

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พันธุ์พืช

ผลกล้วยเล็บมือนาง *Musa* (AA Group) 'Kluai Leb Mu Nang' จากจังหวัดชุมพร ขนส่งถึงห้องปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยว สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาการพัฒนารสของกล้วยเล็บมือนาง

กล้วยเล็บมือนางอายุการเก็บเกี่ยวหลังการปลีแต่ละหวีเปิดเต็มที่ 55 60 และ 65 วัน โดยใช้หวีที่ 2 – 3 นับจากหวีบนเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและบันทึกผลดังนี้

1) ความแน่นเนื้อ

โดยใช้เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (Hardness tester) ขนาด 1 กิโลกรัม หัววัดรูปทรงกระบอก รายงานค่าเป็นนิวตัน

2) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

โดยใช้เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Digital refractometer) รุ่น PAL-1 บริษัท ATAGO อ่านค่าได้ 0 – 45 เปอร์เซ็นต์

3) ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้

นำเนื้อกล้วยเล็บมือนาง 5 กรัมผสมด้วยน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันด้วย Homogenizer นำสารละลายที่ได้ 5 มิลลิลิตรไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N จนถึงจุดยุติ (end point) แล้วคำนวณปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ในรูปของกรดซิตริกเป็นเปอร์เซ็นต์ตามสูตรดังนี้

$$\%TA = (N \text{ NaOH}) (ml \text{ NaOH}) (meq.wt.citric \text{ acid}) \times 100 / g \text{ of banana}$$

4) การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

ทำการทดลองวิธีการ 2,4- dinitrophenyl hydrazine method โดยการประยุกต์และดัดแปลงจากการศึกษาตามวิธีการทดลองของ (Roe, 1948) ซึ่งมีวิธีดังนี้

ตัวอย่างกล้วย 5 กรัม Homogenizer ผสมด้วย Metaphosphoric acid (HPO_3) ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำไป Centrifuge นำส่วนสารละลายใสที่ได้มา 0.4 มิลลิลิตรเติมสารละลาย 20 mg/100 ml Metaphosphoric acid (HPO_3) indolphenol 0.2 มิลลิลิตร Vortex ให้เข้ากัน 2-3 นาที แล้วเติม 2% Thiourea 0.4 มิลลิลิตรและ 2% 2,4- dinitrophenyl hydrazine (DNP) บ่มในอ่างน้ำร้อน 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เติม 85% Sulfuric acid 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรและสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Ascorbic acid เทียบมาตรฐานความเข้มข้น

5) การศึกษาค่าสี

วัดสีเปลือกและสีเนื้อกล้วยเล็บมือนางโดยใช้เครื่องวัดสี Chromameter รุ่น CR-400 ของบริษัท Minolta ประเทศญี่ปุ่น ค่าสีในการทดลองรายงานผลเป็นค่า L^* , a^* และ b^* ค่าสี L^* คือ ค่าแสดงความสว่างของสี มีค่าอยู่ในช่วง 0 ถึง 100 กรณี L^* มีค่าเป็น 0 หมายถึงมีสีดำ (darkness) แต่ถ้ามีค่าเป็น 100 หมายถึงมีสีขาว (lightness) ค่าสี a^* คือความเป็นสีแดงและเขียว (redness/greenness) กรณี a^* มีค่าเป็นบวก หมายถึงมีสีแดง และกรณี a^* มีค่าเป็นลบ หมายถึงมีสีเขียว ค่าสี b^* คือความเป็นสีเหลืองและน้ำเงิน (yellowness/blueness) กรณี b^* มีค่าเป็นบวก หมายถึงมีสีเหลือง และกรณี b^* มีค่าเป็นลบ หมายถึงมีสีน้ำเงิน (Wang et al., 2006)

6) การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

วิเคราะห์คุณภาพการรับประทานโดยความชอบจากผู้ประเมินจำนวน 10 คนมีค่าระดับคะแนนความชอบ 5 ระดับคะแนน

1=ไม่ชอบ

2=ชอบเล็กน้อย

3=ค่อนข้างชอบ

4=ชอบมาก

5=ชอบมากที่สุด

7) ระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงจากผลดิบถึงผลสุก โดยนับเวลาหลังทำการทดลองจนถึงระยะกล้วยเล็บมือนางเปลี่ยนแปลงสีผิวจากสีเขียว เป็นสีเหลืองสุกทั้งผลเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค

และ พร้อมที่จะบริโภค

8) ระยะเวลาหลังสุกถึงเสื่อมสภาพ

9) อื่น ๆ

3.2.2 การทดลองที่ 2 ศึกษากระบวนการพัฒนาและส่วนของผลกล้วยเล็บมือนางต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

เลือกอายุการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 ระยะการพัฒนาของกล้วย (ดิบ สุก และสุกงอม) วางแผนการทดลองแบบ Completely random design (CRD) โดยบันทึกผลการทดลองดังนี้

1) การศึกษาค่าสี

วัดสีเปลือกและสีเนื้อกล้วยเล็บมือนางโดยใช้เครื่องวัดสี Chromameter รุ่น CR-400 ของบริษัท Minolta ประเทศญี่ปุ่น ค่าสีในการทดลองรายงานผลเป็นค่า L^* , a^* และ b^* ค่าสี L^* คือ ค่าแสดงความสว่างของสี มีค่าอยู่ในช่วง 0 ถึง 100 กรณี L^* มีค่าเป็น 0 หมายถึงมีสีดำ (darkness) แต่ถ้ามีค่าเป็น 100 หมายถึงมีสีขาว (lightness) ค่าสี a^* คือความเป็นสีแดงและเขียว (redness/greenness) กรณี a^* มีค่าเป็นบวก หมายถึงมีสีแดง และกรณี a^* มีค่าเป็นลบ หมายถึงมีสีเขียว ค่าสี b^* คือความเป็น

สีเหลืองและน้ำเงิน (yellowness/blueness) กรณี b^* มีค่าเป็นบวก หมายถึงมีสีเหลือง และกรณี b^* มีค่าเป็นลบ หมายถึงมีสีน้ำเงิน (Wang et al., 2006)

2) การวิเคราะห์หาปริมาณ Total phenolic compound content (TPC)

การสกัดสารจากกล้วยน้ำว้าโดยใช้ กล้วยน้ำว้า 5 กรัม ผสมกับ น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากันด้วย Homogenizer นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง Centrifuge จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำการทดลองดังนี้

สารสกัดจากกล้วยน้ำว้า 1 มิลลิลิตรผสมกับสาร Folin-ciocalteu reagent 10% 1 มิลลิลิตร vortex ให้เข้ากันรอ 30 นาทีเติม NaCO_3 7.5 % 2 มิลลิลิตร Vortex ให้เข้ากันวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (Supapvanich et al., 2012)

จากนั้นเตรียมสาร Gallic acid ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นเดียวกันเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Gallic acid (Slinkard et al., 1997; Supapvanich et al., 2012)

3) การวิเคราะห์หาปริมาณ Total flavonoid content (TFC)

การสกัดสารจากกล้วยน้ำว้าโดยใช้ Methanol เป็นตัวทำละลาย โดยใช้ กล้วยน้ำว้า 5 กรัม ผสม กับ Methanol 25 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากันด้วย homogenizer จากนั้นนำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง Centrifuge นำสารสกัดที่ได้มาทำการทดลองดังนี้

ปิเปตสารสกัดจากกล้วยน้ำว้า 0.25 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร เติม 0.75 มิลลิลิตร NaNO_2 ความเข้มข้น 0.5 % ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 5 นาที เติม 0.15 มิลลิลิตร AlCl_3 ความเข้มข้น 10% จากนั้นเติม 0.5 มิลลิลิตร NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ Vortex ให้เข้ากันจากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร (Slinkard et al., 1997; Supapvanich et al., 2012)

จากนั้นเตรียมสาร Catechin ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ให้มีความเข้มข้น 10-100 ppm นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นเดียวกันเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Catechin (Slinkard et al., 1997; Supapvanich et al., 2012)

4) วิธี DPPH scavenging assay

การสกัดสารจากกล้วยน้ำว้าโดยใช้ Methanol เป็นตัวทำละลาย โดยใช้ กล้วยน้ำว้า 5 กรัม ผสม กับ Methanol 50 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากันด้วย homogenizer จากนั้นนำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง Centrifuge นำสารสกัดที่ได้มาทำการทดลอง ดังนี้

สารสกัดจากกล้วยน้ำว้า 5 มิลลิลิตรผสมกับ 1 มิลลิโมลาร์ DPPH solution ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex แล้วนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น

517 นาโนเมตร ได้ค่า A_0 จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง visible spectrophotometer ได้ค่า A_{30} แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง DPPH ตามสูตร (Supapvanich et al., 2012)

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [(A_0 - A_{30}) / A_0] \times 100$$

A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 0 นาที

A_{30} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 30 นาที

5)วิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

การสกัดสารจากกล้วยน้ำว้าโดยใช้ Methanol เป็นตัวทำละลาย โดยใช้ กล้วยน้ำว้า 5 กรัม ผสม กับ Methanol 25 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากันด้วย homogenizer จากนั้นนำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง Centrifuge นำสารสกัดที่ได้มาทำการทดลองดังนี้

FRAP reagent มาใช้ให้ผสมสาร Stock A B C เข้าด้วยกันในอัตราส่วน A:B:C 10:1:1 พร้อมเติมสารสกัดจากกล้วย 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีพร้อมกับเขย่า แล้วนำไปบ่มด้วย เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร จากนั้นเตรียมสาร Trolox ให้มีความเข้มข้น 25 50 100 300 500 และ 800 ไมโครลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 630 nm (Benzie and Strain, 1996 ; Supapvanich et al., 2012)

6) อื่น ๆ

3.2.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระต่ออายุการเก็บรักษากลับ เล็บมือนาง

กล้วยเล็บมือนางหลังจากสุกแล้ว เฉพาะหวีที่ 2 – 4 นับจากหวีบ่น เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบ Completely random design (CRD) โดยบันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2

