รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ต้าน *Blastocystis hominis* ของสารสกัดกระชายขาว และเห็ดหลินจือในหลอดทดลอง

STUDY ON ANTI-*BLASTOCYSTIS HOMINIS* ACTIVITY OF THE EXTRACTS OF *BOESENBERGIA ROTUNDA* AND *GANODERMA LUCIDUM* IN VITRO ASSAY

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

โดย

เฉลิมพล แก้วใจ

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2564

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิตที่สนับสนุนโครงการนี้ รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการอย่างดี อีกทั้งผู้ที่เกี่ยวข้อง ผู้ช่วยวิจัยที่ได้สละเวลาในการทำวิจัย สนับสนุนในงานของห้องปฏิบัติในการเตรียมงานส่งเสริมงานวิจัยนี้ และอาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยในชุมชนชาวบ้าน ต.ธาตุ อ.เชียงคาน จ.เลย จากการศึกษาครั้งก่อนอีกด้วย

ทางผู้วิจัย ขอขอบคุณ ดร.อัญชลี ต้นสมบูรณ์ ที่ได้ร่วมการวิจัยครั้งนี้ และคณาจารย์กลุ่มวิชาปรสิตวิทยา ที่ได้ให้คำแนะนำในโครงการนี้ และเจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คณะเทคนิคการแพทย์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในโครงการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

เฉลิมพล แก้วใจ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ชื่อเรื่อง : การศึกษาฤทธิ์ต้าน *Blastocystis hominis* ของสารสกัดกระชายขาว และเห็ดหลินจือ ในหลอดทดลอง

ผู้วิจัย : เฉลิมพล แก้วใจ สถาบัน : มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีที่พิมพ์ : 2564 สถานที่พิมพ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต

แหล่งที่เก็บรายงาน : คณะเทคนิคการแพทย์ จำนวนหน้างานวิจัย: 39 หน้า

คำสำคัญ : *บลาสโตซิสทิส, โปรโตซัวในลำไส้, กระชายขาว, เห็ดหลินจือ*

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อ *Blastocystis hominis* ด้วยสารสกัดกระชายขาวและเห็ดหลินจือในหลอดทดลอง โดยหาอัตราการยับยั้งเชื้อ *Blastocystis hominis* ในอาหารเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดสมุนไพรและยา metronidazole ด้วยการย้อมสี vital stain exclusion assay นำมาทดสอบในความเข้มข้นที่มีตัวทำละลาย 1%DMSO ในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ นำสารสกัดกับยา metronidazole ใส่ในหลอดเพาะเลี้ยง *Blastocystis* เพื่อทดสอบหาอัตราการตายของเชื้อในเวลา 12 ถึง 48 ชั่วโมง พบว่าอัตราการยับยั้งของสารสกัดกระชายขาวสูงสุด (98.6%) เห็ดหลินจือ (94%) และ ยา metronidazole (90%) ตามลำดับ สารสกัดกระชายขาวมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมากที่สุดและมีองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่สำคัญจากการวิเคราะห์ด้วย GC-HPLC และ MS พบว่า มีสาร terpenes และ monoterpenes ในสารสกัดกระชายขาว ซึ่งเป็นสารประกอบที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อโปรโตซัว *Blastocystis hominis* ได้ สามารถนำสารออกฤทธิ์ที่สำคัญจากสารสกัดสมุนไพรมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเพื่อใช้ในรักษาการติดเชื้อโปรโตซัวในลำไส้ ต่อไป

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Title : STUDY ON ANTI-*BLASTOCYSTIS HOMINIS* ACTIVITY OF THE EXTRACTS OF *BOESENBERGIA ROTUNDA* AND *GANODERMA LUCIDUM* IN VITRO ASSAY

Researcher: Chalermpon Kaewjai **Institution :** Rangsit University

Year of Publication : 2021 **Publisher :** Rangsit University

Sources : Faculty of Medical Technology **No. of page**: 39 pages

Keywords : *Blastocystis hominis*, Intestinal protozoa, Krachai, Lingzhu

Abstract

This study aimed to measure anti-blastocystis activity by using Krachai ethanolic extract and Lingzhu ethanolic extract as local herbal remedies. The inhibitory of *Blastocystis hominis* was measured by viability stain exclusion assay in small capped tube cultivation method. *Blastocystis hominis* culture were incubated in anaerobic condition and measured by cell counting chamber. Krachai and Lingzhu extracts were dissolved with 1%DMSO in Phosphate buffer. *Blastocystis* culture were treated with herbal extracts and metronidazole in buffer solution. This results showed after 12 to 48 hrs, the most inhibitory activities were Krachai extract (98.6%), Lingzhu extract (94%) and metronidazole (90%), respectively. The active chemical compounds were analyzed by CG-HPLC/MS. This results showed terpenes and monoterpenes of Krachai extract was the most residual analyte in this study. Krachai extract was showed the anti-protozoal activity of the herbal extracts that have potential effects and used as therapeutic agents against intestinal protozoa.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ข

บทคัดย่อภาษาไทย ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ง

สารบัญตาราง ช

สารบัญรูป ซ

สารบัญแผนภูมิ ฌ

สัญลักษณ์และคำย่อ ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ที่มาของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 *Blastocystis hominis* 4

2.2 กระชายขาว *Boesenbergia rotunda*(L.) Mansf. 5

2.3 เห็ดหลินจือ *Ganoderma lucidum* 6

2.4 สารสกัดสมุนไพรกับเชื้อ *Blastocystis hominis* 7

2.5 การตรวจวินิจฉัย *B.hominis* วิธี Simple direct smear 7

2.6 การตรวจวินิจฉัย *B.hominis* วิธีการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง 7

2.7 การตรวจวินิจฉัย *B.hominis* วิธี PCR 8

2.8 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี HPLC/LC-MS 9

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย 10

3.1 การออกแบบการวิจัย 10

3.2 เครื่องมือและสารเคมี 10

3.2.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์ 10

3.2.2 สารเคมีและน้ำยาทดสอบ 11

3.2.3 สารเคมีในการทดสอบทางอณูชีววิทยา 11

3.3 วิธีการดำเนินการทดลอง 11

3.3.1 สารสกัดสมุนไพร 11

3.3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ 11

3.3.3 การทดสอบที่ใช้ในงานวิจัย 12

3.3.4 การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูล 12

บทที่ 4 ผลการทดลอง 13

4.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Blastocystis* spp. ใน Jones' medium cultivation 13

4.2 การตรวจหาอัตราการรอดชีวิต ด้วยการย้อมสี vital stain exclusion assay 14

4.3 ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพร ในการยับยั้งการเจริญของ *Blastocystis* spp. 15

4.4 การตรวจวิเคราะห์สารประกอบทางโมเลกุลของสารสกัดสมุนไพร 19

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 21

บรรณานุกรม 23

ภาคผนวก ภาพแสดงการทดสอบและการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Blastocystis hominis* 27

ภาพแสดงผลประสิทธิภาพของสารสกัดด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง 36

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงจำนวนร้อยละอัตราการรอดชีวิต ในสารละลายที่นำมาทดสอบ	14
2	แสดงจำนวนร้อยละการยับยั้งของเชื้อ *Blastocystis hominis* กับสารสกัดสมุนไพร	15
3	ร้อยละของสารประกอบที่พบในสารสกัดกระชายขาวและเห็ดหลินจือ	20

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	*Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form	4
2	กระชายขาว (Krachi) *Boesenbergia rotunda*(L.) Mansf.	6
3	เห็ดหลินจือ (Lingzhi) *Ganoderma lucidum*	6
4	เครื่องมือ HPLC/LC-MS ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร รุ่น GC-17A มี Auto injector รุ่น AOC-17	9
5	*Blastocystis hominis* ใน Jones' medium ระยะ Vacuolar form ที่ได้นำมาทดสอบ	13
6	การนับจำนวนเชื้อ *Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form ที่นำมาทดสอบก่อน-หลังย้อมสี vital stain assay	28
7	ลักษณะการติดสีย้อม Erythrosine B ของเชื้อ *Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form และไม่ติดสี	28
8	ลักษณะของ *Blastocystis hominis* ในอาหารเพาะเลี้ยง Jones' medium หลังจาก 7 วัน	29
9	ลักษณะการติดสีย้อม Trypan blue statin ของเชื้อ *Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form และไม่ติดสี	29
10	แสดงส่วนประกอบของสารสกัดกระชายขาว ด้วยวิธี HPLC	30
11	สาร Geraniol ที่พบในสารสกัดกระชายขาว	30
12	สาร (+)-2-Bornanone/ L-Camphor ที่พบในสารสกัดกระชายขาว	31
13	สาร 2-Propenoic acid, 3-phenyl-, methyl ester / Methyl cinnamate ที่พบในสารสกัดกระชายขาว	31
14	สาร 3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol/ Linalool ที่พบในสารสกัดกระชายขาว	32
15	แสดงส่วนประกอบของสารสกัดเห็ดหลินจือ ด้วยวิธี HPLC	32
16	สาร 7-Acetyl-6-ethyl-1,1,4,4-tertramethyltetralin/ Versalide ที่พบในสารสกัดเห็ดหลินจือ	33
17	สาร Ethylene brassylate/ Astratone ที่พบในสารสกัดเห็ดหลินจือ	33

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญภาพ(ต่อ)

หน้า

รูปที่		
18	สารพันธุกรรมของเชื้อ *Blastocystis hominis* ในหลอดทดลองที่ได้จากการทดสอบ	34
19	Extracted DNA products ของเชื้อ *Blastocystis hominis* ใน 1.5% agarose gel	34
20	อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ และชุดการทดสอบ vital stain exclusion assay	35
21	การควบคุมคุณภาพอุปกรณ์ counting chamber	35
22	*Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form กับสารสกัดเห็ดหลินจือ ในความเข้มข้น 500 µg/ml, 2,000 µg/ml ที่ 12 ชั่วโมง	36
23	*Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form กับยา Metronidazole ในความเข้มข้น 20 µg/ml, 40 µg/ml ที่ 12 ชั่วโมง	36
24	*Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form กับสารสกัดกระชายขาว ในความเข้มข้น 62.5 µg/ml, 2,000 µg/ml ที่เวลา 12 ชั่วโมง	36
25	*Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form กับสารสกัดกระชายขาว ในความเข้มข้น 2,000 µg/ml ที่เวลา 12 ชั่วโมง	37
26	*Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form ในสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ 12, 24 ชั่วโมง	37
27	*Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form ทดสอบกับสารสกัดกระชายขาว ความเข้มข้น 500 µg/ml ที่ 12 ชั่วโมง	37

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญแผนภูมิ

หน้า

รูปที่		
1	การยับยั้งที่ความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดกระชายขาวต่อ เชื้อ *Blastocystis hominis*	16
2	การยับยั้งที่ความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดเห็ดหลินจือต่อ เชื้อ *Blastocystis hominis*	16
3	การยับยั้งที่ความเข้มข้นต่างๆของยา Metronidazoleต่อ เชื้อ *Blastocystis hominis*	17
4	การตอบสนองยับยั้งของสารสกัดสมุนไพร กระชายขาว เห็ดหลินจือและยา Metronidazole ที่ 12 ชั่วโมงของการทดสอบ	17
5	การตอบสนองยับยั้งของสารสกัดสมุนไพร กระชายขาว เห็ดหลินจือและยา Metronidazole ที่ 24 ชั่วโมงของการทดสอบ	18
6	การตอบสนองยับยั้งของสารสกัดสมุนไพร กระชายขาว เห็ดหลินจือและยา Metronidazole ที่ 48 ชั่วโมงของการทดสอบ	18

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สัญลักษณ์และคำย่อ

พ.ศ.	=	พุทธศักราช
ค.ศ.	=	คริสต์ศักราช
μm	=	ไมโครเมตร
ml	=	มิลลิลิตร
μl	=	ไมโครลิตร
et al	=	และคณะ
%	=	เปอร์เซ็นต์
°C	=	องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคอุจจาระร่วงเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์ เกิดจากสาเหตุต่างๆมีหลากหลายสาเหตุ เช่น การติดเชื้อจุลชีพ แบคทีเรีย ไวรัส พยาธิ และโปรโตซัว ซึ่งในทางการแพทย์พบว่า *Blastocystis hominis* เป็นเชื้อโปรโตซัวที่พบได้ในปัจจุบัน จากการศึกษาสุขภาพของประชากรในชุมชนและการสำรวจหาภาวะการติดเชื้อ เริ่มพบว่า *Blastocystis hominis* มีความสำคัญมากขึ้น *Blastocystis* เป็นเชื้อโปรโตซัวในกลุ่มอะมีบาที่ยังสามารถตรวจพบในคนปกติและผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยอาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์ โดยช่องทาง fecal-oral route โดยอาศัยปัจจัยจากการปนเปื้อนในอาหารและน้ำดื่ม การสัมผัสกับสัตว์เลี้ยงที่อาศัยในบ้านเรือน หรือฟาร์มปศุสัตว์ต่างๆ ตรวจพบได้ทั้งในมนุษย์ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์จำพวกฟันแทะ สัตว์ปีก แมลง และสัตว์เลื้อยคลาน เป็นต้น *Blastocystis hominis* มีระยะต่างๆ ที่สามารถพ ได้แก่ amoeboid form, granular form, vacuolar form และ cyst form มีระยะ thick wall cyst form และ vacuolar form เป็นระยะติดต่อ ซึ่งปนออกมากับอุจจาระ แล้วปนเปื้อนในอาหารและน้ำดื่ม (Tan *et al.,* 2008)

ในปัจจุบันมีการรายงานโรคลำไส้แปรปรวน (Irritable Bowel Syndrome) และโรคลำไส้อักเสบเรื้อรัง (Inflammatory Bowel Disease) ซึ่งอาการส่วนใหญ่เป็นลักษณะอาการปวดท้อง ท้องเสีย ท้องร่วง ท้องอืด ท้องผูก หรือ น้ำหนักลด เป็นต้น โดยสาเหตุยังไม่มีรายงานสนับสนุนสาเหตุของโรคได้อย่างชัดเจน ในการศึกษาเบื้องต้นของพฤติกรรมของผู้ป่วยกับการบริโภคอาหาร ภาวะเยื่อบุลำไส้ที่ไม่สมดุล หรือการลดลงของจำนวนแบคทีเรียในลำไส้ จึงมีผลทำให้การรักษาสมดุลของระบบทางเดินอาหารที่ผิดปกติ ทำให้มีปัจจัยส่งเสริมการติดเชื้อทางระบบทางเดินอาหารของกลุ่มเชื้อโปรโตซัวมีสูงขึ้น (Nourrisson *et al.,* 2014) มีรายงานอาการทางคลินิกในกลุ่มผู้ติดเชื้อที่แตกต่างกัน โดยจะพบอาการปวดท้อง และท้องเสียมาก ประกอบกับพบพฤติกรรมการบริโภคอาหารและน้ำดื่ม การสัมผัสกับสัตว์เลี้ยง น่าจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเฝ้าระวังการติดต่อส่งผลให้เกิดโรคลำไส้แปรปรวน

เนื่องจากหลักฐานทางการวิจัย พบการรายงานที่ยังไม่ชัดเจนในการระบุว่า *B. hominis* เป็นโปรโตซัวก่อโรคหรือไม่ และข้อมูลทางด้านระบาดวิทยายังพบมีการติดเชื้อ *B. hominis* ทั้งในกลุ่มเด็กเล็กและในชุมชน (Leelayoova *et al.,* 2008) โดยมีรายงานความชุกของการติดเชื้อ *B. hominis* มีสูงถึงร้อยละ 30-50 ในทุกภูมิภาคหลายจังหวัดในประเทศไทย โดยมีการสำรวจในส่วนของสถาน

รับเลี้ยงเด็ก ตลอดจนหมู่บ้านชุมชน โปรโตซัวชนิดนี้สามารถทำให้เกิดอาการท้องเสีย ท้องร่วง ท้องผูก ปวดท้อง ท้องอืด เบื่ออาหาร ได้ทั้งในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันปกติและภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยเอดส์ เบาหวาน และมะเร็ง (Tasova *et al*., 2000; Popruk *et al*., 2020) ในกลุ่มไม่แสดงอาการที่เกิดจากการติดเชื้อ *B. hominis* เป็นอาการที่ไม่เด่นชัด ดังนั้นผู้วิจัยเห็นความสำคัญในการศึกษาครั้งนี้ นำข้อมูลทางด้านพื้นฐานทางระบาดวิทยาและวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ นำเชื้อโปรโตซัวที่เพาะเลี้ยงได้ มาศึกษาการตอบสนองยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. hominis* ต่อสารสกัดสมุนไพรกระชายขาวและเห็ดหลินจือ ซึ่งอาจจะเป็นแนวทางในการหาสารที่ยับยั้งเบื้องต้นสำหรับการติดเชื้อในลำไส้และช่วยในการป้องกันให้กับผู้ที่มีโอกาสติดเชื้อเสมือนเป็นตัวลดปัจจัยในการก่อโรคได้ ผลจากการศึกษาที่ได้คาดว่าจะเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยและการให้คำแนะนำในการรักษา ช่วยเฝ้าระวังในการติดต่อ จากการเกิดอาการท้องเสียมีความสัมพันธ์กับจำนวนเชื้อพฤติกรรมการบริโภคสมุนไพรจะสามารถยับยั้งลดการดื้อต่อยาและทราบถึงชนิดของสายพันธุ์ของเชื้อ *Blastocystis hominis* ที่ก่อโรคและไม่ก่อโรคได้

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Blastocystis hominis* ต่อสารสกัดกระชายขาวและเห็ดหลินจือในหลอดทดลอง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการวิจัยพื้นฐาน ในสาขาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ โดยใช้วิธีการตรวจวินิจฉัยและตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Blastocystis hominis* เพื่อศึกษาเชิงทดลองนำมาทดสอบในหลอดทดลอง โดยสารสกัดสมุนไพรร่วมกับเชื้อโปรโตซัวทางการแพทย์ ซึ่งใช้เวลาดำเนินการเป็นเวลาประมาณ 12 เดือน โดยผู้ทำการทดลอง ทำการศึกษาเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระที่ให้ผล positive จำนวน 2-3 ใน 30 ตัวอย่าง ที่ได้จากงานวิจัยสำรวจก่อนหน้าของผู้วิจัยและนำมาศึกษาเพื่อยืนยันตัวเชื้อและศึกษาผลการออกฤทธิ์ โดยทำการทดลองตามลำดับ ดังนี้

1) จัดเตรียมสารเคมีที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อและนำผงสารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ทำการเตรียมความเข้มข้นต่างๆ ด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีผลกับตัวเชื้อ

2) เพาะเลี้ยงเชื้อ *Blastocystis hominis* ในห้องปฏิบัติการ4-319 ชั้น 3 ตึกวิทยาศาสตร์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต
3) ทำการทดสอบอัตราการเจริญและการยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรกับเชื้อ *Blastocystis hominis* ในช่วงเวลาที่กำหนด
4) ทำการเก็บและรักษาสภาพตัวเชื้อเพื่อทำการศึกษาในงานวิจัย
5) ดำเนินการรวบรวม ข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล รายงานผล เชิงพรรณนาในการเปรียบเทียบร้อยละการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ รายงานเป็นรูปร้อยละ และให้ข้อมูลที่สำคัญเพื่อทำการวิจัยต่อไปได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

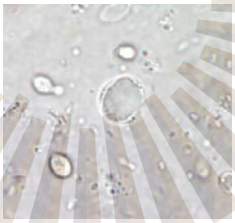
1. ทราบถึงประสิทธิภาพของสารสกัดและการตอบสนองของเชื้อ *Blastocystis hominis* ได้
2. สามารถทราบถึงวิธีการเพาะเลี้ยงและการทดสอบสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ *Blastocystis hominis* ในหลอดทดลองได้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 2

ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Blastocystis hominis เป็นโปรโตซัวที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ สามารถเจริญได้ในภาวะไร้ออกซิเจน โดยระยะซีสต์ มีรูปร่างทรงกลมมีผนังเซลล์เรียบ พบนิวเคลียสเรียงติดชิดขอบผนังเซลล์ มีแวคิวโอลอยู่กลางเซลล์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 5-40 μm ในบางระยะมีผนังหนาและอาจทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอกโฮสต์ ทำให้มีความสามารถในการติดเชื้อและอาจทำให้เกิดโรคท้องเสียในกลุ่มผู้มีภูมิต้านต่ำ โดยมีระยะที่สามารถตรวจพบอยู่ 4 ระยะ คือ ระยะ amoeboid ระยะ granular ระยะ vacuolar และระยะ cyst ส่วนมากจะพบระยะที่เรียกว่า vacuolar form (Azza *et al.*, 2015; Tan, 2008)โดยระยะ granular form พบว่าไม่สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอกที่เปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ อากาศ น้ำได้ ในหลอดทดลองจะสามารถพบ *B.hominis* ระยะต่างๆและสามารถพบได้ทุกระยะ โดยวงจรชีวิตของ *B.hominis* มักตรวจพบการปนเปื้อนทั้งในอาหาร น้ำดื่ม และการสัมผัสโดยตรงกับสัตว์เลี้ยง (Taamasri *et al.*, 2000; Sukthana, 2001)



รูปที่ 1 *Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form

ที่มา: CDC; Centers for Disease Control and prevention

การติดต่อของ *B.hominis* พบว่าการติดเชื้อโปรโตซัวสามารถพบได้ทั้งคนที่มีอาการและไม่มีอาการ โดยการก่อโรคมักพบในผู้ป่วยที่แสดงอาการร่วมกับการติดเชื้อจำนวนมาก โดยส่วนใหญ่พบจากการสำรวจอาการของผู้ป่วยร่วมกับการติดเชื้อแบคทีเรีย หรือมีอาการทางผิวหนังร่วมด้วย สาเหตุของการติดเชื้อมาจากการรับประทานอาหารหรือน้ำดื่มที่มีการปนเปื้อน และมักพบในสมาชิกของครอบครัวที่อาศัยอยู่อย่างใกล้ชิดกัน เช่น การอยู่ร่วมกัน รับประทานอาหารและไม่ได้ล้างมือ สุขอนามัยที่ไม่ดี สำหรับรายงานอุบัติการณ์และความชุกของเชื้อ *B. hominis* ที่พบในคน มีรายงานจากหลายประเทศทั่วโลกและโดยทั่วไปพบการติดเชื้อสูงในประชากรที่อาศัยอยู่บริเวณเขตร้อนและในเขตประเทศกำลังพัฒนา ในกลุ่มผู้อพยพ นักท่องเที่ยวที่เดินทางกลับมาจากถิ่นระบาด เป็นต้น ในประเทศอินโดนีเซียมีการศึกษาพบการติดเชื้อ *B. hominis* ร้อยละ 18 ในประเทศออสเตรเลียพบการติด

เชื้อ *B. hominis* ร้อยละ10.8 อีกทั้งในสหรัฐอเมริกาและประเทศสิงคโปร์ พบการติดเชื้อ ร้อยละ 3 และร้อยละ 4.3 ตามลำดับ สำหรับในประเทศไทยมีรายงานความชุกของเชื้อหลากหลาย พบได้ร้อยละ 10-40 (Taamasri *et al.*, 2000; Popruk *et al.*, 2020)

ในภูมิภาคของประเทศไทย การติดเชื้อ *B. hominis* มีการกระจายอยู่โดยทั่วไป และพบว่ามีความสัมพันธ์กับคุณภาพแหล่งน้ำดื่ม การติดเชื้ออาจเกิดจากการปนเปื้อนในอาหาร(foodborne transmission) นำมาสู่การติดเชื้อระหว่างการสัมผัสโดยไม่ได้ล้างมือให้สะอาดของบุคคลได้โดยตรง เช่น ในเด็กเล็กที่ติดเชื้อจากมารดาที่ป้อนอาหารหรือผู้ดูแลใกล้ชิด (person–to–person transmission) นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *B. hominis* ได้ในสัตว์หลายประเภท ทั้งสัตว์เลี้ยงและสัตว์ที่มีความสำคัญทางการเกษตร เช่น สุนัข แมว หมู ไก่ หนู เป็นต้น มีการศึกษาพบเชื้อที่แยกได้จากหมูมีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายกับ *B. hominis* จึงเชื่อว่าอาจมีการติดต่อมาจากสัตว์ได้ (zoonotic transmission) (Popruk *et al*., 2013, 2015; Leelayoova *et al.*, 2002)

B.hominis สามารถทำให้เกิดโรคได้ทั้งในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันปกติและผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยเอดส์ เบาหวาน และมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Tasova *et al*., 2000, Popruk *et al*., 2020) อาการที่เกิดจากการติดเชื้อ *B. hominis* อาจไม่เฉพาะเจาะจง ส่วนมากพบมีอาการปวดท้อง ท้องเสีย คลื่นไส้ เบื่ออาหาร ท้องอืด และอ่อนล้า ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อเฉียบพลันมักจะมีอุจจาระเหลวเป็นน้ำ ในรายที่ติดเชื้อเรื้อรังจะพบอาการท้องเสียได้น้อยว่าและพบอาการปวดท้องเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังมีการรายงานการติดเชื้อร่วมกับอาการผื่นคัน (Eroglu *et al*.,2009; Hameed *et al*., 2011) *B. hominis* สามารถทำให้เกิดอาการอักเสบในลำไส้ได้ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาว เร่งทำลาย ปล่อยสารอนุมูลอิสระเพื่อทำการทำลายเซลล์แปลกปลอมและการตอบสนองของเซลล์ภูมิต้านทาน จึงทำให้เกิดลำไส้แปรปรวนได้

กระชายขาว *Boesenbergia rotunda*(L.) Mansf.

สมุนไพรกระชายขาว ชื่อสามัญ Chinese ginger/Finger root/Krachai เป็นพืชสมุนไพร มีสรรพคุณในการยับยั้งการอักเสบและทำให้ลดอาการท้องเสียได้ ในการรายงานที่เกี่ยวข้องพบว่าสารสกัดสมุนไพรกระชายขาวมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Esherichia coli* และเชื้อกลุ่มที่พบอยู่ในลำไส้ได้ (Daswani *et al*., 2010) ซึ่งทางคุณสมบัติทางเคมีพบสารเคมี ชื่อ Terpenes เป็นสารกลุ่มที่พบมากในพืชชนิดนี้ มีรส spicy และมีสาร Flavonoid มีรสขม ยกตัวอย่างเช่น pinostrobin สามารถยับยั้งเชื้อโปรโตซัว ไวรัสและแบคทีเรียได้ หรือมีคุณสมบัติในการยับยั้งและทำลายเซลล์มะเร็ง และยังช่วยป้องกันรักษาโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน สารสกัดมีลักษณะแกรนูลหยาบสีเหลืองอ่อน เมื่อผสมในสารละลาย มีกลิ่นคล้ายกับสารกลิ่นหอมเย็นของเถากระชายขาว

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

(http://blog.arda.or.th/กระชาย/)

รูปที่ 2 กระชายขาว (Krachi) *Boesenbergia rotunda*(L.) Mansf.

เห็ดหลินจือ *Ganoderma lucidum*

เห็ดหลินจือ ชื่อสามัญ Lingzhi/Reishi/Lacquered mushroom เป็นสมุนไพรยาจีน (Chinese traditional medicine) เห็ดหลินจือ มีประวัติอันยาวนาน มีสรรพคุณหลากหลายและสามารถช่วยในการยับยั้งการเกาะยึดของเซลล์บุลำไส้ต่างๆ สามารถนำมาทดสอบปฏิกิริยาระหว่างเชื้อที่มีคุณสมบัติก่อโรคได้ (Klancnik *et al*., 2017)

ลักษณะผงละเอียดสีน้ำตาลเข้มคล้ายแป้ง เมื่อผสมในสารละลายจะพบว่ามีลักษณะลอยบนผิวสารละลายและสารละลายมีสีน้ำตาลเข้มมีกลิ่นเฉพาะตัว ในการทดลองที่เกี่ยวข้องพบว่าสารสกัดเห็ดหลินจือจะมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และยังมีสารที่สำคัญอีกมากมาย โดยพบสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ชื่อ โพลีแซคคาไรด์ เป็นส่วนประกอบกูลแคน และมีคุณสมบัติคล้ายไคติน Chitin/Hemicellulose ไม่พบคอลเลสเตอรอล และ enzyme ร่างกายสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ และอาจพบสาร Triterpenoids เป็นสารกลุ่ม Ganoderic acid ที่สำคัญเช่นกันมีฤทธิ์ยับยั้ง reductase enzyme และป้องกันเซลล์ตับ จากการรายงานเกี่ยวกับการแพทย์อีกด้วย

(https://www.biopanax.com/th/health-info/31-lingzhi.html)

รูปที่ 3 เห็ดหลินจือ (Lingzhi) *Ganoderma lucidum*

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารสกัดสมุนไพรกับเชื้อ *Blastocystis hominis*

เมื่อนำเชื้อ *Blastocystis hominis* ที่ความเข้มข้นที่กำหนดและนำสารเคมีในการฆ่าเชื้อหรือทำลายตัวเชื้อ เช่น metronidazole, doxycycline เมื่อผ่านไป 12-72 ชั่วโมง พบการแถบโปรตีนที่สามารถระบุปฏิกิริยาในการกระตุ้นตัวเชื้อได้ ทำให้เกิดการเสียสภาพของผนังซีสต์ และเกิดกลไกการป้องกัน encystation จึงทำให้ตัวเชื้อทนต่อสารเคมีได้ (Init *et al*., 2003) โดยสามารถนำสีย้อม Trypan blue มาตรวจหา viability ของเชื้อได้ หลังจากที่ทดสอบ cytotoxicity (Kordestani *et al*., 2020)

จากการทบทวนงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ความรู้เกี่ยวกับวงจรชีวิต พยาธิกำเนิด รวมถึงสมมติฐานการเกิดอาการ อาจมีความสัมพันธ์กับจำนวนเชื้อ ภูมิคุ้มกัน เชื้อ *B. hominis* ซึ่งยังพบอีกมาก งานวิจัยเกี่ยวกับเชื้อชนิดนี้ จำเป็นต้องมีการทดสอบโดยผู้วิจัยทางปรสิตวิทยา โดยมีรายงานว่าเชื้อชนิดนี้มีการปนเปื้อนในอาหารและน้ำดื่ม ผู้ที่ติดเชื้อ *B. hominis* ส่วนใหญ่มักอาศัยอยู่ในสถานที่ที่มีสุขอนามัยไม่ดี มีความเป็นอยู่อย่างแออัด เช่น ชุมชนแออัดต่างๆ และการสัมผัสกับสัตว์เลี้ยงหรือปศุสัตว์ที่ใกล้ชิดเป็นแหล่งของเชื้อได้

การตรวจวินิจฉัย *B.hominis* วิธี Simple direct smear

เป็นการตรวจเบื้องต้นง่ายต่อการทำการทดลอง โดยนิยมในการตรวจหาความชุกของการติดเชื้อปรสิตในลำไส้ ได้มีการศึกษาในกลุ่มประชากรในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทยและยังพบว่ามีการติดเชื้อในระดับสูงมาก ถึงร้อยละ 21.15 ของประชากรที่ทำการศึกษา ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานประจำปีของหน่วยหนอนพยาธิในลำไส้ของกระทรวงสาธารณสุข ที่พบว่ามีความชุกเพียงร้อยละ 3.3 ของประชากร แต่ผลการศึกษานี้กลับพบว่ามีการติดเชื้อสูง อาจเป็นเพราะรายงานประจำปีที่อ้างถึงเป็นเพียงการศึกษาในกลุ่มประชากรบางกลุ่ม วิธี Simple smear มีผลลบปลอมสูง และยังมีปัจจัยหลายประการที่ทำให้เชื้อมีรูปร่างเปลี่ยนไป ซึ่งจะทำให้ความไวของการตรวจพบเชื้อลดลง เช่น ระยะเวลาในการเก็บอุจจาระ และความเข้มข้นของฟอร์มาลินบัฟเฟอร์ เป็นต้น (Nimri FL, 1993; ภาควิชาพยาธิโปรโตซัว ม.มหิดล, 2009) วิธีการตรวจโดยใช้ Concentration technique อาจใช้เป็นทางเลือกในการตรวจโปรโตซัวในลำไส้ได้หลายชนิด ซึ่งวิธีนี้สามารถตรวจพบเชื้อในกรณีที่มีจำนวนเชื้อน้อยในอุจจาระ โดยทำให้ เชื้อจำนวนน้อยที่อยู่ในอุจจาระมีความเข้มข้นมากขึ้น จะได้มีโอกาสตรวจพบมากขึ้น อย่างไรก็ตามการนำอุจจาระมาตรวจติดต่อกันอย่างน้อย 3 วันจะสามารถเพิ่มโอกาสในการตรวจหาเชื้อ *B. hominis* ได้

การตรวจวินิจฉัย *B.hominis* วิธีการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อโปรโตซัวในหลอดทดลอง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ Jones' medium ใช้เลี้ยง *B. hominis* ในหลอดทดลองแบบมีแบคทีเรียเป็นแหล่งอาหารร่วม และไม่ใช้ยา

ปฏิชีวนะร่วมด้วยในการเพิ่มจำนวน พบว่า *B. hominis* สามารถเจริญได้และทำการเพาะเลี้ยง *B. hominis* ในหลอดทดลองภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน พบว่าเชื้อเจริญได้ดี มีผู้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อ *B. hominis* ด้วยการเพาะเชื้อในหลอดทดลองมีความไวต่อการตรวจพบสูงกว่าการตรวจด้วย simple smear และ concentration technique อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Leelayoova *et al.*, 2002; Termmathurapoj *et al.*, 2004) และมีการศึกษาทดลองการต้านการเจริญของยาสมุนไพรกลุ่มแก้ท้องเสียในทางเภสัชวิทยา และในสารสกัดสมุนไพรจากท้องถิ่นที่มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ *B. hominis* ได้ (Sawangjaroen N and Sawangijroen K., 2004; Ozbilgin *et al.*,2013; Mokhtar *et al.*, 2019)

การตรวจวินิจฉัย *B.hominis* วิธี PCR

เนื่องจากการรายงานวิจัยเกี่ยวกับการตรวจวินิจฉัย *B. hominis* โดยใช้เทคนิคอณูชีววิทยาโมเลกุลมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น จากรายงานพบว่า การตรวจหา *B. hominis* ด้วยวิธี PCR ในอุจจาระที่ไม่ได้ใส่สารรักษาสภาพ ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการออกแบบ primer จาก small subunit ribosomal DNA gene (SSU rDNA) ซึ่งสามารถตรวจพบโปรโตซัวได้ในอุจจาระนั้น ซึ่งจากผลการศึกษานี้ยังสนับสนุนให้ใช้วิธี PCR เป็นวิธีตรวจยืนยันสำหรับผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *B. hominis*

การตรวจวินิจฉัย *B. hominis* ด้วยวิธี PCR ในผู้ป่วยที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ (Stensvold *et al.*, 2006) พบผู้ป่วยติดเชื้อทั้งหมด 32 ราย ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการ 12 ราย และผู้ป่วยที่แสดงอาการ 20 ราย ซึ่งในกลุ่มที่ไม่แสดงอาการส่วนใหญ่พบการติดเชื้อ *B. hominis* subtype 3 ส่วนกลุ่มที่แสดงอาการจะพบ *B. hominis* subtype 1 (Thathaisong *et al.*, 2013; Vogelberg *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังมีการรายงานเกี่ยวกับประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. hominis* ในหลอดทดลองเป็นเวลาประมาณ 48 ชม. เพื่อตรวจสอบและศึกษาเชื้อ *B. hominis* ในระดับอณูชีววิทยา โดยผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อ *B.hominis* ในอุจจาระทำการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธี simple smear และการย้อมสี trichrome จากผลการทดลองพบว่าวิธี simple smear และการย้อมสี trichrome มีความไว 16.7 % และ 40.2% และมีความจำเพาะ 94 % และ 80.4% ตามลำดับ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบว่าหากทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองแล้วนำไปเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR จะทำให้โอกาสในการตรวจพบเชื้อเพิ่มมากขึ้นอีกด้วย และสามารถศึกษาลักษณะเฉพาะที่จะบ่งชี้การดื้อยาของเชื้อได้

การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี HPLC/LC-MS

การวิเคราะห์สารประกอบของสารสกัดสมุนไพรด้วยเครื่อง HPLC เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่สนใจในตัวอย่าง โดยในการวิเคราะห์ปริมาณนั้น จะต้องใช้หลักการคุณสมบัติของสารที่ละลายได้ในตัวทำละลาย เพื่อยืนยันชนิดของสารก่อนโดยทำการเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน โดยสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยสารที่จะนำมาวิเคราะห์ผ่านข้อมูลการถูกตัวทำละลาย และเบื้องต้นโดยเน้นในการวิเคราะห์จากสารในกลุ่ม terpenes เทคนิคการแยกองค์ประกอบของสารเคมีที่ผสมอยู่ โดยเครื่องมือจะอาศัยหลักการในการแยกด้วยความแตกต่างของคุณสมบัติการมีขั้วเมื่อผ่านในคอลัมน์และมีการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบ ได้สัญญาณมาเปรียบเทียบเชิงปริมาณภาพใต้ Mass Chromatogram ของสารสกัดที่นำมาทดสอบ HPLC/LC-MS เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ที่ใช้แยกสารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยได้ หรืออนุพันธ์ที่ระเหยได้ของสารที่ระเหยยาก หลักการทำงานเป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับแยกสารผสมที่มีคุณสมบัติที่สามารถเปลี่ยนเป็นแก๊สได้ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นแก๊สเช่นกันแต่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารผสม เช่น ฮีเลียม จะทำหน้าที่เป็นตัวพา (Carrier) สารผสม ส่วนเฟสอยู่กับที่อาจจะเป็นของแข็งหรือของเหลวที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ เมื่อทั้งตัวพาและสารผสมเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ สารผสมจะถูกพาไปด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน สารผสมก็จะถูกแยกออกจากกัน เทคนิคทางด้าน GC นี้มักใช้ในการวิเคราะห์ทั้งคุณภาพและปริมาณในหลายด้าน อาทิเช่น แอลกอฮอล์ Aromatic Esters Ketone Aldehyde ยาน้ำมันหอมระเหย สารที่ทำให้อยู่ในสถานะของก๊าซ จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (DB1, DB5 และ DBwax column) โดยอาศัย carrier gas เป็นตัวพาสาร สารที่เกิดการแยกแล้วจะถูกตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัด Flame Ionization Detector (FID) ซึ่งเหมาะสำหรับสารอินทรีย์ที่สามารถเกิด ionization ได้ด้วยเปลวไฟ ส่งสัญญาณให้กับตัวตรวจจับได้ รายงานผลเป็น Mass Chromatograms

(https://www.rsu.ac.th/strec)

รูปที่ 4 เครื่องมือ HPLC/LC-MS ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร รุ่น GC-17A มี Auto injector รุ่น AOC-17

บทที่ 3
ระเบียบวิธีการวิจัย

การออกแบบการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ เป็นการวิจัยเชิงการทดลองในความรู้พื้นฐานและการประยุกต์ ในสาขาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ โดยการนำเชื้อ *Blastocystis hominis* ที่สามารถเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง นำมาทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรกระชายขาว เห็ดหลินจือ และยา metronidazole เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและศึกษาหาความสัมพันธ์เบื้องต้นในการตอบสนองของเชื้อกับสารสกัดที่นำมาทดสอบ แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อกับสารสำคัญของสารออกฤทธิ์ และการรอดของตัวเชื้อ

เครื่องมือและอุปกรณ์

Bright field microscope	Model:CX21/Olympus/ Japan
Incubator	Model:USO/Memmert/ Germany
Autoclave	Model: HVE-50/HIYARAMA /Japan
Vortex	Model: G650E/Scientific Industries/Japan
Centrifuge	Model: Hanil AL15-24 และ Rotofix32/Hettichzentrifugen/French
Thermal cyclers	Model: TC-3000/ Technec Inc./ USA
Microcentrifuge	Model: Benchtop5415/Eppendorf/Germany
UV transilluminator	Model: TFX-20.M/Vilber Lourmat/France
Mini Gel Electrophoresis	Model:GE-100/ Hangzhou Bioer technology co., Ltd/China
Pipette	Model:Gilson pipetman 10 µl, 200 µl/Gilson/ France
	Model:Finnpipette4500 1-10 µl/ Thermo scientific/USA
Pipet tips	Model:TIPs-200 µl, 1000 µl/Bioline/USA
	Model:KG1031-0.1-10 µl /Kirgen/China
PCR tubes	Model:P-02-C/Extragen/USA
Glass slides	Model:Red1828/Sail brand/China
Coverslip	Model:22x22/ Deltalab S.L./Spain
Volumetric flask	Model:Pyrex 1000ml
Dropper	Model:Disposal plastic type 2.5ml, 3ml, 5ml
Centrifuge tube	Model: 2.5ml, 15ml tubes

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารเคมีและน้ำยาทดสอบ

-MEM vitamin mix : Invitrogen/USA

-Yeast powder: Becton Dickinson co./France

-Fetal bovine serum: Invitrogen/USA

-Metronidazole :Sigma chemical co./USA

-DMSO :Sigma chemical company/USA

-Krachai extract powder :AP operations co., ltd.

