

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

#### วัสดุ

##### 1. ตัวอย่างอุจจาระ

ตัวอย่างอุจจาระได้จากผู้ป่วยที่แพทย์ส่งตรวจอุจจาระในห้องปฏิบัติการทางจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ในปี พ.ศ. 2540 จำนวน 317 ตัวอย่าง

##### 2. เชื้อโปรโตซัวในลำไส้ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 เชื้อ *E. histolytica* แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยเด็กอายุ 10 เดือน จากโรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช (Eh<sub>1</sub>) 1 ตัวอย่าง และผู้ป่วยอายุ 22 ปี ที่มีอาการถ่ายเป็นมูกเลือดจากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ (Eh<sub>2</sub>) 1 ตัวอย่าง

2.2 เชื้อ *B. hominis* แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ 10 ตัวอย่าง

##### 3. สมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง

3.1 ผักขมหนาม (*Amaranthus spinosus* Linn.) ส่วนที่ใช้ในการวิจัยคือ ราก (ที่มาจากบริเวณเขตเทศบาลนครเมืองสงขลาและบริเวณใกล้เคียงในจังหวัดสงขลา เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2540)

3.2 เบญจกานี (*Quercus infectoria* Olivier) ส่วนที่ใช้ในการวิจัยคือ ส่วนที่เป็นรังหนอนก้อนกลมๆ เรียกว่า ลูกเบญจกานี (ที่มา: ชื้อมาจากร้านขายสมุนไพรในเขตเทศบาลนครเมืองสงขลา จังหวัดสงขลา เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2540)

3.3 ดีปลี (*Piper longum* Linn.) ส่วนที่ใช้ในการวิจัยคือ ผล (ที่มา: ซื้อมาจากร้านขายสมุนไพรในเขตเทศบาลนครเมืองสงขลา จังหวัดสงขลา เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2540)

3.4 ผักเบี้ยใหญ่ (*Portulaca oleracea* Linn.) ส่วนที่ใช้ในการวิจัย คือ ทั้งต้น (ที่มา: เก็บมาจากบริเวณเขตเทศบาลนครเมืองสงขลาและบริเวณใกล้เคียงในจังหวัดสงขลา เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2540)

3.5 ชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.) ส่วนที่ใช้ในการวิจัย คือ ราก (ที่มา: เก็บมาจากบริเวณอำเภอนาหม่อม จังหวัดสงขลา เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2540)

3.6 ชิงช้าชาลี (*Tinospora cordifolia* Forman.) ส่วนที่ใช้ในการวิจัย คือ ลำต้นหรือเถา (ที่มา: ซื้อมาจากร้านขายสมุนไพรในเขตเทศบาลนครเมืองสงขลา จังหวัดสงขลา เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2540)

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Boeck-Drbohlav (ภาคผนวก ก)

5. สารเคมีและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) ของบริษัท BDH

calf bovine donor serum ของบริษัท Starrate

disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ของบริษัท Merck

dimethyl sulfoxide (DMSO) ของบริษัท Riedel

absolute methanol ของบริษัท BDH

potassium chloride (KCl) ของบริษัท Merck

potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ของบริษัท BDH

sodium chloride (NaCl) ของบริษัท Merck

แป้งข้าวเจ้า (rice starch) ของบริษัท Difco

ยา penicillin G sodium และ streptomycin sulphate ของบริษัท Sigma

ยา metronidazole ของบริษัท Sigma

## อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์ (Microscopy) ของ Olympus
2. เครื่องแก้วสำหรับการวิจัยทางจุลชีววิทยา
3. เครื่องเขย่า (Mixer) ของ Scientific Industries, Inc., U.S.A.
4. เครื่องชั่ง (Electronic Balance) ของ Sartorius, Germany
5. เครื่องทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilizer) ของ Flexi-Dry
6. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของ Radiometer Copenhagen
7. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ของ Heraeus GmbH, Germany
8. ตู้เย็น (Refrigerator) ของ Sanyo, Thailand
9. ตู้อบแห้ง (Hot Air Oven) ของ Heraeus GmbH, Germany
10. ไมโครไปเปต (Micropipette) ของ Eppendorf
11. Pastuer Pipette
12. หม้อนึ่งไอน้ำ (Autoclave) ของ Tomy Seiko Co. Ltd., Japan
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ของ Eyela Tokla Rikakikai Co. Ltd., Japan
14. เครื่อง Evaporater ของ Switzerland