1) การศึกษาค่าสี

วัดสีเปลือกและสีเนื้อกล้วยเล็บมือนางโดยการใช้เครื่องวัดสี Chromameter รุ่น CR-400 ของบริษัท Minolta ประเทศญี่ปุ่น ค่าสีในการทดลองรายงานผลเป็นค่า L^* a^* และ b^* ค่าสี L^* คือ ค่าแสดงความสว่างของสี มีค่าอยู่ในช่วง 0 ถึง 100 กรณี L^* มีค่าเป็น 0 หมายถึงมีสีดำ (darkness) แต่ถ้ามีค่าเป็น 100 หมายถึงมีสีขาว (lightness) ค่าสี a^* คือความเป็นสีแดงและเขียว (redness/greenness) กรณี a^* มีค่าเป็นบวก หมายถึงมีสีแดง และกรณี a^* มีค่าเป็นลบ หมายถึงมีสีเขียว ค่าสี b^* คือความเป็นสีเหลืองและน้ำเงิน (yellowness/blueness) กรณี b^* มีค่าเป็นบวก หมายถึงมีสีเหลือง และกรณี b^* มีค่าเป็นลบ หมายถึงมีสีน้ำเงิน (Wang et al.,2006)

2) การวิเคราะห์หาปริมาณ Total phenolic compound content (TPC)

การสกัดสารจากกล้วยน้ำว้าโดยใช้ กล้วยน้ำว้า 5 กรัม ผสมกับ น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากันด้วย Homogenizer นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง Centrifuge จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำการทดลองดังนี้

สารสกัดจากกล้วยน้ำว้า 1 มิลลิลิตรผสมกับสาร Folin-ciocalteu reagent 10% 1 มิลลิลิตร vortex ให้เข้ากันรอ 30 นาทีเติม NaCO_3 7.5 % 2 มิลลิลิตร Vortex ให้เข้ากันวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (Supapvanich et al., 2012)

จากนั้นเตรียมสาร Gallic acid ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นเดียวกันเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Gallic acid (Slinkard et al., 1997; Supapvanich et al., 2012)

3) การวิเคราะห์หาปริมาณ Total flavonoid content (TFC)

การสกัดสารจากกล้วยน้ำว้าโดยใช้ Methanol เป็นตัวทำละลาย โดยใช้ กล้วยน้ำว้า 5 กรัม ผสม กับ Methanol 25 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากันด้วย homogenizer จากนั้นนำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง Centrifuge นำสารสกัดที่ได้มาทำการทดลองดังนี้

ปิเปตสารสกัดจากกล้วยน้ำว้า 0.25 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร เติม 0.75 มิลลิลิตร NaNO_2 ความเข้มข้น 0.5 % ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 5 นาที เติม 0.15 มิลลิลิตร AlCl_3 ความเข้มข้น 10% จากนั้นเติม 0.5 มิลลิลิตร NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ Vortex ให้เข้ากันจากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร (Slinkard et al., 1997; Supapvanich et al., 2012)

จากนั้นเตรียมสาร Catechin ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ให้มีความเข้มข้น 10-100 ppm นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นเดียวกันเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Catechin (Slinkard et al., 1997; Supapvanich et al., 2012)

4) วิธี DPPH scavenging assay

การสกัดสารจากกล้วยน้ำว้าโดยใช้ Methanol เป็นตัวทำละลาย โดยใช้ กล้วยน้ำว้า 5 กรัม ผสม กับ Methanol 50 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากันด้วย homogenizer จากนั้นนำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง Centrifuge นำสารสกัดที่ได้มาทำการทดลอง ดังนี้

สารสกัดจากกล้วยน้ำว้า 5 มิลลิลิตรผสมกับ 1 มิลลิโมลาร์ DPPH solution ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex แล้วนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ได้ค่า A_0 จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง visible spectrophotometer ได้ค่า A_{30} แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง DPPH ตามสูตร

(Supapvanich et al., 2012)

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [(A_0 - A_{30}) / A_0] \times 100$$

A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 0 นาที

A_{30} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 30 นาที

5) วิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

การสกัดสารจากกล้วยน้ำว้าโดยใช้ Methanol เป็นตัวทำละลาย โดยใช้ กล้วยน้ำว้า 5 กรัม ผสม กับ Methanol 25 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากันด้วย homogenizer จากนั้นนำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง Centrifuge นำสารสกัดที่ได้มาทำการทดลองดังนี้

FRAP reagent มาใช้ให้ผสมสาร Stock A B C เข้าด้วยกันในอัตราส่วน A:B:C 10:1:1 พร้อมเติมสารสกัดจากกล้วย 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีพร้อมกับเขย่า แล้วนำไปบ่มด้วย เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร จากนั้นเตรียมสาร Trolox ให้มีความเข้มข้น 25 50 100 300 500 และ 800 ไมโครลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 630 nm (Benzie and Strain, 1996 ; Supapvanich et al., 2012)

5) อายุการเก็บรักษา

6) อื่น ๆ