ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Helicobacter pylori*

Effect of Crude Extracts from *Cymbopogon citratus* Against *Helicobacter pylori*

พรรนิภา ศิริเพิ่มพูล และ วรนาฏ จงโยธา

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Punnipa Siripermpool* and Waranart Jongyota

Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University

บทคัดย่อ

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากใบและลำต้นตะไคร้ในการยับยั้งเชื้อ *Helicobacter pylori* จำนวน 12 isolates ด้วยวิธี broth microdilution พบว่าเชื้อทั้งหมดซึ่งไวต่อยา amoxicillin, erythromycin และดื้อยา metronidazole ร้อยละ 16.67 นั้นถูกยับยั้งได้ด้วยสารสกัดจากใบและลำต้นตะไคร้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ร้อยละ 90 (Minimum Inhibitory Concentration 90%; MIC_{90}) เท่ากับ 18.75 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 50.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดจากใบตะไคร้มาทดสอบฤทธิ์รวมกับยาต้านจุลชีพทั้งสามชนิดคือ amoxicillin erythromycin และ metronidazole พบว่าฤทธิ์รวมระหว่างสารสกัดจากใบตะไคร้กับยาต้านจุลชีพทั้งสามชนิด เป็นแบบไม่แตกต่างไปจากฤทธิ์เดิม และในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการดื้อสารสกัดจากใบและลำต้นตะไคร้แม้เชื้อจะสัมผัสกับสารสกัดจำนวน 10 passages

คำสำคัญ : สารสกัดตะไคร้ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ *Helicobacter pylori*

Abstract

Antibacterial activity of ethanol extract from *Cymbopogon citratus* on 12 isolates of *Helicobacter pylori* was investigated by standard broth microdilution method. All isolates were susceptible to amoxicillin and erythromycin; however 16.67% of the isolates were resistant to metronidazole. Ethanol extracts of leaves and stem from *C. citratus* showed inhibitory effect against *H. pylori* with the level of 90% inhibitory concentration (MIC_{90}) equal to 18.75 mg/ml and 50.0 mg/ml, respectively. The combination effect of ethanol extract from the leaves with amoxicillin, erythromycin and metronidazole was also investigated. The results indicated that the activity of these three combinations were indifference against *H. pylori*. However, resistance to ethanol extracts from the leaves and stem from *C. citratus* did not develop even after 10 sequential passages.

Keywords : *Cymbopogon citratus,* Antibacterial activity, *Helicobacter pylori*

***Corresponding author.** E-mail: punpool@yahoo.com

บทนำ

Helicobacter pylori เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งโค้งงอ จัดเป็นเชื้อที่เจริญยาก สามารถเจริญได้เฉพาะในสภาวะ microaerobic (5%O_2, 10% CO_2 และ 85% N_2) เท่านั้น ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันแล้วว่าเชื้อนี้ทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น และสามารถพัฒนาเป็นมะเร็งกระเพาะอาหารได้ (Goodwin *et al*., 1987; Harris *et al*., 1996)

การรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหารนั้นทำได้โดยการให้ยาสามชนิด ซึ่งประกอบด้วยยาต้านจุลชีพ 2 ชนิดอาจเป็น amoxicillin, clarithromycin, และ/หรือ metronidazole กับยาต้านการหลั่งกรดอีกหนึ่งชนิด (Axon,1991) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการรักษาด้วยยาตำรับดังกล่าวจะมีอัตราการหายขาดสูงกว่ายาตำรับอื่น แต่ก็ยังมีผู้ป่วยอีกจำนวนหนึ่งที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา เนื่องจากเชื้อพัฒนาการดื้อยาขึ้น ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงพยายามคิดค้นหายาชนิดใหม่มาทดแทนยาเก่าซึ่งเริ่มจะใช้ไม่ได้ผล การเลือกใช้สารจากสมุนไพรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง และตามภูมิปัญญาแพทย์แผนไทยนั้นยืนยันว่าลำต้นของตะไคร้สามารถนำมาต้มกับน้ำแล้วดื่ม แก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ แน่นจุกเสียดได้ ซึ่งอาการดังกล่าวมานี้สามารถพบได้ในผู้ที่เป็นโรคแผลในกระเพาะอาหาร และผู้ที่ติดเชื้อ *H. pylori* เช่นกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากตะไคร้และฤทธิ์รวม (combined effect) ระหว่างสารสกัดจากตะไคร้กับยาต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* รวมทั้งศึกษาโอกาสเกิดการดื้อสารสกัดจากตะไคร้ของ *H. pylori* ในหลอดทดลองเพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับประกอบการพัฒนาให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างจริงจัง

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ลำต้นและใบของตะไคร้แกง

2. ยาต้านจุลชีพ ได้แก่ Amoxicillin (GlaxoSmithKline®), Erythromycin (Eli Lilly®), Metronidazole (Aventis®) และ Gentamicin (Liwinner Pharmaceutical®.)

3. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Helicobacter pylori* จำนวน 12 isolates ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่มีแผลในกระเพาะอาหาร และเข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา จังหวัดชลบุรี เชื้อทั้งหมดนี้ทำการคัดแยกและพิสูจน์ชนิดตามคุณสมบัติและการติดสีแกรม (Gram-negative bacilli ขนาดเล็ก บางเซลล์โค้งงอ) เจริญได้ในสภาวะ microaerobic ไม่เจริญในสภาวะ aerobic ให้ผลการทดสอบ oxidase, catalase และ urease เป็นบวก ไวต่อ cephalothin 30 μg/disc ดื้อต่อ nalidixic acid 30 μg/disc)

4. การสกัดสารจากตัวอย่างสมุนไพร

นำใบและลำต้นตะไคร้แกงมาล้างน้ำให้สะอาดผึ่งลมให้แห้งหั่นเป็นชิ้นบางๆ แยกเป็นส่วนลำต้น และส่วนใบ แล้วอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 2-5 วัน นำไปหมักรวมกับ 95% ethanol ที่อุณหภูมิห้อง นานข้ามคืน กรองแยกส่วนที่เป็นกากทิ้งไป เก็บส่วนน้ำกรองมาปั่นเหวี่ยง เก็บส่วน supernatant มาแยก ethanol ออกด้วยเครื่อง vacuum evaporator แล้วละลายสารสกัดด้วย 95% ethanol + น้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม กรองให้ไร้เชื้อด้วย millipore filter เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รอการทดสอบขั้นต่อไป (ความเข้มข้นสูงสุดของ stock สารสกัดลำต้นและใบตะไคร้ที่เตรียมได้เท่ากับ 400 และ 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นสุดท้ายของ ethanol ในสารสกัดเท่ากับ 60%)

5. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* โดยวิธี broth microdilution (ดัดแปลงจาก Piccolomini *et al*., 1997) ทำการทดสอบโดยการเจือจางยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด คือ amoxicillin, erythromycin และ metronidazole ปริมาตร 100 ไมโครลิตรด้วย Mueller-Hinton broth (Difco®)+10% fetal bovine serum (Gibco®) แบบ serial two-fold dilution ใน 96-well microtiter plate ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 64-0.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเตรียมหลุม positive control ซึ่งประกอบด้วย Mueller-Hinton broth ที่ไม่ผสมยาต้านจุลชีพและหลุม negative control จากนั้นเติมเชื้อ *H. pylori* 10 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อประมาณ 10^5CFU/ml ลงไปทุกหลุม (ยกเว้นหลุม negative control) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ microaerobic โดยใช้ microaerophilic gas pack (Mitsubishi®) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อ่านผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ และทดสอบเชื้อควบคุมโดยการเติมเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ลงในอาหาร Mueller-Hinton broth ที่ผสมยา gentamicin ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.062 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

(เชื้อมาตรฐานสำหรับการทดสอบหาค่า MIC โดยมีค่ามาตรฐาน MIC ของยา gentamicin อยู่ในช่วง 0.12-1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) (Hindler,1995) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศปกติ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ)

6. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากลำต้นตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* โดยวิธี broth microdilution (ดัดแปลงจาก Piccolomini *et al.*, 1997) ทำการทดสอบเช่นเดียวกับการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* โดยเจือจางสารสกัดจากลำต้นตะไคร้ ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 200 จนถึง 0.39 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หลุม positive control ประกอบด้วย Mueller-Hinton broth ที่ไม่ผสมสารสกัด และหลุม negative control ประกอบด้วย Mueller-Hinton broth + 60% ethanol อ่านผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้โดยการสุ่มตัวอย่างจากหลุมทดสอบ หลุมละ 10 ไมโครลิตร เพาะลงบน Mueller-Hinton Agar + 5% human blood บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ microaerobic นาน 3 วัน

7. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากใบตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* โดยวิธี broth microdilution (ดัดแปลงจาก Piccolomini *et al.*, 1997) โดยทดสอบเช่นเดียวกับสารสกัดจากลำต้นตะไคร้ ตั้งแต่ความเข้มข้น 75-0.14 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

8. ทดสอบความสามารถของเชื้อในการพัฒนาให้ดื้อสารสกัดตะไคร้

โดยเลี้ยง *H. pylori* ในอาหาร Mueller-Hinton broth ที่เติม 10% fetal bovine serum และสารสกัดจากใบตะไคร้ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเท่ากับ $^1/_2$ MIC และลี้ยงใน Mueller-Hinton broth ที่เติม 10% fetal bovine serum และสารสกัดจากลำต้นตะไคร้ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเท่ากับ $^1/_2$ MIC (ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ microaerobic (โดยใช้ microaerophilic gaspak) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร Helicobacter selective agar [tryptic soy agar + 8% human blood + vancomycin 10 μg/ml, polymyxin 2.5 IU/ml และ trimethoprim 5 μg/ml] บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ microaerobic เป็นเวลานาน 3 วัน (นับเป็น 1 passage) ตรวจดูโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหาร นำโคโลนีของเชื้อที่เจริญบน Helicobacter selective agar มาทดลองเช่นเดียวกันจนครบ 10 passages แล้วจึงนำโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหาร Helicobacter selective agar ใน passage ที่ 10 มาทดสอบหาค่า MIC ต่อสารสกัดจากใบและลำต้นตะไคร้ตามวิธี broth microdilution ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

9. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบตะไคร้รวมกับยาต้านจุลชีพ (Hindler, 1995)

โดยนำยาแต่ละชนิดคือ amoxicillin, erythromycin และ metronidazole ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ $^1/_2$ MIC และ $^1/_4$ MIC มารวมกับสารสกัดจากใบตะไคร้แล้วทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบหมายเลข 56 โดยวิธี broth microdilution ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

ผลการทดลอง

1. ความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

H. pylori ทั้ง 12 isolates นี้มีค่า MIC ต่อยา amoxicillin เท่ากับ 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เชื้อ 2 isolates หรือคิดเป็นร้อยละ 16.67 มีค่า MIC ต่อยา metronidazole มากกว่า 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจัดเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาชนิดนี้ และเชื้อทุก isolates ไวต่อยา erythromycin โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 1-4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รายละเอียดผลการทดสอบความไวของ *H. pylori* ต่อยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดดังแสดงในตารางที่ 1.

ตารางที่ 1 ค่า MIC ของยาต้านจุลชีพ amoxicillin erythromycin และ metronidazole ในการยับยั้ง *H. pylori*

Isolates No.	MIC (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)		
	Amoxicillin	Erythromycin	Metronidazole
22	0.25	2	1
40	0.25	2	1
55	0.25	2	1
56	0.25	2	1
64	0.25	2	16
70	0.25	2	4
84	0.25	2	2
88	0.25	2	1
89	0.25	1	2
92	0.25	1	32
109	0.25	4	0.5
112	0.25	0.5	8

2. ผลของสารสกัดจากใบและลำต้นตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori*

เมื่อนำสารสกัดจากใบตะไคร้ที่เตรียมได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* โดยวิธี microbroth dilution พบว่าสารสกัดจากใบตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* ได้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ร้อยละ 90 ของจำนวนที่นำมาทดสอบ (Minimum Inhibitory Concentration 90%; MIC_{90}) เท่ากับ 18.75 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากลำต้นตะไคร้ก็สามารถยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* ได้เช่นกัน โดยมีค่า MIC_{90} เท่ากับ 50.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 2) สารสกัดจากใบตะไคร้มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *H. pylori* ได้ดีกว่าสารสกัดจากลำต้นตะไคร้ประมาณ 2.67 เท่า

ตารางที่ 2 ค่า MIC ของสารสกัดจากลำต้นและใบตะไคร้ในการยับยั้ง *H. pylori*

Isolates No.	MIC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	
	สารสกัดจากลำต้นตะไคร้	สารสกัดจากใบตะไคร้
22	50	18.75
40	50	18.75
55	50	18.75
56	**50**	**18.75**
64	50	37.50
70	50	18.75
84	50	18.75
88	50	18.75
89	50	18.75
92	50	18.75
109	50	18.75
112	50	18.75

3. ผลการทดสอบความสามารถของ *H. pylori* ในการพัฒนาให้เกิดการดื้อสารสกัดจากใบและลำต้นตะไคร้

จากการคัดเลือก *H. pylori* หมายเลข 56 ซึ่งมีค่า MIC ต่อสารสกัดจากลำต้นและใบตะไคร้เท่ากับ 50 และ 18.75 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรมาเลี้ยงไว้ในอาหารเหลว Mueller-Hinton broth ซึ่งมีสารสกัดจากใบตะไคร้ความเข้มข้นเท่ากับครึ่ง MIC (9.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) บ่มในสภาวะ microaerobic นาน 48 ชั่วโมง และ subculture อย่างต่อเนื่องลงในอาหารเหลวที่ผสมสารสกัดจากตะไคร้ด้วยวิธีการเช่นเดียวกัน จำนวน 10 passages แล้วนำเชื้อใน passage ที่ 10 มาเพาะเลี้ยงและหาค่า MIC ต่อสารสกัดจากใบตะไคร้ด้วยวิธี microbroth dilution พบว่าเชื้อยังคงให้ค่า MIC เท่ากับ 18.75 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และผลการเลี้ยง *H. pylori* ในอาหารเหลว Mueller-Hinton broth ซึ่งมีสารสกัดจากลำต้นตะไคร้ความเข้มข้นเท่ากับครึ่ง MIC (25.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) บ่มในสภาวะ microaerobic นาน 48 ชั่วโมง จำนวน 10 passages ก็พบว่าเชื้อยังคงให้ค่า MIC เท่ากับ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรเช่นเดิม

4. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบตะไคร้รวมกับยาต้านจุลชีพ

เมื่อนำยา amoxicillin ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (เท่ากับ $^1/_2$ MIC) มารวมกับสารสกัดจากใบตะไคร้แล้วทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบหมายเลข 56 พบว่าต้องใช้สารสกัดจากใบตะไคร้ความเข้มข้น 9.30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (เท่ากับ $^1/_2$ MIC ของสารสกัดตะไคร้เมื่อทดสอบแบบสารเดี่ยว) จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ และเมื่อลดระดับความเข้มข้นของ amoxicillin เป็น 0.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (เท่ากับ $^1/_4$ MIC) ต้องทดสอบรวมกับสารสกัดจากใบตะไคร้ความเข้มข้น 18.75 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (ตารางที่ 3) ส่วน erythromycin และ metronidazole นั้น เมื่อนำมาทดสอบรวมกับสารสกัดจากใบตะไคร้พบว่ายาทั้งสองชนิดนี้ทั้งที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ $^1/_2$ MIC และ $^1/_4$ MIC ต้องใช้สารสกัดจากใบตะไคร้ความเข้มข้น 18.75 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ แสดงว่าสารสกัดจากใบตะไคร้แสดงฤทธิ์รวมกับยาทั้งสามชนิด เป็นแบบไม่แตกต่างจากฤทธิ์เดิมของสารสกัด (indifference)

ตารางที่ 3 ค่า MIC ของสารสกัดจากใบตะไคร้เมื่อทดสอบรวมกับยาต้านจุลชีพความเข้มข้นต่างๆ

ยาต้านจุลชีพ		MIC ของสารสกัดจากใบตะไคร้ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
Amoxicillin	$^1/_2$ MIC	9.30
	$^1/_4$ MIC	18.75
Erythromycin	$^1/_2$ MIC	18.75
	$^1/_4$ MIC	18.75
Metronidazole	$^1/_2$ MIC	18.75
	$^1/_4$ MIC	18.75

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เชื้อ *H. pylori* ทั้ง 12 isolates ที่ใช้เป็นตัวอย่างจัดเป็นเชื้อที่ไวต่อยา amoxicillin และ erythromycin เนื่องจาก *H. pylori* ที่ดื้อยา amoxicillin ต้องมีค่า MIC เท่ากับหรือมากกว่า 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเชื้อที่ดื้อยา erythromycin ต้องมีค่า MIC มากกว่า 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Sharara *et al*., 2002) แต่มีเชื้อร้อยละ 16.67 ดื้อยา metronidazole เนื่องจากมีค่า MIC มากกว่า 8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Sharara *et al*., 2002) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ประเทศเกาหลีแล้วพบว่าเชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีอัตราการดื้อยาน้อยกว่า โดย Kim *et al*., (2001) ศึกษาเชื้อทั้งหมด 652 isolates พบเชื้อดื้อยา metronidazole และ clarithromycin ร้อยละ 40.6 และ 5.9 ตามลำดับ และไม่พบเชื้อดื้อยา amoxicillin เลยเช่นกัน อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ยังมีข้อจำกัดเรื่องจำนวนเชื้อทดสอบ

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากใบและลำต้นของตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* ได้ โดยมีค่า MIC_{90} เท่ากับ 18.75 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ และยังพบว่าสารสกัดจากใบตะไคร้มีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดจากส่วนลำต้นประมาณ 2.67 เท่า (ค่า MIC น้อยกว่า 2.67 เท่า) แม้จะยังไม่มีรายงานประสิทธิภาพของสารสกัดจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* แต่ได้มีรายงานการศึกษาของ Bhamarapravati *et al*., (2003) ซึ่งทดสอบความไวของ *H. pylori* ต่อสารสกัดจากเครื่องเทศและพืชสมุนไพรของไทยรวม 20 ชนิด พบว่าสารสกัดด้วย methanol จากจันทน์เทศ ใบของต้นจิก รากเปราะหอม ใบกัลปพฤกษ์ ใบผักเสี้ยนผี กานพลู ใบหญ้าหนอนตายหยาก ใบปรงป่า ใบแมงดา (หรือทำมัง) และผักเสม็ดล้วนมีความสามารถในการยับยั้ง *H. pylori* ได้ โดยมีค่า MIC แตกต่างกันออกไปอยู่ในช่วง 12.5 - 100.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

จากการศึกษาของ Bergonzelli *et al*., (2003) พบว่าสารเคมีหลักในน้ำมันหอมระเหยของตะไคร้คือ citral ซึ่งพบว่ามีอยู่ร้อยละ 72.9 เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยมาละลายด้วย 100% ethanol แล้วทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/disc สามารถยับยั้ง *H. pylori* ได้ โดยมีบริเวณยับยั้งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.3 เซนติเมตร และสาร citral บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.04 กรัม/ลิตร (หรือมิลลิกรัม/มิลลิลิตร) นั้นสามารถฆ่าเชื้อ *H. pylori* ได้ และจากการศึกษาของ Lewinsohn *et al*., (1998) พบว่าใบของตะไคร้แกงสะสมสาร citral ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น aldehyde ไว้ในโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่า oil cells ทำให้โครงสร้างนี้ย้อมติดสีแดงของ Schiff's reagent ซึ่งเป็น aldehyde-specific reagent และเมื่อล้าง section ของใบตะไคร้ก่อนด้วย ethanol และ acetone พบว่า oil cells ไม่ติดสีแดง นอกจากนี้ Lewinsohn *et al*., (1998) ยังพบอีกว่าสารสกัดด้วย ethanol จากใบตะไคร้ ทำปฏิกิริยาเกิดเป็นสีแดงกับ Schiff's reagent ดังนั้นการที่สารสกัดจากใบและลำต้นของตะไคร้ที่ศึกษาในครั้งนี้สามารถยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* ได้อาจเนื่องจากมีสาร citral เป็นส่วนประกอบหลัก อย่างไรก็ตามหากได้มีการศึกษาเพิ่มเติมถึงชนิดของสารสำคัญที่เป็นส่วนประกอบของสารสกัดจากใบและลำต้นตะไคร้อาจเป็นข้อมูลสนับสนุนยิ่งขึ้น

ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบว่ามีการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) หรือต้านฤทธิ์กัน (antagonistic effect) ระหว่างสารสกัดจากใบตะไคร้กับยาต้านจุลชีพทั้งสามชนิด เนื่องจากค่า MIC ของสารใดสารหนึ่งในการทดสอบฤทธิ์รวมมีค่าไม่แตกต่างจากค่า MIC ของสารเมื่อทดสอบเดี่ยวหรือแตกต่างไม่เกิน 4 เท่า (Hindler, 1995) เมื่อเทียบกับผลการศึกษาฤทธิ์รวมของสารบางชนิดกับยาต้านจุลชีพจากการศึกษาอื่นพบว่าให้ผลที่แตกต่างออกไป ดังเช่นการศึกษาของ Koga *et al*., (2002) ซึ่งศึกษาฤทธิ์รวมระหว่าง plaunotol กับ clarithromycin และ amoxicillin แล้วพบว่าฤทธิ์รวมของ plaunotol กับ clarithromycin เป็นแบบ synergistic effect กับเชื้อทดสอบจำนวน 11 จาก 14 isolates หรือคิดเป็นร้อยละ 79 ส่วนเชื้อที่เหลืออีก 3 isolates (ร้อยละ 21) แสดงผลเป็นแบบ additive effect ส่วนฤทธิ์รวมระหว่าง plaunotol กับ amoxicillin แสดงฤทธิ์แบบ additive effect กับเชื้อ 10 isolates (ร้อยละ 71) ส่วนเชื้อที่เหลืออีกร้อยละ 29 ให้ผลแบบไม่แตกต่างจากการใช้สารแบบยาเดี่ยว (indifference) ทั้งนี้ Koga *et al*., (2002) กล่าวว่าอาจเป็นเพราะ plaunotol ทำให้ permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้น ทำให้ clarithromycin ซึ่งเป็นยาที่มีคุณสมบัติ hydrophobic และมีโมเลกุลขนาดใหญ่กว่า amoxicillin สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าในสภาวะที่ไม่มี plaunotol อย่างเด่นชัด เมื่อเทียบกับความสามารถในการผ่านเข้าเซลล์ของ amoxicillin ในสภาวะที่มีและไม่มี plaunotol

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์รวมระหว่างสารสกัดจาก Zingiber officinale กับ clarithromycin ของ Nostro *et al*., (2006) พบว่าฤทธิ์รวมนั้นช่วยยับยั้ง *H. pylori* ได้ดีกว่าการใช้สารแต่ละชนิดแบบยาเดี่ยว โดยฤทธิ์รวมที่พบนั้นมีทั้งแบบ additive และ synergism และผลของฤทธิ์รวมจะแบบใดนั้นไม่ขึ้นกับความไวของเชื้อต่อยา clarithromycin

ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบว่าเชื้อ *H. pylori* มีการดื้อสารสกัดจากตะไคร้ แม้เชื้อจะสัมผัสกับสารสกัดเป็นระยะเวลาติดต่อกันนานถึง 10 passages

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาเบื้องต้นในครั้งนี้ ทำให้ทราบว่าสารสกัดหยาบด้วย ethanol จากลำต้นและใบตะไคร้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *H. pylori* ได้และไม่พบเชื้อดื้อสารสกัดจากตะไคร้ แนวทางในการศึกษาต่อไปนั้นอาจนำสารสกัดจากใบตะไคร้ที่ได้มาวิเคราะห์สารประกอบหลักที่สำคัญ และทดสอบประสิทธิภาพของสารประกอบหลักนั้นในการยับยั้งเชื้อ รวมทั้งทดสอบการออกฤทธิ์รวมระหว่างสารกับยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อชนิดนี้

สรุป

สารสกัดจากใบและลำต้นตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* ได้ โดยมีค่า MIC_{90} เท่ากับ 18.75 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 50.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ ฤทธิ์รวมระหว่างสารสกัดจากตะไคร้กับยาต้านจุลชีพทั้งสามชนิดคือ amoxicillin, erythromycin และ metronidazole เป็นแบบไม่แตกต่างไปจากฤทธิ์เดิมของสารสกัด และไม่พบว่า *H. pylori* พัฒนาการดื้อสารสกัดจากตะไคร้แม้เชื้อจะสัมผัสกับสารสกัดเป็นระยะเวลาติดต่อกันนานถึง 10 passages

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

เอกสารอ้างอิง

Axon, A. T. R. (1991). *Helicobacter pylori* therapy: effect of peptic ulcer disease. *Journal of Gastroenterology*, **6**(2), 131-137.

Bergonzelli, G. E., Donnicola, N., Porta, N., and Corthesy-Theulaz, I. E. (2003). Essential oils as components of a diet-based approach to management of Helicobacter infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *47*(10), 3240-3246.

Bhamarapravati, S., Pendland, S. L., and Mahady, G.B. (2003). Extracts of spice and food plants from Thai traditional medicine inhibit the growth of the human carcinogen *Helicobacter pylori*. *In Vivo*, *17*(6), 541-544.

Goodwin, C. S., McCulloch, R. K., Armstrong, J. A., and Wee, S. H. (1987). Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (Campylobacter pyloridis) from the human gastric mucosa. *Journal of Medical Microbiology, 19*(2), 257-267.

Harris, P. R., Mobley, H. L., Perez-Perez, G. I., Blaser, M. J., and Smith, P. D. (1996). *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology, 111*(2), 419-425

Hindler, J.A. (1995). Special antimicrobial susceptibility tests. In C. R. Mahon and G. Manuselis(eds). *Textbook of diagnostic microbiology*. (pp89-96). Philadelphia: W. B. Saunders.

Kim, J. J., Reddy, R., Lee, M., Kim, J. G., El-Zaatari, F. A., Osato, M. S., Graham, D. Y., and Kwon, D. H. (2001). Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of *Helicobacter pylori* isolates from Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 47*(4), 459-461.

Koga, T., Inoue, H., Ishii, C., Okazaki, Y., Domon, H., and Utsui, Y. (2002). Effect of plaunotol in combination with clarithromycin or amoxicillin on *Helicobacter pylori in vitro* and *in vivo*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 50*(1), 133-136.

Lewinsohn, E., Dudai, N., Tadmor, Y., Katzir, I., Ravid, U., Putievsky, E., and Joel, D. M. (1998). Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (Cymbopogon citratus (DC.) Stapf., Poaceae). *Annals of Botany, 81*(35), 35-39.

Nostro, A., Cellini, L., Di Bartolomeo, S., Cannatelli, M. A., Di Campli, E., Procopio, F., Grande, R., Marzio, L., and Alonzo, V. (2006). Effects of combining extracts (from propolis or Zingiber officinale) with clarithromycin on *Helicobacter pylori*. *Phytotherapy Research, 20*(3), 187-190.

Piccolomini, R., Bonaventura, G. D., Catamo, F. C., and Neri, M. (1997). Comparative evaluation of E test, agar dilution, and broth microdilution for testing susceptibilities of *Helicobacter pylori* strains to 20 antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology, 35*(7), 1842-1846.

Sharara A. I ., Chedid, M., Araj, G. F., Barada, K. A., and Mourad, F.H. (2002). Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxycillin and tetracycline in Lebanon. *International Journal of Antimicrobial Agents, 19*(2), 155-158.