

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การสำรวจการใช้สารเคมีปราบศัตรูพืชโดยใช้แบบสอบถามเลือกเกษตรกรผู้ปลูกบัวบก 30 ตัวอย่างต่อจังหวัดเป้าหมาย เพื่อให้ได้รับข้อมูลการใช้สารเคมีในแปลงเกษตรกร ประวัติการใช้พื้นที่ปลูกในอดีตเพื่อนำมาประเมินแนวโน้มการปนเปื้อนสารเคมีหรือสิ่งแปลกปลอมในบัวบก

3.2 การวิเคราะห์สารอาหารในบัวบก(nutrient analysis) ตามวิธีของAOAC(2006) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นด้วย drying method(method 950.02) เถ้าด้วยวิธี dry ash method(method 900.02) นำhydrolysis with acid, base and filter method(method 962.09)มาหาเยื่อใยทั้งหมดด้วย หาปริมาณโปรตีนด้วยKjeldahl method(method 984.13) ไขมันด้วยsolvent extraction method(method 991.36) ใช้ precipitate and titration method(method 927.02) วิเคราะห์หาแคลเซียม ส่วนวิธี vanado-molybdate colorimetric method(method 965.17)หาฟอสฟอรัส

3.3 การตรวจการปนเปื้อนชิ้นส่วนแมลง ด้วยกล้องstereo microscope ตรวจสอบชิ้นส่วน ระวังค์ ไข ของแมลงที่อาจปนมากับบัวบก

3.4 การตรวจการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ตามวิธีของAOAC(2005) ยีสต์ เชื้อรา Coliform group (Method 966.24), *Escherichia coli* (Method 992.30) และ *Samonella* spp.(Method 967.25)

การวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ทั้งหมด

นำตัวอย่างใบบัวบกที่ได้จากร้านขายผักในตลาดสด พื้นที่กรุงเทพฯ 9 แห่งได้แก่ รามคำแหง คลองตัน ลานบุญ บางกะปิ หัวตะเข้ นิคมลาดกระบัง มีนบุรี รามอินทราคม. 8 และสะพานใหม่ เก็บตัวอย่างตลาดละ 2 ร้านให้เป็นร้านที่ 1 และร้านที่ 2 จากนั้นสุ่มตัวอย่างใบบัวบกตัวอย่างละ 25 กรัม ใส่ถุงพลาสติกที่ปลอดเชื้อ จากนั้นทำการบดผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เจือจาง ความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร เมื่อเข้า

กันดีแล้วจะได้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 1:10 หรือ 10^{-1} และทำการเจือจางจนถึงระดับความเจือจางที่เหมาะสม แล้วจึงปิเปตสารละลายบัฟเฟอร์ ในแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ แล้วเทอาหาร Plate count agar ที่อุ่นๆ (อุณหภูมิ 42-45 °C) ลงในจานเพาะเชื้อที่เติมตัวอย่างไบบวบกไว้แล้ว จานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร หมุนจานเพาะเชื้ออย่างรวดเร็ว ทำระดับความเจือจางละ 2 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว คั่วจานเพาะเชื้อแล้วนำไปป่มในตู้ป่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี รายงานผลเป็น CFU/g

การวิเคราะห์หยาบและรา

ทำการเติมกรดแลคติกหรือกรดทาทาริกความเข้มข้น 10% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร PDA 100 มิลลิลิตรที่หลอมเหลว เขย่าเบาๆให้เข้ากัน จากนั้นเทอาหาร PDA ที่มีความเป็นกรดลงในจานเพาะเชื้อปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร แล้วนำไปป่มเชื้อที่อุณหภูมิ 21°C + 2°C เป็นเวลา 5-7 วัน และวิธีการทำ dilution ใช้อาหาร 11 กรัมผสมในบัฟเฟอร์ 99 มิลลิลิตร การนับเชื้อ ทำเช่นเดียวกับ standard plate count (Diliello, 1982)

การตรวจวิเคราะห์ Coliform โดยวิธี MPN

ซั่งตัวอย่างไบบวบก แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1:10 เจือจางต่อไปอีกให้เป็น 1:100, 1:1000 แล้วปิเปต 1 มล. ของตัวอย่างอาหารที่เจือจางที่ 1:10, 1:100, 1:1000 ใส่ลงในหลอดแก้วที่มี Lauryl sulfate tryptose broth (LST) 10 มล. (มีหลอด fermentation tube คั่วอยู่ภายใน) ระดับความเจือจางละ 3 หลอด นำหลอดดังกล่าวไปป่มที่ 35°C นาน 24 - 48±2 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูหลอดที่เกิดฟองแก๊สใน fermentation tube แล้วถ่ายเชื้อเฉพาะหลอดที่เกิดฟองแก๊สโดยใช้ loop ลงใน Brilliant green lactose bile (BGLB)broth นำไปป่มที่ 35°C นาน 48±2 ชั่วโมง ตรวจผลหลอด BGLB ที่มีฟองแก๊สเกิดขึ้น จากนั้นนำไปหาค่าโดยเปิดตาราง MPN รายงานผลเป็น MPN Coliform bacteria/g

การตรวจวิเคราะห์ *E. coli*

ถ่ายเชื้อ 1 loop จากหลอด LST ที่มีฟองแก๊สลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth นำหลอดดังกล่าวไปบ่มที่ $45.5 \pm 0.02^{\circ}\text{C}$ นาน 48 ± 2 ชั่วโมง เชื้อเชื้อ 1 loop จากหลอด EC broth ที่มีแก๊สแล้ว streak ลงใน Levine 's eosin methylene blue (EMB) agar นำไปบ่มที่ 35°C นาน 48 ± 2 ชั่วโมง โคโลนีของ *E. coli* จะมีลักษณะสีดำตรงกลาง หรืออาจไม่มีก็ได้ เพื่อเก็บไปจัดจำแนก (identification) โดย Biochemical tests โดยเชื้อเชื้ออย่างน้อย 2 โคโลนี (isolate colony) ถ่ายใส่ PCA agar slant บ่มที่ 35°C นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นประเมินค่า MPN ของ *E. coli* จากจำนวนหลอดของ EC broth ที่มีโคโลนีให้ผลเป็น ++- หรือ -+-

การทดสอบ Biochemical tests (IMVic test)

ทดสอบ In dole

โดยถ่ายเชื้อจาก PCA slant ลงในอาหาร Tryptophan broth บ่มที่ 35°C นาน 24 ± 2 ชั่วโมง แล้ว นำมาเติม Kovacs reagent 0.2-0.3 มล. โดยผลบวกจะปรากฏสีแดงที่ส่วนบน

ทดสอบ MR-VP

ถ่ายเชื้อจาก PCA slant ลงในอาหาร MR-VP บ่มที่ 35°C นาน 24 ± 2 ชั่วโมง แล้ว แบ่งเป็น 2 ส่วนเพื่อทดสอบ methyl red reaction และ VP

ทดสอบ methyl red reaction โดยเติมสารละลาย methyl red 5 หยด ลงในสารละลายเชื้อ โดยผลบวกจะให้สีแดง ผลลบจะให้สีเหลือง

ทดสอบ VP โดยถ่ายเชื้อ 1 มล. ใส่หลอดทดลองแล้วเติม 5% alcohol α -naphthol solution (w/v) ปริมาตร 0.6 มล. และ 40% KOH ปริมาตร 0.2 มล. ผสมทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ผลบวกจะให้สีชมพูแดง

ทดสอบ Citrate

โดยถ่ายเชื้อจาก PCA slant ลงในอาหาร Koser citrate broth บ่มที่ 35°C นาน 96 ชั่วโมง รายงานการเจริญเป็น (+) ไม่เจริญเป็น (-)

ย่อมสีแกรม

นำเชื้อจาก PCA slant ที่มีอายุ 18 ชั่วโมง โดย *Coli form* จะติดสีแดงแกรมลบ ทำการจำแนก (Classification) ที่ได้จากการทดสอบ Biochemical tests

3.5 การตรวจสอบการปนเปื้อนของตะกั่วและสารหนู โดยนำตัวอย่างวัตถุดิบบับวกผง ปริมาณ 3 กรัมมาทำการย่อยด้วยกรดไนตริก จนสารละลายใส นำไปวัดด้วยเครื่อง ICP-MS เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน คำนวณปริมาณตะกั่วและสารหนูที่พบในบับวก

3.6 การตรวจการปนเปื้อนสารกลุ่มออกแทนโนคลอรีนและออกแทนโนฟอสเฟต จาก บับวกในตลาดสดกรุงเทพ ทำการสกัดตัวอย่างตามวิธีของ AOAC (2000) และ วิเคราะห์ปริมาณสาร aldrin และ lindane ด้วยเครื่อง GC-MS

3.7 การทดสอบทางประสาทสัมผัส (hedonic test) นำตัวอย่างชาบับวกสำเร็จรูป มาชง กับน้ำเดือดตั้งทิ้งไว้ 5 นาที และทำ Hedonic test เพื่อประเมินการยอมรับด้านประสาท สัมผัสของผู้บริโภคในเรื่อง กลิ่น สี รสชาติ ของชาบับวกพร้อมชงดื่ม โดยคัดเลือกผู้ชิมที่ นิยมดื่มชาจำนวน 30 คน และแบ่งการยอมรับเป็น 9 ระดับ คือ ชอบมากที่สุด ชอบมาก ชอบปานกลาง ชอบเล็กน้อย ไม่ชอบ ไม่ชอบเล็กน้อย ไม่ชอบปานกลาง ไม่ชอบมาก และไม่ชอบมากที่สุด

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ใช้ผู้ทดสอบที่ไม่ได้รับการฝึกฝนจำนวน 30 คนต่อผลิตภัณฑ์ชา 1 ชนิด ทำการประเมินคุณภาพสี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม โดยให้คะแนนความชอบแบบตามเกณฑ์และนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติเพื่อทดสอบความ แตกต่างของค่าเฉลี่ย

เกณฑ์ในการประเมินผล

แบ่งค่าคะแนนระดับความคิดเห็นออกเป็น 5 ระดับ

- 5 คะแนน หมายถึงชอบมาก
- 4 คะแนน หมายถึงชอบ
- 3 คะแนน หมายถึงอยู่ระหว่างชอบและไม่ชอบ
- 2 คะแนน หมายถึงไม่ชอบ
- 1 คะแนน หมายถึงไม่ชอบมาก

เกณฑ์ในการประเมินผลต่อความชอบต่อลักษณะโดยรวม
แบ่งค่าคะแนนระดับความคิดเห็นออกเป็น 9 ระดับ

- 9 คะแนน หมายถึงชอบมากที่สุด
- 8 คะแนน หมายถึงชอบมาก
- 7 คะแนน หมายถึงชอบปานกลาง
- 6 คะแนน หมายถึงชอบเล็กน้อย
- 5 คะแนน หมายถึงอยู่ระหว่างชอบและไม่ชอบ
- 4 คะแนน หมายถึงไม่ชอบเล็กน้อย
- 3 คะแนน หมายถึงไม่ชอบปานกลาง
- 2 คะแนน หมายถึงไม่ชอบมาก
- 1 คะแนน หมายถึงไม่ชอบมากที่สุด

และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อประเมินการยอมรับในผลิตภัณฑ์สุขภาพพร้อมดื่มและปรับปรุงความชอบโดยรวมให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคต่อไปโดยยังคงคุณค่าทางโภชนาการเพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค