ผลการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดทองพันชั่งกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยา

Synergistic Antibacterial Effect of *Rhinacanthus nasutus* Extract and Antibiotics on Antibiotic - Resistant Bacteria

วิสาตรี คงเจริญสุนทร* ณัฐกานต์ ถาแก้ว นันทวัน ชนะภัย, สุพาภร ส่งสกุล และเอกชัย บุดดา

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Wisatre Kongcharoensuntorn*, Nattakan thakaew, Nanthawan Chanapai, Supaporn Songsakul and Ekachai Budda

Department of Biological Science, Burapha University

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาผลการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) เมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ คือ แอมพิซิลิน และเตตราไซคลิน ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยา 3 ชนิด *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* และ methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ด้วยการหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ (MIC) โดยวิธี Agar diffusion susceptibility test พบการเสริมฤทธิ์กันของทองพันชั่งและยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยาสามชนิด ได้แก่ การเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาเตตราไซคลินมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *A. baumannii* ได้ดีที่สุด โดยค่า MIC ลดลง 64 เท่า เมื่อเทียบกับการใช้เฉพาะสารสกัดทองพันชั่งเพียงอย่างเดียว เมื่อใช้ยาเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นถึง 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสกัดทองพันชั่ง และยาเตตราไซคลิน สามารถการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* เมื่อใช้ร่วมกับยาเตตราไซคลินที่ความเข้มข้นต่ำ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า MIC เดิมของสารสกัดทองพันชั่งจะลดลง 4 เท่า และการเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อ MRSA ของสารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาเตตราไซคลินและแอมพิซิลินสามารถลดค่า MIC เดิมลงได้ 4 เท่า เมื่อใช้ยาเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้ยาแอมพิซิลิน 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร งานวิจัยนี้ยังพบว่าใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาเตตราไซคลินมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาแอมพิซิลินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยา

คำสำคัญ : ทองพันชั่ง การเสริมฤทธิ์กับยาปฏิชีวนะ *Acinetobacter baumannii* *Pseudomona aeruginosa* MRSA

***Corresponding author.** E-mail: wisatrek@yahoo.com , wisatrek@hotmail.com

Abtract

This study was aimed to test antibacterial activity of *Rhinacanthus nasutus* extract combined with two antibiotics (ampicillin and tetracycline) against three strains of antibiotic resistant bacteria; *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* and methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Using the agar diffusion susceptibility, the minimal inhibitory concentration (MIC) value was determined for synergistic effect. The results indicated the synergistic effect of *Rhinacanthus nasutus* extract with two antibiotics as the potential antimicrobial agents to inhibit three species of antibiotic resistant bacteria. The most effective synergistic activity against *A. baumannii* was the combination of 80 mg/ml R. *nasutus* with 1.25 mg/ml tetracycline, which reduced 64-fold of the MIC using *R. nasutus*'s extract alone. We also found the synergistic effect of 5 mg/ml *R. nasutus* with 1.25 mg/ml tetracycline which was able to inhibit the growth *P. aeruginosa*. This combination reduced at least four fold of MICs of *R. nasutus*'s extract alone. Moreover, we found synergistic effect of *R. nasutus* with either tetracycline, or ampicillin that could reduce 4-fold of the MICs when using tetracycline or ampicillin at the concentration of 1.25 mg/ml and 20 mg/ml, respectively. Thus, it was concluded that combinations of *R. nasutus* with tetracycline were more effective antimicrobial activity than combination of *R. nasutus* with ampicillin against some strains of antibiotic resistant bacteria.

Keyword : *Rhinacanthus nasutus*, Synergistic antibacterial effect, antibiotic resistant bacteria, *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa*, MRSA

บทนำ

โรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียดื้อยาถูกจัดเป็นหนึ่งในปัญหาสาธารณสุขที่ร้ายแรงที่สุด เป็นสาเหตุให้มีการติดเชื้อในโรงพยาบาลเพิ่มขึ้นโดยแบคทีเรียเหล่านี้มีกลไกที่ให้เกิดภาวะแทรกซ้อนและเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตเพิ่มสูงขึ้น โดยสามารถก่อโรคเมื่อร่างกายอ่อนแอในหลายๆ ระบบของร่างกาย เช่น ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบหมุนเวียนโลหิต ระบบทางเดินหายใจ การติดเชื้อที่บาดแผล เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ไขกระดูกอักเสบ การติดเชื้อจากการใช้เครื่องช่วยหายใจและการสอดใส่เครื่องมือแพทย์ ปอดบวม เป็นต้น (Alekshun and Levy, 2007; David, Slack, & Peutherer, 2002) เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ดื้อต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน จึงทำให้มีทางเลือกในการใช้ยาปฏิชีวนะน้อยลงทุกขณะจำเป็นต้องค้นคว้าหายาชนิดใหม่ เพื่อใช้ยับยั้งแบคทีเรียดื้อยาที่มีกลไกยับยั้งการทำงานของยาปฏิชีวนะหลายชนิด (Alekshun and Levy, 2007; David, Slack, & Peutherer, 2002; Kumar and Schweizer, 2005; Mahady et al., 2008: Tenover, Biddle, & Lancaster, 2001) นอกจากนี้ยังต้องมีการนำเข้ายาชนิดใหม่ๆ ซึ่งมีราคาแพงจากต่างประเทศ ส่งผลต่อค่าใช้จ่ายในการรักษาเพิ่มขึ้น ใช้เวลารักษานานขึ้น การนำสมุนไพรมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะมาใช้ในการรักษาโรค จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคติดเชื้อดื้อยา เนื่องจากสมุนไพรเป็นทรัพยากรธรรมชาติ หาง่าย ราคาถูก ร่างกายสามารถกำจัดออกได้ง่าย ลดผลข้างเคียงที่เกิดจากยาแผนปัจจุบัน

ปัจจุบันพบรายงานการศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมของสารประกอบที่สกัดได้จากสมุนไพรร่วมกับยาปฏิชีวนะมากมาย เช่น ยูกีนอล (eugenol) และไนซิน (nisin) หรือสารสกัดจากชาเขียว สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Bacillus subtilis* (Hayashi *et al*., 1982; Hemaiswarya & Doble, 2009; Ettayebi *et al*., 2000; Tiwari *et al*., 2004; Sakanaka, Juneja, & Taniguchi, 2000) หรือการใช้แวนโคมัยซินร่วมกับสารกลุ่มกลัยโคเป็ปไทด์สามารถต้าน *Staphylococcus aureus* (Tenover, Biddle & Lancaster, 2001) Muroi และคณะ (2004) เสนอการใช้สารสกัดจากมะม่วงหิมพานต์ คือ anacardic acid ร่วมกับ methicillin พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรีย MRSA และมีรายงานการใช้สมุนไพรจีนร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Zai-Chang *et al*., 2005) ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* Kurz) เป็นพืชล้มลุกกึ่งไม้พุ่มเตี้ย อยู่ในวงศ์ Acanthaceae พบได้ทั่วไปในประเทศไทย อินเดีย และจีนทางตอนใต้ ทองพันชั่งนั้นมีประโยชน์หลายด้าน เช่น รักษาโรคมะเร็ง โรคตับอักเสบ โรคผิวหนัง แก้กลากเกลื้อน เป็นต้น ซึ่งส่วนของใบและลำต้นใช้ในการรักษาโรคผิวหนังที่เป็นกลากเกลื้อน (Nascimento *et al*., 2000; Panichayupakaranant & Kongchai, 2003; Sattar *et al*., 2004) ในส่วนของรากมีสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Cowan, 1999; Nascimento *et al*., 2000) จึงได้มีการทดลองนำทองพันชั่งมาสกัดหาองค์ประกอบทางเคมี พบว่าทองพันชั่งประกอบด้วยสารประกอบไรนาแคนทิน (Rhinacanthin) ได้แก่ ไรนาแคนทิน-เอ (rhinacanthin-A) ไรนาแคนทิน-บี (rhinacanthin-B) ไรนาแคนทิน-ซี (rhinacanthin-C) ไรนาแคนทิน-ดี (rhinacanthin-D) ไรนาแคนทิน-เอ็ม (rhinacanthin-M) ไรนาแคนทิน-เอ็น (rhinacanthin-N) และ ไรนาแคนทิน-คิว (rhinacanthin-Q) ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ในกลุ่มแนพโทควิโนนเอสเทอร์ (naphthoquinone ester) (Kernan, 1997a ; Kimachi *et al*., 2009; Sakanaka *et al*., 2000; Wu *et al*., 1998) ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Cai *et al*., 2004; Siripong *et al*., 2006; Wu *et al*., 1998) ยับยั้งการเกาะกลุ่มของแบคทีเรีย (Voravuthikunchai & Kitpipit, 2005) ยับยั้งไวรัส (Akaanitapichat, 2003; Kernan, 1997b; Sendl *et al*., 1996) ยับยั้งเชื้อรา (Sattar *et al*., 2004) เป็นต้น ดังนั้นทองพันชั่งจึงเป็นทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียดื้อยา การนำสารสกัดจากทองพันชั่งมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะเพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะและช่วยลดค่าใช้จ่ายในการรักษา

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากทองพันชั่งเมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และเตตราไซคลินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยาคือ *A. baumannii, P. aeruginosa* และ Methicillin - Resistant *S. aureus* (MRSA) ผลการศึกษาวิจัยนี้จะเป็นแนวทางในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ร่วมของสารสกัดทองพันชั่งกับยาปฏิชีวนะในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยา และเพื่อเป็นทางเลือกให้แพทย์สามารถใช้สารสกัดทองพันชั่งมาทดแทนยาปฏิชีวนะที่ใช้ไม่ได้ผล

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การเตรียมสารสกัดสมุนไพร (crude extract)

นำทองพันชั่งทั้งต้นที่ได้จากร้านศรีทองโอสถ จังหวัดชลบุรี ที่ประกอบด้วยส่วนใบ เถา ลำต้น และราก มาล้างให้สะอาด นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นให้เป็นผงละเอียด เก็บไว้ในที่แห้งปราศจากแสงและความชื้น จากนั้นนำผงทองพันชั่งจำนวน 500 กรัม ละลายในเมทานอล:น้ำ (อัตราส่วน 80:20) ปริมาตร 1500 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สามารถสกัดสารออกฤทธิ์ได้คล้ายกับการใช้เหล้าขาวละลายยาแผนไทยโบราณ จากนั้นทิ้งไว้ 3 วันให้ตกตะกอนทำการกรองสมุนไพรด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 แล้วนำสารละลายที่กรองได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน นำสารสกัดไปทำให้แห้งโดยเครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ (Labconco corporation, Kansas city) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วนำสารสกัดที่ได้ (crude extract) ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลาย ของสารสกัดทองพันชั่งและยาปฏิชีวนะ

ชั่งสารสกัดหยาบ 0.8 กรัม ใส่ใน Conical tube ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) 10 มิลลิลิตร จะได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำสารสกัดไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร (stock solution) จากนั้นเตรียมสารละลายจากสารสกัดทองพันชั่งที่ระดับความเข้มข้น 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยเจือจางสมุนไพรจาก stock solution ครั้งละสองเท่า เก็บที่มืดอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทดสอบในขั้นต่อไป ส่วนยาปฏิชีวนะที่นำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพ คือยาแอมพิซิลิน (Sigma-Aldrich, Germany) และยาเตตราไซคลิน (Sigma-Aldrich, Germany) ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ นำมาเตรียมและเจือจางเช่นเดียวกับสารสกัดทองพันชั่ง โดยเตรียมความเข้มข้นตั้งแต่ 80 – 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดทองพันชั่งที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration) โดยวิธี agar diffusion susceptibility test

เป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Barry & Thornsberry, 1999 เริ่มจากเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii, P. aeruginosa* และ MRSA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (Nutrient agar) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อที่ใช้ทดสอบจำนวน 4-5 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 (1.5 x 108 CFU/ml) โดยปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่า McFarland No. 0.5 ด้วย sterile sodium chloride 0.85 % เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดละ 19 มิลลิลิตร มาผสมกับแบคทีเรียที่ปรับเทียบความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเทลงในจานเพาะเชื้อให้อาหารแข็ง จากนั้นทำการเจาะหลุมในอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตรเพื่อใส่สารทดสอบ นำสารละลายจากสารสกัดทองพันชั่งหรือสารละลายยาแอมพิสิลิน หรือสารละลายยาเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หยอดลงในหลุมที่เจาะไว้ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ในการทดลองนี้ใช้ DMSO และน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุม แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการทดลองวิธี Agar diffusion susceptibility test ของสารสกัดทองพันชั่งเทียบกับยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแต่ละชนิดซ้ำ 3 ครั้ง นำไปบันทึกผลการทดลองหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน แล้วนำมาหาค่า MIC

