

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

กิจกรรมที่ 1 การทดสอบพันธุ์กระเทียมที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงสำหรับปลูกบนพื้นที่สูง

พื้นที่ดำเนินการทดสอบ:

- ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงวัดจันทร์ อ.กัลยาณิวัฒนา จ.เชียงใหม่ (1,000 MSL)
- บ้านป่าพลู อ.บ้านโฮ้ง จ.ลำพูน (แหล่งพื้นที่ปลูกกระเทียม) (400 MSL)

1. วางแผนการทดสอบแบบ Completely Randomized Design ประกอบด้วยกระเทียม 4 พันธุ์ ทวนซ้ำจำนวน 3 ครั้ง เตรียมกลีบพันธุ์กระเทียมน้ำปาด (จ.อุตรดิตถ์) พันธุ์แม่ฮ่องสอน พันธุ์บ้านโฮ้ง (จ.ลำพูน) และพันธุ์เชียงใหม่ (จ.เชียงใหม่)
2. เก็บตัวอย่างดินเพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีดิน ได้แก่ ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (OM) ปริมาณธาตุอาหารในดิน (N P K)
3. ปลูกทดสอบและขยายพันธุ์กระเทียมทั้ง 4 พันธุ์ ระยะปลูก 20x20 เซนติเมตร จำนวน 1 กลีบต่อหลุม
4. ดูแลรักษาตามระบบการปลูกพืชอินทรีย์
5. บันทึกข้อมูลความงอกของกลีบกระเทียมแต่ละพันธุ์ ที่ระยะ 7-10 วันหลังปลูก
6. เมื่อต้นเจริญเติบโต 30 60 และ 90 วันหลังปลูก บันทึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นกระเทียมแต่ละพันธุ์
7. เก็บเกี่ยว บันทึกข้อมูลผลผลิตน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของกระเทียมแต่ละพันธุ์
8. ทำความสะอาด คัดเลือกหัวพันธุ์กระเทียม บันทึกข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาหัวพันธุ์กระเทียมแต่ละพันธุ์ในแต่ละพื้นที่ พร้อมบันทึกภาพของลักษณะหัวพันธุ์ สีเปลือก สีกลีบของกระเทียม
9. วิเคราะห์สารสำคัญทางเภสัชวิทยา (โภชนาการ) ของกระเทียมที่ปลูกทดสอบ พื้นที่ละ 2 พันธุ์
10. ประมวลผลข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยา คุณค่าทางโภชนาการ ผลผลิตของกระเทียมที่ปลูกในแต่ละพื้นที่
11. คัดเลือกพันธุ์กระเทียมที่เหมาะสมสำหรับปลูกเฉพาะพื้นที่สูง อย่างน้อย 2 พันธุ์
12. สรุปผลการทดสอบ

กิจกรรมที่ 2 การทดสอบวิธีการปลูกกระเทียมด้วยปัจจัยการผลิตอินทรีย์สำหรับพื้นที่สูง

2.1 การทดสอบอัตราการใส่ปุ๋ยอินทรีย์และน้ำหมักชีวภาพจากไข่สำหรับการปลูกกระเทียมพื้นที่สูง

พื้นที่ดำเนินการทดสอบ:

- ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงทุ่งหลวง อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ (800 MSL)
- โครงการขยายผลแบบโครงการหลวงเพื่อแก้ปัญหาพื้นที่เฉพาะบ้านป่าเกี๊ยะใหม่ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ (1,100 MSL)

วางแผนการทดสอบแบบ 3x4 Factorial in Strip plot ทวนซ้ำจำนวน 3 ครั้ง

ปัจจัยที่ 1 อัตราปุ๋ยอินทรีย์ 3 อัตรา ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี ได้แก่

- | | |
|------------|-------------------|
| กรรมวิธี 1 | 25 กิโลกรัมต่อไร่ |
| กรรมวิธี 2 | 50 กิโลกรัมต่อไร่ |
| กรรมวิธี 3 | 75 กิโลกรัมต่อไร่ |

ปัจจัยที่ 2 อัตราการฉีดพ่นน้ำหมักชีวภาพจากไข่ ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี ได้แก่

- | | |
|------------|----------------------------|
| กรรมวิธี 1 | 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร |
|------------|----------------------------|

กรรมวิธี 2	20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธี 3	30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธี 4	40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

- 1) คัดเลือกพื้นที่และเกษตรกรเข้าร่วมทดสอบสาธิต พร้อมทั้งชี้แจงการดำเนินงาน
- 2) เก็บตัวอย่างดินในแปลงของเกษตรกรก่อนปลูกกระเทียม วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของดิน ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (OM) ปริมาณธาตุอาหารในดิน (N P K)
- 3) เตรียมแปลงทดสอบ และใส่ปุ๋ยอินทรีย์ตามแผนการทดสอบ ดังนี้
 - ครั้งที่ 1 ใส่ปุ๋ยอินทรีย์พร้อมไถพรวนดินให้มีขนาดเล็กกล (เตรียมดินรอบ 2)
 - ครั้งที่ 2 ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ ที่ระยะ 30 วันหลังปลูก
 - ครั้งที่ 3 ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ ที่ระยะ 60 วันหลังปลูก
 - ครั้งที่ 4 ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ ที่ระยะ 90 วันหลังปลูก
- 4) ปลูกทดสอบกระเทียมตามแผนการทดสอบร่วมกับเกษตรกร โดยปลูกกระเทียมระยะ 20x20 เซนติเมตร หลังปลูกคลุมด้วยฟางให้ทั่วทั้งแปลง
- 5) ฉีดพ่นฮอร์โมนไข่ ตามแผนการทดสอบในแต่ละระยะ ดังนี้
 - ครั้งที่ 1 ที่ระยะ 30 วันหลังปลูก
 - ครั้งที่ 2 ที่ระยะ 40 วันหลังปลูก
 - ครั้งที่ 3 ที่ระยะ 50 วันหลังปลูก
 - ครั้งที่ 4 ที่ระยะ 60 วันหลังปลูก
 - ครั้งที่ 5 ที่ระยะ 70 วันหลังปลูก
 - ครั้งที่ 6 ที่ระยะ 80 วันหลังปลูก
- 6) การป้องกันกำจัดโรคแมลง สามารถใช้สารชีวภัณฑ์เกษตรได้ตามความจำเป็น
- 7) การดูแลรักษา เรื่อง การให้น้ำ กำจัดวัชพืช ดำเนินการตามการปฏิบัติของเกษตรกร
- 8) การบันทึกข้อมูล
 - ที่ระยะ 30, 60 และ 90 วันหลังปลูก บันทึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นกระเทียมแต่ละพันธุ์
 - ระยะเก็บเกี่ยว บันทึกข้อมูลน้ำหนักสดกระเทียมจากแต่ละกรรมวิธี
 - หลังเก็บเกี่ยว
 - ผึ่งกระเทียมให้แห้งประมาณ 1 เดือน ทำความสะอาดมัดจุกหัวพันธุ์กระเทียมของแต่ละกรรมวิธี ทดสอบ และแขวนหัวพันธุ์ไว้ในโกดัง 8 เดือน
 - บันทึกน้ำหนักกระเทียมจากแต่ละกรรมวิธีการทดสอบเดือนละ 1 ครั้ง จนถึงฤดูปลูกถัดไป
 - แกะกลีบพันธุ์ของกระเทียมจากแต่ละกรรมวิธีเพื่อบันทึกน้ำหนักกลีบพันธุ์
- 9) เก็บข้อมูลต้นทุนการปลูกกระเทียมตลอดฤดูกาลปลูก
- 10) สรุปผลการทดสอบร่วมกับเกษตรกร

2.2 การทดสอบและสาธิตการปลูกกระเทียมอินทรีย์ร่วมกับเกษตรกรพื้นที่สูง

พื้นที่ดำเนินการทดสอบ:

- สถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่ (800 MSL)
- ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงเลอตอ อ.แม่ระมาด จ.ตาก (800 MSL)
- โครงการขยายผลแบบโครงการหลวงเพื่อแก้ปัญหาพื้นที่เฉพาะบ้านขุนตื้นน้อย อ.อมก๋อย จ.เชียงใหม่ (1,000 MSL)

- 1) ประชุมและอบรมให้ความรู้เรื่องการปลูกกระเทียมให้แก่เกษตรกรบนพื้นที่สูง ที่มีความต้องการปลูกกระเทียมเพื่อบริโภคในครัวเรือน
- 2) คัดเลือกพื้นที่และเกษตรกรเข้าร่วมทดสอบสาธิต พร้อมทั้งชี้แจงการดำเนินงาน
 - (1) เก็บตัวอย่างดินจากแปลงของเกษตรกรก่อนปลูกกระเทียม วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของดิน ได้แก่ ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (OM) ปริมาณธาตุอาหารในดิน N P K ปริมาณธาตุแมกนีเซียม (Mg) แคลเซียม (Ca)
 - (2) ชุมชน 5 ทดสอบและสาธิตปลูกกระเทียมร่วมกับเกษตรกรพื้นที่สูง
 - เตรียมแปลงกว้างประมาณ 1.20 เมตร ความสูงของแปลงประมาณ 20 เซนติเมตร ขึ้นแปลงยกร่องแปลงเพื่อทำร่องน้ำหากพื้นที่ค่อนข้างชัน หรือทำร่องน้ำรอบๆ ขอบแปลงเพื่อระบายน้ำ
 - สาธิตการแกะ คัดเลือกกลีบพันธุ์กระเทียม
 - ปลูกกระเทียมหลุมละ 1 กลีบ ลึกประมาณ 1/2 ของกลีบ
 - ระยะปลูก 20 x 20 เซนติเมตร
 - หลังปลูกกระเทียมแล้วคลุมฟางหนา 2-3 นิ้ว เพื่อควบคุมการงอกของวัชพืช และควบคุมความชื้นในดินให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโต สาธิตและฝึกให้เกษตรกรคลุมฟางที่ถูกต้อง (ลดปัญหาการงอกของกลีบกระเทียมที่ไม่สามารถไถ่ฟางได้)
 - หากเกิดวัชพืชขึ้นในแปลง ควรถอนกำจัดด้วยแรงงานคน ช่วงเดือนแรกก่อนระยะสร้างหัว
 - การให้น้ำ โดยให้น้ำขังรอบแปลงและตัดรดทุก 3-5 วัน/ครั้ง โดยสังเกตจากใบกระเทียมถ้าเริ่มเหี่ยวให้ตักน้ำรดทันที หรือให้น้ำท่วมแปลงแล้วระบายออกหรือปล่อยให้ไหลไปยังพื้นที่ที่มีระดับต่ำ หากปลูกบนพื้นที่ดอน ให้น้ำแบบสปริงเกอร์ต้องให้น้ำอย่างทั่วถึง วงการกระจายของน้ำต้องสม่ำเสมอ
 - ใส่ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ จำนวน 4 ครั้งโดยแบ่งใส่ 4 ครั้ง ได้แก่ ช่วงเตรียมดินระยะ , 3060 และ 90 วันหลังปลูก
 - ฉีดพ่นน้ำหมักชีวภาพจากไซอิตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร จำนวน 6 ครั้งในระยะ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 วันหลังปลูก
 - การเก็บเกี่ยว: อายุการเก็บเกี่ยวสำหรับกระเทียมขึ้นอยู่กับพันธุ์ และสภาพอากาศของพื้นที่
 - สาธิตวิธีการตากกระเทียมก่อนเก็บแขวน เนื่องจากบนพื้นที่สูงมีความชื้นของอากาศสูงจึงต้องตากให้แห้งในระดับหนึ่งก่อน ไม่เช่นนั้นจะทำให้ใบกระเทียมเน่าเกิดเชื้อรา
 - บันทึกข้อมูลฐานฐานวิทยาและผลผลิตของกระเทียมแต่ละกรรมวิธีทดสอบ ได้แก่ น้ำหนักสด ขนาดหัว สีเปลือก สีกลีบ ฯลฯ
 - หลังเก็บเกี่ยวแขวนเก็บกระเทียมในที่โล่ง ปลอดภัย และสาธิตวิธีการทำความสะอาดและมัดจุก
- 3) เก็บข้อมูลต้นทุนการปลูกกระเทียม

