Chulalongkorn Medical Journal

Volume 62
Issue 3 *May 2018*

Article 17

5-1-2018

ผลของสารสกัดจากใบมะรุม (Moringa oleifera Lam.)ต่อเยื่อบุท่อสร้างอสุจิในหนูขาววัยก่อนเจริญพันธุ์

กนกพร แสนเพชร

จิราวรรณ ครองแก้ว

สุภาพ แสนเพชร

จุรีพร อุปธิ

ไพวรรณ สุดวรรค์

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal

Part of the Medicine and Health Sciences Commons

Recommended Citation

แสนเพชร, กนกพร; ครองแก้ว, จิราวรรณ; แสนเพชร, สุภาพ; อุปธิ, จุรีพร; and สุดวรรค์, ไพวรรณ (2018) "ผลของสารสกัดจากใบมะรุม (Moringa oleifera Lam.)ต่อเยื่อบุท่อสร้างอสุจิในหนูขาววัยก่อนเจริญพันธุ์," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 62: Iss. 3, Article 17.
DOI: 10.58837/CHULA.CMJ.62.3.15
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal/vol62/iss3/17

This Modern Medicine is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

Chula Med J Vol. 62 No. 3 May - June 2018

ผลของสารสกัดจากใบมะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) ต่อเยื่อบุท่อสร้างอสุจิในหนูขาววัยก่อนเจริญพันธุ์

กนกพร แสนเพชร*
จิราวรรณ ครองแก้ว* สุภาพ แสนเพชร*
จุรีพร อุปธิ** ไพวรรณ สุดวรรค์***

Saenphet K, Khrongkaew C, Saenphet S, U-pathi J, Sudwan P. The effects of *Moringa Oleifera* extract on the seminiferous epithelium in pre-mature male rats. Chula Med J 2018 May - Jun; 62(3): 607 - 18

Background : *Moringa oleifera (M. oleifera) Lam. is an herb, widely regarded for its nutritional and medicinal properties. It is promoted as a dietary supplement to prevent and treat malnutrition. M. oleifera leaves also contain many antioxidants.*

Objective : *This study was aimed to assess the safety of the extract from M. oleifera leaves on gametogenesis in pre-mature male rats.*

Methods : *Forty pre-mature male Wistar rats, 4-5 week-old, were divided into five groups. They were administered orally with aqueous extracts of M. oleifera at the doses of 60, 120, 180 and 240 mg/kg BW for 60 consecutive days, while the control-group received only distilled water (1 ml/day). At day 61, the testes of all rats were weighed and processed for histological investigation.*

Results : *The results showed that the control group and the group that was given 60 mg/kg BW of M. oleifera leaves extract contained most seminiferous epithelium development during stage I, while the doses of 180 and 240 mg/kg BW had a more developed seminiferous epithelium during the stage XII. Moreover, at the dose of 120 mg/kg BW the most development of seminiferous epithelium was at stages I and XII equally. Finally, testicular weight and seminiferous tubule diameter of all experimental groups receiving the extract of M. oleifera were not significantly different from those in the control group.*

* Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University
** Department of General Education, Kanchanabhisek Institute of Medical and Public Health Technology
***Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

Conclusion : *The findings of this study indicated that the aqueous extract from M. oleifera leaves are safe for seminiferous epithelium and the reproductive organs of the male rats. It may also be beneficial for reproduction by stimulating the development of the male reproductive tract.*

Keywords : *M. oleifera, seminiferous tubule diameter, seminiferous epithelium, medicinal plant.*

Correspondence to : Sudwan P. Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.
E-mail: paiwan.sudwan@cmu.ac.th

Received for publication: March 16, 2018.

กนกพร แสนเพชร, จิราวรรณ ครองแก้ว, สุภาพ แสนเพชร, จุรีพร อุปธิ, ไพวรรณ สุดวรรค์. ผลของสารสกัดจากใบมะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) ต่อเยื่อบุท่อสร้างอสุจิในหนูขาววัยก่อนเจริญพันธุ์. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2561 พ.ค. – มิ.ย.;62(3): 607 – 18

เหตุผลของการทำวิจัย : *มะรุม (Moringa oleifera Lam.) เป็นสมุนไพรที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางถึงสรรพคุณทางโภชนาการและทางยาเป็นพืชที่มีธาตุอาหารสูงมีการส่งเสริมให้นำมารับประทานเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อป้องกันและรักษาภาวะทุพโภชนาการ และใบมะรุมยังประกอบไปด้วยสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด*

วัตถุประสงค์ : *เพื่อทดสอบความปลอดภัยในการใช้สารสกัดน้ำจากใบมะรุมต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหนูขาวเพศผู้วัยก่อนเจริญพันธุ์*

วิธีการทำวิจัย : *นำหนูขาวเพศผู้วัยก่อนเจริญพันธุ์สายพันธุ์ Wistar อายุ 4-5 สัปดาห์ จำนวน 40 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่มเท่า ๆ กัน มาป้อนสารสกัดน้ำจากใบมะรุมความเข้มข้น 60, 120, 180 และ 240 mg/kg BW เป็นระยะเวลา 60 วัน ส่วนกลุ่มควบคุมป้อนน้ำกลั่น 1 มล./วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำอัณฑะมาชั่งน้ำหนักและเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาลักษณะจุลกายวิภาค*

ผลการศึกษา : *หนูขาวเพศผู้ก่อนวัยเจริญพันธุ์กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากมะรุมความเข้มข้น 60 mg/kg BW จะพบเยื่อบุท่อสร้างอสุจิ (seminiferous epithelium) อยู่ในระยะที่ 1 ส่วนสารสกัดจากมะรุมความเข้มข้น 180 และ 240 mg/kg BW มีผลให้เกิดการพัฒนาของเยื่อบุท่อสร้างอสุจิในระยะที่ 12 มากที่สุด ในขณะที่สารสกัดจากมะรุมความเข้มข้น 120 mg/kg BW มีการพัฒนาของเยื่อบุท่อสร้างอสุจิในระยะที่ 1 และ 12 เท่า ๆ กัน ส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อสร้างอสุจิและน้ำหนักอัณฑะของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบมะรุมทุกความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ*

สรุป : *สารสกัดน้ำจากใบมะรุมนอกจากจะมีความปลอดภัยต่อเยื่อบุท่อสร้างอสุจิ และอวัยวะสืบพันธุ์ของหนูขาวแล้ว ยังอาจให้ผลดีต่อการสืบพันธุ์โดยมีผลกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ด้วย*

คำสำคัญ : *มะรุม, เส้นผ่านศูนย์กลางของท่อสร้างอสุจิ, เยื่อบุท่อสร้างอสุจิ, สมุนไพร.*

การใช้ยาแพทย์แผนปัจจุบันในประเทศไทยต้องนำเข้าจากต่างประเทศเป็นส่วนใหญ่ต้องใช้งบประมาณสูง ยาบางชนิดอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อระบบต่าง ๆ ในร่างกายได้ เช่น ยาแอสไพรินมีสรรพคุณใช้ลดไข้ แก้ปวดทุกชนิด มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ แต่ส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์[1] โดยทำให้น้ำหนักอัณฑะและจำนวนอสุจิลดลง รบกวนการทำงานในเยื่อบุท่อสร้างอสุจิที่มีกระบวนการสร้างอสุจิ (spermatogenesis) และหากได้รับต่อเนื่องเป็นเวลานาน สามารถนำไปสู่ภาวการณ์เป็นหมันได้[2] ปัจจุบันจึงมีการส่งเสริมการใช้ยาสมุนไพรทดแทนยาเคมีแผนปัจจุบัน มีพืชสมุนไพรหลายชนิดในประเทศไทยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งและป้องกันโรคได้ ตามประกาศของคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่องบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2561 โดยรายการบัญชียาหลักแห่งชาติที่เป็นบัญชียาจากสมุนไพร ยาแผนไทยหรือยาแผนโบราณและยาพัฒนาจากสมุนไพร ซึ่งมีตัวยาในสูตรตำรับที่ประกอบด้วยสมุนไพรหลายชนิด เช่น ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb) กระชาย (*Boesenbergia rotunda (Linn.) Mansf.*) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ขิง (*Zingiber officinale* Roscoe) รวมถึงมะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) ที่กำลังเป็นที่นิยมใช้กันมากและรับประทานอย่างแพร่หลาย[3]

มะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) มีต้นกำเนิดมาจากเทือกเขาหิมาลัยของประเทศอินเดีย บังคลาเทศ และปากีสถาน รวมทั้งมีการปลูกกันอย่างแพร่หลายในประเทศแถบแอฟริกา ซาอุดิอารเบีย อเมริกากลางและอเมริกาใต้ หมู่เกาะคาริบเบียน และประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้[4 - 5] ใบมะรุมจัดเป็นส่วนที่มีคุณค่าทางอาหารสูงและยังประกอบไปด้วยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น ascorbic acid, flavonoids, phenolics, carotenoids, oestrogenic substances, b-sitosterol, iron, calcium, phosphorus, copper,vitamins A, B and C, a-tocopherol, riboflavin, nicotinic acid, folic acid, pyridoxine, b-carotene, protein, essential amino acids เช่น methionine, cystine, tryptophan และ lysine[6 - 7] ซึ่งแสดงถึงความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาใบมะรุมและฝักมะรุมเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไปในอนาคต เพื่อแก้ปัญหาการขาดสารอาหารในเด็กโดยใช้ผงใบมะรุมผสมในอาหาร ซึ่งเป็นโครงการที่เกิดขึ้นในประเทศเซเนกัล อินเดีย เบนิน ซิมบับเว และกานา[4, 8 - 9] นอกจากนี้ใบมะรุมยังใช้ในการรักษาโรคหอบหืด เป็นไข้ ปวดหัว กรดไหลย้อน มาลาเรีย ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ ปอดบวม ท้องเสีย หูและตาอักเสบ ไขมันในเลือดสูง เป็นต้น[4] นอกจากนั้นยังมีการศึกษาว่ามะรุมมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง ต้านแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ และช่วยปกป้องตับ[10 - 12] รวมทั้งใช้สำหรับรักษาโลหิตจางด้วย[13] ยิ่งไปกว่านั้น สารสกัดจากใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำสามารถควบคุมภาวะไทรอยด์ผิดปกติในหนูขาวทั้งเพศผู้และเพศเมีย[14] และยังสามารถควบคุมระดับคอเลสเตอรอลในหนูได้[15]

อย่างไรก็ตาม มีพืชสมุนไพรจำนวนไม่น้อยที่มีสรรพคุณในการรักษาได้หลายอาการ แต่อาจมีคุณสมบัติที่อาจก่อให้เกิดผลเสียต่อระบบการทำงานของร่างกายได้ เช่น รายงานผลของสาร Gossypol จากต้นฝ้าย เมื่อป้อนให้แก่หนูขาวที่ความเข้มข้น 30 mg/kg BW/day ระยะเวลา 7 สัปดาห์ พบว่าทำให้เกิดลักษณะถุงใส (vacuoles) หลายขนาด ในเยื่อบุท่อสร้างอสุจิ (seminiferous tubule) [16] สารสกัดเอทานอลจากกระชายดำมีผลต่อการทำหน้าที่ของ sertoli cell[17] และสามารถเพิ่มจำนวนอสุจิในน้ำอสุจิ แต่ทำให้เกิดถุงใสในเซลล์ตับ[18] นอกจากนี้สารสกัดเอทานอลจากกระชาย มีผลเพิ่มขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อสร้างอสุจิและน้ำหนักอัณฑะของหนูขาว[19] จากรายงานข้างต้นทำให้เห็นว่า สมุนไพรที่ใช้ในปัจจุบันมีทั้งรายงานที่ก่อให้เกิดผลดีและผลเสียต่อระบบสืบพันธุ์ ดังนั้นการศึกษาบทบาทของใบมะรุมด้านการบำรุงระบบสืบพันธุ์เพศชายจึงเป็นที่สนใจ แม้จะมีรายงานการใช้สารสกัด hexane จากใบมะรุมที่ความเข้มข้น 50 mg/30 g BW นาน 21 วัน มีผลทำให้น้ำหนัก testis ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของท่อสร้างอสุจิเพิ่มขึ้น[20] และรายงานที่พบว่าใบมะรุมผงทำให้น้ำหนักของอัณฑะหลอดเก็บตัวอสุจิ (epididymis) จำนวนและความสามารถในการเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มขึ้น เมื่อศึกษาในหนู mice ที่เหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวาน[21]

อย่างไรก็ตาม การศึกษาถึงผลของใบมะรุมต่อระบบสืบพันธุ์เพศชายที่เกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่อและลักษณะโครงสร้างท่อสร้างอสุจิยังมีการศึกษาน้อยมาก ดังนั้นศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ของเพื่อการศึกษาถึงผลของสารสกัดด้วยน้ำของใบมะรุมต่ออัณฑะและลักษณะของเนื้อเยื่อและลักษณะโครงสร้างภายในโดยตรวจสอบจากลักษณะผนังเยื่อบุท่อสร้างอสุจิ และเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อสร้างอสุจิในหนูขาวเพศผู้วัยก่อนเจริญพันธุ์

วิธีการศึกษา

การเตรียมสารสกัดมะรุม

ใช้ใบสดของมะรุม ล้างให้สะอาด สับให้ละเอียด แล้วแช่ในน้ำ ทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไปเข้าเครื่อง rotary evaporator เพื่อเอาตัวทำละลายออกจากสารสกัด หลังจากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze drying

การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูขาวเพศผู้ใหญ่สายพันธุ์ Wistar (*Rattus norvegicus*) น้ำหนักประมาณ 200 - 250 กรัม อายุ 4 - 5 สัปดาห์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม มาเลี้ยงในกรงสแตนเลส พื้นที่ 30 x 35 x 15 เซนติเมตร รองพื้นด้วยขี้เลื่อย โดยแยกกรงละ 2 ตัว ในห้องทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิ ประมาณ 25 ± 2 °C ให้แสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง ให้หนูปรับตัวกับสภาพแวดล้อม 1 อาทิตย์ ให้อาหารและน้ำตลอดระยะเวลาการทำการทดลอง

การออกแบบการทดลอง

นำหนูจำนวน 40 ตัว มาแบ่งเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 8 ตัว มาป้อนสารทางปากวันละ 1 ครั้ง ครั้งละ 1 ml จนครบ 60 วัน โดยหนูกลุ่มควบคุมป้อนน้ำกลั่น และหนูกลุ่มทดลองทั้ง 4 กลุ่ม ป้อนสารสกัดมะรุมความเข้มข้น 60, 120,180 และ 240 mg/kg BW ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำให้หนูสลบและเก็บอัณฑะทั้ง 2 ข้าง นำไปล้างในน้ำเกลือ ชั่งน้ำหนัก และนำอัณฑะด้านซ้ายไปตัดที่มีความหนาตามขวาง 6 ไมโครเมตรด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อเพื่อทำแผ่นสไลด์ จากนั้นจึงทำการย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) เพื่อนำไปศึกษาลักษณะผนังเยื่อบุท่อสร้างอสุจิและบันทึกความถี่ของระยะของเยื่อบุท่อสร้างอสุจิเป็นระยะที่ 1, 2, 7, 9, 12 และ 14 (stage I, II, VII, IX, XII และ XIV) ดังภาพที่ 1 โดยกำหนดให้ระยะที่ 1 และ 2 เป็นตัวแทนของเยื่อบุท่อสร้างอสุจิในระยะเริ่มแรก (early stage), ระยะที่ 7 และ 9 เป็นตัวแทนของเยื่อบุท่อสร้างอสุจิในระยะกลาง (middle stage) และระยะที่ 12 และ 14 เป็นตัวแทนของเยื่อบุท่อสร้างอสุจิในระยะท้าย (late stage) เนื่องจากระยะดังกล่าวมีลักษณะเฉพาะที่ชัดเจนและง่ายต่อการจำแนกความแตกต่างในการศึกษา (รูปที่ 1) รวมทั้งศึกษาเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อสร้างอสุจิโดยการสุ่มและเลือกวัด 10 ท่อ ใน 1 section ของอัณฑะ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 10x และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพนิ่งยี่ห้อ OLYMPUS

การใช้สถิติและการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูล และใช้วิธีวิเคราะห์หาความแตกต่างโดยใช้ Bonferroni test กรณีที่ข้อมูลมีความแปรปรวนไม่เท่ากันจะวิเคราะห์โดยใช้สถิติ Kruskal-Wallis test และวิธีวิเคราะห์หาความแตกต่างโดยใช้ Mann-Whitney test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS for Window version 17.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษา

จากการทดลองให้สารสกัดจากใบมะรุม (*M. oleifera*) แก่หนูขาวเพศผู้เป็นเวลา 60 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองและศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของอัณฑะได้ผลการทดลองดังนี้

น้ำหนักอัณฑะ

น้ำหนักอัณฑะที่เทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบมะรุมทุกความเข้มข้นมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1. น้ำหนักอัณฑะต่อน้ำหนักตัวของหนูขาว ที่ได้รับสารสกัดจากมะรุม *(M. oleifera)* ความเข้มข้น 60, 120, 180 และ 240 mg/kg BW เป็นเวลา 60 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Mean ± SD) โดยใช้สถิติ one-way ANOVA

กลุ่มทดลอง	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักอัณฑะต่อน้ำหนักตัว (g%)
Control	0.59 ± 0.03^{NS}
M. oleifera 60 mg/kg BW	0.57 ± 0.10^{NS}
M. oleifera 120 mg/kg BW	0.50 ± 0.19^{NS}
M. oleifera 180 mg/kg BW	0.54 ± 0.10^{NS}
M. oleifera 240 mg/kg BW	0.58 ± 0.06^{NS}

^{NS}ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม

เส้นผ่านศูนย์กลางของท่อสร้างอสุจิ (Diameter of seminiferous tubule)

เส้นผ่านศูนย์กลางของท่อสร้างอสุจิเมื่อเทียบกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบมะรุมความเข้มข้น 60, 120, 180 และ 240 mg/kg BW มีเส้นผ่านศูนย์กลางท่อไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) (ตารางที่ 2)

ระยะเยื่อบุท่อสร้างอสุจิ (Stage of seminiferous epithelium)

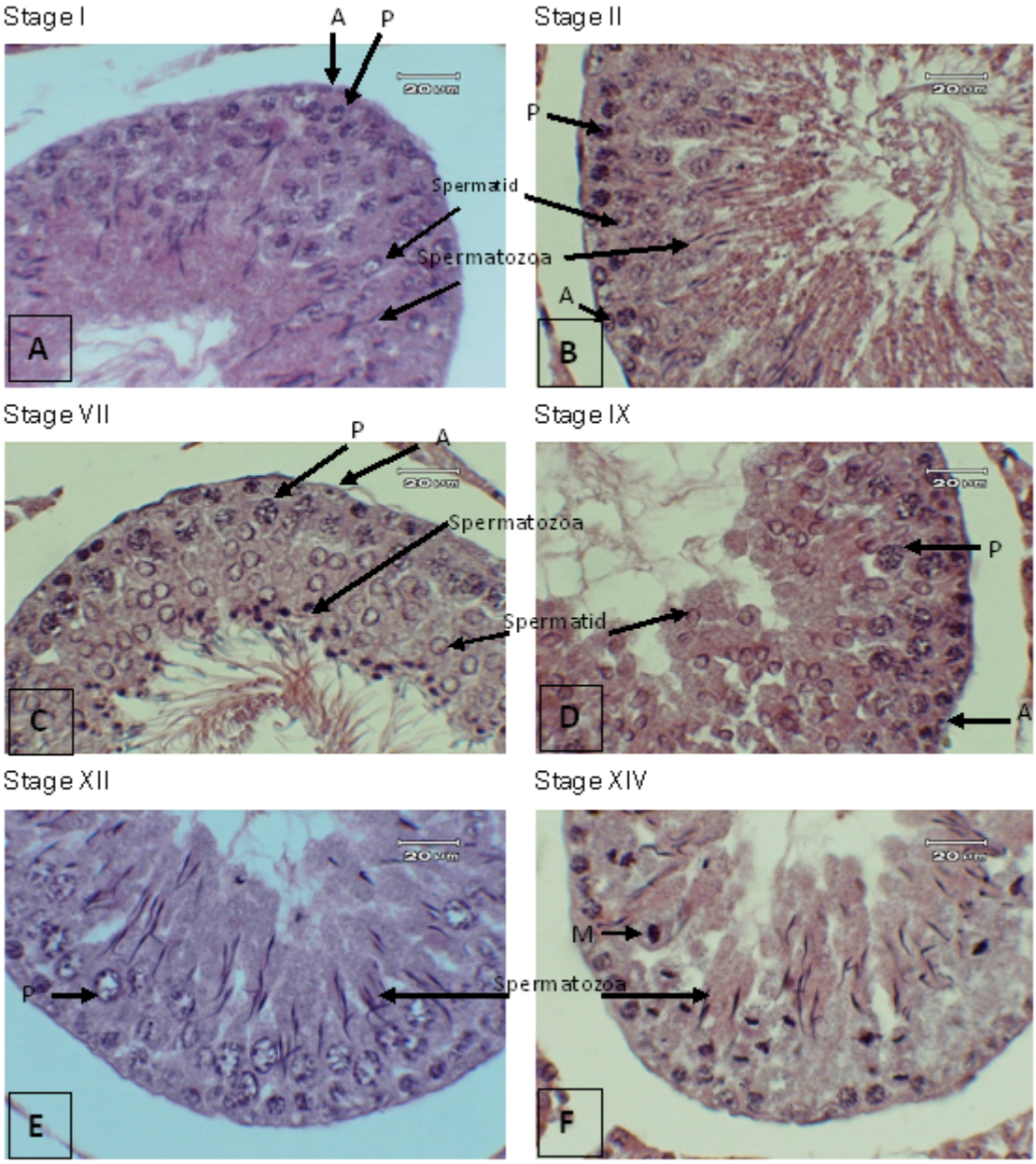
การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของอัณฑะเมื่อนำมาตัดขวางและย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin พบว่าโครงสร้างโดยทั่วไปประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่อยู่ระหว่างท่อสร้างอสุจิที่มี Leydig's cell และท่อสร้างอสุจิซึ่งมี spermatogenic cell ระยะต่าง ๆ กำลังพัฒนาในกระบวนการ spermatogenesis มีการจัดเรียงตัวที่แตกต่างกันในแต่ละระยะของการพัฒนา ซึ่งในหนูขาวมีการพัฒนาทั้งหมด 14 ระยะ (stage I – XIV) แต่ในการศึกษานี้จะให้ความสนใจเพียง 6 ระยะ คือ ระยะที่ 1, 2, 7, 9, 12 และ 14 (รูปที่ 1) พบว่าหนูขาววัยก่อนเจริญพันธุ์มีร้อยละของเยื่อบุท่อสร้างอสุจิในระยะที่ 1 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าหนูกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับ

ตารางที่ 2. เส้นผ่านศูนย์กลางของท่อสร้างอสุจิ ที่ได้รับสารสกัดจากมะรุม (*M. oleifera*) ความเข้มข้น 60, 120, 180 และ 240 mg/kg BW เป็นเวลา 60 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Mean ± SD) โดยใช้สถิติ one-way ANOVA

กลุ่มทดลอง	ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อสร้างอสุจิ (μm)
Control	230.18 ± 21.079^{NS}
M. oleifera 60 mg/kg BW	230.92 ± 17.571^{NS}
M. oleifera 120 mg/kg BW	233.72 ± 19.706^{NS}
M. oleifera 180 mg/kg BW	235.89 ± 12.342^{NS}
M. oleifera 240 mg/kg BW	246.80 ± 11.938^{NS}

^{NS} ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม

สารสกัดจากมะรุมความเข้มข้น 60 mg/kg BW มีความชุกมากกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากมะรุมความเข้มข้น 180 และ 240 mg/kg BW อย่างมีนัยสำคัญ ในทางตรงกันข้ามหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากมะรุมความเข้มข้น 180 และ 240 mg/kg BW มีร้อยละของเยื่อบุท่อสร้างอสุจิในระยะที่ 12 มีความชุกมากกว่าหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากมะรุมความเข้มข้น 60 mg/kg BW อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในขณะที่ความชุกของเยื่อบุท่อสร้างอสุจิในระยะที่ 2, 7, 9 และ 14 ไม่มีความแตกต่างกันในหนูแต่ละกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) (ตารางที่ 3)



รูปที่ 1. Seminiferous epithelium ของหนูขาวกลุ่มควบคุมที่อยู่ใน Stage I, II, VII, IX, XII, XIV; Spermatogonia type A (A), 1° Spermatocyte (P), Meiosis (M) (H&E ; 40X)

ตารางที่ 3. ร้อยละของ stage of seminiferous epithelium ของหนูที่ได้รับสารสกัดจากมะรุม (*M. oleifera*) ความเข้มข้น 60, 120, 180 และ 240 mg/kg BW เป็นเวลา 60 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Groups	Stage of seminiferous epithelium (%)					
M. oleifera	I	II	VII	IX	XII	XIV
Control	35.48 ± 5.87^{a}	17.34 ± 4.66^{NS}	13.57 ± 7.55^{NS}	6.44 ± 2.03^{NS}	23.42 ± 3.04^{a}	1.83 ± 1.03^{a}
60 mg/kgBW	42.47 ± 5.49^{a}	22.69 ± 6.58^{NS}	6.59 ± 1.17^{NS}	5.38 ± 4.13^{NS}	21.14 ± 2.88^{a}	1.72 ± 1.13^{a}
120 mg/kgBW	33.11 ± 8.92^{ab}	23.87 ± 5.04^{NS}	12.64 ± 4.74^{NS}	4.10 ± 1.71^{NS}	28.40 ± 5.31^{ab}	1.42 ± 0.56^{a}
180 mg/kgBW	21.45 ± 5.54^{bc}	23.87 ± 5.04^{NS}	14.53 ± 2.81^{NS}	4.03 ± 1.89^{NS}	32.44 ± 5.27^{b}	3.68 ± 4.20^{a}
240 mg/kgBW	20.21 ± 3.95^{c}	23.87 ± 5.04^{NS}	14.97 ± 4.26^{NS}	5.02 ± 1.34^{NS}	34.56 ± 5.20^{c}	2.30 ± 0.84^{a}

^{NS} ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มในแนวตั้ง (P <0.05)

^{a,b,c}ตัวอักษรแตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มในแนวตั้ง (P <0.05)

Stages I, II, VII, IX and XII of seminiferous epithelium วิเคราะห์โดยใช้สถิติ one-way ANOVA and Bonferroni test

Stage XIV of seminiferous epithelium วิเคราะห์โดยใช้สถิติ Kruskal-Wallis test และ Mann-Whitney test

อภิปรายผล

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากใบมะรุม (*M. oleifera* Lam.) ที่ส่งผลต่อระบบสืบพันธุ์เพศชาย โดยประเมินจากน้ำหนักของอัณฑะ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางท่อสร้างอสุจิ และระยะผนังเยื่อบุท่อสร้างอสุจิ ซึ่งการตรวจสอบจากพารามิเตอร์ข้างต้นสามารถชี้วัดถึงความสมบูรณ์ในเพศชายได้

ผลต่อน้ำหนักอัณฑะ

จากการตรวจสอบผลน้ำหนักของอัณฑะ พบว่าน้ำหนักที่เทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดด้วยน้ำจากใบมะรุมความเข้มข้น 60, 120, 180 และ 240 mg/kg BW มีน้ำหนักที่ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chivapat และคณะ ที่พบว่าหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดด้วยน้ำจากใบมะรุมความเข้มข้น 10, 100 และ 1000 mg/kg BW ติดต่อกันเป็นเวลา 6 เดือน มีน้ำหนักอัณฑะที่เทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัว ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ซึ่งได้ทดลองในหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์เดียวกัน คือ *Rattus norvegicus* และสารสกัดที่ใช้มาจากพืชที่มีพื้นที่เพาะปลูกในประเทศไทยเช่นเดียวกัน[22] ในขณะเดียวกันทั้งระยะเวลาที่ป้อนสารสกัด และความเข้มข้นก็ไม่ได้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักอัณฑะ แต่การศึกษาของ Cajuday และ Pocsidio พบว่าหนู mice เพศผู้ที่ได้รับสารสกัดด้วย hexane จากใบมะรุมความเข้มข้น 5 และ 50 mg/30 g BW เป็นเวลา 21 วัน มีน้ำหนักอัณฑะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่า hexane อาจเป็นตัวสกัดที่ดีกว่าน้ำ จึงทำให้ได้สารสำคัญในใบมะรุมที่มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักอัณฑะ[20] จากรายงานของ Pamok และคณะ พบว่าสารสกัดใบมะรุมและใบว่านพญาวานรจากเอทานอลให้ผลดีกว่าสารสกัดจากน้ำ[23] แสดงให้เห็นว่าการสกัดใบมะรุมด้วยสารสกัดที่ต่างกันให้ผลที่แตกต่างกัน และจากการศึกษาของ Bhatt และคณะ พบว่าจำนวน Leydig cell ที่เป็นแหล่งสร้างฮอร์โมน testosterone จะส่งผลให้ระดับ testosterone ลดลงเมื่อมีปัจจัยที่ทำให้จำนวนเซลล์ลดลง[24] สอดคล้องกับการทดลองของ Gupta และคณะ ที่พบว่าจำนวน Leydig cell ลดลง ทำให้ระดับของ serum testosterone ลดลง ส่งผลให้มีการลดลงของน้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อป้อน *Albizialebbeck* ให้

หนูขาวที่ความเข้มข้น 50 mg/kg BW เป็นเวลา 60 วัน[25] แต่จากการทดลองในหนูที่ป้อนด้วยสารสกัดน้ำจากใบมะรุมนี้มีน้ำหนักของอัณฑะไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำจากใบมะรุมอาจไม่มีผลต่อจำนวน Leydig's cell และ testosterone

ผลต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อสร้างอสุจิ

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อสร้างอสุจิในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดน้ำจากใบมะรุมความเข้มข้น 60, 120, 180 และ 240 mg/kg BW ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) แต่จากรายงานของ Cajuday และ Pocsidio พบว่าหนู mice เพศผู้ที่ได้รับสารสกัดด้วยเฮกเซนจากใบมะรุมความเข้มข้น 0.5, 5 และ 50 mg/30 g BW มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อสร้างอสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[20] โดยพบว่าสารสกัดจากใบมะรุมมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถเพิ่มกระบวนการ spermatogenesis ได้ และกระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นภายในท่อสร้างอสุจิ จึงทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางท่อสร้างอสุจิเพิ่มขึ้นด้วย และอาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ของหนูที่ใช้ในการศึกษา และสารสกัดที่ใช้แตกต่างจากงานวิจัยนี้จึงทำให้ผลการทดลองที่ได้แตกต่างกัน แต่ทั้งนี้การศึกษาที่พบว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการเพิ่มเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อสร้างอสุจิ อาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเพศชายก็ได้ ดังเช่นการศึกษา Sudwan และคณะ ศึกษาผลของสารสกัดเอทานอลจากราก *Boesenbergia rotunda* ที่ความเข้มข้น 60, 120 และ 240 mg/kg BW ในหนูขาว อายุ 6 สัปดาห์ นาน 60 วัน พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มมีเส้นผ่านศูนย์กลางท่อสร้างอสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P \leq 0.05$) แต่ไม่มีผลต่อระดับ testosterone และ androstenedione[19] และจากรายงานของ Piyachaturawat และคณะ ที่ทำการป้อนสารสกัด *Curcumas comosa* ความเข้มข้น 500 mg/kg BW และป้อน estrogen ความเข้มข้น 1, 2, 5 และ 10 μg/kg BW ในหนูขาวเป็นเวลา 7 วัน พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัด *Curcumas comosa* ความเข้มข้น 500 mg/kg BW มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อสร้างอสุจิเล็กกว่ากลุ่มควบคุม โดยมีการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายในท่อเป็นแบบหลวมๆ เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ และเกิดความเสียหายของ spermatogonia และ spermatid ภายในท่อสร้างอสุจิ ซึ่งผลดังกล่าวไม่แตกต่างจากกลุ่มที่รับ estrogen ทุกความเข้มข้น[26] โดย estrogen เป็นสาเหตุของการฝ่อลีบ (atrophy) ของอัณฑะ และอวัยวะช่วยสืบพันธุ์ของเพศผู้ ทั้งยังลดระดับฮอร์โมน testosterone[27] ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่สารสกัดน้ำจากใบมะรุมอาจไม่มีผลต่อระดับฮอร์โมน testosterone และ estrogen และไม่มีผลต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อสร้างอสุจิ

ผลต่อระยะผนังเยื่อบุท่อสร้างอสุจิ

จากการทดลองพบว่าความชุกของเยื่อบุท่อสร้างอสุจิในระยะที่ 7 ไม่มีความแตกต่างกันในหนูแต่ละกลุ่ม สอดคล้องกับรายงานของ Yotarlai และคณะ[28] ที่ทดสอบผลของน้ำคั้น *Boesenbergia rotunda* ต่อคุณภาพอสุจิในหนูขาวเพศผู้ ทั้งหนูวัยก่อนเจริญพันธุ์และวัยเจริญพันธุ์ที่ความเข้มข้น 60, 120 และ 600 mg/kg BW นาน 30 วัน พบว่าหนูวัยก่อนเจริญพันธุ์ที่ได้รับสารสกัดทุกความเข้มข้นมีเยื่อบุท่อสร้างอสุจิระยะที่ 7 และ 8 ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และใช้หนูอายุ 4-5 สัปดาห์เช่นเดียวกัน โดยระยะ ที่ 7 และ 8 มีความสำคัญคือเป็นระยะที่อสุจิมีความสมบูรณ์ที่สุดจึงเป็นตัวบ่งชี้ความสามารถในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้[29] อย่างไรก็ตามงานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาเยื่อบุท่อสร้างอสุจิในระยะอื่นที่เป็นระยะเริ่มแรกและระยะท้ายของผนังเยื่อบุท่อสร้างอสุจิด้วย เมื่อนำมาเปรียบเทียบภายในแต่ละกลุ่ม พบว่าหนูขาววัยก่อนเจริญพันธุ์กลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบมะรุมความเข้มข้น 60 mg/kg BW มีความชุกของเยื่อบุท่อสร้างอสุจิในระยะที่ 1 ซึ่งเป็นระยะเริ่มแรกมากกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากมะรุมความเข้มข้น 180 และ 240 mg/kg BW ในทางตรงกันข้ามหนูกลุ่มที่ได้รับสาร

สกัดจากมะรุมความเข้มข้นสูงกว่าคือ 180 และ 240 mg/kg BW มีความชุกของเยื่อบุท่อสร้างอสุจิในระยะที่ 12 ซึ่งเป็นระยะท้าย ๆ มากกว่าหนูกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากมะรุมความเข้มข้น 60 mg/kg BW ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดมะรุมที่มีความเข้มข้นสูงมีผลมากระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของระยะผนังเยื่อบุท่อสร้างอสุจิไปสู่ในระยะท้าย ๆ เร็วขึ้น จึงสามารถพบว่ามีความชุกของระยะที่ 12 ต่างกัน

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นพบว่าสารสกัดน้ำจากใบมะรุมที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ในภาพรวมแล้วไม่มีผลต่อน้ำหนักของอัณฑะ ความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางท่อสร้างอสุจิ และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ระยะต่าง ๆ ของเซลล์ของผนังเยื่อบุท่อสร้างอสุจิ และมะรุมยังไม่ได้ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเชิงลบแก่ระบบสืบพันธุ์เพศชาย อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการยืนยันผลที่ได้ให้มีความชัดเจนมากขึ้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น มีการตรวจวัดระดับของฮอร์โมน testosterone หรือฮอร์โมนอื่น ๆ ที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์เพศชาย ตรวจสอบภาวะ oxidative stress ในผนังเยื่อบุท่อสร้างอสุจิ รวมทั้งมีการใช้สารสกัดจากใบมะรุมในรูปแบบอื่น เช่น ใช้เอทานอลหรือ hexane ในการสกัดใบมะรุม และควรมีการทดสอบสารสกัดในหนูวัยเจริญพันธุ์ด้วย นอกจากนี้อาจเปลี่ยนจากการใช้ใบมะรุมสดเป็นการสกัดจากใบมะรุมแห้งเป็นต้น โดยข้อมูลจากการศึกษาเบื้องต้นนี้สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลในการแสดงผลของสารสกัดจากใบมะรุมต่อระบบสืบพันธุ์และรับรองถึงความปลอดภัยของใบมะรุมต่ออวัยวะสืบพันธุ์ของหนูขาวเพศผู้ รวมถึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ต่อไป

สรุป

สารสกัดจากใบมะรุมความเข้มข้น 60, 120, 180 และ 240 mg/kg BW ไม่มีผลต่อน้ำหนักอัณฑะและเส้นผ่านศูนย์กลางท่อสร้างอสุจิ นอกจากจะมีความปลอดภัยต่ออวัยวะสืบพันธุ์เพศชายของหนูขาววัยก่อนเจริญพันธุ์ แล้วยังอาจส่งผลดีต่อการสืบพันธุ์โดยมีผลกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในถุงอัณฑะในระยะต่าง ๆ ในหนูขาวเพศผู้ด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ห้องปฏิบัติงานวิจัย 1 ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และภาควิชาการศึกษาทั่วไป วิทยาลัยเทคโนโลยีทางการแพทย์และสาธารณสุข กาญจนาภิเษก ในการสนับสนุนการจัดทำและเผยแพร่ผลงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. ประภัสสร ผลโพธิ์. แอสไพรินยาธรรมดาที่ไม่ธรรมดา หากใช้ต้องระวัง. Fact Sheet หมวดยา 2552;8: 1-5.
2. Didolkar AK, Patel PB, Roychowdhury D. Effect of aspirin on spermatogenesis in mature and immature rats. Int J Androl 1980;3:585-93.
3. ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2561 เรื่อง บัญชียาจากสมุนไพร ประกาศในราชกิจจานุเบกษา เมื่อวันที่ 19 มกราคม 2561. กลุ่มนโยบายแห่งชาติด้านยา. นนทบุรี: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข; 2561.
4. Sujatha BK, Patel P. *Moringa Oleifera* – Nature's gold. Imper J Interdiscipl Res 2017;3:1175-9.
5. Kumssa DB, Joy EJ, Young SD, Odee DW, Ander EL, Broadley MR. Variation in the mineral element concentration of *Moringa oleifera* Lam. and *M. stenopetala* (Bak. f.) Cuf.: Role in human nutrition. PLoS One 2017; 12:e0175503.
6. Siddhuraju P, Becker K. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera*

Lam.) leaves. J Agric Food Chem 2003;51: 2144-55.

7. Anwar F, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. Phytother Res 2007;21:17-25.
8. Glover-Amengor M, Aryeetey R, Afari E, Nyarko A. Micronutrient composition and acceptability of *Moringa oleifera* leaf-fortified dishes by children in Ada-East district, Ghana. Food Sci Nutr 2017;5:317-23.
9. Makkar HPS, Becker K. Nutrional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera* leaves. Anim Feed Sci Technol 1996;63:211-28.
10. Farooq F, Rai M, Tiwari A, Khan AA, Farooq S. Medicinal properties of *Moringa oleifera*l: An overview of promising healer. J Med Plants Res 2012;6:4368-74.
11. Mbikay M. Therapeutic potential of *Moringa oleifera* leaves in chronic hyperglycemia and dyslipidemia: a review. Front Pharmacol 2012; 3:24.
12. Maizuwo AI, Hassan AS, Momoh H, Muhammad JA. Phytochemical constituents, biological activities, therapeutic potentials and nutritional values of *Moringa oleifera* (*Zogale*): a review. J Drug Des Med Chem 2017;3:60-6.
13. Estrella MCP, Mantaring JBV, David GZ. A double-blind, randomized controlled trial on the use of malunggay (*Moringa oleifera*) for augmentation of the volume of breastmilk among non-nursing mothers of preterm infants. Philipp J Pediatr 2000;49:3-6.
14. Tahiliani P, Kar A. Role of *Moringa oleifera* leaf extract in the regulation of thyroid hormone status in adult male and female rats. Pharmacol Res 2000;41:319-23.
15. Ghasi S, Nwobodo E, Ofili JO. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats. J Ethnopharmacol 2000;69:21-5.
16. Hoffer AP. Effects of gossypol on the seminiferous epithelium in the rat: a light and electron microscope study. Biol Reprod 1983;28: 1007-20.
17. Sudwan P, Saenphet K, Saenphet S, Wongsawad C. Sperm density and ultrastructure of Sertoli cells in male rats treated with *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker extract. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2007;38:249-54.
18. Sudwan P, Saenphet K, Saenphet S, Suwansirikul S. Effect of *Kaempferia parviflora* Wall. ex. Baker on sexual activity of male rats and its toxicity. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2006;37 Suppl 3:210-5.
19. Sudwan P, Saenphet K, Aritajat S, Sitasuwan N. Effects of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. on sexual behaviour of male rats. Asian J Androl 2007;9:849-55.
20. Cajuday LA. Pocsidio GL. Effects of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) on the reproduction of male mice (*Mus musculus*). J Med Plants Res 2010;4:1115-21.
21. Priyadarshani N, Varma MC. Effect of *Moringa oleifera* leaf powder on sperm count, histology of testis and epididymis of hyperglycaemic mice *Mus musculus*. Am Int J Res Formal, Appl Nat Sci. 2014; 7:7–13.
22. Chivapat S, Sincharoenpokai P, Saktiyasuthorn

N, Shuaprom A, Thongsrirak P, Sakpetch A, et al. Acute and chronic toxicity of *Moringa oleifera* Linn leaves extracts. Thai J Vet Med 2011;41:417-24.

23. Pamok S, Saenphet S, Vinitketkumnuen U, Saenphet K. Antiproliferative effect of *Moringa oleifera* Lam. and *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk extracts on the colon cancer cells. J Med Plants Res 2012; 6:139-45.
24. Bhatt N, Chawla SL, Rao MV. Contraceptive evaluation of seed extracts of *Abrus precatorius* L. in male mice (*Mus musculus*). J Herb Med Toxicol 2007;1:45-8.
25. Gupta RS, Chaudhary R, Yadav RK, Verma SK, Dobhal MP. Effect of Saponins of *Albizia lebbeck* (L.) Benth bark on the reproductive system of male albino rats. J Ethnopharmacol 2005;96:31-6.
26. Piyachaturawat P, Timinkul A, Chuncharunee A, Suksamrarn A. Effect of *Curcuma comosa* extract of male fertility in rats. Pharm Biol 1999;37:22-7.
27. Moger WH. Direct effects of estrogens on the endocrine function of the mammalian testis. Can J Physiol Pharmacol 1980;58:1011-22.
28. Yotarlai S, Chaisuksunt V, Saenphet K, Sudwan P. Effects of *Boesenbergia rotunda* juice on sperm qualities in male rats. J Med Plants Res 2011;5:3861-7.
29. Hess RA. Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. Biol Reprod 1990;43:525-42.