กิจกรรมการต้านเชื้อจุลินทรีย์และกิจกรรมต้านไบโอฟิล์ม ของสารสกัดจากกากกัญชา

Antimicrobial and Anti-biofilm Activity of *Cannabis sativa* Residue

เอื้อการย์ หินทอง
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนู เมยดง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.บุญมี กวินเสกสรรค์

บทคัดย่อ

ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อสุขภาพของมนุษย์และการสาธารณสุข คือ การเจ็บป่วยเนื่องจากการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค การศึกษาหาสารใหม่ ๆ เพื่อมายับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้จึงมีความสำคัญ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกากกัญชา และกิจกรรมต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรครวมไปถึงกิจกรรมต้านไบโอฟิล์มของสารสกัดจากกากกัญชา พบว่าสารสกัดจากกากกัญชาที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium และ *Staphylococcus aureus* ได้ดีไม่แตกต่างจากเอทานอลที่ความเข้มข้นอื่นที่ศึกษา ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentration; MIC) พบว่ามีค่า MIC ของสารสกัดจากกากกัญชาต่อแบคทีเรีย *E. coli, K. pneumoniae, Salmonella* Typhimurium และ *S. aureus* คือ ความเข้มข้นที่ 250, 250, 125 และ 15.625 µg/ml ตามลำดับ เมื่อทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากกากกัญชาที่ฆ่าเชื้อได้ (Minimum bactericidal concentration; MBC) พบว่าสารสกัดมีค่า MBC ต่อแบคทีเรีย *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Sal.* Typhimurium และ *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 500, 500, 250 และ 31.25 µg/ml ตามลำดับ ทั้งนี้ผลการศึกษาความสามารถของสารสกัดจากกากกัญชาต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค พบว่าสารสกัดนี้สามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Sal.* Typhimurium และ *S. aureus* ได้ร้อยละ 37.87, 40.37, 60.87 และ 79.78 ตามลำดับ โดยยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแกรมบวกได้สูงที่สุด ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารสกัดจากกากกัญชาในการใช้เป็นสารชีวภาพในการต้านจุลินทรีย์

คำสำคัญ: กัญชา สารสกัดหยาบ กิจกรรมต้านเชื้อก่อโรค ไบโอฟิล์ม

ABSTRACT

One of the major problems affecting human health and public health is illness due to infection with pathogenic bacteria. Studying new substances to inhibit these pathogenic bacteria is therefore important. The objective of this research was to study the appropriate solvent concentration for extracting bioactive compounds from cannabis residue and antibacterial activity against pathogenic bacteria including anti-biofilm activity of cannabis residue extracts. It was found that extracts from cannabis residue extracted with 50 % ethanol were able to inhibit pathogenic bacteria tested, including *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Staphylococcus aureus* just as well as ethanol at other studied concentrations. The minimum inhibitory concentration (MIC) of cannabis residue extract against *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* Typhimurium and *S. aureus* was 250, 250, 125 and 15.625 µg/ml, respectively. The minimum bactericidal concentration (MBC) of cannabis residue extracts was found that the extracts had MBC values for bacteria *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Sal.* Typhimurium and *S. aureus* was concentrations of 500, 500, 250 and 31.25 µg/ml, respectively. The results of the study on the ability of cannabis residue extract to inhibit the biofilm of pathogenic bacteria was found that this extract was able to reduced biofilm formation of *E. coli*, *K. pneumoniae, Sal.* Typhimurium and *S. aureus* at 37.87%, 40.37%, 60.87% and 79.78%, respectively. The crude extract inhibited biofilm formation of gram-positive bacteria better than gram-negative bacteria. The results of this study demonstrate the potential of cannabis residue extracts to be used as antimicrobial biological agents.

