

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. รูปแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงวิเคราะห์ (Analytical Research) โดยศึกษาคุณภาพทาง จุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภค และทำการศึกษาคูณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภคที่เก็บรักษาในระดับอุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน ที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้าและตลาด ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

2. ประชากรและตัวอย่าง

2.1 การศึกษาคูณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภคประเภทต่างๆ ที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้าและตลาด

2.1.1 ประชากร

ในการศึกษาคูณภาพครั้งนี้เป็นอาหารพร้อมบริโภคที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้าและตลาด ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น โดยศึกษาอาหารประเภทอาหารพร้อมบริโภค ในกลุ่มของอาหารปรุงสุกทั่วไปตามเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาสำหรับอาหารทั่วไป ที่มีใช้อาหารควบคุมเฉพาะกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2536 โดยแบ่งอาหารออกเป็น 5 ประเภทตามลักษณะการปรุง ได้แก่ ผัด ยำ น้ำพริก สลัด และขนมหวาน

2.1.2 ตัวอย่าง

การศึกษาคูณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภคประเภทต่างๆ ที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้าและตลาด ที่เก็บรักษาในระดับอุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยทำการเก็บตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภคประเภทต่างๆ ที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้า 3 แห่ง และตลาด 3 แห่งในอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น รวมทั้งหมด 6 แห่ง แห่งละ 5 ประเภท ประเภทละ 1 ตัวอย่างในการเก็บตัวอย่าง 1 ครั้ง ได้แก่ ผัด ยำ น้ำพริก สลัด และขนมหวาน โดยตัวอย่างอาหาร 1 ตัวอย่างผู้วิจัยจะทำการเก็บอาหาร 3 แพ็ค/ถุง และนำตัวอย่างอาหาร 3 แพ็ค/ถุง มาผสมให้เข้ากัน ทำการแบ่งตัวอย่างอาหาร เพื่อตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาทันที 100 กรัม แล้วแบ่งตัวอย่างอาหารที่เหลือ ออกเป็น 9 ส่วนเท่าๆ กัน บรรจุในถุงปราศจากเชื้อ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เพื่อให้ปริมาณตัวอย่างอาหารใกล้เคียงกับสภาพความเป็นจริงมากที่สุดและลด



โอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนในขณะที่ทำการทดลอง การเก็บตัวอย่างอาหารจะเก็บตัวอย่างอาหาร
แห่งละ 5 ครั้ง รวม 150 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนตัวอย่างอาหาร

สถานที่จำหน่าย	จำนวนตัวอย่างอาหาร (ตัวอย่าง)					รวม
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	
ตลาดที่ 1	5	5	5	5	5	25
ตลาดที่ 2	5	5	5	5	5	25
ตลาดที่ 3	5	5	5	5	5	25
ห้างสรรพสินค้าที่ 1	5	5	5	5	5	25
ห้างสรรพสินค้าที่ 2	5	5	5	5	5	25
ห้างสรรพสินค้าที่ 3	5	5	5	5	5	25
รวม	30	30	30	30	30	150

ตัวอย่างอาหาร 1 ตัวอย่าง

- ทำการวิเคราะห์ที่ระดับอุณหภูมิห้องตามสภาพจริง อุณหภูมิ 30° ซ และอุณหภูมิ 10°C โดยทำ
การตรวจวิเคราะห์ทันที และหลังการเก็บรักษา 4, 24 และ 48 ชั่วโมง

= (อุณหภูมิ 3 ระดับ×เวลาหลังการเก็บรักษา 3 เวลา)+ ตรวจวิเคราะห์ทันที 1 ครั้ง = 9 ครั้ง

- ทำการตรวจซ้ำในแต่ละหน่วยการทดลองละ 3 ซ้ำ

ดังนั้น การทดลองในครั้งนี้มีตัวอย่างทั้งหมด $150 \times 9 \times 3 = 4,050$ ตัวอย่าง

2.1.3 การสุ่มตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภครandom โดยวิธีการสุ่มแบบสองขั้นตอน (Two-stage
random sampling) ขั้นตอนแรกสุ่มห้างสรรพสินค้าและตลาดตามความเหมาะสม ให้กระจาย
ครอบคลุมแหล่งจำหน่ายต่างๆ ที่สำคัญ โดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างอย่างง่าย (Simple Random
Sampling) ด้วยวิธีการจับฉลาก โดยแบ่งเป็นห้างสรรพสินค้า 3 แห่ง และตลาด 3 แห่ง

ขั้นตอนที่สองสุ่มเลือกอาหารพร้อมบริโภครandom ที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้าและตลาด
ตามประเภทของอาหารที่กำหนดให้ได้จำนวนตัวอย่างไม่น้อยกว่าที่กำหนดไว้ โดยใช้วิธีการสุ่ม
ตัวอย่างอย่างง่าย (Simple Random Sampling) ด้วยวิธีการจับฉลากแผงขายอาหารในตลาด หรือ
แผนกอาหารสำเร็จรูปแต่ละประเภทในห้างสรรพสินค้านั้น

2.2 การศึกษาสุขภาพโภชนาการของแผนก/แผงลอยอาหาร และผู้สัมผัสอาหารพร้อมบริโภคในห้างสรรพสินค้าและตลาด

2.2.1 ประชากร

ประชากรที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ คือ แผนก/แผงลอยที่จำหน่ายอาหารพร้อมบริโภคและพนักงานที่ปฏิบัติงานในแผนกอาหารพร้อมบริโภคในห้างสรรพสินค้าและผู้จำหน่ายอาหารพร้อมบริโภคในตลาด ในจังหวัดขอนแก่น

2.2.2 ตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างในการศึกษา คือ แผนกอาหารพร้อมบริโภคในห้างสรรพสินค้าซึ่งจะทำการเก็บรวบรวมข้อมูลจากพนักงานที่ปฏิบัติงานในหน้าที่บรรจุ และจำหน่ายอาหารทุกคนในทุกแผนกที่ผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างอาหารเพื่อตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา เนื่องจากในห้างสรรพสินค้าได้จัดแผนกจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภคเพียง 1 จุด โดยทำการศึกษาพร้อมกับการเก็บตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภค ห้างสรรพสินค้าละ 5 ครั้ง

สำหรับแผงลอยที่จำหน่ายอาหารพร้อมบริโภคในตลาดจะทำการเก็บรวบรวมข้อมูลจากผู้จำหน่ายที่ปฏิบัติงานในหน้าที่บรรจุ และจำหน่ายอาหารทุกคนในแผงลอย จากการสำรวจของผู้วิจัยมีจำนวนแผงลอยจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภคในตลาดที่ 1, 2 และ 3 ทั้งหมด 37, 28 และ 11 แผงลอย ตามลำดับ รวมมีแผงลอยจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภคทั้งหมด 76 แผงลอย ในการวิจัยครั้งนี้ได้คำนวณตัวอย่างเพื่อประเมินค่าสัดส่วนของประชากร กรณีประชากรมีขนาดเล็ก

สูตรการคำนวณขนาดตัวอย่าง (อรุณ จิรวัฒน์กุล, 2542)

$$n = \frac{NZ_{\alpha/2}^2 P(1-P)}{e^2(N-1) + Z_{\alpha/2}^2 P(1-P)}$$

โดย n = ขนาดกลุ่มตัวอย่าง

$Z_{\alpha/2}$ = ระดับความเชื่อมั่นของการประมาณ (95% CI) จะได้ค่า $Z = 1.96$

N = จำนวนประชากร

e^2 = ความแม่นยำของการประมาณ

$P(1-P)$ = ความแปรปรวนของตัวแปรที่จะศึกษา คำนวณจากค่าสัดส่วน (P) ของตัวแปรที่ต้องการประมาณค่า (ค่า P ได้จากการศึกษาของ อารยา เจียไพบูลย์, 2541 ที่พบว่ามีย่านอาหารที่ปฏิบัติไม่ถูกต้องตามหลักสุขภาพ ร้อยละ 37)

แทนค่า $N = 76$, $Z_{0.025} = 1.96$, $e = 0.05$, $P = 0.37$, $P(1-P) = 0.23$

$$n = \frac{(76)(1.96)^2 0.23}{(0.05)^2 (76-1) + (1.96)^2 0.23} = 41.78$$

จำนวนตัวอย่างที่คำนวณได้ เท่ากับ 42 แผลลอย

ดังนั้น เพื่อให้ผลการศึกษาสุขภาพของแผนก/แผลลอยอาหาร และผู้สัมผัสอาหาร พร้อมบริโภค นำมาเชื่อมโยงกับการศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภคได้อย่างเหมาะสม ผู้วิจัยจึงทำการเก็บรวบรวมข้อมูลทางด้านสุขภาพจากผู้จำหน่ายที่ปฏิบัติงานในหน้าที่บรรจุ และจำหน่ายอาหารทุกคนในแผลลอยที่ทำการเก็บตัวอย่างอาหารเพื่อตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา โดยทำการศึกษาพร้อมกับการเก็บตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภค ตลาดละ 5 ครั้ง ครั้งละ 5 แผลลอย

3. การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภค

3.1 การตรวจหา *E. coli* โดยวิธี MPN (most probable number) ระบบ 3, 3, 3

3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์

- 3.1.1.1 ตู้บเพาะเชื้อ (Incubator)
- 3.1.1.2 หม้อนึ่งอัดความดัน (Autoclave)
- 3.1.1.3 เตาอบร้อน (Hot-air Sterilizing Oven)
- 3.1.1.4 เครื่องชั่งอย่างละเอียด (Analytical balance)
- 3.1.1.5 เครื่อง Stomacher
- 3.1.1.6 เครื่อง Vortex
- 3.1.1.7 ตู้เย็น

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์

- 3.1.2.1 หลอดแก้วทดลอง (Test Tube)
- 3.1.2.2 หลอดดักก๊าซ (Durham Tube)
- 3.1.2.3 กระบอกตวง (Cylinder)
- 3.1.2.4 ปิเปต (Measuring Pipette)
- 3.1.2.5 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.1.2.6 ห่วงเช็ยเชื้อ (Wire loop)

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์

- 3.1.3.1 Lauryl Tryptose Broth
- 3.1.3.2 EC Medium
- 3.1.3.3 EMB agar

3.1.3.4 SIM medium

3.1.3.5 MR-VP medium

3.1.3.6 Simmon's citrate agar

3.1.3.7 สารละลายบัฟเฟอร์

3.1.4 วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.4.1 ชั่งน้ำหนักสาร Lauryl Tryptose Broth ปริมาณ 35.6 กรัม, EC Medium ปริมาณ 37 กรัม, EMB สำเร็จรูปจำนวน 36 กรัม

3.1.4.2 ละลายสารแต่ละชนิดที่ชั่งในน้ำอุ่น ให้ได้ปริมาณ 1000 มิลลิลิตร

3.1.4.3 ตวงอาหารเหลวแต่ละชนิดใส่หลอดทดลองที่มีหลอดคักก๊าซ หลอดละ 10 มิลลิลิตร จำนวน 9 หลอด

3.1.4.4 นำไปฆ่าเชื้อในตู้ Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.1.5 วิธีการเจือจางตัวอย่างอาหาร

3.1.5.1 เตรียมและตวงสารละลายบัฟเฟอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 9 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด

3.1.5.2 ชั่งตัวอย่างอาหาร ปริมาณ 50 กรัม ใส่ถุงพลาสติก นำเข้าเครื่องตีอาหาร เพื่อตีให้ตัวอย่างอาหารละเอียด

3.1.5.3 แบ่งตัวอย่างอาหารที่ละเอียดแล้ว ปริมาณ 5 กรัม ผสมในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ ปริมาณ 45 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ทำการเจือจาง 1 : 10)

3.1.5.4 ปิเปิดตัวอย่างอาหารที่ละลายในบัฟเฟอร์จากข้อ 3.1.5.3 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เทลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาณ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ทำการเจือจาง 1 : 100)

3.1.5.5 ปิเปิดตัวอย่างอาหารที่ละลายในบัฟเฟอร์จากข้อ 3.1.5.4 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เทลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาณ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ทำการเจือจาง 1 : 1000)

3.1.6 การเตรียมและการเจือจางอาหารตัวอย่าง

3.1.6.1 นำอาหารตัวอย่างที่ได้จากห้างสรรพสินค้าในปริมาณประมาณ 500 กรัม ในภาชนะบรรจุที่แต่ละร้านจัดเตรียมไว้ มาแบ่งชั่งน้ำหนักให้ได้ 25 กรัม โดยใช้ช้อนที่มีการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ต้กอาหารใส่ลงในถุงตีบค(Stomacher bag) ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 225

มิลลิลิตรผสมอยู่ นำไปตีบดด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลาอย่างน้อย 30 วินาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 (10^{-1})

3.1.6.2 เขย่าให้อาหารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดสอบบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:100 (10^{-2})

3.1.6.3 ทำให้อาหารตัวอย่างมีความเจือจางจนถึง 1:1000 (10^{-3})

3.1.7 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ AOAC (2000) (Speck, M.L., 1984)

3.1.7.1 ใช้ปิเปตดูดสารละลายของอาหารตัวอย่างที่ถูกเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-3} ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Tryptose Broth ความเจือจางละ 3 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร (9 หลอดต่อหนึ่งตัวอย่าง/ใช้เวลาไม่เกิน 15 นาทีในการทำแต่ละตัวอย่าง)

3.1.7.2 นำหลอดอาหารตัวอย่างทั้งหมดไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง และ 48 ± 3 ชั่วโมง สังเกตหลอดที่ขุ่นและเกิดก๊าซในหลอดคักก๊าซในหลอดอาหารตัวอย่างแต่ละหลอด หลังจากบ่มครบ 24 ชั่วโมง และหากหลอดใดไม่เกิดก๊าซบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมงจึงนำมาตรวจผลอีกครั้งหนึ่ง

3.1.7.3 การตรวจสอบยืนยันผล ถ่ายเชื้อจำนวน 1 loop ที่ให้ผลบวกในข้อ 3.1.7.2 ลงในหลอดเลี้ยงเชื้อที่บรรจุ EC medium พร้อมหลอดคักก๊าซ

3.1.7.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 44.5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3.1.7.5 สังเกตหลอดที่มีก๊าซในหลอดคักก๊าซแสดงว่าให้ผลบวก นับและจดบันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก และนำทุกหลอดที่ผลบวกไปตรวจยืนยันตามข้อถัดไป

3.1.7.6 แยกเชื้อที่ให้ผลบวก streak plate ลงใน EMB agar โดยทำทุกหลอดที่เกิดก๊าซ

3.1.7.7 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบโคโลนี (มองด้วยตา) มีสีชมพูเข้มตรงกลาง และมีสีวาวของโลหะ (Metallic sheen) เป็น *E. coli* ไม่มีสีโลหะ (Metallic sheen) ไม่เป็น *E. coli*

3.1.8 การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์

บันทึกจำนวนหลอดในอาหาร EC medium ที่ให้ผลทางชีวเคมีเป็น *E. coli* ไปอ่านค่า MPN ในตาราง (ภาคผนวก ข) แล้วคำนวณหาปริมาณ *E. coli* ต่อตัวอย่างอาหาร 1 กรัม

3.2 การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Staphylococcus aureus*

3.2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.2.1.1 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)

- 3.2.1.2 หม้อนึ่งอัดความดัน(Autoclave)
- 3.2.1.4 เครื่องชั่งอย่างละเอียด(Analytical balance)
- 3.2.1.5 เครื่อง Stomacher
- 3.2.1.6 เครื่อง Vortex
- 3.2.1.7 ตู้เย็น

3.2.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์

- 3.2.2.1 หลอดแก้วทดลอง (Test Tube)
- 3.2.2.2 ขวดแก้วรูปชมพู่ (Flask)
- 3.2.2.3 กระจกบอกลวด (Cylinder)
- 3.2.2.4 ปิเปต (Measuring Pipette)
- 3.2.2.5 แท่งแก้วสามเหลี่ยม
- 3.2.2.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.2.2.7 จานเพาะเชื้อ (Peri Dish)

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์

- 3.2.3.1 สารละลายบัฟเฟอร์ (0.85% NaCl)
- 3.2.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ (Gelatin Mannitol Salt Agar หรือ *Staphylococcus medium*

no.110)

3.2.4 วิธีเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

- 3.2.4.1 ชั่งน้ำหนักสาร NaCl ปริมาณ 0.34 กรัม
- 3.2.4.2 ละลายสารที่ชั่งในน้ำอุ่น ปริมาณ 250 มิลลิลิตร
- 3.2.4.3 ตวงใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด
- 3.2.4.4 นำไปฆ่าเชื้อในตู้ Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว

นาน 15 นาที

3.2.5 วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.2.5.1 ชั่งน้ำหนักสาร Gelatin Mannitol Salt Agar ปริมาณ 149.5 กรัม
- 3.2.5.2 ละลายสารที่ชั่งในน้ำอุ่น ปริมาณ 1000 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้วรูปชมพู่ (Flask)
- 3.2.5.3 ใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาณ 10 มิลลิลิตรเทลงในจานเพาะเชื้อ หมุนให้อาหารกระจายเต็มจาน แล้วปิดฝาจานเพาะเชื้อ จำนวน 3 จาน
- 3.2.5.4 ทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวเป็นวุ้น จึงนำไปใช้งาน

3.2.5.5 นำไปฆ่าเชื้อในตู้ Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.2.6 วิธีการเจือจางตัวอย่างอาหาร

3.2.6.1 เตรียมและดวงสารละลายบัฟเฟอร์ (0.85% NaCl) ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 9 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด

3.2.6.2 ชั่งตัวอย่างอาหาร อย่างละ 25 กรัม ใส่ถุงพลาสติก นำเข้าเครื่องตีอาหาร เพื่อตีให้ตัวอย่างอาหารละเอียด

3.2.6.3 นำตัวอย่างอาหารที่ตีละเอียดแล้ว ผสมในสารละลายบัฟเฟอร์ (0.85% NaCl) ที่เตรียมไว้ ปริมาณ 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ทำการเจือจาง 1 : 10)

3.2.6.4 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่ละลายในบัฟเฟอร์ (0.85% NaCl) จากข้อ 3.2.6.3) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เทลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ (0.85% NaCl) ปริมาณ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ทำการเจือจาง 1 : 100)

3.2.6.5 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่ละลายในบัฟเฟอร์ (0.85% NaCl) จากข้อ 3.2.6.4) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เทลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ (0.85% NaCl) ปริมาณ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ทำการเจือจาง 1 : 1000)

3.2.7 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ AOAC (2000) (Speck, M.L., 1984)

3.2.7.1 นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่แข็งตัวเป็นวันที่เตรียมไว้ มาจำนวน 6 จาน

3.2.7.2 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจางแล้ว (1 : 10) ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 2 จาน แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ตัวอย่างอาหารกระจายให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ พร้อมคว่ำจานให้ผ่ายู่ด้านล่าง

3.2.7.3 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจางแล้ว (1 : 100) ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 2 จาน แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ตัวอย่างอาหารกระจายให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ พร้อมคว่ำจานให้ผ่ายู่ด้านล่าง

3.2.7.4 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจางแล้ว (1 : 1000) ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 2 จาน แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ตัวอย่างอาหารกระจายให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ พร้อมคว่ำจานให้ผ่ายู่ด้านล่าง

3.2.7.5 นำจานเพาะเชื้อเข้าบ่มในตู้อบเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง

3.2.7.6 เมื่อครบเวลา นำจานเพาะเชื้อออกจากตู้อบเพาะเชื้อ แล้วนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยเครื่องนับ โคโลนีเพื่อรายงานผล

3.2.8 การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์

โคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีลักษณะโคโลนีกลม มีสีเหลืองผิวหน้าเป็นมัน โดยจะเลือกจานอาหารที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ประมาณ 30-300 โคโลนี แล้วนับจำนวนจากจานอาหารที่ระดับการเจือจางนั้น หาค่าเฉลี่ยบนจำนวนจานอาหารทั้ง 2 แล้วคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียต่อมล.ของตัวอย่าง ตามวิธีการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี spread plate (ภาคผนวก ข)

3.3 การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella spp.*

3.3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

- 3.3.1.1 ตู้บเพาะเชื้อ (Incubator)
- 3.3.1.2 หม้อนึ่งอัดความดัน(Autoclave)
- 3.3.1.4 เครื่องชั่งอย่างละเอียด(Analytical balance)
- 3.3.1.5 เครื่อง Stomacher
- 3.3.1.6 เครื่อง Vortex
- 3.3.1.7 ตู้เย็น

3.3.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์

- 3.3.2.1 หลอดแก้วทดลอง (Test Tube)
- 3.3.2.2 ขวดแก้วรูปชมพู่ (Flask)
- 3.3.2.3 กระบอกลวดวง (Cylinder)
- 3.3.2.4 ปิเปต (Measuring Pipette)
- 3.3.2.5 แท่งแก้วสามเหลี่ยม
- 3.3.2.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.3.2.7 จานเพาะเชื้อ (Peri Dish)

3.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์

- 3.3.3.1 สารละลายบัฟเฟอร์ (Buffer Peptone Water : BPW)
- 3.3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport Vassiadis Medium (RV)
- 3.3.3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Selenite Cystine Broth (SCB)
- 3.3.3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ DSM-1
- 3.3.3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Salmonella, Shigella Agar (SS)
- 3.3.3.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose-Lysine Deoxycholate Agar (XLD)

3.3.4 วิธีเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ Buffer Peptone Water (BPW)

3.3.4.1 ชั่งน้ำหนักสาร Buffer Peptone Water ปริมาณ 20 กรัม

3.3.4.2 ละลายสารที่ชั่งในน้ำอุ่น ปริมาณ 100 มิลลิลิตร

3.3.4.3 ตวงใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด

3.3.4.4 นำไปฆ่าเชื้อในตู้ Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.3.5 วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport Vassiliadis Medium (RVM) :

3.3.5.1 ชั่งน้ำหนักสาร Rappaport Vassiliadis Medium (RVM) ปริมาณ 1.476 กรัม

3.3.5.2 ละลายสารที่ชั่งในน้ำอุ่น ปริมาณ 30 มิลลิลิตร แล้วตวงใส่หลอดทดลอง ปริมาณ 10 มิลลิลิตร จำนวน 1 หลอดต่อ 1 ตัวอย่างอาหาร (รวมจำนวน 3 หลอด)

3.3.6 วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Selenite Cystine Broth (SCB):

3.3.6.1 ชั่งน้ำหนักสาร Selenite Cystine Broth (SCB) (A 1.9 กรัม + B 0.4 กรัม) โดย A คือ Fluid Selenite Cystine Medium Part A และ B คือ Fluid Selenite Cystine Medium Part B

3.3.6.2 ละลายสารที่ชั่งในน้ำอุ่น ปริมาณ 100 มิลลิลิตร แล้วตวงใส่หลอดทดลอง ปริมาณ 10 มิลลิลิตร จำนวน 1 หลอดต่อ 1 ตัวอย่างอาหาร (รวมจำนวน 3 หลอด)

3.3.7 วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ DMSc Salm Media-1 (DSM-1):

3.3.7.1 ชั่งน้ำหนัก Agar Powder ปริมาณ 3 กรัม

3.3.7.2 ละลายสารที่ชั่งในสารละลาย DSM-1 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิบนเตาไฟฟ้า

3.3.7.3 เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาณ 15 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อ หมุนให้กระจายเต็มจาน แล้วปิดฝาจานเพาะเชื้อ จำนวน 1 จานต่อ 1 ตัวอย่างอาหาร (รวมจำนวน 3 จาน)

3.3.7.4 ทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวเป็นวุ้น จึงนำไปใช้งาน

3.3.8 วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Salmonella, Shigella Agar (SS):

3.3.8.1 ชั่งน้ำหนักสาร Salmonella, Shigella Agar (SS) ปริมาณ 30 กรัม และ Agar Powder ปริมาณ 2 กรัม

3.3.8.2 ละลายสารที่ชั่งทั้งสองในน้ำอุ่น ปริมาณ 500 มิลลิลิตร

3.3.8.3 เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาณ 15 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อ หมุนให้กระจายเต็มจาน แล้วปิดฝาจานเพาะเชื้อ จำนวน 1 จานต่อ 1 ตัวอย่างอาหาร (รวมจำนวน 3 จาน)

3.3.8.4 ทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวเป็นวุ้น จึงนำไปใช้งาน

3.3.9 วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose-Lysine Deoxycholate Agar (XLD):

3.3.9.1 ชั่งน้ำหนักสาร Xylose-Lysine Deoxycholate Agar (XLD) ปริมาณ 28.34 กรัม และ Agar Powder ปริมาณ 2 กรัม

3.3.9.2 ละลายสารที่ชั่งทั้งสองในน้ำอุ่น ปริมาณ 500 มิลลิลิตร

3.3.9.3 เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาณ 15 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อ หมุนให้กระจายเต็มจาน แล้วปิดฝาจานเพาะเชื้อ จำนวน 1 จานต่อ 1 ตัวอย่างอาหาร (รวมจำนวน 3 จาน)

3.3.9.4 ทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวเป็นวุ้น จึงนำไปใช้งาน

3.3.10 วิธีการเจือจางตัวอย่างอาหาร

3.3.10.1 เตรียมและดวงสารละลายบัฟเฟอร์ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 9 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด

3.3.10.2 ชั่งตัวอย่างอาหาร ตัวอย่างละ 25 กรัม ใส่ถุงพลาสติกนำเข้าเครื่องตีอาหาร เพื่อตีให้ตัวอย่างอาหารละเอียด

3.3.10.3 นำตัวอย่างอาหารที่ตีละเอียดแล้ว ผสมในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ ปริมาณ 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ทำการเจือจาง 1 : 10)

3.3.10.4 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่ละลายในบัฟเฟอร์จากข้อ 3.3.10.3) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เทลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาณ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ทำการเจือจาง 1 : 100)

3.3.10.5 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่ละลายในบัฟเฟอร์ (0.85% NaCl) จากข้อ 3.3.10.4) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เทลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ (0.85% NaCl) ปริมาณ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ทำการเจือจาง 1 : 1000)

3.3.10.6 นำตัวอย่างอาหารที่เจือจางแล้วเข้าสู่บเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง

3.3.11 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ วิธีทดสอบ AOAC(2000) (อรุณ บำงตระกูลนนท์,2549)

3.3.11.1 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจางแล้ว (1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองความเจือจางละ 1 หลอดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ RVM เขย่าให้เข้ากัน

3.3.11.2 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจางแล้ว (1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองความเจือจางละ 1 หลอดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ SCB เขย่าให้เข้ากัน

3.3.11.3 นำหลอดทดลองเข้าบ่มในตู้อบเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว ตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงภายในหลอดทดลอง



3.3.11.4 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจางแล้ว (1 : 10) ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DSM-1 แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ตัวอย่างอาหารกระจายให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ พร้อมคว่ำจานให้ฝายู่ด้านล่าง

3.3.11.5 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจางแล้ว (1 : 100) ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DSM-1 แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ตัวอย่างอาหารกระจายให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ พร้อมคว่ำจานให้ฝายู่ด้านล่าง

3.3.11.6 นำงานเพาะเชื้อเข้าบ่มในตู้อบเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 24 ชั่วโมง

3.3.11.7 เมื่อครบกำหนดเวลาของ DSM-1 ให้นำงานเพาะเชื้อออกจากตู้อบเพาะเชื้อ แล้วนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยเครื่องนับโคโลนีเพื่อรายงานผล

3.3.11.8 เมื่อครบกำหนดเวลาของ RVM แล้วถ่ายเชื้อโดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างจากอาหารเลี้ยงเชื้อ RVM (1:10) ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร เทลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SS และ XLD ตามลำดับ แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ตัวอย่างอาหารกระจายให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ พร้อมคว่ำจานให้ฝายู่ด้านล่าง

3.3.11.9 เมื่อครบกำหนดเวลาของ RVM แล้วถ่ายเชื้อโดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างจากอาหารเลี้ยงเชื้อ RVM (1:100) ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร เทลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SS และ XLD ตามลำดับ แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ตัวอย่างอาหารกระจายให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ พร้อมคว่ำจานให้ฝายู่ด้านล่าง

3.3.11.10 นำงานเพาะเชื้อเข้าบ่มในตู้อบเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง

3.3.11.11 เมื่อครบกำหนดเวลา ให้นำงานเพาะเชื้อออกจากตู้อบเพาะเชื้อ แล้วนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยเครื่องนับโคโลนีเพื่อรายงานผล

