บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การออกแบบการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental research) ซึ่งมีส่วนของการทดลองในห้องปฏิบัติการและการทดลองในคลินิก โดยแบ่งกลุ่มอาสาสมัครแบบสุ่มและปิดบังข้อมูลสองระดับ (randomized double-blinded, controlled trial)

3.2 ประชากรศึกษา

3.2.1 ประชากรในส่วนของการทดลองในห้องปฏิบัติการ

ในส่วนของการทดลองในห้องปฏิบัติการใช้น้ำลายของอาสาสมัครที่มีจำนวนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์สเตร็ปโตคอคไคอยู่ในช่วงปกติ ไม่อยู่ในกลุ่มผู้ป่วยที่เสี่ยงต่อฟันผุสูงหรือต่ำ โดยในที่นี้ได้ใช้น้ำลายของผู้วิจัยเองที่มีปริมาณเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในช่วงมากกว่า 10^3 และน้อยกว่า 10^6 CFU/ml

3.2.2 ประชากรในส่วนของการทดสอบทางคลินิก

ในส่วนของการทดลองในคลินิก ทำการทดสอบในอาสาสมัคร ซึ่งเป็นนักศึกษาระดับปริญญาตรี คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.2.2.1 เกณฑ์คัดเข้า (inclusion criteria)

1. อายุ 18-25 ปี
2. สุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคทางระบบ

3.2.2.2 เกณฑ์คัดออก (exclusion criteria)

1. อยู่ในระหว่างการรักษาที่ต้องได้รับยาที่มีผลต่อการรับรู้รสชาติของลิ้น
2. มีประวัติแพ้ยาหรือแพ้อาหาร
3. มีประวัติหรือมีพฤติกรรมการบริโภคอาหารที่มีรสชาติใดรสชาติหนึ่งมากผิดปกติ โดยใช้การถามคำถามเรื่องการรับประทาน เช่น กาแฟรสขมจัด มะนาว การปรุงก๋วยเตี๋ยวให้มีรสเค็ม หวาน เปรี้ยวจัด อย่างใดอย่างหนึ่งที่ผู้ตอบคำถามคิดว่าตนเองมีความผิดปกติจากบุคคลทั่วไป
4. ไม่เต็มใจเข้าร่วมโครงการวิจัย ตลอดจนไม่สามารถมาตามนัดได้ตลอดการวิจัย

3.3 คำนวณขนาดตัวอย่าง

ขั้นตอนการทดสอบในอาสาสมัคร เรื่องการวัดความพึงพอใจในรสชาติ โดยใช้ visual analogue scale จากค่าคะแนน 0 ถึง 10 และการทดลองแบบ cross-over study จึงใช้สูตรคำนวณขนาดตัวอย่างที่เกี่ยวข้องไม่เป็นอิสระต่อกันเมื่อข้อมูลเป็นแบบต่อเนื่องและวัดผลการทดลองในรูปของค่าเฉลี่ย ดังนี้

$$N\ pair = (Z_{\alpha/2}+Z_{\beta})^2\ \sigma^2/\Delta^2$$

N pair = จำนวนประชากรศึกษาต่อกลุ่ม

σ^2 = ความแปรปรวนของข้อมูล

$Z_{\alpha/2}$ = ค่าความผิดพลาดที่ระดับ $\alpha = 0.05$ เป็นการทดสอบแบบสองทาง ค่า $Z_{\alpha/2}$ คือ 1.96

Z_{β} = ค่าความผิดพลาดของโอกาสความน่าจะเป็นที่ระดับ β = ร้อยละ 5 ค่า Z_{β} คือ 1.645

Δ = ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มศึกษา

คำนวณขนาดประชากรศึกษาตามข้อตกลงเบื้องต้นจากการศึกษาทางคลินิกที่คล้ายกันของ Van Strydonck และคณะ (2005)[66] ซึ่งมีความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองจำนวน 19 คน เท่ากับ 1.84 ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมจำนวน 20 คน เท่ากับ 2.18 ดังนั้นจึงเลือกใช้ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุม และมีค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของความรู้สึกขมที่คงค้างอยู่ในช่องปากเท่ากับ 1.85 จึงแทนค่าทั้งหมดในสมการได้ดังนี้

N pair $= (2.18)^2(1.96+1.645)^2/(1.85)^2 = 18.05$ คน/กลุ่ม

หรือประมาณ 20 คน/กลุ่ม ดังนั้น 3 กลุ่มจึงเท่ากับ 60 คน

3.4 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.4.1 เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมน้ำยาบ้วนปาก

3.4.1.1 บีกเกอร์ (beaker)

3.4.1.2 แท่งแก้วสำหรับคน (stirring rod)

3.4.1.3 หลอดทดลอง (test tube)

3.4.1.4 เครื่องชั่งสารทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Sartorius Extend series;บริษัท Sartorius AG, Goettingen, Germany)

3.4.1.5 เครื่องชั่งสารทศนิยม 5 ตำแหน่ง (KERN ALT 100-5AM; บริษัท KERN & Sohn GmbH, Balingen, Germany)

3.4.1.6 ขวดแก้วมีฝาปิด

3.4.1.7 เครื่องเขย่าผสมสารให้เข้ากัน (vortex mixer, VM-300, Taiwan)

3.4.2 วัสดุที่ใช้ในการเตรียมน้ำยาบ้วนปาก

3.4.2.1 Glycerol (Sigma, USA)

3.4.2.2 Sorbitol (Sigma, USA)

3.4.2.3 Ethanol ร้อยละ 99.8 (วิทยาศรม)

3.4.2.4 Xylitol (Sigma, USA)

3.4.2.5 Sodium benzoate (Fluka, Switzerland)

3.4.2.6 Chlorhexidine digluconate (Sigma, USA)

3.4.2.7 Zinc chloride (Sigma, USA)

3.4.2.8 สารแต่งสีผสมอาหารสีส้มยี่ห้อวินเนอร์ อย.10-1-02148-1-0013

3.4.2.9 สารแต่งสีผสมอาหารสีชมพูยี่ห้อวินเนอร์ อย.10-1-02148-1-0029

3.4.2.10 สารแต่งกลิ่นส้มยี่ห้อ เบสท์ โอเดอร์ อย.10-1-15938-1-0028

3.4.2.11 Sterile distilled water

3.4.3 เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมน้ำลายเทียม

3.4.3.1 หลอดทดลอง

3.4.3.2 เครื่องชั่งสารทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Sartorius Extend series;บริษัท Sartorius AG, Goettingen, Germany)