Keywords: Cannabis, Crude extract, Antimicrobial activity, Biofilm

1. บทนำ

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคเป็นปัญหาที่สำคัญด้านสุขภาพของมนุษย์และการสาธารณสุข โดยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญได้แก่ *Escherichia coli* (นิพนธ์ สนหอม และคณะ, 2565) *Klebsiella pneumoniae* (วรรณวรา ตัณฑ์กุลรัตน์ และคณะ, 2564) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (นิพนธ์ สนหอม และคณะ, 2565) และ *Staphylococcus aureus* (มนตรา ศรีษะแย้ม และคณะ, 2561) เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญที่ถูกเฝ้าระวังในการก่อโรคต่อมนุษย์และสัตว์ โดยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้สามารถเจริญในระบบทางเดินอาหารซึ่งเกิดจากการรับประทานอาหารที่ฆ่าเชื้อไม่สมบูรณ์หรือบริโภคน้ำดื่มที่ไม่สะอาดทำให้มนุษย์และสัตว์เกิดโรคจากอาหารที่มีระดับความรุนแรงน้อยจนถึงรุนแรงมาก เมื่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเจริญในระบบทางเดินอาหารจะก่อให้เกิดการอักเสบหรือระคายเคืองต่อเยื่อบุลำไส้และหากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสร้างสารพิษออกมาการก่อโรคจะรุนแรงขึ้น (ศนิ จิระสถิตย์, 2560; อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ และคณะ, 2563) โดยโรคจากแบคทีเรียเหล่านี้รักษาได้ด้วยยาปฏิชีวนะ แต่ทั้งนี้การใช้ยาปฏิชีวนะส่งผลเสียในด้านการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งในปี 2557 องค์การอนามัยโลกได้ประมาณ

การผู้เสียชีวิตจากเชื้อก่อโรคดื้อยาทั่วโลก พบว่าอาจมีมากกว่า 700,000 รายต่อปี และคาดว่าใน ปี พ.ศ. 2593 จะมีผู้เสียชีวิตถึงปีละ 10 ล้านคน (สุพรรณี ยิ่งขจร และคณะ, 2564) ดังนั้นต้องมีการศึกษาหาสารใหม่ ๆ มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้ เช่น การใช้สารที่ผลิตจากจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่นสารในกลุ่มแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) ที่มาจากแบคทีเรียกรดแล็กติกบางสายพันธุ์ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดี แบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีรายงานการผลิตแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *Lactobacillus farciminis, Lactobacillus pentosus, Leuconostoc* sp. และ *Lactobacillus plantarum* เป็นต้น แบคทีเรียเหล่านี้สามารถแยกได้จากอาหารหมักดอง ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนมากับอาหารได้ (ภาวิณี ศิลาเกษ และวรนุช ภักดีเดชาเกียรติ, 2560)

ด้านการใช้สารสกัดจากสมุนไพรเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่นิยมและมีรายงานประกอบการใช้ว่าสารสกัดจากสมุนไพรสามารถใช้ทำลายและควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ตัวอย่างเช่น สารสกัดจากขมิ้นชัน ที่มีสารสำคัญคือเคอร์คิวมิน มีฤทธิ์ช่วยต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อไวรัส และมีฤทธิ์ในการยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ถึง 13 ชนิด ซึ่งมี *E. coli* และ *S. aureus* รวมอยู่ด้วย (พรชัย สินเจริญโภไคย และคณะ, 2552) อีกทั้งยังมีการศึกษาสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรในด้านฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ *E. coli, K. pneumoniae, Sal. typhi* และ *S. aureus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นกัน (กีรติญา เอี่ยมถาวร และคณะ, 2555) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สารสกัดจากกระชายมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 และ *Sal. typhi* ได้ (สุจรรยา ฉายแสง, 2556)