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC)

เตรียมเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดทองพันชั่ง จากนั้นเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ที่เจาะขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร นำน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และ DMSO หยอดลงในหลุมที่เจาะไว้เป็นตัวควบคุม จากนั้นนำสารละลายยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยอดลงในหลุมที่เจาะไว้หลุมละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 7 หลุม หลังจากนั้นให้นำสารละลายสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้น 80, 40, 20, 10, 5, 2.5 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมา 20 ไมโครลิตรหยอดลงซ้ำในหลุมที่ใส่ยาปฏิชีวนะจำนวนความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 7 หลุม ตามลำดับ ทำเช่นเดียวกันในจานที่มีหลุมที่หยอดยาปฏิชีวนะ 40, 20, 10, 5, 2.5 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

18-24 ชั่วโมง ทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้ง (inhibition zone) ซึ่งเป็นหลุมที่วัดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 0.6 เซนติเมตร และทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกผลการทดลอง และหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน แล้วนำมาหาค่า MIC

วิธีการประเมินผลทางสถิติ

การเปรียบเทียบทองพันชั่งกับยาปฏิชีวนะด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทิศทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบการใช้ทองพันชั่งร่วมกับยาปฏิชีวนะด้วย การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two-way ANOVA) ด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS version 15 และวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมของทองพันชั่งและยาปฏิชีวนะด้วยกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า inhibition zone กับความเข้มข้นของสารสกัดทองพันชั่งและยาปฏิชีวนะโดยใช้ กราฟเส้นตรง

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

สารสกัดทองพันชั่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* และ MRSA ได้ดีกว่า *A. baumannii* เมื่อเทียบประสิทธิภาพของทองพันชั่งกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน 2 ชนิด คือ พบว่าแอมพิซิลินมีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดทองพันชั่งในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* และ MRSA (ค่า MIC เท่ากับ 2.5 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2) แต่ไม่สามารถยับยั้ง *A. baumannii* (ค่า MIC เท่ากับ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนยาเตตราไซคลินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ MRSA ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *P. aeruginosa* และยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* ได้น้อยที่สุดเช่นเดียวกับผลของแอมพิซิลิน (ค่า MIC เท่ากับ 10, 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2)

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาปฏิชีวนะสองชนิดคือแอมพิซิลินและเตตราไซคลิน พบว่าสารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและเตตราไซคลินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยาทั้งสามชนิดได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเฉพาะการใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาเตตราไซคลินจะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดได้ดีที่สุด และดีกว่าการใช้ทองพันชั่งร่วมกับแอมพิซิลิน (ตารางที่ 3 ภาพที่ 1-6)

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยา พบว่าควรใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาเตตราไซคลินในการยับยั้งเชื้อ *P.aeruginosa* เพียงอย่างเดียว และไม่ควรใช้ร่วมกับแอมพิซิลิน (ตารางที่ 3 และภาพที่ 1 และ 2) เมื่อใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาเตตราไซคลินจะลดค่า MIC เดิมของทองพันชั่ง โดยค่า MIC ลดลง 64 เท่าจาก 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3 และภาพที่ 1 และ 2) อาจเป็นผลมาจากการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสกัดทองพันชั่งกับยาเตตราไซคลิน เมื่อลดความเข้มข้นของยาเตตราไซคลินให้ต่ำลงก็ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยาได้ (เมื่อใช้ยาร่วมกับสารสกัดทองพันชั่งที่ความเข้มข้น 1.25-2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่การใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยา ปฏิชีวนะแอมพิซิลินจะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยาได้ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 1 และ 2) จึงควรแยกใช้ยาแอมพิซิลินเพียงอย่างเดียวหรือสารสกัดทองพันชั่งเพียงอย่างเดียว มาใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* สายพันธุ์ดื้อยาจะให้ผลดีกว่าการใช้ร่วมกัน (ตารางที่ 3 และภาพที่ 1 และ 2)

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่าควรใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาเตตราไซคลินในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* แต่ในทางตรงกันข้ามไม่ควรใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาแอมพิซิลินในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* แต่ควรใช้ยาแอมพิซิลินแยกกับสารสกัดทองพันชั่งจะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีกว่า โดยพบว่าเมื่อใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับเตตราไซคลิน สามารถลดค่า MIC ของทองพันชั่งจาก 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลดเหลือ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งลดค่า MIC ที่ใช้สารสกัดทองพันชั่งเพียงอย่างเดียวถึง 4 เท่า (ตารางที่ 3 และภาพที่ 3 และ 4) สารสกัดทองพันชั่งสามารถลดค่าความเข้มข้นของยาเตตราไซคลินลงทีละ 2 เท่าจนถึงความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดทองพันชั่งที่ความเข้มข้น 1.25 ร่วมกับยาเตตราไซคลิน 1.25 มิลลิลิตร ก็ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ได้ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 3 และ 4) อาจเป็นเพราะยาเตตราไซคลินและสารสกัดทองพันชั่งที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) อาจจะมีฤทธิ์ในการส่งเสริมกันอย่างมีประสิทธิภาพ แต่เมื่อใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาแอมพิซิลินไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.aeruginosa* ได้ (ตารางที่ 3) อาจเป็นเพราะสารบางอย่างในทองพันชั่งอาจหักล้างฤทธิ์ของยาแอมพิซิลินจึงทำให้ไม่สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้ง *P.aeruginosa* การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดทองพันชั่งร่วมกับ

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดทองพันชั่งกับยาแอมพิซิลินและยาเตตราไซคลินต่อเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยา คือ *A. baumannii*, *P. aeruginosa* และ MRSA

สารที่ใช้ในการทดสอบ	แบคทีเรีย	เส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (เซนติเมตร) ความเข้มข้นของสารสกัดทองพันชั่ง หรือยาแอมพิซิลิน หรือเตตราไซคลิน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)								
		80	40	20	10	5	2.5	1.25	H_2O	DMSO
แอมพิซิลิน	*A. baumannii*	0.80±0.05	n	n	n	n	n	n	n	n
	P. aeruginosa	2.37±0.06	1.93±0.06	1.43±0.06	1.23±0.06	1.12±0.10	1.00±0.10	n	n	n
	MRSA	1.78±0.03	1.67±0.06	1.53±0.06	1.33±0.06	1.13±0.03	1.00±0.00	0.83±0.06	n	n
เตตราไซคลิน	*A. baumannii*	0.83±0.06	0.70±0.05	n	n	n	n	n	n	n
	P. aeruginosa	1.10±0.00	1.00±0.00	0.90±0.00	n	n	n	n	n	n
	MRSA	1.30±0.00	1.20±0.00	1.10±0.00	0.97±0.06	n	n	n	n	n
สารสกัดทองพันชั่ง	*A. baumannii*	0.83±0.08	n	n	n	n	n	n	n	n
	P. aeruginosa	0.95±0.05	0.85±0.05	0.80±0.05	0.77±0.03	0.72±0.03	n	n	n	n
	MRSA	1.07±0.08	0.92±0.03	0.80±0.00	0.73±0.03	0.70±0.00	n	n	n	n

หมายเหตุ n หมายถึง เส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 0.6 เซนติเมตร

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สารสกัดทองพันชั่งและยาปฏิชีวนะสามารถยับยั้ง การเจริญของแบคทีเรียดื้อยาบางสายพันธุ์ด้วยวิธี Agar diffusion susceptibility test

แบคทีเรีย	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ชนิดของสารที่ใช้ทดสอบ		
	แอมพิซิลิน	เตตราไซคลิน	ทองพันชั่ง
A. baumannii	80	40	80
P. aeruginosa	2.5	20	5
MRSA	1.25	10	5

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยา คือ *A. baumannii, P.aeruginosa* และ MRSA (MIC) ระหว่างการใช้สารสกัดทองพันชั่งเพียงอย่างเดียวกับการใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาแอมพิซิลินและยาเตตราไซคลิน

เชื้อ		ยาปฏิชีวนะ	แอมพิซิลิน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)							เตตราไซคลิน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)						
	MIC ของทองพันชั่ง		80	40	20	10	5	2.5	1.25	80	40	20	10	5	2.5	1.25
A. baumannii	80 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร	MIC	-	-	-	-	-	-	-	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
		Titer	-	-	-	-	-	-	-	64	64	64	64	64	64	64
P. aeruginosa	5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร	MIC	-	-	-	-	-	-	-	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
		Titer	-	-	-	-	-	-	-	4	4	4	4	4	4	4
MRSA	5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร	MIC	1.25	1.25	1.25	2.50	40	40	5	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	2.50
		Titer	4	4	4	2	0.125	0.125	1	4	4	4	4	4	4	2

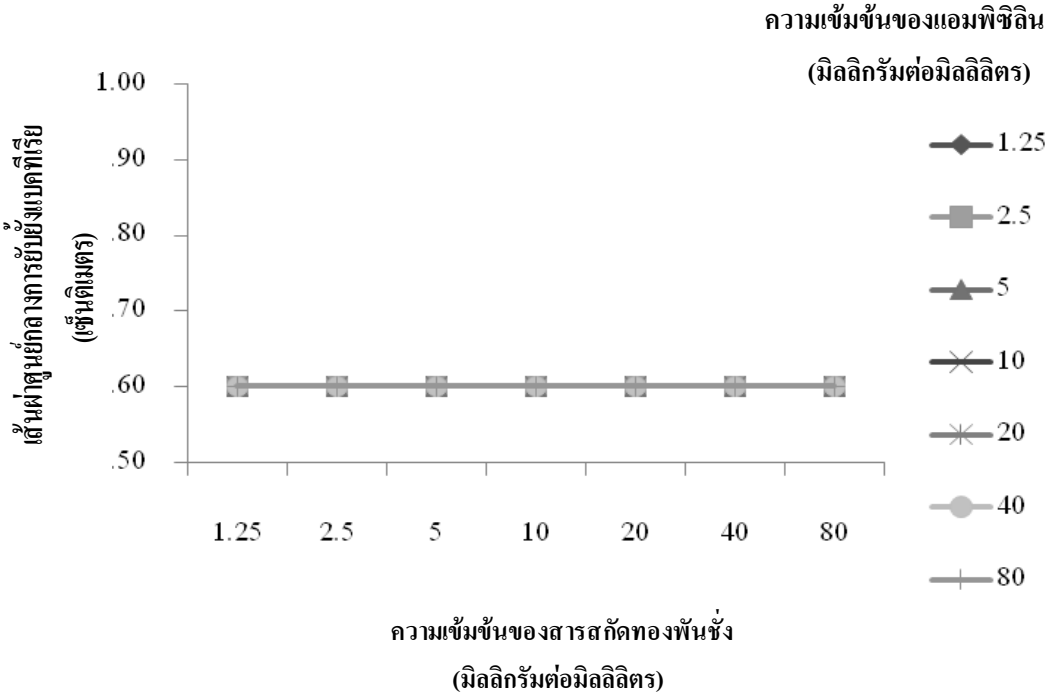
- หมายถึง เส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 0.6 เซนติเมตร คือไม่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จึงไม่สามารถหาค่า MIC เพื่อเทียบเป็นค่า Titer

Titer คือ ค่าสัดส่วนระหว่าง ค่า MIC ของสารสกัดทองพันชั่งหารด้วยค่า MIC ของสารสกัดทองพันชั่งเมื่อใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ

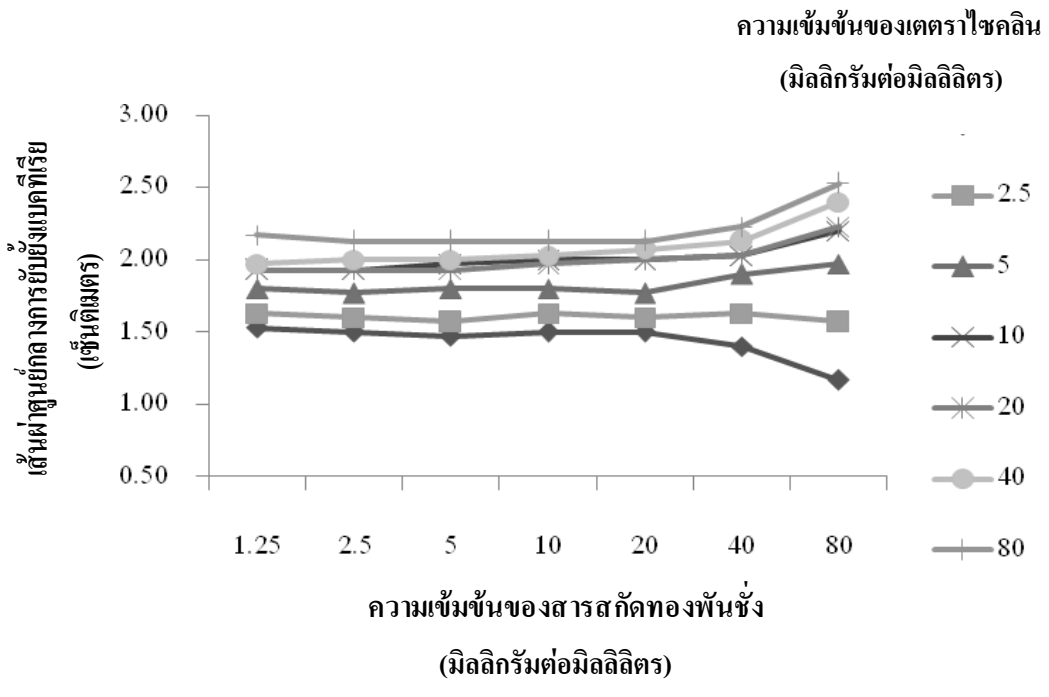
โดยกำหนดให้ ค่า Titer มากกว่า 1 คือ เสริมฤทธิ์

ค่า Titer น้อยกว่า 1 คือ ต้านฤทธิ์

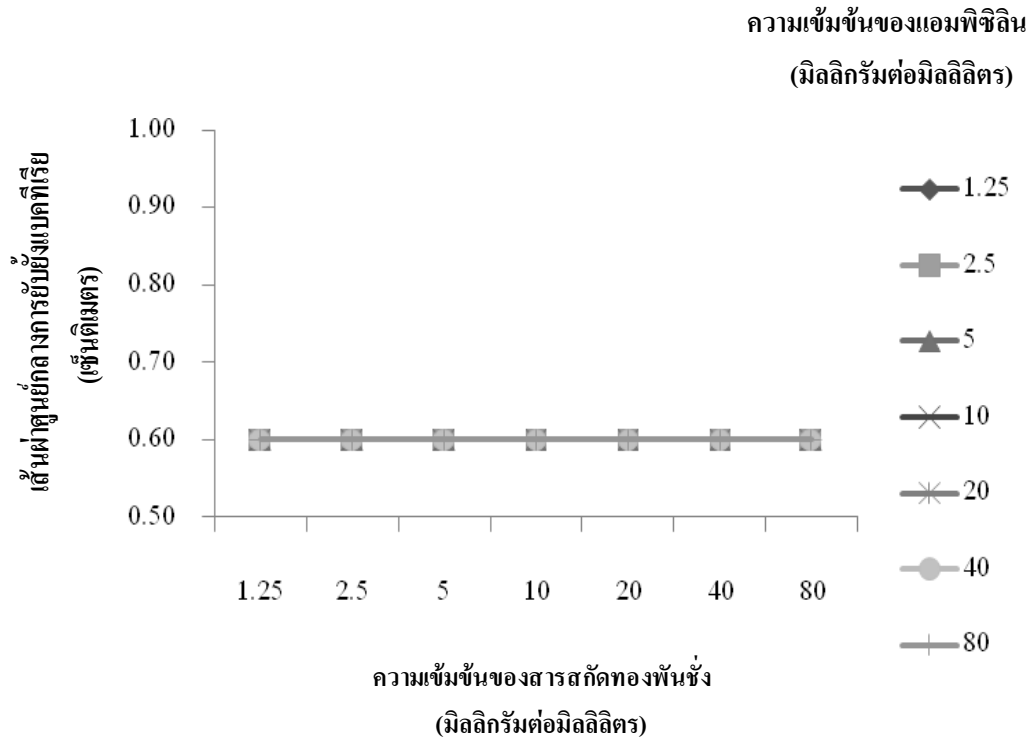
ค่า Titer เท่ากับ 1 คือ ใช้แยกกัน



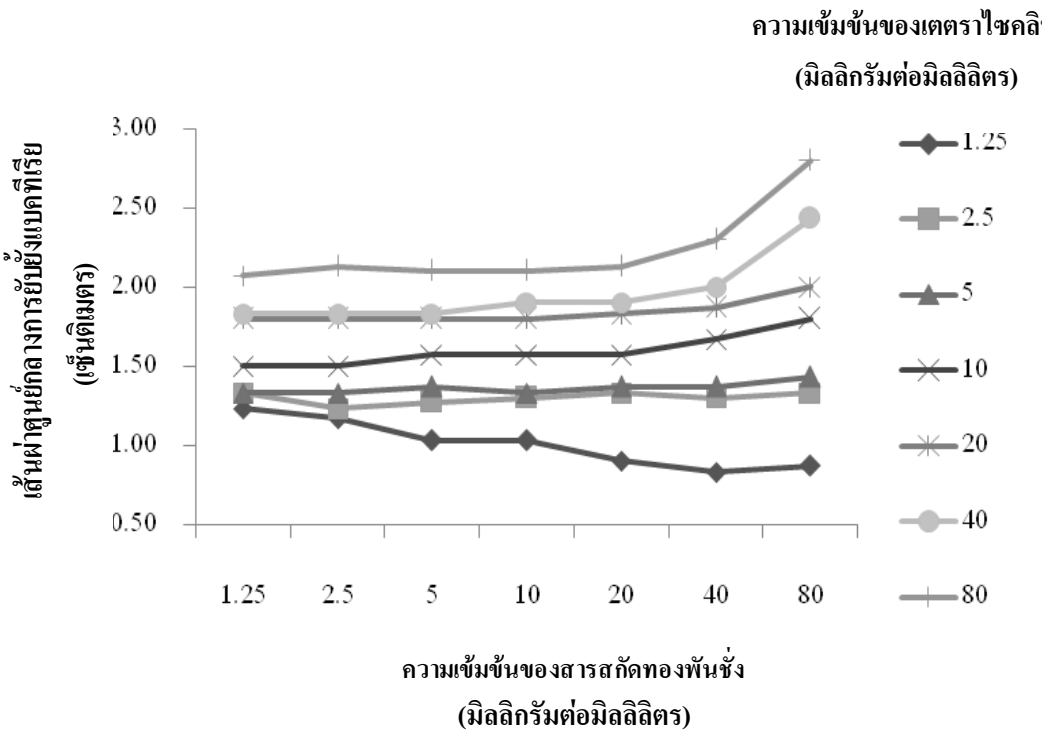
ภาพที่ 1 การเปรียบเทียบการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดทองพันชั่งกับยาแอมพิซิลินต่อเชื้อ *A. baumannii*



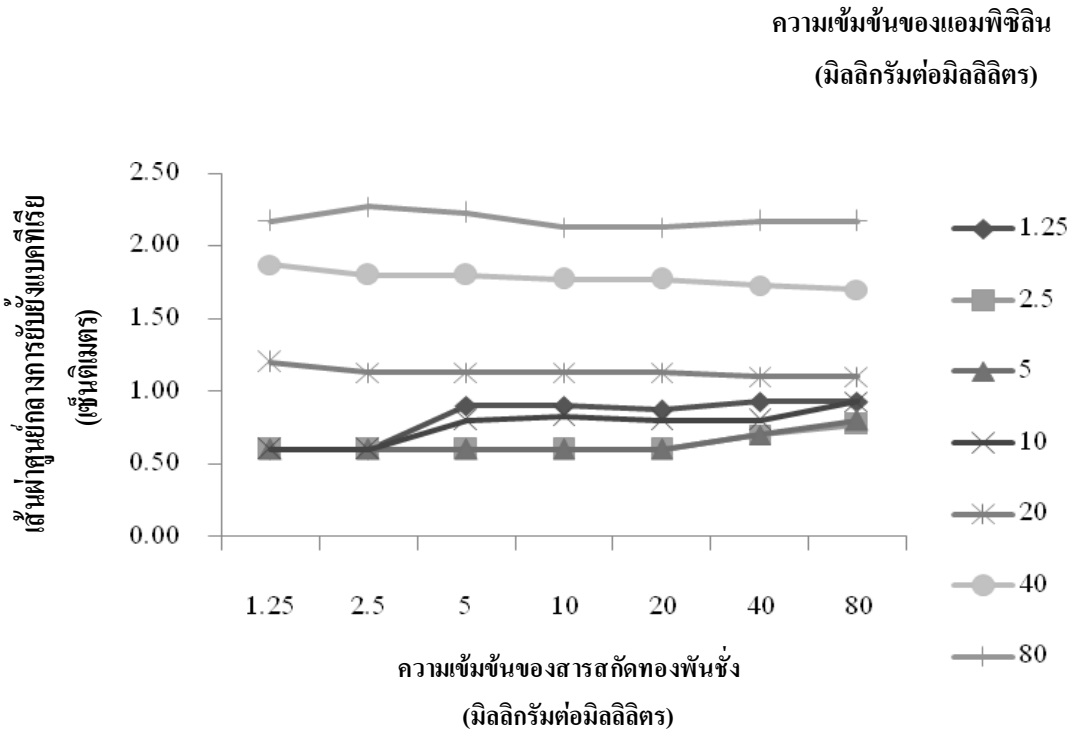
ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดทองพันชั่งกับยาเตตราไซคลินต่อเชื้อ *A. baumannii*



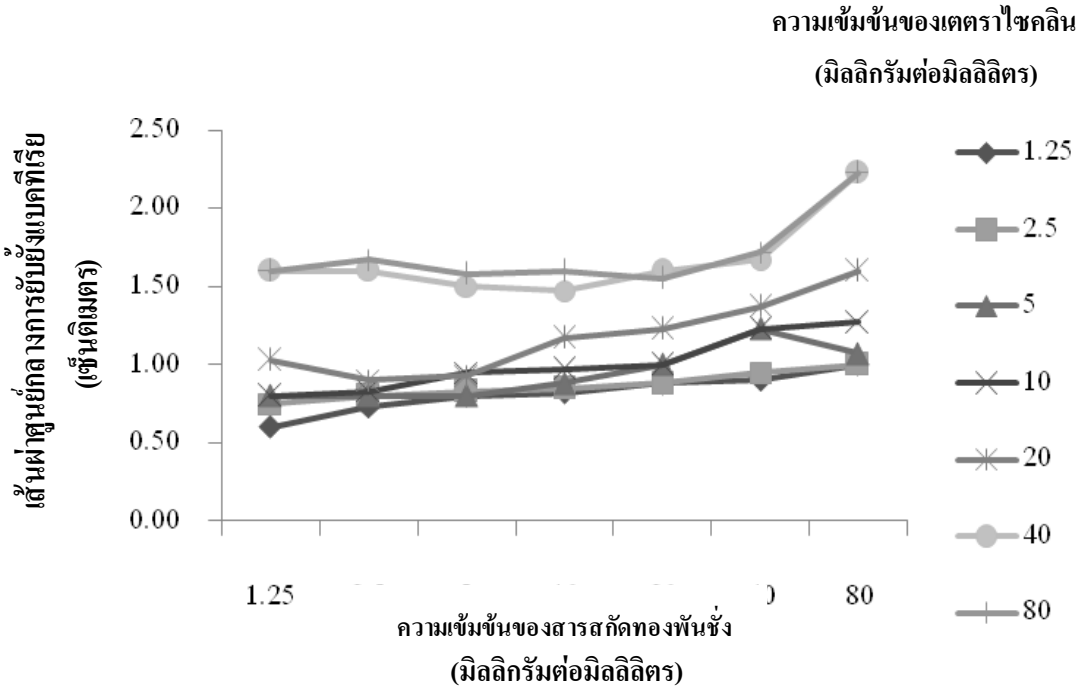
ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดทองพันชั่งกับยาแอมพิซิลินต่อเชื้อ *P. aeruginosa*



ภาพที่ 4 การเปรียบเทียบการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดทองพันชั่งกับยาเตตราไซคลินต่อเชื้อ *P. aeruginosa*



ภาพที่ 5 การเปรียบเทียบการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดทองพันชั่งกับยาแอมพิซิลินต่อเชื้อ MRSA



ภาพที่ 6 การเปรียบเทียบการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดทองพันชั่งกับยาเตตราไซคลินต่อเชื้อ MRSA

ยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อ MRSA (ตารางที่ 3 และภาพที่ 5 และ 6) พบว่าสารสกัดจากทองพันชั่งร่วมกับยาแอมพิซิลินหรือร่วมกับยาเตตราไซคลิน ต่างก็มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA ได้ดีกว่าการใช้ทองพันชั่งเพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 3 และภาพที่ 5 และ 6) ยกตัวอย่าง เช่น เมื่อใช้สารสกัดจากทองพันชั่งร่วมกับยาแอมพิซิลิน ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียเพิ่มขึ้น เมื่อใช้สารสกัดทองพันชั่งที่ความเข้มข้นต่ำกว่าหรือเท่ากับ 1.25-2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับยาแอมพิซิลินที่ความเข้มข้นต่ำสุด 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่มีการต้านฤทธิ์กันเมื่อใช้สารสกัดทองพันชั่งที่ความเข้มข้นสูงมากว่าหรือเท่ากับ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับยาแอมพิซิลินที่ความเข้มข้น 2.5 - 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3 และภาพที่ 5 และ 6) เมื่อใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาเตตราไซคลินในการยับยั้งเชื้อ MRSA พบการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดทองพันชั่งและยาเตตราไซคลินในการยับยั้งเชื้อ MRSA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบว่าสามารถลดค่า MIC ของสารสกัดทองพันชั่งได้ 4 เท่า เมื่อใช้ยาเตตราไซคลินที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ถ้าค่า MIC ของยาเตตราไซคลินต่ำลงจาก 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะไม่สามารถลดค่า MIC ของสารสกัดทองพันชั่ง (ตารางที่ 3 และภาพที่ 5 และ 6) ดังนั้นการใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาเตตราไซคลิน ให้ผลดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA อย่างมีประสิทธิภาพ

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น เราพบลักษณะการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด โดยเฉพาะการใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาเตตราไซคลิน ซึ่งจะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดได้ดีขึ้น อาจเนื่องจากสารสกัดจากทองพันชั่งไปเสริมฤทธิ์การต้านเชื้อของเตตราไซคลิน และเราพบลักษณะการต้านฤทธิ์กัน เมื่อใช้สารสกัดทองพันชั่งในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3) และไม่สามารถใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับแอมพิซิลินในการยับยั้งเชื้อแกรมลบดื้อยา เพราะอาจเกิดการหักล้างฤทธิ์ของยาแอมพิซิลลินจากเดิมที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบดื้อยาทั้งสองสายพันธุ์คือ *A. baumannii* และ *P. aeruginosa* (ค่า MIC เท่ากับ 80 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ) ส่วนสารสกัดจากทองพันชั่งสามารถเสริมฤทธิ์ของเตตราไซคลิน อธิบายได้ว่า สารออกฤทธิ์ในทองพันชั่งบางตัวอาจมีกลไกการยับยั้งแบคทีเรียที่มีกลไกการออกฤทธิ์คล้ายกับเตตราไซคลิน คืออาจไปรบกวนกระบวนการถ่ายรหัสของ DNA และยับยั้งการสังเคราะห์ RNA และโปรตีน (Ettayebi *et al*., 2000) หรือสารออกฤทธิ์บางตัวอาจช่วยนำพายาเตตราไซคลินเข้าไปภายในเซลล์ *A. baumannii* ได้ดียิ่งขึ้น (Hayashi *et al*., 1982; Solomakos *et al*., 2008; Hemaiswarya & Doble, 2009) โดยอาจจะไปรบกวนสมดุลของการผ่านเข้าออกของสาร (Zai-Chang *et al*, 2005) ส่วนการเสริมฤทธิ์กันกับแอมพิซิลินในการยับยั้งเชื้อ MRSA เพียงกรณีเดียว อาจเกิดจากสารออกฤทธิ์บางตัวของทองพันชั่งไปช่วยนำพายาแอมพิซิลินเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียชนิดแกรมบวก เพราะไม่มี outer membrane จึงทำให้ยาซึมเข้าสู่เซลล์ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ หรือมีกลไกการออกฤทธิ์คล้ายกับยาแอมพิซิลินซึ่งเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (Mahady *et al*., 2008) อย่างไรก็ตามยังคงต้องพิสูจน์กลไกต่างๆ การออกฤทธิ์ร่วมกันของสมุนไพรและยาปฏิชีวนะในระดับเซลล์ เช่นดูประสิทธิภาพการนำพาสารเข้าเซลล์แบคทีเรียดื้อยาด้วยวิธี flow cytometry และด้วย Electron microscopy หรือค้นหายีนดื้อยาเพื่อศึกษาความเป็นสารต้านฤทธิ์ (inhibitor) สารประกอบในสมุนไพรแต่ละชนิดด้วยการศึกษาการแสดงออกของยีนดื้อยาในแบคทีเรียดื้อยาในลำดับต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสกัดทองพันชั่งกับยาปฏิชีวนะสองชนิดคือยาแอมพิซิลินและยาเตตราไซคลินในการยับยั้งการเจริญเตอบโตของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยา จะเห็นได้ว่าการใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินหรือเตตราไซคลิน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียดื้อยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะการใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาเตตราไซคลินจะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบลักษณะการเสริมฤทธิ์กัน คือการใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาเตตราไซคลินในการยับยั้งเชื้อดื้อยาทั้งสามสายพันธุ์ คือ *A. baumannii, P. aeruginosa* และ MRSA และการใช้สารสกัดทองพันชั่งร่วมกับยาแอมพิซิลินในการยับยั้งเชื้อ MRSA นอกจากนี้ยังพบผลของการต้านฤทธิ์กัน เมื่อใช้กับยาแอมพิซิลินในระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ดำเนินการวิจัยขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนวิจัย ประเภทเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2553 ขอขอบคุณ ผ.ศ. ดร. วารี เนื่องจำนงค์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษา

เอกสารอ้างอิง

Alekshun, M.N., & Levy, S.B. (2007). Molecular mechanisms of multidrug resistance. *Cell*. 128, 1037-1050.

Akaanitapichat, P., Kurokawa, M., Tewtrakul S., Pramyothin, P., Sripanidkulchai, B., Shiraki, K. (2003). Inhibitory activities of Thai medicinal plants against *Herpes simplex* type 1, Poliovirus type 1, and measles virus. *The Sixth JSPS-NRCT joint Seminar: Recent Advances in Natural Medicine Research.*

Barry, A., and Thornsberry, C. (1999). Susceptibility tests: diffusion test procedures. *In* Balows, A., Hansler, W.J., Herrman, K.U., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J., editors. *Manual of clinical microbiology*. 5th eds. New York, American Society for Microbiology; pp. 1117-1132.

Cai, Q., Luo, Q., Sun, M. & Croke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74, 2517-2184.

Chen, X., Ois Niyonsaba, F., Ushio, H., Okuda, D., Nagaoka, I., Ikeda, S., Okumura, K., Ogawa, H. (2005). Synergistic effect of antibacterial agents human *b*-defensins, cathelicidin L-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Int. Journal. Dermatological Science*, 40, 123-132.

Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews,12*(4), 564-542.

David, G., Slack, C. B. & Peutherer, J. F. (2002). Medical Microbiology. London: Elsevier *Science Limitted*.

Ettayebi, K., Yamani, J. E., & Rossi-Hassani, B. D. (2000). Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters, 183*, 191-195.

Hayashi, H., Kunii, O., Komatsu, T., & Nishiya, H. (1982). The mechanisms of synergistic effect of antibiotics. A mechanism of synergism, cephaloridine with gentamicin on cephaloridine resistant gram negative bacilli. *Journal of Japan Antibiotics*, *35*(7), 1708-15.

Hemaiswarya, S., & Doble, M. (2009). Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine, 16*, 997–1005.

Kernan, M. R., Sendl, A., Chen, J. L., Jolad, S. D., Blanc, P., Murphy, J. T., Stoddart, C. A., Nanakorn, W., Balick, M. J., & Rozhon, E. J. (1997a). Two new lignans with activity against influenza virus from the medicinal plant *Rhinacanthus nasutus. Journal of Natural Products, 60* (6), 635-637.

Kernan, M. R., Sendl, A., Chen, J. L., Jolad, S. D., Blanc, P., Murphy, J. T. *et al*. (1997b).Two new lignans with activity against influenza virus from the medicinal plant *Rhinacanthus nasutus*. *Journal of Natural Products, 60*, 635-7.

Kimachi, T., Ishimoto, E. T. R., Sakue, A., & Ju-chi, M. (2009). Asymmetric total synthesis of Rhinacanthin A. Tetrahedon: *Asymmetry*, *20*, 1683-1689.

Kumar, A., and Schweizer, H. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *57*, 1486-1513.

Kuwaharam, S., Awai, N., & Kodama, O. (1995). A revised structure for Rhinacanthone. *Journal of Natural Products, 58* (9), 1455-1458.

Mahady, G.B., Huang, Y., Doyle, B.J. & Locklear, T. (2008). Natural products as antibacterial agents. *Studies in Natural Products Chemistry, 35*, 423-444.

Muroi, H., Nihei, K.I., Tsujimoto, K.,& Kubo, I. (2004). Synergistic effects of anacardic acids and methicillin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry, 12*(3), 583-587.

Nascimento, G. G. F., Locatelli, J., Freites, P. C., & Silva, G. L. (2000). Antimicrobial activity of Plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazillian Journal of Microbiology, 31*, 247-256.

Panichayupakaranant, P., & Kongchai, N., (2003). Antifungal activities of rhinacanthins and *Rhinacanthus nasutus* extract. *Proceeding of the third Indochina Conferrence on Phaarmaceutical Sciences.*

Sakanaka, S., Juneja, L., & Taniguchi, M. (2000). *Antimicrobial Effect of Green Tea Polyphenol on Thermophilic Spore-Forming Bacteria. Journal of Bioscience and Bioengineering*, *90*(1), 81-85.

Sattar, M. A., Abdulah, N. A., Khan, A. H., & Noor, A. M. (2004). Evaluation of anti-fungal and Anti-bacterial activity of a local plant *Rhinacanthus nasutus*. *Journal of Biological Sciences, 4*(4), 498-500.

Sendl, A., Chen, J. L., Jolad, S. D., Storddart, C., Rozhon, E., & Kernan, M. (1996). Two new Naphthoquinones with antiviral activity from *Rhinacanthus nasutus*. *Journal of Natural Products, 59*(8), 808-811.

Siripong, P., Yahuafai, J., Shimizu, K., Ichiwaka, K. *et al*. (2006). Induction of Apoptosis in Tumor Cell by Three Naphthoquinone Esters Isolated from Thai Medicinal Plant: *Rhinacanthus nasuthus* Kurz. *Journal of Biological & Pharmaceutical Bulletin, 29*(10), 2070-2076.

Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., & Botsoglou, N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiology, 25*(1), 120-127.

Tenover, F. C., Biddle, J. W., & Lancaster, M. V. (2001). Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptide in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*. 87, 327-332.

Tiwari, R. P., Bharti, S. K., Kaur, H. D., Dikshit, R. P. & Hoondal, G. S. (2004). Synergistic antimicrobial activity of tea & antibiotics. *Indian J Med Res, 122*, pp 80-84.

Voravuthikunchai, S. P., & Kitpipit, L. (2005). Activity of medicinal plant extracts against Hospital isolated of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, *11*, 493-512.

Wu, T. S., Tien J., Yeh, M. Y., (1988). Isolation and cytotoxicity of rhinacanthin-A and -B, Two Naphthoquinones from *Rhinacanthus nasutus. Phytochemistry, 49*(7), 2001-2003.

Zai-Chang, Y., Bo-Chu, W., Xiao-Sheng, Y., Qiang, W., & Liang, R. (2005). The synergistic activity of antibiotics combined with eight traditional Chinese medicines against two different strains of *Staphylococcus aureus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 41*, 79–81.