**บทที่ 3**

**วิธีการดำเนินการวิจัย**

การดำเนินการวิจัยครั้งนี้ศึกษาร่วมกับการพัฒนาทดลองรวมถึงการสังเกตแบบมีส่วนร่วม และศึกษาภาคสนามเพื่อนำใส่ประกอบกับข้อมูลเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อให้ได้ข้อมูลที่หลากหลายและครอบคลุมทุกส่วนรวมถึงวิถีชีวิตและภูมิปัญญา รวมถึงการเก็บข้อมูลผู้วิจัยได้เตรียมอุปกรณ์ในการวิเคราะห์ การบันทึกข้อมูลและการถ่ายภาพประกอบ คณะวิจัยได้นำเสนอขั้นตอนต่างๆ เพื่อเป็นแนวทางในการค้นคว้า เรียบเรียงข้อมูลเป็นลำดับดังนี้

 3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

 3.3 วิธีการสร้างเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

 (1) การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของสมุนไพรต่อการพัฒนาน้ำเห็ด

 (2) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry assay

 (3) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

 (4) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2’-Azino-bis-(3-ethybenzothia zoline- 6-sulfonic acid diammonium salt (ABTS)

 (5) การตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

 (6) ศึกษาการยอมรับโดยการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

 (7) การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

 (8) การพัฒนาบรรจุภัณฑ์และตราสัญลักษณ์

**3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง**

 การวิจัยครั้งนี้ได้เลือกพื้นที่โดยการกำหนดกลุ่มเป้าหมายตามเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งประชาการประกอบด้วยผู้ผลิตพืชผลทางการเกษตรและกลุ่มผู้ผลิตสินค้า OTOP ที่นำผลผลิตต่าง ๆ มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ ที่จำหน่าย ประกอบไปด้วยกลุ่มเกษตรสร้างสรรค์บ้านดอนมโนราห์ จังหวัดสมุทรสงคราม

**3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย**

 การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง รายละเอียดดังต่อไปนี้

1. วัตถุดิบ
	1. เห็ดโคนญี่ปุ่น (yanagi mutsutske mushroom)
	2. เห็ดนางฟ้าภูฐาน (sajor-caju mushroom)
	3. เห็ดเป๋าฮื้อ (abalone mushroom)
	4. น้ำตาล (sugar)
	5. เก็กฮวยอบแห้ง (chrysanthemum)
	6. หญ้าหวานอบแห้ง (stevia)
	7. ใบเตยสด (pandanus palm)

 1.8 น้ำกลั่นบริสุทธิ์ (distilled water)

2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

 2.1 อุปกรณ์สำหรับต้ม

2.1.1 หม้อสำหรับต้ม

2.1.2 กระบวยสำหรับคน

2.1.3 ผ้าขาวบาง

2.1.4 ตระแกรงสำหรับกรอง

2.1.5 ชาม

2.1.6 กรวยกรอง

2.1.7 ขวดบรรจุน้ำสมุนไพรพร้อมฝาปิดสนิท

2.1.8 เตาไฟฟ้า

2.2 เครื่องมือ

2.2.1 ไมโครปิเปตต์ (micropipette)

2.2.2 ไมโครปิเปตต์ทิพ (micropipettetip)

2.2.3 ไมโครเวลเพลท (microwell plate)

2.2.4 หลอดไมโครเซนติฟิวก์พลาสติก ขนาด1.5 ไมโครลิตร (micro centrifugetube)

2.2.5 ตะแกรงใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์พลาสติก (micro centrifuge rack)

2.2.6 เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 4 ตำแหน่ง (four digit digital scale) รุ่น pa214 ยี่ห้อ ohaus

* + 1. spectrophotometer components)
		2. หม้อนึ่งแรงดันสูง (เครื่อง auto clave) รุ่น sx -700 ยี่ห้อ tomy
		3. microplate reader รุ่น rt-2100c ยี่ห้อ kayto

2.2.10 automatic environmental speedvac system รุ่น aes 1010 ยี่ห้อ savant

3. สารเคมี

* 1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph) ยี่ห้อ sig..ma-aldrich, switzerland
	2. gallic acid (c7h6o5) ยี่ห้อ emure, chaina
	3. methanol (ch3oh) ยี่ห้อ avantor, united states of america
	4. sodium carbonate (na2co3) ยี่ห้อ emure, chaina

3.5 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (abts) ยี่ห้อ

calbiochem, united states of america

* 1. Potassiumpersulfate (k2s2o8) ยี่ห้อ emure, chaina
	2. น้ำกลั่น (distilled water)
	3. น้ำกลั่นที่ผ่านการสเตอไรด์ (sterile water)
	4. ascorbic acid (c6h8o6) ยี่ห้อ emure, chaina

3.10 bovine serum albumin (bsa) ยี่ห้อ emure, chaina

 3.11 folin-ciocalteu’s phenol reagent ยี่ห้อ sig..ma, Germany

**3.3 วิธีการสร้างเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย (1) การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของสมุนไพรต่อการพัฒนาน้ำเห็ด**

* 1. การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของสมุนไพรในน้ำเห็ดสูตรที่ 1 ประกอบด้วย น้ำเห็ด

ใบเตย เก็กฮวย และหญ้าหวาน

* + 1. การเตรียมส่วนผสมในการทำน้ำเห็ด

1. เห็ดทั้งสามชนิด ได้แก่ เห็ดโคนญี่ปุ่น เห็ดนางฟ้าภูฐาน และเห็ดเป๋าฮื้อ ชนิดละ 150 กรัม

1. เก็กฮวยอบแห้ง 10 กรัม
2. ใบเตยสด 50 กรัม
3. หญ้าหวานอบแห้ง 10 กรัม
4. น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 ลิตร

1.1.2 วิธีการต้มน้ำเห็ดผสมสมุนไพร

1. ล้างทำความสะอาดเห็ดทั้ง 3 ชนิด แล้วสับให้ละเอียด
2. ต้มน้ำให้เดือดแล้วใส่ใบเตยสด โดยแบ่งใบเตยออกเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 25 กรัม ใส่ส่วนแรกลงไปในหม้อ ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นใส่เห็ดทั้ง 3 ชนิดที่สับจนละเอียดแล้วลงไปเคี่ยวจนน้ำเดือดแล้วใส่ใบเตยที่เหลือลงไปเคี่ยวด้วยไฟกลางเป็น เวลา 15 นาที
3. กรองน้ำเห็ดที่ผ่านการต้มพร้อมกับใบเตยแล้วด้วยผ้าขาวบาง 3 ชั้น 2 ครั้ง

แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำ

1. นำน้ำเห็ดที่กรองแล้วไปเคี่ยวอีกครั้งด้วยไฟกลางจนเดือด แล้วใส่หญ้าหวานอบแห้งลงไป โดยวิธีการใส่ คือ ใส่หญ้าหวานลงไปในกระชอนสำหรับกรองชา หรือห่อด้วยผ้าขาวบางแช่ลงในน้ำเห็ดที่เดือดแล้วเป็นเวลา 3-5 นาที แล้วยกออกทันที เนื่องจากหญ้าหวานหากแช่ไว้นานจะให้รสชาติที่ขมและกลิ่นฉุนออกมา
2. เคี่ยวน้ำเห็ดให้เดือดอีกครั้งแล้วปิดไฟ จากนั้นใส่เก็กฮวยอบแห้งลงไปปิดฝา

ทิ้งไว้นาน 10 นาทีจะได้กลิ่นหอมของเก็กฮวยออกมา

1. กรองน้ำเห็ดอีกครั้งด้วยผ้าขาวบาง 3 ชั้น 2 ครั้ง แล้ว บรรจุใส่ขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที แล้วปิดฝาให้สนิทจากนั้นนำน้ำเห็ดแต่ละสูตรไปผ่านความร้อนอีกครั้งด้วยกระบวนการสเตอริไลซ์เซชัน ที่อุณหภูมิ 115 °C นาน 20 นาที
2. ปล่อยให้เย็นสักครู่แล้วนำไปแช่เย็น เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

1.2 การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของสมุนไพรในน้ำเห็ดสูตรที่ 2 ประกอบด้วย น้ำเห็ดใบเตย เก็กฮวย หญ้าหวาน น้ำตาล

1.2.1 การเตรียมส่วนผสมในการทำน้ำเห็ด

1. เห็ดทั้งสามชนิด ได้แก่ เห็ดโคนญี่ปุ่น เห็ดนางฟ้าภูฐาน และเห็ดเป๋าฮื้อ

ชนิดละ 150 กรัม

2. เก็กฮวยอบแห้ง 10 กรัม

3. ใบเตยสด 50 กรัม

4. หญ้าหวานอบแห้ง 10 กรัม

5. น้ำตาลกรวด 10 กรัม

6. น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 ลิตร

1.2.2 วิธีการต้มน้ำเห็ดผสมสมุนไพร

1. ล้างทำความสะอาดเห็ดทั้ง 3 ชนิด แล้วสับให้ละเอียด

2. ต้มน้ำให้เดือดแล้วใส่ใบเตยสด โดยแบ่งใบเตยออกเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 25 กรัมใส่ส่วนแรกลงไปในหม้อทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นใส่เห็ดทั้ง 3 ชนิด ที่สับจนละเอียดแล้วลงไปเคี่ยวจนน้ำเดือด แล้วใส่ใบเตยที่เหลือลงไป เคี่ยวด้วยไฟกลางเป็นเวลา 15 นาที

 3. กรองน้ำเห็ดที่ผ่านการต้มพร้อมกับใบเตยแล้วด้วยผ้าขาวบาง 3 ชั้น 2 ครั้ง แล้วปรับปริมาตร ให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำ

4. นำน้ำเห็ดที่กรองแล้วไปเคี่ยวอีกครั้งด้วยไฟกลางจนเดือด แล้วใส่หญ้าหวาน

อบแห้งลงไปโดยวิธีการใส่ คือ ใส่หญ้าหวานลงไปในกระชอนสำหรับกรองชา หรือห่อด้วยผ้าขาวบาง แช่ลงในน้ำเห็ดที่เดือดแล้ว เป็นเวลา 3-5 นาที แล้วยกออกทันที เนื่องจากหญ้าหวานหากแช่ไว้นานจะให้รสชาติที่ขมและกลิ่นฉุนออกมาซึ่งจะทำมีรสชาติขมและมีกลิ่นฉุน

5. เคี่ยวน้ำเห็ดให้เดือดอีกครั้งแล้วใส่น้ำตาลลงไปเคี่ยวให้น้ำตาลละลายจึงปิดไฟ

จากนั้นใส่เก็กฮวยอบแห้งลงไปปิดฝา ทิ้งไว้นาน 10 นาที จะได้กลิ่นหอมของเก็กฮวยออกมา

6. กรองน้ำเห็ดอีกครั้งด้วยผ้าขาวบาง 3 ชั้น 2 ครั้ง แล้ว บรรจุใส่ขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที แล้วปิดฝาให้สนิท จากนั้นนำน้ำเห็ดแต่ละ สูตรไปผ่านความร้อนอีกครั้ง ด้วยกระบวนการสเตอริไลซ์เซชัน ที่อุณหภูมิ 115 °C นาน 20 นาที

7. ปล่อยให้เย็นสักครู่แล้วนำไปแช่เย็นต่อไป เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

 1.3 การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของสมุนไพรในน้ำเห็ดสูตรที่ 3 ที่ประกอบไปด้วย น้ำเห็ด ใบเตย เก็กฮวย น้ำตาล

1.3.1 เตรียมส่วนผสม

1. เห็ดทั้งสามชนิด ได้แก่ เห็ดโคนญี่ปุ่น เห็ดนางฟ้าภูฐาน และเห็ดเป๋าฮื้อ

ชนิดละ 150 กรัม

2. เก็กฮวยอบแห้ง 10 กรัม

3. ใบเตยสด 50 กรัม

4. น้ำตาลกรวด 50 กรัม

5. น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 ลิตร

1.3.2 วิธีการต้มน้ำเห็ดผสมสมุนไพร

1. ล้างทำความสะอาดเห็ดทั้ง 3 ชนิด แล้วสับให้ละเอียด

2. ต้มน้ำให้เดือดแล้วใส่ใบเตยสด โดยแบ่งใบเตยออกเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 25 กรัม

ใส่ส่วนแรกลงไปในหม้อทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นใส่เห็ดทั้ง 3 ชนิด ที่สับจนละเอียดแล้วลงไปเคี่ยวจนน้ำเดือดแล้วใส่ใบเตยที่เหลือลงไปเคี่ยวด้วยไฟกลางเป็น เวลา 15 นาที

3. กรองน้ำเห็ดที่ผ่านการต้มพร้อมกับใบเตยแล้วด้วยผ้าขาวบาง 3 ชั้น 2 ครั้ง

แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำ

4. นำน้ำเห็ดที่กรองแล้วไปเคี่ยวอีกครั้งด้วยไฟกลางจนเดือด ใส่น้ำตาลลงไปเคี่ยวน้ำ

เห็ดให้เดือดแล้วปิดไฟ จากนั้นใส่เก็กฮวยอบแห้งลงไปปิดฝาทิ้งไว้นาน 10 นาที จะได้กลิ่นหอมของเก็กฮวยออกมา

5. กรองน้ำเห็ดอีกครั้งด้วยผ้าขาวบาง 3 ชั้น 2 ครั้ง แล้วบรรจุใส่ขวดแก้วที่ผ่าน

การฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที แล้วปิดฝาให้สนิท จากนั้นนำน้ำเห็ดแต่ละสูตรไปผ่านความร้อนอีกครั้งด้วยกระบวนการสเตอริไลซ์เซชันที่อุณหภูมิ 115 °C นาน 20 นาที ปล่อยให้เย็นสักครู่แล้วนำไปแช่เย็น เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

 (2) **การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry assay**

2.1 การเตรียมสารละลาย Copper-Tartrate-Carbonate (CTC)

2.1.1 เตรียมสารละลาย CTC โดยการเตรียม 0.2% คอปเปอร์ซัลเฟต ( CuSO4 )

2.1.2 ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต 0.1กรัม และ 0.4% คอปเปอร์ซัลเฟต 0.4 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสารละลาย 20% โซเดียมคาร์บอเนต (NaCO3)

2.2.1 ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 10 กรัม

2.2.2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2.3 เตรียม 0.8% โซเดียมไฮดรอกไซต์ (NaOH)

2.3.1 ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.6 กรัม

2.3.2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2.4 เตรียม 5% โซเดียมโดดีซิล ซัลเฟต (Sodium dodecyl Sulfate ; SDS)

2.4.1 ชั่งโซเดียมโดดีซิล ซัลเฟต 2.5 กรัม

2.4.2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2.5 นำสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆผสมกับน้ำกลั่นตามปริมาณ (ดังในตารางที่1)

**ตารางที่ 1** ตารางแสดงการเตรียมสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ความเข้มข้น (มิลลิกรัม /มิลลิลิตร )** | **สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA (ไมโครลิตร)** | **น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)** |
| 0 | 0 | 5 |
| 0.002 | 1 | 4 |
| 0.004 | 2 | 3 |
| 0.006 | 3 | 2 |
| 0.008 | 4 | 1 |
| 0.01 | 5 | 0 |

2.6 นำโปรตีนตัวอย่างมาเติม Solution A (CTC, 20% Na2CO3, 0.8% NaOH, 5% SDS ) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ทิ้งในที่มืดนาน 30 นาที

2.7 เติม Solution B (0.2% folin-ciocalteuphenol ) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

2.8 บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 690 นาโนเมตร

จากนั้นนำค่าที่ได้มาหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA ที่ทราบความเข้มข้น

2.9 การทำกราฟมาตรฐานสารละลาย Bovine serum albumin (BSA)

2.9.1 ปิเปตสารละลาย BSA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในไมโครเวลเพลท (microwell plate)

2.9.2 เติมสารละลาย A ที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 200 ไมโครลิตร

2.9.3 เติมสารละลาย B ที่เตรียมไว้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

2.9.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร

2.9.5 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้ากราฟกับค่าความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลาย BSA เพื่อหาค่าสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานสำหรับใช้ในการคำนวณโปรตีน

2.10 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากตัวอย่างน้ำเห็ดทั้ง 3 สูตร

2.10.1 ปิเปตตัวอย่างน้ำเห็ดปริมาตร 5 ไมโครลิตรใส่ลงในไมโครเวลเพลท

2.10.2 เติมสารละลาย A ที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 200 ไมโครลิตร

2.10.3 เติมสารละลาย B ที่เตรียมไว้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

2.10.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร

2.10.5 คำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ สารละลายโปรตีน BSA ที่ทราบความเข้มข้น ปริมาณโปรตีนรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของโปรตีน/ มิลลิลิตรของสารละลาย

 **(3) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)**

3.1 การเตรียมสารละลาย DPPH reagent

3.1.1 เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

3.1.2 ชั่ง DPPH 4 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอลปรับปริมาตรให้เป็น 20 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่มืด 30 นาที

3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic Acid)

3.2.1. เตรียสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ทั้งหมด 6 ความเข้มข้น 2, 4, 10, 20, 30 และ 40 ไมโครลิตร

3.2.2 ชั่งกรดแอสคอร์บิก ตามความเข้มข้นที่กล่าวไว้ ดังนี้ 0.002, 0.004, 0.01, 0.02, 0.03 และ 0.04 กรัม ตามลำดับ ทำการละลายด้วยเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2**  ตารางแสดงการเตรียมสารละลาย กรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ปริมาณกรดแอสคอร์บิก (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)** | **ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก (ไมโครลิตร)** | **ปริมาณเมทานอล** **(ไมโครลิตร)** |
| 0.002 | 2 | 998 |
| 0.004 | 4 | 996 |
| 0.01 | 10 | 990 |
| 0.02 | 20 | 980 |
| 0.03 | 30 | 970 |
| 0.04 | 40 | 960 |

3.3 การทำกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแอสคอร์บิก

3.3.1 ปิเปตสารละลายกรดแอสคอร์บิก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในไมโครเวลเพท

3.3.2 เติมสารละลาย DPPH ที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 100 ไมโครลิตรทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา30 นาที

3.3.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

3.3.4 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟกับค่าความเข้มข้นต่างๆของสารละลาย กรดแอสคอร์บิก เพื่อหาสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานสำหรับใช้ในคำนวณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

3.4 วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากตัวอย่างน้ำเห็ดทั้ง 3 สูตร

3.4.1 ปิเปตตัวอย่างน้ำเห็ดปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง

3.4.2 เติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

3.4.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร คำนวณร้อยละ การยับยั้งอนุมูลอิสระ ดังสมการ

inhibition = ×100

 โดยที่ Acontrol คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

 Asample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่เติมสารสกัด

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจะแสดงเป็นค่า %Inhibition คือ ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยรายงานผลในหน่วย มิลลิกรัมของกรดแอสคอร์บิก/มิลลิกรัมของโปรตีน ซึ่งแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

 **(4) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2’-Azino-bis-(3-ethybenzothia zoline- 6-sulfonic acid diammonium salt (ABTS)**

4.1 เตรียมสารละลาย DPPH reagentเตรียมสารละลาย ABTS

4.1.1 เตรียม สารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร

4.1.2 ชั่ง ABTS 25.12 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 7 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่มืด 30 นาที

4.2 การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอซัลเฟต (Potassium persulfate)

4.2.1. เตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอซัลเฟต ให้มีความเข้มข้น 2.44 มิลลิโมลาร์

4.2.2. ชั่งโพแทสเซียม 6.62 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 ไมโครลิตร

4.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

4.3.1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ทั้งหมด 7 ความเข้มข้น 12.5, 25, 50,

100, 150, 200 และ 250 ไมโครลิตร

4.3.2 ชั่งกรดแกลิกตามความเข้มข้นที่กล่าวไว้ ดังนี้ 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15,

0.2, 0.25 กรัม ตามลำดับ

4.3.3 ทำการละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร (ดังตารางที่ 3)

**ตารางที่ 3** ตารางแสดงการเตรียมสารละลาย กรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ปริมาณกรดแกลลิก (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)** | **ความเข้มข้นของกรดแกลลิก (ไมโครลิตร)** | **ปริมาณน้ำกลั่น****(ไมโครลิตร)** |
| 0.0125 | 12.5 | 987.5 |
| 0.025 | 25 | 975 |
| 0.05 | 50 | 950 |
| 0.1 | 100 | 900 |
| 0.15 | 150 | 850 |
| 0.2 | 200 | 800 |
| 0.25 | 250 | 750 |

4.4 การทำกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลิก

4.4.1 ปิเปตสารละลายกรดปริมาตร 100 ไมโครลิตรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในไมโคลเวลเพท

4.4.2 เติมสารละลายโพแทสเซียมที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 50 ไมโครลิตร

4.4.3. เติม ABTS ที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

4.4.4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

4.4.5 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟกับค่าความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายกรดแกลลิก เพื่อหาสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานสำหรับใช้ในคำนวณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

4.5 วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากตัวอย่างน้ำเห็ดทั้ง 3 สูตร

4.5.1. ปิเปตตัวอย่างน้ำเห็ดปริมาตร 10 ไมโครลิตรใส่ในไมโครเวลเพลท

4.5.2 เติมสารละลายโพแทสเซียม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติม ABTS 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

4.5.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร คำนวณร้อยละ การยับยั้งอนุมูลอิสระ ดังสมการ

inhibition = ×100

โดยที่: Acontrol คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

 Asample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่เติมสารสกัด

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจะแสดงเป็นค่า%Inhibition คือ ความสามารถในการยับยั้ง อนุมูลอิสระโดยรายงานผลในหน่วย มิลลิกรัมของกรดแกลลิก/มิลลิกรัมของโปรตีน ซึ่งแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

**5. การตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu**

5.1 การเตรียม 10 % สารละลาย Folin-ciocalteu

5.1.1นำสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 12 ไมโครลิตร

5.2.2 การเตรียม 2 % สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na2CO3) ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต

ปริมาณ 0.2 กรัม และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร

5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid)

5.2.1เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกทั้งหมด 9 ความเข้มข้น ดังนี้12.5, 25,

50, 100, 120, 140, 180 และ200 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร

5.2.2 ชั่งกรดแกลลิก ตามความเข้มข้นต่าง ๆ ที่กล่าวไว้ ดังนี้ 0.0125, 0.025, 0.05, 0.01, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18 และ 0.2 มิลลิกรัม ตามลำดับ

5.2.3 ทำการละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ดังตารางที่ 4)

**ตารางที่ 4** ตารางแสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ปริมาณกรดแกลลิก****(มิลลิกรัม / มิลลิลิตร)** | **ความเข้มข้นของกรดแกลลิก(ไมโครลิตร)** | **ปริมาณน้ำกลั่น****(มิลลิลิตร)** |
| 0.0125 | 12.5 | 987.5 |
| 0.025 | 25 | 975 |
| 0.05 | 50 | 950 |
| 0.1 | 100 | 900 |
| 0.12 | 120 | 880 |
| 0.14 | 140 | 860 |
| 0.16 | 160 | 840 |
| 0.18 | 180 | 820 |
| 0.2 | 200 | 800 |

5.3 การทำกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิก

5.3.1 ปิเปตสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 15 ไมโครลิตร

5.3.2 เติมสารละลายFolin-ciocalteuปริมาตร 125 ไมโครลิตร

5.3.3 เติม 2 % สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที

5.3.4 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

5.3.5 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟกับค่าความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลาย

กรดแกลลิก เพื่อหาสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานสำหรับใช้ในคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

5.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากตัวอย่างน้ำเห็ดทั้ง 3 สูตร

5.4.1 ปิเปตน้ำเห็ดปริมาตร 15 ไมโครลิตร

5.4.2 เติมสารละลายFolin-ciocalteuปริมาตร 125 ไมโครลิตร

5.4.3 เติม 2 % สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 15 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด 30 นาที

5.4.4 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

5.4.5 นำค่าความยาวคลื่นที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยนำค่าที่ได้ไปคำนวณกับสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกรายงานหน่วยเป็นมิลลิกรัมของแกลลิก/มิลลิกรัมของโปรตีน ซึ่งแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

 **6. ศึกษาการยอมรับโดยการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส**

 ศึกษาการยอมรับ ด้าน สี กลิ่น รสชาติเนื้อสัมผัสและความชอบโดยรวม ผู้ชิมเป็นนักศึกษา สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา จำนวน 40 คน ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบ 9 ระดับ (9-Point Hedonic Scale)

 **7. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ**

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติทําซํ้า 3 ครั้ง แสดงผลเป็นค่า mean ± S.D. โดยใช้ one-way ANOVA แบบ Duncan’s multiple comparisons test ค่า p ≤ 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสําคัญ และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากน้ำเห็ดผสมสมุนไพรทั้ง 3 สูตร โดยใช้การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation analysis)

 **(8) การพัฒนาทดลองการสร้างต้นแบบบรรจุภัณฑ์และตราสัญลักษณ์ ดังนี้**

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยเป็นการประชุมกลุ่มย่อยโดยการวิเคราะห์แนวทางในการแก้ปัญหาการบริหารจัดการออกแบบและสร้างตัวอย่างแบบบรรจุภัณฑ์และตราสัญลักษณ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสินค้า OTOP ในจังหวัดตำบลดอนมโนราห์ จังหวัดสมุทรสงคราม โดยใช้วิธีการประชุมกลุ่มย่อย ด้วยการนำเสนอให้กับผู้เชี่ยวชาญ จากหน่วยงานต่าง ๆ เช่น กรมการพัฒนาชุมชน กระทรวงมหาดไทย สำนักงานพาณิชย์ ผู้ผลิตสินค้า OTOP ผู้ผลิตรวมถึงผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องจำนวนผู้ร่วมประชุม 30 ท่าน ซึ่งมีขั้นตอนดำเนินการประชุมกลุ่มย่อย มีดังนี้

 1) รวบรวมข้อมูลที่ได้ผลการวิจัยจากแบบสอบถาม เพื่อกำหนดแนวทางในการตั้งประเด็นคำถามในประเด็นปัญหาต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับสภาพการบริหารจัดการสินค้า OTOP ในจังหวัดตำบลดอนมโนราห์ จังหวัดสมุทรสงคราม

 2) ผู้เชี่ยวชาญจากหน่วยงานต่าง ๆ จำนวน 5 ท่าน ในการดำเนินการประชุมกลุ่มย่อยเพื่อพิจารณาประเด็นปัญหาและหาแนวทางในการแก้ปัญหาการบริหารจัดการเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพด้านการผลิตสินค้า OTOP ในจังหวัดตำบลดอนมโนราห์ จังหวัดสมุทรสงคราม

 3) ในการประชุมกลุ่มมุ่งหาความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้ร่วมประชุมในการหาข้อเท็จจริงหรือความคิดเห็นในแง่มุมต่าง ๆ เพื่อให้ได้คำตอบในประเด็นที่ผู้วิจัยศึกษา

 (9) การสร้างแหล่งเรียนรู้และถ่ายทอดเทคโนโลยีและการหาช่องทางการจัดจำหน่ายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสินค้า OTOP ในจังหวัดตำบลดอนมโนราห์ จังหวัดสมุทรสงคราม

 จากการสังเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จของชุมชนสู่กระบวนการจัดทำศูนย์เรียนรู้ของชุมชน ควรมีองค์ประกอบดังนี้

 1.เพิ่มขีดความสามารถผู้นำชุมชน

 2.สร้างระบบการจัดการความรู้ ในชุมชน

 3. การพัฒนาเศรษฐกิจชุมชนให้เข้มแข็ง

 4. แหล่งเรียนรู้ดิจิทัลในด้านการจัดทำเฟสบุ๊คและไลน์ให้กับกลุ่มชุมชนในจังหวัดสมุทรสงคราม

3.4 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยเป็นการประชุมกลุ่มย่อยโดยการวิเคราะห์แนวทางในการแก้ปัญหาการบริหารจัดการออกแบบและสร้างตัวอย่างแบบบรรจุภัณฑ์และตราสัญลักษณ์ รวมถึงการพัฒนาแหล่งเรียนรู้และถ่ายทอดเทคโนโลยีและการหาช่องทางการจัดจำหน่ายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสินค้า OTOP ในจังหวัดตำบลดอนมโนราห์ จังหวัดสมุทรสงคราม โดยใช้วิธีการประชุมกลุ่มย่อยด้วยการนำเสนอให้กับตัวแทนกลุ่มผู้ผลิตสินค้า OTOP และผู้ผลิตรวมถึงผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องจำนวนผู้ร่วมประชุม 30 ท่าน ซึ่งมีการประเมินความเหมาะสมของบรรจุภัณฑ์และตราสัญลักษณ์ โดยมีการกำหนดเกณฑ์ในการแปลความหมายข้อมูลแบบประมาณค่า (Rating Scale) เป็นค่าเฉลี่ยดังนี้

 คะแนนเฉลี่ยระหว่าง แปลความ

 4.21 – 5.00 มีความเหมาะสมอยู่ในระดับดีที่สุด

 3.41 – 4.20 มีความเหมาะสมอยู่ในระดับดี

 2.61 – 3.40 มีความเหมาะสมอยู่ในระดับปานกลาง

 1.81 – 2.60 มีความเหมาะสมอยู่ในระดับน้อย

 1.00 – 1.80 มีความเหมาะสมอยู่ในระดับน้อยที่สุด

 กำหนดค่าระดับของสภาพการบริหารจัดการสินค้าOTOPและการแปลความหมายข้อมูลจากค่าเฉลี่ย เป็น 5 ระดับ ตามแนวคิดของลิเคิร์ท (Likert Scales) และรวีวรรณ (2542) ดังนี้ดังนี้

 5 หมายถึง ความเหมาะสมมากที่สุด

 4 หมายถึง ความเหมาะสมมาก

 3 หมายถึง ความเหมาะสมปานกลาง

 2 หมายถึง ความเหมาะสมน้อย

 1 หมายถึง ความเหมาะสมน้อยที่สุด