-Lingzhu extract :AP operations co., ltd./Thailand

-$Na_2HPO_4.2H_2O$: Ajax chemical, India

-KH_2PO_4 : Ajax chemical/Australia

-NaCl : Ajax chemical/ Australia

-1%Iodine, 0.85%NSS,

10% formalin

-Absolute Ethanol : Merck /Germany

-สี Trypan blue, Erythrosine B

สารเคมีในการทดสอบทางอณูชีววิทยา

DNA extraction kit	Model:innuPrep stool kit/Analytik Jena company/USA
PCR master mixture	Model:Biodyne/Estonia
Oligo primers	Model:Macrogen / Korea
Distilled water	Model:molecular grade/Sigma/USA
Agarose powder	Model:Midi Fagarose/Favorgen biotech/Taiwan
1%Ethidium bromide	:Sigma chemical company, USA

วิธีการดำเนินการทดลอง

โดยวิธีการดำเนินงาน มีขั้นตอน ดังนี้

1) จัดเตรียมสารเคมีและสกัดสารสมุนไพรด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำ โดยเป็นรูปแบบ commercial extraction powder นำสารสกัดผงสมุนไพร ชั่ง 1 กรัมผสมกับตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร เอทานอล แล้วเขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาให้แน่น แล้วนำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป (Udomthanadech *et al*., 2015) เนื่องจากการทดสอบต้องใช้ตัวทำละลายที่ไม่เป็นพิษหรือไม่มีผลกระทบกับเชื้อ ทางผู้วิจัยจึงทดสอบใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายเพิ่มเติม เพื่อช่วยสามารถนำมาใช้ในการทดสอบการยับยั้งในหลอดทดลองต่อไป

2) เพาะเลี้ยงเชื้อ *Blastocystis hominis* ที่ห้องปฏิบัติการคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต การเตรียมเพาะเลี้ยงเชื้อ *Blastocystis hominis* นำเชื้อตัวอย่างที่เก็บไว้ใน -80 องศาเซลเซียส มาละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วปั่นล้างด้วย Jones' medium หลังจากนั้น ปิเปต 200 ไมโครลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี bovine serum และ PenG/Strep antibiotics ใน small capped tube บ่มเชื้อที่ตู้เพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจด้วย direct simple smear และนำ 20 ไมโครลิตรมานับจำนวนใน counting chamber เพื่อคำนวณจำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโต ทำการนับจำนวนให้ได้ตาม

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

จำนวนเชื้อ $2x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรที่กำหนดหรือมากกว่าร้อยละ 80 สำหรับตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง เป็นตัวอย่างที่เก็บจากการศึกษาก่อนหน้าที่ผ่านการพิจารณาจริยธรรมวิจัยในคนจากสถาบันวิจัยแห่งมหาวิทยาลัยรังสิต

3) ทำการทดสอบการเจริญและการยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรกับเชื้อ *Blastocystis hominis* รวบรวม ข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

In vitro exposure assay โดยการนำสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ (62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 µg/mL) ละลายใน DMSO ใส่ในหลอดทดลองที่มีเชื้อความเข้มข้นเท่าๆ กัน บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส ภายใน 12 ชั่วโมง ถึง 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี หาร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Blastocystis hominis* และทำการทดลองอีกครั้ง สำหรับการควบคุมคุณภาพโดยการใช้ anti-protozoal drug (ยา Metronidazole) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารเคมี และทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เพื่อตรวจสอบและคำนวณจำนวนเซลล์ที่รอดหลังจากทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรและเซลล์ที่ตาย

4) รายงานผล เชิงพรรณนาในการเปรียบเทียบร้อยละการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ รายงานเป็นรูปร้อยละ และข้อมูลที่สำคัญของความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดเพื่อทำการหาปริมาณและความเข้มข้นที่มีผลทำให้ลดลงของเชื้อ และแบ่งช่วงเวลาที่ทำการทดลองออกเป็น ช่วงที่ 1 และช่วงที่ 2 เนื่องจากปรับวิธีการรวบรวมข้อมูลและการทดลองให้สอดคล้องกับสถานการณ์

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

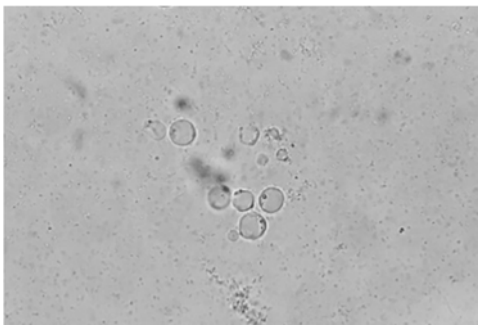
บทที่4

ผลการทดลอง

จากสถานการณ์ระบาดที่ต้องชะลอการทดลองและการระบาดโควิดอย่างต่อเนื่อง ผู้วิจัยนำเชื้อ *Blastocystis hominis* มาทำการเพาะเลี้ยงและทำการจัดเก็บตัวอย่างเชื้อในสารเคมีที่รักษาสภาพเพื่อนำมาทดสอบในช่วงเวลาที่ผ่อนคลาย พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงได้ครบในการทดสอบ และต่อมาได้ผลการทดสอบเพิ่มเติมและรวบรวมผล ผู้วิจัยจึงปรับการทดสอบมีขั้นตอนในการดำเนินการและได้บันทึกผลการทดลองของผลการศึกษาวิจัยตามสถานการณ์จริง ดังนี้

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Blastocystis hominis* ใน Jones' medium cultivation

นำเชื้อ *Blastocystis* spp. ที่เก็บไว้ในช่วงที่ระบาดรอบแรกและจากการทดลองที่ตรวจในอาหารเพาะเลี้ยง Jones' medium พบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถทำให้ตัวเชื้อเจริญเติบโตได้ประมาณ 1-2 สัปดาห์ได้ และนำมาทดสอบจนครบทุกความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสองชนิด หลังจากนำมาเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเพาะเลี้ยงต่อ ไม่สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวได้ ผลทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลง สารเคมีและใช้สารอาหารและวิตามินที่จำเพาะต่อการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยผู้วิจัยพบว่าจำนวนเชื้อหลังจากการเพาะเลี้ยงในช่วงที่ 2 จะมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนที่ไม่แน่นอน ทำให้ปริมาณที่ได้ลดลงและส่งผลต่อการตรวจหาตัวเชื้อและจำนวนที่จะนำมาทดสอบในขั้นตอนต่อไป ทางผู้วิจัยพบว่าการเพิ่มเติมอาหารที่จำเป็นในการเพาะเลี้ยงอาหารที่มีสารอาหารลงในหลอดทดลอง ก่อนที่นำมาทดสอบและได้เริ่มต้นการเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองอีกครั้ง พบว่าสามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้ ร้อยละ 90 ของจำนวนตัวเชื้อที่รอดชีวิต โดยใช้สำหรับการทำการทดลองและนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 5 *Blastocystis hominis* ใน Jones' medium ระยะ Vacuolar form ที่ได้นำมาทดสอบ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การตรวจหาอัตราการรอดชีวิต ด้วยการย้อมสี vital stain exclusion assay

นำเชื้อ *Blastocystis hominis* ที่เพาะเลี้ยงปริมาตร 5 ml มาปั่นล้างด้วย 1X PBS สัดส่วนปริมาตรที่เท่ากัน ที่ความเร็ว 3,000 รอบ นาน 5 นาที แล้วย้อมสีด้วย 1% Vital stain 20 µl และ cell suspension 20 µl นับจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี/จำนวนเซลล์ทั้งหมด ไม่ควรเกิน 10 นาที แล้วหาจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสีเป็น ร้อยละ ของเชื้อที่มีชีวิต(ไม่ติดสี) ในการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนร้อยละอัตราการรอดชีวิต ในสารละลายที่นำมาทดสอบ

การทดสอบตัวอย่าง	จำนวนเซลล์ที่พบ (ไม่ติดสี)(10^5/ml)	จำนวนเซลล์ทั้งหมด (10^5/ml)	อัตราการรอดชีวิตของ *Blastocystis hominis* (%)
Blastocystis ใน Jones' medium	4.32	5.92	73
Blastocystis ใน 1X PBS	4.82	5.38	90
Blastocystis ใน 1%DMSO	4.32	4.80	90

จากผลการทดลอง พบว่าในการนำเชื้อมาทดสอบในอาหารเพาะเลี้ยง มีจำนวนของเซลล์ที่รวบรวมได้มีจำนวนร้อยละ 73 เพิ่มขึ้นได้จากการทดลองช่วงที่ 1 และเมื่อนำมาทดสอบในสารละลายควบคุม ตัวทำละลาย ใน 1X PBS และ 1%DMSO พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ มีจำนวนร้อยละ 90 ซึ่งทำให้สามารถนำเชื้อนี้ มาทดสอบโดยเพิ่มจำนวนได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำมาทดสอบการยับยั้งของเชื้อกับสารสกัดโดยมีการทดสอบกับตัวทำละลายได้ต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพร ในการยับยั้งการเจริญของ *Blastocystis hominis*

นำเชื้อ *Blastocystis hominis* ที่เพาะเลี้ยงปริมาตร 5 ml มาปั่นล้างด้วย 1XPBS สัดส่วนปริมาตรที่เท่ากัน ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที และทำการนับจำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้และมีจำนวนการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 90 นำมาทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรกระชายขาวและเห็ดหลินจือที่ความเข้มข้น 2000 µg/ml ถึง 62.5 µg/ml ลงในหลอดทดลอง เพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส ช่วงเวลา 12 ถึง 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้ว นำย้อมสีด้วย 1% vital stain นับจำนวนเชื้อที่ไม่ติดสีและติดสี ผลการทดสอบ anti-*Blastocystis* activity ด้วยสารสกัดสมุนไพรและยา Metronidazole ในตัวทำละลายในหลอดทดลอง จะแสดงอัตราการยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรและยา Metronidazole ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยรายงานเป็นอัตราร้อยละการตอบสนอง (% inhibition) ดังแสดงในตารางที่ 2

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

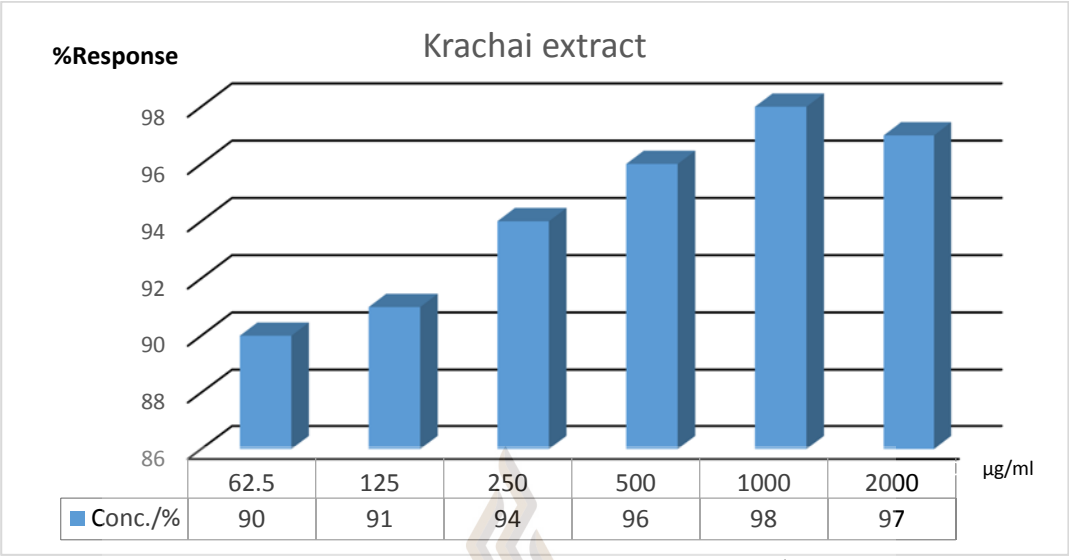
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนร้อยละการยับยั้งเชื้อ *Blastocystis hominis* กับสารสกัดสมุนไพรที่ทดสอบ

กระชายขาว	**ผลการตอบสนอง(% Inhibition)**					
Conc.(µg/ml)	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62.5**
Time#12hrs	95	94	95	87	87	88
Time#24hrs	100	100	94	94	85	87
Time#48hrs	97	100	100	100	100	95
Time#72hrs	100	100	95	100	100	100
เห็ดหลินจือ	**ผลการตอบสนอง(% Inhibition)**					
Conc. (µg/ml)	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62.5**
Time#12hrs	84	85	90	93	85	90
Time#24hrs	95	84	97	90	90	89
Time#48hrs	92	94	91	100	92	97
Time#72hrs	100	100	100	100	95	100
ยา Metronidazole	**ผลการตอบสนอง (% Inhibition)**					
Conc. (µg/ml)	**40**	**20**	**10**	**5**	**2.5**	**1.25**
Time#12hrs	100	93	85	88	92	91
Time#24hrs	100	95	95	95	96	93
Time#48hrs	90	80	100	100	83	92
Time#72hrs	100	95	100	100	97	100
การทดสอบต่อตัวทำละลาย (%Survival rate)						
1%DMSO solution	#12hrs	(93)	#24hrs	(91)	#48hrs	(90)

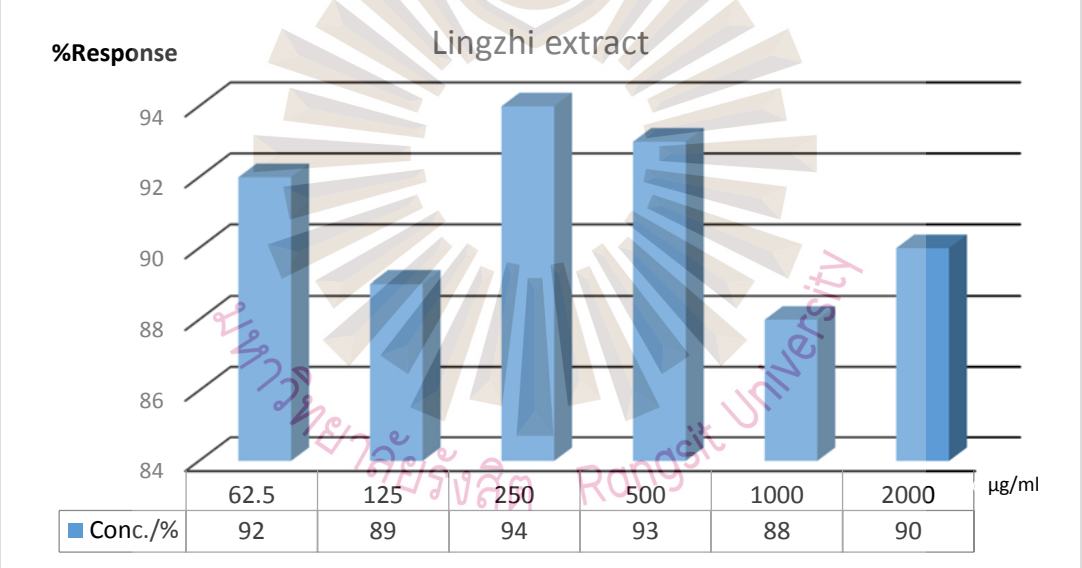
ผลการทดสอบสารสกัดสมุนไพร กระชายขาว เห็ดหลินจือ พบว่าอัตราการยับยั้งเชื้อ ในเวลา 12, 24, 48 และ72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบมีการรอดชีวิตของเชื้อ เมื่อเพิ่มเวลาจนครบ 72 ชั่วโมง ตัวเชื้อมีการตอบสนองมากกว่าร้อยละ 95 ส่วนในตัวทำละลายควบคุมพบว่าจำนวนการตอบสนองยับยั้งน้อยกว่าร้อยละ 10 เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 90 เมื่อนำมาทดสอบ

ส่วนผลการทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรกับอัตราการตอบสนองต่อเชื้อ *Blastocystis hominis* โดยแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร กระชายขาว เห็ดหลินจือ และยา Metronidazole ในเวลาทดสอบ 48 ชั่วโมง ร้อยละการตอบสนองของเชื้อกับสารสกัดกระชายขาว เห็ดหลินจือ และยา Metronidazole ตามที่แสดงในแผนภูมิที่ 1-3

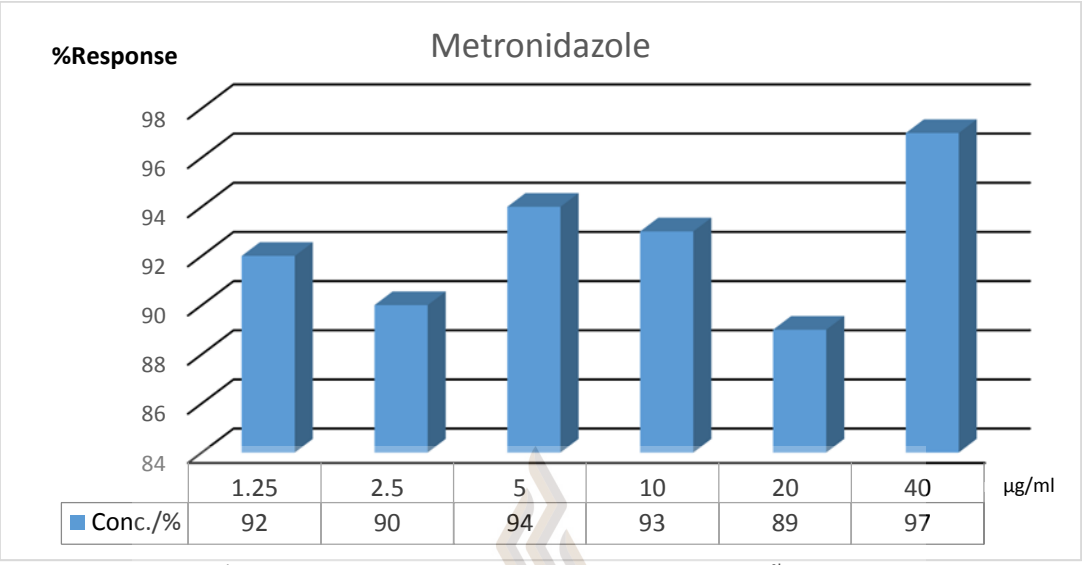
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



แผนภูมิที่ 1 การยับยั้งที่ความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดกระชายขาว ต่อ เชื้อ *Blastocystis hominis*

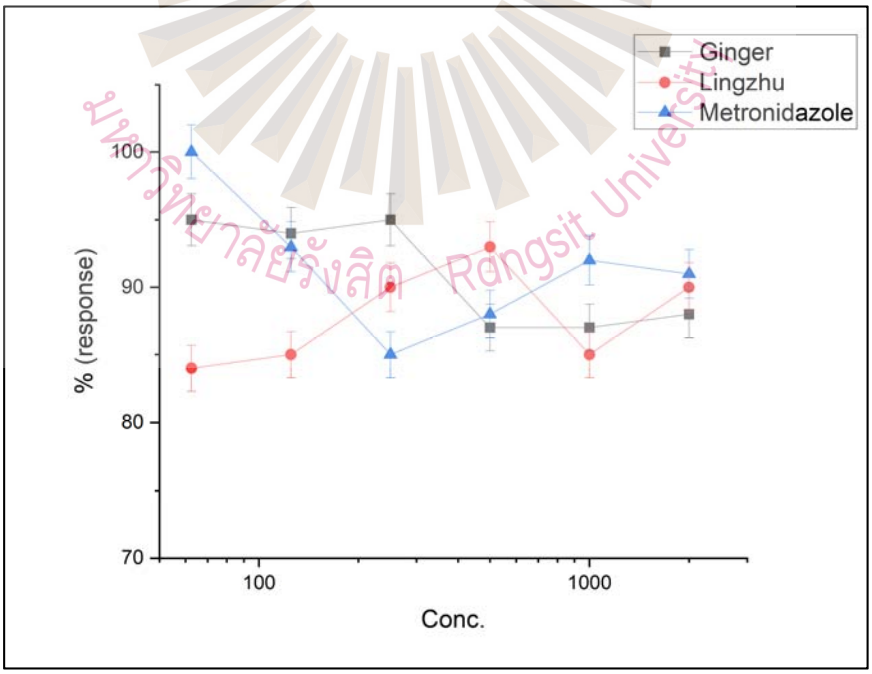


แผนภูมิที่ 2 การยับยั้งที่ความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดเห็ดหลินจือ ต่อ เชื้อ *Blastocystis hominis*

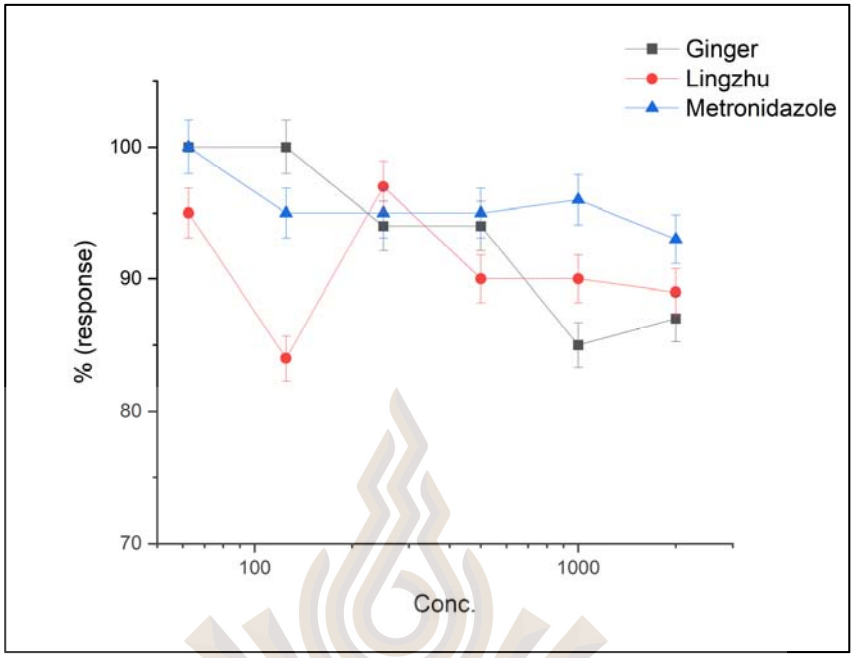


แผนภูมิที่ 3 การยับยั้งที่ความเข้มข้นต่างๆของยา Metronidazole ต่อ เชื้อ *Blastocystis hominis*

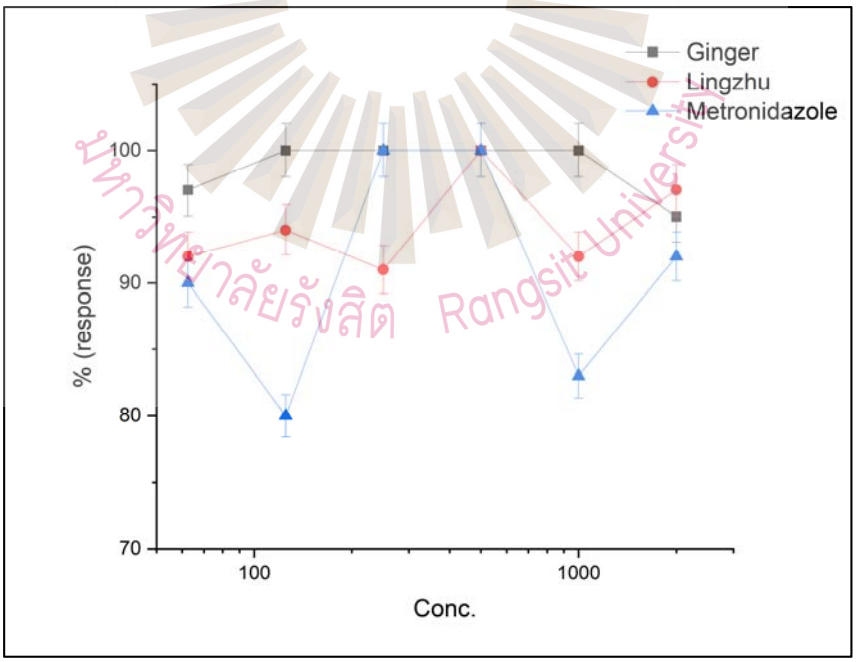
ผลการทดลองการตอบสนองยับยั้งของแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรและยา Metronidazole ที่ช่วงเวลาทดสอบแต่ละช่วงที่ 12, 24 และ 48 ชั่วโมง การตอบสนองยับยั้งจากความเข้มข้นมากที่สุดถึงความเข้มข้นน้อยที่สุด แสดงข้อมูลแทนด้วยตัวเลขเรียงจาก 1 ถึง 6 ของระดับความเข้มข้น ตามลำดับ ในรูปแบบแผนภูมิที่ 4-6



แผนภูมิที่ 4 การตอบสนองยับยั้งของสารสกัดสมุนไพร กระชายขาว เห็ดหลินจือและ ยา Metronidazole ที่ 12 ชั่วโมงของการทดสอบ



แผนภูมิที่ 5 การตอบสนองยับยั้งของสารสกัดสมุนไพร กระชายขาว เห็ดหลินจือและ ยา Metronidazole ที่ 24 ชั่วโมงของการทดสอบ



แผนภูมิที่ 6 การตอบสนองยับยั้งของสารสกัดสมุนไพร กระชายขาว เห็ดหลินจือและ ยา Metronidazole ที่ 48 ชั่วโมงของการทดสอบ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรที่นำมาทดสอบ พบว่า สารสกัดกระชายขาว มีอัตราในการยับยั้ง ร้อยละ97 เวลาในการทดสอบที่ 48 ชั่วโมง ส่วนสารสกัดเห็ดหลินจือ พบการยับยั้งร้อยละ 90 และยา Metronidazole พบการยับยั้งร้อยละ 97 ตามลำดับ

ในช่วงเวลา 12 ชั่วโมง ของการทดสอบ จะพบว่า ร้อยละของการยับยั้งสารสกัดกระชายขาว เห็ดหลินจือ มีอัตราในการยับยั้งน้อยกว่ายา Metronidazole ที่ความเข้มข้นสูง เมื่อความเข้มข้นลดลง ร้อยละของการยับยั้งลดลงตามลำดับ โดยสารสกัดกระชายขาว ประสิทธิภาพลดลงน้อยกว่า 10 % จากการทดสอบ พบอัตราการยับยั้งที่น้อยกว่ายา Metronidazole แต่สูงกว่าสารสกัดเห็ดหลินจือ ยา Metronidazole ที่ความเข้มข้นเท่ากันร้อยละ 90

ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ของการทดสอบ จะพบว่า ร้อยละของการยับยั้งสารสกัดกระชายขาว มีอัตราในการยับยั้งเท่ากับยา Metronidazole ที่ความเข้มข้นสูง และมากกว่าสารสกัดเห็ดหลินจือ เมื่อความเข้มข้นลดลง จะพบว่าสารสกัดเห็ดหลินจือ มีประสิทธิภาพลดลงต่ำกว่าสารสกัดกระชายขาว และยา Metronidazole

ในช่วงเวลาที่ 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบอัตราการยับยั้งของสารสกัดกระชายขาว มีอัตราในการยับยั้งมากที่สุด และสารสกัดเห็ดหลินจือ มีอัตราการยับยั้งรองที่ 2 ส่วนยา Metronidazole มีร้อยละการยับยั้งรองที่ 3 คือมากกว่าร้อยละ 90

สำหรับยา Metronidazole ที่นำมาทดสอบ พบว่าการยับยั้งการตอบสนองน้อยกว่าสารสกัดสมุนไพร ในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดสมุนไพรมีการออกฤทธิ์ที่ลดลงและอัตราการยับยั้งการตอบสนองของเชื้อน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ จึงอาจเป็นการช่วงความเข้มข้นที่สามารถนำมาศึกษาหาระดับความเข้มข้นที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพที่เหมาะสมต่อไป

การตรวจวิเคราะห์สารประกอบทางโมเลกุลของสารสกัดสมุนไพร

ผลการทดลองช่วงที่ 2 ทำการทดสอบเพิ่มเติมจากการเพิ่มจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีข้อจำกัดและเซลล์เพาะเลี้ยงลดลง ทางผู้วิจัยได้ทดสอบหาสารประกอบในสารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ด้วยวิธี HPLC และ MS และการศึกษาลักษณะของผนังเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นหลังจากการนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด

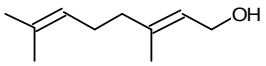
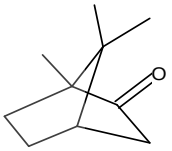
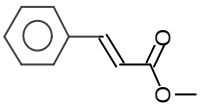
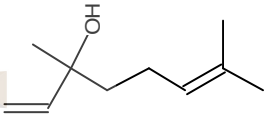
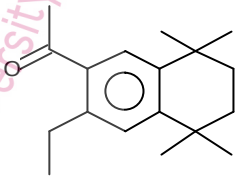
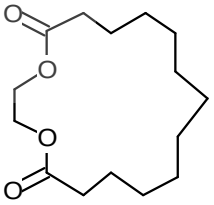
สารสกัดกระชายขาวพบว่ามีส่วนประกอบของสารในกลุ่ม monoterpenes และ terpenes เช่น L-camphor, cis-geraniol, methyl cinnamate และ linalool พบว่าสารสกัดและสารออกฤทธิ์มีประสิทธิภาพที่ทำให้ผนังของเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงสภาพมากที่สุดในการทดลองนี้

สารสกัดเห็ดหลินจือ พบว่ามีส่วนประกอบของสารในกลุ่ม aromatic phenolic flavonoid ซึ่งในการทดสอบครั้งนี้พบสารสำคัญที่การยับยั้งการเจริญน้อยกว่าสารสกัดกระชายขาวและพบการ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ที่น้อยกว่า โดยหลังจากการทดสอบ นำเซลล์ที่ทั้งหมดที่เหลือเก็บในสาร fixative และนำไปศึกษาลักษณะก่อน-หลังการทดสอบการยับยั้งของเชื้อกับสารสกัดด้วย

ตารางที่ 3 ร้อยละของสารประกอบที่พบในสารสกัดกระชายขาวและเห็ดหลินจือ

สารประกอบของสารสกัดกระชายขาว	จำนวนร้อยละ	โครงสร้าง (Structure)
1.Geraniol	27.63	
2.Camphor	12.92	
3.Methyl cinnamate	6.98	
4.Linalool	0.69	
สารประกอบของสารสกัดเห็ดหลินจือ	จำนวนร้อยละ	โครงสร้าง (Structure)
1.Versalide	54.39	
2.Astratone	45.61	

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดสมุนไพรทั้งสองชนิด พบว่า สารสกัดสมุนไพรกระชายขาว มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีกว่าสารสกัดเห็ดหลินจือ โดยเปรียบเทียบจากจำนวนเชื้อที่มีอัตราการรอดชีวิตทั้งหมด และพบว่าในสารสกัดสมุนไพรกระชายขาวมีสารออกฤทธิ์ยับยั้งเป็นสารกลุ่ม terpenes และ monoterpenes และทำให้จำนวนเชื้อลดลงไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ รวมทั้ง จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง มีอัตราการรอดลดลงเริ่มตั้งแต่ 12 ชั่วโมงถึง 48 ชั่วโมง สำหรับความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งได้เกิน 80% ความเข้มข้น 62.5 µg/ml มีการยับยั้งได้มากกว่า 50% ของจำนวนเชื้อเพาะเลี้ยงทั้งหมด

สำหรับยา Metronidazole เป็นยาที่ใช้สำหรับรักษาการติดเชื้อโปรโตซัวในลำไส้ โดยเมื่อนำมาทดสอบผลที่ได้ในระยะเวลาที่นำมาทดสอบตั้งแต่ 12 ชั่วโมงถึง 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนเชื้อที่รอดมีมากกว่า 80% ความเข้มข้นที่ 20 µg/ml ซึ่งอาจพบได้ในกรณีที่ตัวเชื้ออยู่ในภาวะที่ไม่ตอบสนองหรือมีการดื้อยา เนื่องจากประสิทธิภาพและกลไกการออกฤทธิ์การดื้อยาของเชื้อในการทดลองยังพบไม่มาก สำหรับโปรโตซัวในลำไส้นี้อาจจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไป จึงรายงานเป็นข้อมูลเบื้องต้นของความน่าจะเป็นตัวอย่างที่นำมาทดสอบ ซึ่งสารออกฤทธิ์ต้องผ่านกระบวนการทางเคมีกับปฏิกิริยาที่เกิดในร่างกายต่อไป (Bettes, *et al*., 2021)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Blastocystis hominis* ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ และนำมาทดสอบการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าการยับยั้งของสารสกัดสมุนไพร สามารถนำมาตรวจทางห้องปฏิบัติทางการแพทย์ ช่วยเพิ่มการวินิจฉัยโรคติดเชื้อได้ และสามารถระบุระยะต่างๆของเชื้อได้ รวมทั้งการนำมาศึกษาปัจจัยที่ส่งเสริมประสิทธิภาพในการรักษาการติดเชื้อ *B. hominis* โดยการทดสอบผลการตอบสนองยับยั้งหรือฆ่าเชื้อได้ในหลอดทดลอง เพื่อป้องกันการติดเชื้อหรือลดการเกิดอุจจาระร่วงได้ อีกยังช่วยในกรณีผู้ที่มีสุขภาพปกติ (Mirjalali, *et al*.,2020) อาการที่พบร่วมด้วยอื่นๆ เช่น โรคลำไส้แปรปรวน อาการผื่นคัน (Nourrisson, *et al*.,2014, Hameed, *et al*.,2011) ดังนั้นการได้รับการสารสกัดสมุนไพรเสริมร่วมกับการทานจุลชีพที่มีประโยชน์ต่อลำไส้และสารที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อโปรโตซัวในลำไส้จะสามารถช่วยลดจำนวนเชื้อได้ จากการศึกษานี้เป็นแบบเชิงพื้นฐานและประยุกต์ พบว่าการใช้สารสกัดสมุนไพรมาทดสอบนี้ ส่งผลให้การตอบสนองของเชื้อ *Blastocystis hominis* ใน

หลอดทดลอง มีอัตราร้อยละการยับยั้งได้ใน 12-72 ชั่วโมง ได้และเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงในระยะเวลา 12 ชั่วโมงจากความเข้มข้นน้อย ข้อมูลเชิงประยุกต์ที่จะต้องระบุปริมาณสารที่สามารถนำมาใช้ประกอบด้วยคุณสมบัติทางเคมีและการยับยั้งการเพิ่มจำนวนที่สอดคล้องกัน

ปัจจัยส่งเสริมในการเจริญเติบโตของเชื้อและการเก็บรักษา เนื่องจากเชื้อสามารถเจริญในอาหารเพาะเลี้ยงที่จำเพาะในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าการเพิ่มปริมาณซีรั่ม และแหล่งโปรตีน ค่ากรด-ด่างของสารละลาย สภาพไร้ออกซิเจน เป็นการพบปัจจัยของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ที่สำคัญอย่างที่สุด การทดลองวิจัยในครั้งนี้ มีการทดลองส่งตรวจหาลำดับเชื้อและส่งตรวจหาสารเคมีองค์ประกอบของสารสกัดสมุนไพรที่อาจจะเป็นสารที่สำคัญในการยับยั้งการของเชื้อ ในการทดลองสามารถใช้วิธี small capped tube cultivation ด้วย Jones' medium ในการเพาะเลี้ยงเชื้อโปรโตซัวในระยะเวลาไม่เกิน 2 สัปดาห์ได้ (Termmathurapoj, *et al.*, 2004) โดยการนำเชื้อมาระบุชนิดของตัวเชื้อที่แยกได้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากปริมาณของการเพิ่มจำนวนยังมีน้อย จึงทดสอบได้อย่างจำกัดในทั้ง 2 ช่วงเวลา

ส่วนการนำมาทดสอบหาปัจจัยการดื้อต่อยา metronidazole ที่มีเพิ่มขึ้น นำมาทดสอบกับสารสกัดที่มีสารออกฤทธิ์กับส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญและหาวิธีในการทดสอบที่สามารถตรวจสอบที่จำเพาะมากขึ้น และทำให้ทราบลักษณะของเชื้อที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มากขึ้น และการยับยั้งของสารเคมีที่มีฤทธิ์ที่สำคัญและจำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อในเชิงทดลองต่อไป

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม

1. ภาควิชาพยาธิโปรโตซัว คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล. 2009. โครงการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องเคล็ดลับในการตรวจวินิจฉัยพยาธิในลำไส้อย่างง่าย (Intestinal Parasites:Simple Diagnostic Tips). [Online]. Available date: 24 December 2021.
2. Azza SE, Mohamed SY, Amany FF, Ibrahim MN, Marwa MN. 2015. Laboratory diagnosis of *Blastocystis hominis* in diarrheic patient. Trop Parasitol. 5(1): 36-41.
3. Betts EL, Newton JM, Thompson GS, Sarzhanov F, Jinatham V, Kim M-J, Popluechai S, Dogruman-Al F, Won E-J, Gentekaki E, Tsaousis AD. 2021. Metabolic fluctuations in the human stool obtained from *Blastocystis* carriers and non-carriers. Metabolites. 11:883. doi:10.3390/metabo11120883.
4. Daswani PG, Brijesh S, Tatali P, Antia NH, Birdi TJ. 2010. Antidiarrhoeal activity of Zingiber officinale (Rosc.). Current Science. 98(2):222-229.
5. Eroglu F, Genc A, Elgun G, Koltas IS. 2009. Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymtomatic and symptomatic patients by PCR. Parasitol Res. 105(6):1589-92.
6. Hameed DM, Hassanin OM, Zuel-Fakkar NM. 2011. Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. Parasitol Res. 108(3): 553-60. doi: 10.1007/s00436-010-2097-2.
7. Init I, Mak JW, Top S, Zulhainan Z, Prummongkol S, Nissapatorn V, Wan-Yusoff WS, Anuar AK. 2003. Polypeptides associated with in vitro cyst formation of *Blastocystis hominis*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 34(4):727-732.
8. Klancnik A, Megušar P, Sterniša M, Jersek B, Bucar F, Mozina SS, Kos J, Sabotic J. 2017. Aqueous Extracts of Wild Mushrooms Show Antimicrobial and Antiadhesion Activities against Bacteria and Fungi. Phytotherapy Research. 31(12):1971-1976.
9. Kordestani Shargn E, Pirestani M, Sadraei J. 2020. In vitro toxicity evaluation of short cationic antimicrobial peptide(CM11) on *Blastocystis* sp. Acta Tropica. 204(2020):105384.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

10. Leelayoova S, Siripattanapipong S, Thathaisong U, Naaglor T, Taamasri P, Mungthin M. 2008. Drinking water: A possible source of *Blastocystis hominis* subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. Am J Trop Med Hyg. 79(3): 401-6.
11. Leelayoova S, Taamasri P, Rangsin R, Naaglor T, Thathaisong U, Mungthin M. 2002. In-vitro cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. Ann Trop Med Parasitol. 96(8): 803-7.
12. Mirjalali H, Latifi A, Taghipour A, et al.2020. Association between *Blastocystis* and body mass index in healthy subjects; a theoretical pilot study. J Diabetes Metab Disord. 19(1):129-134. doi:10.1007/s40200-019-00483-2.
13. Mokhtar AB, Ahmed SA, Eltamany EE, Karanis P. 2019. Anti- *Blastocystis* activity in vitro of Egyptian herbal extracts(family:asteraceae) with emphasis on *Artemisia judaica*. Int J Environ Res Public Health. 16(9):1555. doi:10.3390/ijerph16091555.
14. Nimri F. Laila. 1993. Evidence of an Epidemic of *Blastocystis hominis* Infections in Preschool Children in Northern Jordan. J Clin Microbiol. 31(10): 2706-8.
15. Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B, NkoudMongo C, Wawrzyniak L, Cian A, Viscogliosi E, Livrelli V, Delbac F, Dapoigny M, Poirier P. 2014. *Blastocystis* Is Associated with Decrease of Fecal Microbiota Protective Bacteria: Comparative Analysis between Patients with Irritable Bowel Syndrome and Control Subjects. PLoS One. 9(11): e111868.doi:10.1371/journal.pone.0111868.
16. Ozbilgin A, Durmuskahya C, Kilimcioglu AA, Kayalar H, Kurt O, Ermis VO, Tabak T, Ostan I. 2013. In vitro efficacy of *Quercus infectoria* oliv. And *Achillea millefolium* L. extracts against *Blastocystis* spp. isolates. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 19(3): 511-516.
17. Popruk S, Pintong A, Radomyos P. 2013. Diversity of *Blastocystis* subtypes in humans. J Trop Med Parasitol. 36(2):88-97.
18. Popruk S, Udonsom R, Koompapong K, Mahittikorn A, Kusolsuk T, Ruangsittichai J, Palasuwan A. 2015. Subtype Distribution of *Blastocystis* in Thai-Myanmar Border, Thailand. Korean J Parasitol. 53 (1): 13-19.
19. Popruk, N., Prasongwattana, S., Mahittikorn, A., Palasuwan, A., Popruk, S., Palasuwan, D. 2020. Prevalence and Subtype Distribution of *Blastocystis* Infection in Patients with

Diabetes Mellitus in Thailand. Int J Environ Res Public Health, 17(23), 8877. https://doi.org/10.3390/ijerph17238877.

20. Sawangjaroen N, Sawangijroen K. 2004. The effects of extracts from anti-diarrheic Thai medicinal plants on the in vitro growth of the intestinal protozoa parasite: *Blastocystis hominis*. J Ethnopharmacol. 98(2005):67-72.
21. Stensvold R, Brillowska-Dabrowska A, Nielsen HV, Arendrup MC. 2006. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. J Parasitol. 92(5): 1081-7.
22. Sukthana Y. 2001. Is *Blastocystis hominis* a Human pathogenic protozoan?. J Trop Med Parasitol. 24(1):16-22.
23. Taamasri P, Mungthin M, Rangsin R, Tongupprakarn B, Areekul W, Leelayoova S. 2000. Transmission of intestinal blastocystosis related to the quality of drinking water. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 31(1): 112-7.
24. Tan KSW. 2008. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis hominis*. Clin Microbiol Rev. 21(4): 639-65.
25. Tan TC, Suresh KG, Smith HV. 2008. Phenotypic and genotypic characterisation of *Blastocystis hominis* isolates implicates subtype 3 as a subtype with pathogenic potential. Parasitol Res. 104(1): 85-93.
26. Tasova Y, Sahın B, Koltas S, Paydas S. 2000. Clinical significance and frequency of *Blastocystis hominis* in Turkish patients with hematological malignancy. Acta Medica Okayama. 4(3): 133-6.
27. Termmathurapoj S, Leelayoova S, Aimpun P, Thathaisong U, Nimmanon T, Taamasri P, Mungthin M. 2004. The usefulness of short-term in vitro cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. Parasitol Res. 93(6): 445-7. doi: 10.1007/s00436-004-1157-x.
28. Thathaisong U, Siripattanapipong S, Mungthin M, Pipatsatitpong D, Tan-ariya P, Naaglor T, Leelayoova S. 2013. Identification of *Blastocystis* Subtype 1 Variants in the Home for Girls, Bangkok, Thailand. Am J Trop Med Hyg. 88(2): 352–8.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

29. Udomthanadech, K., Vajrodaya, S., & Paisooksantivatana, Y. (2015). Antibacterial Properties of the Extracts from Some Zingibereous Species in Thailand against Bacteria Causing Diarrhea and Food Poisoning in Human. Appl Sci. *6*(5):203-213.

30. Vogelberg C, Stensvold CR, Monecke S, Ditzen A, Stopsack K, Heinrich-Grafe U, Pohlmann C. 2003. *Blastocystis sp*. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. Parasitol Int. 59(3):469–71.

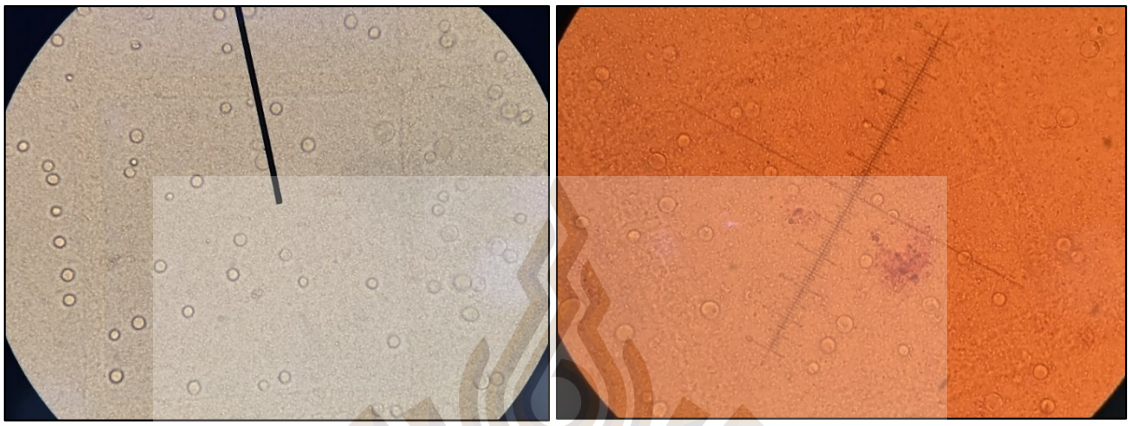
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาคผนวก

ภาพแสดงการทดสอบและการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Blastocystis hominis*

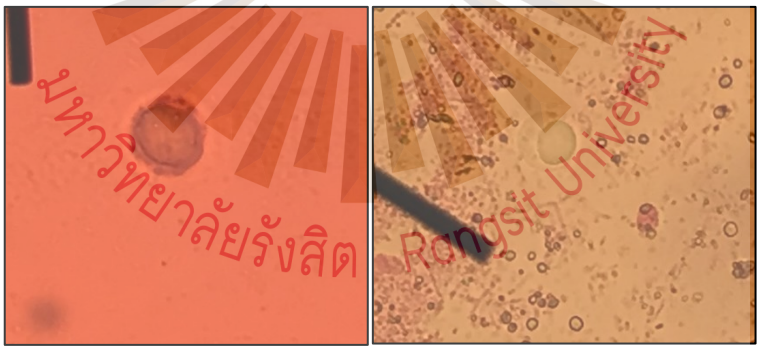
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาพแสดงการทดสอบ Vital stain exclusion test ของเชื้อ *Blastocystis hominis*



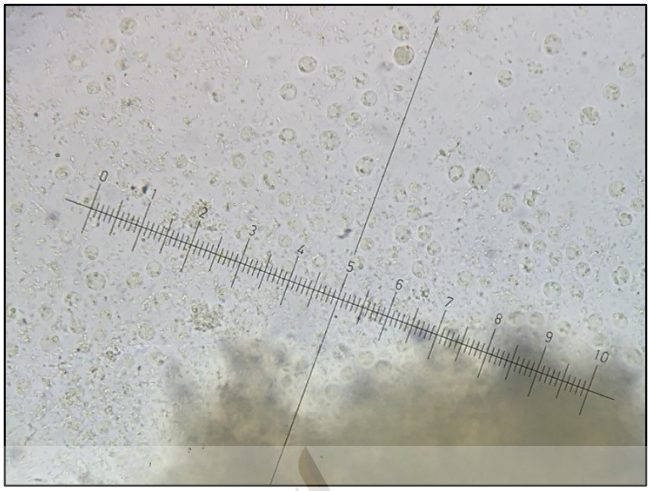
รูปที่ 6 การนับจำนวนเชื้อ *Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form ที่นำมาทดสอบ

A. ก่อนย้อมสี vital stain B. หลังย้อมสี vital stain

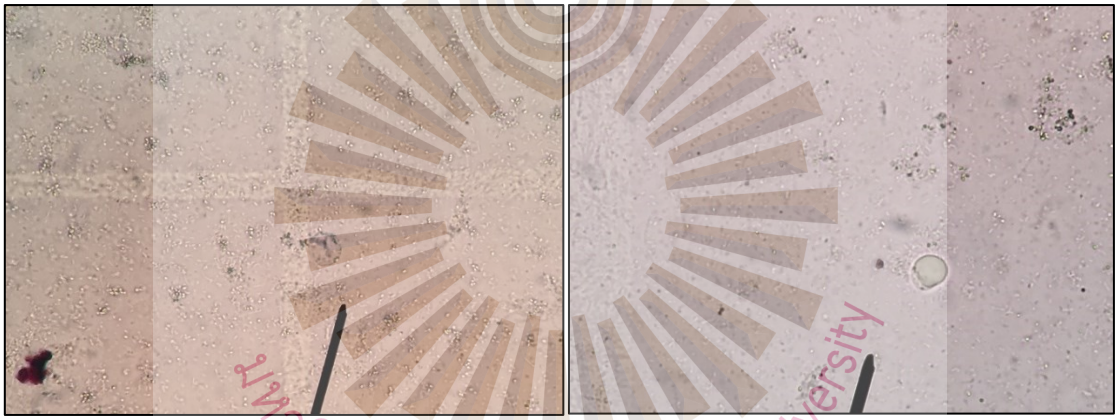

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

รูปที่ 7 ลักษณะการติดสีย้อม Erythrosine B ของเชื้อ *Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form

A. เซลล์ตาย ติดสี B. เซลล์มีชีวิต ไม่ติดสี



รูปที่ 8 ลักษณะของ *Blastocystis hominis* ในอาหารเพาะเลี้ยง Jones' medium หลังจาก 7 วัน

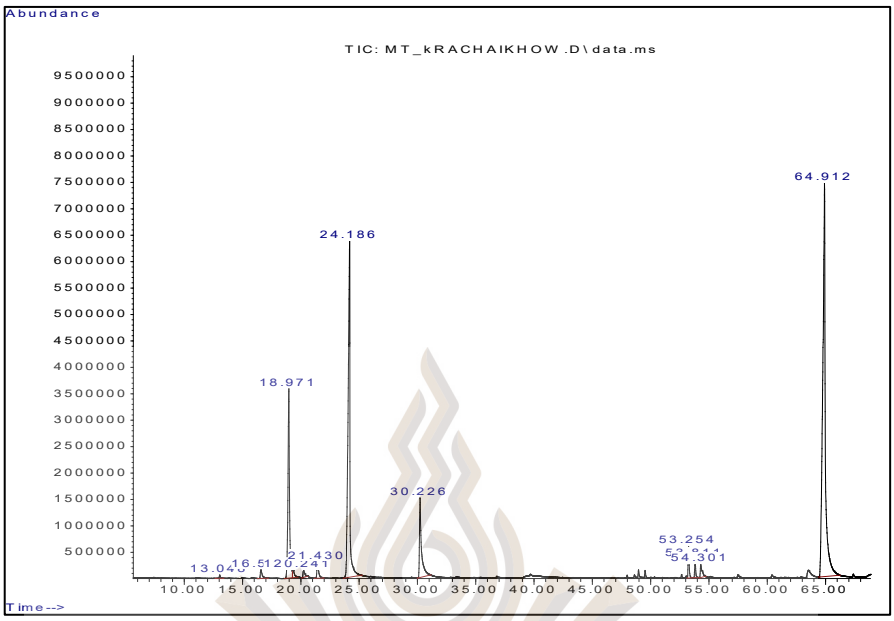


รูปที่ 9 ลักษณะการติดสีย้อม Trypan blue statin ของเชื้อ *Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form

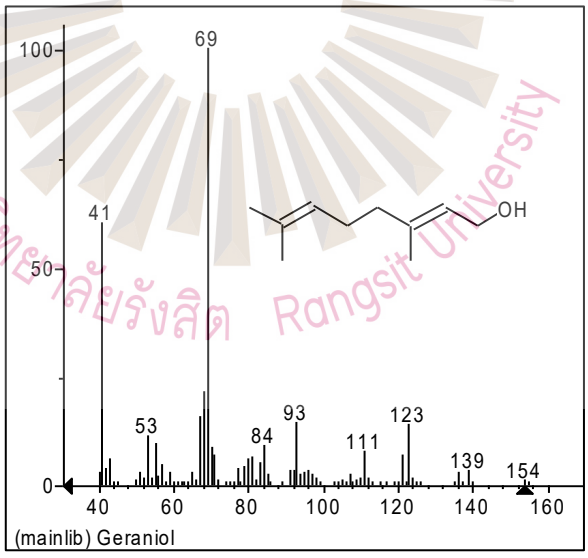
A. เซลล์ตาย ติดสี B. เซลล์มีชีวิต ไม่ติดสี

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาพการทดสอบด้วยเครื่องโครมาโตกราฟี (HPLC)

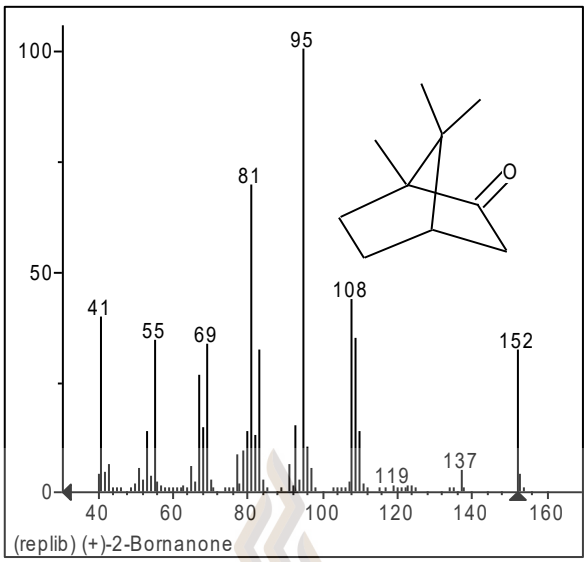


รูปที่ 10 แสดงส่วนประกอบของสารสกัดกระชายขาว ด้วยวิธี HPLC

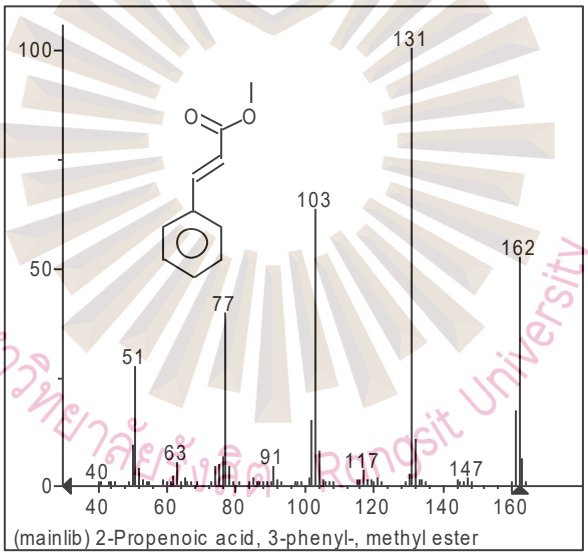


รูปที่ 11 สาร Geraniol ที่พบในสารสกัดกระชายขาว

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

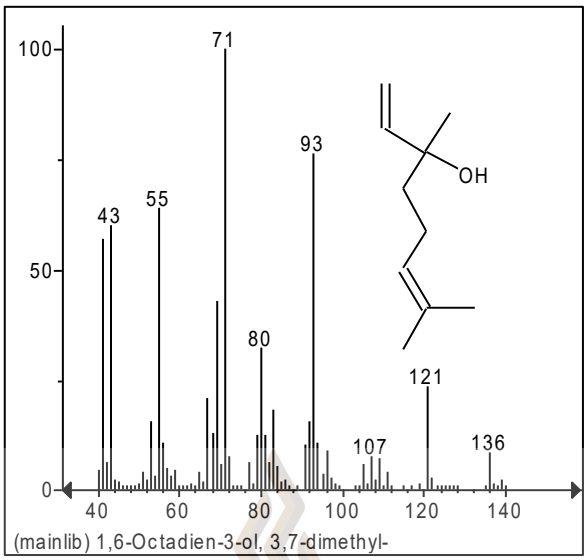


รูปที่ 12 สาร (+)-2-Bornanone/ L-Camphor ที่พบในสารสกัดกระชายขาว

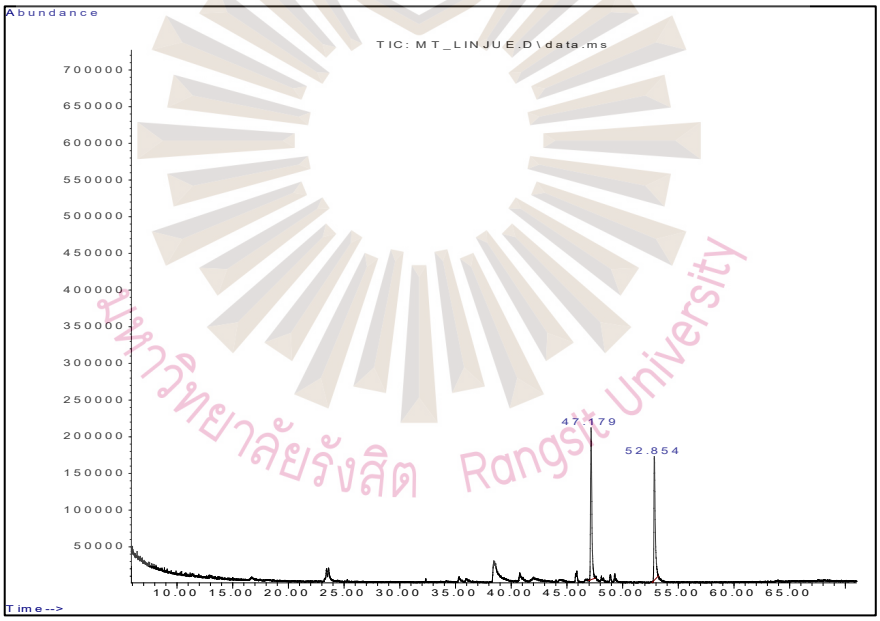


รูปที่ 13 สาร 2-Propenoic acid, 3-phenyl-, methyl ester / Methyl cinnamate ที่พบในสารสกัดกระชายขาว

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

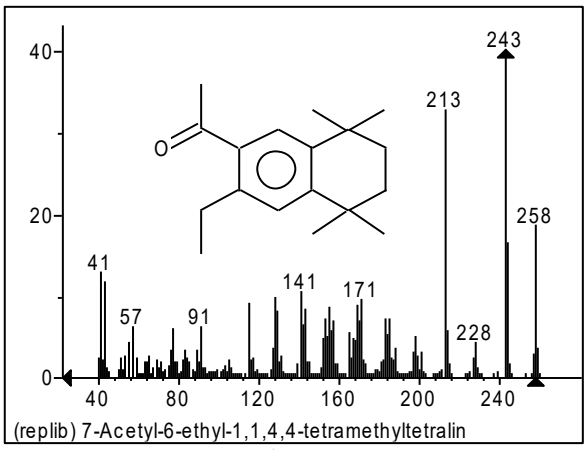


รูปที่ 14 สาร 3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol/ Linalool ที่พบในสารสกัดกระชายขาว

