บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

การศึกษาในห้องปฏิบัติการเลี้ยงเซลล์สัตว์

1. สัตว์ทดลอง

   ไข่ไก่ (พันธุ์โรดไอร์แลนด์แดง) ที่ผ่านการฟักมาแล้ว 10-13 วัน จากฟาร์มสัตว์ปีก ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 2 ฟอง

2. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการผ่าตัดตัวอ่อนไก่

   2.1 Phosphate buffer solution (PBS) pH 7.4

   2.2 ตะเกียงแอลกอฮอล์

   2.3 เครื่องมือผ่าตัด

   2.4 Pasteur pipette พร้อมจุกดูดทำด้วยยาง

   2.5 Volumetric pipette ขนาด 5 และ 10 มล.

   2.6 Petri dish

   2.7 ผ้าก๊อซ

   2.8 เอธานอล (ethanol) 70 และ 95%

   2.9 ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (laminar flow)

3. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้เลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนไก่ เตรียมเชื้อบิด

   3.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ HAM F-12 จากบริษัท Gibco (Cat. No. 11765-054)

   3.2 Fetal bovine serum (FBS) จากบริษัท Gibco (Cat. No. 26400-036)

   3.3 Phosphate buffer solution (PBS) pH 7.4

   3.4 โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate)

   3.5 Trypsin-EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid) 0.25% จากบริษัท Gibco (Cat. No. 25300-054)

   3.6 Hank's balanced salt solution (HBSS)

   3.7 Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$)

   3.8 น้ำเกลืออิ่มตัว

   3.9 น้ำดีไก่

ลิขสิทธิ์เกี่ยวกับมหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.10 ขวดเลี้ยงเซลล์ (culture flask) ขนาด 25 และ 75 ตร.ซม.

3.11 จานเลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อชนิดใช้ครั้งเดียว (disposable culture plate) ขนาด 35 มม.

3.12 Cover slip ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 มม.

3.13 ถาดพลาสติกที่ปลอดเชื้อสำหรับวาง culture plate

3.14 Pasteur pipette พร้อมจุกดูดทำด้วยยาง

3.15 Volumetric pipette ขนาด 5 และ 10 มล.

3.16 Pipette aid

3.17 Hemocytometer

3.18 Eppendolf tube

3.19 Centrifuge tube ขนาด 15 มล.

3.20 Glass beads ขนาด 1 มม.

3.21 Incubator

3.22 CO_2 – incubator (37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2)

3.23 ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (laminar flow)

3.24 กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์วัตถุอยู่ด้านล่าง

3.25 กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ

3.26 เครื่องนับเซลล์ด้วยมือ

4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการย้อมสี

4.1 สี Trypan blue

4.2 สี Hoechst dye (HO; No. 33342) จากบริษัท Sigma (Cat. No. B2261)

- stock solution ; ละลายผง HO ลงใน PBS (1 มก./มล.)
- working concentration ; 50 ไมโครกรัม/มล.

4.3 สี Propidium iodide (PI) จากบริษัท Sigma (Cat. No. P4170)

- stock solution ; ละลายผง PI ลงใน PBS (1 มก./มล.)
- working concentration ; 50 ไมโครกรัม/มล.

4.4 แผ่นสไลด์ และ cover slip

4.5 ปากคีบ

4.6 กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์วัตถุอยู่ด้านล่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.7 กล้อง fluorescene microscope Olympus Digital Model BX 51 มีชุดประกอบแผ่นกรองแสงที่ยอมให้แสงกระตุ้น (excitation wavelength) ที่ความยาวคลื่นระหว่าง 330-385 นาโนเมตร (รหัสที่ตัวกล้องคือ WU)

ก ข

ภาพที่ 8 ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (ก) อาหาร และขวดเลี้ยงเซลล์ (ข)

การศึกษาในห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพร

1. เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดไฟฟ้า ขนาดชั่งได้ 160 ก. มีความละเอียดอ่านได้ 0.001 ก. ใช้สำหรับชั่งตัวอย่างพืชสมุนไพร เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี
2. ตู้อบสำหรับอบตัวอย่างสมุนไพร
3. เครื่องบดสมุนไพร ขนาดบดละเอียด 1 มม.

การศึกษาในฟาร์มทดลอง

1. พันธุ์สัตว์ ใช้ลูกไก่พันธุ์อาร์เบอร์เอเคอร์ อายุ 1 สัปดาห์ โดยสัปดาห์แรกเลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปรตีน 21%

2. คอกทดลอง เป็นโรงเรือนแบบเปิด แบ่งเป็นคอกย่อยจำนวน 24 คอก มีพื้นที่คอกละ 3.3 ตร.ม. คอกทดลองทั้งหมดอยู่ภายในโรงเรือนเดียวกัน

3. กรงทดลอง ขนาด 0.25 ตร.ม.

4. ภาชนะใส่น้ำและอาหาร ใช้ภาชนะใส่น้ำขนาด 8 ลิตร ส่วนภาชนะใส่อาหารใช้แบบแขวน จำนวนคอกละ 1 และ 2 ใบ ตามลำดับ

5. เครื่องผสมอาหารแบบเกลียวนอน ขนาดผสมได้ครั้งละ 60 กก. เมื่อผสมเสร็จในแต่ละครั้งจะกวาดอาหารที่ค้างในเครื่องผสมออกจนหมด ส่วนอาหารทดลองที่ใช้ยากันบิดจะผสมเป็นลำดับสุดท้ายทุกครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

6. เครื่องชั่งน้ำหนัก

6.1 ชนิดไฮโดรลิก ขนาดชั่งได้ 150 กก. มีความละเอียดอ่านได้ 50 ก. ใช้สำหรับชั่งน้ำหนักอาหารและน้ำหนักไก่ทดลอง

6.2 ชนิดไฟฟ้า ขนาดชั่งได้ 160 ก. มีความละเอียด 0.001 ก. สำหรับชั่งอวัยวะภายในของไก่เนื้อ

6.3 ชนิดสปริง ขนาดชั่งได้ 3 กก. มีความละเอียด 10 ก. ซึ่งได้ดัดแปลงตรงจานรองรับน้ำหนักเป็นถาดรูปกรวย สำหรับให้ไก่สอดหัวลงไปได้ ใช้ชั่งน้ำหนักไก่เป็นรายตัว

6.4 ชนิดไฟฟ้าขนาดชั่งได้ 3,110 ก. มีความละเอียดอ่านได้ 0.01 ก. สำหรับชั่งวัตถุดิบชนิดที่ใช้น้อยในสูตรอาหาร เช่น สารผสมล่วงหน้า (premix) ซึ่งเป็นพวกไวตามิน แร่ธาตุ และสารเสริมบางชนิด เกลือ เปลือกหอย และกรดอะมิโน ชนิดดีแอล-เมทไธโอนีน และแอล-ไลซีน เป็นต้น

7. หลอดไฟฟ้าขนาด 100 วัตต์ สำหรับให้ความอบอุ่นแก่ลูกไก่ในช่วงอายุ 1-3 สัปดาห์

8. สมุนไพรกระชาย (ส่วนเหง้า) ไพล (ส่วนเหง้า) และใบฝรั่ง (ส่วนใบติดก้าน) เตรียมจากพืชสมุนไพรสด นำมาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง และอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หรือจนกว่าแห้งสนิท บดเป็นผง และเก็บในภาชนะที่ป้องกันความชื้นได้

วิธีการทดลอง

แบ่งการวิจัยออกเป็น 2 ส่วน คือ

1) การศึกษาในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การเตรียมเชื้อบิด การเตรียมเซลล์ตัวอ่อนไก่ (*in vitro*) การเตรียมสารสกัดสมุนไพร และการทดสอบสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อบิดและเซลล์ตัวอ่อนไก่ รวมทั้งการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพร

2) การศึกษาในฟาร์มทดลอง โดยนำสมุนไพรไปผสมอาหารเลี้ยงไก่เนื้อ แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ

2.1) การทดสอบผลของสมุนไพรในอาหารไก่เนื้อเมื่อให้ไก่ได้รับเชื้อบิดโดยตรง

2.2) การทดสอบผลของสมุนไพรในอาหารไก่เนื้อเมื่อเลี้ยงในสภาพปกติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

1. การเตรียมเชื้อบิด

1.1 เตรียมโอโอซีสต์

1.1.1 เชื้อบิดไก่ชนิด *E. tenella* ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้รับความเอื้อเฟื้อจากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำเชื้อบิดไก่ดังกล่าวป้อนทางปากให้แก่ไก่อายุ 3-4 สัปดาห์ จำนวน 10^4-10^5 โอโอซีสต์/ตัว ก่อนป้อนเชื้อต้องให้อาหารไก่ชนิดที่ไม่มียากันบิดก่อน 24 - 48 ชั่วโมง และหลังจากนั้นให้อาหารไม่มียากันบิดตลอดการทดลอง

1.1.2 การเก็บเชื้อบิด เก็บในวันที่ 6-7 หลังการป้อนเชื้อ ทำให้ไก่ตายด้วยการตัดเส้นเลือดดำที่คอ จากนั้นตัดส่วนไส้ตัน (cecum) จากตัวไก่ออกใส่ใน Petri dish เติมน้ำลงไปเล็กน้อย ขูดผิวลำไส้ชั้น mucosa ออก นำตัวอย่างที่ขูดได้ใส่รวมกัน นำไปปั่นด้วย blender นาน 3-5 นาที เพื่อให้โอโอซีสต์แยกออกจากเนื้อเยื่อ จากนั้นกรองด้วยตะแกรงตาถี่ลงในแก้วทรงสูง เติมน้ำให้เต็มแก้วตั้งทิ้งไว้จนตกตะกอน เทน้ำส่วนบนทิ้งไปเหลือไว้แต่ตะกอนส่วนล่าง ทำซ้ำจนน้ำส่วนบนใส (sedimentation technique)

1.1.3 เทตะกอนใส่หลอดปั่น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบ/นาที นาน 5-7 นาที เทน้ำส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน

1.1.4 เติม potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) 2.5% ผสมกับตะกอนที่ได้ เขย่าให้เข้ากัน เทลงใน Petri dish ให้สารละลายมีความสูงจากก้น Petri dish 1-2 มล. เปิดฝาทิ้งไว้ ประมาณ 2-3 วัน หรือจนกว่า 80% ของโอโอซีสต์เกิดการ sporulation จากนั้นเก็บใส่ขวดไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

1.2 เตรียมสปอโรซอยท์ เพื่อการทดสอบทุกหัวข้อ

1.2.1 ล้างโอโอซีสต์ระยะติดต่อ (sporulated oocysts) ที่อยู่ในสารละลาย 2.5% potassium dichromate ด้วย PBS โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบ/นาที นาน 10 นาที

1.2.2 ใส่สารละลายหรือโอโอซีสต์ (3 มล.) ที่ได้จากข้อ 1.2.1 ลงใน centrifuge tube ที่บรรจุ glass beads ขนาด 1 มม. ประมาณ 5 มล. นำไป vortex จนกระทั่ง oocysts แตกออก 80% (8-10 นาที)

1.2.3 ล้าง glass beads ด้วย HBSS นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบ/นาที นาน 10 นาที จะได้สปอโรซีสต์

1.2.4 กระตุ้นให้สปอโรซอยท์ออกจากสปอโรซีสต์ด้วยสารละลาย excystation ที่มีความเข้มข้นของ Trypsin-EDTA 0.25% และน้ำดีไก่ ตามอุณหภูมิที่ได้จากการทดสอบดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- ทดสอบภายใต้อุณหภูมิ 41 และ 47 องศาเซลเซียส ด้วยสารละลาย Trypsin-EDTA 0.25% และน้ำดีไก่ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 15 และ 30% ตามลำดับ นาน 2 ชั่วโมง

1.2.5 ล้างสารละลาย excystation ด้วย HAM F-12

1.2.6 แยกสปอโรซอยท์ โดยการนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบ/นาที นาน 8 นาที

2. การเตรียมเซลล์ตัวอ่อนไก่

2.1 การทำ primary cell culture

2.1.1 นำไข่ไก่อายุฟัก 10-13 วัน เข้าตู้ laminar flow โดยใช้เทคนิคการปลอดเชื้อ (aseptic technique) เช็ดเปลือกไข่ด้วยผ้าก๊อซที่ฉีดพ่นด้วยเอธานอล 70% จนชุ่ม

2.1.2 กระเทาะเปลือกไข่ด้านป้านให้เป็นช่อง ใช้ปากคีบคีบเฉพาะตัวอ่อนไก่ (embryo) ออกมาใส่ใน Petri dish ที่มีสารละลาย PBS pH 7.4 ตัดเอาถุงไข่แดงและเนื้อเยื่อที่ไม่ต้องการออก

2.1.3 ตัดส่วนหัว และระยางค์ออกจากส่วนลำตัว เลาะขนที่คลุมลำตัวออกให้หมด ตัดเฉพาะเนื้อเยื่อลำตัว ใส่ Petri dish อันใหม่ ที่มีสารละลาย PBS pH 7.4 อยู่พอประมาณ

2.1.4 ใช้มีดผ่าตัดสับชิ้นเนื้อให้ละเอียด และเติม PBS ลงไปในปริมาณเล็กน้อย

2.1.5 ใช้ Pasteur pipette ดูดชิ้นเนื้อที่ผสมอยู่กับ PBS ลงไปในขวดเลี้ยงเซลล์ และพยายามดูด PBS ออกให้มากที่สุด

2.1.6 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAM F-12 + 20% FBS ลงไปเล็กน้อย เพื่อให้ชิ้นเนื้อเกาะกับพื้นขวดเลี้ยงเซลล์ แล้วนำไปเลี้ยงในตู้อบ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณ CO_2 5% คลายฝาขวดเลี้ยงเซลล์เล็กน้อย เพื่อให้ CO_2 สามารถเข้าไปในขวดเลี้ยงเซลล์ได้

2.1.7 เลี้ยงเซลล์ต่อไปอีกประมาณ 1 สัปดาห์ จึงทำการเพาะเลี้ยงแยก (subculture) โดยนับเป็น passage ที่ 1 และนำมาใช้ในการทดลองเมื่อ passage ที่ 3*

2.2 การเตรียมเซลล์เพื่อใช้ในการทดสอบ

หลังจากเซลล์เจริญจนเต็มขวดเลี้ยงเซลล์ จึง trypsinization เซลล์ออกจากขวด โดยมีขั้นตอนการ trypsinization โดยสังเขป ดังนี้

---

*เซลล์ passage ที่ 1 และ 3 คือ เซลล์ที่ผ่านการแยก (trypsinization) มาแล้ว 1 และ 3 ครั้ง ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.1 ใช้ Pasteur pipette ดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกให้หมด แล้วล้างด้วย PBS pH 7.4 ประมาณ 2 มล.

2.2.2 เติม Trypsin-EDTA (0.05%) 1 มล. ลงไป จากนั้นทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 1 นาที จึงดูดออก แล้วนำไปไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-10 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ สังเกตการหลุดตัวของเซลล์ เมื่อเซลล์หลุดจากพื้นขวดแล้วจึงสิ้นสุดกระบวนการ trypsinization

2.2.3 นำเซลล์ที่ได้มาตรวจนับโดยใช้ hemocytometer แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นของจำนวนเซลล์ตามต้องการ จากนั้นแบ่งใส่ลงในจานเลี้ยงเซลล์ โดยใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ประมาณ 1 มล. วางลงบนถาดพลาสติกที่ปลอดเชื้อ เพื่อนำไปเลี้ยงต่อในตู้อบ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณ CO_2 5% ทิ้งไว้ 1 วัน จึงนำมาทดลอง

3. การเตรียมสารสกัดหยาบสมุนไพร

3.1 นำพืชสมุนไพรที่เตรียมไว้ (เตรียมจากพืชสมุนไพรสด) ได้แก่ กระชาย (ส่วนเหง้า) ไพล (ส่วนเหง้า) และใบฝรั่ง (ใบติดก้าน) ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ นำไปผึ่งแดดให้พอแห้ง

3.2 หั่นสมุนไพรแต่ละชนิดให้เป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท แล้วนำไปบดให้ละเอียด

3.3 นำพืชสมุนไพรแต่ละชนิดที่บดได้ 100 ก. แช่ในน้ำ 250 มล. เป็นเวลา 1 วัน แล้วคั้นน้ำโดยกรองผ่านผ้ากรอง และกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

3.4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยให้แห้งโดยวิธี distillation in vacuum ด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้ส่วนสกัดหยาบ (crude extract)

3.5 การทดสอบผลต่อเซลล์ตัวอ่อนไก่และเชื้อบิด จะทำการละลายสารสกัดหยาบด้วยน้ำกลั่น มีหน่วยที่ใช้ทดสอบเป็น ก./มล.

4. การทดสอบสารสกัดหยาบต่อเซลล์ตัวอ่อนไก่และเชื้อบิด

การทดสอบนี้เพื่อศึกษาแนวโน้มในการฆ่าเชื้อและประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของสมุนไพรที่มีต่อเชื้อบิดโดยตรง โดยหาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่มีผลต่อจำนวนสปอโรซอยท์ร้อยละห้าสิบ (effective concentration 50, EC_{50}) ในสภาพ *in vitro* และในขณะเดียวกันก็หาค่า EC_{50} ของสารสกัดหยาบต่อเซลล์ตัวอ่อนไก่ด้วย จากนั้นนำค่าที่ได้มาประเมินผลโดยใช้ค่าดรรชนีในการรักษาหรือ Therapeutic index หรือ TI (Klaassen, 1991)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เริ่มต้นจากการสุ่มหาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด และแอมโพรเลี่ยม (สารต้านบิด) โดยเริ่มจากความเข้มข้นที่มีผลทำให้เซลล์ตัวอ่อนไก่ตายในจำนวนที่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมปกติ (เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนไก่) และกลุ่มควบคุมเติมน้ำกลั่น (2 ความเข้มข้น) จากนั้นค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นจนทำให้เซลล์ตัวอ่อนไก่ตายประมาณ 50% (1 ความเข้มข้น) และเพิ่มความเข้มข้นให้มากขึ้นจนทำให้เซลล์ตายทั้งหมดอีก 2 ระดับความเข้มข้น (การเติมสารทดสอบในจานเลี้ยงเซลล์นั้นจะใช้ปริมาตรเท่ากัน คือ 60 ไมโครลิตร/มล.) ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากสมุนไพร (กระชาย ไพล และใบฝรั่ง) และแอมโพรเลี่ยม ชนิดละ 5 ระดับที่ได้นี้จะใช้ทดสอบกับเชื้อบิด และเซลล์ตัวอ่อนไก่ต่อไป

4.1 การทดสอบกับเซลล์ตัวอ่อนไก่

นำเซลล์ตัวอ่อนไก่ที่เตรียมไว้เพื่อทำการทดสอบ แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 4 กลุ่ม ตามชนิดสารสกัดที่ใช้ทดสอบ (กระชาย ไพล ใบฝรั่ง และแอมโพรเลี่ยม) แต่ละกลุ่มทำ 3 ซ้ำ โดยในแต่ละจานเลี้ยงเซลล์ใช้เซลล์ประมาณ 2-3 x 10^5 เซลล์/มล. เติมสารสกัดหยาบของสมุนไพรแต่ละชนิด และแอมโพรเลี่ยม ชนิดละ 5 ความเข้มข้น ที่หาได้ลงไป ใช้เวลาในการทดสอบนาน 3 ชั่วโมง

4.2 การทดสอบกับเชื้อบิด

ทำในพืชสมุนไพรทั้งสามชนิด และแอมโพรเลี่ยมจำนวน 3 ซ้ำ มีรายละเอียดการทดสอบดังนี้ แยกเชื้อบิดขั้นสปอโรซอยท์ใส่ใน Petri dish ขนาด 35 มม. จำนวน 6 จาน โดยให้มีความหนาแน่นของเชื้อโดยประมาณ 1,000-1,500 สปอโรซอยท์/มล./จาน ในแต่ละจานใส่สารสกัดหยาบ 5 ความเข้มข้นตามที่หาได้ ที่เหลือเป็นกลุ่มควบคุม นำจานเลี้ยงไปบ่มเพาะในตู้อบที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วล้างสารละลายออกด้วย PBS จากนั้นย้อมด้วยสี Hoechst dye (HO) และ Propidium iodide (PI) นำมาตรวจนับภายใต้กล้อง fluorescene microscope ที่ความยาวคลื่นระหว่าง 330-385 นาโนเมตร โดยนับจำนวนสปอโรซอยท์ที่ติดสีน้ำเงินของ HO และสีแดงของ PI จากนั้นนำมาคำนวณหาค่าร้อยละของจำนวนสปอโรซอยท์ที่มีชีวิต

4.3 การตรวจสอบ

4.3.1 ร้อยละของความมีชีวิตของเซลล์ (% viability) โดยวิธี viability assay by dye exclusion สีที่ใช้คือ trypan blue (Freshney, 2000) ซึ่งมีวิธีการย้อมสีดังนี้

- ผสมเซลล์ที่จะตรวจสอบกับสี trypan blue ทิ้งไว้ไม่เกิน 5 นาที
- นับจำนวนเซลล์ติดสีน้ำเงิน (ตาย) และเซลล์ไม่ติดสี (มีชีวิต) เพื่อคำนวณค่าร้อยละของความมีชีวิตของเซลล์ตามสมการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{ร้อยละของความมีชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ไม่ติดสี trypan blue)}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

4.3.2 ร้อยละของความมีชีวิตของสปอโรซอยท์ โดยการย้อมสี Hoechst dye (HO) และ Propidium iodide (PI) มีวิธีการย้อมสีดังนี้

- ผสมสี HO 25 ไมโครลิตร กับสารละลายที่มีสปอโรซอยท์ 0.5 มล. ใน Eppendolf tube
- นำไป incubate ในที่มืด 15 นาที
- หยุดปฏิกิริยาของ HO โดยการแช่ในน้ำแข็งนาน 3 นาที
- ล้างสีด้วย PBS
- ผสมสี PI 20 ไมโครลิตร กับสารละลายดังกล่าว 0.5 มล. ใน Eppendolf tube
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที
- ล้างสีด้วย PBS
- หยดสารละลายลงบนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยแผ่น cover slip
- นำไปส่องดูด้วยกล้อง fluorescene microscope โดยใช้แสงช่วง WU ความยาวคลื่น 330-385 นาโนเมตร

4.3.3 การหาค่า EC_{50}

คำนวณได้จากอัตราการรอดชีวิตและตายของเซลล์ หรือสปอโรซอยท์นำไปวิเคราะห์หาค่า EC_{50} ด้วยโปรแกรม PriProbit ver. 1.63

4.4 การคำนวณหาค่าดัชนีการบำบัดโรค (TI)

คำนวณจากค่า EC_{50} ของเซลล์ หารด้วยค่า EC_{50} ของเชื้อบิด โดยค่าดัชนีการบำบัดโรคนี้ยิ่งมีค่ามากจะแสดงถึงความมีศักยภาพในการใช้เป็นยาได้ดี

5. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพร

นำพืชสมุนไพรสดได้แก่ กระชาย (ส่วนเหง้า) ไพล (ส่วนเหง้า) และใบฝรั่ง ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ นำไปผึ่งแดดให้พอแห้ง หั่นสมุนไพรแต่ละชนิดให้เป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท แล้วนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มม. เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีอย่างหยาบ (Proximate analysis; A.O.A.C., 1995)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาในฟาร์มทดลอง แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1: ผลของสมุนไพรบางชนิดต่อการเกิดโรคบิดไส้ตันในไก่เนื้อ

ใช้ลูกไก่เนื้อสายพันธุ์อาร์เบอร์เอเคอร์ อายุ 1 วัน แบบคละเพศ จำนวน 96 ตัว ชั่งน้ำหนักเริ่มต้นเพื่อแบ่งเป็นกลุ่มๆ ละ 12 ตัว จำนวน 8 กลุ่ม สุ่มแยกลูกไก่เลี้ยงบนกรงแบบยกพื้น ให้กินอาหารชนิดเดียวกัน และให้น้ำแบบเต็มที่จนอายุได้ 21 วันทำการป้อนเชื้อบิด *E. tenella* ระยะติดต่อให้กับไก่ทุกตัว จำนวนตัวละ 10^6 โอโอซีสต์ โดยป้อนเชื้อผ่านท่อพลาสติกเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 1 มม. ที่ต่อกับ syringe ขนาด 3 มล. ซึ่งสอดเข้าไปตรงบริเวณคอจนถึงกระเพาะพัก (crop) ของไก่ พร้อมกับให้อาหารทดลองแบบผงผสมเองเสริมด้วยสมุนไพรแต่ละชนิด (ไพล กระชาย และใบฝรั่ง) ในระดับที่แตกต่างกัน คือ 6 กลุ่มแรก ให้ได้รับอาหารที่เสริมด้วยกระชาย หรือไพล หรือใบฝรั่งตามระดับที่คำนวณได้จากค่า EC ในห้องปฏิบัติการ ชนิดละ 2 ระดับ ส่วนที่เหลืออีก 2 กลุ่ม เป็นกลุ่มที่ไม่เสริม (ควบคุมลบ) และเสริมยาต้านบิดชนิดแอมโพรเลี่ยม (ควบคุมบวก) ตามระดับและระยะเวลาที่แนะนำของผู้ผลิต เลี้ยงจนกระทั่งไก่อายุครบ 27 วัน (หลังการป้อนเชื้อ 6 วัน) ทำการอดอาหารไก่จำนวนกลุ่มละ 8 ตัว เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปฆ่าชำแหละเพื่อดูรอยโรคที่ไส้ตันของไก่แต่ละตัว ที่เหลืออีก 4 ตัว/กลุ่ม เลี้ยงจนอายุได้ 33 วัน (หลังการป้อนเชื้อ 12 วัน)จึงฆ่าชำแหละเพื่อดูรอยโรคที่ไส้ตันอีกครั้ง

การเก็บข้อมูล (อายุไก่ 21-33 วัน) เจาะเลือดดำที่ใต้ปีกจากไก่จำนวน 2 ตัว/ซ้ำ เพื่อหาค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit หรือ pack cell voloum; PCV) บันทึกคะแนนรอยโรค (lesion score) ที่พบจากการผ่าซากเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของลำไส้ส่วนไส้ตัน ตามวิธีของ Johnson and Reid (1970) ซึ่งมีค่าคะแนนรอยโรค 4 ระดับ คือ

ระดับ +1 คือ พบจุดเลือดออกสีแดงหรือสีม่วงที่บริเวณไส้ตันเล็กน้อย เมื่อเปิดผ่าดูจะพบจุดเลือดออกเล็กน้อยเช่นกัน

ระดับ +2 คือ พบจุดเลือดออกที่ผิวของไส้ตันได้มากกว่าระดับคะแนน +1 เมื่อผ่าเปิดจะพบการตกเลือดภายในไส้ตัน

ระดับ +3 คือ พบการตกเลือดจำนวนมากภายในไส้ตันและพบก้อนเลือดที่แข็งตัวบริเวณส่วนปลายสุดของไส้ตัน

ระดับ +4 คือ เมื่อมองดูภายนอกจะเห็นไส้ตันมีการคั่งของเลือด ที่ส่วนปลายลำไส้มีขนาดสั้นกว่าปกติ เมื่อผ่าเปิดจะพบการตกเลือดอย่างรุนแรง ที่ผนังของไส้ตันหนาตัวมากกว่าปกติ

รายละเอียดของรูปภาพการให้คะแนนแต่ละระดับ ดูได้ในภาคผนวก ก (ข้อ 4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2: ผลของสมุนไพรบางชนิดต่อสมรรถภาพการผลิต และประสิทธิภาพการควบคุมโรคบิดในไก่เนื้อที่เลี้ยงแบบปล่อยพื้น

ใช้ไก่เนื้อสายพันธุ์อาร์เบอร์เอเคอร์ อายุ 1 วัน แบบคละเพศ จำนวน 720 ตัว ในช่วงอายุ 7 วันแรกนำมาเลี้ยงและกกรวมกัน จากนั้นแบ่งไก่โดยสุ่มออกเป็น 8 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ซ้ำ (30 ตัว/ซ้ำ) แต่ละซ้ำเลี้ยงในคอกแบบปล่อยพื้นขนาด 3.3 ตร.ม. ให้ไก่ทุกตัวได้กินน้ำและอาหารอย่างเต็มที่ (*ad libitium*) อาหารทดลองเป็นแบบผงผสมเองเสริมด้วยสมุนไพรในระดับที่แตกต่างกัน คือ 6 กลุ่มแรก ให้ได้รับอาหารที่เสริมด้วยกระชาย หรือไพล หรือใบฝรั่งที่ระดับ 1 และ 3% ของสูตรอาหาร ส่วนที่เหลืออีก 2 กลุ่ม เป็นกลุ่มที่ไม่เสริม (ควบคุมลบ) และเสริมยาต้านบิดชนิดแอมโพรเลี่ยม (ควบคุมบวก) ตามระดับและระยะเวลาที่แนะนำของผู้ผลิต

อาหารทดลองของไก่ทุกกลุ่มแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ช่วงไก่อายุ 2-3, 4-6 และ 7 สัปดาห์ โดยในแต่ละระยะมีโปรตีนระดับ 21, 19 และ 17% เท่ากัน และมี ME เท่ากับ 3.15 และ 3.20 กิโลแคลอรี่/ก. ในการทดลองที่ 1 และ 2 ตามลำดับ เหมือนกันทุกระยะ ส่วนผสมและคุณค่าทางโภชนาการของอาหารไก่เนื้อทั้ง 2 การทดลอง แสดงไว้ในตารางที่ 5

การบันทึกข้อมูลด้านสมรรถภาพการผลิต (น้ำหนักตัวเพิ่ม และปริมาณอาหารที่กิน) บันทึกทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนในอาหารและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (อายุไก่ 3, 6 และ 7 สัปดาห์) เมื่อไก่อายุ 6 สัปดาห์ ทำการสุ่มไก่แบบแยกเพศจำนวนเพศละ 2 ตัว/ซ้ำ เพื่อฆ่าแบบตัดเส้นเลือดดำที่คอ นำส่วนลำไส้มาตรวจสอบวิการเพื่อบันทึกค่าคะแนนรอยโรค นอกจากนี้ในวันสุดท้ายของการทดลอง (อายุไก่ 49 วัน) สุ่มไก่แบบแยกเพศจำนวนเพศละ 2 ตัว/ซ้ำ เพื่อฆ่าแบบตัดเส้นเลือดดำที่คอ บันทึกคุณภาพซาก (เปอร์เซ็นต์ซาก น้ำหนักตับ น้ำหนักกึ๋น ไขมันในช่องท้อง ปริมาณเนื้ออก และเนื้อน่อง) รวมทั้งสุ่มเจาะเลือดดำที่ใต้ปีกจากไก่จำนวน 3 ตัว/ซ้ำ เพื่อหาค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอันแน่นและบันทึกค่าคะแนนรอยโรคอีกครั้ง โดยแบ่งส่วนของลำไส้เพื่อให้คะแนนรอยโรคเป็น 4 ส่วน ดังนี้

1) ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) เป็นตำแหน่งรอยโรคที่เกิดจากเชื้อ *E. acervulina*
2) ลำไส้เล็กส่วนกลาง เริ่มตั้งแต่ส่วนท้ายของ duodenum จนถึงถุงไข่แดง (yolk sac) เป็นตำแหน่งรอยโรคที่เกิดจากเชื้อ *E. maxima และ E. necatrix* พิจารณาความแตกต่างของเชื้อจากพยาธิสภาพที่พบ (ตารางที่ 2)
3) ลำไส้เล็กส่วนปลาย เป็นตำแหน่งรอยโรคที่เกิดจากเชื้อ *E. brunetti*
4) ไส้ตัน เป็นตำแหน่งรอยโรคที่เกิดจากเชื้อ *E. tenella*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ผล

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการ (การเปรียบเทียบค่าจากการนับจำนวนเซลล์หรือนับจำนวนสปอโรซอยท์) และข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในฟาร์มทดลอง นำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (Steel and Torrie, 1984) ส่วนข้อมูลด้านคุณภาพซาก วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยแผน Randomized completely block design โดยใช้เพศเป็น block สำหรับการหาลำดับความแตกต่างระหว่างกลุ่มใช้วิธี Duncan's new multiple range test (Duncan, 1955) การวิเคราะห์ผลทางสถิติดังกล่าวข้างต้นใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS) ตามที่บ่งไว้โดย มนต์ชัย (2538)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 5 ส่วนผสมและคุณค่าทางโภชนะของอาหารทดลองไก่เนื้อ

อายุไก่ (สัปดาห์)	2-3		4-6		7
การทดลองที่	1	2	1	2	
Ingredients					
Corn	49.30	47.94	54.53	55.39	60.96
Rice bran	10.00	10.00	12.00	10.00	12.00
Soybean meal (44% CP)	27.25	27.53	22.40	22.02	18.50
Fish meal (57% CP)	6.00	6.00	5.00	6.00	3.50
Rice bran oil	4.72	5.74	3.62	4.30	2.66
Dicalcium phosphate (18% P)	0.79	0.79	0.70	0.56	0.69
Oyster shell	1.09	1.11	1.05	1.02	1.02
DL-Methionine	0.17	0.16	0.08	0.06	0.05
Lysine	0.18	0.17	0.12	0.10	0.12
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Vitamin and mineral premix[1/]	0.25	0.30	0.25	0.30	0.25
Total	100.00	100	100.00	100.00	100.00
Calculated chemical composition **(% air dry basis)**					
CP	21.00	21.00	19.00	19.00	17.00
ME (kcal/g)	3.15	3.20	3.15	3.20	3.15
CF	5.17	5.14	5.17	4.96	5.05
EE	8.44	9.41	7.66	8.18	6.79
Ca	1.00	1.00	0.90	0.90	0.80
P	0.45	0.45	0.40	0.40	0.35
Lysine	1.20	1.20	1.00	1.00	0.85
Methionine	0.50	0.50	0.38	0.38	0.32
Methionine + Cystine	0.78	0.78	0.64	0.64	0.56
Threonine	0.81	0.81	0.72	0.73	0.64
Tryptophan	0.23	0.23	0.20	0.20	0.17

[1/] BASF product บริษัท บีเอเอสเอฟ (ประเทศไทย) จำกัด 622 ห้อง 1-6 อาคารเอ็มโพเรี่ยมทาวเวอร์ ชั้น 23 ถ. สุขุมวิท 24 คลองตัน คลองเตย กรุงเทพฯ.

Exp. 1 : ผลของสมุนไพรบางชนิดต่อการเกิดโรคบิดไส้ตันในไก่เนื้อ

Exp. 2 : ผลของสมุนไพรบางชนิด ต่อสมรรถภาพการผลิต และประสิทธิภาพการควบคุมโรคบิดในไก่เนื้อที่เลี้ยงแบบปล่อยพื้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved