บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุ

1. เชื้อ *Candida albicans*

   - เชื้อ *C. albicans* ที่ในการทดลองนี้ ใช้สายพันธุ์เดียว คือ สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 90028

2. ชิ้นตัวอย่าง (samples)

   - พอลิเมทิลเมทาคริเลตชนิดบ่มตัวด้วยความร้อน แบบไม่มีสี (Heat-polymerized clear polymethyl methacrylate- Rodex®, RODONT S.r.l – MILAN, Italy : Lot. No # 7032110414)

3. ปลาสเตอร์หิน (dental stone)

   - Planet®, LAFARGE PRESTIA, Thailand, Lot. No # 0042D

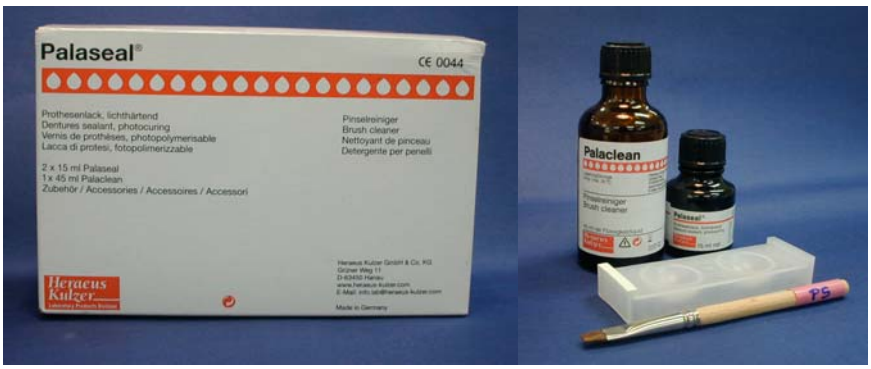
4. วัสดุเคลือบผิว (coating materials)

   4.1 Monopoly

   ผสมและใช้งานตามคำแนะนำของ Gardner และ Parr (1988)

ภาพประกอบที่ 3 แสดง Monopoly ซึ่งผลิตขึ้นมาใช้เอง และแปรงขนนุ่มที่ใช้ในการทา

4.2 Palaseal® (Heraeus Kulzer GmbH & Co.,KG, Germany. Lot No. # 486)



ภาพประกอบที่ 4 แสดงวัสดุเคลือบผิวยี่ห้อ Palaseal® ถาดหลุมสำหรับใส่วัสดุ แปรงขนนุ่ม และน้ำยาทำความสะอาดแปรง (Palaclean)

4.3 Glaze® (Harry J. Bosworth Company, Skokie, Illinois. Lot. No. # 0210-534)

ภาพประกอบที่ 5 แสดงวัสดุเคลือบผิวยี่ห้อ Glaze® และแปรงขนนุ่มที่ใช้ในการทา

5. สารคั่นกลาง (separating media)
6. กระดาษทรายเบอร์ 1000
7. เทปกาวสองหน้า (double-sided tape)
8. อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabauraud dextrose agar, Merck
9. สีย้อม 0.5 % crystalviolet และ 1.0 % iodine solution
10. Phosphate buffer saline (PBS) 0.15 M, pH 7.4

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กระบอกตวง
2. กล้องจุลทรรศน์, Olympus® CH 20; Olympus Optical Co.,LtD., Japan
3. ขวดแก้ว ขนาด 20 มิลลิลิตร
4. ขวดแก้ว ขนาด 100, 500, 1000 มิลลิลิตร
5. เครื่องแก้วสำหรับผสม Monopoly
6. เครื่องเขย่าหลอด, Vortex mixer®-Genie 2
7. เครื่องเขย่าแบบแบน (Platform Shaker), Biosan®
8. เครื่องฉายแสง, DentaColor® XS; Kulzer & Co. GmbH, Wehrheim, Germany
9. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance), Mettler® AE 200
10. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave), Hirayama MFG. Corp.
11. เครื่องนับเม็ดเลือด (Haemocytometer), Boeco®
12. เครื่องบ่มอะคริลิก, KaVo® EWL (type 5518); KaVo Elektrotechnisches Werk GmbH, Germany
13. เครื่องปั่น (Centrifuge), Eppendorf® 5804 R
14. เครื่องผสมสูญญากาศ, Whipmix® model D; Whipmix Corporation, Louisville, Kentucky
15. เครื่องวัดความหยาบผิว (Profilometer), Surfcorder® SE-2300; Kosaka Laboratory Ltd.
16. เครื่องวัด pH (pH meter), Hanna® (8519)

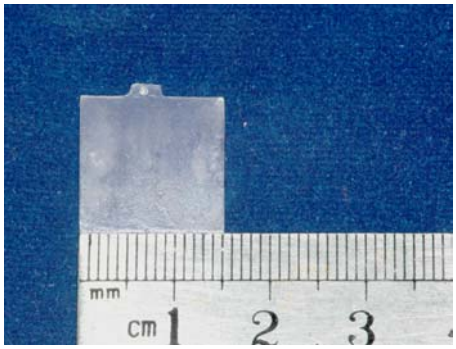
17. เครื่องอัดไฮดรอลิก, KaVo® EWL (type 5415); KaVo Elektrotechnisches Werk GmbH, Germany
18. ตารางนับเชื้อ (Graticule) ขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร, Olympus®
19. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator), WTE binder®
20. ตู้บ่มเชื้อชนิดเขย่าได้, Gallenkamp®
21. ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven), Memmert®
22. เตาไฟฟ้าแม่เหล็ก (Stirring hot plate), Framo-Gerätetechik® M21/1
23. ถาดหลุมเลี้ยงเชื้อแบบ 24 หลุม (Serological plate), Corning Corp.New York, USA
24. ถ้วยกระเบื้อง
25. ปากคีบปลายแหลม
26. ปิเปตแก้ว ขนาด 25 มิลลิลิตร
27. ไมโครปิเปต ขนาด 100-1000 ไมโครลิตร
28. เบ้าหล่อแบบ (Dental flask)
29. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer), Ultrospec® 2000; Biochrom Ltd., Cambridge, England
30. สไลด์ริมผ้า # 7105
31. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath), Hanau®; Teledyne Hanau, Buffalo, NY
32. Centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร
33. Pipette tip ขนาด 100 -1000 ไมโครลิตร

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างขนาด กว้าง 15 x ยาว 15 x หนา 0.7 มิลลิเมตร [Radford *et al*, 1998] ด้วยพอลิเมทิลเมทาคริเลตชนิดบ่มตัวด้วยความร้อนแบบไม่มีสี โดยเตรียมจากพลาสติกต้นแบบชนิดเรียบ (ภาพประกอบที่ 6)

6ก

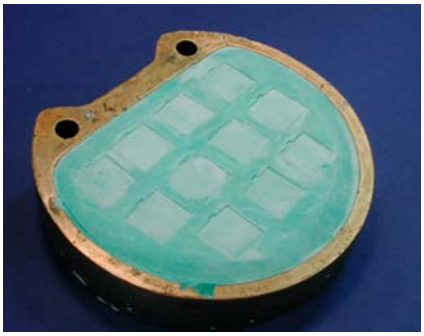


6ข

ภาพประกอบที่ 6 แสดงพลาสติกต้นแบบชนิดเรียบ (6ก) และชิ้นตัวอย่างพอลิเมทิลเมทาคริเลตที่ใช้ในการทดลอง (6ข)

ในการลงเบ้าหล่อแบบ ชั้นล่างสุด คือ ปลาสเตอร์หิน ใช้อัตราส่วน ส่วนน้ำ : ส่วนผง เท่ากับ 31 มิลลิลิตร : 100 กรัม ผสมโดยใช้เครื่องผสมสูญญากาศ เทปลาสเตอร์หินลงในเบ้าหล่อแบบล่างจนเต็ม ป้ายปลาสเตอร์หินลงบนต้นแบบหนึ่งด้านก่อนที่จะวางต้นแบบด้านที่มีปลาสเตอร์หินนั้นลงบนเบ้าหล่อแบบล่าง เพื่อลดโอกาสการเกิดฟองขนาดใหญ่ซึ่งจะถูกขังอยู่ในด้านล่างของต้นแบบ รอปลาสเตอร์หินแข็งตัว ขัดแต่งส่วนเกินออก ทาสารคั่นกลาง เทชั้นกลางด้วยปลาสเตอร์หิน ในอัตราส่วนผสมและวิธีการเดียวกันกับเบ้าหล่อแบบล่าง รอปลาสเตอร์หินแข็ง เทชั้นบนสุดด้วยปลาสเตอร์หิน ในอัตราส่วนเดียวกัน ทิ้งไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมงเพื่อให้ปลาสเตอร์หินแข็งตัวเต็มที่ก่อนการอัดอะคริลิก จากนั้น แยกเบ้าหล่อแบบบนและล่างออกจากกันหลังปลาสเตอร์หินแข็งตัวเต็มที่ แกะพลาสติกต้นแบบออก ขูดปลาสเตอร์หินให้เป็นสี่เหลี่ยมเล็กๆ เพื่อทำให้เกิดด้ามจับชิ้นตัวอย่าง (ภาพประกอบที่ 7) ทำความสะอาดปลาสเตอร์หินใน

เบ้าหล่อแบบบนและล่างด้วยน้ำร้อน ทาสารคั่นกลาง อะคริลิกที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ พอลิ-เมทิลเมทาคริเลต ชนิดบ่มตัวด้วยความร้อนแบบไม่มีสี ใช้อัตราส่วนตามที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ (ส่วนเหลว: ส่วนผง เท่ากับ 15 มิลลิลิตร: 35 กรัม) ในการอัดแต่ละครั้ง ใช้ส่วนเหลว 3 มิลลิลิตร ส่วนผง 7 กรัม การอัดอะคริลิกใช้เทคนิค trial packed ภายใต้เครื่องอัดไฮดรอลิกแรงดัน 4000 ปอนด์/ตารางนิ้ว ทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง เพื่อให้มอนอเมอร์ส่วนเกินระเหยออก ก่อนนำเข้าเครื่องบ่มอะคริลิก ทำการบ่มอะคริลิกที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 ชั่วโมง แยกชิ้นตัวอย่างที่ได้รับการบ่มแล้วออกจากเบ้าหล่อแบบ ตัดแต่งส่วนเกินบริเวณขอบโดยรอบออก ฟื้นผิวของตัวอย่างด้านที่ทำการทดลองเป็นด้านที่ไม่ได้รับการขัดแต่งใดๆ กรอหลุมเล็กๆ ที่ ด้ามจับ ซึ่งอยู่ด้านเดียวกับด้านที่จะทำการทดลอง เพื่อเป็นเครื่องหมายสำหรับทำการทดลอง ขั้นต่อไป ปรับพื้นผิวอีกด้านหนึ่งซึ่งไม่ได้ใช้ในการทดลองให้เรียบ โดยการขัดด้วยกระดาษทรายเบอร์ 1000 เพื่อให้วางตัวอย่างในแนวราบได้ ทำให้สะดวกในการนับเชื้อจากกล้องจุลทรรศน์ ตัวอย่างจะถูกเก็บในน้ำสะอาดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน และเปลี่ยนน้ำทุกวัน ก่อนนำมาทำการทดลอง



ภาพประกอบที่ 7 แสดงเบ้าหล่อแบบล่างที่ได้รับการเอาพลาสติกต้นแบบออก

บริเวณสี่เหลี่ยมเล็กๆ ที่ปลาสเตอร์หินถูกขูดออกเพื่อทำที่จับ

2. การแบ่งกลุ่มตัวอย่าง

ขั้นตอนการทดลองทั้งหมด แสดงในรูปที่ 8 โดยตัวอย่างทั้งหมด 192 ชิ้น ถูกแบ่งครั้งแรกด้วยวิธีการสุ่ม เป็น 4 กลุ่ม (กลุ่มละ 48 ชิ้น) คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับการเคลือบด้วยวัสดุเคลือบใดๆ กลุ่มที่เคลือบด้วย Monopoly Palaseal® และ Glaze® จากนั้นตัวอย่างในแต่ละกลุ่มจะถูกแบ่งอีกครั้งด้วยวิธีการสุ่ม เป็น 4 กลุ่มย่อย (กลุ่มละ 12 ชิ้น) เพื่อทำการทดลองการยึดเกาะของเชื้อ *C. albicans* ที่เวลาแตกต่างกัน 4 ช่วงเวลา คือ หลังเคลือบทันที หลังเคลือบแล้วแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน 30 วัน และ 60 วัน จำนวนตัวอย่างในแต่ละกลุ่มย่อย แสดงในตารางที่ 2

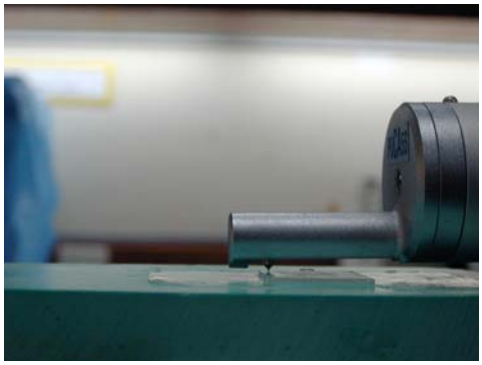
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนตัวอย่างในแต่ละกลุ่มย่อยของการแบ่งกลุ่มทดลอง (ชิ้นตัวอย่าง) จากจำนวนตัวอย่างรวมทั้งหมด 192 ชิ้น

กลุ่ม	การเคลือบผิว	ระยะเวลาต่างๆ ในการทดลองการยึดเกาะของเชื้อ *C. albicans*			
		หลังเคลือบทันที (0 วัน)	เก็บในน้ำกลั่น		
			7 วัน	30 วัน	60 วัน
1	ไม่เคลือบผิว	12	12	12	12
2	Monopoly	12	12	12	12
3	Palaseal®	12	12	12	12
4	Glaze®	12	12	12	12

3. การวัดความหยาบผิว

วัดความหยาบผิวของตัวอย่างทุกชิ้นก่อนและหลังการเคลือบผิว ณ เวลาต่างๆ ดังแสดงในภาพประกอบที่ 8 โดยใช้เครื่องวัดความหยาบผิว (ภาพประกอบที่ 9) วัดเฉพาะพื้นที่หนึ่งในสี่ส่วนของชิ้นตัวอย่างในแนวตั้งซึ่งเป็นพื้นที่ส่วนที่ติดกับด้ามจับชิ้นตัวอย่าง (ภาพประกอบที่ 10) บริเวณนี้จะไม่ถูกใช้ในการประเมินการยึดเกาะของเชื้อ ทำการวัดเป็นจำนวน 3 ครั้งต่อชิ้นตัวอย่าง แนวการวัดแต่ละครั้งห่างกันประมาณ 0.5 มิลลิเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย บันทึกผลเป็นค่าความหยาบผิวเฉลี่ยของแต่ละชิ้นตัวอย่าง

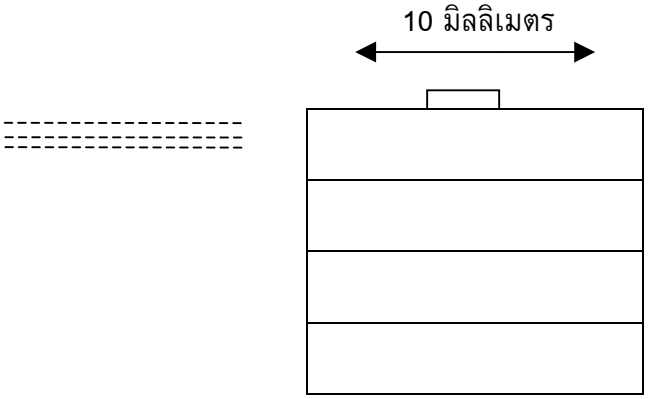
9ก



9ข

ภาพประกอบที่ 9 แสดงเครื่องวัดความหยาบผิว (9ก) และเข็มวัดความหยาบผิว (9ข)

การตั้งค่าต่างๆ ของเครื่องวัดความหยาบผิว (Profilometer) จะใช้ค่าเดียวกันตลอดการทดลอง คือ ระยะอ่านค่า (Evaluation length) 10 มิลลิเมตร ระยะอ้างอิง (Cutoff) 0.8 มิลลิเมตร กำลังขยายในแนวนอน (Horizontal magnification) เท่ากับ 20 กำลังขยายในแนวตั้ง (Vertical magnification) เท่ากับ 500 ความเร็ว (Drive speed) เท่ากับ 0.5 มิลลิเมตร/วินาที ระบบ Filter เป็นแบบ Gauss



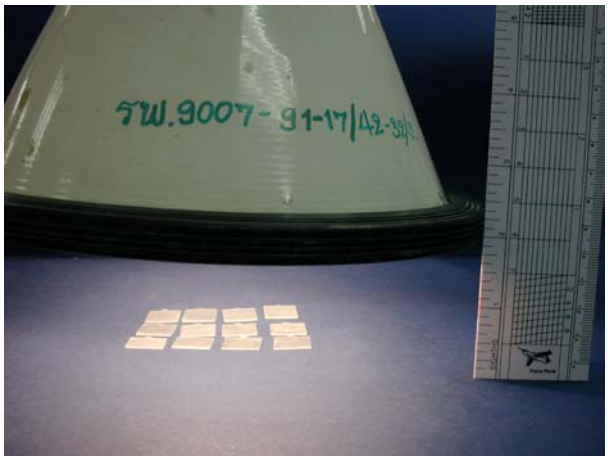
ภาพประกอบที่ 10 แสดงการแบ่งส่วนเพื่อวัดความหยาบผิวด้วยเครื่องวัดความหยาบผิว

4. วิธีการเคลือบผิว

ทำความสะอาดตัวอย่างทุกชิ้นโดยการล้างเบาๆ ด้วยน้ำกลั่น ไม่แปรงหรือขัดชิ้นงาน จากนั้นนำชิ้นตัวอย่างวางบนกระดาษซับน้ำ โดยหงายด้านที่ทำการทดลองขึ้นและซับเบาๆ เฉพาะบริเวณที่มีหยดน้ำ ก่อนนำไปวัดความหยาบผิวก่อนการเคลือบ ตามวิธีการในข้อ 3 จากนั้นทำการเคลือบผิวโดยใช้วัสดุที่จัดเตรียมไว้ ในแต่ละกลุ่มตามการแบ่งกลุ่มในรูปที่ 8 โดยวิธีการเคลือบของวัสดุแต่ละชนิด คือ

4.1 Monopoly

ใช้แปรงขนนุ่ม ทา Monopoly บางๆ บนชิ้นตัวอย่างเฉพาะด้านที่ทำการทดลอง ไปในทิศทางเดียวกันจำนวน 1 ชั้น ทำให้แห้งโดยการวางชิ้นตัวอย่างภายใต้โคมไฟ 50-60 วัตต์ ประมาณ 4-5 นาที โดยให้ผิวของวัสดุส่วนที่ถูกทาอยู่ห่างจากโคมไฟ 2 นิ้ว โดยประมาณ (ภาพประกอบที่ 11)



ภาพประกอบที่ 11 แสดงวิธีการใช้งาน Monopoly

4.2 Palaseal®

ใช้ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยทา Palaseal® บางๆ เฉพาะด้านที่ทำการทดลองด้วยแปรงขนนุ่ม ไปในทิศทางเดียวกัน วางชิ้นตัวอย่างในถาด ฉายแสงด้วยเครื่องฉายแสง DentaColor® (ภาพประกอบที่ 12) เป็นเวลา 90 วินาที

ภาพประกอบที่ 12 แสดงเครื่องฉายแสง DentaColor®

4.3 Glaze®

การใช้งานใช้ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยใช้แปรงขนนุ่ม ทาไปในทิศทางเดียวกัน ปล่อยให้แห้ง วัสดุสามารถแข็งตัวได้ด้วยตัวเอง

หลังการเคลือบ ชิ้นตัวอย่างจะถูกทำให้ปราศเชื้อโดยการอบแก๊สเอทิลีน ออกไซด์ (ethylene oxide) ก่อนนำไปเก็บในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ซึ่งอยู่ในขวดแก้วปราศจากเชื้อจนครบเวลาที่กำหนด คือ 7 วัน 30 วัน หรือ 60 วัน จากนั้น จึงนำชิ้นตัวอย่างออกมาทำการทดลองการยึดเกาะของเชื้อ *C. albicans*

5. การทดลองการยึดเกาะของเชื้อ *C. albicans*

ในการทดลองนี้ทำตามวิธีของ Radford และคณะ (1998) ซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

