

ฤทธิ์และการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดฟ้าทะลายโจร สารสกัดจันทน์เทศและสารปฏิชีวนะ
ต่อการยับยั้งการเจริญและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียบางสายพันธุ์

วิสาตรี คงเจริญสุนทร^{1*} ตรียุทธ งานแข็ง² มนัสนันท์ หาญวัฒนพงษ์³

Received : October 26, 2023

Revised : March 10, 2025

Accepted : March 23, 2025

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาสารสกัดฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall.Ex Nees) สารสกัดจันทน์เทศ (*Myristica gragrans* Houtt.) และสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญและการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียสามสายพันธุ์ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 พบว่าสารสกัดฟ้าทะลายโจรและสารสกัดจันทน์เทศสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ Minimum Inhibition Concentration (MIC) เท่ากับ 20 - 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรกับสารสกัดจันทน์เทศในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ATCC 27853 มีค่า Fractional Inhibitory Concentration Index เท่ากับ 0.317 ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรร่วมกับจันทน์เทศโดยวิธีย้อมสีด้วยคริสตัลไวโอเลตพบว่าฟ้าทะลายโจรผสมกับจันทน์เทศสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดได้ดีที่สุดในช่วงเวลา 2-4 ชั่วโมง ค่าประสิทธิภาพยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอยู่ในช่วง 56.42-85.03 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรทั้งสองชนิดยังมีประสิทธิภาพต่ำกว่าสารปฏิชีวนะ ดังนั้นสารสกัดฟ้าทะลายโจรผสมสารสกัดจันทน์เทศสามารถใช้แทนสารปฏิชีวนะโดยไม่จำเป็น เพื่อรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย

คำสำคัญ: การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม การเสริมฤทธิ์ จันทน์เทศ ฟ้าทะลายโจร
ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

¹ อาจารย์ประจำหลักสูตรภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อีเมล: wisatre@go.buu.ac.th

² นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อีเมล: 62030511@go.buu.ac.th

³ นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อีเมล: 62030522@go.buu.ac.th

* ผู้นิพนธ์หลัก อีเมล: wisatre@go.buu.ac.th

EFFECTS AND SYNERGISTIC EFFECTS OF CRUDE EXTRACT OF *Andrographis paniculata*,
ROUGH NUTMEG AND ANTIBIOTICS TO ANTIBACTERIAL
AND ANTIBIOFILM AGAINST CERTAIN STRAINS OF BACTERIA

Wisatre Kongcharoensuntorn^{1*} Treeyut Ngankang² Manusanun Hanwattanapong³

Abstract

This research studied the extracts of *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall.Ex Nees, nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) and antibiotics against the growth and biofilm formation of three bacteria, namely *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The result was shown that *A. paniculate* and nutmeg inhibited the growth of *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *S. aureus* ATCC 25923 by Minimum Inhibition Concentration (MIC) ranging between 20-80 mg/ml. *A. paniculate* mixed with nutmeg was revealed synergy effects against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 by Fractional Inhibitory Concentration Index of 0.317. Moreover, the study's result on the synergy effects of *A. paniculate* and nutmeg using crystal violet staining showed that their combination could best inhibit biofilm formation of all three bacteria within 2-4 hours. The efficiency value of their inhibition was between 56.42-85.03 percent. However, synergy effect of the two medicinal plants was less than the activity of antibiotics. Thus, the combination of *A. paniculate* and nutmeg may be a potential candidate as unessential antibiotic for treating infectious disease.

Keywords: Antibiofilm activity, Synergistic effect, *Andrographis paniculate*,
Myristica fargrans, Antibacterial activity

¹ Lecturer of Department of Biology, Burapha University, e-mail: wisatre@go.buu.ac.th

² Undergraduate student of Science Program in Biology Department of Biology, Burapha University, e-mail: 62030511@go.buu.ac.th

³ Undergraduate student of Science Program in Biology Department of Biology, Burapha University, e-mail: 62030522@go.buu.ac.th

