บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เชื้อแบคทีเรียและเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เชื้อแบคทีเรีย สเตร็ปโตคอกคัสมิวแทนส์ สายพันธุ์ ATCC 25175
2. เชื้อแบคทีเรีย แอกทิโนบาซิลลัสแอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ สายพันธุ์ ATCC 43718
3. เซลล์ไลน์สร้างเคอราทินฮากาต เป็นเซลล์ไลน์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเคอราทินของเนื้อเยื่อหุ้มผิวหนัง (adult skin keratinocyte) (Boukamp และคณะ, 1988) ได้รับการอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. ปิยมาศ สำเร็จกาญจนกิจ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. เซลล์สร้างเส้นใยเหงือก โดยใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือกของคน ได้จากเนื้อเยื่อฝาเหงือก (operculum) ของฟันกรามซี่ที่ 3 ของผู้ป่วยที่มารับการบริการถอนฟัน จากภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เนื่องจากการจัดฟันหรือผ่าฟันคุด โดยฟันไม่ผุ และไม่พบการอักเสบของเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าว

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุ

1. สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียน โดยสารสกัดดังกล่าวได้จากการนำเปลือกทุเรียนสดด้านในส่วนที่เป็นสีขาว ผ่านการล้าง บด ตกตะกอน โดยใช้แอลกอฮอล์ และทำให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 65 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (สุนันท์ พงษ์สามารถ และคณะ, 2544)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดทริปติเคสซอยชนิดวุ้นและน้ำสำหรับการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย สเตร็ปโตคอกคัสมิวแทนส์
3. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเบรนฮาร์ทอินฟิวชั่นชนิดวุ้นและน้ำสำหรับทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย แอกทิโนบาซิลลัสแอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์
4. น้ำเกลือปราศจากเชื้อ (0.9% sterile normal saline solution; NSS) (General Hospital Products Public)
5. น้ำยาบ้วนปากคลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.2 จาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco Modified Eagle's Medium; DMEM) ซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆ คือ ฟีตัลโบวายน์ซีรัม (fetal bovine serum) ความเข้มข้นร้อยละ 10 แอล-กลูตามีน (L-glutamine) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ เพนนิซิลิน-จี (penicillin-G) ความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สเตร็ปโตมัยซินซัลเฟต (streptomycin sulfate) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอมโฟเทอริซินบี (amphotericin B) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (GIBCO BRL®, USA)
7. สารเอ็มทีที (MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolim bromide) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (USB corporation, USA)
8. สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Riedel-deHaën®, Germany)

อุปกรณ์

1. ตู้ปรับอุณหภูมิและก๊าซเฉพาะอย่าง (Carbondioxide Incubator Model 31212; Forma Scientific®, Japan)
2. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave Model HRM 242; Hirayama®, Japan)
3. ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow Model BH 2000; Clyde-APAC®, Australia)
4. เครื่องปั่นสาร (Centrifuge Model Mikro 20 ; Hettich®, Germany)
5. เครื่องเขย่า (vortex mixer ; Scientific industries Inc., USA)
6. คิวเวตต์ (Cuvette) ขนาด 3 มิลลิลิตร
7. ปลายปิเปต (pipette tip) ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
8. หลอดไมโครเซนทริฟิว (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
9. จานเพาะเลี้ยงเซลล์ (tissue culture dish; Nunc®, Denmark) ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 35 และ 60 เซนติเมตร
10. จานพลาสติกเลี้ยงเชื้อ (plastic plate) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร
11. จานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (24-well plate; Nunc®, Denmark)
12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer Model Ultraspec 3000 pro; Pharmacia Biotech®, Japan)

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การทดลองหาความเข้มข้นของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียน ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรียสเตร็ปโตคอกคัสมิวแทนส์ และ เชื้อแบคทีเรียแอกทิโนบาซิลลัสแอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ ในระยะเวลาที่กำหนด

1.1 การเตรียมสารละลายจากสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียน

นำสารสกัดมาทำสารละลาย โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากอิออนเป็นตัวทำละลาย เตรียมสารละลายให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่า ของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ ได้แก่ ความเข้มข้น 100 (PG_{100}) 200 (PG_{200}) และ 300 (PG_{300}) มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในการทดลองเป็น 50 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมทั้งหมดไปทำการฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งชนิดทริปติเคสซอยและเบรนฮาร์ทอินฟิวชัน ตามคำแนะนำของบริษัท โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากอิออนเป็นตัวทำละลาย แล้วนำไปทำการฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้น นำไปเทลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ขนาด 10 เซนติเมตร ให้ได้ความลึกประมาณ 3-4 มิลลิเมตร (ปริมาณประมาณ 20-25 มิลลิลิตร) รอจนแห้ง หากยังไม่ใช้ให้นำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส เมื่อจะนำมาใช้ต้องวางจานเพาะเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในอุณหภูมิห้องและรอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีผิวหน้าที่แห้ง สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดน้ำนอกจากจะเตรียมที่ความเข้มข้นปกติตามคำแนะนำของบริษัทแล้ว ต้องเตรียมที่ความเข้มข้นเป็นสองเท่าของปกติอีก 1 ชุด เพื่อใช้ในการทดลอง

1.3 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสเตร็ปโตคอกคัสมิวแทนส์

ก่อนนำเชื้อมาทำการทดลองทุกครั้ง ต้องนำเชื้อมาหว่าน (subculture) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดน้ำทริปติเคสซอย ในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นทริปติเคสซอย เลี้ยงต่อ 48 ชั่วโมง พิจารณาว่าไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น แล้วจึงเลือกโคโลนีจากอาหารวุ้นที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร จำนวน 4-5 โคโลนี ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารน้ำปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงต่อในตู้อบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วดูดอาหารส่วนบนทิ้ง เลี้ยงต่อโดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดน้ำประมาณ 4 ชั่วโมงแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อเป็นระยะ โดยดูดอาหารน้ำปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว

3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดอาหารส่วนบนออกแล้วใส่น้ำเกลือปราศจากเชื้อแทน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ค่าความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณค่าความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบกับค่าแมคฟาแลนด์เท่ากับ 0.5 (0.5 McFarland) และ กราฟมาตรฐาน (standard graph) ของความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียและค่าการดูดกลืนแสงที่ทำไว้ ควรอยู่ที่ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.4

1.4 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียแอกทิโนบาซิลลัสแอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์

เตรียมโดยวิธีเดียวกันกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่เลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดน้ำและชนิดวุ้นเบรนฮาร์ทอินฟิวชัน ใช้เวลาในการเลี้ยงในอาหารชนิดน้ำ 18 ชั่วโมง ก่อนนำมาปั่นให้ตกตะกอนแล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร แล้วคำนวณปริมาณของเชื้อแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทำไว้ ควรอยู่ที่ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.5

1.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนในเวลาที่กำหนด

ใช้วิธีการทดสอบแบบไทม์คิล (Wood และ Washington, 1995) ดูดเชื้อปริมาณ $1x10^7$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร นำไปปั่นให้ตกตะกอน แล้วนำเฉพาะส่วนเชื้อที่ตกตะกอนมาเลี้ยงต่อในอาหารน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของที่บริษัทกำหนดปริมาณ 5 มิลลิลิตร เมื่อแบ่งออกเป็น 5 หลอด จะได้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น $2x10^6$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร

เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบจะถูกแบ่งลงในหลอดปราศจากเชื้อ ปริมาณหลอดละ 700 ไมโครลิตร จำนวน 5 หลอด แล้วจึงใส่สารที่ต้องการทดสอบลงในแต่ละหลอด หลอดละ 700 ไมโครลิตร โดยหลอดแรกเติมสารสกัด PG_{100} หลอดที่สองเติมสารสกัด PG_{200} หลอดที่สามเติมสารสกัด PG_{300} หลอดที่สี่เป็นตัวควบคุมบวกจะเติมคลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.2 และ หลอดสุดท้ายเป็นตัวควบคุมลบจะเติมน้ำเกลือปราศจากเชื้อ ทำการเขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่า แล้วนำเข้าตู้ปรับอุณหภูมิและก๊าซเฉพาะอย่าง เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด นำออกจากตู้อบแบ่งสารทดสอบออกมาจากแต่ละหลอดปริมาณหลอดละ 100 ไมโครลิตร ส่วนสารทดสอบที่เหลือในหลอดทดลองนำกลับเข้าตู้ปรับอุณหภูมิและก๊าซเฉพาะอย่างต่อ เติมน้ำเกลือในสารทดสอบที่แยกออกมาเพื่อทำการเจือจางเป็น 10 100 และ 1,000 เท่า ดูดเชื้อจากแต่ละหลอดออกมาเกลี่ยลงบนจานอาหารวุ้น นำไปเพาะเลี้ยงต่อในตู้ปรับอุณหภูมิและก๊าซเฉพาะอย่าง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ทำให้เชื้อเจริญเติบโตเพียงพอที่จะสังเกตโคโลนีได้ ทำการนับโคโลนีที่เจริญเติบโตบนอาหารวุ้น เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ

สารทดสอบส่วนที่เหลือจะถูกนำมาทำการทดสอบเช่นเดียวกันกับวิธีข้างต้นโดยมีการนำออกจากตู้เพื่อทำการทดสอบเมื่อเชื้อแบคทีเรียสัมผัสกับสารสกัด PG ครบตามเวลาที่กำหนด คือ 5 10 20 30 และ 60 นาที ตามลำดับ

ตอนที่ 2 การศึกษาผลของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือกและเซลล์ไลน์สร้างเคอราทิน

2.1 การเตรียมเซลล์สร้างเส้นใยและเซลล์ไลน์สร้างเคอราทิน

เมื่อได้ฟันจากการถอนแล้ว เก็บฟันในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม แล้วนำมาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ (phosphate buffer saline) ที่ปราศจากเชื้อ 3-4 ครั้ง จากนั้นเตรียมเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก โดยตัดชิ้นเนื้อส่วนที่เป็นเหงือกออกจากคอฟัน นำชิ้นเนื้อไปตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 2x2x2 มิลลิเมตร นำชิ้นเนื้อที่ได้ไปเลี้ยงแยกบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มพอท่วมชิ้นเนื้อ จากนั้นเลี้ยงชิ้นเนื้อในตู้ปรับอุณหภูมิและก๊าซเฉพาะอย่าง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เมื่อเซลล์เริ่มคืบคลานออกจากชิ้นเนื้อจนเต็มจานเพาะเลี้ยงแล้ว นำเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้อโดยใช้เอนไซม์ทริพซินอีดีทีเอ (trypsin EDTA) ร้อยละ 0.25 แล้วนำไปหว่าน ในจานเพาะเลี้ยงใหม่ ขนาด 60 มิลลิเมตร และนับเซลล์ที่หว่านนี้เป็นเซลล์รุ่นที่ 1 เมื่อเซลล์มีจำนวนมากขึ้นและเรียงตัวหนาแน่นในจานเพาะเลี้ยงแล้ว จึงหว่านเซลล์ใหม่ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เซลล์รุ่นที่ 3-7 โดยใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากผู้ป่วยอย่างน้อย 3 คน

ส่วนเซลล์ไลน์สร้างเคอราทิน ที่ได้รับอนุเคราะห์มานั้น นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์และทำการหว่านเซลล์ใหม่เช่นเดียวกับเซลล์สร้างเส้นใยที่แยกจากเนื้อเยื่อเหงือก ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

2.2 การหว่านเซลล์

นำเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์ไลน์สร้างเคอราทิน ที่เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเดิมจนแน่นแล้วมาเลี้ยงต่อในจานเพาะเลี้ยงใหม่ในปริมาณที่ต้องการ โดยการใส่สารทริปซินอีดีทีเอ เพื่อให้เซลล์หลุดจากจานเพาะเลี้ยง แล้วนำไปคำนวณปริมาณที่จะดูดลงในจานเพาะเลี้ยงใหม่ให้ได้ตามต้องการ โดยการอ่านค่าจากเครื่องนับปริมาณเม็ดเลือด (hemacytometer)

2.3 การทดสอบเซลล์ด้วยสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียน

หว่านเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 60,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 20 หลุม เลี้ยงต่อในตู้ปรับอุณหภูมิและก๊าซเฉพาะอย่าง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลที่ได้เตรียมไว้โดยการผสม PG_{100} PG_{200} และ PG_{300} กับอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มในอัตราส่วน 1:1 เพื่อให้ได้เป็นสารสกัด PG_{50} PG_{100} และPG_{150} ตามลำดับใช้คลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.1 และ อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มอีกอย่างละ 4 หลุม เป็นตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบ ตามลำดับ ทำการทดสอบโดยเติมสารสกัดทีละสารลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์อย่างละ 4 หลุม เริ่มจาก PG_{50} นำจานเพาะเลี้ยงเข้าตู้อบควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำจานเพาะเลี้ยงออกจากตู้อบ ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ 3 ครั้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์

ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม ปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วจึงทำการทดสอบตามกระบวนการเดียวกันกับข้างต้น แต่เปลี่ยนสารทดสอบเป็นสารสกัด PG_{100} PG_{150} ตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบ เลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยวิธีสอบวิเคราะห์เอ็มทีที ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อยสามครั้ง

สำหรับเซลล์ไลน์สร้างเคอราทิน หว่านเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 200,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วจึงทำการทดลองด้วยขั้นตอนเดียวกันกับเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก

2.4 การศึกษาความเป็นพิษของสารด้วยวิธีสอบวิเคราะห์เอ็มทีที

วิธีการวิเคราะห์นี้ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Kasugai, Hasegawa และ Ogura (1991) กล่าวโดยย่อคือ หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่จะทำการทดสอบในสภาวะที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจล ที่มีความเข้มข้น 50 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จนครบเวลา 1 นาทีแล้ว จึงเลี้ยงต่อจนครบเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ 2 ครั้ง แล้วจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นดีเอ็มอีเอ็มชนิดที่ปราศจาก ฟีนอลเรด (phenol red) ที่มีสารละลายเอ็มทีที ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปเลี้ยงต่อในตู้ปรับอุณหภูมิและก๊าซเฉพาะอย่าง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกใช้เวลา 15 นาที และเซลล์ไลน์สร้างเคอราทิน ใช้เวลา 10 นาที หลังจากเอาออกจากตู้ จะสังเกตเห็นผลึกฟอร์มาแซนที่ก้นหลุม ดูดสารละลายเอ็มทีทีทิ้งและใส่สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์จำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อทำละลายผลึกฟอร์มาแซน แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละของเซลล์มีชีวิต โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่สัมผัสกับสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลทั้ง 3 ความเข้มข้น และคลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.1 กับเซลล์ที่สัมผัสกับตัวควบคุมลบ ตามสูตร

$$\text{ร้อยละของเซลล์มีชีวิต} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุมลบ}} \times 100$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistical package for the Social Science) Version 11.5 ในการประมวลผลข้อมูล ดังนี้

ตอนที่ 1

ใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ การวัดค่าเฉลี่ย (mean) และการวัดส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของข้อมูล ในการเปรียบเทียบระหว่างปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตภายหลังจากสัมผัสกับสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นต่างๆ ในเวลาที่กำหนด กับ คลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.1

ตอนที่ 2

1. การทดสอบผลต่างของร้อยละเซลล์มีชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัดกับเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ตามปกติ โดยการทดสอบแบบนอนพาราเมตริก (non parametric test) ใช้การเปรียบเทียบลำดับด้วยวิธีแมนวิทนีย์ (Mann Whitney U Test) ค่านัยสำคัญที่กำหนด คือ 0.05 โดยมีสมมติฐานของการทดสอบ คือ

H_0 : ร้อยละของเซลล์มีชีวิตที่เวลา 1 นาที ของเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัด ไม่แตกต่างจากเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ตามปกติ

H_1 : ร้อยละของเซลล์มีชีวิตที่เวลา 1 นาที ของเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัด แตกต่างจากเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ตามปกติ

2. เมื่อได้ผลจากการเปรียบเทียบ จึงนำมาทดสอบว่ากลุ่มตัวอย่างจากเซลล์ที่ถูกทดสอบโดยสารสกัดที่เลือก มีความแตกต่างจากเซลล์ที่ถูกทดสอบโดยคลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.1 หรือไม่ โดยการทดสอบด้วยวิธีแมนวิทนีย์ โดยมีสมมติฐานของการทดสอบ คือ

H_0 : ร้อยละของเซลล์มีชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัด ไม่แตกต่างจากเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยคลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.1

H_1 : ร้อยละของเซลล์มีชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัด แตกต่างจากเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยคลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.1