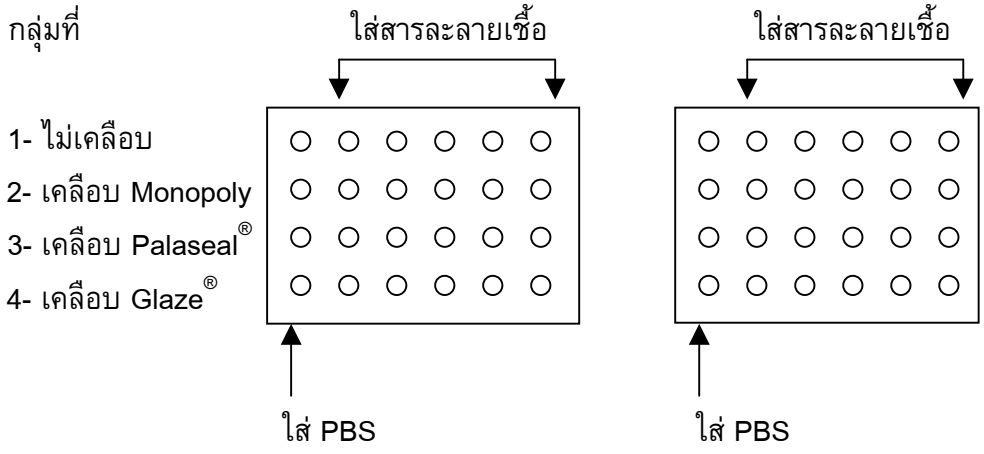
5.1 การเตรียมเชื้อ

นำเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์ ATCC 90028 จากหลอดทดลองที่เก็บไว้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabauraud dextrose agar ที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โคโลนีของเชื้อที่ได้จะมีลักษณะขุ่น สีขาวครีม (ภาพประกอบที่ 13) นำเซลล์ที่เลี้ยงได้มาใส่ในหลอดทดลองที่มี phosphate buffered saline (PBS; 0.15 M, pH7.4) เขย่าจนกระทั่งเชื้อเข้ากันดีกับ PBS นำไปปั่นล้างหนึ่งครั้งที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เชื้อจะตกตะกอนแยกชั้นจาก PBS จากนั้นเท PBS เดิมออก คงเหลือเพียงเชื้อที่ตกตะกอนด้านล่าง เติม PBS อีกครั้ง เพื่อปรับปริมาณเชื้อจนกระทั่งได้สารละลายที่มีปริมาณของเชื้อ *C. albicans* เท่ากับ $1x10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือด (Haemocytometer) ในการนับจำนวนเซลล์ จากนั้นนำมาเปรียบเทียบความขุ่น โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Ultraspec® 2000) ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้ค่าความขุ่น 0.717 ในการทดลองการยึดเกาะของ *C. albicans* ทุกช่วงการทดลองใช้เทคนิคการเปรียบเทียบความขุ่นแทนการนับด้วยเครื่องนับเม็ดเลือด โดยสารละลายเชื้อที่เตรียมในแต่ละครั้ง มีปริมาณไม่ต่ำกว่า 100 มิลลิลิตร

ภาพประกอบที่ 13 แสดงลักษณะโคโลนีของ *C. albicans* ซึ่งผ่านการบ่มในตู้บ่มเชื้อ

5.2. การทดลองการยึดเกาะของ *C. albicans*

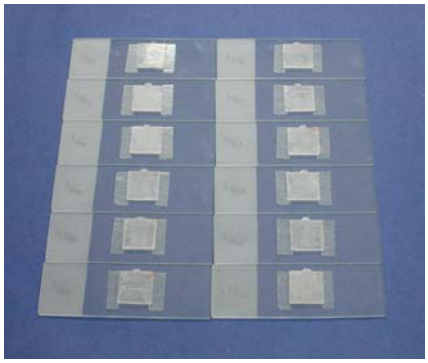
วางตัวอย่างในแนวตั้ง ในถาดหลุมเลี้ยงเชื้อ ขนาด 24 หลุม จำนวน 2 ถาด เติมสารละลาย เชื้อ *C. albicans* ที่เตรียมไว้ ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 1.75 มิลลิลิตร ยกเว้นชิ้นตัวอย่างของหลุมควบคุม ใส่ PBS แทนสารละลายเชื้อ ดังภาพประกอบที่ 14 และ 15 โดยในการเติมสารละลายเชื้อจะมีการเขย่าตลอดเวลาโดยใช้เครื่องเขย่าเพื่อลดโอกาสการตกตะกอนหรือการจับกลุ่มของเชื้อให้มีน้อยที่สุด จากนั้นนำไปวางในตู้บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส พร้อมด้วยการปั่นวน (orbital shaker) 80 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ภาพประกอบที่ 16) เมื่อครบเวลาแล้ว นำถาดหลุมเลี้ยงเชื้อออกมาจากตู้บ่มเชื้อ ตัวอย่างแต่ละชิ้นจะถูกนำมาแกว่งล้างใน PBS เป็นจำนวน 2 ครั้ง ตากให้แห้งที่อุณภูมิห้อง ทำเครื่องหมายด้วยดินสอเขียนแก้วบนด้านที่ขัดด้วยกระดาษทรายซึ่งเป็นด้านที่ไม่ได้ทำการศึกษา เพื่อความถูกต้องในการอ่านผลการทดลอง จากนั้นยึดชิ้นตัวอย่างบนแผ่นสไลด์ด้วยเทปกาวสองหน้าอย่างระมัดระวังด้วยปากคีบปลายแหลม (ภาพประกอบที่ 17) ย้อมด้วย 0.5% crystalviolet และ 1.0% iodine solution อย่างละ 5 นาที (ภาพประกอบที่ 18)



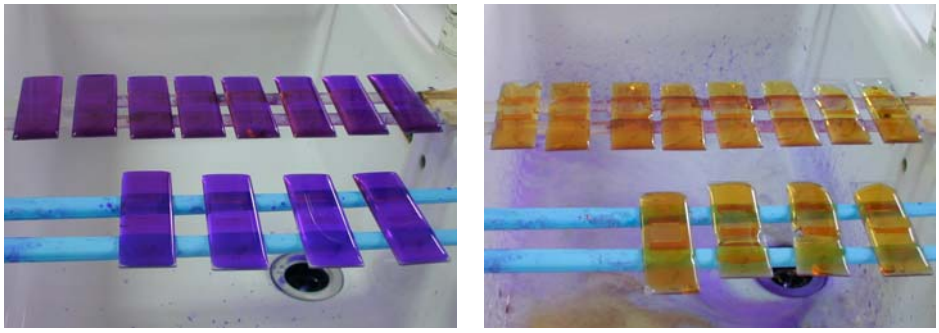
ภาพประกอบที่ 14 แสดงแผนผังการใส่สารละลายเชื้อ *C. albicans* และ PBS ในถาดหลุมเลี้ยงเชื้อ (จำนวนตัวอย่างเท่ากับ 12 ชิ้นต่อกลุ่ม)

ภาพประกอบที่ 15 แสดงชิ้นตัวอย่างที่อยู่ในถาดหลุมเลี้ยงเชื้อ

ภาพประกอบที่ 16 แสดงถาดหลุมเลี้ยงเชื้อพร้อมชิ้นตัวอย่างในตู้บ่มเชื้อที่มีการปั่นวน



ภาพประกอบที่ 17 แสดงชิ้นตัวอย่างที่ถูกยึดบนแผ่นสไลด์



18ก 18ข

ภาพประกอบที่ 18 แสดงชิ้นตัวอย่างที่ได้รับการย้อมด้วย 0.5% crystalviolet (18ก) และ 1.0% iodine solution (18ข)

6. การนับจำนวนเชื้อ

นับจำนวนการยึดเกาะของเชื้อ *C. albicans* โดยใช้ตาราง (graticule) ซึ่งมีพื้นที่ 0.025 x 0.025 ตารางเซนติเมตร (ภาพประกอบที่ 19) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า การนับจำนวนเชื้อจะนับเฉพาะพื้นที่สามในสี่ซึ่งจมในสารละลายเชื้อ และเป็นบริเวณที่ไม่ได้ถูกรบกวนด้วยการวัดความหยาบผิว โดยจะแบ่งพื้นที่สามในสี่ส่วนของชิ้นตัวอย่างเป็น 12 ส่วนโดยประมาณ และใช้เทคนิคการสุ่มอย่างง่าย (Simple random sampling technique) ในการส่องกล้องนับในแต่ละส่วนที่แบ่ง ซึ่งจะนับจำนวนเชื้อทั้งหมดที่เห็นในพื้นที่ทั้งหมดของตาราง ดังนั้นจำนวนการยึดเกาะของเชื้อ *C. albicans* จะมีทั้งหมด 12 ค่าต่อหนึ่งชิ้นตัวอย่าง จากนั้นนำค่าที่นับได้ทั้ง 12 ตำแหน่ง มาหาค่าเฉลี่ยและคูณด้วย 16 ค่าที่ได้จะเป็น ความหนาแน่นของยีสต์เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร

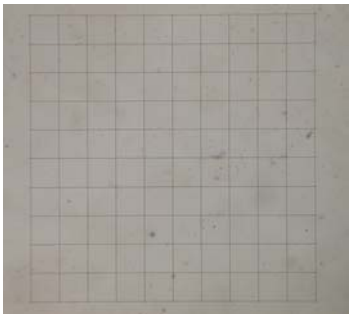
ในการนับจำนวนเชื้อ *C. albicans* จะใช้เกณฑ์ในการนับเชื้อ [Samaranayake and MacFarlane, 1980] ดังนี้

1). ยีสต์ที่กำลังแตกหน่อ (เซลล์ลูกมีขนาดเล็กกว่าเซลล์แม่) นับเป็น 1 เซลล์ (ภาพประกอบที่ 20)

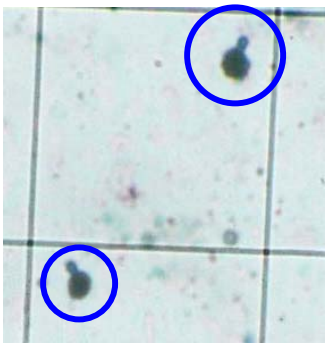
2). สายราหนึ่งสาย นับเป็นหนึ่งเซลล์ (ภาพประกอบที่ 21)

3). หลีกเลี่ยงบริเวณขอบของชิ้นตัวอย่างที่ขรุขระ

เพื่อประเมินความน่าเชื่อถือของผู้วิจัยในการนับจำนวนเชื้อ จะทำการนับซ้ำ 2 ครั้ง โดยผู้วิจัยคนเดียว ในทุกชิ้นตัวอย่างที่ศึกษาและนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ



ภาพประกอบที่ 19 แสดงตารางที่ใช้ในการนับ (พื้นที่ 0.025 x 0.025 ตารางเซนติเมตร) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



20ก

20ข

ภาพประกอบที่ 20 แสดงยีสต์ที่กำลังแตกหน่อ หน่อเดียว (20ก) และแตกสองหน่อ (20ข) ในวงกลมนับเป็นหนึ่งเซลล์

ภาพประกอบที่ 21 แสดงสายราหนึ่งสาย ซึ่งจะนับเป็นหนึ่งเซลล์ (ในวงกลม)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

สถิติทั้งหมดที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลในการศึกษานี้ ใช้ที่ระดับความเชื่อมั่นเดียวกัน คือ ร้อยละ 95 โดยแบ่งการวิเคราะห์ ดังนี้

1. วิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนการยึดเกาะของ *C. albicans* ระหว่างกลุ่มทดลองทุกกลุ่มที่เวลาต่างๆ โดยใช้สถิติครัสคาล วัลลิส (Kruskal-Wallis) และการเปรียบเทียบ-เชิงซ้อนของดันน์ (Dunn Multiple Comparison)
2. วิเคราะห์ความน่าเชื่อถือของผู้วิจัยในการนับจำนวนเชื้อ *C. albicans* โดยใช้สถิติการทดสอบผลต่างระหว่างค่าเฉลี่ย 2 ประชากรแบบจับคู่ (Paired-Samples T Test)
3. วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าความหยาบผิวเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองทุกกลุ่ม ที่เวลาต่างๆ และทดสอบค่าความหยาบผิวเฉลี่ยเมื่อเวลาผ่านไป โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) และการเปรียบเทียบเชิงซ้อนแบบ Tukey HSD (Multiple Comparison- Tukey HSD)
4. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหยาบผิวและจำนวนการยึดเกาะของเชื้อ โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson’s Correlation)