วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 29 (ฉบับที่ 1) มกราคม – เมษายน พ.ศ. 2567
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 29 (No.1) January – April 2024 บทความวิจัย

สมอไทยยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มและเสริมฤทธิ์กับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาบางชนิด

Terminalia chebula Extract Inhibited Biofilm Formation and Enhanced Antibacterial Activity of Antibiotics against some Drug Resistant Bacteria

วิสาตรี คงเจริญสุนทร* และ ณัฐณิกา เย็งประโคน
Wisatre Kongchareonsuntorn* and Natthanika Yengprakhon
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศไทย
Biology Department, Faculty of Science, Burapha University, Thailand
Received : 25 May 2023, Received in revised form : 27 January 2024, Accepted : 24 February 2024
Available online : 27 March 2024

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : สมอไทยถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาโรค งานวิจัยนี้ศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลจากผลสมอไทยร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบางชนิด

วิธีดำเนินการวิจัย : ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Broth microdilution susceptibility test การเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมอไทยร่วมกับยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Checkerboard assay และฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มด้วยการย้อมสีด้วยคริสตัลไวโอเลท

ผลการวิจัย : สารสกัดจากผลสมอไทยสามารถเสริมฤทธิ์กับยาแอมพิซิลลินในการยับยั้ง *B. cereus* และ *B. subtilis* ค่า FICI เท่ากับ 0.187 และ 0.14 ตามลำดับ และเสริมฤทธิ์กับยาออกซี่เตตราซัยคลินในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ค่า FICI เท่ากับ 0.5 และสารสกัดจากผลสมอไทยสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli P. aeruginosa* และ *S. aureus* ได้ดีที่สุดในช่วงเวลา 8-24 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับสารสกัดจากผลสมอไทย พบว่ายาออกซี่เตตราซัยคลินสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli, P. aeruginosa* และ *S. aureus* ได้ดีกว่า สารสกัดจากผลสมอไทยในช่วงเวลา 4-12 ชั่วโมง

สรุปผลการวิจัย : สารสกัดเอทานอลจากผลสมอไทยสามารถเสริมฤทธิ์กับยาแอมพิซิลลินและยาออกซี่เตตราซัยคลินในการยังยั้งเชื้อแบคทีเรียและยับยังการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์

คำสำคัญ : สมอไทย ; การเสริมฤทธิ์ ; แอมพิซิลลิน ; ออกซี่เตตราซัยคลิน ; แบคทีเรียดื้อยา

Abstract

Background and Objectives : *Terminalia chebula* is commonly used to treat frequent disease. This study investigated the synergistic effect of an ethanol extract from *Terminalia chebula* fruit in combination with antibiotics against some bacteria.

Methodology : Antimicrobial activity was determined by Broth microdilution susceptibility test, Synergy effect of *Terminalia chebula* extract in combination with antibiotics was tested by Checkerboard assay and antibiofilm activity was conducted by Crystal violet staining assay.

Main Results : *T. chebula* extract combined with Ampicillin had synergistic effect against *B. cereus* and *B. subtilis* by the FICI values of 0.187 and 0.14, respectively. Likewise, the synergism of *T. chebula* extract combined with Oxytetracycline was detected against *E. coli* and FICI value was 0.5. The antibiofilm activities of *T. chebula* extract were examined and the results showed that *T. chebula* extract inhibited the biofilm formation of *E. coli, P. aeruginosa*, and *S. aureus* during 8–24 hours of incubation. Oxytetracycline inhibited the biofilm formation of *E. coli, P. aeruginosa* and *S. aureus* better than *T. chebula* extract at 4–12 hours.

Conclusions : An ethanol extract from *Terminalia chebula* fruit showed synergy effect with ampicillin and oxytetracycline and had antibiofilm activity against some bacteria.

Keywords : *Terminalia chebula* ; synergy effect ; ampicillin ; Oxytetracycline ; drug resistant bacteria

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

บทนำ

โรคติดเชื้อจุลินทรีย์ในโรงพยาบาลเป็นปัญหาสำคัญต่อระบบสาธารณสุขในประเทศไทยและทั่วโลก โดยเฉพาะกลุ่มเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส เช่น *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* และ *Staphylococcus aureus* (Sadeghnia *et al*., 2017) ปัจจุบันประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่เพิ่มขึ้นอย่างมาก เช่น เพนิซิลลิน แอมพิซิลลิน โพลีมิกซิน สเตรปโตมัยซิน เตตราซัยคลิน เป็นต้น เพราะแบคทีเรียฉวยโอกาสเหล่านี้มีการปรับตัวในการดื้อต่อยาหลายขนาน เช่น สร้างเอนไซม์มาทำลายยา มีการปรับเปลี่ยนเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยา (target sites) ป้องกันหรือขัดขวางไม่ให้ยาเข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย เมื่อเชื้อแบคทีเรียเกิดการดื้อยาจึงส่งผลให้การรักษายากขึ้น ใช้เวลาในการรักษานานขึ้น ค่าใช้จ่ายในการรักษาเพิ่มมากขึ้น หากเชื้อมีการพัฒนากลายเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนานที่รุนแรง จะไม่มียาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อจากจุลินทรีย์ดื้อยา ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตในโรงพยาบาล (Zhou *et al.*, 2015) จากปัญหาดังกล่าวจึงได้มีการศึกษาเพื่อนำสมุนไพรมาประยุกต์ใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะเพื่อลดการดื้อยา ลดปริมาณยาที่ใช้ลง และประหยัดค่าใช้จ่ายในการรักษา (El-Wafa *et al*., 2020)

สมอไทย (*Terminalia chebula*) ถูกนำมาใช้เป็นยาแผนโบราณเป็นเวลานาน มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการแพทย์พื้นบ้านและจัดอยู่ในตำรายาไทย ได้แก่ มหาพิกัดตรีผลา พิกัดตรีสมอ และพิกัดจตุผลาธิ มีสรรพคุณรักษาโรคต่างๆ เช่น ขับลม บิด ยาบำรุงตับ ย่อยอาหาร ยาแก้ท้องเสีย ยาแก้ปวด ยาถ่ายพยาธิ เป็นต้น (Bulbul *et al*., 2022) ซึ่งพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญได้แก่ Arachidic acid, Hebulanin, Chebupentol, Daucosterol, Punicalagin, Quercetin, Sitosterol, Tannin สารประกอบเหล่านี้มีสรรพคุณทางเภสัชวิทยาหลายประการ ยกตัวอย่างเช่น มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา ฤทธิ์ต้านสารก่อมะเร็ง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเบาหวาน ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวี (Bulbul *et al*., 2022) มีการรายงานว่าสมอไทยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Urease ของเชื้อ *Helicobactor pyroli* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกระเพาะ และมะเร็งกระเพาะอาหาร (Malekzadeh *et al.,* 2001) และจากการศึกษาของ Bonjar (2004) ที่พบว่าเมล็ดสุกของสมอไทยแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และยังพบรายงานว่า Ethanedioic acid และ Ellagic acid จากผลสมอไทยมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ ได้แก่ *Clostridium perfringens* และ *E. coli* (Kim *et al*., 2006) นอกจากนี้ยังพบรายงานว่าสารสกัดน้ำของสมอไทยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Streptococcus mutans* (Aneja & Joshi, 2009) เช่นเดียวกับ Nam & Hwang (2021) ที่รายงานว่าสารสกัดเอทานอลจากผลสมอไทยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* และจากการทดลองของ Kathirvel & Sujatha (2012) พบว่าสารสกัดอะซีโตนของสมอไทยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* และ *Klebsiella pneumoniae* ได้ดีกว่ายาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน ปัจจุบันมีรายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า gallotannin 1,2,6-tri-O-galloyl-beta-D glucopyranose ที่ได้จากผลสมอไทยเมื่อใช้ร่วมกับยาเจนตามัยซิน และยาไทรเมโทพริม สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* (Chattopadhyay & Bag, 2017)

ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเอทานอลจากผลสมอไทยเมื่อใช้ร่วมกับยาแอมพิซิลลิน (Ampicillin) และยาออกซี่เตตราซัยคลิน (Oxytetracycline) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม งานวิจัยนี้อาจจะเป็นมุมมองใหม่ที่จะนำสมอไทยมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสดื้อยาที่เคยใช้ยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียวแล้วไม่ได้ผล เช่น ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และออกซี่เตตราซัยคลิน ให้นำกลับมาใช้ใหม่ได้ รวมถึงเป็นการลดค่าใช้จ่ายและเพิ่มประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารสกัดสมุนไพร (crude extract)

ซื้อผลสมอไทยจากร้านศรีทองโอสถ อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี และนำมาระบุสายพันธุ์เลขที่ Buu-Cho/64-2 ทำการสกัดผลสมอไทยด้วยเอทานอล:น้ำ ในอัตราส่วน 80:20 โดยทำการชั่งผลสมอไทยที่บดละเอียด 500 g ละลายในเอทานอลผสมน้ำ ปริมาตร 1,500 mL ทิ้งไว้ 3 วันให้ตกตะกอน ทำการกรองสมุนไพรด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำสารสกัดจากผลสมอไทยที่กรองแล้วไประเหยแห้งเพื่อเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator จากการสกัดผลสมอไทยเริ่มต้นจำนวน 2 kg เมื่อสกัดเสร็จได้สารสกัดจำนวน 253.32 g คิดเป็น

12.67% จากน้ำหนักเริ่มสกัด จากนั้นนำ crude extract ของสมอไทยมาเตรียมความเข้มข้นเริ่มต้น 160 mg/mL ด้วย 10% Dimethyl sulfoxide เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่นำมาศึกษา

เชื้อจุลินทรีย์ฉวยโอกาสดื้อยาได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลศูนย์ชลบุรี จังหวัดชลบุรี ได้แก่ *Acinetobacter baumannii* ดื้อยา aminoglycosides, β-lactam และ quinolone, *Bacillus cereus, B. subtilis, Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* รหัส 1-375/04-2013 ดื้อยา Amikacin Ciprofloxacin tazobactam Imipenem Piperacillin และ *S. aureus* ยืนยันโดยการตรวจสอบด้วยวิธีการย้อมแกรมและทดสอบทางชีวเคมีด้วย API 20 NE System เบื้องต้น โดยเชื้อดื้อยา *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* ยืนยันสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วย คู่ไพรเมอร์ที่สามารถจับบริเวณ ISR ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ระหว่างยีน 16S *rRNA* กับ 23S *rRNA* (Ko *et al.*, 2008) และหายีนดื้อยา *MexA* และ *MexB* gene ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Nehme *et al.* (2004) ด้วยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ใช้วิธี Broth microdilution susceptibility test (CLSI, 2017) โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ของเชื้อที่ใช้ทดสอบจำนวน 4-5 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำมาทำการเทียบความขุ่นกับ McFarland No 0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) จากนั้นเตรียมสารสกัดจากผลสมอไทย 80 mg/mL ปริมาตร 100 µL มาเจือจางด้วย MHB 100 µL เพื่อให้มีความเข้มข้นลดลงที่ละสองเท่า (0.625-80 mg/mL) แล้วจึงนำสารที่เจือจางปริมาตร 100 µL มาผสมกับแบคทีเรียทดสอบ ปริมาตร 100 µL (ปริมาณ 1×10^8 CFU/mL) นำสารทดสอบของแต่ละ treatment ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแต่ละ treatment ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ โดยเทียบกับยาปฏิชีวนะของแกรมบวก คือ แอมพิซิลลิน ยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก คือ ออกซี่เตตราซัยคลิน จากนั้นวัดความขุ่นของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่น 600 nm (Optical density เท่ากับ O.D.) O.D. 600 ด้วย microplate reader (VersaMax, U.S.A.) บันทึกผลเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration (MIC))

ทดสอบการเสริมฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะโดยการผสมสารสกัดจากผลสมอไทย

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับวิธี Broth microdilution susceptibility test แต่เตรียมการผสมสารสกัดจากผลสมอไทยที่ระดับความเข้มข้น 1.25-160 mg/mL ปริมาตร 50 µL กับยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้น 1.25-160 mg/mL ปริมาตร 50 µL จนครบทุกความเข้มข้นที่ต้องการ ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปทดสอบ และออกแบบการทดสอบตามวิธี Checkerboard assay (Chung *et al.*, 2011) จากนั้นนำสารผสมสารสกัดผลสมอไทยและยาปฏิชีวนะปริมาตร 100 µL มาผสมกับเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 100 µL (ปริมาณ 1×10^8 CFU/mL) ใน microtiter plate ตั้งทิ้งไว้ 3-5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ) ทำการวัดความขุ่นของเชื้อด้วยการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (O.D. 600) ด้วย microplate reader (VersaMax, U.S.A.) บันทึกผลการทดลอง โดยอ่านค่าความเข้มข้นของสาร

สกัดผลสมอไทยที่ผสมกับยาปฏิชีวนะ แล้วทำให้ค่า O.D. 600 ที่ต่ำที่สุด เมื่อได้ค่า MIC ของ synergistic effect (MIC_{co}) ของสารสกัดผลสมอไทยและยาปฏิชีวนะ แล้วนำไปหาค่าผลการเสริมฤทธิ์จากค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI (Fractional inhibitory concentration index) ดังสมการ 1 ถึง 3

1. FIC ของยาปฏิชีวนะ = ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ เมื่อใช้ร่วมกับสารสกัดผลสมอไทย /ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ เพียงอย่างเดียว

2. FIC ของ สารสกัดจากผลสมอไทย = ค่า MIC ของสารสกัดผลสมอไทย เมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ /ค่า MIC ของสารสกัดจากผลสมอไทยเพียงอย่างเดียว

3. FICI = FIC ของยาปฏิชีวนะ + FIC ของสารสกัดจากผลสมอไทย

จากนั้นแปลผลการประเมินประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์แบคทีเรียดังนี้ คือ FICI $\leq$ 0.5 เสริมฤทธิ์กัน (synergistic), 0.5 < FICI < 1 เสริมฤทธิ์กันบางส่วน (Partially synergistic), FICI=1 มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (Additive), 1 < FICI < 4 ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (Indifferent), FICI > 4 ต้านฤทธิ์กัน (Antagonistic)

การทดสอบการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

เป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Zheng *et al.* (2021) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนี ของเชื้อที่ใช้ทดสอบจำนวน 4-5 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 3 mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำมาทำการเทียบความขุ่นกับ Mcfarland No 0.5 เตรียมสารทดสอบในแต่ละชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดทดลอง (sample) เติมสารสกัดจากผลสมอไทยความเข้มข้นเท่ากับ 80 mg/mL ปริมาตร 500 µL เติมแบคทีเรีย ความเข้มข้น 1.5 x 10^8 CFU/mL ปริมาตร 500 µL NB 1000 µL และเติม phosphate-buffered saline (PBS) 500 µL ชุดควบคุมลบ (negative control) เติม 0.85% NaCl ปริมาตร 500 µL เซลล์แบคทีเรีย ความเข้มข้น 1.5 x 10^8 CFU/mL ปริมาตร 500 µL เติม NB 1,000 µL และ PBS 500 µL ลงในหลอดทดลอง ชุด positive control เติมยาออกซี่เตตราซัยคลิน ความเข้มข้นเท่ากับ 80mg/mL ปริมาตร 500 µL เติมแบคทีเรีย ความเข้มข้น 1.5 x 10^8 CFU/mL ปริมาตร 500 µL NB 1,000 µL และ PBS 500 µL นำ treatmentทั้งหมด ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2, 4, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง (ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละ treatment) เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดให้นำเซลล์แบคทีเรียที่ไม่เกาะติดกับพื้นผิวหลอดทดลองออก (non-adherent cells) โดยการล้างด้วย PBS 1,000 µL จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นตรึงเซลล์ (fixing) แบคทีเรียที่เกาะอยู่กับผิวหลอดทดลองด้วย 100% Methanol ปริมาตร 200 µL และนำไปย้อมสีด้วย 0.01% Crystal violet ปริมาตร 20 µL ทิ้งไว้ 3-5 นาที จากนั้นหยุดกิจกรรมของเซลล์แบคทีเรียด้วย 33% Glacial acetic acid ปริมาตร 50 µL นำสารละลายตะกอนสีของแบคทีเรียไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ด้วยเครื่อง

BioSpectrometer (Eppendorf, U.S.A.) และบันทึกผลค่าการดูดกลืนแสง ทุกช่วงเวลาที่ทำการทดสอบ จากนั้นนำค่า O.D. 600 ที่ได้มาคำนวนหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (%inhibition) คำนวณจากสูตรดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = (\text{O.D. negative control} - \text{O.D. treatment}) \times 100 / \text{O.D. negative control}$$

O.D. negative control คือ ค่าดูดกลืนคลื่นแสงของชุดควบคุมคือเชื้อแบคทีเรียที่ผสม 0.85% NaCl

O.D. treatment คือ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารสกัดจากผลสมอไทย หรือยาออกซี่เตตราซัยคลิน

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two-way ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธี Tukey โดยใช้โปรแกรม Minitab version 17 (Minitab Pty Ltd, Sydney NSW, Australia) ที่ระดับนัยสำคัญ $P \leq 0.05$

ผลการวิจัย

ฤทธิ์ของสารสกัดจากผลสมอไทยในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากผลสมอไทยในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแสดงดัง Table 1 โดยพบว่าสารสกัดจากผลสมอไทยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และเชื้อดื้อยาบางสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบได้โดยแสดงค่า MIC ในช่วง 1.25 -80 mg/mL

Table 1 Antibacterial activities of an ethanol extract from *Terminalia chebula* fruit, Ampicillin and Oxytetracycline

Bacteria	Minimum inhibitory concentrations (MIC) (mg/mL)		
	T. chebula	Ampicillin	Oxytetracycline
A. baumannii	2.5	80	80
B. cereus	20	20	2.5
B. subtilis	10	80	1.25
E. coli ATC 25922	80	80	20
P. aeruginosa	2.5	5	2.5
S. aureus	1.25	20	1.25

ผลการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดจากผลสมอไทยร่วมกับยาแอมพิซิลลินและยาออกซี่เตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

จากผลการทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดจากผลสมอไทยร่วมกับยาปฏิชีวนะแสดงดัง Table 2 และ 3 โดยผลวิจัยพบว่าสารสกัดจากผลสมอไทยเสริมฤทธิ์กับยาแอมพิซิลลินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* และ *B. subtilis* ค่า FICI เท่ากับ 0.187 และ 0.14 ตามลำดับ และเสริมฤทธิ์กันบางส่วนในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา ค่า FICI เท่ากับ 0.562 อย่างไรก็ตามยังคงมีฤทธิ์ไม่แตกต่างกับการใช้สารสกัดจากผลสมอไทยเพียงชนิดเดียว หรือใช้ยาแอมพิซิลลินเพียงชนิดเดียวในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 *P. Aeruginosa* ดื้อยา และ *S. aureus* (Table 2)

สารสกัดจากผลสมอไทยเสริมฤทธิ์กับยาออกซี่เตตราซัยคลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาที่นำมาทดสอบ และสารสกัดจากผลสมอไทยเมื่อใช้ร่วมกับยาออกซี่เตตราซัยคลิน แสดงผลดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ค่า FICI เท่ากับ 0.5 และเสริมฤทธิ์กันบางส่วนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* ดื้อยา ค่า FICI เท่ากับ 0.562 แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเกิดการต้านฤทธิ์กันเมื่อใช้สารสกัดจากผลสมอไทยร่วมกับยาออกซี่เตตราซัยคลินในการยับยั้ง *P. aeruginosa* ดื้อยา และ *S. aureus* (Table 3)

Table 2 Synergistic effect of an ethanol extract from *T. chebula* fruit in combination with Ampicillin against some bacteria, represented by Fractional Inhibitory Concentration Index * MIC (mg/mL)

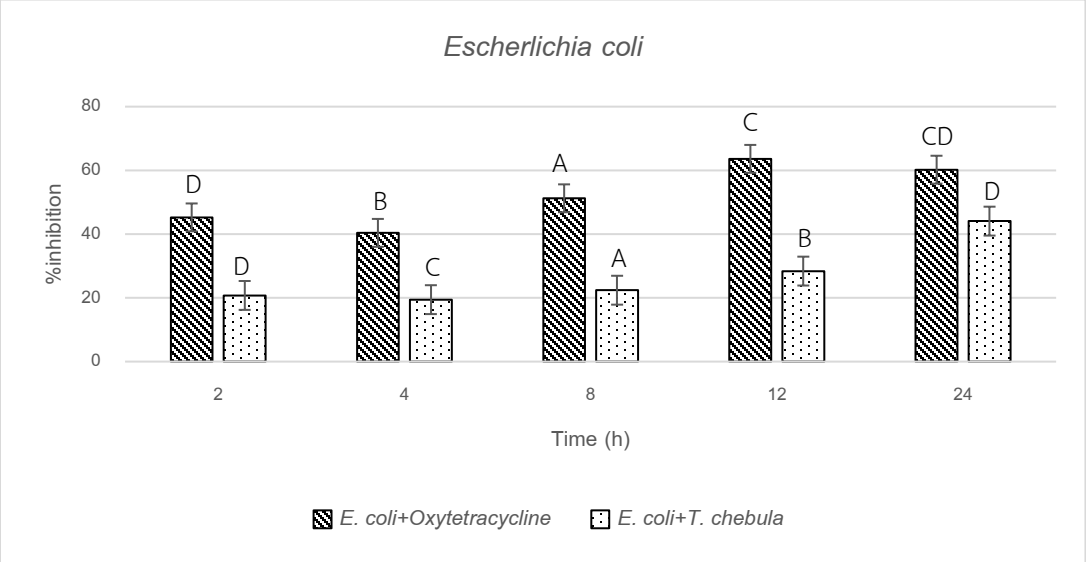
Bacteria	MIC* alone *T. chebula*	MIC combination *T. chebula*	MIC alone Ampicillin	MIC combination Ampicillin	FIC *T. chebula*	FIC Ampicillin	FICI	Evaluation
A. baumannii	2.5	1.25	80	5	0.5	0.062	0.562	Partially synergistic
B. cereus	20	2.5	20	1.25	0.125	0.062	0.187	Synergistic
B. subtilis	10	1.25	80	1.25	0.125	0.015	0.14	Synergistic
E. coli ATCC 25922	80	80	80	10	1	0.125	1.125	Indifferent
P. aeruginosa	2.5	1.25	5	2.5	0.5	0.5	1	Additive
S. aureus	1.25	1.25	20	2.5	1	0.125	1.125	Indifferent

Table 3 Synergistic effect of an ethanol extract from *T. chebula* fruit in combination with Oxytetracycline against some bacteria, represented by Fractional Inhibitory Concentration Index * MIC (mg/mL)

Bacteria	MIC* alone *T. chebula*	MIC combination *T. chebula*	MIC alone Oxytetracycline	MIC combination Oxytetracycline	FIC *T. chebula*	FIC Oxytetracycline	FICI	Evaluation
A. baumannii	2.5	1.25	80	5	0.5	0.062	0.562	Partially synergistic
B. cereus	20	10	2.5	1.25	0.5	0.5	1	Additive
B. subtilis	10	10	1.25	2.5	1	2	3	Indifferent
E. coli ATCC 25922	80	20	20	5	0.25	0.25	0.5	Synergistic
P. aeruginosa	2.5	10	2.5	10	4	4	8	Antagonistic
S. aureus	1.25	20	1.25	1.25	16	1	17	Antagonistic

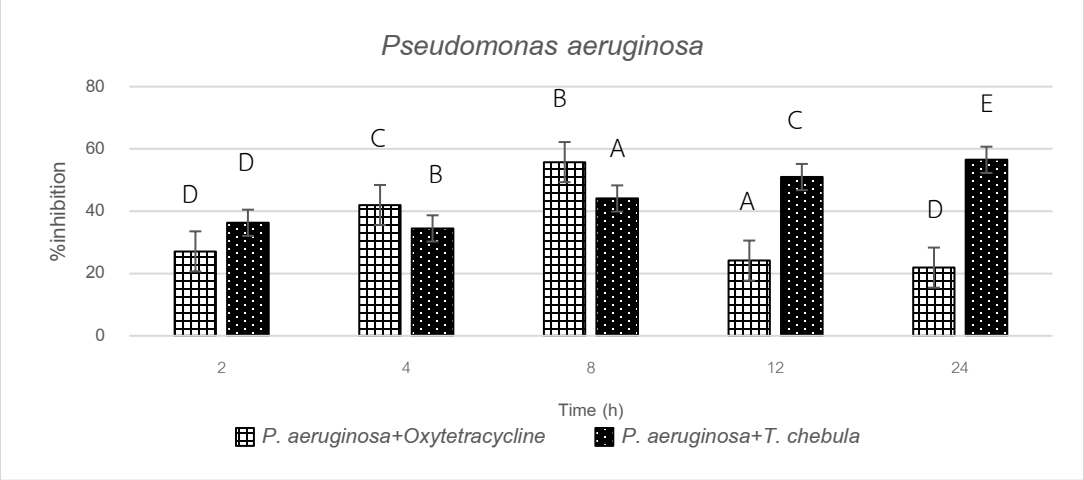
ผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสารสกัดจากผลสมอไทยและยาออกซี่เตตราซัยคลิน

ผลการทดสอบการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ แกรมบวก และแบคทีเรียดื้อยา ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 *S. aureus* และ *P. Aeruginosa* ดื้อยา แสดงดังภาพที่ 1-3 โดยผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้สารสกัดจากผลสมอไทยเท่ากับ 80 mg/mL สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียได้ดีขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น และสารสกัดจากผลสมอไทยสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียในช่วงเวลา 8–24 ชั่วโมง (% inhibition อยู่ระหว่าง 22.40±0.88-56.52±0.85) โดยยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *S. aureus* ถัดมาคือ *E. coli* โดยมี %inhibition เท่ากับ 56.52%, 53.02% และ 44.08% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ายาออกซี่เตตราซัยคลินสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียสูงขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน และผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลสมอไทยกับยาปฏิชีวนะ แสดงให้เห็นว่ายาออกซี่เตตราซัยคลินสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli, P. aeruginosa* และ *S. aureus* ได้ดีกว่าสารสกัดจากผลสมอไทยในช่วงเวลา 4 -12 ชั่วโมง



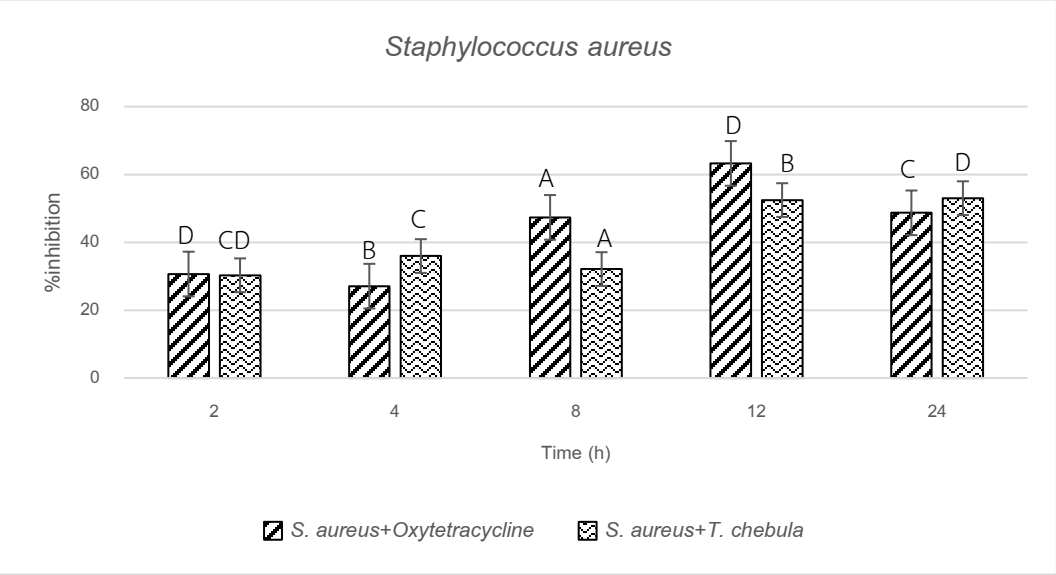
The letters: A-D above column showed difference with statistical significance at $p \leq 0.05$

Figure 1 Antibiofilm activities of an ethanol extract from *T. chebula* fruit and Oxytetracycline against *E. coli* ATCC 25922



The letters: A-D above column showed difference with statistical significance at $p \leq 0.05$

Figure 2 Antibiofilm activities of an ethanol extract from *T. chebula* fruit and Oxytetracycline against *P. aeruginosa*



The letters: A-D above column showed difference with statistical significance at $p \leq 0.05$

Figure 3 Antibiofilm activities of an ethanol extract from *T. chebula* fruit and Oxytetracycline against *S. aureus*

วิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้พิสูจน์ให้เห็นว่าสารสกัดจากผลสมอไทยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ แกรมบวก และแบคทีเรียดื้อยาที่นำมาทดสอบทุกสายพันธุ์ เนื่องจากสารสกัดจากผลสมอไทยมีสารประกอบหลายกลุ่ม เช่น กลุ่มฟีโนลิค (phenolic compouund) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) แทนนิน (tannin) กรดแกลลิก (gallic acid) จึงอาจมีฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Bulbul *et al.*, 2022) ซึ่งแสดงผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีเช่นเดียวกับสารบริสุทธิ์ ethanedioic acid และ ellagic acid ที่สกัดได้จากการนำผลสมอไทยมาละลายด้วยตัวบิวทานอล (Butanol) จะมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. perfingens* และ *E. coli* (Kim *et al*., 2006) เช่นเดียวกับ Sharma *et al*. (2012) ศึกษาสารสกัดเอทานอลจากผลสมอไทย (95% ethanol) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Acinetobacter* spp., *E. coli, P. mirabilis* และ *P. aeruginosa* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 12.5, 50, 25 และ 12.5 mg/mL ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดจากผลสมอไทยที่สกัดด้วยเอทานอล (80% ethanol) ที่ได้จากการวิจัยนี้ให้ผลการยับยั้งต่ำกว่าของ Sharma *et al*. (2012) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii E. coli* และ *P. aeruginosa* และการพิสูจน์ของ Kim *et al*. (2020) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเอทานอลจากสมอไทย (18% ethanol) พบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และฟีนอลิก ในปริมาณสูง และมีฤทธิ์ในการยังยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ดื้อยา แสดงค่า MIC 0.39-0.78 mg/mL ดังนั้นจะเห็นว่าการใช้ตัวทำละลายในการสกัดสารด้วยความเข้มข้นของเอทานอลแตกต่างกัน อาจจะทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญแตกต่างกันได้ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับธรรมชาติของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษาแตกต่างกัน

ปัจจุบันพบอุบัติการณ์การติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสดื้อยาเพิ่มสูงขึ้น จึงจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะในปริมาณมากขึ้นและหลายชนิดร่วมกันในการรักษาโรคติดเชื้อเหล่านี้ (Sadeghnia *et al.,* 2017) ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะนำสมอไทยซึ่งมีสรรพคุณต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ มาเสริมฤทธิ์กับยาออกซี่เตตราซัยคลินและแอมพิซิลลินซึ่งเป็นยาต้นอนุพันธุ์ที่ไม่สามารถรักษาโรคติดเชื้อดื้อยาให้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Bulbul *et al*., 2022) และงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากผลสมอไทยสามารถเสริมฤทธิ์กับออกซี่ยาเตตราซัยคลินและแอมพิซิลลินในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาบางชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะการใช้สารสกัดจากผลสมอไทยร่วมกับยาแอมพิซิลลิน จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ได้ดีได้ดีกว่าการใช้สารสกัดจากผลสมอไทยร่วมกับยาออกซี่ยาเตตราซัยคลิน และแสดงให้เห็นว่าเมื่อผสมสารสกัดจากผลสมอไทยกับยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดแล้วสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อดื้อยา คือ *P. aeruginasa* และ *A. baumannii* ได้ เนื่องจากสารประกอบบางชนิดในสารสกัดจากผลสมอไทยอาจจะไปจับกับแอมพิซิลลิน แล้วไปยับยั้งการซ่อมแซมผนังเซลล์ของแบคทีเรียในชั้นเพปทิโดกลัยแคน (peptidoglycan) หรือทำให้เกิดการแตกสลายของเซลล์แบคทีเรีย เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ Hemaiswarya *et al.* (2008) กล่าวว่าสารสกัดเอทานอลของสมอไทยผสมกับเตตราซัยคลิน จะไปเพิ่มการซึมผ่านยาปฏิชีวนะเข้าสู่ไซโตพลาสซึมผ่าน transmembrane protein หรือ efflux pump ของแบคทีเรียแกรมบวกและลบได้ดียิ่งขึ้น จึงทำให้ยาเตตราซัยคลินมีผลไปยับยั้งการทำงานของ 30s ribosome ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก (Chopra & Roberts, 2001) หรือสารประกอบบางตัวในสมอไทยอาจจะไปรบกวนการผ่านเข้าออกของอิเล็คโตรไลท์ของแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก (Gupta & Birdi, 2017) งานวิจัยนี้สนับสนุนกับงานวิจัยของ Mandeville & Cock (2018) ที่ทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดจากผลสมอไทยที่สกัดด้วยเมทานอลผสมกับเตตราซัยคลินและคลอเรมเฟนนิคอล แล้วสามารถเสริมฤทธิ์กับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. mirabilis* และ *K. pneumoniae* และในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากผลสมอไทยที่สกัดด้วยเอทานอลร่วมกับยาแอมพิซิลลินและออกซี่เตตราซัยคลิน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* และ *B. subtilis* แต่ผลการวิจัยนี้ก็พบการแสดงฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารสกัดจากผลสมอไทย หรือแอมพิซิลลินเพียงชนิดเดียวในการยับยั้งเชื้อ *E. coli และ S. aureus* ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Zuo *et al.* (2012) ที่ทดสอบด้วยสาร 8-acetonyl-dihydroberberine (แยกได้จากสมอไทย) เมื่อใช้ร่วมกับยาแอมพิซิลลิน พบว่าแสดงฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียวกันในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (MRSA) โดยมีค่า FICI เท่ากับ 1.5 นอกจากนี้ยังพบการต้านฤทธิ์กันของสารสกัดจากผลสมอไทยร่วมกับยาออกซี่เตตราซัยคลินในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ซึ่งยังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจน

การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียเป็นกลไกที่แบคทีเรียใช้เพิ่มการเจริญ ทำให้สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวเนื้อเยื่อที่มันสัมผัส เพิ่มโอกาสให้แบคทีเรียมีชีวิตรอด เพิ่มอัตราการติดเชื้อของแบคทีเรีย และปรับตัวดื้อยาปฏิชีวนะ ก่อนกระจายไปยังอวัยวะสำคัญต่างๆ ของผู้ติดเชื้อ (Verderosa *et al*., 2019) จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสารสกัดจากผลสมอไทย อาจจะช่วยลดอันตรายของผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา โดยการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสารสกัดจากผลสมอไทย พบว่าสารสกัดจากผลสมอไทยเมื่อใช้ความเข้มข้นต่ำกว่าค่า MIC ของสารสกัดจากผลสมอไทย (เท่ากับค่า 1/64MIC – 1x MIC) สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก ทั้งนี้

อาจเกิดจากสารบางกลุ่ม เช่น กรดชีบูลินิก (chebulinic acid) กรดชีบูลิก (chebulic acid), กรดแทนนิก (tannic acid) และกรดแกลลิก (gallic acid) มักพบได้จากการสกัดด้วยเอทานอลจากผลสมอไทยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย(Nigam *et al.,* 2020) เช่นเดียวกับรายงานของ Awadelkareem *et al*. (2022) พบว่าสารประกอบอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ฟีโนลิค เทอร์พีน (terpene) ไกลโคไซด์ (glycoside) ซาโปนิน (saponin) ที่สกัดได้จากสารสกัดจากผักร็อคเก็ต (*Eruca sativa*) สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus P. aeruginosa E. coli* และ Chattopadhyay & Bag (2017) ได้ศึกษาสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากผลสมอไทยคือ gallotannin 1,2,6-tri-O-galloyl-beta-D glucopyranose และเมื่อใช้ร่วมกับยาเจนตามัยซิน และยาไทรเมโทพริม สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* และ Wen *et al*. (2021) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไบโอฟิล์มของสารฟลาโวนอยด์ คือ naringenin จากส้มในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 6538 โดยไปลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม ปัจจุบันพบรายงานของสารบริสุทธิ์หลายกลุ่มที่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย ได้แก่ สารกลุ่มเทอร์พีน เช่น carvacol, thymol, geraniol, tran-cinnamaldehyde ซึ่งสังเคราะห์จากเปลือกของซินนาม่อน สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* โดยไปยับยั้งโปรตีนสื่อสารเพื่อใช้สร้างไบโอฟิล์ม (Quorum sensing) เป็นต้น (Gupta & Birdi, 2017) นอกจากนี้สมอไทยไม่มีความเป็นพิษ เมื่อให้หนูแรทเพศผู้สายพันธุ์วิสตาร์กิน ethanedioic acid ที่สกัดจากสมอไทย (LC_{50} เท่ากับ 7,500 mg/kg) (Kim *et al.,* 2006) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการนำสารสกัดจากผลสมอไทยมาผสมกับยาปฏิชีวนะ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งอาจจะนำมาใช้ทดแทนหรือลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะ ทั้งนี้เพื่อลดผลข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะ

ดังนั้นงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากผลสมอไทยสามารถเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียด้วย ซึ่งสามารถนำผลการศึกษามาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการพิจารณาในการนำผลสมอไทยมาเป็นทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคที่ติดเชื้อจากแบคทีเรียดื้อยา ลดผลข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะ ทดแทนยาปฏิชีวนะที่ใช้ไม่ได้ผล หรือนำมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะเพื่อเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียดื้อยา อย่างไรก็ตามควรนำสารสกัดจากผลสมอไทยผสมยาปฏิชีวนะไปทดสอบระดับความเป็นพิษ และหาสารบริสุทธิ์สำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและต้านไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อดื้อยาต่อไป

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากผลสมอไทยเมื่อใช้ร่วมกับยาแอมพิซิลลินสามารถเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* และ *B. subtilis* และสารสกัดจากผลสมอไทยเมื่อใช้ร่วมกับยาออกซี่เตตราซัยคลิน สามารถเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และสารสกัดจากผลสมอไทยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่ายาออกซี่เตตราซัยคลิน จากผลการวิจัยนี้สามารถนำสารสกัดจากผลสมอไทยมาประยุกต์ใช้ทดแทน หรือเสริมฤทธิ์ยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสดื้อยา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี เนื่องจากได้รับการสนับสนุนเครื่องมือวิจัยจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และโรงพยาบาลศูนย์ชลบุรี จังหวัดชลบุรี ที่ให้ความความอนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Aneja, K.R. & Joshi, R., (2009). Evaluation of antimicrobial properties of fruit extracts of *Terminalia chebula* against dental caries pathogens. *Jundishapur Journal of Microbiology, 2*(3), 105-111.

Awadelkareem, A.M., Shammari, E.A., Elkhalifa, A.O., Adnan, M., Siddiqui, A.J., Mahmood, D., Azad, Z.R.A., Patel, M., Mehmood, K., Danciu, C., & Ashraf, S.A. (2022). Anti-adhesion and antibiofilm activity of *Eruca sativa* Miller extract targeting cell adhesion proteins of food-borne bacteria as a potential mechanism: combined in vitro in silico approach. *Plants (Basel), 11*(5), 610.

Bonjar, G.H. (2004). Inhibition of Clotrimazole-resistant *Candida albicans* by plants used in Iranian folkloric medicine. *Fitoterapia, 75*, 74-76.

Bulbul, M.R.H., Chowdhury, M.N.U., Naima, T.A., Sami, S.A., Imtiaj, M.S., Huda, N., & Uddin, M.G. (2022). A comprehensive review on the diverse pharmacological perspectives of *Terminalia chebula* Retz. *Heliyon,14*, 8(8), e10220. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e10220.3-12.

Chattopadhyay, A.& Bag, R.R. (2017). Synergistic antibiofilm efficacy of a gallotannin 1,2,6-tri-O-galloyl-β-D-glucopyranose from *Terminalia chebula* fruit in combination with gentamicin and trimethoprim against multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *PLoS One ,12*(5), e017871. Doi: 10.1371/journal.pone.0178712.

Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, Molecular Biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Review, 65*(2), 232-260.

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*(25). doi: 10.1186/1476-0711-10-25.

CLSI. (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Ko, W.C., Lee, N.Y., Su, S.C., Dijkshoorn, L., Vaneechoutte, M., Wang, L. R., Yan, J. J., & Chang, T. C. (2008). Oligonucleotide array-base identification of species in the *Acinetobacter calcoaceticos-A. baumannii* complex in Isolates from blood culture and antimicrobial susceptibility testing of the Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(6), 2052-2059.

El-Wafa, W.M.A., Ahmed, R.H., & Ramadan, M.A.H. (2020). Synergistic effects of pomegranate and rosemary extracts in combination with antibiotics against antibiotic resistance and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology, 51*(3), 1079-1092.

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

Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K., & Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine, 15*, 639–652.

Kathirvel, A., & Sujatha, V. (2012). In vitro assessment of antioxidant and antibacterial properties of *Terminalia chebula* Retz. leaves. *Tropical Biomedicine, 2*(2), 788-790.

Kim, H.G., Cho, J.H., Jeong, E.Y., Lim, J.H., & Lee, S.H. (2006). Growth inhibitory activity of active component of *Terminalia chebula* fruits against intestinal bacteria. *Journal of Food Protection, 69*(9), 2205-2209.

Kim, G., Gan, R.Y., Zhang, D., Farha, A.K., Habimana, O., Mavumengwana, V., Li, X.H., & Corke, H. (2020). Large- scale screening of 239 traditional Chinese medicinal plant extracts for their antibacterial activities against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* and cytotoxic activities. *Pathogens, 9,* 2-13.

Malekzadeh, F., Ehsanifar, H., Shahamat, M., Levin, M., & Colwell, R.R. (2001). Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Retz) against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *18*, 85-88.

Mandeville, A.,& Cock, I.E. (2018). *Terminalia chebula* Retz. fruit extracts inhibit bacterial triggers of some autoimmune diseases and potentiate the activity of tetracycline. *Indian Journal of Microbiology, 58*, 496–506.

Nam, Y.J.,& Hwang, Y.S. (2021). Antibacterial and antioxidant effect of ethanol extracts of *Terminalia chebula* on *Streptococcus mutans*. *Clinical and Experimental Dental Research, 7*(6), 987–994.

Nehme, D., Li, X.Z., Elliot, R., & Poole, K. (2004). 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, 186*(10), 2973–2983.

Nigam, M., Mishra, A.P., Devkota, A.A., Dirar, A.I., Hassan, Md.M., Adhikari, A., Belwal, T., & Devkota, H.P. (2020). Fruits of *Terminalia chebula* Retz.: A review on traditional uses, bioactive chemical constituents and pharmacological activities. *Phytotherapy Research, 34*, 2518–2533.

Sadeghnia, H.R., Jamshidi, R., Afshari, A.R., Mollazadeh, H., Forouzanfar, F. ,& Rakhshandeh, H. (2017). *Terminalia chebula* attenuates quinolinate-induced oxidative PC12 and OLN-93 cell death. *Multiple Sclerosis and Related Disorders, 14,* 60–67.

Sharma, C., Aneja, K.R., Kasera, R. ,& Aneja, A. (2012). Antimicrobial potential of *Terminalia chebula* Retz. fruit extracts against ear pathogens. *World Journal Otorhinolaryngol*, *2*(2), 8-12.

Verderosa, A. D., Totsika, M., & Fairfull-Smith, K. E. (2019). Bacterial biofilm eradication agents: a current review. *Frontiers in Chemistry* ,*7*(824). doi: 10.3389/fchem.2019.00824.

Wen, Q.H., Wang, R., Zhou, S.Q., Chen, B.R., & Zeng, X.A. (2021). Inhibition of biofilm formation of foodborne *Staphylococcus aureus* by the citrus flavonoid Naringenin. *Foods*, *10*(11), 2614. doi: 10.3390/foods10112614.

Zheng, X., Chen, L., Zeng, W., Liao, W., Wang, Z., Tian, X., Fang, R., Sun, Y., & Zhou, T. (2021). Antibacterial and anti-biofilm efficacy of chinese dragon's blood against *Staphylococcus aureus* isolated from infected wounds. *Frontiers in Microbiology, 12*(672943). doi: 10.3389/fmicb.2021.672943.

Zhou, G., Shi, Q. S., Huang, X.M. , & Xie, X.B. (2015). The three bacterial lines of defense against antimicrobial agents. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(9), 21711-33.

Zuo, G.Y., Li, Y., Han, J., Wang, G.C., Zhang, Y.L., & Bian, Z.Q. (2012). Antibacterial and synergy of berberines with antibacterial agents against clinical multi-ก๓ug resistant isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Molecules, 17*(9), 10322-10330. doi: 10.3390/molecules170910322.