บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

ใบชะมวง จากพื้นที่หมู่บ้านตะปอนน้อย ตำบลตะปอน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี

3.2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 จานเพาะเชื้อแก้ว (Petridish Glass)
3.2.2 กระชอน (Sieve) ขนาด 30 เซนติเมตร
3.2.3 ถาดอบ (Tray)
3.2.4 มีด (Knife)
3.2.5 กรรไกร (Scissors)
3.2.6 ถุงชา (Tea bag)
3.2.7 โถดูดความชื้น (Desiccator)
3.2.8 ถ้วยอะลูมิเนียม (Aluminium Can)
3.2.9 ถ้วยระเหย (Evaporating Dish)
3.2.10 อะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium Foil)
3.2.11 หลอดทดลอง (Test Tube)
3.2.12 คิวเวตต์ (Cuvette)
3.2.13 หลอดหยด (Dropper)
3.2.14 ดินน้ำมัน (Plasticine)
3.2.15 ขวดวัดปริมาตร (Volumetric Flask) ขนาด 10, 25, 50, 100 และ 500 มิลลิลิตร
3.2.16 ช้อนตักสาร (Spatuta)
3.2.17 ที่คีบ (Forcep)
3.2.19 กระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman Filter Paper No. 1)
3.2.20 บีกเกอร์ (Beaker)
3.2.21 แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rot)
3.2.22 กรวยแก้ว (Funnel)
3.2.23 ฟลาสก์ (Flask)
3.2.24 กรวยแยก (Separating Funnel)
3.2.25 ปิเปต (Pipette)
3.2.26 กระบอกตวง (Cylinder)
3.2.27 ไมโครปิเปต (Micro Pipette) ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
3.2.28 ไมโครปิเปต ทิป (Micro Pipette tip) ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
3.2.29 ที่วางหลอดทดลอง (Test Tube Rock)
3.2.30 กระบอกสแตนเลสใส่จานเพาะเชื้อ (Petri Dish Box Stainless)
3.2.31 ขวดสีชา (Amber Bottle)

3.2.32 จุกยางดำแบบเจาะรู 1 รู

3.2.33 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Na_3CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 7

3.2.34 กรดทาร์ทาริก (Tartaric acid, $C_4H_6O_6$) ความเข้มข้นร้อยละ 10

3.2.35 เมทานอล (Methanol, CH_3OH) ความเข้มข้นร้อยละ 95

3.2.36 กรดแกลลิก (Gallic acid, $C_7H_6O_5$)

3.2.37 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

3.2.38 Folin-Ciocalteu reagent

3.2.39 น้ำกลั่น

3.2.40 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) รุ่น Optizen POP ยี่ห้อ Mecasys

3.2.41 เครื่องชั่ง 1 ตำแหน่ง (Balance 2 Digital) รุ่น 6200 D ยี่ห้อ Precisa

3.2.42 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Balance 2 Digital) รุ่น MS 1602S ยี่ห้อ Mettler

3.2.43 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Balance 2 Digital) รุ่น XT 220A ยี่ห้อ Precisa

3.2.44 ตู้อบความร้อนแห้ง (Hot Air Oven) รุ่น UM600 (Memmen)

3.2.45 ตู้อบความร้อนแห้ง (Hot Air Oven) รุ่น ECOCELL 707

3.2.46 เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex Mixer) รุ่น G560E ยี่ห้อ Scientific lndustries

3.2.47 อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Polyscience

3.2.48 อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น SUB Aqna 12 Plus

3.2.49 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ยี่ห้อ HIRAYAMA

3.2.50 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HVE 50 ยี่ห้อ HIRAYAMA

3.2.51 เครื่องปั่น (Blender) รุ่น HR2068 ยี่ห้อ Philips

3.2.52 เตาไฟฟ้า (Hot plate) ยี่ห้อ E.G.O

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 Plate Count Agar (PCA)

