# การประเมินความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ พลาสโมเดียม ฟาลซิพาลัม สายพันธุ์ TM267 ของสารสกัดหยาบจากมะรุม

# Evaluation of Anti-Malarial Activity of *Moringa oleifera* Lam. Crude Extract Against *Plasmodium falciparum* TM267

ณัฐริณี หอระตะ*, ทวีพร พันธุ์พาณิชย์, อิสสริยา เอี่ยมสุวรรณ, สุวรรณา เสมศรี, วชิรญาย์ อธิมัง, ศราวุธ สุทธิรัตน์, วศิน เอม เอาธาน, นัฏฐา ผดุงวัฒนะโชค, กชวรรณ จันเทร์มะ

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

*E-mail: h_natharinee@hotmail.com

**บทคัดย่อ**

มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในประเทศไทย ซึ่งเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* ได้ถูกพบว่ามีการดื้อต่อยาหลายชนิดที่ใช้รักษาโรคมาลาเรีย รวมถึงยาที่มีต้นกำเนิดจากพืชด้วย ได้แก่ Quinine และ artemisinin ดังนั้นการทดสอบเพื่อหาสารจากพืชชนิดอื่นๆที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจึงมีความจำเป็น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์คือเพื่อศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ (Crude extract) จากใบ ฝัก และเมล็ดของมะรุมต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* สายพันธุ์ TM267 ซึ่งดื้อต่อยา chloroquine ด้วยวิธีการวัด parasite lactate dehydrogenase (pLDH) จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดมะรุมมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ TM267 ได้ดีที่สุด [ค่า The half maximal inhibitory concentration ($IC_{50}$) เท่ากับ 1.21 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร] รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากใบมะรุม (ค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 11.07 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารสกัดหยาบจากฝักมะรุม (ค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 210.10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดหยาบจากเมล็ด ใบ และฝักของมะรุมนี้ไม่ปรากฏความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ [ค่าดัชนีความจาเพาะ (Selectivity index; SI) > 2] ดังนั้นสารสกัดหยาบจากมะรุมที่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลายมีสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย ทั้งนี้ยังต้องนำสารสกัดจากมะรุมโดยเฉพาะส่วนของเมล็ดมาทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่ออกฤทธิ์ เพื่อนำไปพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรียต่อไป

**คำสำคัญ:** มะรุม พลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม $IC_{50}$

**Abstract**

Malaria remains an important health problem in Thailand. The main cause of infection is *Plasmodium falciparum* that resists to many antimalarial drugs even those obtain from plant, such as quinine and artemisinin. The finding of new effective antimalarial drugs from plants is necessary. The objective of this study is to evaluate and compared the antimalarial activity from crude extract of *Moringa oleifera* Lam. seed, leaft and fruit against *P. falciparum* strain TM267 (chloroquine-resistance strain) using parasite lactate dehydrogenase (pLDH) assay. The result show that the ethanol extract of *Moringa oleifera* seeds show the highest antimalarial activity ($IC_{50}$ = 1.21 mg/ml) followed by ethanol extract from *Moringa oleifera* leaf ($IC_{50}$ = 11.07 mg/ml) and fruit ($IC_{50}$ = 210.10 mg/ml), respectively. The cytotoxicity effect is determined against peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). When all extracts were tested with PBMCs, all three crude *Moringa oleifera* extracts had no toxic effect with SI>2. It can be concluded that the ethanol extracts of *Moringa oleifera* contain antimalarial activities. Furthermore, the phytochemical of *Moringa oleifera* extracts especially *Moringa oleifera* seed must be investigated for antimalarial drug development.

**Keywords:** *Moringa oleifera* Lam, *Plasmodium falciparum*, $IC_{50}$

## บทนำ

โรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย แม้ว่าโรคนี้จะมีอัตราการป่วยและอัตราการตาย รวมถึงอุบัติการณ์ลดลงก็ตาม เชื้อก่อโรคมาลาเรียที่มีการแพร่ระบาดส่วนใหญ่ในประเทศไทย เป็นเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* และ *P. vivax* โดยในปี 2559 มีการรายงานว่ามีจำนวนผู้ป่วยทั้งประเทศจำนวน 17,913 ราย พบการติดเชื้อมากที่สุดบริเวณชายแดนไทยส่วนที่ติดกับพม่า มาเลเซีย และกัมพูชา จังหวัดที่มีการติดเชื้อสูงสุด ได้แก่ จังหวัดยะลา ตาก นราธิวาส สงขลา และอุบลราชธานี ตามลำดับ (1) การดื้อยาของเชื้อ *P. falciparum* นั้นยังเป็นปัญหาสำคัญสำหรับการรักษาโรคมาลาเรียในประเทศไทยรวมถึงแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งพบว่าส่วนมากจะเป็นการดื้อต่อยาหลายชนิด (multidrug resistance) ที่ใช้ในการรักษาเช่น คลอโรควีน ซัลฟาดอกซีน-ไพริเมทามีน (Sulfadoxine-Pyrimethamine) และ เมฟโฟลควิน (Mefloquine) ในปัจจุบันพบว่าเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* เริ่มดื้อต่อยาผสมอนุพันธุ์อาร์ติมิซินิน (Artemisinin-based combination therapy) ซึ่งเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ที่ใช้ในแถบภูมิภาคนี้ ได้แก่ ไทย ลาว พม่า กัมพูชา และเวียดนาม เป็นต้น ซึ่งหากมีการแพร่กระจายของเชื้อที่ดื้อยาไปยังภูมิภาคอื่นของโลกก็จะทำให้การควบคุมโรคมาลาเรียยุ่งยากมากขึ้น นอกจากนี้การใช้

ยาไม่ได้มาตรฐานและพฤติกรรมการรักษาไม่ถูกต้องก็จะส่งผลให้เกิดการระบาดและแพร่กระจายของเชื้อที่ดื้อยามากขึ้นอีก

ยาที่ใช้ในการรักษามาลาเรียที่มีประสิทธิภาพมีต้นกำเนิดมาจากพืช ได้แก่ ควินิน และอาร์ทิซูเนต โดยยาควินินมีต้นกำเนิดจากต้นควินิน (*Cinchona pubescens* Vahl ;cinchona 49 tree bark) และยาอาร์ติมิซินิน มีต้นกำเนิดจาก *Artemisia annua* (sweet wormwood) ดังนั้นการใช้สมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาใช้เพื่อรักษาโรค ในประเทศไทยมีการนำสมุนไพรที่มีฤทธิ์เป็นยามาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ และบันทึกเป็นข้อมูลไว้ตั้งแต่สมัยโบราณ โดยในปัจจุบันมีการศึกษาและรายงานฤทธิ์การต้านการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคมาลาเรียจากสมุนไพรประจำถิ่นหลายชนิด เช่น เจตมูลเพลิงแดง มังคุด เบญจกุล จันทร์ผา ดีปลี จันทร์เทศ และขิง (2) หนึ่งในสมุนไพรที่น่าสนใจคือ มะรุม (ชื่อวิทยาศาสตร์: *Moringa oleifera* Lam., ชื่อสามัญ: drumstick) ซึ่งเป็นพืชพื้นบ้านของไทยอยู่ในวงศ์ Moringaceae ส่วนที่นิยมใช้คือ เปลือก ใบ ฝัก ดอก เมล็ด ราก และน้ำมันจากเมล็ด โดยมีคุณค่าทางยาที่ประกอบด้วยสารพฤกษเคมีหลากหลายชนิด เช่น glucosinolates, isothiocyanates, alkaloids, flavonoids และ $\beta$-sitosterol ซึ่งทำให้มะรุมมีประโยชน์ทางยา เช่น มีฤทธิ์ป้องกันตับอักเสบ ลดระดับคลอเรสเตอรอล ลดความดันโลหิต ต้านการเกิดเนื้องอกและมะเร็ง รวมถึงสามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส (3) รวมถึงสารในกลุ่ม phenolic ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสะได้ (4) นอกจากนี้ยังมีรายงานจากประเทศแถบแอฟริกาว่าสารสกัดหยาบจากมะรุมมีความสามารถในการต้านเชื้อมาลาเรียทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง (5) ซึ่งสารที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียนั้นประกอบด้วยสารจำพวก flavonoids alkaloids tannins และ saponins (6) ด้วยคุณสมบัติที่กล่าวมานี้ทางคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย โดยเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดจากใบ ฝัก และเมล็ดของมะรุม

## วิธีการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ผ่านการพิจารณาเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ (เลขที่รับรอง อ.326/2558)

### 1. การเตรียมสารสกัดหยาบจากมะรุม

สารสกัดหยาบจากมะรุมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้มาจากส่วนต่างๆ ของมะรุม ได้แก่ ใบมะรุม เมล็ดมะรุม และฝักมะรุม ซึ่งเตรียมโดยนำส่วนต่างๆที่กล่าวมาชนิดละ 100 กรัม แช่ใน 95% เอทานอล ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman ขนาด 10 นาโนเมตร และนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารสกัดแห้ง จากนั้นนำสารสกัดหยาบแต่ละชนิดชั่งน้ำหนักที่ได้ และละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งใช้งาน

### 2. การเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ TM267

เชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ TM267 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.ศรีสิน คูสมิทธิ์ นำมาเลี้ยงอย่างต่อเนื่องตามวิธีที่ปรับจากวิธีมาตรฐานของ Trager และคณะ (7) โดยเลี้ยงในอาหารชนิด RPMI 1640 ที่มีส่วนประกอบเสริมของ $NaHCO_3$ 2 กรัม, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 4.766 กรัม และ gentamicin 40 ยูนิต, Albumax II ร้อยละ 1 และเม็ดเลือดแดงหมู่เลือด “O” นำไปบ่มในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส และมีร้อยละ 5 ของคาร์บอนไดออกไซด์ และติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยการทำสเมียร์เลือดแบบบาง (thin

smear) และนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ *P.falciparum* เทียบกับเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 100 ตัว (%parasitemia) โดยนับแยกระยะต่างๆ เมื่อได้จำนวนเชื้อที่ต้องการจึงนำไปทำการทดสอบ

### 3. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ TM267 ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุม

การทดสอบเริ่มด้วยการเตรียมสารสกัดโดยเจือจางสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมใน DMSO ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (stock solution) และทำการเจือจางสารสกัดที่เตรียมได้แบบ 2-fold dilution ตามความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นเตรียมเชื้อ *P. falciparum* infected red blood cell ให้มีจำนวน 2% parasitemia และ 1-2% hematocrit ตามปริมาณที่ต้องการ แล้วนำมาทำการทดสอบโดยเติมเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อระยะ trophozoite ที่ 2%parasitemia และ 2%hematocrit ปริมาตร 99 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงใน 96-well culture plate จากนั้นเติมสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของมะรุม ความเข้มข้นละ 1 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส และมีร้อยละ 5 ของคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยวิธีการวัด parasite lactate dehydrogenese (pLDH) ในการทดสอบทุกครั้งจะใช้ยาอาร์ติมิซินินเป็น positive control อาหารเลี้ยงมาลาเรีย และ DMSO เป็น negative control ใช้เม็ดเลือดแดงที่มีหมู่เลือด “O” เป็นค่าพื้นหลัง และในหนึ่งการารทดสอบทำการทดลองแบบ 2 ซ้ำ (duplicate)

### 4. การติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ TM267

ติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ TM267 ด้วยวิธี pLDH (8) โดยเริ่มด้วยการเตรียม Malstat reagent (Triton X-100 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร, deionized water ปริมาตร 80 มิลลิลิตร, L-lactate จำนวน 4.00 กรัม, Tris buffer จำนวน 1.32 กรัม และ 3-acetyl pyridine adenine dinucleotide (APAD) จำนวน 0.022 กรัม และปรับค่า pH ให้เท่ากับ 9 ด้วย hydrochloric acid ปรับปริมาตรสุทธิเป็น 200 มิลลิลิตร ด้วย deionised water) จากนั้นเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน และเตรียม NBT/PES solution (nitro blue tetrazolium salt จำนวน 0.160 กรัม และ phenazine ethosulfate จำนวน 0.008 กรัม และ deionized water ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน สำหรับขั้นตอนการวัด pLDH เริ่มจากนำ 96-well culture plate ที่ใช้ทำการทดสอบเชื้อ *P. falciparum* กับสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของมะรุม แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นนำไปละลายที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที ทำซ้ำทั้งหมด 3 รอบ เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก จากนั้นเตรียม microtiterplate อันใหม่แล้วเติม Malstat reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม (Malstat plate) จากนั้นนำเชื้อจาก plate ที่ทำการทดสอบ (plate ที่ freeze-thaw เรียบร้อยแล้ว) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากแต่ละหลุม ใส่ลงใน Malstat plate ผสมให้เข้ากัน แล่ะเติม NBT/PES solution ปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อหลุม แล้วนำไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม 5% acetic acid ปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อหลุม แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโมเมตร ด้วย ELISA reader

### 5. การเตรียมเม็ดเลือดขาวปกติ (Peripheral blood mononuclear cells; PBMCs)

ทำการเจาะเลือดจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพปกติจากเส้นเลือดดำ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแยกเซลล์ PBMCs สำเร็จรูป (BD vacutainer CPT) ทำการปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที หลังจากนั้นทำการดูดเก็บเซลล์ PBMCs แล้วทำการปั่นล้างเซลล์ PBMCs ด้วย sterile PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที หลังจากนั้นเก็บเซลล์เพื่อทำการทดสอบต่อไป

**6. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากมะรุมต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ ด้วยวิธี MTT assay**

ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของมะรุม โดยวิธี 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-5 diphenyltetrazolium bromide (MTT assay) (9) โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ ความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 x $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) ลง 96-well tissue culture plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วบ่มในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส และมีร้อยละ 5 ของคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารสกัดหยาบจากมะรุม ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วนำไปบ่มในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส และมีร้อยละ 5 ของคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจาก 96-well plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นเติม MTT dye solution ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส และมีร้อยละ 5 ของคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วคว่ำ 96-well tissue culture plate และซับอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดด้วยกระดาษชำระ โดยเหลือเฉพาะผลึกฟอร์มาซาน (Formazan) ที่ก้นหลุม เติม DMSO ลงใน 96-well tissue culture plate ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วเขย่า plate เบาๆเพื่อให้ผลึกฟอร์มาซาน (Formazan) ละลายทั้งหมด และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540/620 นาโนเมตร ด้วย ELISA reader แล้วนำค่า การดูดกลืนแสงมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ ซึ่งในทุกการทดสอบต้องทำชุดควบคุม (vehicle control) ควบคู่ไปด้วยโดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม DMSO โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 2

**7. การวิเคราะห์และแปลผลข้อมูล**

การศึกษาและเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ TM267 ของสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของมะรุม คำนวณหาร้อยละของการยั้บยั้งการเจริญเติบโตจากสูตร

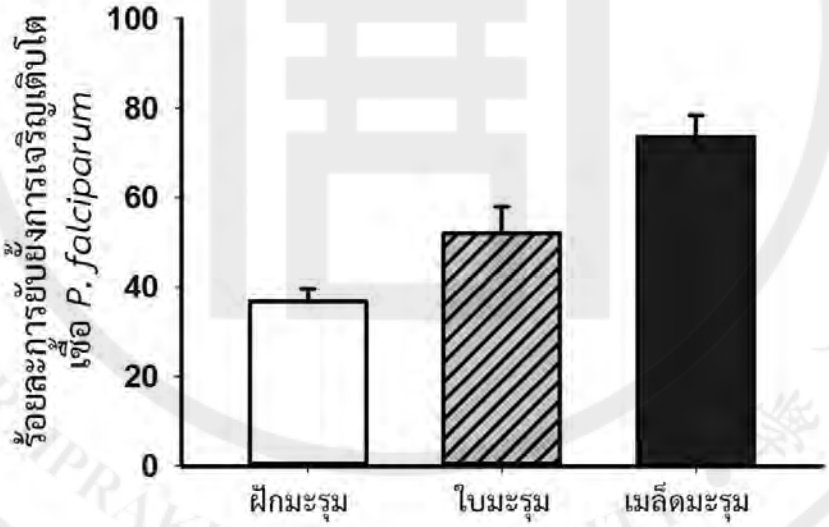
$$\text{ร้อยละของการยับยั้งการเจริญเติบโต} = \frac{\text{ร้อยละของจำนวนเชื้อในหลุมที่ทดสอบกับสารสกัดหยาบ X 100}}{\text{ร้อยละของเชื้อในหลุมควบคุม}}$$

และคำนวณค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ 50% ($IC_{50}$) และคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอด 50% ($CC_{50}$) โดยวิธี MTT assay จากนั้นนำมาคำนวณหาค่าดัชนีความจำเพาะ (selectivity index: SI) ได้จากอัตราส่วนระหว่าง $CC_{50}$ และ $IC_{50}$

**ผลการวิจัย**

การคัดกรองฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของมะรุมที่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลายเพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ TM267 ได้ทำการศึกษาทั้งหมด 3 ครั้งโดยแต่ละครั้งทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate) พร้อมกันนี้ยังทำการทดสอบโดยใช้ malaria culture medium และ DMSO เป็น negative control ควบคู่กับการทำการทดสอบทุกครั้ง พบว่า ทั้ง 2 สภาวะไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเนื่องจากเมื่อเลี้ยงเชื้อกับ malaria culture medium และ เลี้ยงเชื้อกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ DMSO นั้นให้ค่า pLDH ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ในทุกการทดสอบใช้ยาอาร์ติมิซินิน เป็น positive control แทนยาคลอโรควีน เนื่องจากเชื้อที่ใช้ในการทดสอบคือ เชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ TM267 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาคลอโรควีน พบว่า

ยาอาร์ติมิซินิน มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยให้ค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.0042 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดสอบเพื่อคัดกรองความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตจากสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของมะรุมเบื้องต้นที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่า สารสกัดที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ TM267 ได้ดีที่สุด คือสารสกัดหยาบจากเมล็ดมะรุม ใบมะรุม และฝักมะรุม โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละของการยับยั้งการเจริญเติบโต เท่ากับ ร้อยละ 73.84, 52.02 และ 36.77 ตามลำดับ (ภาพที่ 1) เมื่อนำสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของมะรุมมาเจือจางและทำการทดสอบ พบว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของมะรุมมีฤทธิ์แปรผันตรงกับความเข้มข้นของปริมาณสารสกัดที่เพิ่มขึ้น (dose dependent manner) โดยสารสกัดหยาบจากเมล็ดมะรุมมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ TM267 ได้ดีที่สุดโดยให้ค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 1.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากใบมะรุม ให้ค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 11.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาบจากฝักมะรุมซึ่งให้ค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 210.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้เมื่อนำสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิดมาทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ พบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดมะรุม ใบมะรุม และฝักมะรุม ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ โดยสารสกัดหยาบจากเมล็ดมะรุมให้ค่า $CC_{50}$ มากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบจากใบมะรุมให้ค่า $CC_{50}$ เท่ากับ 900 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาบจากฝักมะรุมให้ค่า $CC_{50}$ มากกว่า 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณค่า SI พบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดมะรุมมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ TM267 ได้ดีที่สุด และมีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติน้อยที่สุด (ตารางที่ 1)




**ภาพที่ 1** ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของฝักมะรุม ใบมะรุม และเมล็ดมะรุมในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciprum* สายพันธุ์ TM267

**ตารางที่** 1 ค่า $IC_{50}$ $CC_{50}$ และค่า SI ของสารสกัดหยาบจากฝักมะรุม ใบมะรุม และเมล็ดมะรุม

| สารสกัดหยาบ | $IC_{50}$ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | $CC_{50}$ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | SI |
|---|---|---|---|

| | | | |
|---|---|---|---|
| ฝักมะรุม | 210.10 | >500 | >2.38 |
| ใบมะรุม | 11.07 | 900 | 81.74 |
| เมล็ดมะรุม | 1.21 | >1000 | >826.44 |

**อภิปรายผล**

การศึกษานี้ใช้สารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของมะรุม มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ TM267 ในหลอดทดลอง ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดหยาบจากเมล็ดมะรุมมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ TM267 มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 1.21 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากใบมะรุม มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 11.07 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดหยาบจากฝักมะรุม มีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 210.10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อนำส่วนที่ต่างกันของมะรุมมาสกัดจะทำให้ได้สารที่มีความสามารถแตกต่างกัน นอกจากนี้ผลการศึกษายังพบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนเมล็ด ใบ และฝักมะรุมนั้น ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ ซึ่งแสดงให้เห็นจาก ค่า SI> 2 การศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมาที่นำเอาสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของมะรุมไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) (10) ที่รายงานโดย Olasehide GI และคณะ ศึกษาพบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะรุมที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อ *P. berghei* ในหนูทดลองได้ (11) สำหรับสารกัดหยาบจากใบมะรุม มีรายงานว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* โดยมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.16 ไมโครโมลาร์ (12) ทั้งนี้ความแตกต่างของผลการศึกษานั้นอาจเกิดจากปัจจัยหลายประการประกอบด้วย เชื้อ *P.falciparum* ที่ใช้ในทดการสอบมีสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน วิธีการสกัดพืชสมุนไพรและสารเคมีที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกัน รวมถึงสภาพแวดล้อมของแหล่งที่มาของพืชสมุนไพรที่นำมาสกัด นอกจากนี้ในปี 2014 โดย Dori GU และคณะ รายงานว่าสารสกัดจากใบและรากของ *Moringa stenopetala* ซึ่งเป็นพืชในตระกูลเดียวกับมะรุมก็มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. berghei* ในหนูทดลองเช่นเดียวกัน (2) การรายงานเกี่ยวกับการใช้พืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียอีกหลายชนิด ในปี 2011 Abiodun O และคณะ ได้ทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารสกัดจากใบยี่หร่าด้วยเอททิลอะซิเตท มีค่า $IC_{50}$ อยู่ระหว่าง 1.8-1.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (13) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากยี่หร่าด้วยเอททิลอะซิเตท มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. falciparum* ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดมะรุมที่ทำการทดสอบ จากการสืบค้นข้อมูลมีรายงานว่าสารสกัดหยาบจากมะรุมเมื่อนำไปทำการแยกสารทางพฤกษเคมีจะพบสารหลายกลุ่ม ได้แก่ tannins, alkaloids, quinines, saponins, flavonoids, polyphenols, terpenoids, quercetin, kaempferol, และ gypenoside (14) และสารที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของมาลาเรีย ได้แก่สารในกลุ่ม terpenoids, flavonoids, alkaloids, quinines, quercetin และ kaempferol (14, 15) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงาน ในปี 2009 โดย Bero J และคณะทำการศึกษาความสามารถของสารสกัด flavonoid จากรากของต้นชงโค มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.falciparum* เช่นเดียวกับเมล็ดมะรุมโดยมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 9.5 ไมโครโมลาร์ (16) และในปี 2013 โดย Thiengsusuk A และคณะพบว่าสารสกัดจากโกศจุฬาลัมพาที่มีส่วนประกอบของ flavonoid และ alkaloid เช่นเดียวกับสารสกัดจากมะรุม มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.falciparum* K1 และ 3D7 โดยมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 10.4 และ 21.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (17) จากทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่ามีการรายงานเกี่ยวกับความสามารถของสารสกัดจากพืชในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียมีผลการทดสอบที่หลากหลาย ซึ่งอาจมีสาเหตุจากหลายปัจจัย ได้แก่ ความแตกต่างของการเลือกใช้ตัวทำละลาย สปีชีส์ของเชื้อที่นำมาทดสอบ ชนิดของพืชที่

ใช้ ชนิดและวิธีที่ใช้ในการสกัดสาร รวมถึงวิธีการตรวจวัดการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย โดยงานวิจัยนี้ใช้การตรวจหาเอนไซม์ lactate dehydrogenase ที่มีความสำคัญในกระบวนการไกลโคไลซิสของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* โดย pLDH จะเปลี่ยนสี tetrazolium ให้เป็น formazan ซึ่งมีสีฟ้าและสามารถอ่านค่าการดูดกลืนแสงได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิทรี (spectrophotometry) (18) การศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นดังนั้นจึงควรนำสารสกัดจากมะรุมโดยเฉพาะส่วนเมล็ดมาทำการศึกษาต่อไปเพื่อให้ทราบถึงสารบริสุทธิ์ที่เป็นตัวออกฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย และนำไปพัฒนาเป็นยาต้านโรคมาลาเรียที่เกิดจากการติดเชื้อ *P.falciparum* ต่อไป

## เอกสารอ้างอิง


1. สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข [ homepage on the Internet]. ข้อมูลมาลาเรียรายสัปดาห์ ปี 2259 สัปดาห์ที่ 52 [cited 2017 Jan 15]. Available from: http://www.thaivbd.org/n/histories?module=มาลาเรียรายสัปดาห์&type=week&year=2559.
2. Dori GU, Yerbanga SR, Tepongning NR, Lucantoni L, Lupidi G, Deressa W. et al. Contributing to the validation of *Moringa stenopetala*, an antimalarial plant widely used in Southern Ethiopia. Italian Society for Parasitology, Volume: 52 (1-2), 221.
3. วิมล ศรีศุข. มะรุม พืชสมุนไพรหลากประโยชน์ [homepage on the Internet]. จุลสารข้อมูลสมุนไพร. [cited 2016 Apr 6]. Available from: http://www.medplant.mahidol.ac.th/publish/newsletter/pdf/n26(4)3-20.pdf
4. ปฐม โสมวงศ์. คุณค่าทางอาหารและทางยาของสมุนไพรมะรุม [homepage on the Internet]. [cited 2016 Apr 6]. Available from: www.vegetweb.com/download/doc/marum.doc
5. Aliyu A, Chukwuma UD, Omoregie EH, Folashade KO. Qualitative phytochemical analysis of the leaf of *Moringa oleifera* lam. from three climatic zones of Nigeria. J Chem Pharm Res. 2016, 8(8):93-101.
6. Orman E, Addo P, Ofori MF, Adosraku RK. Investigating the In-vivo Antiplasmodial Properties of Aqueous Extract of *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae) Leaves. Br J Pharm Res. 2015; 5(6): 419-430.
7. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. Science 1976; 193: 673-675.
8. Makler MT, Ries JM, Williams JA, Bancroft JE, Piper RC, Gibbins BL, et al. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for drug sensitivity. Am J Trop Med Hyg. 1993; 48(6):739- 41.
9. Semsri S, Kaewoudorn N, Jaipukdee N, Chorachan N, Horata N. Effect of crude ethanolic extract of Ratchadat (*Brucea amarissima*) fruit on cell cytotoxicity and Wilms' tumor 1 protein expression in K562 leukemic cell line. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2014; 47: 45-52.
10. Lawal B, Shittu OK, Kabiru AY, Jigam AA, Umar MB, Berinyuy EB, Alozieuwa BU. Potential antimalarials from African natural products: A reviw. J Intercult Ethnopharmacol. 2015; 4(4):318-343.
11. Olasehinde GI, Ayanda OI, Ajayi AA, Nwabueze AP. *In-vivo* Antiplasmodial Activity of Crude n-hexane and Ethanolic Extracts of *Moringa oleifera* (LAM.) Seeds on *Plasmodium berghei*. J. Med. Plants Res. 2012; 1(5):50-54.

12. Patel JP, Gani B, Patel K. Evaluation of *in vitro* Schizonticidal properties of acetone extract of some Indian medicine plants. Adv Biol Res 2010; 4(5): 253-258.
13. Oyindamola A, Grace G, Edith A, Tientcha H, Mofolusho F, Sergio W, et al. *In vitro* antiplasmodial activity and toxicity assessment of some plants from Nigerian ethnomedicine. Pharm Biol 2011; 49(1): 9–14.
14. J. Karbwang and T. Harinasuta. Overview: clinical pharmacology of antimalarials. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1992; 4: 95–109.
15. Roopalath UC, Mala V. Phytochemical Analysis of successive reextracts of the leaves of *Moringa oleifera* LAM. Int J Pharm Pharm Sci. 2013; 5(3), 629-634.
16. Joanne B, Michel Fre ´de ´richb, Joe ¨lle Quetin-Leclercqa. Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine. J Pharm Pharmacol 2009; 61: 1401–1433.
17. Thiengsusuk A, Chaijaroenkul W, Na-Bangchang K. antimalarial activities of medicinal plants and herbal formulations used in Thai traditional medicine. Parasitol Res 2013; 112(4):1475-81
18. วรรณา ชัยเจริญกุล. การประเมินและเฝ้าระวังการดื้อของเชื้อมาลาเรียต่อยาต้านมาลาเรีย. วารสารโรคติดต่อนำโดยแมลง 2553; 7(2): 47-60.