

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการศึกษา

การศึกษาเรื่อง การปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหารของผู้สัมผัสอาหารและคุณภาพอาหาร ทางด้านจุลชีววิทยาในร้านจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภค ครั้งนี้ เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (Descriptive Study) มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหารของผู้สัมผัสอาหารและวิเคราะห์คุณภาพอาหารทางด้านจุลชีววิทยาจากร้านจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภคและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหารของผู้สัมผัสอาหารกับคุณภาพอาหารทางด้านจุลชีววิทยาของร้านจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภคจำนวน 5 ร้าน ณ ตลาดภายในมหาวิทยาลัยของรัฐ ผู้สัมผัสอาหาร จำนวน 10 คน โดยใช้การสังเกตการปฏิบัติของผู้สัมผัสอาหารพร้อมบริโภคประเภทยำ ส้มตำ และสลัด ส่วนตัวอย่างอาหารใช้การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ โดยมีวิธีการศึกษาดังนี้

#### ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรที่ใช้ในการศึกษาคือ ผู้จำหน่ายอาหาร ณ ตลาดภายในมหาวิทยาลัยของรัฐ ส่วนกลุ่มตัวอย่างเลือกแบบเจาะจงมี 2 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่มตัวอย่างผู้สัมผัสอาหารที่ทำหน้าที่เตรียมปรุงอาหาร และจำหน่าย จำนวน 10 คน ในร้านจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภคประเภทยำ ส้มตำ และสลัดจำนวน 5 ร้าน

2. กลุ่มตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภคประเภทยำ ส้มตำ และสลัด ประเภทละ 3 ชนิด จำนวน 5 ร้าน โดยแยกตามชนิดที่ได้รับความนิยมซึ่งสอบถามจากผู้จำหน่าย ประกอบด้วย

อาหารประเภทยำ ได้แก่ ยำรวมมิตร(2 ตัวอย่าง) ยำทะเล ยำวุ้นเส้น ยำหอยแครง และยำเห็ด รวมกลุ่มตัวอย่างประเภทยำจำนวน 6 ตัวอย่าง

อาหารประเภทส้มตำ ได้แก่ ส้มตำปูปลาร้า ส้มตำไทยใส่ปู และส้มตำโคราช รวมกลุ่มตัวอย่างประเภทส้มตำจำนวน 3 ตัวอย่าง

อาหารประเภทสลัด ได้แก่ สลัดรวมผักและผลไม้ น้ำขึ้น (2 ตัวอย่าง) สลัดผลไม้ น้ำขึ้น สลัดผลไม้ น้ำใส และสลัดผักน้ำขึ้น (2 ตัวอย่าง) รวมกลุ่มตัวอย่างประเภทสลัดจำนวน 6 ตัวอย่าง

รวมตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภคทั้ง 3 ประเภทจำนวน 15 ตัวอย่าง

### เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

1. แบบการสังเกตการปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลของผู้สัมผัสอาหาร โดยปรับปรุงจากแบบสังเกตการปฏิบัติตามข้อกำหนดด้านสุขาภิบาลอาหารสำหรับร้านอาหารของ กองสุขาภิบาลอาหารและน้ำ กรมอนามัย (2552) มีทั้งหมด 26 รายการ โดยรายการที่ 1-14 เป็นข้อกำหนดด้านการเตรียมและการปรุงอาหารและรายการที่ 15-26 เป็นข้อกำหนดด้านสุขาภิบาลส่วนบุคคลของผู้สัมผัสอาหาร รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ข เนื่องจากเป็นข้อกำหนดพื้นฐานด้านสุขาภิบาลอาหารสำหรับร้านอาหารผู้สัมผัสอาหารต้องปฏิบัติทุกข้อถึงจะอยู่ในเกณฑ์ที่ผ่าน มีเกณฑ์การให้คะแนนดังต่อไปนี้

การปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหาร	คะแนน
ไม่ผ่าน	0
ผ่าน	1

การแปลผลคะแนนการปฏิบัติโดยใช้ค่าเฉลี่ยของคะแนน แล้วนำมาเทียบเกณฑ์ดังนี้

เกณฑ์การปฏิบัติที่ดี (ต้องปฏิบัติผ่านทุกข้อ)	คือ คะแนนเฉลี่ย 1
เกณฑ์การปฏิบัติที่ไม่ดี (ต้องปฏิบัติไม่ผ่านข้อใดข้อหนึ่ง)	คือ คะแนนเฉลี่ยน้อยกว่า 1

2. เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโคลิฟอร์มทั้งหมด ฟีคอลโคลิฟอร์ม และ *E.coli* ในอาหารพร้อมบริโภคประเภทยำ ส้มตำ และสลัด ใช้วิธีการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ วิธี MPN (most probable numberระบบ 3, 3, 3) มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

#### เครื่องมือประกอบด้วย

1. ตู้อบเพาะเชื้อ (Incubator)
2. หม้อนึ่งอัดความดัน(Autoclave)
3. เตาอบร้อน(Hot-air Sterilizing Oven)
4. เครื่องชั่งอย่างละเอียด(Analytical balance)
5. เครื่อง Stomacher

#### อุปกรณ์ประกอบด้วย

1. ถุงตีบด (Stomacher bag)
2. ปิเปต (Sterile pipette) ขนาด 1.0 , 5.0 และ 10.0 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการอบฆ่าเชื้อ

ที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้

3. จานแก้วเพาะเชื้อ (Petri dish) ขนาด 100x15 มิลลิเมตร ซึ่งผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้
4. หลอดทดลองชนิดฝาปิดหรือฝาเกลียวพลาสติก พร้อมหลอดค้ำก๊าซ (Durham tube)
5. หัวงและเข็มเขี่ยเชื้อ (loop)

### การตรวจสอบคุณภาพของเครื่องมือ

1. กรณีกลุ่มตัวอย่าง คือ ผู้สัมผัสอาหาร เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ แบบการสังเกต การปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหารของร้านจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภค โดยทำการตรวจสอบคุณภาพของแบบสังเกต ดังนี้

1.1 การหาความตรงด้านเนื้อหาของแบบสังเกตการปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหารของร้านจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภค ผู้ศึกษาได้นำแบบสังเกตการปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหารของร้านจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภค ให้ผู้ทรงคุณวุฒิ 3 ท่าน ตรวจสอบความครอบคลุมของเนื้อหา รวมทั้งแก้ไขสำนวนภาษา

1.2 การหาความเชื่อมั่นของเครื่องมือโดยนำแบบสังเกตการปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหารของร้านจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภค ไปทดลองสังเกตกับผู้สัมผัสอาหารคนเดียวกันในร้านจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภคอื่นๆ ที่จำหน่าย ณ ตลาดภายในมหาวิทยาลัยของรัฐ โดยใช้ผู้สังเกต 2 คน นำผลมาพิจารณาความสอดคล้องกันทุกรายการของผลการสังเกตโดยหาความเชื่อมั่นใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (r) ได้ค่าความเชื่อมั่น 0.96 (เกียรติสุดา ศรีสุข, 2549)

2. กรณีกลุ่มตัวอย่าง คือ ตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภคประเภทยำ ส้มตำ และสลัด เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อโคลิฟอร์มทั้งหมด ฟิคอลโคลิฟอร์ม และ *E.coli* ในอาหารพร้อมบริโภค ใช้วิธีการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ วิธี MPN (most probable numberระบบ 3, 3, 3) อุปกรณ์ที่ใช้มีมาตรฐานในการตรวจสอบคุณภาพอาหารทางด้านจุลชีววิทยาในการวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ โดยวิธี Most Probable Number (MPN) ของภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาลิขิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผู้ศึกษาทำการวิเคราะห์ด้วยตัวเอง พร้อมมีผู้ช่วยวิเคราะห์ที่มีความรู้ด้านจุลชีววิทยาทางอาหาร โดยใช้อุปกรณ์ทางห้องปฏิบัติการรายละเอียดแสดงในภาคผนวก จ และวิธีการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ วิธี MPN (most probable numberระบบ 3, 3, 3) มีรายละเอียด ดังนี้ต่อไป

2.1 วิธีการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ วิธี MPN (most probable number ระบบ 3, 3, 3) มีหลักการคือ จุลินทรีย์จะมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในของเหลว ถ้าแบ่งของเหลวนี้ออกเป็นส่วนเท่าๆกัน แต่ละส่วนจะมีปริมาณจุลินทรีย์ใกล้เคียงกัน อาจมากกว่าหรือน้อยกว่าบ้าง โดยใช้ระบบ 3 หลอด หมายถึง จำนวนของหลอดเลี้ยงเชื้อที่ใช้หมักต่อปริมาณตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมี 3 หลอด มีปริมาณความเข้มข้นของตัวอย่างอาหารที่ใช้ต่างกันดังนี้คือ อัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1000 ค่าเฉลี่ยที่ได้นี้คือ MPN ซึ่งเป็นค่าทางสถิติไม่มีหน่วย ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบคุณภาพอาหารทางด้านจุลชีววิทยาในอาหารปรุงสุกทั่วไปของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (ไพรินทร์ บุตรกระจ่าง, 2544)

ความถูกต้องของวิธี MPN (most probable number ระบบ 3, 3, 3) คือ มีการทดสอบยืนยันของเชื้อโคลิฟอร์มทั้งหมดโดยใช้อาหารเหลว BGLB ส่วนเชื้อ ฟิคอลโคลิฟอร์ม ใช้อาหารเหลว EC และ *E.coli* ใช้อาหารแข็ง EMB และ PCA slant จากนั้นนำเชื้อไปตรวจขึ้นสมบูร์ณ

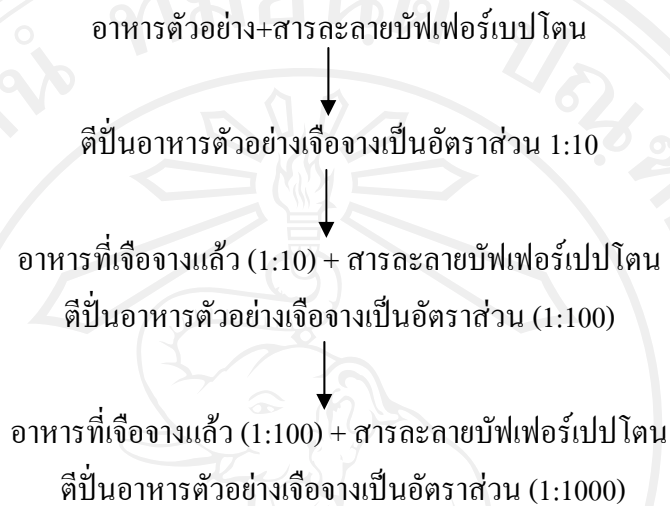
ความเชื่อมั่นของวิธี MPN (most probable number ระบบ 3, 3, 3) คือ การทำซ้ำในแต่ละระดับความเจือจางอัตราส่วน 1:10 3 หลอด, 1:100 3 หลอด และ 1:1000 3 หลอด

### วิธีดำเนินการ

1. ทำการสอบถามรายการอาหารที่ได้รับความนิยมจากผู้จำหน่ายอาหารพร้อมบริโภคประเภทยำ 2 ร้าน ส้มตำ 1 ร้าน และสลัด 2 ร้าน ประเภทละ 3 ตัวอย่างต่อ 1 ร้าน
2. สังเกตการปฏิบัติตัวของผู้สัมผัสอาหารตามหลักสุขาภิบาลอาหารแบบไม่มีส่วนร่วมในแต่ละร้านที่จำหน่ายอาหารพร้อมบริโภค ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ – มีนาคม 2552
3. เก็บตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภคประเภทยำ ส้มตำ และสลัดในช่วงเวลา 15.00 - 15.20 น. โดยไม่มีการแจ้งล่วงหน้า ทำการเก็บตัวอย่างอาหารที่ปรุงเสร็จใหม่ โดยการซื้ออาหารใส่ในภาชนะบรรจุที่ร้านเตรียมไว้ จากนั้นนำตัวอย่างอาหารไปห้องปฏิบัติการทันทีใช้เวลาในการเดินทางตั้งแต่ร้านจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภคถึงห้องปฏิบัติการประมาณ 30 นาที เพื่อทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี ทำการเก็บตัวอย่างอาหารครั้งละ 15 ตัวอย่าง ในครั้งที่ 1 วันที่ 17 กุมภาพันธ์ 2552 และครั้งที่ 2 วันที่ 24 กุมภาพันธ์ 2552 แต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ ทำการทดสอบ 2 ครั้ง

#### 4. การวิเคราะห์คุณภาพอาหารทางด้านจุลชีววิทยา รายละเอียดแสดงในภาคผนวก จ

##### 4.1 การเตรียมและการเจือจางอาหารตัวอย่าง



##### 4.2 การหาเชื้อโคลิฟอร์มทั้งหมด (การคัดกรอง)

อาหารที่เจือจางแล้วทั้ง 3 ระดับ (ระดับละ 3 หลอด) + ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ A

↓

บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24±2 ชั่วโมง

↓

อ่านผล

←

หลอดที่เกิดก๊าซ

↓

อ่านค่า MPN/g

←

หลอดที่ไม่เกิดก๊าซ

↓

บ่มต่อ 24±2 ชั่วโมง

↓

อ่านผล

←

หลอดที่เกิดก๊าซ

↓

อ่านค่า MPN/g

←

หลอดที่ไม่เกิดก๊าซ

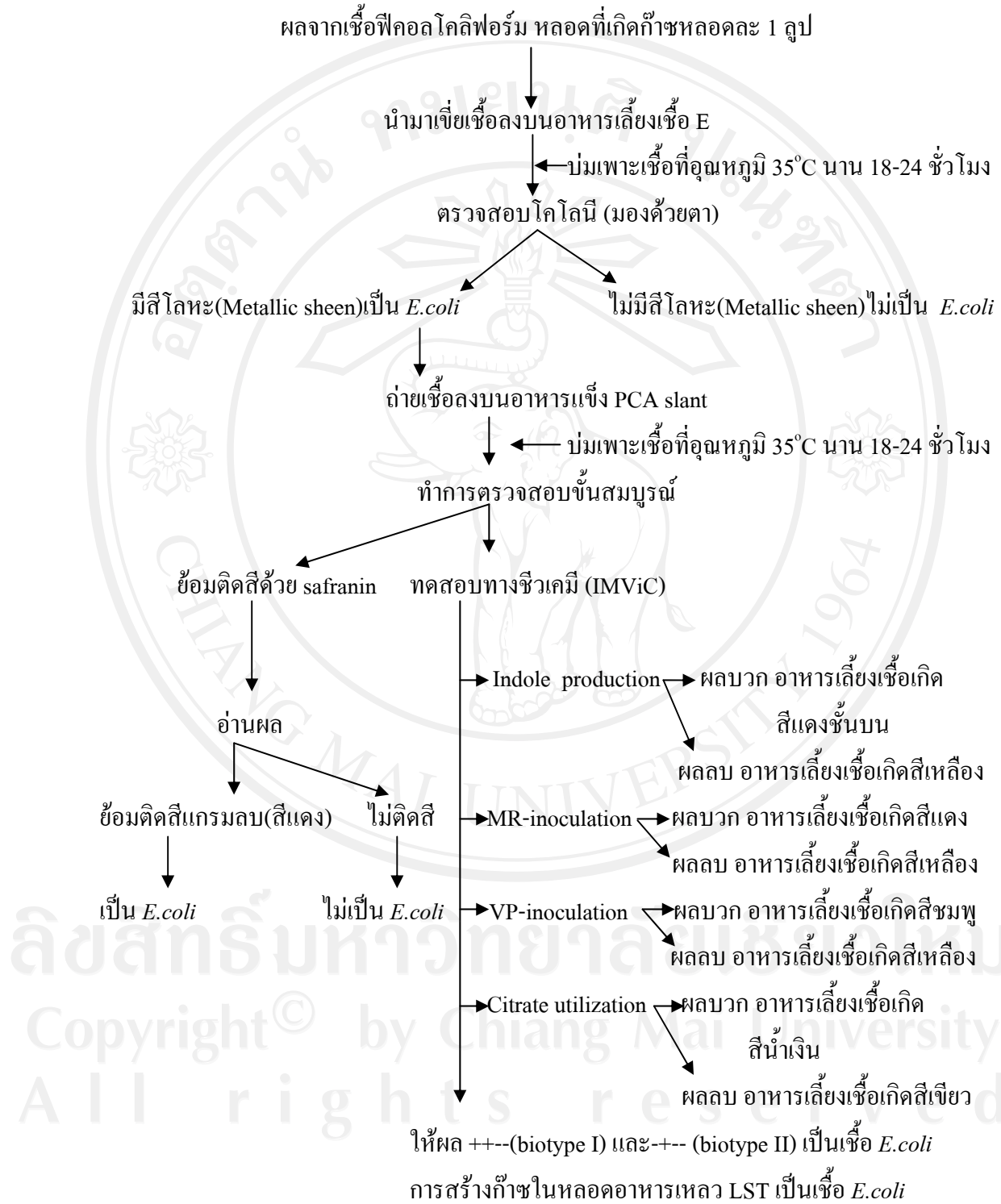
↓

ทำการฆ่าเชื้อ+ทำความสะอาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright © by Chiang Mai University  
All rights reserved



4.5 การหาเชื้อ *E.coli* (จั่นยืนยัน)





ตาราง 3.1 จำนวนหลอดทดสอบที่ให้ผลบวกในอาหารตัวอย่างที่เจือจางในอัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1000 และแปลผลเป็น MPN ต่ออาหาร 1 กรัมในระดับความเชื่อมั่น 95%

อัตราส่วน			MPN ต่อ อาหาร 1 กรัม	ระดับความเชื่อมั่น 95%	
1:10	1:100	1:1000		ต่ำสุด	สูงสุด
0	0	0	<3.0	--	9.5
0	0	1	3.0	0.15	9.6
0	1	0	3.0	0.15	11
0	1	1	6.1	1.2	18
0	2	0	6.2	1.2	18
0	3	0	9.4	3.6	38
1	0	0	3.6	0.17	18
1	0	1	7.2	1.3	18
1	0	2	11	3.6	38
1	1	0	7.4	1.3	20
1	1	1	11	3.6	38
1	2	0	11	3.6	42
1	2	1	15	4.5	42
1	3	0	16	4.5	42
2	0	0	9.2	1.4	38
2	0	1	14	3.6	42
2	0	2	20	4.5	42
2	1	0	15	3.7	42
2	1	1	20	4.5	42
2	1	2	27	8.7	94
2	2	0	21	4.5	42
2	2	1	28	8.7	94
2	2	2	35	8.7	94
2	3	0	29	8.7	94
2	3	1	36	8.7	94

ตาราง 3.1 (ต่อ)



อัตราส่วน			MPN ต่อ อาหาร 1 กรัม	ระดับความเชื่อมั่น 95%	
1:10	1:100	1:1000		ต่ำสุด	สูงสุด
3	0	0	23	4.6	94
3	0	1	38	8.7	110
3	0	2	64	17	180
3	1	0	43	9	180
3	1	1	75	17	200
3	1	2	120	37	420
3	1	3	160	40	420
3	2	0	93	18	420
3	2	1	150	37	420
3	2	2	210	40	430
3	2	3	290	90	1,000
3	3	0	240	42	1,000
3	3	1	460	90	2,000
3	3	2	1100	180	4,100
3	3	3	>1100	420	--

ที่มา : สุทัศน์ สุระวัง และอิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล, 2543

### วิธีการรวบรวมข้อมูล

ผู้ศึกษาทำการเก็บรวบรวมข้อมูลด้วยตนเองและมีผู้ช่วยวิเคราะห์ที่มีความรู้ด้านจุลชีววิทยา  
ทางอาหาร ดำเนินการ

บันทึกผลการสังเกตการปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหารของผู้สัมผัสอาหารและผล  
การทดสอบตัวอย่างอาหารลงในแบบบันทึก

ตาราง 3.2 อาหารพร้อมบริโภคจำแนกตามความนิยม

ตามความนิยม	อันดับที่ 1	อันดับที่ 2	อันดับที่ 3
ร้านอาหาร			
ร้านอาหารประเภทยำ 1	ยำรวมมิตร	ยำทะเล	ยำหอยแครง
ร้านอาหารประเภทยำ 2	ยำรวมมิตร	ยำวุ้นเส้น	ยำเหนง
ร้านอาหารประเภทส้มตำ	ส้มตำปูปลาร้า	ส้มตำไทยใส่ปู	ส้มตำโคราช
ร้านอาหารประเภทสลัด 1	สลัดรวมผักและ ผลไม้ น้ำข้น	สลัดผลไม้ น้ำข้น	สลัดผัก น้ำข้น
ร้านอาหารประเภทสลัด 2	สลัดรวมผักและ ผลไม้ น้ำข้น	สลัดผลไม้ น้ำใส	สลัดผัก น้ำข้น
รวมจำนวน	5 ตัวอย่าง	5 ตัวอย่าง	5 ตัวอย่าง

#### การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

ข้อมูลที่ได้จากการการศึกษานี้ นำมาประมวลและวิเคราะห์ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. ผลการสังเกตแบบไม่มีส่วนร่วมวิเคราะห์หาค่าคะแนนเฉลี่ย และค่ามัธยฐานของคะแนนเฉลี่ย จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับเกณฑ์การแปลผลคะแนนที่กำหนด
2. ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางด้านจุลชีววิทยาในอาหารพร้อมบริโภค
3. หาความสัมพันธ์ระหว่างการปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหารของผู้สัมผัสอาหารกับคุณภาพอาหารทางด้านจุลชีววิทยาในร้านจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภคโดยการเปรียบเทียบคะแนนเฉลี่ยของการปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหารของผู้สัมผัสอาหารกับคุณภาพอาหารทางด้านจุลชีววิทยาในร้านจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภค