลอไรด์ (Food grade)

1.3 วัตถุดิบ

1.3.1 กล้วยไข่ พันธุ์กำแพงเพชร

1.3.2 มะนาว พันธุ์แป้นพิจิตร

1.3.3 สารสกัดจากกล้วยไม้เข้มข้น

2. วิธีดำเนินงานวิจัย

การทดลองที่ 1 ศึกษาการเจริญเติบโต การเพิ่มปริมาณและสารออกฤทธิ์กล้วยไม้เหลืองจันทบูรภายใต้เทคโนโลยีแสง LED ที่แตกต่างกัน

การศึกษาการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรภายใต้เทคโนโลยีแสง LED ที่แตกต่างกัน โดยทำการศึกษากล้วยไม้เหลืองจันทบูรอายุประมาณ 1 ปี ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์สีขาว แสงจากหลอด LED โดยมีสัดส่วนระหว่างแสงสีน้ำเงินและแสงสีแดงแตกต่างกัน มีความเข้มแสง 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-2}$ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการทดลอง ทุก ๆ 1 เดือน โดยบันทึกข้อมูลดังนี้ เส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วย, จำนวนใบ, ความสูงของลำลูกกล้วย และเก็บข้อมูลการทดลอง

การทดลองที่ 2 การสกัดสารจากลำต้นกล้วยไม้

นำส่วนลำต้นของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรที่อบแห้งและบดแล้ว มาสกัดด้วยวิธีอัลตราโซนิค (Prommajak et al., 2014) โดยชั่งตัวอย่างบดแห้งแต่ละส่วนของกล้วยไม้ ปริมาณ 5.0 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ เติมตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 60 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปสกัด

ด้วยเครื่องอัลตราโซนิคที่ความถี่ 40 กิโลเฮิรตซ์ (kHz) เป็นเวลา 10 นาที กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) สกัดซ้ำอีก 2 รอบ โดยเติม ตัวทำละลายในปริมาณเท่าเดิมและสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิค นำสารละลายที่สกัดไประเหยจนแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Evaporator) จะได้สารสกัดหยาบของต้นกล้วยไม้ บันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้

การทดลองที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ดัดแปลงตามวิธีของ Chidambara, Jayaprakasha & Singh (2002) นำสารสกัดต้นกล้วยไม้เหลืองจันทบูรณ์ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร และเติมสาร Folin–Ciocalteu ปริมาณ 0.25 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า เก็บไว้ในที่มืดนาน 10 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ในที่มืดเพื่อให้สารทำปฏิกริยาเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยเปรียบเทียบจากสมการกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก บันทึกผลปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ

การทดลองที่ 4 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric โดยใช้เคอร์ซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซิตินความเข้มข้น 0.002 – 0.016 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารสกัดจากลำต้นกล้วยไม้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร และอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$ reagent) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของเคอร์ซิติน บันทึกผลปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเป็นไมโครกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัดหยาบ

มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

การทดลองที่ 5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging ดัดแปลงจากวิธีของ Singhatong, Leelarungrayub & Chaiyasut, (2010) โดยเตรียมตัวอย่างสารสกัดต้นกล้วยไม้เหลืองจันทบูรที่ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารสกัดปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเติมสารละลาย DPPH radical scavenging ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 3.0 มิลลิลิตร พร้อมกับทำหลอดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากันแล้วไปตั้งไว้

ในที่มืดนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีสูตรการคำนวณ ดังนี้

ร้อยละการยับยั้ง = [(A control - A sample) / A control] x 100

โดย A sample = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

A Control = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

นำค่าร้อยละการยับยั้ง ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาสร้างกราฟเพื่อคำนวณหาค่า IC50 เมื่อค่า IC50 คือความเข้มข้นของสารสกัดที่ร้อยละการยับยั้งลดลง ร้อยละ 50

การทดลองที่ 6 การเตรียมสารเคลือบผิวจากสารสกัดกล้วยไม้

1. เตรียมส่วนผสมของสารเคลือบผิว โดยส่วนผสมของสารเคลือบประกอบด้วย มอลโตเดกซ์ตริน 50 กรัม กรดอะซีติกเข้มข้น 0.5% ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และแคลเซียมคลอไรด์ 10 กรัม กวนส่วนผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันได้สารละลายใสไม่มีสี

2. นำสารสกัดจากกล้วยไม้ โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 0.5, 1.0 และ 1.5% ผสมกับสารเคลือบผิวที่เตรียมในข้อ 1 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยกรดอะซีติก 0.5% ปรับให้ได้ปริมาตร 250 มิลิลิตร

การทดลองที่ 7 การเตรียมสิ่งทดลองสำหรับเคลือบผิว

วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองคือ กล้วยไข่ และมะนาว คัดเลือกกล้วยไข่สายพันธุ์กำแพงเพชร จากสวนผลไม้ในจังหวัดจันทบุรี โดยมีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 60 วัน (นับจากแทงปลี) ผลสีเขียวไม่มีตำหนิปราศจากโรคและแมลง ส่วนมะนาวใช้มะนาวแป้นพิจิตรซื้อจากตลาดผลไม้ อำเภอเมืองจันทบุรี คัดเลือกเฉพาะผลที่มีสีเขียวมีความสม่ำเสมอ นำวัตถุดิบจุ่มลงในสารละลายคลอรีนเข้มข้น 50 ppm. แช่ไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อยับยั้งการเกิดเชื้อโรคภายหลังการเก็บเกี่ยว ผึ่งให้แห้ง เพื่อเตรียมสำหรับเคลือบสารสกัดในขั้นตอนต่อไป

การทดลองที่ 8 การเคลือบสารเคลือบผิว

สิ่งทดลองทั้งหมดมี 5 สิ่งทดลอง คือ สิ่งทดลองที่ 1 ไม่ชุบสารเคลือบผิว (ควบคุม) สิ่งทดลองที่ 2 สารเคลือบผิวซึ่งไม่มีส่วนผสมของสารสกัดจากกล้วยไม้ สิ่งทดลองที่ 3 สารเคลือบผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากกล้วยไม้ 0.5 % สิ่งทดลองที่ 4 สารเคลือบผิวมีส่วนผสมของสารสกัดจากกล้วยไม้ 1.0 % และสิ่งทดลองที่ 5 สารเคลือบผิวมีส่วนผสมของสารสกัดจากกล้วยไม้ 1.5 % นำกล้วยไข่และมะนาวที่เตรียมไว้จุ่มลงในสารเคลือบผิวให้ทั่วถึง จากนั้นนำผึ่งให้แห้ง และบรรจุในภาชนะกล่องกระดาษลูกฟูก เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70±5 % เป็นเวลา 7 วัน โดยสุ่มตัวอย่างทุกวัน ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ และนำวิเคราะห์คุณภาพทุกวันเป็นระยะเวลา 7 วัน ดังนี้

1. การสูญเสียน้ำหนัก นำแต่ละสิ่งทดลอง ชั่งน้ำหนักเริ่มต้น และเก็บตัวอย่าง นำออกมาชั่งน้ำหนักทุกวันที่วิเคราะห์ผล แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก ดังนี้

เปอร์เซ็นต์การสูญเสีย =[(น้ำหนักเริ่มต้น - น้ำหนัก ณ วันที่ตรวจผล) ÷ น้ำหนักเริ่มต้น] x 100

2. การเปลี่ยนแปลงสีของเปลือกผลวัดสีผิว โดยใช้เครื่องวัดสี Chroma meter ซึ่งค่าที่ได้แสดงออกมา เป็นค่าความสว่าง (*L**) ค่าสีเขียว (*a**) ค่าสีเหลือง (*b**) 2.2.1 ค่าความสว่างของสี (*L**) เมื่อค่า *L* มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึง ผลิตผลมีผิวคล้ำ ถ้าเข้าใกล้ 100 แสดงว่ามีความสว่าง ค่าความเป็นสีเขียว (*a**) มีค่าอยู่ ระหว่าง -60 ถึง +60 เมื่อมีค่าเป็นลบ แสดงว่า ผลิตผลมีสีเขียว หากเป็นบวก แสดงว่าผลิตผลมีสีแดง ถ้าค่า *a** ต่ำมาก แสดงว่าผลิตผลมีสีเขียว ส่วนค่าสีเหลือง (*b**) มีค่าอยู่ระหว่าง -60 ถึง +60 เมื่อมีค่าเป็นลบ แสดงว่าผลิตผลมีสีน้ำเงิน หากเป็นบวก แสดงว่าผลิตผลมีสีเหลือง หากมีค่าสูงมาก แสดงว่าผลิตผลมีสีเหลือง

3. การวิเคราะห์คุณภาพกายภาพและเคมี

3.1 การวัดความแน่นแข็ง (Texture) โดยนำตัวอย่างวัดความแน่นเนื้อ ด้วยเครื่อง Penetrometer หน่วยเป็น Kg/cm^2

3.2 ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ด้วย pH meter

3.4 ค่าความเป็นกรด (% Total acidity) (AOAC, 2000)

3.5 ค่าความหวาน (% Brix) ด้วย Hand refractometer

3. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) และวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’s Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี