

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. วัสดุพิมพ์ปากไฮโดรคอลลอยด์ประเภทย้อนกลับไม่ได้ (Irreversible hydrocolloid)
2. พลาสติกออร์หิน (Dental stone)
3. แผ่นฟิล์มพาราฟิน
4. ฟิล์มพาราฟิน
5. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.005 และ 0.003 โมลต่อลิตร
6. ชุดสำเร็จรูปในการหา ปริมาณยูเรีย (Urea liquicolor[®]; Human, Germany) ประกอบด้วย
 - RGT1; ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer, pH 7.0) 120 มิลลิโมล/ลิตร โซเดียมซาลิไซเลต (Sodium salicylate) 60 มิลลิโมล/ลิตร โซเดียมไนโตรพรัสไซด์ (Sodium nitroprusside) 5 มิลลิโมล/ลิตร เอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกแอซิด (Ethylenediamine tetra-acetic acid; EDTA) 1 มิลลิโมล/ลิตร
 - RGT 2; ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer, pHน้อยกว่า 13) 120 มิลลิโมล/ลิตร ไฮโปคลอไรท์ (Hypochlorite) 0.6 กรัม/ลิตร คลอไรท์
 - ENZ; เอนไซม์ยูรีเอส (Urease), มากกว่า 500 กิโลยูนิต/ลิตร
 - STD; ยูเรีย (Urea) 80 มิลลิกรัม/เดซิลิตรหรือ 13.3 มิลลิโมล/ลิตร โซเดียมเอไซด์ (Sodium azide) ร้อยละ 0.095
7. ชุดสำเร็จรูปในการหาปริมาณโปรตีน (BCA[™] Protein Assay Kit) ประกอบด้วย
 - BCA[™] Reagent A ประกอบไปด้วย โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate), โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate), กรดไบซินโคนินิก (Bicinchoninic acid) และโซเดียมทาร์เตรทในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมล (Sodium tartrate in 0.1 M sodium hydroxide)
 - BCA[™] Reagent B ประกอบด้วย คิวพริกซัลเฟต (Cupric sulfate) ร้อยละ 4
 - Albumin standard 2mg/ml ประกอบด้วย Bovine serum albumin (BSA) ปริมาณ 2.0 mg/ml ใน 0.9% saline และ 0.05% sodium azide

อุปกรณ์

1. กระจกส่องปาก (Mouth mirror) เอกซ์พลอเรอร์ (Explorer)
2. บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
3. Microplate ชนิด 96 well
4. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) Orion model EA 520A ของบริษัท Orion Research Incorporated, Boston U.S.A.
5. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer DU[®] 65 ของบริษัท Beckman, U.S.A .)
6. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Titertek Multiscan Plus MKII ของบริษัท Flow Laboratories International SA, Finland)
7. ตู้เย็น – 80 องศาเซลเซียส (Bio-Freezer ของบริษัท Forma Scientific, U.S.A.)

วิธีการวิจัย

ขั้นตอนการทำงานวิจัยจะแบ่งได้เป็นสองส่วนคือ ส่วนที่ทำในคลินิก และที่ทำในห้องปฏิบัติการ การทำงานในคลินิกประกอบไปด้วย ให้อาสาสมัครทำแบบสัมภาษณ์ จากนั้นผู้วิจัยตรวจวัดระดับฟันสึกกร่อน ฟิมพ์ปาก และเก็บตัวอย่างน้ำลาย วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง อัตราการไหลและค่าบัพเฟอร์คาพาซิตีของน้ำลาย ส่วนการทำงานในห้องปฏิบัติการประกอบด้วย การเทแบบฟิมพ์ฟันและให้ค่าระดับคะแนนฟันสึกกร่อน วิเคราะห์ปริมาณน้ำลายที่ใช้ในการไทเทรต หาปริมาณยูเรียและโปรตีนในน้ำลาย

การศึกษานี้หากกลุ่มตัวอย่างประชากรโดยส่งใบเชิญชวนอาสาสมัครเข้าร่วมงานวิจัยไปยังผู้ป่วยที่มารับบริการรักษาทางทันตกรรม ที่โรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งใช้เกณฑ์ในการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างของ Lussi คือ มีอายุระหว่าง 16-20 ปี 26-30 ปี และ 46-50 ปี และมีฟันในช่องปากอย่างน้อย 20 ซี่ ขึ้นไป

