

**การเสริมฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและสร้างไบโอฟิล์มของ Glochidonol จาก
Glochidion acuminatum กับยาปฏิชีวนะต่อเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส
Synergistic Antibacterial and Antibiofilm Activity of Glochidonol Isolated from
Glochidion acuminatum with Antibiotics against Opportunistic Bacteria**

วิสาตรี คงเจริญสุนทร* และ ธาดากรณ์ ไสอิน

Wisatre Kongcharoensuntorn* and Thadakorn So-in

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศไทย

Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Thailand

Received : 16 May 2025, Received in revised form : 10 November 2025, Accepted : 11 November 2025

Available online : 8 January 2026

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : สาร Glochidonol จากตาเลื้อย (*Glochidion acuminatum*) มีสรรพคุณ แก้ปวด ลดไข้ และขับปัสสาวะ และมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ มากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านอาการอักเสบ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสที่พบได้บ่อยในโรงพยาบาลมีอุบัติการณ์การดื้อยาสูง ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Staphylococcus aureus* โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง การติดเชื้อจากแบคทีเรียกลุ่มนี้มักมีความรุนแรงและมีแนวโน้มพัฒนาเป็นการติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) ซึ่งอาจนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนร้ายแรงหรือเสียชีวิต ทำให้การใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลิน (tetracyclines) เช่น Oxytetracycline และกลุ่มเพนนิซิลลิน เช่น Ampicillin มีประสิทธิภาพลดลงและใช้ไม่ได้ผล เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสมีการพัฒนากลไกการดื้อยาลายรูปแบบ เช่น การผลิตเอนไซม์ย่อยยา การลดการซึมผ่านของยา และที่สำคัญคือการสร้างไบโอฟิล์ม คือ โครงสร้างเชิงซ้อนของชั้นเมทริกซ์ชีวภาพ (extracellular polymeric substances) ที่แบคทีเรียหลั่งออกมาเพื่อห่อหุ้มตัวเองและเซลล์ใกล้เคียงภายในกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียทำให้เชื้ออยู่รอดในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และสามารถเกิดการยึดเกาะแน่นบนพื้นผิวสัมผัส เช่น แผล อุปกรณ์ทางการแพทย์ จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่เร่งทำให้เกิดอุบัติการณ์การดื้อยาของแบคทีเรียฉวยโอกาสสูงมาก เนื่องจากยาปฏิชีวนะต้านอนุพันธ์ เช่น ออกซีเตตราซัยคลิน และแอมพิซิลลิน มีประสิทธิภาพลดลงจากกลไกการดื้อยาของแบคทีเรียดังกล่าว การพัฒนาการรักษาแบบใหม่จึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วน หนึ่งในแนวทางที่มีความเป็นไปได้สูง คือการผสมผสานสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติเข้ากับยาปฏิชีวนะที่มีอยู่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรีย สารบริสุทธิ์ธรรมชาติคือ Glochidonol เป็นที่น่าสนใจเป็นพิเศษ เนื่องจากอาจช่วยยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม เพิ่มการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย หรือยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ซึ่งส่งผลให้ฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะแบบดั้งเดิมมีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังนั้นการใช้ Glochidonol ร่วมกับยาปฏิชีวนะอาจจะเป็นทางเลือกใหม่และเป็นการศึกษาครั้งแรกของสารนี้ เพื่อแก้ปัญหาเชื้อแบคทีเรียดื้อยา และลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย

ดื้อยาในสิ่งแวดล้อมได้อย่างยั่งยืน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเสริมฤทธิ์การยับยั้งการเจริญและสร้างไบโอฟิล์มของ *Glochidionol* ที่แยกได้จากตาเสือ (*Glochidion acuminatum*) ต่อเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส

วิธีดำเนินการวิจัย : งานวิจัยนี้ศึกษาประสิทธิภาพของสาร *Glochidionol* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส โดยการหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ด้วยวิธี Broth microdilution assay โดยเติม *Glochidionol* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหาร Mueller Hinton Broth และผสมกับเชื้อแบคทีเรีย 1×10^8 CFU/ml จากนั้นบ่มที่ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง และวัดค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร เพื่อหาค่า MIC และหาค่าการเสริมฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยค่า Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) ด้วยวิธี Checkerboard microdilution assay โดยผสม *Glochidionol* กับยาปฏิชีวนะ จากนั้นนำสารที่ผสมแล้วมาใส่เชื้อแบคทีเรีย 1×10^8 CFU/ml และบ่มตามวิธี MIC แล้วคำนวณค่า FICI เพื่อวิเคราะห์การเสริมฤทธิ์ ส่วนการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย ทดสอบด้วยวิธีการย้อมสีคริสตัลไวโอเลต (Crystal Violet Assay) โดยเติมสาร *Glochidionol* หรือยาปฏิชีวนะ จากนั้นบ่ม 24 ชั่วโมง แล้วล้างแบคทีเรียส่วนเกินด้วย Phosphate Buffered Saline จากนั้นย้อมสีไบโอฟิล์มด้วยคริสตัลไวโอเลต 0.1% ตีรังด้วยเมทานอล 100% แล้วละลายตะกอนแบคทีเรียด้วยกรดอะซิติก 33% แล้ววัดการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร

ผลการวิจัย : พบว่าสารบริสุทธิ์ *Glochidionol* (GE-12) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสได้ทั้งในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก และกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ GE-12 โดยแสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีที่สุด โดยในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ GE-12 สามารถยับยั้งเชื้อ *Acinetobacter baumannii* และ *Klebsiella pneumoniae* มีค่า MIC เท่ากับ 128 ไมโครโมลาร์และเมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดพบว่า GE-12 มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับแอมพิซิลลินและออกซีเตตราซัยคลิน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง GE-12 แสดงการเสริมฤทธิ์กับยาออกซีเตตราซัยคลินต่อเชื้อ *Escherichia coli* โดยมีค่า FICI เท่ากับ 0.56 และให้ผลการต้านฤทธิ์กับเชื้อ *P. aeruginosa* (FICI เท่ากับ 32) แต่ไม่ให้ผลการทดสอบกับเชื้อ *A. baumannii* การศึกษา time kill assay พบว่า สาร GE-12 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 8 เมื่อใช้ ความเข้มข้นสาร GE-12 (1/64 MIC) 16 μM และความเข้มข้นยาออกซีเตตราซัยคลิน (1/8MIC) 256 μM และยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 8 เมื่อใช้ความเข้มข้นสารบริสุทธิ์ GE-12 (1/32MIC) 16 μM และความเข้มข้นยาออกซีเตตราซัยคลิน (1xMIC) 2048 μM นอกจากนี้พบว่า GE-12 ความเข้มข้น 2048 μM สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *A. baumannii*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุดในช่วงเวลา 2-24 ชั่วโมง โดยประสิทธิภาพการยับยั้งอยู่ในช่วง 25-68%

สรุปผลการวิจัย : *Glochidionol* ที่แยกได้จาก *G. acuminatum* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก และสามารถเสริมฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาและไม่ดื้อยาบางสายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* และ *P. aeruginosa*

