รายงานการวิจัย

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยบางชนิด

(Antibacterial Activity of some Thai Medicinal Plant Extracts against *Helicobacter pylori*)

โดย

รศ. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร

รศ. วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล

อ. เมตตา องค์สกุล

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2543

เลขหมู่ .....

Bib Key 229944

บทคัดย่อ

ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย 9 ชนิด ได้แก่ กะเพราแดง กล้วยน้ำว้าดิบ ขมิ้นชัน บัวบก ฟ้าทะลายโจร ข่าลิง ไพล มังคุด และฝรั่ง รวม 32 สารสกัด สารสกัดทั้งหมดมีการละลายต่ำมากในตัวทำละลาย dimethyl sulfoxide และน้ำ ไม่มีสารสกัดใดให้ inhibition zone เมื่อทดสอบโดยวิธี agar diffusion

สำหรับการทดสอบโดยวิธี agar dilution บน color indicator egg yolk agar พบว่าน้ำมันข่าลิงสามารถยับยั้ง *H. pylori* ได้ โดยมีค่า MIC 1,000 µg/ml สารสกัดจากเหง้าขมิ้นชันด้วย ethanol 95% และ ethanol:น้ำ (1:1) และสารสกัดจากเหง้าไพลด้วย ethanol 95% ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

Abstract

Antibacterial activity of 32 extracts of 9 Thai medicinal plants namely *Ocimum sanctum*, *Musa* ABB group (triploid) cv. "Namwaa", *Curcuma longa*, *Andrographis paniculata*, *Centella asiatica*, *Alpinia conchigera*, *Garcinia mangostana*, *Zingiber cassumunar* and *Psidium guajava* was performed against *Helicobacter pylori*. All extracts had low solubility in dimethyl sulfoxide and water and showed no inhibition zone with agar diffusion test.

By agar dilution test, the volatile oil of *A. conchigera* inhibited the growth of *H. pylori* with the MIC value of 1,000 μg/ml. The 95% ethanol and ethanol:H_2O (1:1) extracts of *C. longa* and ethanol:H_2O (1:1) extracts of *Z. cassumunar* at the concentration of 1,000 μg/ml showed inhibitory effect on *H. pylori*.

สารบาญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
สารบาญเรื่อง	iv
สารบาญตาราง	v
สารบาญภาพ	vi
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	5
วัสดุและอุปกรณ์	6
วิธีการดำเนินการวิจัย	8
ผลการวิจัย	11
วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย	19
ปัญหาและอุปสรรค	20
บรรณานุกรม	21
ภาคผนวก	25

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การสกัดพืชด้วย methanol และน้ำหนักแห้งที่ได้	12
2	ค่า MIC ของยาต้านจุลินทรีย์ต่อเชื้อ *Helicobacter pylori* โดยวิธี E- test	14
3	ค่า MIC ของสารสกัดจากพืชชนิดต่าง ๆและยาต้านจุลินทรีย์ต่อเชื้อ *Helicobacter pylori* โดยวิธี agar dilution	17
4	ผลสารสกัดจากพืชชนิดต่าง ๆด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด ต่อเชื้อ *Helicobacter pylori* โดยวิธี agar dilution	18

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์ของเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี E- test บนอาหาร color indicator egg yolk agar	13
2	การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์ของเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี agar dilution	16

บทนำ

ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันแล้วว่า แบคทีเรีย *Helicobacter pylori* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคกระเพาะอาหาร chronic type B gastritis และยังมีความสัมพันธ์กับ peptic ulcer และ gastric cancer (Buck, 1990, Lee *et al.*,1993, NIH, 1994, Parsonett *et al.*, 1994) เชื้อนี้พบได้ทั่วโลก มีผู้ประมาณการว่าครึ่งหนึ่งของประชากรโลกติดเชื้อ *H. pylori* (Blaser, 1992) การรักษาที่ได้ผลต้องใช้ยามากกว่าหนึ่งชนิด เช่น bismuth subsalicylate, tetracycline และ metronidazole (NIH, 1994) หรือ ranitidine, amoxicillin และ metronidazole (Hentschel *et al.*, 1993) หรือ omeprazole และ amoxicillin (Bayersdorffer *et al.*, 1992) แต่คนไข้มักกลับเป็นซ้ำอีก เนื่องจากแบคทีเรียเกิดการดื้อยา ทำให้เป็นปัญหาในการรักษา Okada *et al.* (1999) รายงานว่าการใช้ยาร่วมกัน 4 ชนิด ได้แก่ omeprazole, amoxicillin, roxithromycin และ metronidazole เป็นเวลา 1 สัปดาห์ สามารถกำจัดเชื้อ *H. pylori* ในคนไข้ได้มากกว่า 90%

ในตำรายาไทย มีสมุนไพรหลายตัวที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคกระเพาะอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ ที่รู้จักกันดี คือ เปล้าน้อย (*Croton sublyratus*) ที่ส่วนใบมีสาร plaunotol มีฤทธิ์สมานแผลในกระเพาะอาหาร ซึ่งบริษัทซันเกียว ประเทศญี่ปุ่น ได้ผลิตออกจำหน่ายมีชื่อทางการค้าว่า Kelnac® โดยสาร plaunotol ช่วยเพิ่ม defense factors เช่น เพิ่มการไหลเวียนโลหิตในเยื่อบุกระเพาะอาหาร เพิ่มการหลั่งสาร bicarbonate และ gastric mucous ในกระเพาะอาหาร ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณ prostaglandin ในเยื่อบุกระเพาะอาหาร (Ushiyama *et al.*, 1985) ทำให้จัด plaunotol เป็น cytoprotective antiulcer agent ต่อมาหลังจากที่มีการค้นพบว่า *H. pylori* เป็นสาเหตุของโรคแผลในกระเพาะอาหาร นักวิจัยของบริษัทซันเกียว ก็ได้นำสาร plaunotol มาทดสอบกับเชื้อ *H. pylori* จำนวน 15 สายพันธุ์ในหลอดทดลอง พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *H. pylori* ได้ โดยมีค่า MIC_{50} และ MIC_{90} เท่ากับ 6.25 และ 12.5 mg/L ตามลำดับ และเมื่อทดสอบในสัตว์ทดลองที่ทำให้เกิด gastritis ด้วยเชื้อ *H. pylori* พบว่าจำนวนเชื้อลดลงอย่างชัดเจน (Koga *et al.*, 1996a) plaunotol มีฤทธิ์เป็น bactericide โดยออกฤทธิ์ที่ cell membrane ของเชื้อ (Koga *et al.*, 1996b) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาสารสกัดจากพืชหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* เช่น สารสกัดจากเปลือกต้น *Terminalia spinosa* (Fabry *et al.*, 1996) สารสกัดจาก Iceland moss (Ingolfdottir *et al.*, 1997) สารสกัดจากอบเชยจีน (*Cinnamomum cassia*) (Tabak *et al.*, 1999) สารสกัดจากพืชพื้นเมืองของตุรกีที่ใช้รักษาโรคกระเพาะ (Yesilada *et al.*, 1999) quinolone alkaloids จากผลของ *Evodia ruteacarpa* (Rho *et al.*, 1999, Hamasaki *et al.*, 2000) สารสกัดจากกระเทียม (Jonkers *et al.*, 1999) และสาร epigallocatechin gallate จากชาจีน (Yee and Koo, 2000)

สมุนไพรไทยอื่น ๆ เช่น ขมิ้นชันและกล้วยดิบ ก็มีประสิทธิภาพดีในการรักษาแผลในกระเพาะอาหาร แต่ยังไม่ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *H. pylori* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคนี้ ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยเหล่านี้ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์และเพื่อประโยชน์ในการพัฒนายาจากพืชสมุนไพรไทยต่อไป

พืชสมุนไพรที่เลือกมาทำการศึกษาในครั้งนี้ได้แก่

1. **กะเพรา** (*Ocimum sanctum* Linn.) จัดอยู่ในวงศ์ Labiatae เป็นไม้พุ่ม มีลักษณะหรือใบคล้ายโหระพา ต่างกันที่กลิ่นและกิ่งก้านมีขนปกคลุมมากกว่า กะเพรามี 3 พันธุ์ คือ กะเพราแดง กะเพราขาว และกะเพราลูกผสมระหว่างกะเพราแดงและกะเพราขาว กะเพราขาวมีใบสีเขียวอ่อน ส่วนกะเพราแดงสีเขียวแกมม่วงแดง ดอกย่อยสีชมพูแกมม่วง ดอกกะเพราแดงสีเข้มกว่ากะเพราขาว ในตำรายาไทย ใช้ใบหรือทั้งต้นขับลม แก้ปวดท้อง ท้องเสีย และคลื่นไส้อาเจียน นิยมใช้กะเพราแดงมากกว่ากะเพราขาว มีการทดลองในสัตว์ทดลอง พบว่าน้ำสกัดทั้งต้นมีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ สารสกัดแอลกอฮอล์สามารถรักษาแผลในกระเพาะอาหารได้ (พร้อมจิต และคณะ, 2535, Farnsworth and Bunyapraphatsara, 1992)

2. **กล้วยน้ำว้า** (*Musa* ABB group (triploid) cv. "Namwaa") วงศ์ Musaceae เป็นผลไม้ที่คนไทยรู้จักกันดี ในผลดิบมีสาร tannin มาก รักษาอาการท้องเสียและบิด และมีรายงานว่ามีฤทธิ์ป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยยาแอสไพริน จึงนำมารักษาโรคกระเพาะอาหารของคน โดยใช้กล้วยดิบหั่นเป็นแว่น ตากแห้ง บดเป็นผง รับประทานวันละ 4 ครั้งๆ ละ 1-2 ช้อนแกง ก่อนอาหารและก่อนนอน (พร้อมจิต และคณะ, 2535, Farnsworth and Bunyapraphatsara, 1992)

3. **ขมิ้น** (*Curcuma longa* Linn.) จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เป็นไม้ล้มลุก มีเหง้าใต้ดิน เนื้อในเหง้าสีเหลืองส้ม มีกลิ่นเฉพาะ มีชื่ออื่นๆอีกคือ ขมิ้นแกง ขมิ้นชัน ขมิ้นหัว ในตำรายาไทย ใช้เหง้ารักษาโรคผิวหนังผุพองในเด็ก ใช้เหง้ารักษาโรคท้องอืดท้องเฟ้อและแผลในกระเพาะอาหาร โดยใช้ขนาด 250 มิลลิกรัม ครั้งละ 2 เม็ด วันละ 4 ครั้งหลังอาหารและก่อนนอน (พร้อมจิต และคณะ, 2535,วันดี, 2536, Farnsworth and Bunyapraphatsara, 1992)

4. **บัวบก** (*Centella asiatica* (Linn.) Urban) จัดอยู่ในวงศ์ Umbelliferae เป็นไม้ล้มลุก เลื้อยแผ่ไปตามดิน ชอบที่ชื้นแฉะ ในตำรายาไทย ใช้น้ำต้มใบสดดื่มรักษาโรคปากเปื่อย เจ็บคอ

กระหายน้ำ ลดไข้ ขับปัสสาวะ แก้ท้องเสีย ใช้เป็นยาทาภายนอกรักษาแผลเปื่อย แผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก ระงับการเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนองและลดการอักเสบ มีรายงานการใช้สาร madecassol จากบัวบกในการรักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ในคนไข้ได้ผลดี (พร้อมจิต และคณะ, 2535, Rhee and Choi, 1981, Cho *et al*., 1981, Farnsworth and Bunyapraphatsara, 1992)

5. **ฟ้าทะลายโจร** (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Nees) วงศ์ Acanthaceae เป็นไม้ล้มลุกสูง 30-60 เซนติเมตร ทั้งต้นมีรสขม ใช้เป็นยาแก้เจ็บคอ แก้ท้องเสีย ใช้รักษาโรคอุจจาระร่วงและบิดไม่มีตัว มีประสิทธิภาพในการรักษาเท่ากับยาปฏิชีวนะ tetracycline นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดลองใช้ใบฟ้าทะลายโจรที่บดเป็นผงให้หนูที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดแผลในกระเพาะอาหาร พบว่าช่วยลดการเกิดแผลในกระเพาะอาหารในหนูทดลองได้ (พร้อมจิต และคณะ, 2535, Pornsuwattana *et al*., 1989, Farnsworth and Bunyapraphatsara, 1992)

6. **ข่าลิง** (*Alpinia conchigera* Griff.) เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae มีลักษณะใบ ต้น ดอก และหัวคล้ายข่าใหญ่ (*A. nigra*) แต่มีขนาดเล็กกว่า เหง้ามีกลิ่นฉุนและร้อนแรงกว่า แพทย์แผนโบราณใช้เหง้าผสมกับเหล้า รับประทานแก้ปวดท้อง จุกเสียดแน่นเฟ้อ (สำนักงานปลัดทบวงมหาวิทยาลัย, 2531) Athamaprasangsa *et al*. (1994) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันข่าลิง พบว่าประกอบด้วย 12 สาร และสารหลัก คือ chavicol acetate

7. **มังคุด** (*Garcinia mangostana* Linn.) อยู่ในวงศ์ Guttiferae เป็นไม้ผลที่ปลูกมากทางภาคใต้และภาคตะวันออก เปลือกของมังคุดมีสารแทนนิน และ xanthones หลายชนิด (Yuhikawa, 1994) สาร mangostin ซึ่งเป็นพวก xanthone มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ทั้งสายพันธุ์ที่ไวและที่ดื้อต่อยา penicillin (วิลาวัลย์ และคณะ, 2526) และสายพันธุ์ที่ดื้อยา methicillin (Methicillin resistant *S. aureus*, MRSA) (เสาวลักษณ์ และคณะ, 2537) ในตำรายาไทยใช้เปลือกผลบดแห้งรับประทานแก้บิด ท้องร่วง และมีฤทธิ์สมานแผล (วิทย์, 2542)

8. **ไพล** (*Zingiber cassumunar* Roxb.) อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ในเหง้าไพลมีน้ำมันหอมระเหย (Baku and Nabney, 1975) สาร curcumin ซึ่งมีสีเหลือง (Kuroyanagi *et al*., 1980) สารกลุ่ม monoterpenes (Pongprayoon *et al*., 1997) และ sesquiterpenes (Kishore and Dwinedi, 1992) ตำรายาไทยใช้เหง้าเป็นยาขับลม ขับประจำเดือน มีฤทธิ์เป็นยาระบายอ่อน ๆ แก้บิด และสมานลำไส้ (พร้อมจิต, 2535)

9. **ฝรั่ง** (*Psidium guajava* Linn.) **อยู่ในวงศ์** Myrtaceae **ใบแก่มีสารแทนนิน** 8-15% (**กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์**, 2533) **ตำรายาไทยใช้ใบแก้ท้องร่วง บิดมูกเลือด มีรายงานการทดลองในผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง โดยให้รับประทานผงใบแห้ง** 500 **มิลลิกรัม ทุก** 3 **ชม. เป็นเวลา** 3 **วัน พบว่าได้ผลดีกว่ายา** tetracycline (**พร้อมจิต**, 2535)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของส่วนสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรไทยที่มีสรรพคุณรักษาโรคกระเพาะ หรือโรคระบบทางเดินอาหาร ต่อเชื้อ *H. pylori* ที่เป็นสาเหตุของโรคกระเพาะ

วัสดุและอุปกรณ์

1. พืชสมุนไพร ได้แก่ ต้นกะเพราแดง ผลกล้วยน้ำว้าดิบ เหง้าขมิ้นชัน ใบฟ้าทะลายโจร ต้นบัวบก เปลือกมังคุด เหง้าไพล และใบฝรั่ง เก็บตัวอย่างพืชจากจังหวัดสงขลาและจังหวัดใกล้เคียง

2. แบคทีเรีย *Helicobacter pylori*

2.1 เชื้อที่แยกได้จากคนไข้ จากโรงพยาบาลราชวิถี โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. อรษา สุเธียรกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่

- *H. pylori* 64/41
- *H. pylori* 271
- *H. pylori* 279

2.2 เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Paul W. O'Toole, Institute of Molecular BioSciences, Massey University, Box 11 222, Palmerston North, New Zealand จำนวน 3 สายพันธ์ ได้แก่

- *H. pylori* 915 จาก Gothenburg, Sweden
- *H. pylori* M019 จาก University of Westblom, St. Louis, USA
- *H. pylori* 92-489-1 จาก Korea

เก็บเชื้อไว้ใน TSB และ Brucella broth ที่ผสม 20% glycerol เก็บไว้ที่ -70 °C เมื่อจะทำการทดสอบ ถ่ายเชื้อลงบน Heart infusion agar หรือ Brucella agar ที่ผสมเลือด (กรุ๊ปโอ) 5% บ่มเพาะเชื้อที่ 37 °C ในสภาวะ microaerophilic โดยใช้ Oxoid gas-generating kit (Campy-Gen) ใน anaerobic jar ที่ไม่ใส่ catalyst

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 Tryptic soy broth (TSB, Difco)

3.2 Heart infusion agar (Difco)

3.3 Mueller Hinton agar (MHA, Difco)

3.4 Brucella agar

3.5 Urea agar

4. สารเคมี

4.1 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)

4.2 แผ่นยา E-test ของ clarithromycin, erythromycin และ doxycycline (AB Biodisk)

4.3 ยา methronidazole (Sigma)

4.4 ยา amoxicillin (Sigma)

4.5 สี 2,3,5- triphenyl tetrazolium chloride (TTC, Fluka)

4.6 Oxoid gas-generating kit, Campy Gen (Oxoid)

4.7 Methanol

5. แผ่น disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Schleicher & Schuell)

6. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่าง ๆทางจุลชีววิทยาและทางเคมี

วิธีดำเนินการวิจัย

1. **การสกัดสารจากพืชสมุนไพร**

1.1 สารสกัดด้วย methanol

- กะเพราแดง ใช้ทั้งต้นสด และแห้ง
- กล้วยน้ำว้า ใช้ผลดิบ
- ขมิ้นชัน ใช้ส่วนเหง้าแห้ง
- บัวบก ใช้ทั้งต้นสด และแห้ง
- ฟ้าทะลายโจร ใช้ใบแห้ง

เก็บตัวอย่างพืชสด สำหรับตัวอย่างพืชแห้งนั้นนำพืชสดมาอบให้แห้งในตู้อบ อุณหภูมิ 50 °C จนกว่าจะแห้ง นำส่วนของพืชสมุนไพรแต่ละชนิดมาบดให้ละเอียด โดยแยกส่วนที่สดและแห้งออกจากกัน ทำการสกัดเย็นด้วยการแช่ใน 95% methanol โดยใช้พืชสมุนไพร 1 ส่วน แช่ใน methanol 4 ส่วน ที่อุณหภูมิห้อง ทำการสกัด 3 ครั้ง แช่ครั้งละ 1 สัปดาห์ จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator

1.2 น้ำมันข่าลิง

ได้จากการนำเหง้าข่าลิงสดไปปั่นหยาบ แล้วนำมากลั่นด้วยไอน้ำ น้ำมันหอมระเหยออกมากับไอน้ำและแยกอยู่ชั้นบน จากนั้นจึงแยกออกจากชั้นน้ำ

1.3 สารสกัดจากพืชสมุนไพรด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด

ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. อรุณพร อิฐรัตน์ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้แก่ สารสกัดจาก

- ฟ้าทะลายโจร ใช้ส่วนใบแห้ง
- ฝรั่ง ใช้ส่วนใบแห้ง
- ขมิ้นชัน ใช้ส่วนเหง้าตากแห้ง
- ไพล ใช้ส่วนเหง้าตากแห้ง
- มังคุด ใช้ส่วนปลือกผลตากแห้ง

นำส่วนของพืชสมุนไพรมาบดให้ละเอียด ใส่ใน percolator เพื่อแช่ในตัวทำละลายจากขั้วต่ำไปหาขั้วสูงเรียงตามลำดับ ดังนี้ petroleum ether, chloroform, ethanol 95% และ ethanol: น้ำ (1:1) โดยหมักในตัวทำละลายเป็นเวลา 2 วัน กรอง filtrate ที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ส่วนของกากสมุนไพรนำไปแช่ในตัวทำละลายต่อไป เป็นลำดับ กากสมุนไพรส่วนที่ได้หลังจากแช่ใน ethanol: น้ำ (1:1) นำมาต้มกับน้ำที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 1 ชั่วโมง กรอง นำส่วน filtrate ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer

นำสารสกัดมาเตรียมเป็น stock solution ความเข้มข้น 100 mg/ml โดยใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลาย ยกเว้นสารสกัดส่วนสุดท้ายในข้อ 1.3 ที่สกัดด้วยน้ำ ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

2. การทดสอบความไวของ *H. pylori* ต่อยาต้านจุลินทรีย์และสารสกัด

2.1 วิธีการเตรียมเชื้อ *H. pylori*

เลี้ยงเชื้อ *H. pylori* บนอาหาร Brucella agar ที่ผสมเลือด (กรุ๊ป โอ) 5% บ่มเพาะเชื้อที่ 37 °C ในสภาวะ microaerophilic โดยใช้ Oxoid gas-generating kit (Campy-Gen) ใน anaerobic jar ที่ไม่ใส catalyst เป็นเวลา 3-4 วัน เขี่ยเชื้อใสใน Brucella broth ปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 MCFarland standard (Lorian, 1991)

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

2.2.1 วิธี E-test

นำ bacterial suspension ใน Brucella broth ที่มีความขุ่น 0.5 McFarland standard มาละเลงบนวุ้นอาหาร MHA ที่ผสมเลือด 5% และ MHA ที่ผสมไข่แดงและสี tetrazolium (color indicator egg yolk agar ดัดแปลงจากวิธีของ Vasquez *et al.*, 1996) แล้ววางแผ่น E-test ของยา clarithromycin, erythromycin และ doxycycline นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37 °C ในสภาวะ microaerophilic โดยใช้ Campy-Gen ใน anaerobic jar ที่ไม่ใส catalyst เป็นเวลา 3-4 วัน อ่านค่า MIC จาก ellipse zone ที่ตัดกับแผ่น E-test บน color indicator egg yolk agar บริเวณที่มีเชื้อขึ้นจะเห็นเป็นปื้นเชื้อติดสีแดง ส่วนบริเวณที่ไม่มีเชื้อขึ้นจะเป็นสีเหลืองของวุ้นอาหาร

2.2.2 วิธี disc diffusion

นำ bacterial suspension ใน Brucella broth ที่มีความขุ่น 0.5 McFarland standard มาละเลงบนวุ้นอาหาร MHA ที่ผสมเลือด 5% และ color indicator egg yolk agar แล้ววางแผ่น disc ชุบสารสกัดจากพืชสมุนไพร ความเข้มข้น 1 mg/แผ่น ลงบนวุ้นอาหารที่มีเชื้อ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37 °C ในสภาวะ microaerophilic โดยใช้ Campy-Gen ใน anaerobic jar ที่ไม่ใส catalyst เป็นเวลา 3-4 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone

แผ่น disc ชุดควบคุมจุ่ม DMSO หรือน้ำกลั่นไร้เชื้อที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัด

2.2.3 วิธี agar dilution

เตรียมสารละลายของสารสกัดในข้อ 1.1 และ 1.2 ให้มีความเข้มข้น 100 mg/ml แล้วเจือจางแบบลำดับสองอีก 10 ความเข้มข้น นำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นผสมกับ color indicator egg yolk agar ที่หลอมเหลว ในอัตราส่วน 1:100 ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดในวุ้นอยู่ในช่วง 1.95-1000 µg/ml เทวุ้นลงในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. ทำความเข้มข้นละ 3 จาน

สำหรับยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน ใช้ amoxicillin และ metronidazole ละลายใน DMSO แล้วเจือจางแบบลำดับสอง 10 ความเข้มข้น ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.98-500 µg/ml

สำหรับสารสกัดในข้อ 1.3 ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 1000 µg/ml เพียงความเข้มข้นเดียว

ชุดควบคุมใช้ DMSO ผสมในวุ้นอาหารในอัตราส่วน 1:100

นำ bacterial suspension ความขุ่น 0.5 McFarland standard มา inoculate บนวุ้นอาหารที่ผสมสารสกัดด้วย multipoint inoculator (1 จุดมีปริมาณแบคทีเรีย 10^4 cfu) ทำเชื้อละ 2 ซ้ำ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37 °C ในสภาวะ microaerophilic โดยใช้ Campy-Gen ใน anaerobic jar ที่ไม่ใส่ catalyst เป็นเวลา 3-4 วัน อ่านค่า MIC ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งเชื้อได้ คือ ไม่มีเชื้อขึ้นที่ความเข้มข้นนั้น ถ้ามีเชื้อขึ้นจะเห็นเป็นโคโลนีสีแดงบนวุ้นอาหาร color indicator egg yolk agar

ผลการวิจัย

1. สารสกัดที่สกัดได้จากตัวอย่างพืช

1.1 สารสกัดด้วย methanol จากส่วนต่าง ๆของพืช 5 ชนิด ได้แก่ กะเพราแดง กล้วยน้ำว้าดิบ ขมิ้นชัน บัวบก และฟ้าทะลายโจร ได้สารสกัดรวม 8 สารสกัด น้ำหนักของสารสกัดที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 ร้อยละของสารสกัดที่ได้อยู่ในช่วง 2.92-16.0 สำหรับกะเพราแดงและบัวบก ได้นำทั้งส่วนของพืชสดและแห้งมาทำการสกัด พบว่าปริมาณสารสกัดที่ได้จากใบและต้นกะเพราแดงสดมากกว่าส่วนที่แห้งเล็กน้อย แต่สารสกัดที่ได้จากใบและต้นบัวบกแห้งมีปริมาณมากกว่าพืชสดมาก อย่างไรก็ตามเมื่อนำสารสกัดที่ได้จากทั้งสองส่วนไปตรวจดู TLC pattern พบว่าสารสกัดหยาบจากกะเพราแดงสดและแห้งมี TLC pattern เหมือนกัน เช่นเดียวกับสารสกัดหยาบจากบัวบกสดและแห้ง จึงเลือกทดสอบเฉพาะสารสกัดหยาบจากพืชแห้งเท่านั้น สำหรับผลกล้วยน้ำว้าดิบนั้น หลังจากที่แช่ใน methanol ครั้งที่ 1 เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำส่วน filtrate มาระเหยแห้ง ได้ semisolid สีน้ำตาล เมื่อนำส่วนกากมาแช่ใน methanol เป็นครั้งที่ 2 แล้วนำส่วน filtrate มาระเหยแห้ง ได้ semisolid สีน้ำตาลเหลือง สารสกัดหยาบทั้ง 2 ส่วนมีการละลายที่ต่างกัน จึงแยกทดสอบทั้ง 2 ส่วน

1.2 น้ำมันข่าลิง มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลือง มีกลิ่นหอมฉุน

1.3 สารสกัดจากพืชสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ใบฟ้าทะลายโจร ใบฝรั่ง เหง้าขมิ้นชัน เหง้าไพล และเปลือกมังคุดตากแห้ง ด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด คือ petroleum ether, chloroform, ethanol 95%, ethanol: น้ำ (1:1) และน้ำ ตามลำดับ ได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 25 ชนิด

ดังนั้นจึงได้นำสารสกัดทั้งหมด 32 สารสกัด (จากข้อ 1.1 จำนวน 6 สารสกัด ข้อ 1.2 จำนวน 1 สารสกัด และ ข้อ 1.3 จำนวน 25 สารสกัด) ไปทดสอบ

หมายเหตุ: สารสกัดในข้อ 1.2 และ 1.3 เป็นสารสกัดที่นำมาทดสอบเพิ่มเติมจากที่เสนอไว้ในโครงการวิจัย ดังนั้นจึงไม่มีข้อมูลการสกัด

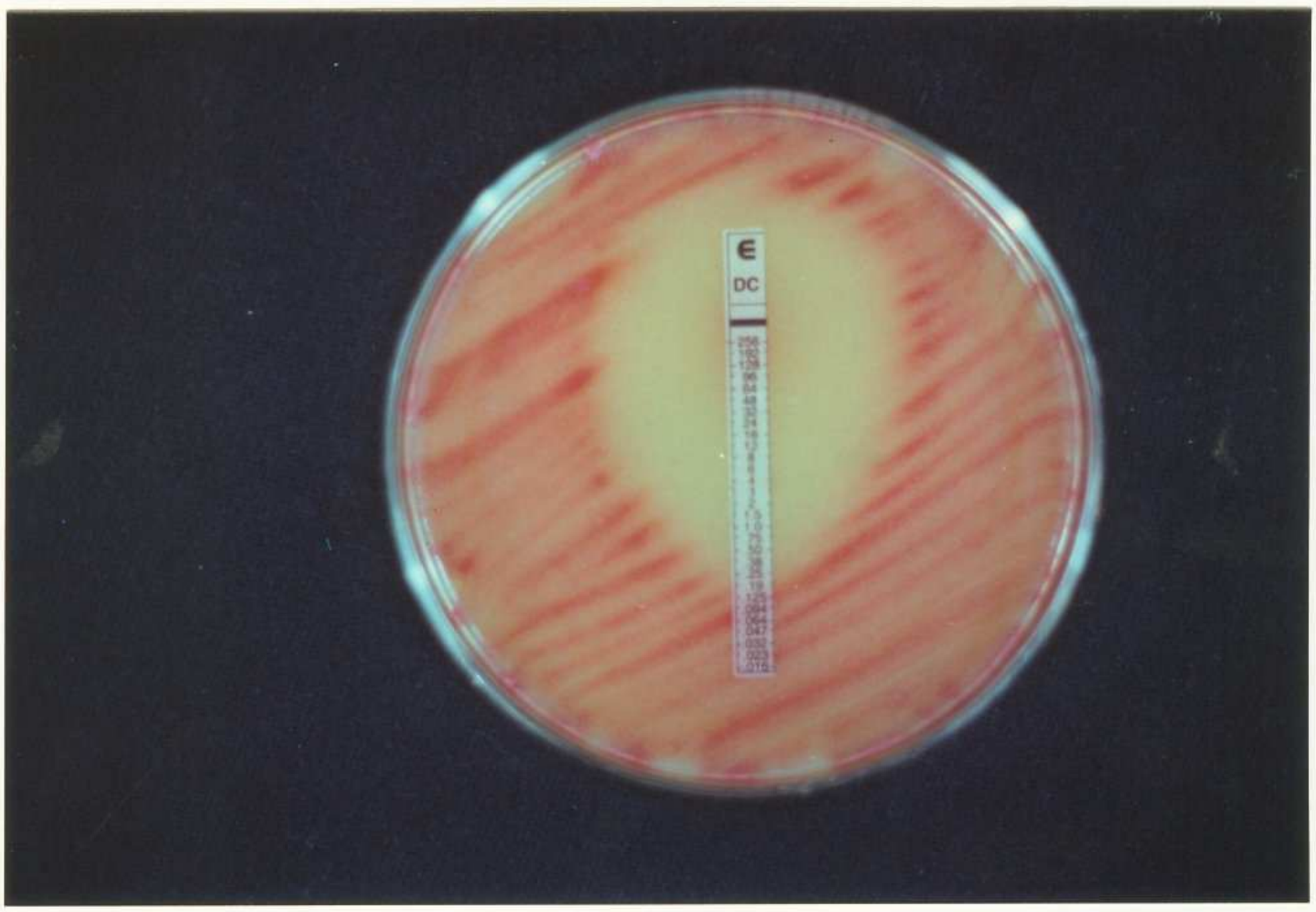
ตารางที่ 1 การสกัดพืชด้วย methanol **และน้ำหนักแห้งที่ได้**

พืชสมุนไพร (ชื่อวิทยาศาสตร์)	ส่วนของพืชที่นำมาสกัด (น้ำหนัก, กรัม)	ลักษณะทางกายภาพ ของส่วนสกัดหยาบ	น.น.ของส่วนสกัดหยาบ (กรัม)	Yield (%)
กะเพราแดง *Ocimum sanctum* Linn.	ใบและต้นสด (980)	ของหนืดสีเขียวน้ำตาล	51.48	4.29
กะเพราแดง *Ocimum sanctum* Linn.	ใบและต้นแห้ง (1,200)	ของหนืดสีเขียวน้ำตาล	57.96	5.91
กล้วยน้ำว้า *Musa* ABB group (triploid) cv. "Namwaa"	ผลดิบ (1,800)	ส่วนที่1: Semisolid สีน้ำตาล	41.23	2.29
		ส่วนที่2: Semisolid สีน้ำตาลเหลือง	11.36	0.63 (รวม 2.92)
ขมิ้นชัน *Curcuma longa* Linn.	เหง้าแห้ง (1,000)	ของหนืดสีแดงน้ำตาล	159.99	16.00
บัวบก *Centella asiatica* (Linn.)Urban	ใบและต้นสด (1,000)	ของหนืดสีเขียวแก่	29.78	2.98
บัวบก *Centella asiatica* (Linn.) Urban	ใบและต้นแห้ง (710)	ของหนืดสีเขียวแก่	48.67	6.95
ฟ้าทะลายโจร *Andrographis paniculata* (Burm.f) Nees	ใบแห้ง (1,000)	ของหนืดสีเขียวเข้ม	108.23	10.83

2. **การทดสอบความไวของ** *H. pylori* **ต่อยาต้านจุลินทรีย์โดยวิธี** E-test

H. pylori เจริญได้ช้า และโคโลนีมีขนาดเล็กมากบนอาหาร MHA ที่ผสมเลือด 5% เมื่อทำการทดสอบ E-test พบว่าสามารถอ่านผลบนอาหาร color indicator egg yolk agar ได้ชัดเจนกว่าเนื่องจากมีการเติมสี tetrazolium ซึ่งเชื้อที่มีชีวิตจะติดสีแดง ตัดกับสีเหลืองของอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างชัดเจน (รูปที่ 1) ดังนั้นในการทดสอบครั้งต่อ ๆไปจึงใช้อาหาร color indicator egg yolk agar

ผลการทดสอบพบว่า *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์จากคณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลไวต่อยา clarithromycin และสายพันธุ์มาตรฐานไวต่อยา erythromycin และ doxycycline ที่ทดสอบโดยวิธี E · test (ตารางที่ 2)



รูปที่ 1 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์ของเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี E- test บนอาหาร color indicator egg yolk agar

ตารางที่ 2 ค่า MIC **ของยาต้านจุลินทรีย์ต่อเชื้อ** *Helicobacter pylori* **โดยวิธี** E- test

ยาต้านจุลินทรีย์	ค่า MIC (µg/ml)					
	HP64/41[a]	HP 271[a]	HP 279[a]	HP 915[b]	HP M019[b]	HP92-489-1[b]
Clarithromycin	<0.016 (S)	<0.016 (S)	<0.016 (S)	ND	ND	ND
Erythromycin	ND	ND	ND	<0.016 (S)	0.50 (S)	<0.016 (S)
Doxycycline	ND	ND	ND	0.38 (S)	0.125 (S)	0.25 (S)

[a]: เชื้อ *H. pylori* ที่แยกได้จากคนไข้ จากโรงพยาบาลราชวิถี

[b]: เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Paul W. O'Toole, Institute of Molecular BioSciences, Massey University

ND - ไม่ได้ทดสอบ

3. **การทดสอบความไวของ *H. pylori* ต่อสารสกัดโดยวิธี** disc diffusion

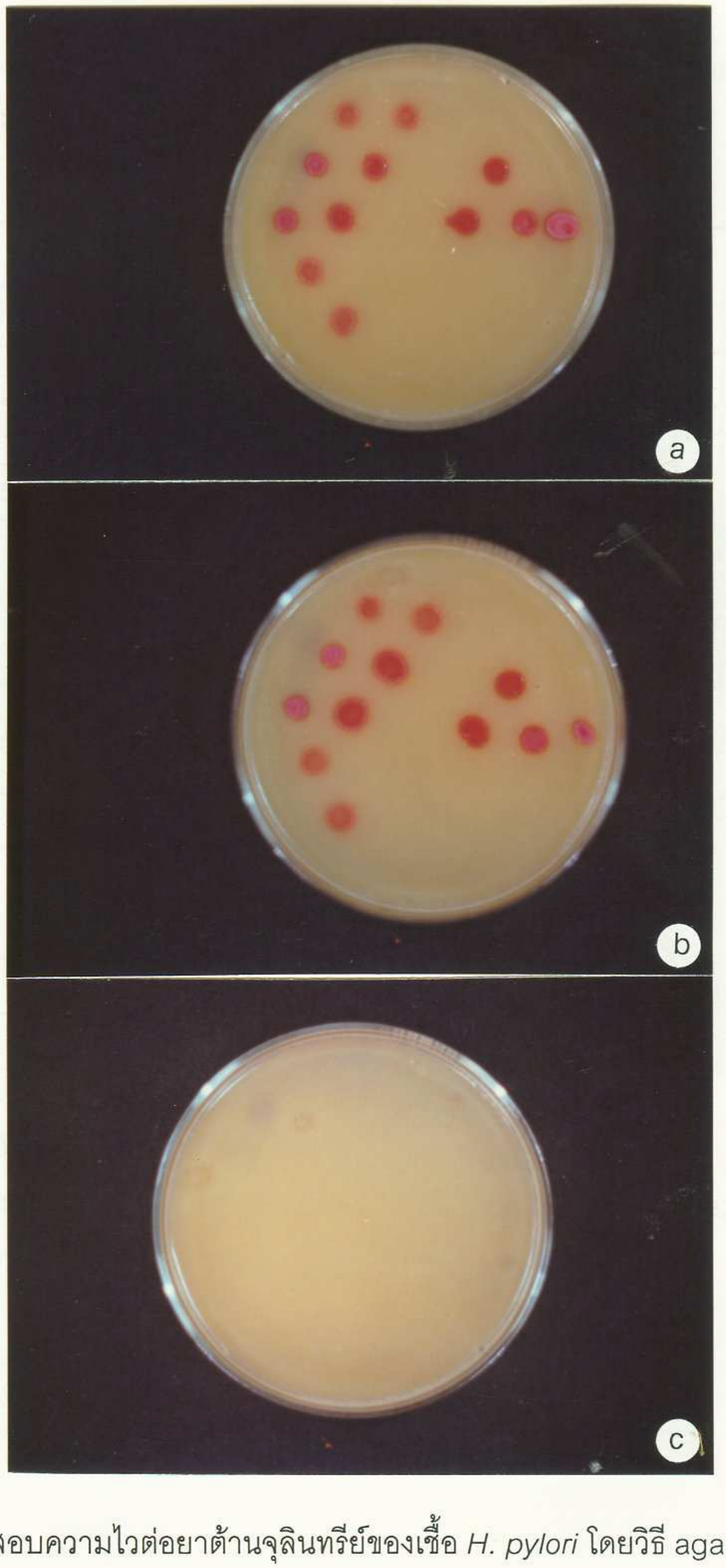
สารสกัดทุกสารสกัดที่นำมาทดสอบละลายใน DMSO ยกเว้นสารสกัดจากข้อ 1.3 ที่สกัดด้วยน้ำ ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ผลการทดสอบพบว่าไม่มีสารสกัดใดให้ inhibition zone จากการสังเกตพบว่าสารสกัดส่วนใหญ่มีการแพร่ซึมในวุ้นอาหารน้อยมาก โดยเฉพาะสารสกัดหยาบจากกล้วยดิบทั้ง 2 สารสกัด มีการละลายใน DMSO น้อยมาก ต้องใช้ sonicator ช่วยให้ได้เป็น suspension และเมื่อนำไปหยดบนแผ่น disc เห็นได้ชัดเจนว่าสารสกัดหยาบเกาะติดอยู่บนแผ่น disc ดังนั้นจึงนำสารสกัดทุกสารไปทดสอบโดยวิธี agar dilution

4. **การทดสอบความไวโดยวิธี** agar dilution

เชื้อ *H. pylori* 3 สายพันธุ์จากโรงพยาบาลราชวิถีและเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานมีความไวต่อยา amoxicillin โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.98 µg/ml (รูปที่ 2) แต่ดื้อต่อยา metronidazole มีค่า MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 500 µg/ml (ตารางที่ 3)

ผลการทดสอบกับสารสกัดจาก กะเพราแดง กล้วยดิบ ขมิ้นชัน บัวบก และฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วย methanol และน้ำมันข่าลิง รวม 7 สารสกัด ที่ระดับความเข้มข้น 1.95 - 1,000 µg/ml พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ คือ 1,000 µg/ml ไม่สามารถยับยั้ง *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์จากโรงพยาบาลราชวิถีได้ (ตารางที่ 3) มีเพียงน้ำมันข่าลิงที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1,000 µg/ml

สำหรับสารสกัดจากพืช 5 ชนิดด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด รวม 25 สารสกัด ได้ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นเดียว คือ 1,000 µg/ml ต่อเชื้อ *H. pylori* 6 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* ได้ มีเพียงสารสกัดจากขมิ้นชันด้วย ethanol 95% และ ethanol: น้ำ (1:1) และสารสกัดจากไพลด้วย ethanol 95% ที่ยับยั้งเชื้อ *H. pylori* 4-5 สายพันธุ์จาก 6 สายพันธุ์ที่ความเข้มข้นนี้ (ตารางที่ 4)



รูปที่ 2 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์ของเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี agar dilution

a: อาหาร color indicator egg yolk agar

b: อาหาร color indicator egg yolk agar ผสม DMSO 1:100

c: อาหาร color indicator egg yolk agar ผสม amoxicillin 0.98 μg/ml

ตารางที่ 3 ค่า MIC ของสารสกัดจากพืชชนิดต่าง ๆ และยาต้านจุลินทรีย์ ต่อเชื้อ *Helicobacter pylori* **โดยวิธี** agar dilution

ยา/ สารสกัด	ค่า MIC (µg/ml)					
	HP64/41[a]	HP 271[a]	HP 279[a]	HP 915[b]	HP M019[b]	HP92-489-1[b]
Control DMSO	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Amoxicillin	0.98 (S)	0.98 (S)	0.98 (S)	0.98 (S)	0.98 (S)	0.98 (S)
Metronidazole	>500 (R)	500(R)	500 (R)	>500 (R)	500(R)	500 (R)
สารสกัดด้วย methanol						
กะเพราแดง-MeOH	>1,000	>1,000	>1,000			
กล้วยน้ำว้า1-MeOH	>1,000	>1,000	>1,000			
กล้วยน้ำว้า2-MeOH	>1,000	>1,000	1,000			
ขมิ้นชัน-MeOH	>1,000	>1,000	>1,000			
ฟ้าทะลายโจร-MeOH	>1,000	>1,000	>1,000			
บัวบก-MeOH	>1,000	>1,000	>1,000			
น้ำมันข่าลิง	1,000	1,000	1,000			

[a]: เชื้อ *H. pylori* ที่แยกได้จากคนไข้ จากโรงพยาบาลราชวิถี

[b]: เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Paul W. O'Toole, Institute of Molecular BioSciences, Massey University

NI: ไม่ยับยั้งเชื้อ

ตารางที่ 4 ผลสารสกัดจากพืชชนิดต่าง ๆด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด ต่อเชื้อ *Helicobacter pylori* โดยวิธี agar dilution

สารสกัด (1,000 µg/ml)	HP64/41 [a]	HP 271 [a]	HP 279 [a]	HP 915 [b]	HP M019 [b]	HP92-489-1 [b]
ฟ้าทะลายโจร-Pet. ether	-	-	-	-	-	-
ฟ้าทะลายโจร-$CHCl_3$	+	+	+	-	-	-
ฟ้าทะลายโจร-EtOH95%	-	-	-	+	+	+
ฟ้าทะลายโจร-EtOH: น้ำ (1:1)	-	-	-	-	+	+
ฟ้าทะลายโจร-น้ำ	-	-	-	+	-	-
ฝรั่ง- Pet. ether	-	-	-	+	+	-
ฝรั่ง-$CHCl_3$	-	-	-	+	+	-
ฝรั่ง-EtOH95%	-	-	-	+	+	+
ฝรั่ง-EtOH: น้ำ(1:1)	-	-	-	+	+	+
ฝรั่ง-น้ำ	-	-	-	-	-	-
ขมิ้น -Pet. ether	-	-	-	+	+	-
ขมิ้น-$CHCl_3$	-	-	-	+	+	-
ขมิ้น -EtOH95%	+	+	+	+	+	-
ขมิ้น-EtOH:น้ำ(1:1)	+	-	+	+	+	-
ขมิ้น -น้ำ	-	-	-	+	+	-
ไพล- Pet. ether	-	+	+	-	-	-
ไพล -$CHCl_3$	-	-	-	-	-	-
ไพล -EtOH95%	+	+	+	+	-	-
ไพล-EtOH: น้ำ (1:1)	-	-	-	-	-	-
ไพล -น้ำ	-	-	-	+	-	-
มังคุด- Pet. ether	-	-	-	+	+	-
มังคุด -$CHCl_3$	-	-	-	-	-	-
มังคุด -EtOH95%	-	-	-	-	-	-
มังคุด-EtOH:น้ำ(1:1)	-	-	-	-	-	-
มังคุด -H_2O	-	-	-	-	-	-

- ไม่ยับยั้ง, + ยับยั้ง

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

สารสกัดทั้งหมดรวม 32 สารสกัดที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 3 และ 4) มีการละลายต่ำมากใน DMSO และน้ำ ทำให้เป็นปัญหาในการเตรียมสารละลายของสารสกัด แม้แต่สารสกัดที่สกัดด้วยน้ำเมื่อเตรียมสารละลายของสารสกัดที่ความเข้มข้นสูง 100 mg/ml โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายจะได้สารละลายที่เป็นของเหลวหนืดละลายได้ยากมาก สำหรับสารสกัดที่ละลายใน DMSO ในการทดสอบความไวโดยวิธี agar diffusion พบว่า DMSO 10% สามารถยับยั้งเชื้อ *H. pylori* ได้ จึงได้ปรับความเข้มข้นของ DMSO ให้น้อยลงเป็น 1% ดังนั้นจึงต้องผสมสารสกัดในวุ้นหลอมเหลวในอัตราส่วน 1:100 ทำให้สามารถทดสอบสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดได้แค่ 1,000 µg/ml ในการทดลองนี้พบว่า น้ำมันข่าลิง สามารถยับยั้ง *H. pylori* ได้ โดยมีค่า MIC 1,000 µg/ml และสารสกัดจากขมิ้นชันด้วย ethanol 95% และ ethanol: น้ำ (1:1) และสารสกัดจากไพลด้วย ethanol 95% ความเข้มข้น1,000 µg/ml ยับยั้ง การเจริญของ *H. pylori* ได้

นอกจากสาร plaunotol ที่สกัดแยกได้จากเปล้าน้อย ที่มีประสิทธิภาพดีในการรักษาโรคกระเพาะอาหาร และยับยั้งเชื้อ *H. pylori* แล้ว เมื่อเร็ว ๆนี้มีรายงานการศึกษาพบว่า สารสกัดจากดอก *Cistus laurifolius* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรของตุรกี สามารถยับยั้ง *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐานและสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไข้ โดยมีค่า MIC 1.95 µg/ml (Yesilada *et al.*, 1999) Rho *et al.* (1999) แยกสารประเภท quinolone alkaloids ได้ 6 ชนิดจากผล *Evodia ruteacarpa* และพบว่าสามารถยับยั้ง *H. pylori* โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 10-20 µg/ml และ Hamasaki *et al.* (2000) แยกได้สาร alkyl methyl quinolone ซึ่งให้ค่า MIC < 0.05 µg/ml Tabak *et al.* (1999) รายงานว่าสารสกัดจากอบเชยจีน (*Cinnamomum cassia*) ที่สกัดด้วย methylene chloride ซึ่งเป็นสาร cinnamaldehyde ยับยั้ง *H. pylori* มีค่า MIC 15-50 µg/ml และ Yee and Koo (2000) พบว่าสารสกัดจากชาจีน (Lung Chen tea) และสาร epigallocatechin gallate จากชาจีนสามารถยับยั้ง *H. pylori* โดยมีค่า MIC_{90} 0.25-0.5% w/w และ 50-100 µg/ml ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสารที่มีฤทธิ์ต้าน *H. pylori* มีหลายประเภท อาจเป็น quinolone alkaloids หรือ cinnamaldehyde หรือ epigallocatechin gallate

สารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยทั้ง 32 สารสกัดที่นำมาทดสอบนี้มีผลต่อตัวเชื้อ *H. pylori* โดยตรงน้อยมาก แม้น้ำมันข่าลิงจะยับยั้งเชื้อได้ก็มีค่า MIC ที่สูงมาก หากพิจารณาเฉพาะค่า MIC อย่างเดียวสารนี้ก็มีศักยภาพต่ำในการนำมาใช้รักษาโรคกระเพาะที่เกิดจากเชื้อนี้ อย่างไรก็ตามสารที่มีฤทธิ์อื่น เช่น ฤทธิ์ cytoprotective ฤทธิ์ต้านการอักเสบ หรือสารที่มีผลต่อ cell surface hydrophobicity ของเชื้อก่อโรค (Annuk *et al.*, 1999) ก็มีประโยชน์ในการนำมาใช้ร่วมกับยาต้านจุลินทรีย์ในการรักษาโรคกระเพาะได้ จึงควรมีการศึกษาฤทธิ์เหล่านี้เพิ่มเติม โดยทดสอบกับน้ำมัน

Central Library
Prince of Songkla University

ข่าลิง สารสกัดจากขมิ้นชันด้วย ethanol 95% และ ethanol: น้ำ (1:1) และสารสกัดจากไพลด้วย ethanol 95% โดยเฉพาะอย่างขมิ้นชันซึ่งมีข้อบ่งใช้อย่างชัดเจนในการรักษาโรคกระเพาะ

ปัญหาและอุปสรรค

เชื้อ *H. pylori* เป็นเชื้อที่เลี้ยงยาก และโตช้า ต้องเลี้ยงในภาวะ microaerophilic เชื้อที่เก็บไว้เป็น stock culture ต้องนำมาทำการ subculture 3-5 ครั้ง ก่อนที่จะทำการทดสอบได้ ทำให้เสียเวลาและสิ้นเปลืองอาหารเลี้ยงเชื้อมากและเปอร์เซนต์การรอดชีวิตต่ำ ผลการทดสอบบนอาหาร MHA ที่ผสมเลือดเห็นไม่ชัดเจน อ่านผลยากมาก ในรายงานนี้ได้ปรับเปลี่ยนไปทำการทดสอบบนอาหาร color indicator egg yolk agar ซึ่ง *H. pylori* เจริญได้ค่อนข้างดี และเนื่องจากในอาหารนี้ผสมสี tetrazolium ไว้ด้วย ทำให้เห็นโคโลนีเชื้อติดสีแดง ตัดกับสีเหลืองของอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างชัดเจน

บรรณานุกรม

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2533. คู่มือสมุนไพรเพื่อการสาธารณสุขมูลฐาน. กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ.

พร้อมจิต ศรลัมพ์ และคณะ. 2535. สมุนไพรสวนสิรีรุกขชาติ. อัมรินทร์พริ้นติ้งกรุ๊ฟ กรุงเทพฯ.

วันดี กฤษณพันธ์. 2536. เภสัชวินิจฉัย ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2542. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. บริษัทรวมสาส์น จำกัด. กรุงเทพฯ. หน้า 645.

วิลาวัลย์ มหาบุษราคัม, เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร, ฉวีวรรณ จั่นสกุล และ พิเชษฐ์ วิริยะจิตรา. 2526. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุด. ว. สงขลานครินทร์ 5: 309- 420.

สำนักงานปลัดทบวงมหาวิทยาลัย กองวิชาการ. 2531. ประมวลงานวิจัยสมุนไพร. กรุงเทพฯ.

เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร, เมตตา องค์สกุล, ลัดดา นิลรัตน์, ประสิทธิ ธราวิจิตรกุล, ศิริพรรณ บุญชู, ธวัชชัย เชื้อประไพศิลป์ และ พิเชษฐ์ วิริยะจิตรา. 2537. ฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยา methicillin (MRSA) และ *Enterococcus* sp. ว. สงขลานครินทร์ 16: 399- 405.

Annuk, H., Hirmo, S., Turi, E., Mikelsaar, M., Arak, E. and Wadstrom, T. 1999. Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant eatracts. FEMS Microbiol. Lett. 172: 41-45.

Athamaprasangsa, S., Buntrarongroj, U., Dampawan, P., Ongkavoranan, N., Rukachaisirikul, V., Sethijinda, S., Sornnarintra, M., Sriwub, P. and Taylor, W.C. 1994. A 1,7 diarylheptanoid from *Alpinia conchigera*. Phytochem. 37: 871-873.

Baku, D.M. and Nabney, J., 1975. Identification of novel constituent of the essential oil of *Zingiber cassumunar*. Int. Flavours Addit. 6: 136.

Bayersdorffer, E., Mannes, G.A., Sommer, A., Hochter, W., Weingart, J., Hatz, R. *et al.* 1992. High dose omeprazole treatment combined with amoxicillin eradicates *Helicobacter pylori*. Eur. J. Gastro. Hep. 4:697-720.

Blaser, M.J. 1992. *Helicobacter pylori*: its role in disease. Clin. Inf. Dis., 15: 386-393.

Buck, G.E. 1990. *Campylobacter pylori* and gastroduodenal diseases. Clin. Microbiol. Rev. 3: 1-12.

Cho, K.H., Chung, T.J., Kim, S.J., Lee, T.H., and Yoon, C.M. 1981. Clinical experiences of madeccasol (*Centella asiatica*) in the treatment of peptic ulcer. Ibid. 13:49-56.

Fabry, W., Okemo, P., Mwatha, W.E., Chhabra, S.C. and ansorg, R. 1996. Susceptibility of *Helicobacter pylori* and *Candida* spp. To the East African plant *Terminalia spinosa*. Arzneimittel-Forschung/Drug Research. 46: 539- 540.

Farnsworth, N.R. and Bunyapraphatsara, N. 1992. Thai Medicinal Plants: Recommended for Primary Health Care System. Medicinal Plant Information Center, Faculty of Pharmacy, Mahidol University. Prachachon Co., Ltd.

Hamashi, N., Ishii, E., Tezuka, Y., Nagaoka, T., Kadota, S., Kuroki, T. and Yano, I. 2000. Highly selective antibacterial activity of novel alkyl quinolone alkaloids from Chinese herbal medicine, Gosyuyu (Wu-Chu-Yu), against *Helicobacter pylori* in vitro. Micrbiol. Immunol. 44: 9-15.

Hentschel, E., Brandstatter, G., Dragosics, B., Hirschl, A.M., Nemec, H., Schutze, K. *et al.* 1993. Effect of ranitidine and amoxicillin plus metronidazole in the erradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer. New Eng. J. Med. 328: 308-312.

Ingolfsdottir, K., Hjaimarsdottir, M.A., Sigurdsson, A., Gudjonsdottir, G.A., Brynjolfsdottir, A. and Steingrimsson, O. 1997. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to protolichesterinic acid from the lichen *Cetraria islandica*. Antimicrob. Agents. Chemother. 41:215-217.

Jonkers, D., Van den Broek, E., Van Dooren, I., Thijs, C., Dorant, E., Hageman, G. and Stobberingh, E. 1999. Antibacterial effect of garlic and omeprazole on *Helicobacter pylori*. J. Antimicrob. Chemother. 43: 837-839.

Kishore, N. and Dwinedi, R.S. 1992. Zerumbone: a potential fungitoxic agent isolated from *Zingiber cassumunar* Roxb. Mycopathologoa. 1203: 155-159.

Koga, T, Kawada, H., Ytsui, Y., Domom, H., Ishii, C. and Yasuda, H. 1996a. In-vitro and in-vivo antibacterial activity of plaunotol, a cytoprotective anticulcer agent, against *Helicobacter pylori.* J. Antimicrob. Chemother. 37: 919-929.

Koga, T, Kawada, H., Ytsui, Y., Domom, H., Ishii, C. and Yasuda, H. 1996b. Bactericidal effect of plaunotol, a cytoprotective anticulcer agent, against *Helicobacter pylori.* J. Antimicrob. Chemother. 38: 387-397.

Kuroyanagi, M., Fukusima, K., Yoshihira, K., Natori, S., Dechaliwongse, T., Mihashi, K., Nishi, M. and Hara, S. 1980. Thai medicinal plants part VIII: Further characterization of constituents of a Thai medicinal plant, *Zingiber cassumunar* Roxb. Chem. Pharm. Bull. 28: 2948- 2959.

Lee, A., Fox, J. and Hazell, S. 1993. Pathogenicity of *Halicobacter pylori*: a perspective. Inf. Imm., 61: 1601-1610.

Lorian, V. 1991. Antibiotics in Laboratory Medicine. 3rd Edition. Williams & Wilkins, pp.12.

National Institute of Health (NIH) Consensus Development Conference. 1994. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. J. Am. Med. Assoc., 272 : 65-69.

Okada, M., Nishimura, H., Kawashima, M., Okabe, N., Maeda, K., Seo, M., Ohkuma, K. and Takata, T. 1999. A new quadruple therapy for *Helicobacter pylori*: influence of resistant strains on treatment outcome. Alimen. Pharmacol. Ther. 13: 769-774.

Parsonett, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A.B., Warnke, R.A., Jellum, E. *et al*. 1994. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. New Eng. J. Med., 330: 1267-1271.

Pongprayoon, U., Soontornsaratune, P., Jarikasemm, S., Sematong, T., Wasuwat, S. and Claeson, P. 1997. Topical anti-inflammatory activity of the major lipophilic constituents of the rhizome of *Zingiber cassumunar* part I: The essential oil. Phytomedicine. 34: 319- 322.

Pornsuwattana, S., Dhummaupakorn, P. and Kitiyanee, U. 1989. Investigation of inhibition and curation effects of *Andrographis paniculata* and *Croton sublyratus* upon gastric lesion and ulcer. Thai J. Pharm. Sci. 14:35-45.

Rhee, J.C. and Choi, K.W. 1981. Clinical effect of the titrated extract of *Centella asiatica* (madeccasol) on peptic ulcer. Korean J. Gastroenterol. 13:35-40.

Rho, T.C., Bae, E-A., Kim, D-H., Oh, W.K. , Kim, B.Y., Ahn, J.S. and Lee, H.S. 1999. Anti-*Helicobacter pylori* activity of quinolone alkaloids from Evodiae Fructus. Biol. Pharm. Bull. 22: 1141-1143.

Tabak, M., Armon, M. and Neeman, I. 1999. Cinnamon extracts' inhibitory effect on *Helicobacter pylori*. J. Ethnopharmacol. 67: 269-277.

Ushiyama, S., Matsuda, K., Asai, F., Kohriyama, T., Oda, T., Iijima, Y., *et al.* 1985. The anti-ulcer mechanism of plaunotol. Progress in Medicine. 5, Suppl. 1: 825-831.

Vasquez, A., Valdez, Y., Gilman, R.H., McDonald, J.J., Westblom, T.U., Berg, T., Mayta, H., Gutierrez, V. and the Gastrointestinal Physiology Working Group of Universidad Peruana Cayetano Heredia and the John Hopkins University. 1996. Metronidazole and clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* determined by measuring MICs of antimicrobial agents in color indicator egg yolk agar in a miniwell format. J. Clin. Microbiol. 34: 1232-1234.

Yee, Y.K. and Koo, W.L. 2000. Anti- *Helicobacter pylori* activity of Chinese tea: in-vitro study. Aliment. Pharmacol. Ther. 14: 635-638.

Yesilada, E., Gurbuz, I. and Shibata, H. 1999. Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti- *Helicobacter pylori* activity. J. Ethnopharmacol. 66: 289-293.

Yuhikawa, M., Harada, E., Miki, A., Tsukamoto, K., Ling, S.Q., Yamahara, J. and Marakami, N. 1994. Antioxidant constituents from the fruit hulls of mangosteen originating from Vietnam. Yakugara Zasshi. 1142: 129- 133.

ภาคผนวก

Color indicator egg yolk agar (ดัดแปลงจากวิธีของ Vasquez *et al.*, 1996)

Mueller Hinton agar (MHA)	38	กรัม
ไข่แดง	100	มิลลิลิตร
TTC	40	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น เติมครบ	1,000	มิลลิลิตร

นำไข่ไก่มาล้างเปลือกนอกให้สะอาดด้วยสบู่ และแช่ใน 95% ethanol ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ต่อยไข่และเอาเฉพาะไข่แดงมาผสมกับ MHA หลอมเหลว ด้วย aseptic technique และเติม TTC solution ที่เตรียมไว้เป็น stock solution กรองด้วย Millipore filter ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

สำหรับอาหารที่ทดสอบกับสารสกัด นำสารสกัดมาผสมในอัตราส่วน 1:100 ให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