3.3.2 Potato Dextrose Agar (PDA)

3.4 วิธีการดำเนินงาน

3.4.1 การเตรียมวัตถุดิบ

คัดเลือกใบชะมวงจากพื้นที่หมู่บ้านตะปอนน้อย ตำบลตะปอน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี เพื่อนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ชาชะมวงเพื่อสุขภาพ โดยลักษณะของใบชะมวงจะต้องไม่อ่อนหรือแก่เกินไป และไม่เป็นรอยโรค จากนั้นนำใบชะมวงที่ได้มาล้างทำความสะอาดแล้วผึ่งให้แห้ง

3.4.2 ผลิตชาใบชะมวง

ผลิตชาใบชะมวงจำนวน 2 สูตร ดังต่อไปนี้

สูตรที่ 1 ดัดแปลงจากวิธีการของ สุนันทา คะเนนอก (2556) แสดงดังภาพที่ 3.1

ใบชะมวงสด

⬇

ตัดขนาดประมาณ 1x1 ตารางเซนติเมตร

⬇

อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (จนกระทั่งน้ำหนักคงที่)

⬇

ปั่นด้วยเครื่องปั่น เป็นเวลา 5 นาที

⬇

บรรจุผงชาปริมาณ 1, 2 และ 3 กรัม ในถุงชาขนาด 3x5 เซนติเมตร

ภาพที่ 3.1 กรรมวิธีในการผลิตชาใบชะมวง สูตรที่ 1

สูตรที่ 2 ดัดแปลงจากวิธีการของ พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง และคณะ (2557) แสดงดังภาพที่ 3.2

ใบชะมวงสดผึ่งไว้ 1 คืน

⬇

ลวกในน้ำร้อนเดือด 30 วินาที

⬇

คั่วเป็นเวลา 4 นาที (เพื่อให้ใบชะมวงมีกลิ่นหอม)

⬇

นวดใบชะมวงประมาณ 10 นาที

⬇

พลิกไปมาที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

⬇

อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (จนกระทั่งน้ำหนักคงที่)

⬇

ปั่นด้วยเครื่องปั่น เป็นเวลา 5 นาที ร่อนด้วยกระซอนขนาด 30 เซนติเมตร

⬇

บรรจุผงชาปริมาณ 1, 2 และ 3 กรัม ในถุงชาขนาด 3x5 เซนติเมตร

ภาพที่ 3.2 กรรมวิธีในการผลิตชาใบชะมวง สูตรที่ 2

3.4.3 วิเคราะห์ปริมาณความชื้นในชา (AOAC, 2000)

อบถ้วยอลูมิเนียมในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 103±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนอย่างละเอียด และชั่งตัวอย่างใส่ถ้วยอลูมิเนียมปริมาณ 3กรัม นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 103±2

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30นาที แล้วนำออกมาใส่โถดูดความชื้น เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ชั่งน้ำหนัก และอบอีกครั้งเป็นเวลา 30นาที หรือจนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละความชื้น ตามสูตร

$$\text{ร้อยละความชื้น} = \frac{(W_1 - W_2)}{W}$$

W = น้ำหนักตัวอย่าง
W_1 = น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและน้ำหนักอลูมิเนียม
W_2 = น้ำหนักตัวอย่างหลังอบและน้ำหนักอลูมิเนียม

3.4.4วิเคราะห์ปริมาณสารสกัดที่สกัดได้ด้วยน้ำร้อนในชา (ดัดแปลงวิธีการของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2558)

ขั้นตอนการทดสอบ

1.อบถ้วยระเหยที่ล้างสะอาดในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 30 นาที แล้วชั่งน้ำหนัก (W_1)

2.ชั่งน้ำหนักตัวอย่างปริมาณ 2 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) (W) ถ่ายใส่ฟลาสก์ปริมาตร 500มิลลิลิตร เติมน้ำร้อนริมาตร 200มิลลิลิตร นำไปตั้งบนอ่างน้ำร้อนต้มให้เดือดแกว่งเบา ๆ เป็นระยะ ปิดปากฟลาสก์ด้วยจุกยางที่มีแท่งแก้วยาว 75 เซนติเมตร เพื่อให้เกิดการกลั่นตัวของไอน้ำต้มช้า ๆ ให้ไอน้ำกลั่นตัวทั้งหมด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยกรระดาษกรองเบอร์ 1

3.ตวงสารที่กรองได้ 50 มิลลิลิตร ใส่ในถ้วยระเหยที่อบแล้วและทราบค่าน้ำหนักที่แน่นอน นำไประเหยบนอ่างน้ำร้อนเดือดจนแห้ง

4.อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 30 นาที แล้วชั่งน้ำหนัก (W_2) คำนวณปริมาณสารสกัดที่สกัดได้ด้วยน้ำร้อนในชา ตามสูตร

$$\text{สารสกัดได้ด้วยน้ำร้อน (ร้อยละโดยน้ำหนักชาแห้ง)} = \frac{(W_1-W_2) \times 10^4 \times 500}{[W \times (100-(\text{ร้อยละความชื้น})) \times 50]}$$

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)
W_1 = น้ำหนักถ้วย (กรัม)
W_2 = น้ำหนักถ้วยพร้อมสารที่สกัดได้ด้วยน้ำร้อน (กรัม) และร้อยละความชื้น

3.4.5 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu
(ดัดแปลงวิธีการของ ชมพูนุท สินธุพิบูลยกิจ และคณะ, 2557)

วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดย Folin-Ciocalteu ในผลิตภัณฑ์ชาชะมวง โดยนำน้ำชาใบชะมวง ปริมาตร 200ไมโครลิตร ผสมน้ำกลั่นปริมาตร 2.6มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteuปริมาตร 200ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6นาที

จากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7 น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 2มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90นาที เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid)

3.4.6 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2 Diphynyl-1-picryl hydrazyl) assay (ดัดแปลงวิธีการของ ประนอม สุขเกื้อ, 2556)

1. เตรียมสารละลาย 0.2 มิลลิโมลาร์ DPPH

ชั่ง DPPH(MW=394.33)หนัก 0.0039กรัม ใส่บีกเกอร์ละลายในเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95แล้วปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. ตรวจสอบการต้าน DPPH ของชาใบชะมวง

นำน้ำชงชาใบชะมวง 2 มิลลิลิตร เติม 0.2มิลลิโมลาร์DPPHในเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95ที่เตรียมไว้ในข้อ1.ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาในที่มืด30นาที และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ส่วนชุดควบคุมใช้เมทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงชุดควบคุมและตัวอย่าง มาคำนวณร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของชาใบชะมวง ตามสูตร

$$\text{ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH} = \left(\frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}}\right) \times 100$$

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

3.4.7 ตรวจสอบอายุการเก็บรักษาชาใบชะมวง (AOAC, 2000)

นำผลิตภัณฑ์ชาใบชะมวงที่ได้มาศึกษาอายุการเก็บรักษา เป็นเวลา 6 เดือน โดยเก็บตัวอย่างทุก 2 เดือน มาทำการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์ และรา โดยวิธี Total Count Plate ดังต่อไปนี้

3.4.7.1 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

1. ชั่งผงชาใบชะมวง 10 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก (Polyethylene : PE) ภายใต้สภาวะที่ปลอดเชื้อ

2.เติมสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ปรับปริมาตร 90 มิลลิลิตร

3.นำถุงพลาสติกที่บรรจุตัวอย่างและสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1เข้าเครื่องตีป่นอาหาร (Stomacher) ตีป่นเป็นเวลา 2 นาที ตัวอย่างจะระดับเจือจางเท่ากับ 1:10 หรือ 10^{-1}

4.นำตัวอย่างที่ผ่านการตีป่นมาเจือจางด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1 ในหลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร โดยทำการเจือจางที่ 10^{-1} ถึง 10^{-4}

5. ตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธี Pour plate โดยใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร จากแต่ละระดับการเจือจาง ระดับเจือจางละ 3 ซ้ำ เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar เททับจุลินทรีย์ หมุนจานเลี้ยงเชื้อเบา ๆ ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว

6.บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±3 ชั่วโมง โดยคว่ำจานเพาะเชื้อ เมื่อครบระยะเวลาการบ่มตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยเลือกนับเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี รายงานผลจำนวนเชื้อเป็น log CFU/กรัม

การคำนวณ

$$\text{จำนวนเชื้อ/ มิลลิลิตร ของตัวอย่าง} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่นับได้ x dilution factor}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่นำมา pour plate}}$$

dilution factor คือ อัตราส่วนการเจือจาง เป็นค่าส่วนกลับของ dilution เช่น dilution 10^{-4} มีค่า dilution factor เป็น 10^{4}

3.4.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และราทั้งหมด

1. ชั่งผงชาใบชะมวง 10 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก (Polyethylene : PE) ภายใต้สภาวะที่ปลอดเชื้อ

2. เติมสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ปรับปริมาตร 90 มิลลิลิตร

3.นำถุงพลาสติกที่บรรจุตัวอย่างและสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 เข้าเครื่องตีป่นอาหาร (Stomacher) ตีป่นเป็นเวลา 2 นาที ตัวอย่างจะระดับเจือจางเท่ากับ 1:10 หรือ 10^{-1}

4.นำตัวอย่างที่ผ่านการตีป่นมาเจือจางด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1 ในหลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร โดยทำการเจือจางที่ 10^{-1} ถึง 10^{-4}

5.ตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธี Pour plate โดยใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างมา 1มิลลิลิตร จากแต่ละระดับการเจือจาง ระดับเจือจางละ 3 ซ้ำ เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextroseagar ที่เติมกรดทาร์ทาริกความเข้มข้นร้อยละ 10ในปริมาณ 1.9มิลลิลิตร ต่อ PDA 100 มิลลิลิตร เพื่อเป็นการปรับ pH ของ PDA ให้เหมาะสมกับเชื้อราและยีสต์ และหมุนจานเลี้ยงเชื้อเบา ๆ ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว

6.บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72±3 ชั่วโมง โดยคว่ำจานเพาะเชื้อ เมื่อครบระยะเวลาการบ่มตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยเลือกนับเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี รายงานผลจำนวนเชื้อเป็น log CFU/กรัม

การคำนวณ

$$\text{จำนวนเชื้อ/ มิลลิลิตร ของตัวอย่าง} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่นับได้ x dilution factor}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่นำมา pour plate}}$$

dilution factor คือ อัตราส่วนการเจือจาง เป็นค่าส่วนกลับของ dilution เช่น dilution 10^{-4} มีค่า dilution factor เป็น 10^{4}

3.4.8 การทดสอบคุณสมบัติทางด้านประสาทสัมผัส (ดัดแปลงวิธีการของสุนันทา คะเนนอก, 2556)

ทดสอบคุณสมบัติทางด้านประสาทสัมผัสโดยศึกษาความชอบโดยรวมของผู้บริโภคด้วยการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้านสี กลิ่น รส และความชอบโดยรวมของผลิตภัณฑ์ชาชะมวงทั้ง 2 สูตร ที่บรรจุซองในปริมาณแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ1, 2 และ3 กรัม โดยใช้ผู้ชิมจำนวนไม่น้อยกว่า50คน ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 5-PointHedonicScale โดยใช้คะแนนความชอบ 5 ระดับ ตั้งแต่ 1-5 ดังต่อไปนี้

1 หมายถึง ไม่ชอบมาก
2 หมายถึง ไม่ชอบ
3 หมายถึง ชอบปานกลาง
4 หมายถึง ชอบ
5 หมายถึง ชอบมาก

3.4.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorialexperiment) ปัจจัยที่ศึกษา คือ สูตรผลิตชาชะมวง จำนวน 2 สูตร ที่มีผลต่อปริมาณปริมาณความชื้น ปริมาณสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำร้อน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ได้ทั้งหมด 2x4 x 3 = 24 ทรีทเมนต์ และการประเมินทางด้านประสาทสัมผัส โดยวิเคราะห์ปริมาณผงชา 3 ระดับ คือ 1, 2 และ 3 กรัม ที่มีผลต่อการทดสอบด้านสี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม ได้ทั้งหมด 3x4 = 12 ทรีทเมนต์ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance (ANOVA)และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan’snew multiple rang test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม SPSS (Trial Version)