

การเสริมฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของสาร Glochidone ร่วมกับยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส

Synergistic Antibacterial and Antibiofilm Effects of Glochidone in Combination with Antibiotics against Gram Negative Opportunistic Bacteria

รินดา ตรงดี¹, ธดากรณ์ โสอิน¹, วิสатรี คงเจริญสุนทร^{1*}

Rinda Trongdee¹, Thadakorn So-in¹, Wisatre Kongcharoensuntorn^{1*}

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ Glochidone จากไคร้ *Glochidion daltonii* (Müll. Arg.) Kurz กับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสด้วยวิธี Broth microdilution susceptibility test โดยงานวิจัยพบว่าสาร Glochidone เมื่อใช้เพียงชนิดเดียว สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 สายพันธุ์ไม่ดื้อยา แสดงค่า MIC เท่ากันคือเท่ากับ 2048 μM เมื่อนำ Glochidone ผสมกับยาเตตราซัยคลิน พบว่าสามารถเสริมฤทธิ์กันเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 แสดงค่า FICI เท่ากับ 0.375 และ 0.25 ตามลำดับ การศึกษา Time kill curve แสดงให้เห็นว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้ดีที่สุดในช่วงเวลาที่ 2-6 ชั่วโมง เมื่อใช้สาร Glochidone ความเข้มข้น 64 และ 32 μM ตามลำดับ และยาเตตราซัยคลินความเข้มข้น 128 และ 16 μM ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า สาร Glochidone สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *Acinetobacter baumannii* ได้ดีที่สุดในช่วงเวลา 4-12 ชั่วโมง โดยแสดงค่าประสิทธิภาพของการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอยู่ระหว่าง 63.73-71.54% และ Glochidone เมื่อผสมกับยาเตตราซัยคลิน พบว่าสามารถเสริมฤทธิ์กันยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสามสายพันธุ์ได้ดีกว่าสาร Glochidone เมื่อใช้เพียงชนิดเดียว ยกเว้นของเชื้อ *A. baumannii* (p-value<0.05)

คำสำคัญ: ไคร้, การเสริมฤทธิ์, การยับยั้งการเจริญ, การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

Citation:

Trongdee R, So-in T, Kongcharoensuntorn W. Synergistic antibacterial and antibiofilm effect of Glochidone in combination with antibiotics against gram negative opportunistic bacteria. Health Sci J Thai 2026; 8(1): 30-39. (in Thai); <https://doi.org/10.55164/hsjt.v8i1.271313>

¹ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ชลบุรี 20131

¹ Faculty of Science, Burapha University,
Chonburi, 20131, Thailand

* Corresponding author: Email: wisatre@go.buu.ac.th, Tel: 08 9253 7896
Received: 25 Sep 2025; Revised: 3 Feb 2026; Accepted: 26 Feb 2026

Abstract

This research aimed to study the synergistic effect of Glochidone from *G. daltonii* with ampicillin and tetracycline to inhibit the growth of gram-negative opportunistic bacteria. The tests were conducted by broth microdilution susceptibility tests. The results revealed that a single dose of Glochidone inhibited the growth of non-drug-resistant *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and the MIC was equal to 2048 μ M. The result was found that Glochidone in combination with tetracycline revealed the best synergistic antibacterial activity against *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 with the value of FICI at 0.375 and 0.25, respectively. In addition, from the study of the time kill curve, the synergy effect of Glochidone in combination with tetracycline against *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 showed the best inhibition of bacterial growth when using 64 and 32 μ M Glochidone, respectively and 128 and 16 μ M tetracycline and the best time of synergy effect was indicated at 2-6 hours after starting inoculum. Likewise, the results found that Glochidone indicated the best antibiofilm activity against *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *Acinetobacter baumannii* at 4-12 hours, and the inhibitory efficacy values were 63.73-71.54%. Glochidone in combination with tetracycline indicated significantly better antibiofilm activity than a single dose of Glochidone against three strains of tested bacteria except *A. baumannii* (p-value <0.05).

Keywords: Glochidone, Synergistic effect, Antibacterial activity, Antibiofilm activity

บทนำ

ในปัจจุบันสถานการณ์การติดเชื้อของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสถูกจัดเป็นหนึ่งในปัญหาสาธารณสุขที่ร้ายแรงที่สุดของโลก ซึ่งมักพบเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล ได้แก่ *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดย *A. baumannii* เป็นเชื้อที่ก่อโรคทางเดินปัสสาวะอักเสบ (Urethritis) เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Meningitis) โลหิตเป็นพิษ (Septicemia) เป็นต้น *E. coli* ก่อให้เกิดโรคทางเดินปัสสาวะ โรค Colitis และ Urethritis *P. aeruginosa* ทำให้เกิดโรคปอดบวมแทรกซ้อน หรือก่อให้เกิดแผลติดเชื้อแผลไฟไหม้ หรือ Ventilator-associated pneumonia⁽¹⁾ สาเหตุของโรคติดเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ มักเกิดในโรงพยาบาลจากเครื่องมือแพทย์ที่เชื้อเหล่านี้ไปสร้างไบโอฟิล์มและเพิ่มจำนวนจนมีปริมาณไบโอฟิล์มจำนวนมากบนผิวเครื่องมือแพทย์และวัสดุชีวภาพ เช่น สายสวนปัสสาวะ (Venous catheter) ลิ้นหัวใจเทียม หรือเครื่อง Pace maker และเชื้อเหล่านี้มักจะติดต่อกัน ทำให้โรคติดเชื้อจากแบคทีเรียฉวยโอกาสเหล่านี้ มีความอันตราย และทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในที่สุด⁽²⁾

การสร้างไบโอฟิล์ม คือ กลไกหนึ่งของเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในช่วงการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนพื้นผิวที่เชื้อเกาะ แบคทีเรียในไบโอฟิล์มมักทนทานต่อยาปฏิชีวนะมากกว่าแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เดี่ยว ทำให้แบคทีเรียคือยาปฏิชีวนะได้ เพราะยาไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปแกนกลางของไบโอฟิล์ม และแพร่กระจายออกจากไบโอฟิล์มไปติดเชื้อสู่สิ่งแวดล้อม⁽³⁾ ปัจจุบันการกำจัดไบโอฟิล์มเป็นสิ่งที่กระทำได้ยากและมีค่าใช้จ่ายสูง ส่วนการติดต่อกันทำให้

แพทย์ต้องเพิ่มปริมาณและชนิดของยาปฏิชีวนะ และอาจต้องรักษาเป็นเวลานานทำให้เกิดอันตรายต่อตัวผู้ป่วยจากผลข้างเคียงต่อดื่บและไต และก่อผลทางอ้อมคือเกิดการสะสมของยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพตกค้างในสิ่งแวดล้อม⁽³⁾ นอกจากนี้ยังสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น ปัจจุบันจึงเกิดแนวคิดที่จะนำสารบริสุทธิ์และสารสกัดจากธรรมชาติผสมกับยาปฏิชีวนะ เช่น การนำสารสกัดทับทิมและสารสกัดจากโรสแมรี่มาผสมกับยาปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa*⁽⁴⁾ ทั้งนี้เพื่อลดปริมาณการใช้ยาและเพื่อลดผลข้างเคียงจากยา และลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะและยาต้านจุลชีพสู่สิ่งแวดล้อม⁽²⁾

ไคร้ (Khrai) มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Glochidion daltonii* เป็นพืชในวงศ์ *Euphorbiaceae*⁽⁵⁾ พบสารสำคัญในพืชสกุล *Glochidion* ได้แก่ Triterpenoids, Flavonoids, Lignans, Sesquiterpenoids, Glucosides, Alkaloids และ Butenolides⁽⁶⁾ พืชสกุล *Glochidion* สร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย ได้แก่ สาร lupane-type triterpenoids เช่น Glochidonol, Glochidiol, Lup-20(29)-ene-1 β ,3 β -diol และ Glochidone จากเปลือก *G. zeylanicum* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งผิวหนังในหนูทดลอง⁽⁷⁾ สาร Triterpene ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*⁽⁸⁾ และอนุพันธ์ของ terpene สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Streptococcus pneumoniae*⁽⁹⁾

ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ Glochidone ที่แยกได้จากไคร้ (*G. daltonii*) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และการเสริมฤทธิ์ของ Glochidone

ผสมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสดี้อย่าและไม่ดีอย่า ศึกษาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมของสาร Glochidone ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยวิธี Time-kill assay และศึกษาการเสริมฤทธิ์ต้านการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาส ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการสนับสนุนการเลือกใช้สารบริสุทธิ์ชนิดใหม่จากสมุนไพรในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย เพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะที่ใช้ไม่ได้ผลและลดผลข้างเคียงของยาปฏิชีวนะ รวมทั้งเป็นข้อมูลในการวิจัยขั้นต้นในการพัฒนาสาร Glochidone จากไคร้ มาใช้เป็นยารักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในอนาคต

วิธีการวิจัย

การเตรียมและวิเคราะห์สารบริสุทธิ์ Glochidone

สารสกัดที่แยกได้จากต้นไคร้ (*G. daltonii*) จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี รหัสพรรณไม้เลขที่ BKF147874 นำมาสกัดด้วยวิธีของ Puapairoj et al. (2005)⁽¹⁰⁾ โดยนำส่วนรากจำนวน 2 kg ที่บดละเอียดมาสกัดด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอลตามลำดับที่อุณหภูมิห้อง นำส่วนสกัดที่ได้มาทำแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporation จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี gradient elution ได้จำนวน 10 fraction นำ Fraction ที่ 5 มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยวิธี Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. วารีนีเนื่องจางันต์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา พบสารกลุ่ม Lupanes คือ สาร Glochidone มีโครงสร้างดังภาพที่ (Figure) 1

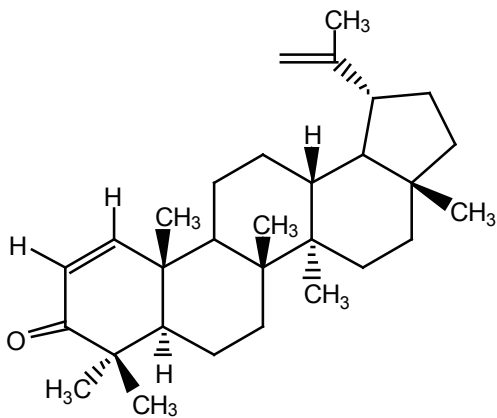


Figure 1 Structure of Glochidone (Mw 442)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ใช้วิธี Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Assay ด้วย Total Antioxidant Status assay kit โดยเติม Glochidone ปริมาตร 20 μ L ความเข้มข้น 2048 μ M แล้วเติมสี Chromogen (Metmyoglobin และ ABTS®) 2 μ mol/L (Randox, UK) 1 mL เติม Substrate (Hydrogen peroxide

250 (μ mol/L) (Randox, UK) 200 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งที่ความยาวคลื่น 600 nm บันทึกค่าการดูดกลืนแสง (A2) โดยเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น และสาร Standard (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylcroman-2-carboxylic acid) (Randox, UK) แล้วนำมาหาค่า Antioxidant activity

เชื้อแบคทีเรียทดสอบ

E. coli ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ไม่ดีอย่าได้นำมาพิสูจน์ยืนยันสายพันธุ์ด้วยวิธี API 20 NE System และวิเคราะห์หาลำดับเบสของ ISR ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ระหว่างยีน 16S rRNA กับ 23S rRNA⁽¹¹⁾ เช่นเดียวกับเชื้อ *A. baumannii* คือยาปฏิชีวนะหลายขนาน เช่น amikacin, ciprofloxacin, sulperazone, piperacillin และ *P. aeruginosa* (ดีอย่า, รหัส 1-375/04-2023) คือยาในกลุ่ม Aminoglycosides, β -Lactams, Carbapenem, quinolone) และนำมาระบุยีนดีอย่าหลายขนานด้วยยีน *mexA* และ *mexB* gene ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Nehme et al. (2004)⁽¹²⁾ ด้วยการทำให้ซีอาร์และนำมาทำ Sequencing

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ทดสอบด้วยวิธี Broth microdilution susceptibility test โดยวิธีของ Clinical and standard Institute (2017)⁽¹³⁾ เตรียมเชื้อทดสอบมาเทียบความเข้มข้นกับ McFarland No. 0.5 จากนั้นเติมสาร Glochidone ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นทีละสองเท่า (0.125 - 2048 μ M) ที่เจจางด้วย Mueller Hinton broth (MHB) 100 μ L ใน Microtiter plate จากนั้นนำมาผสมกับเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 100 μ L นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ด้วย Microplate reader (VersaMax, U.S.A.) บันทึกผลเพื่อหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC)

การศึกษาเสริมฤทธิ์ร่วมกันของสารบริสุทธิ์

ทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธี Broth microdilution susceptibility test โดยปรับการใส่สารทดสอบในแต่ละชุดการทดสอบด้วย checkerboard assay⁽¹⁴⁾ โดยผสม Glochidone ความเข้มข้น 4 - 4,096 μ M กับยาปฏิชีวนะความเข้มข้น 4 - 4,096 μ M อย่างละ 50 μ L เติมเชื้อแบคทีเรีย 100 μ L (1×10^8 CFU/mL) และเติมอาหารเหลว MHB 100 μ L ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm แล้วหาค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน ได้แก่ ค่า MIC ของสารเมื่อผสมกับยาปฏิชีวนะ และค่า MIC ของยาปฏิชีวนะเพียงชนิดเดียวหรือ MIC ของสารบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียว และหาค่า FIC ของยาปฏิชีวนะ และค่า FIC ของสารบริสุทธิ์ และค่าดัชนีชี้วัด fractional inhibitory concentration index (FICI)⁽¹⁴⁾

การศึกษา Time-kill assay

การทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในแต่ละช่วงเวลาที่กำหนด โดยเติมเชื้อแบคทีเรีย 1.5×10^8 CFU/mL ปริมาตร 100 μ L เติม Glochidone ที่ผสมกับยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ได้จากการเสริมฤทธิ์ ปริมาตร 100 μ L เติมอาหาร MHB ปริมาตร 2.8 mL จากนั้นนำไปบ่มตามเวลาที่กำหนดคือ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 และ 48 h ที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อครบเวลาทำการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (เจือจางด้วยวิธี 10-fold dilution ในน้ำเกลือ (0.85% NaCl) โดยเกลี่ยเชื้อ ปริมาตร 100 μ L ในอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย (โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ผสม MHB และชุดเปรียบเทียบ คือสารบริสุทธิ์และยาปฏิชีวนะ) จากนั้นนำจำนวนแบคทีเรียที่นับได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละของแบคทีเรียที่ลดลงจากเวลาเริ่มต้น (The effectiveness antibacterial activity; EAA)

การทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (Antibiofilm activity test)

ทดสอบโดยดัดแปลงจากวิธีของ Awolola et al. (2014)⁽¹⁵⁾ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร Nutrient broth (NB) ปริมาตร 2 mL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเทียบความขุ่นกับ MacFarland No. 0.5 (ปริมาณ 1×10^8 CFU/mL) เติม Glochidone ความเข้มข้น 2048 μ M ปริมาตร 500 μ L แล้วเติมเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 500 μ L เติมอาหาร NB 500 μ L บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 0, 2, 4, 8, 12

และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ตรึงเซลล์ด้วย 100% Absolute Methanol 200 ไมโครลิตร และนำไปไอฟิล์มของแบคทีเรียไปย้อมสี 0.01 % crystal violet ปริมาตร 40 μ L เติม 33% Glacial acetic acid 50 μ L จากนั้นนำไปไอฟิล์มที่อยู่ในรูปสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ที่ความยาวคลื่นที่ 600 nm ทุกการทดสอบจะทำการทดสอบ 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และยาเตตราไซคลิน จากนั้นบันทึกผลการดูดกลืนแสง หาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง และหาประสิทธิภาพของการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (%inhibition)

ผลการศึกษา

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสาร Glochidone

สาร Glochidone ที่แยกได้จากไคร้ (*G. daltonii*) เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี TEAC assay แสดงค่า Antioxidant เท่ากับ 0.38 ± 0.04 (mmol/L)

ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสาร Glochidone แสดงดังตารางที่ (Table) 1 โดย สาร Glochidone และเตตราไซคลินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 (สายพันธุ์ไม่ดื้อยา) โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2048 μ M (MIC เท่ากับ 1012.90 μ g/mL) แต่ Glochidone ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยา อย่างไรก็ตามพบว่ายาแอมพิซิลลินไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่นำมาทดสอบ

Table 1 Antibacterial activities of Glochidone, Ampicillin and Tetracycline

Bacteria	Minimum inhibition concentration (MIC, μ M)		
	Glochidone	Ampicillin	Tetracycline
<i>A. baumannii</i> (Drug resistant)	>2048	>2048	>2048
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2048	>2048	256
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2048	>2048	64
<i>P. aeruginosa</i> (Drug resistant)	>2048	>2048	>2048

การเสริมฤทธิ์กันของสาร Glochidone กับยาปฏิชีวนะ

ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสาร Glochidone ร่วมกับยาแอมพิซิลลินและเตตราไซคลิน แสดงดังตารางที่ (Table) 2 พบว่าสาร Glochidone เมื่อใช้ร่วมกับยาเตตราไซคลิน สามารถเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ไม่ดื้อยา นอกจากนี้ยังพบว่า Glochidone เมื่อใช้ร่วมกับยาแอมพิซิลลินจะไม่สามารถเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ

การศึกษาผลของสาร Glochidone ร่วมกับยาปฏิชีวนะเตตราไซคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อหน่วยเวลา

ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสาร Glochidone ร่วมกับยาเตตราไซคลิน แสดงให้เห็นว่า Glochidone เสริมฤทธิ์กับยาเตตราไซคลินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียไม่ดื้อยาเท่านั้น แต่ไม่สามารถเสริมฤทธิ์กันเพื่อยับยั้งแบคทีเรียดื้อยา จากนั้นจึงยืนยันผลการเสริมฤทธิ์ด้วยการหาช่วงเวลาและปริมาณที่น้อยที่สุด

ที่สาร Glochidone ผสมกับยาเตตราซัยคลินแล้วสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

ผลการวิจัยพบว่าเมื่อใช้ สาร Glochidone เท่ากับ 1/32 MIC (64 μ M) ร่วมกับยาเตตราซัยคลิน เท่ากับ 1/2 MIC (128 μ M) จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ในชั่วโมงที่ 2-6 โดยพบว่าจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย จะลดลงจากเวลาเริ่มต้น 71.84 \pm 8.41 - 89.99 \pm 2.89% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือน้ำกลั่น โดยแสดงให้เห็นว่าสาร Glochidone

ผสมกับยาเตตราซัยคลินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไม่ดื้อยาที่ระยะเริ่มต้นของ Log phase และสามารถเสริมฤทธิ์กันยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีที่สุดในระหว่างชั่วโมงที่ 2-8 (ภาพที่ (Figure) 3 และเมื่อใช้สาร Glochidone เท่ากับ 1/64 MIC (32 μ M) ร่วมกับยาเตตราซัยคลิน เท่ากับ 1/4 MIC (16 μ M) สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ไม่ดื้อยาได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 2-6 (ระยะเริ่มต้นของ log phase) ภาพที่ (Figure) 4

Table 2 Synergistic antibacterial effect of Glochidone in combination with tetracycline shown by MICs, FICs and FICIs

Bacteria	The synergistic effect of 3-epi-Lupeol combined with antibiotics			
	Glochidone + Ampicillin		Glochidone + Oxytetracycline	
	FICIs	Interpretations	FICIs	Interpretations
drug-resistant <i>A. baumannii</i>	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	0.375	Synergistic effect
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	0.250	Synergistic effect
drug-resistant <i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-

- Represented no synergistic effect, no FIC, no FICI; * FICI, a synergistic effect, as FIC index of \leq 0.5, a partially synergism, as FIC index of $0.5 < \text{FICI} < 1$, an additive effect, as FICI index of $\text{FICI} = 1$, an indifferent effect, as FICI index of $1 < \text{FICI} \leq 4$, an antagonism, FICI index of $\text{FICI} > 4$

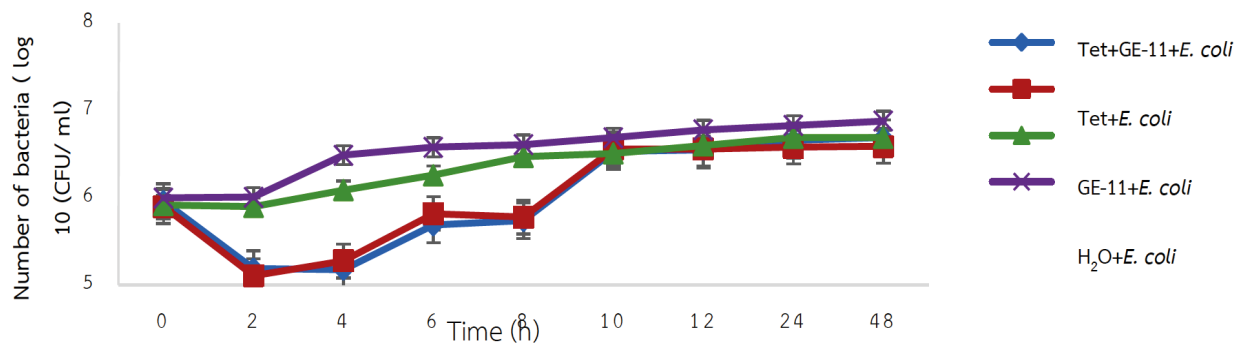


Figure 3 Time kill curve of Glochidone (GE11) in combination with tetracycline against *E. coli* ATCC 25922 when mixing 1/32 MIC Glochidone with 1/2 MIC tetracycline

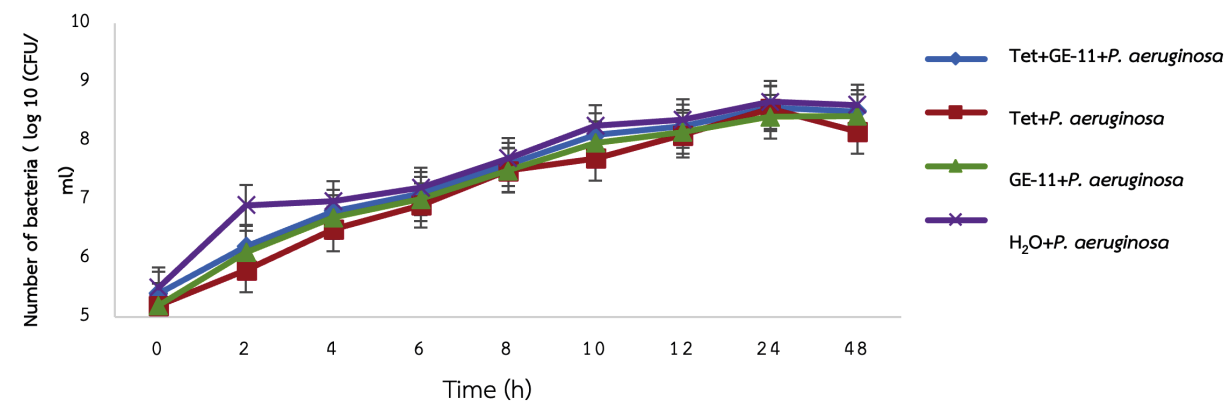


Figure 4 Time kill curve of Glochidone (GE11) in combination with tetracycline against *P. aeruginosa* ATCC 27853 when mixing 1/64 MIC Glochidone with 1/4 MIC tetracycline

การศึกษาการเสริมฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสาร Glochidone ร่วมกับยาเตตราซัยคลิน

งานการวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยที่ต่อยอดในการศึกษากลไกของสาร Glochidone ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มซึ่งเป็นด่านแรกในการป้องกันการรวมกลุ่มกันของแบคทีเรีย เพื่อลดโอกาสของแบคทีเรียเพื่อปรับตัวคือยาปฏิชีวนะ โดยจะทำการศึกษาเปรียบเทียบเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อเรื้อรัง⁽³⁾

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสาร Glochidone เมื่อใช้เพียงชนิดเดียวสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *A. baumannii* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีประสิทธิภาพดีกว่ายาเตตราซัยคลิน แสดงดังภาพที่ (Figure) 5-6 โดยพบว่าสาร

Glochidone ปริมาณ 2048 μM สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้มากกว่า 50% โดย Glochidone มีฤทธิ์ยับยั้งอยู่ในช่วง (58.73-75.16%) และเมื่อนำสาร Glochidone (1012.90 $\mu\text{g/mL}$) มาผสมกับยาเตตราซัยคลิน (910.2 $\mu\text{g/mL}$) สามารถเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้ดีกว่าการใช้ Glochidone เพียงชนิดเดียว (68.54-98.58%) อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ Glochidone ผสมกับยาเตตราซัยคลินจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้ Glochidone เพียงชนิดเดียว (32.59-36.04%) ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *A. baumannii* ได้อย่างหลายขนาน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงดังภาพที่ (Figure) 7

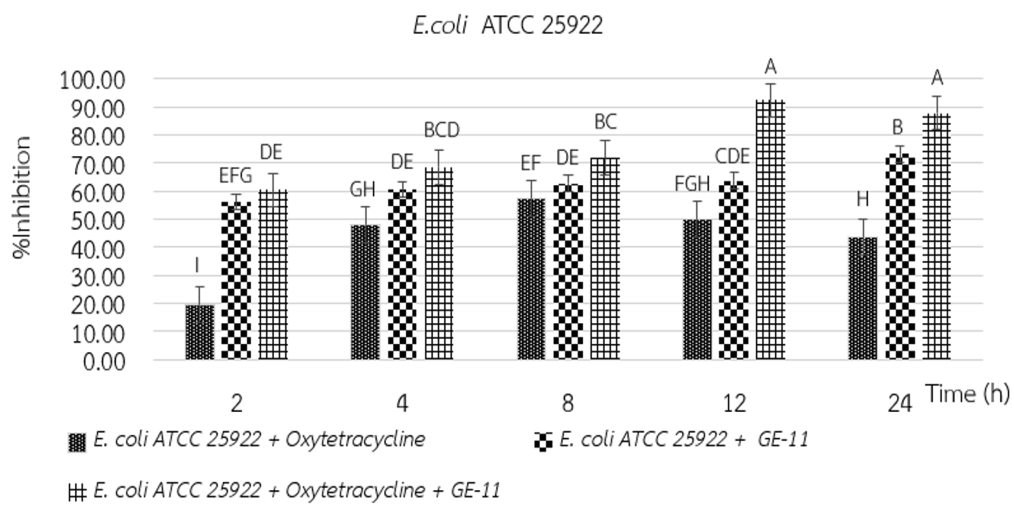


Figure 5 Antibiofilm activity of Glochidone (GE – 11) and Glochidone in combination with tetracycline against *E. coli* ATCC 25922, ^{a-g} Different superscript letters within each bar are significantly different (p-value <0.05)

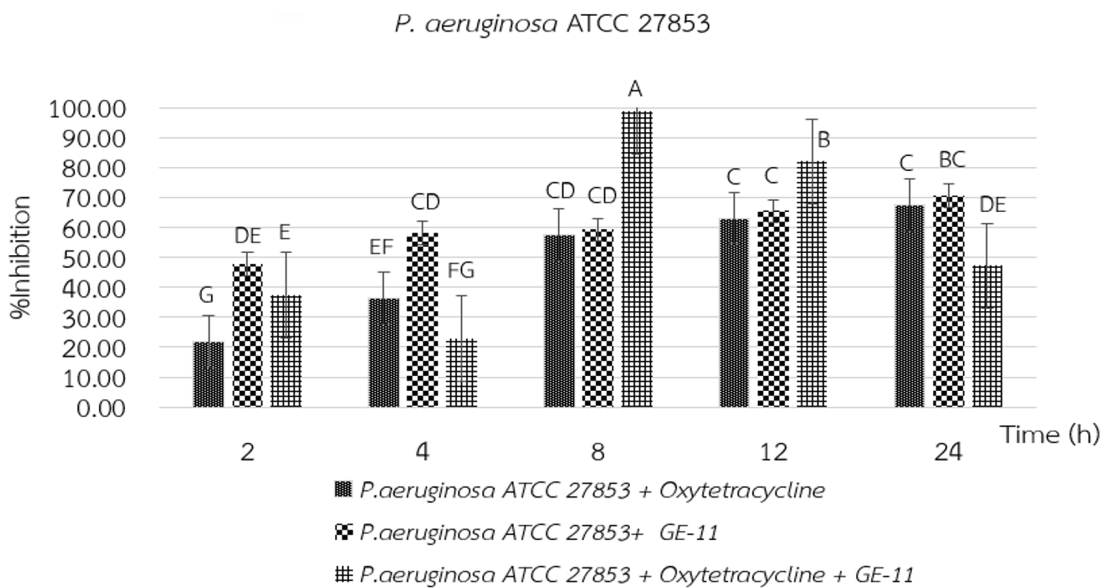


Figure 6 Antibiofilm activity of Glochidone (GE – 11) and Glochidone in combination with tetracycline against *P. aeruginosa* ATCC 27853, ^{a-g} Different superscript letters within each bar are significantly different (p-value <0.05)

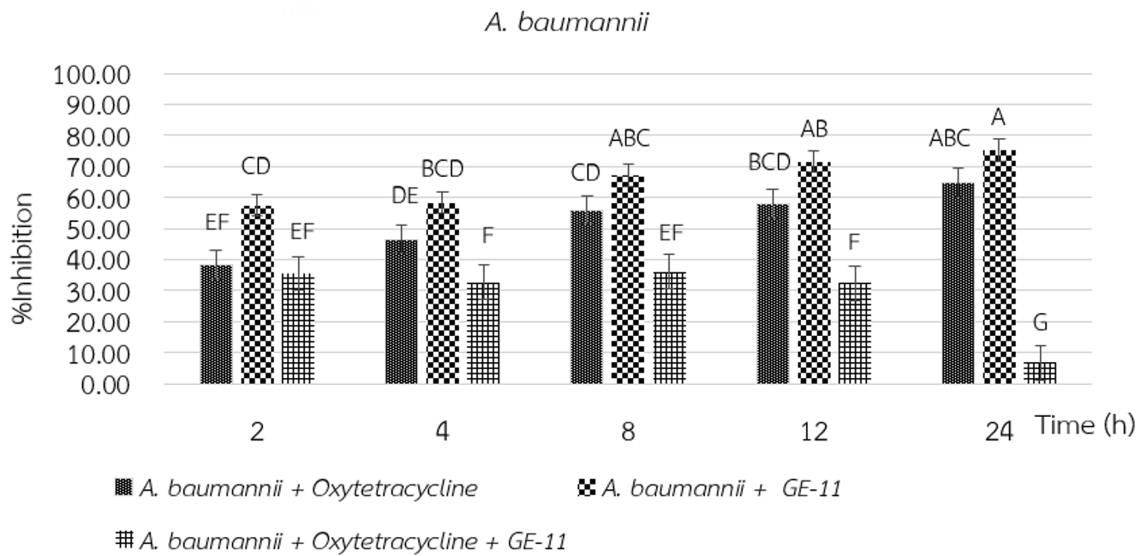


Figure 7 Antibiofilm activity of Glochidone (GE – 11) and Glochidone in combination with tetracycline against drug resistant *A. Baumannii*, a-g Different superscript letters within each bar are significantly different (p-value <0.05)

อภิปรายผล

สาร Glochidone ที่แยกได้จากไคร้ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี TEAC assay เช่นเดียวกับรายงานของ Junlatat & Sripanidkulchai (2018) ⁽¹⁶⁾ ทดสอบคุณสมบัติของการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH method พบว่าสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากไคร้ แสดงค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่างานวิจัยนี้ (IC₅₀ เท่ากับ 6.35 ± 0.28 ug/mL) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการทดสอบและการสกัดสารบริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแสดงให้เห็นว่า สาร Glochidone มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้แต่มีประสิทธิภาพที่ต่ำกว่าสารกลุ่ม Lupane ชนิดอื่น ๆ เช่น สาร lupeol acetate ได้แก่ 5,7,4'-Trihydroxyflavan-3-ol มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 (MIC 8 mg/mL) ที่ดีกว่าสาร Glochidone จากงานวิจัยนี้ ⁽¹⁵⁾ อย่างไรก็ตามฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสาร Naringin แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ได้ต่ำกว่าสาร Glochidone (ความเข้มข้น 370-470 µg/mL) และ Naringin สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เพราะอาจจะไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ของแบคทีเรีย หรือยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย ⁽¹⁷⁾

ผลการเสริมฤทธิ์ของสาร Glochidone ร่วมกับยาปฏิชีวนะไม่สามารถเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบตัวยาว อย่างไรก็ตามเมื่อนำสาร Glochidone ผสมกับยาเตตราซัยคลินแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ขึ้นเล็กน้อย อาจเกิดจากสาร Glochidone ไปส่งเสริมการทำงานของเตตราซัยคลินยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ที่

เป็นกลุ่มโปรตีนที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย ⁽¹⁸⁾ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสาร triterpene ชนิดอื่น ๆ เช่น สารกลุ่ม diterpene ที่สกัดได้จากใบของ *Polyathia longifolia* คือ สาร 16α-Hydroxycyclo-3,13 (14)Z-dien-15,16-olide เสริมฤทธิ์กับออกซีเตตราซัยคลิน (Oxytetracycline) และออกซาลิลลิน (Oxacillin) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA ⁽⁹⁾ หรือสารกลุ่ม Pentacyclic triterpenoid ผสมกับยาเมธิซิลลิน (Methicillin) และแวนโคไมซิน (Vancomycin) สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยไปยับยั้งกิจกรรมการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และการสังเคราะห์แมโครโมเลกุล (macromolecule) ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ⁽¹⁴⁾ อย่างไรก็ตามควรนำสาร Glochidone ไปปรับโครงสร้างใหม่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียตัวยาว

ผลการยืนยันการเสริมฤทธิ์ของสาร Glochidone ร่วมกับยาเตตราซัยคลิน ด้วยการศึกษากการเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Time kill assay แสดงให้เห็นว่าเมื่อผสมสาร Glochidone ร่วมกับยาเตตราซัยคลิน ในสัดส่วนที่เหมาะสมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไม่ตัวยาวได้บ้างเล็กน้อยต่อเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ซึ่งงานวิจัยนี้สนับสนุนงานวิจัยของ Wang et al. (2016) ⁽¹⁹⁾ เมื่อใช้สาร Lupane คือ 8 µg/mL ผสมกับออกซีเตตราซัยคลิน 2 µg/mL จึงจะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบคือ *Bacillus cereus* และ *S. aureus* และสนับสนุนรายงานวิจัยของ Zacchino et al. (2017) ⁽²⁰⁾ ใช้สารกลุ่มเดียวกันคือ Oleanic acid ผสมกับยา

กลุ่ม Aminoglycoside (Gentamicin และ Kanamycin) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียตัวยาว *A. baumannii* เช่นเดียวกับมรายงานของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ Thymol และ Carvacrol

สามารถเสริมฤทธิ์กับยาเตตราซัยคลิน เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*⁽²¹⁾ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสาร Glochidone ร่วมกับยาเตตราซัยคลินไม่สามารถเสริมฤทธิ์กับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดีดอยา อย่างไรก็ตามเมื่อลดความเข้มข้นของสาร Glochidone และยาปฏิชีวนะที่ปริมาณต่ำกว่าค่า FICI ยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดีดอยา

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มสาร Glochidone พบว่าสาร Glochidone สามารถเสริมฤทธิ์กับยาออกซีเตตราซัยคลินได้บ้างเล็กน้อย เพื่อยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียดีดอยาและไม่ดีดอยา และแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้สาร Lupane (ความเข้มข้น 1019.9 µg/mL) ร่วมกับยาเตตราซัยคลิน (ความเข้มข้น 910.2 µg/mL หรือ 2048 µM) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แต่มีฤทธิ์ที่ต่ำกว่าสาร 4-Allyl, 2-methallyl, และ 2- and 4-n-propyl ที่สามารถยับยั้งการสร้างเซลล์แพลงตอนิกของแบคทีเรียขณะรวมกลุ่มกันสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. epidermidis* และ *P. aeruginosa*⁽²²⁾ และมีฤทธิ์ต่ำกว่ายา Colistin sulphate ปริมาณ 4 mg/mL ผสมกับสาร Bicarinalin ที่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *A. baumannii* เนื่องจาก bicarinalin ไปทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย⁽²³⁾ อย่างไรก็ตามควรนำสาร Glochidone ไปศึกษาผลในการยับยั้งการเกาะติดผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นอกจากนี้ยังสนับสนุนงานวิจัยการใช้สาร Betulinic acid และ Ursolic acid (กลุ่มเดียวกันกับสาร Glochidone) ที่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม เนื่องจากสามารถยับยั้งการสร้างเซลล์แพลงตอนิกของเชื้อ *Enterococcus faecalis*, *S. aureus* และ *S. Epidermidis*⁽⁸⁾ ซึ่งอาจจะเกิดจากสารกลุ่ม lupane สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์แบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียขาดโปรตีนที่จำเป็นในการเกาะกลุ่มกันเป็นไบโอฟิล์ม และสนับสนุนงานวิจัยของ Dey et al. (2020)⁽²⁴⁾ ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ Naringin ร่วมกับยา Ciprofloxacin และ Tetracycline สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* เมื่อผสม naringin (370-470 µg/mL) กับยา Ciprofloxacin (0.125 µg/mL) หรือ Tetracycline (2 µg/mL) และได้สนับสนุนงานวิจัยของ Wen et al. (2021)⁽²⁵⁾ ศึกษาผลในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสาร Naringenin พบว่า Naringenin สามารถลดปริมาณของเซลล์ *S. aureus* ที่เกาะติดผิว เนื่องมาจากไปลดคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และลดการผลิต Exopolysaccharide ซึ่งเป็นปัจจัยของการเกาะติดผิว จึงทำให้ลดการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียในไบโอฟิล์ม และไปลดการแสดงออกของยีนสร้าง Sigma factor (*SigB*)

สารบริสุทธิ์ Glochidone ที่แยกได้จากไคร้ (*G. daltonii*) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ

แบคทีเรียดีดอยาที่นำมาทดสอบ อย่างไรก็ตามสาร Glochidone สามารถเสริมฤทธิ์กับยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแกรมลบไม่ดื้อยา และเมื่อนำ Glochidone ผสมกับยาเตตราซัยคลิน จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้เพียงเล็กน้อยต่อเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยาหลายขนาน, *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853

สรุปงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสาร Glochidone จากไคร้ไม่สามารถนำไปใช้เสริมฤทธิ์ของยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งแบคทีเรียบางสายพันธุ์ดีดอยา และการใช้ร่วมกับยาที่ไม่สามารถลดระดับ MIC ของยาลงมาในระดับที่ใช้ทางคลินิกได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับการสนับสนุนจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี และได้รับความอนุเคราะห์ในการหาสูตรโครงสร้างสารบริสุทธิ์โดย รศ. ดร. วารีย์ เนื่องจางค์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณผู้สนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างสูงซึ่ง

เอกสารอ้างอิง

1. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogen and Global Health* 2015; 109(7): 309-318.
2. Murugaiyan J, Kumar PA, Rao GS, Iskandar K, Hawser S, Hays JP, et al. Progress in Alternative Strategies to Combat Antimicrobial Resistance: Focus on Antibiotics. *Antibiotics (Basel)* 2022; 11(2): 200.
3. Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Frontiers in Chemistry* 2019; 7(824): 1-17.
4. Abu El-Wafa WM, Ahmed RH, Ramadan MA. Synergistic effects of pomegranate and rosemary extracts in combination with antibiotics against antibiotic resistance and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology* 2020; 51(3): 1079-1092.
5. Bingtao L, Gilbert MG. *Glochidion*. *Flora of China* 2008; 11: 193-202.
6. Zhang B, Liu S, Lei Q, Zhou J, Long C. Phytochemical constituents and pharmacological activities of a traditional medicinal plant, *Glochidion eriocarpum* (Phyllanthaceae). *Medicinal Plants: Biodiversity, Sustainable Utilization and Conservation* 2020; 431-441.

7. Gallo MBC, Sarachine MJ. Biological activities of lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Science* 2009; 3: 46-66.
8. Silva GNSD, Primon-Barros M, Macedo AJ, Gnoatto SCB. Triterpene Derivatives as Relevant Scaffold for New Antibiofilm Drugs. *Biomolecules* 2019; 9(2): 58.
9. Mahizan NA, Yang SK, Moo CL, Song AA, Chong CM, Chong CW, Abushelaibi A, Lim SE, Lai KS. Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens. *Molecules* 2019; 24(14): 2631.
10. Puapairoj P, Naengchomnong W, Kijjoa A, Pinto MM, Pedro M, Nascimento MS, et al. Cytotoxic activity of lupane-type triterpenes from *Glochidion sphaerogynum* and *Glochidion eriocarpum* two of which induce apoptosis. *Planta Medica* 2005; 71(3): 208-213.
11. Ko WC, Lee NY, Su SC, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Wang LR, Yan JJ, Chang TC. Oligonucleotide array-base identification of species in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex in isolates from blood cultures and antimicrobial susceptibility testing of the isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46(6): 2052-2059.
12. Nehme D, Li XZ, Elliot R, Poole K. Assembly of the MexAB - OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of mutations in mexA compromising MexA multimerization and interaction with MexB. *Journal of Bacteriology* 2004; 186(10): 2973-2983.
13. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th Edition. CLSI Supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017
14. Chung PY, Navaratnam P, Chung LY. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2011; 10(25): 1-6.
15. Awolola GV, Koorbanally NA, Chenia H, Shode FO, Bajinath H. Antibacterial and Anti-Biofilm Activity of Flavonoids and Triterpenes Isolated from the Extracts of *Ficus Sansibarica* Warb. *Subsp. Sansibarica* (Moraceae) Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 2014; 11(3): 124-131.
16. Junlatat J, Sripanidkulchai B. Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Activities of *Glochidion daltonii* Branch Extract. *Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia* 2018; 3(2): 39-43.
17. Gupta PD, Birdi TJ. Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine* 2017; 8(4): 266-275.
18. Zhou G, Shi QS, Huang XM, Xie XB. The Three Bacterial Lines of Defense against Antimicrobial Agents. *International Journal of Molecular Sciences* 2015; 16(9): 21711-21733.
19. Wang CM, Chen HT, Wu ZY, Jhan YL, Shyu CL, Chou CH. Antibacterial and Synergistic Activity of Pentacyclic Triterpenoids Isolated from *Alstonia scholaris*. *Molecules* 2016; 21(2): 139.
20. Zacchino SA, Butassi E, Cordisco E, Svetaz LA. Hybrid combinations containing natural products and antimicrobial drugs that interfere with bacterial and fungal biofilms. *Phytomedicine* 2017; 37: 14-26.
21. Sousa Silveira Z, Macêdo NS, Sampaio Dos Santos JF, Sampaio de Freitas T, Rodrigues Dos Santos Barbosa C, Júnior DLS, Muniz DF, Castro de Oliveira LC, Júnior JPS, Cunha FABD, Melo Coutinho HD, Balbino VQ, Martins N. Evaluation of the Antibacterial Activity and Efflux Pump Reversal of Thymol and Carvacrol against *Staphylococcus aureus* and Their Toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Molecules* 2020; 25(9): 2103.
22. Walsh DJ, Livinghouse T, Goeres DM, Mettler M, Stewart PS. Antimicrobial Activity of Naturally Occurring Phenols and Derivatives Against Biofilm and Planktonic Bacteria. *Frontiers in Chemistry* 2019; 7(653): 1-13.
23. Eales MG, Ferrari E, Goddard AD, Lancaster L, Sanderson P, Miller C. Mechanistic and phenotypic studies of bicarinalin, BP100 and colistin action on *Acinetobacter baumannii* Research in Microbiology 2018; 169(6): 296-302.
24. Dey P, Parai D, Banerjee M, Hossain ST, Mukherjee, SK. Naringin sensitizes the antibiofilm effect of

ciprofloxacin and tetracycline against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. International Journal of Medical Microbiology 2020; 310(3): 151410.

25. Wen QH, Wang R, Zhao SQ, Chen BR, Zeng XA. Inhibition of Biofilm Formation of Foodborne *Staphylococcus aureus* by the Citrus Flavonoid Naringenin. Foods 2021; 10(11): 2614.