สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ประสิทธิภาพของสารเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชัน
ในการยับยั้ง *Helicobacter pylori*

(Antimicrobial Effect of Curcuminoids
from *Curcuma longa Linn. on Helicobacter pylori)*

โดย

พรรนิภา ศิริเพิ่มพูล
จงกลณี จงอร่ามเรือง

14 พ.ค. 2552
QK911/163
254668
เริ่มบริการ
19 ส.ค. 2552

ทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณแผ่นดิน 2551
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ
มีนาคม 2552

หัวข้อวิจัย ประสิทธิภาพของสารเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชันในการยับยั้ง *Helicobacter pylori*

(Antimicrobial effect of curcuminoids from *Curcuma longa* Linn. on *Helicobacter pylori*)

หัวหน้าโครงการ พรรนิภา ศิริเพิ่มพูล

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีงบประมาณ 2551

บทคัดย่อ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชันในการยับยั้งเชื้อ *Helicobacter pylori* ด้วยวิธี agar dilution พบว่าเคอร์คูมินอยด์สามารถยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* ทั้ง 5 isolates ซึ่งเป็นเชื้อที่ไวต่อยา amoxicillin erythromycin และ tetracycline ได้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งได้เท่ากันคือเท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำเคอร์คูมินอยด์ไปศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ urease พบว่าเคอร์คูมินอยด์ในปริมาณต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้นั้นสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ urease จากเชื้อได้ และเมื่อนำสารเคอร์คูมินอยด์ไปทดสอบฤทธิ์รวมกับยา erythromycin และ tetracycline โดยวิธี agar chequerboard titration พบว่าฤทธิ์รวมระหว่างเคอร์คูมินอยด์กับ erythromycin และ tetracycline นั้นเป็นแบบไม่ต่างไปจากฤทธิ์เดิมของสาร (Indifference) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการใช้เคอร์คูมินอยด์ร่วมกับ erythromycin และ tetracycline เพื่อรักษาโรคติดเชื้อ *H. pylori*

คำสำคัญ : *H. pylori* เคอร์คูมินอยด์ ขมิ้นชัน ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ urease

ABSTRACT

Antimicrobial activity of curcuminoids from *Curcuma longa* Linn. against 5 isolates of *H. pylori* was determined by the standard agar dilution method. All isolates tested were susceptible to amoxicillin erythromycin and tetracycline by E-test method. The curcuminoids could inhibit growth of all isolates of *H. pylori* with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 25 μg/ml. Moreover, curcuminoids at the MIC level could exhibit inhibitory effect on urease activity. The combination of curcuminoids and erythromycin, studied with agar chequerboard titration, showed an indifference effect as well as the combination of curcuminoids and tetracycline. From the result of this study, it was suggested that the combination of curcuminoids and erythromycin or tetracycline could be beneficial for treatment of *H. pylori* infection.

Keywords: *H. pylor*i, curcuminoids, Curcuma *longa*, antimicrobial activity, anti-urease activity

สารบัญ

		หน้า
สารบัญตาราง		ข
สารบัญภาพ		ค-ง
บทที่ 1	**บทนำ**	1
บทที่ 2	**เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา**	3
	รายละเอียดเกี่ยวกับเชื้อ *Helicobacter pylori*	3
	รายละเอียดเกี่ยวกับการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ	4
	รายละเอียดเกี่ยวกับขมิ้นชัน	5
	รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	7
บทที่ 3	**วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง**	8
บทที่ 4	**ผลการทดลอง**	13
บทที่ 5	**สรุปและอภิปรายผลการทดลอง**	18
	สรุปผลการทดลอง	18
	อภิปรายผลการทดลอง	18
เอกสารอ้างอิง		21
ภาคผนวก		24
	ภาคผนวก ก ตารางแสดงข้อมูลผลการทดลอง	25
	ภาคผนวก ข ภาพประกอบผลการทดสอบ	32
	ภาคผนวก ค อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	38
	ภาคผนวก ง รายละเอียดของเคอร์คูมินอยด์ที่ใช้ศึกษา	39

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* โดยวิธี E-test.....	13
2	Fractional inhibitory concentrations (FICs) and FIC indices (FICI).....	17
3	คุณสมบัติทั่วไปของเชื้อทดสอบ.....	25-27
4	ตัวทำละลายเคอร์คูมินอยด์ที่เหมาะสม.....	28
5	ค่า MIC ของเคอร์คูมินอยด์ ในการทดสอบโดยวิธี agar dilution.....	28
6	ค่า MIC ของยา gentamicin ในการทดสอบโดยวิธี agar dilution.....	29
7	ค่า pH ของการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ urease ของ *H. pylori* หมายเลข 3.....	29
8	ค่า pH ของการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ urease ของ *H. pylori* หมายเลข 34.....	30
9	ค่า pH ของการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ urease ของ *H. pylori* หมายเลข 10B.....	30
10	ค่า MIC ของเคอร์คูมินอยด์ และ erythromycin ในการทดสอบ combined effect.....	31
11	ค่า MIC ของเคอร์คูมินอยด์ และ tetracycline ในการทดสอบ combined effect.....	31

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ประสิทธิภาพของเคอร์คูมินอยด์ในการยับยั้งกิจกรรมของ enzyme urease ของเชื้อ *H. pylori* หมายเลข 3.....	15
2	ประสิทธิภาพของเคอร์คูมินอยด์ในการยับยั้งกิจกรรมของ enzyme urease ของเชื้อ*H. pylori* หมายเลข 34.....	15
3	ประสิทธิภาพของเคอร์คูมินอยด์ในการยับยั้งกิจกรรมของ enzyme urease ของเชื้อ*H. pylori* หมายเลข 10B.....	16
4	ลักษณะโคโลนีสีเหลืองทองของเชื้อ *Helicobacter pylori* ที่ใช้ในการศึกษา.....	32
5	ผลการทดสอบ Nalidixic acid และ cephalothin susceptibility test ของเชื้อที่ใช้ในการศึกษา	33
6	ลักษณะการติดสีแกรมของ *H. pylori* ที่ใช้ในการศึกษา.....	33
7	ลักษณะผลการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration ของ erythromycin ด้วยวิธี E test.....	34
8	ลักษณะผลการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration ของ metronidazole ด้วยวิธี E test.....	35
9	ลักษณะผลการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration ของ amoxicillin ด้วยวิธี E test.....	35
10	ลักษณะผลการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration ของ tetracycline ด้วยวิธี E test.....	36

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	ลักษณะการเจริญของ *H. pylori* ในการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration ของเคอร์คูมินอยด์ ด้วยวิธี agar dilution method.....	37

บทที่ 1
บทนำ

แต่ก่อนนั้นเชื่อกันว่าโรคแผลในกระเพาะอาหาร (peptic ulcer) เป็นโรคไม่ติดต่อ สาเหตุเกิดจากมีกรดในกระเพาะอาหารมากเกิน จึงย่อยเยื่อบุกระเพาะของตนเอง ทำให้เกิดเป็นแผลขึ้น แต่ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันแล้วว่าโรคนี้มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่มีชื่อว่า *Helicobacter pylori* การรักษาจึงเปลี่ยนมาให้ยาปฏิชีวนะเพื่อฆ่าเชื้อต้นเหตุโรคแทนการให้ยาลดกรดแต่เพียงอย่างเดียว เพราะหากคนไข้ยังคงติดเชื้อนี้เรื้อรังในกระเพาะอาหาร จะทำให้เกิดการพัฒนาของโรคจนกลายเป็นมะเร็งในกระเพาะอาหาร และมะเร็งลำไส้เล็กตอนต้น นานวันเข้าอาจทำให้ถึงขั้นเสียชีวิตได้ ปัญหาที่พบต่อมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะก็คือ ต้องใช้ยาติดต่อกันเป็นเวลานานอย่างน้อย 14 วัน ยาบางชนิดเกิดผลข้างเคียงกับคนไข้บางราย ทำให้คนไข้มักหยุดยาเมื่ออาการทุเลาลง ทำให้มี คนไข้จำนวนหนึ่งไม่ตอบสนองต่อการรักษา เนื่องจากเชื้อได้พัฒนาการดื้อยาขึ้น ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงพยายามคิดค้น และวิจัยเพื่อหายาชนิดใหม่มาทดแทนยาเก่าซึ่งเริ่มจะใช้ไม่ได้ผล การเลือกใช้สารจากสมุนไพรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง และตามภูมิปัญญาแพทย์แผนไทยนั้นยืนยันว่าขมิ้นชัน *(Curcuma longa* Linn.) มีสรรพคุณทางยา ใช้รักษาโรคหรืออาการโรคได้หลายอย่างเช่น ขับลม ลดการอักเสบ บรรเทาอาการปวดท้อง ท้องอืด แน่นจุกเสียด (สำนักงานคณะกรรมการการสาธารณสุขมูลฐาน, 2542) ซึ่งอาการดังกล่าวมานี้สามารถพบได้ในผู้ที่เป็นโรคแผลในกระเพาะอาหาร และผู้ที่ติดเชื้อ *H. pylori* เช่นกัน ดังนั้นจึงน่าที่จะศึกษาผลของสารสกัดจากขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* และศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ urease ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อสามารถทนกรดอยู่ในกระเพาะอาหารของคนได้ รวมทั้งทดสอบฤทธิ์รวมระหว่างสารสกัดกับยาปฏิชีวนะบางชนิดที่ใช้สำหรับรักษาโรคติดเชื้อชนิดนี้เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับประกอบการพัฒนาให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างจริงจัง

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori*
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชันในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ urease
3. เพื่อทดสอบฤทธิ์รวม (combined effect) ระหว่างสารเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชันกับยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *H. pylori*

ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาโดยนำสารเคอร์คูมินอยด์ จากหัวของขมิ้นชันมาทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* (Minimum Inhibitory Concentration ; MIC) ควบคู่ไปกับการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อนี้ และทดสอบฤทธิ์ของสารเคอร์คูมินอยด์ จากขมิ้นชันในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ urease แล้วจึงทดสอบฤทธิ์รวมระหว่างสารเคอร์คูมินอยด์กับยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษานี้จะทำให้ทราบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารเคอร์คูมินอยด์ จากขมิ้นชันที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* ซึ่งเป็นต้นเหตุของโรคแผลในกระเพาะอาหาร ทราบผลการออกฤทธิ์รวม (combined effect) ระหว่างสารเคอร์คูมินอยด์กับยาปฏิชีวนะ ทำให้หน่วยงานอื่น เช่น องค์การเภสัชกรรม สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ และโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศ สามารถใช้ข้อมูลเบื้องต้นเหล่านี้ไปพัฒนาเป็นตำรับยาและผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพต่อไป โรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา ชลบุรีสามารถนำผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดทั้งชนิดที่ทดสอบเดี่ยว และที่ทดสอบฤทธิ์รวมกับยาปฏิชีวนะไปใช้ในการรักษาผู้ที่ติดเชื้อนี้ได้

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับเชื้อ *Helicobacter pylori*
2. รายละเอียดเกี่ยวกับการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ
3. รายละเอียดเกี่ยวกับขมิ้นชัน
4. รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับเชื้อ *Helicobacter pylori*

1.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ

H.pylori เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งสั้นหรืออาจพบบางเซลล์โค้งงอ เซลล์มีขนาดกว้าง-ยาวประมาณ 0.5-1.0 x 2.5-4.0 ไมโครเมตร เมื่อเชื้ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากท่อนโค้งงอกลายเป็นรูปร่างกลม(coccoid)ได้ สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาซึ่งมีอยู่ประมาณ 4-8 เส้นที่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ จัดเป็น microaerobic bacteria คือสามารถเจริญได้เฉพาะในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อย ๆ ประมาณ 3-5 % เท่านั้น ต้องใช้เวลาประมาณ 3-5 วัน จึงสามารถเห็นโคโลนี ซึ่งมีลักษณะใส ขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร อุณหภูมิที่เหมาะแก่การเจริญอยู่ในช่วง 35-37 องศาเซลเซียส จัดเป็นเชื้อที่เจริญยาก (fastidious organism) ต้องการสารเสริมพิเศษเช่น เลือด หรือซีรัม 5-10 % เพื่อช่วยในการเจริญ (Dunn *et al.*, 1997)

เชื้อนี้ให้ผลบวกกับการทดสอบ catalase และ oxidase และให้ผลบวกกับการทดสอบ urease อย่างรวดเร็วภายในเวลาไม่เกิน 5 นาที เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ urease ได้ในปริมาณมาก (Dunn *et al.*, 1997) และสามารถใช้คุณสมบัติของการสร้าง urease นี้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *H.pylori* ได้

1.2 ปัจจัยในการก่อโรคของเชื้อ *H.pylori*

H.pylori สามารถสร้าง urease ออกมาไว้ที่ผิวเซลล์ในปริมาณมาก เอนไซม์นี้สามารถสลาย urea ที่อยู่ในกระเพาะอาหารให้กลายเป็นแอมโมเนีย สะเทินความเป็นกรดที่มีอยู่ ณ บริเวณเยื่อบุกระเพาะอาหาร ทำให้เชื้อสามารถทนอยู่และเจริญต่อไปได้ (Tabak *et al.*, 1999) นอกจากนี้เชื้อยังสามารถผลิตสารพิษชนิด ต่างๆ ขึ้นมาทำลายเนื้อเยื่อของร่างกายมนุษย์ได้ ตัวอย่างเช่น Vac

A และ Cag A เป็นต้น Vac A เป็นสารที่ทำให้เกิด vacuoles ขึ้นมากมายภายในเซลล์ที่ติดเชื้อส่วน Cag A เป็นสารที่ทำให้เกิดการจับกลุ่มและการเพิ่มจำนวนของเชื้อ เมื่อมีเชื้อมากขึ้นจึงเกิดการทำลายเซลล์และเกิดการอักเสบของเยื่อบุกระเพาะอาหารมาก ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร จึงมีโอกาสเกิดแผลในกระเพาะอาหารและเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารมากขึ้นด้วย

2. รายละเอียดเกี่ยวกับการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยามีวิธีหลักอยู่ 3 วิธี คือ Broth dilution test, Agar dilution test และ Agar diffusion test แต่ละวิธีมีวิธีการทดสอบโดยสังเขปดังนี้

Broth dilution test สามารถแบ่งได้เป็น macrodilution และ microdilution test วิธีนี้ทำการทดสอบโดยเจือจางยาต้านจุลชีพเริ่มต้นแบบ serial two-fold dilution ด้วย Mueller-Hinton broth จากนั้นจึงเติมเชื้อทดสอบซึ่งมีจำนวนเซลล์ประมาณ 1.5 X 10^8 CFU/ml ลงไป บ่มในอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะแก่การเจริญของเชื้อทดสอบ จากนั้นบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum inhibitory concentration;MIC) โดยสังเกตความขุ่นหรือใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการหาค่า MIC ของเชื้อ *H.pylori* นั้นทดสอบโดยวิธี broth microdilution โดยเจือจางยาต้านจุลชีพแบบ two-fold dilution ใน microtiter plates ด้วยอาหาร Mueller-Hinton broth ที่เติม 10 % Fetal bovine serum จากนั้นเติม suspension ของเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อประมาณ 5x10^5 CFU/หลุมทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ microaerobic นาน 3 วัน บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Piccolomini *et al.*, 1997)

Agar dilution test วิธีนี้ทำการทดสอบโดยการเจือจางยาต้านจุลชีพให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ ผสมกับ Mueller-Hinton agar ซึ่งหลอมไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ในอัตรายา 1ส่วนต่ออาหาร 19 ส่วน ผสมให้เข้ากันแล้วเทใส่จานรอให้วุ้นแข็งตัว นำเชื้อที่ต้องการทดสอบมา spot ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ บ่มไว้ในอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อทดสอบ อ่านค่า MIC โดยดูการเจริญของเชื้อบนอาหาร สำหรับการทดสอบเชื้อ *H.pylori* ด้วยวิธีนี้ปฏิบัติด้วยวิธีการเช่นเดียวกัน และนำเชื้อมา spot ลงบนผิวหน้าอาหาร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อประมาณ 5x10^5 CFU/spot บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ microaerobic นาน 3 วัน บันทึกผลค่า MIC (Piccolomini *et al.*, 1997)

Disc diffusion test วิธีนี้ทำการทดสอบโดยป้ายเชื้อที่ต้องการทดสอบให้กระจายอย่างสม่ำเสมอลงบนผิวหน้า Mueller-Hinton agar แล้ววางแผ่นยาต้านจุลชีพลงบนผิวหน้าอาหาร หลังจากบ่มเชื้อในสภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม ยาจะแพร่กระจายไปในเนื้ออาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวงโดยรอบ ความเข้มข้นของยาในอาหารเลี้ยงเชื้อแปรผกผันกับระยะห่างจากแผ่นยา หากยาสา-

มารถยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเชื้อได้ จะเกิดเป็นบริเวณใสที่เชื้อถูกยับยั้งการเจริญรอบแผ่นยาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสที่เกิดขึ้นเทียบกับตารางมาตรฐานเพื่อแปลผล สำหรับการทดสอบเชื้อ *H.pylori* ด้วยวิธี ใช้ suspension ของเชื้อที่มีความขุ่นเทียบเท่า McFarland standard No.3 ป้ายลงบน Mueller-Hinton agar ที่ผสมเลือด 5% จากนั้นวางแผ่นยาต้านจุลชีพที่ต้องการทดสอบบ่มที่อุณหภูมิ37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ microaerobic นาน3 วัน (Piccolomini *et al.*, 1997)

3. รายละเอียดเกี่ยวกับขมิ้นชัน

ขมิ้นชัน (ชื่อสามัญ) หรือชื่อในภาษาอังกฤษว่า Turmeric ชื่อวิทยาศาสตร์*Curcuma longa* Linn. อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามท้องถิ่น เช่น ขมิ้น ขมิ้นแกง ขมิ้นหยอก ขมิ้นหัว ขี้มิ้น ตายอ สะยอ หรือหมิ้น

ขมิ้นเป็นพืชล้มลุกมีลำต้นอยู่ใต้ดินเรียกว่าเหง้าประกอบด้วยแง่งที่มีลักษณะต่างๆกันคือ แง่งแม่หรือแง่งหลัก มีลักษณะกลม มีแขนงที่สองและสามแตกต่อไป แขนงที่แตกออกไปใหม่นี้หากมีลักษณะกลมเรียกว่าหัว หากมีลักษณะยาวคล้ายนิ้วมือจะเรียกว่านิ้ว เนื้อในของหัวขมิ้นมีสีเหลืองอมส้มและมีกลิ่นหอม

ลักษณะใบของขมิ้นเป็นใบเดี่ยว แผ่นใบเรียวยาว ปลายใบแหลม เห็นเส้นกลางใบชัดเจนที่ด้านล่างของใบ ใบเรียงสลับและอยู่กันเป็นกลุ่ม

ขมิ้นออกดอกเป็นช่อ ช่อดอกอาจจะเกิดบนลำต้นที่มีใบหรือขึ้นมาจากใจกลางของกลุ่มใบ ช่อดอกมีรูปร่างแบบทรงกระบอกหรือรูปกรวย ใบประดับมีสีเขียวอ่อนๆ หรือสีขาว ตรงปลายช่อดอกมีสีชมพูอ่อน อเรียงซ้อนกันอย่างเป็นระเบียบ กลีบรองกลีบดอกเชื่อมติดกัน กลีบดอกมีสีขาว ตรงโคนเชื่อมติดกันเป็นท่อยาว (อุดมการณ์ อินทุใสและปาริชาติ ทะนานแก้ว, 2549)

องค์ประกอบทางเคมี

ขมิ้นประกอบไปด้วยสารอาหารต่าง ๆ มากมายได้แก่ คาร์โบไฮเดรต (69.4%) โปรตีน (6.3%) ไขมัน (5.1%) เกลือแร่ (3.5%) นอกจากนี้ยังมีน้ำมันหอมระเหย (5.8%) และ เคอร์คูมินอยด์ ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม phenolic compound มีสีเหลืองส้ม พบได้ 3-6 % (Bhavani และ Sreenivasa, 1979) เคอร์คูมินอยด์ ประกอบด้วยสารหลักที่สำคัญ 3 ชนิดคือ curcumin เป็นสารที่มีสีเหลืองส้ม ไม่ละลายน้ำ พบได้ในปริมาณมากที่สุดคือ 70-75% รองลงมาได้แก่ demethoxycurcumin พบได้ 15-20% และ bisdemethoxycurcumin พบได้ 3 % เคอร์คูมินอยด์ เตรียมได้โดยการสกัดขมิ้นด้วย ethanol

สารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ curcumin, และอนุพันธ์ (desmethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ขมิ้นมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร มีฤทธิ์ลดการอักเสบ ขับน้ำดี และฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบได้ ฤทธิ์ป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารเกิดจากสาร curcumin กระตุ้นการหลั่ง mucin ออกมาเคลือบกระเพาะ แต่หากใช้ในปริมาณสูงอาจทำให้เกิดแผลในกระเพาะได้ ส่วนฤทธิ์ลดการอักเสบเกิดจากสาร curcumin และน้ำมันหอมระเหยทำให้ขมิ้นมีผลช่วยบรรเทาอาการปวดท้องเนื่องจากแผลในกระเพาะได้ (คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา, 2549)

Curcumin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ Streptococcus, Staphylococcus และ Lactobacillus (Bhavani และ Sreenivasa 1979) รวมทั้ง *H. pylori* ชนิดที่สร้าง cagA ได้อีกด้วย (Mahady *et al.*, 2002)

4. รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

Sivam *et al.*,(1997) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกระเทียมด้วยน้ำพบว่ามีความสามารถยับยั้ง *H. pylori* ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 40 ug thiosulfinate/ml

Jonkers *et al.*, (1999) ศึกษาผลของสารสกัดกระเทียมสดและสารสกัดกระเทียมสำเร็จรูปชนิดเม็ดในการต้านเชื้อ *H. pylori* ทั้งแบบทดสอบเดี่ยว และทดสอบรวมกับยาปฏิชีวนะและ omeprazole พบว่าสารสกัดกระเทียมสดมีค่า MIC เท่ากับ 10,000 (ช่วง 5,000-10,000) mg/L ส่วนสารสกัดกระเทียมสำเร็จรูปชนิดเม็ด มีค่า MIC อยู่ในช่วง 12,500-17,500 mg/L ดังนั้นกระ- เทียมสดจึงมีผลต่อเชื้อนี้มากที่สุด และเมื่อทดสอบผลของสารสกัดกระเทียมรวมกับยาปฏิชีวนะ ปรากฏว่าไม่มีผลในการเสริมฤทธิ์และต้านฤทธิ์กันกับ amoxicillin, clarithromycin หรือmetro- nidazole แต่พบการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสกัดกระเทียมกับ omeprazole นอกจากนี้ยังมีราย งานอีกว่าสารสกัดจากกระเทียมยังสามารถยับยั้งเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่ดื้อยาได้อีกด้วย (Sivam, 2001)

Mahady *et al.*, (2002) ทำการทดลองโดยนำผงเหง้าขมิ้นชันมาสกัดด้วยเมทานอลแล้วทดสอบกับเชื้อ *H. pylori* จำนวน 19 strains (ซึ่งรวมสายพันธุ์ Cag A+ ด้วยจำนวน 5 strains) ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากเหง้าขมิ้นชันด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งเชื้อได้ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 6.25- 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คูมินก็ให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกัน

Bhamarapravati *et al.*, (2003) ได้ทดสอบความไวของ *H. pylori* ต่อสารสกัดจากเครื่องเทศและพืชสมุนไพรของไทยรวม 20 ชนิด พบว่าสารสกัดด้วย methanol จากจันทน์เทศ, ใบจิก รากเปราะหอม ใบกัลปพฤกษ์ ใบผักเสี้ยนผี กานพลู ใบหญ้าหนอนตายหยาก ใบปรงป่า ใบแมงดา (หรือทำมัง) และผักเสม็ด ล้วนมีความสามารถในการยับยั้ง *H. pylori* ได้ โดยมีค่า MIC แตกต่างกันออกไปอยู่ในช่วง 50 ug/ml – 12.5 mg/ml

Adeniyi และ Anyiam (2004) ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบด้วย methanol จากใบหอมแดง (Allium ascalonicum) กับ *H. pylori* จำนวน 5 isolates พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อได้โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 6.25-12.5 mg/ml และเมื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่าเป็นสารประเภท alkaloids, cardiac glycoside และ saponins

Foryst-Ludwig *et al.*, (2004) ศึกษาผลของ curcumin จากขมิ้นชันความเข้มข้น 40 หรือ 80 ไมโครโมล พบว่าไม่มีผลยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* แต่พบว่า curcumin ยับยั้งการทำงานของ NF-kappa B ซึ่งก่อให้เกิดการอักเสบโดยจะยับยั้งการสลายตัวของ IKBα นอกจากนี้ยังยับยั้งการหลั่ง Interleukin 8 และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

   ได้แก่เชื้อ *Helicobacter pylori* จำนวน 5 isolates ที่แยกได้จากคนไข้ที่เข้ารับการรักษาด้วยอาการ peptic ulcer ณ โรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราช จังหวัดชลบุรี และ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

2. เคอร์คูมินอยด์

   จากองค์การเภสัชกรรม กรุงเทพมหานครฯ

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

   3.1 Mueller-Hinton agar (MHA)-Difco®

   3.2 Mueller-Hinton broth (MHB) -Difco®

   3.3 Helicobacter selective blood agar (HSBA)

4. สารเคมี

   4.1 Microaerophilic gaspak (Mitsubishi®)

   4.2 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)

   4.3 Campylobacter selective supplement (Oxoid®)

5. ยาปฏิชีวนะ

   5.1 Gentamicin (Liwinner Pharmaceutical®.)

   5.2 Cephalothin (KF) 30 ไมโครกรัม/ดิสค์ -BBL®

   5.3 Nalidixic acid (NA) 30 ไมโครกรัม/ดิสค์-BBL®

   5.4 Ampicillin (AMP) 10 ไมโครกรัม/ดิสค์-BBL®

   5.5 Oxacillin (OX) 1 ไมโครกรัม/ดิสค์-BBL®

   5.6 E-test strip (Amoxicillin , Tetracycline , Metronidazole , Erythromycin) (AB BIODISK®)

   5.7 Amoxicillin powder (GlaxoSmithKline®)

   5.8 Tetracycline powder (Seven Stars Pharmaceutical Co., Ltd.)

   5.9 Erythromycin powder (Eli Lilly®)

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาคุณสมบัติทั่วไปของเชื้อทดสอบ

1.1 *Helicobacter pylori*

นำ *H. pylori* ทั้ง 5 isolates ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่มีแผลในกระเพาะอาหาร และเข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา จังหวัดชลบุรี และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำมาเพาะลงบน Helicobacter selective agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใน anaerobic jar ภายใต้สภาวะ microaerobic โดยการใช้ microaerophilic gaspak เชื้อทั้งหมดนี้ได้ทำการคัดแยกและพิสูจน์ชนิดตามคุณสมบัติและการติดสีแกรม (Gram-negative bacilli ขนาดเล็ก บางเซลล์โค้งงอ) การเจริญได้ในสภาวะ microaerobic ไม่เจริญในสภาวะ aerobic ให้ผลการทดสอบoxidase catalase และ urease เป็นบวก ไวต่อ cephalothin 30 µg/disc ดื้อต่อ nalidixic acid 30 µg/disc)

1.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

นำ *S. aureus* ATCC 29213 มาเพาะลงบน blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนี การ hemolysis เม็ดเลือดแดง นำโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้มาทดสอบ Catalase, Coagulase, Glucose fermentation และ Mannitol fermentation

2. การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* โดยวิธี Epsilometer test (E-test) (Lang & Garcia, 2004)

นำโคโลนีของ *H. pylori* มา suspend ใน MHB ที่ผสม fetal bovine serum ร้อยละ 10 จนมีความขุ่นเท่ากับ McFarland เบอร์ 3 แล้วป้ายลงจนทั่วผิวหน้าอาหาร Helicobacter selective agar จากนั้นวางแถบยาปฏิชีวนะ (E-test strip) amoxicillin erythromycin และ tetracycline ลงบนผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใน anaerobic jar ภายใต้สภาวะ microaerobic โดยการใช้ microaerophilic gaspak

3. การเลือกตัวทำละลายเดอร์คูมินอยด์ที่เหมาะสม

1. นำ absolute ethanol, DMSO, และ Tween 80 มาเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ตั้งแต่ร้อยละ 2 ถึง 60 แล้วนำมาละลายเดอร์คูมินอยด์ให้มีความเข้มข้น 0.2 0.5 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. สังเกตดูการละลายอย่างสมบูรณ์ที่เวลา 30 นาที 1 2 3 6 และ 24 ชั่วโมง เลือกตัวทำละลายแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้เตรียม stock สารละลายเคอร์คูมินอยด์ในการทดสอบขั้นต่อไป

4. การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของเคอร์คูมินอยด์ด้วยวิธี agar dilution (Piccolomini *et al.*, 1997)

การเตรียมเชื้อทดสอบ

1. นำเชื้อ *H. pylori* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Helicobacter selective agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะ microaerobic
2. นำโคโลนีมา suspend ใน MHB +fetal bovine serum 10 % ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No 0.5 แล้วถ่ายเชื้อที่มีความขุ่นเทียบเท่า McFarland No 0.5 มา 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำกลั่นไร้เชื้อ 1.0 มิลลิลิตร (ปริมาณเชื้อประมาณ 5×10^7 CFU/ml)

การเตรียมสารละลายเคอร์คูมินอยด์

1. ละลายเคอร์คูมินอยด์ 10 มิลลิกรัม ด้วย ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นเคอร์คูมินอยด์เท่ากับ 1 000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) กรองให้ไร้เชื้อ
2. เจือจางต่อไปแบบ serial two-fold dilution ให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 500 ถึง 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. ปิเปตสารละลายเคอร์คูมินอยด์ในหลอดที่มีความเข้มข้นของเคอร์คูมินอยด์ตั้งแต่ 1 000 ถึง 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาหลอดละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ปริมาตร 18 มิลลิลิตร เติมเลือดหลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เทลงจานเพาะเชื้อ (ความเข้มข้นละ 3 จาน)

การทดสอบ

1. Spot suspension ของเชื้อที่เจือจางแล้ว 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารละลายเคอร์คูมินอยด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (แต่ละเชื้อทำการทดสอบ 3 ซ้ำ)
2. บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะ microaerobic

หมายเหตุ

Positive Control ทำการทดสอบเช่นเดียวกัน แต่ไม่เติมสารเคอร์คูมินอยด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Negative Control ทำการทดสอบเช่นเดียวกัน แต่เติม ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 50 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแทนสารเคอร์คูมินอยด์

ชุดควบคุม

ทำการทดสอบเช่นเดียวกันโดยใช้ *S. aureus* ATCC 29213 ทดสอบกับยา gentamicin ความเข้มข้นตั้งแต่ 2 ถึง 0.0625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะ aerobic เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ)

การอ่านผล

1. อ่านค่า MIC ของยา gentamicin โดย MIC หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ (บริเวณที่ spot ไม่มีเชื้อเจริญ)
2. อ่านค่า MIC ของสารเคอร์คูมินอยด์ โดย MIC หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารเคอร์คูมินอยด์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ (บริเวณที่ spot ไม่มีเชื้อเจริญ)

5. การทดสอบความสามารถของเคอร์คูมินอยด์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ urease (ดัดแปลงจากวิธีของ Tabak, *et al.*, 1999)

การเตรียมเชื้อทดสอบ

เขี่ยเชื้อ *H. pylori* ซึ่งเลี้ยงไว้บนอาหาร Helicobacter selective agar นาน 3 วัน ใส่ใน 20 mM phosphate buffer solution (PBS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับให้มีความขุ่นเทียบเท่า standard McFarland No 3.0

การเตรียมน้ำยาทดสอบ

ผสม 3.0 mMPBS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับ urea 0.25 กรัมและ phenol red 0.0005 กรัม กรองให้ไร้เชื้อด้วย millipore filter ขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร

วิธีการทดสอบ

1. นำ suspension ของเชื้อ 50 ไมโครลิตร ใส่ในกระบอกตวงขนาด 25 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำยาทดสอบลงไป 5.0 มิลลิลิตร วัด pH ครั้งที่ 1
3. เติมเคอร์คูมินอยด์ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับค่า MIC ของเชื้อลงไป 50ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที วัด pH ครั้งที่ 2 หา ΔpH ทุกๆ 10 นาที จนครบ 1ชั่วโมง

<u>หมายเหตุ</u>

Positive control	ทำการทดสอบเช่นเดียวกัน แต่ไม่เติมสารเคอร์คูมินอยด์
Negative control	ทำการทดสอบเช่นเดียวกัน แต่ไม่เติมเชื้อ เติม ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 50 แทนสารเคอร์คูมินอยด์

6. การทดสอบฤทธิ์รวมระหว่างเคอร์คูมินอยด์กับยาต้านจุลชีพด้วยวิธี agar chequerboard titration (Koga *et al.*, 2002)

6.1 การทดสอบฤทธิ์รวมระหว่างเคอร์คูมินอยด์กับ Erythromycin

การเตรียมอาหารสำหรับทดสอบ

1. เจือจางสารเคอร์คูมินอยด์แบบ serial two-fold dilution ในหลอดทดลองให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 8 000-500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
2. เจือจาง erythromycin แบบ serial two-fold dilution ในหลอดทดลองให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 40-2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
3. ผสมสารเคอร์คูมินอยด์แต่ละความเข้มข้นกับสารละลายยา erythromycin แต่ละความเข้มข้นในอัตราส่วน 1:1
4. ผสมสารละลายที่ได้ในข้อ 3 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรกับอาหาร Helicobacter selective agar ปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร เทใส่ลงใน 6-wells microtiterplate หลุมละประมาณ 3 มิลลิลิตร

การเตรียมเชื้อสำหรับทดสอบ

เช่นเดียวกันกับการเตรียมเชื้อสำหรับทดสอบหาค่า MIC ของสารเคอร์คูมินอยด์ด้วยวิธี agar dilution

การทดสอบ

โดยการ spot เชื้อทดสอบ Helicobacter pylori หมายเลข 2 3 และ 22 ลงบนผิวหน้าของอาหารที่เตรียมไว้ ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

6.2 การทดสอบฤทธิ์รวมระหว่างเคอร์คูมินอยด์กับ Tetracycline

วิธีการทดสอบเช่นเดียวกันกับการทดสอบฤทธิ์รวมระหว่างเคอร์คูมินอยด์กับerythromycin แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของยาเป็นตั้งแต่ 20-0.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. คุณสมบัติทั่วไปของเชื้อทดสอบ

Helicobacter pylori ทั้ง 5 isolates ที่ใช้ในการศึกษานี้เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงลงบน Helicobacter selective agar พบว่าโคโลนีมีสีเหลืองทอง ขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4-ภาคผนวก)ให้ผลการทดสอบ oxidase และ urease เป็นบวก เชื้อทั้ง 5 isolates ไวต่อยาปฏิชีวนะ cephalothin (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เท่ากับ 69-71 มิลลิเมตร) และดื้อ nalidixic acid (inhibition zone ประมาณ 8 มิลลิเมตร) (ภาพที่ 5- ภาคผนวก) ผลการย้อมสีแกรมพบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นๆ ขนาดเล็ก บางเซลล์โค้งงอ (ภาพที่ 6- ภาคผนวก)

2. การหาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ amoxicillin erythromycin และ tetracycline ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี E-test

จากการหาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ amoxicillin erythromycin และ tetracycline โดยวิธี E-test พบว่าเชื้อทั้ง 5 isolates มีค่า MIC ของ amoxicillin และ tetracycline เท่ากันคือน้อยกว่า 0.016 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า MIC ของ erythromycin อยู่ในช่วง 0.064 ถึง 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 7-10 - ภาคผนวก และตารางที่ 1)

ตารางที่ 1. ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* โดยวิธี E-test

เชื้อทดสอบ	ค่า MIC (μg/ml)*		
	Amoxicillin	**Erythromycin**	**Tetracycline**
H. pylori No.2	< 0.016	0.125	< 0.016
H. pylori No.3	< 0.016	0.125	< 0.016
H. pylori No.22	< 0.016	0.064	< 0.016
H. pylori No.34	< 0.016	0.064	< 0.016
H. pylori No.10B	< 0.016	0.094	< 0.016

* หมายถึง ผลการทดสอบ 2 ใน 3 ซ้ำของการทดลอง

3. การเลือกตัวทำละลายเคอร์คูมินอยด์ที่เหมาะสม

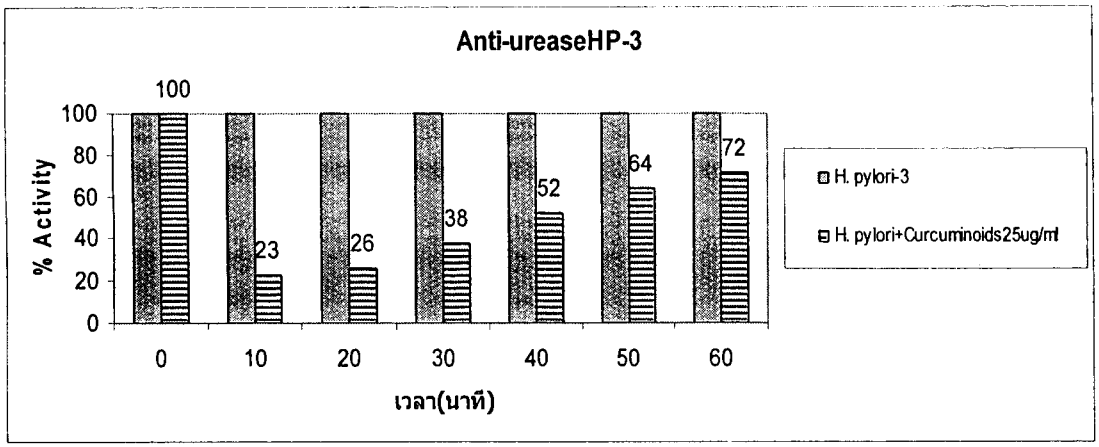
เมื่อนำ absolute ethanol Tween80 และ DMSO มาเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน แล้วนำมาละลายเคอร์คูมินอยด์ให้มีความเข้มข้น 0.2 0.5 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สังเกตดูการละลายอย่างสมบูรณ์ที่เวลาต่างๆ พบว่าเคอร์คูมินอยด์ที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถละลายได้อย่างสมบูรณ์ในตัวทำละลาย ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 40 50 60 และ Tween80 ความเข้มข้นร้อยละ 2 และ 20 โดยไม่มีการแยกชั้นหรือตกตะกอนของสาร แม้เวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ส่วน DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 2 และ 20 นั้นพบว่าไม่สามารถละลายสารเคอร์คูมินอยด์ได้สมบูรณ์ โดยสารละลายที่ได้มีลักษณะใส ไม่มีสีและเกิดการตกตะกอน(ตารางที่ 4 -ภาคผนวก)

4. การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของเคอร์คูมินอยด์ด้วยวิธี agar dilution

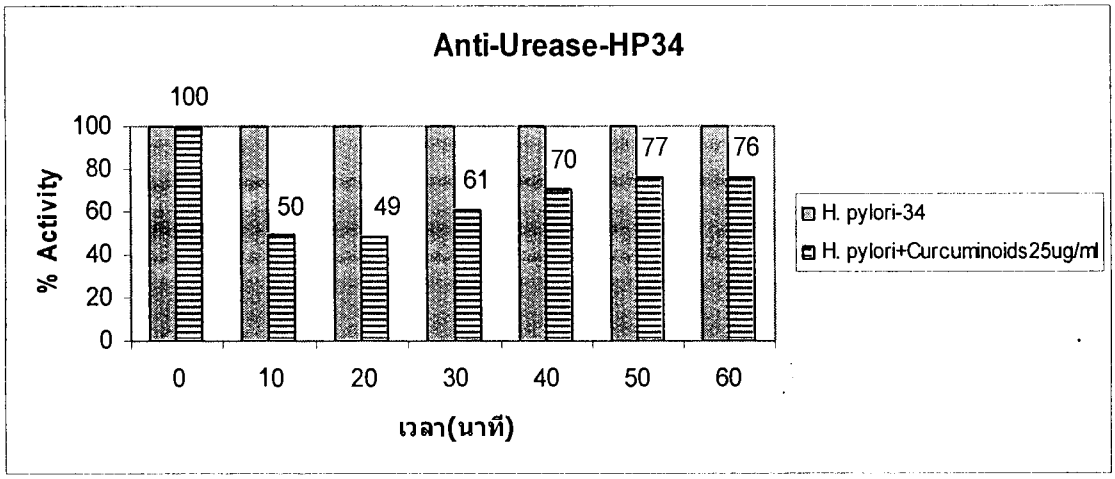
จากการหาค่า MIC ของเคอร์คูมินอยด์ด้วยวิธี agar dilution โดยใช้ ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นตัวทำละลายพบว่า *H. pylori* ทั้ง 5 isolates มีค่าMIC ของเคอร์คูมินอยด์เท่ากันคือเท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 5 - ภาคผนวก และภาพที่ 11 -ภาคผนวก) ทั้งนี้ค่า MIC ของยา gentamicin ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ในการทดสอบโดยวิธี agar dilution มีค่าอยู่ในช่วง 0.5-1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 6- ภาคผนวก)

5. การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ urease

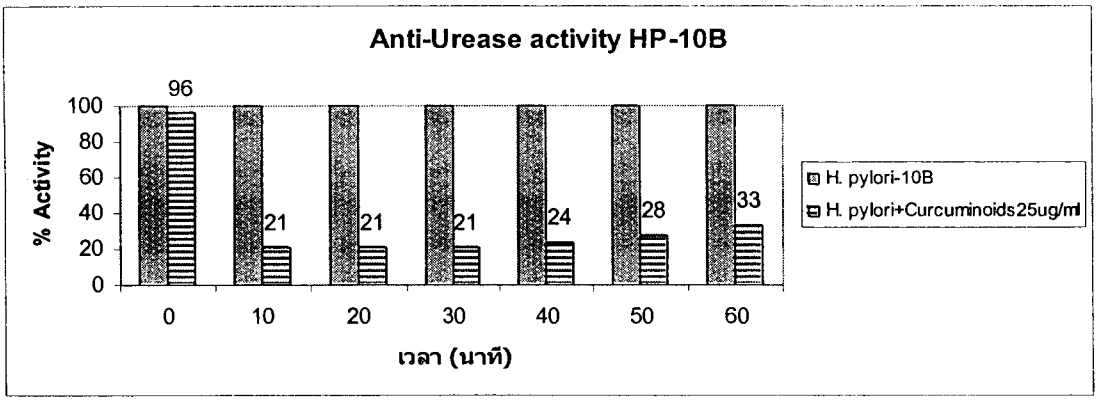
จากการทดสอบประสิทธิภาพของเคอร์คูมินอยด์ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ urease นั้น พบว่าเอนไซม์ urease จากเชื้อ *H. pylori* หมายเลข 3 34 และ 10B สามารถสลายยูเรีย ทำให้ pH ของน้ำยาทดสอบมีความเป็นด่างมากขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่ pH ประมาณ 7.0 ณ เวลาเริ่มต้นทดสอบ จนเป็น 8.9 เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที ส่วนในชุดการทดลองที่ประกอบด้วยน้ำยาทดสอบรวมกับเชื้อและเคอร์คูมินอยด์เท่ากับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (คือเท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่า pH ของน้ำยาทดสอบ เพิ่มขึ้นเช่นกันแต่ในอัตราที่น้อยกว่า ส่วนชุดทดสอบของ diluents control ซึ่งประกอบด้วยน้ำยาทดสอบรวมกับ ethanol พบว่า pH ของน้ำยาทดสอบเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเคอร์คูมินอยด์ในการยับยั้งกิจกรรมของ enzyme urease พบว่าสารเคอร์คูมินอยด์สามารถยับยั้งกิจกรรม urease ของเชื้อได้อยู่ในช่วง 30-70% (ภาพที่ 1-3)



ภาพที่ 1. ประสิทธิภาพของเคอร์คูมินอยด์ในการยับยั้งกิจกรรมของ enzyme urease ของเชื้อ *H. pylori* หมายเลข 3



ภาพที่ 2. ประสิทธิภาพของเคอร์คูมินอยด์ในการยับยั้งกิจกรรมของ enzyme urease ของเชื้อ *H. pylori* หมายเลข 34



ภาพที่ 3. ประสิทธิภาพของเคอร์คูมินอยด์ในการยับยั้งกิจกรรมของ enzyme urease ของเชื้อ *H. pylori* หมายเลข 10B

6. ฤทธิ์รวมระหว่างสารเคอร์คูมินอยด์กับยาต้านจุลชีพ

ในการทดสอบฤทธิ์รวมระหว่างสารเคอร์คูมินอยด์กับยา tetracycline และ erythromycin ต่อเชื้อ *H. pylori* หมายเลข 2 3 และ 22 พบว่าสารเคอร์คูมินอยด์ออกฤทธิ์รวมกับ tetracycline เป็นแบบไม่แตกต่างไปจากฤทธิ์เดิมของแต่ละสารเมื่อใช้แบบยาเดี่ยวเช่นเดียวกันกับฤทธิ์รวมระหว่างสารเคอร์คูมินอยด์กับยา erythromycin (ตารางที่ 10-11 -ภาคผนวก) โดยค่า FICI ของการทดสอบฤทธิ์รวมระหว่าง เคอร์คูมินอยด์ กับ erythromycin ของเชื้อทั้ง 3 isolates มีค่าเท่ากับ 4 ส่วนค่า FICI ของการทดสอบฤทธิ์รวมระหว่าง เคอร์คูมินอยด์ กับ tetracycline อยู่ในช่วง 1.5-3.0 (ตารางที่ 2.)

ตารางที่ 2. Fractional inhibitory concentrations (FICs) and FIC indices (FICI)

Combinations	HP-2		HP-3		HP-22	
	FIC	FICI	FIC	FICI	FIC	FICI
1.Erythromycin-เคอร์คูมินอยด์	2 2	**4**	2 2	**4**	2 2.08	**4.08**
2. Tetracycline-เคอร์คูมินอยด์	2 1	**3**	0.5 1	**1.5**	1 2.08	**3.08**

FIC of drug A = MIC of drug A in combination /MIC of drug A alone

FICI = FIC of drug A + FIC of drug B

FIC indicies were interpreted as follows:

$\leq$ 0.5, synergy; >0.5-1, additive; >1-4.0, indifference; >4, antagonism.

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

1. สารเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชันมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* ได้ โดยมีค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
2. เคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชันในปริมาณที่ยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* นั้นสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ urease ได้
3. ฤทธิ์รวม (combined effect) ระหว่างสารเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชันกับยา erythromycin และ tetracycline ที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* นั้นเป็นแบบไม่ต่างไปจากฤทธิ์เดิม (Indifference)

อภิปรายผลการทดลอง

H. pylori ทั้ง 5 isolates ที่ใช้เป็นตัวอย่างเชื้อในการศึกษาครั้งนี้จัดเป็นเชื้อที่ไวต่อยา amoxicillin, erythromycin และ tetracycline เนื่องจาก *H. pylori* ที่ดื้อยาแต่ละชนิดต้องมีค่า MIC เท่ากับหรือมากกว่า 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร(Mishra *et al.*, 2006) จากรายงานการศึกษาผลการทดสอบความไวของเชื้อ *H. pylori* ต่อยาต้านจุลชีพของนักวิจัยจากประเทศต่าง ๆ พบว่า *H. pylori* มีอัตราการดื้อยา amoxicillin, และ tetracycline น้อยมาก คือพบเชื้อดื้อยาเพียงร้อยละ 0-5.3 เท่านั้น (Kim, *et al.* 2001; Loivukene, *et al.*, 2002; Lang and Garcia, 2004) ส่วนการดื้อยา erythromycin พบได้ประมาณร้อยละ 2.5 (Loivukene, *et al.*, 2002)

ขมิ้นชันหรือที่มีชื่อเรียกในภาษาอังกฤษว่า turmeric เป็นพืชพื้นเมืองของชาวเอเชีย ใส่ในอาหารทำให้อาหารมีสีเหลืองน่ารับประทาน และยังมีสรรพคุณรักษาอาการอักเสบต่าง ๆ และยังช่วยแก้อาการท้องอืด แน่นท้องอีกด้วย คนบางประเทศได้รับขมิ้นในรูปที่เป็นส่วนประกอบอยู่ในอาหารมากถึงวันละ 2.5 กรัม หรือเทียบเท่ากับ curcumin ประมาณ 100 มิลลิกรัม ซึ่งมีรายงานการศึกษาว่าบุคคลสามารถบริโภค curcumin ได้มากถึงวันละ 8 กรัม โดยไม่มีผลข้างเคียง (Cheng, *et al.*, 2001) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า เคอร์คูมินอยด์ ในปริมาณความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* ได้ทั้ง 5 isolates ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Mahady et al.,ในปีค.ศ. 2002 ที่พบว่าสารสกัดจากขมิ้นด้วย methanol และสาร curcumin สามารถยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* ได้ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 6.25-50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เช่นกัน

ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ศึกษาประสิทธิภาพของเคอร์คูมินอยด์ ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ urease ซึ่งทดลองโดยวิธีวัดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด – เบส สารใดที่ทำให้ค่าความเป็นกรด – เบสไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่าสารชนิดนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ urease จาก *H. pylori* ได้โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการเปลี่ยนยูเรียเป็นแอมโมเนีย แต่หากสารใดที่เมื่อเติมลงไปในระบบการทดสอบแล้ว ค่า pH ของระบบยังคงเพิ่มสูงขึ้น แสดงว่าสารชนิดนั้นไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ urease จากเชื้อ ยังคงทำให้เอนไซม์สามารถย่อยสลายยูเรียในระบบ ให้กลายเป็นแอมโมเนีย ทำให้มีความเป็นเบสเพิ่มขึ้น ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เคอร์คูมินอยด์ ในระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรนั้น สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ urease จากเชื้อได้ โดยในระยะเวลา 20 นาทีแรกที่สัมผัสเชื้อ เคอร์คูมินอยด์ สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้อย่างรวดเร็ว กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 20-49 ของกิจกรรมเริ่มต้น หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์กลับคืนมาอย่างช้า ๆ เหลือร้อยละ 30-76 ของกิจกรรมเริ่มต้น แสดงให้เห็นว่า เคอร์คูมินอยด์ มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ urease แบบ reversible

เอนไซม์ urease ของ *H. pylori* นั้นมีคุณสมบัติเป็น extracellular enzyme ที่เชื้อสร้างขึ้นภายใน cytoplasm ของเซลล์ในระยะแรกของการเจริญแล้วปล่อยออกสู่ชั้น outer membrane เมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้นเพื่อช่วยปกป้องเซลล์ มีโครงสร้างคล้ายกับเอนไซม์ urease ของถั่วลันเตา กล่าวคือมีลักษณะเป็น homohexameric proteins มี Ni^{2+} และหมู่ –SH เป็นบริเวณ active site ในการเข้าทำปฏิกิริยา (Juszkiewicz *et al.*, 2004) หมู่ –SH ทั้ง 6 หมู่นั้นถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่เกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วและกลุ่มที่เกิดปฏิกิริยาช้ากว่า (Juszkiewicz *et al.*, 2004) มีการศึกษาพบว่าสารหลายชนิดสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ได้ตัวอย่างเช่น Acetohydroxamic acid (AHA), Hydroxyurea, EDTA, Flurofamide, L-Arginine hydroxamate, L-Lysine hydroxamate และ Thiourea เป็นต้น (Mobley, *et al.*, 1988)

เอนไซม์ urease มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคของเชื้อ *H. pylori* โดยเมื่อ H. pylori เข้าสู่กระเพาะอาหารแล้วนั้น จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ urease ในการสลาย urea ในกระเพาะให้เกิดเป็นแอมโมเนีย ช่วยสะเทินสภาวะความเป็นกรด ทำให้เชื้อสามารถทนอยู่และบุกรุกเข้าสู่เซลล์เยื่อบุได้ (Bijlsma *et al.*, 2002) *H. pylori* สายพันธุ์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์เป็นชนิดที่ไม่มีเอนไซม์ urease นั้น ไม่สามารถทำให้กระเพาะอาหารของหนูทดลองอักเสบได้ (Tsuda *et al.* 1994) ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า เคอร์คูมินอยด์ น่าจะมีสรรพคุณในการป้องกัน การ colonize ของ *H. pylori* ที่เข้าสู่กระเพาะอาหาร และยังช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อีกด้วย

นอกจากนี้เมื่อนำ เคอร์คูมินอยด์ ไปทดสอบฤทธิ์รวมกับยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *H. pylori* คือ tetracycline และ erythromycin ยังพบว่า เคอร์คูมินอยด์ ไม่ต้านฤทธิ์และไม่เสริมฤทธิ์กันกับยาแผนปัจจุบันทั้งสองชนิดดังกล่าว ดังนั้นจึงน่าจะใช้ เคอร์คูมินอยด์ นี้ร่วมกับ

tetracycline และ erythromycin ในการรักษาโรคได้อย่างปลอดภัย เนื่องจาก เคอร์คูมินอยด์ ในปริมาณดังกล่าวไม่เป็นพิษต่อผู้บริโภค

เอกสารอ้างอิง

คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. (2549). *บัญชียาจากสมุนไพร พ.ศ.2549*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

สำนักงานคณะกรรมการการสาธารณสุขมูลฐาน. 2542. *ยาสมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐาน (พิมพ์ครั้งที่ 2)*. กรุงเทพฯ: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

อุดมการณ์ อินทุใสและปาริชาติ ทะนานแก้ว. 2549. *สมุนไพรไทย: ตำรับยา บำบัดโรค บำรุงร่างกาย*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มติชน.

Adeniyi, B. A., and Anyiam, F. M. (2004). *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* of methanol extract Of Allium ascalonicum Linn. (Liliaceae) leaf: susceptibility and effect on urease activity. *Phytotherapy Research* 18, 358-361.

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, 541-544.

Bhavani Shankar, B., and Sreenivasa Murthy, S. (1979). Effect of turmeric (Curcuma longa) fractions on the growth of some intestinal pathogenic bacteria *in vitro*. *Indian Journal Experimental Biology* 17, 1363-1366.

Bijlsma, J. E., Waidner, B., van Vliet, A. H. M., *et al.* (2002) The *Helicobacter pylori* homologue of the ferric uptake regulator is involved in acid resistance. *Infection and Immunity*, 70, 606-611.

Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., and Banerjee, R. K. (2004). Tumeric and curcumin: biological actions and medicinal applications. *Current Science* 87(1): 44-53.

Cheng, A. L., Hsu, C. H., and Lin, J. K., *et al.* (2001). Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Research*, 21, 2895-2900.

Dunn, B. E., Cohen, H. and Blaser, M. J. (1997). *Helicobacter pylori. Clinical Microbiology Reviews* 10, 720-741.

Foryst-Ludwig, A., Neumann, M., Schneider-Brachert, W., and Neumann, M. (2004). Curcumin blocks NF-kB and the motogenic response in *Helicobacter pylori*-infected epithelial calls. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316(4): 1065-1072.

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. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 43 : 837-839.

Juszkiewicz, A., Zaborska, A., Laptas, A., and Olech, Z. (2004). A study of the inhibition of jack bean urease by garlic extract. *Food Chemistry,* 85,553-558

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, 133-136.

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 Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 459-461.

Lang L., and Garcia, F. (2004). Comparison of E-test and disk diffusion assay to evaluate resistance of *Helicobacter pylori* isolates to amoxicillin, clarithromycin, metronidazole and tetracycline in Costa Rica. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24, 572-577.

Loivukene, K., Maaroos, H. I., Kolk, H., Kull, I., Labotkin, K., and Mikelsaar, M. (2002). Prevalence of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolates in Estonia during 1995-2000 in comparison to the consumption of antibiotics used in treatment regimens. *Clinical Microbiology and Infection*, 8, 598-603.

Mahady, G. B., Pendland, S. L., Yun, G., and Lu, Z. Z. (2002). Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. . *Anticancer Research,* 22, 4179-4181.

Mishra, A. A., Srivastava, S., Garg, A., and Ayyagari, A. (2006). Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* clinical isolates: comparative evaluation of disk-diffusion and E-test methods. *Current Microbiology*, 53, 329-334.

Mobley, H. L. T., Cortesia, M. J., Rosenthal, L. E., and Jones, B. D. (1988). Characterization of urease from *Campylobacter pylori. Journal of Clinical Microbiology,* 26(5), 831-836.

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

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ค.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

Sivam, G. P., Lampe, J. W., Ulness, B., Swanzy, S. R., and Potter, .J.D. (1997). *Helicobacter pylori* in vitro susceptibility to garlic (Allium savitum) extract. *Nutrition and Cancer* 27, 118-121.

Sivam, G. P. (2001). Protection against *Helicobacter pylori* and other bacterial infections by garlic. *The Journal of Nutrition*, 131, 1106S-1108S.

Tabak, M., Armon, R., and Neeman, I. (1999) Cinnamon extracts' inhibitory effect on *Helicobacter pylori. Journal of Ethnopharmacology* , 67, 269-277.

Tsuda, M., Karita, M., Morshed, M. G., Okita, K., and Nakazawa, T. (1994). A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infection and Immunity*, 62, 3586-3589.

ยร.3ย1
ท๒๗3ป
ย.๒

254668

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ 3 คุณสมบัติทั่วไปของเชื้อทดสอบ

เชื้อ	การทดสอบ	ผลการทดสอบ
H. pylori No.2	ลักษณะโคโลนีบน Helicobacter selective agar	โคโลนีสีทอง ขนาดเล็ก ประมาณ 0.5 มิลลิเมตร
	Gram's stain	แกรมลบ รูปท่อนสั้น ขนาดเล็ก บางเซลล์โค้งงอ
	Susceptibility to Cephalothin Nalidixic acid	 Susceptible (Zone = 71 mm) Resistant (Zone = 6 mm)
	การทดสอบทางชีวเคมี Oxidase test Urease test	 บวก บวก
H. pylori No.3	ลักษณะโคโลนีบน Helicobacter selective agar	โคโลนีสีทอง ขนาดเล็ก ประมาณ 0.5 มิลลิเมตร
	Susceptibility to Cephalothin Nalidixic acid	 Susceptible (Zone = 70 mm) Resistant (Zone = 6 mm)
	Gram's stain	แกรมลบ รูปท่อนสั้น ขนาดเล็ก บางเซลล์โค้งงอ
	การทดสอบทางชีวเคมี Oxidase test Urease test	 บวก บวก

ตารางที่ 3 (ต่อ)

เชื้อ	การทดสอบ	ผลการทดสอบ
H. pylori No.22	ลักษณะโคโลนีบน Helicobacter selective agar	โคโลนีสีทอง ขนาดเล็ก ประมาณ 0.5 มิลลิเมตร
	Gram's stain	แกรมลบ รูปท่อนสั้น ขนาดเล็ก บางเซลล์โค้งงอ
	Susceptibility to	
	Cephalothin	Susceptible (Zone = 70 mm)
	Nalidixic acid	Resistant (Zone = 6 mm)
	การทดสอบทางชีวเคมี	
	Oxidase test	บวก
	Urease test	บวก
H. pylori No.34	ลักษณะโคโลนีบน Helicobacter selective agar	โคโลนีสีทอง ขนาดเล็ก ประมาณ 0.5 มิลลิเมตร
	Susceptibility to	
	Cephalothin	Susceptible (Zone = 70 mm)
	Nalidixic acid	Resistant (Zone = 6 mm)
	Gram's stain	แกรมลบ รูปท่อนสั้น ขนาดเล็ก บางเซลล์โค้งงอ
	การทดสอบทางชีวเคมี	
	Oxidase test	บวก
	Urease test	บวก

ตารางที่ 3 (ต่อ)

เชื้อ	การทดสอบ	ผลการทดสอบ
H. pylori No.10B	ลักษณะโคโลนีบน Helicobacter selective agar	โคโลนีสีทอง ขนาดเล็ก ประมาณ 0.5 มิลลิเมตร
	Gram's stain	แกรมลบ รูปท่อนสั้น ขนาดเล็ก บางเซลล์โค้งงอ
	Susceptibility to Cephalothin Nalidixic acid	 Susceptible (Zone = 69 mm) Resistant (Zone = 6 mm)
	การทดสอบทางชีวเคมี Oxidase test Urease test	 บวก บวก
S. aureus ATCC 29213	ลักษณะโคโลนีบน blood agar	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง กลม นูน ขอบเรียบ
	Hemolysis type	β-hemolysis
	การทดสอบทางชีวเคมี Catalase test Coagulase test Mannitol Glucose	 บวก บวก บวก บวก

ตารางที่ 4. ตัวทำละลายเคอร์คูมินอยด์ ที่เหมาะสม

ตัวทำละลาย	ลักษณะตัวทำละลาย	ลักษณะสารละลาย	การละลายที่เวลา (ชั่วโมง)*					
			0.5	1	2	3	6	24
40% ethanol	ใส	สีเหลืองเข้ม	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์
50% ethanol	ใส	สีเหลืองเข้ม	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์
60% ethanol	ใส	สีเหลืองเข้ม	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์
2% DMSO	ใส	ใสและตกตะกอน	ไม่สมบูรณ์	ไม่สมบูรณ์	ไม่สมบูรณ์	ไม่สมบูรณ์	ไม่สมบูรณ์	ไม่สมบูรณ์
20% DMSO	ใส	ใสและตกตะกอน	ไม่สมบูรณ์	ไม่สมบูรณ์	ไม่สมบูรณ์	ไม่สมบูรณ์	ไม่สมบูรณ์	ไม่สมบูรณ์
2% Tween80	สีเหลืองใสและหนืด	สีเหลืองเข้ม	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์
20% Tween80	สีเหลืองใสและหนืด	สีเหลืองเข้ม	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์	สมบูรณ์

*หมายถึง บันทึกลักษณะเป็นการละลายอย่างสมบูรณ์หรือแยกชั้น

ตารางที่ 5. ค่า MIC ของเคอร์คูมินอยด์ ในการทดสอบโดยวิธี agar dilution

เชื้อทดสอบ	ค่า MIC (μg/ml)*
H. pylori No.2	25
H. pylori No.3	25
H. pylori No.22	25
H. pylori No.34	25
H. pylori No.10B	25

* หมายถึง ผลการทดสอบ 2 ใน 3 ซ้ำการทดลอง

ตารางที่ 6. ค่า MIC ของยา gentamicin ในการทดสอบโดยวิธี agar dilution

เชื้อทดสอบ	ค่า MIC (μg/ml)*
S. aureus ATCC 29213	0.5-1.0

* หมายถึง ผลการทดสอบ 2 ใน 3 ซ้ำการทดลองของช่วงค่า MIC ตลอดการทดลอง

ตารางที่ 7. ค่า pH ของการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ urease ของ *H. pylori* หมายเลข 3

เวลา (นาที)	pH*		
	Test	Control	Diluents control
0	7.041	7.043	7.091
10	7.229	7.788	7.063
20	7.434	8.491	7.057
30	7.686	8.722	7.05
40	7.983	8.833	7.048
50	8.23	8.896	7.045
60	8.401	8.937	7.044

Test หมายถึง *H. pylori* + เคอร์คูมินอยด์ 1xMIC

Control หมายถึง *H. pylori*

Diluents control หมายถึง *H. pylori* + 50%ethanol

ตารางที่ 8. ค่า pH ของการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ urease ของ *H. pylori* หมายเลข 34

เวลา (นาที)	pH*		
	Test	Control	Diluents control
0	7.043	7.062	7.062
10	7.401	7.764	7.041
20	7.773	8.553	7.033
30	8.105	8.793	7.028
40	8.342	8.895	7.026
50	8.498	8.949	7.025
60	8.513	8.984	7.025

Test หมายถึง *H. pylori* + เคอร์คูมินอยด์ 1xMIC

Control หมายถึง *H. pylori*

Diluents control หมายถึง *H. pylori* + 50%ethanol

ตารางที่ 9. ค่า pH ของการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ urease ของ *H. pylori* หมายเลข 10B

เวลา (นาที)	pH*		
	Test	Control	Diluents control
0	7.048	7.049	7.024
10	7.098	7.411	7.017
20	7.208	7.958	7.014
30	7.32	8.428	7.02
40	7.432	8.722	7.03
50	7.546	8.846	7.039
60	7.67	8.924	7.047

Test หมายถึง *H. pylori* + เคอร์คูมินอยด์ 1xMIC

Control หมายถึง *H. pylori*

Diluents control หมายถึง *H. pylori* + 50%ethanol

ตารางที่ 10. ค่า MIC ของเคอร์คูมินอยด์ และ erythromycin ในการทดสอบ combined effect

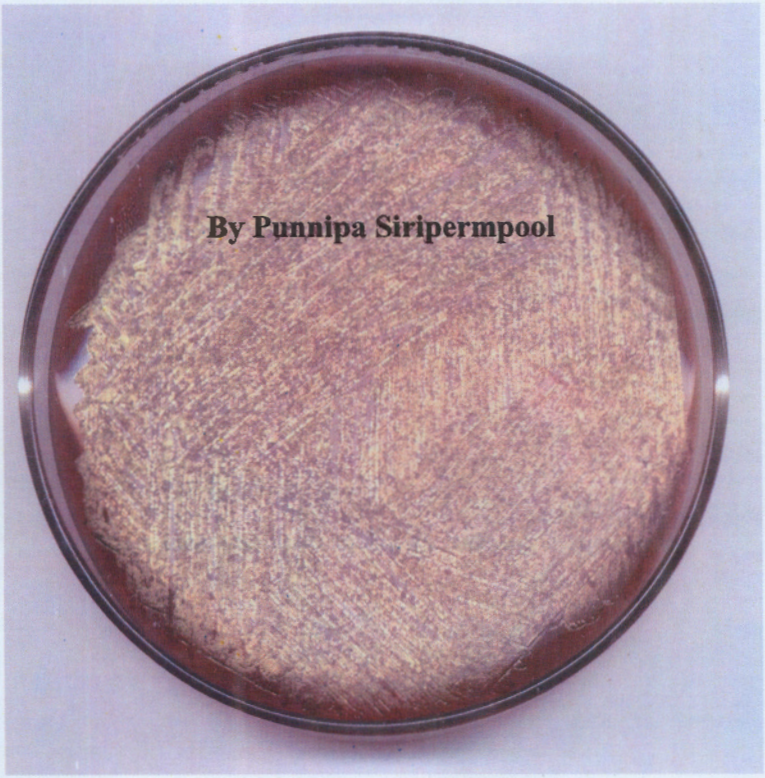
	MIC			
H. pylori Strain	Curcuminoids alone	Curcuminoids in combine with erythromycin	Erythromycin alone	Erythromycin in combine with Curcuminoids
2	50	100	0.125	0.25
3	50	100	0.125	0.25
22	50	100	0.06	0.125

ตารางที่ 11. ค่า MIC ของเคอร์คูมินอยด์ และ tetracycline ในการทดสอบ combined effect

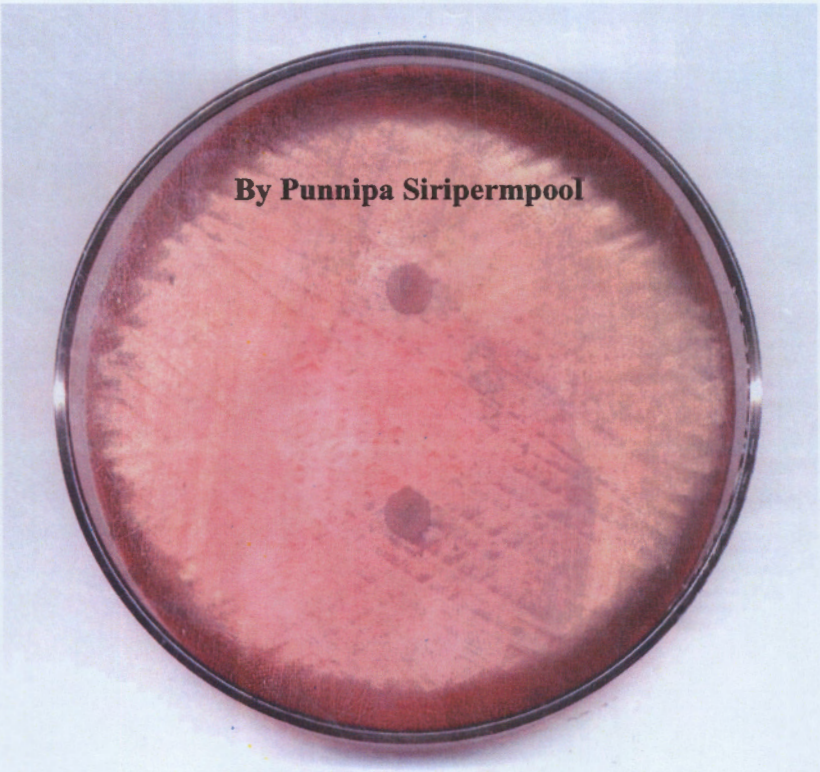
	MIC			
Strains	Curcuminoids alone	Curcuminoids in combine with Tetracycline	Tetracycline alone	Tetracycline in combine with Curcuminoids
2	50	100	0.125	0.125
3	50	25	0.125	0.125
22	50	50	0.06	0.125

ภาคผนวก ข

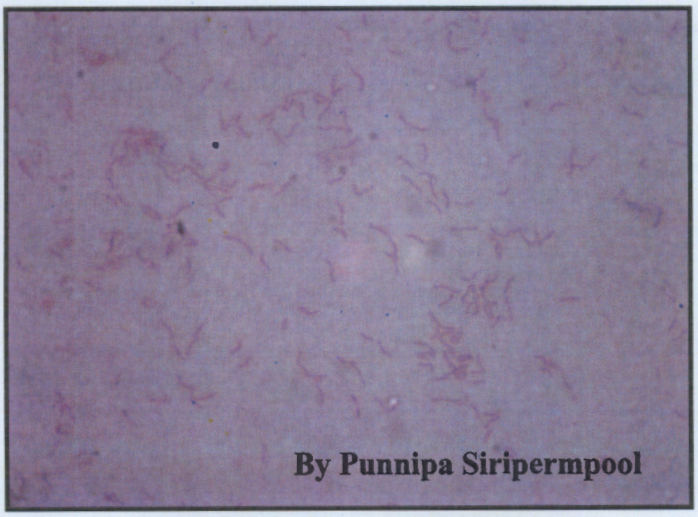
ภาพประกอบผลการทดสอบ



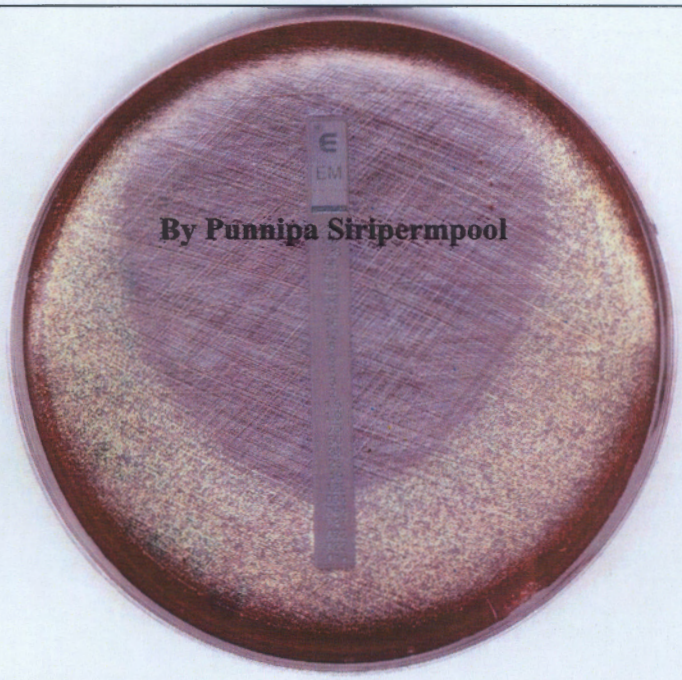
ภาพที่ 4. ลักษณะโคโลนีสีเหลืองทองของเชื้อ *Helicobacter pylori* ที่ใช้ในการศึกษา



ภาพที่ 5. ผลการทดสอบ Nalidixic acid และ cephalothin susceptibility test ของเชื้อที่ใช้ในการศึกษา



ภาพที่ 6. ลักษณะการติดสีแกรมของ *H. pylori* ที่ใช้ในการศึกษา

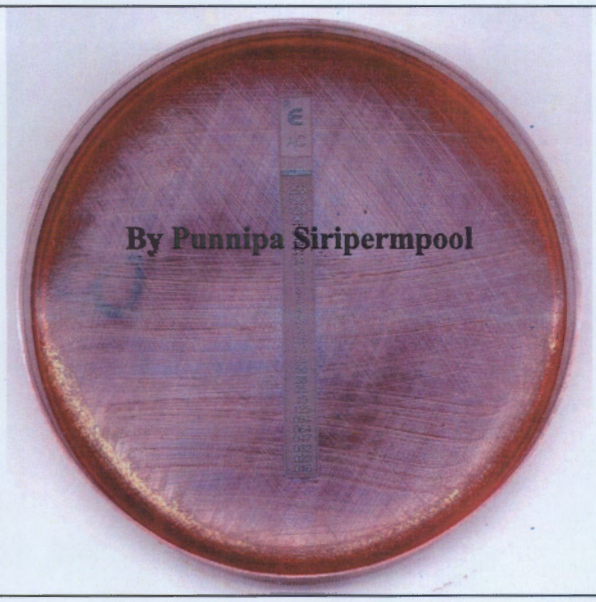


MIC ของ erythromycin เท่ากับ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพที่ 7. ลักษณะผลการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration ของ erythromycin ด้วยวิธี E test

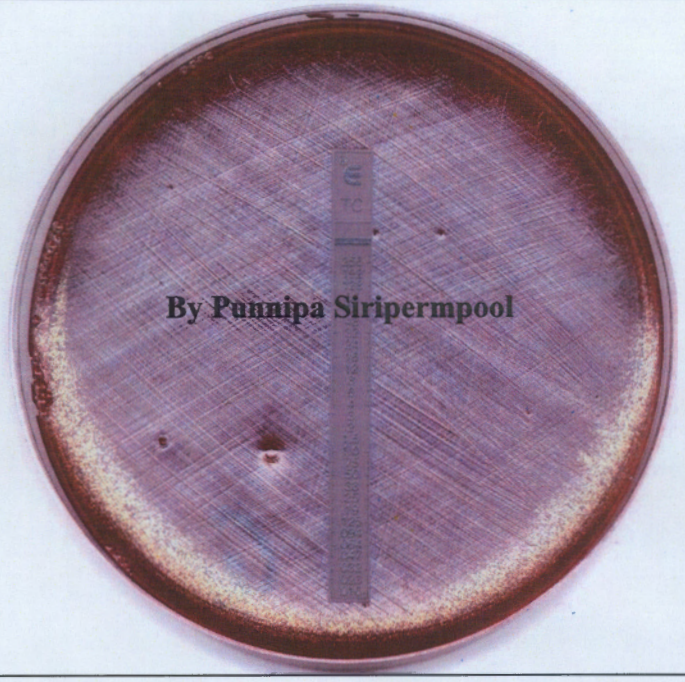
MIC ของ metronidazole
เท่ากับ 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพที่ 8. ลักษณะผลการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration ของ metronidazole ด้วยวิธี E test



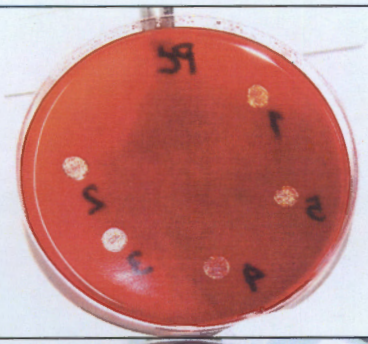
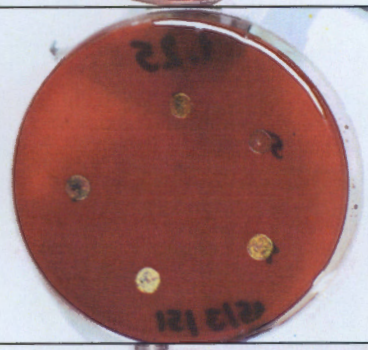
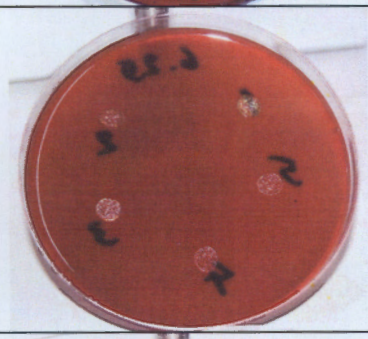
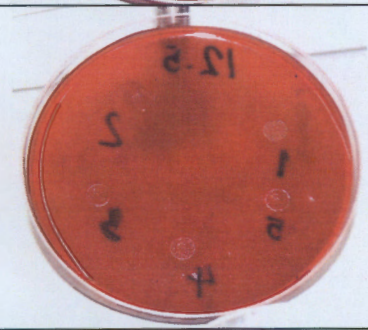
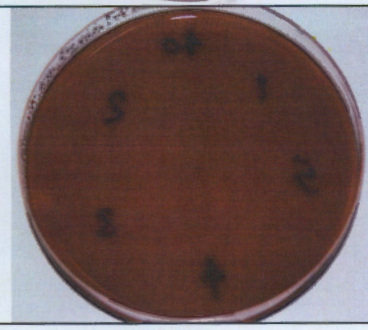
MIC ของยา amoxicillin น้อยกว่า
0.016 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพที่ 9. ลักษณะผลการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration ของ amoxicillin ด้วยวิธี E test



MIC ของ tetracycline น้อยกว่า 0.016 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพที่ 10. ลักษณะผลการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration ของ tetracycline ด้วยวิธี E test

	เชื้อทุก isolates เจริญบนอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของ curcuminoids (Positive control)
	เชื้อทุก isolates เจริญบนอาหารที่ผสม diluents ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.25%
	เชื้อทุก isolatesเจริญบนอาหารผสม curcuminoids ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
	เชื้อทุก isolates เจริญบนอาหารผสม curcuminoids ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
	เชื้อทุก isolates ไม่เจริญบนอาหารผสม curcuminoids ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพที่ 11. ลักษณะการเจริญของ *H. pylori* ในการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration ของ curcuminoids ด้วยวิธี agar dilution method

ภาคผนวก ค
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

Helicobacter selective agar

ประกอบด้วย

Brain heart infusion agar	5.2	กรัม
Human blood	5-10	มิลลิลิตร
Campylobacter selective supplement (Code SR69)	0.4	มิลลิลิตร
TTC	0.5	มิลลิลิตร

นำอาหารเลี้ยงเชื้อละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที อุ่นใน water bath อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นจึงเติม Human blood TTC และCampylobacter selective supplement โดยวิธี aseptic technique

2. สารเคมี

2.1 Standard McFarland เบอร์ 0.5

ประกอบด้วย

Barium chloride ($BaCl_2.2H_2O$)	1.175% (w/v)	0.05	มิลลิลิตร
Sulfuric acid (H_2SO_4)	1% (v/v)	9.95	มิลลิลิตร

นำสารละลาย 1.175% $BaCl_2$ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับ 1% H_2SO_4 ปริมาตร 9.95 มิลลิลิตร โดยผสมสารทั้งสองใส่ลงในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิดสนิท แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง

2.2 Standard McFarland เบอร์ 3.0

ประกอบด้วย

Barium chloride ($BaCl_2.2H_2O$)	1.175% (w/v)	0.3	มิลลิลิตร
Sulfuric acid (H_2SO_4)	1% (v/v)	9.7	มิลลิลิตร

นำสารละลาย 1.175% $BaCl_2$ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับ 1% H_2SO_4 ปริมาตร 9.7 มิลลิลิตร โดยผสมสารทั้งสองใส่ลงในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิดสนิท แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ง
รายละเอียดของเคอร์คูมินอยด์ที่ใช้ศึกษา

Curcuminoid extract

ลักษณะ	:	ผงสีเหลืองถึงน้ำตาลส้ม
ปริมาณน้ำ	:	0.66%w/w
อัตราส่วน curcuminoids (curcumin : demethoxycurcumin : bisdemethoxycurcumin)	:	1 : 0.5 : 0.2
Total curcuminoids (คำนวณจาก curcumin)	:	86.80%w/w