3.4.3.3 เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง (KERN ALT 100-5AM; บริษัท KERN & Sohn GmbH, Balingen, Germany)

3.4.3.4 ขวดแก้วมีฝาปิด

3.4.3.5 เครื่องเขย่าผสมสารให้เข้ากัน (vortex mixer, VM-300, Taiwan)

3.4.4 วัสดุที่ใช้ในการเตรียมน้ำลายเทียม

3.4.4.1 Mucin from porcine stomach type III(Sigma, USA)

3.4.4.2 Lab lemco (Oxoid, England)

3.4.4.3 Yeast extact (Difco, USA)

3.4.4.4 Calcium chloride (Merck, Germany)

3.4.4.5 Magnesium chloride (Merck, Germany)

3.4.4.6 Monopotassium phosphate (Sigma, USA)

3.4.4.7 Potassium phosphate dibasis (Merck, Germany)

3.4.4.8 Sodium chloride (Merck, Germany)

3.4.4.9 Potassium chloride (Sigma, USA)

3.4.4.10 Ammoium chloride (Sigma, USA)

3.4.4.11 Urea (Fluka, Switzerland)

3.4.5 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.4.5.1 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Thermo Scientific Verioskan® Flash, Vantaa, Finland)

3.4.5.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.4.5.3 ตู้บ่มเชื้อ

3.4.5.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

3.4.5.5 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ

3.4.5.6 หลอดทดลอง

3.4.5.7 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

3.4.5.8 เครื่องเขย่าผสมสารให้เข้ากัน (vortex mixer, VM-300, Taiwan)

3.4.5.9 หลอดเอพเพนดอร์ฟ (eppendorph)

3.4.5.10 หลอดพลาสติกปลอดเชื้อ (polypropylene sterile tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร

3.4.5.11 ปิเปตต์อัตโนมัติขนาดต่าง ๆ พร้อมปลาย

3.4.6 วัสดุที่ใช้ในการวิจัย

3.4.6.1 แบคทีเรีย *สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์* สายพันธุ์ UA 159

3.4.6.2 LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability (Molecular probe, USA)

3.4.6.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.4.6.4 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid)

3.4.6.7 DL-Dithiothreitol (Sigma, USA)

3.4.6.8 Bacitracin from Bacillus licheniformis 50 KU (Sigma, USA)

3.4.6.9 อาหารเลี้ยงเลี้ยงเชื้อไมติส ซาลิวาเลียส (Mitis salivarius agar, Difco, USA)

3.4.6.10 อาหารเลี้ยงเชื้อทอดด์-ฮิววิท บรอท (Todd-Hewit broth, Difco, USA)

3.4.6.11 อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar (BBL, France)

3.4.6.12 กระดาษกรอง Watmann no. 1 (Difco, USA)

3.4.6.13 กระดาษกรอง Watmann no. 4 (Difco, USA)

3.4.6.14 Steriled glass wool(Sigma, USA)

3.4.6.15 96-well polystyrene ไมโครเพลท (Nunc, Denmark)

3.4.6.16 อลูมิเนียมฟอยล์ (aluminium foil)

3.4.6.17 แผ่นพาราฟิล์ม (parafilm, American National CanTM, USA)

3.4.6.18 หัวปิเปตต์ขนาดต่างๆ (pipette tip)

3.4.6.19 ถุงมือ

3.4.6.20 หน้ากากอนามัย

3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.5.1 การทดลองในห้องปฏิบัติการ

3.5.1.1 การทดสอบคุณสมบัติการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ*สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์*

ทำการทดสอบคุณสมบัติเสริมฤทธิ์กันของสารออกฤทธิ์ตัวแรกคือ คลอร์เฮ็กซิดีนกับสารออกฤทธิ์ตัวที่สองได้แก่ ซิงค์คลอไรด์ โดยการหาค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) ของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดต่อเชื้อ*สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์* (*S. mutans* UA159) โดยวิธี broth dilution method แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าดัชนีการเสริมฤทธิ์ (FIC) ตามเกณฑ์ของสมาคมจุลชีววิทยาคลินิกและโรคติดเชื้อแห่งยุโรป[65] ดังนี้

FIC ของสารออกฤทธิ์ตัวแรก = MIC ของสารออกฤทธิ์ตัวแรกในส่วนผสมระหว่างสารออกฤทธิ์ตัวแรกกับสารออกฤทธิ์ตัวที่สอง/MIC ของสารออกฤทธิ์ตัวแรกอย่างเดียว

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

FIC ของสารออกฤทธิ์ตัวที่สอง = MIC ของสารออกฤทธิ์ตัวที่สองในส่วนผสมระหว่างสารออกฤทธิ์ตัวแรกกับสารออกฤทธิ์ตัวที่สอง/MIC ของสารออกฤทธิ์ตัวที่สองอย่างเดียว

ΣFIC = FIC ของสารออกฤทธิ์ตัวแรก + FIC ของสารออกฤทธิ์ตัวที่สอง

<u>การแปลผล</u> (ดังภาพที่ 9)

ถ้า $\Sigma FIC \leq 0.5$ หมายถึง สารทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติในการเสริมฤทธิ์กัน เมื่อนำมาผสมกันจะทำให้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นๆเพิ่มขึ้นจากการใช้สารชนิดเดียว หรือมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นๆเท่าเดิมแต่ใช้สารปริมาณลดลงกว่าเดิม (synergism)

ถ้า $\Sigma FIC > 0.5$ ถึง 1 หมายถึง สารทั้งสองชนิดเมื่อนำมาผสมกันจะทำให้เกิดผลลัพธ์ในการต้านต่อเชื้อแบคทีเรียเท่ากับการใช้สารทั้งสองชนิดนั้นรวมกัน

ถ้า $\Sigma FIC > 1$ ถึง < 2 หมายถึง สารทั้งสองชนิดนั้นเมื่อนำมาใช้ร่วมกันในการต้านต่อเชื้อแล้วพบว่าฤทธิ์ในการต้านต่อเชื้อเกิดจากสารที่มีฤทธิ์สูงสุดในสารผสมเพียงตัวเดียว

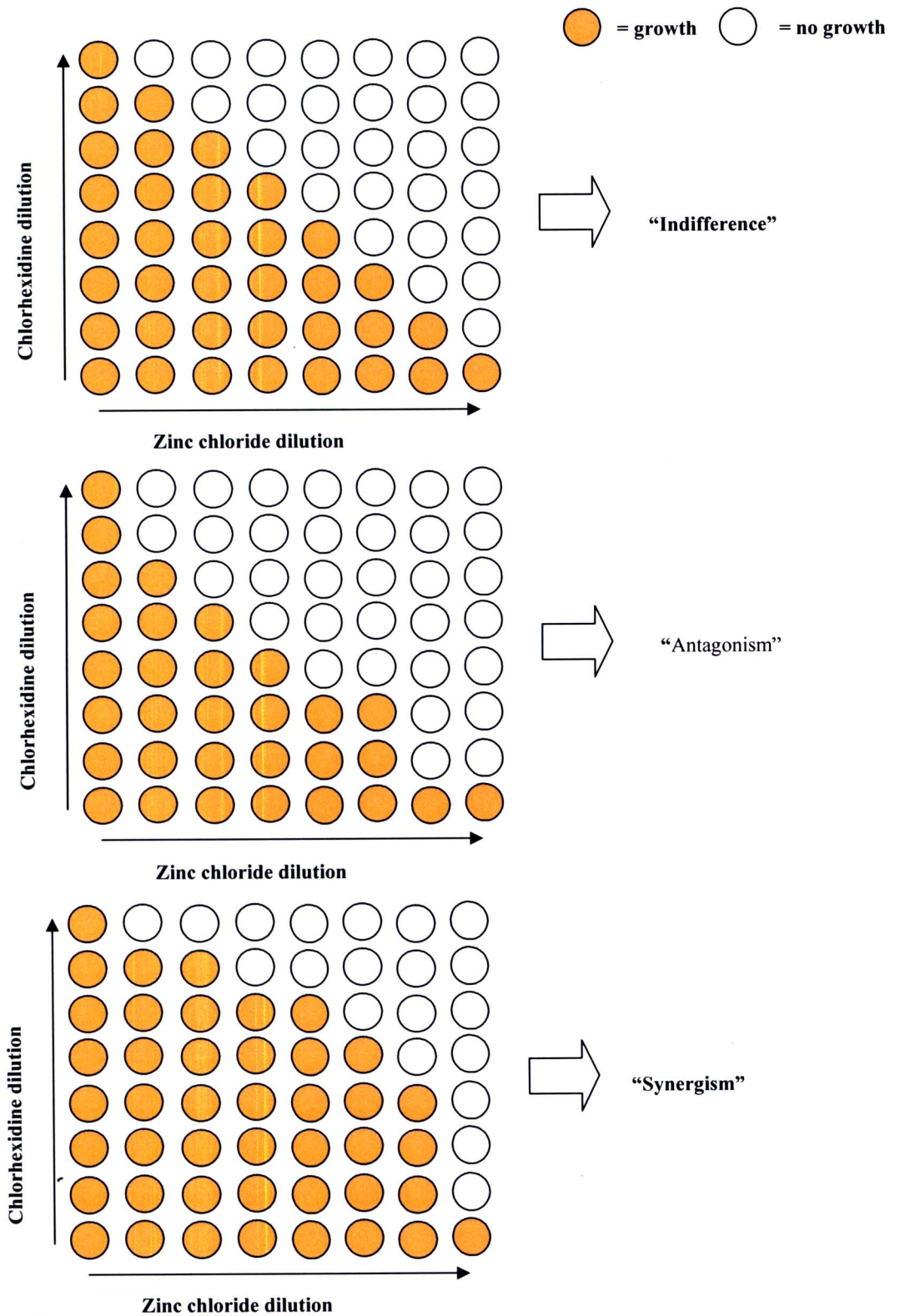
ถ้า $\Sigma FIC \geq 2$ หมายถึง สารทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ต้านกัน เมื่อนำมาผสมกันจะทำให้มีคุณสมบัติในการต้านต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นๆลดลงจากเดิม (antagonism)

3.5.1.2 วิธีการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์* (*S. mutans* UA159) โดยวิธี broth dilution method

นำสารละลายคลอร์เฮ็กซิดีนและสารละลายซิงค์คลอไรด์ใส่ในไมโครเพลทให้ได้ความเข้มข้นจากมากไปหาน้อย และในแต่ละหลุมมีปริมาณของสารแต่ละชนิดเท่ากับ 100 ไมโครลิตรต่อหนึ่งหลุมดูดเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (broth culture) ที่ปรับความขุ่นจนได้ค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) เท่ากับ 0.1 ใส่ลงในหลุมที่เตรียมสารละลายทั้งสองชนิดไว้แล้วในปริมาณหลุมละ 100 ไมโครลิตรนำไมโครเพลทไปวางบนเครื่องเขย่าสารให้สารในแต่ละหลุมเข้ากัน แล้วนำไปบ่มเพาะในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลค่า MIC จากหลุมแรกที่มีความใสและนำไปอ่านค่า OD ในเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.5.1.3 วิธีการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสองชนิดรวมกันที่สามารถยับยั้งเชื้อ *สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์* (*S. mutans* UA159) โดยวิธี broth dilution method

นำสารละลายคลอร์เฮ็กซิดีนและสารละลายซิงค์คลอไรด์ใส่ในไมโครเพลท ให้ได้ความเข้มข้นจากมากไปหาน้อย และมีปริมาณสารทั้งสองชนิดรวมกันเท่ากับ 100 ไมโครลิตร ดูดเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (broth culture) ที่ปรับความขุ่นจนได้ค่า OD เท่ากับ 0.1 ใส่ลงในหลุมที่เตรียมสารละลายทั้งสองชนิดไว้ในปริมาณหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไมโครเพลทไปวางบนเครื่องเขย่าสารให้สารในแต่ละหลุมเข้ากัน แล้วนำไปบ่มเพาะในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงอ่านผลค่า MIC จากหลุมแรกที่มีความใสและนำไปอ่านค่า OD ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำค่า MIC ที่ได้จากสารเดี่ยวและสารผสมมาคำนวณหาค่า FIC และนำไปแปลผล



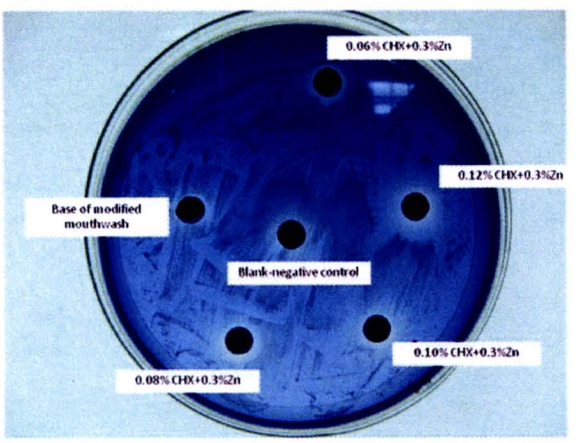
ภาพที่ 9 การทดสอบคุณสมบัติการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ

3.5.1.3 ขั้นตอนการเตรียมน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีน

เตรียมน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนสูตรปรับปรุง 2 สูตร โดยสูตรปรับปรุง 1 มีความเข้มข้นของคลอร์เฮ็กซิดีนเท่าเดิมคือร้อยละ 0.12 และสูตรปรับปรุง 2 มีความเข้มข้นของคลอร์เฮ็กซิดีนน้อยกว่าสูตรเดิม

ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในสูตรปรับปรุงนี้ได้จากการผสมน้ำยาบ้วนปากในสูตรที่มีความเข้มข้นของคลอร์เฮ็กซิดีนและซิงค์ที่หลากหลาย โดยสูตรปรับปรุง 1 ได้จากการใช้ความเข้มข้นของสารคลอร์เฮ็กซิดีนเท่ากับความเข้มข้นเดิมที่ใช้อยู่ในท้องตลาดทั่วไปและสูตรดั้งเดิมคือร้อยละ 0.12 และเลือกความเข้มข้นของซิงค์จากรสชาติที่รับได้จากการชิมรสชาติโดยผู้วิจัยได้แก่ ร้อยละ 0.3

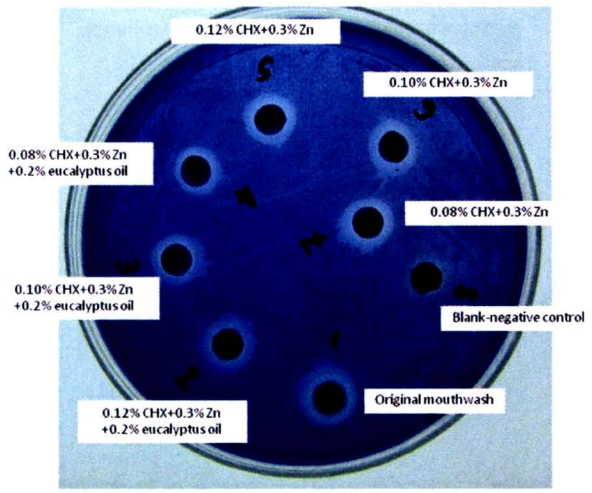
สูตรปรับปรุง 2 ทำโดยนำค่าความเข้มข้นของซิงค์ที่ได้จากสูตรปรับปรุง 1 คือร้อยละ 0.3 มาใช้และพยายามลดความเข้มข้นของคลอร์เฮ็กซิดีนลงจากร้อยละ 0.12 ถึง 0.06 พบว่าจากการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ*สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์* ด้วยวิธี disc diffusion ความเข้มข้นที่ลดลงครึ่งหนึ่งคือร้อยละ 0.06 นั้นทำให้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อน้อยลงโดยพบโซนของการยับยั้งน้อยที่สุดและเมื่อใช้ความเข้มข้นของคลอร์เฮ็กซิดีนร้อยละ 0.10 และ 0.08 ให้โซนยับยั้งเชื้อที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของสารคลอร์เฮ็กซิดีนสำหรับสูตรปรับปรุงที่ 2 ร้อยละ 0.08 ใช้ร่วมกับซิงค์คลอร์ไรด์ร้อยละ 0.3 (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของคลอร์เฮ็กซิดีนกับซิงค์คลอไรด์ด้วยวิธี disc diffusion

จากนั้นทำการผสมสารพื้นฐานสูตรต่างๆ รวมถึงลองผสมน้ำมันยูคาลิปตัสซึ่งมีการศึกษาพบว่าเมื่อนำมาใช้ร่วมกับสารคลอร์เฮ็กซิดีนแล้วมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อ*สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์*[67] แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี disc diffusion และวัดโซนการยับยั้งเชื้อ(ภาพที่ 11) พบว่ามีโซนของการยับยั้งเชื้อใกล้เคียงกันระหว่างสูตรที่ผสมและไม่ผสมน้ำมันยูคาลิปตัสที่มีความเข้มข้นของคลอร์เฮ็กซิดีนและซิงค์คลอร์ไรด์ที่เท่ากัน แต่สูตรที่มีน้ำมันยูคาลิปตัสมีความขมมากกว่าสูตรที่ไม่มี จึงเลือกใช้สูตรที่ไม่มีส่วนผสมของน้ำมันยูคาลิปตัส

การผสมน้ำยาบ้วนปากทำได้โดย ผสมโซเดียมเบนโซเอทในแอลกอฮอล์ นำซิงค์คลอไรด์มาละลายในน้ำและเติมด้วยส่วนผสมอื่นๆที่เป็นของเหลวและของแข็ง แล้วจึงนำส่วนผสมในข้อ ก และ ข มารวมกัน น้ำยาบ้วนปากที่ได้จะมีความเป็นกรดด่างประมาณ 6.7

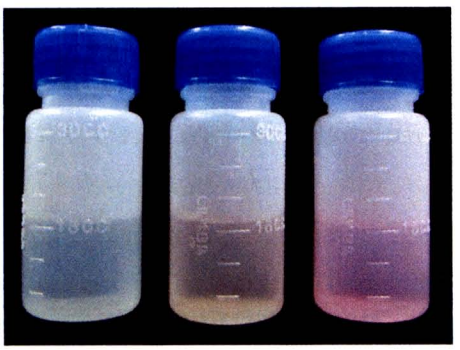


ภาพที่ 11 การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อ*สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์* ของน้ำยาบ้วนปากสูตรต่างๆ

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบในน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุง

ลำดับ	สาร	สูตรปรับปรุง 1 (ร้อยละ)	สูตรปรับปรุง 2 (ร้อยละ)
1	โซเดียมเบนโซเอท	0.10	0.10
2	ซอร์บิทอล	5.00	5.00
3	ไซลิทอล	4.00	4.00
4	ซิตริก	0.01	0.01
5	ซิงค์คลอร์ไรด์	0.30	0.30
6	โพลีเอธิลีนไกลคอล	1.00	1.00
7	กลีเซอรอล	2.00	2.00
8	สารแต่งสี	0.05	0.05
9	สารแต่งรส	0.05	0.05
10	คลอร์เฮ็กซิดีน	0.12	0.08
11	แอลกอฮอล์	5.00	5.00
12	น้ำ		

ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนทั้งหมด 3 ชนิด (ภาพที่ 12) ได้แก่ (A) น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนสูตรดั้งเดิม ที่จ่ายในคณะทันตแพทยศาสตร์ (B) น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนสูตรปรับปรุง 1 ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.12 (C) น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนสูตรปรับปรุง 2 ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.08



A B C

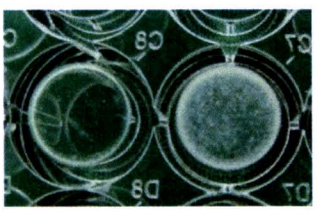
ภาพที่ 12 ยาบ้วนปากที่ใช้ในการทดลอง 3 ชนิด

3.5.1.4 การทดสอบคุณสมบัติของน้ำยาบ้วนปากในการต้านต่อไบโอฟิล์ม

<u>การเตรียมไบโอฟิล์ม</u>

เก็บน้ำลายจำนวน 10 มิลลิลิตรจากอาสาสมัครที่ไม่ได้ทำความสะอาดช่องปากมาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาผสมกับ Di-thiothreitol ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิโมลาร์ กรองผ่านใยแก้วปราศจากเชื้อ (sterile glass wool) แล้วนำมาเติมลงในไมโครเพลทพื้นเรียบ หลุมละ 10 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงให้เชื้อและส่วนประกอบในน้ำลายสร้างไบโอฟิล์มเกาะบริเวณพื้นหลุม แล้วเติมสารละลายน้ำลายเทียม[68]หลุมละ 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงในตู้บ่มที่มีสภาวะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 13)

A B



ภาพที่ 13 ภาพไบโอฟิล์มที่เตรียมในห้องปฏิบัติการโดยเลี้ยงในไมโครเพลท

A = หลุมไมโครเพลทเปล่า

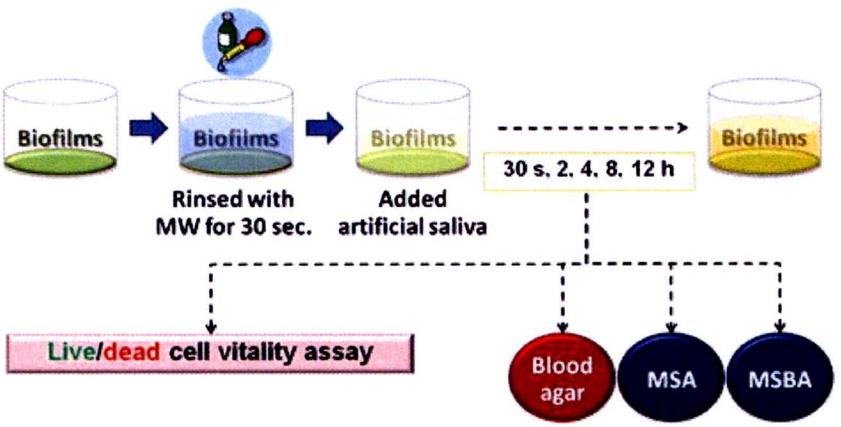
B = ไบโอฟิล์มที่ก้นหลุม

การเตรียมแผ่นคราบน้ำลายปราศจากเชื้อ

เก็บน้ำลายจากอาสาสมัครด้วยวิธีการเดียวกับการทำไบโอฟิล์ม หลังจากกรองผ่านใยแก้วปราศจากเชื้อแล้ว นำมากรองผ่านตัวกรองที่มีรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร (Minisart filter®) นำน้ำลายปราศจากเชื้อเติมลงในไมโครเพลท หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำเข้าตู้บ่มที่มีสภาวะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการสร้างแผ่นคราบน้ำลายที่บริเวณผิวของไมโครเพลท โดยดูดน้ำลายปราศจากเชื้อจำนวน 200 ไมโครลิตรออกเมื่อนำมาใช้

3.5.1.5 การทดสอบคุณสมบัติของน้ำยาบ้วนปากในการยับยั้งเชื้อในไบโอฟิล์ม

ทำการทดสอบในไบโอฟิล์ม 2 ชุด โดยชุดแรกเตรียมไว้ในไมโครเพลทสีดำพื้นเรียบใส และชุดที่สองเตรียมในไมโครเพลทใสพื้นเรียบ นำไบโอฟิล์มชุดแรกมาวัดอัตราส่วนเซลล์ที่มีชีวิตต่อเซลล์ตายของแบคทีเรียบนไบโอฟิล์มที่ยังคงเกาะติดอยู่ในหลุม โดยใช้ชุดทดสอบ LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability[69] (ภาพที่ 12) และอ่านผลด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทโดยใช้ excitation wavelength เท่ากับ 485 นาโนเมตร และ emission wavelength เท่ากับ 530 นาโนเมตร (เขียว) และ 630 นาโนเมตร (แดง) ส่วนไบโอฟิล์มชุดที่สองให้แยกเชื้อออกจากหลุมแล้วนำไปบ่มเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง 3 ชนิดเพื่อนับจำนวนโคโลนีของเชื้อชนิดต่างๆ (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 วิธีการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อในไบโอฟิล์ม

วิธีการทดลองประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากในการยับยั้งเชื้อในไบโอฟิล์มโดยวิธีการย้อมสีเซลล์และวัดปฏิกิริยาฟลูออเรสเซ้นท์ ทำโดย

- เตรียมสีย้อมเซลล์ตามที่บริษัทแนะนำ (ภาคผนวก ซ)
- นำไบโอฟิล์มที่ผ่านการบ่มเพาะนาน 24 ชั่วโมงมาล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 200 ไมโครลิตรเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นในกลุ่มควบคุมเติมด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และกลุ่มทดลองเติมเติมน้ำยาบ้วนปากแต่ละชนิด โดยปล่อยให้ไบโอฟิล์มสัมผัสกับน้ำกลั่นหรือน้ำยาบ้วนปากเป็นเวลา 30 วินาทีเท่ากัน
- ดูดน้ำกลั่นหรือน้ำยาบ้วนปากออกแล้วเติมน้ำลายเทียมจำนวน 200 ไมโครลิตรลงไปบนไบโอฟิล์ม

- นำไบโอฟิล์มที่ผ่านการทดสอบกับกลุ่มควบคุมและน้ำยาบ้วนปากแล้วกลับเข้าไปบ่มต่อที่สภาวะเดิม และวัดผลตามช่วงเวลาที่กำหนดไว้ได้แก่ 0 2 4 8 และ 12 ชั่วโมง สำหรับที่เวลา 0 ชั่วโมง นั้นจะวัดผลทันทีไม่มีการนำกลับเข้าไปบ่มต่อ
- ทำการย้อมสีเซลล์ในไบโอฟิล์มตามคำแนะนำของบริษัท (ภาคผนวก ซ)
- ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดในเครื่องวัดปฏิกิริยา ฟลูออเรสเซ้นท์ที่เกิดขึ้นเพื่อหาอัตราส่วนเซลล์ที่มีชีวิตต่อเซลล์ตายบนถาดหลุมนั้น

ภาพที่ 15 ชุดย้อมสีเซลล์ LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability

วิธีการทดลองประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากในการยับยั้งเชื้อในไบโอฟิล์มโดยวิธีการนับโคโลนีเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ทำโดย

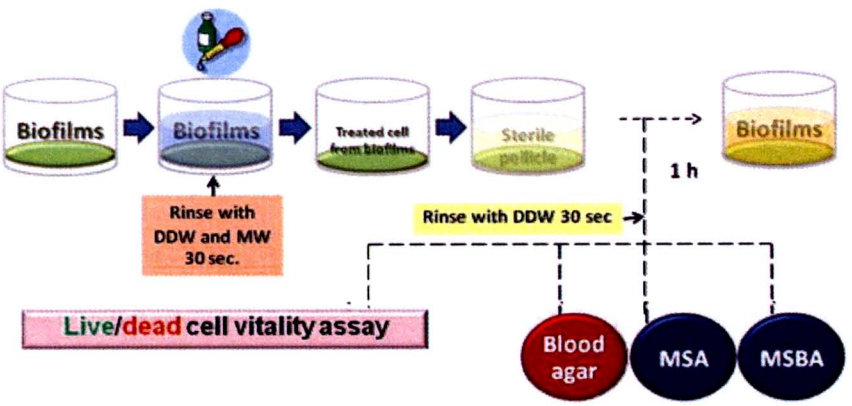
- นำไบโอฟิล์มที่ผ่านการเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง มาล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 200 ไมโครลิตรเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำน้ำยาบ้วนปากแต่ละชนิดมาเติมลงในหลุมไบโอฟิล์มเป็นเวลา 30 วินาที
- ดูดน้ำยาบ้วนปากออกแล้วเติมน้ำลายเทียมจำนวน 200 ไมโครลิตรลงไปบนไบโอฟิล์ม
- นำไบโอฟิล์มที่ผ่านการทดสอบกับกลุ่มควบคุมและน้ำยาบ้วนปากแล้วกลับเข้าไปบ่มต่อที่สภาวะเดิม และนำออกมาวัดผลตามช่วงเวลาที่กำหนดไว้ได้แก่ 4 และ 8 ชั่วโมง สำหรับที่เวลา 0 ชั่วโมงนั้นจะวัดผลทันทีไม่มีการนำกลับเข้าไปบ่มต่อ
- เมื่อถึงเวลาที่กำหนดนำไบโอฟิล์มออกจากตู้บ่ม ดูดน้ำลายเทียมออกจากหลุมจำนวน 200 ไมโครลิตร
- เชื้อจากไมโครเพลทถูกทำให้เจือจางครั้งละ 10 เท่า โดยใช้สารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง 3 ชนิดดังต่อไปนี้ 1) วุ้นเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของเลือด เพื่อใช้ในการประเมินจำนวนเชื้อกลุ่มแอโรบิกและแฟคัลเททีฟทั้งหมด (total aerobic and facultative bacteria) 2) วุ้นเลี้ยงเชื้อไมติส ซาไลวาเรียส เพื่อใช้ในการประเมินจำนวนสเตร็ปโตคอคไคทั้งหมด และ 3) วุ้น

เลี้ยงเชื้อไมติส ซาไลวาเรียสบาซิทราซิน เพื่อใช้ในการประเมินจำนวนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไค และเพื่อการคำนวณอัตราส่วนของจำนวนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์สเตร็ปโตคอคไคต่อจำนวนเชื้อกลุ่มแอโรบิกและแฟคัลเททีฟทั้งหมด หรือต่อจำนวนสเตร็ปโตคอคไคทั้งหมด

- บ่มเชื้อที่สภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง ในแต่ละชุดทดลอง

3.5.1.6 การทดสอบคุณสมบัติของน้ำยาบ้วนปากในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ *สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์*

ทำการทดสอบในไบโอฟิล์ม 2 ชุด โดยเตรียมไบโอฟิล์มตามขั้นตอนข้างต้นล้างไบโอฟิล์มด้วยน้ำกลั่นและน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิดเป็นเวลา 30 วินาที ดูดน้ำกลั่นและน้ำยาบ้วนปากออกนำเซลล์ที่อยู่ในไบโอฟิล์มที่ผ่านการทดสอบด้วยน้ำกลั่นและน้ำยาบ้วนปากแล้วมาปล่อยให้เกิดการยึดเกาะกับแผ่นคราบน้ำลายปราศจากเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 30 วินาทีเพื่อล้างเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะออกไป แล้วนำไบโอฟิล์มที่มีเชื้อที่มีความสามารถในการยึดเกาะใหม่มาวัดผลด้วยวิธีการทั้งสอง (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ

วิธีการทดลองประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อโดยวิธีการย้อมสีเซลล์และวัดปฏิกิริยาฟลูออเรสเซ้นท์ ทำโดย

- นำไบโอฟิล์มที่เลี้ยงในไมโครเพลทชนิดใสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงมาล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 200 ไมโครลิตรเป็นเวลา 30 วินาที และนำน้ำยาบ้วนปากมาเติมในหลุมไบโอฟิล์มเป็นเวลา 30 วินาที

- ดูดน้ำยาบ้วนปากออกแล้วเติมน้ำลายเทียมจำนวน 200 ไมโครลิตรลงไปบนไบโอฟิล์ม ดูดขึ้นลง 3 ครั้ง

- นำน้ำลายเทียมที่มีเชื้อจากไบโอฟิล์มที่ผ่านน้ำยาบ้วนปากแต่ละกลุ่มแล้วจำนวน 200 ไมโครลิตรนั้นมาใส่ในแผ่นคราบน้ำลายปราศจากเชื้อที่เตรียมในไมโครเพลทสีดำพื้นใส ทิ้งให้เกิดการยึดเกาะของเชื้อกับแผ่นคราบน้ำลายเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

- เมื่อครบ 1 ชั่วโมงแล้วดูดน้ำลายเทียมออกและล้างเชื้อที่ไม่ยึดเกาะออกด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นเวลา 30 วินาที และนำสารย้อมสีมาย้อมไบโอฟิล์มตามคำแนะนำของบริษัท

- ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดในเครื่องวัดปฏิกิริยา ฟลูออเรสเซ้นท์ที่เกิดขึ้นเพื่อหาอัตราส่วนเซลล์ที่มีชีวิตต่อเซลล์ตายบนถาดหลุมนั้น

วิธีการทดลองประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อโดยวิธีการนับโคโลนีเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ทำโดย

- นำไบโอฟิล์มที่ผ่านการเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมงมาล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 200 ไมโครลิตรเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและน้ำยาบ้วนปากแต่ละชนิดมาเติมลงในหลุมไบโอฟิล์มเป็นเวลา 30 วินาที

- ดูดน้ำยาบ้วนปากออกแล้วเติมน้ำลายเทียมจำนวน200 ไมโครลิตรลงไปบนไบโอฟิล์ม ดูดขึ้นลง 3 ครั้ง

- นำน้ำลายเทียมที่มีเชื้อจากไบโอฟิล์มที่ผ่านน้ำยาบ้วนปากแต่ละกลุ่มแล้วจำนวน 200 ไมโครลิตรนั้นมาใส่ในแผ่นคราบน้ำลายปราศจากเชื้อที่เตรียมไว้ ทิ้งให้เกิดการยึดเกาะของเชื้อกับแผ่นคราบน้ำลายเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- ดูดน้ำลายเทียมออกและล้างเชื้อที่ไม่ยึดเกาะออกด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นเวลา 30 วินาที และนำสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เติมลงในแต่ละหลุมจำนวน 100 ไมโครลิตรดูดขึ้นลง 3 ครั้ง

- นำสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเชื้อจากไมโครเพลทไปเจือจางครั้งละ 10 เท่า และนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง 3 ชนิด ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อเลือด อาหารเลี้ยงเชื้อไมติสซาลิวาเรียส และอาหารเลี้ยงเชื้อไมติสซาลิวาเรียสบาซิทราซิน

- บ่มเชื้อที่สภาวะกาซคาร์บอนไดร์ออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงและนำมาคำนวณหาจำนวนเชื้อที่สามารถยึดเกาะกับไมโครเพลทได้หลังจากที่ผ่านน้ำยาบ้วนปากแต่ละชนิด

3.5.2 การทดลองในอาสาสมัครเพื่อเปรียบเทียบความพึงพอใจ

3.5.2.1 ประชากรศึกษา

นักศึกษาคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 60 คน โดยมีจำนวนเพศชายและหญิงอย่างละ 30 คน เพื่อควบคุมปัจจัยเรื่องเพศที่อาจมีผลต่อการทดสอบ[70]

3.5.2.2 การแบ่งกลุ่ม

ทำการแบ่งกลุ่มแบบสุ่มโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปออนไลน์จากเว็บไซต์ www.randomization.com โดยอาศัยหลักการสร้างสถานการณ์ที่อาสาสมัครแต่ละคนมีโอกาสได้รับน้ำยาบ้วนปากทั้ง 3 ชนิด ในลำดับแบบสุ่ม โดยควบคุมให้อาสาสมัครชายและหญิงจำนวนเท่าๆกันได้รับน้ำยาบ้วนปากแต่ละชนิดในแต่ละครั้งหรือแต่ละเวลาที่ทำการทดสอบ (balanced permutations) ในลักษณะบล็อค (blocked randomization) โดยมีค่า permutation เท่ากับ 6 และจำนวนบล็อคเท่ากับ 5 จากนั้นโปรแกรมจะทำการสุ่มเลือกลำดับการได้รับน้ำยาบ้วนปากให้อาสาสมัครแต่ละคนอย่างอัตโนมัติ (ตารางที่ 4) และกำหนดหมายเลขของ

อาสาสมัครแต่ละคนโดยการจับสลาก ผู้วิจัยปิดบังชนิดของน้ำยาบ้วนปากไม่ให้อาสาสมัครทราบ โดยใช้ภาชนะบรรจุเหมือนกันที่ไม่มีฉลาก แต่มีรหัส 4 ตำแหน่งดังนี้ [อักษรตำแหน่งแรก M = เพศชาย F = เพศหญิง] [ตัวเลข 2 ตำแหน่งถัดมา = หมายเลขอาสาสมัคร] [ตัวเลขตำแหน่งสุดท้าย = ลำดับที่ของน้ำยาบ้วนปาก] ตัวอย่างเช่น M-18-B หมายถึง อาสาสมัครเพศชายหมายเลขประจำตัวลำดับที่ 18 บ้วนน้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุงที่ 2

3.5.2.3 วิธีการเก็บข้อมูล

การเก็บข้อมูลทำโดยให้อาสาสมัครกรอกแบบสอบถามที่แบ่งออกเป็นสามส่วน ได้แก่ ส่วนแรกข้อมูลทั่วไปและประวัติทางการแพทย์ ส่วนที่สอง ข้อมูลการใช้น้ำยาบ้วนปากก่อนและระหว่างการเข้าร่วมงานวิจัย ส่วนที่สามเป็นการวัดระดับความพึงพอใจในน้ำยาบ้วนปากทั้งสามชนิด (ภาคผนวก จ) เมื่อคัดเลือกอาสาสมัครได้แล้วทำการทดสอบในอาสาสมัครสัปดาห์ละ 1 ครั้ง และให้อาสาสมัครงดอาหารมาก่อนบ้วนน้ำยาบ้วนปาก 1 ชั่วโมง บ้วนน้ำยาบ้วนปากเป็นเวลา 30 วินาที แล้วกรอกคะแนนความพึงพอใจ ส่วนหัวข้อความรู้สึกคงค้างในช่องปากให้มากรอกในสัปดาห์ถัดไปทำการทดสอบจนครบทั้งสามชนิด

ตารางที่ 4 ลำดับการบ้วนน้ำยาบ้วนปากแบบสุ่ม

หมายเลขอาสาสมัคร	ชนิดของน้ำยาบ้วนปาก			หมายเลขอาสาสมัคร	ชนิดของน้ำยาบ้วนปาก		
	ลำดับที่ 1	ลำดับที่ 2	ลำดับที่ 3		ลำดับที่ 1	ลำดับที่ 2	ลำดับที่ 3
01	B	A	C	16	C	B	A
02	C	B	A	17	A	C	B
03	A	B	C	18	B	C	A
04	C	A	B	19	A	C	B
05	B	C	A	20	C	B	A
06	A	C	B	21	A	B	C
07	C	B	A	22	B	A	C
08	B	A	C	23	B	C	A
09	A	C	B	24	C	A	B
10	C	A	B	25	C	B	A
11	B	C	A	26	A	B	C
12	A	B	C	27	B	C	A
13	C	A	B	28	C	A	B
14	A	B	C	29	B	A	C
15	B	A	C	30	A	C	B

A = น้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุง 1; B = น้ำยาบ้วนปากสูตรปรับปรุง 2; C = น้ำยาบ้วนปากสูตรควบคุม

3.5.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

3.5.3.1 การทดลองในห้องปฏิบัติการเป็นการเปรียบเทียบผลของน้ำยาบ้วนปาก 3 ชนิด (สูตรดั้งเดิมและสูตรปรับปรุงทั้ง 2 สูตร) ต่อความมีชีวิตของจุลินทรีย์ในไบโอฟิล์ม และต่ออัตราส่วนของจำนวนเชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็ปโตคอคไคต่อจำนวนเชื้อกลุ่มแอโรบิกและแฟคัลเททีฟทั้งหมด และต่อจำนวนเชื้อสเตร็ปโตคอคไคทั้งหมด แต่ละการทดลองมีการทำซ้ำอย่างน้อยสามครั้งและนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ โดยหากข้อมูลมีการกระจายปกติใช้การวิเคราะห์สถิติแบบใช้พารามิเตอร์ชนิด One-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างกันทีละคู่โดยใช้สถิติ Post-hoc comparison ชนิด Bonferroni หากข้อมูลทุกกลุ่มมีความแปรปรวนไม่แตกต่างกันหรือ Tamhane หากข้อมูลมีความแปรปรวนแตกต่างกัน และหากข้อมูลมีการกระจายที่ไม่ปกติใช้การวิเคราะห์สถิติแบบไม่ใช้พารามิเตอร์ชนิด Kruskal Wallis Test ซึ่งทำการเปรียบเทียบความแตกต่างกันทีละคู่โดยใช้การคำนวณค่าวิกฤตแต่ละคู่จากสูตร[71]

$$\left|\bar{R}_u - \bar{R}_v\right| \geq Z_{\alpha/k(k-1)} \sqrt{\frac{N(N+1)\{(1/nu)+(1/nv)\}}{12}}$$

N = จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

Nu = จำนวนตัวอย่างในกลุ่ม u, v....

และนำค่าวิกฤตที่ได้มาเทียบกับค่าความต่างของค่า mean rank แปลผลโดย

Ri-Rj ≥ ค่าวิกฤตจากสูตร = มีความแตกต่าง

Ri-Rj < ค่าวิกฤตจากสูตร = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.5.3.2 วัดผลโดยวัดระดับคะแนนจากแบบสอบถามโดยผู้วัดและกรอกคะแนน 1 คนที่ไม่รู้ชนิดของน้ำยาบ้วนปาก ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS 11.5 โดยนำผลที่ได้มาวิเคราะห์การแจกแจงความถี่ของข้อมูลโดย หากข้อมูลมีการกระจายปกติใช้การวิเคราะห์สถิติแบบใช้พารามิเตอร์ชนิด Repeated Measured ANOVA หากข้อมูลมีการกระจายที่ไม่ปกติใช้การวิเคราะห์สถิติแบบไม่ใช้พารามิเตอร์ชนิด Friedman test