กิจกรรมที่ 3 การศึกษาและทดสอบวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาของกลีบกระเทียมจากพื้นที่สูง

- 1) วางแผนการทดสอบแบบ 3×3 Factorial in CRD ทวนซ้ำจำนวน 3 ครั้ง

ปัจจัยที่ 1 ลักษณะกลีบกระเทียม 3 ลักษณะ ได้แก่

กรรมวิธี 1 กลีบชั้นนอก

กรรมวิธี 2 กลีบชั้นกลาง

กรรมวิธี 3 กลีบชั้นใน

ปัจจัยที่ 2 อุณหภูมิเก็บรักษา 3 ระดับ ได้แก่

กรรมวิธี 1 อุณหภูมิห้อง (ชุดควบคุม)

กรรมวิธี 2 อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

กรรมวิธี 3 อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

- 2) แกะเตรียมกลีบกระเทียมจากผลผลิตกระเทียมที่ปลูกบนพื้นที่สูงซึ่งไม่ใช่สารเคมี โดยแยกลักษณะกลีบตามกรรมวิธีการทดสอบ
- 3) สุ่มคัดเลือกกลีบกระเทียมแต่ละลักษณะบันทึกภาพกลีบภายนอกและภายใน
- 4) สุ่มตัวอย่างกลีบกระเทียมแต่ละลักษณะจำนวน 50 กลีบต่อถุง บรรจุลงในถุงสุญญากาศ จำนวนซ้ำละ 5 ครั้ง รวมทั้งหมด $3 \times 3 \times 3 \times 5 = 135$ ถุง (ตัวอย่าง)
- 5) นำตัวอย่างกระเทียมในถุงสุญญากาศไปเก็บรักษาในอุณหภูมิตามแผนการทดสอบ
- 6) เริ่มบันทึกข้อมูลการงอกของกลีบกระเทียมจากแต่ละกรรมวิธีการทดสอบ ตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงเดือนตุลาคม เป็นระยะเวลา 5 เดือน โดยบันทึก
 - จำนวนกลีบกระเทียมที่งอกเดือนละครั้ง
 - จำนวนกลีบกระเทียมที่เกิดเชื้อรา
 - จำนวนกลีบกระเทียมที่ฝ่อ
 - จำนวนกลีบที่สมบูรณ์ (ไม่งอก ไม่เน่า ฯลฯ)
 - บันทึกภาพลักษณะกลีบกระเทียมจากแต่ละกรรมวิธีการทดสอบ และผ่าครึ่งกลีบกระเทียมตามแนวยาว บันทึกภาพ
- 7) ประมวลผล และสรุปผลการทดสอบ