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

บทนำ

โรคติดเชื้อแบคทีเรียในโรงพยาบาลเป็นปัญหาสำคัญ ที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล แต่ละปีมีรายงานการพบผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในระหว่างเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นจำนวนมาก จึงเป็นสาเหตุให้อาการของผู้ป่วยมีความรุนแรง และต้องอยู่ในโรงพยาบาลนานขึ้น ซึ่งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบบ่อยที่มักก่อปัญหาได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, Methicillin Resistant *S. aureus* (MRSA) และ เชื้อกลุ่ม *Enterococci* (Prestinaci et al., 2015) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้มีกลไกในการปรับตัวดื้อยาที่หลากหลาย เช่น สร้างโปรตีนขับยาและสารพิษออกนอกเซลล์ ทำให้การรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียไม่ได้ผล ผู้ป่วยต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาเพิ่มมากขึ้น และเสี่ยงต่อการเสียชีวิตสูงมาก และต้องเพิ่มปริมาณยาในการรักษา จึงเร่งให้เกิดอุบัติการณ์การดื้อยาสูงมาก (Abushaheen et al., 2020) นอกจากนี้ปัญหาดังกล่าวแล้วการใช้ยาแอมพิซิลลินและออกซีเตตราไซคลินอย่างพร่ำเพรื่อจะทำให้เชื้อแบคทีเรียดื้อต่อสารปฏิชีวนะ และทำให้สารปฏิชีวนะตกค้างปริมาณมากในสิ่งแวดล้อม (Gupta & Birdi, 2017) ดังนั้นการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่ช่วยลดปัญหาดังกล่าว เช่น การนำพืชสมุนไพรมาผสมกับสารปฏิชีวนะ หรือนำสารสกัดจากสมุนไพรหลาย ๆ ชนิดมาผสมกัน (Mickymarry et al., 2019) โดยงานวิจัยนี้สนใจที่จะใช้พืชสมุนไพรบางชนิด ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*(Burm.f.) Wall.Ex Nees) และจันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.) เพื่อนำมาผสมรวมกันในการรักษาโรคติดเชื้อจุลินทรีย์ดื้อยา เพราะเป็นสมุนไพรที่ใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน และมีความเป็นพิษต่ำ อาจจะช่วยลดความเป็นพิษต่อบุคคลไต่ของผู้ป่วย

ฟ้าทะลายโจร และ จันทน์เทศ มีคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรีย ด้านอนุมูลอิสระ กระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดขาว ยับยั้งการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง ลดอาการอักเสบ รักษาไข้ไทฟอยด์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น (Dzotam et al., 2018; Fardiyah et al., 2020; Hossain et al., 2021;) น้ำมันหอมระเหยจากลูกจันทน์เทศสามารถยับยั้งการเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาเมธิซิลลิน (Oo et al., 2021) และสารสกัดฟ้าทะลายโจรสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่ก่อโรคติดเชื้อในปอด (Sah et al., 2020; Simamora et al., 2018) นอกจากนี้ฟ้าทะลายโจร มีฤทธิ์ลดไข้ แก้อาการอักเสบ ลดอาการคออักเสบ โดยพบสารสำคัญ คือ สารกลุ่ม diterpene lactones ซึ่งได้แก่ andrographolide, neoandrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์(Flavonoid) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้ฟ้าทะลายโจรอย่างกว้างขวางทั้งเป็นยาสามัญประจำบ้านและใช้ในโรงพยาบาล (Hossain et al., 2021) และมีการนำฟ้าทะลายโจรมาใช้รักษาโรคโควิด-19 ส่วนผลจันทน์เทศพบสารสำคัญ ได้แก่ myristicin, elemicin, safrol, eugenol ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยา คือ

E. coli, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *P. stuartii*, *E. cloacae* และ *P. aeruginosa* และใช้เป็นสมุนไพรด้านการอักเสบ ด้านอนุมูลอิสระและด้านแบคทีเรีย (Gupta et al., 2017; Simamora et al., 2018)

การก่อตัวของไบโอฟิล์มเป็นกลยุทธ์ของแบคทีเรียหลายชนิด ที่ใช้ในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ซึ่งทำให้แบคทีเรียสามารถปรับตัวดีเยี่ยม และทำให้การติดเชื้อแบคทีเรียทวีความรุนแรง (Verderosa et al., 2019) ดังนั้นการกำจัดหรือยับยั้งการก่อตัวของไบโอฟิล์มโดยใช้สารสกัดจากธรรมชาติ จึงเป็นช่องทางแรกในการป้องกันโรคติดเชื้อจากจุลชีพ ปัจจุบันพบรายงานวิจัยสารกลุ่มไตรเทอร์พีน (Triterpene) ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย (Silva et al., 2019) หรือสารบริสุทธ์ Oleanolic acid และ Ursolic acid สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* (Lawrence et al., 2020) ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการเสริมฤทธิ์ด้านแบคทีเรียและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของฟ้าทะลายโจรกับจันทน์เทศ เพื่อนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียต่อไป ซึ่งถือว่าเป็นอีกหนึ่งทางเลือกหนึ่งในการป้องกันการติดเชื้อจุลชีพและลดอุปสรรคการก่อตัวของเชื้อแบคทีเรีย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดฟ้าทะลายโจร สารสกัดจันทน์เทศและยาปฏิชีวนะบางชนิดต่อการยับยั้งการเจริญและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย
2. เพื่อศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดฟ้าทะลายโจร สารสกัดจันทน์เทศและสารปฏิชีวนะต่อการยับยั้งการเจริญและการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร (crude extract)

เตรียมเมล็ดและเปลือกหุ้มเมล็ดจากจันทน์เทศที่ตากแห้งจากร้านศรีทองโฮสเทล จังหวัดชลบุรี ในช่วงเดือนตุลาคม 2564 นำมาบดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 106 ไมครอน ให้เป็นผงละเอียดจำนวน 3 กิโลกรัม และนำมาระบุชนิด โดยนักพฤกษศาสตร์ ดร. เบญจวรรณ ชิวปริษา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (รหัสพรรณไม้คือ Buu-Cho/64-10) จากนั้นนำไปสกัดด้วยเอทานอลต่อน้ำ (80:20) (Tan et al., 2014) สัดส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลายเท่ากับ ¼ ที่ใช้ประมาณ 5 วันให้ตกตะกอน จากนั้นนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นำไปคำนวณปริมาณได้สารสกัดหยาบ (crude extract) 21.47 เปอร์เซ็นต์ (107.37 กรัม) จากน้ำหนักเริ่มสกัด จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำจันทน์เทศมาเตรียมความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