การตรวจฟันสึกกร่อน

ก่อนที่จะเริ่มทำวิจัยและเก็บข้อมูล อธิบายให้อาสาสมัครรับทราบถึงเหตุผลในการทำวิจัย แจ้งขั้นตอนในการทำวิจัยและภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นพร้อมแนวทางแก้ไข เมื่ออาสาสมัครรับทราบและยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัยให้อาสาสมัครเซ็นใบยินยอม จากนั้นให้อาสาสมัครทำแบบสัมภาษณ์ ซึ่งจะประกอบไปด้วย ข้อมูลพื้นฐานประวัติทางการแพทย์และประวัติการตรวจรักษาทางทันตกรรม พฤติกรรมการดูแลสุขภาพช่องปาก และพฤติกรรมการรับประทานอาหารดังแสดงในภาคผนวก

ผู้วิจัยตรวจวัดระดับความรุนแรงของฟันสึกกร่อน โดยใช้อุปกรณ์ ประกอบด้วย กระจกส่องปาก เอกซ์พลอเรอร์ และแสงไฟจากเก้าอี้ทำฟัน พร้อมทั้งบันทึกลงในแบบการตรวจในช่องปาก ตามความรุนแรงของฟันสึกกร่อนแต่ละซี่ เรียงตามตำแหน่งและด้านของฟัน ตามรายละเอียดในตารางที่ ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้ภาวะฟันสึกกร่อนของ Lussi³⁴ จากนั้นฟิมพ์ปากด้วยวัสดุฟิมพ์ปากไฮโดรคอลลอยด์ประเภทย้อนกลับไม่ได้ พร้อมทั้งเทแบบด้วยพลาสติกอร์หินเมื่อได้แบบศึกษา (Study model) นำมาช่วยตรวจวิเคราะห์ความรุนแรงของฟันสึกกร่อนและปรับมาตรฐานในการตรวจในอาสาสมัคร 10 รายแรกกับอาจารย์ผู้ชำนาญการ

ตารางที่ 2 ลักษณะฟันสึกกร่อนในแต่ละระดับคะแนนและด้าน ตามดัชนีบ่งชี้ภาวะฟันสึกกร่อนของ Lussi³⁴

ระดับ คะแนน	ด้านแก้ม	ด้านบดเคี้ยวและด้านลิ้น
ระดับ 0	ไม่มีฟันสึกกร่อน ผิวฟันเรียบเป็นมันเงา	ไม่มีฟันสึกกร่อน ผิวฟันเรียบเป็นมันเงา
ระดับ 1	มีการสูญเสียผิวเคลือบฟัน ขอบของรอยสึกกร่อนยังเป็นเคลือบฟันที่สมบูรณ์มีความกว้างมากกว่าความลึก และรอยสึกกร่อนยังไม่ลุกลามถึงเนื้อฟัน	มีฟันสึกกร่อนเล็กน้อย ยอดของปุ่มฟันเริ่มเป็นมุมมน ขอบของวัสดุอุดฟันเริ่มยกตัวสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผิวฟันข้างเคียงที่เริ่มมีการสึกกร่อน รอยสึกกร่อนยังไม่ลุกลามถึงเนื้อฟัน
ระดับ 2	ฟันเริ่มสึกกร่อนถึงชั้นเนื้อฟันแต่ยังน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความหนาของเนื้อฟัน	ฟันสึกกร่อนรุนแรงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับระดับ 1 และรอยสึกกร่อนลุกลามถึงชั้นเนื้อฟัน
ระดับ 3	ฟันเริ่มสึกกร่อนถึงชั้นเนื้อฟันแต่รอยโรคลุกลามมากกว่าครึ่งหนึ่งของความหนาของเนื้อฟัน	-

การวิเคราะห์คุณสมบัติและองค์ประกอบของน้ำลาย

การเก็บตัวอย่างน้ำลายจะทำในช่วงเวลาที่เก็บ 9.00 – 11.00 น อาสาสมัครจะต้องไม่รับประทานอาหารก่อนเก็บน้ำลาย 1 ชั่วโมง และห้ามสูบบุหรี่ วิธีการเก็บน้ำลายในสภาวะพัก ให้อาสาสมัครนั่งตัวตรง ห้ามกลืนน้ำลาย นานประมาณ 5 นาที ในระหว่างนี้ถ้ามีน้ำลายให้บ้วนลงในบีกเกอร์ ถ้าได้ปริมาณน้ำลายน้อยให้ขยายเวลาต่อประมาณ 5-10 นาที แล้วปิดด้วยแผ่นพาราฟินสำหรับน้ำลายในสภาวะกระตุ้น ให้อาสาสมัครเคี้ยวพาราฟิน 5 นาที ในระหว่างที่เคี้ยวถ้ามีน้ำลายให้บ้วนน้ำลายลงในบีกเกอร์ เมื่อครบ 5 นาทีให้ปิดบีกเกอร์ด้วยแผ่นพาราฟิน จากนั้นนำน้ำลายทั้งสองสภาวะไปวิเคราะห์หาอัตราการไหล ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าบัฟเฟอร์คาปาซิตี โดยทำทันทีที่คลินิก ส่วนปริมาณน้ำลายสภาวะกระตุ้นที่ใช้ไทเทรตความเป็นกรดของน้ำส้วม จะทำในช่วงบ่ายของวันเดียวกับที่เก็บน้ำลาย สำหรับปริมาณยูเรียและปริมาณโปรตีนจะทำการวิเคราะห์ภายหลังจากที่เก็บตัวอย่างได้มากพอสำหรับการวิเคราะห์รวมกันครั้งละประมาณ 20 ตัวอย่าง โดยที่เก็บน้ำลายไว้ที่ตู้เย็น – 80 องศาเซลเซียส

อัตราการไหลของน้ำลาย

วัดปริมาณทั้งหมดของน้ำลายที่เก็บได้ทั้งสองสภาวะ จากนั้นคำนวณหาปริมาตรต่อนาที มีหน่วยเป็นมิลลิลิตรต่อนาที

ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำลาย

วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำลายทันทีหลังจากการเก็บน้ำลายเพื่อลดความคลาดเคลื่อนและให้ค่าที่ใกล้เคียงกับในช่องปาก โดยแบ่งน้ำลายมาใส่หลอดขนาดเล็ก 2 มิลลิลิตรแล้วนำปลายอิเล็กโทรดของเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง แขนงน้ำลายจนกระทั่งเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง สามารถอ่านค่าได้

ค่าบัฟเฟอร์คาปาซิตี

วัดค่าบัฟเฟอร์คาปาซิตี โดยใช้เทคนิคของ Bratthal และ Ericsson⁶⁰ ซึ่งมีวิธีวัดคือใช้น้ำลายสภาวะกระตุ้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.005 โมลต่อลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ส่วนน้ำลายในสภาวะพักใช้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.003 โมลต่อลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปิดบีกเกอร์ด้วยแผ่นพาราฟิน ทิ้งไว้ 20 นาที นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง สูดทำของสารละลายโดยใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และประเมินค่าบัฟเฟอร์คาปาซิตี ตามเกณฑ์ดังนี้

ตารางที่ 3 แสดงเกณฑ์ในการประเมินค่าบัพเฟอร์คาปาซิตีของน้ำลาย⁶⁰

	ค่าความเป็นกรดต่ำสุดท้าย	ผลการประเมิน
บัพเฟอร์สำหรับน้ำลายในสภาวะ	มากกว่า 4.75	สูง
พัก	4.25-4.75	ปกติ
	3.5-4.25	ต่ำ
	น้อยกว่า 3.5	ต่ำมาก
บัพเฟอร์สำหรับน้ำลายในสภาวะ	มากกว่า 6.5	สูง
กระตุ้น	5.75-6.5	ปกติ
	4.00-5.74	ต่ำ
	น้อยกว่า 4.00	ต่ำมาก

การหาปริมาณยูเรียในน้ำลาย

นำน้ำลายสภาวะพัก และสภาวะกระตุ้น มาหาปริมาณยูเรีย โดยใช้ชุดสำเร็จรูปในการหา ปริมาณยูเรีย โดยมีหลักการคือ ยูเรียจะสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเอนไซม์ยูรีเอส (Urease) หรือมีการดึงน้ำออกจากโมเลกุลของยูเรีย แอมโมเนียไอออนที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับไฮโปคลอไรท์ (Hypochlorite) และซาลิไซเลท (Salicylate) ได้เป็นสารที่มีสีเขียว ซึ่งสารสีเขียวที่ได้นี้จะมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 578 นาโนเมตร ทั้งนี้ในชุดสำเร็จรูปเพื่อทดสอบหาปริมาณยูเรียจะมีไฮโปคลอไรท์และซาลิไซเลทเป็นองค์ประกอบ โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

1. เตรียมยูเรียมาตรฐานเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรหรือ 13.3 มิลลิโมลต่อลิตรแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร
2. เตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Reagent) โดยใช้ ENZ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ RGT 1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
3. ใส่ น้ำลายและยูเรียมาตรฐานที่ปรับความเข้มข้นลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำ Reagent ที่เตรียมในข้อ 2) ผสมลงในหลอดทดลองหลอดละ 1,000 ไมโครลิตร แล้วนำไปอบ (Incubate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จากนั้นผสม RGT2 ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร แล้วนำไปอบ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

4. นำสารละลายที่ได้ใส่ใน Cuvette และอ่านค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) หรือ Optical density (OD) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 570-600 นาโนเมตร หลักการทำงานคือให้แสงอัลตราไวโอเลตหรือแสงในช่วงที่มองเห็นได้ผ่านสารละลายชีวโมเลกุล พลังงานแสงจะกระตุ้นอิเล็กตรอนของชีวโมเลกุล ทำให้คูพลังงานแสงบางส่วนไว้และปล่อยออกมาบางส่วน นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้และความเข้มข้นของยูเรียมาตรฐานไปสร้างกราฟและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกราฟจากสมการเส้นตรงดังแสดงด้านล่าง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ของน้ำลายไปเปรียบเทียบเพื่อหาความเข้มข้น

$$\text{สมการเส้นตรง..... } Y = aX + b\text{.....}$$

(Y= ค่าดูดกลืนแสง a= ความชันของเส้นตรง X= ความเข้มข้นของยูเรีย และ b=ค่าคงที่)

การหาปริมาณโปรตีนในน้ำลาย

นำน้ำลายสภาวะพัก และสภาวะกระตุ้น มาหาปริมาณโปรตีน โดยใช้ชุดสำเร็จรูปในการหาปริมาณโปรตีน (BCA™ Protein Assay Kit) สารเคมีที่อยู่ในชุดจะมีสูตรโครงสร้างเคมีพื้นฐานเป็นกรดไบซินโคนินิก (Bicinchoninic acid) ซึ่งสามารถตรวจหาและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้ด้วยเทคนิค Colorimetric methods⁶¹ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารเคมีในชุดทดสอบกับโปรตีนในน้ำลายคือ คอปเปอร์ไอออน (Cu^{1+}) จะจับกับโปรตีนได้สารละลายที่มีสีม่วง ซึ่งจะมีความเข้มของสีมากขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโปรตีน ทั้งนี้จะสามารถตรวจพบความเข้มของสีได้ด้วยแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรจากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ขั้นตอนในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนมี 3 ขั้นตอนคือ

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานจากโปรตีนอัลบูมิน เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นดังแสดงในตารางที่ 4
2. เตรียมสารเคมีที่ใช้ทดสอบจาก BCA™ Reagent A ปริมาตร 50 มิลลิลิตรผสมกับ BCA™ Reagent B 1 มิลลิลิตร ได้เป็น Working reagent
3. ทดสอบหาความเข้มข้นของโปรตีน ใส่โปรตีนอัลบูมินที่ปรับความเข้มข้นและใส่น้ำลายที่เก็บจากตัวอย่างลงหลุมใน micro plate หลุมละ 10 ไมโครลิตร ใส่ working reagent 1 มิลลิลิตรผสมในโปรตีนอัลบูมินและน้ำลาย แล้วเขย่า micro plate เพื่อให้สารที่ต้องการทดสอบทำปฏิกิริยากับชุดทดสอบ เป็นระยะเวลาประมาณ 30 วินาที นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีจากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Titertek Multiscan Plus MKII หลักการทำงานคือให้แสงอัลตราไวโอเลต

หรือแสงในช่วงที่มองเห็นได้ผ่านสารละลายชีวโมเลกุล พลังงานแสงจะกระตุ้นอิเล็กตรอนของชีวโมเลกุล ทำให้คู่อิเล็กตรอนบางส่วนไว้และปล่อยออกมาบางส่วน นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้และความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมินมาตรฐานไปสร้างกราฟ และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกราฟจากสมการเส้นตรงดังแสดงด้านล่าง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้น้ำลายไปเปรียบเทียบกับเพื่อหาความเข้มข้น

$$\text{สมการเส้นตรง..... } Y = aX + b\text{.....}$$

(Y= ค่าดูดกลืนแสง a = ความชันของเส้นตรง X = ความเข้มข้นของโปรตีน b = ค่าคงที่)

ตารางที่ 4 การเตรียมความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมินเพื่อนำมาใช้ในการทดสอบหาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำลาย

หลอดทดลอง	ปริมาตรน้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	ปริมาตรของอัลบูมินมาตรฐาน	ความเข้มข้นของอัลบูมิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม)
A	0	300 ไมโครลิตรจากอัลบูมินมาตรฐาน	2,000
B	125	375 ไมโครลิตรจากอัลบูมินมาตรฐาน	1,500
C	325	325 ไมโครลิตรจากอัลบูมินมาตรฐาน	1,000
D	175	175 ไมโครลิตรจากหลอดทดลอง B	750
E	325	325 ไมโครลิตรจากหลอดทดลอง C	500
F	325	325 ไมโครลิตรจากหลอดทดลอง E	250
G	325	325 ไมโครลิตรจากหลอดทดลอง F	125
H	400	100 ไมโครลิตรจากหลอดทดลอง G	25
I	400	0	0

ปริมาณน้ำลายสภาวะกระตุ้นที่ใช้ไทเทรตความเป็นกรด-ด่างที่ 4.5 และ 5.5

การทดลองในขั้นตอนนี้ยังไม่มีการศึกษาใดเคยทำมาก่อน โดยมีแนวคิดมาจากการประเมินความสามารถของอาหารที่ทำให้เกิดฟันสึกกร่อน มีการใช้ค่าไทเทรตเทเบิลอะซิดิตี้เพื่อประเมินความสามารถของอาหารในการทำให้เกิดฟันสึกกร่อนกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีรายงานพบว่าให้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำและสามารถคาดการณ์ความสามารถของอาหารในการทำให้เกิดฟันสึกกร่อนได้^{10,11} การหาค่าไทเทรตเทเบิลอะซิดิตี้จะใช้สารละลายที่มีความเป็นด่างสูงเช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) มาปรับลดความเป็นกรดของอาหารลง โดยค่อยๆเพิ่มปริมาณของสารที่เป็นด่างทีละน้อย ๆ จนกระทั่งอาหารที่นำมาทดสอบมีค่าเป็นกลาง ปริมาณด่างทั้งหมดที่ใช้จะเป็นค่าไทเทรตเทเบิลอะซิดิตี้ ซึ่งพบว่าถ้ากรดชนิดใดมีค่าไทเทรตเทเบิลอะซิดิตี้สูง แสดงว่ามีความสามารถในการทำให้เกิดฟันสึกกร่อนสูงด้วยเช่นกัน^{43, 45-47} ในการศึกษาี้เลือกใช้น้ำลายแทนสารที่มีความเป็นด่างเพื่อที่ศึกษาความสามารถของน้ำลายในการปรับลดสภาวะความเป็นกรดของอาหารที่มีฤทธิ์กัดกร่อน ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5.5 จะหมายถึงสภาวะที่เริ่มมีการสูญเสียแร่ธาตุออกจากผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4.5 จะหมายถึงเริ่มเกิดการทำลายผิวฟันเป็นชั้น ๆ หรือเกิดฟันสึกกร่อน มีวิธีการทดลองคือ

1. ใช้น้ำส้มคั้นร้อยเปอร์เซ็นต์ยี่ห้อมาลีใส่ในหลอดขนาดเล็ก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
2. วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำส้มเริ่มต้นด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง
3. หยคน้ำลายสภาวะกระตุ้นลงในน้ำส้มครึ่งละ 0.5 มิลลิลิตร ใช้แท่งแม่เหล็ก (Stir) กวนให้เข้ากันระหว่างน้ำลายกับน้ำส้ม แล้ววัดค่าความเป็นกรด-ด่างทุกครั้งจนถึงค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4.5 และ 5.5 นำปริมาณที่ใช้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับฟันสึกกร่อนและปัจจัยระหว่างน้ำลาย

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS สำหรับข้อมูลความรุนแรงของฟันสึกกร่อน ซึ่งจะถูกรวบรวมการกระจาย คำนวณค่าเฉลี่ยเลขคณิต ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทำการวิเคราะห์ข้อมูลดังนี้

1. ใช้สถิติทดสอบวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (ONE WAY ANOVA) ระหว่างทั้ง 3 กลุ่มอายุ โดยมีตัวแปรอิสระต่าง ๆ ของน้ำลายคือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง อัตราการไหล บัฟเฟอร์คาพาซิตี ปริมาณยูเรีย ปริมาณโปรตีนของน้ำลายทั้งสภาวะพักและสภาวะกระตุ้น และปริมาตรของน้ำลายสภาวะกระตุ้นที่ใช้ในการปรับลดความเป็นกรดของอาหารจนถึงค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 และ 5.5 เพื่อทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของตัวแปรดังกล่าวข้างต้นในกลุ่มตัวอย่างประชากร 3 กลุ่มอายุได้แก่กลุ่มอายุ 16-20 ปี 26-30 ปี และ 46-50 ปี ทดสอบว่ามีคู่ที่แตกต่างกันหรือไม่ ถ้ามีคู่ที่แตกต่างกันทำการทดสอบต่อเพื่อหาค่าเฉลี่ยของกลุ่มอายุใดที่แตกต่างกันโดยใช้การเปรียบเทียบเชิงซ้อน (Multiple comparison) ชนิด Scheffe และทำการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างเพศหญิงกับเพศชายด้วยการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ 2 ประชากรโดยที่สุ่มตัวอย่างจากแต่ละกลุ่มอย่างเป็นอิสระ (Independent-Sample T test) ในแต่ละกลุ่มอายุ
2. หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของตัวแปร 2 ตัว (Bivariate correlation) โดยใช้เพียร์สันคอร์ริเลชัน (Pearson Correlation) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอายุ คะแนนฟันสึกกร่อน และปัจจัยน้ำลายทั้งสองสภาวะ
3. หาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆกับการเกิดฟันสึกกร่อนโดยใช้การวิเคราะห์ความถดถอยเชิงพหุ (Multiple regression analysis) ซึ่งจะใช้วิธี Stepwise method วิเคราะห์ตัวแปรอิสระเข้าสมการความถดถอย กำหนดค่าระดับนัยสำคัญของสถิติทดสอบ F มีเกณฑ์การเลือกตัวแปรอิสระเข้าสมการคือ ค่านัยสำคัญทางสถิติของการเลือกเข้าเป็น 0.05 และค่านัยสำคัญของการเลือกตัวแปรออกเป็น 0.1 ตัวแปรอิสระที่นำเข้าสมการได้แก่ กลุ่มอายุของกลุ่มตัวอย่าง ปัจจัยทางน้ำลายทั้งสองสภาวะ ส่วนตัวแปรตามเป็นผลรวมคะแนนฟันสึกกร่อนแยกเป็นด้านแก้ม ด้านบนเคี้ยว ด้านลิ้น และผลรวมคะแนนฟันสึกกร่อนของทุกด้านรวมกัน