กิจกรรมที่ 4 การศึกษาแนวทางการแปรรูปสร้างมูลค่าแก่กระเทียมอินทรีย์

- 1) จัดเตรียมน้ำมันกระเทียมเคมีและกระเทียมอินทรีย์จากพื้นที่สูง
- 2) ศึกษาลักษณะทางกายภาพ และร้อยละของน้ำมันกระเทียมที่ได้จากพื้นที่สูง
- 3) ศึกษาสมบัติทางเคมีของน้ำมันที่ได้จากกระเทียมบนพื้นที่สูงเพื่อประเมินคุณภาพเบื้องต้น เช่น
 - (3.1) การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด (Acid value) เป็นค่าบ่งชี้คุณภาพของน้ำมันกระเทียม โดยเป็นค่าบ่งชี้ว่าไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ที่เป็นส่วนประกอบหลักในน้ำมันซึ่งได้จากการศึกษาหาปริมาณของ Free acid ที่มีอยู่ในน้ำมัน โดยวิธีการไทเทรตจำนวนมิลลิกรัมของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งทำปฏิกิริยาพอดีกับกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ซึ่งค่าที่ได้สามารถนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระได้
 - (3.2) การวิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide value) เป็นค่าที่ใช้การวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยา lipid oxidation ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดกลิ่นหืน (rancidity) เป็นค่าที่บ่งชี้ถึงการเสื่อมเสียของน้ำมันและไขมัน โดยอาศัยการตรวจวัดปริมาณออกไซด์ที่มีอยู่ในน้ำมันและไขมัน ซึ่งวัด

จากการทำปฏิกิริยาสมมูลกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต ถ้าค่า Peroxide value สูง แสดงว่าน้ำมันนั้นเกิด lipid oxidation มาก มีแนวโน้มเกิดกลิ่นหืนมาก เกิดปฏิกิริยา oxidative rancidity มาก

- 4) ศึกษาคุณค่าทางอาหาร (Proximate analysis) เช่น วิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน เยื่อใย อาหาร เถ้า กรดไขมันที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของน้ำมันกระเทียม โดยการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารด้วยวิธีตาม AOAC ส่วนกรดไขมันวิเคราะห์ด้วย GC-MS ดังนี้
- สถานะวิเคราะห์กรดไขมัน (Fatty acid) โดย GC-MS

เครื่องมือวิเคราะห์

- (1) Gas Chromatograph FID ยี่ห้อ Agilent รุ่น 6890N
- (2) Column DB Wax 0.32 ID x 30M film thickness 0.25um
- (3) Water bath shaker

สารเคมีที่ใช้

- (1) methanol 100 mL
- (2) n-Heptane
- (3) methanolic 0.25M KOH โดยชั่ง KOH 14 g ละลาย methanol 100 mL
- (4) Saturated Sodium Chloride โดยละลาย Sodium Chloride ในน้ำ 100 mL เติมนจนกระทั่งไม่ละลาย

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง Saponification

- (1) ปิเปตตัวอย่างน้ำมัน 0.5 mL ใส่ในหลอดนำไปอุ่นที่ water bath 80 องศาเซลเซียส 10 นาที
- (2) เติมน Methanolic 0.25M KOH 0.5 mL เขย่าแล้วไปต้มต่อ 10 นาที
- (3) เติมน n Heptane 0.2 mL เขย่าแล้วไปอุ่น 5 นาที
- (4) รองนสารตัวอย่างเย็น แล้วเติมน saturated Sodium Chloride 0.4 mL ผ่านสารละลาย
- (5) รอประมาณ 10 นาทีจนสารแยกชั้น ปิเปตสารละลายชั้นบนสุดใส่ vial 1.5 mL แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC FID

การฉีดวิเคราะห์ตัวอย่าง

- (1) Injection Volume 1 uL
- (2) Split Mode carrier gas He
Injection port Temp. 250 °C
Pressure 10.92 psi
Total flow 97.5 mL/min
Split ratio 50:1
Split flow 93.1 mL/min
- (3) Column
Pressure 10.93 psi
Flow 1.9 mL/min
Average Velocity: 34 cm/sec
- (4) Column Oven
- Initial temp. 100 °C

- Ramp. 10 °C /min 250 °C Hold time 3 min
- Run time 18 min

(5) FID Detector

- Heater temp. 260 °C
- H₂ Flow 40 mL/min
- Air Flow 40 mL/min
- Makeup flow (He) 25 mL/min

