การพัฒนาวิธีประเมินประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อ *Giardia intestinalis* ในหลอดทดลอง

Method Development for the Evaluation of Anti-giardial Drugs *In Vitro*

เครือวัลย์ ห้วนก้ง

Kruawan Hounkong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University
2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาวิธีประเมินประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อ *Giardia intestinalis* ในหลอดทดลอง

ผู้เขียน นางสาวเครือวัลย์ ห้วนกัง

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. นงเยาว์ สว่างเจริญ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จรรยา นครินทร์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นงเยาว์ สว่างเจริญ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ พญ. วีระนุช นิสภาธร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาวิธีประเมินประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อ *Giardia intestinalis* ในหลอดทดลอง
ผู้เขียน นางสาวเครือวัลย์ หัวนก้ง
สาขาวิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2552

บทคัดย่อ

จุดมุ่งหมายในการศึกษาครั้งนี้เพื่อพัฒนาวิธีการประเมินประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อ *Giardia intestinalis* ในหลอดทดลอง ด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยพัฒนาในจานเลี้ยงเชื้อ 96 หลุมเพื่อหาวิธีที่ง่าย มีความรวดเร็ว เหมาะสมและน่าเชื่อถือ ซึ่งอาศัยการย้อมสีตัวเป็นของเชื้อที่ยังมีชีวิตและยังคงเกาะติดอยู่กับภาชนะที่ใช้เลี้ยงหลังสัมผัสกับยาหรือสารที่ใช้ทดสอบด้วยสีที่ใช้ย้อมเซลล์ทั่วๆ ไป แล้วอ่านผลโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสี

การศึกษาเริ่มจากการหาจำนวนเชื้อเริ่มต้นและระยะเวลาในการบ่มเชื้อที่เหมาะสม พบว่าวิธีการย้อมด้วยสี eosin 0.5% สามารถวัดเชื้อได้ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นอย่างน้อย 10^5 cell/ml และค่า OD ที่ได้มีความแปรปรวนสูงจึงได้ศึกษาผลของการล้างและไม่ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกก่อนการ fix เชื้อ พบว่าเมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง การ fix เชื้อหลังเทอาหารออกทันที ได้ค่า OD ที่สูงกว่าการล้างอาหารออกก่อนอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อศึกษาวิธีการล้าง plate ก่อนการ fix เชื้อและหลังการย้อมสีระหว่างวิธีเทสารละลายจากบิกเกอร์ลงใน plate โดยตรงกับการแช่ plate ลงในสารละลาย พบว่าค่า OD ที่ได้จากวิธีการแช่ plate ในสารละลายสูงกว่าวิธีการเทสารละลายลงใน plate โดยตรงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบการใช้สีต่างๆ ความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังนี้ eosin (0.25, 0.5 และ 1.0%), crystal violet (0.05, 0.1 และ 0.2%) และ methylene blue (0.05, 0.1 และ 0.2%) ในการย้อมเชื้อ *G. intestinalis* โดยใช้วิธีเท methanol และน้ำจากบิกเกอร์ลงใน plate เปรียบเทียบกับการแช่ plate ลงใน methanol และน้ำ ในขั้นตอนการ fix และล้างสี พบว่าค่า OD ของสีจากทั้งสองวิธีที่ย้อมด้วยสี eosin ทั้ง 3 ความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนสี crystal violet ที่ความเข้มข้น 0.2% วิธีแช่ plate ให้ค่า OD สูงกว่าวิธีเทอย่างมีนัยสำคัญ แต่การติดสี crystal violet ค่า OD ที่ได้จากการทดลองทั้ง 3 ครั้ง ของสีที่ความเข้มข้นเดียวกันให้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนจากการทดลองสูงกว่าการย้อมด้วยสี methylene blue สี crystal violet จึงไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ต่อไปและสำหรับสี methylene blue ที่ความเข้มข้น 0.05 กับ 0.1% วิธีแช่ให้ค่า OD สูงกว่าวิธีเทอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ผลจากการทดลองข้างต้นเลือกสี methylene blue มาเป็นสีที่ใช้ในการศึกษาต่อไป โดยใช้วิธี fix เชื้อหลังบ่มโดยไม่ล้างอาหารออก และใช้วิธีแช่ plate ลงใน methanol และน้ำในขั้นตอนการ fix และล้างสี เมื่อทำการศึกษาจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมเพื่อนำไปศึกษาหาประสิทธิภาพของยาและสารสกัดสมุนไพร โดยย้อมเชื้อความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ ด้วยสี methylene blue ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2% พบว่า การย้อมเชื้อด้วยสีที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2% ไม่แตกต่างกัน โดยเชื้อที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 6.25×10^5 cell/ml ให้ค่า OD สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเชื้อที่ความเข้มข้น 3.9×10^4 cell/ml ($p<0.05$) ดังนั้นจึงได้เลือกเชื้อที่ความเข้มข้น 5×10^5 cell/ml และย้อมด้วยสี methylene blue ที่ความเข้มข้น 0.1% โดยใช้วิธีแช่ plate ลงใน methanol และน้ำ ในขั้นตอนการ fix และล้างสี เพื่อนำไปประเมินประสิทธิภาพของยาและสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อการเจริญของ *G. intestinalis* ในหลอดทดลองต่อไป

การเปรียบเทียบวิธีประเมินประสิทธิภาพของยามาตรฐาน metronidazole, ornidazole และ furazolidone ต่อการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis* ในหลอดทดลอง เปรียบเทียบระหว่างวิธีการนับจำนวนเชื้อตัวเป็นที่เหลืออยู่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และวิธีการที่พัฒนาขึ้นมาใหม่โดยใช้วิธีการย้อมเชื้อด้วยสี methylene blue 0.1% แล้ววัดค่า OD พบว่า ค่า IC_{50} ของยา metronidazole, ornidazole และ furazolidone ที่ได้จากวิธีนับเท่ากับ 0.14±0.05, 0.15±0.04, 0.14±0.02 µg/ml และจากวิธีย้อมเท่ากับ 0.41±0.06, 0.18±0.01, 0.26±0.13 µg/ml ตามลำดับ

เมื่อนำวิธีที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ตรวจสอบผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพร 19 ชนิดและสารบริสุทธิ์สกัดจากต้นกะออก 7 สารต่อการเจริญเชื้อ *G. intestinalis* พบว่าสามารถตรวจสอบผลของสารได้ครั้งละเป็นจำนวนมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และราคาถูก แต่อาจมีข้อจำกัดในการใช้กับสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรที่มีตะกอนที่อาจจะเกิดการรบกวนการอ่านค่าการดูดกลืนแสง

Thesis Title	Method development for the evaluation of anti-giardial drugs *in vitro*
Author	Miss Kruawan Hounkong
Major Program	Microbiology
Academic Year	2008

ABSTRACT

The aim of this study was to develop a simple, rapid, practical and reliable method to determine the effect of drugs or natural products that inhibited the growth of *Giardia intestinalis* trophozoites *in vitro* using a 96-well tissue culture plate. The option selected to test for growth inhibition was to use a dye that stained the *Giardia* trophozoites that remained attached to the plate after they had been incubated with the anti-giardial agent and then measure the intensity of the remaining dye using a colorimeter.

Tests to obtain optimum conditions and sensitivity of the selected technique were first evaluated. Results of staining the remaining trophozoites with eosin before and after washing followed by fixing with methanol were compared. The eosin staining method could detect trophozoites of 10^5 cell/ml but the OD values had a high variation. When *G. intestinalis* was incubated for 48 h then immediately fixed, OD values for the unwashed method were significantly higher than in the washed method ($p<0.05$). The wash method before cell fixing and after staining cells was compared using either a pour or steep method. The optical density values for the steep method were significantly higher than for the pour method ($p<0.05$).

Eosin (0.25, 0.5, 1.0%), crystal violet (0.05, 0.1, 0.2%) and methylene blue (0.05, 0.1, 0.2%) dyes were compared using the 2 methods; by pouring a solution of methanol and water from a beaker on to the plate or by steeping the plate in the solution during the cell-fixing and dye-washing. The optical density of the eosin dye - stained - cells for either washing method (by pouring on the plate and steeping the plate) were not significantly different at all dye concentrations. For 0.2% crystal violet, the steeping method was significantly higher than the pour method but it had a higher

coefficient of variation than the methylene blue dye - stained - cell, so it was not used in further studies. Using 0.05 and 0.1% concentrations of methylene blue the steep method gave a significantly higher result than the pour method ($p<0.05$).

Methylene blue was selected for further experiments. Viable cells were fixed with methanol using the unwashed plate method. The plate was steeped in solution during cell fixing and then the dyed plates were washed. The optimum inoculum size was determined by staining different concentrations of *G. intestinalis* with 0.1 and 0.2% dye concentrations. Results from a 0.1 and 0.2% dye were not significantly different. An inoculum of 6.25×10^5 cell/ml gave significantly higher values than 3.9×10^4 cell/ml ($p<0.05$). Thus, an inoculum of 6.25×10^5 cell/ml and 0.1% methylene blue dye were selected to evaluate the anti-giardial effect of drugs or medicinal plant extracts.

Two methods for the *in vitro* screening of the anti-giardial activity of metronidazole, ornidazole and furazolidone drugs were compared: cell counting and optical density evaluation after 0.1% methylene blue staining. Inhibitory concentrations (IC_{50}) of metronidazole, ornidazole and furazolidone determined using a microscope were (0.14±0.05, 0.15±0.04, 0.14±0.02 μg/ml respectively) whereas using the optical density measurement they were (0.41±0.06, 0.18±0.01, 0.26±0.13 μg/ml respectively).

Hence this method described above was used to screen for the effects of crude extracts from 19 medicinal plants and pure compounds isolated from *Atropus elasticus* against *G. intestinalis*. The main advantage of the new *in vitro* anti-giardial drug susceptibility assay method is that it can be used to analyze several compounds at one time and it is simple, fast and low-cost. However it may not be suitable if the medicinal plant extracts precipitate during the test.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้คงไม่สำเร็จลุล่วงได้หากไม่ได้รับความช่วยเหลือและความร่วมมือจากบุคคลและหน่วยงานต่างๆ ดังต่อไปนี้ ผู้เขียนกราบขอขอบพระคุณ รศ. ดร. นงเยาว์ สว่างเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้หยิบยื่นโอกาสในการเรียนปริญญาโท แนะนำการทำงานต่างๆมากมาย ตลอดจนการสนับสนุนให้ผู้เขียนได้พัฒนาตนเองอย่างเต็มที่ ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. เสาวลักษณ์ พงไพจิตร สำหรับความอนุเคราะห์ให้คำแนะนำที่เกี่ยวข้องในงานวิจัยชิ้นนี้ ขอบคุณ ผศ. ดร. จรรยา นครินทร์ รศ. พญ. วีระนุช นิสภาธร สำหรับความอนุเคราะห์ให้คำแนะนำในการแก้วิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และอาจารย์สมชัย ยืนนาน ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับสถิติในการวิจัยและข้าพเจ้าขอขอบคุณ ดร. กมลธรรม อ่ำสกุล ดร. Brian Hodgson และคณาจารย์ภาคจุลชีววิทยาท่านอื่นๆ ที่ได้สอนวิชาความรู้ในทางวิชาการ และแนะนำประสบการณ์ต่างๆ ที่มีค่ายิ่งต่อการทำงาน พร้อมทั้งยังให้ความช่วยเหลือในด้านการเรียน ซึ่งทางผู้เขียนขอขอบพระคุณในน้ำใจของอาจารย์ทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือด้วยความเต็มใจเสมอมา

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนด้านงบวิจัยจากทางบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์และขอบคุณทุนผู้ช่วยวิจัย (Research Assistance) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ หากมีผู้เขียนเพียงลำพัง คงไม่สำเร็จลงได้ แต่เพราะได้รับความช่วยเหลือจากคนกลุ่มต่างๆ จึงสามารถทำให้งานวิจัยเสร็จสิ้นลงไปได้ คนกลุ่มดังกล่าวได้แก่ พี่อนงค์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่เอื้อเฟื้อสารเคมีและอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำแลป ขอบคุณเจ้าหน้าที่ พี่ เพื่อนๆ ภาคจุลชีววิทยาทุกท่าน และน้องๆ ห้องแลป PR 500 ทุกคนรวมทั้งพี่ เพื่อน น้องๆ ห้องแลป PR 504 และคุณพีรพลที่คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา ขอบคุณน้ำใจ เสียงหัวเราะที่มอบให้ และมอบมิตรภาพดีๆ ให้แก่ข้าพเจ้า

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณคุณแม่ คุณพ่อที่คอยให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้ตลอดมาและสนับสนุนข้าพเจ้าในทุกๆ ด้านมาโดยตลอด

เครือวัลย์ ห้วนก้ง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(13)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	19
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	20
วัสดุ	20
อุปกรณ์	22
วิธีการทดลอง	23
3. ผลการทดลอง	30
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	57
5. สรุปผลการทดลอง	61
เอกสารอ้างอิง	63
ภาคผนวก	73
ก	74
ข	76
ค	77
ง	81
จ	84
ประวัติผู้เขียน	99

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	เปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของวิธีการตรวจสอบผลของยาต่อเชื้อโปรโตซัว	2
2.	เปรียบเทียบภาวการณ์ติดเชื้อ *Giardia lamblia* และ *Entamoeba histolytica*	10
3.	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา metronidazole, ornidazole และ furazolidone (µg/ml) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Giardia intestinalis* ในหลอดทดลอง (MIC) ที่ได้จากการวัดค่า OD ที่ 655 nm	48
4.	ความเข้มข้นต่ำสุดของยา metronidazole, ornidazole และ furazolidone (µg/ml) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis* 50% (IC_{50}) และ 90% (IC_{90}) ที่คำนวณได้จากวิธีการนับเชื้อตัวเป็น กับวิธีการวัดค่า OD หลังย้อมเชื้อด้วยสี methylene blue 0.1%	48
5.	ผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *G. intestinalis* ในหลอดทดลอง (MIC)	53
6.	ผลของสารสกัดบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *G. intestinalis* ในหลอดทดลอง (MIC)	56

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	รูปร่างของ *Giardia lamblia* ในระยะโทรโฟซอยด์และซีสต์	6
2.	วงจรชีวิตของ *Giardia lamblia*	7
3.	โครงสร้างของสี eosin Y	16
4.	โครงสร้างของสี methylene blue	17
5.	โครงสร้างของสี crystal violet	18
6.	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD±SE กับความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อ *G. intestinalis* บ่มเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงของการทดลอง 3 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ หลังบ่มล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ fix ด้วย methanol และย้อมด้วยสี eosin 0.5% การเติมสารละลายลงใน plate ทำโดยการเทจากบิกเกอร์	30
7.	ตัวอย่างการติดสี eosin 0.5% ของเชื้อ *G. intestinalis* ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน plate ที่ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกก่อนการ fix เชื้อด้วย methanol และ plate ที่ fix ด้วย methanol ทันทีหลังเทอาหารเลี้ยงเชื้อออก	32
8.	ตัวอย่างการติดสี eosin 0.5% ของเชื้อ *G. intestinalis* ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน plate ที่ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกก่อนการ fix เชื้อด้วย methanol และ plate ที่ fix ด้วย methanol ทันทีหลังเทอาหารเลี้ยงเชื้อออก	33
9.	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD±SD กับความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อ *G. intestinalis* บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง จากการทดลอง 3 ครั้ง ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์กับไม่ล้าง fix ด้วย methanol และย้อมด้วยสี eosin 0.5% การเติมสารละลายลงใน plate ทำโดยการเทจากบิกเกอร์	34
10.	ตัวอย่างของเชื้อที่เกาะในหลุมหลังย้อมด้วยสี eosin 0.5% เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง plate ที่ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกก่อนการ fix เชื้อด้วย methanol และ plate ที่ fix ด้วยmethanol ทันทีหลังเทอาหารเลี้ยงเชื้อออกที่กำลังขยาย 40x	35

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
11.	ตัวอย่างของเชื้อที่เกาะในหลุมหลังย้อมด้วยสี eosin 0.5% เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง plate ที่ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกก่อนการ fix เชื้อด้วย methanol และ plate ที่ fix ด้วยmethanol ทันทีหลังเทอาหารเลี้ยงเชื้อออกที่กำลังขยาย 40x	35
12.	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD±SE กับความเข้มข้นเริ่มต้นของ *G. intestinalis* บ่มเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ล้างด้วยวิธีการเทจากบิกเกอร์และวิธีการแช่ plate ในทุกขั้นตอนและย้อมด้วยสี eosin 0.5%	37
13.	ตัวอย่างการติดสีของเชื้อ *G. intestinalis* เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ล้างด้วยวิธีการเท methanol จากบิกเกอร์และวิธีการแช่ plate ลงใน methanol ในทุกขั้นตอนเมื่อย้อมด้วยสี eosin, crystal violet และ methylene blue ที่ความเข้มข้นต่างๆ	39
14.	ตัวอย่างเชื้อ *G. intestinalis* ที่ย้อมด้วยสี methylene blue ความเข้มข้น 0.1% ที่กำลังขยาย 40x	40
15.	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD±SD กับสี eosin, crystal violet และ methylene blue ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ได้จากการล้างด้วยวิธีการเท methanol และน้ำจากบิกเกอร์และวิธีการแช่ plate ลงใน methanol และน้ำในทุกขั้นตอน จากการทดลอง 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ซ้ำ	41
16.	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD±SE กับความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อ *G. intestinalis* บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง fix โดยไม่ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออก ย้อมด้วยสี methylene blue 0.1% และ 0.2% โดยใช้วิธีแช่ plate ในสารละลายในขั้นตอนการ fix และล้างสีออกจากการทดลอง 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ซ้ำ	42
17.	ตัวอย่างการติดสี methylene blue ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อและความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD±SE กับความเข้มข้นของยา metronidazole, ornidazole และ furazolidone เมื่อบ่มเชื้อ *G. intestinalis* กับยาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง การทดลองทำครั้งละ 3 ซ้ำ	44

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
18.	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า probit ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis* และความเข้มข้นของยา metronidazole จากวิธีการนับกับวิธีย้อมหลังบ่มเชื้อ *G. intestinalis* กับยาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	45
19.	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า probit ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis* และความเข้มข้นของยา ornidazole จากวิธีการนับกับวิธีย้อมหลังบ่มเชื้อ *G. intestinalis* กับยาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	46
20.	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า probit ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis* และความเข้มข้นของยา furazolidone จากวิธีการนับกับวิธีย้อมหลังบ่มเชื้อ *G. intestinalis* กับยาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	47
21.	ตัวอย่างลักษณะการติดสีของ plate ที่ทดสอบผลของสารสกัดหยาบสมอไทยและต้นโท๊ะที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis* ในหลอดทดลองเทียบกับยา metronidazole เมื่อเทอาหารออกจาก plate หลังจากย้อมด้วยสี methylene blue 0.1% และความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD±SE กับความเข้มข้นของสารสกัดสมอไทยและต้นโท๊ะ	50
22.	ตัวอย่างลักษณะของ plate ที่ทดสอบผลของสารบริสุทธิ์ D13S1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis* ในหลอดทดลองเทียบกับยา metronidazole หลังจาก fix ด้วย methanol และหลังจากย้อมด้วยสี methylene blue 0.1% และความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD±SE กับความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ D13S1 และยา metronidazole	51
23.	ตัวอย่างลักษณะการติดสีของ plate ที่ทดสอบผลของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ต่อการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis* ในหลอดทดลองเทียบกับยา metronidazole เมื่อย้อมด้วยสี methylene blue 0.1 และความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD±SE กับความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นและสารบริสุทธิ์ Stc1	52
24.	แสดงลักษณะของ Counting chamber หรือ haemocytometer และภาพแสดงตำแหน่งการนับเชื้อ	82

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

^{o}C	=	องศาเซลเซียส
mg	=	มิลลิกรัม
µg	=	ไมโครกรัม
ml	=	มิลลิลิตร
nm	=	นาโนเมตร
µl	=	ไมโครลิตร
µm	=	ไมโครเมตร
%	=	เปอร์เซ็นต์
NaOH	=	Sodium hydroxide
HCl	=	Hydrochloric acid
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
H_2SO_4	=	Sulfuric acid
g	=	กรัม
MTT	=	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
XTT	=	2,3- bis[2-methyloxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
MIC	=	Minimal inhibitory concentration
SD	=	Standard deviation
SE	=	Standard error of mean
CV	=	Coefficient of variation

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

Giardia intestinalis เป็นโปรโตซัวปรสิตในกลุ่มที่มีแฟลกเจลลา อาศัยอยู่ที่ลำไส้เล็กส่วนต้นและลำไส้เล็กส่วนกลางของคน เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงเรื้อรังที่เรียกว่า จิอาร์ดิเอสิส โดยพบการระบาดทั่วโลกคิดเป็น 2.8×10^{8} คนต่อปี (Lane and Lloyd, 2002) ปัจจุบันโรคนี้ยังเป็นปัญหาสาธารณสุขระดับโลกที่ยังไม่สามารถควบคุมและกำจัดไปได้ ซึ่งพบอย่างแพร่หลายในประเทศที่ด้อยพัฒนามากกว่าประเทศกำลังพัฒนาและโดยเฉพาะในเด็ก (Adam, 2001) แม้ในปัจจุบันจะมียาหลายชนิดที่ใช้ในการรักษาโรค จิอาร์ดิเอสิส แต่ก็พบว่าให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ และยังมีรายงานการดื้อยาเกิดขึ้นเสมอ (Agrawal *et al*., 1997; Harris *et al*., 2001; Upcroft and Upcroft 2001; Jimenez-Cardoso *et al*., 2004)

ในปัจจุบันยาที่ใช้รักษาโรคที่เกิดจาก *G. intestinalis* และโรคที่เกิดจากโปรโตซัวในลำไส้ชนิดอื่น รวมทั้งโปรโตซัวในอวัยวะสืบพันธุ์ (*Trichomonas vaginalis*) ที่องค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้คือ metronidazole (Tracy and Webster, 1996) ซึ่งยานี้ทำให้เกิดผลกระทบต่างๆ ต่อร่างกาย เช่น มีรสขื่น ปวดศีรษะ คลื่นไส้ ตาพร่ามัว เป็นลมพิษ คัน และปัสสาวะสีดำ (Calzada *et al*., 2006; Vidal *et al*., 2007) ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียภายในร่างกาย (Legator *et al*., 1975; Gardner and Hill, 2001) และจากการทดสอบในหลอดทดลองยังพบว่ายาชนิดนี้น่าจะมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ไม่ว่าจะเป็น cell mediated และ humoral immune responses (Sexena *et al*., 1985) และยังเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งในลูกของสัตว์กัดแทะที่ได้รับยานี้ขณะอยู่ในครรภ์ (Rustia and Subik, 1972) และยิ่งกว่านั้นสายพันธุ์ของ *G. intestinalis* ที่เคยไวต่อยา กลับดื้อยามากขึ้น (Majewska *et al*., 1991; Harris *et al*., 2000; Liu *et al*., 2000) จึงมีความจำเป็นในการตรวจหาสารหรือยาตัวใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านโปรโตซัวตัวนี้

โดยทั่วไปวิธีการศึกษาหรือทดสอบผลของสารต่างๆ ที่มีต่อตัวเชื้อ *G. intestinalis* ในหลอดทดลอง เพื่อการค้นหายาใหม่ หรือวัตถุประสงค์อื่นๆ มีด้วยกันหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธียังมีข้อจำกัดอยู่บ้างดังแสดงในตารางที่ 1 ดังนั้นวิธีการตรวจสอบผลของยาหรือสารต่างๆ ที่มีต่อเชื้อโปรโตซัวที่น่าเชื่อถือ และมีความรวดเร็ว หรือสามารถตรวจสอบได้ครั้งละเป็นจำนวนมากจึงเป็นความต้องการของนักวิทยาศาสตร์

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของวิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบผลของยาต่อเชื้อโปรโตซัว

วิธีการตรวจสอบ	ข้อดี	ข้อเสีย
- การดูลักษณะรูปร่าง (Jokipii and Jokipii, 1980; Arguello-Garcia *et al*., 2004)	- สามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวเป็นและตัวตายโดยดูความแตกต่างของตัวเซลล์	- อาจจะมีการประเมินที่ต่ำ ถ้าซากของตัวเชื้อที่เหลือมีรูปร่างที่ไม่บุบสลายแต่ที่จริงแล้วไม่สามารถแบ่งตัวได้ (Sousa and Poiares-da-Silva, 1999)
- การยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ (Cruz *et al*., 2003a;b)	- สามารถเห็นลักษณะของตัวเชื้อเนื่องจากเป็นการประเมินด้วยสายตา	- ตัวเชื้ออาจจะไม่มีการเกาะติดหากเชื้อมีการเจริญเติบโตมาก (Wright *et al*., 1992)
- การนับจำนวนเชื้อ (Campanati and Monteiro-Leal, 2002; Jimenez-Cardoso *et al*., 2004; Calzada *et al*., 2005; Gadelha *et al*., 2005; Sawangjaroen *et al*., 2005; Freitas *et al*., 2006; Anthony *et al*., 2007)	- ทำได้ง่าย ราคาถูก	- ทำได้ยากหากตัวอย่างของสารที่จะต้องตรวจมีจำนวนมากและใช้เวลานาน รวมทั้งอาจเกิดความผิดพลาดจากการนับด้วย (Fumarola *et al*., 2004)
- การตรวจวัดปริมาณออกซิเจนที่เชื้อรับเข้าในเซลล์ (Oxygen uptake) (Sousa and Poiares-da-Silva, 1999)	- ใช้เครื่องมือที่ไม่ซับซ้อน ไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว	- เครื่องมือที่ใช้วัด (Clark-type oxygen electrode) มีราคาแพง

ตารางที่ 1 (ต่อ) เปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของวิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบผลของยาต่อเชื้อโปรโตซัว

วิธีการตรวจสอบ	ข้อดี	ข้อเสีย
- ประเมินโดยการให้คะแนนในระดับ +1 ถึง +4 (Upcroft and Upcroft, 2001)	- ใช้เวลาในการตรวจสอบไม่นาน	- ต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญในการดูแล้วนำมาเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมซึ่งจะแยกความแตกต่างได้ยากระหว่างหลุมที่มีความเข้มข้นของยาน้อยกับหลุมที่ไม่มียาและเป็นการประเมินคร่าวๆ เท่านั้นและอาจมีความแตกต่างของผลที่ได้ระหว่างผู้ประเมินแต่ละคน
-วิเคราะห์โดยใช้ MTT	- ง่าย ราคาถูก สามารถตรวจสอบสารจำนวนมากได้	- เกิดปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบ formazan กับยาหรืออาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สีที่ได้ไม่ได้เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของเซลล์ (Fumarola *et al*., 2004; Benere *et al*., 2007;)

การศึกษาครั้งนี้อยู่บนสมมุติฐานว่าการย้อมตัวเชื้อหรือเซลล์ที่ยังมีชีวิตและยังคงเกาะติดอยู่กับภาชนะที่ใช้เลี้ยงหลังสัมผัสกับยาหรือสารที่ใช้ทดสอบด้วยสีที่ใช้ย้อมเซลล์ทั่วๆ ไป แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง น่าจะเป็นแนวทางที่ดีในการแก้ปัญหาเหล่านี้ ปัจจุบันมีนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มที่ได้ใช้วิธีนี้ในการประเมินประสิทธิภาพของยาหรือสารต่างๆ ต่อจุลชีพอื่นๆ เช่น การใช้สี neutral red ย้อมเชื้อ herpes simplex virus (Danve *et al*., 2002) และใช้สี crystal violet ย้อมเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (Castro-Garza *et al*., 2007) แต่ในการนำมาใช้กับโปรโตซัวในลำไส้นั้นยังมีอยู่เพียง 2-3 กลุ่มเท่านั้น เช่น Busatti and Gomes (2007) ย้อมเชื้อ *G. lamblia* ที่ยังคงเกาะอยู่กับภาชนะที่ใช้เลี้ยงด้วยสี methylene blue และ Maurya และคณะ (2006) ใช้สี eosin ย้อม *Entamoeba histolytica* แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสีด้วย microplate reader โดยพบว่าวิธีการเหล่านี้สามารถใช้ตรวจสอบผลของยาหรือสาร

ต้านเชื้อได้ แต่วิธีการเหล่านี้ยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบอย่างเป็นระบบระหว่างสีชนิดต่างๆ หรือปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องรวมทั้งวิธีการย้อมเชื้อ โดยเฉพาะการนำมาใช้ในการประเมินจำนวนเชื้อ *G. intestinalis* ที่ยังมีชีวิต

จุดมุ่งหมายในการศึกษาครั้งนี้เพื่อพัฒนาวิธีการประเมินประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อ *G. intestinalis* ในหลอดทดลอง โดยใช้วิธีการย้อมสี และวัดค่าการดูดกลืนแสง เพื่อให้ได้วิธีที่รวดเร็วและเชื่อถือได้ โดยศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการย้อม เช่น จำนวนเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม ปัจจัยในการทำให้เชื้อที่เกาะติดอยู่กับภาชนะที่ใช้เลี้ยงหลุดออกน้อยที่สุดในขั้นตอนการล้างอาหารออก ชนิดและความเข้มข้นของสีที่ใช้ โดยสีที่เลือกใช้ศึกษา คือ eosin, crystal violet และ methylene blue ศึกษาวิธีการย้อมเชื้อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานที่ใช้กันอยู่ทั่วไป คือ การนับจำนวนเชื้อที่ยังมีชีวิต (Aley *et al*., 1994) เพื่อหาวิธีการที่ดีที่สุดในการประเมินจำนวนเชื้อ *G. intestinalis* ที่มีอยู่ และนำวิธีการที่ได้นี้ไปประยุกต์ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของยาต้านโปรโตซัวในลำไส้ 3 ชนิด คือ metronidazole, ornidazole และ furazolidone เพื่อหาค่ามาตรฐานสำหรับวิธีการใหม่ที่เลือก รวมทั้งนำวิธีการที่ได้มาใช้ในการทดสอบสารสกัดหยาบสมุนไพรและสารสกัดบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 25 สารสกัด เพื่อศึกษาว่ามีข้อจำกัดในการใช้หรือไม่

บทตรวจเอกสาร

1.1 เชื้อ *Giardia intestinalis* (Syn. *G. lamblia*, *G. duodenalis*)

1.1.1 ประวัติ

Antony van Leewenhoek เป็นผู้ค้นพบปรสิตชนิดนี้เป็นครั้งแรกในอุจจาระของเขาเองในปี ค.ศ. 1681 ต่อมาในปี ค.ศ. 1882 Kunster ได้ตั้งชื่อสกุล (genus) นี้ว่า *Giardia* แต่ในปี ค.ศ. 1888 Blanchard ได้ตั้งชื่อสกุล *Lamblia intestinalis* เพื่อเป็นเกียรติแก่ Lambl ซึ่งได้อธิบายรูปร่างลักษณะของเชื้อนี้อย่างละเอียดเป็นคนแรกในปี ค.ศ. 1859 ในเวลาต่อมาในปี ค.ศ. 1902 Stiles ได้เปลี่ยนชื่อเป็น *G. duodenalis* ภายหลังในปี ค.ศ.1915 Kofoid และ Christiansen ได้เสนอชื่อว่า *G. lamblia* เพื่อเป็นเกียรติแก่ A. Giard ที่ปารีส และนพ. F. Lamble ที่กรุงปราก (Adam, 2001) กล่าวกันว่า *G. lamblia* เป็นปรสิตโปรโตซัวของคนตัวแรกที่ค้นพบ *G. intestinalis* จัดอยู่ใน Phylum Sarcomastigophora, Class Zoomastigophorea, Order Diplomonadida และอยู่ใน Family Hexamitidae

การเรียกชื่อในระดับชนิด (species) ของ *Giardia* ยังไม่เป็นที่ตกลงกันแน่ชัด แต่ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้เสนอให้มีการจัดแบ่งเป็นกลุ่มโดยใช้ลักษณะรูปร่างของมีเดียนบอดี (median body) แบ่งแยกได้ 3 กลุ่ม (type) ดังนี้ (มานพ, 2545; Filice, 1952)

1. กลุ่ม *Giardia agilis*-type พบในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ลักษณะของโทรโฟซอยด์รูปร่างเรียวยาว 20 × 4.5 μm มีเดียนบอดีเป็นรูปหยดน้ำตา (tear drop หรือ club-shape) อยู่ในแนวขนานตามความยาวของตัว
2. กลุ่ม *Giardia muris*-type พบในสัตว์แทะ สัตว์เลื้อยคลานและนก โทรโฟซอยด์รูปร่างกลม สั้น และมีขนาดเล็ก โดยมีขนาด 10 × 7 μm มีเดียนบอดี มีรูปร่างกลม 2 ก้อนขนาดเล็กอยู่ตรงกลางตัว
3. กลุ่ม *Giardia duodenalis*-type พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมทั้งคน สัตว์แทะ สัตว์เลื้อยคลาน และอาจพบมากในนก โทรโฟซอยด์มีขนาด 11-16 × 5-9 μm มีเดียนบอดี มีลักษณะคล้ายส่วนหงอนของค้อนที่ใช้ถอนตะปู (claw hammer) อยู่ขวางลำตัว มักจะพบ 2 ก้อน

จากการศึกษาต่อมาโดยเทคโนโลยีต่างๆ พบว่ากลุ่มเหล่านี้ยังมีความแตกต่างกัน ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จำนวนหนึ่ง ยังคงใช้ชื่อเดิมคือ *G. intestinalis* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบในคน แม้ว่าในประเทศทางตะวันตกจะนิยมใช้ชื่อ *G. intestinalis* แต่ในประเทศทางยุโรปและในสหภาพโซเวียต กลับเป็นชื่อ *Lamblia intestinalis* ซึ่งเป็นชื่อที่ใช้กันบ่อย ทำให้เกิดการถกเถียงกันว่าการใช้ชื่อใดจึงจะเป็นชื่อที่เหมาะสมที่สุด แต่ในประเทศสหรัฐอเมริการยังคงคุ้นเคยกับชื่อเดิมคือ *G. lamblia* ดังนั้นจึงนิยมใช้ชื่อนี้ต่อไป เนื่องจากในขณะนี้ยังไม่มีข้อตกลงที่เป็นสากลที่แน่นอนในการเรียกชื่อ *Giardia* ในคน ดังนั้นจึงขอใช้ชื่อ *G. intestinalis*

1.1.2 รูปร่างลักษณะ

1. ระยะโทรโฟซอยด์ (trophozoite)

Giardia intestinalis ในระยะโทรโฟซอยด์ (รูปที่ 1ก) มีลักษณะคล้ายลูกแพร์หรือหยดน้ำตาเมื่อมองจากด้านบน มีขนาดยาวประมาณ 9.5-20 μm และกว้าง 5-15 μm ถ้ามองด้านข้างจะมีลักษณะคล้ายช้อน (Wolfe, 1992) โดยส่วนที่เว้าเข้าไปจะเป็นบริเวณของ sucking disc (จานดูด) มีขนาดยาวประมาณ 10-15 μm ซึ่งเป็นโครงสร้างในการเกาะติดกับผนังลำไส้ (Tessier and Davies, 1999) มีนิวเคลียส 2 ก้อนอยู่ด้านบน โทรโฟซอยด์มีแฟลกเจลลา 8 เส้น (4 คู่) และมีโครงสร้างเด่นชัด เรียกว่ามีเดียนบอดี กลางลำตัว ซึ่งโครงสร้างนี้ใช้ประกอบในการจัดกลุ่ม *Giardia*

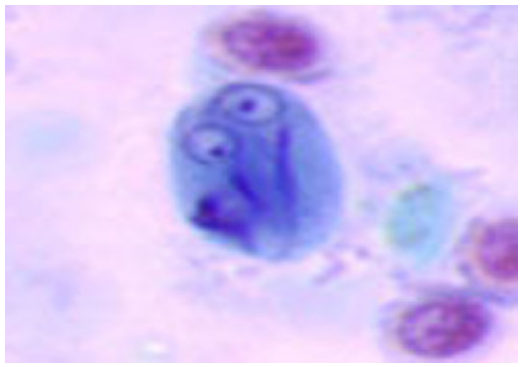
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน มีเดียนบอดีประกอบด้วยกลุ่มไมโครทูบลูโค้ง หน้าที่ยังไม่ทราบแน่ชัด โทรโฟซอยด์ไม่มีแอกโซสไตล์แท้ (axostyle) แต่เส้นยาวแนวดิ่งที่ในแนวกลางลำตัวนั้นเป็นแอกโซนีม (axoneme) ของแฟลกเจลลาส่วนล่างเสริมด้วยแถวโค้ง 2 แถว แต่ละแถวประกอบด้วยไมโครทูบลู 10-15 เส้น ล้อมไว้

โทรโฟซอยด์อาศัยจานดูดเกาะติดกับผนังลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม โดยกลไกการเกาะติดขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง อาจจะเป็นการทำงานระหว่างจานดูดกับแฟลกเจลลาด้านท้องที่สะบัดไปมา หรืออาจใช้หน่วยประกอบของจานดูด และ ventrolateral flange หรือปฏิกิริยาระหว่าง receptors ของโฮสต์และปรสิต

2. ระยะซีสต์ (cyst)

โทรโฟซอยด์เปลี่ยนรูปเป็นซีสต์ โดยดึงแฟลกเจลลาเข้าไปในไซโตพลาสซึม เหลืออยู่คู่เดียวที่เป็นอิสระอยู่ในช่องกลวงของไซโตพลาสซึม แล้วหลั่งสารมาหุ้มตัวกลายเป็นซีสต์ คนจะเป็นโรคนี้ได้ถ้าได้รับเชื้อในระยะที่เป็นซีสต์เข้าไป ซีสต์มีรูปร่างรูปไข่ (รูปที่ 1ข) มีขนาดยาวประมาณ 8-12 μm และกว้าง 7-10 μm และมี fibrous proteinaceous wall ล้อมรอบอยู่ ซึ่งหนาประมาณ 0.3 μm (Adam, 1991) ซึ่งทำให้เห็นว่าผนังของซีสต์ มี 2 ชั้น ภายในซีสต์พบว่ามีนิวเคลียส โดยซีสต์อ่อนมีนิวเคลียส 2 อัน และซีสต์แก่ซึ่งเป็นระยะติดต่อ มีนิวเคลียส 4 อัน ขึ้นอยู่กับการแบ่งนิวเคลียสว่าสมบูรณ์หรือไม่ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเห็นเอกโซนีมเป็นเส้นพาดตามยาวของซีสต์ ส่วนเส้นโค้งหลายเส้นเป็นชิ้นส่วนของจานดูด มีเดียนบอดีที่พบในระยะซีสต์จะสลายกระจัดกระจายเป็นไมโครทูบลูในไซโทพลาซึม มีช่องว่าง (lacuna) ในไซโทพลาซึมที่ขั้วหนึ่งของซีสต์ (นิมิตร และ เกตุรัตน์, 2546)

ก



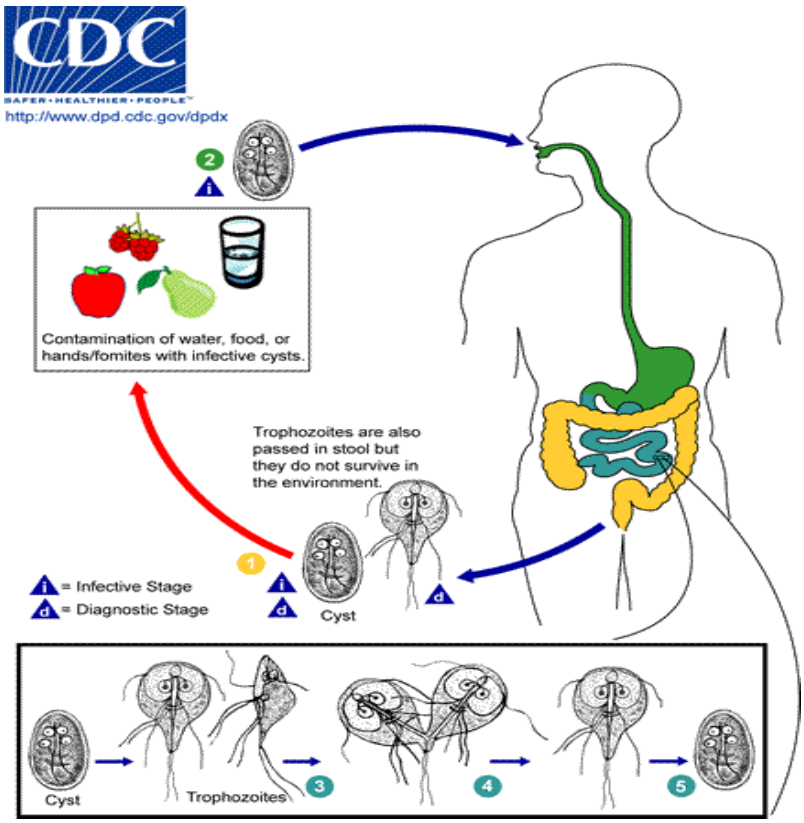
ข

รูปที่ 1 *Giardia intestinalis* ในระยะโทรโฟซอยด์ (ก) และระยะซีสต์ที่ย้อมด้วยสี Trichrome (ข)
ที่มา : (ก) http://www.inselhunde.de/images/Giardien2.jpg

(ข) http://www.mt.mahidol.ac.th/eLearning/Parasite/giardialamblia.html

1.1.3 วงจรชีวิต (รูปที่ 2)

Giardia ติดต่อเข้าสู่คนโดยการกินระยะซีสต์ที่ปนเปื้อนในอาหารและน้ำดื่มหรือได้รับซีสต์จากอุจจาระเข้าทางปากโดยตรง โทรโฟซอยด์ออกจากซีสต์ที่ลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมและเริ่มแบ่งตัวในขณะที่กำลังออกจากซีสต์ ได้ปรสิตระยะโทรโฟซอยด์สองตัว (Wolfe, 1992) ขบวนการทั้งหมด (excystation process) ใช้เวลา 10-30 นาที โทรโฟซอยด์แบ่งตัวจาก 1 เป็น 2 ตามแนวยาว (longitudinal binary fission) อย่างรวดเร็ว โทรโฟซอยด์ใช้จานดูดเกาะติดอยู่บนผิวของเซลล์บุลำไส้เล็กส่วนต้น ส่วนดูโอดีนัม และเจจูนัม หลังจากเพิ่มจำนวนไประยะหนึ่งแล้ว จะแปรสภาพเป็นระยะซีสต์ (encyst) เมื่อโทรโฟซอยด์ผ่านลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม โดยกลไกในการกระตุ้นให้เปลี่ยนรูปเป็นซีสต์ยังไม่ทราบแน่ชัด (นิมิตร และเกตุรัตน์, 2546) และซีสต์ออกมากับอุจจาระสู่สิ่งแวดล้อม (Lebwohl *et al*., 2003)



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของ *Giardia intestinalis*

ที่มา : http://www.mt.mahidol.ac.th/eLearning/Parasite/life_cyclegl.html

1.2 ระบาดวิทยาของเชื้อ *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis เป็นปรสิตที่พบได้ทั่วโลก พบมากในเขตอบอุ่นมากกว่าเขตที่มีอากาศหนาว โดยเฉพาะบริเวณเขตร้อน (tropics) และเขตชิดร้อน (subtropics) (มานพ, 2545) พบความชุกของโรคในเด็กมากกว่าผู้ใหญ่โดยเฉพาะในเด็กครอบครัวใหญ่ ในสถานสงเคราะห์ที่อยู่รวมกันเป็นจำนวนมากและสถานที่รับเลี้ยงเด็ก คิดเป็นร้อยละ 2-20 ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 10 ปี (Arbo *et al*., 2006) และเป็นโปรโตซัวที่พบบ่อยที่สุดในทางเดินอาหาร โรคจิอาร์ดิเอลิส ติดอันดับ 1 ใน 10 โรคปรสิตที่สำคัญในคน โดยพบผู้ป่วยที่เป็นโรคจิอาร์ดิเอสิส 200 ล้านคน ในเอเชีย อัฟริกา และลาตินอเมริกา ในประเทศสหรัฐอเมริกามีผู้ป่วยเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจำนวน 5,000 คนต่อปี (Lengerich *et al*., 1994) นอกจากนี้ยังพบผู้ติดเชื้อรายใหม่จำนวน 500,000 คนในแต่ละปี (Thompson, 2000) โดยการติดเชื้อส่วนใหญ่จะพบมากในประเทศกำลังพัฒนาประมาณร้อยละ 20 เมื่อเทียบกับประเทศพัฒนาแล้วมีประมาณร้อยละ 5 (Roxstrom-Lindquist *et al*., 2006) และยังเป็นสาเหตุสำคัญของโรค waterborne diarrhea (Lengerich *et al*., 1994) ซึ่งพบการระบาดระหว่างปี 1960 ในประเทศยุโรป และประเทศสหรัฐอเมริกา (Farthing, 1992) และในปี 1976-1994 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา (Furness *et al*., 2000) เพียงแต่ไม่ปรากฏผู้เสียชีวิตจากโรคนี้ สัตว์ที่มีรายงานการตรวจพบ *G. intestinalis* ได้แก่ สุนัข แมว โค กระบือ และตัวบีเวอร์ (Buret *et al*., 1990; Thompson, 2000) ซึ่งอาจถือเป็นโฮสต์กักตุนได้ คนโดยส่วนใหญ่ติดโรคนี้จาก

1. กินอาหารหรือน้ำดื่มที่ปนเปื้อนซีสต์ระยะติดต่อ เช่น การระบาดในกลุ่มคนมากกว่า 50,000 คนในรัฐโอเรกอน ประเทศสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 1969 เกิดจากการดื่มน้ำที่ไม่สะอาด โดยเฉพาะน้ำประปาหรือน้ำบาดาลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ หรือน้ำดื่มที่ปนเปื้อนน้ำโสโครกและไม่มีการบำบัดหรือบำบัดไม่ดี บางรายพบผู้ติดเชื้อจากการว่ายน้ำในสระน้ำที่ปนเปื้อนอุจจาระของผู้ที่มาว่ายน้ำ (นิมิต และ เกตุรัตน์, 2546)
2. การสัมผัสโดยตรง (fecal-oral) โดยเฉพาะสถานที่แออัด ซึ่งมีสุขอนามัยไม่ดี เช่น สถานรับเลี้ยงเด็ก สาเหตุเกิดจากพฤติกรรมเด็กบางประการ โดยเฉพาะนิสัยการดูดนิ้วในกรณีนี้จะพบความชุกการติดเชื้อในเด็กอ่อนวัยหัดเดิน (toddlers) และจากผู้ที่เปลี่ยนผ้าอ้อมให้เด็กแล้วไม่ล้างมือก่อนการประกอบอาหาร รวมทั้งการสัมผัสสัตว์ที่ติดเชื้อ การติดเชื้อระหว่างสมาชิกในครอบครัวจากเด็กที่ติดเชื้อ (Lee *et al*., 2002) เป็นต้น
3. ทางเพศสัมพันธ์ (sexual) โดยเฉพาะในกลุ่มโฮโมเซกซวล (Wolfe, 1992; Mayers *et al*., 1977)

ผู้ติดเชื้อแล้วหายขาดได้เอง ซึ่งอาจเกิดจากภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ จากการสำรวจในประเทศต่างๆ พบความชุกของโรคตั้งแต่ร้อยละ 21-25 ขึ้นอยู่กับกลุ่มอายุที่สำรวจ สุขอนามัย สิ่งแวดล้อมและดินฟ้าอากาศของประเทศนั้น ในประเทศไทยพบการติดเชื้อในเด็กชนบทประมาณร้อยละ 5-20 (Chulalerk and Saepoo, 1986) การระบาดที่เวอร์มอนต์ ในประเทศสหรัฐอเมริกาความชุกสูงในเด็ก 1-4 ขวบ และที่ Mount Isa ในประเทศออสเตรเลียความชุกสูงในเด็ก 1-5 ขวบ โรคระบาดในบางแห่งมักเกิดจากการดื่มน้ำไม่สะอาด ซึ่งอาจเป็นน้ำบาดาลหรือลำธารหรือน้ำประปา จึงมักเรียกโรคนี้ว่า hiker's diarrhea หรือ picnicker's disease

ตัวอย่างการเป็นสาเหตุของ traveller's diarrhea ได้แก่ นักท่องเที่ยวชาวสหรัฐอเมริกาที่ไปเซ็นปีเตอร์สเบิร์ก ประเทศรัสเซียระหว่าง ค.ศ. 1960-1973 ร้อยละ 23 มีอาการของโรค ร้อยละ 81 ของคณะทำงานจากองค์การนาซา (NASA) ที่ไปยังเซ็นปีเตอร์สเบิร์กมีเชื้อในอุจจาระ ในขณะที่พบเพียงร้อยละ 4 ของคนที่ไปยังเมืองอื่นๆ ของรัสเซีย สำหรับในประเทศไทยจากการสำรวจสถานเลี้ยงเด็กกำพร้า 25 แห่งในกรุงเทพมหานคร พบความชุกร้อยละ 20 และอีกร้อยละ 1 พบการติดเชื้อร่วมกับ *Cryptosporidium* (Janoff *et al.,* 1990) ที่สถานที่เลี้ยงเด็กกำพร้าจังหวัดเชียงใหม่พบความชุกร้อยละ 40 (นิมิตและคณะ, 2533) ในเด็กนักเรียนประถมศึกษาจังหวัดเชียงใหม่พบความชุกในเขตเมืองร้อยละ 3.9 เขตชานเมืองร้อยละ 11 และในเขตชนบทร้อยละ 15.3 (เกษมและคณะ, 2530)

1.3 อาการและพยาธิสภาพของโรคที่เกิดจาก *Giardia intestinalis*

ระยะฟักตัวของเชื้อใช้เวลา 9-15 วัน (Wolfe, 1992) ความรุนแรงของโรคเกิดจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น ระบบภูมิคุ้มกันของ host อายุและสภาวะขาดอาหารของ host สายพันธุ์ของเชื้อ ปริมาณในการติดเชื้อ และการติดเชื้อร่วมกับเชื้อตัวอื่น (Faubert, 2000; Roxstrom-Lindquist *et al*., 2006) คนที่ติดเชื้อแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มที่ไม่มีอาการ (asymptomatic) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดมีมากถึงร้อยละ 60-80 (Farthing, 1992; Tessier and Davies, 1999)
2. กลุ่มที่มีอาการแบบเฉพาะ (typical disease) ได้แก่ มีอุจจาระร่วงหรืออ่อนเหลว อ่อนเพลีย ปวดท้องเกร็งและน้ำหนักลด ระยะฟักตัวของโรคประมาณ 2 สัปดาห์และอาการยังคงอยู่ประมาณ 6 สัปดาห์ (Adam, 1991) แล้วจะหายจากอาการดังกล่าวใน 2-4 สัปดาห์ (Lewohl *et al*., 2003) เชื้ออาจจะหมดไปหรือไม่หมดไปก็ได้
3. กลุ่มที่มีอาการรุนแรง เป็นกลุ่มน้อย ความรุนแรงของโรคอาจเกี่ยวกับการมีกรดน้อยในกระเพาะอาหาร (achlorhydria) ภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Faubert, 2000) ขาดสารอาหาร หรืออื่นๆ การติดเชื้อในเด็กอาจทำให้การดูดซึมอาหาร

ผิดปกติ (malabsorption) และเกิด celiac-like syndrome บางครั้งเกิดภาวะไม่ดูดซึมไขมัน ทำให้อุจจาระมีไขมันมาก (steatorrhea) ซึ่งกลไกการที่เชื้อทำให้เกิดภาวะนี้ยังไม่แน่ชัด ในผู้ป่วยบางรายปรสิตเข้าไปในถุงน้ำดี ทำให้เกิดการอักเสบของถุงน้ำดีได้ และอาจพัฒนาไปเป็นการติดเชื้อเรื้อรังได้ (นิมิตร และ เกตุรัตน์, 2546)

ข้อสังเกตถึงความแตกต่างระหว่างภาวะการณ์ติดเชื้อ *Giardia intestinalis* และ *Entamoeba histolytica* ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบภาวะการณ์ติดเชื้อ *Giardia intestinalis* และ *Entamoeba histolytica*

ข้อเปรียบเทียบ	*G. intestinalis*	*E. histolytica*
ระยะก่อนเชื้อปรากฏ	6-15 วัน	4-8 วัน
ระยะฟักตัว	7-12 วัน	อย่างน้อย 3 สัปดาห์
ID 50*	25-100 ซีสต์	<2,000 ซีสต์
ความชุกในคนปกติ	ถึง 20%	ไม่เกิน 5%
ซีสต์ในอุจจาระของผู้มีอาการ	จำนวนมาก	ไม่มี
ระยะเวลาการติดเชื้อ	สั้น (<3 เดือน)	ยาว (หลายปี)
จำนวนซีสต์ที่ปล่อยออกมาในแต่ละวัน (จำนวนสูงสุด)	9×10^6	45×10^6
ความต้านทานต่อระดับคลอรีนที่ใส่น้ำตามปกติ	ทนทาน	ทนทาน

* จำนวนซีสต์ที่สามารถก่อโรคให้ผู้ได้รับร้อยละ 50 ติดเชื้อ (Symposium on giardiasis, 1980)

ภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นตามมา ได้แก่ น้ำหนักลดลงเนื่องจากภาวะขาดอาหาร มีอาการของการขาดโฟเลทในเด็กเล็กๆ อาจเป็นสาเหตุของการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ (Wright *et a*l., 1977; Carvalho *et al*., 2004) การดูดซึมไขมัน กลูโคส แลคโตส วิตามินเอ และวิตามินบี 12 ผิดปกติในผู้ป่วยบางราย (Gardner and Hill, 2001; Ortiz *et al*., 2001) ภาวะขาดอาหารทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสติดเชื้อนี้ได้ง่ายกว่าปกติ ภาวะที่มีกรดในกระเพาะต่ำจากภาวะขาดอาหาร atrophic gastritis หรือจากการผ่าตัดจะทำให้ติดโรคได้ง่ายกว่าปกติเช่นกัน ในเด็กเล็กผู้สูงอายุและผู้ป่วยที่มีภาวะบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันก็มีโอกาสเป็นโรคได้ง่ายกว่าปกติ

1.4 การวินิจฉัยโรคที่เกิดจาก *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis ในระยะโทรโฟซอยด์มักไม่ออกมากับอุจจาระผู้ป่วย ยกเว้นในกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการอุจจาระร่วงอย่างรุนแรง สำหรับการวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการทำโดยการตรวจหาเชื้อจากอุจจาระโดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์สามารถพบเชื้อซึ่งวินิจฉัยได้อย่างแน่นอน แต่เนื่องจากซีสต์ของ *G. intestinalis* ไม่ออกมาในอุจจาระอย่างสม่ำเสมอทุกวัน ดังนั้น การตรวจอุจจาระซ้ำ 2-3 ครั้ง จะช่วยให้มีโอกาสพบซีสต์มากขึ้น เนื่องจากระยะก่อนเชื้อปรากฏนานกว่าระยะฟักตัวของโรค และเชื้อไม่ออกมาในอุจจาระอย่างสม่ำเสมอ แต่จะมีอยู่ 3 แบบ คือ แบบแรก พบเชื้อในอุจจาระทุกครั้ง แบบ 2 พบเชื้อในร้อยละ 40 ของอุจจาระ และแบบ 3 พบเชื้อในช่วง 1-3 สัปดาห์แรก โดยจะตรวจพบซีสต์ในอุจจาระที่ผสมกับน้ำเกลือแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาหรือถ้าใช้วิธีหยดสีไอโอดีนลงไปก็จะช่วยทำให้เห็นชัดขึ้น เนื่องจากนิวเคลียสจะติดสีน้ำตาลของไอโอดีน (Wolfe, 1978) อุจจาระผู้ป่วยมักมีมูก และไขมันแต่ไม่มีเลือด อุจจาระอ่อนหรือเหลว อาจพบได้ทั้งโทรโฟซอยด์และซีสต์ ในขณะที่อุจจาระปกติมักพบแต่ระยะซีสต์ สังเกตเห็นโทรโฟซอยด์ในสเมียร์อุจจาระสดได้ง่าย โดยดูการเคลื่อนที่ของเชื้อ ซึ่งเน้นลักษณะการเคลื่อนที่แบบใบไม้ร่วง (falling leaves) คือ พลิกตัวคว่ำหงายสลับไปมาระหว่างการเคลื่อนที่ (swaying movement)

ในบางครั้งถ้าผู้ป่วยมีอาการของโรคแต่ตรวจอุจจาระไม่พบตัวเชื้อ อาจจำเป็นต้องเก็บสิ่งส่งตรวจจากของเหลวในลำไส้เล็กมาตรวจ มีรายงานว่าการดูดของเหลวจากส่วนต้นของลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม (duodenum) มาตรวจเพื่อหาเชื้อในระยะโทรโฟซอยด์มีโอกาสตรวจพบสูงขึ้นกว่าการตรวจอุจจาระจากร้อยละ 50 เป็นร้อยละ 70 (Kumath and Murugasu, 1974) เช่น การดูดโดยสอดหลอดเข้าในลำไส้ (duodenal intubation) หรือ การใช้ Enterotest® capsule แคปซูลนี้เป็นด้ายไนลอนยาว 1 เมตร ส่วนปลายติดไว้ด้วยตุ้มน้ำหนัก ทั้งหมดเก็บม้วนไว้ในแคปซูลเจลาทินและมีปลายสายโผล่ออกมา เมื่อกินแคปซูลลงไปเจลลาทินจะละลาย ด้ายคลายตัวลงไปได้ถึงเจจูนัม *G. intestinalis* จะเกาะตามด้าย เมื่อสาวด้ายขึ้นมาก็นำของเหลวที่เกาะติดด้ายไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Wolfe, 1992)

นอกจากนี้วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ ที่สามารถนำมาช่วยในการวินิจฉัยโรค ได้แก่ การตรวจดูพยาธิสภาพของลำไส้ซึ่งมีความไวร้อยละ 82.5-100 (Kamath and Murugasu, 1974; Oberhuber *et al*., 1997) การตรวจอุจจาระด้วยวิธีเข้มข้น เช่น zinc floatation technique (Faust *et al*., 1938) หรือ formalin-ether concentration technique (Ritchie, 1948) จะช่วยให้โอกาสการพบซีสต์มีมากขึ้น นอกจากวิธีดังกล่าวแล้ว การตรวจวินิจฉัยอาจทำได้ด้วยวิธีทางน้ำเหลืองโดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อตัวเชื้อ *Giardia* เช่น การตรวจหาระยะซีสต์และโทรโฟซอยด์ในอุจจาระด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (Ungar *et al*., 1984) ซึ่งวิธีนี้มีความไวในการตรวจเพิ่มขึ้นร้อยละ 92-96 และมีความจำเพาะ

ร้อยละ 95-100 (Tessier and Davies,1999) การตรวจหาด้วยวิธี enzyme immunoassay (EIA) ซึ่งวิธีการนี้เมื่อเทียบกับการตรวจหาโดยการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์มีความไวเพิ่มขึ้นร้อยละ 96.3 ในขณะที่การดูด้วยกล้องมีความไวร้อยละ 88.9 (Hanson and Cartwright, 2001) การตรวจหาแอนติเจนของ *G. intestinalis* ในอุจจาระด้วยวิธี Counter current immunoelectrophoresis ซึ่งมีความไวและความน่าเชื่อถือเมื่อตรวจสอบในอุจจาระร่วมกับการตรวจของเหลวจากส่วนต้นของลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม (Craft and Nelson, 1982)

การตรวจหาทางอณูวิทยา คือ polymerase chain reaction (Ghosh *et al*., 2000) โดยศึกษา 16S rRNA gene และ การตรวจหาซีสต์ในอุจจาระด้วยวิธี fluorescent in situ hybridization (FISH) ซึ่งจะมีความจำเพาะสูงและมีความไวในการตรวจหาโปรโตซัวที่มีชีวิตในอุจจาระและตัวอย่างสิ่งแวดล้อม (Dorsch *et al*., 2001; Lemos *et al*., 2005)

1.5 ยาที่นิยมใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจาก *Giardia intestinalis*

ยาที่ให้ผลดีและนิยมใช้มากที่สุดคือ ยากลุ่ม nitroimidazoles ประกอบด้วย metronidazole, tinidazole, ornidazole และ secnidazole โดยยาในกลุ่มนี้ถูกค้นพบใน ค.ศ. 1955 และมีประสิทธิภาพในการต้านการติดเชื้อโปรโตซัวหลายชนิด (Gardner and Hill, 2001) ยา metronidazole และ quinacrine เป็นยาที่นับได้ว่ามีประสิทธิภาพถึงร้อยละ 90 (Farthing, 1992) รวมทั้งยา furazolidone สามารถนำมารักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคจิอาร์ดิเอสิสได้ (Adam, 1991)

Metronidazole และ tinidazole มีประสิทธิภาพสูงในการรักษาโรคจิอาร์ดิเอสิส ยาในกลุ่มนี้จัดเป็น broad spectrum ในการต้าน anaerobic bacteria และโปรโตซัว (Adam, 1991) แต่ metronidazole เป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษากันทั่วโลก มีฤทธิ์ต่ออะมีบาทั้งระยะโทรโฟซอยด์และซีสต์ รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียพวกที่ไม่ใช้ออกซิเจนหลายชนิดและเชื้อโปรโตซัว เช่น *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia* และ *Balantidium coli* ซึ่งยาจะไปมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันที่ nitro group ของยากับ ferridoxin ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่เป็นพิษต่อเซลล์ของเชื้อ ยับยั้งการสร้าง DNA ของเชื้อ และทำให้โครงสร้าง helix ของ DNA ถูกทำลายไป ทำให้สูญเสียหน้าที่ไป (นิตยา, 2539; สมใจ, 2541; ประเสริฐศักดิ์, 2542; Gillis and Wiseman, 1996)

อาการข้างเคียงของยา metronidazole ที่พบ

- ต่อระบบทางเดินอาหาร โดยส่วนใหญ่คือ มีรสขื่น (metallic taste) คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร

- ต่อระบบประสาท ที่พบบ่อยที่สุด คือ อาการวิงเวียน ปวดศีรษะ (สมใจ, 2541; ประเสริฐศักดิ์, 2542) นอกจากนี้ยังมีผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบประสาทหากได้รับยาในปริมาณที่มาก (Gardner and Hill, 2001)

- ต่อผิวหนัง อาจมีอาการคัน ผื่นลมพิษ อาการอื่นๆ เช่น ปัสสาวะแสบ ปัสสาวะสีน้ำตาลเข้ม (ประเสริฐศักดิ์, 2542)

Quinacrine เป็นยาต้านมาลาเรียที่สามารถใช้ในการรักษาโรคจิอาร์ดิเอสิสได้ โดยมีอัตราการหายมากกว่าร้อยละ 90 แต่มีฤทธิ์ข้างเคียงหลายอย่างซึ่งจะพบมาก โดยเฉพาะในเด็ก เช่น เวียนศีรษะ ปวดศีรษะ อาเจียน ปัสสาวะมีสีเหลือง ท้องเสีย มีไข้ (Wolfe, 1992; Gardner and Hill, 2001) มีฤทธิ์ข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหาร ผิวหนัง กลไกของยายังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน ในการยับยั้งโปรโตซัวเกิดจากการแทรกตัวของยาเข้าไปใน DNA ของเชื้อ *G. intestinalis* ซึ่งเป็นสาเหตุของการยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลิอิกของเชื้อ (Gardner and Hill, 2001)

Furazolidone เป็นยาที่มีประสิทธิภาพดีในการต้านแบคทีเรีย เช่น *Klebsiella* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus aureus* เป็นต้น เป็นยาที่ใช้บ่อยในเด็กเนื่องจากมีรสขมและอาการข้างเคียงน้อยกว่า quinacrine แต่ประสิทธิภาพในการรักษาน้อยกว่า quinacrine และ metronidazole (Adam, 2001) กลไกในการออกฤทธิ์ยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน แต่ยาไปทำลายส่วนประกอบที่สำคัญของเซลล์ประกอบด้วย DNA (Gardner and Hill, 2001)

ทั้งยา quinacrine และ furazolidone ทำให้เกิด toxic psychosis และอาจทำให้เกิด hemolysis ได้ในผู้ป่วยที่มี G6PD deficiency (ประยงค์ และ คณะ, 2539; Speelman, 1985; Wolfe, 1992)

ยาในกลุ่ม nitronimidazole derivative ที่ได้ผลดีในการกำจัดโปรโตซัว มีผลข้างเคียงน้อยหรือเกือบไม่มี ยากลุ่มนี้ที่นิยมใช้กันได้แก่

1. Metronidazole (Flagyl®)

ขนาดสำหรับผู้ใหญ่ 250 มิลลิกรัม วันละ 3 เวลา เป็นเวลา 5-7 วันหรือ วันละ 2 กรัมเป็นเวลา 3 วัน (สมใจ, 2539; ประเสริฐ, 2542; Lebwokl *et al*., 2003) ขนาดสำหรับเด็ก 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วันละ 3 เวลา เป็นเวลา 7 วัน (Wolfe, 1992)

2. Tinidazole (Fasigyn®)

ให้ผลการรักษาสูงถึงร้อยละ 95 อาจให้ครั้งเดียว 2 กรัม หรือวันละ 300 มิลลิกรัม นาน 7 วัน (Mendelson, 1980; Speelman, 1985)

3. Ornidazole (Tibera®)

ขนาดที่ใช้ 2 กรัม ครั้งเดียว (Gardner and Hill, 2001) จากรายงานในหลายสถาบัน (Levi *et al*., 1977) พบว่าสามารถรักษาได้หายขาดเกือบ 100 เปอร์เซนต์ ผู้ป่วยทนต่อยาได้ดี มักไม่พบอาการข้างเคียง แต่อาจจะมี transminase ขึ้นสูงชั่วคราวได้ในบางราย

1.6 การควบคุมและป้องกัน

ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนป้องกันโรคจิอาร์ดิเอสิส การป้องกันทำได้โดยการรักษาสุขอนามัยส่วนบุคคลให้ดี รักษาความสะอาดอยู่เสมอ เช่น การล้างมือให้สะอาดก่อนรับประทานอาหารหรือหลังจากเปลี่ยนผ้าอ้อมให้เด็กและหลังจากออกจากห้องน้ำ การดื่มน้ำที่ต้มสุกแล้วรับประทานอาหารที่สุก รวมทั้งควบคุมแมลงวันซึ่งเป็นพาหะนำซีสต์มาปนเปื้อนในอาหาร และป้องกันการปนเปื้อนของอุจจาระลงในแหล่งน้ำของชุมชน เนื่องจากโรคนี้มี infective dose ค่อนข้างต่ำ การได้รับซีสต์เข้าไปไม่ถึง 100 ตัวก็เป็นโรคได้ และซีสต์ของ *G. intestinalis* ค่อนข้างทนที่อุณหภูมิต่ำสามารถอยู่รอดได้นานมากกว่า 3 เดือน (Wolfe, 1992) ที่อุณหภูมิ 8°C อยู่ได้นาน 77 วัน และที่ 21°C อยู่ได้นาน 5-24 วัน ส่วนที่อุณหภูมิ 37°C ไม่เกิน 4 วัน อย่างไรก็ตามเชื้อจะถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 50°C ขึ้นไปและ ใน 2-5 เปอร์เซ็นต์ ฟีนอลหรือไลซอล (Wright *et al*., 1977) อีกทั้งเชื้อยังทนทานต่อการฆ่าด้วยคลอรีน ดังนั้นการต้มน้ำให้เดือดอย่างน้อย 3 นาทีหรือกรองจะสามารถกำจัดซีสต์ให้หมดไปจากน้ำดื่มได้ (Steven, 1985; Tessier and Davies, 1999) ในทารกที่ดื่มนมมารดาจะติดเชื้อได้ยากเพราะในน้ำนมของมารดามีเอนไซม์ไลเปส (นิมิต และ เกตุรัตน์, 2546)

1.7 การตรวจสอบผลของยาต่อเชื้อ *Giardia intestinalis* ในหลอดทดลอง

วิธีการตรวจสอบผลของยาต่อเชื้อโปรโตซัวในลำไส้ในหลอดทดลองมีด้วยกันหลายวิธี เช่น การดูลักษณะรูปร่างด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Jokipii and Jokipii, 1980; Arguello-Garcia *et al*., 2004) ดูการยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ (Cruz *et al*., 2003b) ซึ่งวิธีการเหล่านี้ก็พบปัญหาในการตรวจสอบ ตัวอย่างเช่น ปัญหาจากการวิเคราะห์รูปร่างของตัวเชื้อ อาจจะมีการประเมินที่ต่ำถ้าซากของตัวเชื้อที่เหลือมีรูปร่างที่ไม่บุบสลาย แม้ว่าที่จริงแล้วไม่สามารถแบ่งตัวได้ (Sousa and Poiares-da-Silva, 1999) ส่วนวิธีการนับจำนวนเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่หลังสัมผัสกับยาโดยการย้อมด้วยสี trypan blue (เซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสี) และคำนวณโดยใช้ haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ก็เป็นที่นิยม (Campanati and Monteiro-Leal, 2002; Jiménez-Cardoso *et al*., 2004; Calzada *et al*., 2005; Gadelha *et al*., 2005; Sawangjaroen *et al*., 2005; Freitas *et al*., 2006; Anthony *et al*., 2007) เนื่องจากวิธีนี้เป็น

วิธีการที่ใช้วิธีตรวจสอบที่ง่าย สะดวก ใช้อุปกรณ์ที่ไม่ยุ่งยาก แต่วิธีนี้ทำได้ยากหากตัวอย่างของสารที่จะต้องตรวจมีจำนวนมากและต้องอาศัยความชำนาญในการดูเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อตัวเป็นและเชื้อตัวตาย ปัญหาเหล่านี้นำไปสู่การใช้เทคนิค colorimetric โดยการใช้สีที่แตกต่างกันย้อมตัวเชื้อที่ยังคงเกาะอยู่ติดกับภาชนะที่ใช้เลี้ยง Busatti และ Gomes (2007) ได้ย้อมเชื้อ *G. lamblia* ด้วย methylene blue แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสีด้วย microplate reader เทียบกับวิธีการนับจำนวนเชื้อ ค่า IC_{50} ที่ได้จากผลการทดลองระหว่างวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงและวิธีการนับสอดคล้องกับผู้วิจัยคนอื่นๆ เคยมีการทดลองใช้การวัดเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงโดยอาศัยเอนไซม์ในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสีในโปรโตซัวชนิดต่างๆ เช่น การใช้ nitro blue tetrazolium (NBT) ประเมินการรอดชีวิตของเชื้อ *Entamoeba histolytica* ในระยะโทรโฟซอยด์ (Mukhopadhyay and Chaudhuri, 1996) การตรวจวัดจำนวนเชื้อ *G. lamblia* โดยใช้ XTT และ MTT (Wright *et al*., 1992; Arguello-Garcia *et al*., 2004; Benere *et al*., 2007) รวมทั้งการตรวจหาจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตของเชื้อ *Trichomonas vaginalis* โดยใช้สี alamar blue ศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติ (ดูการเปลี่ยนสีด้วยตา) และปริมาณ (วัด fluorometric ของความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 50 และ 90) (Aldrete *et al*.,2005) ส่วนวิธีการย้อมตัวเชื้อที่มีชีวิตด้วยสี eosin ยังไม่เคยมีการใช้กับเชื้อ *G. intestinalis* ที่มีชีวิตในระยะโทรโฟซอยด์ แต่เคยใช้ได้ผลกับเชื้อ *E. histolytica* ซึ่ง Maurya และคณะ (2006) ใช้สี eosin ย้อม *E. histolytica* เพื่อหาประสิทธิภาพของยาต้านโปรโตซัวและนำค่าที่ได้ไปหาค่า IC_{50} ซึ่งวิธีการดังกล่าวใช้ได้ผลดีสำหรับเชื้อตัวนี้

1.8 สีย้อมโปรโตซัว

สีเป็นสารเคมีชนิดสารประกอบอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ส่วนใหญ่เป็นน้ำมันดำถ่านหิน (coal tar) หรือ อนุพันธ์ของเบนซีน (benzene derivative) (Carson, 1997) จากประวัติยังไม่ทราบแน่ชัดว่าใครเป็นคนแรกที่ได้ริเริ่มนำสีมาใช้ย้อมตัวอย่าง สีชนิดแรกที่มีบันทึกไว้ในการนำมาใช้ คือ สีคาร์มิน (carmine) และ สีอินดิโก (indigo) เริ่มใช้กันอย่างแพร่หลายในปี ค.ศ. 1850 ต่อมาในปี ค.ศ. 1856 สีอนิลีน ได้ถูกนำมาใช้มากขึ้น หลังจากนั้นเป็นต้นมาได้มีการค้นพบสีต่างๆ ออกมามากมาย เพื่อนำมาย้อมตัวอย่าง สีที่ใช้ย้อมเซลล์หรือโครงสร้างของเซลล์เป็นสีที่อยู่ในรูปของเกลือประกอบด้วยไอออนบวกและลบ สีที่มีหมู่ chromophoric ที่แสดงไอออนบวกเป็นส่วนที่แสดงสี เรียกสีประเภทนี้ว่า basic dyes (สีประเภทด่าง) เช่น methylene blue ในรูปของเกลือ methylene blue chloride ซึ่งเมื่อละลายในตัวทำละลายจะได้หมู่ chromophore คือ methylene blue^{+} และ chloride^{-} แต่ถ้าหมู่ chromophoric เป็นไอออนลบ สีนี้จะเรียกว่า acid dyes (สีประเภทกรด) เช่น สี eosin ในรูปเกลือ sodium eosinate เมื่อละลาย

น้ำจะได้ Na^+ และ $eosinate^-$ สีที่ใช้ในการย้อมเซลล์หรือโครงสร้างของเซลล์ ส่วนใหญ่มักเป็นสี basic dyes (ปราโมทย์, 2530)

ชนิดของสี โดยทั่วไปสีแบ่งตามต้นกำเนิดที่ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. สีธรรมชาติ (natural dye)

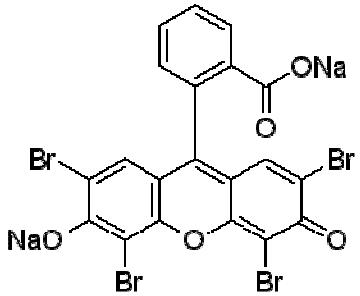
เป็นสีที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยตรง เช่น สี hematoxylin ที่ได้จากต้น *Hematoxylin campechianum* ซึ่งปลูกกันในประเทศแมกซิโกและเวสต์อินเดีย (West Indies) สี indigo ได้จากพืชตระกูล *Indigofera* ส่วนสีคาร์มีนหรือกรดคาร์มินิค (carmine, carminic acid) เป็นสีที่สกัดได้จากแมลงโคชีเนียล (Cochineal beetles) ส่วนสีธรรมชาติตัวอื่น คือ ออร์ซีน (orcein) และแซฟฟรอน (saffron) สกัดได้จากราและดอกไม้ตามลำดับ สีพวกนี้มีความสำคัญน้อยทั้งในโรงงานอุตสาหกรรมและทางชีววิทยา เนื่องจากเป็นสีที่ไม่บริสุทธิ์และไม่ทราบคุณสมบัติทางเคมีกันเป็นอย่างดี

2. สีสังเคราะห์ (synthetic dye)

เป็นสีที่ได้จากการสังเคราะห์โดยวิธีเคมี ซึ่งมีเป็นจำนวนมาก สีพวกนี้จะทราบสูตรโครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมี (เวคิน, 2524; ศุภลักษณ์, 2545)

1.8.1 สี Eosin (รูปที่ 3)

Eosin เป็นสีที่ได้มาจากน้ำมันดำถ่านหิน ซึ่งเป็นสีย้อมที่มีสภาพเป็นกรด ใช้ย้อมไซโตพลาสซึม collagen และ muscle (Carson, 1997) ส่วนใหญ่ใช้ในการย้อมชิ้นเนื้อและเซลล์เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่าง nucleus และไซโตพลาสซึม โดยมักใช้ร่วมกับสี hematoxylin ซึ่งเรียกการย้อมแบบนี้ว่า hematoxylin และ eosin (H&E) staining โดย hematoxylin จะย้อม nucleus ติดสีน้ำเงิน eosin จะย้อมติดไซโตพลาสซึมให้สีแดง (http://en.wikipedia.org/wiki/Staining_(biology)) ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วง 515-518 (Lillie, 1969)

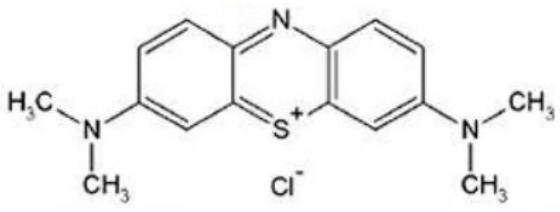


รูปที่ 3 โครงสร้างของสี eosin Y

ที่มา: http://www.sigmaaldrich.com/structureimages/40/mfcd00005040.gif

1.8.4 สี Methylene blue (รูปที่ 4)

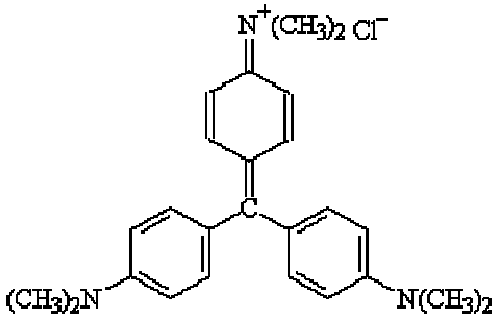
Methylene blue เป็นสารเคมีที่ใช้เป็นสี ลักษณะเป็นผลึก สีเขียวเข้ม ไม่มีกลิ่น methylene blue เป็นสีย้อมที่เป็นด่าง (basic dye) ซึ่งมีไอออนบวกเป็นตัวให้สี เมื่อนำไปย้อมรวมกับส่วนประกอบของเซลล์ที่อยู่บนผิว หรือภายในเซลล์ ไอออนบวกของสีจะจับกับกลุ่มของประจุลบภายในเซลล์ เช่น กรดนิวคลีอิก (Oliver *et al*., 1989) โดยจับกันด้วยพันธะหลายชนิด เช่น พันธะอิออนิก พันธะไฮโดรเจน และแรงวันเดอร์วาล (http://www.vcharkarn.com/vcafe/43097) methylene blue ใช้เป็นสีย้อมในวิธีต่าง ๆ เช่น Gram's stain, Wright's stain และ Jenner's stain ในทางการแพทย์ใช้สำหรับรักษาโรค methemoglobinemia (http://en.wikipedia.org/wiki/Methylene_blue) ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วง 664-666 (Lillie, 1969)



รูปที่ 4 โครงสร้างของสี methylene blue
ที่มา: http://www.nilesbio.com/images/categories/C281.jpg

1.8.5 สี Crystal violet (รูปที่ 5)

Crystal violet มีชื่อเรียกต่าง ๆ กันอีกหลายชื่อ ได้แก่ Andergon, Aniline violet, Axuris, Badil, Basic Violet 3, Brilliant Violet 58, Gentiaverm, Hexamethyl-p-rosaniline chloride, Meroxylan, Meroxyl, Methylrosanilide chloride, Methyl Violet 10BNS, Pyoktanin, Vianin, Viocid และ Viola Crystallina เป็นสีย้อมที่เป็นด่าง ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปผงหรือผลึกสีเขียวเข้มหรือที่รู้จักกันคือ gentian violet สีนี้ส่วนใหญ่นำมาประยุกต์ใช้สำหรับย้อมแกรม (Castro-Garza *et al*., 2007) และนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) หรือการตายของเซลล์ที่เกิดจากสารเคมี ยาหรือสารพิษจากเชื้อก่อโรค (Rothman, 1986; Shaik *et al*., 2004) ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วง 589-593 (Lillie, 1969)



รูปที่ 5 โครงสร้างของสี crystal violet

ที่มา: http://www.usca.edu/chemistry/spectra/crysviol.gif

วัตถุประสงค์

1) พัฒนาวิธีการประเมินผลของยาต้านเชื้อ *G. intestinalis* โดยการย้อมสีเชื้อที่ยังมีชีวิตและเกาะติดกับภาชนะที่ใช้เลี้ยงแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง

2) ศึกษาและเปรียบเทียบสีที่ใช้ย้อมตัวเชื้อที่ให้ผลดีที่สุด ใช้ขั้นตอนในการย้อมที่รวดเร็ว รวมทั้งให้ค่าการดูดกลืนแสงที่แม่นยำและเชื่อถือได้

3) นำวิธีการที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *G. intestinalis* ของยา และสารสกัดสมุนไพรที่สนใจ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

ได้วิธีการประเมินประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อ *G. intestinalis* ที่มีความจำเพาะเจาะจง แม่นยำน่าเชื่อถือรวมทั้งมีความรวดเร็วในการวิเคราะห์ และสามารถใช้ในการประเมินผลของยา รวมทั้งสารสกัดสมุนไพรที่สนใจได้ครั้งละเป็นจำนวนมาก

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

2.1. วัสดุ และอุปกรณ์

2.1.1 เชื้อ *Giardia intestinalis*

เชื้อ *G. intestinalis* ที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นเชื้อที่แยกได้จากระยะซีสต์ในอุจจาระคนไทย (Siripanth *et al*., 1995) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.จุฑาทิพย์ ศิริพันธุ์ ภาควิชาพยาธิ โปรโตซัว คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

2.1.2 สารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์จากสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง

2.1.2.1 สารสกัดหยาบ

- กระชาย
- ขมิ้น
- ข่า
- ขิง
- ดอกนนทรี
- ดอกปีบ
- ดีปลี
- ต้นโท๊ะ
- ใบกระท่อม
- เปลือกโกโก้
- เปลือกโกงกาง
- เปลือกตะบูน
- เปลือกนนทรี
- พริกไทยขาว
- มะตูมแก่
- ไมยราบ
- ว่านหอมแดง
- สมอเทศ

- สมอไทย
- สมอภิเภก

สารสกัดจากกระชาย ข่า ขิง และขมิ้นสกัดเอง ส่วนสารสกัดที่เหลือได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย และคุณสุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ

2.1.2.2 สารบริสุทธิ์สกัดได้จากต้นกะออกได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. วิลาวัลย์ มหาบุษราคัม

- A2
- B6-3124S
- C11-9S
- C13-2S
- C17
- D13S1
- Stc1

2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ YI-broth (ภาคผนวก ก)

2.1.4 สารเคมีและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 0.1 N NaOH (MERCK) (ภาคผนวก ค)
- 0.1M HCl (BDH) (ภาคผนวก ค)
- Ascorbic acid (Riedel)
- Bovine serum (GIBCO)
- Calcium pantothenate (SIGMA)
- Conc. H_2SO_4 (LAB SCAN)
- Crystal violet (MERCK)
- d-Biotin (SIGMA)
- Dehydrated bovine bile (SIGMA)
- Dimethy sulfoxide (DMSO) (MERCK)
- DL-6,8 thioctic acid (SIGMA)
- Eosin (Fluka)
- Ferric ammonium citrate (SIGMA)
- Folic acid (SIGMA)
- Glucose (SIGMA)

- $K_2Cr_2O_7$
- K_2HPO_4 (MERCK)
- KH_2PO_4 (SIGMA)
- L-cysteine hydrochloride (ALDRICH)
- Methanol (BDH)
- Methylene blue (Fluka)
- Metronidazole (SIGMA)
- Na_2HPO_4 (MERCK)
- NaCl (BDH)
- Niacinamide (SIGMA)
- Ornidazole (SIGMA)
- Phosphate buffer saline (ภาคผนวก ค)
- Pyridoxal hydrochloride (SIGMA)
- Riboflavin (SIGMA)
- Sodium dodexyl sulphate (SDS) (BDH)
- Thianium hydrochloride (SIGMA-ALDRICH)
- Tinidazole (SIGMA)
- Tween 80 (SIGMA)
- Vitamine B12 (SIGMA)
- Yeast extract (MERCK)

2.1.5 อุปกรณ์

- กระดาษกรอง Millipore (0.45 μm) ของ Sartorius, Germany
- กล้องจุลทรรศน์ชนิด Light microscope และ Inverted microscope ของ Olympus
- เครื่อง Evaporator ของ BUCHI, Switzerland
- เครื่องแก้วสำหรับการวิจัยทางจุลชีววิทยา
- เครื่องเขย่า (Vortex mixer) ของ Scientific Industries, Inc., U.S.A.
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของ Backman, U.S.A.
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Micro plate reader ของ PowerWaveX, Biotek
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ของ HERMLE Z200A, Germany
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Biosafety cabinet) ของ Microflow
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ของ Heraeus GmbH, Germany
- ตู้อบแห้ง (Hot Air Oven) ของ Heraeus GmbH, Germany

- ไมโครปิเปต (Micro pipette) ของ Eppendorf
- หม้อนึ่งไอน้ำ (Autoclave) ของ Tomy Seiko Co. Ltd., Japan
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ของ Eyela Tokla Rikakikai Co. Ltd., Japan
- 96-well tissue culture plate ของ NUNC
- Anaerocult® A mini ของ MERCK
- Counting chambers (Haemacytometer) ของ boeco, Germany
- Eppendorf tube ของ Axygen
- Indicator (Anaerotest) ของ MERCK
- Pasture pipette
- Tip ขนาด 20, 200, 1000 และ 5000 ml ของ Axygen

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Giardia intestinalis*

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *G. intestinalis* เลี้ยงแบบ axenic culture (ไม่มีแบคทีเรียปนเปื้อน) โดยเลี้ยงในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16×125 mm (15 ml) ใช้อาหาร YI-S (Diamond *et al*., 1995) ที่มีวิตามินและ 10% heat-inactivated bovine serum (ภาคผนวก ก) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C โดยเอียงหลอดประมาณ 45 องศา เพื่อให้เชื้อเจริญเกาะอยู่ข้างหลอด ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 48 ชั่วโมง โดยใช้ pasture pipette ที่ปราศจากเชื้อดูดเอาอาหารเก่าออกจนหมด แล้วเติมอาหารใหม่ลงไป จนมีปริมาตร 2/3 (ประมาณ 10.5-12 ml) ของหลอดฝาเกลียว

2.2.2 การเตรียมเชื้อที่ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทดลอง

ใช้เชื้อ *G. intestinalis* ความเข้มข้นเริ่มต้น 2×10^6 cell/ml ปริมาตร 2 ml ใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 16×125 mm (15 ml) จากนั้นเติมอาหารใหม่ปริมาตร 8 ml นำไปบ่มเป็นเวลา 40-50 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปใช้ในการทดลอง

2.2.3 การเตรียมยามาตรฐาน

ยามาตรฐานที่ใช้ ได้แก่ metronidazole, ornidazole และ furazolidone นำมาละลายด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้น 2 mg/ml เก็บเป็น stock ที่อุณหภูมิ -18°C เวลาใช้นำมาเจือจางด้วยอาหาร YI-S ให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

2.2.4 การเตรียมสารสกัดหยาบสมุนไพร

2.2.4.1 การสกัดสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างสมุนไพรที่เลือกมาเพื่อใช้ในการทดสอบครั้งนี้เลือกจากสมุนไพรที่มีเคยมีรายงานผลการยับยั้งการเจริญของ *Giardia intestinalis* ในหลอดทดลอง ดังนี้ กระชาย, ข่า, ขิง (Sawangjaroen *et al*., 2005) และสมุนไพรที่มีสีคือ ขมิ้น (Perez-Arriaga *et al*., 2006) เพื่อดูว่าสีของสมุนไพรมีผลต่อการใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นในการอ่านค่าการดูดกลืนแสง (OD) หรือไม่ โดยนำสมุนไพรที่เลือกทั้ง 4 ชนิด (กระชาย ขมิ้น ข่า และขิง) มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปาและล้างครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปตากและอบที่อุณหภูมิ 50°C จนแห้งสนิท ปั่นด้วยเครื่องปั่นให้เป็นผงละเอียด นำผงสมุนไพรมาแช่ในเอทานอลในสัดส่วนสมุนไพรต่อเอทานอลเป็น 1:3 โดยน้ำหนัก นาน 7 วัน กรองส่วนใส กากสมุนไพรที่เหลือนำมาแช่ด้วยเอทานอลอีกครั้ง เช่นเดียวกับการแช่ครั้งแรก ทำซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้ง จากนั้นนำของเหลวที่กรองได้ไประเหยเอทานอลด้วยเครื่อง evaporator แล้วนำสารสกัดที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -18°C จนกว่าจะใช้ ส่วนสารสกัดหยาบที่เหลืออีก 16 ชนิดที่สกัดด้วยน้ำและ methanol ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย และ คุณสุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ ส่วนสารบริสุทธิ์สกัดจากต้นกะออกได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. วิลาวัลย์ มหาบุษราคัม เวลาใช้ละลายสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ให้มีความเข้มข้น 100 และ 10 mg/ml ตามลำดับด้วย DMSO แล้วนำมาเจือจางด้วยอาหาร YI-S ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2,000 และ 800 µg/ml ตามลำดับ

2.2.5 การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสง

2.2.5.1 จำนวนเชื้อเริ่มต้นและระยะเวลาในการบ่มเชื้อ

การศึกษานี้ดัดแปลงจากการทดลองของ Maurya *et al*., (2006) ที่ใช้สี eosin ในการย้อมเชื้อ *Entamoeba histolytica* โดยนำหลอดทดลองที่มีเชื้อ *G. intestinalis* จากข้อ 2.2.2 แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15-20 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากข้างหลอดที่เกาะอยู่ ปั่นด้วยความเร็ว 3,250 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนบนทิ้ง นำตะกอนมานับจำนวนเซลล์โดยใช้ heamocytometer ปรับให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2×10^7 cell/ml ด้วยอาหาร YI-S และเจือจางลำดับสอง ด้วยอาหาร YI-S จนได้ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 2×10^7, 1×10^7, 5×10^6, 2.5×10^6, 1.25×10^6, 6.25×10^5, 3.13×10^5, 1.56×10^5, 7.8×10^4, 3.9×10^4, 1.95×10^4, 9.75×10^3, 4.88×10^3, 2.44×10^3, 1.22×10^3, 6.1×10^2 cell/ml ตามลำดับ แล้วดูดเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ เหล่านี้ ปริมาตร 300 µl ใส่ใน 96-well tissue culture plate ความเข้มข้นละ 3 หลุม และในแต่ละ plate เตรียมหลุมควบคุมโดยดูดอาหาร YI-S ใส่ในหลุมที่ 1A-1H หลุมละ

300 µl และใช้ค่านี้เป็นค่า blank (เตรียมเช่นนี้ 3 plate) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยใช้ Anaerocult® A mini (MERCK)

เมื่อครบแต่ละเวลา (24, 48 และ 72 ชั่วโมง) ให้เทอาหารเลี้ยงเชื้อออกและเคาะ plate เล็กน้อย ล้างเบาๆ ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% โดยวิธีการเทสารละลายจากบิกเกอร์ลงใน plate ให้เต็มจากนั้นเทออกโดยการคว่ำ plate ลงบนกระดาษทิชชู วางทิ้งไว้จนแห้งแล้ว fix เชื้อ โดยการเท methanol จากบิกเกอร์ลงใน plate จนเต็มหลุม ทิ้งไว้นาน 1 นาที จากนั้นเท methanol ออก วางทิ้งไว้จนแห้ง เติมสี eosin 0.5% ปริมาตร 300 µl ลงในแต่ละหลุม ทิ้งไว้นาน 15 นาที เทสีออก ล้างด้วยน้ำก๊อก 1 ครั้งและล้างน้ำกลั่น 2 ครั้ง โดยวิธีการเทน้ำจากบิกเกอร์ จากนั้นวางทิ้งไว้จนแห้ง เติม 0.1M NaOH ปริมาตร 300 µl เพื่อละลายโปรตีนและปล่อยสี แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง micro plate reader (Biotek) ที่ 490 nm นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟ โดยให้แกน X แทน log ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อ *G. intestinalis* หน่วย cell/ml, แกน Y แทน ค่า OD 490 nm ในแต่ละการทดลองจะทำ 3 ครั้ง

2.2.5.2 การล้างและไม่ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกก่อนการ fix เชื้อ

จากการทดลองที่ 2.2.5.1 พบว่าในการทดลองแต่ละครั้งค่า OD ที่ได้ไม่สูงมากนัก และเมื่อจำนวนเชื้อเริ่มต้นเพิ่มขึ้นก็ไม่เห็นความแตกต่างของค่า OD อย่างชัดเจน รวมทั้งได้ค่า standard error of mean (SE) ค่อนข้างกว้าง (0.01-0.11) และเมื่อนำ plate มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted microscope พบว่ามีเชื้อหลุดออกจากการยึดเกาะไปเป็นจำนวนมาก ในการทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการล้างกับไม่ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกก่อนการ fix เชื้อว่าผลที่ได้ต่างกันหรือไม่ โดยทำการเลี้ยง *G. intestinalis* ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน tissue culture plate (เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.2.5.1) บ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ โดยทำเวลาละ 2 plate เมื่อครบแต่ละเวลานำ plate แรกมาเทอาหารออกและล้างเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.2.5.1 ในขณะที่ plate ที่ 2 เมื่อเทอาหารออกแล้วก็ fix ด้วย methanol ทันที แล้วย้อมด้วยสี eosin ตามขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 2.2.5.1 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเขียนกราฟเปรียบเทียบระหว่าง plate ที่ล้างและไม่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ก่อนการ fix ด้วย methanol แต่ละการทดลองจะทำ 3 ครั้ง

2.2.5.3 วิธีการล้าง plate ก่อนการ fix เชื้อและหลังการย้อมสี

จากการทดลองที่ 2.2.5.1 และ 2.2.5.2 พบว่าวิธีการล้าง plate หรือการ fix เชื้อและล้างสีออกโดยวิธีการเทสารละลายโซเดียมคลอไรด์หรือ methanol หรือน้ำจากบิกเกอร์ลงใน plate นั้น คาดว่าบางครั้งความหนักเบาของการเท และอุณหภูมิสารละลายที่เทลงไปใน plate อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการหลุดของเชื้อเพิ่มขึ้นได้ การทดลองนี้จึงได้ศึกษาเปรียบเทียบ

ระหว่างวิธีการเท methanol หรือน้ำลงไปใน plate กับการแช่ plate ลงไปใน methanol หรือน้ำที่ใช้ล้าง ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยทำการเลี้ยง *G. intestinalis* ใน tissue culture plate เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ย้อมเชื้อด้วยสี eosin และล้างสีออกเหมือนกับข้อที่ 2.2.5.1 เพียงแต่เปลี่ยนจากวิธีการเทสารละลายจากบิกเกอร์ลงใน plate เป็นการแช่ plate ลงในสารละลายแทน

2.2.6 เปรียบเทียบการใช้สี eosin, crystal violet และ methylene blue ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันในการย้อมเชื้อ *Giardia intestinalis*

การทดลองนี้เพื่อศึกษาว่าชนิดและความเข้มข้นของสีรวมทั้งวิธีการล้างสีออกหลังการย้อมด้วยการเท methanol และน้ำลงใน plate โดยตรงกับวิธีแช่ plate ลงใน methanol และน้ำมีผลต่อค่า OD จากแต่ละสีหรือไม่ โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *G. intestinalis* ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^6 cell/ml นำไปบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (จากผลการทดลองที่ 2.2.5.2) เมื่อครบเวลาเทอาหารออก ย้อมเชื้อด้วยสี eosin, crystal violet และ methylene blue ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ด้วยวิธีการเท methanol และน้ำจากบิกเกอร์ลง plate โดยตรงเปรียบเทียบกับการแช่ plate ลงใน methanol และน้ำโดยในแต่ละการทดลองทำ 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ซ้ำ

วิธีการย้อมสี eosin (ดัดแปลงจาก Maurya *et al*., 2006) ใช้สีความเข้มข้น 0.5, 0.25 และ 0.1% ปริมาตร 300 µl ลงในแต่ละหลุมทิ้งไว้นาน 15 นาที เทสีออก ล้างด้วยน้ำก๊อก 1 ครั้งและล้างน้ำกลั่น 2 ครั้ง วางทิ้งไว้จนแห้ง เติม 0.1M NaOH ปริมาตร 300 µl เพื่อละลายโปรตีนและปล่อยสี แล้วนำไปวัดค่า OD ที่ 490 nm

วิธีการย้อมสี crystal violet (ดัดแปลงจาก Chiba *et al*., 1998; De Saint Jean *et al*., 1999) ใช้สีความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.2% ใน methanol 300 µl ลงในแต่ละหลุมทิ้งไว้นาน 30 นาที เทสีออก ล้างด้วยน้ำก๊อก 1 ครั้งและน้ำกลั่น 2 ครั้ง วางทิ้งไว้จนแห้ง เติม 2% สารละลาย Sodium dodexyl sulphate ปริมาตร 300 µl เพื่อละลายโปรตีนและปล่อยสี แล้วนำไปวัดค่า OD ที่ 590 nm

วิธีการย้อมสี methylene blue (ดัดแปลงจาก Busatti and Gomes, 2007) ใช้สีความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.2% ใน phosphate buffer saline (pH 7.2) ลงในแต่ละหลุมทิ้งไว้นาน 10 นาที เทสีออก ล้างด้วยน้ำก๊อก 1 ครั้งและล้างน้ำกลั่น 2 ครั้ง วางทิ้งไว้จนแห้ง เติม 0.1M HCl ปริมาตร 300 µl เพื่อละลายโปรตีนและปล่อยสี แล้วนำไปวัดค่า OD ที่ 655 nm

2.2.7 การหาจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม โดยใช้วิธีย้อมเชื้อด้วยสี methylene blue

จากการทดลองตั้งแต่ข้อ 2.2.5.1 ถึงข้อ 2.2.6 พบว่าการ fix เชื้อโดยไม่ต้องล้างอาหารออกก่อน, การบ่มเชื้อที่ 48 ชั่วโมง, วิธีการล้าง plate โดยการแช่ plate ในสารละลาย

โดยตรง รวมทั้งการย้อมเชื้อด้วยสี methylene blue ให้ผลการประเมินจำนวนเชื้อ *G. intestinalis* ที่ดีที่สุด การทดลองนี้จึงทำการศึกษาหาจำนวนเชื้อเริ่มต้นและความเข้มข้นของสี methylene blue ที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของยาและสารสกัดสมุนไพร โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *G. intestinalis* ใน tissue culture plate เหมือนกับข้อ 2.2.5.1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้อมด้วยสี methylene blue ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2% ตามวิธีของข้อ 2.2.6 วัดค่า OD ที่ 655 nm หาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเชื้อและสีกับค่า OD

2.2.8 การประยุกต์ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของยาและสารสกัดสมุนไพร

2.2.8.1 การประเมินผลของยา metronidazole, ornidazole และ furazolidone ต่อการเจริญของเชื้อ *Giardia intestinalis*

จากผลการทดลองที่ 2.2.7 ได้นำมาใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของยา 3 ตัว เปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้กันอยู่ทั่วไปคือการนับเชื้อตัวเป็นที่เหลือรอดอยู่หลังสัมผัสยา ทำโดยบ่มเชื้อที่ความเข้มข้น 5×10^5 cell/ml กับยา metronidazole, ornidazole และ furazolidone ที่ความเข้มข้น 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.078125 µg/ml โดยเตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เตรียมหลุม blank โดยใส่อาหารในหลุม 1A-1H ปริมาตร 300 µl และหลุม positive control ใส่เชื้อความเข้มข้น 5×10^5 cell/ml โดยไม่มียา ในหลุม 2A-2H (เตรียมเช่นนี้ 2 plate) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลา นำ plate ที่ 1 แช่ส่วนกัน plate ในอ่างน้ำแข็ง 15-20 นาที เพื่อให้เชื้อหลุดจากการยึดเกาะกับ plate เติมสี trypan blue (0.04%) 20 µl ลงในหลุมที่ทดสอบ ดูดเชื้อใส่ใน haemocytometer แล้วเลือกนับเฉพาะเซลล์ที่มีชีวิต (ไม่ติดสี) อีก 1 plate นำไปย้อมด้วยสี methylene blue ความเข้มข้น 0.1% (เหมือนข้อ 2.2.7) จากนั้นนำไปวัดค่า OD ที่ 655 nm ทำการทดลอง 3 ครั้ง และหาค่า MIC จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยากับค่า OD จากนั้นนำผลที่ได้จากวิธีการย้อมและการนับมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ 50% (IC_{50}) และ 90% (IC_{90}) ตามลำดับ ดังนี้

วิธีการนับจำนวนเชื้อคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมที่ไม่มียา โดยใช้สูตร

$$\left[\frac{\text{จำนวนเชื้อจากกลุ่มควบคุม—จำนวนเชื้อที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกับยา}}{\text{จำนวนเชื้อจากกลุ่มควบคุม}}\right] \times 100$$

วิธีการวัด OD คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมที่ไม่มียา โดยใช้สูตร (Mukhopadhyay and Chaudhri, 1996)

$$\left[\frac{\text{Control } OD_{655} - \text{Test } OD_{655}}{\text{Control } OD_{655}} \right] \times 100$$

นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ได้มาแปลงเป็นค่า probit เขียนกราฟ โดยให้แกน Y แทนค่า probit และแกน X แทน log ความเข้มข้นของยา หน่วยเป็น µg/ml คำนวณค่า IC_{50} และ IC_{90} จากสมการเส้นตรงของเส้นกราฟ

2.2.8.2 การประเมินผลสารสกัดหยาบจากสมุนไพรและสารสกัดบริสุทธิ์จากต้นกะออก

จากผลการทดลองข้อ 2.2.8.1 พบว่าสามารถนำวิธีการย้อมเชื้อมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบผลของยามาตรฐานได้ จึงนำมาใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ที่สกัดจากสมุนไพรว่ามีข้อจำกัดในการใช้วิธีการนี้หรือไม่ โดยทำการทดลองเหมือนกับข้อ 2.2.8.1 ใช้สารสกัดบริสุทธิ์และสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นระหว่าง 3.125 - 400และ 7.8125 - 1,000 µg/ml ตามลำดับ และใช้ยา metronidazole ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.078125 - 10 µg/ml เป็นตัวควบคุม เมื่อครบเวลานำมาย้อมด้วยสี methylene blue และหาค่า MIC จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับค่า OD โดยถ้าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์มีค่า MIC มากกว่า 1000 และ 400 µg/ml จะไม่นำมาคิดค่า probit จากนั้นนำค่า OD ที่ได้มาคำนวณหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ 50% (IC_{50}) และ 90% (IC_{90}) และอ่านค่า MIC จากการให้คะแนน 1+ จนถึง 4+ โดยดูลักษณะของเชื้อ (Upcroft and Upcroft, 2001) ว่าต่างกันหรือไม่ บันทึกผลดังนี้

1+ เชื้อตายมากกว่า 90%

2+ 20-50% ของเซลล์มีลักษณะปกติ บางเซลล์มีการเคลื่อนที่

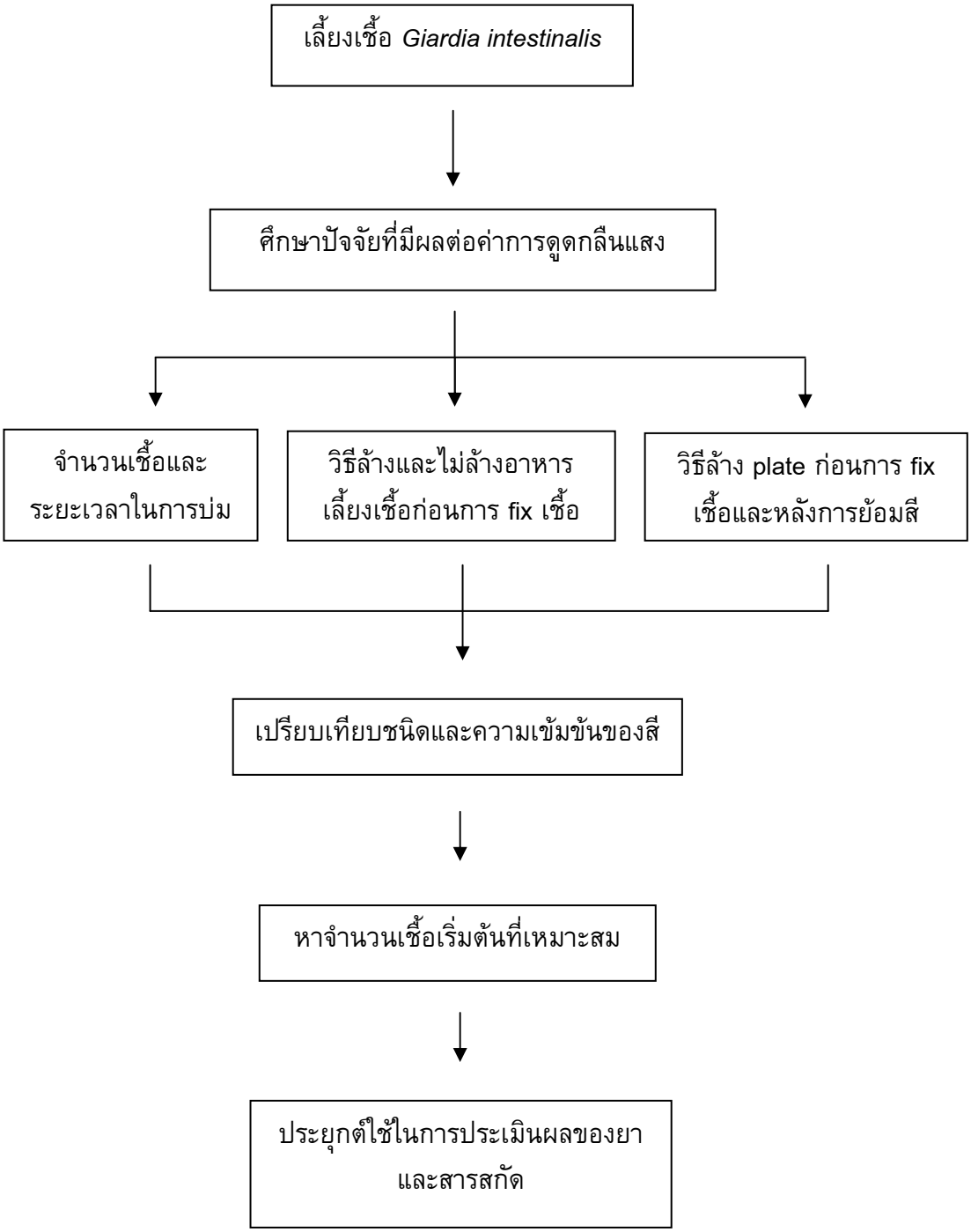
3+ เชื้อเจริญใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม

4+ กลุ่มควบคุม

2.2.9 วิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้ค่าทางสถิติ (t-test และ ANOVA) เพื่อประเมินความแตกต่างระหว่างกลุ่มและหาความแปรปรวนของกลุ่มการทดลอง

แผนผังขั้นตอนการทดลอง



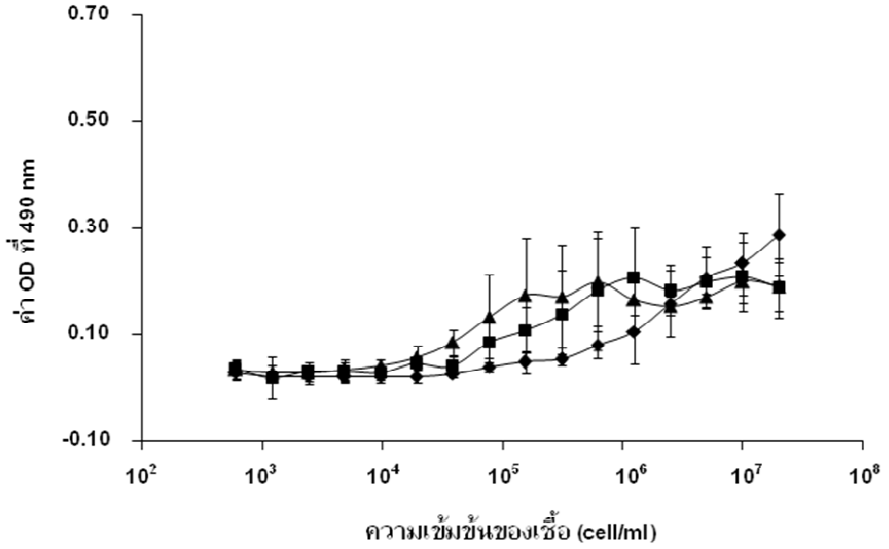
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสง

3.1.1 จำนวนเชื้อเริ่มต้นและระยะเวลาในการบ่มเชื้อ

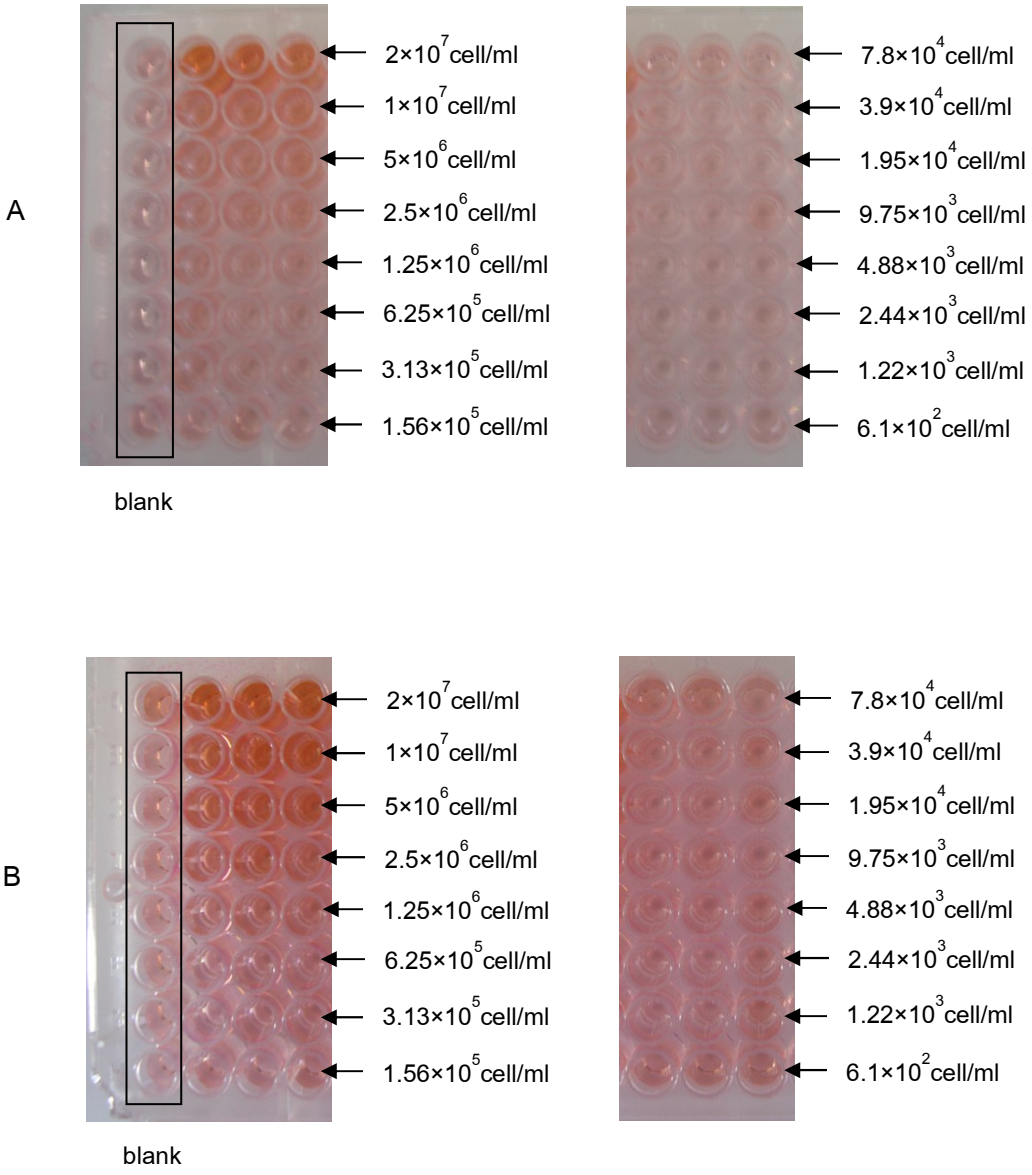
รูปที่ 6 แสดงค่า OD±SE ที่วัดได้จากการเลี้ยงเชื้อ *G. intestinalis* ระยะโทรโฟซอยต์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ล้างอาหารออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์และ fix เชื้อด้วย methanol แล้วนำมาย้อมด้วยสี eosin 0.5% ใช้วิธีการล้าง plate โดยเทสารละลายจากบิกเกอร์ลงใน plate โดยตรง พบว่าเริ่มเห็นความแตกต่างของค่า OD เมื่อความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นมากกว่า 10^5 cell/ml เมื่อนำ tissue culture plate มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted microscope หลังจากย้อมด้วยสี eosin แล้ว พบว่ามีเชื้อหลุดออกจากการยึดเกาะไปเป็นจำนวนมาก จากการวิเคราะห์ด้วย two-way ANOVA พบว่า ความเข้มข้นของเชื้อมีผลต่อค่า OD อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่เวลาในการบ่มเชื้อที่ต่างกันไม่มีผลต่อค่า OD อย่างมีนัยสำคัญ



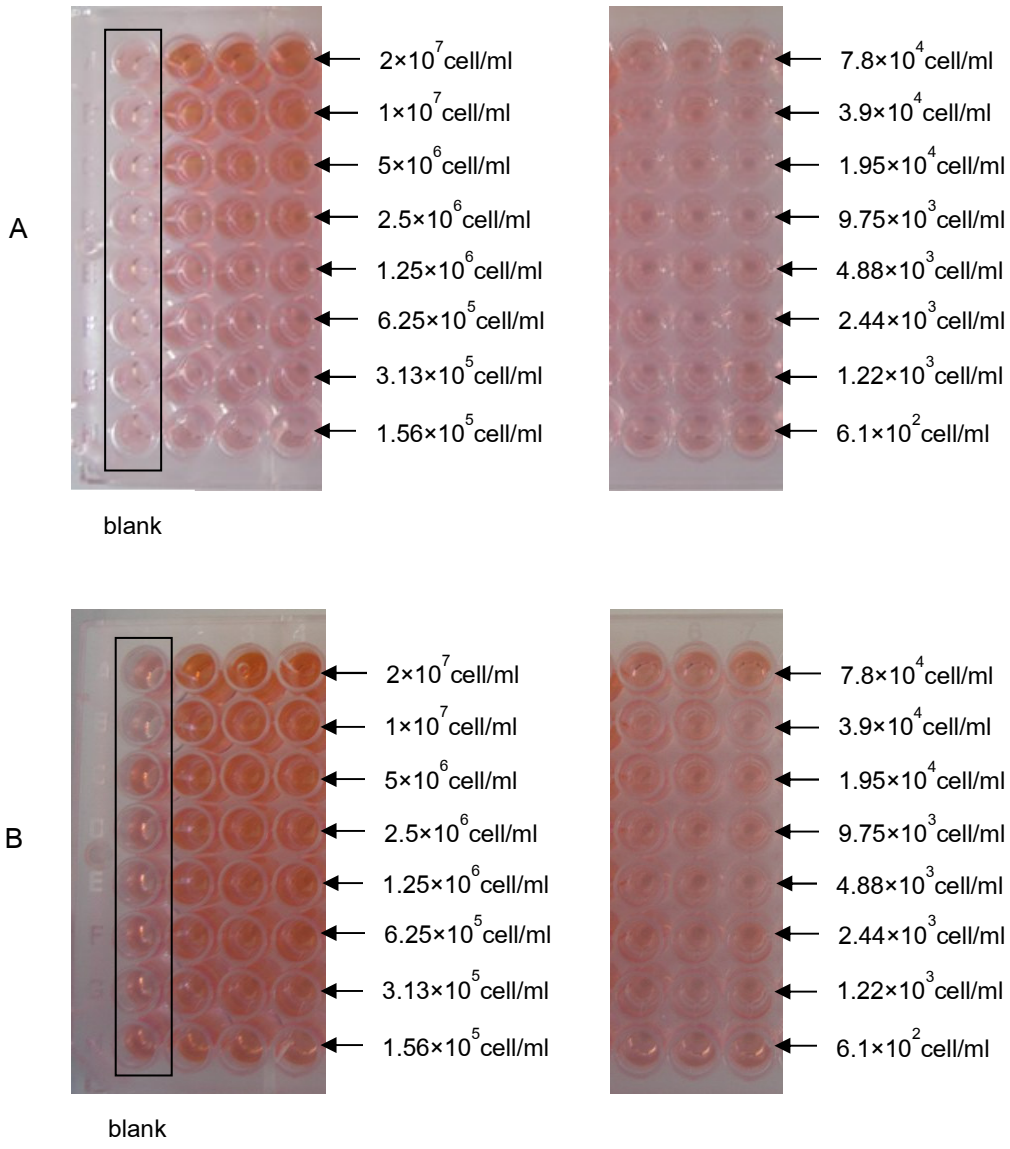
รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD±SE กับความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อ *G. intestinalis* บ่มเป็นเวลา 24 (♦), 48 (■) และ 72 (▲) ชั่วโมงของการทดลอง 3 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ หลังบ่มล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ fix ด้วย methanol และย้อมด้วยสี eosin 0.5% การเติมสารละลายลงใน plate ทำโดยการเทจากบิกเกอร์

3.1.2 ผลของการล้างและไม่ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกก่อนการ fix เชื้อ

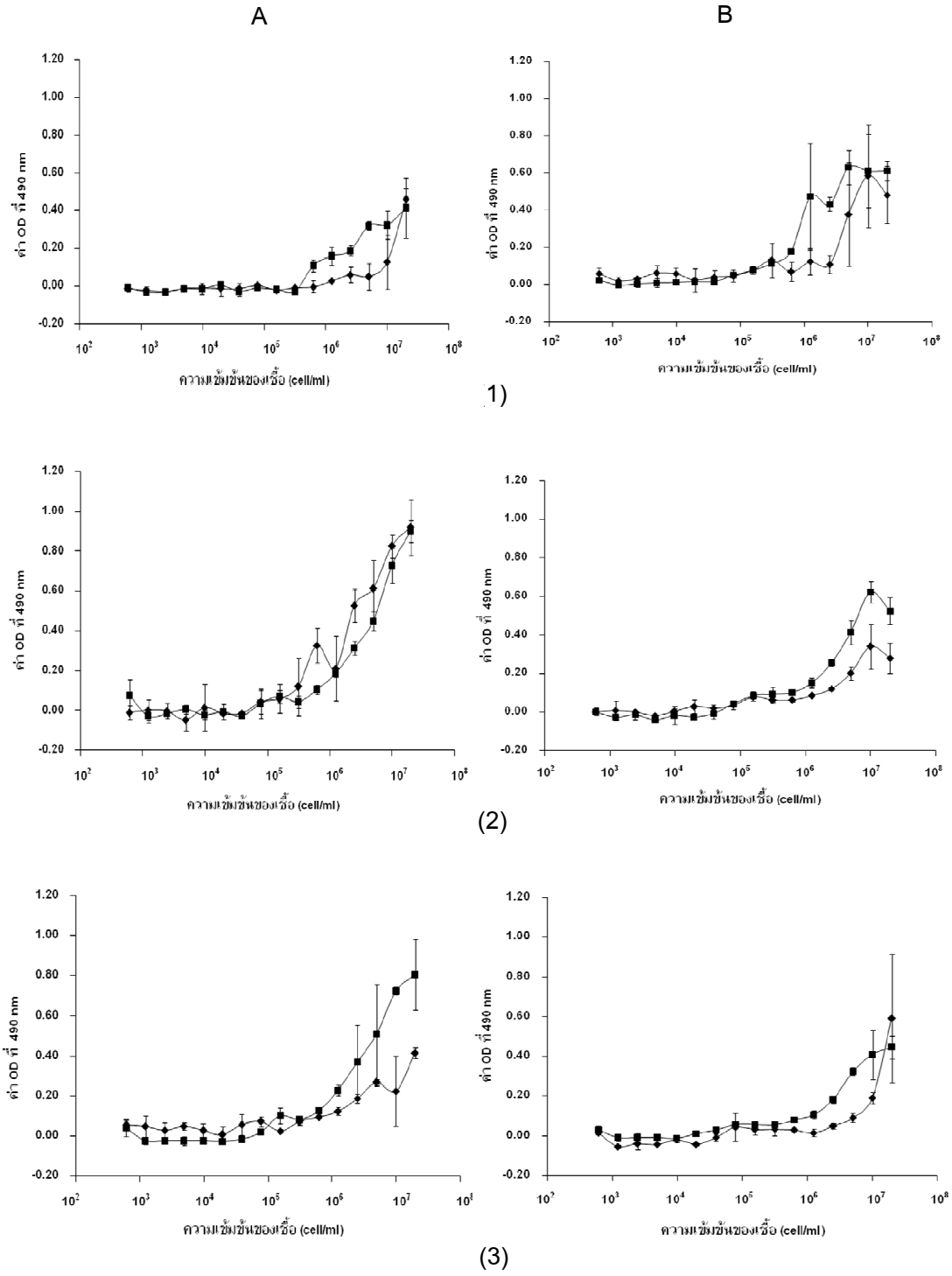
เมื่อเปรียบเทียบวิธีการล้างอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยการ fix เชื้อด้วย methanol หลังการบ่มที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยไม่ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกก่อนเปรียบเทียบกับการทดลองข้อ 2.2.5.1 ย้อมด้วยสี eosin พบว่า plate ที่ไม่ล้างมีการติดสีเข้มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 7 และ 8 ตามลำดับ) สำหรับค่า OD จากแต่ละการทดลองได้แสดงในรูปที่ 9 พบว่าวิธีการ fix เชื้อทันทีจะให้ค่า OD สูงกว่าวิธีการล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกก่อนและมีจำนวนเชื้อที่ยึดเกาะในหลุมของ plate สม่ำเสมอมากกว่าดังแสดงในรูปที่ 10 และ 11 จากการวิเคราะห์ด้วย t-test ของค่าเฉลี่ย OD ทั้ง 3 ครั้ง พบว่าที่การบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่า OD ที่ได้ระหว่างวิธีล้างกับไม่ล้าง plate ไม่มีความแตกต่างกันแต่ในการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง การ fix เชื้อหลังเทอาหารออกทันที ได้ค่า OD ที่สูงกว่าการล้างอาหารออกก่อนอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 9B) จึงเลือกการบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และวิธีการ fix เชื้อด้วย methanol ทันทีหลังจากเทอาหารออก



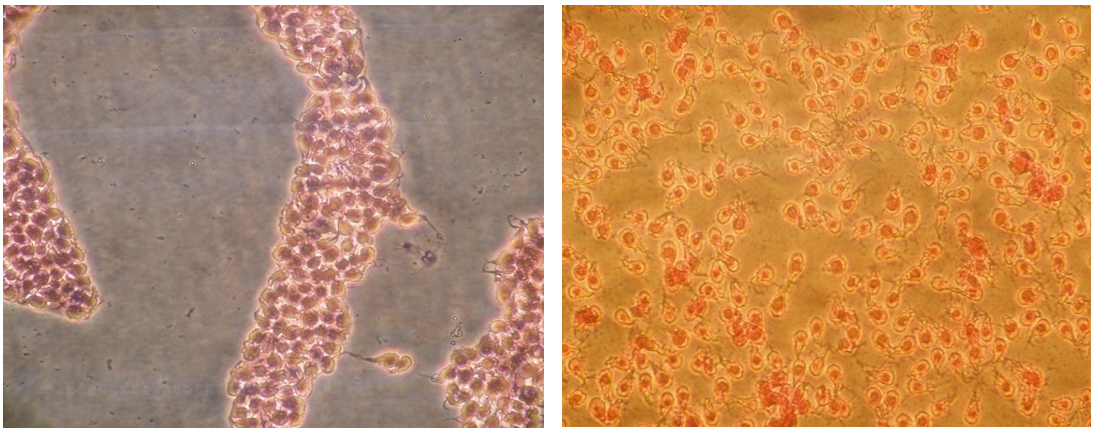
รูปที่ 7 ตัวอย่างการติดสี eosin 0.5% ของเชื้อ *G. intestinalis* ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน plate ที่ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกก่อนการ fix เชื้อด้วย methanol (A) และ plate ที่ fix ด้วย methanol ทันทีหลังเทอาหารเลี้ยงเชื้อออก (B)



รูปที่ 8 ตัวอย่างการติดสี eosin 0.5% ของเชื้อ *G. intestinalis* ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน plate ที่ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกก่อนการ fix เชื้อด้วย methanol (A) และ plate ที่ fix ด้วย methanol ทันทีหลังเทอาหารเลี้ยงเชื้อออก (B)

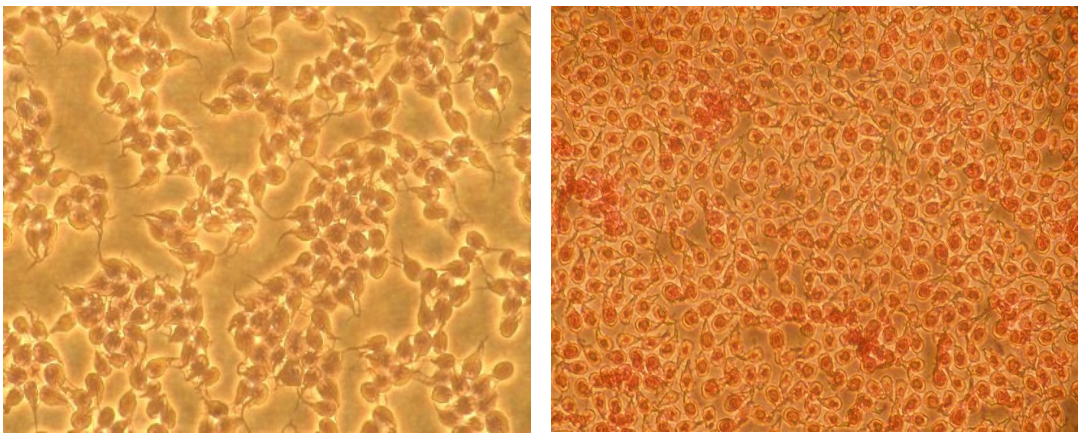


รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD±SD กับความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อ *G. intestinalis* บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) และ 48 ชั่วโมง (B) จากการทดลอง 3 ครั้ง (1, 2, 3) ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (♦) กับไม่ล้าง (■) fix ด้วย methanol และย้อมด้วยสี eosin 0.5% การเติมสารละลายลงใน plate ทำโดยการเทจากบิกเกอร์



A B

รูปที่ 10 ตัวอย่างของเชื้อที่เกาะในหลุมหลังย้อมด้วยสี eosin 0.5% เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง plate ที่ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกก่อนการ fix เชื้อด้วย methanol (A) และ plate ที่ fix ด้วย methanol ทันทีหลังเทอาหารเลี้ยงเชื้อออก (B) ที่กำลังขยาย 40x

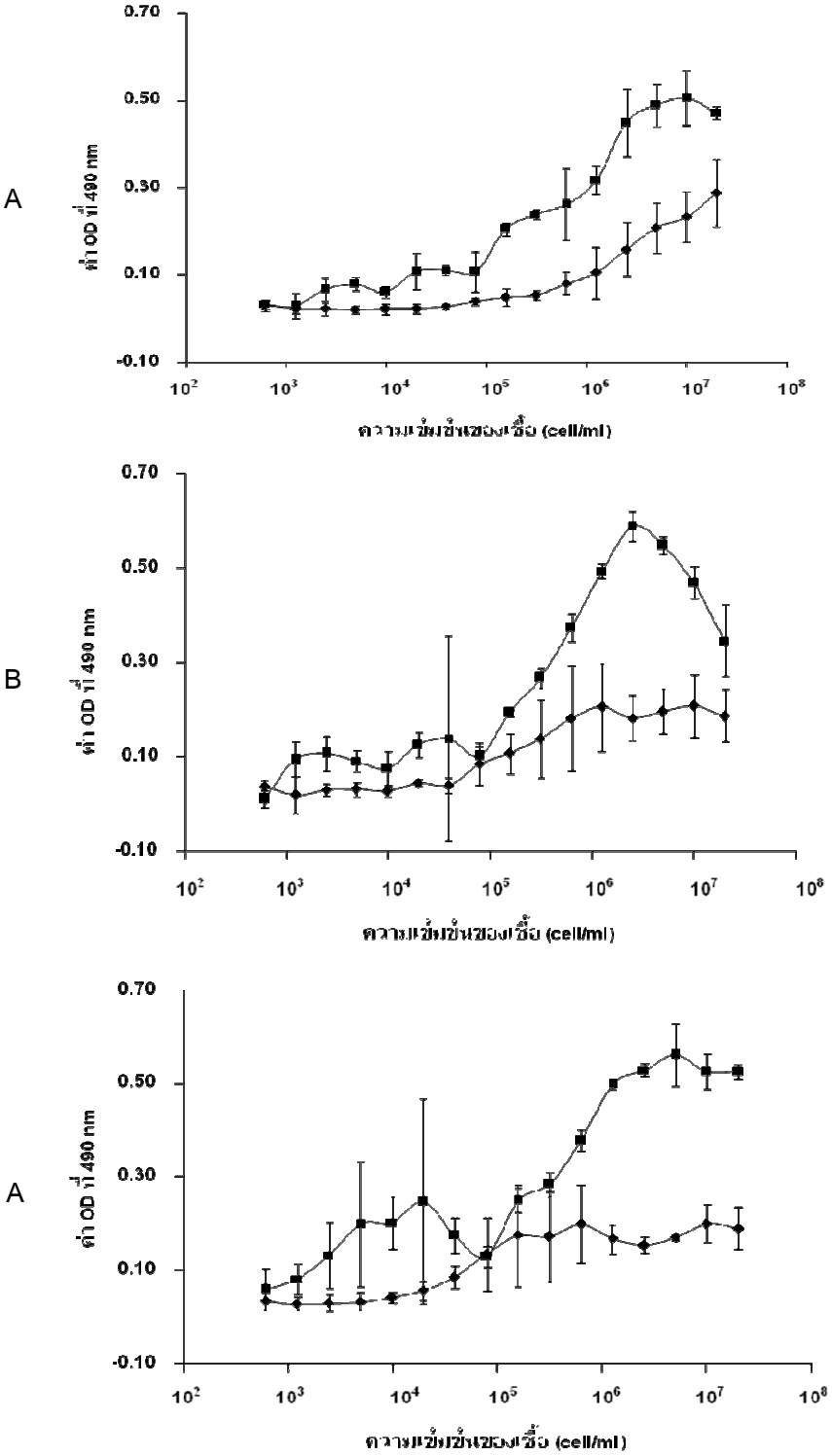


A B

รูปที่ 11 ตัวอย่างของเชื้อที่เกาะในหลุมหลังย้อมด้วยสี eosin 0.5% เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง plate ที่ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกก่อนการ fix เชื้อด้วย methanol (A) และ plate ที่ fix ด้วย methanol ทันทีหลังเทอาหารเลี้ยงเชื้อออก (B) ที่กำลังขยาย 40x

3.1.3 ผลของวิธีการล้าง plate ก่อนการ fix เชื้อและหลังการย้อมสี

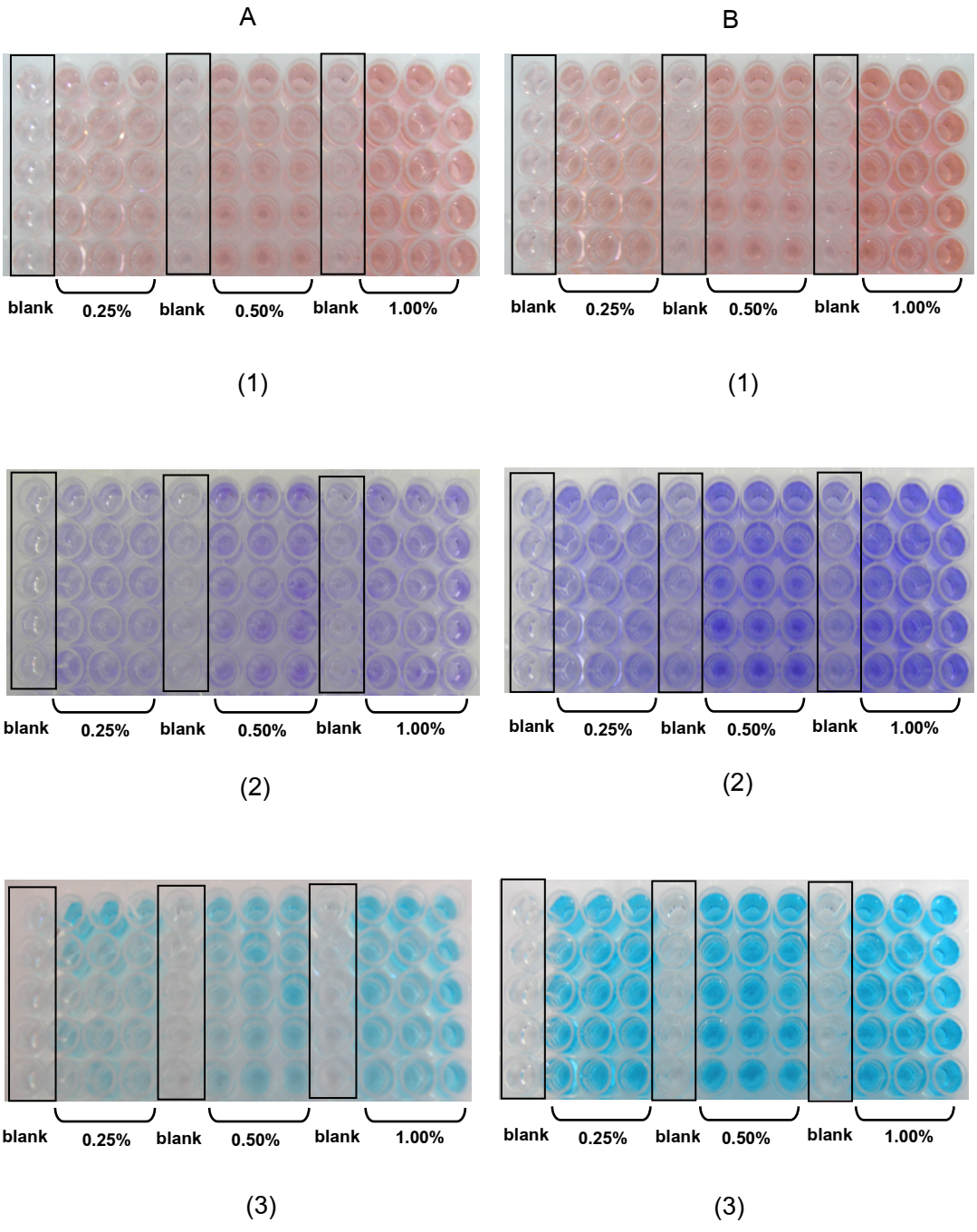
รูปที่ 12 แสดงค่า OD±SE ของเชื้อ *G. intestinalis* ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ จากวิธีการล้างในทุกขั้นตอนโดยใช้วิธีแช่ plate ลงในสารละลายเปรียบเทียบกับวิธีการล้างโดยเทสารละลายจากบิกเกอร์ในการทดลองที่ 2.2.5.1 เมื่อวิเคราะห์ด้วย t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันที่การบ่ม 24 ชั่วโมงในทุกความเข้มข้นของเชื้อ แต่วิธีการแช่ plate ในสารละลายให้ค่า OD ที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ที่ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 2.5×10^6 cell/ml เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ 5×10^6 กับ 2.5×10^6 cell/ml เมื่อบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่าเชื้อที่ความเข้มข้นระหว่าง 2.4×10^3-7.8×10^4 cell/ml เมื่อบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีการเจริญมากกว่าการบ่มที่เวลาอื่น จึงเลือกเชื้อความเข้มข้น 10^6 cell/ml และบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อนำไปศึกษาชนิดของสีที่ใช้ย้อมตัวเชื้อ



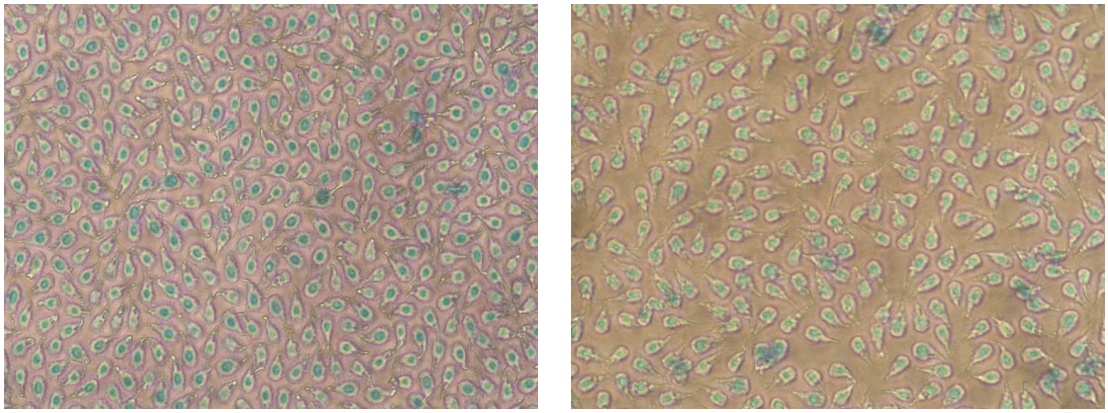
รูปที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD±SE กับความเข้มข้นเริ่มต้นของ *G. intestinalis* บ่มเป็นเวลา 24 (A), 48 (B) และ 72 (C) ชั่วโมง ล้างด้วยวิธีการเทจากบิกเกอร์ (♦) และวิธีการแช่ plate (■) ในทุกขั้นตอนและย้อมด้วยสี eosin 0.5%

3.2 ผลการเปรียบเทียบการใช้สี eosin, crystal violet และ methylene blue ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันในการย้อมสี *Giardia intestinalis*

ผลจากการย้อมเชื้อความเข้มข้นเริ่มต้น 10^6 cell/ml บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยสี eosin (0.25, 0.5 และ 1.0%), crystal violet (0.05, 0.1 และ 0.2%) และ methylene blue (0.05, 0.1 และ 0.2%) fix และล้างสีโดยใช้วิธีเท methanol และน้ำจากบิกเกอร์ลงใน plate เปรียบเทียบกับการแช่ plate ลงใน methanol และน้ำ ได้แสดงในรูปที่ 13A และ 13B ตามลำดับ พบว่าวิธีการแช่ plate ลงใน methanol และน้ำมีการติดสีในแต่ละสีชัดเจนกว่าวิธีเทจากบิกเกอร์อย่างเห็นได้ชัดเจน (รูปที่ 13B) และเมื่อนำมาส่องดูกล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted microscope พบว่าเชื้อมีการเกาะติดกับ plate มากกว่าวิธีการเท methanol และน้ำจากบิกเกอร์ลงใน plate (รูปที่ 14) สำหรับค่า OD ที่ได้จากทั้ง 2 วิธีได้แสดงในรูปที่ 15 พบว่าการย้อมเชื้อด้วยวิธีแช่ plate ของสีทั้ง 3 สีจะให้ค่า OD ที่สูงขึ้น จากการวิเคราะห์ด้วย t-test ของสีทั้ง 3 สี ระหว่างวิธีเทกับวิธีแช่ plate พบว่าสี eosin ทั้ง 3 ความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนสี crystal violet ที่ความเข้มข้น 0.05 กับ 0.1% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่ความเข้มข้น 0.2% วิธีแช่ plate ให้ค่า OD สูงกว่าวิธีเทอย่างมีนัยสำคัญและสี methylene blue ที่ความเข้มข้น 0.05 กับ 0.1% ของวิธีแช่ให้ค่า OD สูงกว่าวิธีเทอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่ที่ความเข้มข้น 0.2% ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกวิธีการล้างโดยวิธีแช่ plate และเลือกสี methylene blue เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนน้อยกว่าสี crystal violet จากการวิเคราะห์ด้วย one way ANOVA ของสี methylene blue ทั้ง 3 ความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 13 ตัวอย่างการติดสีของเชื้อ *G. intestinalis* เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ล้างด้วยวิธีการเท methanol จากบิกเกอร์ (A) และวิธีการแช่ plate ลงใน methanol (B) ในทุกขั้นตอนเมื่อย้อมด้วยสี eosin (1), crystal violet (2) และ methylene blue (3) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

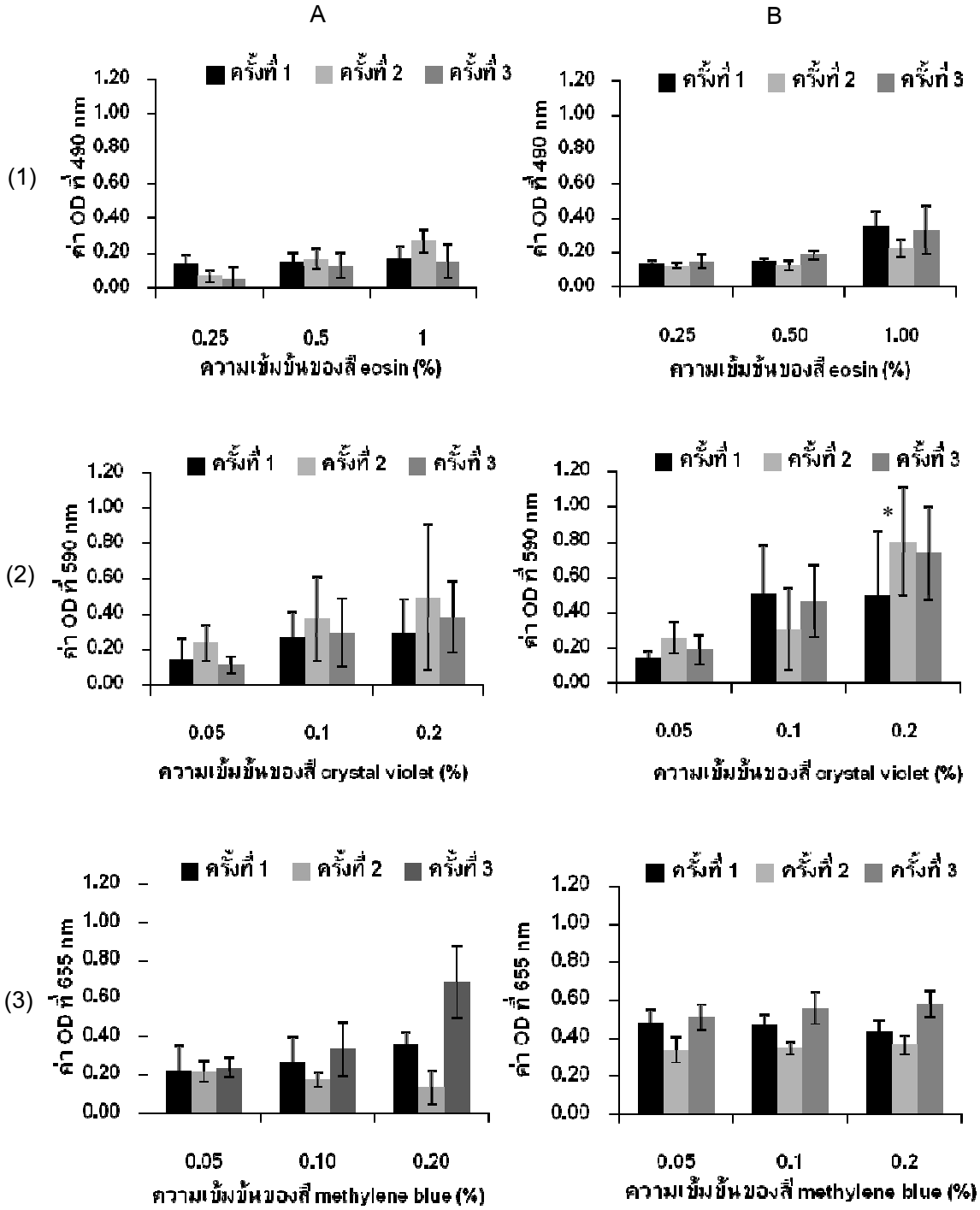


A B

รูปที่ 14 ตัวอย่างเชื้อ *Giardia intestinalis* ที่ย้อมด้วยสี methylene blue ความเข้มข้น 0.1% ที่กำลังขยาย 40x

A. ลักษณะเชื้อ *G. intestinalis* ที่ย้อมด้วยสี methylene blue ความเข้มข้น 0.1% โดยวิธีการล้าง plate ด้วยวิธีแช่ plate ในขั้นตอนการ fix และล้างสี

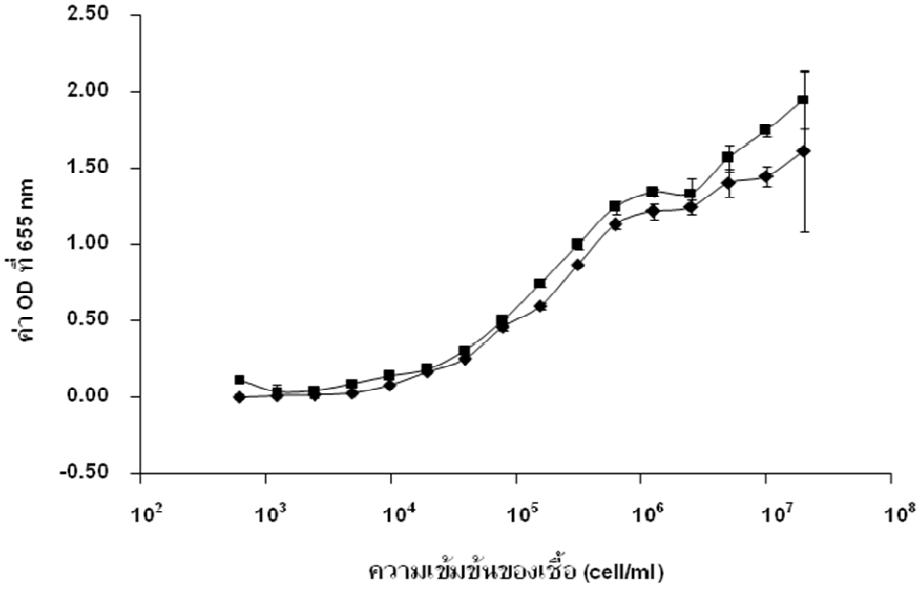
B. ลักษณะเชื้อ *G. intestinalis* ที่ย้อมด้วยสี methylene blue ความเข้มข้น 0.1% โดยวิธีการล้าง plate ด้วยวิธีเทจากบิกเกอร์ลงใน plate ในขั้นตอนการ fix และล้างสี



รูปที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD±SD กับสี eosin (1), crystal violet (2) และ methylene blue (3) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ได้จากการล้างด้วยวิธีการเท methanol และน้ำจากบิกเกอร์ (A) และวิธีการแช่ plate ลงใน methanol และน้ำ (B) ในทุกขั้นตอน จากการทดลอง 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ซ้ำ (*$p<0.05$)

3.3 ผลของการหาจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม โดยใช้วิธีย้อมเชื้อด้วยสี methylene blue

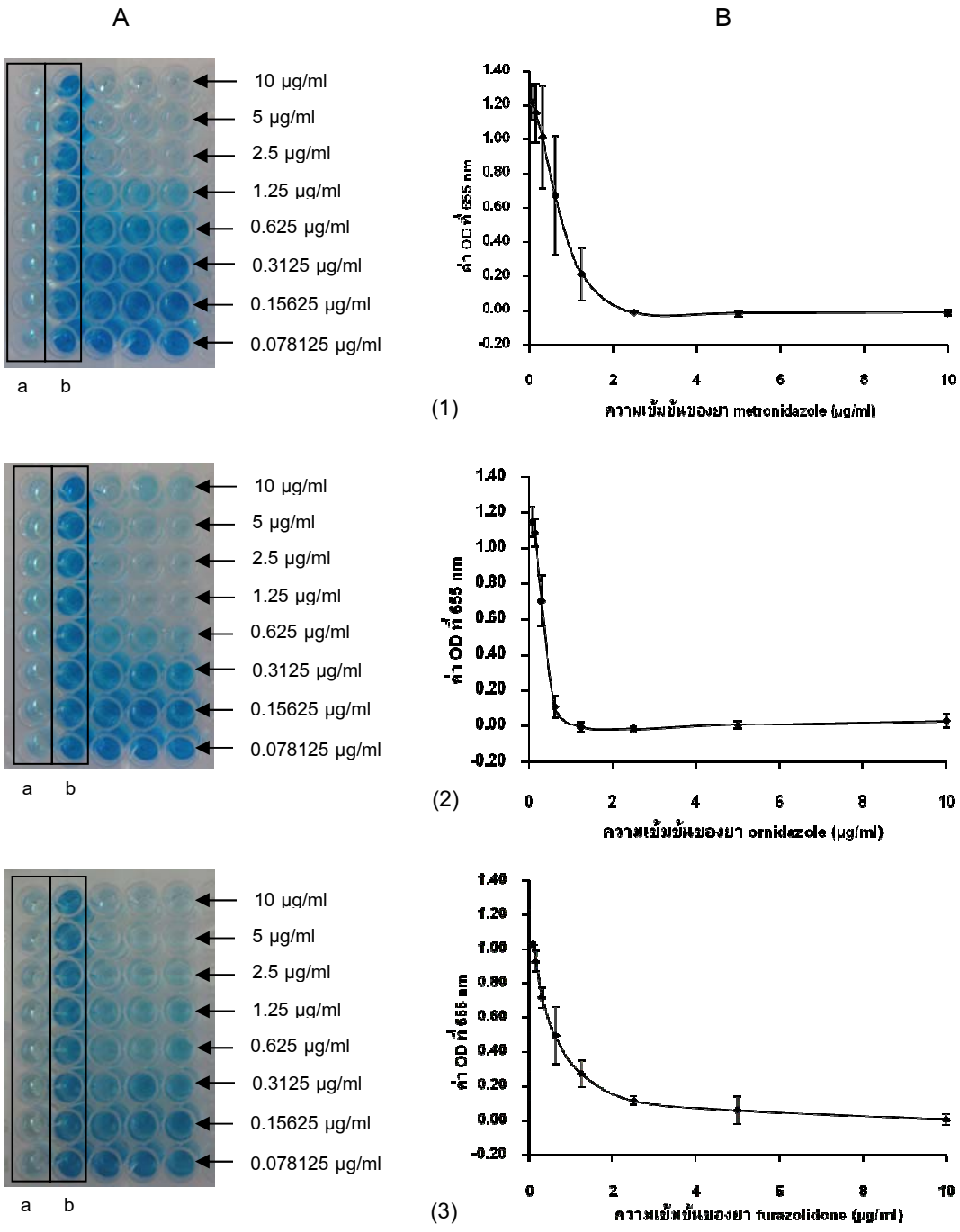
รูปที่ 16 แสดงค่า OD±SE ที่วัดได้จากการย้อมเชื้อที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยสี methylene blue ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2% โดยใช้วิธีการที่ได้จากการทดลองที่ 3.2 พบว่าค่า OD จะแปรผันตรงตามความเข้มข้นของเชื้อที่มากขึ้น โดยเริ่มเห็นการเพิ่มของค่า OD ตั้งแต่เชื้อที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3.9×10^{4} cell/ml เมื่อวิเคราะห์ด้วย t-test พบว่าการย้อม *G. intestinalis* ด้วยสี methylene blue ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2% ให้ผลในการอ่านค่า OD ไม่แตกต่างกัน เชื้อที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 6.25×10^{5} cell/ml ให้ค่า OD สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับเชื้อที่ความเข้มข้น 3.9×10^{4} cell/ml จึงเลือกสี methylene blue ที่ความเข้มข้น 0.1% และใช้เชื้อที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5×10^{5} cell/ml ไปใช้ในการประเมินผลของยามาตรฐาน 3 ตัว คือ metronidazole, ornidazole และ furazolidone ต่อไป



รูปที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD±SE กับความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อ *G. intestinalis* บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง fix โดยไม่ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออก ย้อมด้วยสี methylene blue 0.1% (♦) และ 0.2% (■) โดยใช้วิธีแช่ plate ในสารละลายในขั้นตอนการ fix และล้างสีออกจากการทดลอง 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ

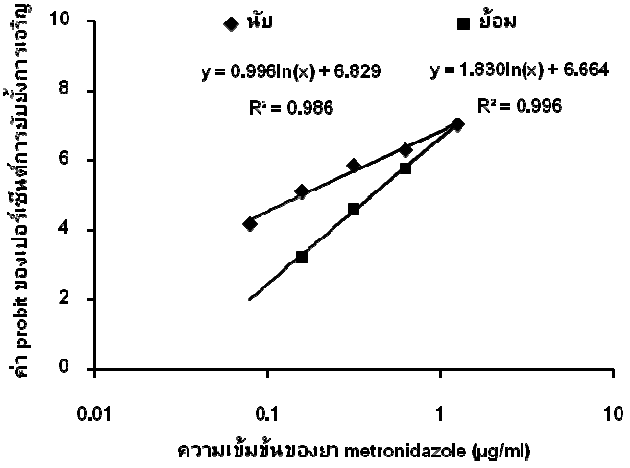
3.4 ผลของยามาตรฐาน metronidazole, ornidazole และ furazolidone ต่อการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis*

เมื่อทดสอบเชื้อความเข้มข้น 5×10^5 cell/ml ด้วยยา metronidazole, ornidazole และ furazolidone ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.078125 - 10 µg/ml บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านผลเปรียบเทียบระหว่างวิธีการนับเชื้อตัวเป็นกับวิธีการย้อมเชื้อด้วยสี methylene blue 0.1% แล้วอ่านค่า OD พบว่าหลุมที่ทดสอบด้วยยาที่มีความเข้มข้นมากเมื่อทำการย้อมด้วยสี methylene blue สีที่ได้จะมีความเข้มน้อย ส่วนหลุมที่ทดสอบด้วยยาที่ความเข้มข้นน้อยสีที่ได้จะมีความเข้มมาก (รูปที่ 17) ซึ่งเป็นไปตามจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกับยา เมื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ได้จากการนับเชื้อที่รอดชีวิตหลังทดสอบกับยา และที่ได้จากการวัด OD ไปแปลงเป็นค่า probit และเขียนกราฟระหว่างค่า probit กับ log ความเข้มข้นของยา และหาสมการเส้นตรง ได้แสดงในรูปที่ 18, 19 และ 20 ตามลำดับ ค่า MIC ของยา metronidazole ornidazole และ furazolidone ที่ได้จากการวัดค่า OD แสดงในตารางที่ 3 โดยมีค่าเท่ากับ 2.50, 1.25 และ 5-10 µg/ml ตามลำดับ การคำนวณค่า IC_{50} และ IC_{90} ของยาทั้ง 3 ตัวที่ได้จากทั้ง 2 วิธีจากสมการเส้นตรงที่ได้ แสดงในตารางที่ 4 โดยค่า IC_{50} ที่ได้จากวิธีนับเชื้อตัวเป็นของยา metronidazole ornidazole และ furazolidone เท่ากับ 0.14±0.05, 0.15±0.04, 0.14±0.02 µg/ml และจากวิธีย้อมเท่ากับ 0.41±0.06, 0.18±0.01, 0.26±0.13 µg/ml ตามลำดับ ส่วนค่า IC_{90} ที่ได้จากวิธีนับเชื้อตัวเป็นของยา metronidazole ornidazole และ furazolidone เท่ากับ 0.55±0.09, 0.42±0.06, 0.57±0.13 µg/ml และจากวิธีย้อมเท่ากับ 0.86±0.04, 0.34±0.02, 0.98±0.32 µg/ml ตามลำดับ

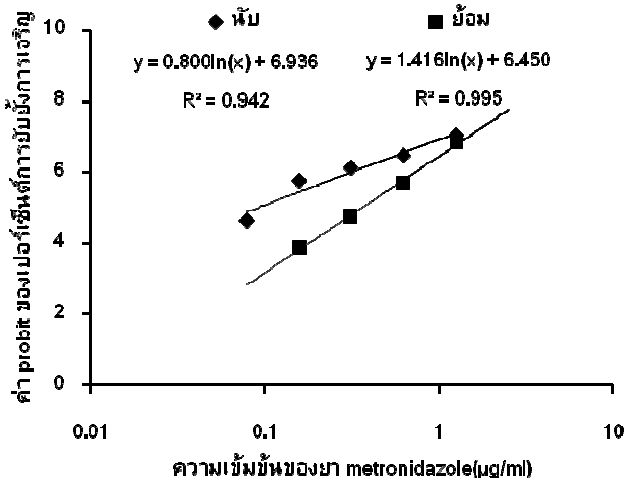


รูปที่ 17 (A) ตัวอย่างการติดสี methylene blue ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และ (B) ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD±SE กับความเข้มข้นของยา metronidazole (1), ornidazole (2) และ furazolidone (3) เมื่อบ่มเชื้อ *G. intestinalis* กับยาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง การทดลองทำครั้งละ 3 ซ้ำ แถว a = blank (อาหารเลี้ยงเชื้อ) และแถว b = positive control (เชื้อกับอาหารเลี้ยงเชื้อ)

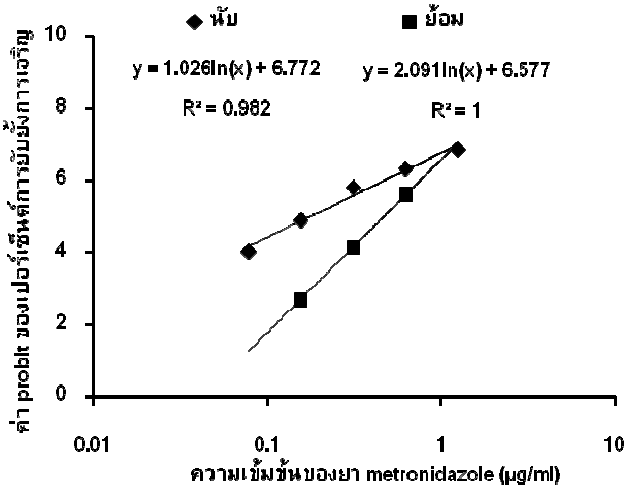
(1)



(2)

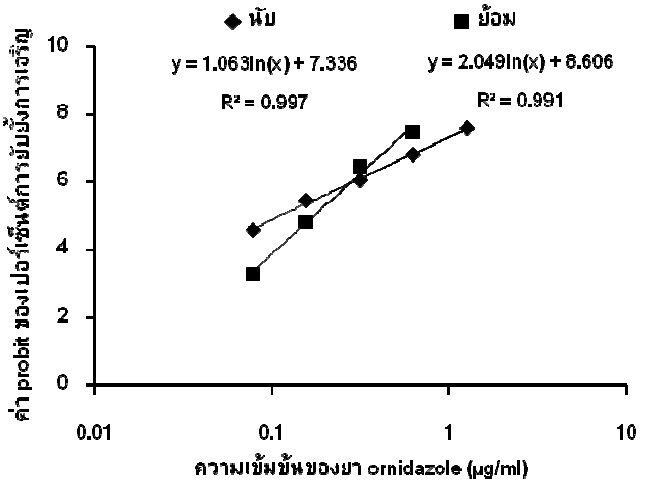


(3)

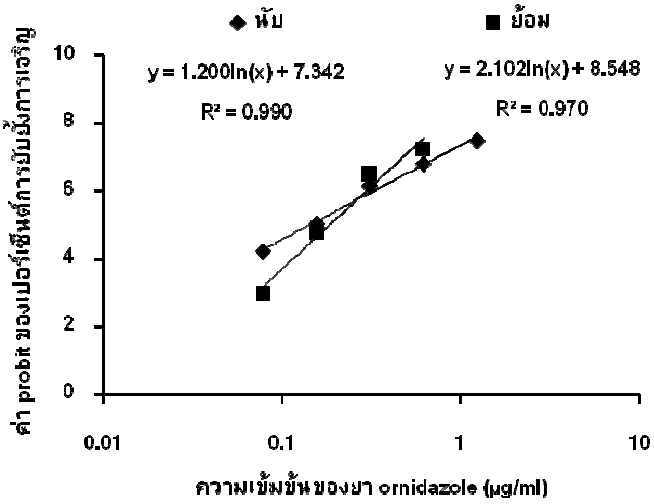


รูปที่ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า probit ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis* และความเข้มข้นของยา metronidazole จากวิธีการนับ (♦) กับวิธีย้อม (■) หลังบ่มเชื้อ *G. intestinalis* กับยาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการทดลอง 3 ครั้ง (1, 2, 3) ครั้งละ 3 ซ้ำ

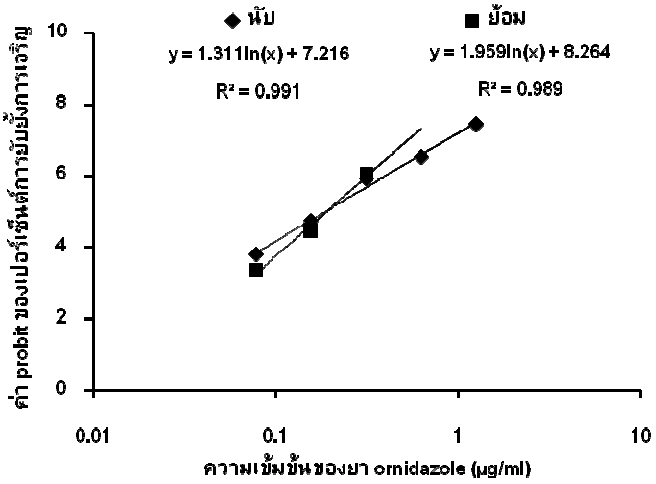
(1)



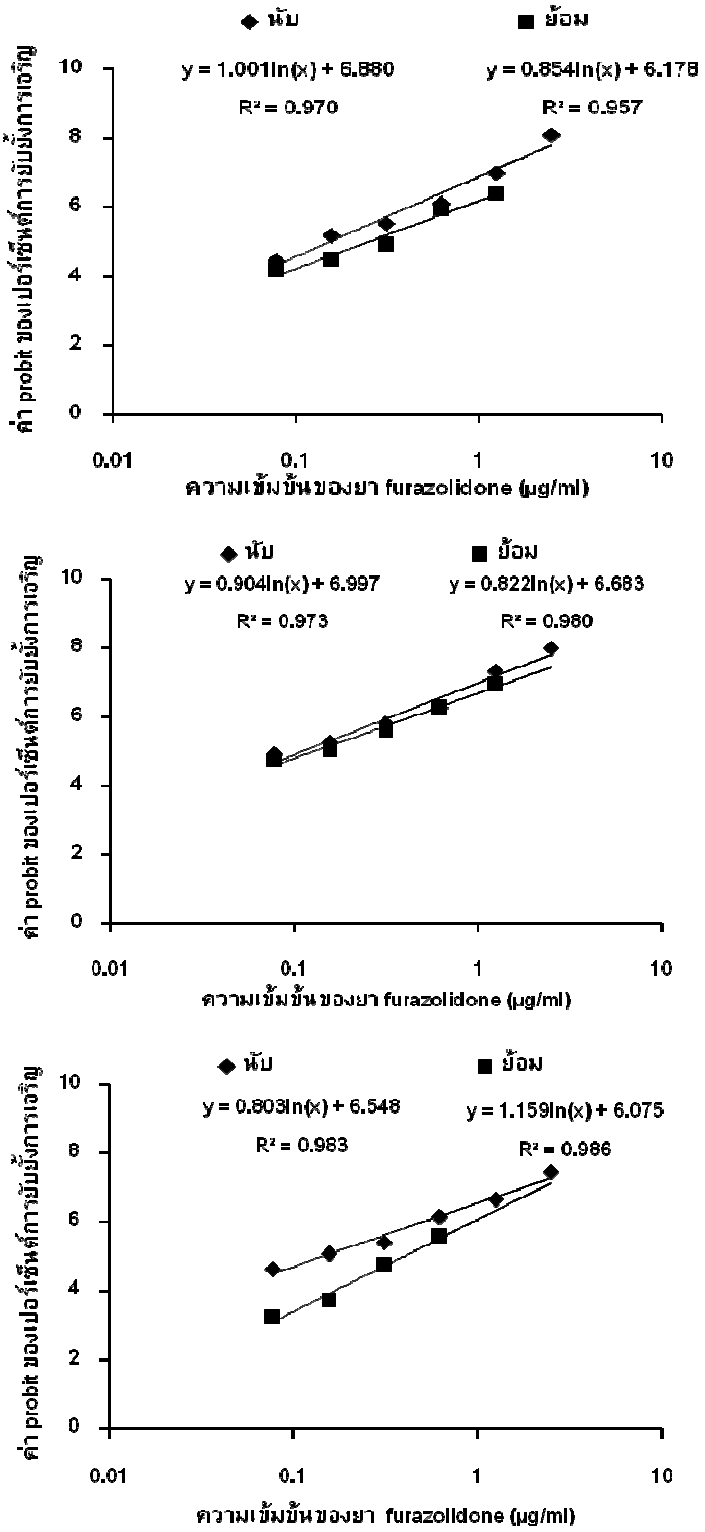
(2)



(3)



รูปที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า probit ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis* และความเข้มข้นของยา ornidazole จากวิธีการนับ (♦) กับวิธีย้อม (■) หลังบ่มเชื้อ *G. intestinalis* กับยาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการทดลอง 3 ครั้ง (1, 2, 3) ครั้งละ 3 ซ้ำ



รูปที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า probit ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis* และความเข้มข้นของยา furazolidone จากวิธีการนับ (♦) กับวิธีย้อม (■) หลังบ่มเชื้อ *G. intestinalis* กับยาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการทดลอง 3 ครั้ง (1, 2, 3) ครั้งละ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา metronidazole, ornidazole และ furazolidone (µg/ml) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Giardia intestinalis* ในหลอดทดลอง (MIC) ที่ได้จากการวัดค่า OD ที่ 655 nm

ยา	ครั้งที่			MIC
	1	2	3	
metronidazole	2.50	2.50	2.50	2.50
ornidazole	1.25	1.25	1.25	1.25
furazolidone	5.00	5.00	10.00	5-10

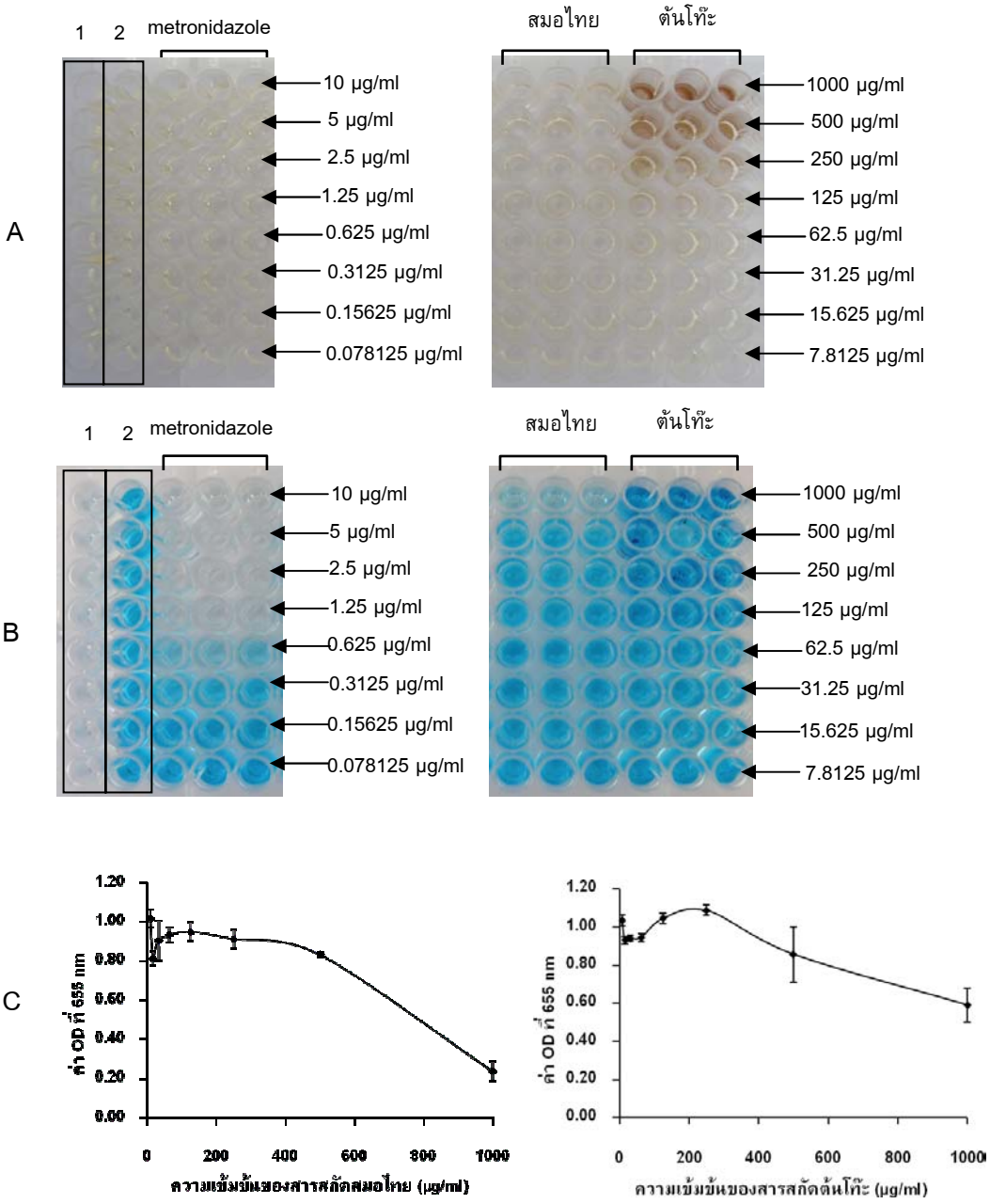
ตารางที่ 4 ความเข้มข้นต่ำสุดของยา metronidazole, ornidazole และ furazolidone (µg/ml) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis* 50% (IC_{50}) และ 90% (IC_{90}) ที่คำนวณได้จากวิธีการนับเชื้อตัวเป็น กับวิธีการวัดค่า OD หลังย้อมเชื้อด้วยสี methylene blue 0.1%

ยา	วิธีตรวจ	ครั้งที่						เฉลี่ย ± SD	
		1		2		3			
		IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}
metronidazole	นับเชื้อ	0.16	0.58	0.09	0.44	0.18	0.62	0.14±0.05	0.55±0.09
	วัด OD	0.40	0.81	0.36	0.89	0.47	0.87	0.41±0.06	0.86±0.04
ornidazole	นับเชื้อ	0.11	0.37	0.14	0.41	0.18	0.49	0.15±0.04	0.42±0.06
	วัด OD	0.17	0.32	0.18	0.34	0.19	0.36	0.18±0.01	0.34±0.02
furazolidone	นับเชื้อ	0.15	0.55	0.11	0.45	0.15	0.71	0.14±0.02	0.57±0.13
	วัด OD	0.25	1.13	0.13	0.61	0.40	1.20	0.26±0.13	0.98±0.32

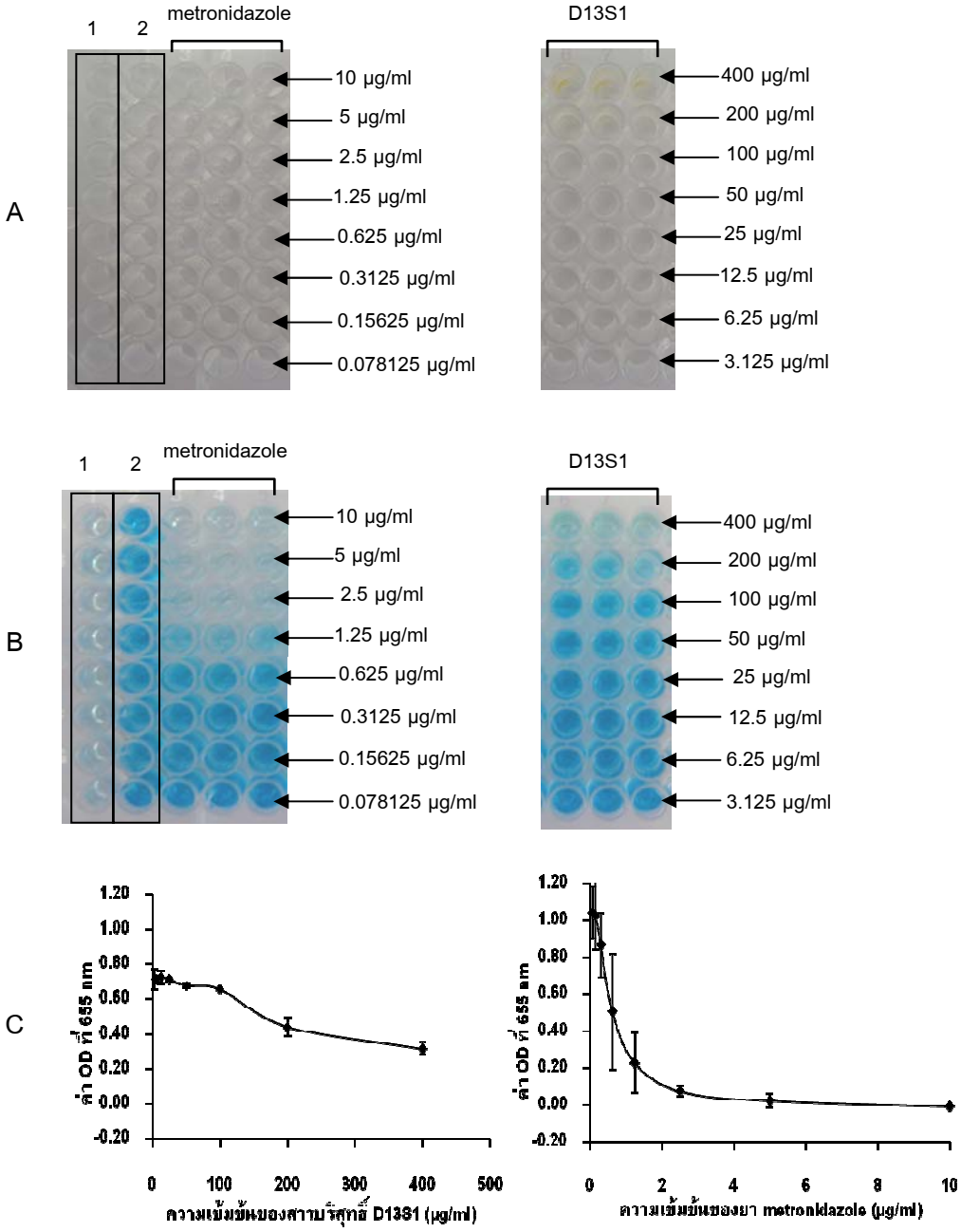
3.5 การประยุกต์ใช้ในการประเมินผลสารสกัดหยาบจากสมุนไพรและสารบริสุทธิ์จากต้นกะออก

เมื่อนำวิธีการย้อม *G. intestinalis* ที่ติดอยู่กับ plate ด้วยสี methylene blue 0.1% แล้ววัดค่า OD ที่ 655 nm มาใช้ตรวจสอบผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพร (19 ชนิด) ที่ความเข้มข้น 7.8125 - 1,000 µg/ml และสารบริสุทธิ์ที่สกัดจากต้นกะออก (7 สาร) ที่ความเข้มข้น 3.125 - 400 µg/ml ต่อการเจริญของ *G. intestinalis* ในหลอดทดลอง พบว่าวิธีนี้มีข้อจำกัดในการใช้ตรวจสอบผลของสารสกัดที่เป็นตะกอน เช่น สารสกัดจากต้นโท๊ะ หรือสารบริสุทธิ์ D13S1 ที่สกัดจากต้นกะออก เนื่องจากเมื่อเทอาหารออก จะยังคงมีตะกอนติดอยู่ ดังแสดงในรูปที่ 21 (A) และ 22 (A) ตามลำดับ เมื่อ fix และย้อมสีก็จะย้อมติดตะกอนด้วย ดังแสดงในรูปที่ 21 (B) และ 22 (B) ทำให้ค่า OD ที่ได้ไม่ใช่ค่าที่อ่านได้จากจำนวนเชื้อที่เหลือรอดในหลุมอย่างแท้จริง ดังแสดงในรูปที่ 21 (C) และ 22 (C) แต่สารสกัดหยาบที่ไม่มีตะกอนหรือสารที่มีสีจะให้ค่า OD ที่ได้จากตัวเชื้อที่เหลือรอดในหลุม ดังแสดงในรูปที่ 23

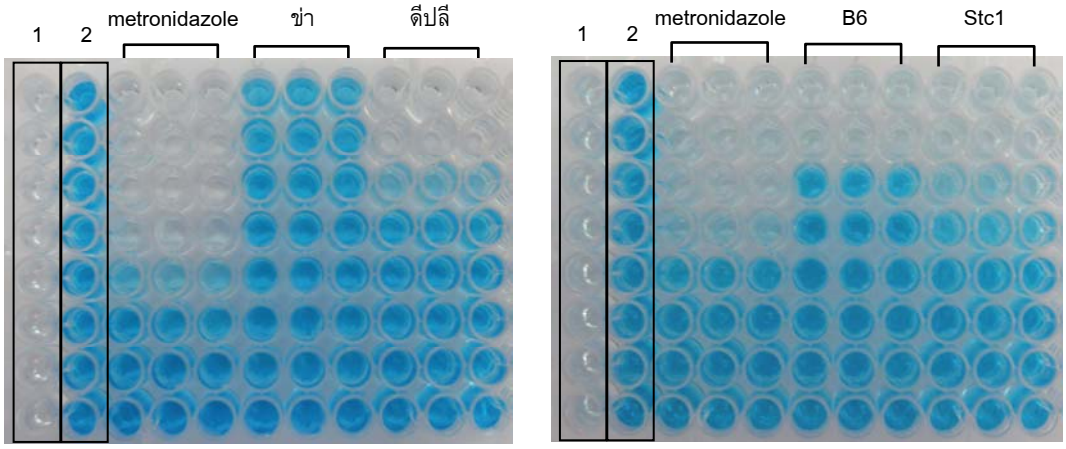
ผลของสารสกัดหยาบ (20 ตัวอย่าง) และสารบริสุทธิ์จากต้นกะออก (7 ตัวอย่าง) ที่ได้จากจุดตัดของกราฟจากการวัดค่า OD ได้แสดงในตารางที่ 5 และ 6 ตามลำดับ ผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ เมื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ได้จากการวัด OD ไปแปลงเป็นค่า probit และเขียนกราฟระหว่างค่า probit กับ log ความเข้มข้นของยา และหาสมการเส้นตรง ได้แสดงในตารางที่ 7 เมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้จากวิธีย้อมสีกับจุดตัดของกราฟจากการวัดค่า OD พบว่าผลที่ได้มีความสอดคล้องกัน สารสกัดสมุนไพรที่มีผลสามารถยับยั้งการเจริญของ *G. intestinalis* ในหลอดทดลอง มี 6 ชนิด คือ กระชาย, ขมิ้น, ขิง, ดีปลี, พริกไทยขาวและว่านหอมแดง ซึ่งค่า MIC เมื่อทดสอบโดยวิธีการให้คะแนนของ Upcroft และ Upcroft (2001) เท่ากับ 1,000 µg/ml ทุกสาร แต่ค่า MIC ที่ได้จากวิธีวัดค่า OD ให้ค่า MIC ต่ำกว่าคือ 500 µg/ml ทุกสารและให้ค่า IC_{50} และ IC_{90} อยู่ในช่วง 15.74-50.42 และ 46.35-173.58 µg/ml ตามลำดับ สำหรับสารบริสุทธิ์สกัดจากต้นกะออกที่มีฤทธิ์มี 4 สาร คือ A2, B6-3124S, C11-9S และ Stc1 ซึ่งค่า MIC เมื่อทดสอบโดยวิธีการให้คะแนนของ Upcroft และ Upcroft (2001) เท่ากับ 400 µg/ml ทุกสาร ยกเว้น A2 ที่ให้ค่า MIC มากกว่า 400 µg/ml แต่ค่า MIC ที่ได้จากวิธีวัดค่า OD ให้ค่า MIC ต่ำกว่าอยู่ในช่วง 100-400 µg/ml และให้ค่า IC_{50} และ IC_{90} อยู่ในช่วง 6.48-18.40 และ 14.49-51.77 µg/ml ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ที่เหลือไม่มีผลต่อการเจริญของ *G. intestinalis* โดยมีค่า MIC มากกว่า 1000 และ 400 µg/ml ตามลำดับ



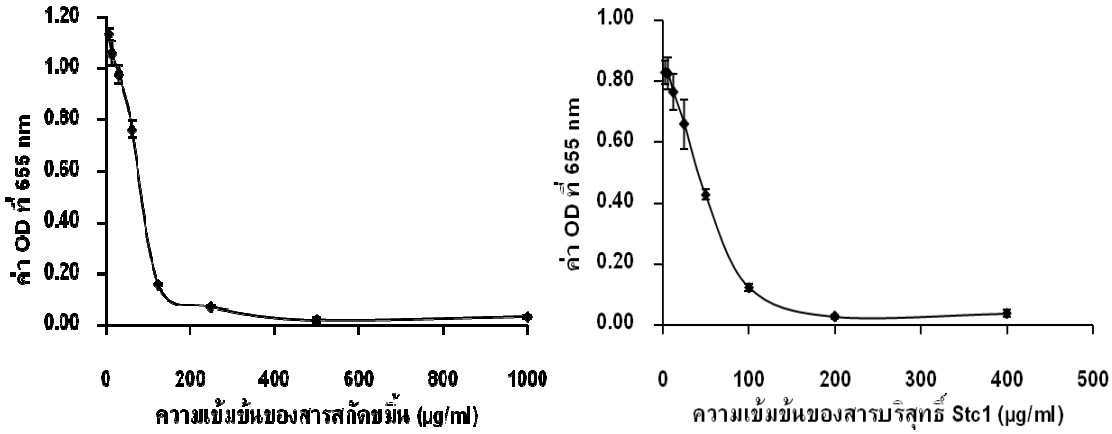
รูปที่ 21 ตัวอย่างลักษณะการติดสีของ plate ที่ทดสอบผลของสารสกัดหยาบสมอไทยและต้นโท๊ะที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis* ในหลอดทดลองเทียบกับยา metronidazole (A) เมื่อเทอาหารออกจาก plate (B) หลังจากย้อมด้วยสี methylene blue 0.1% และ (C) ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD±SE กับความเข้มข้นของสารสกัดสมอไทยและต้นโท๊ะ แถว 1 = blank (อาหารเลี้ยงเชื้อ), แถว 2 = positive control (เชื้อกับอาหารเลี้ยงเชื้อ)



รูปที่ 22 ตัวอย่างลักษณะของ plate ที่ทดสอบผลของสารบริสุทธิ์ D13S1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis* ในหลอดทดลองเทียบกับยา metronidazole (A) หลังจาก fix ด้วย methanol และ (B) หลังจากย้อมด้วยสี methylene blue 0.1% และ (C) ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD±SE กับความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ D13S1 และยา metronidazole แถว 1 = blank (อาหารเลี้ยงเชื้อ), แถว 2 = positive control (เชื้อกับอาหารเลี้ยงเชื้อ)



A B



C

รูปที่ 23 ตัวอย่างลักษณะการติดสีของ plate ที่ทดสอบผลของสารสกัดหยาบ (A) และสารบริสุทธิ์ (B) ต่อการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis* ในหลอดทดลองเทียบกับยา metronidazole เมื่อย้อมด้วยสี methylene blue 0.1% และ (C) ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย OD±SE กับความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นและสารบริสุทธิ์ Stc1

แถว 1 = blank (อาหารเลี้ยงเชื้อ), แถว 2 = positive control (เชื้อกับอาหารเลี้ยงเชื้อ)

ตารางที่ 5 ผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *Giardia intestinalis* ในหลอดทดลอง ทดสอบโดยวิธีการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์และให้ระดับคะแนนตามวิธีของ Uproft และ Upcroft (2001) และวิธีการวัดค่า OD ที่ 655 nm

สมุนไพร	ส่วนที่ใช้	สารสกัดที่ใช้	MIC[a] (µg/ml)	MIC[b] (µg/ml)	IC_{50} (µg/ml)	IC_{90} (µg/ml)
1. กระชาย (*Boesenbergia pandurata (Roxb.) Schltr.*)	เหง้า	เอทานอล	1,000	500	24.16±3.36	87.66±15.41
2. กระท่อม (*Mitragyna speciosa* Korth.)	ใบ	น้ำ	>1,000	>1,000	-	-
3. โกโก้ (*Theobroma cacao* L.)	เปลือก	น้ำ	>1,000	>1,000	-	-
4. โกงกาง (*Rhizaphora mucronata* Poir.)	เปลือก	น้ำ	>1,000	>1,000	-	-
5. ขมิ้น (*Curcuma longa Linn.*)	เหง้า	เอทานอล	1,000	500	50.42±17.50	173.58±73.47
6. ข่า (*Alpinia galanga (L.) Willd.*)	เหง้า	เอทานอล	>1,000	>1,000	-	-
7. ขิง (*Zingiber officinale Roscoe*)	เหง้า	เอทานอล	1,000	500	25.98±12.80	86.48±59.33

ตารางที่ 5 (ต่อ) ผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *Giardia intestinalis* ในหลอดทดลอง ทดสอบโดยวิธีการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์และให้ระดับคะแนนตามวิธีของ Uproft และ Upcroft (2001) และวิธีการวัดค่า OD ที่ 655 nm

สมุนไพร	ส่วนที่ใช้	สารสกัดที่ใช้	MIC[a] (µg/ml)	MIC[b] (µg/ml)	IC_{50} (µg/ml)	IC_{90} (µg/ml)
8. ดีปลี (*Piper chaba* Vahl)	ผล	น้ำ	1,000	500	29.21±12.13	76.80±52.14
9. ตะบูน (*Xylocarpus granatum* J. Konig)	เปลือก	น้ำ	>1,000	>1,000	-	-
10. โท๊ะ (*Rhodomytus tomentosa* (Ait.) Hassk)	ลำต้น	น้ำ	>1,000	>1,000	-	-
11. นนทรี (*Peltophorum ptterocarpum*)	ดอก	น้ำ	>1,000	>1,000	-	-
	เปลือกต้น	เมธานอล	>1,000	>1,000	-	-
12. ปีบ (*Millingtonia hortensis* Linn.)	ดอก	น้ำ	>1,000	>1,000	-	-
13. พริกไทยขาว (*Piper nigrum* Linn)	ผล	น้ำ	1,000	500	21.62±4.10	59.22±5.84
14. มะตูมแก่ (*Aegel marmelos* (Linn.) Corr.	ผล	น้ำ	>1,000	>1,000	-	-

ตารางที่ 5 (ต่อ) ผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *Giardia intestinalis* ในหลอดทดลอง ทดสอบโดยวิธีการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์และให้ระดับคะแนนตามวิธีของ Uproft และ Upcroft (2001) และวิธีการวัดค่า OD ที่ 655 nm

สมุนไพร	ส่วนที่ใช้	สารสกัดที่ใช้	MIC[a] (µg/ml)	MIC[b] (µg/ml)	IC_{50} (µg/ml)	IC_{90} (µg/ml)
15. ไมยราบ (*Mimosa pudica* Linn. var. hispida Bren)	ทั้งต้น	น้ำ	>1,000	>1,000	-	-
16. ว่านหอมแดง (*Allium ascalonicum* Linn)	หัว	น้ำ	1,000	500	15.74±1.10	46.35±1.90
17. สมอเทศ (*Terminli Belerica*)	ผล	น้ำ	>1,000	>1,000	-	-
18. สมอไทย (*Terminalia chebula*. Retz.)	ผล	น้ำ	>1,000	>1,000	-	-
19. สมอภิเภก (*Terminalia belerica* (Gaertn.) Roxb.)	ผล	น้ำ	>1,000	>1,000	-	-

[a] ทดสอบโดยวิธีการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์และให้ระดับคะแนนตามวิธีของ Uproft และ Upcroft (2001) ค่า MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ให้ค่า 1+ (มากกว่า 90% ของเซลล์ที่ตาย)

[b] ได้จากการวัดค่า OD ที่ 655 nm ค่า MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ให้ค่า OD $\leq$ 0.03

ตารางที่ 6 ผลของสารสกัดบริสุทธิ์จากต้นกะออกในการยับยั้งการเจริญของ *Giardia intestinalis* ในหลอดทดลอง ทดสอบโดยวิธีการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์และให้ระดับคะแนนตามวิธีของ Uproft และ Upcroft (2001) และวิธีการวัดค่า OD ที่ 655 nm

สารที่ใช้	MIC[a] (µg/ml)	MIC[b] (µg/ml)	IC_{50} (µg/ml)	IC_{90} (µg/ml)
A2	>400	400	18.40±11.87	49.03±20.93
B6 3124S	>400	400	17.65±2.94	40.00±7.21
C11 9S	400	100	6.48±1.46	14.49±5.33
C13 2S	>400	>400	□	□
C17	400	>400	□	□
D13S1	>400	>400	□	□
Stc1	400	400	16.68±12.13	51.77±38.4
Metronidazole*	2.5	2.5	□	□

หมายเหตุ *ยามาตราฐาน

[a] ทดสอบโดยวิธีการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์และให้ระดับคะแนนตามวิธีของ Uproft และ Upcroft (2001)
ค่า MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ให้ค่า 1+ (มากกว่า 90% ของเซลล์ที่ตาย)

[b] ได้จากการวัดค่า OD ที่ 655 nm ค่า MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ให้ค่า OD $\leq$ 0.03

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

จุดมุ่งหมายในการศึกษาครั้งนี้เพื่อพัฒนาวิธีการประเมินประสิทธิภาพของสารต่างๆ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis* ในหลอดทดลองให้มีความรวดเร็ว น่าเชื่อถือ และสามารถตรวจสอบผลของสารได้ครั้งละเป็นจำนวนมาก เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพของสารหรือยาใหม่ๆ ที่จะนำมาใช้ในการต้านเชื้อนี้ ปัจจุบันวิธีที่นิยมคือการใช้วิธีการนับเชื้อตัวเป็นด้วย haemocytometer ซึ่งเป็นวิธีที่เสียเวลาและให้ผลไม่แน่นอนเนื่องจากอาจมีความผิดพลาดจากการใช้คนในการนับหรือการแยกระหว่างเชื้อตัวที่มีชีวิตและเชื้อตัวที่ตายแล้ว *G. intestinalis* เป็นโปรโตซัวที่มี sucking disc ในการยึดเกาะกับภาชนะที่ใช้เลี้ยง ซึ่งเมื่อตายก็จะสูญเสียความสามารถนี้ไป (Sandhu *et al*., 2004; Muller *et al*., 2006) การย้อมเชื้อที่รอดชีวิตที่เกาะติดอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อด้วยสีแล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงนับเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาแทนวิธีการนับเชื้อได้ เนื่องจากเป็นการตรวจสอบที่รวดเร็วเพราะใช้เครื่องเป็นตัวอ่านผลการทดสอบและยังสามารถตรวจสอบสารได้หลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน เป็นวิธีที่อาศัยหลักการที่ว่า สีจะย้อมติดตัวเชื้อที่รอดชีวิตที่เกาะติดอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเชื้อที่ตายจะไม่มีความสามารถในการยึดเกาะกับหลุม tissue culture plate จึงถูกแยกออกไปในขั้นตอนของการเทอาหารออกจากหลุม

ขั้นตอนแรกของการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาตามวิธีของ Maurya และ คณะ (2006) ซึ่งได้ใช้สี eosin ย้อมเชื้อ *E. histolytica* ที่ยังคงเกาะติดกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อหลังบ่มกับยา พบว่าเมื่อบ่มเชื้อ *G. intestinalis* ความเข้มข้นเริ่มต้น 6.1×10^{2} - 2×10^{7} cell/ml เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วยสี eosin ตามวิธีของ Maurya และ คณะ (2006) ค่า OD ที่ได้จากการทดลองแต่ละครั้งไม่เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนนักเมื่อความเข้มข้นของเชื้อเพิ่มขึ้น (OD ที่ได้อยู่ระหว่าง 0.02-0.29) และยังมีความแปรปรวนมาก (SE อยู่ระหว่าง 0.01-0.11)

วิธีการตรวจสอบผลของยาหรือสารต้านเชื้อในหลอดทดลองโดยอาศัยเทคนิคการวัดค่า OD ส่วนใหญ่จะต้องมีการล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกก่อนการ fix ตัวเชื้อ เนื่องจากยาหรือส่วนประกอบของอาหาร เช่น L-cystein และ yeast extract จะไปมีผลต่อสารที่ใช้เป็นตัวทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดจากการ reduce เช่น MTT, XTT และ resazurin เป็นต้น (Benere *et al*., 2007) ซึ่งในขั้นตอนการล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกนี้จะต้องทำอย่างรวดเร็วและระมัดระวังไม่ให้เชื้อที่เกาะอยู่ได้รับความเย็นเพราะอาจจะทำให้ตัวเชื้อหลุดออกจากการยึดเกาะได้ (Wright *et al*., 1992) นอกจากนี้วิธีการตรวจสอบผลของยาหรือสารต่อเชื้อแบคทีเรียโปรโตซัวตัวอื่นๆ หรือแม้กระทั่งการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ cell line ก็ล้วนแต่ล้างอาหารใน plate

ออกก่อนเช่นกัน (Mukhopadhyay and Chaudhuri, 1996; Wright *et al*., 1988; Saravanan *et al*., 2003) แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการ fix เชื้อ *G. intestinalis* โดยไม่ต้องล้างอาหารออกก่อนไม่มีผลกระทบต่อการติดสีที่จานอาหาร และได้ค่า OD เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าเมื่อนำมาจานอาหารเลี้ยงเชื้อมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted microscope มีจำนวนเชื้อที่ยึดเกาะใน plate สม่ำเสมอและมากกว่าเชื้อจาก plate ที่ล้างอาหารออกก่อนการ fix (รูปที่ 10 และ 11) โดยพบว่าการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อจะหลุดออกจาก plate น้อยกว่าเมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากเวลา 48 ชั่วโมงเป็นช่วงการเจริญเติบโตของเชื้อ (log phase) ในขณะที่ช่วง stationary phase ของเชื้อนี้อยู่ที่ 5 วัน (Cedillo-rivera and Munoz, 1992)

นอกจากปัญหาการหลุดของเชื้อ *G. intestinalis* ออกจาก plate ในขั้นตอนการล้างอาหารออกก่อนแล้ว วิธีการล้างอาหารก่อนการ fix ตัวเชื้อตามวิธีของ Maurya และ คณะ (2006) ต้องรอให้ plate แห้งก่อนจึงจะสามารถนำไปทำในขั้นตอนต่อไปได้ ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ค่อนข้างมาก ประมาณ 5-6 ชั่วโมง แต่โดยวิธี fix เชื้อทันทีนี้นอกจากทำให้จำนวนเชื้อหลุดออกจาก plate น้อยกว่าแล้วยังลดเวลาในการรอเหลือเพียงประมาณ 20 นาทีเท่านั้น ก็สามารถนำไปย้อมสีได้

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบระหว่างวิธีการเทสารละลายหรือ methanol และน้ำลงใน plate โดยตรงในทุกขั้นตอนกับวิธีการล้าง plate โดยการแช่ plate ลงในสารละลายพบว่าวิธีแช่ plate ในสารละลายให้ค่า OD สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากมีแรงกระเด็นของสารน้อยกว่าวิธีการเททำให้ตัวเชื้อที่เกาะอยู่ใน plate หลุดออกน้อยกว่า

เมื่อเปรียบเทียบการใช้สี eosin, crystal violet และ methylene blue ย้อม *G. intestinalis* ด้วยวิธีเท methanol และน้ำในขั้นตอนการ fix และล้างสีกับวิธีแช่ plate ในสารละลาย พบว่าค่า OD ที่ได้จากวิธีแช่ plate ของสี crystal violet และ methylene blue สูงกว่าวิธีการเทสารละลายลงใน plate อย่างมีนัยสำคัญ แต่เนื่องจากสี crystal violet จะมีความหนืดมากกว่าสีอื่นทำให้มีการติดสีที่พื้นผิว plate ด้วย และค่า OD ที่ได้จากการทดลองทั้ง 3 ครั้งของสีที่ความเข้มข้นเดียวกันให้ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนจากการทดลองสูงกว่าการย้อมด้วยสี methylene blue สี crystal violet จึงไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ต่อไป

เมื่อศึกษาจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมเพื่อนำไปศึกษาหาประสิทธิภาพของยาและสารสกัดสมุนไพรโดยการย้อมด้วยสี methylene blue ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2% พบว่าสี methylene blue ทั้งสองความเข้มข้นให้ค่า OD ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยจะเห็นค่า OD ที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนที่ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^4 cell/ml การทดลองขั้นต่อไปได้เลือกเชื้อที่ความเข้มข้น $5x10^5$ cell/ml เป็นเชื้อเริ่มต้นในการใช้ทดสอบผลของยาซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Benere และคณะ (2007) ที่ว่าเชื้อ *G. lamblia* ความ

เข้มข้น 10^5 trophozoites/ml โทรโฟซอยด์จะเกาะแผ่เต็ม plate หลังจากบ่มเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

เมื่อนำวิธีการย้อมเชื้อด้วยสี methylene blue 0.1% โดยใช้วิธี fix เชื้อหลังบ่มโดยไม่ล้างอาหารออก และใช้วิธีแช่ plate ลงใน methanol และน้ำในขั้นตอนการ fix และล้างสีมาใช้ประเมินประสิทธิภาพของยา metronidazole, ornidazole และ furazolidone ต่อการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis* ในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับวิธีนับ พบว่า ค่า IC_{50} ของยา metronidazole, ornidazole และ furazolidone ที่ได้จากวิธีนับเท่ากับ 0.14±0.05, 0.15±0.04, 0.14±0.02 µg/ml และจากวิธีย้อมเท่ากับ 0.41±0.06, 0.18±0.01, 0.26±0.13 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งค่า IC_{50} ของยา metronidazole ที่ได้จากวิธีนี้มีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Wright *et al*., 1992, Sousa and Poiares-da-Silva, Benere *et al*., 2007 และ Busatti and Gomes, 2007 ค่า IC_{50} ของยา metronidazole และ furazolidone ที่ได้จากวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงของ Wright และ คณะ (1992) เท่ากับ 2.98 (0.51 µg/ml) และ 4.14 µM (0.93 µg/ml), Benere และ คณะ (2007) เท่ากับ 2.25 (0.39 µg/ml) และ 2.00 µM (0.45 µg/ml)เป็นต้น และค่า IC_{50} ของยา ornidazole ที่ได้จากวิธีการนับของ Cedillo-Rivera และ Munoz (1992) เท่ากับ 0.2 mg/L (0.2 µg/ml)

ในการใช้วิธีการย้อมเชื้อด้วยสี methylene blue 0.1% ตรวจสอบผลของสารสกัดสมุนไพรเปรียบเทียบกับวิธีการให้คะแนน 1+ ถึง 4+ เมื่อเทียบกับหลุมที่ไม่มียาตามวิธีของ Upcroft และ Upcroft (2001) เมื่ออ่านผลโดยการให้ระดับคะแนนตามวิธีของ Upcroft และ Upcroft (2001) ค่า MIC ที่ได้มีค่าสูงกว่าการอ่านค่า MIC จากค่า OD เมื่อเปรียบเทียบค่า MIC ที่ได้จาการอ่านค่า OD กับค่า IC_{50} หรือ IC_{90} ผลที่ได้ส่วนใหญ่เป็นไปในแนวทางเดียวกันซึ่งผลที่ได้ของแต่ละสมุนไพรที่ทดสอบโดยส่วนใหญ่สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ (เครือวัลย์, 2549) วิธีการให้คะแนนมีความรวดเร็วแต่เป็นการประเมินอย่างคร่าว ๆ และขึ้นอยู่กับความชำนาญของผู้ตรวจสอบ เหมาะสำหรับคัดสารที่ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *G. intestinalis* ในหลอดทดลองออกไปแต่ไม่สามารถหาค่า IC_{50} หรือ IC_{90} ได้ วิธีการย้อมสีสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ โดยเฉพาะในเรื่องการนับเชื้อที่มีข้อจำกัด เช่นใช้เวลานาน (ความเข้มข้นละประมาณ 15 นาที) และให้ผลไม่แน่นอนเนื่องจากอาจมีความผิดพลาดจากการใช้คนในการนับจำนวนและแยกระหว่างตัวเชื้อที่มีชีวิตและตัวเชื้อที่ตาย ส่วนวิธีการย้อมเชื้อทำได้เร็วและสามารถตรวจสอบผลของยาหรือสารได้ครั้งละเป็นจำนวนมาก แต่การศึกษาครั้งนี้พบข้อจำกัดในการใช้กับสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรที่มีตะกอนที่อาจจะเกิดการรบกวนการอ่านค่าการดูดกลืนแสงจึงน่าจะใช้ทั้ง 2 วิธีนี้ควบคู่กัน

วิธีการย้อมสีตัวเชื้อที่พัฒนาได้จากการศึกษาครั้งนี้มีความรวดเร็วมากกว่าการตรวจสอบโดยการวิเคราะห์ด้วย MTT และ XTT เนื่องจากวิธีการวิเคราะห์ด้วย MTT ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ MTT formazan ซึ่งสารประกอบตัวนี้ไม่สามารถละลายได้ในอาหารจึงต้องใส่สารละลาย

อินทรีย์เพื่อไปละลายสารประกอบ formazan ก่อนการวัดค่าการดูดกลืนแสงซึ่งในขั้นตอนนี้ทำให้เสียเวลา และสารประกอบ formazan จะเกิดการสะสมอยู่ในเซลล์ทำให้เซลล์เกิดความเสียหายได้ นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วย MTT อาจจะไม่มีความถูกต้อง (accuracy) เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาระหว่างยาบางตัวกับ tetrazolium ซึ่งอาจจะมีผลต่อกิจกรรมของยา (Tominaga *et al*., 1999; Williams *et al*., 2003; Fumarola *et al*., 2004) เมื่อเทียบกับวิธีของ Busatti และ Gomes (2007) วิธีนี้ทำได้รวดเร็วกว่าเนื่องจากไม่ต้องเสียเวลาในขั้นตอนการล้าง plate และค่า OD ที่ได้มีแนวโน้มเดียวกัน ส่วนค่า IC_{50} ของยา metronidazole ก็มีความสอดคล้องกันคือ 1.96±0.13 μM (0.34 μg/ml) ของ Busatii และ Gomes (2007) และ 0.41±0.06 μg/ml ของวิธีการย้อมนี้

บทที่ 5

สรุป

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อหาวิธีที่น่าเชื่อถือ และมีความรวดเร็ว หรือสามารถตรวจสอบผลของสารต่างๆ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Giardia intestinalis* ในหลอดทดลองได้ครั้งละเป็นจำนวนมาก เพื่อนำไปใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของสารหรือยาใหม่ๆ ที่จะนำมาใช้ในการต้านเชื้อนี้ พบว่าการใช้ *G. intestinalis* ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5×10^5 cell/ml บ่มกับยาหรือสารสกัดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เทอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้ว fix ทันทีด้วย methanol ย้อมด้วยสี methylene blue ที่ความเข้มข้น 0.1% โดยในขั้นตอนการ fix และล้างสีใช้วิธีแช่ plate ลงใน methanol และน้ำเป็นวิธีการที่ให้ผลดีในการที่จะนำมาใช้ประเมินจำนวนเชื้อที่เหลืออยู่ในจานอาหาร

เมื่อได้นำวิธีที่ได้พัฒนาในการศึกษาครั้งนี้มาทดสอบกับยามาตรฐาน 3 ตัว คือ metronidazole, ornidazole และ furazolidone ค่า MIC ของยา metronidazole ornidazole และ furazolidone ที่ได้จากการวัดค่า OD มีค่าเท่ากับ 2.50±0.00, 1.25±0.00 และ 5-10 µg/ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการนับจำนวนเชื้อตัวเป็นที่ใช้กันอยู่ทั่วไป พบว่า ค่า IC_{50} ของยา metronidazole, ornidazole และ furazolidone ที่คำนวณได้จากวิธีนับเท่ากับ 0.14±0.05, 0.15±0.04, 0.14±0.02 µg/ml และจากวิธีย้อมด้วยสี methylene blue เท่ากับ 0.41±0.06, 0.18±0.01, 0.26±0.13 µg/ml ตามลำดับ

เมื่อนำวิธีใหม่นี้มาทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพร 19 ชนิดและสารบริสุทธิ์สกัดจากต้นกะออก 7 สารต่อการเจริญเชื้อ *G. intestinalis* ในหลอดทดลอง พบว่าผลที่ได้เป็นไปในแนวทางเดียวกับการประเมินโดยวิธีนับ

การศึกษาครั้งนี้สรุปว่าวิธีการประเมินจำนวนเชื้อ *G. intestinalis* ที่พัฒนาในครั้งนี้สามารถใช้ในการตรวจสอบผลของสารที่สนใจได้พร้อมๆ กันครั้งละเป็นจำนวนมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่การอ่านผลทำได้ง่าย รวดเร็ว และราคาถูก แต่อาจมีข้อจำกัดในการใช้กับสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรที่มีตะกอนที่อาจจะเกิดการรบกวนการอ่านค่าการดูดกลืนแสง

ข้อเสนอแนะ

1. ไม่ควรใช้วิธีย้อมเชื้อด้วยสี methylene blue กับสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรที่มีตะกอนที่จะเกิดการรบกวนการอ่านค่าการดูดกลืนแสง

เอกสารอ้างอิง

เกษม อุตวิชัย, นิมิต มรกต, เกตุรัตน์ สุขวัจน์ และ วราภรณ์ ศิริสว่าง. 2530. การศึกษาสุขภาพและความชุกชุมของพยาธิลำไส้ของเด็กนักเรียนในเมือง, ชานเมือง และชนบท ของจังหวัดเชียงใหม่. รายงานวิจัยเสนอคณะกรรมการส่งเสริมวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เครือวัลย์ ห้วนกัง. 2549. ผลของสารสกัดสมุนไพรบางชนิดต่อการเจริญของ *Giardia lamblia* ในหลอดทดลอง. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นิตยา ภูไพรัชพงษ์. 2539. เภสัชวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 4. ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

นิมิต มรกต และ เกตุรัตน์ สุขวัจน์. 2546. ปรสิตวิทยาทางการแพทย์: โปรโตซัวและหนอนพยาธิวิทยา. โครงการตำรา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

นิมิต มรกต, จุไรรัตน์ จันทร์ประเสริฐ, สมพงษ์ ศรีแก้ว และ ลำดวน วงศ์สวัสดิ์. 2533. *Cryptosporidium* and *Giardia* infections among orphans in the Home for Boya, Chiang Mai. เชียงใหม่เวชสาร. 29:41-44.

ประยงค์ ระดมยศ, สุวณี สุภเวช, ศรชัย หลูอารีย์สุวรรณ์. 2539. ตำราปรสิตวิทยาทางการแพทย์. สำนักพิมพ์ เมดิคัลมีเดีย: กรุงเทพฯ.

ประเสริฐศักดิ์ ตู้จินดา. 2542. ตำราเภสัชวิทยา เล่มที่ 3. พิมพ์ครั้งที่ 4. ห้างหุ้นส่วนจำกัดพิทักษ์การพิมพ์: กรุงเทพฯ.

ปราโมทย์ วณิตย์ธนาคม. 2530. จุลกายวิภาคเคมี. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มานพ ม่วงใหญ่. 2545. วิทยาสัตว์เซลล์เดียวทางสัตวแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพฯ.

เวคิน นพนิตย์. 2524. เทคนิคทางเนื่อเยื่อ. พิมพ์ครั้งที่1. ห้างขายยาตรานกยูง: กรุงเทพฯ.

ศุภลักษณ์ โรมรัตนพันธ์. 2545. เทคนิคทางเนื้อเยื่อสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.

สมใจ นครชัย. 2541. เภสัชวิทยา (เล่ม 2). พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัทนิวไทยมิตรการพิมพ์ (1996) จำกัด: กรุงเทพฯ.

Adam, R.D. 1991. The biology of *Giardia* spp. Microbiological Reviews. 55(4): 706-732.

Adam, R.D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clinical Microbiology Reviews. 14(3): 447-475.

Agrawal, A.K., Singh, M., Gupta, N., Saxena, R., Puri, A., Verma, A.K., Saxena, R.P., Dubey, C.B. and Saxena, K.C. 1997. Management of *Giardia lamblia* by immuno-modulatory herbal drug: Pippali Rasayana. Journal of Ethnopharmacology. 44: 143-146.

Aldrete, M.E.C., Salgado-Zamora, H., Luna, J., Melendez, E. and Meraz-Rios, M.A. 2005. A high-throughput colorimetric and fluorometric microassay for the evaluation of nitroimidazole derivatives anti-trichomonas activity. Toxicology in Vitro. 19: 1045-1050.

Aley, S.B., Zimmerman, M., Hetsko, M., Selsted, M.E. and Gillin, F.D. 1994. Killing of *Giardia lamblia* by cryptdins and cationic neutrophil peptides. Infection and Immunity. 62(12): 5397–5403.

Antony, J.P., Fyfe, L., Stewart, D., McDougall, G.J. and Smith, H.V. 2007. The effect of blueberry extracts on *Giardia duodenalis* viability and spontaneous excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts, *in vitro*. Methods. 42: 339-348.

Arbo, A., Pavia-Ruz, N. and Santos, J. 2006. Opsonic requirements for the respiratory burst of neutrophils against *Giardia lamblia* trophozoites. Archieves of Medical Research. 37: 465-473.

Arguello-Garcia, R., Cruz-Soto, M., Romero-Montoya, L. and Ortega-Pierres, G. 2004. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles *in vitro*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 54: 711-721.

Benere, E., Inocencio da Luz, R.A., Vermeersch, M., Cos, P. and Maes, L. 2007. A new quantitative *in vitro* microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites. Journal of Microbiological Methods. 71: 101-106.

Buret, A., den Hollander, N., Wallis, P.M., Befus, D. and Olson, M.E. 1990. Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. The Journal of Infectious Diseases. 162(1): 231-237.

Busatti, H.G.N.O. and Gomes, M.A. 2007. A simple colourimetric method to determine anti-giardial activity of drugs. Parasitology Research. 101: 819-821.

Calzada, F., Cervantes-Martinez, J.A. and Yepez-mulia, L. 2005. *In vitro* antiprotozoal activity from the roots of *Geranium mexicanum* and its constituents on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. Journal of Ethnopharmacology. 98: 191-193.

Calzada, F., Yepez-mulia, L. and Aguilar, A. 2006. *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. Journal of Ethnopharmacology. 108: 367-370.

Campanati, L. and Monteiro-Leal, L.H. 2002. The effects of the antiprotozoal drugs metronidazole and furazolidone on trophozoites of *Giardia lamblia* (P1 strain). Parasitology Research. 88: 80-85.

Carson, F.L. 1997. The dyes In: Histotechnology: A self-Instructional Text, 2rd. American Society of Clinical Pathologists, pp 89-95.

Carvalho, K.P. and Monteiro- Leal, L.H. 2004. The caudal complex of *Giardia lamblia* and its relation to motility. Experimental Parasitology. 108: 154-162.

Castro-Garza, J., Barrios-Garcia, H.B., Cruz-Vega, D.E., Said-Fernandez, S., Carranza-Rosales, P., Molina-Torres, C.A. and Vera-Cabrera, L. 2007. Use of a colorimetric assay to measure differences in cytotoxicity of *Mycobacterium tuberculosis* strains. Journal of Medical Microbiology. 56: 733-737.

Cedillo-rivera, R. and Munoz, O. 1992. In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebedazole and other chemotherapeutic agents. Medical Microbiology. 37: 221-224.

Chiba, K., Kawakami, K. and Tohyama, K. 1998. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. Toxicology in Vitro. 12: 251-258.

Chularerk, U. and Saepoo, S. 1986. The relationship between fecal fat and numbers of *Giardia lamblia* in faeces of infected children. The Parasitology and Tropical Medicine Association of Thailand. 9: 54-65.

Craft, J.C. and Nelson, J.D. 1982. Diagnosis of giardiasis by counter-immunoelectrophoresis of feces. Journal of infectious diseases. 145: 499-504.

Cruz, A., Isaura Sousa, M., Azeredo, Z., Carolina Silva, M., Figueiredo de Sousa, J.C., Manso, O. and Cabral, M. 2003a. Comparison between two common methods for measuring *Giardia lamblia* susceptibility to antiparasitic drugs *in vitro*. Acta tropica. 88: 131-135.

Cruz, A., Isaura Sousa, M., Azeredo, Z., Leite, E., Figueiredo de Sousa, J.C. and Cabral, M. 2003b. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia*

isolates: *in vitro* susceptibility to metronidazole and albendazole. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 51: 1017-1020.

Danve, C., Morfin, F., Thouvenot, D. and Aymard, M. 2002. A screening dye-uptake assay to evaluate *in vitro* susceptibility of herpes simplex virus isolates to acyclovir. Journal of Virological Methods. 105: 207-217.

De Saint Jean, M., Brignole, F., Bringuier, A.F., Bauchet, A., Feldmann., G. and Baudouin, C. 1999. Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of chang conjunctival cells. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 40(3): 619-630.

Diamond, L.S., Clark, C.G. and Cunnick, C.C. 1995. YI-S, a casein-free medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, related *Entamoeba*, *Giardia intestinalis* and *Tichomonas vaginalis*. Journal of Eukalyotic Microbiology. 42: 277-278.

Dorsch, M.R. and Veal, D.A. 2001. Oligonucleotide probes for specific detection of *Giardia lamblia* cysts by fluorescent in situ hybridization. Journal of Applied Microbiology. 90:836-842.

Farthing, M.J.G. 1992. *Giardia* come of age: progress in epidemiology, immunology and chemotherapy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 30: 563-566.

Faubert, G. 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. Clinical Microbiology Reviews. 13(1): 35-54.

Faust, E.C., D' Antoni., J.S., Odorn, V., Miller, M.J., Peres, C., Sawitz, W., Thomen, L.F., Tobie, J.E. and Walker, J.H. 1938. A critical study of clinical laboratory techniques for the diagnosis of protozoan cyst and helminth eggs in feces. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 18: 169-183.

Filice, F.P. 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. University of California Publications in Zoology. 57: 53-146.

Freitas, S.F., Shinohara, L., Sforcin, J.M. and Guimaraes, S. 2006. *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. Phytomedicine. 13: 170-175.

Fumarola, L., Spinelli, R. and Brandonisio, O. 2004. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. Research in Microbiology. 155: 224-230.

Furness, B.W., Beach, M.J. and Roberts, J.M. 2000. Giardiasis Surveillance-United States, 1992-1997. Surveillance Summaries. 49:1-13.

Gadelha, A.P.R., Vidal F., Castro, T.M., Lopes, C.S., Albarello, N., Coelho, M.G.P., Figueiredo, S.F.L. and Monteiro-Leal, L.H. 2005. Susceptibility of *Giardia lamblia* to *Hovenia dulcis* extracts. Parasitology Research. 97: 399-407.

Gardner, T.B. and Hill, D.R. 2001. Treatment of Giardiasis. Clinical Microbiology Reviews. 14(1): 114-128.

Ghosh, S., Debnath, A., Sil, A., De S, Chattopadhyay, D J. and Das, P. 2000. PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene. Molecular and Cellular Probes. 14: 181-189.

Gillis, J.C. and Wiseman, L.R. 1996. Secnidazole: A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in the management of protozoal infections and bacterial vaginosis. Drugs. 51(4): 621-638.

Hanson, K.L. and Cartwright, C.P. 2001. Use of an enzyme immunoassay does not eliminate the need to analyze multiple stool specimens for sensitivity detection of *Giardia lamblia*. Journal of Clinical Microbiology. 39(2): 474-477.

Harris, J.C., Plummer, S, Turner, M.P. and Lloyd, D. 2000. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: *Allium sativum* (garlic) is an effective antigiardial. Microbiology. 146: 3119-3127.

Harris, J.C., Plummer, S. and Lloyd, D. 2001. Antigiardial drugs. Applied Microbiology and Biotechnology. 57: 614-619.

Janoff, E.N., Mead, J.R. and Echeverria, P. 1990. Endemic *Cryptosporidium* and *Giardia lamblia* infection in a Thai orphanage. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 43: 248-256.

Jimenez-Cardoso, E., Flores-Luna, A. and Perez-Urizar, J. 2004. *In vitro* activity of two phenyl-carbamate derivatives, singly and in combination with albendazole against albendazole-resistant *Giardia intestinalis*. Acta Tropica. 92: 237-244.

Jokipii, L. and Jopikii, A.M. 1980. *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to metronidazole and tinidazole. Journal of Infectious Diseases. 141: 317-325.

Kumath, K.R. and Murugasu, R. 1974. A comparative study of four methods for detecting *Giardia lamblia* in children with diarrheal disease and malabsorption. Gastroenterology. 16: 16-21.

Lane, S. and Lloyd, D. 2002. Current trends in research into the waterborn parasite *Giardia*. Clinical Microbiology Reviews. 28: 123-147.

Lebwohl, B., Deckellbaum, R.J. and Green, P.H.R. 2003. Giardiasis. Gastrointestinal Endoscopy. 57(7): 906-913.

Lee, S.H., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J. and Calderon, R.L. 2002. Surveillance for waterborn disease outbreaks- United States, 1999-2000. In Surveillance Summaries. 51: 1-48.

Legator, M.S., Conner, T.H. and Stoeckel, M., 1975. Detection of mutagenic activity of metronidazole and niridazole in body fluids of humans and mice. Science. 118(4193): 1118-1119.

Lemos, V., Graczyk, T.K., Alves, M., Lobo, M.L., Sousa, M.C., Antunes, F. and Matos, O. 2005. Identification and determination of the viability of *Giardia lamblia* cysts and *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts in human fecal and water supply samples by fluorescent in situ hybridization (FISH) monoclonal antibodies. Parasitology Research. 98: 48-53.

Lengerich, E.J., Addiss, D.G. and Juranek, D.D. 1994. Severe giardiasis in the United States. Clinical Infectious Diseases. 18: 760-763.

Levi, G.C., de Avila, C.A. and Amato Neto, A. 1977. Efficacy of various drugs for treatment of giardiasis. The American journal of tropical medicine and hygiene. 26(3): 564-565.

Lillie, R.D. 1969. H.J. conn's Biologycal stains. 8th ed. WAVERLY PRESS, INC. Baltimore, MD., U.S.A.

Liu, S.M., Brown, D.M., O'Donoghue, P., Upcroft, P. and Upcroft, J.A. 2000. Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*. Molecular and Biochemical Parasitology. 108: 137-140.

Majewska, A.C., Kasprzak, W., de Jonckheere, J.F. and Kaczmarek, E. 1991. Heterogeneity in the sensitivity of stocks and clones of *Giardia* to metronidazole and ornidazole. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 85: 67-69.

Maurya, M.R., Kumar, A., Bhat, A.R., Azam, A., Bader, C., and Rehder, D. 2006. Dioxo- and oxovanadium (V) complexes of thiohydrazone ONS donor ligands: synthesis, characterization, reactivity, and antiamoebic. Inorganic Chemistry. 45: 1260-1269.

Mayers, J.D., Kuharic, H.A. and Holmes, K.K. 1977. *Giardia lamblia* infection in homosexual men. British Journal of Venereal Diseases. 53: 54-55.

Mendelson, R.M. 1980. The treatment of giardiasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 74: 438-439.

Mukhopadhyay, R. M. and Chaudhuri, S. K. 1996. Rapid *in vitro* test for determination of anti-amoebic activity. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 90: 189-191.

Muller, J., Ruhle, G., Muller, N., Rossignol, J.F. and Hemphill, A. 2006. *In vitro* effects of thiazolides on *Giardia lamblia* WB clone C6 cultured axenically and in coculture with Caco2 cells. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 50(1): 162-170.

Oberhuber, G., Kastner, N. and Stolte, M. 1997. Giardiasis: a histologic analysis of 567 cases. Scandinavian journal of gastroenterology. 32: 48-51.

Oliver, M.H., Harriso, N.K., Bishop, J.E. Cole, P.J. and Laurent, G.J. 1989. A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: application for assessment of growth factors. Journal of cell Science. 92: 513-518.

Ortiz, J.J., Ayoub, A., Chegne, N.L. and Favennec, L. 2001. Randomized clinical study of nitazoxanide compared to metronidazole in the treatment of symptomatic giardiasis in children from Northern Peru. Aliment Pharmacology and Therapeutics. 15: 1409-1415.

Perez-Arriaga, L., Mendoza-Magana, M.L., Cortes-Zarate, R., Corona-Rivera, A., Bobadilla-Morale,s L., Troyo-Sanroman, R. and Ramirez-Herrera, M.A. 2006. Cytoxic effect of curcumin on *Giardia lamblia* trophozoites. Acta Tropica. 98: 152-161.

Ritchie, L.S. 1948. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. Bulletin United States Army Medical Dept. 8: 326.

Rothman, S.W. 1986. Technique for measuring 50% end points in cytotoxicity assay for *Clostridium difficile* toxins. Journal of Clinical Pathology. 39: 672-676.

Roxstrom-Lindquist, K., Palm, D., Reiner, D., Ringqvist, E. and Svard, S.G. 2006. *Giardia* immunity-an update. Trends in Parasitology. 22(1): 26-31.

Rustia, M. and Shubik, P. 1972. Induction of lung tumors and malignant lymphomas in mice by metronidazole. Journal of the Nation Center Institute. 48(3): 721-729.

Sandhu, H., Mahajan, R.C. and Ganguly, N.K. 2004. Flowcytometric assessment of the effect of drugs on *Giardia lamblia* trophozoites *in vitro*. Molecular and Cellular Biochemistry. 265: 151-160.

Saravanan, B.C., Sreekumar, C., Bansal, G.C., Ray, D., Rao, J.R. and Mishra, A.K. 2003. A rapid MTT colorimetric assay to assess the proliferative index of two Indian stains of *Theileria annulata*. Veterinary Parasitology. 113: 211-216.

Sawangjaroen, N., Subhadhirasakul, S., Phongpaichit, S., Siripanth, C., Jamjaroen, K. and Sawangjaroen, K. 2005. The *in vitro* anti-giardial activity of extracts from plants that are used for self-medication by AIDS patients in southern Thailand. Parasitology Research. 95: 17-21.

Saxena, A., Chugh, S. and Vinayak, V.K. 1985. Modulation of host immune responses by metronidazole. Indian Journal of Medical Researches. 81: 387-390.

Shaik. M.S., Chatterjee, A. and Singh, M. 2004. Effects of monensin liposomes on the cytotoxicity, apoptosis and expression of multidrug resistance genes in doxorubicin-resistant human breast tumour (MCF-7/dox) cell-line. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 56: 899-907.

Siripanth, C., Chintana, T., Tharaphan, Y. and Lekkra, A. 1995. Cloning of Thai strain *Giardia intestinalis*. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology. 13: 71-73.

Sousa, M.C. and Poiares-da-Silva, J. 1999. A new method for assessing metronidazole susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 43(12): 2939-2942.

Speelman, P. 1985. Single-dose tinidazole for the treatment of *Giardiasis*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 27(2): 277-229.

Steven, D.P. 1985. Selective primary health care; strategies for control of disease in the developing world. XIX. Giardiasis. Reviews of infectious diseases. 7: 530-535.

Symposium on giardiasis. 1980. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 74: 427-448.

Tessier, J.L. and Davies, G.A.L. 1999. Giardiasis. Infectious Diseases Update. 6(1): 8-11.

Thompson, R.C.A. 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. International Journal for Parasitology. 30: 1259-1267.

Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K. and Watanabe, M. 1999. A water-soluble tetrazolium salt for colorimetric cell: viability assay. Analytical Communications. 36: 47-50.

Tracy, J.W. and Webster, L.T. Jr. 1996. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. In: Hardman J. G., Limbird (eds) L.E. Goodman and Gilman's. The

pharmacological basis of therapeutics, 9th ed. McGraw-Hill Book Co., New York, N.Y. pp 987-1008.

Ungar, B.L.P., Yolken, R.H., Nash, T.E. and Quinn, T.C. 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection do *Giardia lamblia* in feccal specimens. The Journal of infectious diseases. 149: 90-97.

Upcroft, J.A. and Upcroft, P. 2001. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45(6): 1810-1814.

Vidal, F., Vidal, J.C. Gadelha, A.P.R., Lopes, C.S., Coelho, M.G.P. and Monteiro-Leal, L.H. 2007. *Giardia lamblia*: The effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. Experimental Parasitology.115: 25-31.

Williams, C., Espinosa, O.A., Montenegro, H., Cubilla, L., Capson, T.L., Ortega-Barria, E. and Romero, L.I. 2003. Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for *Leishmania*. Journal of Microbiology methods. 55: 813-816.

Wolfe, M.S. 1978. Giardiasis. The New England Journal of Medicine. 298: 319-321.

Wolfe, M.S. 1992. Giardiasis. Clinical Microbiology Reviews. 5: 93-100.

Wright, C.W., Melwani, S.I., Phillipson, J.D., and Warhurst, D.C. 1992. Determination of anti-giardial activity in vitro by means of soluble formazan production. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 86: 517-519.

Wright, C.W., O'Neill, M.J., Phillipson J.D. and Warhurst, D.C. 1988. Use of microdilution to assess *in vitro* antiamoebic activities of *Brucea javanica* fruits, *Simarouba amara* stem, and a number of quassinoids. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 32(11): 1725-1729.

Wright, S.G. and Tomkins, A.M. 1997. Quantification of the lymphocytic infiltration in jejunal epithelium in giardiasis. Clinical and experimental immunology. 29: 408-412.

Wright, S.G., Tomkins, A.M. and Ridley, D.S. 1977. Giardiasis clinical and therapeutic aspect. Gut. 18: 343-350.

http://en.wikipedia.org/wiki/Methylene_blue. (Access date 2 March 2008)

http://en.wikipedia.org/wiki/Staining_(biology). (Access date 17 January 2008)

http://ink.primate.wisc.edu/~thomson/graphics/hemocytometer.gif (Access date 11 January 2008)

http://www.inselhunde.de/images/Giardien2.jpg

http://www.microscopyu.com/articles/formulas/measurements.html (Access date 11 January 2008)

http://www.mt.mahidol.ac.th/eLearning/Parasite/giardia lamblia.html (Access date 27 January 2008)

http://www.mt.mahidol.ac.th/eLearning/Parasite/life_cyclegl.html (Access date 29 January 2008)

http://www.nilesbio.com/images/categories/C281.jpg (Access date 2 March 2008)

http://www.sigmaaldrich.com/structureimages/40/mfcd00005040.gif (Access date 2 March 2008)

http://www.usca.edu/chemistry/spectra/crysviol.gif (Access date 2 March 2008)

http://www.vcharkarn.com/vcafe/43097 (Access date 17 January 2008)

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Giardia intestinalis*

1. อาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Giardia intestinalis* ในการทดลองครั้งนี้ ตามสูตรของ (Diamond *et al*., 1995) ซึ่งมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

YI broth

น้ำกลั่น	00	ml
K_2HPO_4	1	g
KH_2PO_4	0.	g
NaCl	1	g
Yeast extract	30	g
Glucose	10	g
L-cysteine hydrochloride	2	g
Ascorbic acid	0.2	g
Ferric ammonium citrate	22.8	mg
Dehydrated bovine bile	500	mg
เติมน้ำกลั่นจนครบ	880	ml

ปรับให้ได้ pH 7.0-7.1 ด้วย 0.1 N NaOH ; Osmolarity 380 milliosmols/kg โดยเพิ่ม/ลด NaCl กรองผ่าน membrane filter ขนาดรู 0.45 μm แบ่งใส่ขวด Duran ขวดละ 88 ml เก็บที่-20˚C ได้อย่างน้อย เดือน

Vitamin mixture #18

Solution 1

A	Niacinamide	45	mg
	Pyridoxal hydrochloride	4	mg
	Calcium pantothenate	23	mg
	Thianium hydrochloride	5	mg
	Vitamine B12	1.2	mg
	เติมน้ำกลั่นจนครบ	25	ml
B	Riboflavin	7	mg
	เติมน้ำกลั่นจนครบ	45	ml

C	Folic acid	5.5	mg
	เติมน้ำกลั่นจนครบ	45	ml
D	d-Biotin	2	mg
	เติมน้ำกลั่นจนครบ	45	ml

หมายเหตุ B และ C จะละลายน้ำกลั่นได้ดีขึ้น ถ้าเติม 0.1 N NaOH เล็กน้อย ถ้าทุกอย่างรวมกันแล้วขุ่น แสดงว่ามี NaOH มากเกินไป ต้องทิ้ง

Solution 2

DL-□,8 thioclic acid	1	ml
95% ethanol	5	ml
Tween 80	500	mg
เติมน้ำกลั่นจนครบ	20	ml

ผสม Solution 1 และ Solution 2 เข้าด้วยกัน

เติมน้ำกลั่นจนเป็น	200	ml

Sterile โดยการกรองผ่านกระดาษกรองชนิด cellulose nitrate ขนาดรู 0.22 μm เก็บในตู้เย็น 4˚C ในที่มืดได้ไม่เกิน □เดือน

Bovine serum

Complete medium

YI broth	88	ml
Vitamin mixture #18	2	ml
Bovine Serum	10	ml

เก็บในตู้เย็น 4˚C ในที่มืด ใช้ภายใน 9□ ชั่วโมง เวลาใช้ให้ใส่ใน 1□×125 Screw capped tube ในปริมาณ 10.5-12 ml

ภาคผนวก ข

1. การเตรียมสารสกัดสมุนไพรหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์ความเข้มข้น 2,000 และ 800 µg/ml

ดูดสารสกัดสมุนไพรหยาบจาก stock solution ความเข้มข้น 100 mg/ml มา 20 µl เติม media 980 µl

ดูดสารสกัดสมุนไพรบริสุทธิ์จาก stock solution ความเข้มข้น 10 mg/ml มา 80 µl เติม media 920 µl

2. การเตรียม metronidazole, ornidazole และ furazolidone ความเข้มข้น 20 µg/ml

จาก เดิมความเข้มข้น 10 mg/ml ดูดมา 2 µl เติม media 998 µl

3. การเตรียม 70% alcohol จาก 95% alcohol ปริมาตร 1,000 ml

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$(95)\ V_1 = (70)\ (1{,}000)$

$V_1 = 736.84$ ml

ดังนั้นต้องใช้ 95% alcohol จำนวน ~737 ml แล้วเติมน้ำกลั่น 263 ml

4. การเตรียม Cleaning solution (100 ml)

Potassium Dichromate ($K_2Cr_2O_7$)	10	g
Conc. H_2SO_4	25	g
น้ำกลั่น	75	ml

ละลาย $K_2Cr_2O_7$ ในน้ำกลั่นจนละลายเข้ากันดี แล้วค่อยๆ เติม Conc. H_2SO_4 ในสภาวะที่หล่อเย็นจนครบ 25 ml ปรับปริมาตรจนได้ 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

ภาคผนวก ค

การเตรียมสีย้อมและสารสำหรับสีย้อม

การเตรียมสีย้อม

1. การเตรียม eosin ปริมาตร 500 ml

- การเตรียม 0.25% eosin

น้ำ 100 ml มี eosin 0.25 g.

น้ำ 500 ml มี eosin $\frac{0.25 \text{ g.} \times 500 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 1.25 \text{ g.}$

ดังนั้นต้องชั่ง eosin 1.25 g. เติมน้ำกลั่นจนครบ 500 ml

- การเตรียม 0.5% eosin

น้ำ 100 ml มี eosin 0.5 g.

น้ำ 500 ml มี eosin $\frac{0.5 \text{ g.} \times 500 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 2.5 \text{ g.}$

ดังนั้นต้องชั่ง eosin 2.5 g. เติมน้ำกลั่นจนครบ 500 ml

- การเตรียม 1% eosin

น้ำ 100 ml มี eosin 1.0 g.

น้ำ 500 ml มี eosin $\frac{1.0 \text{ g.} \times 500 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 5.0 \text{ g.}$

ดังนั้นต้องชั่ง eosin 5.0 g. เติมน้ำกลั่นจนครบ 500 ml

2. การเตรียม methylene blue ปริมาตร 500 ml

- การเตรียม 0.05% methylene blue

PBS (pH 7.2) 100 ml มี methylene blue 0.05 g.

PBS (pH 7.2) 500 ml มี methylene blue $\frac{0.05 \text{ g.} \times 500 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 0.25 \text{ g.}$

ดังนั้นต้องชั่ง methylene blue 0.25 g. เติม PBS (pH 7.2) จนครบ 500 ml

- การเตรียม 0.1% methylene blue

PBS (pH 7.2) 100 ml มี methylene blue 0.1 g.

PBS (pH 7.2) 500 ml มี methylene blue $\frac{0.1 \text{ g.} \times 500 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 0.5 \text{ g.}$

ดังนั้นต้องชั่ง methylene blue 0.5 g. เติม PBS(pH 7.2) จนครบ 500 ml

- การเตรียม 0.2% methylene blue

PBS (pH 7.2) 100 ml มี methylene blue 0.2 g.

PBS (pH 7.2) 500 ml มี methylene blue $\frac{0.2 \text{ g.} \times 500 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 1.0 \text{ g.}$

ดังนั้นต้องชั่ง methylene blue 1.0 g. เติม PBS (pH 7.2) จนครบ 500 ml

3. การเตรียม crystal violet ปริมาตร 500 ml

- การเตรียม 0.05% crystal violet

เมธานอล 100 ml มี crystal violet 0.05 g.

เมธานอล 500 ml มี crystal violet $\frac{0.05 \text{ g.} \times 500 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 0.25 \text{ g.}$

ดังนั้นต้องชั่ง crystal violet 5.0 g. เติมเมธานอลจนครบ 500 ml

- การเตรียม 0.1% crystal violet

เมธานอล 100 ml มี crystal violet 0.1 g.

เมธานอล 500 ml มี crystal violet $\frac{0.1 \text{ g.} \times 500 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 0.5 \text{ g.}$

ดังนั้นต้องชั่ง crystal violet 0.5 g. เติมเมธานอลจนครบ 500 ml

- การเตรียม 0.2% crystal violet

เมธานอล 100 ml มี crystal violet 0.2 g.

เมธานอล 500 ml มี crystal violet $\frac{0.2 \text{ g.} \times 500 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 1.0 \text{ g.}$

ดังนั้นต้องชั่ง crystal violet 1.0 g. เติมเมธานอลจนครบ 500 ml

4. การเตรียมสีย้อม trypan blue 0.04%

- ชั่งสี trypan blue 0.06 g ละลายด้วย PBS 10 ml ได้ความเข้มข้นของสี 0.6% ดูดมา 20 µl เติมลงในหลุมที่ทดสอบคนให้เข้ากันทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที ก่อนนับเซลล์ควรคนให้เข้ากันอีกครั้ง

การเตรียมสารสำหรับสีย้อม

1. การเตรียม 0.9% NaCl ปริมาตร 1,000 ml

น้ำ 100 ml มี NaCl 0.9 g.

น้ำ 1,000 ml มี NaCl $\frac{0.9\text{ g.} \times 100\text{ ml}}{1{,}000\text{ ml}}$ = 9.0 g.

ดังนั้นต้องชั่ง NaCl 9.0 g. เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 ml

2. การเตรียม 0.1 M NaOH ปริมาตร 500 ml

น้ำ 1,000 ml มี NaOH 0.1 mole

น้ำ 500 ml มี NaOH $\frac{0.1\text{mole} \times 1{,}000\text{ml}}{500\text{ ml}}$ = 0.05 mole

จากสูตร g = nM

= 0.05 mole ×40

= 2 g.

ดังนั้นต้องชั่ง NaOH 2.0 g. เติมน้ำกลั่นจนครบ 500 ml

3. การเตรียม 0.1M HCl ปริมาตร 500 ml

กรด HCl มีน้ำหนักกรัมโมเลกุล (M□) = 36

มีความเข้มข้น = 35.4%

มี specific gravity (D) = 1.18

คำนวณโมลาริตีของ HCl จากสูตร

$C = \frac{10(\%)D}{M□}$

$= \frac{10 \times 35.4 \times 1.18}{36}$

= 11.60 M

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$11.60 \times V_1 = 0.1 \times 500$

$V_1 = \frac{50}{11.60}$

$= 4.31$

ดังนั้นต้องใช้ HCl จำนวน 4.31 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 500 ml

4. การเตรียม sodium dodexyl sulphate (SDS) 2% ปริมาตร 500 ml

น้ำ 100 ml มี SDS 0.1

น้ำ 500 ml มี SDS $\frac{0.1 \times 500 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 0.5$

ดังนั้น ชั่ง SDS 0.5 g. เติมน้ำกลั่นจนครบ 500 ml

5. การเตรียม phosphate buffer saline (pH 7.2) ปริมาตร 500 ml

- สารละลาย 0.85% NSS

NaCl	0.85	g
น้ำกลั่น	100	ml

- การเตรียม M/15 KH_2PO_4

KH_2PO_4	9.07	g
น้ำกลั่น	1000	ml

- การเตรียม M/15 Na_2HPO_4

Na_2HPO_4	9.46	g
น้ำกลั่น	1000	ml

นำสารละลายทั้งหมดมารวมกันตามปริมาตรดังนี้

0.85% NSS	500	ml
M/15 KH_2PO_4	410	ml
M/15 Na_2HPO_4	90	ml

นำไปปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.2 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)

ภาคผนวก ง

การตรวจนับจำ านวนเชื้อด้ วยวิ ธี Counting chamber (haemocytometer)

1. ทำความสะอาด counting chamber และ cover slip โดยใช้กระดาษเช็ดให้สะอาด
2. นำหลอดเชื้อไปเขย่าให้เข้ากันดี แล้วใช้ pasture pipette ดูดเชื้อ จากนั้นแตะปลายของ pasture pipette ลงบนช่องว่างระหว่าง cover slip กับ counting chamber โดยค่อยๆ ปล่อยเชื้อที่ต้องการนับออกมา ระวังอย่าให้ล้น
3. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10x ปรับระยะจนเห็นตารางแบ่งช่องชัดเจน แล้วจึงเปลี่ยนเป็นกำลังขยาย 40x
4. นับจำนวนเซลล์จากช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ทั้งหมดตรงมุมเล็กทั้ง 4 ช่อง (บริเวณสีขาว) ดังรูป แล้วหาค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ต่อ 1 ช่อง ทำ 2 ซ้ำ
5. กำหนดบริเวณที่ต้องการนับจำนวนเซลล์ เช่น นับเฉพาะเซลล์ที่คร่อมเส้นด้านบน และด้านซ้ายของแต่ละช่อง และจะไม่นับเซลล์ที่คร่อมด้านขวา มิฉะนั้นอาจทำให้เกิดความสับสนจึงทำให้เกิดการนับซ้ำหรือลืมนับ
6. บันทึก และคำนวณ
7. ล้าง counting chamber และ cover slip ให้สะอาด เช็ดให้แห้ง แล้วเก็บใส่กล่อง

การคำนวณการนับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer

ปริมาตร 1 ช่อง (บริเวณสีขาว)	=	1 mm ×1 mm ×0.1 mm
	=	$0.1\ mm^3$
ถ้านับ 4 บริเวณ	=	$0.1 \times 4\ mm^3$
	=	$0.4\ mm^3$
1 ml	=	$1{,}000\ mm^3$
	=	1,000 µl
Volume correction factor	=	ปริมาตรที่ต้องการ (1,000µl) / ปริมาตรที่นับจริง
	=	1,000 / 0.4
	=	2,500
ดังนั้นจำนวนเซลล์ใน 1 ml	=	จำนวนเซลล์ที่นับได้ × volume correction factor

สมมตินับในบริเวณสีขาวทั้ง 4 บริเวณ ได้ Y เซลล์

ดังนั้น จำนวนเซลล์ใน 1 ml = $Y \times 2{,}500$

ถ้าค่าของ Y = 150 จะมีเซลล์ทั้งหมด

	=	$150 \times 2{,}500$
	=	375,000 cell/ml
	=	3.75×10^5 cell/ml

ภาคผนวก จ

ตารางภาคผนวก จ 1 ค่าเฉลี่ย OD และค่า SE ที่ได้จากการวัดความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ ของเชื้อ *G. intestinalis* บ่มเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของการทดลอง 3 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ หลังบ่มล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ fix ด้วย methanol และย้อมด้วยสี eosin 0.5% การเติมสารละลายลงใน plate ทำโดยการเทจากบิกเกอร์

จำนวนเชื้อ (cell/ml)	2×10^{7}	1×10^{7}	5×10^{6}	2.5×10^{6}	1.25×10^{6}	6.25×10^{5}	3.13×10^{5}	1.56×10^{5}	7.8×10^{4}	3.9×10^{4}	1.95×10^{4}	9.75×10^{3}	4.88×10^{3}	2.44×10^{3}	1.22×10^{3}	6.1×10^{2}
เฉลี่ย 24 ชม.	0.29± 0.08	0.23± 0.06	0.21± 0.06	0.16± 0.06	0.10± 0.06	0.08± 0.03	0.05± 0.01	0.05± 0.02	0.04± 0.01	0.03± 0.01	0.02± 0.01	0.02± 0.01	0.02± 0.01	0.02± 0.01	0.02± 0.01	0.03± 0.01
เฉลี่ย 48 ชม.	0.19± 0.06	0.21± 0.06	0.20± 0.05	0.18± 0.05	0.21± 0.09	0.18± 0.11	0.14± 0.08	0.11± 0.04	0.08± 0.04	0.04± 0.02	0.05± 0.01	0.03± 0.01	0.03± 0.02	0.03± 0.01	0.02± 0.04	0.04± 0.01
เฉลี่ย 72 ชม.	0.19± 0.05	0.20± 0.04	0.17± 0.01	0.15± 0.02	0.17± 0.03	0.20± 0.08	0.17± 0.10	0.17± 0.11	0.13± 0.08	0.08± 0.02	0.06± 0.02	0.04± 0.01	0.03± 0.02	0.03± 0.02	0.03± 0.01	0.03± 0.02

ตารางภาคผนวก จ 2 ค่า OD และค่า SD ที่ได้จากการวัดความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อ *G. intestinalis* บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดลอง 3 ครั้ง ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์กับไม่ล้าง fix ด้วย methanol และย้อมด้วยสี eosin 0.5% การเติมสารละลายลงใน plate ทำโดยการเทจากบิกเกอร์

จำนวนเชื้อ (cell/ml)	**2×10^{7}**	**1×10^{7}**	**5×10^{6}**	**2.5×10^{6}**	**1.25×10^{6}**	**6.25×10^{5}**	**3.13×10^{5}**	**1.56×10^{5}**	**7.8×10^{4}**	**3.9×10^{4}**	**1.95×10^{4}**	**9.75×10^{3}**	**4.88×10^{3}**	**2.44×10^{3}**	**1.22×10^{3}**	**6.1×10^{2}**
ล้างครั้งที่ 1	0.46± 0.06	0.13± 0.14	0.05± 0.07	0.06± 0.04	0.03± 0.00	0.00± 0.03	-0.01± 0.01	-0.02± 0.01	0.01± 0.01	-0.01± 0.03	-0.01± 0.04	-0.01± 0.02	-0.01± 0.02	-0.03± 0.01	-0.02± 0.02	-0.01± 0.02
ล้างครั้งที่ 2	0.92± 0.06	0.83± 0.09	0.61± 0.05	0.53± 0.03	0.21± 0.02	0.33± 0.02	0.12± 0.03	0.06± 0.03	0.04± 0.08	-0.01± 0.01	-0.01± 0.04	0.02± 0.03	-0.05± 0.02	0.00± 0.01	0.00± 0.03	-0.01± 0.08
ล้างครั้งที่ 3	0.41± 0.03	0.23± 0.17	0.27± 0.02	0.19± 0.02	0.12± 0.02	0.09± 0.01	0.07± 0.02	0.03± 0.01	0.07± 0.02	0.06± 0.05	0.01± 0.04	0.03± 0.04	0.05± 0.02	0.03± 0.04	0.05± 0.05	0.06± 0.02
ไม่ล้างครั้งที่ 1	0.41± 0.16	0.32± 0.08	0.32± 0.02	0.19± 0.03	0.16± 0.05	0.11± 0.03	-0.03± 0.02	-0.02± 0.01	-0.01± 0.01	-0.03± 0.02	0.01± 0.01	-0.01± 0.03	-0.01± 0.01	-0.03± 0.02	-0.03± 0.01	-0.01± 0.01
ไม่ล้างครั้งที่ 2	0.90± 0.06	0.73± 0.09	0.45± 0.05	0.31± 0.03	0.19± 0.02	0.11± 0.02	0.04± 0.03	0.07± 0.03	0.04± 0.08	-0.03± 0.01	-0.01± 0.04	-0.02± 0.03	0.01± 0.02	-0.02± 0.01	-0.03± 0.03	0.07± 0.08
ไม่ล้างครั้งที่ 3	0.81± 0.18	0.73± 0.02	0.51± 0.25	0.37± 0.19	0.23± 0.03	0.13± 0.01	0.08± 0.02	0.10± 0.04	0.02± 0.01	-0.02± 0.01	-0.03± 0.00	-0.02± 0.01	-0.03± 0.02	-0.02± 0.01	-0.02± 0.02	0.04± 0.04

ตารางภาคผนวก จ 3 ค่า OD และค่า SD ที่ได้จากการวัดความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อ *G. intestinalis* บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการทดลอง 3 ครั้ง ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์กับไม่ล้าง fix ด้วย methanol และย้อมด้วยสี eosin 0.5% การเติมสารละลายลงใน plate ทำโดยการเทจากบิกเกอร์

จำนวนเชื้อ (cell/ml)	2×10^{7}	1×10^{7}	5×10^{6}	2.5×10^{6}	1.25×10^{6}	6.25×10^{5}	3.13×10^{5}	1.56×10^{5}	7.8×10^{4}	3.9×10^{4}	1.95×10^{4}	9.75×10^{3}	4.88×10^{3}	2.44×10^{3}	1.22×10^{3}	6.1×10^{2}
ล้างครั้งที่ 1	0.48± 0.15	0.58± 0.28	0.38± 0.28	0.11± 0.05	0.12± 0.07	0.07± 0.05	0.13± 0.02	0.08± 0.02	0.05± 0.03	0.04± 0.04	0.03± 0.06	0.06± 0.03	0.06± 0.04	0.03± 0.01	0.02± 0.02	0.06± 0.04
ล้างครั้งที่ 2	0.28± 0.08	0.34± 0.12	0.20± 0.03	0.12± 0.01	0.08± 0.00	0.06± 0.01	0.06± 0.02	0.08± 0.02	0.04± 0.02	0.02± 0.02	0.03± 0.03	0.00± 0.01	-0.02± 0.00	0.00± 0.01	0.01± 0.05	0.00± 0.02
ล้างครั้งที่ 3	0.59± 0.32	0.19± 0.03	0.09± 0.02	0.05± 0.01	0.01± 0.02	0.03± 0.01	0.03± 0.03	0.03± 0.03	0.04± 0.07	-0.01± 0.02	-0.04± 0.01	-0.02± 0.01	-0.04± 0.00	-0.04± 0.03	-0.05± 0.01	0.01± 0.01
ไม่ล้างครั้งที่ 1	0.61± 0.05	0.61± 0.20	0.63± 0.09	0.43± 0.04	0.47± 0.29	0.18± 0.01	0.11± 0.01	0.08± 0.01	0.05± 0.01	0.02± 0.01	0.02± 0.01	0.01± 0.01	0.01± 0.02	0.01± 0.02	0.00± 0.02	0.02± 0.00
ไม่ล้างครั้งที่ 2	0.52± 0.07	0.62± 0.06	0.41± 0.06	0.26± 0.02	0.15± 0.03	0.10± 0.01	0.09± 0.04	0.09± 0.02	0.04± 0.02	-0.01± 0.03	-0.03± 0.01	-0.02± 0.05	-0.04± 0.00	-0.02± 0.02	-0.03± 0.02	0.00± 0.02
ไม่ล้างครั้งที่ 3	0.44± 0.06	0.41± 0.13	0.33± 0.02	0.18± 0.02	0.11± 0.02	0.08± 0.01	0.05± 0.01	0.06± 0.02	0.05± 0.02	0.03± 0.02	0.01± 0.01	-0.01± 0.05	-0.01± 0.01	-0.01± 0.02	-0.01± 0.02	0.03± 0.02

ตารางภาคผนวก จ 4 ค่าเฉลี่ย OD และค่า SE ที่ได้จากการวัดความเข้มข้นเริ่มต้นของ *G. intestinalis* บ่มเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ล้างด้วยวิธีการแช่ plate ในทุกขั้นตอนและย้อมด้วยสี eosin 0.5% ทดลอง 3 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ

จำนวนเชื้อ (cell/ml)	2×10^{7}	1×10^{7}	5×10^{6}	2.5×10^{6}	1.25×10^{6}	6.25×10^{5}	3.13×10^{5}	1.56×10^{5}	7.8×10^{4}	3.9×10^{4}	1.95×10^{4}	9.75×10^{3}	4.88×10^{3}	2.44×10^{3}	1.22×10^{3}	6.1×10^{2}
เฉลี่ย 24 ชม.	0.47± 0.01	0.51± 0.06	0.49± 0.05	0.45± 0.08	0.32± 0.03	0.26± 0.08	0.24± 0.01	0.20± 0.01	0.11± 0.05	0.11± 0.01	0.11± 0.04	0.06± 0.01	0.08± 0.02	0.07± 0.03	0.03± 0.03	0.03± 0.01
เฉลี่ย 48 ชม.	0.35± 0.08	0.47± 0.03	0.55± 0.02	0.59± 0.03	0.49± 0.01	0.37± 0.03	0.27± 0.02	0.19± 0.01	0.10± 0.02	0.14± 0.22	0.13± 0.03	0.07± 0.04	0.09± 0.02	0.11± 0.04	0.09± 0.04	0.01± 0.02
เฉลี่ย 72 ชม.	0.52± 0.02	0. 0.04	0.56± 0.07	0.53± 0.02	0.50± 0.01	0.38± 0.02	0.28± 0.02	0.25± 0.02	0.13± 0.02	0.17± 0.04	0.25± 0.22	0.20± 0.06	0.20± 0.13	0.13± 0.07	0.08± 0.03	0.06± 0.04

ตารางภาคผนวก จ 5 ค่า OD ที่ได้จากการวัดจำนวนเชื้อที่ย้อมด้วยสี eosin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ได้จากการล้างด้วยวิธีการเท methanol และน้ำจากบิกเกอร์ในทุกขั้นตอน จากการทดลอง 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ซ้ำ

	ย้อมสี eosin 0.25%			ย้อมสี eosin 0.5%			ย้อมสี eosin 1%		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 3
	0.12	0.09	0.04	0.18	0.15	0.26	0.14	0.25	0.29
	0.06	0.07	0.01	0.07	0.18	0.12	0.14	0.21	0.15
	0.04	0.03	0.15	0.22	0.22	0.04	0.19	0.29	0.06
	0.20	0.04	0.05	0.18	0.15	0.06	0.11	0.28	0.07
	0.19	0.07	0.06	0.20	0.13	0.14	0.05	0.29	0.14
	0.15	0.09	0.03	0.18	0.16	0.05	0.20	0.25	0.16
	0.20	0.05	0.07	0.13	0.20	0.10	0.12	0.20	0.20
	0.13	0.13	0.22	0.04	0.16	0.20	0.19	0.34	0.19
	0.12	0.10	0.15	0.15	0.18	0.18	0.19	0.36	0.41
	0.16	0.13	-0.03	0.17	0.15	0.26	0.15	0.35	0.17
	0.10	0.03	0.02	0.18	0.09	0.10	0.21	0.29	0.18
	0.16	0.04	0.00	0.19	0.33	0.09	0.36	0.29	0.04
	0.16	0.09	0.01	0.13	0.18	0.12	0.21	0.27	0.06
	0.21	0.09	0.02	0.13	0.09	0.08	0.16	0.30	0.08
	0.10	0.05	0.03	0.15	0.16	0.17	0.15	0.10	0.14
เฉลี่ย	0.14	0.07	0.06	0.15	0.17	0.13	0.17	0.27	0.16
SD	0.05	0.03	0.07	0.05	0.06	0.07	0.07	0.07	0.10
CV	37.04	46.14	120.10	31.52	34.53	52.86	39.56	24.30	61.77

ตารางภาคผนวก จ 6 ค่า OD ที่ได้จากการวัดจำนวนเชื้อที่ย้อมด้วยสี crystal violet ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ได้จากการล้างด้วยวิธีการเท methanol และน้ำจากบิกเกอร์ในทุกขั้นตอน จากการทดลอง 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ซ้ำ

	0.05 % crystal violet			0.1 % crystal violet			0.2 % crystal violet		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
	0.04	0.29	0.08	0.05	0.70	0.00	0.09	0.02	0.15
	0.15	0.14	0.04	0.21	0.20	0.30	0.11	0.05	0.27
	0.32	0.17	0.09	0.43	0.34	0.34	0.29	0.33	0.63
	0.16	0.14	0.13	0.27	0.32	0.51	0.16	0.22	0.39
	0.10	0.19	0.13	0.14	0.31	0.31	0.36	0.23	0.64
	0.36	0.33	0.09	0.33	0.83	0.58	0.34	0.58	0.34
	0.36	0.16	0.11	0.15	0.43	0.09	0.47	0.59	0.35
	0.05	0.16	0.13	0.34	0.16	-0.04	0.42	1.32	0.00
	0.03	0.27	0.03	0.09	0.81	0.23	0.21	-0.03	0.35
	0.09	0.38	0.12	0.22	0.16	0.20	0.20	0.72	0.17
	0.12	0.20	0.12	0.35	0.13	0.24	0.26	0.62	0.74
	0.08	0.50	0.11	0.58	0.18	0.52	0.16	0.84	0.42
	0.05	0.26	0.14	0.37	0.18	0.54	0.32	0.91	0.54
	0.22	0.15	0.19	0.09	0.49	0.39	0.29	0.09	0.49
	0.02	0.21	0.20	0.35	0.38	0.19	0.83	1.00	0.34
เฉลี่ย	0.14	0.24	0.11	0.27	0.37	0.29	0.30	0.50	0.39
SD	0.12	0.10	0.05	0.15	0.24	0.19	0.18	0.41	0.20
CV	83.24	43.63	39.37	55.49	63.81	65.41	61.61	82.28	51.53

ตารางภาคผนวก จ 7 ค่า OD ที่ได้จากการวัดจำนวนเชื้อที่ย้อมด้วยสี methylene blue ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ได้จากการล้างด้วยวิธีการเท methanol และน้ำจากบิกเกอร์ในทุกขั้นตอน จากการทดลอง 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ซ้ำ

	0.05 % methylene blue			0.1 % methylene blue			0.2 % methylene blue		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
	0.30	0.12	0.25	0.30	0.21	0.20	0.44	0.23	0.88
	0.29	0.29	0.16	0.21	0.23	0.37	0.33	0.20	0.49
	0.12	0.28	0.26	0.15	0.17	0.26	0.37	0.17	0.40
	0.29	0.18	0.16	0.13	0.19	0.26	0.34	0.09	0.61
	0.10	0.31	0.18	0.18	0.17	0.41	0.32	0.16	0.60
	0.07	0.25	0.24	0.26	0.19	0.41	0.32	0.09	0.85
	0.10	0.20	0.21	0.18	0.14	0.63	0.28	0.19	0.93
	0.49	0.19	0.21	0.66	0.10	0.56	0.46	0.07	0.89
	0.43	0.15	0.20	0.31	0.23	0.24	0.49	0.35	1.04
	0.24	0.23	0.29	0.41	0.20	0.27	0.41	0.07	0.51
	0.12	0.25	0.33	0.23	0.17	0.20	0.30	0.17	0.53
	0.17	0.15	0.28	0.21	0.16	0.15	0.34	0.07	0.58
	0.25	0.24	0.22	0.24	0.13	0.28	0.31	-0.03	0.62
	0.31	0.22	0.29	0.29	0.19	0.27	0.35	0.09	0.66
	0.10	0.26	0.28	0.27	0.13	0.52	0.36	0.11	0.73
เฉลี่ย	0.22	0.22	0.24	0.27	0.17	0.33	0.36	0.14	0.69
SD	0.13	0.06	0.05	0.13	0.04	0.14	0.06	0.09	0.19
CV	57.80	25.23	21.51	47.76	21.18	42.53	17.08	66.47	27.30

ตารางภาคผนวก จ 8 ค่า OD ที่ได้จากการวัดจำนวนเชื้อที่ย้อมด้วยสี eosin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ได้จากการล้างด้วยวิธีการแช่ plate ลงใน methanol และน้ำในทุกขั้นตอน จากการทดลอง 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ซ้ำ

	ย้อมสี eosin 0.25%			ย้อมสี eosin 0.5%			ย้อมสี eosin 1.0%		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
	0.12	0.12	0.11	0.14	0.12	0.15	0.42	0.16	0.28
	0.12	0.13	0.08	0.15	0.10	0.17	0.53	0.19	0.29
	0.09	0.13	0.09	0.13	0.10	0.17	0.42	0.28	0.30
	0.13	0.12	0.15	0.15	0.13	0.19	0.31	0.22	0.30
	0.17	0.14	0.11	0.17	0.10	0.22	0.33	0.25	0.83
	0.12	0.11	0.10	0.15	0.11	0.15	0.39	0.25	0.32
	0.13	0.12	0.20	0.14	0.11	0.20	0.29	0.20	0.32
	0.12	0.13	0.16	0.15	0.10	0.19	0.30	0.28	0.30
	0.13	0.12	0.15	0.17	0.10	0.16	0.41	0.26	0.23
	0.17	0.14	0.20	0.16	0.15	0.16	0.23	0.18	0.26
	0.12	0.12	0.19	0.15	0.15	0.19	0.31	0.27	0.31
	0.14	0.10	0.18	0.17	0.12	0.19	0.33	0.14	0.27
	0.11	0.12	0.17	0.17	0.21	0.22	0.30	0.32	0.30
	0.14	0.16	0.15	0.15	0.14	0.22	0.34	0.20	0.32
	0.16	0.10	0.18	0.14	0.14	0.23	0.50	0.17	0.30
เฉลี่ย	0.13	0.12	0.15	0.15	0.12	0.19	0.36	0.22	0.33
SD	0.02	0.02	0.04	0.01	0.03	0.03	0.08	0.05	0.14
CV	16.24	13.37	27.38	8.61	23.56	14.53	22.31	22.69	42.72

ตารางภาคผนวก จ 9 ค่า OD ที่ได้จากการวัดจำนวนเชื้อที่ย้อมด้วยสี crystal violet ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ได้จากการล้างด้วยวิธีการแช่ plate ลงใน methanol และน้ำในทุกขั้นตอน จากการทดลอง 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ซ้ำ

	ย้อมสี crystal violet 0.05%			ย้อมสี crystal violet 0.1%			ย้อมสี crystal violet 0.2%		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
	0.16	0.17	0.15	0.46	0.24	0.44	0.15	0.59	0.31
	0.20	0.26	0.11	0.21	0.30	0.58	0.15	0.79	0.62
	0.12	0.30	0.05	0.27	0.29	0.12	0.03	1.21	0.59
	0.13	0.23	0.28	0.17	0.21	0.56	0.77	0.95	0.59
	0.16	0.21	0.37	0.30	0.22	0.48	0.85	1.20	0.60
	0.17	0.20	0.30	0.35	0.20	0.20	0.22	0.71	0.64
	0.08	0.17	0.21	0.49	0.32	0.58	0.69	0.61	0.99
	0.12	0.15	0.17	0.41	0.37	0.46	0.41	0.53	0.82
	0.13	0.26	0.17	0.48	0.42	0.32	0.41	0.44	0.79
	0.07	0.24	0.17	0.83	0.55	0.65	0.84	1.13	0.71
	0.15	0.29	0.11	0.93	0.90	0.51	0.81	1.18	0.53
	0.14	0.37	0.13	0.93	0.50	0.42	0.27	0.31	1.22
	0.16	0.38	0.23	0.68	0.02	0.31	1.33	1.06	1.28
	0.18	0.17	0.22	0.88	-0.01	0.96	0.40	0.88	0.54
	0.20	0.45	0.16	0.26	0.06	0.36	0.19	0.49	0.83
เฉลี่ย	0.14	0.26	0.19	0.51	0.31	0.46	0.50	0.80	0.74
SD	0.04	0.09	0.08	0.27	0.23	0.20	0.36	0.30	0.26
CV	26.17	34.47	43.58	52.84	75.43	43.72	72.60	37.84	35.56

ตารางภาคผนวก จ 10 ค่า OD ที่ได้จากการวัดจำนวนเชื้อที่ย้อมด้วยสี methylene blue ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ได้จากการล้างด้วยวิธีการแช่ plate ลงใน methanol และน้ำในทุกขั้นตอน จากการทดลอง 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ซ้ำ

	ย้อมสี methylene blue 0.05%			ย้อมสี methylene blue 0.1%			ย้อมสี methylene blue 0.2%		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
	0.39	0.31	0.55	0.60	0.36	0.46	0.48	0.37	0.58
	0.53	0.30	0.43	0.49	0.35	0.47	0.40	0.32	0.53
	0.45	0.31	0.46	0.46	0.40	0.60	0.42	0.35	0.61
	0.41	0.27	0.67	0.58	0.40	0.52	0.36	0.44	0.61
	0.51	0.34	0.54	0.44	0.32	0.43	0.52	0.37	0.56
	0.54	0.31	0.62	0.43	0.40	0.52	0.43	0.40	0.60
	0.42	0.26	0.49	0.49	0.32	0.70	0.38	0.31	0.62
	0.59	0.35	0.57	0.41	0.33	0.67	0.44	0.37	0.51
	0.57	0.38	0.47	0.47	0.37	0.61	0.43	0.35	0.52
	0.40	0.28	0.46	0.49	0.34	0.51	0.45	0.38	0.77
	0.51	0.33	0.45	0.41	0.30	0.44	0.47	0.31	0.47
	0.51	0.54	0.48	0.45	0.31	0.57	0.34	0.33	0.55
	0.42	0.33	0.47	0.41	0.36	0.66	0.50	0.49	0.60
	0.46	0.39	0.48	0.40	0.35	0.61	0.52	0.37	0.60
	0.55	0.38	0.51	0.47	0.35	0.59	0.36	0.34	0.59
เฉลี่ย	0.48	0.34	0.51	0.47	0.35	0.56	0.43	0.37	0.58
SD	0.07	0.07	0.07	0.06	0.03	0.09	0.06	0.05	0.07
CV	13.52	20.30	13.42	12.45	9.37	15.43	13.51	13.36	11.77

ตารางภาคผนวก จ 11 ค่าเฉลี่ย OD และค่า SE ที่ได้จากการวัดความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ ของเชื้อ *G. intestinalis* บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง fix โดยไม่ล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออก ย้อมด้วยสี methylene blue 0.1% และ 0.2% โดยใช้วิธีแช่ plate ในสารละลายในขั้นตอนการ fix และล้างสีออกจากการทดลอง 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ

จำนวนเชื้อ (cell/ml)	2×10^{7}	1×10^{7}	5×10^{6}	2.5×10^{6}	1.25×10^{6}	6.25×10^{5}	3.13×10^{5}	1.56×10^{5}	7.8×10^{4}	3.9×10^{4}	1.95×10^{4}	9.75×10^{3}	4.88×10^{3}	2.44×10^{3}	1.22×10^{3}	6.1×10^{2}
0.1%	1.61± 0.53	1.44± 0.07	1.40± 0.09	1.24± 0.05	1.21± 0.06	1.12± 0.02	0.87± 0.00	0.59± 0.02	0.46± 0.02	0.25± 0.01	0.16± 0.01	0.08± 0.01	0.03± 0.01	0.01± 0.02	0.01± 0.01	0.00± 0.02
0.2%	1.95± 0.19	1.74± 0.03	1.56± 0.09	1.33± 0.10	1.34± 0.02	1.24± 0.04	1.00± 0.03	0.74± 0.03	0.49± 0.02	0.31± 0.01	0.18± 0.01	0.13± 0.01	0.09± 0.01	0.04± 0.01	0.04± 0.04	0.11± 0.00

ตารางภาคผนวก จ 12 ค่าเฉลี่ย OD และค่า SE ที่ได้จากการวัดเมื่อบ่มเชื้อ *G. intestinalis* กับยา metronidazole, ornidazole และ furazolidone ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการทดลอง 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ

Metronidazole	**0.078125**	**0.15625**	**0.3125**	**0.625**	**1.25**	**2.5**	**5**	**10**
ค่า OD ครั้งที่ 1	1.32	1.31	1.25	0.84	0.29	-0.02	0.00	-0.01
ค่า OD ครั้งที่ 2	1.18	0.97	0.68	0.27	0.04	-0.01	-0.01	0.01
ค่า OD ครั้งที่ 3	1.14	1.18	1.11	0.90	0.31	0.00	-0.04	-0.03
เฉลี่ย	1.21	1.15	1.01	0.67	0.21	-0.01	-0.02	-0.01
SE	0.10	0.17	0.30	0.35	0.15	0.01	0.02	0.02

Ornidazole	**0.078125**	**0.15625**	**0.3125**	**0.625**	**1.25**	**2.5**	**5**	**10**
ค่า OD ครั้งที่ 1	1.20	1.07	0.64	0.08	0.01	0.00	0.03	0.02
ค่า OD ครั้งที่ 2	1.05	1.01	0.60	0.07	0.01	-0.02	-0.01	0.00
ค่า OD ครั้งที่ 3	1.19	1.17	0.86	0.18	-0.04	-0.03	0.01	0.07
เฉลี่ย	1.15	1.08	0.70	0.11	-0.01	-0.02	0.01	0.03
SE	0.09	0.08	0.14	0.06	0.03	0.01	0.02	0.04

Furazolidone	**0.078125**	**0.15625**	**0.3125**	**0.625**	**1.25**	**2.5**	**5**	**10**
ค่า OD ครั้งที่ 1	1.01	0.86	0.76	0.58	0.19	0.09	0.00	-0.03
ค่า OD ครั้งที่ 2	1.03	0.97	0.75	0.60	0.33	0.13	0.03	0.03
ค่า OD ครั้งที่ 3	1.04	0.96	0.65	0.30	0.30	0.13	0.15	0.02
เฉลี่ย	1.02	0.93	0.72	0.50	0.27	0.12	0.06	0.01
SE	0.01	0.06	0.06	0.17	0.08	0.03	0.08	0.03

ตารางภาคผนวก จ 13 ค่าเฉลี่ย OD และค่า SD ที่ได้จากการวัดเมื่อบ่มเชื้อ *G. intestinalis* กับสารสกัดสมุนไพรหยาบ 19 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการทดลอง 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ

ความเข้มข้นของสารสกัด	**7.8125**	**15.625**	**31.25**	**62.5**	**125**	**250**	**500**	**1000**
กระชาย	1.00± 0.06	0.88± 0.05	0.70± 0.09	0.43± 0.08	0.27± 0.17	0.03± 0.02	0.02± 0.02	0.05± 0.03
กระท่อม	0.96± 0.10	0.98± 0.05	1.02± 0.04	0.93± 0.03	0.74± 0.08	0.32± 0.05	0.11± 0.03	0.08± 0.01
โกโก้	1.16± 0.08	1.09± 0.04	1.07± 0.06	0.98± 0.04	0.86± 0.12	0.56± 0.38	0.28± 0.48	0.19± 0.35
โกงกาง	1.00± 0.11	1.02± 0.14	1.00± 0.11	0.96± 0.10	0.97± 0.12	0.94± 0.01	0.88± 0.12	0.81± 0.18
ขมิ้น	1.14± 0.03	1.06± 0.04	0.98± 0.07	0.76± 0.02	0.16± 0.07	0.07± 0.03	0.02± 0.01	0.03± 0.01
ข่า	1.10± 0.12	1.03± 0.02	1.08± 0.03	1.07± 0.10	1.05± 0.11	1.01± 0.10	0.92± 0.06	0.78± 0.07
ขิง	1.11± 0.09	1.11± 0.06	1.09± 0.10	1.00± 0.03	0.77± 0.04	0.35± 0.02	0.00± 0.01	-0.02± 0.01
ดีปลี	1.06± 0.10	1.08± 0.05	1.06± 0.04	1.03± 0.03	0.85± 0.08	0.41± 0.05	0.00± 0.03	0.00± 0.01
ตะบูน	0.94± 0.10	1.01± 0.05	0.90± 0.04	0.89± 0.03	0.74± 0.08	0.60± 0.05	0.34± 0.03	0.50± 0.01
โท๊ะ	1.03± 0.11	0.93± 0.14	0.94± 0.08	0.94± 0.12	1.05± 0.04	1.09± 0.15	0.86± 0.15	0.59± 0.07
นนทรี (ดอก)	0.93± 0.10	0.96± 0.12	0.99± 0.11	1.01± 0.16	1.00± 0.17	0.92± 0.12	0.86± 0.06	0.82± 0.15
นนทรี (เปลือกต้น)	1.16± 0.04	1.15± 0.05	1.16± 0.06	1.15± 0.05	1.20± 0.11	1.10± 0.09	0.84± 0.33	0.97± 0.16

ตารางภาคผนวก จ 13 (ต่อ) แสดงค่าเฉลี่ย OD และค่า SD ที่ได้จากการวัดเมื่อบ่มเชื้อ *G. intestinalis* กับสารสกัดสมุนไพรหยาบ 19 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการทดลอง 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ

ความเข้มข้นของสารสกัด	**7.8125**	**15.625**	**31.25**	**62.5**	**125**	**250**	**500**	**1000**
ปีบ	0.98± 0.09	1.00± 0.05	0.98± 0.03	0.94± 0.10	0.86± 0.21	0.84± 0.08	0.69± 0.06	0.48± 0.08
พริกไทยขาว	1.06± 0.10	1.08± 0.05	1.06± 0.04	1.03± 0.03	0.85± 0.08	0.41± 0.05	0.00± 0.03	0.00± 0.01
มะตูมแก่	1.02± 0.10	1.01± 0.05	1.01± 0.04	0.89± 0.03	0.92± 0.08	0.89± 0.05	0.74± 0.03	0.55± 0.01
ไมยราบ	1.06± 0.10	1.06± 0.05	1.07± 0.04	1.04± 0.03	0.95± 0.08	0.90± 0.05	0.82± 0.03	0.62± 0.01
ว่านหอมแดง	0.94± 0.11	0.90± 0.09	0.88± 0.06	0.83± 0.08	0.58± 0.14	0.29± 0.12	0.04± 0.00	0.02± 0.01
สมอเทศ	1.13± 0.09	1.18± 0.05	1.21± 0.09	1.30± 0.05	1.24± 0.07	1.01± 0.12	0.89± 0.19	0.52± 0.23
สมอไทย	1.02± 0.13	0.81± 0.10	0.90± 0.14	0.93± 0.11	0.95± 0.20	0.91± 0.17	0.83± 0.11	0.24± 0.04
สมอภิเภก	0.99± 0.09	0.97± 0.09	0.97± 0.06	1.11± 0.11	0.96± 0.09	0.91± 0.12	0.75± 0.03	0.40± 0.07
Metronidazole*	1.04± 0.14	1.03± 0.18	0.87± 0.17	0.51± 0.31	0.23± 0.16	0.08± 0.03	0.03± 0.04	-0.01± 0.00

หมายเหตุ * ยามาตรฐานที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 µg/ml

ตารางภาคผนวก จ 14 ค่าเฉลี่ย OD และค่า SD ที่ได้จากการวัดเมื่อบ่มเชื้อ *G. intestinalis* กับสารบริสุทธิ์จากต้นกะออก 7 สารที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการทดลอง 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ

ความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400
A2	0.78± 0.39	0.77± 0.32	0.76± 0.31	0.72± 0.23	0.59± 0.14	0.36± 0.09	0.14± 0.04	0.03± 0.04
B6-3124S	0.84± 0.39	0.85± 0.41	0.84± 0.34	0.82± 0.28	0.79± 0.38	0.67± 0.25	0.07± 0.05	0.01± 0.03
C11-9S	0.89± 0.43	0.82± 0.38	0.80± 0.38	0.65± 0.26	0.40± 0.09	0.01± 0.01	0.00± 0.01	0.02± 0.01
C13-2S	0.85± 0.41	0.78± 0.32	0.86± 0.33	0.82± 0.30	0.77± 0.23	0.64± 0.25	0.39± 0.18	0.11± 0.14
C17	0.92± 0.37	0.80± 0.28	0.75± 0.22	0.72± 0.26	0.63± 0.28	0.41± 0.37	0.24± 0.28	0.12± 0.14
D13S1	0.72± 0.30	0.72± 0.26	0.73± 0.26	0.71± 0.23	0.68± 0.23	0.66± 0.28	0.44± 0.27	0.32± 0.31
Stc1	0.83± 0.43	0.82± 0.41	0.76± 0.33	0.66± 0.28	0.43± 0.13	0.12± 0.10	0.03± 0.01	0.04± 0.01
Metronidazole*	0.85± 0.38	0.70± 0.30	0.47± 0.27	0.29± 0.29	0.11± 0.14	0.02± 0.03	0.03± 0.03	-0.01± 0.02

หมายเหตุ * ยามาตรฐานที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 µg/ml

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวเครือวัลย์ ห้วนกัง

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010220018

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

รับทุนผู้ช่วยวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รับทุนผู้ช่วยสอนภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Hounkong, K., Sawangjaroen, N. and Phongpaichit, S. 2009. New method for evaluation of amount of *Giardia intestinals in vitro*. Proceeding of the 2th Graduate Research Conference. King ongkut' s Institute of Technology Ladkrabang, April 23-24, 2009.