บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. ตัวอย่างพอลิยูรีเทน (Polyurethane) ผสมนาโนซิลเวอร์ (PU-Ag) ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ เตรียมฟิล์มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสความเข้มข้น 40 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 500 ppm, และ 1000 ppm เตรียมฟิล์มที่อุณหภูมิ 60 และ 80 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 1000 และ 2000 ppm ตัดเป็นรูปวงกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

2. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และโรงพยาบาลชลบุรี จำนวน 3 ชนิด ได้แก่

2.1 *E. coli* ATCC 25913

2.2 *P. aeruginosa*

2.3 *P. aeruginosa* ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (1-375/04-2013)

2.4 *P. mirabilis*

3. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1 ดิสก์ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 10 ไมโครกรัม (Susceptibility discs ampicillin 10 µg) (OXOID, England)

3.2 ดิสก์ยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน 30 ไมโครกรัม (Susceptibility discs tetracyclin 30 µg) (OXOID, England)

3.3 70% ethanol

3.4 95% ethanol

3.5 0.85% NaCl

3.6 น้ำกลั่น

3.7 McFarland Standard No. 0.5

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

4.1 Nutrient agar (NA) (Criterion, U.S.A.)

4.2 Mueller-Hinton agar (MHA) (Criterion, U.S.A.)

4.3 Mueller-Hinton broth (MHB) (Criterion, U.S.A.)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. อุปกรณ์และเครื่องมืออื่น ๆ

5.1 สำลี

5.2 ถุงพลาสติก

5.3 อลูมิเนียมฟอยล์

5.4 ถุงมือยาง

5.5 กระบอกฉีดยา

5.6 จานเพาะเชื้อ (Petridish)

5.7 ลูป (Inoculating loop)

5.8 บีกเกอร์ (Beaker)

5.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์

5.10 Centriifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Corning, U.S.A.)

5.11 หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร (Test tube)

5.12 หลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิลิตร (Test tube)

5.13 กระบอกตวงขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร (Cylinder)

5.14 ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร (Erlenmeyer flask)

5.15 ไมโครปิเปตขนาด 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Micropipettes)

5.16 เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง

5.17 ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Incubator) (EHRET รุ่น BK 4266, Germany)

5.18 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) (Astec รุ่น HLF 1200 E, England)

5.19 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) (Tommy. U.S.A.)

5.20 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

5.21 เครื่องเขย่า (Shaker) (Gallenkamp)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการดำเนินการทดลอง

1. การทดสอบประสิทธิภาพของพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ เตรียมฟิล์มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

1.1 นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25913, *P. aeruginosa,* และ *P. mirabilis* มา streak plate บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

1.2 คัดเลือกแบคทีเรียทดสอบโคโลนีเดี่ยว ๆ จำนวน 4 – 5 โคโลนี ลงบนอาหาร MHB ปริมาณ 2 มิลลิลิตร โดยบ่มแบคทีเรียทดสอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปเทียบความขุ่นกับ McFarland Standard No. 0.5 ซึ่งมีความขุ่นเท่ากับเชื้อแบคทีเรีย 1.5×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร

1.3 นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน MHA ที่อยู่ในสภาพหลอมเหลว ปริมาณ 19 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง ผสมอาหารและเชื้อแบคทีเรียให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นเทส่วนผสมลงบนจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

1.4 นำพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อรังสี UV แต่ละความเข้มข้นวางบนผิวหน้าอาหาร

1.5 ชุดควบคุมการทดลองได้แก่

Positive control: ดิสก์ยาแอมพิซิลิน (AMP 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์) และดิสก์ยาเตตราซัยคลิน (TET 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์)

Negative control: พอลิยูรีเทนที่ไม่ผสมนาโนซิลเวอร์

1.6 นำจานเพาะเชื้อไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ชุดการทดลอง

1.7 อ่านผลการทดลองโดยการสังเกตและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่แบคทีเรียทดสอบถูกยับยั้ง (Inhibition zone) เป็นหน่วยมิลลิเมตรและบันทึกผลการทดสอบ จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางของแบคทีเรียระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง

2. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ของพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ เตรียมฟิล์มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (วิธีมาตรฐานของการหาค่า MIC จาก clinical and laboratory standard institute (CLSI) (Clinical and standard Institute, 2010)

2.1 นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25913, *P. aeruginosa,* และ *P. mirabilis* มา streak plate บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

2.2 คัดเลือกแบคทีเรียทดสอบโคโลนีเดี่ยว ๆ จำนวน 4 – 5 โคโลนี ลงบนอาหาร MHB ปริมาณ 2 มิลลิลิตร โดยบ่มแบคทีเรียทดสอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปเทียบความขุ่นกับ McFarland Standard No. 0.5 ซึ่งมีความขุ่นเท่ากับเชื้อแบคทีเรีย 1.5×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร

2.3 นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน MHB ปริมาณ 1 มิลลิลิตรจากนั้นนำแผ่นพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ใส่ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 ดิสก์

2.4 ชุดควบคุมการทดลอง ให้นำแผ่นพอลิยูรีเทนและแผ่นดิสก์ยาดังนี้

Positive control: ดิสก์ยาแอมพิซิลิน (AMP 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์) และดิสก์ยาเตตราซัยคลิน (TET 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์)

Negative control: พอลิยูรีเทนที่ไม่ผสมนาโนซิลเวอร์

2.5 บ่มเชื้อแบคทีเรียและอาหารที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.6 เมื่อบ่มเชื้อจนครบ 18 – 24 ชั่วโมงแล้ว นำมาเจือจางแบบ 10 – fold dilution ด้วย 0.85% Normal saline เพื่อปรับความเข้มข้นให้อยู่เป็น 10^{-1} ถึง 10^{-5} เท่า

2.7 นำเชื้อแบคทีเรียที่เจือจางแล้วมา 100 ไมโครลิตร spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการทดลองทั้งหมด 3 ชุดการทดลอง

2.8 นับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตจากจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นเทียบเป็นความเข้มข้นของแบคทีเรียที่รอดชีวิต บันทึกผลการทดลองเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในข้อ 2.4 จากนั้นนำเปรียบเทียบความแตกต่างของจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่างโดยการทดสอบสมมติฐานทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

2.9 คำนวณหาค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (The effectiveness of the PU-nonosilver antibacterial activity; EAA) (Sedlarik, Galya, Sedlarikova, Valasek, & Saha, 2010) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{EAA (\%)} = \frac{N_0 - N_S}{N_0} \times 100$$

EAA คือ ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

N_0 คือ จำนวนโคโลนีแบคทีเรีย (CFU/mL) ของกลุ่มควบคุม (พอลิยูรีเทน)

N_S คือ จำนวนโคโลนีแบคทีเรีย (CFU/mL) ของกลุ่มทดลอง (พอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์)

3. การศึกษาผลของ Polyurethane ผสมนาโนซิลเวอร์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบต่อหน่วยเวลา (time-kill curve assay)

3.1 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหาร MHB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของแบคทีเรียทดสอบให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับสารละลาย McFarland Standard No. 0.5 โดยใช้ 0.85% Normal Saline ผสมแบคทีเรียทดสอบกับพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ที่ความเข้มข้น ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (EAA) สูงที่สุด สำหรับชุดควบคุม (control) ใช้พอลิยูรีเทนที่ไม่ผสมนาโนซิลเวอร์ ในอัตราส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตรต่อพอลิยูรีเทน 1 แผ่น

3.2 บ่มหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 และ 48 ตามลำดับ ใช้ 0.85% Normal saline เจือจางตัวอย่างด้วยวิธีเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) แล้ว spread plate บนอาหาร NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3 นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและค่า $\log_{10}$ จำนวนโคโลนี (CFU ต่อมิลลิลิตร) และหาค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยสูตรดังนี้

$$\text{ค่าความแตกต่าง (เท่า)} = \frac{N_0}{N_S}$$

N_0 คือ จำนวนโคโลนีแบคทีเรีย (CFU/mL) ของกลุ่มควบคุม (พอลิยูรีเทน)

N_S คือ จำนวนโคโลนีแบคทีเรีย (CFU/mL) ของกลุ่มทดลอง (พอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์ 1000 ppm)

4. การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์เตรียมฟิล์มที่อุณหภูมิ 25, 60 และ 80 องศาเซลเซียส

ใช้วิธี Agar Disc Diffusion และ Broth Dilution Susceptibility Test เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และ 2 แต่พอลิยูรีเทนที่ทดสอบเป็นพอลิยูรีเทนผสมนาโนซิลเวอร์เข้มข้น 1000 และ 2000 ppm ซึ่งเตรียมฟิล์มที่อุณหภูมิ 25, 60 และ 80 องศาเซลเซียส

5. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

หาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน แล้วนำมาหาค่า MIC และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบ Random Completely Block Design (RCBD) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test เปรียบเทียบค่าความแปรปรวนจำนวนโคโลนี ต่ออุณหภูมิที่ใช้เตรียมฟิล์ม ความเข้มข้นของนาโนซิลเวอร์ และชนิดของแบคทีเรีย ด้วยวิธี Three-way ANOVA โดยใช้ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.01

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University