## วิธีการ

### 2.1 การสกัดสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง

นำรากผักขมหนาม ต้นผักเบี้ยใหญ่ และ รากชะพลู มาล้างให้สะอาดและล้างครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น นำมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปตากและอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท

นำลูกเบญจกานี ผลคิปลี และเถาชิงช้าชาติ ที่ซื้อจากร้านขายสมุนไพรมาล้างให้สะอาดและล้างครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปตากและอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท

จากนั้นนำสมุนไพรแต่ละชนิด มาปั่นด้วยเครื่องปั่นให้เป็นผงละเอียด นำผงของสมุนไพรห่อด้วยผ้าก๊อซแช่ใน absolute methanol ในสัดส่วนสมุนไพรต่อ absolute methanol เป็น 1:3 โดยน้ำหนัก นาน 7 วัน รินส่วนที่เป็นของเหลวไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำของเหลวที่กรองได้ไประเหย absolute methanol ออกด้วยเครื่อง evaporator กากสมุนไพรที่เหลือนำไปแช่ต่อด้วย absolute methanol ทำเช่นเดียวกับการแช่ครั้งแรกทำซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้ง แล้วนำของเหลวไปทำให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่อง lyophilizer นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดของสมุนไพรแต่ละชนิดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้ในการทดลอง

## 2.2 เปรียบเทียบวิธีตรวจหาโปรโตซัวในลำไส้ด้วยวิธีสเมียร์โดยตรง กับวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงโปรโตซัวในหลอดทดลอง

### 2.2.1 การตรวจหาโปรโตซัวในลำไส้ด้วยวิธีสเมียร์โดยตรง

หยดน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% ลงบนสไลด์ ประมาณ 1- 2 หยด ป้ายอุจจาระขนาดเท่าหัวไม้ขีดไฟลงบนสไลด์แล้วเกลี่ยให้ผสมกับน้ำเกลือที่หยดไว้แล้วปิดทับด้วย cover glass (22x22 มิลลิเมตร) นำไปตรวจหาโปรโตซัวในลำไส้ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x และ 40x (Zaman and Khan, 1994) ทำการตรวจตัวอย่างละ 2 ซ้ำ บันทึกผล

### 2.2.2 การตรวจหาโปรโตซัวในลำไส้ด้วยวิธีเพาะเลี้ยง

นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้แล้ว (ภาคผนวก ก) วางไว้ในอุณหภูมิห้องจนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วจึงใส่ซีรัม (calf bovine donor serum) เป็น 10% ของสารละลาย PBS (phosphate buffer saline) pH 7.4 ที่มีในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อและใส่แป้งข้าวเจ้า (rice starch) ที่ปราศจากเชื้อลงไปหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณหลอดละ 25 มิลลิกรัม แล้วนำตัวอย่างอุจจาระที่ต้องการตรวจขนาดเท่าหัวไม้ขีดไฟใส่ลงไปในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ตัวอย่างละ 2 หลอด ปิดฝาให้แน่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปตรวจหาโปรโตซัวในลำไส้โดยใช้ pastuer pipette ที่ปราศจากเชื้อดูดสารละลาย PBS ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อตรงบริเวณส่วนล่างของหลอดหยดลงบนสไลด์ 1-2 หยด ปิดทับด้วย

cover glass (22x22 มิลลิเมตร) นำไปตรวจหาโปรโตซัวด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x และ 40x ทำการตรวจหาลอดละ 2 ครั้ง บันทึกผลและนำโปรโตซัวที่ตรวจพบมาเพาะเลี้ยงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

นำผลการตรวจทั้ง 2 วิธีมาทำการทดสอบหาความแตกต่างทางสถิติ สถิติที่ใช้ในการทดสอบ คือ Z-test

### 2.3 ศึกษาการเติบโตของ *E. histolytica* และ *B. hominis* ในหลอดทดลอง

นำ *E. histolytica* และ *B. hominis* ที่เพาะเลี้ยงไว้ในข้อ 2.2.2 ถ่ายใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ จำนวน 2 หลอด โดยคำนวณให้ได้จำนวนเชื้อเริ่มต้นในแต่ละหลอดเท่ากับ  $1 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มครบทุกๆ 4 ชั่วโมง จึงนำแต่ละหลอดมานับจำนวนเชื้อ โดยการเขย่าส่วน PBS ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันแล้วจึงใช้ pastuer pipette ดูดเชื้อหยดลงบน haemocytometer นับจำนวนโปรโตซัวด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x และ 40x นับจำนวนเชื้อหลอดละ 2 ซ้ำ นับและคำนวณจำนวนเชื้อเป็น เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) บันทึกจำนวนเซลล์ที่นับได้กับเวลาเขียนเป็นกราฟแสดงการเติบโตของเชื้อ

### 2.4 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรและยาเมโทรนิดาโซลต่อโปรโตซัวในลำไส้ในหลอดทดลอง (ดัดแปลงจาก Zierdt *et al.*, 1983)

2.4.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรและยาเมโทรนิดาโซลที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

ชั่งสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 2.1 อย่างละ 500 มิลลิกรัม ผสมกับ dimethyl sulfoxide (DMSO) จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วจึงใส่สารละลาย PBS (pH 7.4) จำนวน 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันใช้สารละลายที่เตรียมไว้นี้เป็น stock ในการเตรียมสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ต้องการใช้ในการทดลอง ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง คือ 2,000, 1,500, 1,000, 750, 500, 250 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำยาเมโทรนิดาโซล 200 มิลลิกรัม ผสมกับสารละลาย PBS (pH 7.4) จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันใช้เป็น stock ในการเตรียมยาที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ต้องการใช้ในการทดลอง ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง คือ 20, 10, และ 5 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร

#### 2.4.2 การเตรียมเชื้อ โปรโตซัวในลำไส้เพื่อใช้ในการทดลอง

นำ *E. histolytica* และ *B. hominis* ที่ได้จากการตรวจอุจจาระมาถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะเลี้ยงจนกระทั่งมีจำนวนมากพอที่จะนำมาทดสอบ โดยการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง สำหรับ *E. histolytica* และใส่แป้งข้าวเจ้า เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 48 ชั่วโมง สำหรับ *B. hominis* และไม่ใส่แป้งข้าวเจ้า

#### 2.4.3 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อโปรโตซัวในลำไส้ในหลอดทดลอง

##### 2.4.3.1 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อ *E. histolytica* ในหลอดทดลอง

นำหลอดอาหารที่เตรียมไว้สำหรับเพาะเลี้ยง *E. histolytica* (ภาคผนวก ก) ซึ่งมีสารละลายที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 3 มิลลิลิตร จำนวน 4 ชุด ทำการทดลองชุดละ 2 ซ้ำ คือ ชุดที่ 1 หลอดทดลอง PBS ชุดที่ 2 หลอดควบคุม DMSO ชุดที่ 3 หลอดทดลองยาเมโทรนิดาโซล และชุดที่ 4 หลอดทดลองสารสกัดสมุนไพร จากนั้นใส่เชื้อ *E. histolytica* ที่ต้องการทดลอง ( $Eh_1$  และ  $Eh_2$ ) ใส่ในหลอดทดลอง จำนวน  $1 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร และใส่สารที่ต้องการทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร (ชุดที่ 1 ใส่สารละลาย PBS, ชุดที่ 2 ใส่สารละลาย DMSO, ชุดที่ 3 ใส่เมโทรนิดาโซล และชุดที่ 4 ใส่สารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงดูดเชื้อจากหลอดทดลองแต่ละหลอดมาตรวจหาเชื้อและนับจำนวนเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x โดยใช้ hemocytometer นับซ้ำหลอดละ 2 ครั้ง การทดลองจากชุดที่ 2 และ 3 นำจำนวนเชื้อที่นับได้แต่ละครั้งมารวมกันแล้วคิดเป็นค่าเฉลี่ยนำมาคำนวณเป็น เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมาเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อในหลอดควบคุม DMSO บันทึกผลการทดลองและรายงานผล ส่วนการทดลองชุดที่ 1 และ 2 นำจำนวนเชื้อที่นับได้แต่ละครั้งมา