5) วิเคราะห์ปริมาณสารพอลิฟีนอลรวม (Total polyphenol) และสารสำคัญหลัก (major component) หรือสารออกฤทธิ์ (active component) ในน้ำมันที่ได้จากกระเทียมแต่ละชนิดด้วยวิธีการที่เหมาะสม

(5.1) วิเคราะห์ปริมาณสารพอลิฟีนอลรวม (Total polyphenol) โดยชั่งน้ำหนักสารสกัดเตรียมละลายในเอทานอลและแยกเฉพาะส่วนน้ำเพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกโดยรวมโดยการเตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu ประมาณ 10% สารละลายอิมัลชันโซเดียมคาร์บอเนต (Na₂CO₃) ที่ผ่านการกรอง และเตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างเพื่อวิเคราะห์เทียบเป็นกราฟของสารมาตรฐาน โดยเตรียมตัวอย่างทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ปฏิกิริยาด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer โดยการสแกนความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) ของการวัดปฏิกิริยา

(5.2) วิเคราะห์สารสำคัญหลัก (major component) หรือสารออกฤทธิ์ (active component) ในน้ำมันที่ได้จากพืชแต่ละชนิดด้วยวิธีการที่เหมาะสม เช่น วิเคราะห์สาร แกมมาโอโรซานอล ในน้ำมันรำข้าว ด้วย Reverse phase HPLC หรือ spectrometry ที่เหมาะสมหรือน้ำมันหอมระเหยในน้ำมันกระเทียม ด้วยวิธี GC/HPLC เป็นต้น โดยมีสภาวะวิเคราะห์สารสำคัญด้วยวิธี HPLC ดังนี้

คอลัมน์ Zorbax SB-C18

StableBond Analytical 4.6 x 250 mm, 5 micron

p/n 880975-902

S/n USCL088158

Agilent, USA

สภาวะ Injection volume = 5 μ L

Mobile phase:

1. Acetonitrile: 0.1% TFA = 70:30

2. MeOH: Water = 75:25 (220 nm) สำหรับวิเคราะห์ Allicin

3. Hexane: Ethylacetate = 7:3 (220 nm) สำหรับวิเคราะห์ gamma-oryzanol

เครื่อง HPLC 8

Shimadzu, Japan

Prominence-I LC-2030

6) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันที่ได้จากกระเทียม ดังนี้

(6.1) ฤทธิ์ลดหรือยับยั้งภาวะเมแทบอลิกซินโดรมในโรคติดต่อไม่เรื้อรัง เช่น เบาหวาน ไขมัน และความดัน เป็นต้น โดยการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเมแทบอลิซึมและกิจกรรมเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -amylase และ α -glucosidase ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA Reductase (HMG-CoA) เพื่อประเมินฤทธิ์ลด/ยับยั้งภาวะเมแทบอลิกซินโดรม (เบาหวาน ไขมัน ความดัน) โดยผ่านการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเมแทบอลิซึมและกิจกรรมเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง คือ

- ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ α -amylase และ α -glucosidase ของน้ำมันโดย ดัดแปลงตามวิธีการของ Oyedemi et al. (2017)
- ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) โดยการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin Converting Enzyme เป็นวิธีการที่จะประเมินความสามารถในการลดการเกิดโรคความดันโลหิตสูงของสารสกัด โดยใช้ชุดทดสอบ ELISA kit (ดัดแปลงตามวิธีการของ Matthew et al., 2007)
- ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA Reductase (HMG-CoA) วิเคราะห์โดยใช้ HMG-CoA reductase assay kit โดยเตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำปฏิกิริยาทดสอบกับสารตั้งต้นหรือ substrate ของเอนไซม์ HMG CoA reductase และคำนวณค่าร้อยละการยับยั้ง ดังสูตรที่ 1 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่เกิดปฏิกิริยาและวัดการเกิดปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Uv-Vis spectrophotometer (Baskaran et al., 2015)

$$\text{Inhibition \%} = \left(\frac{\Delta \text{ Absorbance control} - \Delta \text{ Absorbance test}}{\Delta \text{ Absorbance control}} \right) \times 100$$

