

## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### วัสดุ

1. ตัวอย่าง วัตถุดิบ ภาชนะอุปกรณ์ และผลิตภัณฑ์จากกระบวนการผลิตของกลุ่มสตรีชุมชนอิสลามบ้านตรับ

1.1 วัตถุดิบ : บูดิบ เครื่องเทศ (ข่า ตะไคร้ หอมแดง) เครื่องปรุงรส (น้ำมะขามเปียก น้ำตาลปีบ น้ำตาลทราย) น้ำประปา

1.2 ผลิตภัณฑ์น้ำบูดูข้าวต้มสำเร็จรูป

1.3 ภาชนะอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตน้ำบูดูข้าวต้มสำเร็จรูป : หม้อ จัก กระทะ กระชอน เขียง มีด เครื่องปั่น ถังน้ำและขันน้ำ เข็ยกน้ำพลาสติก ขวด-ฝา

1.4 มือผู้สัมผัสอาหาร ทั้ง 2 มือของกลุ่มแม่บ้าน 4 คน

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (Analytical Reagent Grade ; Merck : Germany)

1. Lactose broth
2. EC broth
3. Plate count agar
4. Koser's citrate broth
5. Tetrathionate broth
6. Tryptone broth
7. Selenite cystine broth
8. Bismuth sulfite agar
9. Triple sugar iron agar
10. Egg yolk emulsion
11. Baird-Parker medium
12. Hektoen enteric agar
13. Lauryl tryptose broth
14. Peptone-Tween-salt diluent
15. Voges-Proskauer reagents

16. Brain heart infusion broth
17. Tryptose-sulfite-cycloserine agar
18. Rappaport-Vassiliadis medium
19. Brilliant green lactose bile broth
20. Xylose lysine desoxycholate agar
21. Mannitol-egg yolk-polymyxin agar
22. Levine's eosin-methylene blue agar
23. Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar
24. Polymyxin B solutions for MYP agar

**3. สารเคมี (Analytical Reagent Grade ; Merck : Germany)**

1.  $\text{AgNO}_3$
2. Methanol
3.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
4. Creatine crystals
5. Peptone diluent
6. Kovacs' reagent
7.  $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$
8. HCl
9. NaOH
10.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
11. Creatine crystals
12. Peptone diluent
13. Methyl red indicator
14. Gram stain reagents
15. Methyl red indicator
16. Phenolphthaleine
17. Gram stain reagents
18.  $\text{NH}_4\text{SCN}$
19.  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

20. HNO<sub>3</sub>
21. KSCN
22. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
23. Phthalicdicarboxaldehyde (OPT)
24. Alkaline peptone water (APW)
25. Coagulase plasma (rabbit) with EDTA

### อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่า Water activity (ยี่ห้อ Novasina รุ่น TH200)
2. Spectrofluorometer (ยี่ห้อ JASCO รุ่น FP-750)
3. pH meter (ยี่ห้อ Scientific รุ่น Denver 15)
4. Magnetic stirrer (ยี่ห้อ KIKAL labortechnik รุ่น RO 10 power)
5. Water bath (ยี่ห้อ Memmert รุ่น W350)
6. อุปกรณ์ และเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์
7. อุปกรณ์ และเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. แผนงานวิจัย แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1. ตรวจสอบวิเคราะห์คุณภาพของวัตถุดิบ ผลิตภัณฑ์น้ำบูดูข้าวยาสำเร็จรูป ภาชนะอุปกรณ์ และมือผู้สัมผัสอาหาร ก่อนการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP ในกระบวนการผลิต

ขั้นตอนที่ 2. พัฒนาระบบ HACCP ทั้ง 7 หลักการ 12 ขั้นตอน โดยผู้ทำการวิจัย ปฏิบัติร่วมกับสมาชิกกลุ่มแม่บ้าน ในการดำเนินงานดังนี้

2.1 จัดตั้งคณะทำงาน HACCP จากผู้ที่มีความเข้าใจในตัวผลิตภัณฑ์เป็นอย่างดีและเป็นผู้เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิต

2.2 บรรยายรายละเอียดของผลิตภัณฑ์ ที่จะจัดทำแผน HACCP เพื่อเป็น ข้อมูลในการระบุอันตรายทั้งหมดที่มีโอกาสเกิดขึ้น

2.3 ระบุวัตถุประสงค์การนำผลิตภัณฑ์ ไปใช้

2.4 จัดทำแผนภูมิการผลิต เพื่อให้เข้าใจถึงขั้นตอนการผลิตได้โดยง่าย

2.5 ทวนสอบแผนภูมิการผลิตที่จุดการผลิตจริงเพื่อยืนยันความถูกต้อง

ทั้งหมด

2.6 ระบุอันตรายทั้งหมดที่มีโอกาสเกิดขึ้นในทุกขั้นตอนของกระบวนการผลิต รวมทั้งวัตถุดิบทุกตัว พร้อมทั้งพิจารณามาตรการควบคุม

2.7 กำหนดจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม

2.8 กำหนดค่าวิกฤตสำหรับจุดวิกฤตที่ต้องควบคุมแต่ละจุด

2.9 จัดทำระบบตรวจติดตามสำหรับจุดวิกฤตที่ต้องการควบคุมในแต่ละจุด

2.10 กำหนดวิธีการแก้ไข

2.11 กำหนดกระบวนการทดสอบ เพื่อยืนยันว่าระบบ HACCP ที่จัดทำขึ้นมีการนำไปปฏิบัติจริงและดำเนินการไปอย่างถูกต้อง รวมทั้งมีประสิทธิภาพในการควบคุมการผลิตอาหารให้ปลอดภัยอย่างสม่ำเสมอ

2.12 จัดทำระบบเอกสารและการจัดเก็บบันทึก ที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการปฏิบัติและวิธีปฏิบัติ เมื่อมีการนำระบบ HACCP เข้าสู่การปฏิบัติ

ขั้นตอนที่ 3. นำระบบ HACCP ที่พัฒนาไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์น้ำบูดูข้าวยาสำเร็จรูป โดยการอบรมให้ความรู้แก่กลุ่มแม่บ้าน และปฏิบัติตามแผนงานระบบ HACCP ตรวจสอบประเมินผลหลังการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP

## 2. วิธีการเก็บตัวอย่าง การนำส่งตัวอย่าง และการตรวจวิเคราะห์

### 2.1 วิธีการเก็บตัวอย่าง

ก่อนการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP ทำการเก็บตัวอย่าง 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ และหลังการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP ทำการเก็บตัวอย่างอีก 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ การเก็บตัวอย่างในแต่ละครั้งจะทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพเป็นจำนวน 2 ซ้ำ โดยเก็บตัวอย่างดังนี้

- วัตถุดิบ ( วัตถุดิบ เครื่องเทศ เครื่องปรุงรส) เก็บตัวอย่างอย่างน้อย 50 กรัม เก็บในถุงพลาสติก มัดปากถุงให้แน่น

- ผลิตภัณฑ์น้ำบูดูข้าวยาสำเร็จรูป โดยเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ซึ่งบรรจุขวดพร้อมจำหน่ายจำนวน 5 ขวด

- ภาชนะอุปกรณ์สัมผัสอาหาร ใช้ไม้พินสำลีใน Phosphate buffer solution ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ สวอปภาชนะอย่างละ 5 ชิ้น โดยแต่ละชิ้น ทำการสวอป 5 จุด โดยเลือกสุ่มจากจุดต่างๆ ของพื้นที่ใช้สัมผัสอาหาร ดังนี้

- ถ้วย พื้นที่สวอปใช้พื้นที่ผิวประมาณครึ่งนิ้วจากขอบแก้วด้านบนทั้งข้างในและข้างนอกของถ้วย

- จาน, ถาด, หม้อ, กระทะ พื้นที่สวอปใช้ด้านในของจาน, ถาด, หม้อ, กระทะ ที่สัมผัสอาหารชั้นละ 4 ตารางนิ้ว

- ช้อน, ทัพพี, จี๊วก, มีด, เขียง พื้นที่สวอปใช้พื้นที่ผิวทั้งหมดคือด้านในและด้านนอกยกเว้นส่วนที่เป็นด้ามถือ

- ขวดบรรจุพร้อมฝา พื้นที่สวอปใช้ด้านในของขวดบรรจุชั้นละ 4 ตารางนิ้ว ส่วนฝาสวอปพื้นที่ด้านในทั้งฝา

● มือผู้สัมผัสอาหาร สวอปมือผู้สัมผัสอาหาร ทุกคนที่ทำการผลิต ใช้ไม้พันสำลีใน Phosphate buffer solution ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ สวอปมือผู้สัมผัสอาหารทั้ง 2 ข้าง ให้หงายฝ่ามือขึ้นสวอปจากปลายนิ้วถึงข้อที่ 2 นอกจากหัวแม่มือให้สวอปจากปลายนิ้วถึงข้อที่ 1 ทำการสวอปมือผู้สัมผัสอาหารก่อนการเริ่มปฏิบัติงาน (ก่อนการผลิตน้ำบูดูข้าวย่ำสำเร็จรูป) และก่อนการบรรจุน้ำบูดูข้าวย่ำสำเร็จรูป

## 2.2 การนำส่งตัวอย่าง

การนำส่งตัวอย่างจากสถานที่ผลิตน้ำบูดูข้าวย่ำสำเร็จรูป มายังคณะกรรมการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ระหว่างการเดินทางตัวอย่างทั้งหมดเก็บในสภาพแช่แข็งตลอดระยะเวลาการเดินทาง โดยใช้เวลาในการเดินทางเพื่อนำส่งไม่เกิน 2 ชั่วโมง เมื่อถึงห้องปฏิบัติการ คณะกรรมการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เคลื่อนย้ายตัวอย่างทั้งหมดไปเก็บในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 2.3 การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ เคมมี และจุลินทรีย์

การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ เคมมี และจุลินทรีย์ ของตัวอย่างที่นำส่งมายังห้องปฏิบัติการ โดยมีรายการที่แตกต่างกันตามชนิดของตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1 (วิธีการวิเคราะห์โดยละเอียด ได้แสดงในภาคผนวก ก)

## 3. การวางแผนการทดลองการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการเก็บตัวอย่างก่อนประยุกต์ใช้ระบบ 3 ครั้ง และหลังประยุกต์ใช้ระบบ 3 ครั้ง การเก็บตัวอย่างในแต่ละครั้งจะทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพเป็นจำนวน 2 ซ้ำ โดยวิเคราะห์ความแตกต่างโดย Duncan's multiple range test

ตารางที่ 1 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพวัตถุดิบ ภาชนะอุปกรณ์ และผลิตภัณฑ์ในกระบวนการผลิต  
น้ำบูดูข้าวยาสำเร็จรูป

การตรวจวิเคราะห์ทางคุณภาพ	วัตถุดิบ				ผลิต ภัณฑ์	ภาชนะ อุปกรณ์	มือผู้ สัมผัส อาหาร
	บูดู ดิบ	เครื่อง เทศ	เครื่อง ปรุง รส	น้ำ ประ ปา			
1. ทางกายภาพ							
1.1 สิ่งปนเปื้อนทางกายภาพ ด้วยตาเปล่า	×	×	×		×		
1.2 สิ่งปนเปื้อนโดย การกรอง (Filtration) (AOAC, 2000)	×				×		
1.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) (AOAC, 2000)	×				×		
1.4 ค่า Water activity ( $a_w$ )(AOAC, 2000)	×				×		
2. ทางเคมี (AOAC, 2000)							
2.1 ค่าความเป็นกรดโดย Titration method	×				×		
2.2 ปริมาณเกลือโดย Volumetric method	×				×		
2.3 ค่าฮีสตามีน โดย Fluorometric method	×				×		
3. ทางจุลินทรีย์ (BAM, 2002)							
3.1 Total bacteria	×				×	×	×
3.2 Coliform bacteria	×				×		
3.3 <i>Escherichia coli</i>	×	×	×	×	×		
3.4 <i>Staphylococcus aureus</i>					×		
3.5 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>					×		
3.6 <i>Clostridium perfringens</i>	×				×		
3.7 <i>Salmonellae spp.</i>					×		
3.8 <i>Bacillus cereus</i>	×				×		

หมายเหตุ : เครื่องหมาย × แสดงว่ามีการตรวจวิเคราะห์