สมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค

Medicinal Plants with Anti-Tuberculosis Activity

อารีรัตน์ ซื่อดี

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis* H_{37} Ra) โดยการนำสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรมาทดสอบด้วยวิธีการแยกและประกอบโปรตีนที่สามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์สีเขียวหรือโปรตีนจีเอฟพี (Green Fluorescent Protein--GFP) จากผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดและผลพริกไทยมีค่า MIC_{90} เท่ากับ 12.50 - 50.00 และ 50.00 µg /ml ตามลำดับ และจากรายงานที่มีการศึกษาวิจัยของสารพิเพอร์รีน (piperine) ที่สกัดแยกได้จากผลพริกไทย โดยพบว่าสาร piperine ช่วยเพิ่มฤทธิ์ในการรักษาร่วมกับยาได้ ดังนั้นจึงเป็นแนวทางอีกทางเลือกหนึ่ง หากมีการนำสารสกัดที่ได้ไปใช้ร่วมกับยาต้านวัณโรคเพื่อเสริมฤทธิ์ในการรักษาร่วมกับยาต้านวัณโรค, ลดผลข้างเคียงและพิษของยาต้านวัณโรคที่ใช้ในปัจจุบันได้ อีกทั้งยังสามารถลดการนำเข้าของยาที่มีราคาสูง ส่งผลทำให้ผู้ป่วยมีสุขภาพชีวิตที่ดีขึ้นได้

คำสำคัญ: สมุนไพรไทย, ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค, เชื้อวัณโรค โปรตีนจีเอฟพี, พิเพอร์รีน

Abstract

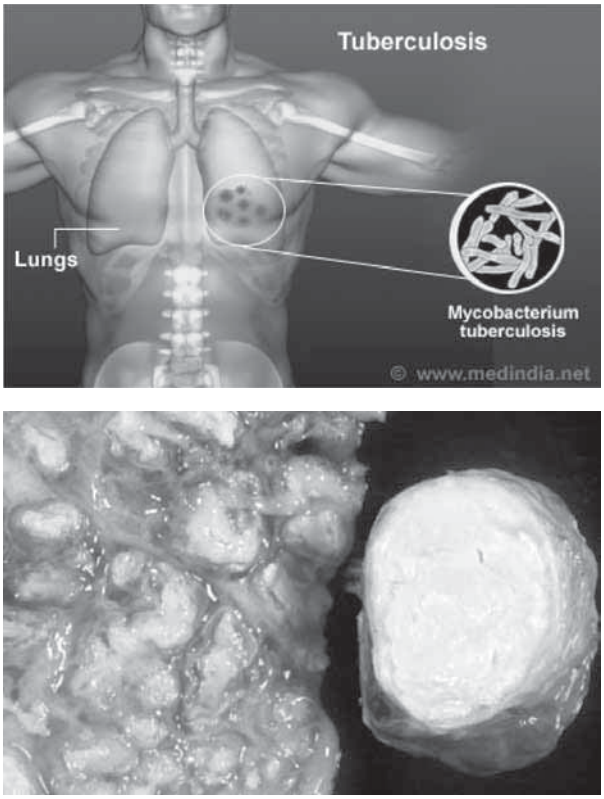
This research is an experiment research. The purpose of this research was studied of Thai medicinal plants with anti-tuberculosis activity (*Mycobacterium tuberculosis* H_{37} Ra). Crude extracts were tested by technique of Green Fluorescent Protein (GFP). The results exhibited anti-tuberculosis activity of pepper with MIC_{90} value of 12.50 - 50.00 and 50.00 µg /ml, respectively. There have been some researches on the anti-tuberculosis activity of piperine from P. nigrum. Piperine was found to increase the activity of medicine. Therefore, it is an alternative approach of extracts to combine with anti-tuberculosis drugs for synergistic treatment for reduce the side effects, toxic of medicinal agent and reduce the import of medicines with high prices have resulted in the patient's better for healthy life.

Keywords: Thai medicinal plants, anti-tuberculosis activity, *Mycobacterium tuberculosis* H_{37} Ra, Green Fluorescent Protein (GFP), piperine

ความนำ

ในปัจจุบันสถานการณ์วัณโรคเริ่มทวีความรุนแรงมากขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งส่งผลกระทบต่อภาวะทุพพลภาพของชีวิตรวมถึงส่งผลต่อเศรษฐสถานะของผู้ป่วยตลอดจนเศรษฐกิจระดับประเทศ โดยมีรายงานพบจำนวนผู้ป่วยวัณโรครายใหม่เพิ่มขึ้นทุกปี (กำพล สุวรรณพิมลกุล และคณะ, 2553) สำหรับประเทศไทยองค์การอนามัยโลกจัดให้เป็น 1 ใน 22 ประเทศที่มีปัญหาวัณโรคในระดับรุนแรง โดยคาดว่ามีผู้ป่วยวัณโรครายเก่าและใหม่รวมกว่า 110,000 ราย มีผู้ป่วยรายใหม่เพิ่มปีละประมาณ 86,000 ราย และมีผู้เสียชีวิตประมาณ 9,800 ราย (วงการแพทย์, 2556)

วัณโรคมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* หรือเรียกย่อ ๆ ว่า TB มักอยู่ในที่ที่มีออกซิเจนมาก ๆ เช่น ปอด เชื้อนี้จะทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการไอติดต่อกันเป็นเวลานานและเกิดแผลในปอดจนทำให้เสียชีวิตได้ การติดต่อโดยการแพร่กระจายจากผู้ป่วยขณะไอ จาม การพูดหรือร้องเพลง ถ้าอณูละอองฝอยนั้นมีขนาดพอเหมาะคือ 1-10 ไมครอน จะไม่รวมตัวเป็นกลุ่มก้อนแต่จะกระจายออกและลอยอยู่ทั่ว ๆ ไปในกระแสลม ซึ่งอณูละอองฝอยจะมีเชื้อวัณโรคเกาะติดอยู่ 1-3 ตัว โดยเชื้อที่ออกมาจากน้ำลายหรือละอองเสมหะและจะลอยอยู่ในอากาศได้เป็นเวลานาน โดยเฉพาะในที่ที่อากาศไม่ถ่ายเทหรือไม่ค่อยมีแสงส่องถึง จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรควัณโรคในคนได้เกือบทุกอวัยวะ (คณะกรรมการพัฒนาระบบเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมวัณโรคของสำนักการแพทย์, 2550; สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุลและคณะ, 2547) การติดเชื้อวัณโรคแบ่งได้เป็น 2 ระยะ คือระยะโรคสงบ คือการที่คนคนหนึ่งมีเชื้อวัณโรคอยู่ในตัว แต่ไม่เกิดโรคและไม่มีอาการป่วยใด ๆ และระยะป่วยเป็นโรคซึ่งเป็นการป่วยเป็นโรคขึ้นมาในภายหลังได้ หากภูมิคุ้มกันอ่อนแอลง อาการที่พบบ่อยที่สุดของผู้ป่วยวัณโรคปอด คือ ไอเกิน 3 สัปดาห์ มักจะมีเสมะร่วมด้วย ซึ่งเสมหะส่วนใหญ่จะมีสีเหลือง ขาวขุ่น เขียว บางครั้งมีเลือดปน นอกจากนี้ผู้ป่วยเหล่านี้มักมีอาการอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น น้ำหนักลดอ่อนเพลียมีไข้(โดยเฉพาะตอนเย็น)เหงื่อออกตอนกลางคืน เจ็บหน้าอก หายใจหอบเบื่ออาหาร ไอเป็นเลือดหรือไอเสมหะมีเลือดปน สำหรับผู้ป่วยที่เป็นวัณโรคนอกปอด (Extra pulmonary Tuberculosis) มักจะมีอาการทั่วไป ได้แก่ น้ำหนักลด มีไข้ และมีเหงื่อออกตอนกลางคืน (ดำเกิง ตันธรรมจาริก, 2548)



ภาพ 1 แสดงลักษณะของปอดที่ติดเชื้อ Mycobacterium tuberculosis

ที่มา. จาก *วัณโรคในโค*, โดย คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ค้นจาก http://www.eidas.vet.chula.ac.th/th/diseases/people/bacteria/369

กลไกการเกิดโรควัณโรค หลังจากที่เราหายใจเอาเชื้อโรคเข้าในปอด หากร่างกายเรามีภูมิก็จะฆ่าเชื้อโรคได้ หากฆ่าได้ไม่หมดเนื่องจากจำนวนหรือความรุนแรงของเชื้อ เชื้อก็จะอยู่ในเม็ดเลือดขาว และแบ่งตัวอย่างช้า ๆ โดยจะแบ่งตัวทุก 25-32 ชั่วโมง จนกระทั่งเวลาผ่านไป 2-12 สัปดาห์จะมีปริมาณเชื้อ 1,000-10,000 เซลล์ซึ่งมีปริมาณมากพอที่จะทำให้ร่างกายสร้างภูมิต่อโรคซึ่งสามารถตรวจพบภูมิโดยการทดสอบทางผิวหนัง ก่อนที่ร่างกายจะสร้างภูมิคุ้มกันเชื้อจะแพร่กระจายไปยังระบบน้ำเหลืองและกระแสเลือดไปยังอวัยวะต่าง ๆ เช่น ต่อมน้ำเหลือง ไขกระดูก ตับ ม้าม ปอดกลีบบน ไต กระดูก และสมอง (Kumar, V., et al., 2010) ในปัจจุบันนี้การติดเชื้อเอดส์

เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่สุดของการป่วยเป็นวัณโรค (กระทรวงสาธารณสุข, 2551)

ยาที่ใช้ในการรักษาในปัจจุบัน ได้แก่ Isoniazid (H), Rifampicin (R), Pyrazinamide (Z), Ethambutol (E), Streptomycin (S) ซึ่งต้องใช้ยาหลายขนานร่วมกัน นอกจากนั้นยังมีช่วงระยะเวลาในการรักษาที่ค่อนข้างยาวนานตั้งแต่ 3 - 9 เดือน หรือนานกว่านั้นขึ้นอยู่กับลำดับอาการของโรค ซึ่งยาที่ใช้อาจมีผลข้างเคียงของยาตามตารางที่ 1 ดังนี้ (คณะกรรมการพัฒนาระบบเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมวัณโรคของสำนักการแพทย์, 2550; กระทรวงสาธารณสุข, 2551; Walker, R. & Whittlesea, C., 2012; Dipiro, J. T., et al., 2005)

ตาราง 1

ตารางแสดงยาที่ใช้ในการรักษาวัณโรคในปัจจุบัน

ชื่อยา	ขนาดยาใช้ยาทุกวัน		ให้ยาสัปดาห์ละ 3 ครั้ง (สำหรับผู้ใหญ่)	ผลข้างเคียงของยา
	ผู้ใหญ่	เด็ก		
Isoniazid (H)	300 มก./วัน	5(4-6) มก./กก./วัน	10 (8-12) มก./กก.	ตับอักเสบ
Rifampicin (R)	≥50 กก. ให้ 600 มก./วัน < 50 กก. ให้ 450 มก./วัน	10(8-12) มก./กก./วัน	10 (8-12) มก./กก.	ตับอักเสบ อาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ ถ้าให้ยาสัปดาห์ละ 2 ครั้ง
Pyrazinamide (Z)	20-30 มก./กก./วัน	25(20-30) มก./กก./วัน	35 (30-40) มก./กก.	ตับอักเสบ ผิวหนังเกรียม แพ้แดด ปวดมือ
Ethambutol (E)	15-25 มก./กก./วัน	15(15-20) มก./กก./วัน	30 (25-30) มก./กก.	ตามัว และอาจตาบอดได้
Streptomycin (S)	≥50 กก. ให้ 1 กรัม/วัน < 50 กก. ให้ 0.75 กรัม/วัน	15(12-18) มก./กก./วัน ไม่เกินวันละ 1 กรัม	15 (12-18) มก./กก.	หูตึง เสียการทรงตัว

จากข้อมูลผลข้างเคียงของยาที่ใช้ในการรักษาข้างต้นนั้น จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ หากมีแนวทางเลือกอื่นเพื่อให้ผู้ป่วยที่ได้รับยาแล้วนั้น มีผลข้างเคียงของยาจากยาที่ใช้อยู่ลดน้อยลง และลดภาระค่าใช้จ่ายจากการใช้ยาในราคาแพง โดยการส่งเสริมหรือรณรงค์ให้ผู้ป่วยมาใช้สมุนไพรของไทยที่มีอยู่ที่มีฤทธิ์หรือมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อวัณโรค หรือเพื่อนำมาใช้ร่วมกับการใช้ยาแผนปัจจุบันที่มีอยู่ต่อไป

เมื่อได้ศึกษาค้นคว้าหาข้อมูลรายงานการวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคนั้น สามารถสรุปตารางสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคได้ดังตารางที่ 2-3 ตามลำดับ

ตาราง 2

ตารางแสดงข้อมูลสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค

ชื่อพืช / วงศ์	ส่วนที่ใช้	ตัวทำละลาย	วิธีการ	MIC (mg/ml)	IC_{50} (mg/ml)	เอกสารอ้างอิง
ชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* Linn.) / Leguminosae	ราก	เอทานอล	BACTEC assay	0.5	-	Gupta, V. K., et.al., 2008
แอปริคอต (*Prunus armeniaca*) / Rosaceae	ผล	เอทานอล	Disc method	0.1, 0.2 และ 0.4	-	Sehgal, J., et.al., 2010
มะแขว่น (*Zanthoxylum limonella* Alston.) / Rutaceae	ผลแห้ง	คลอโรฟอร์ม	Microplate Alamar Blue Assay	0.2	-	Charoenying, P., et.al., 2008
Thymus syriacus / Lamiaceae	ไม่ระบุ	เอทิล อะซิเตต	ไม่ระบุ	0.8	-	Askun, T., et.al., 2012
Thymus syriacus / Lamiaceae	ไม่ระบุ	เมทานอล	ไม่ระบุ	3.1	-	
Satureja boissieri / Lamiaceae	ไม่ระบุ	เอทิล อะซิเตต	ไม่ระบุ	6.3	-	Askun, T., et.al., 2012
กัดลิ้น (*Walsura trichostemon*) / Meliaceae	เปลือก	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	-	0.05	อุดมวิชช์ พลเยี่ยม และคณะ, 2551
Salvia verticillata subsp. *amasiaca* / Lamiaceae	หัว	ไม่ระบุ	Mycobacteria Growth Indicator Tube	0.19	-	Aşkun, T., et.al., 2010
Salvia aucheri subsp. *aucheri* / Labiatae	หัว	ไม่ระบุ	Mycobacteria Growth Indicator Tube	0.19	-	Aşkun, T., et.al., 2010
Salvia tomentosa / Lamiaceae	หัว	ไม่ระบุ	Mycobacteria Growth Indicator Tube	0.19	-	Aşkun, T.,et.al., 2010
Pittosporum tenuifolium / Pittosporaceae	ใบ	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	1.25	0.51	Earl, E. A., et.al., 2010
Laurelia novae-zelandiae / Monimiaceae	เปลือกต้น	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	4.16	2.39	Earl, E. A., et.al., 2010