คำสำคัญ : *Glochidionol*, ตาเสือ, การเสริมฤทธิ์, ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย, ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

Abstract

Background and Objectives: Glochidonol, a bioactive compound isolated from *Glochidion acuminatum*, has been traditionally recognized for its analgesic, antipyretic, and diuretic properties. In recent years, scientific investigations have revealed that Glochidonol also possesses a broad spectrum of biological activities, including anti-inflammatory, antibacterial, antioxidant, and anticancer effects. These properties make it a promising candidate in the search for novel agents to combat emerging threats from drug-resistant microorganisms. Opportunistic bacterial pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus* are increasingly responsible for healthcare-associated infections, especially among immunocompromised individuals. Infections caused by this group of bacteria are often severe and tend to develop into bloodstream infections (septicemia), which may lead to serious complications or death. This condition reduces the effectiveness of antibiotics in the tetracycline group (such as Oxytetracycline) and the penicillin group (such as Ampicillin), rendering them less effective or ineffective. Opportunistic bacteria have developed various mechanisms of antibiotic resistance, such as producing drug-degrading enzymes, reducing membrane permeability, and most importantly, forming biofilms, complex structures composed of extracellular polymeric substances (EPS) secreted by the bacteria to encapsulate themselves and neighboring cells within the community. This protective matrix enables the bacteria to survive under unfavorable environmental conditions and adhere firmly to surfaces such as wounds or medical devices, making biofilm formation a key factor that accelerates the high incidence of antibiotic resistance among opportunistic bacteria. As conventional antibiotics such as Oxytetracycline) and Ampicillin) become less effective due to these resistance mechanisms, the development of new therapeutic strategies is urgently needed. One promising approach is the combination of natural bioactive compounds with existing antibiotics to restore or enhance antibacterial efficacy. Natural products like Glochidonol are of particular interest because they may disrupt biofilm formation, increase bacterial membrane permeability, or inhibit resistance-related enzymes, thereby potentiating the activity of conventional antibiotics. Therefore, the use of Glochidonol in combination with antibiotics may represent a new therapeutic alternative and constitutes the first study of this compound. Given this context, this study aims to evaluate the potential synergistic effects of Glochidonol, in combination with standard antibiotics, against opportunistic bacterial pathogens, with a particular focus on its ability to inhibit bacterial growth and biofilm formation. By investigating these combined effects, the research seeks to provide a scientific basis for utilizing Glochidonol as a complementary agent in antimicrobial therapy, offering a novel and sustainable strategy to combat drug-resistant infections and reduce the environmental impact of antibiotic-resistant bacteria.

Methodology : This study investigates the efficacy of Glochidonol in inhibiting the growth of opportunistic bacteria by determining the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) using the broth microdilution assay. Glochidonol was prepared in various concentrations in Mueller Hinton Broth (MHB) and mixed with bacterial suspensions adjusted to 1×10^8 CFU/mL. The samples were incubated at 37°C for 18–24 hours, and bacterial growth was conducted by measuring optical density at 600 nm (OD_{600}) to determine the MIC. To evaluate the synergistic antibacterial activity, the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) was calculated using the checkerboard microdilution assay. Glochidonol was combined with antibiotics, and the mixtures were tested against bacterial suspensions at 1×10^8 CFU/mL, following the same incubation protocol as the MIC assay. The FICI was calculated to determine potential synergistic effect between Glochidonol and antibiotics. The anti-biofilm activity of Glochidonol was determined using the Crystal Violet Assay. Bacterial cultures were incubated with Glochidonol or antibiotics for 24 hours, after which non-adherent cells were removed by washing with Phosphate Buffered Saline (PBS). Bacterial biofilms were stained with 0.1% crystal violet, fixed with 100% methanol, and the bacterial bound dye was solubilized using 33% glacial acetic acid. Biofilm biomass was quantified by measuring optical density at 600 nm.

Main results : The purified compound Glochidonol (GE-12) was found to inhibit the growth of opportunistic bacteria, including both Gram-positive and Gram-negative bacteria. GE-12 exhibited its strongest antibacterial activity against Gram-negative bacteria, particularly against *A. baumannii* and *K. pneumoniae*, with a MIC of 128 μ M. When compared with conventional antibiotics, GE-12 demonstrated comparable efficacy to Ampicillin and Oxytetracycline. Moreover, GE-12 showed the best synergistic effect with Oxytetracycline against *Escherichia coli*, with a FICI value of 0.56. In contrast, it showed antagonistic effect against *Pseudomonas aeruginosa* (FICI = 32) and had no synergistic effect against *A. baumannii*. The time-kill assay revealed that GE-12 most effectively inhibited *E. coli* growth at 8 hours when used at 16 μ M (1/64 MIC) in combination with Oxytetracycline at 256 μ M (1/8 MIC). For *P. aeruginosa*, the best inhibitory effect was observed when GE-12 at 16 μ M (1/32 MIC) was combined with Oxytetracycline at 2048 μ M (1 $\times$ MIC). Additionally, GE-12 at a concentration of 2048 μ M was most effective in inhibiting biofilm formation of *A. baumannii*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* over a 2–24hour period, with inhibition rates ranging from 25% to 68%.

Conclusions : Glochidonol isolated from *G. acuminatum* demonstrated stronger inhibitory activity against Gram-negative bacteria compared to Gram-positive bacteria. It also exhibited synergistic effects in inhibiting bacterial growth and biofilm formation in both drug-resistant and non-resistant strains, particularly *E. coli* and *P. aeruginosa*.

Keywords : glochidonol; *Glochidion acuminatum*; synergistic effect; antibacterial activity; antibiofilm activity

