บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างแหนม ทำการเก็บตัวอย่างแหนมดิบพร้อมบริโภค ที่บรรจุในวัสดุต่าง ๆ เช่น ถุงพลาสติก หลอดพลาสติก ใบตอง รวมทั้งที่ไม่ใช้วัสดุใดๆบรรจุ ที่จำหน่ายตามร้านค้าในตลาดและซูเปอร์มาร์เกต ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2542 จำนวน 60 ตัวอย่าง จำแนกเป็น

1. แหนมที่มีฉลากผลิตภัณฑ์จำนวน 15 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นจำนวนตัวอย่างแหนมที่มีฉลากผลิตภัณฑ์ทั้งหมดที่มีจำหน่ายในซูเปอร์มาร์เกตและห้างสรรพสินค้า บรรจุในพลาสติก
2. แหนมที่ไม่มีฉลากผลิตภัณฑ์จำนวน 45 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากการสุ่มตัวอย่างจากร้านค้า บรรจุในพลาสติก 16 ตัวอย่าง ใบตอง 14 ตัวอย่าง และไม่ใช้วัสดุใดๆบรรจุ 15 ตัวอย่าง

หมายเหตุ แหนมที่มีฉลากผลิตภัณฑ์หมายถึง แหนมที่มีชื่อฉลาก มีลักษณะบรรจุภัณฑ์ที่ดี มีการระบุสถานที่ผลิตที่แน่นอน มีวันผลิตและวันหมดอายุ

แหนมที่ไม่มีฉลากผลิตภัณฑ์หมายถึงแหนมที่ไม่มีชื่อฉลาก ไม่มีการระบุสถานที่ผลิต ไม่มีวันผลิตและวันหมดอายุ บางชนิดไม่ใช้วัสดุใดๆบรรจุเพื่อการจำหน่าย เช่นแหนมหม้อ แหนมกะละมัง

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ (media) ได้แก่ Trypticase Soy Broth (TSB), Selenite F (SF) broth, Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) , Triple Sugar Iron (TSI), Motility-Indole-Lysine decarboxylation-Lysine deamination (MIL), Mannitol Salt Agar (MSA) , Trypticase Soy Agar (TSA) , Simmon's citrate agar, Urea agar , Brain Heart Infusion (BHI) + plasma , Potato Dextrose Agar (PDA) , Cooked meat medium , Anaerobic Blood Agar (Anaerobic BA) , Blood Agar (BA) ,Glucose O/F , Phenol Red (PR) mannitol

2. น้ำยา (reagent) ได้แก่ Phosphate buffer pH7.2 , Oxidase reagent , 3% H_2O_2 , Kovac's reagent , Polyvalent A-I and Vi antiserum ต่อ Salmonellae

3. ชุดสีย้อมแกรม (Gram stain) ได้แก่ Crystal violet , Gram iodine , 95 % Alcohol , Safranin O

4. เครื่องมือ (equipment) ได้แก่ Incubator , Autoclave , Hot air oven , Blender , Microwave , pH meter , Balance , Water bath , Vortex mixer , Microscope , Anaerobic jar

5. เครื่องแก้ว (glass ware) ได้แก่ Pipette , Test tube , Flask , Beaker , Petri dish , Needle , Loop , Focep , Slide , Rack

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ทำการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ในแหนมตามวิธีมาตรฐานที่กำหนดโดยสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก. 1266-2537)

2. เปรียบเทียบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของแหนมที่มีฉลากผลิตภัณฑ์ กับแหนมที่ไม่มีฉลากผลิตภัณฑ์ โดยใช้วิธีการทางสถิติ standard Z-test

การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ในแหนมตามวิธีมาตรฐานที่กำหนดโดยสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก. 1266-2537) (Association of Official Analytical Chemists , AOAC) ดังนี้

1. การตรวจหาเชื้อ Salmonellae (Desmedth and Bolderdijk. 1987:658-661)