เตรียมใบฟ้าทะลายโจรที่ตากแห้ง เก็บมาจาก อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ในช่วงเดือนมิถุนายน - ตุลาคม 2564 นำมาบดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 106 ไมครอน และนำมาระบุชนิด และตั้งชื่อรหัสพรรณไม้อ้างอิง

คือ ScBUU-Cho/63-2 ทำการสกัดใบฟ้าทะลายโจรด้วยเอทานอลเช่นเดียวกับฟ้าทะลายโจร ได้ปริมาณสารสกัดหยาบ เท่ากับ 25.65 เปอร์เซ็นต์ (128.5 กรัม) จากน้ำหนักเริ่มสกัด

จากนั้นนำมาเตรียมเป็นฟ้าทะลายโจร 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เพื่อใช้ทดสอบต่อไป

2. แบคทีเรียทดสอบ

แบคทีเรียสามสายพันธุ์ ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. aureus* ATCC 25923 ยืนยันสายพันธุ์ด้วยการย้อมแกรม และทดสอบทางชีวเคมีด้วย API 20 NE system

3. การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ทดสอบด้วยวิธี broth microdilution assay (CLSI, 2017) โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงใน Mueller Hinton Broth (MHB) (Sigma-Aldrich, U.S.A.) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดปริมาณให้ได้ 1×10^8 โคโลนีฟอร์มมิงยูนิต (Colony forming unit) ต่อมิลลิลิตร (CFU/mL) โดยเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 จากนั้นเติมสารทดสอบความเข้มข้นเริ่มต้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครไตเตอร์เพลท (Microtiter plate) แล้วนำมาเจือจางด้วย MHB 100 ไมโครลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้นลดลงที่ละสองเท่า (0.001-80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไมโครไตเตอร์เพลท ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยทำการเปรียบเทียบสารทดสอบกับยาแอมพิซิลินและออกซีเตตราซัยคลิน แล้วบันทึกผล ทำการทดสอบสามซ้ำ เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration (MIC)) ของสารทดสอบ

4. การทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรและจันทน์เทศ

ออกแบบการทดสอบด้วยวิธี Checkerboard assay (Chung et al., 2011) โดยผสมฟ้าทะลายโจรหรือจันทน์เทศ เช่น 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับยาออกซีเตตราซัยคลิน 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือยาแอมพิซิลิน 160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำไปทดสอบหาค่า MIC ด้วยวิธี Broth microdilution assay เช่นเดียวกับข้อ 3 จากนั้นนำค่า MIC ที่ได้ไปหาค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพ FICI (Fractional Inhibitory Concentration Index) ค่า FICI คือค่าที่ใช้บอกประสิทธิภาพของสมุนไพรหรือยาปฏิชีวนะเมื่อนำมาใช้ร่วมกัน จะแสดงค่าในสัดส่วนของตัวเลข เช่น การออกฤทธิ์เสริมกัน หรือการต้านฤทธิ์กัน เป็นต้น โดยคำนวณจากค่า FIC ของยาปฏิชีวนะ คือ FIC ของยาปฏิชีวนะ เท่ากับ ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน/ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะเพียงชนิดเดียว และ FIC ของสารบริสุทธิ์ เท่ากับ ค่า MIC ของการออกฤทธิ์ร่วมกัน/ค่า MIC ของสารบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียว จากนั้นนำไปบวกกัน แสดงค่า FICI (ดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม) หมายถึง FIC ของยาปฏิชีวนะ + FIC ของสารบริสุทธิ์ (Hall et al., 1983)

การแปลผลดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI แปลผลดังนี้คือ $FICI \leq 0.5$ หมายถึง เสริมฤทธิ์กัน (Synergistic), $0.5 < FICI < 0.99$ หมายถึง เสริมฤทธิ์กันบางส่วน (Partially Synergistic), $FICI = 1$ หมายถึง มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (Additive), $1.01 < FICI \leq 4$ หมายถึง ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (Indifferent), $FICI > 4$ หมายถึง ต้านฤทธิ์กัน (Antagonistic)

5. การทดสอบการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

ดัดแปลงจากวิธีของ Awolola et al. (2014) โดยเติมสารสกัดฟ้าทะลายโจร สารสกัดจันทน์เทศ และสารปฏิชีวนะความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในหลอดแก้ว แล้วเติมแบคทีเรียความเข้มข้น 1.5×10^8 โคโลนีฟอร์มมิงยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติม Nutrient broth (NB) 1,000 ไมโครลิตร และเติม Phosphate-buffered saline (PBS) 500 ไมโครลิตร ชุดควบคุม (Negative Control) เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมเซลล์แบคทีเรีย ความเข้มข้น 1.5×10^8 โคโลนีฟอร์มมิงยูนิต (Colony forming unit) ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติม NB 1,000 ไมโครลิตร และ PBS 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำชุดการทดสอบและชุดควบคุม ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่ม นำแบคทีเรียที่เกาะบนผิวแก้ว มาล้างด้วย PBS 1000 ไมโครลิตร จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียไปตรึงให้แน่นบนหลอดแก้วด้วย เมทานอล (Methanol) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรีย (แผ่นไบโอฟิล์ม) มาย้อมสีแบคทีเรียด้วยคริสตัลไวโอเลท 0.01 เปอร์เซ็นต์ (crystal violet) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 3-5 นาที แล้วใส่กลacial acetic acid 33 เปอร์เซ็นต์ (glacial acetic acid) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาและฆ่าเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (O.D.) บันทึกค่า O.D. ที่ 4, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ นำค่า O.D. มาคำนวณค่าการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (% inhibition) การทดสอบทุกชุดจะทำสามซ้ำและเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงไปวิเคราะห์ทำเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ดังสมการที่ 1

$$\% \text{ inhibition} = ((N_0 - N_s) / N_0) \times 100 \dots\dots\dots 1$$

N_0 คือ ค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

N_s คือ ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ

6. การทดสอบทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (two-way ANOVA) โดยใช้โปรแกรม Minitab version 17 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการวิจัย

1. ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสารสกัดฟ้าทะลายโจรและสารสกัดจันทน์เทศ

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรและสารปฏิชีวนะ แสดงดังตารางที่ 1 พบว่าสารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดที่นำมาทดสอบคือ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. aureus* ATCC 25923 โดยแสดงค่า MIC ที่เท่ากัน 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าสารสกัดหยาบจากจันทน์เทศ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดที่ค่า MIC ที่เท่ากัน คือเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม ออกซี่เตตราซัยคลินยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจรมาก (MIC อยู่ระหว่าง 0.001-0.008 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำมาศึกษาผลการเสริมฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรผสมกับจันทน์เทศในลำดับต่อไป

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรและยาปฏิชีวนะ

แบคทีเรียทดสอบ	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสาร ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	สารทดสอบ			
	ฟ้าทะลายโจร	จันทน์เทศ	แอมพิซิลิน	ออกซี่เตตราซัยคลิน
<i>E. coli</i> ATCC 25922	80	20	80	0.008
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	80	20	5	40
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	80	20	20	0.001

2. การเสริมฤทธิ์ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรร่วมกับจันทน์เทศ

ผลการทดสอบการเสริมฤทธิ์ร่วมกันระหว่างฟ้าทะลายโจรกับจันทน์เทศ พบว่าสารสกัดฟ้าทะลายโจรสามารถเสริมฤทธิ์ (Synergistic) กับสารสกัดจันทน์เทศ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 โดยมีค่าประสิทธิภาพร่วมของการออกฤทธิ์เท่ากับ 0.317 แต่จะไม่สามารถเสริมฤทธิ์เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC25922 (ตารางที่ 2) และเมื่อเปรียบเทียบกับ การเสริมฤทธิ์ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรร่วมกับยาปฏิชีวนะ แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้สารสกัดฟ้าทะลายโจรร่วมกับแอมพิซิลินสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ (ค่า FICI เท่ากับ 0.0322 - 0.0375) และ

เมื่อใช้สารสกัดฟ้าทะลายโจรร่วมกับยาออกซีเตตราซัยคลินสามารถเสริมฤทธิ์กันเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ATCC 27853 และเสริมฤทธิ์กันบางส่วนเพื่อยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC25922

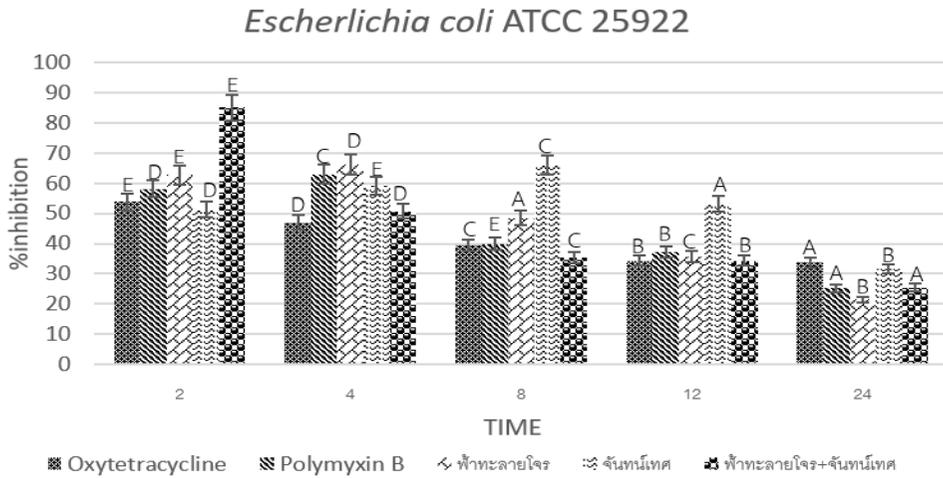
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรร่วมกับสารสกัดจันทน์เทศ

แบคทีเรีย	ผลการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรร่วมกับสารสกัดจันทน์เทศและสารปฏิชีวนะ					
	สารสกัดฟ้าทะลายโจร + สารสกัดจันทน์เทศ		สารสกัดฟ้าทะลายโจร + แอมพิซิลลิน		สารสกัดฟ้าทะลายโจร + ออกซีเตตราซัยคลิน	
	FICI	แปลผล	FICI	แปลผล	FICI	แปลผล
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	0.0322	Synergistic	0.56	Partially Synergistic
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.317	Synergistic	0.0375	Synergistic	0.141	synergistic
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	0.0362	Synergistic	2	indifferent

- หมายถึงไม่สามารถหาค่า FICI เนื่องจากไม่สามารถหาค่า MIC ของสารสกัดจันทน์เทศร่วมกับสารปฏิชีวนะ
หมายเหตุ: $FICI \leq 0.5$ หมายถึง เสริมฤทธิ์กัน (Synergistic), $0.5 < FICI < 0.99$ หมายถึง เสริมฤทธิ์กันบางส่วน (Partially Synergistic), $FICI = 1$ หมายถึง มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (Additive), $1.01 < FICI \leq 4$ หมายถึง ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (Indifferent), $FICI > 4$ หมายถึง ต้านฤทธิ์กัน (Antagonistic)

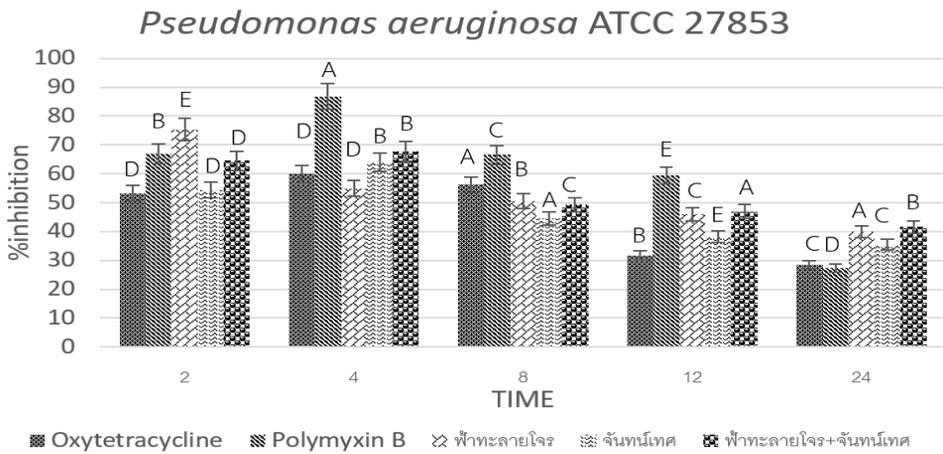
3. การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสารสกัดฟ้าทะลายโจรร่วมกับสารสกัดจันทน์เทศ

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสารสกัดฟ้าทะลายโจรร่วมกับสารสกัดจันทน์เทศ แสดงดังภาพที่ 1 ถึงภาพที่ 3 โดยพบว่าสารสกัดฟ้าทะลายโจรร่วมกับสารสกัดจันทน์เทศสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุดในช่วงเวลา 2-4 ชั่วโมง โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* มีค่า เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition) อยู่ที่ 85.03 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 2 ชั่วโมง และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มเชื้อ *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ซึ่งมีค่า เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 67.7 เปอร์เซ็นต์ และ 56.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำผลไปเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะพบว่า ยาออกซีเตตราซัยคลินและ โพลีมิกซิน บี สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ได้ดีกว่าการใช้ฟ้าทะลายโจรผสมกับจันทน์เทศ และพบว่ายาออกซีออกซีเตตราซัยคลินสามารถยับยั้งสร้างไบโอฟิล์มเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 27853 ได้ดีที่สุด (มีค่าการยับยั้งอยู่ที่ 61.64 เปอร์เซ็นต์) ในส่วนของยาโพลีมิกซิน บี พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้ดีที่สุด (เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 86.83 เปอร์เซ็นต์)



