

ประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของ 3-acetyl aleuritolic acid จากต้นตีหมี
(*Cleidion spiciflorum* (Burm. f.) Merr.) ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้ง
การเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด

Synergistic effect of 3-acetyl aleuritolic acid from *Cleidion spiciflorum*
(Burm. f.) Merr. with antibiotics to inhibit the growth of some
opportunistic bacteria

พรนภา ขาวประเสริฐ (Pornnapa Kawpraseat)^{*}

วิสาตรี คงเจริญสุนทร (Wisatre Kongchareonsuntorn)^{**}

วารีย์ เนื่องจางค์ (Waree Naengchomnong)^{***}

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจฤทธิ์ต้านแบคทีเรียฉวยโอกาสของ 3-acetyl aleuritolic acid ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส 10 สายพันธุ์ จากตีหมี (*Cleidion spiciflorum* (Burm. f.) Merr.) และศึกษาการเสริมฤทธิ์ร่วมกันระหว่าง 3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลินและศึกษาเวลาที่เหมาะสม (time-kill curve assay) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ผลการวิจัยพบว่า 3-acetyl aleuritolic acid มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งเชื้อ *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* และ *Serratia marcescens* (MIC อยู่ระหว่าง 128-256 μ M) จากนั้นนำเชื้อที่ได้ผลดีมาทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกัน และพบว่าสาร 3-acetyl aleuritolic acid สามารถเสริมฤทธิ์กับยาแอมพิซิลลิน การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P. mirabilis* (FICI เท่ากับ 0.38) และนอกจากนี้พบว่า 3-acetyl aleuritolic acid สามารถเสริมฤทธิ์ร่วมกันบางส่วนกับยาเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922 (FICI เท่ากับ 0.53) และจากการศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* ได้ดีเมื่อผสมยาแอมพิซิลลิน เท่ากับ 1/4 เท่าของ MIC ยา ร่วมกับ 3-acetyl aleuritolic acid เท่ากับ 1/8 เท่าของ MIC ของสาร และ

^{*} นักศึกษาระดับปริญญาโท ชีววิทยาศึกษา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

M.Eng. Biology education, Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chon-Buri, Thailand.,

E-mail: Pornnapabiology123456@gmail.com

^{**} อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ADVISORS: Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chon-Buri, Thailand, Corresponding Author., E-mail: wisatre@buu.ac.th

^{***} อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

COADVISORS: Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chon-Buri, Thailand, Corresponding Author., E-mail: wareenaeng@buu.ac.th

สามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีเมื่อผสมยาเตตราซัยคลินเท่ากับของ 1/2 เท่าของ MIC ของยา ร่วมกับ 3-acetyl aleuritolic acid เท่ากับ 1/32 เท่าของ MIC ของสาร และเวลาที่เหมาะสมที่สามารถยับยั้ง การเจริญเติบโตของเชื้อ *P. mirabilis* และ *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีที่สุดคือในช่วงเวลาที่ 4-8 ดังนั้นผล การศึกษาในครั้งนี้พิสูจน์ให้เห็นว่าสาร 3-acetyl aleuritolic acid ที่สกัดจากรากตีหมีเสริมฤทธิ์ร่วมกับสาร ปฏิชีวนะในเชิงพาณิชย์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ : ตีหมี, 3-acetyl aleuritolic acid, การเสริมฤทธิ์, แอมพิซิลลิน, เตตราซัยคลิน, เชื้อแบคทีเรียฉวย โอกาส

Abstract

The objective of this research was to screen antibacterial activity of 3-acetyl aleuritolic acid from “Dee mee” (*Cleidion spiciflorum* (Burm. f.) Merr.) against ten species of opportunistic bacteria. The synergistic effect of 3-acetyl aleuritolic acid, combined to ampicillin and tetracycline was studied, and the time-kill curve assay was also conducted against some opportunistic bacteria. The results were shown that 3-acetyl aleuritolic acid exhibited antibacterial activity against *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* (MICs ranged from 128-256 μ M). The synergistic effect was further analyzed and the results indicated that 3-acetyl aleuritolic acid, combined to ampicillin and tetracycline, exhibited synergistic and partial synergistic effects against *P. mirabilis* and *E. coli* ATCC 25922 (FICI = 0.38 and 0.53, respectively). In order to determine optimal time to inhibit growth of opportunistic bacteria, the time kill analysis was carried out. Combination treatment using 3-acetyl aleuritolic acid and ampicillin could inhibit growth of *P. mirabilis* at MIC_{co}/MIC_{alone} ratios of 1/8 and 1/4, respectively. Whereas, combination treatment using 3-acetyl aleuritolic acid and tetracycline could repress growth of *E. coli* ATCC 25922 at MIC_{co}/MIC_{alone} ratios of 1/32 and 1/2, respectively. Growth inhibition was found after 4-8 h after inoculation, indicating that 3-acetyl aleuritolic acid extracted from the root of *Cleidion spiciflorum* had a potent synergistic effect against some opportunistic bacteria when combined to commercial antibiotics.

Keywords: *Cleidion spiciflorum*, 3-acetyl aleuritolic acid, synergistic effects, ampicillin, tetracycline, opportunistic bacteria

บทนำ

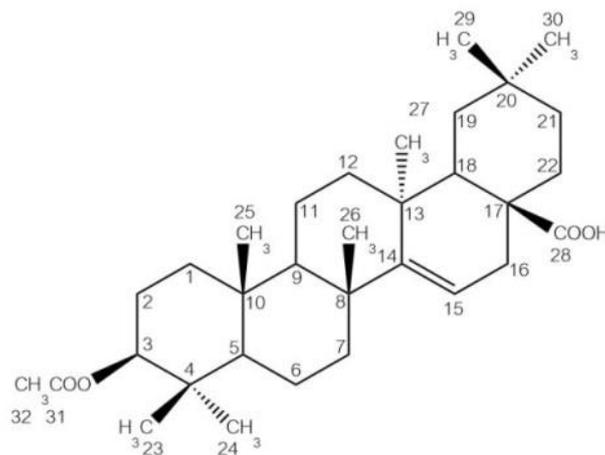
เชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสที่มักก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) แบคทีเรียเหล่านี้เป็นสาเหตุทำให้ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำและหากต้องนอนพักรักษาตัวในโรงพยาบาล อาจทำให้เกิดภาวะโรคแทรกซ้อนจากการติดเชื้อในตำแหน่งสำคัญต่าง ๆ เช่น ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะ และแผลผ่าตัด นอกจากนี้เชืวดังกล่าวสามารถปรับตัวคือยาปฏิชีวนะ ได้แก่ กลุ่ม extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) คือยาในกลุ่ม cephalopirin และกลุ่ม multidrug-resistant (MDR) คือยาในกลุ่ม amikacin, ciprofloxacin และ ceftazidime และเชื้อในกลุ่ม MRSA ที่คือยาในกลุ่ม Methicillin (นิตยา อินทรา วัฒนา และมุขิตา วนาภรณ์, 2558; Fair & Tor, 2014) หรือในกรณีของผู้สูงอายุที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัด โดยเฉพาะการผ่าตัดหัวใจและผ่าตัดข้อสะโพก ซึ่งต้องเพิ่มระยะเวลาในการอยู่ในโรงพยาบาล จึงอาจเกิดภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อฉวยโอกาสได้ (นิศารัตน์ ยูวพัฒน์วงศ์ และลัดดา เหลืองรัตนมาศ, 2559) จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นทำให้ยาปฏิชีวนะที่รักษาในปัจจุบันใช้ไม่ได้ผล และมักเกิดผลข้างเคียงต่อผู้ใช้ จึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนที่ต้องพัฒนาตัวยาคือยาตัวใหม่เสมอ อาจส่งผลให้เสียเวลาเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น ทางเลือกใหม่ที่สำคัญคือการนำสมุนไพร หรือการหาสารต้านจุลชีพจากสมุนไพร เพราะมีประวัติการใช้มาอย่างยาวนานและมีความปลอดภัยสูง ดังรายงาน พบว่า pentacyclic triterpenoids มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและ macromolecular ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (Chung et al., 2011) และ pentacyclic triterpenoids สามารถเสริมฤทธิ์ยาปฏิชีวนะในการต้านเชื้อ *S. aureus* (Chung et al., 2011; Wang et al., 2016) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าต้นตีหมีเป็นพืชที่เริ่มมีผู้ศึกษาวิจัยด้านองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย เนื่องจากมีสารกลุ่ม triterpenoids ที่สามารถออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเช่นเดียวกับสารกลุ่ม triterpenes ที่พบในต้นน้ำนมราชสีห์ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกัน จึงมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa* และ *S. aureus* (Ragasa & Cornelio, 2013) และอาจเป็นทางเลือกใหม่มาแก้ปัญหาแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ

ต้นตีหมี (*Cleidion spiciflorum*) จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae (วงศ์เปล้า) จัดเป็นไม้ยืนต้นสูงประมาณ 20 เมตร เป็นพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายในภาคกลาง มีประวัติใช้เป็นส่วนประกอบในตำรายาโบราณของไทย และมีสรรพคุณทางยา คือ น้ำต้มจากเปลือกตีหมีเป็นยาแก้ปวดท้อง น้ำต้มจากใบมีพิษอาจทำให้สตรีมีครรภ์แท้งบุตร เมล็ดใช้กินเป็นยาระบาย (ก่องกานดา ชยามฤต, 2548; Sanseera et al., 2012) การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบของต้นตีหมีพบว่า มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านสารอนุมูลอิสระ และยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียคือ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* สารสำคัญที่พบได้ในตีหมีคือ 3-acetyl aleuritolic acid จัดเป็นสารกลุ่ม triterpenoid (Naengchomnong et al., 2006) สารกลุ่ม triterpenes ที่ได้จากรากน้ำนมราชสีห์ (*Euphorbia hirta*) ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับตีหมี มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง และมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* และ *S. aureus* (Ragasa & Cornelio, 2013; Sanseera et al., 2012) ตีหมีมีสารกลุ่ม triterpenoids ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *P. aeruginosa* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 12.5 mg/ml และ 25.0 mg/ml ตามลำดับ (Sanseera, et al., 2012) นอกจากนี้สารบริสุทธิ์จากตีหมียังมีสรรพคุณในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น betulinic acid-3-trans-caffeate (Basma et al., 2011)

การศึกษาในครั้งนี้ได้นำสารบริสุทธิ์จากต้นตีหมีคือ 3-acetyl aleuritolic acid มาตรวจฤทธิ์ต้านจุลชีพ และต้านอนุมูลอิสระ และทดสอบการเสริมฤทธิ์กับยาแอฟซิซิลลินและเตตราไซคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิด งานวิจัยนี้อาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษากลไกตัวยาของเชื้อแบคทีเรีย และเพื่อช่วยลดอุบัติการณ์ตัวยาของเชื้อแบคทีเรียจากการลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะลง รวมทั้งเป็นการวิจัยในการพัฒนา 3-acetyl aleuritolic acid จากต้นตีหมี เพื่อเป็นยารักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย เพราะเป็นสารบริสุทธิ์ที่ได้จากธรรมชาติจึงมีความปลอดภัยสูง และสามารถนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ยารักษาโรค อาหารเสริม และเครื่องสำอาง

วิธีการศึกษา

การเตรียมสารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid จากต้นตีหมี (*Cleidion spiciflorum*) รหัสพรรณไม้ BKF 131868 ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งเก็บตีหมีมาจากจังหวัดเชียงราย โดยเจ้าหน้าที่ของกรมป่าไม้ได้นำเฉพาะส่วนรากมาศึกษาหาสารบริสุทธิ์ และพบสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 1 (Naengchomnong et al., 2006) เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 40.2% เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 0.005 mg/ml



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ 3-acetyl aleuritolic acid

แบคทีเรียทดสอบ ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา คือ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) สำหรับ *A. baumannii* (ตัวยา) ซึ่งตัวยาปฏิชีวนะหลายชนิด ได้แก่ amikacin, ciprofloxacin, sulperazon, piperacillin, tazobactam, ceftriaxone, ceftazidime, imipenem, cefpirome, meropenem, cefepime และ piperacillin แต่ตอบสนองต่อยา gentamicin และ *P. aeruginosa* (ตัวยา, รหัส 1-375/04-2013) ซึ่งตัวยาปฏิชีวนะหลายชนิดนั้นได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี

การเตรียมเชื้อทดสอบ เริ่มจากเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ 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 1.5×10^8 CFU/ml

ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration, MIC) ของ 3-acetyl aleuritolic acid ด้วยวิธี agar diffusion susceptibility test (CLSI, 2006) เริ่มจากนำเชื้อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เทียบความขุ่นของเชื้อกับ McFarland No. 0.5 ปริมาตร 1 ml ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHA ปริมาตร 19 ml ให้เข้ากัน จากนั้นเทลงในจานเพาะเชื้อ ใช้ cork borer เจาะหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเติม 3-acetyl aleuritolic acid ที่ระดับความเข้มข้น 4,096 - 64 μ M และสารควบคุม (Control) ได้แก่ DMSO และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 h แล้วทำการทดสอบเทียบกับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันกับ 3-acetyl aleuritolic acid หลังจากบ่มเป็นเวลา 18-24 h นำมาวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่ถูกยับยั้ง (inhibition zone) เฉพาะหลุมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่ถูกยับยั้งมากกว่า 0.6 เซนติเมตร (ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ) แล้วนำไปคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อนำมาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration, MIC)

การศึกษาประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันของ 3-acetyl aleuritolic acid ผสมยาปฏิชีวนะ โดยทำการทดลองเช่นเดียวกันกับ MIC แต่ใส่สารทดสอบในแต่ละ treatment ด้วยวิธี checkerboard assay (Padalia & Chanda, 2015) โดยผสม 3-acetyl aleuritolic acid ที่ระดับความเข้มข้น 4,096 μ M กับยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้น 4,096, 2,048, 1,024, 512, 256, 128 และ 64 μ M มาอย่างละ 20 μ l ให้เข้ากัน แล้วหยอดลงในหลุมที่เจาะในอาหาร MHA ที่ผสมเชื้อปริมาตร 40 μ l รอให้แห้ง จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 h แล้ววัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่ถูกยับยั้ง (inhibition zone) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ แล้วประเมินประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid และยาปฏิชีวนะด้วยดัชนีชี้วัดที่เรียกว่า fractional inhibitory concentration index (FICI)

การแปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI (Padalia & Chanda, 2015)

FICI < 0.5 เสริมฤทธิ์กัน (synergistic)

0.5 < FICI < 1 เสริมฤทธิ์กันบางส่วน (partial synergistic)

FICI = 1 มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (additive)

1 < FICI < 4 ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (indifferent)

FICI > 4 ต้านฤทธิ์กัน (antagonistic)

การศึกษาผลของ 3-acetyl aleuritic acid ผสมยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบต่อหน่วยเวลา (time-kill curve assay, CLSI, 2006) เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 h คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อที่ใช้ทดสอบจำนวน 4-5 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 h จากนั้นเทียบความขุ่นของเชื้อกับ McFarland No. 0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) นำเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว ปริมาตร 100 μ l สารละลาย 3-acetyl aleuritic acid ปริมาตร 50 μ l และสารละลายแอมพิซิลลินหรือเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ปริมาตร 50 μ l มาเติมลงในอาหาร MHB ปริมาตร 2.8 ml เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำการทดสอบทั้งหมดมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) โดยเก็บตัวอย่างมานับเพื่อหาเชื้อแบคทีเรียที่รอดชีวิตที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 และ 48 h ดังนี้ นำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมาเจือจางด้วยวิธี serial dilution ในน้ำเกลือ (0.85 % NaCl) เขย่าให้เข้ากัน จนได้สารแขวนลอยของเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} จากนั้นนำเชื้อที่แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 μ l มาเกลี่ยลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 h (ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ) นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เกิดขึ้นและบันทึกผลเพื่อนำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml) ต่อเวลา (h)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของส่วนสกัดต่อ clear zone เชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียโดยใช้ single factor analysis of variance วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ RBCD จำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี Tukey โดยใช้โปรแกรม Minitab เวอร์ชัน 17.0 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิจัย

การสำรวจฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสเบื้องต้นของ 3-acetyl aleuritic acid พบว่าสาร 3-acetyl aleuritic acid มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสจำนวน 5 สายพันธุ์จาก 10 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ โดยให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii*, *A. baumannii* (ดื้อยา), *S. marcescens* และ *P. mirabilis* (MIC เท่ากับ 128 μ M) รองลงมาคือ *E. coli* ATCC 25922 (MIC เท่ากับ 256 μ M) แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa*, *P. aeruginosa* (ดื้อยา), *K. pneumoniae*, *S. aureus* และ MRSA แสดงดังตารางที่ 1 เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า สาร 3-acetyl aleuritic acid ที่สกัดจากรากติ่มสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร 3-acetyl aleuritic acid กับยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดพบว่า เตตราซัยคลินให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส (ทั้งชนิดดื้อยาและไม่ดื้อยา) บางชนิดได้ดีกว่าแอมพิซิลลินและสาร 3-acetyl aleuritic acid ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิดได้อย่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสาร 3-acetyl aleuritic acid กับยาปฏิชีวนะสองชนิดในการต้านเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส

แบคทีเรีย	ค่า MIC (μM)		
	สาร 3-acetyl aleuritic acid	แอมพิซิลลิน	เตตราซัยคลิน
<i>A. baumannii</i> ไม่ดื้อยา	128	32	64
<i>A. baumannii</i> ดื้อยา	128	-	32
<i>E. coli</i> ATCC25922	256	32	16
<i>P. aeruginosa</i> ไม่ดื้อยา	-	64	64
<i>P. aeruginosa</i> ดื้อยา	-	-	-
<i>S. marcescens</i>	128	64	64
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	64
<i>P. mirabilis</i>	128	64	64
<i>S. aureus</i>	-	64	64
MRSA	-	64	64

การศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสาร 3-acetyl aleuritic acid ร่วมกับยาปฏิชีวนะ ในขั้นตอนนี้ได้นำเชื้อเพียง 3 สายพันธุ์ คือ *A. baumannii* (ดื้อยา), *E. coli* ATCC 25922 และ *P. mirabilis* มาทดสอบการเสริมฤทธิ์ เพราะเป็นเชื้อให้ผลทดสอบกับยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิด และเป็นเชื้อที่มีอุบัติการณ์การดื้อยาสูงมากในปัจจุบัน

ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสาร 3-acetyl aleuritic acid ร่วมกับยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิด แสดงอยู่ในตารางที่ 2-4 จะเห็นว่าสาร 3 - acetyl aleuritic acid สามารถเสริมฤทธิ์กับแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินในการต้านเชื้อ *P. mirabilis* และ *E. coli* ATCC 25922 ตามลำดับ โดยเมื่อผสมสาร 3-acetyl aleuritic acid กับแอมพิซิลลินจะเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ได้ดีที่สุดเมื่อทดสอบกับเชื้อ *P. mirabilis* (FICI เท่ากับ 0.38) แต่จะให้ผลไม่แตกต่าง (indifferent effect) จากการใช้สาร 3 - acetyl aleuritic acid หรือแอมพิซิลลินเพียงชนิดเดียวเมื่อทดสอบกับเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 (FICI เท่ากับ 1.13, ตารางที่ 2 และ 4) ในทำนองเดียวกันเมื่อผสมสาร 3 - acetyl aleuritic acid กับเตตราซัยคลินจะเสริมฤทธิ์กันบางส่วน (partial synergistic effect) เมื่อทดสอบกับเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 (FICI เท่ากับ 0.53) และให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ สาร 3 - acetyl aleuritic acid หรือเตตราซัยคลินเพียงชนิดเดียวเมื่อทดสอบกับเชื้อ *A. baumannii* (ดื้อยา) และ *P. mirabilis* (FICI เท่ากับ 2.25 และ 1.13 ตามลำดับ, ตารางที่ 3 และ 4) การนำสาร 3-acetyl aleuritic acid มาใช้ร่วมกับแอมพิซิลลิน สามารถลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะเมื่อทดสอบกับเชื้อ *P. mirabilis* ได้ถึง 1/4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แอมพิซิลลินเพียงอย่างเดียว ส่วนการนำสาร 3-acetyl aleuritic acid มาใช้ร่วมกับเตตราซัยคลิน สามารถลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะเมื่อทดสอบกับ

เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ได้ถึง 1/2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เตตราซัยคลินเพียงอย่างเดียว สำหรับการนำสาร 3 - acetyl aleuritolic acid มาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิด ยังช่วยลดปริมาณการใช้สารสกัดจากรากดีหมีได้ระหว่าง 1/4-1/32 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สาร 3-acetyl aleuritolic acid เพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 2 ค่า FICI ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับยาแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบบางสายพันธุ์

แบคทีเรีย	MIC alone แอมพิซิลลิน (μM)	MIC combination แอมพิซิลลิน + 3-acetyl aleuritolic acid (μM)	MIC alone 3-acetyl aleuritolic acid (μM)	MIC combination 3-acetyl aleuritolic acid + แอมพิซิลลิน (μM)	FIC 3-acetyl aleuritolic acid	FIC แอมพิ ซิลลิน	FICI	แปลผลดัชนีชี้ วัด ประสิทธิภาพ ร่วม
<i>A. baumannii</i> ดื้อยา	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC25922	32	32	256	32	0.13	1	1.13	ไม่ต่างจากการ ใช้สารตัวเดียว
<i>P. mirabilis</i>	64	16	128	16	0.13	0.25	0.38	เสริมฤทธิ์กัน

ตารางที่ 3 ค่า FICI ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสาร 3-acetyl aleuritic acid กับยาเตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบบางสายพันธุ์

แบคทีเรีย	MIC alone ยาเตตราซัยคลิน (μM)	MIC combination ยาเตตราซัยคลิน + 3-acetyl aleuritic acid (μM)	MIC alone 3-acetyl aleuritic acid (μM)	MIC combination 3-acetyl aleuritic acid + ยาเตตราซัยคลิน (μM)	FIC 3-acetyl aleuritic acid	FIC ยาเตตราซัยคลิน	FICI	แปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม
<i>A. baumannii</i> ตื้อยา	32	64	128	32	0.25	2	2.25	ไม่ต่างจากการใช้สารตัวเดียว
<i>E. coli</i> ATCC25922	16	8	256	8	0.03	0.5	0.53	เสริมฤทธิ์กันบางส่วน
<i>P. mirabilis</i>	64	64	128	16	0.13	1	1.13	ไม่ต่างจากการใช้สารตัวเดียว

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมระหว่าง 3-acetyl aleuritic acid กับยาแอมพิซิลลิน และยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบฉวยโอกาสบางสายพันธุ์

แบคทีเรีย	ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมระหว่างสาร 3-acetyl aleuritic acid กับยาปฏิชีวนะ			
	สาร 3-acetyl aleuritic acid + ยาแอมพิซิลลิน		สาร 3-acetyl aleuritic acid + ยาเตตราซัยคลิน	
	ค่า FICI	แปลผล	ค่า FICI	แปลผล
<i>A. baumannii</i> ดื้อยา	-	-	2.25	ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1.13	ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว	0.53	เสริมฤทธิ์กันบางส่วน
<i>P. mirabilis</i>	0.38	เสริมฤทธิ์กัน	1.13	ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ร่วมกันของ 3-acetyl aleuritic acid และยาปฏิชีวนะเปรียบเทียบกับเมื่อใช้ยาปฏิชีวนะชนิดเดียว

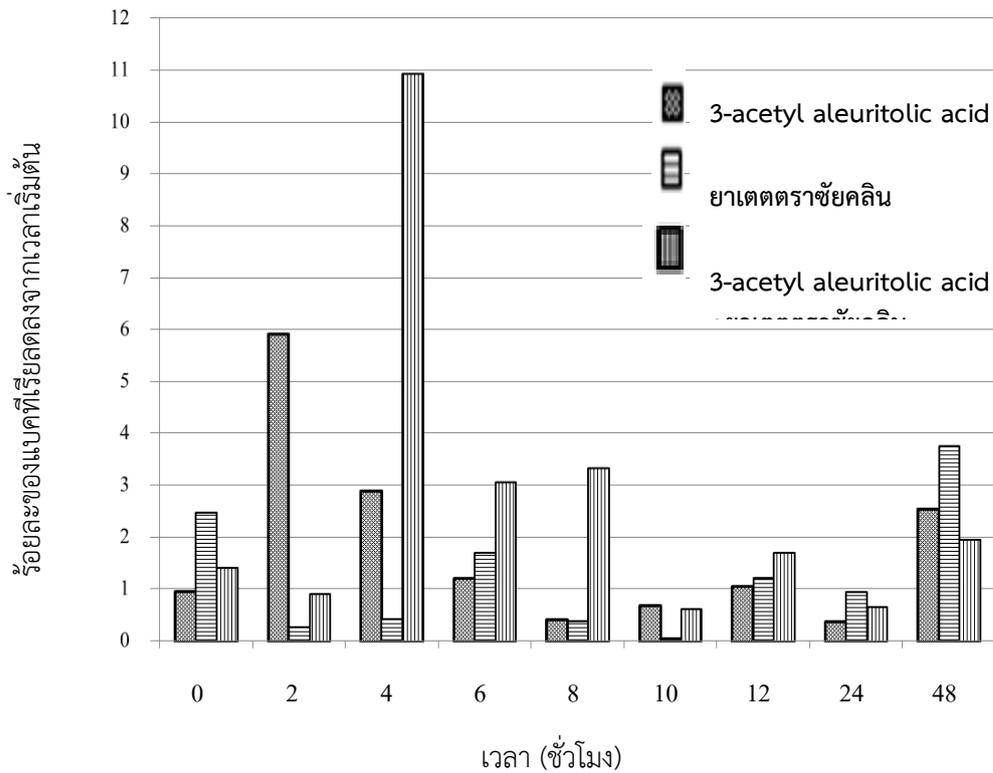
ยาปฏิชีวนะ	MIC _{Co} / MIC _{alone} (μM)	
	3-acetyl aleuritic acid	ยาปฏิชีวนะ
<i>A. baumannii</i> ดื้อยา		
แอมพิซิลลิน	-	-
เตตราซัยคลิน	32/128	64/32
<i>E. coli</i> ATCC 25922		
แอมพิซิลลิน	32/256	32/32
เตตราซัยคลิน	8/256	8/16
<i>P. mirabilis</i>		
แอมพิซิลลิน	16/128	16/64
เตตราซัยคลิน	16/128	64/64

- หมายถึง ไม่สามารถหาสัดส่วนได้ เนื่องจากไม่มีค่า MIC

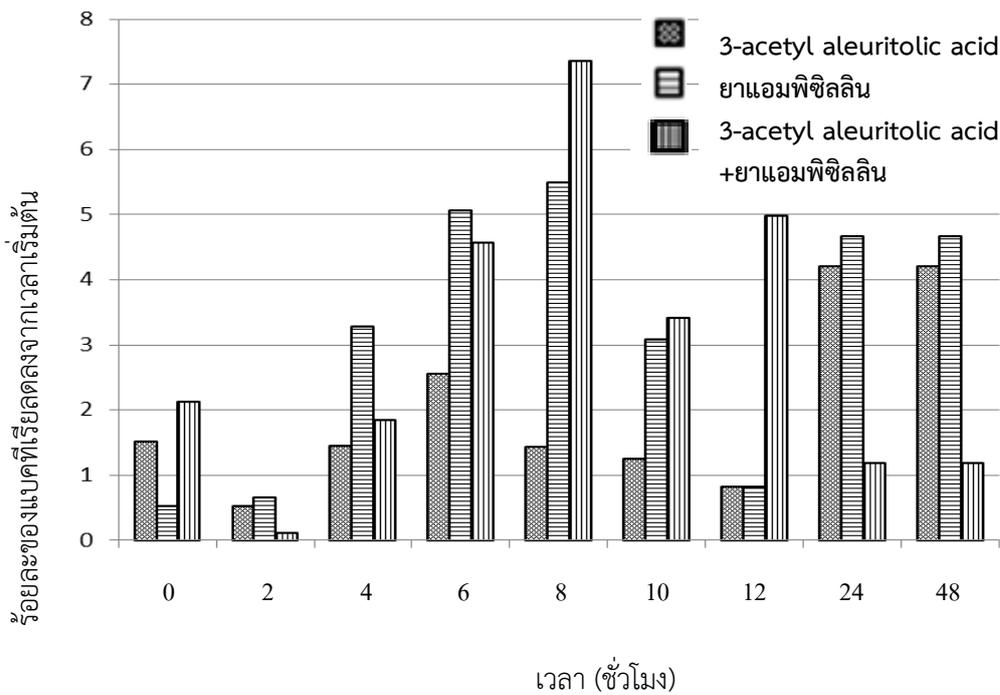
การศึกษาผลของเวลาในการออกฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid ผสมกับยาปฏิชีวนะ (time-kill curve assay)