ตาราง 3

ตารางแสดงข้อมูลสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค

ชื่อพืช / วงศ์	ส่วนที่ใช้	ชื่อสารบริสุทธิ์	วิธีการ	MIC (mg/ml)	เอกสารอ้างอิง
ดีปลีน้ำ (*Potamogeton malaianus*) / Potamogetonaceae	ไม่ระบุ	Potamogetonin	Microplate Alamar Blue Assay	50	Kittakoop, P., et.al., 2001
		15,16-Epoxy-12-oxo-8(17),13(16),14-labdatrien-20,19-olide, Potamogetonyde และ Potamogetonol	Microplate Alamar Blue Assay	100	Kittakoop, P., et.al., 2001
ชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* Linn.) / Leguminosae	ราก	Glabridin	BACTEC assay	29.16	Gupta, V. K., et.al., 2008
Salvia verticillata subsp. *amasiaca* / Lamiaceae	หัว	b-Pinene และ 1,8-Cineole	Mycobacteria Growth Indicator Tube	ไม่ระบุ	Aşkun, T., et.al., 2010
Salvia aucheri subsp. *aucheri* / Labiatae	หัว	1,8-Cineole, Camphor, a-Pinene และ b- Pinene	Mycobacteria Growth Indicator Tube	ไม่ระบุ	Aşkun, T., et.al., 2010
Salvia tomentosa / Lamiaceae	หัว	a-Pinene, Camphor, Borneol และ1,8-cineole	Mycobacteria Growth Indicator Tube	ไม่ระบุ	Aşkun, T., et.al., 2010
Sideritis tmolea / Lamiaceae	หัว	Siderol	Disc-diffusion method	ไม่ระบุ	Çarikçi, S., et.al., 2007
Zanthoxylum capense/ Rutaceae	ไม่ระบุ	Decarine	Broth microdilution method	3.1	Ferreira, U. M. J., et.al., 2012
Zanthoxylum capense/ Rutaceae	ไม่ระบุ	6-Acetonyldihydronitidine และ *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-2,4-tetra-Decadienamide	Broth microdilution method	1.6-12.5	
		Sesamin และ (–)-Episesamin	Broth microdilution method	25-50	
มังคุด *Garcinia mangostana* / Guttiferae	เปลือกผล	a-Mangostin และ b-Mangostin	Microplate Alamar Blue Assay	6.25	Suksamrarn, S., et.al., 2003, Copp, B. R., et.al., 2007
		Garcinone B	Microplate Alamar Blue Assay	25	

ชื่อพืช / วงศ์	ส่วนที่ใช้	ชื่อสารบริสุทธิ์	วิธีการ	MIC (mg/ml)	เอกสารอ้างอิง
หวดหม่อน *Clausena excavate*/ Rutaceae	ไม่ระบุ	Clausendium	ไม่ระบุ	50	Copp, B. R., et.al., 2007
		Dentatin	ไม่ระบุ	100	
		nor- Dentatin	ไม่ระบุ	200	
มะหาด *Artocarpus lakoocha* / Moraceae	ราก	Lakoochins A	ไม่ระบุ	12.5	Copp, B. R., et.al., 2007
		Lakoochins B	ไม่ระบุ	50	
เสี้ยวเครือ *Bauhinia saccocalyx* / Fabaceae	ราก	Bauhinoxepin A	Microplate Alamar Blue Assay	6.25	Copp, B. R., et.al., 2007
		Bauhinoxepin B	Microplate Alamar Blue Assay	12.5	
ตับเต่าต้น *Diospyros ehretioides* / Ebenaceae	ผล	Palmarumycin JC2	ไม่ระบุ	6.25	Copp, B. R., et.al., 2007
Piper aff *pedicellatum* / Piperaceae	ราก	(+)-Bornyl piperate	ไม่ระบุ	25	Copp, B. R., et.al., 2007

รายงานเหล่านี้ทำให้ผู้วิจัยได้มองเห็นความเป็นไปได้สำหรับแผนงานวิจัยสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคได้ คณะผู้วิจัยจึงได้กำหนดแผนงานวิจัยในระยะยาวเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค ซึ่งจากข้อจำกัดในการใช้ยารักษาวัณโรคและข้อมูลรายงานการวิจัยของสารสกัดธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะหาได้จากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค อีกทั้งพบว่าในปัจจุบันได้มีการนำพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณรักษาแผลฝีหนอง หรือมีข้อมูลวารสารทางวิชาการที่สนับสนุนการใช้มาสกัดจากพืชไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค อาทิเช่น พืชที่มีสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอลคาลอยด์ ควิโนน เป็นต้น (Arya V., 2011) อีกทั้งสารสกัดที่ได้จากธรรมชาตินั้นมีความปลอดภัยกว่าและยังเป็นการลดการนำเข้ายาราคาแพงจากต่างประเทศ รวมถึงสามารถใช้เป็นทางเลือกใหม่ในการเลือกใช้สมุนไพรร่วมกับยาอื่น ๆ ได้มากยิ่งขึ้นซึ่งในการศึกษาวิจัยนี้ยังอาจจะสามารถนำไปต่อยอดเพื่อเพิ่มศักยภาพอุตสาหกรรมของยาภายในประเทศต่อไปในอนาคตได้

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาหาสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis* H_{37} Ra)

แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ทฤษฎีเกี่ยวกับการเกิดเชื้อวัณโรค

กรอบแนวคิดการวิจัย

เพื่อดูว่าสารสกัดจากสมุนไพรไทยสามารถต้านเชื้อวัณโรคได้ดีหรือไม่

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวแปร

ตัวแปรต้น คือ สารสกัดจากพืชสมุนไพร เช่น มังคุด, พริกไทย, พิกุล, สุพรรณิการ์, รำเพย, แก้ว, แคป่า, ย่านางแดง, เหงือกปลาหมอ, ฟ้าทะลายโจร, พญายอ, มะรุม เป็นต้น

ตัวแปรตาม คือ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค

สารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค สามารถศึกษาวิจัยและนำไปประยุกต์พัฒนาตั้งสูตร ตำรับ เพื่อใช้เป็นยารักษาในอนาคตได้

วิจัย

เป็นการวิจัยเชิงทดลองตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. การเตรียมสารสกัด

นำพืชสมุนไพรสดแต่ละชนิด (ประมาณ 70 ชนิด ยกตัวอย่างเช่น มังคุด, พริกไทย, พิกุล, สุพรรณิการ์, รำเพย, แก้ว, แคป่า, ย่านางแดง, เหงือกปลาหมอ, ฟ้าทะลายโจร, พญายอ, มะรุม เป็นต้น) มาล้างให้สะอาด แล้วอบที่อุณหภูมิไม่เกิน 50 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบดพืชสมุนไพรให้เป็นชิ้นเล็กๆ แบ่งผงพืชแต่ละชนิดอย่างละ 500 กรัม (ดังแสดงในตารางที่ 5) แล้วนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เมทานอล, เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, เอทิลอะซิเตต ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน กรองนำไประเหยเพื่อให้ตัวทำละลายออกจากสารสกัด จนได้สารสกัดหยาบแห้งเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์

2. ส่งไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคโดยกระบวนการตัดต่อโปรตีนเรืองแสงสีเขียวหรือโปรตีนจีเอฟพี

2.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง 10 mg/ml ใน 100% DMSO นำมาเจือจางเป็น 0.5 mg/ml ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงทุก 2 เท่าไปเรื่อย ๆ ด้วย 5% DMSO เพื่อเตรียมเป็น 5 ความเข้มข้น

2.2 การเตรียมเชื้อวัณโรค

เชื้อที่ใช้เป็น *Mycobacterium tuberculosis* H_{37} Ra เพาะเชื้อบน7H10 agar ซึ่งประกอบด้วย 30 µg/ml ของ kanamycin เก็บเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์หรือจนกว่าเชื้อจะเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นให้นำเชื้อ 2-3 โคโลนี มาเพาะบ่ม 10 ml ใน 7H9 broth กับ 0.2% v/v glycerol, 0.1 % w/v ของ casitone, 0.05% v/v Tween 80, 10% v/v Middlebrook OADC enrichment solution และ 30 µg/ml ของ kanamycin

ในการเพาะบ่มเชื้อใช้เครื่อง rotary shaker 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นสัปดาห์ แล้วนำไปวัดค่า optical density ที่ 550 nm (OD_{550}) ที่ประมาณ 0.5 - 1

จากนั้นปรับเชื้อให้ได้อัตราส่วน 1/10 โดยปริมาตร 7H9 broth และเพาะเชื้อด้วยการเขย่า จนสามารถวัดค่า 550 nm (OD_{550}) ที่ประมาณ 0.5 – 1 แล้วเก็บเชื้อด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที, ล้างด้วย phosphate buffer saline 2 ครั้ง แล้วกระจายเซลล์ด้วยวิธีการเขย่าสั่นด้วยคลื่นเสียงเป็นเวลา 15 วินาที จำนวน 8 ครั้ง, จนได้เชื้อวัณโรคและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน

โดยแต่ละส่วนของเชื้อที่เก็บไว้ด้วยวิธี colony forming unit (cfu) assay จะทำ dilution titer ของเชื้อวัณโรคในรูปของ logarithmic phase ของวันที่ 10 ที่เก็บไว้เพื่อการวิเคราะห์ที่เหมาะสม

2.3 การเตรียมการวิเคราะห์เชื้อวัณโรค

ทดสอบโดยใช้ 384-well plate ทำซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละ plate ประกอบด้วย 5 µl ของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ และ 45 µl ของเชื้อที่เตรียมไว้ จนได้ความเข้มข้นเป็น $1x10^5$ cfu/ml ในแต่ละ plate นำไปเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน วัดค่าการเรืองแสงที่สภาวะกระตุ้นที่ 485 nm และที่สภาวะการปลดปล่อยที่ 535 nm โดยใช้ bottom-reading mode ของเครื่องวัดการเรืองแสง (โดยค่าสัญญาณจะถูกหักลบจากวันแรกก่อนการเพาะเชื้อ)

3. เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อ (MIC)

การวิเคราะห์การคำนวณ % inhibition ของเชื้อวัณโรค โดยใช้สมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [1- (FU_T / FU_C)] \times 100$$

โดย FU_T และ FU_C คือ ค่าการเรืองแสงของเซลล์เชื้อและสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.5% DMSO ตามลำดับ เกณฑ์การยับยั้ง % inhibition พิจารณาได้ดังนี้ 1) ถ้า % inhibition น้อยกว่า 90%, รายงานเป็น “Inactive หรือ ไม่มีฤทธิ์”. 2) ถ้า % inhibition มากกว่าหรือเท่ากับ 90%, รายงานเป็น “Active หรือ มีฤทธิ์” ค่า MIC พิจารณาได้โดยค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดที่แสดงผลยับยั้งที่ 90% ของการเจริญเติบโตของเชื้อหลังจากที่เพาะเชื้อ

ผลการวิจัย

จากการส่งสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคที่สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช. หรือ NSTDA) โดยให้ผลการทดสอบตามตารางที่ 4 นี้

ตาราง 4

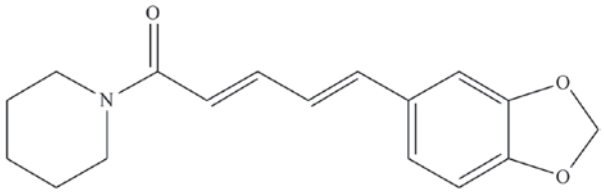
ตารางแสดงค่า % Inhibition และ MIC ของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

Screening code	Sample code	Final concentration (µg / ml)	Fluorescence unit at Day 0		Fluorescence unit at Day 10		% Inhibition	Activity	MIC (µg /ml)
			Average	SD	Average	SD			
Negative	Cell+DMSO	0.5% DMSO	1545	51	3234	265	0.00	-	-
Positive 1	Rifampicin	0.050	1490	21	1371	38	107.05	Active	0.025
		0.025	1550	36	1294	88	115.15	Active	
		0.0125	1621	63	2364	142	56.03	Inactive	
		0.00063	1625	81	2809	200	29.90	Inactive	
		0.0031	1561	34	2939	220	18.42	Inactive	
		0.0016	1646	53	3122	284	12.62	Inactive	
Positive 2	Ofloxacin	3.13	1626	23	1481	47	108.56	Active	0.391
		1.56	1597	18	1438	6	109.43	Active	
		0.0781	1608	35	1466	31	108.38	Active	
		0.391	1553	47	1376	35	110.51	Active	
		0.195	1557	47	3640	251	-22.10	Inactive	
		0.098	1552	46	3417	158	-10.35	Inactive	
Positive 3	Streptomycin	1.25	1510	48	1413	18	105.75	Active	0.313
		0.625	1595	40	1437	47	109.36	Active	
		0.313	1600	38	1512	43	105.19	Active	
		0.156	1564	17	2062	54	70.53	Inactive	
		0.078	1559	25	2330	136	54.38	Inactive	
		0.039	1528	51	2724	147	29.19	Inactive	
Positive 4	Isoniacid	0.375	1635	68	1457	48	110.56	Active	0.0496
		0.188	1602	73	1451	57	108.93	Active	
		0.0938	1595	25	1445	35	108.87	Active	
		0.0469	1625	39	1474	29	108.93	Active	
		0.0234	1593	10	2189	210	64.71	Inactive	
		0.0117	1630	12	3329	150	-0.52	Inactive	
Positive 5	Ethambutol	3.75	1437	38	1316	12	107.14	Active	0.469
		1.88	1512	41	1361	37	108.97	Active	
		0.938	1481	29	1358	15	107.29	Active	
		0.469	1473	51	1466	138	100.45	Active	
		0.234	1540	22	3352	204	-7.26	Inactive	
		0.117	1454	32	3401	146	-15.25	Inactive	
1.	มังคุด	50.00	1468	28	1188	15	116.59	Active	12.50-25.00
2.	พริกไทย	50.00	1548	69	1393	21	109.16	Active	50.00

การอภิปรายผล

จากผลการทดสอบดังในตารางที่ 4 พบว่าสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) และผลของพริกไทย (*Piper nigrum* L.) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค (*M. tuberculosis* H_{37} Ra) ด้วยการทดสอบด้วยวิธีการตัดต่อโปรตีนเรืองแสงสีเขียวหรือโปรตีนจีเอฟพี (Green Fluorescent Protein (GFP) โดยมีค่า MIC_{90} เท่ากับ 12.50-50.00 และ 50.00 µg /ml ตามลำดับ ซึ่งเทคนิคนี้มีข้อดีคือช่วยให้ขั้นตอนการทดสอบตัวยากับเชื้อทำได้เร็วขึ้นและสามารถทดสอบเชื้อได้หลายชนิดพร้อมกัน

โดยจากรายงานการวิจัยพบว่าสารกลุ่มพรีนิลแซนโทน (prenylated xanthones) ซึ่งได้แก่ α และ β - Mangostin, Garcinone B ที่สกัดจากเมทานอลของเปลือกผลมังคุด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *M. tuberculosis* H_{37} Ra ด้วยวิธีการทดสอบ Microplate Alamar Blue Assay (MABA) ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 6.25, 6.25 และ 25.00 µg /ml ตามลำดับ (Suksamrarn, S., et al., 2003, Copp, B. R., et al., 2007) ส่วนสารสกัดจากเมทานอลของผลพริกไทยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *M. tuberculosis* H_{37} Rv ใช้การทดสอบด้วยวิธี Tetrazolium microplate assay ซึ่งมีค่ามี MIC เท่ากับ 1,600 µg /ml (Mohamad, S., et al., 2011) จากรายงานการวิจัยพบการศึกษาเกี่ยวกับสารบริสุทธิ์ piperine (ดังภาพที่ 2) ที่สกัดแยกได้จากผลของพริกไทยโดยการนำมาใช้รักษาผู้ป่วยวัณโรคร่วมกับยาแผนปัจจุบันเพื่อเพิ่มฤทธิ์ในการรักษาหรือลดปริมาณการให้หรือใช้ยาแผนปัจจุบันลง พบว่าสาร piperine ช่วยเพิ่มฤทธิ์ในการรักษาร่วมกับยา rifampicin ได้ประมาณ 60% และช่วยลดปริมาณการใช้ยาจาก 450 mg ไปเป็น 200 mg นอกจากนี้สาร piperine ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของฤทธิ์ในการรักษาเมื่อใช้ร่วมกับยาต้านเชื้อเอชไอวี nevirapine ซึ่งเป็นยาในกลุ่มของ non-nucleotide inhibitor ของการยับยั้งเชื้อ HIV-1 reverse transcriptase ซึ่งในผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรคมักพบผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HV-1 ร่วมด้วย (Tatiraji, D. V., et al., 2013, Dudhatra, G. B., et al., 2012)



ภาพ 2 แสดงโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ Piperine

จากข้อมูลการค้นคว้าการศึกษาวิจัยเบื้องต้นดังที่กล่าวมาข้างต้นจึงสรุปได้ว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดและผลของพริกไทยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค (*M. tuberculosis* H_{37} Ra) ซึ่งเป็นสมุนไพรที่หาได้ง่ายและมีความน่าสนใจที่จะนำสารบริสุทธิ์หรือนำสารสกัดที่ได้จากเปลือกมังคุดและผลพริกไทยมาใช้ร่วมกันกับยาในแผนปัจจุบันเพื่อช่วยเพิ่มฤทธิ์ของยาในการรักษาผู้ป่วย, ลดปริมาณของขนาดหรือจำนวนการให้หรือการใช้ยาแผนปัจจุบันแก่ผู้ป่วย, ลดต้นทุนประหยัดค่าใช้จ่ายในใช้ยาแผนปัจจุบัน อีกทั้งยังช่วยลดปัญหาหรืออันตรายและผลข้างเคียงจากการใช้ยาแผนปัจจุบันของผู้ป่วยได้

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการศึกษาวิจัยนี้มีข้อจำกัดเกี่ยวกับระยะเวลาการศึกษาทดลองในแต่ละขั้นตอน โดยกว่าจะศึกษาจนได้เป็นผลิตภัณฑ์อาจต้องใช้ระยะเวลาพอสมควร รวมถึงการมีผู้เชี่ยวชาญในแต่ละสาขาวิจัยเพื่อร่วมดำเนินการต่อยอดการผลิต ซึ่งจากผลของการศึกษาวิจัยที่ได้ในครั้งนี้สามารถนำไปใช้เพื่อต่อยอดการผลิตได้ (ในด้านอุตสาหกรรมยาเพื่อตั้งสูตรตำรับยา) เพื่อให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรผสมผสานร่วมกับยาแผนปัจจุบัน นอกจากการทดสอบวิเคราะห์ให้มีอัตราส่วนของยาที่ใช้ในขนาดที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรคแล้ว ยังสามารถให้เกิดประโยชน์แก่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีได้ร่วมด้วยต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงสาธารณสุข. (2551). *แนวทางการดำเนินงานควบคุมวัณโรคแห่งชาติ* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

กำพล สุวรรณพิมลกุล และคณะ. (2553). *Current topics in infection diseases* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

คณะกรรมการพัฒนาระบบเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมวัณโรคของสำนักการแพทย์. (2550). *คู่มือแนวทางการดำเนินงานด้านวัณโรคสำนักการแพทย์*. กรุงเทพฯ: ผู้แต่ง.

ดำเกิง ตันธรรมจาริก. (2548). *วัณโรคปอด*. ค้นจาก http://www.vichaiyut.co.th/ jul/30_01-2548/30_01-2548_P51-52.pdf

วงการแพทย์. (2556). *ไทยรุกปราบวัณโรค ตายน้อยกว่า 5 ขาดยาเป็น 0*. ค้นจาก http://www.wongkarnpat.com/viewpat.php?id=116

สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุล และคณะ. (2547). *ภาวะติดเชื้อ Molecular / Cellular and Clinical Basis*. กรุงเทพฯ: เม็ดทรายพริ้นติ้ง.

อุดมวิชช์ พลเยี่ยม, ภานุภัทร ตางาม และอมรรัตน์ ทองน้อย. (2551). *การสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพร*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล.

Arya, V. (2011). A review on anti-tubercular plants. *International Journal of Pharmtech Research, 3*(2), 872-880.

Aşkun, T., Başer, K. H. C., Tümen, G. & Kürkçüoğlu, M. (2010). Characterization of essential oils of some *Salvia* species and their antimycobacterial activities. *Turkish Journal of Biology, 34*(1), 89-95.

Askun, T., Tumen, G., Satil, F., Modanlioglu, S. & Yalcin, O. (2012). *Antimycobacterial activity some different Lamiaceae plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds*. Retrieved from http://www.intechopen.com/books/understanding-tuberculosis-new-approaches-to-fighting-against-drug-resistance/antimycobacterial-activity-some-different-lamiaceae-plant-extracts-containing-flavonoids-and-other-p

Çarikçi, S., ÇÖl, Ç., Kihç, T. & Azizoğlu, A. (2007). Diterpenoids from sideritis tmolea P.H. Davis. *Records of Natural Products, 1*(4), 44-50.

Charoenying, P., Laosinwattana, C., Phuwiwat, W. & Lomratsiri, J. (2008). Biological activities of Zanthoxylum limonella Alston fruit extracts. *KMITL Science Journal, 8*(1),12-15.

Copp, B. R. & Pearce, A. N. (2007). Natural product growth inhibitors of Mycobacterium tuberculosis. *Natural Product Reports, 24*(1), 278-297.

Dipiro, J. T., et al. (2005). *Pharmacotherpy a pathophysiologic approach* (6th ed.). New York: The Mc Graw-Hill.

Dudhatra, G. B., Mody, S. K., Awale, M. M., Patel, H. B., Modi, C. M., Kumar, A., Kamani, D. R. & Chauhan, B. N. (2012). A comprehensive review on pharmacotherapeutics of herbal bioenhancers. *Scientific World Journal, 20*(2), 1-33.

Earl, E. A., Altaf, M., Murikoli, R. V., Swift, S. & O'Toole, R. (2010). Native New Zealand plants with inhibitory activity towards Mycobacterium tuberculosis. *BMC Complementary and Alternative Medicine, 10*(25), 1-7.

Ferreira, U. M. J., Luo, X., Pires, D., Aínsa, J., Gracia, B., Duarte, N., Mulhovo, S. & Anes, A. (2012). Searching for natural antituberculars from mozambican medicinal plants. *IICT - JBT, 8*(1), 1-10.

Gupta, V. K., Fatima, A., Faridi, U., Negi, A. S., Shanker, K., Kumar, J. K., Rahuja, N., Luqman, S., Sisodia, B. S., Saikia, D., Darokar, M. P. & Khanuja, S. P. S. (2008). Antimicrobial potential of Glycyrrhiza glabra roots. *Journal of Ethnopharmacology, 116*(1), 377-380.

Kittakoop, P., Wanasith, S., Watts, P., Kramyu, J., Tanticharoen, M. & Thebtaranonth, Y. (2001). Potent antiviral potamogetonyde and potamogetonol, New furanoid labdane diterpenes from *Potamogeton malaianus. Journal of Natural Products. 64*(3). 385-388.

Kumar, V., et al. (2010). *Robbins and Cotan Pathologic Basis of Disease*. (8th ed.). China: Sauders Elsever.

Mohamad, S., Zin, N. M., Wahab, H. A., Ibrahim, P., Sulaiman, S. F., Zahariluddin, A. S. M. & Noor, S. S. M. (2011). Antituberculosis potential of some ethnobotanically selected Malaysian plants. *Journal of Ethnopharmacology, 133*(1), 1021-1026.

Sehgal, J., Siddheswaran, P., Kumar, K. L. S & Karthiyayini, T. (2010). Anti-tubercular activity of fruits of Prunus armeniaca (L.). *International Journal of Pharma and Bio Sciences, 1*(2), 1-4.

Suksamrarn, S., Suwannapoch, N., Phakhodee, W., Thanuhiranlert, J., Ratananukul, P., Chimnoi, N. & Suksamrarn, A. (2003). Antimycobacterial activity of prenylated xanthones from the fruits of Garcinia mangostana. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 51*(7), 857-859.

Tatiraji, D. V., Bagade, V. B., Karambelkar, P. J., Jadhav, V. M. & Kadam, V. (2013). Natural bioenhancers: An overview. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2*(3), 55-60.

Walker, R. & Whittlesea, C. (2012). *Clinical Pharmacy and Terapeutics*. (5th ed). China: Elsevier.

Translated Thai References

Medical Profession. (2013). Thai anti-tuberculosis. Retrieved from http://www.wongkarnpat.com/viewpat.php?id=116

Ministry of Public Health. (2008). National anti-tuberculosis measure (2nd ed.). Bangkok: The Agricultural Co-operative Federation of Thailand.

National anti-tuberculosis committee. (2007). A guide of anti-tuberculosis for medicine department. Bangkok: Author

Ponyaim, U., Tangam, P. & Thongnoi, A. (2008). Herb extraction and biological activities. Bangkok: Ratchamangkala University.

Suwanpimolkul, K., et al. (2010). *Current topics in infection diseases* (2nd ed.). Bangkok: Chulalongkorn University.

Tunthummajarik, D. (2005). Tuberculosis. Retrieved from http://www.vichaiyut.co.th/ jul/30_01-2548/30_01-2548_P51-52.pdf

Wattanasirichaikul, S., et al. (2004). *Infect with Molecular / Cellular and Clinical Basis*. Bangkok: Med-Sai.