3.3.12 การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์

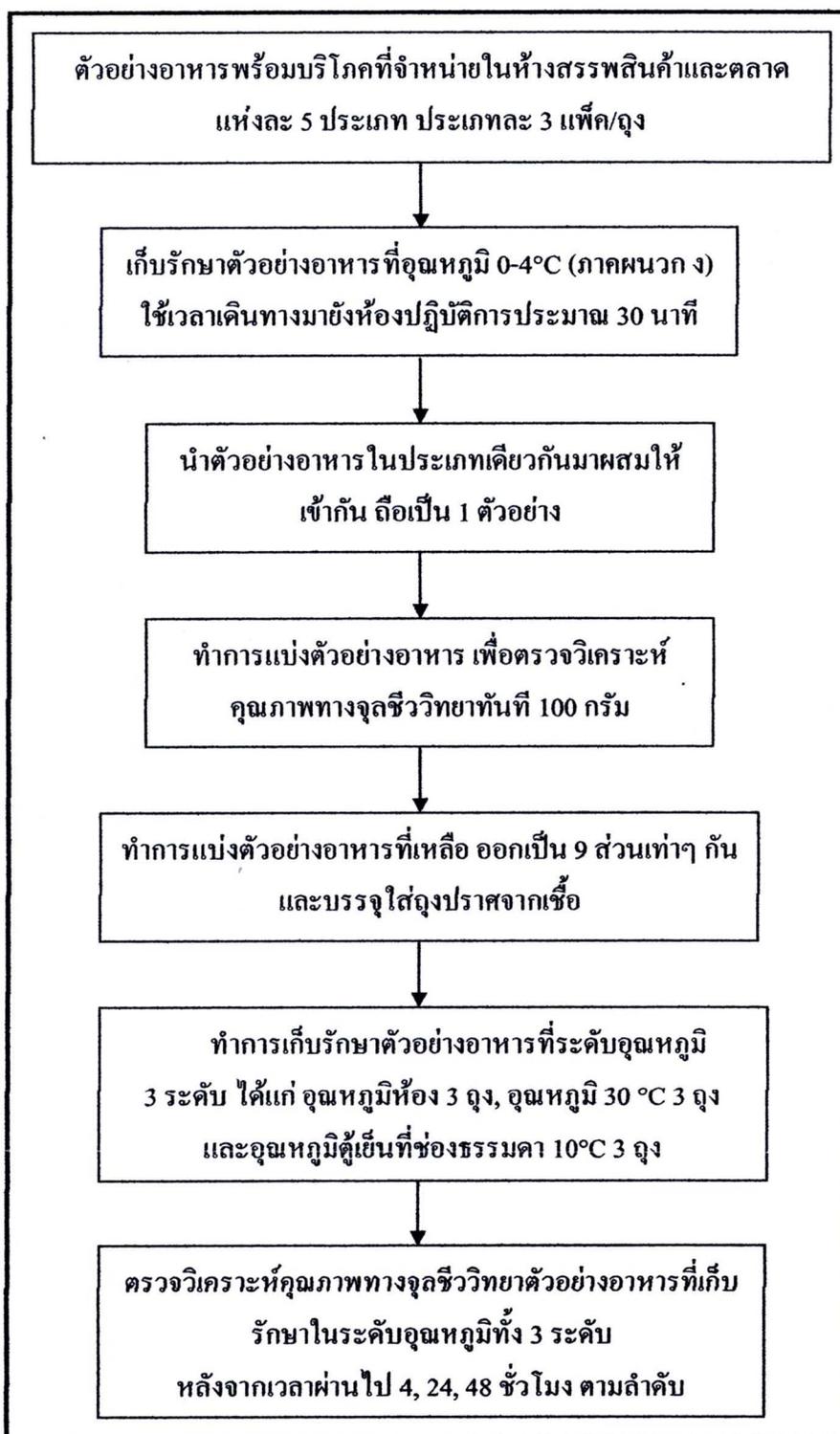
สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ดังนี้

อาหารเลี้ยงเชื้อ RVM เกิดการเปลี่ยนแปลงของอาหารจากสีเขียวอมฟ้าเป็นสีขุ่นเขียว แสดงว่าตัวอย่างอาหารมีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย *Salmonella spp*

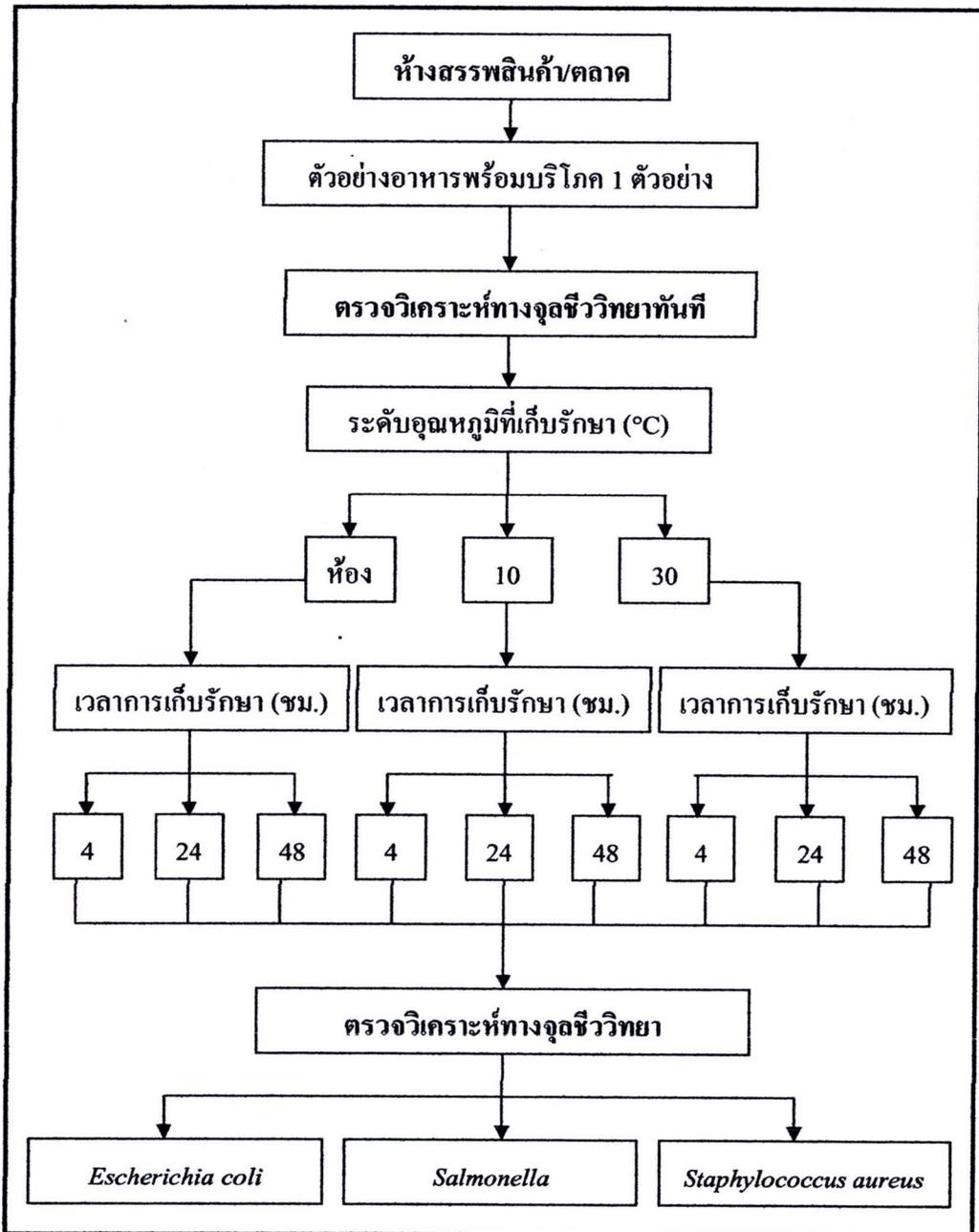
อาหารเลี้ยงเชื้อ SCB เกิดการเปลี่ยนแปลงของอาหารจากสีเหลืองใสมาเป็นสีส้มเกิดตะกอนสีแดงอิฐ แสดงว่าตัวอย่างอาหารมีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย *Salmonella spp*

อาหารเลี้ยงเชื้อ DSM-1 อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดการเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีแดง แสดงว่าในตัวอย่างอาหารมีการปนเปื้อนของ *Salmonella spp*. ชนิดที่สามารถเคลื่อนที่ได้

อาหารเลี้ยงเชื้อ SS Agar และ XLD Agar หากพบโคโลนีสีชมพูจางๆ และบางครั้งพบโคโลนีสีชมพูแดงมีจุดสีดำตรงกลาง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *Salmonella spp*.



ภาพที่ 1 แสดงการศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภคประเภทต่างๆ ที่จำหน่าย
ในห้างสรรพสินค้าและตลาดที่เก็บรักษาในระดับอุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 2 แสดงแผนผังการทดลองเพื่อวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภค 1 ตัวอย่าง

4. การศึกษาสุขภาพโภชนาการของแผนก/แผงลอยอาหาร และผู้สัมผัสอาหารพร้อมบริโภคในห้างสรรพสินค้าและตลาด

4.1 เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

4.1.1 แบบสำรวจการสุขภาพของแผนกอาหารพร้อมบริโภค และผู้สัมผัสอาหารพร้อมบริโภคในห้างสรรพสินค้า

4.1.2 แบบสำรวจการสุขภาพของแผงลอยอาหาร และผู้สัมผัสอาหารพร้อมบริโภคในตลาด

แบบสำรวจทั้งสองได้ทำการปรับปรุงจากข้อกำหนดด้านสุขภาพอาหารสำหรับแผงลอยจำหน่ายอาหาร(กรมอนามัย, 2552) แบบตรวจสอบสุขลักษณะอาหารในซูเปอร์มาร์เก็ตของกองสุขภาพอาหารและน้ำ (กรมอนามัย, 2552) และหลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร (GMP) (กรมอนามัย, 2552) โดยหลังจากที่ทำการปรับปรุงแล้วแบบสำรวจประกอบด้วย 2 ตอน ดังนี้ ตอนที่ 1 แบบสำรวจการสุขภาพของแผนก/แผงลอยอาหารพร้อมบริโภค

ตอนที่ 2 แบบสำรวจการสุขภาพของผู้สัมผัสอาหารพร้อมบริโภค

รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก แบบสำรวจดังกล่าวเป็นแบบสำรวจปลายปิดและปลายเปิด โดยใช้วิธีการสังเกตเป็นหลัก เนื่องจากเป็นข้อกำหนดพื้นฐานด้านสุขภาพอาหารสำหรับแผงลอยจำหน่ายอาหาร และห้างสรรพสินค้า ผู้สัมผัสอาหารต้องปฏิบัติทุกข้อถึงจะอยู่ในเกณฑ์ที่ผ่าน ซึ่งมีเกณฑ์การให้คะแนนดังต่อไปนี้

การปฏิบัติตามหลักสุขภาพอาหาร	คะแนน
ไม่ปฏิบัติ	0
ปฏิบัติ	1

การแปลผลคะแนนการปฏิบัติโดยใช้ค่าเฉลี่ยของคะแนน แล้วนำมาเทียบเกณฑ์ที่ผู้วิจัยได้กำหนดขึ้น ดังนี้

เกณฑ์การปฏิบัติ	คะแนนเฉลี่ย
เกณฑ์การปฏิบัติที่ดี	คะแนนเฉลี่ย 1
เกณฑ์การปฏิบัติที่ไม่ดี	คะแนนเฉลี่ยน้อยกว่า 1

4.2 การตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือ

4.2.1 การหาความตรงตามเนื้อหา (Content Validity) ผู้วิจัยนำแบบสังเกตที่สร้างขึ้น ไปให้ผู้ทรงคุณวุฒิซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญด้านการปฏิบัติตามหลักสุขภาพอาหารของผู้สัมผัสอาหารจำนวน 3 ท่าน เพื่อพิจารณาตรวจสอบความถูกต้อง ความเหมาะสมของข้อความ และความครอบคลุมเนื้อหาเพื่อนำไปปรับปรุงแก้ไขก่อนนำไปสอบถามในการเก็บข้อมูลจริง

4.2.2 การหาความเที่ยงของผู้สังเกต (inter-rater reliability) โดยนำแบบสำรวจที่สร้างขึ้นมาและปรับปรุงแก้ไขแล้วนำไปทดลองสังเกตกับผู้สัมผัสอาหารคนเดียวกันในแผงลอยจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภครูปแบบอื่นๆ ที่จำหน่าย ณ ตลาดและห้างสรรพสินค้า จำนวน 20 คน โดยใช้ผู้สังเกต 2 คน แล้วนำผลที่ได้มาทดสอบว่าตรงกันมากน้อยเพียงใด โดยสูตรของโพลิต และฮูร์เลอร์ (Polit and Hurgler) ใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ความเที่ยงของการสังเกต} = \frac{\text{จำนวนครั้งที่สังเกตเหมือนกัน}}{\text{จำนวนครั้งที่สังเกตเหมือนกัน} + \text{จำนวนครั้งที่สังเกตต่างกัน}}$$

เกณฑ์วัดระดับความเที่ยง

ความเที่ยงของการสังเกต มีค่าระหว่าง 0.40 ถึง 0.60 ถือว่ามี ความเที่ยงระดับปานกลางหรือพอใช้

ความเที่ยงของการสังเกต มีค่าระหว่าง 0.60 ถึง 0.75 ถือว่ามี ความเที่ยงระดับดี (Good)

ความเที่ยงของการสังเกต มีค่าตั้งแต่ 0.76 ขึ้นไป ถือว่ามี ความเที่ยงระดับดีมาก (excellent)

5. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิทยาศาสตร์อนามัยสิ่งแวดล้อม คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

6. การเก็บรวบรวมข้อมูล

6.1 การศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภคประเภทต่างๆ ที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้าและตลาด มีการเก็บรวบรวมข้อมูลดังนี้

6.1.1 ทำการสุ่มตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภคที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้าและตลาด

6.1.2 ดำเนินการเก็บตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภค ที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้าและตลาด ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น โดยเก็บตัวอย่างอาหารประเภทอาหารพร้อมบริโภค ในกลุ่มของอาหารปรุงสุกทั่วไป แบ่งอาหารออกเป็น 5 ประเภท ได้แก่ ผัด ยำ น้ำพริก สลัด และขนมหวาน ทำการเก็บรักษาตัวอย่างอาหารด้วยอุณหภูมิ 0-4°C จากนั้นนำตัวอย่างอาหารไปที่ห้องปฏิบัติการทันที โดยใช้ระยะเวลาในการเดินทางตั้งแต่ห้างสรรพสินค้าและตลาดถึงห้องปฏิบัติการประมาณ 30 นาที

6.1.3 ตรวจสอบวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาทันที

6.1.4 ทำการเก็บรักษาตัวอย่างอาหารที่ระดับอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิห้องตามสภาพเป็นจริง อุณหภูมิ 30°C และอุณหภูมิตู้เย็นที่ช่องธรรมดา (10°C) ตามลำดับ

6.1.5 ทำตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาตัวอย่างอาหารที่เก็บรักษาในระดับอุณหภูมิ ทั้ง 3 ระดับ หลังจากเวลาผ่านไป 4, 24 และ 48 ชั่วโมง

6.1.6 บันทึกข้อมูลของตัวอย่างอาหาร และผลการตรวจวิเคราะห์ลงในแบบบันทึกการทดลอง

6.2 การศึกษาสุขาภิบาลอาหารของแผนก/แผงลอยอาหาร และผู้สัมผัสอาหารพร้อมบริโภคนในห้างสรรพสินค้าและตลาด

6.2.1 ทำการสุ่มกลุ่มตัวอย่างที่จะทำการศึกษา

6.2.2 ชี้แจงวิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล ตลอดจนซักซ้อมความเข้าใจเกี่ยวกับแนวทางสังเกตให้กับผู้ช่วยการศึกษา เพื่อให้เข้าใจถึงวัตถุประสงค์การศึกษา และเพื่อให้ผู้ช่วยการศึกษาทำการสังเกตไปในทางเดียวกัน

6.2.3 ทำการเก็บรวบรวมข้อมูล โดยการเก็บข้อมูลจากการสังเกต โดยใช้แบบสำรวจการสุขาภิบาลของแผนกอาหารพร้อมบริโภค และผู้สัมผัสอาหารพร้อมบริโภคในห้างสรรพสินค้าและแบบสำรวจการสุขาภิบาลของแผงลอยอาหาร และผู้สัมผัสอาหารพร้อมบริโภคในตลาดที่ผู้วิจัยสร้างขึ้นให้ได้ตามจำนวนตัวอย่างที่กำหนด

6.2.4 เก็บรวบรวมข้อมูลจากแบบสำรวจ มาตรวจสอบความถูกต้องครบถ้วนของข้อมูล นำแบบสอบถามที่ถูกต้องเรียบร้อยแล้วมาลงรหัสเพื่อประมวลผล

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

7.1 ตรวจสอบข้อมูล ทั้งความครบถ้วนสมบูรณ์และความถูกต้อง

7.2 จัดเตรียมข้อมูล โดยการลงรหัสข้อมูล

7.3 ประมวลผลข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS FOR WINDOWS VERSION 17.0 ทดสอบสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น = 0.05 โดยแบ่งส่วนการวิเคราะห์ดังนี้

7.3.1 สถิติเชิงพรรณนา ใช้สถิติร้อยละ ค่าเฉลี่ย ค่าสัดส่วน (ร้อยละ) ในการวิเคราะห์ข้อมูล การศึกษาสุขาภิบาลอาหารของแผนก/แผงลอยอาหาร และผู้สัมผัสอาหารพร้อมบริโภคในห้างสรรพสินค้าและตลาด

7.3.2 สถิติเชิงวิเคราะห์ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว เนื่องจากค่าผลการทดลองมีความแปรปรวนที่แตกต่างกันจึงใช้สถิติ Kruskal Wallis One-way analysis of Variance เพื่อทดสอบความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรีย ในการเก็บรักษาอาหารพร้อมบริโภคที่ระดับอุณหภูมิ และระยะเวลาที่แตกต่างกัน

8. ตัวแปรที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย

8.1 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภคประเภทต่างๆ ที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้าและตลาดที่เก็บรักษาในระดับอุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

8.1.1 ตัวแปรต้น ได้แก่

8.2.2.1 ระดับอุณหภูมิในการเก็บรักษา คือ อุณหภูมิห้องตามสภาพเป็นจริง อุณหภูมิ 25°C และอุณหภูมิตู้เย็นที่ช่องธรรมดา (10°C) ตามลำดับ

8.2.2.2 ระยะเวลาในการเก็บรักษาอาหาร คือ ตรวจวิเคราะห์หลังจากเก็บรักษาอาหาร 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

8.2.2.3 สถานที่จำหน่ายอาหารพร้อมบริโภค คือ ห้างสรรพสินค้า และตลาด

8.2.2.4 ประเภทของอาหารพร้อมบริโภค 5 ประเภท ได้แก่ ผัด ยำ น้ำพริก สลัด และขนมหวาน

8.1.2 ตัวแปรตาม ได้แก่ ปริมาณแบคทีเรียที่พบในอาหารพร้อมบริโภค

9. ข้อพิจารณาด้านจริยธรรมในการวิจัย

ผู้วิจัยจะพิทักษ์สิทธิของสถานที่และร้านค้า/แผงลอยที่การจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภค โดยจะไม่ระบุชื่อสถานที่และร้านค้า/แผงลอยที่การจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภคที่ผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภคมาเพื่อทำการทดลองตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาและทำการทดลองดังกล่าว

