บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาเครื่องดื่มน้ำผัก สมุนไพร และผลไม้เพื่อสุขภาพ เทศบาลตำบลนาอ้อ อำเภอเมือง จังหวัดเลย เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผัก สมุนไพร และผลไม้ และเพื่อพัฒนาเครื่องดื่มน้ำผัก สมุนไพร และผลไม้ ซึ่งมีขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย ดังนี้

3.1 เครื่องมือในการวิจัย

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

1) Micropipette ขนาด 10, 100, 1000 ไมโครลิตร
2) tip ขนาด 100, 1000 ไมโครลิตร
3) บิกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250, 1000 มิลลิลิตร
4) หลอดทดลอง
5) rack
6) ผ้าขาวบาง
7) มีด
8) เขียง
9) กระชอน

3.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1) UV/VIS spectrophotometer รุ่น Lambda 25 ยี่ห้อ PerkinElmer
2) เครื่องปั่นน้ำผัก ผลไม้ และสมุนไพร
3) เครื่องสกัดน้ำผัก ผลไม้ และสมุนไพร
4) เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge) SEQI/RILO รุ่น Universal 32 ยี่ห้อ Hettich Zentrifugen
5) แบบบันทึกข้อมูลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.1.3 สารเคมี

1) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Germany)
2) methanol (RCI Labscan, Thailand)
3) Ascorbic acid (RCI Labscan, Thailand)

3.1.4 ผัก สมุนไพร และผลไม้ ที่ใช้ในการวิจัย

ผัก สมุนไพร และผลไม้ที่ใช้ในการวิจัยในครั้งนี้ เป็นผัก สมุนไพร และผลไม้ที่ปลูกหรือจำหน่ายในเขตพื้นที่เทศบาลตำบลนาอ้อ อำเภอเมือง จังหวัดเลย และเป็นผักผลไม้ที่ประชาชนนำมาทำเครื่องดื่มน้ำผัก ผลไม้ และสมุนไพรบริโภค ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ผัก สมุนไพร **และ**ผลไม้

ชื่อผักผลไม้และสมุนไพร	ส่วนที่ใช้	ฤดูกาลที่ใช้
ย่านาง	ใบ	ทุกฤดูกาล
ผักคาว	ใบ	ฤดูร้อน และฤดูหนาว
หญ้าหวาน	ใบ	ทุกฤดูกาล
จิงจูฉ่าย	ใบ	ทุกฤดูกาล
ตำลึง	ใบ ลำต้น	ทุกฤดูกาล
คะน้า	ใบ	ทุกฤดูกาล
สะระแหน่	ใบ	ทุกฤดูกาล
โหระพา	ใบ	ทุกฤดูกาล
หญ้าปักกิ่ง	ใบ	ทุกฤดูกาล
ใบบัวบก	ใบ	ทุกฤดูกาล
อัญชัน	ดอก	ฤดูฝน
แอปเปิล	ผล	ทุกฤดูกาล
แตงโม	ผล	ทุกฤดูกาล
สับปะรด	ผล	ทุกฤดูกาล
มะนาว	ผล	ทุกฤดูกาล
ฝรั่ง	ผล	ทุกฤดูกาล
ลูกหม่อน	ผล	ฤดูฝน
แครอท	ผล	ทุกฤดูกาล

ที่มา : กองสาธารณสุขและอนามัยสิ่งแวดล้อม เทศบาลตำบลนาอ้อ อำเภอเมือง จังหวัดเลย (2560)

3.1.5 เครื่องมือที่ใช้ในการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

1) แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส เป็นแบบให้คะแนนความชอบ 5 ระดับ

2) เครื่องดื่มน้ำผัก สมุนไพร และผลไม้

3) ปากกา

4) ถ้วยชิม

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การศึกษาสภาพปัญหาของชุมชน

3.2.1.1 ทำหนังสือถึงนายกมนตรีเทศบาลตำบลนาอ้อ อำเภอเมือง จังหวัดเลย เพื่อเก็บรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับสภาพปัญหาของชุมชนในการทำเครื่องดื่มน้ำผัก สมุนไพร และผลไม้

3.2.1.2 สัมภาษณ์ผู้นำชุมชน เจ้าหน้าที่กองสาธารณสุขและอนามัยสิ่งแวดล้อมเทศบาลตำบลนาอ้อ อำเภอเมือง จังหวัดเลย และประชาชนเกี่ยวกับข้อมูลสภาพปัญหาของชุมชนในการทำเครื่องดื่มน้ำผัก สมุนไพร และผลไม้

3.2.1.2 วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากชุมชน เพื่อดำเนินการวิจัย

3.2.2 การเตรียมตัวอย่างสดสำหรับวิเคราะห์

3.2.2.1 นำใบของผักและสมุนไพร จำนวน 100 กรัม ล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผสมน้ำ 1000 มิลลิลิตร นำมาปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ กรองด้วยกระชอน 1 ครั้ง แบ่งเก็บส่วนหนึ่งเพื่อนำไปพัฒนาสูตรเครื่องดื่มน้ำผัก ผลไม้ และสมุนไพรเพื่อสุขภาพ อีกส่วนนำไปกรองด้วยผ้าขาวบางหนา 4 ชั้น จำนวน 1 ครั้ง และปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge SEQI/RILO รุ่น Universal 32 ยี่ห้อ Hettich Zentrifugen) ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำส่วนใสที่ได้เก็บในภาชนะสีเข้มเพื่อนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระต่อไป (รวินิภา ศรีมล และ ศิริจันทร์ ตาใจ, 2557)

3.2.2.2 นำผลของแครอท แอปเปิล แตงโม สับปะรด (ปอกเปลือก) ลูกหม่อน ฝรั่ง และมะนาว ล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นพอประมาณ นำใส่เครื่องสกัดหรือคั้นด้วยเครื่องคั้นน้ำผลไม้เพื่อแยกกากและน้ำออก กรองด้วยกระชอน 1 ครั้ง แบ่งเก็บส่วนหนึ่งเพื่อนำไปพัฒนาสูตรเครื่องดื่มน้ำผัก ผลไม้ และสมุนไพรเพื่อสุขภาพ อีกส่วนนำมากรองด้วยผ้าขาวบางหน้า 4 ชั้น 1 ครั้ง และปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge SEQI/RILO รุ่น Universal 32 ยี่ห้อ Hettich Zentrifugen)ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำส่วนใสที่ได้เก็บในภาชนะสีเข้มเพื่อนำไปวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป (รวินิภา ศรีมล และ ศิริจันทร์ ตาใจ, 2557)

3.2.3 การทดสอบฤทธิ์ในกำจัดสารอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผัก ผลไม้ และสมุนไพร ด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay (Jandaruang et al., 2012)

3.2.3.1 เติมสารละลายสารสกัดผัก ผลไม้ และสมุนไพร จำนวน 100 µl ลงใน 2,900 µl ของ 0.1 mM DPPH (fresh DPPH metanolic solution) เขย่าให้เข้ากัน

3.2.3.2 บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

3.2.3.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm เครื่อง UV/VIS spectrophotometer (รุ่น Lambda 25 ยี่ห้อ PerkinElmer)

3.2.3.4 ตัวอย่างควบคุมคือ สภาวะเดียวกับตัวอย่างทดลอง ยกเว้นไม่เติมตัวอย่างทดลอง

3.2.3.5 นำมาคำนวณ %Radical scavenging activity

3.2.3.6 ใช้ ascorbic acid ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 µM เป็นสารมาตรฐาน นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

การเตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เข้มข้น 0.1 มิลลิโมล่าร์ ในเมทานอลทำได้โดย ชั่ง 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl มา 0.1972 กรัม ละลายด้วยเมทานอลจนสารละลายหมดจากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรจะได้สารละลาย DPPH เข้มข้น 5 มิลลิโมล่าร์ จากนั้นปิเปตสารละลายนี้มา 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ ๆ ก่อนใช้งาน (รวินิภา ศรีมล และ ศิริจันทร์ ตาใจ, 2557)

3.2.4 การพัฒนาสูตรน้ำผัก สมุนไพร และผลไม้ เพื่อสุขภาพ

นำน้ำผัก สมุนไพร และผลไม้ ได้แก่ ย่านาง ผักคาว หญ้าหวาน ใบสะระแหน่ ใบโหระพา หญ้าปักกิ่ง ลูกหม่อน แอปเปิลแดง แตงโม สับปะรด น้ำมะนาว ฝรั่ง ที่เตรียมจากข้อ 3.2.2 มาผสมกันตามอัตราส่วนที่กำหนด ซึ่งในการเลือกชนิดของผัก สมุนไพร และผลไม้ มาพัฒนาเป็นสูตรนั้นอาศัยข้อมูล 2 อย่างในการเลือก คือ 1) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ 2) รสชาติที่เข้ากันได้ ดังตารางที่ 3.2 เพื่อพัฒนาเป็นสูตรน้ำผัก สมุนไพร และผลไม้เพื่อสุขภาพ จากนั้นแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส และอีกส่วนนำมากรองด้วยผ้าขาวบางหนา 4 ชั้น 1 ครั้ง และนำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge SEQI/RILO รุ่น Universal 32 ยี่ห้อ Hettich Zentrifugen) ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำส่วนใสที่ได้เก็บในภาชนะสีเข้มเพื่อนำไปวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป (รวินิภา ศรีมล และ ศิริจันทร์ ตาใจ, 2557) นำมาทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดสารอนุมูลอิสระตามข้อ 3.2.3

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบในสูตรเครื่องดื่มน้ำผัก สมุนไพร และผลไม้เพื่อสุขภาพ

ส่วนประกอบ	สูตร 1 (กรัม)	สูตร 2 (กรัม)	สูตร 3 (กรัม)	สูตร 4 (กรัม)	สูตร 5 (กรัม)	สูตร 6 (กรัม)
ย่านาง	-	100	-	-	-	100
ผักคาว	100	-	-	-	100	-
หญ้าหวาน	40	40	-	-	40	40
จิงจูฉ่าย	-	25	-	-	-	25
ตำลึง	-	100	-	-	-	100
คะน้า	100	-	-	-	100	-
สะระแหน่	-	100	-	-	-	100
โหระพา	100	-	-	-	100	-
หญ้าปักกิ่ง	100	-	-	-	100	-
ใบบัวบก	-	100	-	-	-	100
อัญชัน	100	-	-	-	100	-
แอปเปิลแดง	-	-	-	100	-	100
แตงโม	-	-	100	-	100	-
สับปะรด	-	-	100	-	100	-
มะนาว	-	-	10	10	10	10
ฝรั่ง	-	-	-	100	-	100
ลูกหม่อน	-	-	100	-	100	-
แครอท	-	-	-	100		100

3.2.5 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

นำเครื่องดื่มน้ำผัก สมุนไพร และผลไม้ ทั้ง 6 สูตร มาประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้วยแบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส เป็นแบบให้คะแนนความชอบ 5 ระดับ ดัดแปลงจากสุรีย์ แถวเที่ยง (2552) โดยให้ประชาชนในเขตเทศบาลตำบลนาอ้อ อำเภอเมือง จังหวัดเลย จำนวน 33 คน (สุ่มโดยบังเอิญ) ดื่มเครื่องดื่มน้ำผักผลไม้และสมุนไพร จำนวน 1 ถ้วยต่อสูตร (ประมาณ 30 มิลลิลิตร) แล้วตอบแบบประเมินประสาทสัมผัส คนละ 1 ชุด (สุรีย์ แถวเที่ยง, 2552)

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การศึกษาสภาพปัญหาชุมชน โดยการวิเคราะห์เชิงเนื้อหา

2. ผลการทดลองทั้งหมดจะนำมาวิเคราะห์หา %Radical scavenging activity ตามสูตร และนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid รายงานผลในหน่วยไมโครโมลของ ascorbic acid ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (μmol ascorbic acid Equivalent Antioxidant Capacity (AEAC)/ ml sample)

$$\%\text{Radical scavenging activity} = \left(\frac{(\text{Control OD} - \text{Sample OD})}{\text{Control OD}} \right) \times 100$$

3. วิเคราะห์ข้อมูลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส เป็นแบบให้คะแนนความชอบ 5 ระดับ ดังนี้

5	คะแนน	=	ชอบมากที่สุด
4	คะแนน	=	ชอบมาก
3	คะแนน	=	ชอบปานกลาง
2	คะแนน	=	ชอบเล็กน้อย
1	คะแนน	=	ไม่ชอบ

และใช้ค่าเฉลี่ยระหว่างคะแนนสูงสุด และคะแนนต่ำสุด มาจัดลำดับโดยใช้เกณฑ์พิจารณาดังนี้ (บุญชม ศรีสะอาด, 2538)

ระดับความชอบในการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส	ระดับคะแนน
ชอบมากที่สุด	4.21 – 5.00
ชอบมาก	3.41 – 4.20
ชอบปานกลาง	2.61 – 3.40
ชอบเล็กน้อย	1.81 – 2.60
ไม่ชอบ	1.00 – 1.80

$$\frac{\text{คะแนนสูงสุด-คะแนนต่ำสุด}}{\text{จำนวนชั้น}} = \frac{5-1}{5} = 0.8$$

4. วิเคราะห์ความแปรปรวนของการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้าน สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมของสูตรน้ำผัก สมุนไพร และผลไม้เพื่อสุขภาพ ทั้ง 6 สูตร โดยใช้สถิติ One-Way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของการประเมินคุณภาพ

ทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม ของสูตรน้ำผัก สมุนไพร และผลไม้เพื่อสุขภาพ ทั้ง 6 สูตร ด้วยวิธี Fisher's least significant difference (LSD) กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

3.4 แผนการดำเนินการวิจัย

ในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้ มีระยะเวลาในการดำเนินการเริ่มต้นตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2560 ถึง เดือนตุลาคม 2561 โดยมีรายละเอียดการดำเนินการวิจัย ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แผนดำเนินการวิจัย

กิจกรรม	พ.ศ. 2560-2561			พ.ศ. 2561								
	เดือน พ.ย.	เดือน ธ.ค.	เดือน ม.ค.	เดือน ก.พ.	เดือน มี.ค.	เดือน เม.ย.	เดือน พ.ค.	เดือน มิ.ย.	เดือน ก.ค.	เดือน ส.ค.	เดือน ก.ย.	เดือน ต.ค.
1.1 ศึกษาค้นคว้าข้อมูลที่เกี่ยวข้อง												
1.2 จัดหาสารเคมีและการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผัก ผลไม้ และพืชสมุนไพรแต่ละชนิด												
1.3 การพัฒนาสูตรเครื่องดื่มน้ำผัก ผลไม้ และพืชสมุนไพร และตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านสาร												

กิจกรรม	พ.ศ. 2560-2561			พ.ศ. 2561								
	เดือน พ.ย.	เดือน ธ.ค.	เดือน ม.ค.	เดือน ก.พ.	เดือน มี.ค.	เดือน เม.ย.	เดือน พ.ค.	เดือน มิ.ย.	เดือน ก.ค.	เดือน ส.ค.	เดือน ก.ย.	เดือน ต.ค.
อนุมูลอิสระของเครื่องดื่ม												
1.4 การประเมินสี กลิ่น รสของเครื่องดื่มน้ำผัก ผลไม้ และพืชสมุนไพร												
1.5 วิเคราะห์ผลและสรุปผลการทดลอง พร้อมทั้งจัดทำเล่มรายงาน												
1.6 การถ่ายทอดเทคโนโลยีการพัฒนาสูตรเครื่องดื่มน้ำผัก ผลไม้ และพืชสมุนไพรสู่ชุมชน												

3.5 สถานที่ทำการวิจัย

1. สาขาวิชาสาธารณสุขศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย
2. สาขาวิชาอาหารและโภชนาการ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย
3. ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย
4. เทศบาลตำบลนาอ้อ อำเภอเมือง จังหวัดเลย