จากการศึกษาการเสริมฤทธิ์พบว่าสาร 3-acetyl aleuritolic acid สามารถเสริมฤทธิ์กับแอมพิซิลลินในการยับยั้งเชื้อ *P. mirabilis* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เสริมฤทธิ์กันบางส่วนกับเตตราซัยคลินในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำเชื้อทั้งสองชนิดมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียต่อหน่วยเวลา ผลการทดสอบพบว่า เมื่อใช้สารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับเตตราซัยคลิน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 4 กล่าวคือ จำนวนโคโลนีของ *E. coli* ATCC 25922 ลดลงจากเวลาเริ่มต้น 10.93% แสดงว่า เมื่อผสมสารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid กับเตตราซัยคลินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ในช่วงต้นของระยะ log phase (ชั่วโมงที่ 2-8, ภาพที่ 2) โดยสัดส่วนของความเข้มข้นที่ใช้คือ สารบริสุทธิ์ 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้น 8 μM กับเตตราซัยคลิน 8 μM (มีค่าเท่ากับ 1/2 เท่าของเตตราซัยคลินและ 1/32 เท่าของสาร 3-acetyl aleuritolic acid)

เมื่อทดสอบ time-kill curve assay ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับแอมพิซิลลินในการยับยั้งเชื้อ *P. mirabilis* พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 8 กล่าวคือ จำนวนโคโลนีของ *P. mirabilis* ลดลงจากเวลาเริ่มต้น 7.36% และเป็นการยับยั้งเชื้อในช่วงต้นของระยะ log phase (ชั่วโมงที่ 4-12, ภาพที่ 3) โดยใช้ปริมาตรสาร 3-acetyl aleuritolic acid และแอมพิซิลลินที่ความเข้มข้น 16 μM เท่ากัน คิดเป็น 1/4 เท่าของแอมพิซิลลินและ 1/8 เท่าของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ตามลำดับ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า แม้จะลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะและสาร 3-acetyl aleuritolic acid ให้น้อยลงก็ยังสามารถเสริมฤทธิ์ระหว่างกันได้



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับเตตราซัยคลินในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ต่อหน่วยเวลา



ภาพที่ 3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ร่วมกับแอมพิซิลลินในการยับยั้งเชื้อ *P. mirabilis* ต่อหน่วยเวลา

อภิปรายผลและสรุปผล

ผลการสำรวจฤทธิ์ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิดด้วยวิธี agar diffusion susceptibility test แสดงผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii*, *A. baumannii* (ดี้อยา), *S. marcescens* และ *P. mirabilis* ได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang et al. (2016) เนื่องจากสาร 3-acetyl aleuritolic acid เป็นสารกลุ่ม triterpenoids pentacyclic เช่นเดียวกับสารที่พบจากต้นพญาสัตบรรณ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แต่งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมกับแบคทีเรียฉวยโอกาสแกรมลบและแบคทีเรียที่ดีอย่าง *E. coli* ATCC 25922, *P. mirabilis*, *S. marcescens* และ *A. baumannii* (ดี้อยา) และพบข้อสังเกตว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* ได้ดี ในขณะที่ยาแอมพิซิลลินไม่สามารถยับยั้งเชื้อนี้ได้ งานวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นว่าสาร 3-acetyl aleuritolic acid จากรากดีหมีสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (MICs อยู่ระหว่าง 63.7-127.5 ug/ml) ซึ่งแสดงผลที่ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบดีหมี (Sanseera et al., 2012) เนื่องจากสาร 3-acetyl aleuritolic acid จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ triterpenoids จึงอาจมีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมการสังเคราะห์ DNA และ macromolecule ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ (Chung et al., 2011)

สาร 3-acetyl aleuritolic acid สามารถเสริมฤทธิ์กับยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบคือ *P. mirabilis* (FICI เท่ากับ 0.38) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าสาร oleanolic acid (สารกลุ่ม pentacyclic triterpenoid) มีผลเสริมฤทธิ์กับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus* และ *S. aureus* แต่ยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ (Wang et al., 2016) ซึ่งอาจจะเป็นผลจากสารบริสุทธิ์ไปช่วยยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้การสร้างผนังเซลล์เกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ เซลล์แบคทีเรียอาจแตกได้ง่าย (Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009) นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังแสดงผลเสริมฤทธิ์ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบด้วยซึ่งยังไม่เคยมีผู้ทำวิจัยมาก่อน โดยกลไกการเสริมฤทธิ์กันอาจจะเกิดจาก triterpenoids ไปยับยั้งกิจกรรมการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและ macromolecular ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย หรือสาร 3-acetyl aleuritolic acid อาจจะไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนซึ่งเป็นกลไกที่คล้ายคลึงกันกับของเตตราซัยคลิน (Ettayebi et al., 2000) และสอดคล้องกับงานวิจัยการเสริมฤทธิ์ร่วมกันของ eugenol จากกานพลูกับยาแอมพิซิลลิน เพนนิซิลลิน ออกซาลิน เตตราซัยคลิน และแอมพินิคอลลในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* *P. vulgaris* และ *P. aeruginosa* เพราะ eugenol ไปเสริมฤทธิ์กับยาปฏิชีวนะ จึงอาจจะมีผลต่อการสร้างผนังเซลล์ หรืออาจจะไปขัดขวางการสร้างโปรตีน ซึ่งเป็นกลไกเสริมฤทธิ์เช่นเดียวกันกับเตตราซัยคลิน (Hemaiswarya & Doble, 2009; Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009) อีกทั้งงานวิจัยนี้ให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับของ Wang et al. (2016) ที่พบว่าสารกลุ่ม triterpene สามารถเสริมฤทธิ์กับแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* และ *S. aureus*

จากการศึกษา time-kill curve assay ของสาร 3-acetyl aleuritolic acid กับแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* และ *E. coli* ATCC 25922 ต่อหน่วยเวลา พบว่าสาร 3-acetyl aleuritolic acid สามารถส่งเสริมให้แอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินให้ทำงานได้ดีขึ้น ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลักคือ สารบริสุทธิ์อาจจะช่วยเพิ่มการนำยาให้สามารถซึมเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียแกรมลบได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งต้องทำการพิสูจน์หากมีโอกาสออกฤทธิ์ต่อไป นอกจากนี้งานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่า สาร 3-acetyl aleuritolic acid สามารถลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะให้น้อยลง 1/4 และ 1/2 เท่าของแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009)

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า สาร 3-acetyl aleuritolic acid สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii*, *A. baumannii* (ดื้อยา), *S. marcescens* และ *P. mirabilis* โดยสาร 3-acetyl aleuritolic acid สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลินในการยับยั้งเชื้อ *P. mirabilis* และ *E. coli* ATCC 25922 ได้ตามลำดับ ทำให้สามารถลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดได้ อีกทั้งยังสามารถลดระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะได้ดีขึ้นด้วย ซึ่งผลจากการวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในศึกษากลไกแก้ไขการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อลดปริมาณการใช้และลดผลข้างเคียงของการใช้ยาปฏิชีวนะ หรืออาจนำสาร 3-acetyl aleuritolic acid มาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของอาหารเสริมและเครื่องสำอางได้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี ซึ่งให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัย รวมถึงภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่เอื้อเพื่อสถานที่และอุปกรณ์เครื่องมือต่าง ๆ ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

- ก่องกานดา ชยามฤต. (2548). *พืชมีประโยชน์วงศ์เปล้า*. กรุงเทพฯ: บริษัท ประชาชน จำกัด.
- นิตยา อินทราวัฒนา และมูติตา วนาภรณ์. (2558). โรคดื้อยาในโรงพยาบาลและสถานการณ์การดื้อยา. *วารสารการแพทย์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ*, 22, 81-92.
- นิตารัตน์ ยูวพัฒน์วงศ์ และลัดดา เหลืองรัตนมาศ. (2559). การประเมินและแนวทางการดูแลผู้สูงอายุที่มีภาวะสับสนเฉียบพลันภายหลังการผ่าตัด. *Veridian E-Journal, Silpakorn University*, 3, 101-112
- Basma A.A., Zakaria Z., Latha L. Y., and Sasidharan S. (2011). Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4, 386-390.
- Chung, P. Y., Navaratnam, P., & Chung, L. Y. (2011). Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10, 1-6.
- Clinical & Laboratory Standards Institute. (2006). M100-S16: *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement*. Wayne, PA: CLSI.
- Ettayebi, K., El Yamani, J., Rossi-Hassani, B. (2000). Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*. 183,191-195.
- Fair, R. J. and Tor, Y. (2014) Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 6, 25-64.
- Hemaiswarya, S., Doble, M. (2009). Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine*, 16, 997-1005.
- Naengchomnong, W., Pinho, P. M., Kijjoa, A., Sawangwong, P., Gonzalez, M. J., Silva, A. M. S., Eaton, G., & Herz, W. (2006). Clerodanes and other constituents of *Cleidion spiciflorum*. *Phytochemistry*, 67, 1029–1033.
- Padalia, H., & Chanda, S. (2015). Antimicrobial efficacy of different solvent extracts of *Tagetes erecta* L. flower, alone and in combination with antibiotics. *Applied Microbiology*, 1, 1-10.
- Ragasa, C. Y., & Cornelio, K. B. (2013). Triterpenes form *Euphorbia hirta* and their cytotoxicity. *Chines Journal of Natural Medicines*, 11, 528-533.

- Sanseera, D., Niwatananun, W., Liawruangrath, B., Liawruangrath, S., Baramee, A., & Pyne, S. G. (2012). Chemical composition and biological activities of the essential oil from leaves of *Cleidion javanicum* Bl. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15, 186-194.
- Wagner H. & Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 16, 97-110.
- 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.