รวมกันแล้วคิดเป็นค่าเฉลี่ยนำมาคำนวณเป็น เซลล์ต่อมิลลิลิตร บันทึกผลการทดลองเพื่อนำมาเปรียบเทียบจำนวนเชื้อของการทดลองชุดที่ 1 และ 2

2.4.3.2 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อ *B. hominis* ในหลอดทดลอง

นำหลอดอาหารที่เตรียมไว้สำหรับเพาะเลี้ยง *B. hominis* (ภาคผนวก ก) ซึ่งมีสารละลายที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 3 มิลลิลิตร จำนวน 4 ชุด ทำการทดลองชุดละ 2 ซ้ำ คือ ชุดที่ 1 หลอดทดลอง PBS, ชุดที่ 2 หลอดควบคุม DMSO, ชุดที่ 3 หลอดทดลองยามะโทรนิดาโซล และชุดที่ 4 หลอดทดลองสารสกัดสมุนไพร ทำการทดลองกับเชื้อ *B. hominis* จำนวน 10 ตัวอย่าง ( $Bh_1, Bh_2, Bh_3, Bh_4, Bh_5, Bh_6, Bh_7, Bh_8, Bh_9$  และ  $Bh_{10}$ ) ทำการทดลองและรายงานผลตามขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 2.4.3.1

การรายงานผลใช้วิธีการรายงานผลของ Zierdt *et al.*, (1983) ดังนี้

(1) ในหลอดทดลองใดมีจำนวนเชื้อต่ำกว่าหลอดควบคุม 50-100 เท่า ถือว่าสารสกัดสมุนไพรจากหลอดนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Inhibitory)

(2) ในหลอดทดลองใดมีจำนวนเชื้อต่ำกว่าหลอดควบคุม 5-50 เท่า ถือว่าสารสกัดสมุนไพรจากหลอดนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้บางส่วน (Moderately inhibitory)

(3) ในหลอดทดลองใดมีจำนวนเชื้อต่ำกว่าหลอดควบคุม 0-5 เท่า ถือว่าสารสกัดสมุนไพรจากหลอดนั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Not inhibitory)

การรายงานค่า Minimum Parasitidal Concentration (MPC) ดังนี้

ถ้าหลอดไหนตรวจไม่พบเชื้อให้นำตะกอนมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่ที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพรแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง แล้วนำตะกอนมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อหาค่า Minimum Parasitidal Concentration (MPC) ซึ่งก็คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรหรือยาที่สามารถฆ่าเชื้อได้หมด

## 2.5 การทดลองหาความเป็นไปได้ในการดื้อยาสมุนไพรของโปรโตซัวในลำไส้ในหลอดทดลอง

นำ *B. hominis* จากหลอดทดสอบที่ตรวจไม่พบเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงโดยการถ่ายเชื้อลงในอาหารปกติแล้วเชื้อสามารถเจริญได้มาเพาะเลี้ยงจนมีปริมาณเพียงพอ แล้วนำมาทดสอบกับสมุนไพรเดิมอีกครั้ง พร้อมทั้งตรวจนับและรายงานผลเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.4.3 นำค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรและยามะโหรีนิคาโซลที่สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อโปรโตซัวในลำไส้ได้มาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลองจากข้อ 2.4.3

การแปรผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรและยามะโหรีนิคาโซลที่สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อโปรโตซัวในลำไส้จากผลการทดลองครั้งที่ 2 มีค่ามากกว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรและยามะโหรีนิคาโซลที่สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อโปรโตซัวในลำไส้จากผลการทดลองครั้งที่ 1 มากกว่า 1 ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองถือว่าเชื่อมีความเป็นไปได้ในการดื้อยา