

## พิษเฉียบพลันของสารสกัดใบมะรุมต่อปลานิลแดง

Acute Toxicity of Moringa Leaf Extract on Red Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

จิราพร กุลคำ<sup>1</sup> สมิ้ง จำปาศรี<sup>1</sup> กิตติมา วานิชกุล<sup>1</sup> และวารารณณ์ ใจเย็น<sup>1</sup>  
Kulkham, J.<sup>1</sup>, Champasri, S.<sup>1</sup>, Vanichkul, K.<sup>1</sup> and Jaiyen, W.<sup>1</sup>

## Abstract

The aim of this study was to investigate acute toxicity of Moringa Leaf Extract on Red Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Static Bioassay test were exposed to the crude extract concentrations that was 0 (Control), 600, 678, 765, 863, 968 and 1,100 mg/L. Probit analysis was performed for evaluating the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>). The 24-h LC<sub>50</sub> were found to be 792 (746.18-840.63) mg/L. for *O. niloticus*. At 95% confidence of slop function was 1.247 (0.6412-2.4251) mg/L. and safe concentration was 39.6 mg/L. Behavior responses of fish were obtained moringa leaf extract showed loss of equilibrium, restlessness, jerky movements, rapid operculum and 100 percent death were exposed to the crude extract concentrations of 1100 mg/L. Water qualities were the standard level of the water quality used for aquaculture activity.

**Keywords :** Moringa leaf extract, Toxicity, Red Tilapia

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดใบมะรุมต่อปลานิลแดง โดยใช้วิธีชีววิเคราะห์นิ่ง (Static Bioassays) เพื่อหาค่าความเป็นพิษที่ทำให้ปลานิลแดงตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC<sub>50</sub>) ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ใช้สารสกัดใบมะรุม ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 600, 678, 765, 863, 968 และ 1,100 มิลลิกรัมต่อลิตร คำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ปลานิลแดงตายร้อยละ 50 (LC<sub>50</sub>) ด้วยการวิเคราะห์โพรบิต (Probit analysis) พบว่าค่า LC<sub>50</sub> ที่เวลา 24 ชั่วโมง ของปลานิลแดงมีค่าเท่ากับ 792 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความลาดเอียง (Slope function) เท่ากับ 1.247 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าความเข้มข้นที่ปลอดภัย (Safe concentration) ของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมต่อปลานิลแดงเท่ากับ 39.6 มิลลิกรัมต่อลิตร พฤติกรรมการตอบสนองของปลาต่อสารสกัดใบมะรุมโดยการสูญเสียการทรงตัว กระสับกระส่าย ขยับแผ่นปิดเหงือกอย่างรวดเร็ว และตาย 100 เปอร์เซ็นต์ที่ระดับความเข้มข้น 1100 มิลลิกรัมต่อลิตร คุณภาพน้ำอยู่ในระดับปกติของมาตรฐานคุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด

**คำสำคัญ:** สารสกัดใบมะรุม ความเป็นพิษ ปลานิลแดง

## คำนำ

ปลานิลแดงเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เป็นปลากินพืช เลี้ยงง่าย โตเร็ว เนื้อมีรสชาดี และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี จึงทำให้มีความต้องการและความนิยมในบริโภคค่อนข้างสูงขึ้น เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศและต่างประเทศ เกษตรกรจึงนิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย แต่ในระหว่างการเลี้ยงเกษตรกรมักพบปัญหาการเกิดโรคปลา ซึ่งหากเกิดโรคที่รุนแรงก็สามารถสร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรได้ จึงทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่หันมาใชยาปฏิชีวนะมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการตกค้างของยาในปลา และตกค้างในสิ่งแวดล้อม ทั้งยังส่งผลให้มีการสะสมของยาในผู้บริโภค จึงมีความพยายามในการใช้สารสกัดจากใบของพืชสมุนไพรเพื่อช่วยให้ปลาที่เลี้ยง อาศัยอยู่ในน้ำที่มีมลพิษระบบนิเวศสำหรับการเลี้ยงปลา และเพื่อการต่อต้านอนุมูลอิสระ (Sayed และ Hamed, 2017) เพื่อปรับปรุงสุขภาพ และการเจริญเติบโตของปลา (Hamed และ Abdel-Tawwab, 2017) ดังนั้นจึงมีแนวทางการเลือกใช้สมุนไพรที่มีคุณสมบัติและฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อโรคโดยไม่ก่อให้เกิดการตกค้าง

มะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่นกรดอะมิโน กำมะถัน antioxidants, essential oils, alkaloids, terpenoids, steroids และ phenolics (Aly และคณะ, 2016; Elsayed และคณะ, 2015) ปัจจุบันมีงานวิจัยหลายชิ้น ใช้ สารสกัดจากใบมะรุม และเมล็ดมะรุม เพื่อศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบทางพิษวิทยา ความปลอดภัยของมะรุมต่อสัตว์น้ำ (El-Hak และคณะ, 2017; de Sartana Silva และคณะ (2017) นอกจากนั้นยังสามารถนำสารสกัดมะรุมมาใส่ลงในน้ำที่เลี้ยงปลานิลเพื่อลดความเป็นพิษที่เกิดจากสารกำจัดวัชพืช (Pendimethalin) ที่ปนเปื้อนลงในแหล่งน้ำได้ (Tabassum และคณะ, 2015).

<sup>1</sup> สาขาประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี รัษฎบุรี ปทุมธานี 12130

<sup>1</sup> Fisheries Program, Faculty of Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathumthani, 12130

สารสกัดจากใบมะรุมีสรรพคุณที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลายในกิจกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ แต่อันตรายต่อสุขภาพของสัตว์น้ำยังมีการศึกษาน้อยมาก และมีข้อจำกัดที่ผู้ใช้ต้องระวังเป็นอย่างยิ่งโดยเฉพาะความเป็นพิษของสารสกัดใบมะรุ ดังนั้น การศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดใบมะรุต่อปลาไนแดงจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ประโยชน์จากสารสกัดใบมะรุ และหาค่าความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อม (Safe Concentration) เพื่อเป็นแนวทางในการเลี้ยงปลาที่มีคุณภาพ และปลอดภัยช่วยในการกำหนดความเข้มข้น และผลกระทบที่ปลอดภัยของสารสกัดใบมะรุ ต่อคุณภาพน้ำและปริมาณของสารสกัดสามารถนำไปคาดการณ์ได้อย่างปลอดภัยในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

### อุปกรณ์และวิธีการ

การทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดใบมะรุโดยวิธีชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง (Static Bioassay) แบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลอง คือ 1) การทดลองขั้นต้น (Preliminary test) เพื่อหาระดับของสารสกัดใบมะรุที่ทำให้ปลาไนแดงตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และรอด 100 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 24 ชั่วโมง และ 2) การทดลองแบบละเอียด (Full scale test) โดยนำผลจากการทดลองขั้นต้นมากำหนดระดับความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุ โดยใช้ log scale

เตรียมสารสกัดใบมะรุ ด้วยวิธีแช่ขย (maceration) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (stock solution) 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสารสกัดใบมะรุที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล 100 มิลลิกรัม เจือจางด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร เติมน้ำปริมาตร 8 ลิตร ลงในตุ้กระจกขนาด 18x35x23 เซนติเมตร เติมน้ำปริมาตรตามความเข้มข้นที่กำหนด ใส่ปลาไนแดงความยาวเฉลี่ย  $3.03 \pm 0.07$  เซนติเมตร ตู้อะ 10 ตัว งดให้อาหารก่อนเริ่มการทดลอง 24 ชั่วโมง

บันทึกลักษณะการตอบสนอง พฤติกรรมของลูกปลา และอัตราการตายสะสมที่เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นที่ทำให้ปลาไนแดงตายร้อยละ 50 ของจำนวนสัตว์ทดลอง  $LC_{50}$  ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธีวิเคราะห์แบบโพรบิท (Probit analysis) ตามวิธีของ Litchfield and Wilcoxon (1949) และประเมินค่าความเข้มข้นที่ปลอดภัย (Safe concentration) ของสารสกัดใบมะรุที่มีต่อปลาไนแดง ตรวจสอบคุณภาพน้ำบางประการ ได้แก่ อุณหภูมิ (Temperature) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารสกัดใบมะรุ ที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันต่อปลาไนแดง ด้วยเครื่องวัด Multi-Para meter ยี่ห้อ YSI รุ่น 550A ที่ช่วงเวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดใบมะรุต่อปลาไนแดง จากการทดลองขั้นต้น พบว่า ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบมะรุที่ทำให้ปลาไนแดงตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และระดับความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุสูงสุดที่ทำให้ปลาไนแดงรอด 100 เปอร์เซ็นต์ คือ 600 และ 1,100 มิลลิกรัมต่อลิตร และนำค่าที่ได้มากำหนดช่วงระดับความเข้มข้นในการทดลองขั้นละเอียดด้วย log scale ได้ระดับความเข้มข้นในขั้นละเอียด คือ 0 (ชุดควบคุม), 0, 600, 678, 765, 863, 968 และ 1,100 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อนำมาใช้ทดลองพิษเฉียบพลันของสารใบมะรุต่อปลาไนแดง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ระดับความเข้มข้น 0 และ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่พบการตายของปลาไนแดง ที่ระดับความเข้มข้นที่ 678 มิลลิกรัมต่อลิตร ปลาไนแดงตายในชั่วโมงที่ 24 โดยมีอัตราการตายสะสมคิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 765 มิลลิกรัมต่อลิตร ปลาไนแดงเริ่มตายในชั่วโมงที่ 18 และ 24 โดยมีอัตราการตายสะสมคิดเป็น 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 863 มิลลิกรัมต่อลิตร ปลาไนแดงเริ่มตายในชั่วโมงที่ 12, 18 และ 24 คิดเป็นอัตราการตายสะสม 10, 26.6 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 968 มิลลิกรัมต่อลิตรลูกปลาเริ่มแดงมีการตายในชั่วโมงที่ 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ซึ่งคิดเป็นอัตราการตายสะสม 20, 46.6 และ 76.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในระดับความเข้มข้น 1,100 มิลลิกรัมต่อลิตร ลูกปลาเริ่มแดงมีการตายตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6, 12, 18 และ 24 มีอัตราการตาย สะสมคิดเป็น 20, 43.3, 76.6, และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 1, Figure1)

หลังครบ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นที่ทำให้ปลาไนแดงร้อยละ 50 ของ ( $LC_{50}$ ) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 792 (746.18-840.63 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความเข้มข้นที่ปลอดภัย (Safe Concentration) เท่ากับ 39.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการศึกษาของ Kumar และคณะ (2010) พบว่า ความเป็นพิษของสารสกัดใบมะรุที่ทำให้ปลาปลาไนตาย 50 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 96 ชั่วโมง เท่ากับ 124 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากปลาไนแดงมีความอดทนต่อสภาพแวดล้อมสามารถดำรงชีวิตอยู่ในออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำได้ดีกว่าปลาไน อย่างไรก็ตาม Hamed และ Tawwab (2017) กล่าวว่า การเพิ่มสารสกัดใบมะรุลงในน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสามารถลดความเครียดในปลาไนได้ Elsayed และคณะ (2020) รายงานว่าพิษเฉียบพลันของสารสกัดเมล็ดมะรุ ระดับความเข้มข้นที่ทำให้ปลาไนลาย (zebrafish) ตายร้อยละ 50 ของ ( $LC_{50}$ ) ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าที่คำนวณได้คือ  $21.24 \pm 0.44$  กรัมต่อมิลลิกรัม

**Table 1** Cumulative mortality of Red Tilapia were obtained Moringa Leaf Extract

Moringa leaf concentration (mg/L)	n	Cumulative mortality (%)			
		6 hrs	12 hrs	18 hrs	24 hrs
600	10	0	0	0	0
678	10	0	0	0	20
765	10	0	0	20	40
863	10	0	10	26.6	50.0
968	10	0	20	46.6	76.6
1,100	10	20	43.3	76.6	100

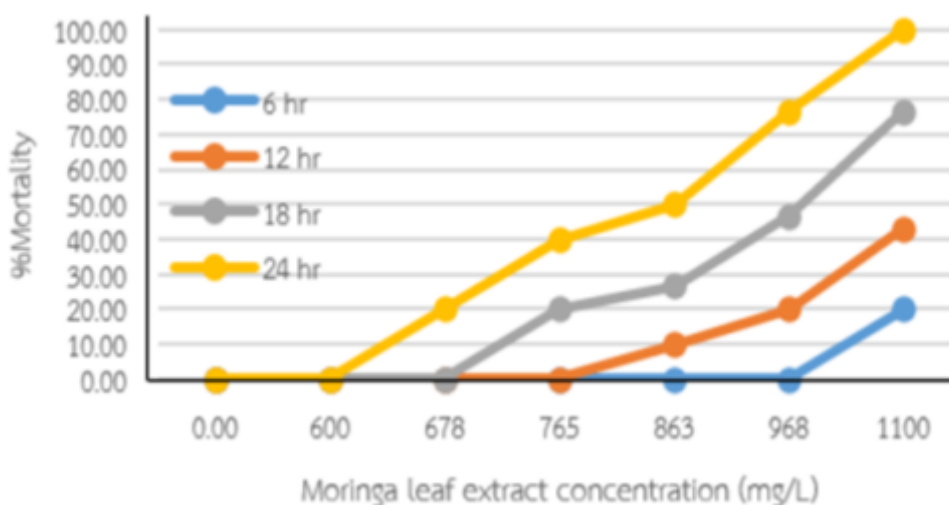


Figure 1 Percentage of mortality of Red Tilapia were obtained moringa leaf extract during 24 hours

ลักษณะอาการของปลาที่ตอบสนองต่อสารสกัดใบมะรุม ปลานิลแดงเริ่มมีการขับถ่ายเพิ่มขึ้น ว่ายน้ำช้าลง ผ่นปิดเหงือก เปิดปิดอย่างรวดเร็ว สูญเสียการทรงตัว กระสับกระส่าย ลอยนิ่งอยู่ก้นตู้ และตายในที่สุด โดยเฉพาะระดับความเข้มข้น 1,100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าปลานิลแดงมีการตอบสนองเร็วกว่า และแสดงอาการมากกว่าในทุกระดับความเข้มข้นจนกระทั่งตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 24 ชั่วโมง สอดคล้องกับการศึกษาของ Kavitha และคณะ(2012) ที่ทดสอบพิษเฉียบพลันสารสกัดเมล็ดมะรุม และหาค่า LC<sub>50</sub> ต่อปลาไน (*Cyprinus carpio*) เพื่อการตอบสนอง และพฤติกรรม เมื่อปลาได้สัมผัสกับสารสกัดที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น ปลามีอาการหลังเมื่อกจำนวนมาก สูญเสียการทรงตัว กระสับกระส่าย มีการเคลื่อนไหวที่กระตุก และผ่นปิดเหงือก (operculum) เปิดปิดอย่างรวดเร็ว เมื่อปลาได้รับสารที่เป็นสิ่งแปลกปลอม หรือทำให้เกิดสภาวะเครียด ปลาจะมีอาการเปิดปิด ผ่นเหงือกเร็วขึ้น และอาจทำให้ตายได้ Huntman (1995) ถ้าปลาเกิดความเครียดสามารถใส่สารสกัดใบมะรุมลงในน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสามารถลดความเครียดในปลานิลได้ (Hamed และ El-Sayed, 2519)

คุณภาพน้ำบางประการตลอดการทดลอง พบว่า อุณหภูมิในน้ำ 27.0-28.5 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดเป็นด่าง 6.73-7.00 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 3.05-5.57 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ เริ่มลดลงในช่วงเวลา 12 ชั่วโมง แต่อยู่ในระดับปกติของมาตรฐานคุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด (กรมควบคุมมลพิษ, 2561)

**สรุป**

พิษเฉียบพลันของสารสกัดใบมะรุมต่อปลานิลแดง ค่า LC<sub>50</sub> ที่เวลา 24 ชั่วโมง ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 792 (746.18-840.63) มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าความลาดเอียง (Slope Function) เท่ากับ 1.247 (0.6412-2.4251) มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าความเข้มข้นที่ปลอดภัย (Safe Concentration) ของสารสกัดใบมะรุมต่อปลานิลแดง มีค่าเท่ากับ 39.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ปลามีอาการหลังเมื่อกจำนวนมาก สูญเสียการทรงตัว กระสับกระส่าย มีการเคลื่อนไหวที่กระตุก และผ่นปิดเหงือกเปิดปิดอย่างรวดเร็ว และตาย 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุมสูงขึ้น

## เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ, 2561, มาตรฐานคุณภาพน้ำแหล่งที่มา: [http://pcd.go.th/info\\_serv/reg\\_std\\_water06.html#s1](http://pcd.go.th/info_serv/reg_std_water06.html#s1), 24 เมษายน 2564.
- Aly, A.A., Maraei, R.W., and Ali, H.G.M., 2016, Fatty Acids Profile and Chemical Composition of Egyptian *Moringa oleifera* Seed Oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93: 397–404.
- de Santana Silva, L.L., Alves, R.N., de Paulo, D.V., da Silva, J.D.F., and de Oliveira, A.P.S., Coelho, L.C.B.B., do Amaral Ferraz Navarro, D.M., Napoleao, T.H., do Amaral, I.P.G., de Carvalho, P.S.M. and Paiva, P.M.G., 2017, Ecotoxicity of Water-soluble Lectin from *Moringa oleifera* Seeds to Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos and Larvae, *Chemosphere*, 185: 178–182
- El-Hak, H.N.G., Moustafa, A.R.A., and Mansour, S.R., 2017, Toxic Effect of *Moringa peregrina* Seeds on Histological and Biochemical Analyses of Adult Male Albino Rats, *Toxicology Report*, 12: 38–45.
- Elsayed, E.A., Sharaf-Eldin, M.A and Wadaan, M., 2015, *In Vitro* Evaluation of Cytotoxic Activities of Essential Oil from *Moringa oleifera* Seeds on HeLa, HepG2, MCF-7, CACO-2 and L929 Cell Lines, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16: 4671–4675.
- Elsayed, E.A., Farooqa, M., Sharaf-Eldin, M.A., El-Enshasy, H.A. and Wadaan, M., 2020, Evaluation of Developmental Toxicity and Anti-angiogenic Potential of Essential Oils from *Moringa oleifera* and *Moringa peregrina* Seeds in Zebrafish (*Danio rerio*) Model, *South African Journal of Botany*, 129: 229–237.
- Hamed, H.S. and Abdel-Tawwab, M., 2017, Ameliorative Effect of Propolis Supplementation on Alleviating Bisphenol-A Toxicity: Growth Performance, Biochemical Variables, and Oxidative Stress Biomarkers of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) Fingerlings, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 202: 63–69.
- Hamed, H.S. and El-Sayed, Y.S., 2019, Antioxidant Activities of *Moringa oleifera* Leaf Extract Against Pendimethalin-induced Oxidative Stress and Genotoxicity in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), *Fish Physiology and Biochemistry*, 45(1):71-82.
- Huntman, L.C., 1995, *In Vitro* Studies of Eosinophilic Granule Cell of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Small Intestine, A Thesis Submitted to the Graduate Faculty in Partial Fulfillment of the Requirement for Degree of Master of Science in the Department of Anatomy and Physiology, Faculty of Veterinary Medicine University of Prince Edward Island.
- Kavitha, C., Ramesh, M., Kumaran, S.S. and Lakshmi., S.A., 2012, Toxicity of *Moringa oleifera* Seed Extract on Some Hematological and Biochemical Profiles in a Freshwater Fish, *Cyprinus carpio*, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64: 681–687.
- Kumar, A, Prasad, M., Mishra, D., Srivastav, S., and Srivastav, A., 2010, Toxicity of Aqueous Extract of *Euphorbia tirucalli* Latex on Catfish, *Heteropneustes fossilis*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73:1671–3.
- Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., 1949, A Simplified Method of Evaluating Dose Effect Experiments, *Journal of Pharmacology and Experiment Therapeutics*, 96: 99-113.
- Sayed A.E.H. and Hamed H.S., 2017, Induction of Apoptosis and DNA Damage by 4-Nonylphenol in African Catfish (*Clarias gariepinus*) and the Antioxidant Role of *Cydonia oblonga*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139: 97–101.
- Tabassum H, Afjal M.A, Khan J, Raisuddin S, and Parvez S., 2015, Neurotoxicological Assessment of Pendimethalin in Freshwater Fish *Channa punctata* Bloch, *Ecology Indic*, 58:411–417.