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

Introduction

เชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ปกติอาจไม่ก่อโรคในบุคคลทั่วไป แต่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือผู้ที่อยู่ในภาวะวิกฤต เช่น ผู้ป่วยในโรงพยาบาล โดยเฉพาะผู้ที่ได้รับการรักษาด้วยเครื่องช่วยหายใจ ใส่สายสวน หรือเข้ารับการผ่าตัด เชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสที่พบได้บ่อยในโรงพยาบาล ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ทางเดินปัสสาวะ แผลติดเชื้อ และการติดเชื้อในกระแสเลือด (bloodstream infections) ปัจจัยที่ทำให้เชื้อฉวยโอกาสเหล่านี้รุนแรงขึ้น คือ ความสามารถในการพัฒนาและถ่ายทอดความดื้อต่อยาปฏิชีวนะ รวมถึงการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ช่วยให้เชื้อแบคทีเรียหลบเลี่ยงการถูกทำลายจากทั้งยาปฏิชีวนะและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Verderosa *et al.*, 2019) ไบโอฟิล์ม คือ กลไกหนึ่งของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างขึ้นเพื่อใช้เจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย และเข้าไปติดเชื้อในเซลล์ของผู้ป่วย การสร้างไบโอฟิล์มนี้ทำให้เกาะติดผิวเนื้อเยื่อของผู้ติดเชื้อ เช่น การติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในปอดก่อให้เกิดโรค cystic fibrosis การติดเชื้อ *Escherichia coli* และ *S. aureus* ก่อให้เกิดโรค colitis, urethritis และ gingivitis เป็นต้น (Verderosa *et al.*, 2019) และจากการศึกษาพบว่า แบคทีเรีย (Planktonic cell) ที่เติบโตในไบโอฟิล์มมักเกิดความทนทานต่อยาปฏิชีวนะมากกว่าหลายพันเท่า ทำให้เชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสมีอุบัติการณ์การดื้อยาเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพของยาที่ใช้รักษาน้อยลง หรือต้องเพิ่มปริมาณยาเพื่อรักษา (Verderosa *et al.*, 2019) จากปัญหาเหล่านี้จึงต้องพัฒนายาชนิดใหม่ หรือหาทางเลือกใหม่เพื่อรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาส ปัจจุบันมีนักวิจัยมากมายคิดค้นหาสารจากธรรมชาติหรือจากสมุนไพรที่มีประวัติการใช้อย่างปลอดภัย เพื่อมาใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้ใช้ (El-Wafa *et al.*, 2020) เช่น การนำสารสกัดจากสมุนไพรมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ เช่น เทอร์พีนฟีนอล (ไทมอลและคาร์วาโคล) เทอร์พีนอัลดีไฮด์ (ซิทรัล) สารสกัดจากเมล็ดส้มโอ และสารสกัดจากพืช *Ficus Sansibarica* (Kim *et al.*, 2022; Song *et al.*, 2019) *Glochidion acuminatum* หรือตาเสือเป็นพืชสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ Phyllanthaceae เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ใบเลี้ยงเดี่ยว มีสรรพคุณ แก้ปวด ลดไข้ และขับปัสสาวะ (Smitinand *et al.*, 2007) พืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน เช่น *G. hongkongense* (ไคร้ร่มด) *G. daltonii* (ไคร้) *G. sphaerogynum* (ไคร้ปลา) เป็นต้น (Welzen & Chayamarit, 2007) พบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญได้แก่ lupane, triterpenoids, flavonoid และ saponin ปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารกลุ่ม lupane ได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus pyocyaneus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *Salmonella paratyphi* และ *Salmonella typhi* (Nhien *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012) พืชในสกุล *Glochidion* มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ โดยเฉพาะสารในกลุ่มฟีนอลิก ได้แก่ กรดแกลลิก (gallic acid) และ เมทิลแกลเลต (methyl gallate) ซึ่งสารกลุ่มนี้สามารถรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ (Linh *et al.*, 2024) ยกตัวอย่างพืช *G. acuminatum* พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยมีค่า IC₅₀ ในการทดสอบ DPPH เท่ากับ 14.97 µg/mL (Khalequeuzzaman *et al.*, 2023) ในปัจจุบันพบการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารบริสุทธิ์ต่างๆ ในพืชสกุล *Glochidion* (Khalequeuzzaman *et al.*, 2023) และที่สำคัญพบว่า Glochidonol มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Thang *et al.*, 2011) แต่ยังไม่พบรายงานการเสริมฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์การต้านการสร้างไบโอฟิล์มของสาร Glochidonol ด้วยเหตุนี้งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาสาร Glochidonol

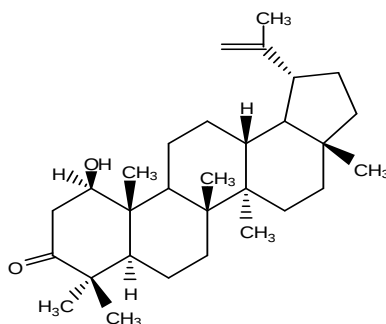
ที่แยกได้จาก *G. acuminatum* เพื่อใช้พัฒนาเป็นยาต้านจุลชีพจากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย งานวิจัยนี้จึงเป็นการนำเสนอทางเลือกใหม่เพื่อนำสาร Glochidonol มารักษาการติดเชื้อฉวยโอกาสที่ดื้อยาอย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัยมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้จะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการรักษา ลดการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะสู่สิ่งแวดล้อม และลดอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส (Cheesman *et al.*, 2017)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการเสริมฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตและการสร้างไบโอฟิล์มของสาร Glochidonol จากตาเสือ (*G. acuminatum*) ต่อเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส เพื่อนำข้อมูลของสารบริสุทธิ์จากตาเสือไปพัฒนาเป็นตัวยารักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่สามารถนำไปใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ หรือสามารถใช้ควบคู่กับยาปฏิชีวนะ รวมไปถึงสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการต่อยอดเพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในอนาคต

Methodology

การเตรียมสารบริสุทธิ์

Glochidonol (GE-12) แยกได้จากรากของต้นตาเสือ (*G. acuminatum*, รหัส BKF147876) ซึ่งเก็บจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ด้วยความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.วารี เนื่องจำนงค์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา หลังจากสกัดด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยภายใต้ความดัน สารสกัดถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ จากนั้นวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ด้วย NMR spectroscopy เพื่อระบุหมู่ฟังก์ชันตำแหน่งของอะตอม และยืนยันโครงสร้างของสารตามแนวทางของ Puapairoj *et al.* (2005) ดังแสดงใน Figure 1



Figures 1 Structure of Glochidonol (GE-12) (MW 440)

แบคทีเรียทดสอบ

แบคทีเรียทดสอบจำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อไม่ดื้อยา คือ *E. coli*, *Bacillus subtilis*, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Serratia marcescens*

และ *S. aureus* ได้รับความอนุเคราะห์และยืนยันสายพันธุ์ทางชีวเคมีจากภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยา ได้แก่ เชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายชนิด (ดื้อต่อยาหลายกลุ่ม เช่น amikacin, ciprofloxacin, sulperazon และ carbapenems แต่ไวต่อ gentamicin) และเชื้อ *P. aeruginosa* ดื้อยา (รหัสสายพันธุ์ 1-375/04-2013; ดื้อต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides, β -lactams, carbapenems และ quinolones) ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลชลบุรี

การเตรียม stock ของสาร Glochidonol

เตรียม Master stock ของสาร Glochidonol 0.72995 กรัม (มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 440 กรัมต่อโมล) เติมน้ำ DMSO 20 มิลลิเมตร เป็นตัวทำละลาย ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 82950 μM กรองโดยใช้กระดาษขนาด 0.2 μm จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปเจือจางที่ความเข้มข้น 4096 μM โดยใช้สารละลายจาก Master stock จำนวน 49.60 μL เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ครบ 1000 μL และทำการเจือจางด้วยเทคนิค two-fold dilution ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 8–2,048 μM ตามลำดับ และเก็บในที่ปราศจากแสง

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration, MIC)

ทดสอบด้วยวิธี Broth microdilution assay (CLSI, 2024) โดยการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย (1×10^8 CFU/mL) ผสมกับ Glochidonol หรือยาปฏิชีวนะมาตรฐาน (positive control) คือ ยาแอมพิซิลลิน (Ampicillin) และออกซีเตตราซัยคลิน (Oxytetracycline) จำนวน 100 μL ที่เจือจางความเข้มข้น 8–2,048 μM ใน Mueller Hinton Broth (MHB) จำนวน 100 μL หลังจากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยการวัดการดูดกลืนแสง OD₆₀₀ (Optical Density at 600 nm) โดยใช้เครื่อง microplate reader (VersaMax, USA) เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC)

การศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์

การทดสอบใช้วิธีเดียวกับการหาค่า MIC แต่ออกแบบการผสม Glochidonol กับยาปฏิชีวนะยาแอมพิซิลลิน และออกซีเตตราซัยคลิน ด้วยเทคนิค checkerboard assay (Chung *et al.*, 2011) โดยผสม Glochidonol ที่ความเข้มข้น 16 μM - 4,096 μM กับยาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้น 16 μM - 4,096 μM อย่างละ 50 μL จากนั้นผสมสารทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 100 μL (1×10^8 CFU/mL) และเติม Mueller Hinton Broth (MHB) 100 μL ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมงทำการทดสอบ 3 ซ้ำ จากนั้นวัดวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยการวัดการดูดกลืนแสง OD₆₀₀ ด้วย microplate reader และหาค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน เพื่อกำหนดค่า FIC ของยาปฏิชีวนะและ FIC ของสารบริสุทธิ์ จากนั้นคำนวณค่า FICI ตามสูตร 1-3 ดังนี้ :

$$1. \text{ FIC ของยาปฏิชีวนะ} = \text{MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน} / \text{MIC ของยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว} \quad (1)$$

$$2. \text{ FIC ของสารบริสุทธิ์} = \text{MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน} / \text{MIC ของสารบริสุทธิ์เพียงอย่างเดียว} \quad (2)$$

$$3. \text{ FICI} = \text{FIC ของยาปฏิชีวนะ} + \text{FIC ของสารบริสุทธิ์} \quad (3)$$

การแปลผล FICI: $FICI < 0.5$ คือเสริมฤทธิ์กัน (synergistic), $0.5 < FICI < 1$ คือเสริมฤทธิ์กันบางส่วน (partial synergistic), $FICI = 1$ คือมีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (additive), $1 < FICI < 4$ คือมีฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (indifferent), $FICI > 4$ คือต้านฤทธิ์กัน (antagonistic)

การศึกษา Time-kill assay

การศึกษากการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียต่อหน่วยเวลา 48 ชั่วโมง ดัดแปลงจาก Ramli *et al.* (2017) ทดสอบโดยเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No. 0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) ปริมาตร 100 μ L และเติม Glochidonol และยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตรอย่างละ 50 μ L ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม MHB 2.8 mL เขย่าส่วนผสมแล้วนำไปบ่มที่ 37°C เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่น + MHB) และชุดเปรียบเทียบ (Glochidonol + ยาปฏิชีวนะ) ตัวอย่างถูกเก็บทุก 2, 4, 6, 8, 10, 24, และ 48 ชั่วโมง เพื่อบันทึกจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่รอดชีวิตโดยการเจือจางตัวอย่าง 10 เท่าในน้ำเกลือ (0.85% NaCl) และเพาะเชื้อบน NA ที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เพื่อบันทึกโคโลนีและคำนวณหาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ (EAA) โดยใช้สูตร 4:

$$EAA \% = \frac{N_0 - N_E}{N_0} \times 100 \quad (4)$$

N_0 คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU/ml) ของกลุ่มควบคุม
 N_E คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU/ml) ของกลุ่มทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

การทดสอบการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (Antibiofilm activity) ทำโดยใช้วิธี microplate assay ตามที่ดัดแปลงจาก Song *et al.* (2019) โดยใช้สาร Glochidonol หรือ Oxytetracycline 100 μ L ลงในไมโครเพลต 96 หลุม ตามด้วยเชื้อแบคทีเรีย (1×10^8 CFU/mL) และ Tryptic Soy broth (TSB) ปริมาตร 100 μ L ใส่ในหลุมเดียวกัน จากนั้นบ่มที่ 37°C สำหรับ 2, 4, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้อมสีไบโอฟิล์มด้วยคริสตัลไวโอเลต 1% และล้างออกด้วย Phosphate Buffered Saline (PBS) ไบโอฟิล์มถูกตรึงด้วยเมทานอล (methanol) 100% แล้วละลายตะกอนแบคทีเรียด้วยกรดอะซิติก (Glacial acetic acid) 33% แล้ววัดการดูดกลืนแสง OD600 โดยใช้ VersaMax microplate reader เพื่อบันทึกเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไบโอฟิล์ม โดยใช้สูตร 5:

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไบโอฟิล์ม (\% inhibition)} = \frac{(\text{OD negative control} - \text{OD experiment})}{\text{OD negative control}} \times 100 \quad (5)$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองจะทำซ้ำสามครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อน ($\bar{x}$ และ SD) โดยใช้ Excel จากนั้นทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทิศทางเดียว (one-way ANOVA) เปรียบเทียบสารบริสุทธิ์กับยา

ปฏิชีวนะ และการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two-way ANOVA) เปรียบเทียบสารบริสุทธิ์ร่วมกับยาปฏิชีวนะ โดยใช้โปรแกรม Minitab version 17 โดยผลความแตกต่างที่มีค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Results

ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของสาร Glochidonol (GE12) จากตาเสือ แสดงดัง Table 1 โดยผลวิจัยแสดงให้เห็นว่าสาร GE-12 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *A. baumannii* และ *K. pneumoniae* (128 μ M) และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญได้ดีกว่าของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *B. cereus*, *B. subtilis* (2048 μ M) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร GE-12 กับยาแอมพิซิลลิน และออกซีเตตราซัยคลิน พบว่า GE-12 มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับยาแอมพิซิลลิน และออกซีเตตราซัยคลินที่นำมาเปรียบเทียบเนื่องจากเป็นยาปฏิชีวนะที่มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกัน

ผลการเสริมฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ผลการเสริมฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบไม่ดื้อยา คือ *E. coli* (Table 2) แสดงให้เห็นว่าสาร GE-12 สามารถเสริมฤทธิ์บางส่วนกับยาออกซีเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* แต่แสดงผลต้านฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ดื้อยา และไม่ให้เกิดผลการทดสอบการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* และงานวิจัยนี้พบว่ายาออกซีเตตราซัยคลินเมื่อนำมาผสมกับ GE-12 มีประสิทธิภาพร่วมกันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ไม่ได้แสดงผลการทดสอบ)

