

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาผลของอุณหภูมิระหว่างการเก็บรักษาต่อปริมาณแคโรทีนอยด์และกิจกรรมของสารอนุมูลอิสระในมะละกอพันธุ์แขกดำ แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ผลของอุณหภูมิระหว่างการเก็บรักษาต่อปริมาณแคโรทีนอยด์และกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระในมะละกอพันธุ์แขกดำทั้งผล (whole fruit)

โดยนำผลมะละกอรยะผลสีเขียวมีแต้มเหลืองที่ผิวผลเริ่มปรากฏแต้มสีเหลืองบริเวณท้ายผล มาล้างทำความสะอาด ผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นนำมะละกามาเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิต่ำ บันทึกผลทุก 3 วัน เป็นระยะเวลา 12 วัน โดยแบ่งออกเป็น 3 หน่วยทดลอง คือ

1. เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 2 องศาเซลเซียส)
2. เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (12 ± 2 องศาเซลเซียส)
3. เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 ± 2 องศาเซลเซียส)

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomize Design (CRD) โดยแต่ละหน่วยทดลองมี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 6 ผล ทำการบันทึกผลดังนี้

1. สีผิวผล และสีเนื้อ ในระบบ CIE L a b color space โดยค่า L* คือค่าความสว่าง มีค่าเท่ากับ 0 คือสีดำ และ เท่ากับ 100 คือสีขาว ค่า a* โดยถ้าค่า a* เป็นบวก (+) คือสีแดง ค่า a* เป็นลบ (-) คือสีเขียว และค่า b* โดยถ้าค่า b* เป็นบวก (+) คือสีเหลือง ค่า b* เป็นลบ (-) คือสีน้ำเงิน

2. การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักผล (กรัม)
3. ความแน่นเนื้อ (นิวตัน)
4. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solid; TSS)
5. ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (titratable acidity; TA)
6. อายุการเก็บรักษา (วัน)
7. ปริมาณของแคโรทีนอยด์
8. กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ

การทดลองที่ 2 ผลของอุณหภูมิระหว่างการเก็บรักษาต่อปริมาณแคโรทีนอยด์และกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระในมะละกอพันธุ์แขกดำตัดแต่งพร้อมบริโภค (fresh-cut)

โดยนำผลมะละกอรยะผลสีเขียวมีแต้มเหลืองที่ผิวผลเริ่มปรากฏแต้มสีเหลืองบริเวณท้ายผล มาล้างทำความสะอาด ผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นนำมะละกอตัดแต่งเป็นชิ้นพร้อมบริโภค นำมา

บรรจุในถาดโพนห่อด้วยฟิล์มพลาสติกและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิต่ำ บันทึกผลทุก 3 วัน เป็นระยะเวลา 12 วัน โดยแบ่งออกเป็น 3 หน่วยทดลอง คือ

1. เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 2 องศาเซลเซียส)
2. เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (12 ± 2 องศาเซลเซียส)
3. เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 ± 2 องศาเซลเซียส)

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomize Design (CRD) โดยแต่ละหน่วยทดลองมี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 6 ผล ทำการบันทึกผลเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การศึกษาข้อมูล

1. การวัดสีเปลือก และสีเนื้อ ในระบบ CIE L a b color space โดยค่า L^* คือค่าความสว่าง มีค่าเข้าใกล้ 0 คือสีดำ และเข้าใกล้ 100 คือสีขาว ค่า a^* โดยถ้าค่า a^* เป็นบวก (+) คือสีแดง ค่า a^* เป็นลบ (-) คือสีเขียว และค่า b^* โดยถ้าค่า b^* เป็นบวก (+) คือสีเหลือง ค่า b^* เป็นลบ (-) คือสีน้ำเงิน โดยใช้เครื่องวัดสี Color Flex โดยวัดค่าสีเปลือกทุกวัน และวัดค่าสีเนื้อทุก 3 วัน

2. การเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก โดยชั่งผลมะละกอด้วยตาชั่งน้ำหนัก และบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักทุกวัน ตลอดอายุการเก็บรักษา จากนั้นจึงนำค่าการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักที่ได้มาหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{การสูญเสียน้ำหนัก (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักก่อนการทดลอง} - \text{น้ำหนักหลังการทดลอง})}{\text{น้ำหนักก่อนการทดลอง}} \times 100$$

3. ความแน่นเนื้อ ทำการบันทึกผลของค่าความแน่นเนื้อ โดยใช้เครื่องวัดความแน่นเนื้อ penetrometer ใช้หัวกดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร โดยใช้ตัวอย่างของมะละกอกที่ผ่าแบ่งเป็น 2 ซีกตามยาว แล้วหั่นเป็นชิ้น ซีกละ 5 ชิ้น ใช้เครื่องวัดความแน่นเนื้อกดลงไปบริเวณเนื้อมะละกอประมาณ 1 เซนติเมตร บันทึกผล โดยมีหน่วยเป็นนิวตัน

4. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ โดยการนำตัวอย่างของมะละกอประมาณ 50 กรัม มาคั้นน้ำ จากนั้นนำน้ำคั้นของมะละกอหยดลงบน Hand refractrometer จำนวน 1 หยด อ่านค่าที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์บริกซ์

5. ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ โดยการนำน้ำคั้นของมะละกอประมาณ 5 มิลลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนครบ 20 มิลลิตร แล้วหยด ฟีนอล์ฟทาเลิน (phenolphthalein) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 3 หยด แล้วนำมาไทเทรตด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ที่เตรียมไว้ปริมาตรขนาด 25 มิลลิตรไว้ หยดโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ลงในน้ำคั้น สังเกตจุดสีของน้ำ

คั้นที่เปลี่ยนไปเป็นสีชมพูอ่อนๆ แล้วทิ้งไว้ประมาณ 30 วินาที จนสีของน้ำคั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลง จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (\%)} = \frac{(N \text{ base} \times \text{ml base} \times \text{meq.wt.}) \times 100}{\text{ml ของน้ำคั้น}}$$

N base	= normality ของ NaOH (0.1 นอร์มอล)
ml base	= จำนวนมิลลิลิตรของ NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต
meq.wt. ของ malic acid	= 0.067
ml ของน้ำคั้น	= จำนวนมิลลิลิตรของน้ำคั้นที่ใช้ในการไทเทรต

6. ปริมาณแคโรทีนอยด์ คัดแปลงจากวิธีการของ Dere *et al.* (1998) ทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างมะละกามา 1 กรัม สกัดด้วย methanol ความเข้มข้น 96 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 1 กรัม จากนั้นนำมาบดด้วยโกร่งเป็นเวลา 5 นาที เสร็จแล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 666, 653 และ 470 nm จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์ โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{กลอโรฟิลล์ เอ} = 15.65 A_{666} - 7.340 A_{653}$$

$$\text{กลอโรฟิลล์ บี} = 27.05 A_{653} - 11.21 A_{666}$$

$$\text{แคโรทีนอยด์ทั้งหมด} = (1000 A_{470} - (2.860 \text{ กลอโรฟิลล์ เอ} - 129.2 \text{ กลอโรฟิลล์ บี}))/245$$

7. การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH คัดแปลงจากวิธีการของ Torun *et al.* (2013) ดังนี้

- เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ

วิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ในตัวอย่างมะละกอดังนี้

เตรียมสารสกัดจากตัวอย่างมะละกามา 3 กรัม ตวงใส่บีกเกอร์ เติมน้ำกลอสอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บดละเอียด จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman # 1 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

เตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลาย DPPH จากความเข้มข้นเริ่มต้น 0.8 มิลลิโมลาร์ โดยให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01 ถึง 0.08 มิลลิโมลาร์ ด้วยการเติมน้ำกลอสอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรในแต่ละหลอดให้เป็น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำผลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลาย DPPH (มิลลิโมลาร์)

ปิเปตสารสกัดตัวอย่างของมะละกอ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 5.4 มิลลิลิตร ด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที และเตรียมปฏิกิริยาควบคุม (control) โดยใช้แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แทนตัวอย่างสารสกัด นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้สมการดังต่อไปนี้

เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH = $[1 - (A - A_b) / A_0] \times 100$

โดยที่ $A = A_{517}$ ของตัวอย่างสารสกัดและสารละลาย DPPH

$A_b = A_{517}$ ของสารละลาย DPPH

$A_0 = A_{517}$ ของตัวอย่างสารสกัด

- กิจกรรมการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant activity)

จากการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การทำลายสารอนุมูลอิสระ DPPH ทำการบันทึกค่าความเข้มข้นของปริมาณตัวอย่างที่ทำให้ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระมีค่าเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ (ค่า EC_{50}) มาคำนวณค่า $1/EC_{50}$ โดยใช้สมการเส้นตรง จากการเขียนกราฟระหว่างปริมาตรตัวอย่างสารสกัด (แกน x) และเปอร์เซ็นต์การทำลายสารอนุมูลอิสระ DPPH (แกน y) ซึ่งค่า $1/EC_{50}$ จะใช้ในการประเมินศักยภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ กล่าวคือหากตัวอย่างหรือทรีตเมนต์ใดที่มีค่า $1/EC_{50}$ สูง แสดงว่ามีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าทรีตเมนต์ที่มีค่า $1/EC_{50}$ ต่ำ

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์