อีกหนึ่งสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบันคือ สารสกัดจากกัญชา (*Cannabis sativa* L.) มีรายงานถึงกิจกรรมต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหลายสายพันธุ์ (Riaz et al., 2022) เนื่องจากกัญชานั้นมีสารสำคัญมากกว่า 100 ชนิด แต่สารสำคัญที่รายงานว่ามีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์คือ สารแคนนาบิไดออล (Cannabidol; CBD) ซึ่งสารนี้สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ รายงานการวิจัยที่ศึกษาสารแคนนาบิไดออลด้านการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ การใช้สารนี้ยับยั้งเชื้อ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ได้ (Backes, 2021) และสารสกัดจากกัญชายังสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคอื่น ๆ ได้อีกด้วย เช่น มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Sal. typhimurium, E. coli* (พราว ศุภจริยาวัตร และคณะ, 2564) *Staphylococcus* sp., *Klebsiella* sp., *Bacillus cereus, Enterobacter bugandensis* (Riaz et al., 2022) *S. aureus, Streptococcus epidermidis* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Martinenghi et al., 2020) จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากกัญชาสามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ จากข้อมูลที่กล่าวมาจะเห็นว่าสารสกัดจากกัญชาสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดีและจากการลงพื้นที่หาข้อมูลในหน่วยงานที่นำกัญชามาสกัดใช้ พบว่ามีกากกัญชาเหลือทิ้งจากการสกัดด้วยน้ำมันมะพร้าวเป็นจำนวนมาก ทั้งนี้จากรายงานก่อนหน้าสารสำคัญมีการสกัดมาจากตัวทำละลายอื่น ๆ ทางผู้วิจัยจึงคาดว่าเมื่อนำกากกัญชาที่เหลือทิ้งเหล่านั้นมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่นอาจมีสารสำคัญที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้หลงเหลืออยู่ จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ที่ศึกษาสารละลายในการสกัดกากกัญชาที่เหมาะสม เพื่อนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคและประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียก่อโรค

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกากกัญชา

2.2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากกากกัญชาต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียก่อโรค

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมกากกัญชา

กากกัญชาในการศึกษานี้รวบรวมมาจากโครงการฟื้นฟูคุณภาพชีวิตผู้สูงวัยด้วยน้ำมันกัญชาของอาจารย์เดชา ศิริภัทร ตำบลสระแก้ว อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี ที่ผู้เข้าร่วมโครงการสกัดขึ้นเองในการสกัดน้ำมันกัญชาของโครงการในโครงการนี้ใช้ช่อดอกกัญชาผสมใบกัญชา ก่อนการศึกษานำกากกัญชา 100 กรัม ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้ง และเก็บไว้ในโถดูดความชื้นเพื่อใช้ในการทดลองถัดไป

3.2 แบคทีเรียก่อโรคและการสภาวะการเพาะเลี้ยง

แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ *Escherichia coli* DMST 4212, *Klebsiella pneumoniae* TISTR 1383, *Salmonella enterica* Typhimurium DMST 8023 และ *Staphylococcus aureus* DMST 562 เลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton broth (MHB) บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส รอบเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3 การสกัดสารสกัดหยาบจากกากกัญชา

นำกากกัญชามาอบแห้งก่อนสกัด โดยสารละลายที่ใช้ในการสกัดคือเอทานอลที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่เอทานอล ร้อยละ 99 (ET99) เอทานอล ร้อยละ 80 (ET80) และเอทานอล ร้อยละ 50 (ET50) (Moreno et al., 2020) ใช้สารสกัดแต่ละความเข้มข้นที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และกากกัญชาปริมาณ 10 กรัม นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส รอบการเขย่า 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง 4 ชั้น แล้วนำไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน

3.4 ศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดจากกากกัญชาด้วยวิธี Agar well diffusion assay

นำสารสกัดจากกากกัญชาที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 (ET50) เอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 80 (ET80) และ เอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 99 (ET99) มาเตรียมที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวละลายสารสกัดก่อนนำมาทดสอบ ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion assay เริ่มจากปรับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทดสอบให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland no. 0.5 (10^7 CFU/ml) (Meidong et al., 2019) จากนั้นใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อจุ่มลงในเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทดสอบ นำมา swab ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA แบบสามระนาบให้ทั่วทั้งจาน เจาะหลุมในจานเพาะเลี้ยงเชื้อก่อนหยดสารสกัดจากกากกัญชาปริมาตร 100 ไมโครลิตร และใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อในหลุมควบคุม หยดลงในแต่ละหลุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบการยับยั้งจากโซนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น วัดผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทดสอบโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส โดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร

3.5 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration; MIC)

ในการทดสอบนี้ใช้ Mueller Hinton Broth (MHB) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ นำสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่คัดได้จากข้อ 3.4 คือ ET50 มาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยเตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางเป็นลำดับส่วนได้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.81 และ 3.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ลงในทุกหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาในการบ่มตรวจผลโดยสังเกตความการเจริญของแบคทีเรียทดสอบของทุกหลอด หลอดที่มีความขุ่นคือมีการเจริญ (+) หลอดที่ไม่มีความขุ่นคือไม่มีการเจริญ (-) โดยความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียให้บันทึกผลการทดลองเป็นค่า MIC (CLSI, 2009)

3.6 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration; MBC)

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เชื้อไม่เจริญในอาหารเหลวนั้น นำมาศึกษาต่อโดยนำหลอดที่ไม่มีการเจริญมาตรวจสอบการเจริญด้วยวิธี drop plate technique เพื่อหาค่า MBC (CLSI, 2011) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA รอให้แห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยเชื้อจากหลอด

ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดที่มีการเจริญในจานอาหารให้เครื่องหมายบวก (+) เชื้อจากหลอดความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญในจานอาหารให้เครื่องหมายลบ (-) การแปรผลคือความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อเจริญคือค่า MBC ของสารสกัดต่อเชื้อก่อโรคนั้น

3.7 การตรวจสอบผลของสารสกัดจากกากกัญชาต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

การศึกษานี้ได้ทำตามวิธีของ Bag and Chattopadhyay (2017) โดยสารสกัดจากกากกัญชาใช้จากการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 50 ที่ค่าความเข้มข้นจากผลการทดลอง MBC เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ทดสอบได้แก่ *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* Typhimurium และ *S. aureus*

ในการทดสอบเริ่มจากเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton broth ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 wells microtiter plate (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Denmark) ตามด้วยสารสกัดจากกากกัญชาปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นค่อยเติมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน microtiter plates จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาในการบ่มของแต่ละชุดการทดลอง นำมาล้างเบา ๆ 3 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แบคทีเรียที่ไม่ยึดเกาะจะหลุดออก จากนั้นตรึงเซลล์ด้วยเมทานอล (Analytical reagent, Australia) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เป็นเวลา 15 นาที และทำให้แห้ง แล้วนำเพลทมาย้อมด้วยสีคริสตัลไวโอเลตที่ละลายในน้ำกลั่นจนได้ความเข้มข้น ร้อยละ 2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นจนสีจางหายไป สกัดเซลล์โดยใช้กรดอะซิติกที่ละลายในน้ำกลั่นจนได้ความเข้มข้น ร้อยละ 33 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และนำไปวัด Ab_{600} ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลต (Spectrostar nano, Germany) โดยในหลุมควบคลุมเติมอาหารเลี้ยงเชื้อก่อโรคปริมาตร 100 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเชื้อก่อโรคปริมาตร 20 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณร้อยละการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มตามสูตรดังนี้

$$\%\text{Biofilm Inhibition} = [(A_{control} - A_{sample}) \div A_{control}] \times 100$$

3.8 การวิเคราะห์ผลด้วยวิธีทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยจากการทดลองในการศึกษาผลของสารสกัดจากกากกัญชาต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ทุกการทดลองทำ 3 ซ้ำ และนำไปวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบทางเดียว (One way Analysis of variance ANOVA) เมื่อพบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan new Multiple Rang Test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปแกรม SPSS for Windows

4. สรุปผลการวิจัย

4.1 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดจากกากกัญชาด้วยวิธี Agar well diffusion assay

จากการทดสอบสารสกัดจากกากกัญชาต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion assay พบว่า สารสกัดจากกากกัญชาที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 (ET50) ร้อยละ 80 (ET80) และร้อยละ 99 (ET99) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) สานสกัดที่ได้สามารถยับยั้ง *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* Typhimurium และ *S. aureus* โดยยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ

4.2 ผลการทดสอบหา MIC และ MBC

จากการวิเคราะห์ค่า MIC ของสารสกัดจากกากกัญชาตัวอย่าง ET50 ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 2 พบว่าค่า MIC ของสารสกัดจากกากกัญชาตัวอย่าง ET50 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* DMST 4212 และ *Klebsiella pneumoniae* TISTR 1383 คือ 250 µg/ml

ส่วนค่า MIC ของสารสกัดจากกากกัญชาต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium DMST 8023 คือ 125 µg/ml และค่า MIC ต่อการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* DMST 562 เท่ากับ 15.625 µg/ml

ตาราง 1 ผลของสารสกัดจากกากกัญชาในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ต่าง ๆ

ตัวอย่างทดสอบ	ขนาดโซนใสยับยั้ง (mm)			
	E. coli	*K.pneumoniae*	*Salmonella* Typhimurium	*S. aureus*
ET50	29.33±3.21[b]	25.33±2.08[c]	30.33±0.57[b]	35.00±0.00[b]
ET80	29.33±1.15[b]	20.33±1.52[b]	28.66±3.21[b]	35.00±0.00[b]
ET99	32.33±0.57[b]	28.33±2.88[c]	30.00±0.00[b]	35.00±0.00[b]
น้ำกลั่น	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]

ตัวอักษรตัวยกที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ผลการตรวจสอบหาค่า MIC ของสารสกัดจากกากกัญชาตัวอย่าง ET50 เมื่อนำมาตรวจค่า MBC พบว่าสารสกัดจากกากกัญชาที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Escherichia coli* DMST 4212 และ *Klebsiella pneumoniae* TISTR 1383 คือ 500 µg/ml ส่วนความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Salmonella* Typhimurium DMST 8023 คือ 250 µg/ml และความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* DMST 562 คือ 31.25 µg/ml

4.3 ผลของสารสกัดจากกากกัญชาต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรค

จากการทดสอบสารสกัดจากกากกัญชาต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยนำตัวอย่าง ET50 มาทำการศึกษาและใช้ความเข้มข้นของตัวอย่าง ET50 ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยอ้างอิงจากค่า MBC จากการทดลองพบว่าสารสกัด ET50 ต่อแบคทีเรียก่อโรคเมื่อเวลาการบ่มเพิ่มขึ้นหรือคือเวลาที่เชื้ออยู่ในสารสกัดนานขึ้นจะพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สารสกัด ET50 ต่อการยับยั้งไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*, *K. pneumoniae, Salmonella* Typhimurium และ *S. aureus* ที่เวลาในการบ่ม 72 ชั่วโมง มีร้อยละการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่ 37.87±1.17, 40.37±0.70, 60.87±1.94 และ 79.78±0.81 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่าสารสกัด ET50 ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

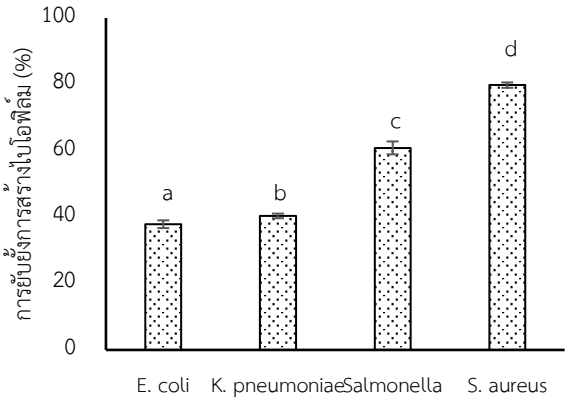
ตาราง 2 ผลการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากกากกัญชาที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 (ET50)

แบคทีเรียทดสอบ	ความเข้มข้นของตัวอย่างทดสอบ (µg/ml)	
	MIC	MBC
E. coli	250	500
K. pneumoniae	250	500
Salmonella Typhimurium	125	250
S. aureus	15.625	31.25

5. อภิปรายผล

ในการวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาผลของสารสกัดจากกากกัญชาต่อกิจกรรมการต้านเชื้อจุลินทรีย์และกิจกรรมต้านไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ผลการวิจัยครั้งนี้สามารถอภิปรายผลตามลำดับของวัตถุประสงค์การวิจัยดังต่อไปนี้ ตัวทำละลายที่ใช้ทำการสกัด คือ เอทานอลซึ่งเป็นหนึ่งในตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลายงานวิจัยนิยมนำมาใช้ ตัวอย่างเช่นงานวิจัยของ Riaz et al. (2022) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ของพืชกัญชาต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อ

โรคที่แยกมาจากระบบทางเดินอาหารและเยื่อเมือกของปลาหมอเทศ และงานวิจัยของ Martinenghi et al. (2020) ที่สกัด การทำบริสุทธิ์ และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคของสาร cannabidiolic acid (CBDA) และ cannabidiol (CBD) ที่สกัดจากกัญชา (*Cannabis sativa* L.) โดยทั้งสองงานวิจัยนั้นได้นำเอทานอลมาใช้ในการสกัดสารสำคัญจากกัญชาที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน



ภาพที่ 1 ผลของสารสกัดจากกากกัญชาต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรคทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่เวลา 72 ชั่วโมง; ตัวอักษรตัวยกที่แตกต่างกันในแต่ละแท่งกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

สำหรับความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ดีเทียบเท่ากับระดับความเข้มข้นร้อยละ 80 และร้อยละ 99 โดยทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion assay ซึ่งงานวิจัยของรัตนา เพ็งเพราะ และคณะ (2562) ได้ใช้วิธีการนี้ในการทดสอบสารสกัดสมุนไพรเนียมหอม ใบเตยตะไคร้ และรางจืดกับการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* DMST 8840 หรือแม้แต่งานวิจัยของกานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร และมนัสวี เดชกล้า (2560) ที่ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบชะมวง ใบหว้า ใบฝรั่ง มะเขือพวง สาปแร้งสาปกา ในการยับยั้งของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคท้องเสียได้นำวิธีนี้มาใช้ทดสอบกับเชื้อ *E. coli* เช่นกันและเพื่อความชัดเจนต่อการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคของสารสกัดในเกือบทุกงานวิจัยมักหาค่า MIC ร่วมด้วย โดยค่า MIC ของสารสกัดจากกากกัญชาที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ ตัวอย่างเช่นค่า MIC ต่อการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* DMST 562 อยู่ที่ 15.625 µg/ml เปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Martinenghi et al. (2020) ที่ทดสอบสารสกัด CBDA พบว่าค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* อยู่ที่ 2 µg/ml และค่า MIC ของสาร CBD ต่อเชื้อ *S. aureus* อยู่ที่ 1 µg/ml ซึ่งหากค่า MIC ที่ความเข้มข้นต่ำสุดสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ ดังนั้นค่าความเข้มข้นที่สูงขึ้นก็จะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดียิ่งขึ้น เช่นเดียวกับค่า MBC ที่ความเข้มข้นต่ำสุดสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ หากค่าความเข้มข้นสูงขึ้นก็จะสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดียิ่งขึ้นและค่า MBC ที่ได้สามารถนำสารสกัดนั้นไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มโดยเทียบชั่วโมงที่ผลการยับยั้งสูงที่สุดคือที่ 72 ชั่วโมง ซึ่งจากการวิจัยของ Gildea et al. (2022) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของ CBD ที่สกัดจากกัญชง (*Cannabis sativa*) ต่อเชื้อ *Sal. typhimurium* และ *Sal. newington* สามารถยับยั้งการสร้างสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Sal. typhimurium* และ *Sal. newington* สูงสุดที่ระยะเวลาทดสอบ 48 ชั่วโมง

6. ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้มุ่งเน้นหาสารจากธรรมชาติเพื่อใช้ยับยั้งเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งสารสกัดจากกากกัญชามีความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร รวมไปถึงสารสกัดจากกากกัญชานี้ยังมีข้อดีคือไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพมนุษย์และสัตว์หากใช้ในปริมาณที่เหมาะสม

ข้อเสนอแนะในการทำการวิจัยครั้งต่อไป

เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาครั้งต่อไป ผู้วิจัยจึงขอเสนอแนะประเด็นที่น่าศึกษาต่อไป เช่น การนำสารสกัด

จากกากกัญชาไปประยุกต์ใช้ร่วมกับจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ในการยับยั้งและทำลายเชื้อก่อโรค การศึกษาสารสกัดจากกากกัญชาในการยับยั้งเชื้อรา หรือการหาปริมาณที่เหมาะสมของสารสกัดต่อการนำไปใช้ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค เป็นต้น

7. เอกสารอ้างอิง

กานต์ชนา สิทธิ์เหล่าถาวร และมนัสวี เดชกล้า. (2560). การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคท้องเสียและการประยุกต์ใช้แก่นตะวันเป็นพรีไบโอติกในการผลิตโยเกิร์ต. **Journal of Food Health and Bioenvironmental Science**, 10(3), 69-86.

กีรติญา เอี่ยมถาวร และยิ่งมณี ตระกูลพัว. (2555). การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโพรพอลิส นมผึ้ง และฟ้าทะลายโจร. **การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานระดับชาติ The 4th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012 "Pharmacy Profession in Harmony" ณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น**, 103-110.

ธนวัฒน์ ทองจีน สรเพชร มาสุด พีรธรรม เทียมเทียบรัตน์ สายัณห์ เรืองเขตร ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง พิเชฐ บัญญัติ ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์ และอัศวชัย ช่วยพรหม. (2564). การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ในใบกัญชาด้วยวิธี Ultra High Performance Liquid Chromatography. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์**, 63(3), 505-523.

นิพนธ์ สนหอม วีระพงษ์ วรประโยชน์ กฤตพร รำจวนเกียรติ. (2565). การศึกษาการยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Salmonella* Typhimurium ด้วยสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรไทย 12 ชนิด และสารสกัดหยาบผสม. **วารสารวิจัยราชภัฏพระนคร สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, 17(2), 26-38.

พรชัย สินเจริญโภไคย องอาจ เลาหวินิจ พัชรี สุนทรนันท งามผ่อง คงคาทิพย์ สุริยัน สุทธิประภา และบุญส่ง คงคาทิพย์. (2552). ผลการยับยั้งของสารสกัดขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในคนและสัตว์บางชนิด. **บทความในหนังสือเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาวิทยาศาสตร์**, 1-10. ISBN: 978-974-660-354-366.

พราว ศุภจริยาวัตร สุจริต อุ่นกาศ วิจิตรา สุดห่วง ปัถยา ศิรินันท์ธนานนท์ เสกรชตกร บัวเบา ศรายุธ ระดาพงษ์ พิเชฐ บัญญัติ ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์ แพรว ศุภจริยาวัตร และพรชัย สินเจริญโภไคย. (2564). การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากช่อดอกกัญชาพันธุ์ไทย. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์**, 63(3), 490-504.

ภาวิณี ศิลาเกษ และวรนุช ภักดีเดชาเกียรติ. (2560). การประยุกต์ใช้สารยับยั้งจุลินทรีย์จากแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**, 51-61.

มนตรา ศรีษะแย้ม จริญา จูด้วง อนงค์ ศรีโสภา พิมรินทร์ คีรินทร์ และสริตา สังข์ทอง. (2561). องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นสามชนิดในประเทศไทย. **วารสารมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม**, 19(2), 222-233.

รัชนู เมยดง เสาวนิต ทองพิมพ์ จรัญ ประจันบาล รัตน์สุภา ธรรมาภรณ์ เกษม คงนิรันดรสุข ปิลันธนา เลิศสถิตธนกร และศิริพร ทิพย์สิงห์. (2564). กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคและการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของสารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญชง. **วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้**, 12(1), 99-110.

รัตนา เพ็งเพราะ ภาวิณี ศิลาเกษ สันธยา บุญรุ่ง และปกฉัตร กุศลกรรมบถ. (2562). ผลของสารต้านอนุมูลอิสระและสารสกัดหยาบเนียมหอมร่วมกับสมุนไพรพื้นบ้านต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**, 21(3), 208-224.

วรรณวรา ตัณฑ์กุลรัตน์ วิศิษฎ์ ฉวีพจน์กำจร และพีรยา เอกจริยาวัฒน์. (2564). ปัจจัยเสี่ยงที่มีความสัมพันธ์

กับการติดเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่ดื้อต่อยา Carbapenems ในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิ. **งานประชุมวิชาการระดับชาตินนทรีอีสาน ครั้งที่ 9 (ออนไลน์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร**, 1090-1101.

ศนิ จิระสถิตย์. (2560). จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร. **วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา**, 22(2), 218-232.

สุจรรยา ฉายแสง. (2556). การแยกเชื้อเอนโดไฟติคแอคติโนมัยซีสจากข่าและกระชาย: สมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์การต้านอนุมูลอิสระและการต้านเซลล์มะเร็ง. **วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร**, 1-156.

สุพรรณี ยิ่งขจร สตา สุทธิโชติ นิธิกุล หงส์ทอง ตั้ม บุญรอด วิชชาดา สิมลา และศิริรัตน์ ศรีรักษา. (2564). การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียในโรงพยาบาล:การทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบและการวิเคราะห์เชิงอภิมาน. **วารสารวิชาการสาธารณสุข**, 30(5), 916-927.

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ สถิตย์ พันวิไล จรัญ ประจันบาล และสมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ. (2563). จุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหารที่สำคัญ. **วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้**, 11(1), 188-206.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2011). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: Twenty-first Informational Supplement M100-S21. CLSI, Wayne, PA, USA.

Martinenghi, L.D., Jonsson, R., Lund, T. and Jenssen, H. (2020). Isolation, Purification, and Antimicrobial Characterization of Cannabidiolic Acid and Cannabidiol from *Cannabis sativa* L. **Biomolecules**, 2020(10,900), 1-15.

Gildea, L., Ayariga, J.A., Ajayi, O.S., Xu, J., Villafane, R. and Samuel-Foo, M. (2022). Cannabis sativa CBD Extract Shows Promising Antibacterial Activity against *Salmonella typhimurium* and *S. newington*. **Molecules**, 27(2669), 1-18.

Backes, M. (2021). กัญชาทางการแพทย์. (จารวี นิพนธ์กิจ). กรุงเทพฯ : แอร์โรว์.

Moreno, T., Montanes, F., Tallon, S.J., Fenton, T., King, J.W. (2020). Extraction of cannabinoids from hemp (*Cannabis sativa* L.) using high pressure solvents: An overview of different processing options. **The Journal of Supercritical Fluids**, 161(1), 104850.

Riaz, Z., Khalid, S., Ali, Q., Ashfaq, N., Hayat, S., Ahmad, F. and Haider, M.S. (2022). Anti-microbial potential of cannabis plant extract against bacteria isolated from gut and mucus of *Oreochromis mossambicus*. **Biological and Clinical Sciences Research Journal**, 101, 1-11. ISSN: 2708-2261.