การศึกษา Time kill assay

การศึกษา Time kill assay แสดงดัง Figure 2, 3 พบว่า สาร GE-12 ผสมกับยาออกซีเตตราซัยคลิน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุดในช่วงเริ่มต้นของ log phase คือในช่วงเวลาที่ 8 (84.83%) และเมื่อใช้ความเข้มข้นสารบริสุทธิ์ GE-12 (1/64 MIC) 16 μ M ผสมกับความเข้มข้นยาออกซีเตตราซัยคลิน (1/8MIC) 256 μ M ส่วนการเสริมฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* แสดงให้เห็นว่าเมื่อปรับความเข้มข้นของยาออกซีเตตราซัยคลินและสาร GE-12 จะมีประสิทธิภาพเสริมฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* เมื่อใช้ GE-12 ความเข้มข้น (1/32MIC) GE-12 16 μ M และความเข้มข้นออกซีเตตราซัยคลิน (1xMIC) 2048 μ M ได้ดีที่สุดที่ช่วงเวลาที่ 6 (59.13%) และผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าสาร GE-12 เมื่อนำมาผสมกับยาออกซีเตตราซัยคลินจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ในช่วงเริ่มต้นของ log phase (ช่วงเวลาที่ 2-8)

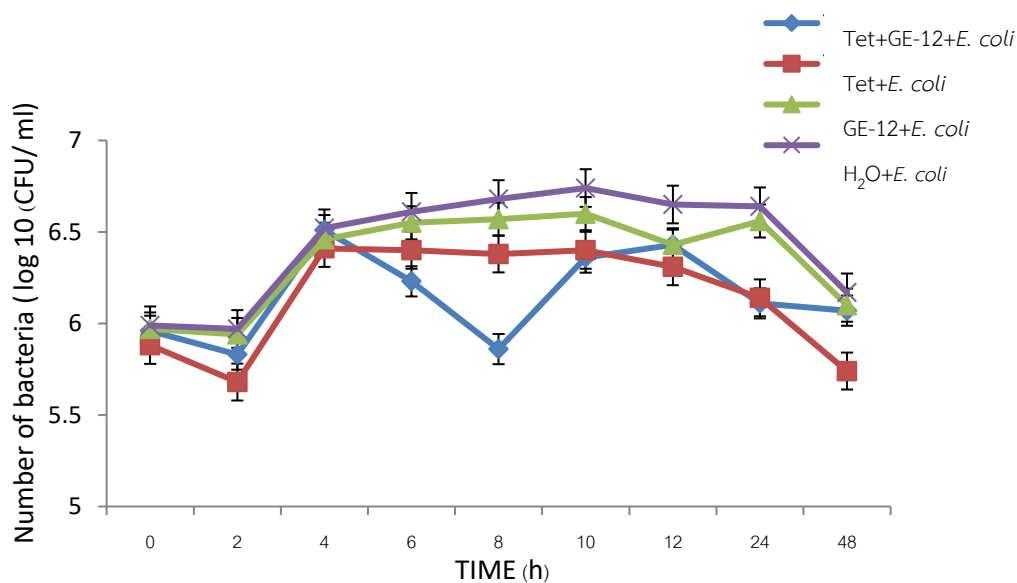
Table 1 Comparison of the antibacterial activity of Glochidonol (GE12) isolated from the roots of *Glochidion acuminatum*

bacteria	Minimum Inhibition Concentration (μ M)		
	GE-12	Ampicillin	Oxytetracycline
<i>B. cereus</i>	2048	128	128
<i>B. subtilis</i>	2048	2048	512
MRSA	512	128	128
<i>S. aureus</i>	2048	128	128
<i>A. baumannii</i>	128	2048	128
<i>E. coli</i>	2048	256	2048
<i>K. pneumoniae</i>	128	128	1024
<i>P. mirabilis</i>	1024	128	2048
<i>P. vulgaris</i>	2048	1024	512
<i>P. aeruginosa</i>	512	128	2048

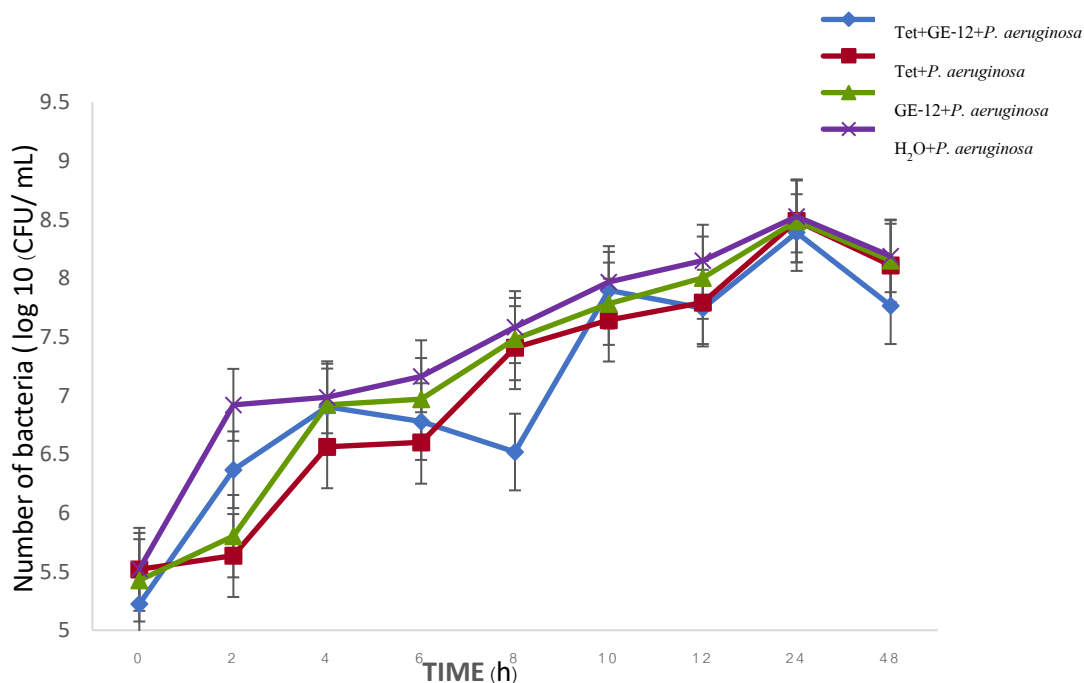
Table 2 The FICI value indicates the synergistic effect between Glochidonol (GE-12) and the antibiotics in inhibiting bacterial growth

Bacteria	The synergistic effect between GE-12 and antibiotics			
	GE-12 + Ampicillin		GE-12 + Oxytetracycline	
	FICI	interpretation	FICI	interpretation
<i>A. baumannii</i>	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	0.5625	partial synergistic
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	32	antagonistic

a synergism as FICI index of ≤ 0.5 , a partially synergism, as FICI index of $0.5 < \text{FICI} < 1$, an additive effect, as FICI index of 1, an indifferent effect, as FICI index of $1 < \text{FICI} \leq 4$, an antagonism, FICI index of > 4



Figures 2 The effect of Glochidonol (GE-12) combined with Oxytetracycline on inhibiting the growth of *E. coli* over time (Time-kill assay)



Figures 3 The effect of Glochidonol (GE-12) combined with Oxytetracycline on inhibiting the growth of *P. aeruginosa* over time (Time-kill assay)

ฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสาร GE-12 เมื่อใช้เพียงชนิดเดียว แสดงผลดัง Figure 4 จากกราฟแสดงให้เห็นว่า GE-12 เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น สาร GE-12 สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ดียิ่งขึ้น เมื่อใช้ GE-12 2048 μ M โดยสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *A. baumannii* *E. coli* และ *P. aeruginosa* ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด (45.22 – 68.56%) และรองลงมาคือ *P. aeruginosa* (43.19–58.74%) และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *A. baumannii* ได้น้อยที่สุด (25.49–27.76%) และสาร GE-12 สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดได้ดี ในช่วงเวลา 2–8 ชั่วโมง

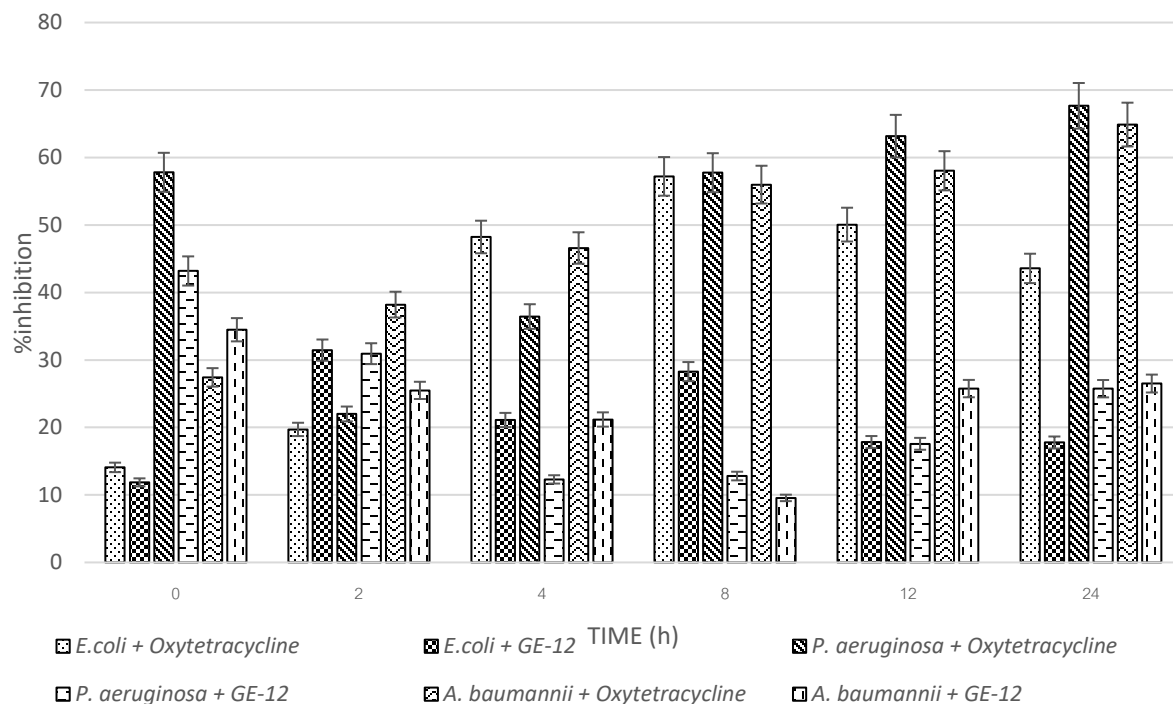


Figure 4 Compare the effectiveness of GE-12 and Oxytetracycline in inhibiting biofilm formation of *A. baumannii*, *E. coli* and *P. aeruginosa* over time

Discussion

สาร Glochidonol ที่พบใน *G. Acuminatum* มีโครงสร้างเป็น Lupane alcohol แสดงผลยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะกับเชื้อ *A. baumannii* และ *K. pneumoniae* และเชื้อแกรมบวก *B. cereus* และ *B. subtilis* ได้เช่นเดียวกับสาร Glochidion มีโครงสร้างเป็น Lupane ketone สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการ

เจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่า (*B. subtilis* และ MRSA) (MICs เท่ากับ 128 μ M) (Kongcharoensuntorn & Somnuk, 2021) อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า Glochidonol ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในวงกว้างมากกว่า Glochidiol และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Linh *et al.* (2024) พบว่าพืชในวงศ์ *Glochidion* ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในวงกว้างเช่นเดียวกัน ดังนั้น Glochidonol จึงเป็นสารบริสุทธิ์ที่มีแนวโน้มเหมาะจะนำไปพัฒนาเป็นยาต้านแบคทีเรียฉวยโอกาสที่พบอุบัติการณ์การดื้อยาปฏิชีวนะสูง เนื่องจาก Glochidonol เป็นสารไตรเทอร์พีนอยด์ ซึ่งอาจไปรบกวนการจำลองดีเอ็นเอ และการสังเคราะห์แมคโครโมเลกุลในเซลล์แบคทีเรีย หรืออาจทำให้เกิดการรั่วไหลของสารเมตาโบไลต์ และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย (Khwaza & Aderibigbe, 2024)

การทดสอบการเสริมฤทธิ์ของ Glochidonol ผู้วิจัยเลือกใช้ยาแอมพิซิลลินและออกซิเตตราซัยคลิน เนื่องจากเป็นยาปฏิชีวนะที่มีกลไกการออกฤทธิ์ต่างกัน และใช้แพร่หลายในทางการแพทย์และอุตสาหกรรมอาหาร อีกทั้งเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดมีแนวโน้มดื้อต่อยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดนี้สูงมาก จึงเหมาะสำหรับการศึกษากลไกการเสริมฤทธิ์ของสารธรรมชาติในการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียและลดการใช้ยาปฏิชีวนะ การทดสอบการเสริมฤทธิ์แสดงให้เห็นว่าสาร Glochidonol สามารถเสริมฤทธิ์กับยาออกซิเตตราซัยคลินในการยับยั้งเฉพาะกับเชื้อ *E. coli* และต้านฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับสาร Glochidiol แยกได้จาก *G. eriocarpum* พบว่า Glochidiol สามารถเสริมฤทธิ์กับเตตราซัยคลินเพื่อยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *P. aeruginosa* แต่ไม่สามารถเสริมฤทธิ์เพื่อยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* เช่นเดียวกัน (Kongcharoensuntorn & Somnuk, 2021) เมื่อเปรียบเทียบกับสาร 3 β ,6 β ,16 β -Trihydroxylup-20(29)-ene จาก *Combretum leprosum* ผสมกับ Amikacin (80-100 μ g/mL) และ Gentamicin (15-20 μ g/mL) สามารถลดค่า MIC ของเชื้อ *E. coli* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ลดการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิด (Teixeira *et al.*, 2023) และสนับสนุนงานวิจัย เมื่อนำ oleanolic acid และ ursolic acid (pentacyclic triterpenoid) จากพืช *Alstonia scholaris* สามารถเสริมฤทธิ์กับยาแอมพิซิลลิน และเตตราซัยคลินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* และ *B. cereus* (Jesus *et al.*, 2015) อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า Glochidonol ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* และต้านฤทธิ์กับยาออกซิเตตราซัยคลินในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งนี้ *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* มีโปรตีนขับยาออกนอกเซลล์ (คือกลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขับสารออกจากแบคทีเรีย (efflux pumps) ชนิดแตกต่างกันได้แก่ AdeABC AdeIJK และ AbeM) ดังนั้นจึงสามารถขับยาในกลุ่ม Carbapenems และ Aminoglycosides ออกนอกเซลล์ของแบคทีเรีย (Kyriakidis *et al.*, 2021) ส่วนผลการต้านฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์กับยาปฏิชีวนะ อาจเกิดจากโปรตีนขับยาออกนอกเซลล์ หรือสารชีวโมเลกุลบางชนิดในเซลล์แบคทีเรียล้างฤทธิ์ของยาออกซิเตตราซัยคลินและแอมพิซิลลิน (Kuate *et al.*, 2010) หรือยาบางชนิดไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่ไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย เพราะประจุลบของยา Tobramycin หักล้างกับประจุลบบนผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (Song *et al.*, 2016)

ผลการศึกษาช่วงเวลาของการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ตอบสนองต่อสาร Glochidonol (Time-kill assay) แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำมาผสม Glochidonol กับยาออกซิเตตราซัยคลิน พบว่าสาร Glochidonol ในสัดส่วนที่เหมาะสมสามารถเสริมฤทธิ์กันเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* และ เชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่แสดงฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียได้น้อยกว่าการใช้ Glochidonol หรือยาออกซิเตตราซัยคลินเพียงชนิดเดียว เช่นเดียวกับงานวิจัยของ

Alrashidi *et al.* (2021) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม (pomegranate rind extract) ผสมกับสังกะสี (Zinc II) สามารถเสริมฤทธิ์กันเพื่อฆ่าเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* เมื่อทดสอบด้วย time-kill assay เช่นเดียวกัน และงานของ Kuete *et al.* (2010) แสดงให้เห็นว่าสาร isobavachalcone ผสมกับสาร diospyrone สามารถเสริมฤทธิ์กันยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* เช่นเดียวกัน โดยสารทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งโปรตีนขับยาออกนอกเซลล์ (efflux pumps) แบคทีเรียดื้อยา จึงช่วยเพิ่มความไวของแบคทีเรียดื้อยาต่อยาปฏิชีวนะ ดังนั้นการเสริมฤทธิ์ของ Glochidonol กับยาออกฤทธิ์เตตราซัยคลินอาจขัดขวางการทำงานของโปรตีนขับยาออกนอกเซลล์แบคทีเรียเช่นเดียวกัน Kuete *et al.* (2010) นอกจากนี้ยังสนับสนุนงานวิจัยของสารอัลคาลอยด์ (cycloberberine) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA ซึ่งอาจจะเกิดจากสารอัลคาลอยด์ไปรบกวนการรวมตัวของฟอสโฟลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย จึงมีผลรบกวนการผ่านเข้าออกของเมตาโบไลต์ (Metabolite) ของแบคทีเรีย (Yang *et al.*, 2018) อย่างไรก็ตามควรนำสาร Glochidonol ไปศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เช่น การรบกวนการผ่านเข้าออกของสารเมตาโบไลต์ (metabolite transport) บนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย หรือสาร Glochidonol อาจออกฤทธิ์ยับยั้งโปรตีนขับยาออกนอกเซลล์

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย แสดงให้เห็นว่าสาร Glochidonol เมื่อใช้เพียงชนิดเดียวสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสนับสนุนกับการนำสาร Berberine ซึ่งเป็นอัลคาลอยด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* และ *S. typhimurium* โดยออกฤทธิ์ยับยั้งระบบ quorum sensing ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการสร้างและคงสภาพไบโอฟิล์ม ทำให้ลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย (Bai *et al.*, 2018) ซึ่งสนับสนุนงานวิจัยที่นำสาร Quercetin เป็นสารฟลาโวนอยด์มีความสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* โดยไปลดระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมโดยระบบ quorum sensing ของแบคทีเรีย ได้แก่ *lasI*, *lasR*, *rhlI* และ *rhlR* (Lu *et al.*, 2019) หรือสนับสนุนงานวิจัยที่นำสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ เช่น terpinen-4-ol มาทดสอบ และแสดงฤทธิ์ยับยั้งไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* เช่นเดียวกัน เพราะไปรบกวนการแสดงออกของยีนควบคุมระบบ quorum sensing และยีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยก่อความรุนแรง (virulence) ของเชื้อแบคทีเรียดื้อยา (Guzzo *et al.*, 2020)

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกของสาร Glochidonol ซึ่งเป็นหนึ่งในอนุพันธ์ของ lupane ที่แยกได้จาก *G. acuminatum* สามารถเสริมฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเมื่อใช้ร่วมกับยาออกฤทธิ์เตตราซัยคลิน โดยมีจุดเด่น คือ แสดงให้เห็นการเสริมฤทธิ์ร่วมกัน (synergistic effect) ระหว่างสารธรรมชาติกับยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะกับ ยากลุ่มเตตราซัยคลินที่ใช้ในอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหารและการแพทย์ และมักทำให้เกิดปัญหาอุปสรรคการดื้อยา ดังนั้นจึงอาจจะเป็นไปได้ที่จะนำสาร Glochidonol ไปการรักษาคิดเชื้อแบคทีเรีย หรือใช้เป็นสารกันบูดที่ปลอดภัยเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร เพื่อลดการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อเป็นการส่งเสริมการประยุกต์ใช้สารธรรมชาติจากพืชท้องถิ่นไทยมีเอกลักษณ์ และพัฒนาแนวทางใหม่ในการควบคุมเชื้อก่อโรคและยืดอายุอาหารในอุตสาหกรรมอาหาร อย่างไรก็ตามควรนำ Glochidonol ไปศึกษาความเป็นพิษ และกลไกการออกฤทธิ์ของสาร Glochidonol ในระดับโมเลกุล เช่น กลไกการทำลายไบโอฟิล์มและการ

ยับยั้งเมตอบอลิซึมของแบคทีเรียด้วยเทคนิค Fluorescence spectroscopy ซึ่งจะทำให้สามารถนำสาร Glochidonol ไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียอย่างปลอดภัย และการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของสาร Glochidonol ร่วมกับยาปฏิชีวนะต่อเซลล์ไลน์ RAW 264.7 (Murine macrophage cell line) ต่อภูมิคุ้มกันและการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดขาวต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย และการศึกษาเซลล์ไลน์เนื้อเยื่อปอด A549 (Human alveolar basal epithelial cells) เพื่อดูระดับความเป็นพิษในเซลล์มนุษย์ต่อไป

Conclusions

สาร Glochidonol ซึ่งเป็นหนึ่งในอนุพันธ์ของ lupane ที่แยกได้จาก *G. acuminatum* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก และสามารถเสริมฤทธิ์กับยาออกซิเตตราซัยคลินในการยับยั้ง *E. coli* แต่ต้านฤทธิ์กับยาออกซิเตตราซัยคลินในการยับยั้ง *P. aeruginosa* นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *A. baumannii* *E. coli* และ *P. aeruginosa*

Acknowledgments

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และโรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี เป็นอย่างสูง ที่ให้การสนับสนุนเชื้อแบคทีเรียสำหรับการวิจัยครั้งนี้ รวมถึงภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการดำเนินการทดลอง จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดี

References

- Alrashidi, A., Jafar, M., Higgins, N., Mulligan, C., Varricchio, C., Moseley, R., Celiksoy, V., Houston, D. M. J., & Heard, C. M. (2021). A time-kill assay study on the synergistic bactericidal activity of pomegranate rind extract and Zn (II) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomolecules*, 11(12), 1889. doi.org/10.3390/biom11121889
- Bai, J., Aswathanarayan, J. B., & Rai, R. V. (2018). Inhibition of biofilm formation and quorum sensing mediated phenotypes by berberine in *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium*. *RSC Advances*, 8(62), 36133–36141. doi.org/10.1039/C8RA06413J

- Cheesman, M. J., Ilanko, A., Blonk, B., & Cock, I. E. (2017). Developing new antimicrobial therapies: Are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? *Pharmacognosy Reviews*, 11(22), 57–72.
- 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), 1–6.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2024). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 34th Ed.* CLSI Document M100-Ed34. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- 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.
- Guzzo, F., Scognamiglio, M., Fiorentino, A., Buommino, E., & D'Abrosca, B. (2020). Plant-derived natural products against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: Antibiofilm activity and molecular mechanisms. *Molecules*, 25(21), 5024. doi.org/10.3390/molecules25215024
- Jesus, J. A., Lago, J. H. G., Laurenti, M. D., Yamamoto, E. S., & Passero, L. F. D. (2015). Antibacterial activity of ursolic acid and oleanolic acid: An update. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 620472. doi.org/10.1155/2015/620472
- Khalequeuzzaman, M., Hasan, S. A., Haque, M., Parul, R., & Alam, R. M. (2023). Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Glochidion acuminatum* leaves. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(2), 65–70. doi.org/10.52711/2231-5691.2023.00017
- Khwaza, V., & Aderibigbe, B. A. (2024). Potential pharmacological properties of triterpene derivatives of ursolic acid. *Molecules*, 29(16), 3884. doi.org/10.3390/molecules29163884
- Kim, G. S., Park, C. R., Kim, J. E., Kim, H. K., & Kim, B. S. (2022). Anti-biofilm effects of *Torilis japonica* ethanol extracts against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(2), 220–227.

- Kongcharoensuntorn, W., & Somnuk, W. (2021). Antibacterial activity of Glochidiol from *Glochidion eriocarpum* enhanced tetracycline against opportunistic bacteria. *Burapha Science Journal*, 26(3), 1–10. (in Thai)
- Kuete, V., Ngameni, B., Tangmouo, J. G., Bolla, J. M., Alibert-Franco, S., Ngadjui, B. T., & Pagès, J. M. (2010). Efflux pumps are involved in the defense of Gram-negative bacteria against the natural products isobavachalcone and diospyrone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5), 1749–1752. doi.org/10.1128/AAC.01533-09
- Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, Z. D., & Tragiannidis, A. (2021). *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. *Pathogens*, 10(3), 373. doi.org/10.3390/pathogens10030373
- Linh, N. N., Hop, N. Q., Nhung, P. T. T., Dao, P. T. T., Manh, P. T. B., Pham, Y. V., & Son, N. T. (2024). *Glochidion* species: A review on phytochemistry and pharmacology. *Journal of Experimental Pharmacology*. doi.org/10.1177/1934578X241276962
- Lu, L., Hu, W., Tian, Z., Yuan, D., Yi, G., Zhou, Y.I. (2019). Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chinese Medicine*, 14, 11. doi.org/10.1186/s13020-019-0232-2
- Nhiem, N. X., Thu, V. K., Kiem, P.V., Minh, C. V., Tai, B. H., Quang, T. H., Cuong, N. X., Yen, P. H., Boo, H. J., Kang, J. I., Kang, H. K., & Kim, Y. H. (2012). Cytotoxic olean-type triterpene saponins from *Glochidion eriocarpum*. *Archives of Pharmacal Research* volume 35(1), 19-26.
- Puapairoj, P., Naengchomnong, W., Kijjoa, A., Pinto, M., Nascimento, M. S., Silva, A. M., & Herz, W. (2005). Cytotoxic activity of lupane-type triterpenes from *Glochidion sphaerogynum* and *Glochidion eriocarpum*, two of which induce apoptosis. *Planta Medica*, 71, 208–213.
- Ramli, S., Radu, S., Shaari, K., & Rukayadi, Y. (2017). Antibacterial activity of ethanolic extract of *Syzygium polyanthum* L. (Salam) leaves against foodborne pathogens and application as food sanitizer. *BioMed Research International*. doi.org/10.1155/2017/9024246
- Smitinand, T., Larsen, K. & Santisuk, T. (2007). *Flora of Thailand*. Vol. 8 part 2. Bangkok: Forest Herbarium, Royal Forest Department.

- Song, T., Duperthuy, M., & Wai, S. N. (2016). Sub-optimal treatment of bacterial biofilms. *Antibiotics*, 5(2), 23. doi.org/10.3390/antibiotics5020023
- Song, Y. J., Yu, H. H., Kim, Y. J., Lee, N. K., & Paik, H. D. (2019). Anti-biofilm activity of grapefruit seed extract against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(8), 1177–1183.
- Teixeira, E. H., Andrade, A. L., Pereira, R., Farias, L. P., Monteiro, G. S., & Marinho, M. M. (2023). Antimicrobial, antibiofilm activities and synergic effect of triterpene 3 β ,6 β ,16 β -trihydroxylup-20(29)-ene isolated from *Combretum leprosum* leaves against *Staphylococcus* strains. *Current Microbiology*, 80(5), 176. doi.org/10.1007/s00284-023-03284-2
- Thang, T. D., Kuo, P. C., Yu, C. S., Shen, Y. C., Hoa, L. T. M., Thanh, T. V., Kuo, Y. H., Yang, M. L., & Wu, T. S. (2011). Chemical constituents of the leaves of *Glochidion obliquum* and their bioactivity. *Archives of Pharmacal Research*, 34(3), 383–389. doi.org/10.1007/s12272-011-0305-y
- Verderosa, A. D., Totsika, M., & Fairfull-Smith, K. E. (2019). Bacterial biofilm eradication agents: A current review. *Frontiers in Chemistry*, 7, 824.
- Welzen, P.C., & Chayamarit, K. (2007). *Flora of Thailand*. Vol. 8 part 2. Bangkok : National park wildlife and plant conservation department.
- Yang, Y. S., Wei, W., Hu, X. X., Tang, S., Pang, J., You, X. F., Fan, T. Y., Wang, Y. X., & Song, D. Q. (2018). Evolution and antibacterial evaluation of 8-hydroxy-cycloberberine derivatives as a novel family of antibacterial agents against MRSA. *Molecules*, 24(5), 984.
- Zhang, X., Chen, J., & Gao, K. (2012). Chemical constituents from *Glochidion wrightii* Benth. *Biochemical Systematics and Ecology* 45, 7-11.