

ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้ออะแคนทามีบาอะซีสต์ ของสารสกัดเมทานอลจากสบู่ดำ

ปณณวิชญ์ สิริเวชวิริยะ นันทนัทช์ มุขระโกษา อรอำไพ จำภา

สาขาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา

Received: February 19, 2020

Revised: March 24, 2020

Accepted: June 16, 2020

บทคัดย่อ

อะแคนทามีบาเป็นเชื้อโปรโตซัวฉวยโอกาสที่สามารถทำให้เกิดโรครุนแรงในคนได้ เช่น เยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิด Granulomatous Amoebic Encephalitis นอกจากนี้ ยังสามารถทำให้เกิดโรคกระจกตาอักเสบ (Acanthamoeba keratitis, AK) ส่วนมากจะพบการเกิดโรคในคนที่สวมคอนแทคเลนส์ และเกิดการติดเชื้อได้ง่ายในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง การศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสบู่ดำ ในการฆ่าเชื้ออะแคนทามีบาอะซีสต์ โดยผสมซีสต์ของเชื้อให้มีความเข้มข้น 7×10^4 ซีสต์ต่อมิลลิลิตร แล้วทดสอบสารสกัดด้วยเมทานอลจากรากสบู่ดำและ 1% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของซีสต์ตั้งแต่เวลา 1 ถึง 24 ชั่วโมงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากรากสบู่ดำที่ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง และความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถทำลายเชื้ออะแคนทามีบาอะซีสต์ได้อย่างสมบูรณ์ และค่าการฆ่าซีสต์ของเชื้ออะแคนทามีบาได้ในอัตราร้อยละ 50 (LC50) ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 303 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 245 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากรากสบู่ดำด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ในการทำลายซีสต์ของเชื้ออะแคนทามีบา

คำสำคัญ: อะแคนทามีบา สบู่ดำ ทำลายซีสต์ รากสบู่ดำ ประสิทธิภาพการฆ่าซีสต์ สกัดด้วยเมทานอล

ผู้นิพนธ์ประสานงาน:

ปณณวิชญ์ สิริเวชวิริยะ

สาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยพะเยา

19 หมู่ 2 ต.แม่กา อ.เมือง จ.พะเยา 56000

อีเมล: pannawich.si@up.ac.th

Cysticidal efficacy of methanolic extract from *Jatropha curcas* on *Acanthamoeba* spp.

Pannawich Siriwechviriya, Nannaphat mooktharakhosa, Ornampai Japa

Microbiology and Parasitology Division, School of Medical Science, University of Phayao

Abstract

Introduction: *Acanthamoeba* is an opportunistic protozoon causing granulomatous amoebic encephalitis and amoebic keratitis (AK). Humans can be infections with a serious symptom especially contact lens wearers and immunocompromised patients. This study aimed to evaluate the cysticidal efficacy of methanolic extract of *Jatropha curcas* on *Acanthamoeba* spp. *Acanthamoeba* cyst-containing suspension of 7×10^4 cysts/ml was treated with methanolic extract of *J. curcas* and 1% sodium hypochlorite for 1 to 24 hours to determine the minimal cysticidal concentration of each disinfectant. Inverted phase-contrast microscopy was used to observe the morphologic changes. The minimum concentration methanolic extract of *J. curcas* root for 12 and 24 hours were 400 and 300 µg/ml, respectively. And, lethal concentration values which causes the death of 50% for 12 and 24 hours were 303 and 245 µg/ml respectively. The results show that, methanolic extract of *J. curcas* root can make a damage to *Acanthamoeba* cyst.

Keywords: *Acanthamoeba* spp., *Jatropha curcas*, cysticidal, *J. curcas* root, cysticidal efficacy, methanolic extracts

Corresponding Author:

Pannawich Siriwechviriya

Microbiology and Parasitology Division, School of Medical Science,
University of Phayao

19 Moo.2, Mae Ka, Muang Phayao, Phayao, 56000

E-mail: pannawich.si@up.ac.th

บทนำ

Acanthamoeba spp. เป็นเชื้อโพรโตซัวเซลล์เดียวชนิดหนึ่งที่สามารถดำรงชีพอิสระได้ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ ตามธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ และติดอยู่กับฝุ่นละอองลอยไปในอากาศ¹ ในวงจรชีวิตของเชื้อ *Acanthamoeba* spp. จะประกอบไปด้วย 2 ระยะ คือระยะ โทรโฟซอยต์ (trophozoite) เป็นระยะที่มีการกินอาหาร แบ่งตัว และเคลื่อนที่ด้วยเท้าเทียมที่มีลักษณะคล้ายหนาม และระยะซิสต์ (cyst) เป็นระยะที่ไม่มีการกินอาหารมีการสร้างผนังขึ้นมาห่อหุ้มนิเคลียสเอาไว้ ในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถจัดจำแนกได้โดยดูลักษณะของซิสต์แบ่งได้ 3 กลุ่ม² นอกจากนี้ในการศึกษาทางด้านพันธุกรรมของเชื้อเพื่อจัดจำแนกกลุ่มที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคได้มากถึง 15 กลุ่ม (T1-T15)^{3,4} *Acanthamoeba* spp. สายพันธุ์ก่อโรคเมื่อติดเชื้อ เชื้อจะเข้าไปทำลายระบบประสาทส่วนกลางของมนุษย์ เป็นสาเหตุของภาวะเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิด Granulomatous amoebic Encephalitis (GAE) ทำให้เสียชีวิตได้⁵ ในปัจจุบันยังพบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อและก่อโรครดังกล่าวได้ค่อนข้างน้อย แต่พยาธิสภาพขณะเกิดโรคจะมีความรุนแรงมากเมื่อเทียบกับการเกิดโรคจากการติดเชื้อชนิดอื่นๆ โดยลักษณะและอาการของโรคมักมีความคล้ายคลึงกับโรคที่ติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัสทำให้ยากต่อการวินิจฉัย ผู้ติดเชื้อมักได้รับการวินิจฉัยที่ล่าช้า ส่งผลให้เกิดการติดเชื้อรุนแรงและอัตราการเสียชีวิตสูง^{6,7} *Acanthamoeba* spp. ยังทำให้เกิดโรคได้กับอวัยวะอื่นๆ อีก เช่น การเกิดการติดเชื้อที่ผิวหนังทำให้เกิดการอักเสบรุนแรงแบบเฉียบพลันซึ่งจะเกิดขึ้นได้ในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง⁸⁻¹⁰ นอกจากนี้ ยังสามารถทำให้เกิดโรคกระจกตาอักเสบ (*Acanthamoeba* keratitis, AK) ส่วนมากจะพบการเกิดโรคในคนที่สวมคอนแทคเลนส์ โดยเชื้อจะทำให้เกิดการอักเสบที่กระจกตาและจะทำลายกระจกตาทำให้ผู้ป่วยส่วนใหญ่สูญเสียดวงตาไปในที่สุด¹¹

ปัจจุบันในประเทศไทย มีการใช้คอนแทคเลนส์มากขึ้น ทั้งในแง่ของทางการแพทย์สำหรับคนที่มีความผิดปกติทางสายตา นอกจากนี้ ยังมีการใช้คอนแทคเลนส์เพื่อความสวยงาม ทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการเกิด *Acanthamoeba* keratitis ได้มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้คอนแทคเลนส์ที่ไม่ได้มาตรฐานการผลิต และการขาดสุขอนามัยที่ดี จากรายงานงานวิจัยที่ผ่านมาของ *Acanthamoeba* spp. พบว่าเริ่มมีการติดต่อยาเพิ่มขึ้น^{12,13} ซึ่งส่งผลให้ยากต่อการรักษา ดังนั้น การป้องกันที่ดีคือ การป้องกันการติดเชื้ออันเกิดมาจากการสวมใส่คอนแทคเลนส์ที่ปลอดภัย งานวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาผลของสารสกัดจากรากสบู่ดำในการฆ่าเชื้ออะแคนทามิบาในระยะซิสต์

วัตถุประสงค์

การศึกษานี้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากรากสบู่ดำ ในการฆ่าเชื้ออะแคนทามิบาในระยะซิสต์

วิธีการศึกษา

การเตรียมเชื้ออะแคนทามิบา

เชื้ออะแคนทามิบาที่ใช้ในการศึกษาได้จากการสำรวจภาคสนามในจังหวัดพะเยา ทำการเพาะเลี้ยงคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ชนิดหัวกลับ (Olympus CKX53) ภายในห้องปฏิบัติการคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Non-Nutrient Agar (NNA) ที่ฉาบด้วยเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้อ่อนแรงด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วันเพื่อให้เชื้ออะแคนทามิบาเป็นระยะซิสต์

การเตรียมรากสบู่ดำ

เก็บรวบรวมรากสบู่ดำ จากตำบลประดู่ยืน อำเภอลานสภก จังหวัดอุทัยธานี นำรากสบู่ดำมาล้างให้สะอาด แล้วผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ด้วยตู้อบความร้อน (Jeiotech

รุ่น OF-22G) เป็นเวลานาน 2 วัน หลังจากนั้นนำ รากสบูดำที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียดเก็บใส่ขวดสีชา ปิดให้มิดชิดเพื่อป้องกันความชื้นก่อนจะนำมาใช้ ในขั้นตอนการสกัด

การเตรียมสารสกัดรากสบูดำ

ตัวอย่างที่ผ่านการอบและบดละเอียดแล้ว นำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย เมทานอล 99.8% โดยชั่ง ตัวอย่างที่บดแล้วใส่ลงในขวดสีชาขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาณ 50 กรัมต่อขวด จากนั้นเติมตัวทำละลายใน ปริมาตร 250 มิลลิลิตร (อัตราส่วนของตัวอย่างต่อ ตัวทำละลาย เท่ากับ 1 ต่อ 5) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำมากรองเอาส่วนของเหลว ออกจากกากด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 (whatman) นำสารสกัดที่ได้เข้าเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบ สูญญากาศ (evaporator รุ่น Heidolph Laborota 400/HB/G3) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเร็ว รอบ 60 รอบ/นาที เพื่อทำการแยกตัวทำละลายออก จากนั้นนำสารสกัดที่ได้เข้าเครื่อง Freeze dryer (Scam รุ่น Vac CoolSafe 110-4 Pro) เพื่อให้ สารสกัดแห้งและเก็บสารสกัดไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การทดสอบฤทธิ์การทำลายเชื้ออะแคนทามีบา ระยะซิสต์

เตรียมสารสกัดจากรากสบูดำด้วย 0.5% DMSO ให้มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 400 และ 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เตรียมสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในถาดหลุมเลี้ยงเชื้อขนาด 12 หลุมต่อถาด (12 wells plate) โดยหลุมที่ 1 เติมความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเพิ่มขึ้นในอัตราหลุมละ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (n+50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จนถึงหลุมที่เติมความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ตามลำดับ เติม 0.5% Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 11 โดย

ให้เป็น negative control และเติม 1% sodium hydroxide ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 12 โดยให้เป็น positive control หลังจากนั้นนำซิสต์ที่ ปรับความเข้มข้น 7×10^4 ซิสต์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในทุกหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจหา ซิสต์ที่ถูกทำลายด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Olympus CKX53) เมื่อครบเวลาที่ 12 และ 24 ชั่วโมง ตรวจสอบอัตราการตายของซิสต์ด้วยการ ย้อมสีทริปเพน บลู (Trypan Blue) แล้วนำมาวิเคราะห์ คำนวณหาค่า LC50 โดยใช้วิธีแบบโพรบิท (Probit Analysis)

การพิสูจน์การทำลายซิสต์ของเชื้ออะแคนทามีบา ด้วยวิธี culture media

ดูต่อเนื่องจากการทดลองก่อนหน้านี้ไป เพาะเลี้ยงบนอาหาร non-nutrient agar ที่ swab เชื้อ *Escherichia coli* ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และบันทึกผลเป็นเวลา 7 วัน

ผลการศึกษา

การสกัดรากสบูดำ

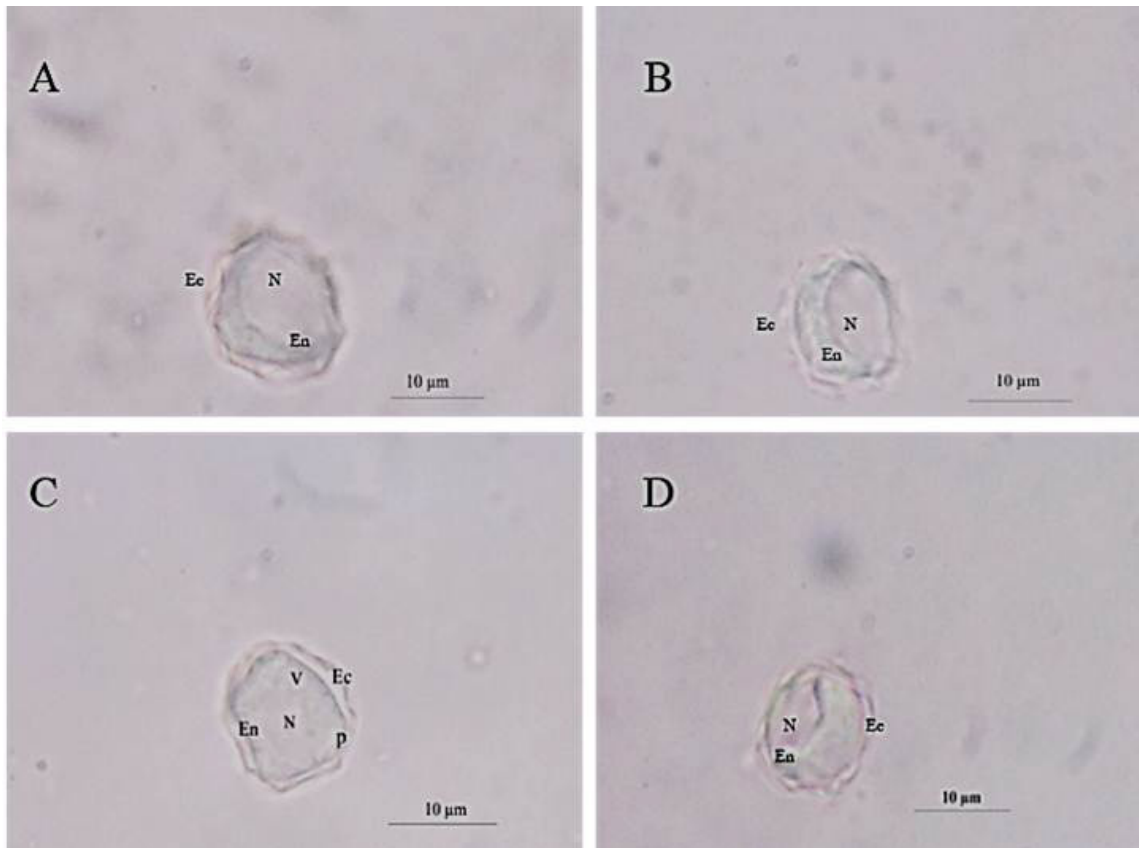
การสกัดสมุนไพรรากสบูดำด้วยตัวทำละลาย เมทานอล 99.8% มีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้คือ 5.12% โดยสารสกัดที่ได้มีลักษณะหนืดหลังจากระเหิดแห้ง แล้วจะได้ผลึกสีเหลืองอมน้ำตาล

ผลการทดสอบการทำลายเชื้ออะแคนทามีบา ระยะซิสต์

ผลทดสอบฤทธิ์การทำลายเชื้ออะแคนทามีบา ระยะซิสต์ ของสารสกัดหยาบจากรากสบูดำ โดยใช้ เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้นและ เวลาต่างกัน พบว่าสารสกัดหยาบจากรากสบูดำ ที่ความเข้มข้น 400, 450 และ 500 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 300, 350, 400, 450 และ 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่เวลา

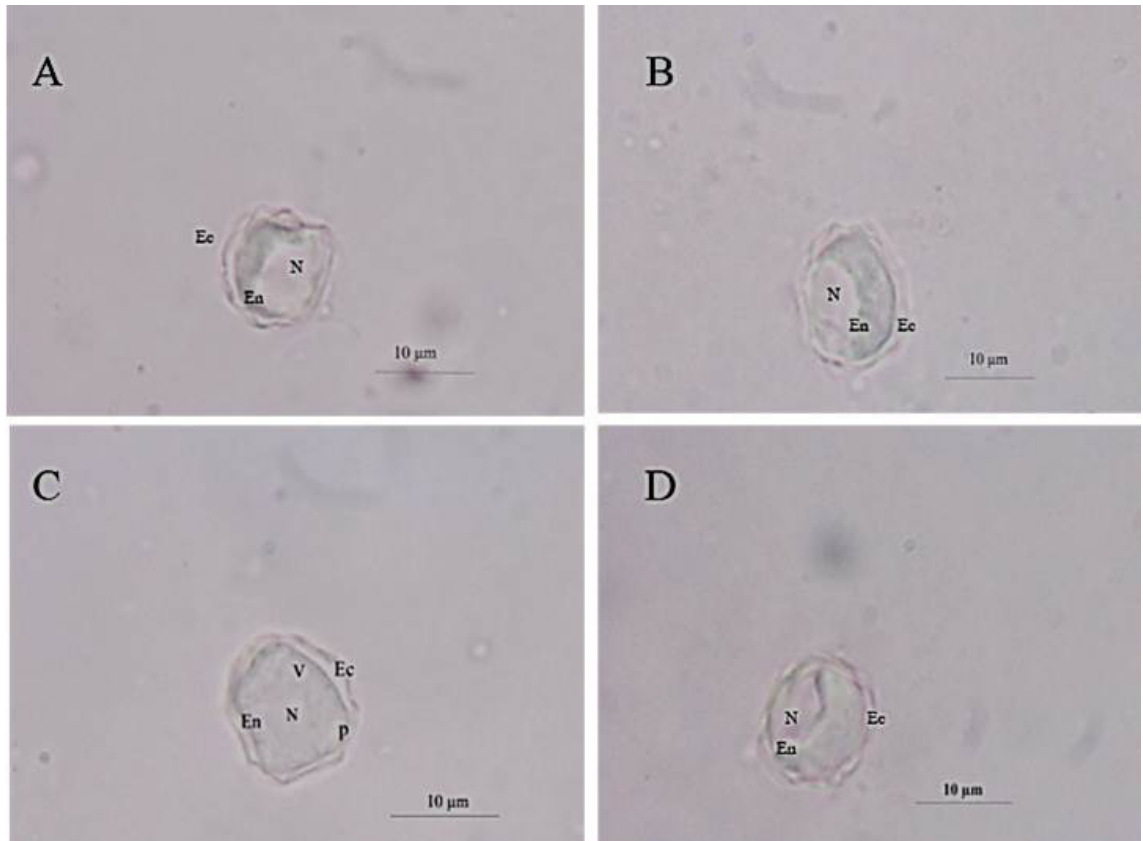
24 ชั่วโมง สามารถทำลายเชื้ออะแคนทามีบาอะเยชีสต์ เมื่อเทียบกับสารที่ใช้เป็นตัวควบคุม 1% sodium hypochlorite เป็น positive control และใช้ 0.5% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) เป็น negative

control พบเชื้ออะแคนทามีบาอะเยชีสต์ ถูกทำลายด้วย 1% sodium hypochlorite ในขณะที่ 0.5% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ไม่มีฤทธิ์ทำลายเชื้ออะแคนทามีบาอะเยชีสต์ (รูปที่ 1-2)



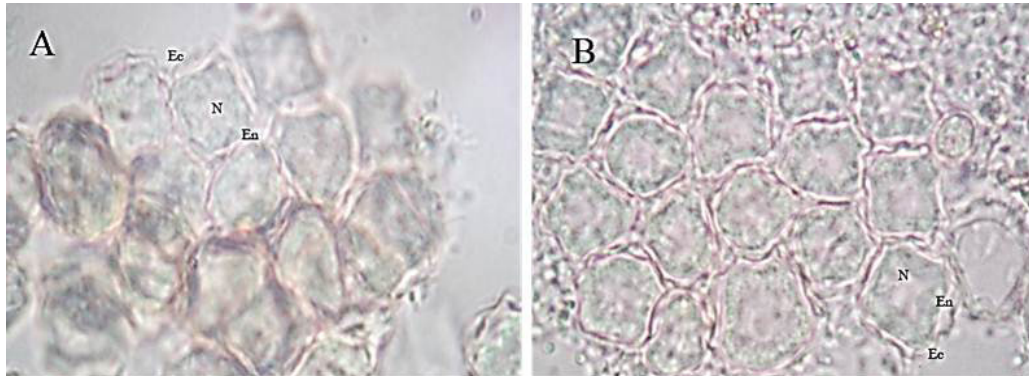
รูปที่ 1 แสดงลักษณะการทำลายเชื้ออะแคนทามีบาอะเยชีสต์ ของสารสกัดหยาดจากรากสบู่ดำ ที่เวลา 12 ชั่วโมง (A) ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นิวเคลียสของชีสต์หดตัวลง เกิดช่องว่างของผนังชั้นนอก (Ec) และผนังชั้นใน (En) ของชีสต์เพิ่มขึ้นและขนาดของชีสต์เท่ากับชีสต์ปกติ, (B) ความเข้มข้น 450 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นิวเคลียสของชีสต์หดตัวลง เกิดช่องว่างของผนังชั้นนอก (Ec) และผนังชั้นใน (En) ของชีสต์เพิ่มมากขึ้นและขนาดของชีสต์หดเล็กลงกว่าชีสต์ปกติ, (C) negative control (0.5% DMSO) ชีสต์ปกติไม่มีการเปลี่ยนแปลง, (D) positive control (1% sodium hypochlorite) นิวเคลียสของชีสต์หดตัวลง เกิดช่องว่างของผนังชั้นนอก (Ec) และผนังชั้นใน (En) ของชีสต์เพิ่มมากขึ้นและขนาดของชีสต์หดเล็กลงกว่าชีสต์ปกติ

