

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### วัตถุประสงค์

1. ไบโหม่อนสดจากสถาบันวิจัยหม่อนไหมและบริษัทอุตสาหกรรมไหมไทย จำกัด จ.นครราชสีมา และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ได้แก่ บุรีรัมย์ 60 คุณไผ่ น้อย ไร่ นครราชสีมา 60 บุรีรัมย์ 51 เชียงใหม่กินผล บุรีรัมย์ 4 และจันทบุรีผสม โดยชนิดของไบโหม่อนที่เก็บได้และแหล่งที่เก็บ และคำย่อแสดงในตาราง 8

2. เชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ได้จากห้องปฏิบัติการของ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ได้แก่ *Bacillus cereus* DMST50-40, *Escherichia coli* DMST4212, *Escherichia coli* 0157:H7 ATCC43889, *Pseudomonas fluorescens* DMST15720, *Staphylococcus aureus* ATCC13565 และ *Salmonella typhimurium* DMST0562 เนื่องจากเป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบมากในผลิตภัณฑ์ปลา สามารถทนต่อปริมาณเกลือสูงและเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคเสีย

3. ตัวอย่างปลาสดน้ำหนัก 60 กิโลกรัม สุ่มเก็บตัวอย่างจาก จ.พิษณุโลก คัดเลือกโดยดูขนาดของตัวปลาสดอยู่ในช่วง 6.0x12.0x1.5 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ยของตัวปลา 50-55 กรัม ความสดและน้ำหนักของปลาจากผู้เชี่ยวชาญที่มีประสบการณ์ในการแปรรูปปลาและตรวจสอบทางความสดเบื้องต้น โดยปลาสดควรมีปริมาณ TVB-N ไม่เกิน 22.2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 100 กรัม (บุษกร อุดรภิชาติ, 2545) เพื่อเป็นดัชนีชี้วัดความสดของปลา ปริมาณยีสต์และรา ต้องไม่เกิน 500 โคโลนีต่อกรัม (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, 2549)

##### ตาราง 8 ชนิดของหม่อนและสถานที่เก็บเกี่ยว

ตัวอย่างที่	ชนิดของไบโหม่อน	คำย่อ	สถานที่เก็บเกี่ยว
1	บุรีรัมย์ 60	Bn60	สถาบันวิจัยหม่อนไหม จ.นครราชสีมา
2	คุณไผ่	Pn	"
3	น้อย	Nn	"
4	ไร่	Pin	"
5	นครราชสีมา 60	Nn60	"
6	บุรีรัมย์ 51	Bn51	"

## ตาราง 8 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของไบโหม่อน	คำย่อ	สถานที่เก็บเกี่ยว
7	เชียงใหม่กินผล	Cmn	"
8	บุรีรัมย์ 4	Bj4	บริษัทอุตสาหกรรมไหมไทยจำกัด จ.นครราชสีมา
9	คุณไผ่	Pj	"
10	บุรีรัมย์ 60	Bj60	"
11	จีนลูกผสม	Chj	"
12	บุรีรัมย์ 60	Bk60	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม
13	คุณไผ่	Pk	"

## สารเคมี (Analytical Reagent Grade)

1. กรดแกลลิก (Gallic acid, Fluka)
2. กรดบอริก (Boric acid, Fisher)
3. กรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid, Fisher)
4. กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid, Fisher)
5. กรดอะซิติก (Acetic acid, Fluka)
6. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, Merck)
7. สารโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, Merck)
8. สารโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Merck)
9. สารโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, Merck)
10. สารโบรมอกสีเขียว (Bromocresol green, Fisher)
11. สารเมทิลออเรนจ์ (Methyl orange, Fisher)
12. สารดีพีพีเอช (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH, Fluka)
13. สารโฟลีน - ซิโอกาทิล ฟีนอล ทีเอส (Folin - Ciocalteu Phenol TS, WWR)
14. สารละลายเอทานอล (Ethanol, Merck)
15. สารฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde, Merck)
16. สารมาตรฐานวิตามินอี ( $\alpha$ -Tocopherol, Fluka)
17. สารโพแทสเซียมไอโอไดน์ (Potassium iodide; KI, Merck)

18. สารละลายคลอโรฟอร์ม (Chloroform, Fluka)
19. สารไอโอดีน (Iodine, Fluka)
20. น้ำแป้ง (Starch, Merck)
21. ผงวุ้น (Agar)
22. สารกาแลกโตส (Galactose, Merck)
23. สารเคซีนเปปโตน (Peptone from Casein, Merck)
24. สาร ดี-แมนนิทอล (D (-)-mannitol, Merck)
25. สารไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate, Merck)
26. สารเปปโตน (Peptone, Merck)
27. สารฟีนอลเรด (Phenol red, Merck)
28. สารแมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate, Merck)
29. สารละลายกลีเซอรอล (Glycerol, Merck)
30. สารสกัดจากเนื้อสัตว์ (Meat extract, Merck)
31. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution; PBS, Merck)
32. สารละลายโพลีมิกซิน บี ซัลเฟต (Polymyxin B sulfate)
33. ไข่แดง (Egg yolk emulsion)
34. อาหารเหลวสำเร็จรูปทริปติก ซอย บรอต (Tryptic soy broth; TSB, Becton)
35. อาหารสำเร็จรูปสำหรับเชื้อรา-ยีสต์ (Bengal rose, Fluka)
36. อาหารสำเร็จรูปสำหรับเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Plate count agar; PCA, Merck)
37. อาหารสำเร็จรูป Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) agar

#### อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. กระดาษกรองเบอร์ 1 และ 3 (Whatman)
2. เครื่องบดผสม (Hammer mill, Sharp)
3. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo; AG 204)
4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer; Speack Perkin Elmer, Lambda 20)
5. เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง (Ultra centrifuge)
6. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator, Buchi B-480)

7. เครื่องทดสอบค่าสี (Hunter Lab Colorimeter, DP 9000)
8. เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Instron, 4411)
9. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, Horiba Nodel F-21)
10. เครื่องวัดค่าวอเตอร์แอกทิวิตี (water activity; Novasina, Aw-center 200)
11. เครื่องตีป่นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ (Lab System Stomacher; 400)
12. ชุดกรองแบคทีเรีย (Bacteriological filter)
13. ชุดกลั่นไอน้ำ (Steam distillation Unit)
14. ตะแกรงร่อน (Retsch; SEIVE ASIME; II, 00 mesh)
15. ตู้อบลมร้อนแบบสุญญากาศ (Vacuum oven, Shel Lab; 1375Fx)
16. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator, Shel Lab; 1535)
17. ตู้อบลมร้อน (Tray drier, KPO-700)
18. ถ้วยวิเคราะห์ความชื้น (Moisture can)
19. โถดูดความชื้น (Desiccator, Duran)
20. อุปกรณ์ทดสอบชิม

#### ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การทดสอบหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียในใบหม่อน

1. สุ่มตัวอย่างใบหม่อนจากสถาบันวิจัยหม่อนไหม และบริษัทอุตสาหกรรมไหมไทย จำกัด จังหวัดนครราชสีมา และคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ได้แก่ บุรีรัมย์ 60 คุณไผ่ น้อย ไร่ นครราชสีมา 60 บุรีรัมย์ 51 เชียงใหม่กินผล บุรีรัมย์ 4 และจีนลูกผสม (ตาราง 7) วิธีการเก็บใบหม่อนได้ประยุกต์จาก รัตติยา สำราญสกุล (2544) โดยทำการเก็บใบหม่อนได้ยอดลงมาใบที่ 1-3 ของต้น วัดความชื้นและชั่งน้ำหนักตัวอย่าง หลังจากนั้นนำไปล้างน้ำให้สะอาดแล้วตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ลดความชื้นร้อยละ 10-12 นำไปบดทำให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดผสมและร่อนด้วยตะแกรงขนาด 100 mesh ใส่ในถุงพลาสติกสะอาด ปิดผนึกด้วยถุงซิปล็อกทำการเก็บที่อุณหภูมิ 0-4 °C เพื่อนำมาสกัดสารในขั้นตอนต่อไป

2. สกัดสารจากใบหม่อนที่อบแห้งและบดละเอียดแล้ว โดยประยุกต์จากวิธีของ Kahkonen et al. (1999) โดยใช้สารทำลายเอทานอลร้อยละ 60 ได้สารสกัดอย่างหยาบระเหยให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C ภายใต้ความดัน 175 mbar ปรับปริมาตรให้เท่ากัน เก็บไว้ในขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดสนิท ที่อุณหภูมิ -18 °C

### 3. นำสารสกัดใบหม่อนที่ได้ตรวจวัด

3.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ตามวิธีของ Meda et al. (2005)

3.2 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ตามวิธี DPPH ของ Chang et al. (2002)

3.3 ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด ตามวิธีของ A.O.A.C., (1990) ข้อ 942.34

3.4 ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย ตามวิธี disc diffusion method ประยุกต์จาก Siripongvutikorn, Thummaratwasik and Huang. (2005)

3.5 ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี MIC (Minimal inhibitory concentration) ตามวิธี วชิรี สภาอินทร์ (2545)

ในสารสกัดที่ได้จากข้อ 2 จากนั้นคัดเลือกพันธุ์หม่อนที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติที่สุด 1 พันธุ์

4. สกัดสารจากใบหม่อนที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 โดยวิธีสกัดอย่างหยาบด้วยสารทำละลายเอทานอลร้อยละ 60 ตามวิธีการข้อ 2 เพื่อนำมาทดสอบกับพลาสติกตกแห้งในขั้นตอนต่อไป

ตอนที่ 2 การทดสอบสารสกัดในพลาสติกและศึกษาอายุการเก็บรักษาพลาสติกตกแห้งแดดเดียว

1. สุ่มตัวอย่างพลาสติกสดปริมาณ 60 กิโลกรัม ที่จำหน่ายในเขตจังหวัดพิษณุโลก โดยคิดขนาด น้ำหนักและความสดของปลาอาศัยผู้เชี่ยวชาญที่เป็นผู้ประกอบการ นำตัวอย่างพลาสติกสดมาล้างทำความสะอาดและทำให้แห้ง โดยประยุกต์วิธีของศรวณีย์ รอดเที่ยง (2542) คัดเลือกตัวปลาให้มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกัน ล้างด้วยน้ำสะอาด ตัดหัว ขอดเกล็ดและควักไส้ออก แช่ด้วยน้ำเกลือร้อยละ 12 ในอัตราส่วน 1:1 (ปลา:น้ำเกลือ) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างขึ้นปลาด้วยน้ำสะอาดอย่างรวดเร็ว เพื่อขจัดคราบน้ำเกลือที่เกาะบริเวณผิวหนังปลาออก ฝั่งให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรง จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 12 ชั่วโมง บรรจุในถุงซิปล็อกที่อุณหภูมิห้อง (35-37 °C) และอุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ศึกษาขั้นตอนต่อไป

2. ทดสอบสารสกัดที่ได้กับพลาสติกสดที่เตรียมไว้ โดยดำเนินการทดลองแบบ 2 x 3 Factorial Design in RCBD มี 2 ปัจจัย ดังนี้ ปัจจัยที่ 1 อุณหภูมิการเก็บรักษามี 2 ระดับ คือ อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 °C ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของสารสกัดสำหรับแช่ปลามี 3 ระดับ คือ 250, 500 และ 750 mg/kg

3. การทดสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์พลาสติกตกแห้ง

3.1 คุณภาพทางกายภาพ (ทั้งก่อนตากและหลังตากแห้งพลาสติก) ประกอบด้วย

### 3.1.1 ค่าสี ในระบบ CIE L\* a\* b\* โดยเครื่อง Hunter LAB Reflectance

Tristimulus Colormeter ใส่ตัวอย่างลงใน quartz แล้ววาง quartz บนแท่นวัด ปิดด้วยฝาครอบ ทำการวัดค่าสี

3.1.2 ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ วัดโดยเครื่อง Instron Texture Analyzer โดยวัดค่าแรงเฉือน (N, นิวตัน) ซึ่งเป็นค่าแรงสูงสุดในการตัดเนื้อปลาให้ขาด ที่ความเร็ว 20 มิลลิเมตร/วินาที (Orban et al, 1997) ใช้หัววัดแบบ single blade, Meat shear cell ที่โหลด cell เท่ากับ 500 kgf นำตัวอย่างชิ้นเนื้อปลาสวนกล้ามเนื้อส่วนบน (upper mass) ในการทดสอบ ขนาด 2.0x5.0x1.0 เซนติเมตร

3.1.3 การอุ้มน้ำ (Water-holding capacity; WHC) ตามวิธี Ogden et al. (1995)

3.1.4 ความชื้นของปลาสด ตามวิธีของ A.O.A.C. (1990) ข้อ 390.15

3.1.5 ค่าวอเตอร์แอคทิวิตี (water activity;  $a_w$ ) นำตัวอย่างประมาณ 3 กรัม มาใส่ในถ้วยพลาสติกที่เตรียมให้วัดค่าโดยเครื่องวัดค่าวอเตอร์แอคทิวิตี

## 3.2 คุณภาพทางด้านเคมี ประกอบด้วย

3.2.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของน้ำที่ผสมสารสกัดจากใบหม่อน โดยวิธีของ Meda et al. (2005) ทั้งก่อนแช่และหลังแช่ปลาสด

3.2.2 ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของน้ำที่ผสมสารสกัดจากใบหม่อนโดยวิธี DPPH ของ Chang et al. (2002) ทั้งก่อนแช่สารและหลังแช่ปลาสด

3.2.3 ปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile base nitrogen, TVB-N) ในปลาสดสดและหลังการเก็บรักษาตามวิธีของ Requixo (1998)

3.2.4 ปริมาณไตรเมทิลเอมีน (trimethylamine, TMA) ในปลาสดสดและหลังการเก็บรักษาตามวิธีของ Requixo (1998)

3.2.5 ค่า pH โดยใช้เครื่องวัด pH meter

## 3.3 คุณภาพทางจุลชีววิทยา ประกอบด้วย

3.3.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดตามวิธีของ A.O.A.C. (1990) ข้อ 966.23

3.3.2 ปริมาณเชื้อยีสต์และราตามวิธีของ A.O.A.C. (1990) ข้อ 940.37

4. ศึกษาอายุของผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาอุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4 °C นำมาตรวจวิเคราะห์ตามข้อ 3 ทุก ๆ 2 วัน จนเสื่อมสภาพ โดยสังเกตจากลักษณะเนื้อปลาสลิดร่วนซุย สีของเนื้อปลาเขียวคล้ำ เริ่มมีกลิ่นเหม็น

### ตอนที่ 3 การทดสอบความชอบผลิตภัณฑ์พลาสติกตากแห้งแดดเดียว

นำพลาสติกที่ผ่านการแช่สารมาทดสอบความชอบของผลิตภัณฑ์พลาสติกตากแห้งแดดเดียวผสมสารสกัดเปรียบเทียบกับพลาสติกตากแห้งที่ไม่ใส่สารสกัดในด้านสี กลิ่น รสชาติ ความแน่นเนื้อ ลักษณะเนื้อสัมผัสและความชอบทั้งก่อนทอดและหลังทอด โดยก่อนทอดใช้ระดับคะแนนในการวัดการยอมรับเป็น 5-Point hedonic scale ผู้ทดสอบทั่วไปจำนวน 50 คน และหลังการทอดใช้ระดับคะแนนในการวัดการยอมรับเป็น 9-Point hedonic scale และ 5-point just about right เพื่อหาตัวอย่างผลิตภัณฑ์พลาสติกตากแห้งแดดเดียวที่ผู้บริโภคยอมรับมากที่สุด โดยนำพลาสติกที่ได้มาทอดในน้ำมันอุณหภูมิ 180 °C ด้านละ 3 นาที ตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที ก่อนนำมาทดสอบชิม โดยกลุ่มผู้ทดสอบชิมจำนวน 29 คน คือ นักศึกษาเจ้าหน้าที่คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวรและบุคคลทั่วไปที่สนใจ

### ตอนที่ 4 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการทดลอง โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