1.1 ชั่งตัวอย่างแหนม 25 กรัม ใส่ใน sterile blender จากนั้นเติม TSB 225 มิลลิลิตร นำมาปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ความเร็ว 13000-15000 rpm นาน 2 นาทีบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

1.2 ดูดสารละลายตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร ลงใน SF broth นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง

1.3 ถ่ายเชื้อจาก SF broth ลงบน MSRV 5 จุด นำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง ผลบวกจะพบโคโลนีแผ่สีขาวขุ่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.4 นำโคโลนีมาทดสอบชีวเคมี oxidase , TSI , MIL , Citrate , Urea

1.5 ถ้าเป็นเชื้อ Salmonellae นำเชื้อมาทดสอบยืนยันด้วย polyvalent A-I และ Vi antiserum ต่อเชื้อ Salmonellae

2. การตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Kenneth.1990:449-451)

2.1 ชั่งตัวอย่างแหนม 25 กรัม ใส่ใน sterile blender จากนั้นเติม sterile phosphate buffer 225 มิลลิลิตร ปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน

2.2 ดูดสารละลายตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร ลงใน TSB เขย่าให้เข้ากันจากนั้นบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง

2.3 ดูดสารละลาย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แบ่งใส่ MSA 3 จาน ๆ ละ 0.4 , 0.3 และ 0.3 มิลลิลิตร จากนั้นทำการ spread plate นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง

2.4 เลือกโคโลนีสีเหลืองบน MSA นำมาย้อมแกรม ถ้าเป็นแกรมบวกรูปร่างกลม นำมาทดสอบ catalase , glucose O/F , coagulase , PR mannitol

3. การตรวจหาเชื้อ *Clostridium perfringens* (นคร พจนวรพงษ์ และคณะ. 2525:136) (Baron , Peterson , Finegold , *et al.*1994:504-514)

3.1 ชั่งตัวอย่างแหนม 25 กรัม ใส่ใน sterile blender จากนั้นเติม sterile phosphate buffer 225 มิลลิลิตร ปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.2 ดูดสารละลายตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Cooked Meat medium จากนั้นนำไปต้มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ราดทับด้วย paraffin oil นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 1-4 วัน สังเกตุความขุ่นของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3 ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น นำมาย้อมแกรม เพาะเลี้ยงบน BA ในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic condition) และเพาะเลี้ยงบน Anaerobic BA ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน (anaerobic condition)

3.4 ถ้าเป็นเชื้อแกรมบวกรูปร่างแท่ง เจริญได้เฉพาะในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน และให้ double zone β-hemolysis ให้นำมาทดสอบ reverse CAMP test

4. การตรวจหาเชื้อราต่อตัวอย่างแหนม 1 กรัม (Kenneth.1990:428-429)

4.1 ชั่งตัวอย่างแหนม 25 กรัม ใส่ใน sterile blender เติม sterile phosphate buffer ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน

4.2 ทำการเจือจางสารละลายจากข้อ 4.1 ให้ได้ dilution 10^{-2} , 10^{-3}

4.3 ดูดสารละลายตัวอย่างแหนม dilution 10^{-2} , 10^{-3} ปริมาตร 1 ml ลงใน sterile petri dish ทำ dilution ละ 2 จาน

4.4 เท melted PDA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 วัน

4.5 ตรวจดูโคโลนีของราที่เกิดขึ้นคำนวนเป็นจำนวนโคโลนีของราต่อตัวอย่างแหนม 1 กรัม

เกณฑ์ที่ใช้ในการตัดสิน

ใช้เกณฑ์กำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาของแหนมตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก) (สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม มอก. 1219-2537) ดังนี้

1. Salmonellae ต่อ 25 กรัม	ไม่พบ
2. *Staphylococcus aureus* ต่อ 0.1 กรัม	ไม่พบ
3. *Clostridium perfringens* ต่อ 0.1 กรัม	ไม่พบ
4. เชื้อรา ต่อ 1 กรัม	< 10 colony

หมายเหตุ ถ้าตรวจพบเชื้อดังกล่าวข้างต้นเพียงเชื้อเดียวถือว่า ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學