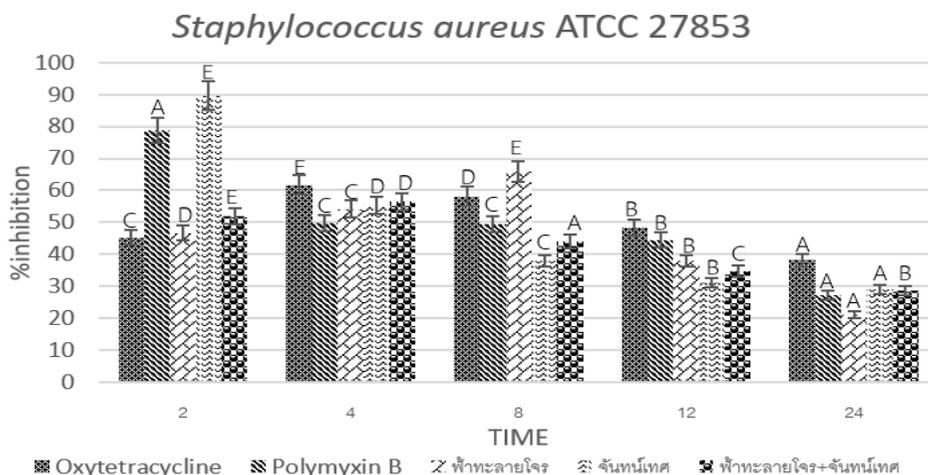
* A-E เป็นตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *E. coli* ATCC 25922 ของสารปฏิชีวนะ สารสกัดจากพืชสมุนไพร และการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดฟัททะเลายใจและสารสกัดจันทน์เทศ ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน



* A-E เป็นตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ของสารปฏิชีวนะ สารสกัดจากพืชสมุนไพร และการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดฟัททะเลายใจและ สารสกัดจันทน์เทศ ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน



* A-E เป็นตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ATCC 27853 ของสารปฏิชีวนะ สารสกัดจากพืชสมุนไพร และการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดฟ้าทะเลลายโจร และสารสกัดจันทน์เทศ ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดฟ้าทะเลลายโจรและสารสกัดจันทน์เทศสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษา เนื่องจากสมุนไพรทั้งสองชนิด มักพบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) อัลคาลอยด์ (alkaloids) สเตียรอยด์ (steroids) ซาโปนิน (saponins) แทนนิน (tannins) และฟีนอลิก (phenolics) ซึ่งมีรายงานว่าสารเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Fardiyah et al., 2020) และยังสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Soni et al. (2016) น้ำมันหอมระเหยจากลูกจันทน์เทศ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae* และ *S. aureus* และการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจันทน์เทศ โดย Setty et al. (2020) พบสารไมริสตีซิน กรดไมริสติก ไตรไมริสทิน เอเลมิซิน และซาโฟโรล จึงสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *E. coli*, *S. aureus* และตรงกับรายงานการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของฟ้าทะเลลายโจรของ Banji et al. (2018) ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบฟ้าทะเลลายโจรและสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 เพราะประกอบด้วยสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในปริมาณมาก

ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดฟ้าทะเลลายโจรร่วมกับสารสกัดจันทน์เทศ แสดงให้เห็นว่าฟ้าทะเลลายโจรสามารถเสริมฤทธิ์กับจันทน์เทศในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ (*P. aeruginosa* ATCC 27853) และเมื่อนำฟ้าทะเลลายโจรมาผสมกับยาปฏิชีวนะ พบว่าสามารถเสริมฤทธิ์กับยาแอมพิซิลลิน และออกซีเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการใช้สารแกลโลแทนนิน (Gallotannin) จากผลของสมอไทยมาผสมกับยาเจนตามัยซิน (gentamicin)

และไตรเมโทพริม (trimethoprim) สามารถยับยั้งคุณสมบัติการดื้อยาหลายขนานของเชื้อ *P. aeruginosa* (Bulbul et al., 2022) และแสดงให้เห็นว่าสารสกัดฟ้าทะลายโจรร่วมกับสารสกัดจันทน์เทศสามารถเสริมฤทธิ์ได้ดีเช่นเดียวกับสารบริสุทธิ์ในการทดสอบของ Silveria et al. (2020) เมื่อทดสอบโดยใช้ไทมอล (thymol) ร่วมกับเตตราซัยคลิน สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ดังนั้นสารสกัดฟ้าทะลายโจรร่วมกับสารสกัดจันทน์เทศซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เช่นเดียวกับสารปฏิชีวนะ จึงอาจใช้แทนสารปฏิชีวนะโดยไม่จำเป็น เพื่อรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย

ผลการวิจัยของฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของฟ้าทะลายโจรผสมกับจันทน์เทศจะทำการทดสอบเปรียบเทียบกับยาออกซีเตตราซัยคลินและยาโพลีมิกซิน เนื่องจากมักพบอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้เป็นจำนวนมาก จนทำให้สารปฏิชีวนะที่มีอยู่ในท้องตลาดใช้รักษาไม่ได้ผล ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าสารสกัดฟ้าทะลายโจรและสารสกัดจันทน์เทศเมื่อใช้เพียงชนิดเดียว หรือเมื่อนำมาผสมกันก็สามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ได้ ซึ่งสนับสนุนงานวิจัยของการใช้ฟ้าทะลายโจรเพียงชนิดเดียว สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มโดย *S. aureus* (Hossain et al., 2021) เนื่องจากฟ้าทะลายโจรและจันทน์เทศ พบสารฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ แทนนิน ไตรเทอร์พีนอยด์ และโพลีฟีนอลเป็นจำนวนมาก ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้สามารถป้องกันการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย (Hossain et al., 2021) และตรงกับรายงานของ Majumdar et al. (2020) พบว่าสาร 14-deoxy-11,12 didehydroandrographolide จากฟ้าทะลายโจร สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* และยังสนับสนุนงานวิจัยของสารสกัดจากพืชสมุนไพรหลายชนิด ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย เช่น สารสกัดเอทานอลของอบเชย (Panjaitan et al., 2022) สาร glycyrrhizic acid ที่ได้จากสารสกัดจากชะเอมเทศ (Chakotiya et al., 2016) น้ำมันหอมระเหยของผักชี (Simamora et al., 2018) หรือฟ้าทะลายโจรและจันทน์เทศมีฤทธิ์ด้านการสร้างไบโอฟิล์ม เพราะสารกลุ่มฟีนอลิกที่พบมากทั้งในฟ้าทะลายโจรและจันทน์เทศอาจจะไปยับยั้งการสังเคราะห์เอทีพี (ATP) ของแบคทีเรีย หรือสารกลุ่มไตรเทอร์พีนจากฟ้าทะลายโจรและจันทน์เทศอาจจะไปยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย เป็นต้น (Gupta & Birdi, 2017)

งานวิจัยนี้พิสูจน์ให้เห็นว่าเมื่อนำฟ้าทะลายโจรมาผสมกับจันทน์เทศสามารถยับยั้งการเจริญและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ซึ่งการใช้สารสกัดฟ้าทะลายโจรมาผสมกับสารสกัดจันทน์เทศ อาจจะช่วยลดปริมาณ หรือใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ จึงอาจจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการบริโภคยาปฏิชีวนะ ตลอดจนลดผลข้างเคียงและการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะในสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังเป็นทางเลือกใหม่ในการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์และเกิดมูลค่าเพิ่มสูงสุด อย่างไรก็ตามต้องศึกษาความเป็นพิษของฟ้าทะลายโจรผสมกับจันทน์เทศต่อสัตว์ทดลองและเซลล์ไลน์ชนิดต่าง ๆ หรือศึกษาผลของฟ้าทะลายโจรและจันทน์เทศต่อเซลล์ไลน์ในระบบภูมิคุ้มกันต่อไป

สรุป

สารสกัดเอทานอลจากฟ้าทะลายโจรผสมกับสารสกัดจันทน์เทศเสริมฤทธิ์กับยาออกซีเตตราซัยคลิน และยาแอมพิซิลลิน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. aureus* ATCC 25923 และสารสกัดฟ้าทะลายโจร หรือสารสกัดจันทน์เทศเมื่อใช้เพียงชนิดเดียว หรือสารสกัดฟ้าทะลายโจรผสมกับสารสกัดจันทน์เทศสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียสามสายพันธุ์

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้สามารถนำไปต่อยอดเพื่อพัฒนานำสารสกัดฟ้าทะลายโจรผสมกับสารสกัดจันทน์เทศ ใช้เป็นยารักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสามารถลดปริมาณการนำเข้ายาปฏิชีวนะ และเพื่อลดผลข้างเคียงของการใช้ยาปฏิชีวนะ อีกทั้งยังสามารถนำมาปรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยนำมาปรับใช้เป็นสารกันบูดและลดการเกิดไบโอฟิล์มในภาชนะบรรจุภัณฑ์ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามควรมีการทดสอบความเป็นพิษ เพื่อความปลอดภัยในการใช้สารสกัดก่อนนำมาใช้จริง นอกจากนี้ควรมีการทดสอบทางเคมีเพื่อหาสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยสำเร็จลงด้วยดี เพราะได้รับการสนับสนุนจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนวัสดุ อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Abushaheen, M. A., Muzaheed, Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., & Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, 66(6), 100971.

<https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.100971>

Awolola G. V., Koorbanally N. A., Chenia H., Shode F. O., & Baijnath H. (2014). Antibacterial and antibiofilm activity of flavonoids and triterpenes Isolated from the extracts of *Ficus sansibarica* WARB. SUBSP., *Sansibarica* (Moraceae) extract. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(3), 124-131.

- Banji, A., Goodluck, B., Oluchi, O., & Stephen, F. (2018). Antimicrobial and antioxidant activities of crude methanol extract and fractions of *Andrographis paniculata* leaf (Family: Acanthaceae) (Burm.f.) Wall. Ex Nees. **Jordan Journal of Biological Sciences**, 11(1), 23-30.
- 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**, 10220. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10220>
- Chakotiya, A. S., Tanwar, A., Narula, A., & Sharma, R. K. (2016). Alternative to antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*: Effects of *Glycyrrhiza glabra* on membrane permeability and inhibition of efflux activity and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and its in vitro time-kill activity. **Microbial Pathogenesis**, 98, 98-105.
- 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 & Laboratory Standards Institute (CLSI). (2017). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27th ed. Wayne, PA.
- Dzotam, J. K., Simo, I. K., Bitchagno, G., Celik, I., Sandjo, L. P., Tane, P., & Kute, V. (2018). In vitro antibacterial and antibiotic modifying activity of crude extract, fractions and 3',4',7-trihydroxyflavone from *Myristica fragrans* Houutt against MDR Gram-negative enteric bacteria. **BMC Complement Altern Med**, 18(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2084-1>
- Fardiyah, Q., Ersam, T., Suyanta, Slamet, A., Suprpto, S., Kurniawan, F. (2020). New potential and characterization of *Andrographis paniculata* L. Ness plant extracts as photoprotective agent. **Arabian Journal of Chemistry**, 13(12), 8888-8897.
- Gupta, P. D., & Birdi, T. J. (2017). Development of botanicals to combat antibiotic resistance. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, 8(4), 266-275.

- Hall, M. J., Middleton, R. F., & Westmacott, D. (1983) The fractional inhibitory concentration (Fic) index as a measure of synergy. **Journal of Antimicrobial. Chemotherapy**, 11, 427–433.
- Hossain, S., Urbi, Z., Karuniawati, H., Mohiuddin, R. B., Moh Qrimida, A., Allzrag, A. M. M., & Capasso, R. (2021). *Andrographis paniculata* (burm. F.) wall. Ex nees: an updated review of phytochemistry, antimicrobial pharmacology, and clinical safety and efficacy. **Life**, 11(4), 348.
- Lawrence, J. A., Huang, Z., Rathinavelu, S., Hu, J. F., Garo, E., Ellis, M., Norman, V. L., Buckle, R., Williams, R. B., Starks, C. M., & Eldridge, G. R. (2020). Optimized plant compound with potent anti-biofilm activity across gram-negative species. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 28(5), 58. <https://doi.org/10.1016/biom9020058>
- Majumder, M., Misra, T. K., & Roy, D. N. (2020). In vitro anti-biofilm activity of 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide from *Andrographis paniculate* against *Pseudomonas aeruginosa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 51, 15-27.
- Mickymarry, S. (2019). Efficacy and mechanism of traditional medicinal plants and bioactive compounds against clinically important pathogen. **Antibiotics**, 8, 257. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040257>
- Oo, T., Saiboonjan, B., Srijampa, S., Srisrattakarn, A., Sutthanut, K., Tavichakorntrakool, R., Chanawong, A., Lulitanond, A., & Tippayawat, P. (2021). Inhibition of bacterial efflux pumps by crude extracts and essential oil from *Myristica fragrans* Houtt. (Nutmeg) Seeds against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, 26(15), 4662. <https://doi.org/10.3390/molecules26154662>
- Panjaitan, C. C., Widyarman, A. S., Amtha, R., & Astoeti, T. E. (2022). Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Cinnamon (*Cinnamomum burmanii*) Extract on Periodontal Pathogens—An *in vitro* study. **European Journal of Dentistry**, 16(4), 938-946.
- Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: global multifaceted phenomenon. **Pathog Glob Health**. 109(7), 309-18.
- Sah, S. K., Rasool, U., & Hemalatha, S. (2020). *Andrographis paniculata* extract inhibit growth, biofilm formation in multidrug resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, 10(6), 599-604.

- Setty, J. V., Srinivasan, I., Sathiesh, R. T., Kale, M., Shetty, V. V., & Venkatesh, S. (2020). *In vitro* evaluation of antimicrobial effect of *Myristica fragrans* on common endodontic pathogens. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, 38(2), 145-151.
- Silva, G. N. S. D., Primon-Barros, M., José Macedo, A., & Gnoatto, S. C. B. (2019). Triterpene Derivatives as Relevant Scaffold for New Antibiofilm Drugs. **Biomolecules**, 9(58), 1. <https://doi.org/10.3390/biom9020058>
- Silveria, S., Macedo, N. S., Francely, J., Santos, S. D., Freitas, T. S., Santos, C. R., Sousa, D. L., Muniz, D. F., Oliveira, L. C. C., Junior, J. P. S., Cunha, F. A. B., Coutinho, H. D. M., Balbino, V. Q., & Martins, N. (2020). Article Evaluation of the Antibacterial Activity and Efflux Pump Reversal of Thymol and Carvacrol against *Staphylococcus aureus* and Their Toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Molecules**, 25(210), 2-8.
- Simamora, A. , Santoso, A. W. , & Timotius, K. H. (2018) . Bioactivities of methanol and ethyl acetate Extracts of *Myristica fragrans* Houtt. **Pharmacognosy Communications**, 8(3), 103-107.
- Soni, R., Sharma, G., & Jasuja, N. D. (2016). Essential Oil Yield Pattern and Antibacterial and Insecticidal Activities of *Trachyspermum ammi* and *Myristica fragrans*. **Scientifica**, 1428194. <https://doi.org/10.1155/2016/1428194>
- Tan, S. P., Park, S. E., Stahopoulos, C. E., & Roach, P. D. (2014). Extraction of flavonoids from bitter melon. **Food and Nutrition Sciences**, 5(5), 458-465.
- Verderosa, A. D., Totsika, M., & Fairfull-Smith, K. E. (2019). Bacterial biofilm eradication agents: A current review. **Frontiers in Chemistry**, 7(824), 1. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00824>