

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แผนการวิจัย

แบ่งการวิจัยออกเป็น 5 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 การคัดเลือกพืชสมุนไพร คัดเลือกพืชสมุนไพร 60 ชนิด ที่มีรายงานว่ามียาสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดต่าง ๆ ได้ นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Campylobacter* spp.

1.1 การเตรียมสารสกัดพืชสมุนไพร

1.2 การเตรียมเชื้อ *Campylobacter* spp.

1.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรต่อ

เชื้อ *Campylobacter* spp. โดยวิธี agar well diffusion

ขั้นตอนที่ 2 การหาความเข้มข้นต่ำสุด (minimal inhibitory concentration, MIC) ของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* spp. โดยวิธี agar well diffusion

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาผลของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการเจริญและการเหลือรอดของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในขวดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Mueller-Hinton Broth

ขั้นตอนที่ 4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรสูตรผสมต่อเชื้อ *Campylobacter* spp. โดยวิธี agar well diffusion

ขั้นตอนที่ 5 ศึกษาผลของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการเพิ่มจำนวนและการเหลือรอดของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่ทดลอง

3.2 สารเคมีและอุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1.1 พืชสมุนไพร

ตารางที่ 8 รายชื่อพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการวิจัย

ลำดับ	ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	ส่วนที่ใช้
1	กระเทียม	<i>Allium sativum</i> Linn.	Amaryllidaceae	ผล
2	กล้วยน้ำว้า	<i>Musa sapientum</i> Linn.	Musaceae	เปลือกผล
3	กะเพรา	<i>Ocimum sanctum</i> Linn.	Labiatae	ผล
4	กะทือ	<i>Zingiber zerumbet</i> Smith.	Zingiberaceae	ใบ
5	กระชาย	<i>Boesenbergia pandurata</i> Holtt.	Zingiberaceae	แง่ง
6	โกฐพุงปลา	<i>Terminalia chebula</i> Rezt.	Combretaceae	ก้อนบนใบ
7	ขนุน	<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lamk.	Moraceae	แง่ง
8	ขมิ้นชัน	<i>Curcuma longa</i> Linn.	Zingiberaceae	ใบ
9	ขมิ้นอ้อย	<i>Curcuma zedoaria</i> (Berg.)Rosc.	Zingiberaceae	แง่ง
10	ข้าวเย็นใต้	<i>Smilax corbularia</i> Kuth.	Smilacaceae	หัว
11	คำแสด	<i>Mallotus philippensis</i>	Euphorbiaceae	ดอก
12	จามจุรี	<i>Samanea saman</i> (Jacq.)Merr.	Leguminosae	ใบ
13	ชะพลู	<i>Piper sarmentosum</i> Roxb.ex Hunter	Piperaceae	ใบ
14	ใบชา	<i>Camelia sinensis</i> Ktze.	Temstroemiaceae	ใบ
15	ชุมเห็ดเทศ	<i>Cassia alata</i> Linn.	Leguminosae	ใบ
16	ตะขบ	<i>Muntingia calabura</i> Linn.	Tiliaceae	ผล
17	ตะไคร้	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.	Gramineae	ต้น
18	ถั่วลันเตา	<i>Pisum sativum</i> Linn.	Leguminosae	ผล
19	ฟักทอง	<i>Cucurbita moschata</i> (Duch.)Poir.	Cucurbitaceae	ผล
20	ทองพันชั่ง	<i>Rhinacanthus nasutus</i> (L) Kurz.	Acantaceae	ใบ
21	ทับทิม	<i>Punica granatum</i> Linn.	Punicaceae	เปลือกผล
22	ทุเรียน	<i>Durio zibethinus</i> Linn.	Bombacaceae	เปลือกผล
23	น้อยหน่า	<i>Annona squamosa</i> Linn.	Anonaceae	ใบ
24	บุญนาศ	<i>Mesua ferrea</i> Linn.	Guttiferae	ดอก
25	เบญจกานี	<i>Querus infectoria</i> Olivier.	Anacardiaceae	ผล
26	ประคู้	<i>Pterocarpus macrocarpus</i> Kurz.	Leguminosae	ใบ
27	ผักกะสัง	<i>Peperomia pellucida</i> Korth.	Peperomiaceae	ทั้งต้น

ตารางที่ 8 รายชื่อพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการวิจัย (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	ส่วนที่ใช้
28	ฝรั่ง	<i>Psidium guajava</i> Linn.	Myrtaceae	ใบ
29	ฝาง	<i>Caesalpinia sappan</i> Linn.	Caesalpiniaceae	ใบ
30	พริกขี้หนู	<i>Capsicum frutescens</i> Linn.	Solanaceae	เปลือกต้น
31	พลู	<i>Piper betel</i> Linn.	Piperaceae	ใบ
32	พิทูลด	<i>Mimusops elengi</i> Linn.	Sapotaceae	ดอก
33	ไพล	<i>Zingiber purpureum</i>	Zingiberaceae	แง่ง
34	มะขาม	<i>Tamarindus indica</i> Linn.	Leguminosae	ผล
35	มะกอกฝรั่ง	<i>Elaeocarpus hygrophilus</i> Kurz.	Anacardiaceae	เมล็ด
36	มะขามเทศ	<i>Pithecolobium dulce</i> (Roxb.) Benth.	Leguminosae	ใบ
37	มะขามป้อม	<i>Phyllanthus emblica</i> Linn.	Euphorbiaceae	ผล
38	มะม่วง	<i>Mangifera indica</i> Linn.	Anacardiaceae	ผล
39	มะม่วงหิมพานต์	<i>Anacardium occidentale</i> Linn.	Anacardiaceae	ใบ
40	มะยม	<i>Phyllanthus acidus</i> (L.) Skeel	Euphorbiaceae	ใบ
41	มะระขี้นก	<i>Momordica charantia</i> Linn.	Cucurbitaceae	ผล
42	มะละกอ	<i>Carica papaya</i> Linn.	Caricaceae	ใบ
43	ขอ	<i>Morinda citrifolia</i> Linn.	Rubiaceae	ผล
44	ราชคัศ	<i>Brucea javanica</i> (L.) Merr.	Simaroubaceae	ผล
45	ว่านชักมดลูก	<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.	Zingiberaceae	หัว
46	ส้มโอ	<i>Citrus maxima</i> (Burm.f.) Merr.	Rutaceae	เปลือกผล
47	สมอไทย	<i>Terminalia chebula</i> Retz.	Combretaceae	ผล
48	สมอพิเภก	<i>Terminalia bellerica</i> Roxb.	Combretaceae	ผล
49	สารภี	<i>Mammea siamensis</i> Kosterm.	Guttiferae	ดอก
50	สีเสียดเหนือ	<i>Acacia catechu</i> (L.f.) Willd.	Leguminosae	เปลือกต้น
51	หอมแดง	<i>Allium ascalonicum</i> Linn.	Alliaceae	หัว
52	ผักกาดหัว	<i>Raphanus sativus</i>	Brassicaceae	ราก
53	หญ้าแห้วหมู	<i>Cyperus rotundus</i> Linn.	Cyperaceae	ราก
54	หญ้าคา	<i>Imperata cylindrical</i> Beauv.	Gramineae	ราก



ตารางที่ 8 รายชื่อพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการวิจัย (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	ส่วนที่ใช้
55	หญ้างวงช้าง	<i>Heliotropium indicum</i> Linn.	Boraginaceae	ทั้งต้น
56	หญ้าพันงูแดง	<i>Cyathula postrata</i> Bl.	Amalanthaceae	ทั้งต้น
57	หมาก	<i>Areca catechu</i> Linn.	Palmae	ผล
58	หม่อน	<i>Morus alba</i> Linn.	Moraceae	ใบ
59	หางนกยูง	<i>Caesalpinia pulcherrima</i> (L)Sw.	Leguminosae	ใบ
60	หูกวาง	<i>Terminalia catappa</i> Linn.	Combretaceae	ใบ

ที่มา: คัดแปลงจาก สนง.คณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน กระทรวงสาธารณสุข (2541)

3.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. *Campylobacter* blood-free selective agar base (Modified CCDA-preston) (Oxoid, CM 739, Hampshire, England)
2. Bolton broth (Oxoid, BB CM 983, Basingtoke, Hampshire, England)
3. Mueller-Hinton Broth (Oxoid, CM 405, Hampshire, England)
4. Brucella medium base (Oxoid, CM 169, Basingtoke, Hampshire, England)

3.2.1.3 สารเคมี

1. CCDA selective supplement (Oxoid, SR 155E, Hampshire, England)
2. Modified Bolton broth selective supplement (Oxoid, SR 208E, Hampshire, England)
3. 95% ethanol (Lab-Scan)
4. GasPak™ EZ (BD. Ref. 260685, Becton, Dickinson and Company, Maryland, USA)
5. Glycerol (Glygerin; C₃H₈O₃, Merck, Darmstadt, Germany)
6. Distilled water
7. Oil immersion
8. Glacial acetic acid (BDH, AnalaR, England)
9. น้ำยาฆ่าเชื้อ Ethyl alcohol 70%

3.2.1.4 อุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม.
2. หลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มล.
3. ไมโครปิเปต และ tip ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
4. กระดาษกรอง No.1 (Whatman filter paper No.1, Whatman, England)
5. หลอดทดลองแบบฝาเกลียวพร้อมฝาปิด ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 ซม. ยาว 15 ซม. (Pyrex, New York)
6. ขวดแก้วสี่ขา
7. บีกเกอร์ ขนาด 500 มล.
8. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล.
9. Incubator (Model. 1535, Sheldon Manufacturing, Inc. USA)
10. Vortex genie 2 mixer (Scientific industries)
11. Anaero JarTM (Code. AG 25, Oxoid, AnaeroJarTM AG0025A)
12. Centrifuge (Marathon micro A, Fisher Scientific)
13. Filter 0.2 μm (CE 297, Sartorius. Minisart^R, Geottingen, Germany)
14. Water bath (Type 1004 GFL, Burgwedel, Germany)
15. Autoclave (Model. HL36 A-DY/HL42 A-DY, Tokyo, Japan)
16. Rotary evaporator
17. Hot air oven (Model. 1370 FX, Sheldon Manufacturing, Inc. USA)
18. กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)
19. Microscope slide (25.4 x 76.2 mm, 1 – 1.2 mm thick)
20. Cover glass
21. ขวดแก้วใส แบบฝาเกลียวสี่ขา ขนาดความจุ 250, 500 และ 1,000 มล.
(Scott Duran, Germany)
22. Shaker (KS 250B, IKA Labo technik stuafen, Germany)
23. loop
24. Cock – borer
25. Triangle glass
26. เครื่องมือวัดความยาว (vernier caliper)
27. ปากคีบ

28. Glass bead

3.2.1.5 สัตว์ทดลอง

1. ไก่เนื้อ คณะเกษตร อายุ 1 วัน จำนวน 40 ตัว
2. อาหารไก่เนื้อระยะแรก โปรตีน ไม่น้อยกว่า 21% ไม่มียากันบิดและยาปฏิชีวนะ
3. อุปกรณ์ให้น้ำให้อาหารไก่
4. หลอดไฟฟ้าฮีทอน (หลอดกลม) ขนาด 100 วัตต์
5. วัสดุรองนอน คือ แกลบที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมสารสกัดพีชสมุนไพรมะนาว, การแยกและพิสูจน์เชื้อ *Campylobacter* spp. จากลำไส้ไก่

3.3.1.1 การสกัดพีชสมุนไพรมะนาวอย่างหยาบ

พีชสมุนไพรมะนาวที่นำมาศึกษามีทั้งแบบสดและแบบแห้ง โดยแบบแห้งซื้อจากร้านขายสมุนไพรมะนาวเหรียญ 43/2 หมู่ที่ 14 บ้านหนองแวง ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ซึ่งจัดเก็บไว้ในถุงกระดาษหนาสีน้ำตาล มีอายุการเก็บไม่เกิน 6 เดือน และแบบสดซื้อจากร้านค้าที่ขายสมุนไพรมะนาวสดในตลาดสดบางลำพู เขตเทศบาลเมืองขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

การเตรียมสมุนไพรมะนาวเพื่อทำการบดเพื่อทำเป็นผงยา

1. นำสมุนไพรมะนาวที่คัดเลือกแล้วมาล้างให้สะอาด ทิ้งไว้ให้เสด็จน้ำแล้วทำการหั่นให้เป็นชิ้นย่อย ๆ แล้วจึงนำไปอบแห้งในตู้อบสมุนไพรมะนาว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 45 – 50°C จนแห้งสนิทใช้ระยะเวลาประมาณ 8-10 ชั่วโมง

ผงยา

2. นำสมุนไพรมะนาวที่ผ่านการอบแห้งแล้วนำมาบดโดยใช้เครื่องบด เพื่อให้ได้

3. เก็บผงยาที่ได้ใส่ภาชนะที่เตรียมไว้ นำไปไว้ในโถสุญญากาศ เพื่อทำการวิจัยต่อไป

การเตรียมสารสกัดผงยาสมุนไพรมะนาวด้วย 95% ethanol โดยใช้วิธีการหมัก (maceration)

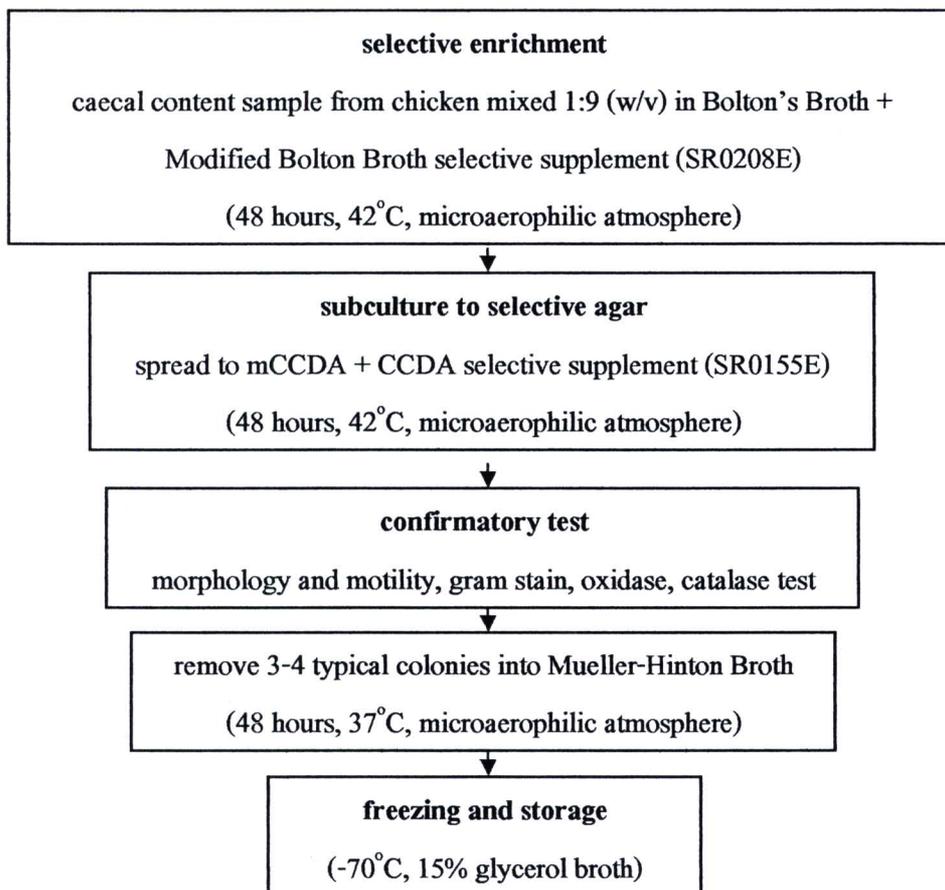
1. ชั่งผงยาสมุนไพรมะนาวประมาณ 50 กรัม ใส่ flask ขนาด 500 มล. นำมาแช่ใน 95% ethanol ปริมาตร 250 มล. หมักนาน 2 วัน ในระหว่างการหมักมีการเขย่า flask ด้วยเครื่องเขย่า

สารความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นระยะ ๆ เมื่อครบกำหนดทำการเก็บสารสกัด โดยผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1

2. นำสารสกัดที่ได้มาทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) เมื่อสารสกัดมีปริมาตรลดลงเหลือ 1 ใน 3 ของสารสกัดขั้นต้น จึงนำเอาสารสกัดที่ได้มาถ่ายใส่ลงใน evaporating dish นำไปตั้งบนอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) จนกระทั่งได้สารสกัดที่แห้งหรือเข้มข้น

3. ทำการเก็บสารสกัดแห้งหรือเข้มข้นที่ได้ในขวดเก็บสาร แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเตรียมทำการวิจัยขั้นตอนต่อไป (รูปภาพที่ 2-5 ในภาคผนวก)

3.3.1.2 การแยกเชื้อ *Campylobacter* จากกากอาหารที่อยู่ภายในลำไส้ไก่ส่วนไส้ตัน (caecal content) ไก่พื้นเมือง สุขภาพแข็งแรง อายุ 3-4 สัปดาห์ จำนวน 10 ตัว จากตลาดสดบ้านโนนม่วง อ.เมือง จ.ขอนแก่น



ภาพที่ 4 Flow diagram แสดงวิธีการแยกเชื้อพิสูจน์เชื้อและเก็บรักษาเชื้อ *Campylobacter* ที่มา: คัดแปลงจาก Adhikari (2003)

การยืนยันเชื้อ *Campylobacter* (Confirmation of *Campylobacter*)

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

หลังการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้บ่มเชื้อภายใต้สภาวะ microaerophilic เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะพบโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mCCDA ซึ่งมีลักษณะแบนสีเทาถึงขาว เนื้อละเอียด โปร่งแสง แวววาวด้วยลักษณะ metallic sheen ขอบโคโลนีไม่เรียบไม่เป็นรูปร่าง เจริญตามรอยเชื้อ (streak)

การทดสอบการติดสีโดยการย้อม gramstain (ตามวิธีของ Andrews, 1992)

หยคน้ำกลั่นประมาณ 10 ไมโครลิตร บนสไลด์แก้วที่สะอาด เชื้อเชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง ด้วยรูปที่เผาฆ่าเชื้อแล้ว นำมาเขียนบนหยคน้ำและกระจายให้มีความหนาแน่นเท่า ๆ กัน บนผิวสไลด์ ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ตรึงเซลล์กับแผ่นสไลด์ด้วยความร้อน โดยการลนตัวอย่างด้วยเปลวไฟจาก ตะเกียงแอลกอฮอล์ผ่านไปมา 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปย้อมสี ในขั้นตอนการย้อมสี นำตัวอย่าง เชื้อที่ผ่านการตรึงเซลล์แล้วมาหยดด้วย gram crystal violet ให้ท่วมตัวอย่างและทิ้งไว้นาน 30 วินาที ล้างเบา ๆ ด้วยน้ำ จนไม่มีสีปนออกมากับน้ำ หยดด้วย gram iodine ให้ท่วมตัวอย่างและทิ้งไว้นาน 10 วินาที ล้างเบา ๆ ด้วยน้ำ และล้างด้วย แอลกอฮอล์ 95% จนกระทั่งไม่มีสีปนออกมากับน้ำอีกครั้ง หยด gram safranin ให้ท่วมตัวอย่างและทิ้งไว้ 30-60 วินาที ล้างเบา ๆ ด้วยน้ำซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู นำแผ่นสไลด์ไปส่องดูเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตรูปร่างเซลล์ของเชื้อ ซึ่งจะมีลักษณะเป็นแท่ง บิดเกลียว คล้ายรูปตัวเอส หรือปีกนกนางนวลและติดสีแดงของ safranin

รูปร่างและการเคลื่อนที่

ทำการทดสอบการเคลื่อนที่จากการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยนำเชื้อ

Campylobacter มาแตะบนสไลด์แล้วหยคน้ำกลั่นลงไป ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปส่องดูการเคลื่อนที่ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเชื้อ *Campylobacter* จะมีรูปร่างเรียวยาว พบได้ทั้งเป็นรูปตัวเอส หรือ โค้งงอจนถึงบิดเกลียวหลวม และเคลื่อนที่ได้ การเคลื่อนที่เกิดจากแส้ (flagella) ที่ปลายด้านหนึ่งทำให้เชื้อหมุนเป็นเกลียวและเคลื่อนที่ไปข้างหน้าคล้ายการปาลูกดอกและเป็นการเคลื่อนที่แบบไร้ทิศทาง

การทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test)

Growth at microaerophilic เพาะเชื้อที่ส่งสัยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mCCDA ตัวอย่างละ 2 เพลท แยกบ่มที่ 42°C โดยที่เพลทที่ 1 บ่มเชื้อภายใต้สภาวะ microaerophilic ส่วนเพลทที่ 2 บ่มในสภาวะมือออกซิเจน (aerobic) นาน 24 ชั่วโมง เชื้อ *Campylobacter* spp. จะไม่เจริญในสภาพแวดล้อมทั่วไปคือ มือออกซิเจน แต่จะเจริญในสภาวะที่มีมือออกซิเจนต่ำ (microaerophilic condition) เท่านั้น

Catalase test เช็ยเชื้อจาก โคโลนีที่สงสัยป้ายลงบนแผ่นสไลด์ หยด 3% H₂O₂ เชื้อที่ให้ผลบวกจะเกิดฟองอากาศให้เห็น

Oxidase test เช็ยเชื้อจาก โคโลนีที่สงสัยป้ายลงบนกระดาษกรองที่หยดสาร oxidase พอชุ่ม เชื้อที่ให้ผลบวกจะเกิดสีน้ำเงินตรงบริเวณรอยป้ายเชื้อภายใน 10 วินาที

3.3.2 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Campylobacter* เบื้องต้น ของสารสกัดสมุนไพร ด้วยวิธี agar well diffusion คัดแปลงตามวิธีของ Perez et al. (1990)

3.3.2.1 การเพาะเชื้อ *Campylobacter* จากคลังเชื้อ

ย้ายเชื้อ *Campylobacter* แต่ละสายพันธุ์ จากคลังเชื้อ (stock culture) ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Bolton Broth 10 มล. และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาพ microaerophilic condition นาน 48 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณ จากนั้นจึงใช้ลูปที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มในสารละลายเหลวที่มีเซลล์เจริญ แล้วนำไปเช็ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง mCCDA แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาพ microaerophilic condition นาน 48 ชั่วโมง ต่อจากนั้นใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อหรือลูปที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะหรือป้าย typical *Campylobacter* colony นำไปลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MHB 3 มล. ปรับความเข้มข้นของปริมาณเชื้อตามวิธีการของ Kolmer, Boerner (1945) โดยการวัดค่า optical density (OD) ของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งเท่ากับ 0.5 McFarland nephelometer standard เพื่อให้จำนวนเซลล์อยู่ในระดับที่เหมาะสม (10⁸ colony – forming unit (CFU)/ml) ถ้าค่า OD มากกว่า 0.5 ต้องปรับค่าความขุ่นด้วยอาหารเหลว MHB จากนั้นถ่ายสารละลายเชื้อปริมาณ 150 µl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเหลวกึ่งแข็ง (Semi-Solid Brucella Agar) จำนวน 14 มล. เขย่าให้เข้ากันดี โดยใช้ vortex mixer ที่ 30 วินาที แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อหมุนจานเพาะเชื้อ แล้วทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวแล้วทำการเจาะหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย cork-borer ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม. และลึก 4 มม. จำนวน 7 หลุมต่อจานเพาะเชื้อ 1 จาน รอการทดสอบขั้นตอนต่อไป

3.3.2.2 การเตรียมสารสกัดพืชสมุนไพร

เตรียมความเข้มข้นของสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 95% ethanol โดยชั่งสารสกัดแห้งจากคลังเก็บมา 2 กรัม ละลายซ้ำครั้งที่สองด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 10 มล. จะได้สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 200 มก./มล. กรองสารสกัดอีกครั้งเพื่อทำให้ปลอดเชื้อ โดยการกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อความพรุน 0.20 ไมโครเมตร ก่อนนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

3.3.2.3 วิธีการทดสอบ

หยดสารสกัดหยาบพืชสมุนไพรความเข้มข้น 200 มก./มล. ด้วยปิเปตใส่ใน หลุมปริมาตร หลุมละ 35 ไมโครลิตร โดยที่งานเพาะเชื้อ 1 งานจะทดสอบสารสกัดได้ 5 ชนิด ที่ เหลือ 2 หลุม จะเป็นตัวควบคุมโดยที่ตัวควบคุมผลลบใช้น้ำกลั่น ส่วนตัวควบคุมผลบวกจะใช้ 5% glacial acetic acid ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มภายใต้สภาพ microaerophilic condition ที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบที่กผลวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณเชื้อที่ไม่เจริญ ลักษณะโซนใส (clear zone) รอบหลุมสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดหน่วยเป็นมิลลิเมตร แล้วหาค่าเฉลี่ยบันทึกผลและบันทึกภาพ คัดเลือกสารสกัดหยาบจากพืชที่ให้ผลดีไปทดสอบการทดลอง ต่อไป