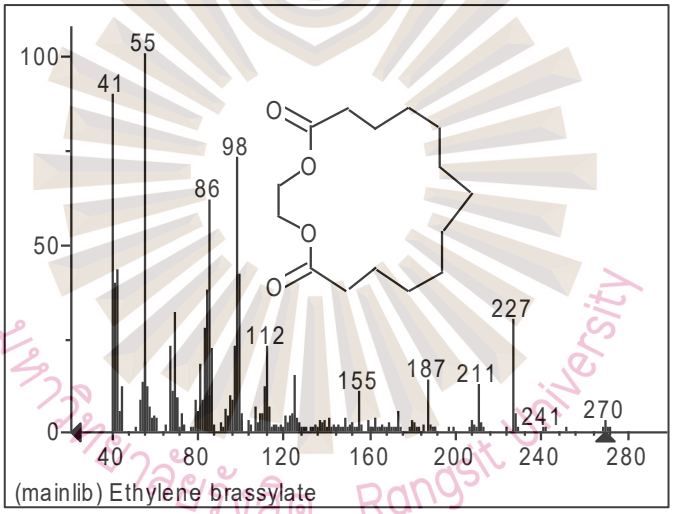


รูปที่ 15 แสดงส่วนประกอบของสารสกัดเห็ดหลินจือ ด้วยวิธี HPLC

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

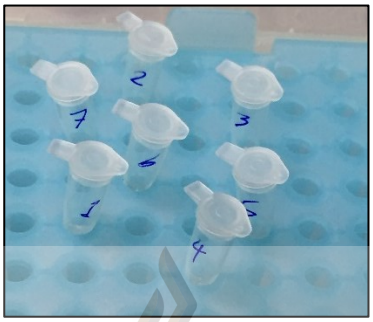


รูปที่ 16 สาร 7-Acetyl-6-ethyl-1,1,4,4-tertramethyltetralin/ Versalide ที่พบในสารสกัดเห็ดหลินจือ

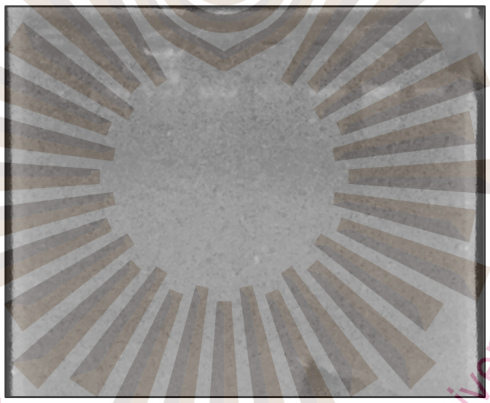


รูปที่ 17 สาร Ethylene brassylate/ Astratone ที่พบในสารสกัดเห็ดหลินจือ

ภาพการทดสอบด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

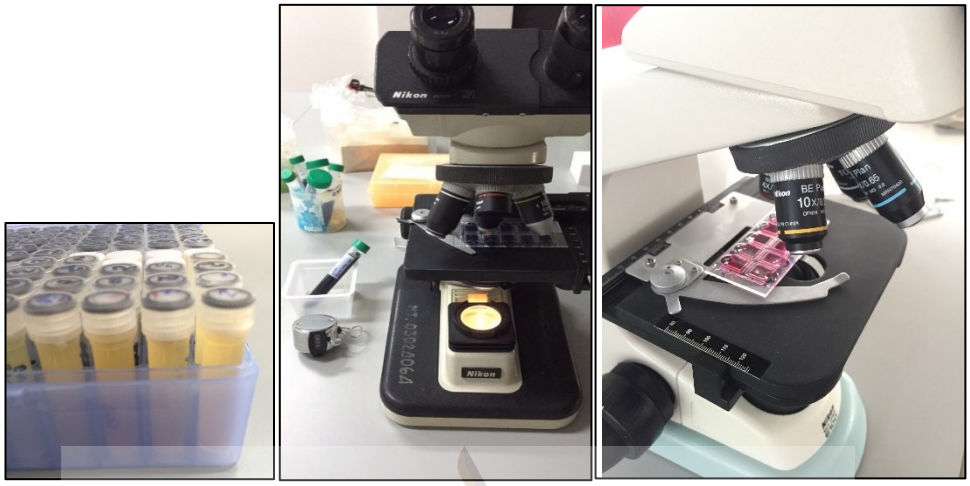


รูปที่ 19 สารพันธุกรรมของเชื้อ *Blastocystis hominis* ในหลอดทดลองที่ได้จากการทดสอบ



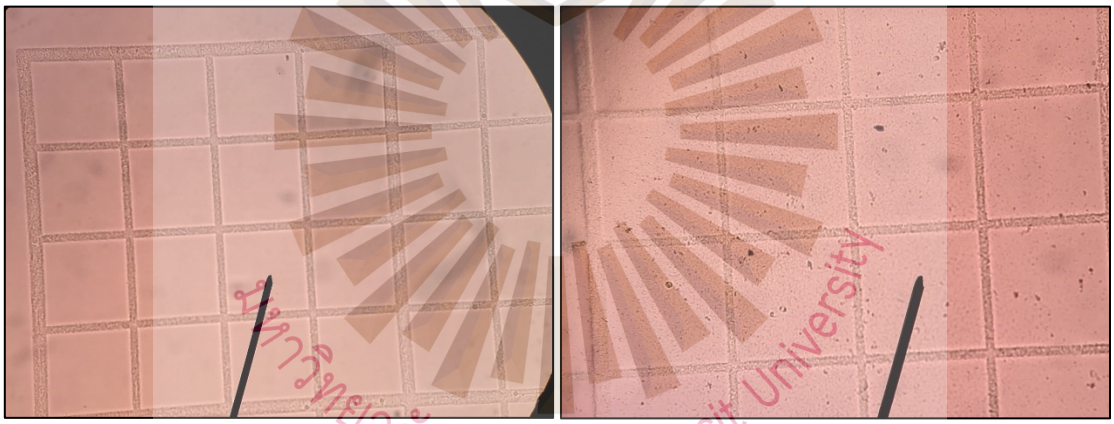
รูปที่ 19 Extracted DNA products ของเชื้อ *Blastocystis hominis* ใน 1.5% agarose gel

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 20 อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ และชุดการทดสอบ vital stain exclusion assay

A. หลอดทดลอง B. สี Trypan blue C. สี Erythrosine B

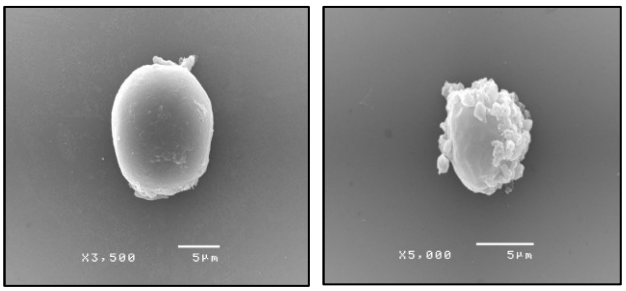


รูปที่ 21 การควบคุมคุณภาพอุปกรณ์ counting chamber

A. Blank control B. Negative control ของสารละลายที่ทดสอบ

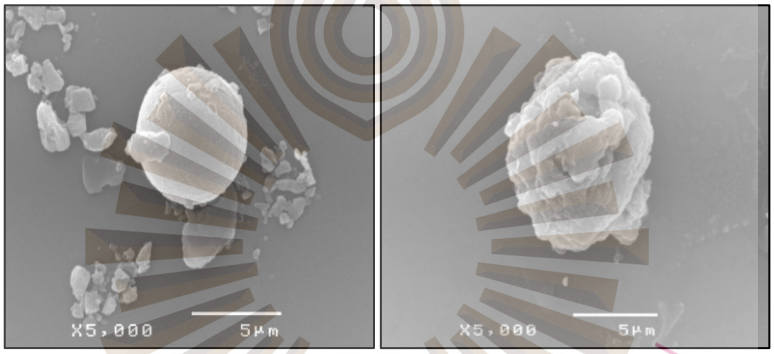
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาพการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน (SEM)



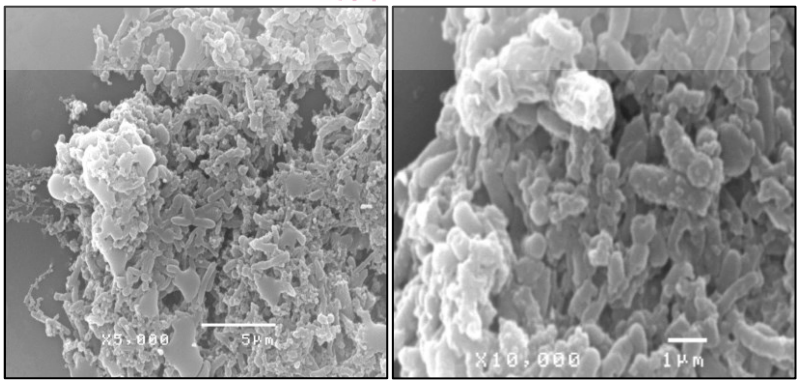
รูปที่ 22 *Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form ทดสอบกับสารสกัดเห็ดหลินจือ ที่ 12 ชั่วโมง

A. ความเข้มข้น 500 µg/ml B. ความเข้มข้น 2,000 µg/ml



รูปที่ 23 *Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form ทดสอบกับยา Metronidazole ที่ 12 ชั่วโมง

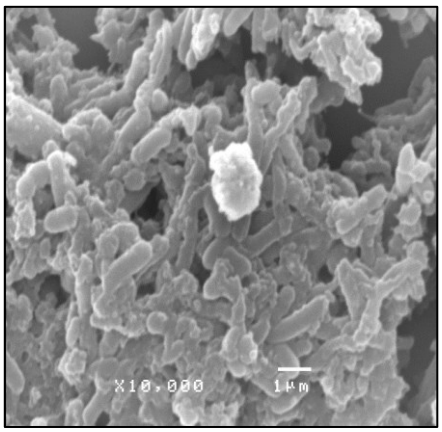
A. ความเข้มข้น 20 µg/ml B. ความเข้มข้น 40 µg/ml



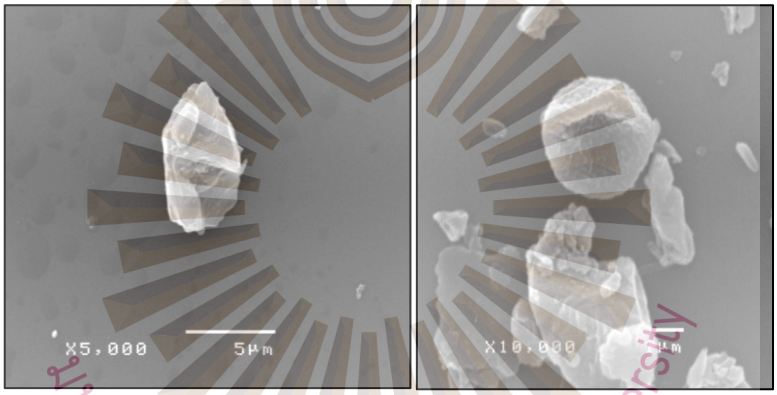
รูปที่ 24 *Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form ทดสอบกับสารสกัดกระชายขาวที่ 12 ชั่วโมง

A. ความเข้มข้น 62.5 µg/ml B. ความเข้มข้น 2,000 µg/ml

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

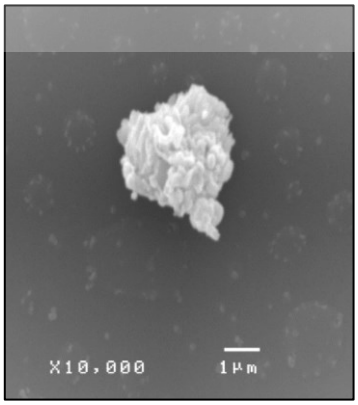


รูปที่ 25 *Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form ทดสอบกับสารสกัดกระชายขาว ความเข้มข้น 2,000 μg/ml ที่ 12 ชั่วโมง



รูปที่ 26 *Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form ในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์

A. 12 ชั่วโมง B. 24 ชั่วโมง



รูปที่ 27 *Blastocystis hominis* ระยะ vacuolar form ทดสอบกับสารสกัดกระชายขาว ความเข้มข้น 500 μg/ml ที่ 12 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ประวัติผู้วิจัย

คำนำหน้า	☐ นาย ☐ นาง ☐ นางสาว ☑ ว่าที่ร้อยตรี
ตำแหน่งทางวิชาการ	☐ ศ. ☐ รศ. ☐ ผศ.
ชื่อผู้วิจัย	เฉลิมพล
นามสกุลผู้วิจัย	แก้วใจ
ชื่อผู้วิจัยภาษาอังกฤษ	Chalermpon
นามสกุลภาษาอังกฤษ	Kaewjai
ที่อยู่ (บ้าน)	46/38 ซ.คลองหลวง17 ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง
จังหวัด	ปทุมธานี
รหัสไปรษณีย์	12120
โทรศัพท์ (บ้าน)	-
ที่อยู่ (ที่ทำงาน)	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต เมืองเอก ถ.พหลโยธิน ต.หลักหก อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000
โทรศัพท์ (ที่ทำงาน)	02 997 2222 ต่อ 1517
แฟ็กซ์ (ที่ทำงาน)	02 997 2222 ต่อ 1451

E-mail Address: chalermpon.k@rsu.ac.th

การศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ.ที่จบ	ชื่อสถานศึกษา
วท.ม. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)	2544	มหาวิทยาลัยมหิดล
วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)	2540	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ

- Kaewjai C, Kitwatanachai S, Kowaboot S. (2015). A preliminary survey of *Acanthamoeba* spp. contamination in contact lens storages from health science students of Rangsit University, Thailand. Thammasat Medical journal, 15(2), 191-199.
- Kaewjai C, Prommano O, Tonsomboon A. (2020). Detection of *Blastocystis hominis* using Simple direct smear compared with Jones' medium cultivation in Thatu Subdistrict, Chiang Khan District, Loei Province. Thammasat Medical journal, 20(1), 8-14.
- เฉลิมพล แก้วใจ, สวรรยา พงศ์ปริตร, ธวัช แก้วกัณฑ์. (2560).การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียด้วยความร้อนสูงจากแผ่นเซรามิคกับตะเกียงบุนเซนในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์. ววท, 25(4), 649-654.

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารภายต่างประเทศ

ไม่มี

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการในต่างประเทศ

- Kaewjai C., Watanasatitarpa S. Application of *Blastocystis* identification techniques in medical laboratory. (2021). 3rd international *Blastocystis* conference. Virtual edition, 2-4 June 2021.
- Kaewjai C. The isolation of *Blastocystis* by using small capped tube cultivation in medical laboratory.(2020). Medlab Asia & Asia Health 2020.Virtual edition, October 20-22, 2020.

สาขาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ

ปรสิตวิทยาทางการแพทย์

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University