*En = endocyst, Ec = ectocyst, N = nucleus, P = pore, V = vacuole



รูปที่ 2 แสดงลักษณะการทำลายเชื้ออะแคนทามีบาระยะซิสต์ ของสารสกัดหยาบจากรากสบู่ดำ ที่เวลา 24 ชั่วโมง (A) 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นิวเคลียสของซิสต์หดตัวลง เกิดช่องว่างของผนังชั้นนอก (Ec) และผนังชั้นใน (En) ของซิสต์เพิ่มมากขึ้นและขนาดของซิสต์หดเล็กลงกว่าซิสต์ปกติ, (B) ความเข้มข้น 350 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นิวเคลียสของซิสต์หดตัวลง เกิดช่องว่างของผนังชั้นนอก (Ec) และผนังชั้นใน (En) ของซิสต์เพิ่มมากขึ้นและขนาดของซิสต์หดเล็กลงกว่าซิสต์ปกติ, (C) negative control (0.5% DMSO) ซิสต์ปกติไม่มีการเปลี่ยนแปลง, (D) positive control (1% sodium hypochlorite) นิวเคลียสของซิสต์หดตัวลง เกิดช่องว่างของผนังชั้นนอก (Ec) และผนังชั้นใน (En) ของซิสต์เพิ่มมากขึ้นและขนาดของซิสต์หดเล็กลงกว่าซิสต์ปกติ

*En = endocyst, Ec = ectocyst, N = nucleus, P = pore, V = vacuole



รูปที่ 3 แสดงซีสต์ที่เกาะกลุ่มกันหลังจากนำไปทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 450 mg/ml หลังจากนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร non-nutrient agar ที่ swab เชื้อ *Escherichia coli* ไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน, (A) ที่เวลา 24 ชั่วโมง, (B) 1% sodium hypochlorite ที่เวลา 24 ชั่วโมง และทั้งสองการทดสอบซีสต์ไม่มีการเปลี่ยนเป็นระยะโทรโฟซอยต์

*En = endocyst, Ec = ectocyst, N = nucleus, P = pore, V = vacuole

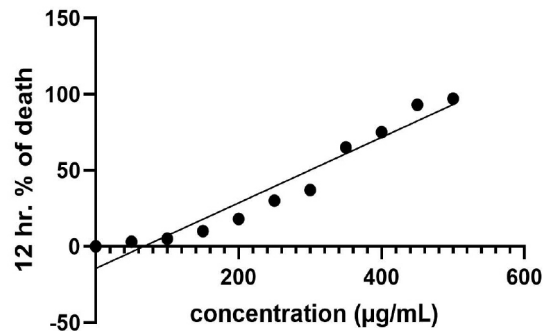
ผลการพิสูจน์เพื่อยืนยันทำลายซีสต์ของเชื้ออะแคนทามิบา ด้วยวิธี culture media

จากการทดสอบการทำลายเชื้ออะแคนทามิบา ระยะซีสต์ของสารสกัดหยาบจากรากสบู่ดำ โดยนำผลการทดสอบที่สามารถทำลายซีสต์ได้ มาเลี้ยงด้วยวิธี culture media บนอาหาร non-Nutrient agar ที่ swab ด้วยเชื้อ *E. coli* บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Olympus CKX53) พบว่าซีสต์มีการเกาะกลุ่มกันเป็นจำนวนมากและไม่สามารถเจริญเป็นระยะโทรโฟซอยต์ (trophozoite) ได้

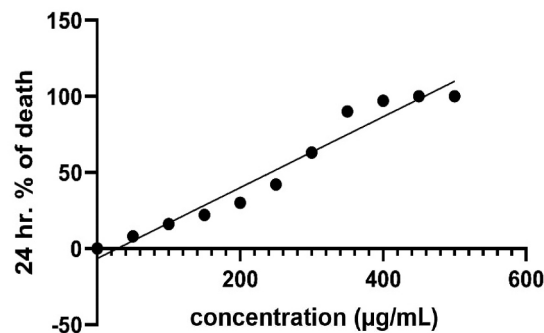
การวิเคราะห์ทางสถิติ

จากข้อมูลอัตราการตายของซีสต์นำมาวิเคราะห์โดยใช้วิธี Probit Analysis ซึ่งพัฒนาให้สะดวกขึ้นโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยในการวิเคราะห์ได้ค่า LC50 ที่เวลา 12 ชั่วโมงเท่ากับ 303 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ LC50 ที่เวลา 24 ชั่วโมงเท่ากับ 245 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 4)

A



B



รูปที่ 4 แสดงร้อยละอัตราการตายของชีสต์ของเชื้ออะแคนทามีบาที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง, A: แสดงร้อยละอัตราการตายที่ 12 ชั่วโมงคำนวณค่า LC50 ได้เท่ากับ 303 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, B: แสดงร้อยละอัตราการตายที่ 24 ชั่วโมงคำนวณค่า LC50 ได้เท่ากับ 245 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

อภิปรายผล

จากการสกัดรากสบู่ดำด้วยเมทานอล แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการทำลายเชื้ออะแคนทามีบาระยะชีสต์ เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถทำลายชีสต์ได้ในเวลาต่างกัน ซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยสารสกัดจากรากสบู่ดำที่ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 0.4 ของน้ำหนักสารต่อปริมาตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง และความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 0.3 ของน้ำหนักสารต่อปริมาตร

ที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถทำลายเชื้ออะแคนทามีบาระยะชีสต์ได้ โดยชีสต์ของเชื้ออะแคนทามีบา จะมีการเสียสภาพอย่างถาวร โดนผนังชีสต์ด้านนอก (ectocyst) มีรอยย่น และผนังชีสต์ด้านใน (endocyst) จะหดตัวและนิวเคลียสภายในมีการหดตัวเล็กลง ช่องว่างระหว่างผนังชั้นใน (endocyst) และ cell membrane จะมีการหดตัวและแยกออกจากกัน ชัดเจน จากรายงานการศึกษาสารสกัดจากรากสบู่ดำพบว่าในเปลือกกรากสบู่ดำประกอบไปด้วยสารในกลุ่ม phenolic, flavonoids, saponin, pynogallol

phorbol ester และสาร curcun ที่อยู่ในรากสบู่ดำ มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีน¹⁴ สอดคล้องกับ Sangsuwon และคณะ ได้ศึกษาสารสกัดจาก *Peperomia pellucida* โดยทดสอบกับเชื้อ อะแคนทามีบาอะเยซีสต์ พบว่าสามารถทำลายซีสต์ของเชื้อดังกล่าวได้โดยสามารถฆ่าซีสต์ได้ร้อยละ 50 (LC50) ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 29.28±3.6415 ของน้ำหนักสารต่อปริมาตร ซึ่งสารประกอบที่พบคือ สารกลุ่ม phenolic compound ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญ ที่สร้างความเสียหายให้กับ plasma membrane และส่งผลทำให้เกิดการรั่วไหลของสารภายในเซลล์ และยังทำหน้าที่เป็นตัวออกซิไดซ์โดยเกิดปฏิกิริยาที่โปรตีน, ไขมัน, กรดนิวคลีอิกและคาร์โบไฮเดรต จากการศึกษาผลการทำลายเชื้ออะแคนทามีบาอะเยซีสต์ด้วยสารสกัดรากสบู่ดำ โดยยืนยันผลด้วยวิธี culture media พบว่าซีสต์มีลักษณะเกาะกันเป็นกลุ่มและไม่สามารถพัฒนาไปเป็นระยะโทรโฟซอยต์ได้ พบว่ามีความสอดคล้องกับการศึกษาการทำลายเชื้ออะแคนทามีบาอะเยซีสต์ ด้วยคลอรีนที่ความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) 0.5-3.5 มิลลิกรัม/ลิตร และความเข้มข้นสูงสุด 1.5-8.5 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าซีสต์มีการเกาะกันเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ ซึ่งเกิดจากผลของคลอรีนที่ทำลาย cyst membrane ของเชื้ออะแคนทามีบา¹⁶ จะเห็นได้ว่ามีค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำกว่ามากเมื่อเทียบกับการศึกษาครั้งนี้เนื่องจากคลอรีนมีความเป็นพิษสูง จากผลการวิจัยครั้งนี้สารสกัดรากสบู่ดำโดยใช้เมทานอลเป็นตัวสกัด สามารถทำลายอะแคนทามีบาอะเยซีสต์ได้ และมีความสามารถที่จะนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการกำจัดซีสต์ของเชื้ออะแคนทามีบาได้ โดยการศึกษาเพิ่มเติมถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ องค์ประกอบของสาร และสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในการฆ่าซีสต์ของอะแคนทามีบา รวมถึงวิธีการสกัดสารให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ในอนาคต

สรุปผล

สารสกัดจากรากสบู่ดำมีสารที่ออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้ออะแคนทามีบาระยะซีสต์ โดยพบว่า ที่ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง และความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถทำลายเชื้ออะแคนทามีบาระยะซีสต์ได้อย่างสมบูรณ์ และค่าการฆ่าซีสต์ได้ในอัตราร้อยละ 50 (LC50) ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 303 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 245 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่สนับสนุนทุนวิจัยและเอื้อเพื่อ สถานที่พร้อมอุปกรณ์ต่างๆ ตลอดโครงการวิจัยในครั้งนี้

References

1. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. Clin Microbiol Rev 2003;16(2):273-307.
2. Pussard M. Morphology of free-living amoebas. Importance and principles of study. Ann Soc Belg Med Trop 1974;54(4-5): 249-57.
3. Ledee DR, Booton GC, Awwad MH, et al. Advantages of using mitochondrial 16S rDNA sequences to classify clinical isolates of *Acanthamoeba*. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003;44(3):1142-9.
4. Gast RJ, Ledee DR, Fuerst PA, Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. J Eukaryot Microbiol 1996;43(6):498-504.

5. Sell JJ, Rupp FW, Orrison WW, Jr. Granulomatous amebic encephalitis caused by *Acanthamoeba*. *Neuroradiology* 1997;39(6):434-6.
6. Flores-Maldonado C, Gonzalez-Robles A, Salazar-Villatoro L, et al. *Acanthamoeba* (T4) trophozoites cross the MDCK epithelium without cell damage but increase paracellular permeability and transepithelial resistance by modifying tight junction composition. *Exp Parasitol* 2017;183:69-75.
7. Memari F, Niyati M, Joneidi Z. Pathogenic *Acanthamoeba* T4 Genotype Isolated from Mucosal Tissue of a Patient with HIV Infection: A Case Report. *Iran J Parasitol* 2017;12(1):143-7.
8. Gullett J, Mills J, Hadley K, et al. Disseminated granulomatous *acanthamoeba* infection presenting as an unusual skin lesion. *Am J Med* 1979;67(5):891-6.
9. Tan B, Weldon-Linne CM, Rhone DP, et al. *Acanthamoeba* infection presenting as skin lesions in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117(10):1043-6.
10. Walochnik J, Aichelburg A, Assadian O, et al. Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* amoebae of genotype T2 in a human immunodeficiency virus-negative patient. *J Clin Microbiol* 2008;46(1):338-40.
11. Claerhout I, Kestelyn P. *Acanthamoeba* keratitis: a review. *Bull Soc Belge Ophtalmol* 1999;274:71-82.
12. Seilhamer JJ, Byers TJ. Mutants of *Acanthamoeba castellanii* resistant to erythromycin, chloramphenicol, and oligomycin. *J Protozool* 1978;25(4):486-9.
13. Iovieno A, Oechsler RA, Ledee DR, et al. Drug-resistant severe *Acanthamoeba* keratitis caused by rare T5 *Acanthamoeba* genotype. *Eye Contact Lens* 2010;36(3):183-4.
14. Namuli A, Abdullah N, Sieo CC, et al. Phytochemical compounds and antibacterial activity of *Jatropha curcas* Linn. extracts. *J Med Plants Res* 2011;5(16):3982-90.
15. Sangsuwon C, Jirujchariyakul W, Roongruangchai K. Chemical Constituents and Antiamoebic of Methanolic Fraction from *Peperomia pellucida* (Linn.) Kunth. *Appl Mech Mater* 2014;709:417-21.
16. Ahmad T, Shukla K, Sharma A. K. Effect of chlorine (disinfectant) on viability of pathogenic free-living amoebae. *Indian J Fundamental Appl Life Sci* 2012;2(2):132-7.