

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. สัตว์ทดลอง

- 1.1 ลูกไก่ (*Gallus gallus domesticus*) อายุ 1-2 วัน จากโรงฟักไข่ภาควิชาสัตวปีก คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
- 1.2 ปลาสร้อย (*Henicorhynchus siamensis*) ที่มีเมตาเซอคาเรียของ *H. taichui* ที่นำมาจากเขื่อนแม่งัดสมบูรณ์ชล อ.แม่แตง จ. เชียงใหม่

2. พืชสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง

- 2.1 ฝักแก่ของราชพฤกษ์ จากหมู่ 5 ต. หอนงหาร อ. สันทราย จ. เชียงใหม่
- 2.2 ใบของแก้ว จากชุมชนดอนเจดีย์ ต. จองคำ อ. เมือง จ. แม่ฮ่องสอน
- 2.3 ผงปอกหาคาจากร้านขายสมุนไพร ตลาดวโรรส อ. เมือง จ. เชียงใหม่

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมสกัดจากพืชสมุนไพร

- 3.1 เครื่อง Freeze dry ยี่ห้อ Labconco รุ่น AT-BOON
- 3.2 เครื่องหมุนเหวี่ยงแยกตะกอน ยี่ห้อ Hettich รุ่น EBA-8S
- 3.3 กระดาษกรองเบอร์ 1 และ 5 ยี่ห้อ Whatman
- 3.4 หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร

4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการย่อยตัวอย่างปลา

- 4.1 เครื่องปั่น
- 4.2 มีด เขียง
- 4.3 ตะแกรงกรองแยกเมตาเซอคาเรีย ความถี่ของช่องตะแกรงขนาด 20 40 60 และ 80 μm
- 4.4 Shaker Water bath รุ่น Schutzart DIN 40050 ยี่ห้อ Memmert
- 4.5 1% pepsin

5. อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง

5.1 กรงไก่ และอุปกรณ์ใส่อาหารและน้ำ

5.2 หลอดไฟกลม

6. อุปกรณ์แยกพยาธิจากสัตว์ทดลอง

4.1 ชุดเครื่องมือผ่าตัด

4.2 ชุดแยกพยาธิ Bearman's apparatus

7. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อพยาธิ

7.1 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ Olympus Model SZ

7.2 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ Motic Model B3 professional series

7.3 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

7.4 ตู้ดูดไอพิษ (toxicap)

7.5 โกร่งบดตัวอย่าง

7.6 ตู้บ่ม (incubator) รุ่น Heraeus ยี่ห้อ Kendro

7.7 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียด 4ตำแหน่ง ยี่ห้อ Precisa รุ่น 240 A

7.8 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Cyberscan รุ่น 2000 pH

7.9 เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ บีกเกอร์ กระจกบดวง ขวดรูปชมพู่ กระจกบดวง ฯลฯ

7.10 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ ถุงมือ คีมคีบ ช้อนตักสาร กระจกยั้งสาร

8. สารเคมีและอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ทำวิจัยทางด้านจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

8.1 สารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัยทางด้านจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

8.1.1 2.5 % glutaraldehyde

8.1.2 1 % osmium tetroxide

8.1.3 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3)

8.1.4 acetone

8.1.5 เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% และ 100%

8.1.6 0.2 M sodium phosphate monobasic buffer

8.1.7 0.2 M sodium phosphate dibasic buffer

8.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัยทางด้านจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

- 8.2.1 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ Hund wetzlar Model SM33
- 8.2.2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด JEOL Model JSM 5410 LV
- 8.2.3 เครื่อง Critical Point Dryer, Polaron Model CPD7501
- 8.2.4 เครื่อง Fine Coater, JEOL Model JFC 1200
- 8.2.5 แท่นวางตัวอย่างชนิดโลหะ (stub)
- 8.2.6 คาร์บอนเทป

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมสารสกัดด้วยน้ำของพืชสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง ราชพฤกษ์

ใช้เนื้อในฝักที่แก่(สีน้ำตาลคล้ำมะขามเปียก) จำนวน 30 แว่น นำมาแช่ในน้ำกลั่นจำนวน 400 ml. จนส่วนของเนื้อในสีน้ำตาลหลุดจากเปลือกที่หุ้มเมล็ดจนหมด จากนั้นกรองกรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 5 และเบอร์ 1 เมื่อได้สารสกัดนำไปผ่านเครื่อง freeze drying จนได้สารสกัดเป็นผงแห้ง เพื่อใช้เตรียมเป็นสารละลายในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่มีต่อพยาธิ *H. taichui* ต่อไป

มะหาด

ใช้ส่วนของผงซึ่งได้จากการนำเอาแก่นต้นมะหาดมาต้มด้วยจนเกิดฟอง ช้อนเอาส่วนของฟองมาผึ่งให้แห้งแล้วนำไปบดจนได้ส่วนของผง ซึ่งเรียกว่าปวกหาด โดยชั่งปวกหาดจำนวน 10 กรัมละลายในน้ำกลั่นจำนวน 200 ml. ตั้งทิ้งไว้จนผงมะหาดละลายหมด จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และเบอร์ 5 นำสารสกัดนำไปผ่านเครื่อง freeze drying จนได้สารสกัดเป็นผงแห้ง เพื่อใช้เตรียมเป็นสารละลายในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่มีต่อพยาธิ *H. taichui* ต่อไป

แก้ว

นำส่วนใบแก้วจำนวน 40 ใบ นำมาปั่นรวมกับน้ำ 400 ml. ด้วยเครื่องปั่น จากนั้นนำสารละลายที่ได้ ไปใส่ในหลอดทดลองแล้วนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแยกตะกอน จากนั้นแยกเอาเฉพาะส่วนที่ละลายในน้ำออกจากตะกอน นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และเบอร์ 5 นำสารสกัดนำไปผ่านเครื่อง freeze drying จนได้สารสกัดเป็นผงแห้ง เพื่อใช้เตรียมเป็นสารละลายในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่มีต่อพยาธิ *H. taichui* ต่อไป

2. การเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดของพืชสมุนไพร

นำผงของสารสกัดที่ได้จากพืชทั้ง 3 ชนิด มาละลายใน Tyrod's solution 100 ml กำหนดให้เป็น Stock solution (ภาคผนวก ก) เพื่อทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ออกฤทธิ์ในการฆ่าพยาธิ

3. การเตรียมตัวอย่างระยะตัวเต็มวัยพยาธิใบไม้ *Haplorchis taichui*

ทำการแยกระยะเมตาเซอคาเรียของพยาธิใบไม้ *H. taichui* จากโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สองปลาสร้อย (*Henicorhynchus siamensis*) โดยนำส่วนของหัว ครีบและหางของปลาสร้อย นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นพร้อมกับ 1% pepsin จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง waterbath shaking ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองแยกเอาเฉพาะระยะเมตาเซอคาเรียด้วยตะแกรงที่มีความถี่ของช่องตะแกรง 40, 60 และ 80 ล้างด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% รอให้เมตาเซอคาเรียตกตะกอน ประมาณ 5 นาที ค่อยๆ เทน้ำทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนที่อยู่ด้านล่างภาชนะ เทน้ำที่มีตะกอนลอยอยู่ด้านบนทิ้งจนกว่าตัวอย่างน้ำจะใส จากนั้นนำมาแยกเมตาเซอคาเรียออกจากตะกอนโดยกลั่นจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แล้วนำไปป้อนให้กับลูกไก่ (*Gallus gallus domesticus*) (ภาพ 8) ที่ปลอดเชื้ออายุ 1-2 วัน หลังจากนั้น 5 วัน ทำการผ่าทำการผ่าเปิดลำไส้ของไก่แล้ว นำส่วนของลำไส้เล็กของไก่มาตัดตามยาว แล้วทำให้พยาธิหลุดออกจากลำไส้โดย Bearman's apparatus (ภาพ 9) ซึ่งตัวอย่างพยาธิจะตกลงสู่ด้านล่างของขวดที่ตกตะกอน จากนั้นนำตัวอย่างพยาธิที่อยู่ในตะกอนมาล้างด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% เพื่อกำจัดเศษอาหารที่ติดอยู่บนตัวพยาธิ เก็บตัวอย่างพยาธิ ตัวเต็มวัยไว้เพื่อเตรียมใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่มีต่อพยาธิใบไม้

4 การศึกษาหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดจากพืชสมุนไพรจำนวน 3 ชนิดที่ออกฤทธิ์ที่ดีที่สุดในการฆ่าพยาธิ *H. taichui*

ทำการแยกหนอนพยาธิจำนวน 30 ตัว เลี้ยงใน Petri dish ขนาดเล็ก ที่บรรจุ Tyrod's solution กำหนดให้เป็นกลุ่มควบคุม และในกลุ่มทดลองทำการเลี้ยงพยาธิใน Tyrod's solution (Kumchoo, 2005) ที่ผสมกับสารสกัดด้วยน้ำจากพืชทั้ง 3 ชนิดตามความเข้มข้นที่กำหนด จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบความมีชีวิตของพยาธิเมื่อเวลา 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง โดยกำหนดการให้คะแนนของการเคลื่อนไหวของพยาธิ (ดัดแปลงจาก Kumchoo, 2005)

ระดับคะแนน 3 พยาธิมีการเคลื่อนไหวมากกว่า 10 ครั้งภายในเวลา 10 วินาที

ระดับคะแนน 2 พยาธิมีการเคลื่อนไหว 6-10 ครั้งภายในเวลา 10 วินาที

ระดับคะแนน 1 พยาธิมีการเคลื่อนไหว 1-5 ครั้งภายในเวลา 10 วินาที

ระดับคะแนน 0 พยาธิไม่มีการเคลื่อนไหวภายในเวลา 10 วินาที

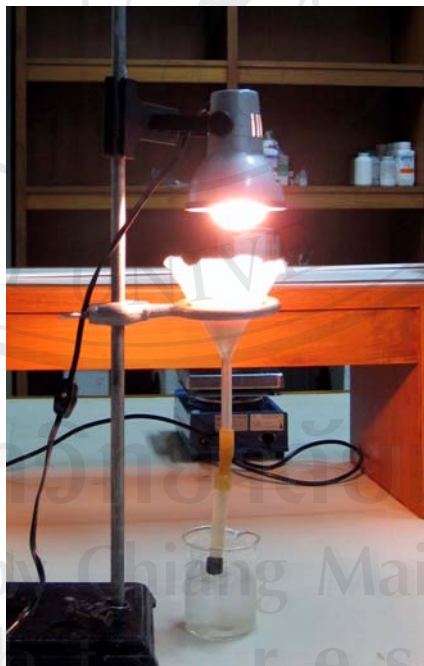
ทำการบันทึกผล

5. การศึกษาสภาพพื้นผิวของพยาธิใบไม้ *H. taichui* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

นำหนอนพยาธิที่สัมผัสกับสารสกัดของพืชทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ มาล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.3 โดยใช้ Pasteur pipette ดูด phosphate buffer เป่าบนตัวพยาธิเบาๆ เพื่อล้างเอาสิ่งปนเปื้อนที่เกาะอยู่ตามผนังลำตัวพยาธิออก ล้างหลาย ๆ ครั้งจน phosphate buffer ใสทำภายใต้กล้อง stereoscope จากนั้นคงด้วยสารละลาย 2.5% glutaraldehyde fixative เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยสารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 7.3 แล้ว post fixed ด้วย 1% osmium tetroxide เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการขจัดน้ำออกจากเซลล์ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่างๆ คือ 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% และ 100% ขึ้นตอนละ 30 นาที ตามด้วยอะซิโตน อีก 30 นาที จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Critical Point Dryer โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเป็นตัวดึงน้ำ (transitional fluid) จากนั้นนำพยาธิมาติดบนแท่นโลหะรองรับตัวอย่าง (stub) แล้วนำไปฉาบผิวตัวอย่างด้วยทอง ด้วยเครื่อง Fine coater sputting แล้วตัวอย่างพยาธิไปส่องดูพื้นผิวลำตัวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด JEOL model JSM-5410 LV เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสภาพผิวบริเวณ oral sucker, ventral sucker และบริเวณลำตัวด้านต่างๆ ทั้งด้าน dorsal และ ventral โดยใช้กำลังขยายต่างๆ



ภาพ 8 ลูกไก่ (*Gallus gallus domesticus*) อายุ 1-2 วัน



ภาพ 9 Bearman's apparatus