บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้ง

เก็บตัวอย่างน้ำผึ้งชันโรงในช่วงเดือนมีนาคม ถึง เดือนเมษายน พ.ศ. 2561 (ฤดูร้อน) และช่วงเดือนพฤศจิกายน ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2561 (ฤดูหนาว) จากแหล่งอาหารต่าง ๆ ในจังหวัดจันทบุรี ประกอบด้วย ป่าชายเลนของเกษตรกร ตำบลเกาะขวาง อำเภอเมืองและตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ สวนมะพร้าวของเกษตรกร ตำบลบางสระเก้า อำเภอแหลมสิงห์ และ สวนผลไม้ของเกษตรกรจากตำบลวังแซ้ม อำเภอมะขาม และตำบลรำพัน อำเภอท่าใหม่ ซึ่งปลูกทุเรียนเป็นหลัก นำตัวอย่างน้ำผึ้งที่ได้กรองเศษฝุ่นและแมลงออก และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3.2 การศึกษาลักษณะบางประการของน้ำผึ้งชันโรงจากแหล่งต่างๆ

นำตัวอย่างน้ำผึ้งชันโรงมาวิเคราะห์ลักษณะสี ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความหวานและปริมาณความชื้น โดยอ้างอิงจากมาตรฐานสินค้าเกษตร น้ำผึ้ง มกษ. 8003-2556 ดังนี้

3.2.1 การวิเคราะห์ค่าความชื้น ตามวิธีมาตรฐาน AOAC, 2000

3.2.2 การวิเคราะห์ค่าความหวาน นำตัวอย่างน้ำผึ้งมาเจือจางและวัดปริมาณความหวานด้วยเครื่อง Hand refactometer

3.2.3 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง ตัวอย่างน้ำผึ้งชันโรงมาเจือจางแล้ววัดด้วยเครื่อง pH meter

3.3 วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ดัดแปลงจากวิธีของ Chidambara, et al (2002) เตรียมน้ำผึ้งให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำน้ำผึ้งที่เตรียมได้ปริมาณ 0.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocateu reagent 0.25 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 7 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของน้ำผึ้งไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในรูปมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำผึ้ง

3.4 การทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งชันโรง

ทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และวิธี ABTS radical scavenging assay ในตัวอย่างน้ำผึ้งชันโรงจากแหล่งต่าง ๆ

3.4.1 วิธี DPPH radical scavenging

ทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging ดัดแปลงจากวิธีของ Singhatong, et al. (2010) โดยปิเปตตัวอย่างน้ำผึ้งชันโรงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้กรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นสารมาตรฐานและสร้างกราฟมาตรฐาน คำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นร้อยละของการยับยั้ง ตามสมการที่ [1] ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระรายงานผลเป็นค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = [(A0-As)/A0] \times 100 \qquad [1]$$

โดย A0 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุม และ As = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

3.4.2 วิธี ABTS radical scavenging assay

ทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay ดัดแปลงจากวิธีของ Re, et al. (1999) เตรียมสารละลาย ABTS โดยผสม ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต อัตราส่วน 1:0.5 ทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ เจือจางสารละลาย ABTS ด้วยเอทานอล ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7-0.9 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ปิเปตตัวอย่างน้ำผึ้งชันโรงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้แอสคอร์บิกความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นสารมาตรฐานและสร้างกราฟมาตรฐาน คำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นร้อยละของการยับยั้ง ตามสมการที่ [2] ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระรายงานผลเป็นค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = [(A0-As)/A0] \times 100 \qquad [2]$$

โดย A0 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุม และ As = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

3.5 การทดสอบคุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของน้ำผึ้งชันโรง

การทดสอบคุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของน้ำผึ้งต้องมีการเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้ง แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ และการทดสอบ ดังนี้

3.5.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้ง

ทำการเจือจางน้ำผึ้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 20 40 60 80 และ100 เปอร์เซ็นต์ (undiluted) โดยปริมาตร ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน

3.5.2 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Salmonell*a Typhimurium ATCC 13311 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เตรียมโดยการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Muller Hinton Broth (MHB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน 0.5 McFarland standard มีปริมาณหัวเชื้อเท่ากับ $1X10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียต่อไป

3.5.3 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำผึ้งชันโรงต่อการยับยั้งแบคทีเรีย

ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำผึ้งต่อการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion โดยใช้ไม้พันสำลีฆ่าเชื้อจุ่มในสารละลายแบคทีเรียที่อยู่ใน MHB ป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Muller Hinton Agar (MHA) ที่มีปริมาตรอาหารเท่า ๆ กันทุกจานอาหารที่ทดสอบ ทิ้งให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ปิเปตน้ำผึ้งชันโรงทุกความเข้มข้นที่ทดสอบใส่ในแผ่นดิสก์ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ลงบนแผ่นดิสก์ละ 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวางบนจานอาหาร MHA ที่มีแบคทีเรียทดสอบ โดยมีชุดควบคุมผลบวกเป็นน้ำผึ้งชันโรง ชุดควบคุมผลลบ คือน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ บ่มจานอาหารที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) หน่วยเป็นมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.6 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลองแต่ละการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้ Duncan’s multiple range test (DMRT)