บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 น้ำมันหอมระหย

น้ำมันหอมระเหยโหระพา (*Ocimum basilicum*) และกระเพรา (*Ocimum sanctum*) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.จำรูญ เล้าสินวัฒนา ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สาขาวิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานทดลอง

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สายพันธุ์จุลินทรีย์ทดสอบและสภาวะการเจริญเติบโต

เชื้อทดสอบ	อาหาร	อุณหภูมิ(°C)
เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียแลคติก		
Lactobacillus plantarum ATCC 14917^T	MRS	30
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JCM 1157^T	MRS	30
Lactobacillus sakei TISTR 890	MRS	37
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* JCM 6124^T	MRS	30
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* TISTR 942	MRS	30
Enterococcus faecalis TISTR 888	MRS	37
Streptococcus sp. TISTR 1030	MRS	30
เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค		
Salmonella Typhimurium TISTR 292	TSB-YE	37
Escherichia coli TISTR 780	TSB-YE	37
Staphylococcus aureus TISTR 118	TSB-YE	37
Enterococcus faecalis JCM 5803^T	MRS	37
Other Gram-negative bacteria		
Pseudomonas fluorescens JCM 5963^T	TSB-YE	26
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	TSB-YE	26
Aeromonas hydrophila TISTR 1321	NB	30
Listeria innocua ATCC 33090^T	TSB-YE	37
Brochotrix campestris NBRC 11547^T	TSB-YE	26

ATCC = American Type Culture Collection , Rockville, MD

JCM = Japanese Culture of Microorganism ,Wako, Japan

NBRC = National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research

3.3 ตัวอย่างเนื้อทดลอง

ใช้เนื้อสันนอกสุกร (*Longissimus dorsi*) จากบริษัทเฟรชมีท โพรเซสซิ่ง จำกัด จังหวัดนครปฐม นำมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. MRS broth (Merck, Germany)
2. Agar (Criterion, U.S.A.)
3. Tryptic soy broth (Merck, Germany)
4. Yeast extract (BIO BASIC INC, Canada)
5. Nutrient broth (Merck, Germany)
6. Peptone (Merck, Germany)
7. Plate Count Agar (Merck, Germany)
8. Malt extract (Merck, Germany)
9. Methyl Red Voges Proskawer Broth (MR-VP) (Merck, Germany)
10. Simmon's Citrate Agar (Merck, Germany)

3.5 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ตู้เขี่ยเชื้อ Laminar Flow (Dwyer model Mark II, USA)
2. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (WTB Binder model BD, Germany)
3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Auto clave, Hirayama, Japan)
4. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert model CM 500, Germany)
5. เครื่องชั่งชนิดหยาบ (Tanita model 1144, Tanita Corporation, Japan)
6. เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (Vortex Mixer KMC-1300V, Korea)
7. ไมโครปิเปต ขนาด 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Eppendrof, USA)
8. ไมโครเวฟ (Turbora model TRX 249m, Korea)

9. อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath, Memmert, Germany)
10. เครื่องมือวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในเนื้อ (Mettler Toledo model SG-2, Switzerland)
11. เครื่องมือวัดสีของเนื้อ (Hunter, Japan)
12. กระดาษกรอง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
13. ภาชนะบรรจุพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร สูง 4 เซนติเมตร
14. เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็น
15. เครื่องบดเนื้อ

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.7 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ตุลาคม 2552 – กันยายน 2553

3.8 วิธีการทดลอง

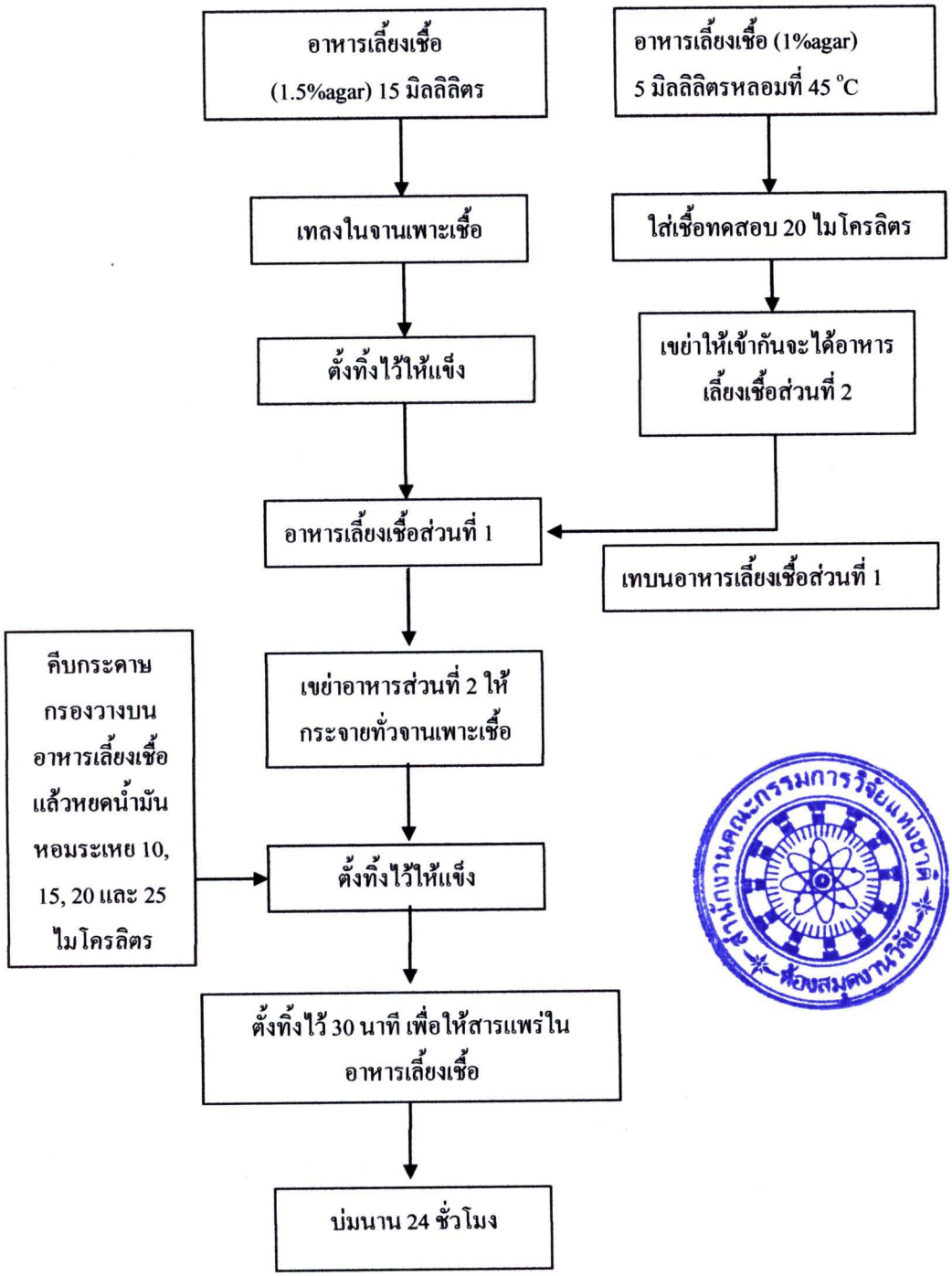
การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การทดสอบในหลอดทดลอง (*In vitro*) และ การทดสอบในเนื้อสันนอกสุกรบด (*In vivo*)

ส่วนที่ 1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาและกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ ทำการศึกษา 3 การทดลอง ได้แก่

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาและกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (*In vitro*) โดยวิธีแพร่ผ่านแผ่นกระดาษกรอง (Disc diffusion method)

เทอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS, TSB-YE หรือ NB ที่มีวุ้น (agar) 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนที่ 1 จากนั้นถ่ายเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 1) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีวุ้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด (ตารางที่ 1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่หลอมตัวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนที่ 2 แล้วเททับลงในอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนที่ 1 ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว ใช้ปากคีบแผ่นกระดาษกรอง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนที่ 2 จากนั้นหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรา ปริมาตร 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร พร้อมวางแผ่นกระดาษกรองที่หยดน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) รอจนกระทั่งน้ำมันหอมระเหยที่หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง นำจานเพาะเชื้อไปบ่ม

ที่อุณหภูมิต่างๆ ตามความเหมาะสมของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 1) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลให้ดูจากบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นจากผลการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแปลผลโดยใช้เวอร์เนียวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณวงใส (Inhibition zone) และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยของโซนใสมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร (ภาพที่ 4)



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาพที่ 4 วิธีการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีแพร่ผ่านกระดาษกรอง

การทดลองที่ 2 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรา ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (minimal inhibition concentration ; MIC) ด้วยวิธี micro-dilution broth susceptibility assay (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999)

นำน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรา ปริมาตรที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาทำให้เจือจางลงครั้งละ 2 เท่า (two-fold serial dilution) อย่างต่อเนื่องกันด้วย 0.5% tween 80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ มี 8 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 5,000, 2,500, 1,250, 625, 312.5, 156.25, 78.12 และ 39.06 ppm. โดยขั้นแรกนำน้ำมันหอมระเหยที่ได้ปิเปตลงใส่ในหลอด eppendoff หลอดละ 20 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด จากตารางที่ 1 ปริมาตร 160 ไมโครลิตร และจุลินทรีย์ทดสอบ (ตารางที่ 1)ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดเดียวกันกับน้ำมันหอมระเหย โดยในแต่ละชุดความเข้มข้นจะมี growth control และ negative control กล่าวคือ growth control ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 160 ไมโครลิตร และจุลินทรีย์ทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตร ส่วน negative control ประกอบด้วย 0.5% tween 80 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 160 ไมโครลิตร และจุลินทรีย์ทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิด (ตารางที่ 1) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตหลอดที่มีตะกอน (pellet) สีขาวที่ก้นหลอด รายงานผลเป็น (+) ส่วนหลอดที่ไม่มีจุลินทรีย์ทดสอบขึ้นหรือหลอดที่ไม่มีตะกอน (pellet) รายงานผลเป็น (-) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายที่ไม่มีตะกอนหมายถึงความเข้มข้นที่ต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC)

การทดลองที่ 3 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรา ต่อการทำลายจุลินทรีย์ (minimal bactericidal concentration ; MBC) ด้วยวิธี micro-dilution broth susceptibility assay (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999)

จากการทดสอบหาค่า MIC ในการทดลองที่ 2 ให้นำหลอดที่ไม่เกิดตะกอนสีขาวทุกหลอดมา streak ในอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิเหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิด (ตารางที่ 1) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รายงานผลเป็น (+) กรณีที่เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รายงานผลเป็น (–) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายที่เชื้อจุลินทรีย์ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถทำลายจุลินทรีย์ทดสอบได้ (MBC)

ส่วนที่ 2 ศึกษาความสามารถของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพด้านกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด ทำการศึกษา 2 การทดลอง ได้แก่

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพาที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และคุณภาพทางกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยกระเพราที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และคุณภาพทางกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด

นำเนื้อสุกรสันนอกบดละเอียด น้ำหนักประมาณ 100 กรัม บรรจุกล่องพลาสติก แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่สองนำน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรา หยดลงบนกระดาษกรองที่ติดไว้บริเวณฝากล่องโดยใช้ปริมาณที่เหมาะสมในการทดลองที่ 1 โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ใช้กระดาษกรอง 1 แผ่น หยด 20 ไมโครลิตร และ ใช้กระดาษกรอง 2 แผ่น หยดแผ่นละ 10 ไมโครลิตร เพื่อกระจายการระเหยให้ทั่วทั้งกล่อง และเก็บที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มตัวอย่างที่ระยะเวลา 0, 1, 3 และ 5 วัน สุ่มตรวจจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (AOAC, 2006) จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ จำนวนเชื้อราและยีสต์ จำนวนโคลิฟอร์ม (Coliform) และ อีโคไล (*E. coli*) คุณภาพทางด้านกายภาพของเนื้อสุกรบด ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าสีของเนื้อ และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำระหว่างการเก็บรักษา

3.9 ขั้นตอนการศึกษาและการเก็บข้อมูล

3.9.1 การศึกษาทางด้านจุลินทรีย์

1. การศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count)

สุ่มตัวอย่างเนื้อสันนอกสุกรบดที่บ่มในระยะเวลาต่างๆ 25 กรัม ในสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 ทำจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมในแต่ละช่วงเวลาการบ่ม จากนั้นดูดสารละลายเจือจางที่ 3 ระดับความเจือจางสุดท้ายความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร และถ่ายลงในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร Plate Count Agar ลงจานเพาะเชื้อปริมาตรจานละ 15 – 20 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ รอจนอาหารแข็งแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g (AOAC, 2006)

2. การศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ (Psychrotrophic bacteria)

สุ่มตัวอย่างเนื้อสันนอกสุกรบดที่บ่มในระยะเวลาต่างๆ 25 กรัม ในสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 ทำจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมในแต่ละช่วงเวลาการบ่ม จากนั้นดูดสารละลายเจือจาง 1 มิลลิลิตร และถ่ายลงในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร Plate Count Agar ลงจานเพาะเชื้อปริมาตรจานละ 15 – 20 มิลลิลิตรที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ รอจนอาหารแข็งแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่

อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน นำมานับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และรายงานผลเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g (Diliello. 1982)

3. การศึกษาราและยีสต์ (Yeast & Mold)

สุ่มตัวอย่างเนื้อสันนอกสุกรบดที่บ่มในระยะเวลาต่างๆ 25 กรัม ในสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 ทำจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมในแต่ละช่วงเวลาการบ่ม จากนั้นดูดสารละลายเจือจาง 1 มิลลิลิตร และถ่ายลงในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร Malt Agar ลงจานเพาะเชื้อปริมาตรจานละ 15 – 20 มิลลิลิตรที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ รอจนอาหารแข็งแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำมานับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และรายงานผลเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g (AOAC, 2006)

4. การศึกษาโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria) และ *Escherichia coli* โดยวิธี Most Probable Number (MPN) อ้างอิงวิธี AOAC (2006)

4.1 Presumptive Test

สุ่มตัวอย่างเนื้อสันนอกสุกรบดที่บ่มในระยะเวลาต่างๆ 25 กรัม ในสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 ทำจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมในแต่ละช่วงเวลาการบ่ม จากนั้นดูดสารละลายเจือจางที่ 3 ระดับความเจือจางสุดท้ายความเจือจางละ 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ LST ที่มีหลอดดักแก๊สคว่ำอยู่ความเจือจางละ 3 หลอด รวม 9 หลอด นำไปบ่มที่ 35±1 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง

4.2 Confirmed Test

ถ่ายเชื้อจากหลอด LST ที่เกิดแก๊สลงในหลอด BGLB หลอดละ 1 loop นำไปบ่มที่ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±2 ชั่วโมง เลือกหลอดที่เกิดแก๊สไปอ่านค่าจากตาราง Most probable numbers (MPN) (ภาคผนวก) มีหน่วยเป็น MPN/g

4.3 Confirmed Test for *E.coli*

ถ่ายเชื้อจากหลอด LST ที่เกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส ลงใน EC broth ที่มีหลอดดักแก๊สคว่ำอยู่ หลอดละ 1 ลูป โดยถ่ายหลอดต่อหลอด นำไปบ่มที่ 45.5±0.2 องศาเซลเซียส 48±2 ชั่วโมง บันทึกผลหลอดที่เกิดแก๊สไปอ่านค่าจากตาราง MPN (ภาคผนวก) มีหน่วยเป็น MPN/g

4.4 Completed Test for *E.coli*

ใช้ลูปถ่ายเชื้อจาก EC broth ที่เกิดแก๊สมา streak บนผิวหน้าอาหาร EMB agar นำไปบ่มที่ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีจะมีสีม่วงหรือดำ อาจมีหรือไม่มีมันวาวคล้ายโลหะ (Metallic Sheen) หรือโคโลนีดังกล่าวมา streak บน PCA slant จำนวน 5 โคโลนี นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ต่อไป

4.5 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (IMViC test)

4.5.1 การทดสอบ Indole โดยการถ่ายเชื้อจากอาหาร Plate Count Agar slant ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptophan Broth แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย Kovac จำนวน 0.2-0.3 มิลลิลิตร ถ้าให้ผล + จะปรากฏสีแดงที่ส่วนบนของ Tryptophan Broth

4.5.2 การทดสอบ Methyl Red และ Acetoin (MR-VP) โดยการถ่ายเชื้อจากอาหารใน Plate Count Agar slant ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MR-VP บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วแบ่งเป็น 2 ส่วนดังนี้

- ทดสอบ Methyl red reaction (MR) โดยเติมสารละลาย Methyl red 5 หยด ลงในสารละลายเชื้อ โดยผลบวกจะให้สีแดง ผลลบจะให้สีเหลือง

- สำหรับ VP โดยถ่ายเชื้อจาก 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแล้วเติม 5% alcoholic - naphthol solution (w/v) ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร และ 40% KOH ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ผลบวกจะให้สีชมพูแดง

4.5.3 การทดสอบ citrate ทำการถ่ายเชื้อใส่อาหาร Simmon's Citrate Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลบวกจะให้สีน้ำเงิน

ตารางที่ 2 การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli*

จุลินทรีย์	Indole	MR	VP	Citrate
Typical *E.coli*	+	+	-	-
Atypicao *E.coli*	-	+	-	-
Typical intermediate	+	+	-	+
Atypical intermediate	-	+	-	+
Typical *Enterbacter aerogenes*	-	-	+	+
Atypical *Enterbacter aerogenes*	+	-	+	+

4.6 การรายงานผล นับจำนวนหลอดที่พบเชื้อ *E.coli* (ตารางที่ 2) ของแต่ละความเจือจาง นำไปอ่านค่าจากตาราง MPN (ภาคผนวก)

3.9.2 การศึกษาคุณภาพทางด้านกายภาพของเนื้อสุกร

1. วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

โดยใช้ probe แทงลงในเนื้อบด ด้วยเครื่องมือวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ในเนื้อ (Mettler Toledo, model SG-2)

2. วัดค่าสีของเนื้อ

ผสมเนื้อบดให้เข้ากัน จากนั้นทำการวัดสีด้วยเครื่องมือวัดสีของเนื้อ (Hunter) เก็บข้อมูล บันทึกค่า L*, a* และ b*

3. การหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษา (% drip loss)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างเนื้อบดก่อนเก็บรักษาเป็นน้ำหนักเริ่มต้น (D1) บรรจุเนื้อบดลงในภาชนะแล้วนำไปบ่มที่ 2-4 °C นาน 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนัก (D2) (Stolowski *et al.* 2006) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษาได้จากสูตรต่อไปนี้

การวัดค่าการสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษา = ((D1-D2) x100) /D1

3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการศึกษาความสามารถของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพด้านกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบดโดยปริมาณจำนวนจุลินทรีย์รวม จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ จำนวนราและยีสต์ จำนวนโคลิฟอร์ม และ *E. coli* นำมาแปลงในค่าลอการิธึม (y = log X) ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าสีของเนื้อ และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษา นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ตามแบบแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Completely Block Design) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) วิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป กำหนดให้

ปัจจัย A คือ กลุ่มการทดสอบ ได้แก่ 1. กลุ่มควบคุม 2. กลุ่มที่บรรจุเนื้อสันนอกสุกรบดในกล่องพลาสติกแล้วหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราบนกระดาษกรอง 1 แผ่น หยด 20 ไมโครลิตร ติดไว้บริเวณฝากล่อง 3. กลุ่มที่บรรจุเนื้อสันนอกสุกรบดในกล่องพลาสติกแล้วหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราบนใช้กระดาษกรอง 2 แผ่น หยดแผ่นละ 10 ไมโครลิตร ติดไว้บริเวณฝากล่อง

ปัจจัย B คือ ระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา Before , After , 1, 3 และ 5 วัน โดย Before หมายถึง ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก After หมายถึง หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก