บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

การศึกษาเป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) ซึ่งมีการศึกษาในห้องทดลอง (*In-vitro* study) และการศึกษานำร่องทางคลินิก (Clinical Trial; pilot study) โดยแบ่งการศึกษาเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1. การศึกษาประสิทธิภาพของแกรนูลฟู่น้ำมันตะไคร้ต่อปริมาณการยึดเกาะของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์บนแผ่นอะคริลิก (*In-vitro* study)

2. การศึกษาประสิทธิภาพของแกรนูลฟู่น้ำมันตะไคร้ต่อปริมาณการยึดเกาะของเชื้อ แคนดิดาอัลบิแคนส์บนฐานฟันเทียมอะคริลิก (*In-vitro* study)

3. การศึกษานำร่องเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแกรนูลฟู่น้ำมันตะไคร้ต่อปริมาณการยึดเกาะของเชื้อแคนดิดา บนฐานฟันเทียมทั้งปากชนิดที่ทำด้วยเรซินอะคริลิกในอาสาสมัครที่ได้รับการใส่ฟันเทียมทั้งปาก (Clinical Trial; pilot study)

3.2 วัสดุและวิธีการ (Materials and Methods)

3.2.1 อุปกรณ์ (Equipments)

1. เครื่องตัดชิ้นงานความเร็วต่ำ (low speed saw machine: Isomet 4000, Buehler, IL, USA)
2. เครื่องวัดชิ้นงานดิจิตอล (digital veneer caliper)
3. หลอดทดลอง (test tube)
4. จานเพาะเชื้อ (petridishes)
5. ปิเปตสำหรับดูดของเหลวกึ่งอัตโนมัติ (semiautomatic micropipette)
6. ตู้เพาะเชื้อ (incubator)
7. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol lamp)
8. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
9. เครื่องเขย่า (mixer: Vortex-genie 2™, Scientific industrial, USA)
10. เครื่องชั่งสาร (scale)
11. ห่วงเพาะเชื้อ (sterile loop)
12. ท่อปลายพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ (sterile plastic tip)
13. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge: Hermle Z200A, Hermle Labortechnik, Germany)

14. คีมคีบ (forceps)

15. ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer: Reichert-Jung, Hausser Scientific Horcham, PA, USA)

16. กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)

17. บีกเกอร์ (beaker)

18. ขวดแก้วรูปชมพู่ (flask)

19. กระบอกตวง (cylinder)

20. ชั้นวางหลอดทดลอง (rack)

21. จานหลุมขนาดเล็ก (microtitre plate: Nunclon™, Denmark)

22. เครื่องปรับสมดุล (balance equipment)

23. เครื่องเขย่าสาร (shaker 25: Compact Rocker, National Labnet Company, USA)

24. ตู้ดูดอากาศ (hood)

25. หม้อปรับอุณหภูมิ (water bath)

26. นาฬิกาจับเวลา ความละเอียด ± 0.1 วินาที

27. หลอดทดลองขนาดเล็ก (eppenderf tubes)

28. กล้องถ่ายภาพดิจิตอลในช่องปาก (intra-oral digital camera; Canon, Japan)

29. กระเบื้อง

30. มีดตัดขี้ผึ้ง (wax knife)

3.2.2 วัสดุ (Materials)

1. ขี้ผึ้งสำหรับรอบขอบ (boxing wax)

2. ขี้ผึ้งสีชมพู (pink wax)

3. เรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อนส่วนผงสีชมพูและน้ำ (pink heat-cured acrylic powder and monomer liquid)

4. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Sabouraud's dextrose broth: Pronadisa, Fabricado por Hispanlab, Spain)

5. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Sabouraud's dextrose agar; BBL, Becton Dickinson and Company, USA)

6. อาหารเลี้ยงเชื้อแคนดิดาชนิดจำเพาะ (CHROMagar®; CHROMagar Company, Paris, France)

7. เอทิล แอลกอฮอล์ (ethyl alcohol)

8. น้ำกลั่น (distilled water)

9. แกรนูลฟู่น้ำมันตะไคร้

10. ยาเม็ดฟู่ยี่ห้อ Bonyplus® (Bonyplus®: Eminence, Switzerland)

11. สาร (2, 3)-บิส (2-เมทอกซี-4-ไนโตร-5-ซัลโฟฟีนิล)-5-[(ฟีนิลามิโน)-คาร์โบนิล] -2เอช-เททาโซเลียม ไฮดรอกไซด์ [(2, 3)-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2*H*-tetrazolium hydrozide (XTT: Sigma Chemical, USA)

12. โคเอ็นไซม์ คิวศูนย์ (Coenzyme Q_0: Sigma Chemical, USA)

13. ได-โพแทสเซียม ไฮโดรเจน ออโธฟอตเฟต (K_2HPO_4: di Potassium Hydrogen Orthophosphate)

14. โพแทสเซียม ไดไฮโดรฟอตเฟต ออโธฟอตเฟต (KH_2PO_4: Potassium dihydrogen orthophosphate)

15. เกลือ (NaCl)

3.3 วิธีการทดลอง (Methods)

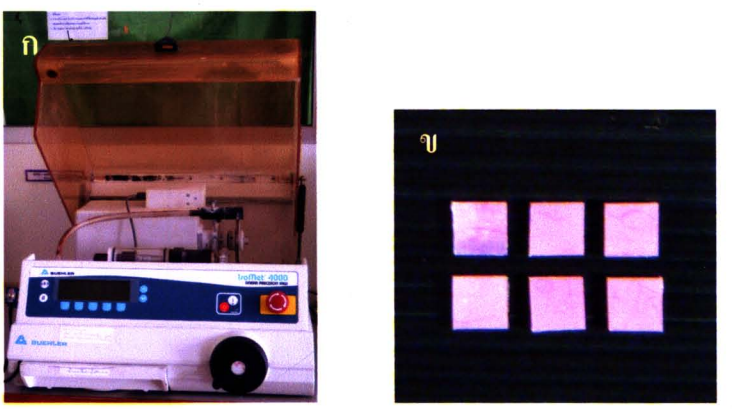
3.3.1 การศึกษาประสิทธิภาพของแกรนูลฟู่น้ำมันตะไคร้ต่อปริมาณการยึดเกาะของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์บนแผ่นอะคริลิกเปรียบเทียบกับยาเม็ดฟู่ที่ใช้ทั่วไปในท้องตลาด ณ เวลาต่าง ๆ (*In-vitro*)

3.3.1.1 การเตรียมแผ่นอะคริลิก

1) นำแผ่นขี้ผึ้งสีชมพูขนาด 3x3 ตารางนิ้ว หนา 2 มิลลิเมตร ลงแบบหล่อ (flasking) ดังแสดงในภาพที่ 3 เพื่อเตรียมขึ้นรูปเรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อน (heat polymerized acrylic resin) ตามกระบวนการทางห้องปฏิบัติการทันตกรรมประดิษฐ์ โดยผสมเรซิน อะคริลิกส่วนผงและน้ำตามอัตราส่วนที่แนะนำโดยผู้ผลิต เมื่อส่วนผสมถึงระยะที่ปั้นเป็นก้อนได้ (dough stage) ให้ทำการอัดเรซินอะคริลิกเข้าสู่แบบหล่อที่เตรียมไว้ นำไปต้มที่อุณหภูมิหม้อต้ม 165 องศาฟาเรนไฮต์ นาน 9 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นตามปกติ

2) เมื่อได้แผ่นอะคริลิกที่แข็งตัวสมบูรณ์แล้วนำมาทำความสะอาดด้วยแปรงสีฟันขนนุ่มและน้ำสบู่ จากนั้นนำแผ่นอะคริลิกไปตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นงานความเร็วต่ำให้ได้ขนาดประมาณ 5x5 ตารางมิลลิเมตร ดังแสดงในภาพที่ 4 แล้วนำไปแช่ในน้ำประมาณ 4 สัปดาห์ เพื่อกำจัดโมโนเมอร์ส่วนเกินออกให้หมด หลังจากนั้นนำแผ่นอะคริลิกไปล้างด้วยน้ำประปาโดยเปิดน้ำไหลผ่าน (running water) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอก่อนนำมาทดสอบ

ภาพที่ 3 (ก) วัสดุเรซินอะคริลิกและอุปกรณ์ในการผสม (ข) การหล่อแบบเพื่อขึ้นรูปแผ่นอะคริลิก



ภาพที่ 4 (ก) เครื่องตัดชิ้นงานความเร็วต่ำ (low speed saw machine; Isomet 4000) (ข) แผ่นอะคริลิก ขนาดประมาณ 5x5 ตารางมิลลิแมตร หนา 2 มิลลิเมตร

3.3.1.2 การเตรียมเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (clinical isolate)

1) ทำการเลี้ยงเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Sabouraud's dextrose agar) ในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2) นำเชื้อราในข้อ 3.3.1.2.1 ไปล้างด้วยสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) ความเข้มข้น 0.15 M และ pH 7.4 3 ครั้ง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเจือจางเชื้อจุลชีพด้วยสารละลาย PBS ให้ได้ปริมาณของเชื้อเท่ากับ 1×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้วิธีการนับจำนวนเชื้อโดยตรง (direct count) ด้วยกล้องจุลทรรศน์และนับจำนวนเชื้อราบนฮีโมไซโตมิเตอร์ ตามวิธีการดังต่อไปนี้

(1) นำสารละลายปริมาตร 10 ไมโครลิตรในหลอดที่มีการเจือจาง $1:10^{3}$ และ $1:10^{4}$ ใส่ลงในร่องด้านข้างของฮีโมไซโตมิเตอร์ซึ่งปิดทับด้วยแผ่นแก้วชนิดบาง (cover slip) ไว้แล้ว ซึ่งสารละลายจะไหลเข้าไปเองและกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอบนตาราง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

(2) นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10×40 เท่า โดยปิดทางผ่านของแสง (Iris diaphragm) เพื่อลดความเข้มของแสงบนพื้นภาพ

(3) นับจำนวนเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (n) โดยวิธีสุ่มจากตารางขนาดเล็ก จำนวน 5 ตาราง บนฮีโมไซโตมิเตอร์ โดยนับในตารางซึ่งอยู่กลางรูปสี่เหลี่ยมใหญ่และตารางที่มุมทั้งสี่ ดังแสดงในภาพที่ 5

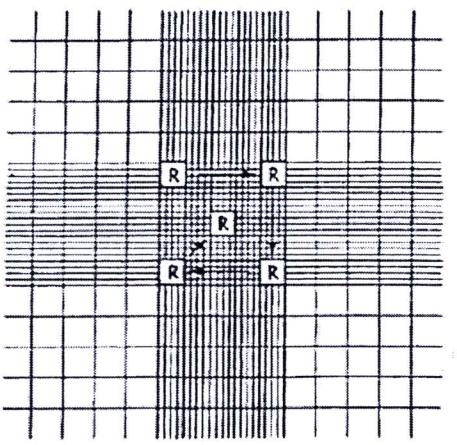
(4) คำนวณจำนวนเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ตามสมการดังนี้

$$N = (n) \times 5 \times 10^4 \times (\text{dilution factor})$$

N = จำนวนเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์/มิลลิลิตร

n = ผลบวกของจำนวนเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ที่นับได้ทั้งหมด

dilution factor = จำนวนเท่าของการเจือจาง



ภาพที่ 5 แสดงตำแหน่งบนฮีโมไซโตมิเตอร์ที่ใช้นับจำนวนเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (นับในช่องที่มีสัญลักษณ์ตัว R)

3.3.1.3 การเตรียมสารละลาย XTT

เตรียมสารละลายตั้งต้นของ XTT ตามวิธีที่รายงานโดย Sen และคณะในปี 2003 [94] ดังนี้ นำสาร XTT และโคเอนไซม์ คิวศูนย์ (Coenzyme Q_0) มาทำละลายในสารละลาย โดยให้มีปริมาณของสาร XTT และโคเอนไซม์ คิวศูนย์ เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เก็บสารละลายไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เมื่อจะนำไปทดสอบให้ทำการเจือจางสารละลาย XTT ด้วยสารละลาย PBS ในอัตราส่วน 1:6

3.3.1.4 การทดสอบประสิทธิภาพของแกรนูลฟู่น้ำมันตะไคร้ต่อปริมาณการยึดเกาะของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์บนแผ่นอะคริลิก ณ เวลาต่าง ๆ

1) นำเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ที่เตรียมไว้ปริมาณ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาใส่ในหลอดทดลองในปริมาณหลอดละ 400 ไมโครลิตร จากนั้นใส่แผ่นอะคริลิกลงในหลอดทดลองโดยวางในแนวตั้งหลอดละ 1 แผ่น แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง [83] หลังจากนั้นนำแผ่นอะคริลิกออกมาล้างในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ (sterile normal saline solution) ซึ่งบรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อ (petridish) ปริมาณ 20 มิลลิลิตรต่อแผ่น

2) แบ่งแผ่นอะคริลิกที่มีเชื้อราออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ใส่แผ่นอะคริลิกในน้ำกลั่น (กลุ่มควบคุม) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 2 ใส่แผ่นอะคริลิกในน้ำกลั่นปริมาณ 100 มิลลิลิตรร่วมกับเม็ดฟู่ยี่ห้อ Bonyplus® (Bonyplus®; Eminence, Switzerland) จำนวนครึ่งเม็ด (1.22 กรัม)

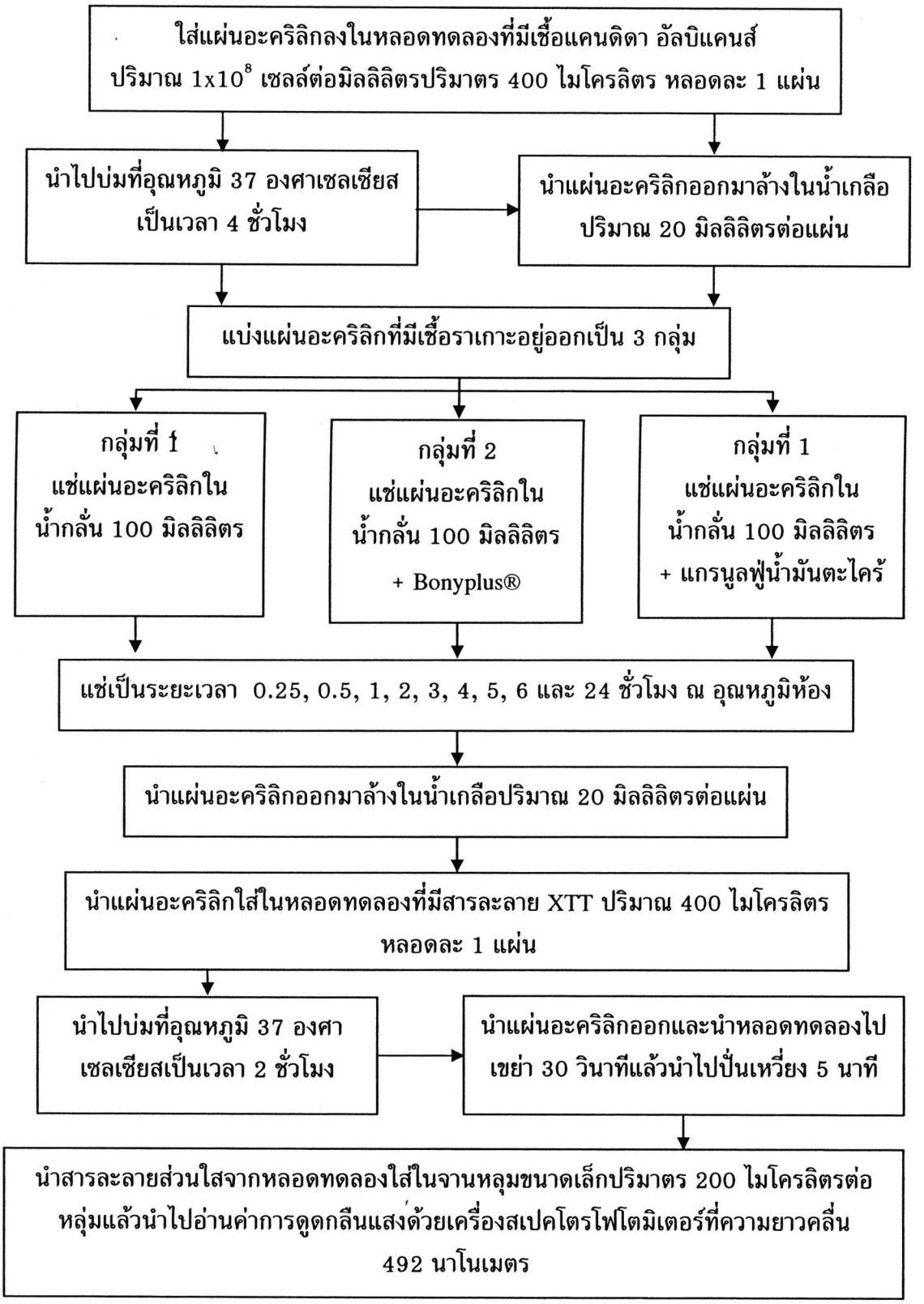
กลุ่มที่ 3 ใส่แผ่นอะคริลิกในน้ำกลั่นปริมาณ 100 มิลลิลิตรร่วมกับแกรนูลฟู่น้ำมันตะไคร้ (เตรียมตำรับโดยคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น) จำนวนครึ่งซอง (6.34 กรัม)

นำตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 24 ชั่วโมง

3) เมื่อครบระยะเวลาในแต่ละกลุ่มแล้วนำแผ่นอะคริลิกออกมาล้างในน้ำเกลือปราศจากเชื้อซึ่งบรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อปริมาณ 20 มิลลิลิตร/แผ่น จากนั้นนำแผ่นอะคริลิกไปใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย XTT ที่เตรียมไว้ (ตามข้อ 3.3.1.3) ในปริมาณหลอดละ 400 ไมโครลิตร โดยให้วางแผ่นอะคริลิกในแนวตั้ง หลอดละ 1 แผ่น แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4) เมื่อครบ 2 ชั่วโมงแล้ว นำแผ่นอะคริลิกออกและนำหลอดทดลองไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใส (supernatant solution) จากหลอดทดลองไปใส่ในจานหลุมขนาดเล็ก (96-well microtiter plate) ในปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

5) การทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มย่อย สรุปขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ผังงานการทดสอบประสิทธิภาพของแกรนูลฟู่น้ำมันตะไคร้ต่อปริมาณการยึดเกาะของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์บนแผ่นอะคริลิกเปรียบเทียบกับยาเม็ดฟู่ยี่ห้อ Bonyplus® และกลุ่มควบคุม ณ เวลาต่าง ๆ

3.3.1.5 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

คำนวณขนาดตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่าง 3 กลุ่ม ที่เป็นอิสระต่อกัน โดยใช้สถิติ Analysis of Variance (ANOVA) ในการทดสอบ ซึ่งในการศึกษานี้ใช้โปรแกรม Java Applets for Power and Sample Size จากเวปไซต์ http://www.stat. uiowa.edu/~rlenth/Power แทนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยข้อมูลจากการ ศึกษาของสุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์ และคณะในปี 2006 [83] ดังนี้

-ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดค่าดูดกลืนแสง (SD) = 0.19

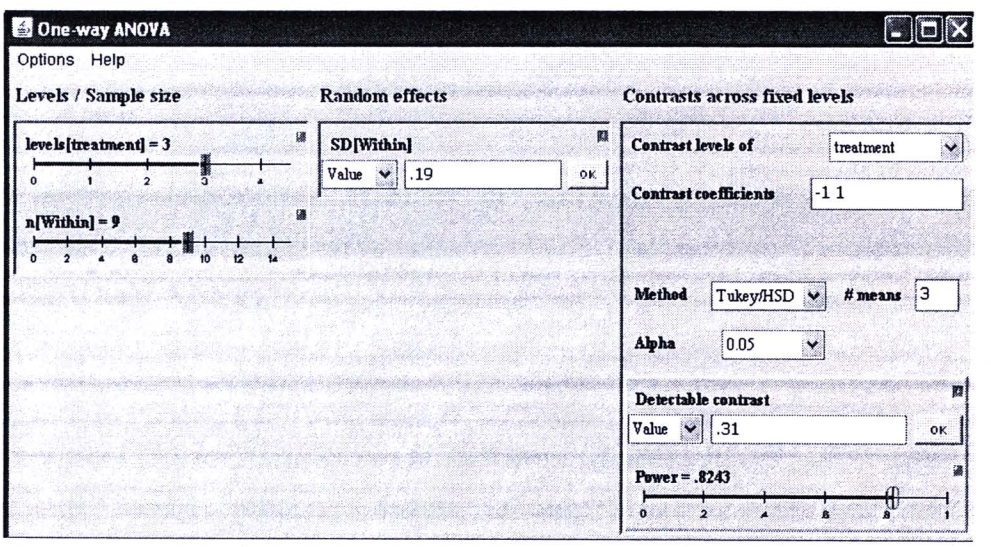
-ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยสูงสุดและค่าเฉลี่ยต่ำสุด (max.Mean-min.Mean)

= 0.40 – 0.09

= 0.31

-กำหนดระดับความเชื่อมั่น (α) = 0.05

จากการคำนวณโดยกำหนดให้อำนาจการทดสอบมีค่ามากกว่า 0.80 จะได้ขนาดตัวอย่างกลุ่มละ 9 ชิ้น ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แสดงการแทนค่าเพื่อคำนวณขนาดตัวอย่างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการศึกษานี้ คือ กลุ่มละ 9 ชิ้น โดยมีกลุ่มทดสอบ 3 กลุ่ม ๆ ละ 9 เวลา และกลุ่มที่ใช้หาปริมาณเชื้อตั้งต้นก่อนแช่ในสารละลายต่าง ๆ 1 กลุ่ม จึงใช้จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 252 ชิ้น (แสดงรายละเอียดในตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนแผ่นอะคริลิกที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของแกรนูลฟู่น้ำมันตะไคร้ต่อปริมาณการยึดเกาะของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์บนแผ่นอะคริลิกเปรียบเทียบกับยาเม็ดฟู่ยี่ห้อ Bonyplus® ณ เวลาต่างๆ

จำนวนแผ่นอะคริลิก (ชิ้น)	เวลา (ชั่วโมง)										
	0	0.25	0.5	1	2	3	4	5	6	24	**รวม**
กลุ่มเชื้อตั้งต้น (baseline)	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
กลุ่มควบคุม (น้ำกลั่น)	-	9	9	9	9	9	9	9	9	9	81
กลุ่มทดลอง (Bonyplus®)	-	9	9	9	9	9	9	9	9	9	81
กลุ่มทดลอง (แกรนูลฟู่ฯ)	-	9	9	9	9	9	9	9	9	9	81
รวมแผ่นอะคริลิกทั้งหมด											**252**

3.3.1.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้โปรแกรม SPSS Version NO. 11.5 ในการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงระหว่างกลุ่ม กำหนดค่าระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05 ใช้สถิติ Kruskal-Wallis test ร่วมกับ pairwise Mann-Whitney U test with Bonferroni adjustment เปรียบเทียบปริมาณเชื้อระหว่างกลุ่ม และเปรียบเทียบปริมาณเชื้อ ณ เวลาต่างๆ กับปริมาณเชื้อ ณ เวลาตั้งต้น (0 นาที) เนื่องจากข้อมูลมีการแจกแจงไม่ปกติ

3.3.2 การศึกษาประสิทธิภาพของแกรนูลฟู่น้ำมันตะไคร้ต่อปริมาณการยึดเกาะของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์บนฐานฟันเทียมอะคริลิกเปรียบเทียบกับยาเม็ดฟู่ที่ใช้ทั่วไปในท้องตลาด

3.3.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งเพื่อจำลองฐานฟันเทียม

1) นำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Sabouraud's dextrose agar) ในอัตราส่วน ส่วนผง 65 กรัม ต่อ น้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมให้ละลายเข้ากันเป็นเนื้อเดียว ต้มให้เดือด 1 นาที นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบรรจุในหลอดทดลองหลอดละ 20 มิลลิลิตร

2) จากนั้นนำหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที

3) เก็บหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อข้างต้นไว้ในหม้อปรับอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซสเซียส

3.3.2.2 การศึกษาเพื่อหาปริมาณเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ที่เหมาะสมในการยึดเกาะกับฐานฟันเทียมอะคริลิก

1) การเตรียมเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (clinical isolate)

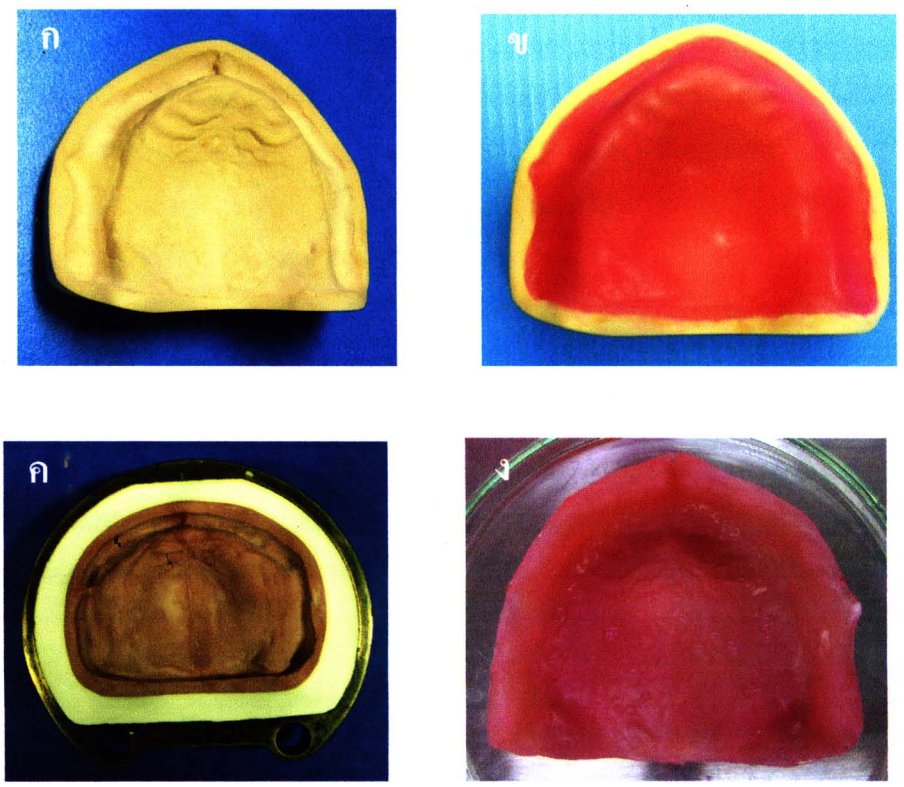
นำเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (จากข้อ 3.3.1.2 1)) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นปรับเชื้อจุลชีพในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวให้มีปริมาณของเชื้อ 2.5×10^{3} และ 5×10^{3} เซลล์ต่อมิลลิลิตร จำนวนของยีสต์ต่อมิลลิลิตรในทุกการทดสอบเตรียมโดยการใช้การนับจำนวนเชื้อด้วยเครื่องฮีโมไซโตมิเตอร์

2) การเตรียมฐานฟันเทียมอะคริลิก

(1) นำแผ่นขี้ผึ้งสีชมพูลนไฟด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์จนขี้ผึ้งอ่อนตัวแล้วนำแผ่นขี้ผึ้งไปกดลงบนแบบจำลองสันเหงือกไร้ฟันบน (upper arch) ซึ่งทำการเทแบบหล่อด้วยพลาสเตอร์หิน (dental stone) ตัดแต่งส่วนเกินของขี้ผึ้งให้พอดีกับร่องลึกรอบปาก (vestibule) ส่วนด้านหลังให้ขอบเขตของขี้ผึ้งอยู่ที่เส้นที่ลากจากร่องฮามูลาร์ (hamular notch) ข้างหนึ่งผ่านบริเวณเพดานอ่อนหน้าต่อจุดโฟเวีย พาลาติน (fovea palatine) ประมาณ 2 มิลลิเมตร ไปยังร่องฮามูลาร์อีกข้างหนึ่ง

(2) นำแบบจำลองลงแบบหล่อเตรียมเพื่อขึ้นรูปเรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อนแทนที่ขี้ผึ้งในแบบหล่อ ตามกระบวนการทางห้องปฏิบัติการทันตกรรมประดิษฐ์เช่นเดียวกับการเตรียมแผ่นอะคริลิกในข้อที่ 3.3.1.1 1)

(3) นำฐานฟันเทียมที่เปลี่ยนจากขี้ผึ้งเป็นเรซินอะคริลิกเรียบร้อยแล้ว (ภาพที่ 8) ออกจากภาชนะหล่อแบบและแบบหล่อ (deflasking and removing the denture from cast) ทำการกรอแต่งส่วนเกินของฐานฟันเทียมและขัดแต่งฐานฟันเทียม แล้วนำไปแช่ในน้ำประมาณ 4 สัปดาห์เพื่อกำจัดโมโนเมอร์ส่วนเกินออกให้หมด หลังจากนั้นนำฐานฟันเทียมไปล้างผ่านน้ำประปาอีก 3 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปอบก๊าซก่อนนำมาทดสอบ ภาพที่ 8



ภาพที่ 8 (ก) แบบหล่อพลาสเตอร์หินของสันเหงือกไร้ฟันบน (ข) แสดงลักษณะฐานฟันเทียมที่ขึ้นรูปด้วยแผ่นขี้ผึ้งบนแบบจำลองสันเหงือกไร้ฟันบน (ค) การเตรียมแบบหล่อฐานฟันเทียมเพื่อขึ้นรูปด้วยเรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อน (ง) ฐานฟันเทียมที่เปลี่ยนจากขี้ผึ้งเป็นเรซินอะคริลิกเรียบร้อยแล้ว

3) ทดสอบการยึดเกาะของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ปริมาณต่าง ๆกับฐานฟันเทียมอะคริลิกด้วยวิธีจำลองฐานฟันเทียม (replica method)

(1) นำเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ที่ได้เจือจางให้มีปริมาณต่าง ๆ (จากข้อ 3.3.2.2 1)) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ป้ายที่ฐานฟันเทียมฐานอะคริลิกด้านที่สัมผัสกับเนื้อเยื่อโดยให้กระจายตัวทั่วฐานฟันเทียม (จากข้อ 3.3.2.2 2)) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำฐานฟันเทียมอะคริลิกออกมาล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile distilled water) ซึ่งบรรจุอยู่ในบีกเกอร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อชิ้น

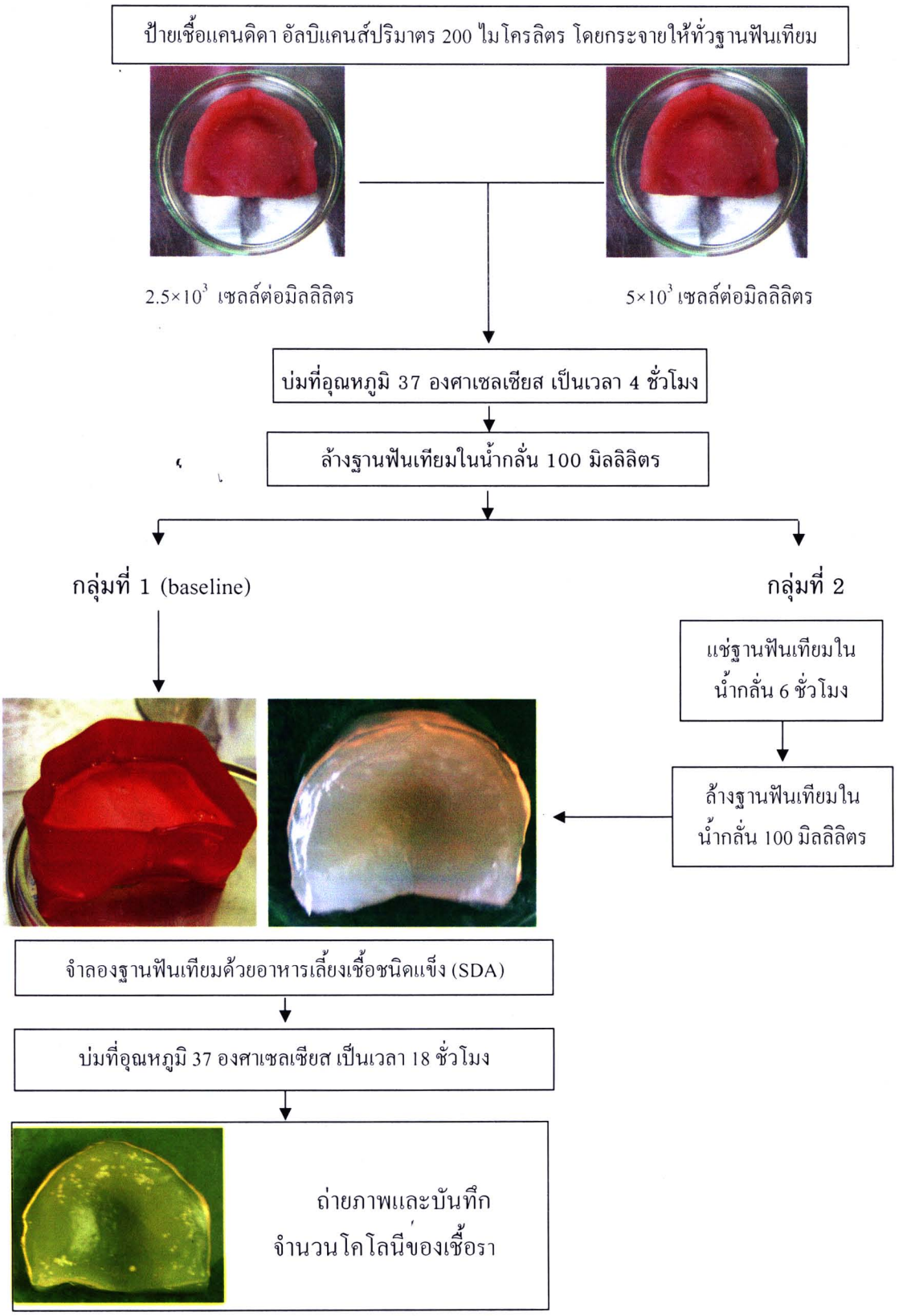
(2) แบ่งฐานฟันเทียมที่มีเชื้อราเกาะอยู่ออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 นำฐานฟันเทียมอะคริลิกไปรอบขอบเขตด้วยแผ่นขี้ผึ้งสำหรับรอบขอบ (boxing wax) กว้างประมาณ 1 นิ้ว โดยให้มีความสูงของแผ่นขี้ผึ้งเหนือขอบฐานฟันเทียมประมาณ 0.5 นิ้ว ใช้ขี้ผึ้งต่อขอบผนึกระหว่างขี้ผึ้งสีชมพูและขอบฟันเทียมโดยรอบ ให้แนบสนิทเพื่อเตรียมจำลองฐานฟันเทียมด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

กลุ่มที่ 2 นำฐานฟันเทียมอะคริลิกแช่ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำฐานฟันเทียมอะคริลิกออกมาล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile distilled water) ซึ่งบรรจุอยู่ในบีกเกอร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อชิ้น แล้วนำฐาน ฟันเทียมไปรอบขอบเขตด้วยแผ่นขี้ผึ้งสำหรับรอบขอบเพื่อเตรียมจำลองฐานฟันเทียมด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

(3) ค่อย ๆ เทอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง (จากข้อที่ 3.3.2.1) ลงบนฐานฟันเทียม โดยอาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีความหนาอย่างน้อย 5 มิลลิเมตรจากฐานฟันเทียม รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวเต็มที่ใช้เวลาประมาณ 15 นาที จากนั้นแกะแผ่นขี้ผึ้งที่ล้อมรอบขอบฟันเทียมออก นำอาหารเลี้ยงเชื้อราที่แข็งตัวแล้วออกจากฟันเทียมเก็บไว้ในจานเลี้ยงเชื้อ โดยให้อาหารเลี้ยงเชื้อด้านที่สัมผัสกับฐานฟันเทียมอยู่ในลักษณะหงายขึ้น นำไปเข้าตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

(4) เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกลักษณะการเกาะกลุ่มของโคโลนีของเชื้อและถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิตอล บันทึกปริมาณเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ที่เหมาะสม คือ ปริมาณเชื้อที่แสดงให้เห็นลักษณะโคโลนีเดี่ยว สามารถนับปริมาณโคโลนีได้เพื่อนำข้อมูลไปใช้ในการทดสอบต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ผังงานการทดสอบเพื่อหาปริมาณของเชื้อราที่เหมาะสมในการยึดเกาะกับฐานฟันเทียมอะคริลิกด้วยวิธีจำลองฐานฟันเทียม (replica method)

3.3.2.3 ทดสอบประสิทธิภาพของแกรนูลฟู่น้ำมันตะไคร้ต่อการต้านการยึดเกาะของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์บนฐานฟันเทียมอะคริลิก เปรียบเทียบกับยาเม็ดฟู่ที่ใช้ทั่วไปในท้องตลาด

1) นำเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ที่ได้ปริมาณที่เหมาะสม (จากข้อ 3.3.2.2 3)) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ป้ายที่ฐานฟันเทียมอะคริลิก (จากข้อ 3.3.2.2 2)) โดยให้กระจายตัวทั่วฐานฟันเทียมแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำฐานฟันเทียมอะคริลิกออกมาล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile distilled water) ปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อชิ้น

2) แบ่งฐานฟันเทียมที่มีเชื้อราเกาะอยู่ออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 นำฐานฟันเทียมอะคริลิกไปรอบขอบเขตด้วยแผ่นขี้ผึ้งสำหรับรอบขอบ กว้างประมาณ 1 นิ้ว โดยให้มีความสูงของแผ่นขี้ผึ้งเหนือขอบฐานฟันเทียมประมาณ 0.5 นิ้ว ใช้ขี้ผึ้งต่อขอบผนึกระหว่างขี้ผึ้งสีชมพูและขอบฟันเทียมโดยรอบให้แนบสนิท เพื่อเตรียมจำลองฐานฟันเทียมด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

กลุ่มที่ 2 นำฐานฟันเทียมอะคริลิกแช่ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 3 นำฐานฟันเทียมอะคริลิกแช่ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตรร่วมกับเม็ดฟู่ยี่ห้อ Bonyplus® จำนวนครึ่งเม็ด (1.22 กรัม) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

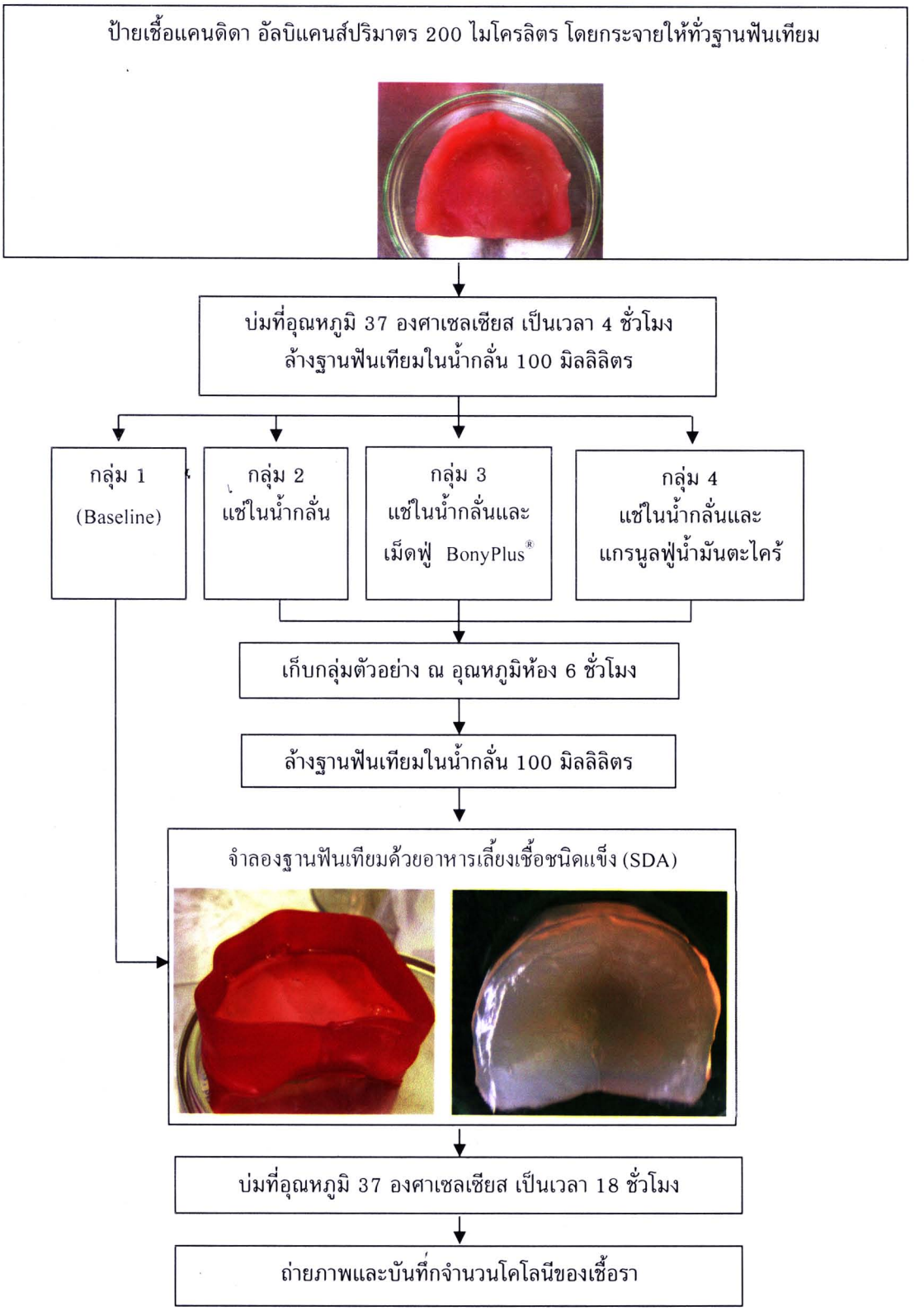
กลุ่มที่ 4 นำฐานฟันเทียมอะคริลิกแช่ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตรร่วมกับแกรนูลฟู่น้ำมันตะไคร้ จำนวนครึ่งซอง (6.34 กรัม) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

3) เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำฐานฟันเทียนมอะคริลิกออกมาล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile distilled water) ซึ่งบรรจุอยู่ในบีกเกอร์ ปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อชิ้น แล้วนำฐานฟันเทียมไปรอบขอบเขตด้วยแผ่นขี้ผึ้งสำหรับรอบขอบเพื่อเตรียมจำลองฐานฟันเทียมด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

4) ค่อย ๆ เทอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง (จากข้อที่ 3.3.2.1) ลงบนฐานฟันเทียม โดยอาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีความหนาอย่างน้อย 5 มิลลิเมตรจากฐานฟันเทียม รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวเต็มที่ใช้เวลาประมาณ 15 นาที จากนั้นแกะแผ่นขี้ผึ้งที่ล้อมรอบขอบฟันเทียมออก นำอาหารเลี้ยงเชื้อราที่แข็งตัวแล้วออกจากฟันเทียมเก็บไว้ในจานเลี้ยงเชื้อ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อด้านที่สัมผัสกับฐานฟันเทียมอยู่ในลักษณะหงายขึ้น นำไปเข้าตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

5) เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกลักษณะการเกาะกลุ่มของโคโลนีของเชื้อ และถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิตอล ดังแสดงในภาพที่ 10

6) ทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มย่อย



ภาพที่ 10 ผังงานการทดสอบประสิทธิภาพของแกรนูลฟู่น้ำมันตะไคร้ต่อการต้านการยึดเกาะของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์บนฐานฟันเทียมอะคริลิก เปรียบเทียบกับยาเม็ดฟู่ยี่ห้อ Bonyplus®

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.3.2.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

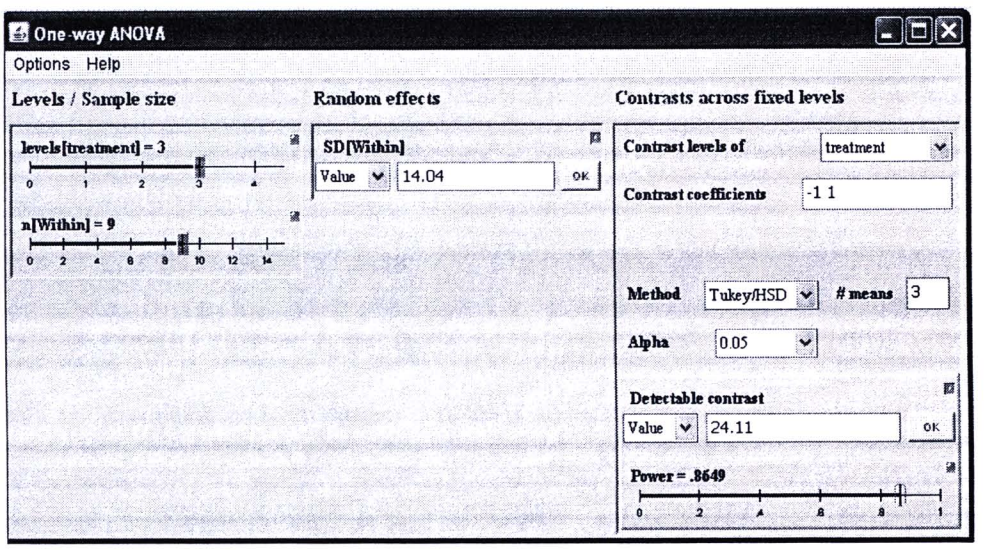
คำนวณขนาดตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกันโดยใช้สถิติ Analysis of Variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม Java Applets for Power and Sample Size http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power ซึ่งในการศึกษานี้แทนค่าจำนวนโคโลนีของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ด้วยข้อมูลจากการศึกษาของ Barbeau และคณะในปี 2003 [3] ดังนี้

-ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนโคโลนีของเชื้อรา (SD) = 14.04

-ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยสูงสุดและค่าเฉลี่ยต่ำสุด (max.Mean-min.Mean) = 41.82-17.71 = 24.11

-กำหนดระดับความเชื่อมั่น (α) = 0.05

จากการคำนวณโดยกำหนดให้อำนาจการทดสอบมีค่ามากกว่า 0.80 จะได้ขนาดตัวอย่างกลุ่มละ 9 ชิ้น ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 แสดงการแทนค่าเพื่อคำนวณขนาดตัวอย่างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการศึกษานี้ คือ กลุ่มละ 9 ชิ้น โดยมีกลุ่มทดสอบ 3 กลุ่มและกลุ่มที่ใช้หาปริมาณเชื้อตั้งต้นก่อนแช่ในสารละลายต่าง ๆ 1 กลุ่ม จึงใช้จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 36 ชิ้น

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.3.2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้โปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีระหว่างกลุ่ม กำหนดค่าระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05 ใช้สถิติ Kruskal-Wallis test ร่วมกับ pairwise Mann-Whitney U test with Bonferroni adjustment เปรียบเทียบปริมาณเชื้อระหว่างกลุ่ม และเปรียบเทียบปริมาณเชื้อ ณ ก่อนการทดสอบกับปริมาณเชื้อหลังการทดสอบ เนื่องจากข้อมูลมีการแจกแจงไม่ปกติ

3.3.3 การศึกษาประสิทธิภาพของแกรนูลฟู่น้ำมันตะไคร้ต่อปริมาณการยึดเกาะของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์บนฐานฟันเทียมทั้งปากชนิดที่ทำด้วยเรซินอะคริลิก ในผู้ป่วยที่ได้รับการใส่ฟันเทียมทั้งปาก *(Clinical Trial; Pilot study)*

3.3.3.1 ขั้นเตรียมการ

1) การขออนุมัติจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

โครงการวิจัยนี้ได้รับอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นแล้ว เลขที่โครงการ HE 510639

2) การสร้างแบบสอบถามและแบบบันทึกการตรวจทางคลินิก

ทำการกำหนดขอบเขตของคำถามที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาและแบบบันทึกการตรวจทางคลินิกเพื่อให้ได้ครอบคลุมประเด็นที่ต้องการศึกษา (เอกสาร ภาคผนวก ก)

3) การสร้างคู่มือการดูแลรักษาและทำความสะอาดฟันเทียม

จัดทำคู่มือดูแลรักษาและทำความสะอาดฟันเทียมเพื่อนำไปแนะนำและอธิบายให้ผู้ป่วยเข้าใจให้สามารถนำไปปฏิบัติได้ง่าย (เอกสารภาคผนวก ก)

3.3.3.2 กลุ่มตัวอย่าง

1) ผู้ป่วยที่ได้รับการใส่ฟันเทียมทั้งปาก จากภาควิชาทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ วิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 22 คน โดยมีข้อกำหนดในการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างดัง ต่อไปนี้

เกณฑ์ในการคัดอาสาสมัครเข้าศึกษา (Inclusion Criteria)

(1) อายุมากกว่า 50 ปีขึ้นไป

(2) ได้รับการใส่ฟันเทียมทั้งปากบนฐานเรซินอะคริลิก

(3) ไม่มีประวัติการแพ้ตะไคร้หรือน้ำมันหอมระเหยอื่นๆ

(4) สามารถติดต่อสื่อสารด้วยวิธีพูด อ่าน ฟัง หรือเขียนภาษาไทยได้ หรือมีญาติที่ดูแลใกล้ชิดตลอดเวลา สามารถติดต่อสื่อสารได้ด้วยวิธีพูด อ่าน ฟัง หรือเขียนภาษาไทย

(5) เต็มใจหรือสมัครใจที่จะเข้าร่วมในการวิจัยจนถึงสิ้นสุดการวิจัยและร่วมมือปฏิบัติตามแผนที่ผู้วิจัยแนะนำ

เกณฑ์ในการคัดอาสาสมัครออกจากการศึกษา (Exclusion Criteria)

(1) ผู้ป่วยที่มีอาการแทรกซ้อนอื่น ๆ เช่น โรคทางระบบที่อาจก่อให้เกิดอันตรายได้

(2) ได้รับยาปฏิชีวนะและ/หรือยาต้านเชื้อราในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา

(3) ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง

(4) ผู้ป่วยที่ติดเชื้อราในช่องปากจำเป็นต้องได้รับยาต้านเชื้อราเพื่อรักษา

(5) ใช้น้ำยาบ้วนปากในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา

2) การแบ่งกลุ่มการทดสอบ

แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม

กลุ่ม A กลุ่มควบคุม ได้รับการแนะนำทันตสุขศึกษาร่วมกับการใช้น้ำเปล่าแช่ฟันเทียมตลอดคืน

กลุ่ม B กลุ่มทดลอง ได้รับการแนะนำทันตสุขศึกษาร่วมกับการใช้แกรนูลฟู่น้ำมันตะไคร้แช่ฟันเทียมตลอดคืน

กลุ่ม C ได้รับการแนะนำทันตสุขศึกษาร่วมกับการใช้ยาเม็ดฟู่ Bonyplus® แช่ฟันเทียมตลอดคืน