3.3.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* spp. (minimal inhibitory concentration, MIC) ของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร คัดแปลงตามวิธีของ Perez et al. (1990)

3.3.3.1 การเตรียมสารสกัดพืชสมุนไพร

ทำการละลายสารสกัดพืชสมุนไพรที่ผ่านการทดสอบในข้อ 3.3.2.3 ว่ามี ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* spp. ใน Mueller-Hinton Broth (MHB) ในอัตราส่วน 2 กรัม/10 มล. ละลายให้เข้ากัน จะได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 200 มก./มล. (น้ำหนัก ต่อปริมาตร) จากนั้นทำการเจือจางใน MHB ให้ความเข้มข้นลดลงทุก ๆ 2 เท่า (Two-fold serial dilution) จนถึงหลอดที่ 9 ซึ่งมีความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร 0.78 มก./มล. แต่ละหลอดจะมี ปริมาตร 2 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C รอการทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.3.3.2 การเตรียมเชื้อและหลุมเพื่อทดสอบ MIC

เชื้อที่ใช้ทดสอบเป็นเชื้อ *Campylobacter* spp. 10 สายพันธุ์ ที่เก็บรวบรวมไว้ในคลังเชื้อ โดยเตรียมเชื้อตามวิธีการเตรียมดังที่กล่าวมาแล้วจนได้สารละลายเชื้อที่มี จำนวนเซลล์ อยู่ในระดับที่เหมาะสม (10^6 CFU/ml) และวิธีการเติมเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดจนวิธีการทำหลุม เช่นเดียวกันกับที่ได้อธิบายมาแล้วข้างต้น

3.3.3.3 การทดสอบ

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารสกัดพืชสมุนไพรที่เตรียมไว้ปริมาณ 35 ไมโครลิตร ย้ายใส่ในหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ *Campylobacter* โดยเริ่มต้นจากความเข้มข้นสูงสุดเวียนตาม เหมนาฬิกาจนกระทั่งถึงหลุมที่ 9 ซึ่งจะเป็นหลุมที่มีความเข้มข้นต่ำสุดหรือเจือจางน้อยที่สุดส่วน หลุมที่ 10 จะใส่ MHB เป็นตัวควบคุมผลลบ และทำในลักษณะเดียวกันนี้กับเชื้อ *Campylobacter* สายพันธุ์อื่น ๆ ที่เหลือจนครบ 10 สายพันธุ์ นำไปบ่มภายใต้สภาพ microaerophilic condition ที่

อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบที่ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดที่ทำให้เกิดโซนใส คัดเลือกสารสกัดพีชสมุนไพรที่ให้ผลดีที่สุดหนึ่งตัวไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อในขั้นต่อไป

3.3.4 ศึกษาผลของสารสกัดพีชสมุนไพรต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในขวดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Mueller-Hinton Broth ดัดแปลงตามวิธีของ Chaveerach et al. (2004)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Broth (MHB) 100 มล. ใส่ในขวดทดลองขนาดความจุ 200 มล. ปิดฝาด้วยจุกยางแล้วซีลรอบปากขวดด้วยอลูมิเนียมแคป นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 10 นาทีและทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 80°C ปรับสภาวะบรรยากาศภายในขวดให้มีสภาพ microaerophilic ด้วยก๊าซไนโตรเจนที่มีอัตราส่วนของก๊าซออกซิเจน: ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์: ก๊าซไนโตรเจน เท่ากับ 5%: 10%: 85 % ตามลำดับ โดยทำการเปลี่ยนถ่ายก๊าซภายในขวดด้วยการปล่อยก๊าซเข้าและดูดออกจำนวน 20 ครั้ง แต่ละครั้งนาน 20 วินาที เสร็จแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที อีกครั้งหนึ่งแล้วทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 37°C แล้วทำการถ่ายเชื้อ *Campylobacter* isolate (A2) ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ด้วยเข็มและกระบอกฉีดยาปราศจากเชื้อ ลงในขวดทดลองที่ 1, 2 และ 3 โดยขวดทดลองที่ 1 *Campylobacter* เป็นขวดควบคุมผลบวก ขวดทดลองที่ 2 *Campylobacter* + น้ำกลั่นเป็นขวดควบคุมผลลบ และขวดทดลองที่ 3 *Campylobacter* + สารสกัดจากผลสมอไทยที่เป็นขวดสำหรับทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 °C ควบคุมสารสกัดหยาบพีชสมุนไพร (ความเข้มข้น 2 เท่าของค่า MIC ของสารสกัดพีชสมุนไพรที่ได้จากการทดสอบ) จำนวน 0.5 มล. ย้ายลงในขวดทดลองที่ 3 เมื่อเวลาการบ่มเชื้อผ่านไป 24 และ 48 ชั่วโมง ทำลักษณะเดียวกันในขวดที่ 2 (ควบคุมผลลบ) แต่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนสารสกัด ส่วนขวดทดลองที่ 1 (ควบคุมผลบวก) ไม่มีการเติมสารสกัดใด ๆ ลงไปนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ทำการสุ่มตัวอย่างในช่วงเวลา 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 และ 120 ชั่วโมง โดยติดตามค่าสังเกตดังต่อไปนี้

การนับจำนวนเชื้อ *Campylobacter* ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Broth โดยย้ายสารละลายตัวอย่าง 3 มล. จากขวดทดลองแต่ละขวด สารละลายตัวอย่าง 1 มล. ถูกนำมาเจือจาง 10 เท่า ด้วย 0.1% peptone water (PW) เขย่าให้เข้ากันดีจากนั้นเจือจางลำดับขั้นครั้งละ 10 เท่าจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมนำสารละลายตัวอย่างที่ได้มานับจำนวนเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ mCCDA ที่เติม selective supplement (Oxoid, SR0155E) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะ microaerophilic นาน 48 ชั่วโมง ตรวจสอบโคโลนีแล้วจดบันทึกจำนวนโคโลนีที่อยู่ในช่วง 30 – 300 CFU/ml แสดงผลจำนวนโคโลนีเป็นค่า log CFU/ml ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.3.5 การทดลองหาสัดส่วนที่เหมาะสมของสารสกัดต่อการเจริญเติบโตเชื้อ *Campylobacter* spp. โดยวิธี agar well diffusion ดัดแปลงตามวิธีของ Perez et al. (1990)

3.3.5.1 การเตรียมสารสกัด

ทำการละลายสารสกัดพืชสมุนไพรแต่ละชนิดที่ผ่านการทดสอบในข้อ 3.3.2.3 ว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในอัตราส่วน 2 กรัม/10 มล. ละลายให้เข้ากัน จะได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 200 มก./มล. (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นทำการผสมสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดในอัตราส่วนต่าง ๆ 9 สูตร การทดลอง ก่อนนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

3.3.5.2 การเตรียมเชื้อ *Campylobacter* และหลุมเพื่อทดสอบฤทธิ์

เชื้อที่ใช้ทดสอบเป็นเชื้อ *Campylobacter* spp. จำนวน 10 สายพันธุ์ เตรียมเชื้อตามวิธีการเตรียมดังที่กล่าวมาแล้วจนได้สารละลายเชื้อที่มี จำนวนเซลล์อยู่ในระดับที่เหมาะสม (10^8 CFU/ml) และวิธีการเติมเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดจนวิธีการทำหลุม เช่นเดียวกันกับที่ได้อธิบายมาแล้วข้างต้น

3.3.5.3 การทดสอบ

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารสกัดพืชสมุนไพร แต่ละสูตรที่เตรียมไว้ปริมาณ 35 ไมโครลิตร ย้ายใส่ในหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ *Campylobacter* โดยมีน้ำกลั่นตัวควบคุมผลลบ และ 5% glacial acetic acid เป็นตัวควบคุมผลบวก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มภายใต้สภาพ microaerophilic condition ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบที่ผลวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณเชื้อที่ไม่เจริญลักษณะโซนใส (clear zone) รอบหลุมสารสกัดสมุนไพรแต่ละสูตร หน่วยเป็น มิลลิเมตรแล้วหาค่าเฉลี่ยบันทึกผลและบันทึกภาพ

3.3.6 ทดสอบฤทธิ์สารสกัดหยาบพืชสมุนไพรต่อการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* ในไก่ทดลอง ดัดแปลงตามวิธีของ Banhart et al. (1999)

การเตรียมเชื้อเพื่อใช้ทดสอบ เตรียมสารละลายเชื้อ *Campylobacter* isolate (A2) ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland nephelometer standard 0.5 จากนั้นเจือจางด้วย 0.85% sterile normal saline เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 10^6 CFU/ml

ไก่ทดลอง ใช้ไก่เนื้อ คณะแพศยาอายุ 1 วัน จำนวน 40 ตัว จากบริษัทเบทาโกรเกษตรอุตสาหกรรม สาขาร้อยเอ็ด ได้วางแผนการทดลองแบบสุ่มทั้งหมดโดยสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) โดยแบ่งลูกไก่ 40 ตัวออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว ให้อาหารและน้ำตามปกติเป็นเวลา 7 วัน (เพื่อปรับให้เข้ากับสภาพแวดล้อม)

กลุ่มที่ 1 ไม่ได้รับสารสกัดฯ, ไม่ได้รับเชื้อ

กลุ่มที่ 2 ไม่ได้รับสารสกัดฯ, ได้รับเชื้อ (ที่อายุ 9 วัน)

กลุ่มที่ 3 เริ่มได้รับสารสกัดฯ ในขนาด 2 เท่าของค่า MIC ก่อนได้รับเชื้อ 24 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 4 เริ่มได้รับสารสกัดจากพืชที่ผลิตในเชิงการค้า

(commercial herbal medicine extract)

การเลี้ยงไก่ แต่ละกลุ่มเลี้ยงแบบปล่อยพื้นบนพื้นปูนรองพื้นด้วยแกลบ ขนาด 0.6 x 1.0 เมตร โดยแยกเลี้ยงในแต่ละคอกที่สร้างห่างกัน 2.50 เมตร ให้แสงสว่างตลอด 24 ชั่วโมง ให้น้ำและอาหารกินเต็มที่ตลอดเวลา อาหารใช้อาหารสำหรับลูกไก่เนื้อระยะแรก โปรตีนไม่น้อยกว่า 21% และไม่มียาปฏิชีวนะผสม

การให้เชื้อแก่ไก่ ไก่แต่ละตัวในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 จะได้รับเชื้อขนาด 1×10^6 CFU/ml ใน 0.85% sterile normal saline 500 ไมโครลิตร โดยการป้อนทางปากเมื่อไก่อายุ 9 วัน และได้ลดอาหารก่อนป้อนเชื้อ 2 ชั่วโมง

การให้สารสกัดหยาบพืชสมุนไพร ไก่จะได้รับสารสกัดติดต่อกัน 4 วัน โดยเริ่มวันที่ 8, 9, 10, 11 โดยสารสกัดหยาบพืชสมุนไพรจะละลายในน้ำกลั่น โดยให้สารสกัดมีความเข้มข้นเท่ากับ 50 มก./มล. ก่อนป้อนเข้ากระเพาะพักโดยตรง ในปริมาณ 0.5 มล. ด้วยกระบอกฉีดยาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยป้อนให้ไก่ทุกตัว

เมื่ออายุไก่ได้ 6 วัน ทำ cloaca swab ลูกไก่ ในแต่ละกลุ่มทุกตัว เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อโดยใช้ก้านสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแห้งเข้าไปในทวารไก่ลึกประมาณ 2.5 ซม. หรือป้ายอุจจาระที่ติดอยู่ที่ cloaca ของไก่ แล้วนำไปใส่ในหลอดทดลองปิดฝาหลอดให้แน่น บรรจุในถังส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุขทันที หลังจากนั้นทำ cloacal swabs ทุกวันจนกระทั่งลูกไก่อายุได้ 8 วัน การเก็บตัวอย่างเมื่อลูกไก่อายุ 12 วัน ไก่ทุกตัวจะถูกทำสลบโดยวิธีฉีด 70% alcohol เข้าสมอง แล้วทำการผ่าซากเก็บลำไส้บริเวณไส้ตัน (caecum) เพื่อตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* โดยเก็บ caecum ทุกตัวนำกากอาหาร (caecal content) ที่อยู่ในไส้ตัน ของไก่แต่ละตัวมา 1 กรัม เพื่อทำการเจือจาง 10 เท่าด้วย 0.1% peptone water (PW) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นเจือจางลำดับขั้นครั้งละ 10 เท่าจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม จึงนำตัวอย่างที่ได้มาเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ mCCDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง ภายใต้ microaerophilic condition แล้วจึงนับจำนวนโคโลนีเพื่อแสดงผลจำนวนโคโลนีเป็นค่า \log_{10} CFU/g เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่พบในแต่ละกลุ่ม

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

3.4.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Campylobacter* เบื้องต้นของสารสกัดพืชสมุนไพร โดยวิธี agar well diffusion assay

การทดลองนี้ตัวอย่างเชื้อทดสอบทั้งหมด 10 ตัวอย่าง จำนวนสมุนไพรทั้งหมด 60 ชนิด แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้จากการบันทึกผลเป็นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (clear zone) ในการยับยั้งเชื้อแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mm \pm S.D.) และข้อมูลถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ด้วยวิธี one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.4.2 การศึกษาผลของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Campylobacter* ในขวดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Mueller-Hinton Broth

การทดลองนี้ตัวอย่างเชื้อที่ทดสอบ 1 ตัวอย่าง ข้อมูลที่ได้จากการบันทึกจำนวนเชื้อ *Campylobacter* ที่ตรวจนับได้ แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนี \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (\log_{10} CFU/g \pm S.D.) แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างกลุ่ม โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อ *Campylobacter* ที่ตรวจนับได้ของกลุ่มทดสอบกับกลุ่มควบคุม ด้วยวิธี Independent-Sample T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์มาจากการทดลองอย่างน้อย 2 ซ้ำ ตัวอย่างชุดควบคุมในการทดลองคือ ตัวอย่างที่ไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ)

3.4.3 การทดสอบฤทธิ์สมุนไพรต้านเชื้อ *Campylobacter* ในไก่ทดลอง

การทดลองนี้แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วยลูกไก่จำนวน 10 ตัว ข้อมูลที่ได้จากการบันทึกผลเป็น จำนวนเชื้อ *Campylobacter* ใน caecal content ของลูกไก่แต่ละกลุ่มที่ตรวจนับได้ หลังจากสิ้นสุดการทดลอง แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนี \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (\log_{10} CFU/g \pm S.D.) แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน ด้วยวิธี one-way ANOVA ถ้าผลการวิเคราะห์มีนัยสำคัญทางสถิติจึงเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วยวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%