วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 26 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2564
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 26 (No.3) September – December 2021 บทความวิจัย

Glochidiol จากไคร้มด (*Glochidion eriocarpum*) เสริมฤทธิ์กับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส

Antibacterial Activity of Glochidiol from *Glochidion eriocarpum* Enhanced Tetracycline against Opportunistic Bacteria

วิสาตรี คงเจริญสุนทร * และ วรุฒม์ สมนึก

Wisatre Kongcharoensuntorn * and Warut Somnuk

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University

Received : 2 October 2020

Revised : 17 January 2021

Accepted : 2 February 2021

บทคัดย่อ

สาร Glochidiol จากไคร้มด *(Glochidion eriocarpum)* มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆมากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านอาการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เป็นต้น งานวิจัยนี้สนใจศึกษาประสิทธิภาพของสาร Glochidiol ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสและแบคทีเรียแกรมลบดื้อยา โดยการหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และค่า Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) ด้วยวิธี Broth dilution test พบว่าเมื่อใช้สาร Glochidiol เพียงอย่างเดียว สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* และ Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ได้ดีที่สุดให้ค่า MIC เท่ากัน คือ เท่ากับ 128 µM จากเชื้อ 11 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ดื้อยา, *Proteus mirabilis, P. vulgaris* และ *Pseudomonas aeruginosa* ดื้อยา นอกจากนี้ Glochidiol สามารถเสริมฤทธิ์กับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aerugiosa* ATCC27853 โดยมีค่า FICI เท่ากับ 0.5156 และ 0.5313 ตามลำดับ แต่ไม่เสริมฤทธิ์กับยาแอมพิซิลลินเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 จากนั้นได้ศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aerugiosa* ATCC 27853 ด้วย Time-kill assay พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aerugiosa* ATCC 27853 ได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 4 และ 6 ตามลำดับ หลังจากได้รับยาเตตราซัยคลิน ปริมาณเท่ากับ 1/2 เท่าของ MIC ของยาเตตราซัยคลิน ร่วมกับสาร Glochidiol เท่ากับ 1/32-1/64 เท่าของ MIC ของ Glochidiol ตามลำดับ

คำสำคัญ : Glochidiol ; ไคร้มด ; การเสริมฤทธิ์ ; เตตราซัยคลิน ; แบคทีเรียฉวยโอกาส

Abstract

The various biological activities of pure compound, Glochidiol from Khrai mot (*Glochidion eriocarpum*) are anti-inflammatory, anti-cancer and anti-microbial activity. In this study, synergistic effect of Glochidiol against opportunistic bacteria and drug-resistant gram negative bacteria was investigated. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) value and Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) were determined for synergistic effect by Broth diffusion test. Among eleven tested bacteria, Glochidiol alone showed the best antibacterial activity to inhibit the growth of *B. subtilis* and Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and had MICs equal as 128 µM. However, Glochidiol showed no antibacterial activity against drug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis, P. vulgaris* and drug-resistant *P. aeruginosa.* Moreover, combination of Glochidiol with tetracycline showed partially synergistic effect against *E. coli* ATCC 25922 and *P. aerugiosa* ATCC 27853 with FICI of 0.5156 and 0.5313, respectively. On the other hand, Glochidiol mixed with ampicillin had no effect against *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853. Then, Time-kill assay were tested and indicated that the specific times, mostly decreased the growth of *E. coli* ATCC 25922 and *P. aerugiosa* ATCC 27853 were at 4 and 6 hours after treatment with ½ MICs of tetracycline and 1/32-1/64 MICs of Glochidiol, respectively.

Keywords : glochidiol ; *Glochidion eriocarpum* ; synergistic effects ; tetracycline ; opportunistic bacteria

***Corresponding author : E-mail :** wisatre@go.buu.ac.th

บทนำ

ในปัจจุบันสถานการณ์การติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสถูกจัดเป็นหนึ่งในปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลกรวมทั้งประเทศไทย เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสในโรงพยาบาลที่พบมากที่สุด คือ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter baumannii* เป็นต้น ซึ่งมักจะพบการระบาด และพบอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ในหอผู้ป่วยวิกฤตเพิ่มสูงขึ้นเป็นประวัติการณ์ 20 ปีที่ผ่านมา เช่น *E. coli* ก่อให้เกิดโรคทางเดินปัสสาวะร่วมกับติดเชื้อในทุกระบบของร่างกาย *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ทำให้เกิดโรคปอดบวมและภาวะติดเชื้อของผู้ป่วยวิกฤต เป็นต้น (Fair and Tor, 2014; Schroeder *et al.*, 2017) นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ยังพบอุบัติการณ์การดื้อยาที่สูงขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียปรับตัวด้วยกลไกดื้อยาที่หลากหลาย และมักจะดื้อยากลุ่มเพนนิซิลลิน (แอมพิซิลลิน) อะมิโนกลัยโคไซด์ และเตตราซัยคลิน (Tiwari et al., 2013) ทำให้ยาปฏิชีวนะที่ใช้อยู่ในปัจจุบันรักษาไม่ได้ผลจึงต้องเลือกใช้ยาปฏิชีวนะอนุพันธุ์ที่แรงขึ้น (Cheesman *et al.,* 2017;. Schroeder *et al.,* 2017) ผลของการดื้อยาของแบคทีเรียเหล่านี้ ทำให้ผู้ป่วยที่มารักษาตัวในโรงพยาบาล เช่น โรคมะเร็ง หรือจากการผ่าตัด ไตวาย และตับวาย ติดเชื้อซ้ำซ้อนเพิ่มเติมจากแบคทีเรียฉวยโอกาสดื้อยา และเข้าสู่ระยะวิกฤต จึงเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตเมื่อรักษาตัวอยู่ในโรงพยาบาลยาวนาน (Gupta & Birdi, 2017) จากปัญหาดังกล่าวข้างต้น ทำยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อจุลินทรีย์ดื้อยาที่ใช้อยู่เดิมรักษาไม่ได้ผล จึงจำเป็นต้องค้นคว้าหายาชนิดใหม่เพื่อใช้รักษาโรคติดเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ แต่การพัฒนายาต้องให้เวลานานมาก ดังนั้นนักวิจัยจึงหันมาศึกษาวิจัยด้านการหาสารบริสุทธิ์และสารสกัดสมุนไพรเพื่อลดค่าใช้จ่ายในการรักษา และลดอันตรายจากการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ เพราะสมุนไพรเป็นผลิตผลธรรมชาติ หาง่าย ราคาถูก มีประวัติการใช้บริโภคมาอย่างยาวนาน ร่างกายสามารถกำจัดออกได้ง่าย ก่อให้เกิดผลข้างเคียงน้อยกว่ายาปฏิชีวนะเมื่อใช้เป็นเวลานาน (Cheesman *et al.*, 2017; Gupta & Birdi, 2017) งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะทดสอบการนำสารบริสุทธิ์จากธรรมชาติมาผสมกับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน เพราะยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน เป็นยาต้นอนุพันธุ์ของยาที่ใช้แพร่หลายกันอยู่ในปัจจุบัน และมักก่อให้เกิดการดื้อยาจากแบคทีเรียเสมอ และยาเหล่านี้ยังคงจำเป็นเพื่อใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียบางกลุ่ม เช่น *Anthrax, Listeria, Clostridium, Actinomyces* (Cheesman *et al.,* 2017) นอกจากนี้เพื่อใช้ลดผลข้างเคียงของการใช้ยาของการแพ้ยา (anaphylaxis) และลดความเป็นพิษต่อตับและไต และเพื่อเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ในการแก้ปัญหาภาวะดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส ผลพลอยได้ของการวิจัยนี้คือการนำสารบริสุทธิ์จากพืชไปประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมของเวชสำอางเป็นสารบำรุงผิว เป็นต้น

Glochidiol คือสารบริสุทธิ์กลุ่ม Lupane เป็นสารที่สกัดได้จากไคร้มด (Khraimot) ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Glochidion eriocarpum* (วงศ์ Euphorbiaceae).ใบมีสรรพคุณแก้ไข้ และอาการอ่อนเพลีย เปลือกมีสรรพคุณแก้ปวด ลดไข้ เป็นต้น (Smitinand *et al*., 2007) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในไคร้มดได้แก่ ไตรเทอร์พีนอยด์ (triterpenoids) ซาโปนิน (saponin) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) สเตียรอยด์ (steroid) และ lupane ปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารกลุ่ม lupane ได้แก่ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus pyocyaneus*, *E. coli, K. pneumoniae, S. aureus*, *Salmonella Paratyphi* และ *S. Typhi* (Nhiem *et al*., 2012; Zhang *et al*., 2012) แต่ไม่พบรายงานของเชื้อฉวยโอกาสกลุ่มอื่นๆ เช่น *A. baumannii*, *P. aeruginosa* ฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ของสารกลุ่ม Lupane เช่น Glochidone มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งปอดและเม็ดเลือด Lupeol

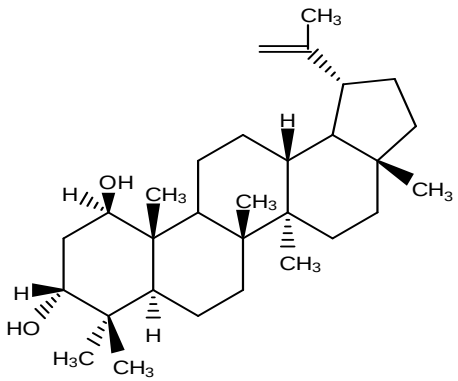
สามารถต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ (Siddiqueand Saleem, 2011) นอกจากนี้ยังมีงานศึกษาวิจัยของการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรร่วมกับยาปฏิชีวนะ เช่น eugenol ร่วมกับยาแอมพิซิลลิน สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* (FICI เท่ากับ 0.26 และ 0.38) (Hemaiswarya and Doble, 2009) สาร pentacyclic และ triterpenoid เสริมฤทธิ์กับยา methicillin และ vancomycin ในยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* เพราะ triterpenoid มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และสาร macromolecule จึงทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย (Chung *et al*., 2011) และการเสริมฤทธิ์ของสารกลุ่มอื่น เช่น น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยร่วมกับยา piperacillin สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* โดยไปรบกวนการการซึมผ่านอิเล็คโตรไลท์ของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย รวมถึงไปหยุดการส่งสัญญาณ qurum sensing ภายในเซลล์แบคทีเรีย (Yap *et al*., 2015; Zhang *et al*., 2017) อย่างไรก็ตามยังไม่พบงานวิจัยที่ศึกษาผลการเสริมฤทธิ์ของสารกลุ่ม lupane ร่วมกับยาปฏิชีวนะ

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้ได้สำรวจฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและศึกษาประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของสาร Glochidiol ร่วมกับแอมพิซิลลินและเตตตราซัยคลิน งานวิจัยนี้อาจจะสามารถนำ Glochidiol มาพัฒนาเพื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ เพื่อลดผลข้างเคียงของยาปฏิชีวนะ หรือปรับสูตรยาปฏิชีวนะที่ใช้ไม่ได้ผลให้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ หรืออาจจะนำ Glochidiol ที่แยกได้จากธรรมชาตินี้มาใช้เป็นส่วนผสมของเวชสำอาง เป็นต้น

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารบริสุทธิ์

Glochidiol แยกได้จากต้นไคร้มด *G. eriocarpum* ที่เก็บมาจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี (รหัสพรรณไม้ BKF147874) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.วารี เนื่องจำนงค์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยนำเฉพาะส่วนรากจากไคร้มดที่บดละเอียดมาสกัดด้วยเฮกเซนไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ตามลำดับที่อุณหภูมิห้อง และทำให้ส่วนสกัดแห้งด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีและวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีด้วย NMR spectroscopy และพิสูจน์เอกลักษณ์ (Puapairoj *et al*., 2005) แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ Glochidiol (M.W. 442)

แบคทีเรียทดสอบ

เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis,* Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis, P. vulgaris*, *Serratia marcescens* และ *S. aureus* ได้รับความอนุเคราะห์และพิสูจน์ยืนยันสายพันธุ์ด้วยหลักการทางชีวเคมี จากภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี สำหรับ *A. baumannii* ซึ่งดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ได้แก่ amikacin, ciprofloxacin, sulperrazon, piperacillin, tazobactam, ceftriaxone, ceftazidime, imipenem, cefpirome, meropenem, cefepime และ piperacillin แต่ตอบสนองต่อยา gentamicin และ *P. aeruginosa* (ดื้อยา, รหัส 1-375/04-2013 ดื้อยากลุ่ม aminoglycosides, β-lactams, carbapenem, quinolone) ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี

การเพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA, Merck, Germany) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 h คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อที่ใช้ทดสอบจำนวน 4-5 โคโลนี นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB, Becton Dickinson, USA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3-5 h จากนั้นนำมาเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 เพื่อเตรียมเชื้อทดสอบให้มีปริมาณ 1 x 10^8 CFU/ml

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration, MIC)

ประยุกต์การทดสอบด้วยวิธี Broth dilution assay (CLSI, 2016) เริ่มต้น นำเชื้อทดสอบที่ปรับความขุ่นของเชื้อให้มีปริมาณ 1 x 10^8 CFU/ml ปริมาตร 100 µl ไปผสมกับสารทดสอบอย่างละ 100 µl ได้แก่ ยาปฏิชีวนะความเข้มข้น 8 µM - 2,048 µM หรือ Glochidiol ความเข้มข้น 8 µM - 2,048 µM ที่เจือจางด้วยอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 100 µl เพื่อให้มีความเข้มข้นลดลงที่ละสองเท่า จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วนำสารทดสอบในแต่ละ treatment ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 h และแต่ละ treatment ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นวัดความขุ่นของเชื้อจาก microplate ที่ O.D. 610 ด้วย microplate reader (VersaMax, U.S.A.) บันทึกผลเพื่อหาค่า MIC

การศึกษาเสริมฤทธิ์ร่วมกันของสารบริสุทธิ์

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการหาค่า MIC แต่ใส่สารทดสอบในแต่ละ treatment ด้วยการทดสอบแบบ checkerboard assay (Chung *et al.,* 2011) ได้แก่ผสม Glochidiol ความเข้มข้น 16 µM - 4,096 µM กับยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้น 16 µM - 4,096 µM อย่างละ 50 µl จากนั้นผสมสารทดสอบดังกล่าว ใส่ในเชื้อทดสอบ 100 µl (1 x 10^8 CFU/ml) และเติมอาหารเหลว MHB 100 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 h และแต่ละ treatment ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่าง เช่นเดียวกับ วิธี Broth dilution assay โดยวัดความขุ่นของเชื้อจาก microplate แล้วหาค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน แล้วนำค่า MIC ทั้งหมด มาคำนวณค่า FIC ของยาปฏิชีวนะ และค่า FIC ของสารบริสุทธิ์ แล้วจึงนำมาหาค่าดัชนีชี้วัด โดยคำนวณได้ดังนี้

1. FIC ของยาปฏิชีวนะ = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน/ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว
2. FIC ของสารบริสุทธิ์ = ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน/ค่า MIC ของสารบริสุทธิ์เพียงอย่างเดียว
3. ค่าดัชนีชี้วัด fractional inhibitory concentration index (FICI) = FIC ของยาปฏิชีวนะ + FIC ของสารบริสุทธิ์

การแปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI แปลผลดังนี้ FICI < 0.5 คือเสริมฤทธิ์กัน (synergistic), 0.5 < FICI < 1 คือ เสริมฤทธิ์กันบางส่วน (partial synergistic), FICI = 1 คือมีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (additive), 1 < FICI < 4 คือมีฤทธิ์ไม่แตกต่าง จากการใช้สารตัวเดียว (indifferent), FICI > 4 คือต้านฤทธิ์กัน (antagonistic)

การศึกษา Time-kill assay (Ramli *et al.*, 2017)

คือการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เมื่อทดสอบต่อหน่วยเวลาเป็นเวลา 48 h ทำการทดสอบโดย เตรียมเชื้อแบคทีเรียความขุ่นของเชื้อกับ McFarland No. 0.5 (1.5 X10^8 CFU/ml) ปริมาตร 100 µl, เติม Glochidiol และยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม (เช่นเดียวกับการทดสอบการเสริมฤทธิ์) ปริมาตรอย่างละ 50 µl แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมอาหาร MHB ปริมาตร 2.8 ml เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C (ทำการเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) คือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ผสม MHB และชุดเปรียบเทียบ คือ Glochidiol และยาปฏิชีวนะ) เมื่อบ่มตามเวลาที่กำหนด จึงเก็บตัวอย่างมานับเชื้อ เพื่อหาเชื้อแบคทีเรียที่รอดชีวิตที่เวลาต่างๆ ได้แก่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 และ 48 h เมื่อครบเวลาที่กำหนดก็จะเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย แล้วนำมาเจือจางด้วยวิธี 10-fold dilution ในน้ำเกลือ (0.85% NaCl) จากนั้น นำเชื้อปริมาตร 100 µl มาเกลี่ยลงบนอาหาร NA บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18.24 h (ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ) เพื่อนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่รอดชีวิต และบันทึกผลเพื่อนำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรีย (log CFU/ml) ต่อเวลา (h) และนำจำนวนแบคทีเรีย มาคำนวณหาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ (The effectiveness antibacterial activity; EAA = ร้อยละของแบคทีเรียที่ลดลงจากเวลาเริ่มต้น) คำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{EAA \%} = \frac{N_0 - N_E}{N_0} X\ 100 \qquad (1)$$

N_0 คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU/ml) ของกลุ่มควบคุม

N_E คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU/ml) ของกลุ่มทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

สำหรับการทดลองทั้งหมดจะทำสามซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของการทดลอง ในแต่ละครั้งด้วย Excel แล้วนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติเปรียบเทียบสารบริสุทธิ์กับยาปฏิชีวนะด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทิศทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบสารบริสุทธิ์ร่วมกับยาปฏิชีวนะ ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two-way ANOVA) ด้วยโปรแกรมสถิติ Minitab version 17

ผลการวิจัย

ผลการสำรวจฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสของสาร Glochidiol

ผลการสำรวจฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของ Glochidiol แสดงดังตารางที่ 1 โดยพบว่า Glochidiol มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสจำนวน 7 สายพันธุ์ จาก 11 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ กล่าวคือสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ MRSA ได้ดีที่สุดคือให้ค่า MIC เท่ากันคือเท่ากับ 128 µM รองลงมาคือ *K. pneumoniae* ให้ค่า MIC เท่ากับ 256 µM แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา, *P. mirabilis, P. vulgaris* และ *P. aeruginosa* ดื้อยา (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของยาเตตราซัยคลินของเชื้อ *E. coli* (>760 µg/ml) , *S. aureus* (56 µg/ml) และ *P. aeruginosa* ATCC27853 (56 µg/ml) และการยับยั้งการเจริญของเอมพิซิลลินของเชื้อ *E. coli* (>455 µg/ml), *S.aureus* (48 µg/ml) พบว่าเชื้อเหล่านี้ปรับตัวดื้อยา และ มีค่าสูงกว่าค่า MIC มาตรฐาน (เตตราซัยคลิน = 2-8 µg/ml และแอมพิซิลลิน = 2-8 µg/ml) (CLSI. ,2016). และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร Glochidiol กับยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด พบว่า Glochidiol มีประสิทธิภาพต่ำกว่ายาแอมพิซิลลิน และ เตตราซัยคลิน ยกเว้นมีประสิทธิภาพดีกว่าแอมพิซิลลินในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และยาเตตราซัยคลินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาส 7 สายพันธุ์ได้ดีกว่ายาแอมพิซิลลิน และสาร Glochidiol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสาร Glochidiol กับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส

ชนิดของแบคทีเรีย		ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย µM		
		Glochidiol	ยาแอมพิซิลลิน	ยาเตตราซัยคลิน
แกรมบวก	*B. cereus*	512	128	128
	B. subtilis	128	2048	256
	S. aureus	1024	128	128
	MRSA	128	128	128
แกรมลบ	*A. baumannii* ดื้อยา	>2048	>2048	>2048
	E. coli ATCC 25922	2048	>2048	1024
	K. pneumoniae	256	128	1024
	P. mirabilis	>2048	128	2048
	P. vulgaris	>2048	1024	512
	P. aeruginosa ATCC27853	2048	>2048	256
	P. aeruginosa ดื้อยา	>2048	>2048	>2048

ผลการเสริมฤทธิ์ของสาร Glochidiol กับยาปฏิชีวนะ

การทดสอบการเสริมฤทธิ์ได้เลือกทดสอบกับเชื้อที่มักพบอุบัติการณ์การดื้อยาในโรงพยาบาลสูง ได้แก่ *A. baumannii* ดื้อยาและ *P. aeruginosa* ดื้อยา และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC27853 ทั้งนี้เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดื้อยา

งานวิจัยนี้พบว่า Glochidiol ไม่เสริมกับยาแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2) แต่สามารถเสริมฤทธิ์กับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC27853 โดยพบว่าเมื่อใช้สาร Glochidiol ร่วมกับยาเตตราซัยคลินความเข้มข้น 512 µM (เท่ากับ ½ เท่าของค่า MIC ยาเตตราซัยคลินเดิม) ร่วมกับใช้สาร Glochidiol ด้วยค่าความเข้มข้น 32 µM (1/64 เท่าของค่า MIC Glochidiol เดิม) สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น โดยให้ผลเสริมฤทธิ์กันบางส่วน (Partially Synergistic effect) แสดงค่า FICI เท่ากับ 0.5156 (ตารางที่ 3) และเมื่อใช้ยาเตตราซัยคลิน ความเข้มขัน 128 µM (เท่ากับ ½ เท่าของค่า MIC ยาเตตราซัยคลินเดิม) ร่วมกับสาร Glochidiol ความเข้มข้น 64 µM (1/32 เท่าของค่า MIC Glochidiol เดิม) สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ATCC27853 ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน โดยให้ผลเสริมฤทธิ์กันบางส่วน แสดงค่า FICI เท่ากับ 0.5313 (ตารางที่ 3) และยาเตตราซัยคลินเพียงชนิดเดียว มีอิทธิพลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($p<0.05$) (ไม่ได้แสดงผลการทดสอบ)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบการเสริมฤทธิ์ของสาร Glochidiol กับยาปฏิชีวนะสองชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส

แบคทีเรีย	**ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมระหว่างสาร Glochidiol กับยาปฏิชีวนะ**			
	Glochidiol + ยาแอมพิซิลลิน		Glochidiol + ยาเตตราซัยคลิน	
	ค่า FICI	แปลผล	ค่า FICI	แปลผล
A. baumannii ดื้อยา	-	-	-	-
E. coli ATCC 25922	-	-	0.5156	เสริมฤทธิ์กันบางส่วน
P. aeruginosa ATCC27853	-	-	0.5313	เสริมฤทธิ์กันบางส่วน
P. aeruginosa ดื้อยา	-	-	-	-

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบค่าดัชนีต่างๆของการเสริมฤทธิ์ของสาร GE-15 กับยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส

แบคทีเรีย	**สาร GE-15**			**ยาเตตราซัยคลิน**			**FICI**	**แปลผล**
	MIC GE-15	MIC ออกฤทธิ์ร่วม	FIC GE-15	MIC ยาเตตราซัยคลิน	MIC ออกฤทธิ์ร่วม	FIC ยาเตตราซัยคลิน		
A. baumannii	>2048	-	-	>2048	-	-	-	-
E. coli ATCC 25922	2048	32	0.0156	1024	512	0.5	0.5156	เสริมฤทธิ์กันบางส่วน
P. aeruginosa ATCC27853	2048	64	0.03125	256	128	0.5	0.5312	เสริมฤทธิ์กันบางส่วน
P. aeruginosa ดื้อยา	>2048	-	-	>2048	-	-	-	-

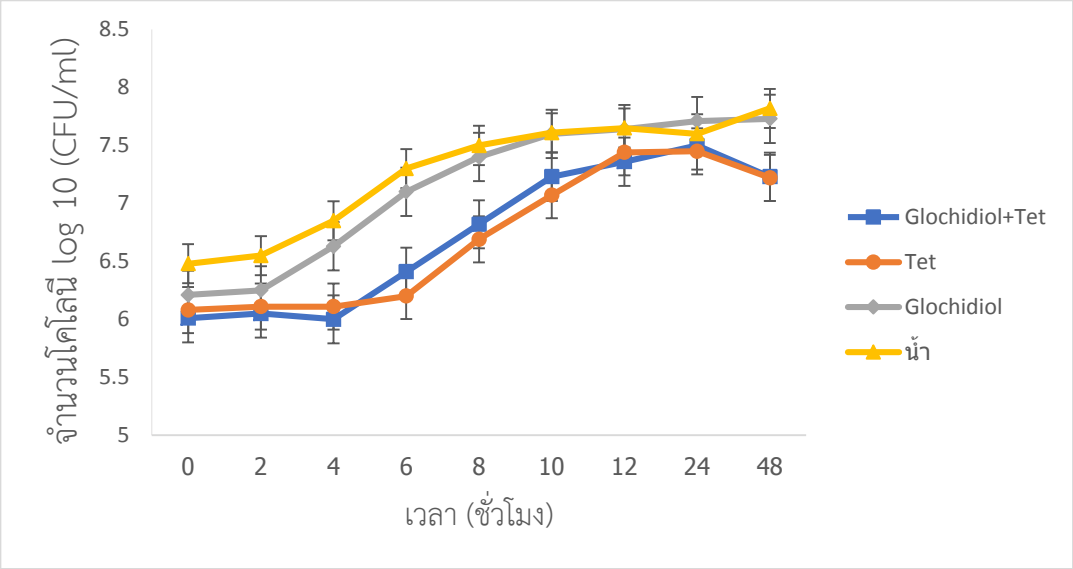
การศึกษาผลของเวลาในการออกฤทธิ์ของสาร Glochidiol เมื่อผสมกับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่อหน่วยเวลา (Time-kill assay)

เมื่อใช้สาร Glochidiol เท่ากับ 1/64 MIC (32 µM /2048 µM) ร่วมกับยาเตตราซัยคลิน เท่ากับ ½ MIC (512 µM/1024 µM) สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 4 กล่าวคือจะทำให้จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียจะลดลงจากเวลาเริ่มต้น ร้อยละ 86.50 ของการยับยั้ง และสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 อยู่ในช่วงเริ่มต้นของ log phase นอกจากนี้ยังสามารถลดระยะเวลาของการออกฤทธิ์ของยาเตตราซัยคลินให้เร็วยิ่งขึ้นจากเดิม 2 ชั่วโมง (เดิมออกฤทธิ์ในชั่วโมงที่ 6) (ภาพที่ 1 และภาพที่ 2)

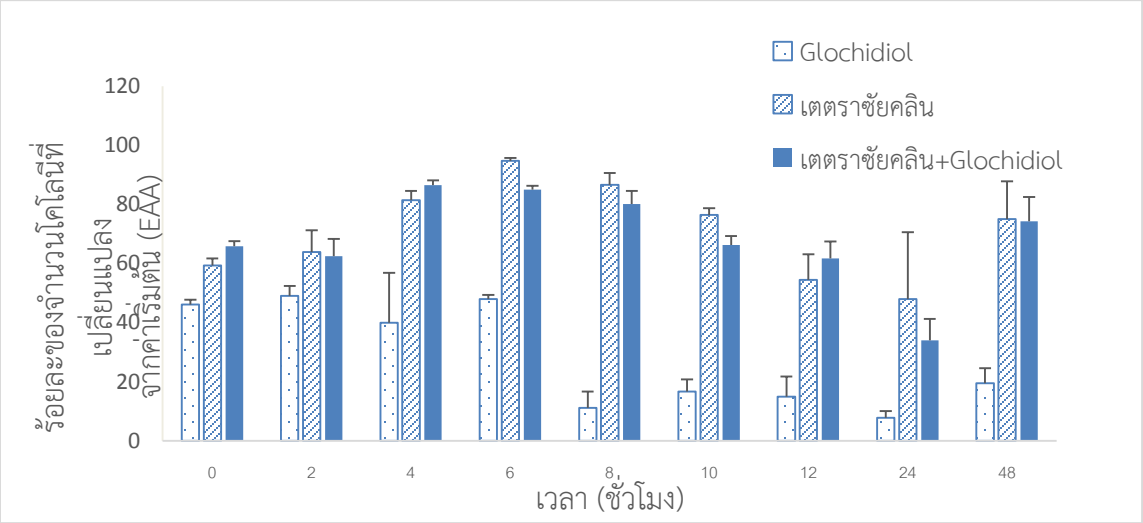
เมื่อใช้สาร Glochidiol เท่ากับ 1/32xMIC (64 µM/2048 µM) ร่วมกับยาเตตราซัยคลิน เท่ากับ ½ MIC (128 µM/256 µM/) สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 6 กล่าวคือ จะทำให้จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียจะลดลงจากเวลาเริ่มต้น ร้อยละ 69.97 และสามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ATCC27853 ในช่วงเริ่มต้นของ log phase และลดระยะเวลาของการออกฤทธิ์ของยาเตตราซัยคลินให้เร็วยิ่งขึ้นจากเดิม 4 ชั่วโมง (เดิมออกฤทธิ์ในชั่วโมงที่ 10) (ภาพที่ 3 และภาพที่ 4)

วิจารณ์ผลการวิจัย

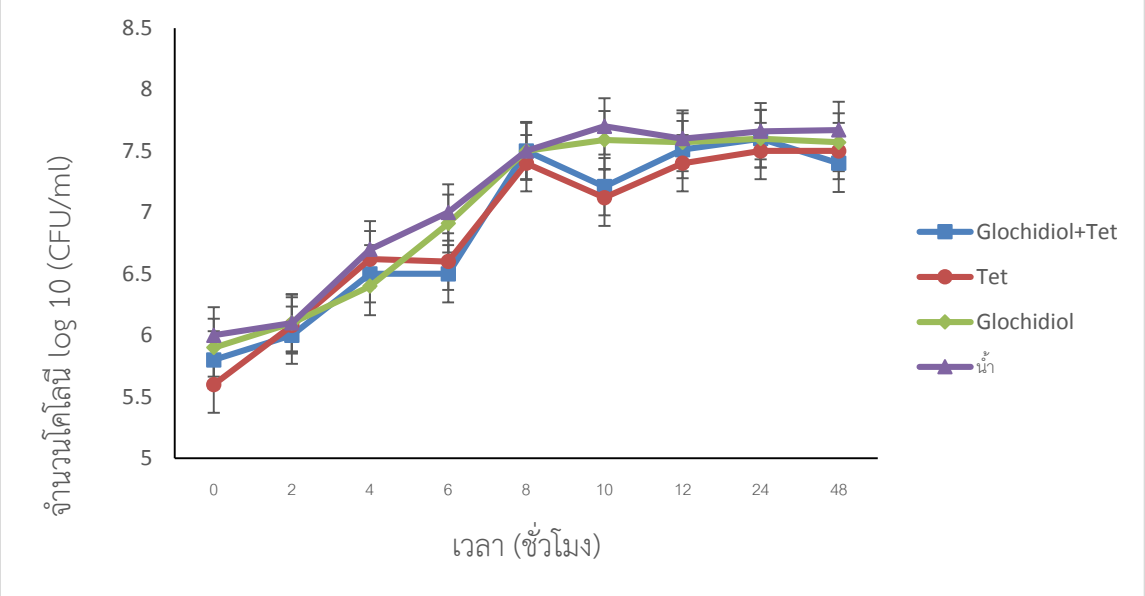
ผลการสำรวจฤทธิ์ของ Glochidiol เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาส แสดงให้เห็นว่า Glochidiol สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus, S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ATCC27853 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าสารกลุ่ม lupane สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มเดียวกันแต่ งานวิจัยนี้ พบว่า Glochidiol มีประสิทธิภาพที่ต่ำกว่า (56.58-905.21 µg/ml) (Siddique and Saleem , 2011; Penduka *et al.*, 2015) และสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่มเดียวกันกับ lupane ที่พบในพืชวงศ์ *Euphorbia hirta* (MIC ระหว่าง 64-128 µg/ml) Glochidiol สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เพราะ Glochidiol เป็นสารบริสุทธิ์คล้ายกับสารกลุ่ม triterpene จึงอาจจะไปมีผลต่อการการสังเคราะห์ DNA และ macromolecule หรือยับยั้งการสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (Chung *et al.*, 2011) หรือ ATCC27853 ต่อหน่วยเวลา (time-kill curve assay ณ จุดเวลาที่ดีที่สุดของการยับยั้ง คล้ายกับสารกลุ่ม triterpene อาจจะช่วยลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย เช่น *E. coli* และ *S. aureus* (Silva et al., 2019; Awolola *et al.*, 2014) ดังนั้นจะเห็นได้ว่า Glochidiol มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบฉวย จึงสามารถไปประยุกต์ใช้ เช่น เป็นส่วนผสมในน้ำยาทำความสะอาดเพื่อลดการติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสได้ อย่างไรก็ตามควรทดสอบความเป็นพิษก่อนนำไปใช้จริง



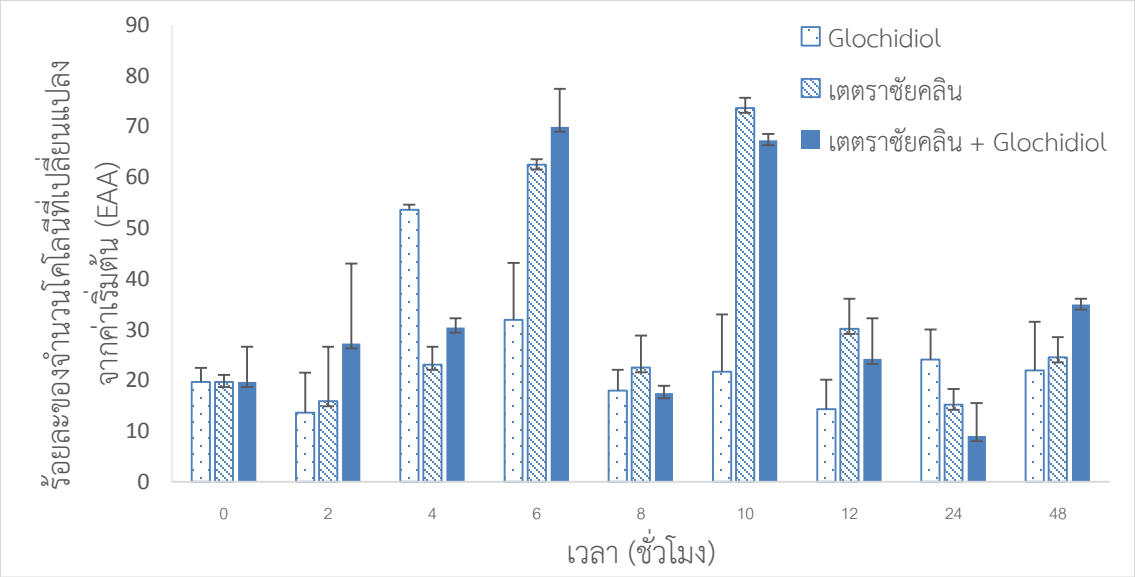
ภาพที่ 1 ผลของสาร Glochidiol (GE-15) ร่วมกับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อหน่วยเวลา (Time-kill assay)



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ (EAA) Glochidiol ร่วมกับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อหน่วยเวลา (time-kill curve assay) ณ จุดเวลาที่ดีที่สุดของการยับยั้ง



ภาพที่ 3 ผลของสาร Glochidiol ร่วมกับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ATCC27853 ต่อหน่วยเวลา (Time-kill assay)



ภาพที่ 4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ Glochidiol ร่วมกับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa*

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสาร Glochidiol สามารถเสริมฤทธิ์กับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ซึ่งสนับสนุนผลการวิจัยเช่นเดียวกับสารกลุ่มเดียวกันคือ oleanolic acid (สารกลุ่ม triterpenoid) สามารถเสริมฤทธิ์ยาเตตราซัยคลินบางส่วนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแกรมลบคือ *A. baumannii* (FICI เท่ากับ 0.531) (Shin and Park , 2015) นอกจากนี้ยังพบรายงานวิจัยที่มีการศึกษาที่สนับสนุนการเสริมฤทธิ์ในสารกลุ่ม triterpenoid จากต้นพญาสัตบรรณ เสริมฤทธิ์กับแอมพิซิลินและเตตราซัยคลิน เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแกรมบวก *Bacillus cereus* และ *S. aureus* (Wang *et al.*, 2016) หรือสาร ursolic acid (triterpenoid) สามารถเสริมฤทธิ์กับยาแวนโคมัยซินและเซฟราดีน เพื่อยับยั้งเชื้อแกรมบวก *S. aureus* (Hamza *et al.*, 2016) อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า Glochidiol ร่วมกับยาเตตราซัยคลินไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* ดื้อยา อาจจะเกิดจากเชื้อดื้อยาเหล่านี้มีความสามารถในการปรับตัวดื้อยาอยู่ก่อนแล้ว เช่น การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการจับของยาปฏิชีวนะ สร้างเอนไซม์มาทำลายยาปฏิชีวนะ หรือขับยาออกนอกเซลล์ได้ ทำให้การเสริมฤทธิ์ของ Glochidiol ไม่ได้ผล (Schroeder *et al.*, 2017) ซึ่งจะต้องศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสาร Glochidiol และกลไกการเสริมฤทธิ์ของสารและยาปฏิชีวนะร่วมกัน นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังพบข้อสังเกตคือยาเตตราซัยคลินสามารถช่วยลดปริมาณการใช้สาร Glochidiol ให้น้อยลงยิ่งขึ้น (1/64 - 1/32 ของ MIC ของ Glochidiol) อาจจะเป็นไปได้ที่ยาเตตราซัยคลินไปเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของสาร Glochidiol

การศึกษา Time-kill assay ของ สาร Glochidiol แสดงให้เห็นว่าสามารถส่งเสริมยาเตตราซัยคลิน สามารถลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะให้น้อยลง 1/2 เท่าของเตตราซัยคลิน อีกทั้งสามารถลดปริมาณการติดเชื้อแบคทีเรียลง (ประมาณ 1-1.5Log_{10}CFU/ml) และสามารถลดระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะให้เร็วขึ้น 2-4 ชั่งโมง แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่า

สารกลุ่มอัลคาลอยด์ (cycloberberine) เพราะสามารถยับยั้งการเจริญของ MRSA มากว่า 6 Log_{10}CFU/ml ภายในเวลา 12 h เมื่อใช้สาร 8XMIC (Yang *et al*., 2018) อย่างไรก็ตามยังคงต้องศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของ Glochidiol เพื่อต่อยอดไปสู่การศึกษากลไกการดื้อยาและการแก้ไขภาวะดื้อยาของเชื่อแบคทีเรีย ประโยชน์ที่ได้รับคืออาจจะนำสาร Glochidiol มาใช้เป็นส่วนผสมเวชสำอาง หรืออาหารเสริม หรือปรับใช้กับยาปฏิชีวนะเพื่อลดขนาดการใช้ยาปฏิชีวนะ ทั้งนี้เพื่อช่วยลดผลข้างเคียงของยาเตตราซัยคลิน ก็อาจจะช่วยลดปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรีย เช่น การติดเชื้อซ้ำซ้อนเพิ่มเติม (superinfection) ในกลุ่มผู้ป่วยที่ต้องใช้เวลานานในการรักษา อย่างไรก็ตามเนื่องจากการใช้สารสกัดจากพืชร่วมกับยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดพร้อมกันอาจจะส่งผลเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อ อวัยวะของสัตว์หรือมนุษย์ที่ได้ จึงควรนำสาร Glochidiol ผสมกับยาปฏิชีวนะไปทดสอบความเป็นพิษ หรือการอักเสบกับเซลล์ไลน์ปฐมภูมิเพื่อทดสอบความปลอดภัยก่อนนำไปใช้ประโยชน์

สรุปผลการวิจัย

สาร Glochidiol สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส 7 สายพันธุ์ จาก 11 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ และ Glochidiol มีประสิทธิภาพต่ำกว่ายาแอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลิน นอกจากนี้ Glochidiol สามารถเสริมฤทธิ์กับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aerugiosa* ATCC27853 และสามารถลดระยะเวลาของการออกฤทธิ์ของยาเตตราซัยคลินให้น้อยลง 2-4 ชั่งโมง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จเรียบร้อย เพราะได้รับการสนับสนุนจากภาควิชาจุลชีววิทยา และโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในงานวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Chaudhary, H.J., Zeb, A., Bano, A., Rasul, F., Munis M.F.H., Fahad, S., & Naseem W. (2011). Antimicrobial activities of *Sapium sebiferum* (L.) belonging to family Euphorbiaceae. *Journal of Medicinal plant Research*, *5*(24), 5916-5919.

Chung, P.Y., Navaratnam, P., & Chung, L.Y. (2011). Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococus aureus* stains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *10*(25), 1-6.

Cheesman, M.J., Ilanko, A., Blonk, B., & Cock, I.E. (2017). Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? *Pharmacognosy Reviews*, *11*(22), 57-72.

CLSI. (2016). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 26th edition. CLSI supplement M100S*. Pennsylvania: Clinical and laboratory standard institute.

Fair, R.J. & Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, *6*, 25-64.

Gupta, P.D., & Birdi, T.J. (2017). Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, *8*(4), 266-275.

Hamza, M., Nadir, M., Mehmood, N., & Farooq, A. (2016). In vitro effectiveness of triterpenoids and their synergistic effect with antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Indian Journal of Phamacology*, *48*(6), 1-5.

Hemaiswarya, S., & Doble, M. (2009). Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine*, *16*, 997-1005.

Nhiem, N.X., Thu, V.K., P.V., Minh, C.V., Tai, B.H., Quang, T.H., Cuong, N.X., Yen, P.H., Boo, H.J., Kang, J.I., Kang, H.K., & Kim, Y.H. (2012). Cytotoxic Oleane-type Triterpene Saponins from *Glochidion eriocarpum*. Archives of *Pharmacal Research*, *35* (1), 19-26.

Penduka, D., Gasa, N.P., Hlongwane, M.S., Amosa, R.A., Osunsanmi, F.O., & Opoku, A.R. (2015).The antibacterial activities of some plant-derived triterpenes. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, *12*(6), 180-188.

Patel, N.B., & Patel K.C. (2013). Antibacterial activity of *Euphorbia hirta* L. ethanomedicinal plant against gram negative UTI pathogens. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, *3*, 24-29.

Puapairoj, P., Naengchomnong, W., Kijjoa, A, Pinto, M, Nascimento, M.S., Silva, A.M., & Herz, W. (2005). Cytotoxic activity of lupane-type triterpenes from *Glochidion sphaerogynum* and *Glochidion eriocarpum* two of which induce apoptosis. *Planta Med*, 71, 208-213.

Ramli, S., Radu, S., Shaari, K., and Rukayadi, Y. (2017). Antibacterial activity of ethanolic extract of Syzygium polyanthum L. (Salam) leaves against foodborne pathogens and application as food sanitizer. *Biomed Research International*, DOI 10.1155/2017/9024246.

Schroeder, M., Brooks, B.D., & Brooks, A.E. (2017). The complex relationship between virulence and antibiotic resistance. *Gene*, *8*(39), 3-23.

Shin, B., & Park, W. (2015). Synergistic effect of oleanolic acid on aminoglycoside antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. *PLOS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0137751.

Siddique, H.R., & Saleem , M. (2011). Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. *Life Science*, *88*, 285-93.

Silva, G.N.S., Primon- Barros, M., Macedo, A.J. & Gnoatto, S.C.B. (2019). Triterpene derivatives as relevant scaffold for new antibiofilm drugs. *Biomolecules*, *9*(2), 58.

Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K, Rajagunatan, S., & Singh, V. (2013). Antibiotics resistance an emerging health problem: causes, worries, challenges and solution: a review. *International Journal of Current Research*, *5*, 1880-1892.

Wang, C.M., Chen, H.T., Wu, Z.Y., Jhan, Y.L., Shyu, C.L., & Chou, C.H. (2016). Antibacterial and synergistic activity of pentacyclic triterpenoids isolated from *Alstonia scholaris*. *Molecules*, *21,* 1-11.

Wagner H. & Ulrich- Merzenich, G. (2009). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, *16,* 97-110.

Yap, P.S., Krishnan, T., Chan, K.G., & Lim, S.H.E. (2015). Antibacterial mode of action of *Cinnamomum verum* bark essential oil, alone and in combination with Piperacillin, against a multidrug-resistant *Escherichia coli strain. Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*(8), 1299–1306.

Yang, Y.S., Wei, W., Hu, X.X., Tang, S., Pang, J., You, X.F., Fan, T.Y., Wang, Y.X., Song, D.Q. (2018). Evolution and antibacterial evaluation of 8-hydroxy-cycloberberine derivatives as a novel family of antibacterial agents against MRSA. *Molecules*, *24*(5), 984.

Zhang, J., Ye, K. P., Xin., Z., Pan., D.D., Sun, Y.Y., & Cao, J.Z. (2017). Antibacterial activity and mechanism of action of black pepper essential oil on meat-borne *Escherichia coli*. *Frontiers microbiology*. DOI:10.3389/fmicb.2016.02094.