รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิด ต่อเชื้อ *Blastocystis hominis* ในหลอดทดลอง

(Effects of extract from some medicinal plants on *Blastocystis hominis in vitro*)

โดย

ผศ. ดร. นงเยาว์ สว่างเจริญ

และ

ผศ. ดร. กิจจา สว่างเจริญ

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2543

สมอ
เลขหมู่ RS201.E9 ส27 2544 ฉ.1
Bib Key 217925

บทคัดย่อ

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ผลดีปลี ลูกเบญกานี สีเสียดไทย เมล็ดราชดัด และ ต้นผักขมหนาม ซึ่งเป็นสมุนไพรที่ได้นำมาใช้ในการรักษาโรคท้องร่วง ท้องเสียหรือโรคบิดในตำรับยาไทยแผนโบราณ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Blastocystis hominis* ในหลอดทดลอง โดยการสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดด้วย n-Hexane, dichloromethane และ methanol ตามลำดับ พบว่าเมล็ดราชดัดส่วนที่สกัดด้วย dichloromethane, และส่วนที่สกัดด้วย methanol, ลูกเบญกานีส่วนที่สกัดด้วย methanol จะให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* ในหลอดทดลองได้ดีกว่าสารสกัดสมุนไพรชนิดอื่นๆ คือสารสกัดที่ความเข้มข้น 2000 μg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* คิดเป็น 92%, 92% และ 76% ของจำนวนตัวอย่างที่นำมาทดสอบตามลำดับ สีเสียดไทยส่วนที่สกัดด้วย methanol, ราชดัดส่วนที่สกัดด้วย n-Hexane, ผักขมหนามส่วนที่สกัดด้วย dichloromethane และ methanol ที่ความเข้มข้น 2000 μg/ml ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* ได้ อย่างไรก็ตาม สารสกัดสมุนไพรที่ใช้ทดสอบเป็นส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เพียงบางส่วน ยา metronidazole ที่ใช้เป็นยามาตรฐานที่ความเข้มข้น 1.25-20 μg/ml ยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้ได้ดี

Abstract

The activity of 5 medicinal plants, *Piper longum*'s fruit, nut gall of *Quercus infectoria*, *Acacia catechu*'s bark, *Brucea amarissima*'s seed and whole plant of *Spiny amaranth* which were used as antidiarrhoeic in Thai traditional medicine, was tested against the growth of *Blastocystis hominis in vitro*. The plants were extracted with n-Hexane, dichloromethane and methanol, respectively. Dichloromethane extract of *Brucea amarissima*, methanol extract of *Brucea amarissima* and methanol extract from nut gall of *Quercus infectoria*, are the most effective. At a concentration of 2000 μg/ml, the three extracts inhibited the growth of *B. hominis* in 92%, 92% and 76% of samples tested, respectively. Methanol extract of *Acacia catechu*, n-Hexane extract of *Brucea amarissima*, dichloromethane and methanol extract of *Amaranthus spinosus* at a concentration of 2000 μg/ml were not able to inhibit the growth. However, the growth of *B. hominis* in almost all the samples tested were moderately inhibited by the plant extracts. Metronidazole, which was used as reference antiprotozoal drug at concentration 1.25-20 μg/ml showed a more pronounced activity than that of all plant extract.

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
Abstract	(2)
กิตติกรรมประกาศ	(3)
สารบาญ	(4)
รายการตาราง	(5)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	5
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	6
ผลการทดลอง	10
วิจารณ์ผลการทดลอง	21
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก ก	29

รายการตาราง

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะสารและน้ำหนักที่ได้ (g) ของสมุนไพรดีปลี เบญกานี สีเสียดไทย ราชดัด และผักขมหนาม เมื่อสกัดด้วย n-Hexane, dichloromethane และ methanol ตามลำดับ..... 10

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นต่ำสุดของยา metronidazole (μg/ml) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* (MIC) และสามารถฆ่า *B. hominis* (MPC) ในหลอดทดลอง..... 11

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพร (μg/ml) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* (MIC) และสามารถฆ่า *B. hominis* (MPC) ในหลอดทดลอง..... 12

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนตัวอย่าง *B. hominis* (%) ที่สารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 2,000 μg/ml หรือต่ำกว่า สามารถยับยั้งการเจริญ (Inhibit, I) หรือฆ่า (Kill, K) เชื้อ *B. hominis* ในหลอดทดลองได้..... 13

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพร (μg/ml) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. hominis* ได้บางส่วน (moderately inhibition) ในหลอดทดลอง..... 15

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนตัวอย่าง *B. hominis* (%) ที่สารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 2,000 μg/ml หรือต่ำกว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. hominis* ในหลอดทดลองได้บางส่วน..... 16

ตารางที่ 7 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา metronidazole (μg/ml) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* (MIC) และ ฆ่า *B. hominis* (MPC) ในหลอดทดลองได้ จากการทดลองครั้งต่าง ๆ..... 18

ตารางที่ 8 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุด ของสารสกัดสมุนไพรเบญกานีที่สกัดด้วย methanol (μg/ml) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Blastocystis hominis* (MIC) และ ฆ่า *B. hominis* (MPC) ในหลอดทดลองได้ จากการทดลองครั้งต่าง ๆ..... 19

ตารางที่ 9 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดราชดัด ที่สกัดด้วย dichloromethane (μg/ml) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* (MIC) และ ฆ่า *B. hominis* (MPC) ในหลอดทดลองได้ จากการทดลองครั้งต่าง ๆ..... 20

บทนำ

Blastocystis hominis ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Brumpt (1912) เดิมนั้นจัดว่าเป็นยีสต์พวก Schizosaccharomyces ต่อมาได้มีผู้ศึกษาลักษณะและสมบัติต่างๆ ของ *B. hominis* โดยการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ตลอดจนดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า *B. hominis* เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ แต่ไม่มีผนังเซลล์ มีไมโตคอนเดรียคล้ายของโปรโตซัวและมีขาเทียมยืดหดได้ สืบพันธุ์โดยการแบ่งตัวหรือสร้างสปอร์ (Zierdt *et al.*, 1967) Zierdt (1978) จึงได้จัด *B. hominis* ให้เป็นโปรโตซัวอยู่ใน subphylum Sporozoa, class Blastocystea และ order Blastocystida อย่างไรก็ตามได้มีรายงานว่าการเรียงลำดับเบสของ srRNA ของ *B. hominis* ไม่ได้ใกล้เคียงกับสิ่งมีชีวิตใน genus ใดของพวกโปรโตซัว (Johnson *et al.*, 1989) และมีข้อเสนอแนะที่จะจัดกลุ่มให้ *B. hominis* ใหม่ (Zierdt, 1991) แต่อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันยังไม่ได้มีการดำเนินการในส่วนนี้

B. hominis เป็นโปรโตซัวในลำไส้ที่พบได้ทั่วโลก ในอุจจาระของคนปกติจะพบโปรโตซัวนี้บ่อยที่สุด (Stenzel and Boreham, 1996) เช่น ประมาณ 3-16% เมื่อตรวจโดยวิธีธรรมดา (นุวิท คุณารักษ์, 2535; Sheehan *et al.*, 1986) แต่ถ้าตรวจโดยวิธีการเพาะเลี้ยงก็มักจะพบได้มากขึ้น โดยในบางท้องที่อาจพบได้สูงถึง 45% (Sawangjaroen *et al.*, 1993; Zaman and Khan, 1994) ส่วนใหญ่เชื้อนี้แพร่กระจายทางน้ำดื่ม (Taamsri *et al.*, 2000)