3.3.3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

1) อธิบายให้อาสาสมัครทราบถึงรายละเอียดของงานวิจัยและให้ความยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจ

2) ให้อาสาสมัครเซ็นชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการ

3) อาสาสมัครทุกคนได้รับการซักประวัติต่าง ๆ และทำการบันทึกตามแบบ สอบถาม (เอกสารในภาคผนวก ก)

4) การตรวจภายในช่องปาก

อาสาสมัครทุกคนได้รับการตรวจช่องปากและสัมภาษณ์โดยผู้ทำการวิจัยเพียงคนเดียวตลอดการศึกษา โดยใช้ชุดตรวจภายในช่องปากซึ่งประกอบด้วยกระจกส่องปาก คีมคีบสำลี และเครื่องมือตรวจฟันและเหงือก ตรวจและบันทึกลักษณะของเนื้อเยื่อภายใต้ฐานฟันเทียม โดยทำการตรวจและบันทึกก่อนเริ่มการศึกษาและการติดตามผลภายหลังจากการศึกษาครบ 4 สัปดาห์ (เอกสารในภาคผนวก ก)

5) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแคนดิดาชนิดแข็ง

นำอาหารเลี้ยงเชื้อแคนดิดาชนิดแข็ง (CHROMagar®, CHRO Magar Company, Paris, France) ในอัตราส่วน ส่วนผง 45.9 กรัม ต่อ น้ำบริสุทธิ์ 1 ลิตร ผสมให้ละลายเข้ากันเป็นเนื้อเดียว ต้มให้ค่อยๆ ละลายจนกระทั่งได้สารลายเนื้อเดียว แล้วนำไปเก็บไว้ในหม้อปรับอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซสเซียส เพื่อเตรียมนำไปใช้ในการจำลองฐานฟันเทียมในขั้นตอนต่อไป

6) การจำลองฐานฟันเทียม

นำฟันเทียมบนของผู้ป่วยล้างด้วยน้ำประปา จากนั้นทำการจำลองฐานฟันเทียมด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแคนดิดาชนิดแข็ง โดยนำฐานฟันเทียมอะคริลิกไปล้อมรอบขอบเขตด้วยแผ่นขี้ผึ้งสำหรับรอบขอบ (boxing wax) กว้างประมาณ 1 นิ้ว โดยให้มีความสูงของแผ่นขี้ผึ้งเหนือขอบฐานฟันเทียมประมาณ 0.5 นิ้ว ใช้ขี้ผึ้งต่อขอบผนึกระหว่างขี้ผึ้งสีชมพูและขอบฟันเทียมโดยรอบให้แนบสนิท ค่อย ๆ เทอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เตรียมไว้ (จากข้อที่ 3.3.3.3 5)) ลงบนฐานฟันเทียม โดยอาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีความหนาอย่างน้อย 5 มิลลิเมตรจากฐานฟันเทียม รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวเต็มที่ใช้เวลาประมาณ 15 นาที จากนั้นแกะแผ่นขี้ผึ้งที่ล้อมรอบขอบฟันเทียมออก นำอาหารเลี้ยงเชื้อราที่แข็งตัวแล้วออกจากฟันเทียมเก็บไว้ในจานเลี้ยงเชื้อ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อด้านที่สัมผัสกับฐานฟันเทียมอยู่ในลักษณะหงายขึ้น นำไปเข้าตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการบันทึกลักษณะตำแหน่ง และนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแคนดิดา บนฐานฟันเทียม (first agar replica, Screening)

7) การทดสอบหาเชื้อแคนดิดาในเนื้อเยื่อช่องปากด้วยวิธีการป้าย

นำไม้พันสำลีไปป้ายบริเวณเนื้อเยื่อใต้ฐานฟันเทียม (บริเวณเพดานปาก) จากนั้นนำไม้พันสำลีไปใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรแล้วนำหลอดทดลองไปเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าผสมให้เข้ากัน (vortex) นาน 30 วินาที แล้วนำสารละลายจากหลอดทดลองในปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อแคนดิดาชนิดแข็งและกระจายสารละลายให้ทั่วจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด นับและบันทึกจำนวนโคโลนี

8) แบ่งกลุ่มการทดสอบเป็น 3 กลุ่ม ให้ทันตสุขศึกษาและแนะนำการทำความสะอาดฟันเทียม ดังนี้

กล่ม A กลุ่มควบคุม ได้รับการแนะนำทันตสุขศึกษาร่วมกับการใช้น้ำเปล่าแช่ฟันเทียมในตลอดคืน

กลุ่ม B กลุ่มทดลอง ได้รับการแนะนำทันตสุขศึกษาร่วมกับการใช้แกรนูลฟู่น้ำมันตะไคร้แช่ฟันเทียมตลอดคืน

กลุ่ม C กลุ่มทดลอง ได้รับการแนะนำทันตสุขศึกษาร่วมกับการใช้ยาเม็ดฟู่ Bonyplus® แช่ฟันเทียมตลอดคืน

โดยก่อนเริ่มต้นการทดสอบให้ทำการจำลองฐานฟันเทียมด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแคนดิดาชนิดแข็ง และทำการทดสอบหาเชื้อแคนดิดาในเนื้อเยื่อช่องปากด้วยวิธีการป้าย (ด้วยวิธีการในข้อ 3.3.3.3 6) และ 3.3.3.3 7) ตามลำดับ) เพื่อเป็นฐานข้อมูลก่อนทำการทดสอบ (second agar replica, Baseline)

9) นัดติดตามผลการรักษาผู้ป่วยเมื่อเวลาผ่านไปครบ 4 สัปดาห์โดยในการติดตามผลจะทำการทดสอบหาเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์บนฐานฟันเทียมและทำการทดสอบหาเชื้อแคนดิดาในเนื้อเยื่อช่องปากด้วยวิธีการป้ายซ้ำอีกครั้งหนึ่ง (ด้วยวิธีการในข้อ 3.3.3.3 6) และ 3.3.3.3 7)) เพื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป (third agar replica, Result)

3.3.3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลด้วยสถิติเชิงพรรณนา (Descriptive Statistics)

การวิเคราะห์ผลด้วยสถิติเชิงอนุมาน (Inferencial Statistics) ด้วยโปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีระหว่างกลุ่ม กำหนดค่าระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05 ใช้สถิติ Kruskal-Wallis test ร่วมกับ pairwise Mann-Whitney U test with Bonferroni adjustment เปรียบเทียบปริมาณเชื้อระหว่างกลุ่ม และใช้สถิติ Wilcoxon signed-rank test เปรียบเทียบปริมาณเชื้อ ณ ก่อนการทดสอบกับปริมาณเชื้อหลังการทดสอบ เนื่องจากข้อมูลมีการแจกแจงไม่ปกติ

การเปรียบเทียบปริมาณเชื้อระหว่างกลุ่มทั้ง 3 กลุ่มทำการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อทั้งก่อนและหลังการทดสอบ และเปรียบเทียบร้อยละการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ ก่อน-หลังการทดสอบ ซึ่งมีสูตรการคำนวณ ดังนี้

$$\% \text{ Change} = \frac{Y1 - Y2 \times 100}{Y1}$$

- % Change หมายถึง ร้อยละการเปลี่ยนแปลงก่อน-หลังการทดสอบ
- Y1 = ปริมาณของเชื้อก่อนการทดสอบ
- Y2 = ปริมาณของเชื้อหลังการทดสอบ