บทที่ 2

วัสดุที่ใช้และวิธีทดลอง

1. วัสดุที่ใช้

1.1 ยา

1.1.1 ยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด

Ampicillin	(Europharm Labs.)
Chloramphenicol	(succinate Carlo Erba)
Dalacin C phosphate	(Upjohn)
Erythromycin estolate	(Lilly)
Garamycin	(Schering, U.S.A.)
Kanamycin sulfate	(Europharm Labs)
Lincocin	(Upjohn)
Penicillin G sodium	(Glaxo)
Streptomycin sulfate	(Dumex)
Tetracycline hydrochloride	(Asian Pharmaceutical)

1.1.2 น้ำยาอมบ้วนปาก 8 ชนิด

Cepacol	(Richardson-Merrell)
Fluocaril	(Borneo)
Lavoris	(Richardson-Merrell)
Listerine	(Warner-Lambert)
Micrin	(Johnson & Johnson)

Orasol	(L.P. Standard Labs)
Sterisol	(Warner - Lambert)
Vademecum	(Barnangen)

1.1.3 Sulfonamide drugs

Co-trimoxazole	(Roche)
Lidaprim	(Chemie Linz Research Labs)
Sulfamethoxazole	(Atlantic)
Trimethoprim	(Atlantic)

1.1.4 ยาสีฟัน 12 ชนิด

ไกลชิด	(Lever Brothers)
Colgate	(Colgate-Palmolive Company)
Kolenos	(Whitehall Labs)
Zolex	(ประจวบจำปาทอง)
Darkie	(Hawley & Hazel Chemical)
DR Dentarux	(The Lion Dentifrice Co.Ltd.)
ทิพย์นิยม	(ทิพย์นิยม)
Paradontax	(Dr. Madaus & Co.)
Fluocaril	(Laboratories Goupil S.A.)
วาว	(ศรีธนารักษ์ จำกัด)
Vademecum	(Barnangen)
Sensodyne	(Stafford - Miller Limited)

1.1.5 สมุนไพร 2 ชนิด

น้ำมันกานพลู	(สหเภสัช)
การบูร	(สหเภสัช)

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Mitis Salivarius Agar

Tryptic soy broth

1.3 เชื้อที่ใช้

Streptococcus mutans (IB-1600) จากคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาฯ

Streptococcus sanguis แยกที่คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาฯ

1.4 Standard sensitivity discs

1.4.1 Standard discs ของยาปฏิชีวนะ

Ampicillin	10 mcg/disc	(Difco Labs)
Chloramphenicol	30 mcg/disc	(Difco Labs)
Dalacin C phophate	10 mcg/disc	(Upjohn)
Erythromycin estolate	15 mcg/disc	(Difco Labs)
Garamycin	10 mcg/disc	(Schering Corporation, U.S.A.)
Kanamycin	30 mcg/disc	(Difco Labs)
Lincocin	10 mcg/disc	(Upjohn)
Penicillin G	10 mcg/disc	(Difco Labs)
Streptomycin	10 mcg/disc	(Difco Labs)
Tetracycline	30 mcg/disc	(Difco Labs)

1.4.2 standard discs ของ Sulfonamide drugs

Co-trimoxazole	25 mcg/disc	(Wellcome)
Lidaprim	25 mcg/disc	(Linz)

1.5 discs น้ำยาอมบ้วนปากชนิดต่าง ๆ ตาม 1.1.2 หยดน้ำยา discs ละ 0.1 ml

1.6 แอลกอฮอล์ 95 %

1.7 น้ำยา buffers สำหรับยาปฏิชีวนะต่าง ๆ

1.8 sterile plates (Pyrex)

1.9 sterile cups

1.10 loops สำหรับ streak เชื้อ

1.11 sterile test tubes (Pyrex)

1.12 sterile flasks (Pyrex)

1.13 sterile pipets (Pyrex)

1.14 sterile droppers

1.15 anaerobic incubator (National)
ภายในเป็นบรรยากาศของ 5% Carbondioxide และ 95 % Nitrogen

1.16 Klett-Summerson photoelectric colorimeter

2. วิธีทดลอง

2.1 การทดลองเพื่อวัด inhibition zone

2.1.1 ยาปฏิชีวนะ

เพาะเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ S. mutans และ S. sanguis ใน Mitis salivarius agar, plates วาง standard disc ของยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ตาม 1.4.1 บนอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ในการทดลองทำเหมือนกันอย่างละ 2 plates นำไป incubate ในบรรยากาศของไนโตรเจนต่อคาร์บอนไดออกไซด์ 95 ต่อ 5 ส่วน เป็นเวลานานที่ 37° C 48 ชั่วโมง นำมาวัด inhibition zone แล้วหาค่าเฉลี่ย

2.1.2 น้ำยาอมบ้วนปาก

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดใน Mitis salivarius agar plates แล้ววาง sterile discs ที่ชุบน้ำยาอมบ้วนปากชนิดต่าง ๆ ตาม 1.1.2 บน plates ในการทดลองทำเหมือนกันอย่างละ 2 plates นำไป incubate เหมือน 2.1.1 นำมาวัด inhibition zone เพื่อหาค่าเฉลี่ย

2.1.3 Sulfonamide drugs

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mitis salivarius agar plates แล้ววาง Standard sensitivity disc ของ combination ของ 80 mg Trimethoprim + 400 mg Sulfamethoxazole และ 80 mg Trimethoprim + 400 mg Sulfametrole วางบนอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดไว้ นำไป incubate เหมือนกับการทดลองใน 2.1.1 นำมาวัด inhibition zone เพื่อหาค่าเฉลี่ย

2.1.4 ยาสีฟัน

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ใน Mitis salivarius agar plates แล้ววาง steriled cups บรรจุยาสีฟัน 12 ชนิด โดยแต่ละชนิดเตรียมเป็น dilution ต่าง ๆ ชนิดละ 5 dilutions คือ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} ปริมาตรที่บรรจุ cup และ 0.3 ml. วางบนอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ไว้ทำการทดลองอย่างละ 2 ชุด แล้วนำไป incubate ภายในบรรยากาศของ 5 % Carbondioxide และ 95 % Nitrogen ที่ 37° C นาน 48 ชั่วโมง จากนี้แล้วนำมาวัด inhibition zone เพื่อหาค่าเฉลี่ย

2.1.5 สมุนไพร

2.1.5.1 น้ำมันกานพลู

เพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ใน Mitis salivarius agar plate เตรียม dilution ของน้ำมันกานพลู 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} และน้ำมันกานพลูเข้มข้นใส่ steriled cups ที่วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสอง การเตรียมเป็น dilution ต่าง ๆ ใช้ น้ำมันมะกอก เป็นตัวทำละลาย ทำ control ไว้ด้วย แต่ละ dilution ทำ 2 ชุด นำไป incubate ตาม 2.1.1 นำมาวัด inhibition zone เพื่อหาค่าเฉลี่ย

2.1.5.2 การบูร

เพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ใน Mitis salivarius agar plate เตรียมการบูรเป็น dilution ต่าง ๆ คือ 1:2 , 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} โดยใช้แอลกอฮอล์ 95% เป็นตัวทำละลาย บรรจุการบูร dilution ต่าง ๆ ลง

ใน steriled cups ที่วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด และมี cups บรรจุแอลกอฮอล์ 95 % เป็น control ด้วย นำไป incubate ตาม 2.1.1 นำมาวัด inhibition zone เพื่อหาค่าเฉลี่ย

2.2 การทดลองเพื่อหา minimal inhibition concentration (MIC)

2.2.1 ยาปฏิชีวนะ

เพาะเชื้อทั้ง 2 ชนิด ใน Tryptic soy broth 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าความขุ่นด้วย Klett-Summerson photoelectric colorimeter เพื่อที่จะได้ค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากันทุกครั้งที่ทำการทดลอง ความขุ่นเริ่มต้นที่ใช้ คือ S. mutans เท่ากับ 80 และ S. sanguis เท่ากับ 125 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth หลอดละ 10 ml เท่ากันทุกหลอด เตรียมยาแต่ละชนิด เป็น dilutions ต่าง ๆ ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-5} แต่สำหรับยางชนิดเตรียม 10^{-1} ถึง 10^{-10} ในการทำ dilution ใช้ dilute ด้วย phosphate buffer ที่มี pH เหมาะสม สำหรับยาแต่ละชนิด phosphate buffer ที่ใช้ได้แก่

pH	4.5	สำหรับ	Tetracycline
pH	7.0	"	Ampicillin
pH	6.0	"	Penicillin G
		"	Chloramphenicol
		"	Dalacin C phosphate
pH	8.0	"	Garamycin
		"	Kanamycin
		"	Lincocin

pH 8.0 สำหรับ Streptomycin

" Erythromycin

ดูวิธีเตรียมที่ appendix ท้ายเล่ม

Inoculate เชื้อ 0.1 ml และยา dilution ละ 0.5 ml ลงในหลอดที่อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth แกละ dilution ของยาทำ 2 ชุด นำไป incubate ตาม 2.1.1 แล้ววัดค่าความขุ่นด้วย Klett - Summerson photoelectric colorimeter

2.2.2 ยาอมบ้วนปาก เพื่อหาค่าเฉลี่ยน้ำยาอมบ้วนปาก เฉพาะที่ให้ผล positive จากการทดลอง ตาม 2.1.2 มาทดลอง 24 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ใน Tryptic soy broth นำไปวัดค่าความขุ่น ปรับให้ได้ความขุ่น ดังนี้คือ

ค่าของ S. mutans เท่ากับ 80

ค่าของ S. sanguis " 125

เตรียม Tryptic soy broth หลอดละ 10 ml เตรียมน้ำยาอมบ้วนปาก dilution ต่าง ๆ คือ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ใช้ steriled distill water เป็นตัวทำละลาย inoculate เชื้อ 0.1 ml และน้ำยาอมบ้วนปาก dilution ละ 0.5 ml ลงในหลอดอาหาร Tryptic soy broth แกละ dilution ทำ 2 ชุด นำไป incubate ตาม 2.1.1 แล้ววัดค่าความขุ่นด้วย Klett - Summerson photoelectric colorimeter แล้วหาค่าเฉลี่ย

2.2.3 Sulfonamides drugs

เพาะเลี้ยงเชื้อ S. mutans และ S. sanguis ใน Tryptic soy broth 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดความขุ่น ปรับให้

ได้ค่า 80 และ 125 ตามลำดับ เตรียม Tryptic soy broth หลอดละ 10 ml. เตรียมยาทั้ง 4 ชนิด เป็น dilution ต่าง ๆ คือ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ใช้ steriled distill water เป็นตัวละลายและ diluent Inoculate เชื้อ 0.1 ml และยา dilution ละ 0.5 ml ลงในอาหาร Tryptic soy broth แต่ละ dilution ทำ 2 ชุด นำไป incubate ตาม 2.1.1 แล้ววัดหาค่าความขุ่น แล้วหาค่าเฉลี่ย

2.2.4 ยาสี่ตัว

นำการทดลองจาก 2.1.4 มาคำนวณหาค่า MIC