บทบาทของ *B. hominis* ในการทำให้เกิดโรคยังเป็นที่ถกเถียงกันมาก ในสมัยก่อนเชื่อว่า *B. hominis* ไม่ก่อให้เกิดโรค แต่ปัจจุบันมีรายงานการวิจัยมากมายที่สนับสนุนว่า *B. hominis* สามารถทำให้เกิดอาการต่างๆ ในระบบทางเดินอาหารของคน อาการเหล่านี้ได้แก่ ท้องร่วงเรื้อรัง ปวดท้อง คลื่นไส้ มีลมในท้อง ฯลฯ (Ricci *et al.*, 1984; Sheehan *et al.*, 1986; Sinnian and Rajeswari, 1994) และอาการเหล่านี้จะหายไปเมื่อได้รับยา metronidazole อย่างไรก็ตามคนส่วนใหญ่เมื่อติดเชื้อนี้มักไม่แสดงอาการ ซึ่งเป็นไปได้ว่า *B. hominis* นี้มี 2 ชนิด คือ ชนิดที่ทำให้เกิดโรค และชนิดที่ไม่ทำให้เกิดโรค (Mehlhorn, 1988) หรืออาจจะต้องมีสภาวะในร่างกายบางอย่าง เช่น ภูมิคุ้มกันของร่างกายลดลง ภาวะทุโภชนาการ หรือมีการติดเชื้ออื่นร่วมด้วย จึงทำให้ *B. hominis* ก่อให้เกิดอาการในระบบทางเดินอาหาร (Boreham and Stenzel, 1993)

ในประเทศไทยยังมีข้อมูลเกี่ยวกับการก่อโรคจาก *B. hominis* นี้น้อยมาก เท่าที่เคยมีรายงานจากโรงพยาบาลศิริราชพบว่า *B. hominis* อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียเรื้อรัง (Leelakusolvong *et al.*, 1997) ระหว่าง ค.ศ. 1989-1990 Lamon *et al.*, (1992) ตรวจอุจจาระจากผู้ป่วยนอกของโรงพยาบาลศิริราช โดยใช้วิธีสเมียร์โดยตรงร่วมกับการเพาะเลี้ยง พบ *B. hominis* สูงถึง 39% นุวิท คุณารักษ์ (2535) ตรวจอุจจาระจากผู้ป่วยที่มีอาการผิดปกติทางระบบทางเดินอาหารที่มารับการตรวจในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ สงขลา จำนวน 1101 ราย โดยใช้วิธีเสมียร์โดยตรงร่วมกับการย้อมสี พบเชื้อ *B. hominis* 3%

ปัจจุบันยามาตรฐานที่นิยมนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจากโปรโตซัวในระบบทางเดินอาหาร คือ metronidazole และ emetine ทั้งนี้ ยาเหล่านี้ต่างก็มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคได้ดี แต่อาจก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ร้ายแรงขึ้นได้ เช่น metronidazole อาจเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ในสัตว์กัดแทะ (rodents) (Rustia and Shubik, 1972; Shubik, 1972) และพบว่าก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenesis) ในแบคทีเรีย (Legator *et al.*, 1975) และกดระบบภูมิคุ้มกันในคน (Saxena *et al.*, 1985) จึงมีข้อแนะนำไม่ให้ใช้ metronidazole ในระหว่างตั้งครรภ์ในไตรมาสแรก ส่วน emetine มีความเป็นพิษต่อหัวใจ (Tracy and Webster, 1996) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามีเชื้อโปรโตซัวหลายชนิดดื้อต่อยาที่ใช้รักษา เช่น *Giardia lamblia* และ *Trichomonas vaginalis* ดื้อต่อยา metronidazole (Johnson, 1993; Voolmann and Boreham, 1993; Lemée *et al.*, 2000) และมักจะทำให้เกิดการดื้อต่อยาในกลุ่มเดียวกันร่วมด้วย (Upcroft and Upcroft, 1993) ดังนั้น จึงได้มีความพยายามหายาใหม่เพื่อใช้รักษาโรคติดเชื้อจากโปรโตซัวโดยให้มีความปลอดภัยจากการใช้ยามากขึ้น

พืชที่นำมาใช้เป็นยาสมุนไพร หรือถูกบรรจุอยู่ในตำรับยาแผนโบราณมักเป็นพืชที่เคยถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคในคนมาเป็นเวลาหลายสิบปีหรือหลายร้อยปี ดังนั้นจึงมีแนวโน้มสูงว่าพืชดังกล่าวเป็นพืชที่มีความปลอดภัยเมื่อนำมาใช้ในคน ในประเทศไทยรวมทั้งประเทศในเขตใกล้เคียงได้เคยมีการศึกษาถึงการใช้สมุนไพรบางชนิดสำหรับรักษาโรคที่เกิดจากโปรโตซัวอื่นในลำไส้ เช่น บิดมีตัว (Ongsakul *et al.*, 1992-1993; Bhopale *et al.*, 1995; Tona *et al.*, 1998) สมุนไพรเหล่านี้ได้แก่ ผักเบี้ยใหญ่ ดีปลี (สายพันธุ์อินเดีย) กระชาย และ กระทือ เป็นต้น สารสกัดลำดับส่วนของสมุนไพรเหล่านี้บางชนิดเช่น ดีปลี ได้ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้ออะมีบา โดยทดสอบทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองซึ่งปรากฏว่าใช้ได้ผลดี (Ghoshal *et al.*, 1996) แต่สำหรับผลของสาร

สกัดสมุนไพรต่อเชื้อ *B. hominis* ยังมีข้อมูลน้อยมาก ในประเทศสิงคโปร์ก็ได้มีการทดสอบฤทธิ์ของน้ำต้มสมุนไพรจีน 20 ชนิดต่อ *B. hominis* ในหลอดทดลอง โดยใช้เชื้อที่เป็น axenic culture (คือการเพาะเลี้ยงที่ปราศจากแบคทีเรีย) และพบว่าน้ำต้มสมุนไพรจีนประมาณ 15 ชนิดที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของโปรโตซัวตัวนี้ (Yang *et al.*, 1996)

การศึกษาในครั้งนี้มุ่งที่จะทำการศึกษาถึงผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 5 ชนิดที่มีการกล่าวถึงในตำรับยาแผนไทยโบราณ ว่าสามารถรักษาอาการท้องร่วง ท้องเสียได้ คือ ผลดีปลี (สายพันธุ์ไทย) ลูกเบญกานี สีเสียด เมล็ดราชดัด และ ต้นผักขมหนาม ที่มีต่อเชื้อ *B. hominis* ที่ได้จากคนไข้ และนำมาเพาะเลี้ยงเป็นแบบที่มีแบคทีเรียร่วมด้วย ซึ่งเป็นการเลียนแบบสภาวะแวดล้อมของโปรโตซัวที่อยู่ในลำไส้จริง และศึกษาต่อไปถึงโอกาสของโปรโตซัวตัวนี้ที่จะเกิดการดื้อต่อสมุนไพรที่ใช้โดยใช้ยามาตรฐาน metronidazole เป็นตัวเปรียบเทียบ

ดีปลี (*Piper longum* Linn., วงศ์ Piperaceae) เป็นไม้เถาเลื้อยชนิดหนึ่ง ผลของดีปลีมีสรรพคุณทางแพทย์แผนโบราณว่าใช้ปรุงเป็นยาธาตุ แก้ธาตุดินพิการ แก้ท้องร่วง ขับลมในลำไส้ (เสงี่ยม พงษ์บุญรอด, 2519) มีรายงานจากประเทศอินเดียว่า สารสกัดจากผลดีปลีมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *Entamoeba histolytica* ได้ทั้งในหลอดทดลองและในหนูขาวที่ถูกชักนำให้เป็นโรคบิดมีตัว (Ghoshal, *et al.*, 1996) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานในลักษณะเดียวกันที่ใช้สารสกัดดีปลีจากดีปลีสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย

เบญกานี (nut gall) เป็นระยางค์ที่เกิดขึ้นอย่างผิดปกติจากการถูกรบกวนโดยแมลง (excredescent appendage) บนลำต้นของต้นไม้ชนิดหนึ่ง (*Quercus infectoria* Olivier., วงศ์ Fagaceae) พบในประเทศอินเดีย มีสรรพคุณในการแก้อาการท้องร่วง แก้บิด แก้ปวดเบ่ง (เสงี่ยม พงษ์บุญรอด, 2519; อรุณพร อิฐรัตน์, 2532; จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์, 2539) แต่ทั้งนี้ยังไม่เคยมีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวกับผลของเบญกานีต่อเชื้อ *B. hominis* หรือโปรโตซัวในทางเดินอาหารชนิดอื่น

สีเสียด (Cutch tree หรือ Black catechu; *Acacia catechu* Willd., วงศ์ Mimosaceae) เป็นไม้ยืนต้นขนาดย่อม ใบเล็กเป็นฝอยคล้ายกระถิน เปลือกและเนื้อไม้สีเสียดเมื่อทำให้เป็นฝอยแล้วนำมาต้มเคี่ยวจนข้น จะได้ยางสีน้ำตาลแก่เกือบดำ เมื่อนำมาปั้นเป็นก้อนแล้วทิ้งให้แห้งจะได้เป็นก้อนแข็ง เปลือกต้นสีเสียดหรือก้อนสีเสียดมีสรรพคุณทางแพทย์แผนโบราณ เป็นยาฝาดสมาน แก้ท้องร่วง แก้บิด (เสงี่ยม พงษ์บุญรอด, 2519)

ราชดัด (*Brucea amarissima* Desv., วงศ์ Simarubaceae) เป็นไม้ขนาดเล็ก มีผลคล้ายคลึงกับมะละกอ เมล็ดเมื่อแก่มีสีดำ แพทย์จีนใช้เมล็ดราชดัดเป็นยาแก้บิดมานานมากกว่าร้อยปี เคยมีรายงานการวิจัยจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์แห่งประเทศไทยว่าสารสกัดจากเมล็ดราชดัดมีฤทธิ์สามารถฆ่าเชื้อบิดได้ใกล้เคียงกับฤทธิ์ของ emetine (เสงี่ยม พงษ์บุญรอด, 2519)

ผักขมหนาม (Spiny amaranth, Spiny pigweed, *Amaranthus spinosus* Linn., วงศ์ Amaranthaceae) เป็นต้นไม้ขนาดเล็ก ต้นใช้รับประทานเป็นอาหารได้ รากและทั้งต้นของผักขมหนามมีสรรพคุณแก้บิด ถ่ายเป็นมูกเลือด (วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม, 2542; ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, 2525)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ *Blastocystis hominis* ในหลอดทดลอง
2. เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ของเชื้อ *Blastocystis hominis* ที่จะดื้อต่อสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อที่ใช้ทดสอบ พืชสมุนไพรและยามาตรฐาน metronidazole

1.1 เชื้อ *Blastocystis hominis* ที่ใช้ทดสอบ แยกได้จากอุจจาระที่เก็บจากผู้ป่วยนอกที่มาตรวจอุจจาระด้วยโรคต่าง ๆ ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงโปรโตซัว แล้วนำมาทดสอบโดยเร็วที่สุด (ภายในเวลาไม่เกิน 1 สัปดาห์)

1.2 สมุนไพร ผลดีปลี ลูกเบญกานี สีเสียดไทย เมล็ดราชดัด ซื้อจากร้านขายสมุนไพรในอำเภอหาดใหญ่

1.3 ผักขมหนามเก็บจากรั้วมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ใช้ทั้งต้น

1.4 ยา metronidazole (2 Methyl-5-nitroimidazole-1-ethanol) ซื้อจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. การเตรียมสารสกัดหยาบจากสมุนไพร

2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากดีปลี

2.1.1 ผลดีปลีแห้งจะถูกนำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1 วัน ต่อจากนั้นจะนำมาบดให้ละเอียด

2.1.2 ทำการสกัดหยาบโดยการหมักใน n-Hexane เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงแยกสารสกัด n-Hexane ออกโดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 กากที่เหลือจะนำไปหมักใน n-Hexane อีก 3 ครั้งโดยใช้กระบวนการเช่นเดิม สารสกัด n-Hexane ที่ได้ทั้ง 4 ครั้งจะถูกนำมารวมกันและระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิไม่เกิน 50°C ผลิตผลที่ได้จะนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้

2.1.3 นำกากที่เหลือมาสกัดด้วย dichloromethane อีก 4 ครั้ง ครั้งละ 7 วัน แล้วนำมาระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำทำนองเดียวกับสารสกัดจาก n-Hexane ข้างต้น แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

2.1.4 นำกากที่เหลือมาสกัดด้วย methanol อีก 4 ครั้ง ครั้งละ 7 วัน แล้วนำมาระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำทำนองเดียวกับสารสกัดจาก n-Hexane และ dichloromethane ข้างต้น แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้

2.2 เตรียมสารสกัดจากเบญกานี สีเสียด ราชดัด และผักขมหนาม เช่นเดียวกับการเตรียมสารสกัดหยาบจากดีปลี นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงโปรโตซัวในลำไส้

การเตรียมอาหารเลี้ยงโปรโตซัวในลำไส้ทำได้โดยการนำเอาไข่ไก่ ผสมกับ Ringer's solution นึ่งจนไข่สุกเป็น slant แล้วเติม Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 ลงไป นำไปเก็บ ในตู้เย็นจนกว่าจะใช้ (ภาคผนวก ก) ก่อนใช้เติม Calf bovine donor serum ลงไปจนได้ความเข้มข้น 10 %

4. การตรวจหา *Blastocystis hominis* ในอุจจาระโดยวิธีเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

4.1 นำตัวอย่างอุจจาระขนาดประมาณครึ่งเมล็ดถั่วเขียว ใส่ในอาหารเลี้ยงโปรโตซัวในลำไส้ที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ทำตัวอย่างละ 2 หลอด)

4.2 นำตะกอนมาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x เพื่อดูว่ามี *B. hominis* หรือไม่โดยดูดมาตรวจหลอดละ 2 ครั้ง บันทึกผล

5. การเตรียมเชื้อ *Blastocystis hominis* สำหรับทดสอบสมุนไพร

นำเอาเชื้อจากหลอดที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามี *B. hominis* มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ บ่มที่ 37°C 48 ชั่วโมง จนกระทั่งมีเชื้อปริมาณมากพอสำหรับการทดสอบในข้อต่อไป

6. การทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรและยา metronidazole ต่อเชื้อ *B hominis* ในหลอดทดลอง

6.1 เตรียมสารละลายจากสารสกัดดีปลี เบญกานี สีเสียด ราชดัด และ ผักขมหนาม โดยการละลายสารสกัดใน dimethyl sulfoxide (DMSO) จนเข้ากันดี ต่อจากนั้นเติม PBS pH 7.4 จนได้ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร ในอาหารเลี้ยง

เชื้อแต่ละหลอดเป็น 2,000, 1,000, 500, 250, 125 และ 62.5 μg/ml และความเข้มข้นของสารละลาย metronidazole เป็น 40, 20, 10, 5, 2.5 และ 1.25 μg/ml สารละลาย DMSO ในบัฟเฟอร์ในความเข้มข้นที่เท่ากันกับในกรณีแรก จะใช้เป็นหลอดควบคุม หลอดทดลองและหลอดควบคุมทำอย่างละ 2 หลอด

6.2 เติม *B. hominis* ที่เตรียมไว้ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดสมุนไพรหรือยา metronidazole และหลอดควบคุม โดยคำนวณให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น 5,000 cells/ml

6.3 นำหลอดทดลองที่ได้จากข้อ 6.2 ทั้งหมดไปบ่มที่ตู้เพาะเชื้ออุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

6.4 นำหลอดทดลองทั้งหมดมาคำนวณจำนวนเชื้อที่มี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x โดยใช้ hemocytometer นับซ้ำหลอดละ 2 ครั้ง นำจำนวนเชื้อที่คำนวณได้ในแต่ละหลอด มาเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อในหลอดควบคุม

6.5 หาค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentration) ซึ่งก็คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากหลอดที่ตรวจนับโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์แล้ว มีเชื้อน้อยกว่าหลอดควบคุมอย่างน้อย 50 เท่า (Zierdt *et al.*, 1983)

สำหรับในหลอดทดลองใดที่มีเชื้อต่ำกว่าหลอดควบคุม 5-50 เท่า ถือว่าความเข้มข้นของสารสกัดหรือยาในหลอดนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* ได้บางส่วน (Zierdt *et al.*, 1983)

6.6 หาค่า MPC (Minimal Parasiticidal Concentration) โดยการนำเอาตะกอนจากหลอดที่ตรวจไม่พบเชื้อโดยกล้องจุลทรรศน์ มาเพาะเลี้ยงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตะกอนมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อีกครั้ง ค่า MPC ก็คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา หรือของสารสกัดสมุนไพรจากหลอดที่เมื่อนำตะกอนมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ แล้วตรวจไม่พบเชื้อ

หมายเหตุ ถ้ายา metronidazole หรือสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลองไม่สามารถยับยั้งหรือฆ่า *B. hominis* ได้ จะรายงานว่าไม่ได้ผล

7. การทดสอบความเป็นไปได้ของ ***Blastocystis hominis*** ที่จะดื้อต่อสมุนไพรที่ใช้ทดสอบและยา metronidazole

นำตะกอนจากหลอดทดลองที่ตรวจไม่พบเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มาเพาะเลี้ยงในหลอดอาหารหลอดใหม่ หลอดที่มีเชื้อขึ้นจะนำมาเลี้ยงและทดสอบซ้ำเพื่อดูการตอบสนองต่อสมุนไพรหรือยา metronidazole อีก 3 - 4 รอบ ว่ามีการตอบสนองที่เปลี่ยนแปลงไปหรือไม่

ผลการทดลอง

1. การสกัดสมุนไพร

ลักษณะสารและน้ำหนัก (g) ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดหลังจากการสกัดด้วย n-Hexane, dichloromethane และ methanol ได้แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะสารและน้ำหนักที่ได้ (g) ของสมุนไพรดีปลี เบญกานี สีเสียดไทย ราชดัด และผักขมหนาม เมื่อสกัดด้วย n-Hexane, dichloromethane และ methanol ตามลำดับ

สมุนไพร	น้ำหนักเริ่มต้น (g)	น้ำหนักเป็นกรัม (ลักษณะสาร) ที่ได้เมื่อสกัดด้วย		
		n-Hexane	dichloromethane	methanol
ดีปลี	469	21.50 (น้ำมัน สีส้มแดง)	20.5** (ก้อนแห้งสีน้ำตาลเข้ม)	10.88 (เหนียว สีน้ำตาลอมเหลือง)
เบญกานี	439	0.68* (เหนียว สีน้ำตาลอ่อน)	0.79* (เหนียว สีน้ำตาลอ่อน)	220 (ผง สีน้ำตาลอ่อน)
สีเสียดไทย	181	0.19* (หนืด สีเขียวอ่อน)	6.10 (หนืด สีเขียว)	140 (หนืด ข้น สีน้ำตาลเข้ม)
ราชดัด	448	82.62 (น้ำมัน สีเขียวอมเหลือง)	6.95 (เหนียว สีน้ำตาลอมเขียว)	16.28 (เหนียว สีน้ำตาลเข้ม)
ผักขมหนาม	900	3.75* (เหนียว สีเขียวแก่)	36 (เหนียว สีเขียวแก่)	25 (เหนียว สีเขียวแก่)

* ปริมาณสารสกัดที่ได้น้อยมาก ไม่ได้นำมาทดสอบ

** สารสกัดนี้ไม่สามารถทำละลายได้ในตัวทำละลาย จึงไม่ได้นำมาทดสอบ

2. การตรวจอุจจาระโดยวิธีการเพาะเลี้ยง

อุจจาระที่เก็บจากผู้ป่วยนอกที่มาตรวจอุจจาระด้วยโรคต่าง ๆ ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ทั้งหมด 503 ราย เมื่อนำมาเพาะเลี้ยง พบมีเชื้อ *B. hominis* 67 ราย คิดเป็น 13.32%

3. ผลของยา metronidazole ต่อเชื้อ *Blastocystis hominis* ในหลอดทดลอง

ผลของยา metronidazole ที่มีต่อเชื้อ *B. hominis* ในหลอดทดลอง (ทั้งหมด 22 ตัวอย่าง) ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 ค่า MIC ของยา metronidazole ที่มีต่อ *B. hominis* อยู่ระหว่าง 1.25 – 20 μg/ml โดยที่ส่วนใหญ่ (21/22 ตัวอย่าง) มีค่า MIC 10 μg/ml หรือต่ำกว่า เมื่อหาค่า MPC พบว่ามี 1 ตัวอย่าง ที่ยา metronidazole ความเข้มข้น 40 μg/ml ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้หมด ตัวอย่างที่เหลือค่า MPC จะอยู่ระหว่าง 5 – 40 μg/ml

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นต่ำสุดของยา metronidazole (μg/ml) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* (MIC) และสามารถฆ่า *B. hominis* (MPC) ในหลอดทดลอง

	ความเข้มข้นของยา metronidazole (μg/ml)						
	ไม่ได้ผล	40	20	10	5	2.5	1.25
MIC	-	-	1	6	6	7	2
MPC	1	3	7	4	7	-	-

4. ผลของสารสกัดสมุนไพร ต่อเชื้อ *Blastocystis hominis* ในหลอดทดลอง

ผลของสารสกัดสมุนไพร ต่อเชื้อ *B. hominis* ในหลอดทดลองได้แสดงในตารางที่ 3 ที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดสมุนไพรในการทดลองครั้งนี้ (2,000 μg/ml) ไม่มีสารสกัดสมุนไพรใดเลยที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* ทุกตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ จำนวนตัวอย่าง (%) ที่สารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 2,000 μg/ml หรือต่ำกว่า สามารถยับยั้งการเจริญ (Inhibit, I) หรือฆ่า (kill, K) *B. hominis* ในหลอดทดลองได้แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพร (μg/ml) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* (MIC) และสามารถฆ่า *B. hominis* (MPC) ในหลอดทดลอง

สมุนไพร (สารที่ใช้สกัด)	จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ		ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร (μg/ml)						
			ไม่ได้ผล	2,000	1,000	500	250	125	62.5
ดีปลี (n-Hexane)	12	MIC	7	2	2	-	1	-	-
		MPC	10	1	1	-	-	-	-
ดีปลี (methanol)	6	MIC	4	1	1	-	-	-	-
		MPC	6	-	-	-	-	-	-
เบญกานี (methanol)	21	MIC	5	1	1	1	3	4	6
		MPC	7	4	5	4	1	-	-
สีเสียดไทย (dichloromethane)	10	MIC	5	1	3	1	-	-	-
		MPC	10	-	-	-	-	-	-
สีเสียดไทย (methanol)	10	MIC	9	1					
		MPC	10	-	-	-	-	-	-
ราชดัด (n-Hexane)	6	MIC	6	-	-	-	-	-	-
		MPC	6	-	-	-	-	-	-
ราชดัด (dichloromethane)	13	MIC	1	4	4	2	1	-	1
		MPC	4	4	3	1	1	-	-
ราชดัด (methanol)	12	MIC	1	1	4	4	1	1	-
		MPC	3	6	2	-	-	1	-
ผักขมหนาม (dichloromethane)	10	MIC	10	-	-	-	-	-	-
		MPC	10	-	-	-	-	-	-
ผักขมหนาม (methanol)	10	MIC	10	-	-	-	-	-	-
		MPC	10	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนตัวอย่าง *B. hominis* (%) ที่สารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 2,000 μg/ml หรือต่ำกว่า สามารถยับยั้งการเจริญ (Inhibit, I) หรือฆ่า (Kill, K) เชื้อ *B. hominis* ในหลอดทดลองได้

สมุนไพร (สารที่ใช้สกัด)	จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ		จำนวนตัวอย่างที่ได้ผล (%)
ดีปลี (n-Hexane)	12	I	5 (42)
		K	2 (17)
ดีปลี (methanol)	6	I	2(33)
		K	0(0)
เบญกานี (methanol)	21	I	16(76)
		K	14(67)
สีเสียดไทย (dichloromethane)	10	I	5(50)
		K	0(0)
สีเสียดไทย (methanol)	10	I	1(10)
		K	0(0)
ราชดัด (n-Hexane)	6	I	0(0)
		K	0(0)
ราชดัด (dichloromethane)	13	I	12(92)
		K	9(69)
ราชดัด (methanol)	12	I	11(92)
		K	9(75)
ผักขมหนาม (dichloromethane)	10	I	0(0)
		K	0(0)
ผักขมหนาม (methanol)	10	I	0(0)
		K	0(0)

เมื่อคำนวณจำนวนเชื้อในหลอดทดลองที่มีสารสกัดสมุนไพรแต่ละความเข้มข้นเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อในหลอดควบคุม พบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้งหมด (ยกเว้นราชดัดที่สกัดด้วย n-Hexane) ที่ความเข้มข้น 2,000 μg/ml หรือต่ำกว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* ได้บางส่วน (moderately inhibition; จำนวนเชื้อในหลอดทดลองน้อยกว่าจำนวนเชื้อในหลอดควบคุม 5-50 เท่า) ในเกือบทุกตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 5 จำนวนตัวอย่าง (%) ที่สารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 2,000 μg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* ในหลอดทดลองได้บางส่วน ได้แสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพร (μg/ml) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. hominis* ได้บางส่วน (moderately inhibition) ในหลอดทดลอง

	จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ	ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร (μg/ml) ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* บางส่วน							
		ไม่ได้ผล	2,000	1,000	500	250	125	62.5	<62.5
ดีปลี (n-Hexane)	12	2	1	2	4	1	2	-	-
ดีปลี (methanol)	6	2	2	1	1	-	-	-	-
เบญกานี (methanol)	21	1	-	-	4	1	4	2	9
สีเสียดไทย (dichloro.)	10	1	-	1	2	1	1	4	-
สีเสียดไทย (methanol)	10	3	3	3	-	1	-	-	-
ราชดัด (n-Hexane)	6	5	1	-	-	-	-	-	-
ราชดัด (dichloro.)	13	-	-	1	2	6	3	-	1
ราชดัด (methanol)	12	-	-	-	2	5	1	4	-
ผักขมหนาม (dichloro.)	10	-	1	3	3	2	1	-	-
ผักขมหนาม (methanol)	10	4	3	1	1	-	1	-	-

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนตัวอย่าง *B. hominis* (%) ที่สารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 2,000 μg/ml หรือต่ำกว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. hominis* ในหลอดทดลองได้บางส่วน

สมุนไพร (สารที่ใช้สกัด)	จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ	จำนวนตัวอย่างที่ได้ผล (%)
ดีปลี (n-Hexane)	12	10 (83)
ดีปลี (methanol)	6	4(67)
เบญกานี (methanol)	21	20(95)
สีเสียดไทย (dichloromethane)	10	9(90)
สีเสียดไทย (methanol)	10	7(70)
ราชดัด (n-Hexane)	6	1(17)
ราชดัด (dichloromethane)	13	13(100)
ราชดัด (methanol)	12	12(100)
ผักขมหนาม (dichloromethane)	10	10(100)
ผักขมหนาม (methanol)	10	6(60)

5. การทดสอบความเป็นไปได้ที่เชื้อ *Blastocystis hominis* จะดื้อต่อยา metronidazole หรือสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ทดสอบ

เมื่อนำเชื้อที่ผ่านการทดสอบยา metronidazole มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่แล้วยังสามารถเจริญได้อีก มาทดสอบกับยา metronidazole ซ้ำอีก 3 - 4 ครั้ง พบว่า 4/12 ตัวอย่าง (Bh3, Bh4, Bh5, และ Bh6) มีค่า MIC เพิ่มขึ้นจากเดิมมากกว่า 2 เท่า และมี 4/12 ตัวอย่าง (Bh5, Bh9, Bh10 และ Bh24) มีค่า MPC เพิ่มขึ้นจากเดิมมากกว่า 2 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 7

สำหรับเชื้อที่ผ่านการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพร ที่นำมาทดสอบหาความเป็นไปได้ของการเกิดการดื้อต่อสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบนั้น ได้เลือกทดสอบ

เฉพาะบางตัวอย่างที่สารสกัดสมุนไพรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 1000 μg/ml เท่านั้น

ค่า MIC และค่า MPC ของเบญกานีที่สกัดด้วย methanol จากการทดสอบครั้งต่างๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 8 พบว่ามีเพียง 1/9 ตัวอย่าง (Bh 29) ที่ค่า MICเพิ่มขึ้นจากเดิมมากกว่า 2 เท่า และ 1/9 ตัวอย่าง (Bh 13) ที่ค่า MPC เพิ่มขึ้นจากเดิมมากกว่า 2 เท่า

ค่า MIC และค่า MPC ของราชดัดที่สกัดด้วย dichloromethane จากการทดสอบครั้งต่างๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 9 พบว่ามีเพียง 1/4 ตัวอย่าง (Bh 29) ที่ค่า MIC และ ค่า MPC เพิ่มขึ้นจากเดิมมากกว่า 2 เท่า

ตารางที่ 7 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา metronidazole (μg/ml) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* (MIC) และ ฆ่า *B. hominis* (MPC) ในหลอดทดลองได้ จากการทดลองครั้งต่าง ๆ

ชื่อตัวอย่าง		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4
Bh 3	MIC*	1.25	5	10	ND
	MPC	20	10	40	ND
Bh 4	MIC*	2.5	5	10	ND
	MPC	20	10	40	ND
Bh 5	MIC*	2.5	2.5	10	ND
	MPC#	5	20	>40	ND
Bh 6	MIC*	<1.25	2.5	2.5	ND
	MPC	5	5	10	ND
Bh 7	MIC	10	10	ND	ND
	MPC	20	40	ND	ND
Bh 9	MIC	5	10	ND	ND
	MPC#	5	40	ND	ND
Bh 10	MIC	2.5	5	ND	ND
	MPC#	5	>40	ND	ND
Bh 22	MIC	20	1.25	10	5
	MPC	40	5	10	10
Bh 23	MIC	2.5	5	2.5	ND
	MPC	10	10	5	ND
Bh 24	MIC	5	10	10	ND
	MPC#	5	10	20	ND
Bh 25	MIC	5	2.5	10	5
	MPC	10	10	10	10
Bh 26	MIC	10	5	10	10
	MPC	10	20	20	20

* = มีค่า MIC สูงกว่าเดิมมากกว่า 2 เท่า

\# = มีค่า MPC สูงกว่าเดิมมากกว่า 2 เท่า

ND = not determined

ตารางที่ 8 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรเบญกานี ที่สกัดด้วย methanol (μg/ml) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* (MIC) และฆ่า *B. hominis* (MPC) ในหลอดทดลองได้ จากการทดลองครั้งต่าง ๆ

ชื่อตัวอย่าง		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4
Bh5	MIC	125	125	250	ND
	MPC	1,000	1,000	>2,000	ND
Bh6	MIC	62.5	250	125	125
	MPC	1,000	500	1,000	2,000
Bh7	MIC	125	250	250	ND
	MPC	2,000	2,000	2,000	ND
Bh9	MIC	250	250	125	ND
	MPC	1,000	1,000	2,000	ND
Bh12	MIC	62.5	125	125	ND
	MPC	1,000	2,000	2,000	ND
Bh13	MIC	62.5	125	125	ND
	MPC#	500	2,000	2,000	ND
Bh 29	MIC*	62.5	250	500	ND
	MPC	500	250	1,000	500
Bh 30	MIC	250	500	ND	ND
	MPC	500	1,000	ND	ND
Bh 32	MIC	250	500	ND	ND
	MPC	1,000	2,000	ND	ND

* = มีค่า MIC สูงกว่าเดิมมากกว่า 2 เท่า

\# = มีค่า MPC สูงกว่าเดิมมากกว่า 2 เท่า

ND = Not determined

Central Library
Prince of Songkhla University

ตารางที่ 9 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุด ของสารสกัดราชดัด ที่สกัดด้วย dichloromethane ($\mu g/ml$) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* (MIC) และ ฆ่า *B. hominis* (MPC) ในหลอดทดลองได้ จากการทดลองครั้งต่าง ๆ

ตัวอย่าง		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4
Bh29	MIC*	<62.5	500	250	500
	MPC#	250	1,000	500	1000
Bh30	MIC	1,000	500	ND	ND
	MPC	1,000	500	1,000	2,000
Bh31	MIC	500	250	ND	ND
	MPC	1,000	1,000	ND	ND
Bh32	MIC	250	500	ND	ND
	MPC	1,000	1,000	ND	ND

* = มีค่า MIC สูงกว่าเดิมมากกว่า 2 เท่า

\# = มีค่า MPC สูงกว่าเดิมมากกว่า 2 เท่า

ND = Not determined

วิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจอุจจาระที่เก็บจากผู้ป่วยนอกที่มาตรวจอุจจาระด้วยโรคต่าง ๆ ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ในการศึกษาครั้งนี้พบ *B. hominis* 67 ราย จากตัวอย่างอุจจาระ 503 ราย (13.32%) เมื่อเทียบกับ 3% ที่รายงานโดยนุวิทย์ คุณารักษ์ (2535) ทั้งที่เก็บอุจจาระจากแหล่งเดียวกันเนื่องจากการศึกษาครั้งนี้เป็นการตรวจหาเชื้อโดยการเพาะเลี้ยง ทำให้พบอุบัติการได้มากกว่า (Sawangjaroen 1993)

ความรุนแรงของการทำให้เกิดโรคจะสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของ *B. hominis* ที่ตรวจพบในอุจจาระ ในผู้ที่ไม่มีอาการผิดปกติก็สามารถตรวจพบ *B. hominis* ได้ ในบางครั้งก็พบ *B. hominis* ร่วมกับจุลชีพอื่นที่ก่อโรค มีรายงานว่าในกรณีที่ตรวจไม่พบจุลชีพอื่นที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการในระบบทางเดินอาหารและตรวจพบ *B. hominis* มากกว่า 5 ตัวต่อวงกล้องที่กำลังขยาย 100x ถึงจะให้การวินิจฉัยว่า *B. hominis* อาจเป็นสาเหตุของโรค (Zierdt, 1983; Zaki *et al.*, 1991) และถ้าตรวจพบ *B. hominis* มากกว่า 5 ตัว ต่อวงกล้อง ที่กำลังขยาย 40x ผู้ป่วยก็จะแสดงอาการรุนแรง (Nimri, 1993) โดยทั่วไปการตรวจวินิจฉัยโปรโตซัวก่อโรคในทางเดินอาหารจะไม่ใช้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x และส่วนใหญ่แล้วคนที่มี *B. hominis* ในลำไส้มักจะมีเชื้อในปริมาณที่น้อยและตรวจไม่พบโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์เพียงอย่างเดียว ประกอบกับในการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นชัดเจนว่า *B. hominis* เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นการใช้วิธีเพาะเลี้ยงจะช่วยในการวินิจฉัยการติดเชื้อ *B. hominis* ได้เพิ่มขึ้น

จากผลการทดสอบฤทธิ์ของยา metronidazole ต่อเชื้อ *B. hominis* ในหลอดทดลองพบว่า ในครั้งแรกค่า MIC ของยา metronidazole ที่มีต่อ *B. hominis* อยู่ระหว่าง <1.25 – 20 μg/ml โดยที่ส่วนใหญ่ (21/22 ตัวอย่าง) มีค่า MIC 10 μg/ml หรือต่ำกว่า ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับการทดลองของ Zaman และ Zaki (1996) ที่รายงานว่ายา metronidazole ที่ความเข้มข้น 5 μg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* ในหลอดทดลองได้ แต่ไม่ได้รายงานว่ายานี้สามารถฆ่าเชื้อนี้ในหลอดทดลองหรือไม่ และในการทดลองครั้งนี้พบว่ามี *B. hominis* 1 ตัวอย่างที่ความเข้มข้นของยา metronidazole สูงถึง 40 μg/ml ก็ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้หมด ทั้งนี้ Zaman และ Zaki (1996) พบว่าบาง

ครั้งซีสท์ของ *B. hominis* สามารถทนต่อ metronidazole ที่ความเข้มข้นสูงถึง 5 mg/ml ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *B. hominis* ที่แยกได้จากอุจจาระของชาวอินโดนีเซียจะมีความทนทานต่อยา metronidazole ที่ความเข้มข้นมากกว่า *B. hominis* ที่แยกจากอุจจาระของชาวสิงคโปร์หรือบังคลาเทศถึง 100 เท่า (Haresh *et al.*, 1999) สาหรับผลของยา metronidazole ต่อเชื้อ *B. hominis* ที่แยกจากอุจจาระของคนไทยยังไม่เคยมีรายงาน

ในการทดลองครั้งนี้เมื่อมีการคัดเลือกประชากรของ *B. hominis* ที่เหลือรอดจากการสัมผัสกับยา metronidazole ที่ความเข้มข้นสูงและนำมาทดสอบต่อไป ก็พบว่ามี 4/12 ตัวอย่างที่ต้องใช้ยาที่ความเข้มข้นมากขึ้นกว่าเดิมมากกว่า 2 เท่า จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* หรือฆ่า *B. hominis* ในหลอดทดลองได้หมด (ตารางที่ 5) โดยที่พบว่ามี 2 ตัวอย่าง (Bh 5 และ Bh 10) ที่ยา metronidazole ที่ความเข้มข้น 40 μg/ml ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้หมด กลไกของการดื้อยาใน *B. hominis* นั้นยังไม่มีการศึกษา ส่วนในโปรโตซัวชนิดอื่น เช่น *Trichomonas vaginalis* และ *Giardia lamblia* ดื้อต่อ metronidazole โดยการเปลี่ยนแปลง metabolic pathway (Upcroft and Upcroft, 2001) สำหรับในโปรโตซัวชนิด *Entamoeba histolytica* ที่ทำให้เกิดโรคบิดมีตัวจะเกิดการกลายพันธุ์โดยธรรมชาติเป็นดื้อต่อยา emetine ที่ใช้ในการรักษา ในอัตราส่วน $1:2.5x10^7$ ตัว (Orozco *et al.*, 1985) และพบว่าสามารถชักนำให้ *E. histolytica* เกิดการกลายพันธุ์เป็นดื้อต่อ emetine ในความเข้มข้นที่สูงมากได้โดยการใช้ ethyl-methanesulphonate (Prabhu *et al.*, 2000)

สมุนไพรหลายชนิดที่มีการกล่าวถึงฤทธิ์ในการรักษาอาการเป็นบิดหรือท้องร่วง ท้องเสียในตำหรับยาโบราณตามส่วนต่างๆ ของโลกได้เคยถูกนำมาศึกษาบ่อยครั้ง แต่ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ *B. hominis* มีข้อมูลอยู่น้อยมาก การทดลองครั้งนี้เป็นการนำเอาสมุนไพรไทยที่ใช้ในการรักษาโรคท้องร่วง ท้องเสียในตำรับยาไทยแผนโบราณมาทดสอบกับ *B. hominis* ซึ่งเป็นโปรโตซัวในลำไส้ที่พบบ่อยที่สุด ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้พบว่าราชดัดส่วนที่สกัดด้วย dichloromethane, ราชดัดส่วนที่สกัดด้วย methanol, ลูกเบญกานีส่วนที่สกัดด้วย methanol จะให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* ในหลอดทดลองได้ดีกว่าสารสกัดสมุนไพรชนิดอื่นๆ คือสารสกัดที่ความเข้มข้น 2,000 μg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* คิดเป็น 92%, 92% และ 76% ของจำนวนตัวอย่างที่นำมาทดสอบ ตามลำดับ

เบญกานีเป็นยาฝาดสมาน ใช้แก้ท้องเสีย สารประกอบที่สำคัญคือกรดแทนนิน และกรดกัลลิค (gallic acid) (อรุณพร อิฐรัตน์, 2532; จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์, 2539) Yang และคณะ (1996) พบว่าน้ำต้มของเมล็ดราชดัดที่ความเข้มข้น 500 μg/ml มีผลในการยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* ในหลอดทดลอง ในปี 1992-1993 Ongsakul และคณะได้รายงานว่าน้ำคั้นสดและน้ำต้มผักเบี้ยใหญ่มีผลต่อการเจริญของ *Entamoeba histolytica* ในหลอดทดลอง นอกจากนี้ ได้มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรบางชนิดต่อ *E. histolytica* ในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองจากประเทศอินเดีย พบว่าสมุนไพรหลายชนิดที่สกัดด้วย ethanol มีผลต่อเชื้อบิดมีตัวในหลอดทดลองและสามารถรักษาโรคนี้ในสัตว์ทดลองได้ (Sohni *et al.*, 1995; Ghoshal *et al.*, 1996)

เมื่อนำ *B. hominis* 9 ตัวอย่างจากหลอดที่มีสารสกัดเบญกานีที่ความเข้มข้นสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้ มาเพาะเลี้ยง และมาทดสอบความเป็นไปได้ของการดื้อยาโดยการทดสอบซ้ำอีก 3-4 ครั้ง พบว่ามีเพียงตัวอย่างเดียว (11%) ที่ต้องใช้สารสกัดเบญกานีในระดับความเข้มข้นที่ต่างจากเดิมมากกว่า 2 เท่าจึงจะยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* ได้ ในขณะที่เมื่อทดสอบกับ metronidazole มีถึง 4/12 ตัวอย่าง (33%) ที่ต้องใช้ความเข้มข้นของยา metronidazole ที่สูงขึ้นมากกว่าการทดสอบครั้งแรกประมาณ 2-3 เท่า จึงจะยับยั้งการเจริญได้ (ตารางที่ 7) แสดงให้เห็นว่า *B. hominis* อาจเกิดการดื้อต่อ metronidazole ได้ง่ายกว่าดื้อต่อเบญกานี สำหรับการทดสอบการดื้อต่อสารสกัดจากราชดัดส่วนที่สกัดด้วย dichloromethane เนื่องจากตัวอย่างมีจำนวนน้อย การแปลผลยังไม่สามารถสรุปได้

การทดลองในครั้งนี้พบว่าสารสกัดสมุนไพรส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* ในหลอดทดลองได้บางส่วน ซึ่งนับว่าเป็นการลดปริมาณเชื้อลงเท่านั้น อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าสารสกัดสมุนไพรสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. hominis* ได้บางส่วน แต่ก็ยังนับว่ามีประโยชน์เนื่องจากการติดเชื้อ *B. hominis* เป็นจำนวนน้อยในลำไส้ ผู้ติดเชื้อก็มักจะไม่แสดงอาการของโรค (Zierdt, 1983; Zaki *et al.*, 1991) ดังนั้น การใช้สมุนไพรดังกล่าวเพื่อลดปริมาณ *B. hominis* ในลำไส้ลงบางส่วนอาจเป็นการทุเลาอาการที่จะเกิดได้ ขณะนี้ยังไม่สามารถบอกได้ว่าสารที่ออกฤทธิ์เป็นสารชนิดใด จะต้องมีการศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์. 2539. *เภสัชเวทกับตำรายาแผนโบราณ.* ภาควิชาเภสัชเวท และ เภสัชพฤกษาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 218-219.

ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ. 2525 ผักขมหนาม, *หมอชาวบ้าน* ปีที่ 34: 58-59.

นุวิท คุณารักษ์. 2535. พยาธิ *Blastocystis hominis* ในอุจจาระผู้ป่วยของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์. ว. *เทคนิคการแพทย์* 20: 49-52.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2542. *พจนานุกรมสมุนไพรไทย.* รวมสาส์น. กรุงเทพฯ. หน้า 467-469.

เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. 2519. *ไม้เทศเมืองไทย* สรรพคุณของยาเทศและยาไทย. สำนักพิมพ์เกษมบรรณกิจ, กรุงเทพฯ.

อรุณพร อิฐรัตน์. 2532. *สมุนไพรไทย-เทศ.* ภาควิชาเภสัชเวท และเภสัชพฤกษาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 68.

Bhopale, K.K, Pradhan, K.S, Masani, K.B. and Kaul, C.L. 1995. A comparative study of experimental caecal amoebiasis and the evaluation of amoebicides. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **89**: 253-259.

Boreham, P.F.L. and Stenzel, D.J. 1993. *Blastocystis hominis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Adv. Parasitol.* **32**: 1-70.

Brumpt, E. 1912. *Blastocystis hominis* n. sp. *et* formes voisines. *Bull. la Soc. Pathol. Exot.* **5**: 725-730

Ghoshal, S., Krishna Prasad, B.N. and Lakshmi, V. 1996. Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against *Entamoeba histolytica in vitro* and *in vivo. J. Ethnopharmacol.* **50**: 167-170.

Haresh, K., Suresh, K., Khairul Anus, A., and Saminathan, S. 1999. Isolate resistance of *Blastocystis hominis* to metronidazole. *Trop. Med. Int. Health* **4**: 274-277.

Johnson, A.M., Thanou, A., Boreham, P.F.L. and Baverstock, P.R. 1989. *Blastocystis hominis*: phylogenetic affinities determined by rRNA sequence comparison. *Exp. Parasitol.* **68**: 283-288.

Johnson, P.J. 1993. Metronidazole and drug resistance. *Parasitol. Today* **9**: 183-186.

Lamon, C., Sermsart, B. and Sripochang, S. 1992. Prevalence of *Blastocystis hominis* in the patients from out patients department of Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand. *J. Trop Med Parasitol.* **15**: 1-6.

Leelakusolvong, S., Manatsathit, S., Sattawatthamrong, Y., Tanwandee, T., Kachintorn, U., Luengrojanakul, P., Boonyapisit, S. and Chimapak, O. 1997. Causes and clinical courses of chronic diarrhoea in Siriraj hospital. *Siriraj Hosp. Gaz.* **49**: 462-468.

Legator, M.S., Connor, T.H. and Stoeckel, M., 1975. Detection of mutagenic activity of metronidazole and nitridazole in body fluids of humans and mice. *Science* **188**, 1118-1119.

Lemée, V., Zaharia, I., Nevez, G., Rabodonirina, M., Brasseur, P., Ballet, J.J. and Favennec, L. 2000. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *J. Antimicrob. Chemothe.* **46**: 819-821.

Mehlhorn, H. 1988. *Blastocystis hominis*, Brumpt 1912. Are there different stages or species? *Parasitol. Res.* **74**: 393-395.

Nimri, L.F. 1993. Evidence of an epidemic of *Blastocystis hominis* infections in preschool children in northern Jordan. *J. Clin. Microbiol* **31**: 2706-2708.

Ongsakul, M., Sawangjaroen, N., Thaina, P., Sunbhanich, M., Chatbenjarong, J. and Thongnurung, A. 1992-1993. Antimicrobial activities of *Portulaca oleracea* Linn *in vitro*. *Thai J. Pharmacol.* **14-15**: 49-53.

Orozco, E., de la Cruz Hernandez, F. and Rodriguez, M.A. 1985. Isolation and characterization of *Entamoeba histolytica* mutants resistant to emetine. *Mol. Biochem. Parasitol.* **15**: 49-59.

Prabhu, R., Sehgal, R., Chakraborti, A., Malla, N., Ganguly, N.K. and Mahajan, R.C. 2000. Isolation of emetine resistant clones of *Entamoeba histolytica* by petri dish agar method. *Indian J. Med. Res.* **111**: 11-13.

Ricci, N. Toma, P., Furlani, M., Caselli, M. and Gullini, S. 1984. Blastocystis hominis: a neglected cause of diarrhea? *Lancet* **1**:966.

Rustia, M. and Shubik, P., 1972. Induction of lung tumors and malignant lymphomas in mice by metronidazole. *J. National Cancer Institute* **48**, 721-729.

Sawangjaroen, N., Luke, R. and Prociv, P. 1993. Diagnosis by faecal culture of *Dientamoeba fragilis* infections in Australian patients with diarrhoea. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med .Hyg.* **87**: 163-165.

Saxena, A., Chugh, S. and Vinayak, V.K., 1985. Modulation of host immune responses by metronidazole. *Indian J. of Med. Res.* **81**: 387-390.

Sheehan, D.J., Raucher, B.G. and McKitrick, J.C. 1986. Association of *Blastocystis hominis* with sign and symptoms of human disease. *J. Clin. Microb.* **24**: 548-550.

Shubik, P. 1972. Current status of chemical carcinogens. *Proc. Nat. Academy Sci. USA.* **69**: 1052-1055.

Sinnian, B. and Rajeswari, B. 1994. *Blastocystis hominis* infection, A cause of human diarrhea. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **25**: 490-492.

Sohni, Y.R., Kaimal, P. and Bhatt, R.M. 1995. The antiamoebic effect of a crude drug formulation of herbal extracts against *Entamoeba histolytica in vitro* and *in vivo. J. Ethnopharmacol.* **45**: 43-52.

Stenzel, D.J. and Boreham, P.F.L. 1996. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**: 563-584.

Taamasri, P., Mungthin, M., Rangsin, R., Tongupprakarn, B., Areekul, W. and Leelayoova, S. 2000. Transmission of intestinal blastocystosis related to the quality of drinking water. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 31: 112-117.

Tona, L., Kambu, K., Ngimbi, N., Cimanga, K. and Vlietinck, A.J. 1998. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 61: 57-65.

Tracy, J.W. and Webster, L.T. 1996. Drug used in the chemotherapy of protozoal infections. In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Ninth edition, Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W. and Gilman, A.G. editors, McGraw-Hill, New York, pp 987-1008.

Upcroft, J.A. and Upcroft, P. 1993. Drug resistance and *Giardia*. *Parasitol Today* 9: 187-190.

Upcroft, J.A. and Upcroft, P. 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 150-164.

Voolmann, Y. and Boreham, P.F.L. 1993. Metronidazole resistant *Trichomonas vaginalis* in Brisbane. *Med. J. Aust.* 159: 490.

Yang, L.Q., Singh, M., Yap, E.H., Ng, G.C., Xu, H.X. and Sim, K.Y. 1996. *In vitro* response of *Blastocystis hominis* against traditional Chinese medicine. *J. Ethnopharmacol.* 55:35-42.

Zaki, M., Daoud, A.S., Pugh, R.N.H., Al-Ali, F., Al-Mutairi, G. and Al-Saleh, Q. 1991 Clinical report of *Blastocystis hominis* infection in Children. *J. Trop. Med. Hyg.* 94: 118-122.

Zaman, V. and Khan, K.Z. 1994. A comparison of direct microscopy with culture for the diagnosis of *Blastocystis hominis*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 25: 792-793.

Zaman, V. and Zaki, M. 1996. Resistance of *Blastocystis hominis* cysts to metronidazole. *Trop. Med. Int. Health* 1:677-678.

Zierdt, C.H. 1978. *Blastocystis hominis*, an intestinal protozoan parasite of man. *Public Health Lab.* **36**: 147-161.

Zierdt, C.H. 1983. *Blastocystis hominis*; a protozoan parasite of human beings. *Clin. Microbiol. Newsetter* **5**: 57-59.

Zierdt, C.H. 1991. *Blastocystis hominis*-past and future. *Clin. Microbiol.* Rev. **4**: 61-79.

Zierdt, C.H., Rude, W.S. and Bull, B.S. 1967. Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. *Am. J. Clin. Pathol.* **48(5)**: 495-501.

Zierdt, C.H., Swan, J.C. and Hosseini, J. 1983 *In vitro* response of *Blastocystis hominis* to anbtiprotozoal drugs. *J. Parasitol.* **30**: 332-334.

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงโปรโตซัวในลำไส้

ล้างไข่ไก่ 4 ฟองให้สะอาดด้วย 70 % alcohol
รอจนแห้งแล้วต่อยไข่ลงในบิกเกอร์
ขนาด 250 ml เติม Ringer's solution ที่ sterile แล้ว 50 ml

↓

ตีไข่กับน้ำยาให้เข้ากันเบา ๆ อย่าให้เกิดฟอง

↓

นำส่วนผสมที่ได้กรองด้วยผ้าก๊อซที่ sterile 3 ชั้น

↓

ดูดส่วนผสมใส่ใน screw capped tube ขนาด 15 ml หลอดละ 3 ml
พยายามอย่าให้เกิดฟอง

↓

นำไปนึ่งใน water bath 80 – 90 °C นาน 10 นาที
โดยเอียงหลอดให้ได้หน้าตัดของไข่ 30 องศา

↓

เมื่อ slant เย็นลงแล้วเติม PBS pH 7.4 ที่ sterileแล้ว หลอดละ 4.5 ml

↓

เก็บไว้ในตู้เย็น 4°C เพื่อใช้ต่อไป

การเตรียมสารละลาย Phosphate Buffered saline (PBS) pH 7.4 (1,000 ml)

0.85% NSS เตรียมโดย

ละลาย NaCl 8.5 g ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 L

M/15 KH_2PO_4 เตรียมโดย

ละลาย KH_2PO_4 9.07 g ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 L

M/15 Na_2HPO_4 เตรียมโดย

ละลาย Na_2HPO_4 0.946 g ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 L

ผสม 0.85% NSS 500 ml, M/15 KH_2PO_4 410 ml และ M/15 Na_2HPO_4 90 ml เข้าด้วยกัน ปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วย 1N HCl หรือ 1 N NaOH ก่อนใช้

การเตรียม stock solution ของ Ringer's solution (1,000 ml)

ส่วนประกอบมีดังนี้

1. NaCl 90 g
2. $CaCl_2$ 2 g
3. KCl 2 g

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 L

autoclave ก่อนนำไปใช้

ก่อนใช้เจือจาง 1 : 10 ด้วยน้ำกลั่นที่ sterile แล้ว