(6.2) ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันหรืออนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) โดยใช้วิธีการที่ศึกษาที่เหมาะสม เช่น ABTS assay, FRAP หรือ Lipid peroxidation assay

- ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธีการ ABTS assay (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonic acid)) free radical decolorization assay (Saenjum et al., 2010)
- ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธีการ FRAP (Ferric reducing/antioxidant power) (Benzie and Strain, 1996)
- ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด Lipid peroxidation เทียบกับฤทธิ์ของสารมาตรฐาน โดยดัดแปลงตามวิธีของ Iwueke และคณะ (Iwueke et al., 2010)

(6.3) ฤทธิ์ต่อสมดุลจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร โดยศึกษาผลต่อการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียชนิดที่เป็นประโยชน์และไม่ส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดก่อโรคที่มีรายงานพบในระบบทางเดินอาหารมนุษย์ เช่น แบคทีเรียชนิดดี *Lactobacillus* sp. และ *Bifidobacterium* sp. ตัวแทนแบคทีเรียก่อโรค เช่น *E. coli* *Salmonella* sp.

ศึกษาโดยการทดสอบอัตราส่วนของสารทดสอบต่าง ๆ ต่อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบชนิดดีและชนิดก่อโรคที่เป็นตัวแทนในการศึกษา โดยใช้ตัวแทนแบคทีเรียชนิดดี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus paracasei* และ *Bifidobacterium lactis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียตัวแทนของ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เป็นตัวแทนของแบคทีเรีย

ชนิดที่ส่งเสริมสุขภาพ ที่เรียกว่า โพรไบโอติก โดยนำมาทดสอบกับสารทดสอบ ดังนี้ เพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติก ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) และอาหาร MRS ผสม 0.05% Cysteine สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. และ *Bifidobacterium* sp. ตามลำดับ และจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นตัวแทนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร คือ *Escherichia coli* และ *Salmonella Typhi* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Broth (TSB) โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารทดสอบอัตราส่วนต่าง ๆ เป็นแหล่งอาหารทดแทนแหล่งคาร์บอนหลัก คือ กลูโคส หรือ เด็กซ์โตรส (Dextrose) ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรปกติ และศึกษาการเจริญของแบคทีเรียโดยทดสอบการเพาะเลี้ยงร่วมกันนั้น จะผ่านการทดสอบเพื่อยืนยันผลว่าสูตรอาหารสามารถใช้ทดสอบการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละชนิดได้ แล้วจึงนำแบคทีเรียทดสอบทุกชนิดมาเพาะเลี้ยงร่วมกัน และติดตามการเจริญโดยการตรวจนับปริมาณด้วยวิธีการ pour plate technique และ spread plate technique ตามความเหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิด และบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส ที่ aerobic/anaerobic condition ตามความเหมาะสมของแบคทีเรียแต่ละชนิด และตรวจติดตามเก็บตัวอย่าง ณ เวลา 0 12 และ 24 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกันเพื่อตรวจติดตามปริมาณแบคทีเรีย โดยการศึกษาจะศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในสูตรอาหารที่ผสมสารทดสอบเปรียบเทียบกับสูตรอาหารปกติ

- 7) จัดทำต้นแบบน้ำมันกระเทียมบรรจุแคปซูลนัม
- 8) ศึกษาความคงตัว (Stability test) และทดสอบสมบัติทางเคมีกายภาพของตำรับที่ได้ โดยศึกษาความคงตัว ที่สภาวะต่าง ๆ เช่น ที่สภาวะเร่ง ที่อุณหภูมิ $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ และความชื้น $60 \pm 5\% \text{RH}$ และที่สภาวะปกติ ที่อุณหภูมิ $4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ เป็นต้น
- 9) สรุปผลการวิจัย