

ผลของสารสกัดสมุนไพรผางและซิลเวอร์ไอออน ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนม

Effect of *Caesalpinia sappan* L. extract and Silver ions on inhibition mastitis-causing bacteria pathogens in dairy cows

ผกาสินี ขาวแดง¹, วิวัฒน์ พัฒนาวงค์¹, ปราณวรี สุคันธ์², กฤดา ชูเกียรติศิริ¹, อภิชาติ หมั่นวิชา¹ และ พชรพร ตาดี^{1*}

Pakasinee Khaodang¹, Wiwat Pattanawong¹, Pranrawee Sukhan², Kridda Chukiatsiri¹, Apichart Manwicha¹ and Phacharaporn Tadee^{1*}

¹ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้

¹ Faculty of Animal Science and Technology, Maejo University

² คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

² Faculty of Sciences, Maejo University

บทคัดย่อ: ปัญหาเต้านมอักเสบในโคนมส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ทำให้ต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา ก่อให้เกิดการตกค้างของยาปฏิชีวนะ และการเพิ่มอุบัติการณ์ดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียได้ การใช้สมุนไพรหรือสารอื่นๆ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ สมุนไพรผางเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และซิลเวอร์ไอออนสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อราได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรผางและซิลเวอร์ไอออน ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนม ด้วยวิธีการตรวจวัดความเข้มข้นของสมุนไพรผางและซิลเวอร์ไอออนที่น้อยที่สุด (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนม โดยมีความเข้มข้นของสมุนไพรผางเท่ากับ 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0.07, 0.04 และ 0.02 มก./มล. ตามลำดับ และระดับความเข้มข้นของซิลเวอร์ไอออนเท่ากับ 2, 1 และ 0.5 มล.ม./มล. ตามลำดับ พบว่าสมุนไพรผางมีค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 0.04 – 2.5 มก./มล. โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* มีค่า MIC น้อยที่สุดคือ 0.04 มก./มล. และ *Streptococcus uberis* ที่ 2.5 มก./มล. รวมไปถึงซิลเวอร์ไอออนพบว่าทุกเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบที่นำมาทดสอบ มีค่า MIC อยู่ที่ 0.5 มล.ม./มล. จากผลการทดลองสรุปได้พืชสมุนไพรผางและซิลเวอร์ไอออนสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้เชิงพาณิชย์ต่อไปได้

คำสำคัญ: สมุนไพรผาง; ซิลเวอร์ไอออน; แบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบ; โคนม

ABSTRACT: Most cases of mastitis in dairy cows are caused by bacterial infections. Irrational use of antibiotics leads to antibiotic residue and increases the incidence of drug resistance of bacteria. The use of herbs or other substances is therefore an alternative to the use of antibiotics. *Caesalpinia sappan* L. is an herb that has the effect of inhibiting bacteria. Additionally, silver ions have the effect of killing bacteria, viruses, and fungi. The objective of this study was to evaluate the efficacy of *Caesalpinia sappan* L. extracts and silver ions to inhibit mastitis causing bacteria pathogens in dairy cows. The minimum inhibitory concentration method (MIC), uses *Caesalpinia sappan* L. and silver ions, was tested for inhibition of mastitis-causing bacteria pathogens in dairy cows. The concentrations of *Caesalpinia*

* Corresponding author: Phacharaporn.boonkoot@gmail.com

Received: date; April 30, 2024 Revised: date; August 28, 2024

Accepted: date; August 28, 2024 Published: date; October 7, 2024

sappan L. extract evaluated were 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0.15, 0.7, 0.04, 0.02 and 0.02 mg/mL, and the concentration of the silver ion evaluated were 2, 1, and 0.5 mM/mL. The MIC value of *Caesalpinia sappan* L. was between 0.04 and 2.5 mg/mL. The lowest MIC value of *Caesalpinia sappan* L. extract was 0.04 mg/mL for *Enterococcus faecalis*. The highest MIC value of *Caesalpinia sappan* L. extract was 2.5 mg/mL for *Streptococcus uberis*. In addition, The MIC value of silver ions was 0.5 mM/mL for all mastitis-causing bacteria. It was concluded that *Caesalpinia sappan* L. and silver ions can be applied in commercial production processes.

Keywords: *Caesalpinia sappan* L.; Silver ions; mastitis-causing bacteria pathogens; dairy cows

บทนำ

ปัญหาโรคเต้านมอักเสบในโคนม ยังคงเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตน้ำนมและสุขภาพของโคนม รวมไปถึงส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก พบว่าในโคนมร้อยละ 31 เป็นโรคเต้านมอักเสบเมื่อเทียบกับโรคอื่นๆ ที่เกิดในโคนม (Hagner et al., 2024) ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสวัสดิภาพสัตว์และความยั่งยืนในระยะยาวของอุตสาหกรรมนม (Chinmayee et al., 2024) การเกิดโรคเต้านมอักเสบหรือการอักเสบของเต้านมในโคนมมีหลายสาเหตุ ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1. เชื้อแบคทีเรียติดต่อจากโคสู่โค (contagious bacteria) เช่น *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* และ *Corynebacterium bovis* (Makovec and Ruegg, 2003) เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถแพร่กระจายไปสู่โคตัวอื่นๆ ผ่านกระบวนการรีดนม มือคนรีดนม ผ้าเช็ดเต้านม และอุปกรณ์รีดนม เป็นต้น 2. เชื้อแบคทีเรียที่มาจากสิ่งแวดล้อม (environmental bacteria) เช่น *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* และ *Pseudomonas spp.* (Makovec and Ruegg, 2003; Sampimon et al., 2004) เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่พบได้ในสิ่งแวดล้อมภายในฟาร์ม เช่น อาหาร มูลโค สิ่งรองนอน และพื้นดิน เป็นต้น (Visser and Driehuis, 2009) ซึ่งไม่สามารถกำจัดออกไปจากสิ่งแวดล้อมภายในฟาร์มได้หมด (Smith and Hogan, 1993) ในโครีดนมในประเทศไทยที่มีรายงานในหลายพื้นที่ว่าพบอุบัติการณ์การเกิดโรคเต้านมอักเสบที่มีค่าสูง เช่น อำเภอมือง จังหวัดขอนแก่น พบว่า 40 % ของฟาร์มโคนมมีปัญหาเต้านมอักเสบ (Kampa et al., 2010) นอกจากนี้จังหวัดเชียงใหม่และลำพูน พบว่าแม่โคเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการร้อยละ 28.86 (ธัญญาพร และคณะ, 2548) พบส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* และ *Bacillus spp.* (Todtong et al., 2021) นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้ยังพบอุบัติการณ์ดื้อยาที่สูงขึ้น เนื่องจากมีกลไกการดื้อยาที่หลากหลาย ส่วนมากจะดื้อต่อยากลุ่มเพนิซิลลิน (แอมพิซิลลิน) อะมิโนไกลโคไซด์ และเตตราไซคลิน (Tiwari et al., 2013) การศึกษาของศุภรัตน์และคณะ (2550) ได้ทำการศึกษาค่าการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียที่สัมพันธ์กับเต้านมอักเสบในแม่โครีดนมในเขตจังหวัดเชียงใหม่ พบว่าเชื้อแบคทีเรียแสดงความชุกต่อการดื้อยาเซฟทริไมด์น้อยที่สุดและแสดงความชุกต่อการดื้อยาแอมพิซิลลินและเตตราไซคลินมากที่สุด ทำให้การเลือกใชยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอาจไม่ได้ผล จึงมองหาสารสกัดจากธรรมชาติ ก่อให้เกิดผลข้างเคียงน้อยกว่ายาปฏิชีวนะเมื่อใช้เป็นเวลานาน (Cheesman et al., 2017; Gupta and Birdi, 2017)

ฝาง (*Caesalpinia sappan* L.) เป็นไม้พุ่มขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ลักษณะของลำต้น ผล ดอก และแก่นฝาง เปลือกไม้มีสีน้ำตาลอมเทา กิ่งอ่อนจะมียอดขนสีน้ำตาล (Orwa et al., 2019) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีมาอย่างยาวนาน มีองค์ประกอบทางเคมีหลักๆ คือ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) กรดฟีนอลิก (phenolic acids) และแอนทราควิโนน (anthraquinones) และแทนนิน (Tannin) (Vij et al., 2023) การศึกษาของชนัญ และ ศรีบุญ (2562) พบว่าสารประกอบฟีนอลิกรวม (TPC) ของแก่นฝางมีค่า 699.68 ± 34.02 มก. มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (TFC) เท่ากับ 170.21 ± 14.20 มก. เทียบเท่าเคออสตินต่อกรัมสารสกัด การศึกษาฝางมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา อาทิ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ของแก่นฝางที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่า 3.69 ± 0.17 มก./มล. (Hwang and Shim, 2018) ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial) (Puttipan et al., 2017) ชัดขวางการเกิดปฏิกิริยา oxidative phosphorylation และยับยั้งการสร้างเอนไซม์นอกเซลล์ของแบคทีเรีย รวมไปถึงยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยมีคุณสมบัติในการลดการยึดเกาะของแบคทีเรียบนพื้นผิว สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) และโปรตีนของแบคทีเรียได้ (Xu and Lee, 2004) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammation) (Jung et al., 2015)

ซิลเวอร์ไอออน (Silver ions; Ag^+) เป็นโลหะธาตุเงินที่เกิดเป็นไอออนบวกหลังจากสูญเสียอิเล็กตรอนชั้นนอก รัศมีมีขนาดเท่ากับขนาดอะตอมมีรัศมี เท่ากับ 0.126 น.ม. ซิลเวอร์ไอออนมีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อรา (Moteriya and Chanda, 2020) หลักการทำงานของซิลเวอร์ไอออนคือทำให้เกิดความเป็นพิษต่อโปรตีนของเมมเบรน ซึ่งทำให้เกิดการหยุดชะงักของความสมบูรณ์ของเมมเบรน การผลิตสารต้านจุลชีพที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม มีประสิทธิภาพ ด้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ และมาจากแหล่งธรรมชาติที่มีอยู่จึงเป็นเป้าหมายหลัก ด้วยการผสมผสานระหว่างซิลเวอร์ไอออนและจุลชีววิทยา ทำให้สามารถสร้างสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ได้ โดยที่ซิลเวอร์ไอออนที่ได้ทำการทดสอบแล้วว่าสามารถต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพต่อแบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อราที่ออกฤทธิ์ได้ดี (Hamad et al., 2020)

ดังนั้น สรรพคุณของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและซิลเวอร์ไอออนสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้นานอีกสัปดาห์ได้ วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้นานอีกสัปดาห์จากพืชสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและซิลเวอร์ไอออน เพื่อพัฒนาประยุกต์ใช้อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ป้องกันโรคได้นานอีกสัปดาห์ในโคนมสู่กระบวนการเชิงพาณิชย์ต่อไป

วิธีการศึกษา

วิธีการเตรียมสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร

นำพืชสมุนไพรฟ้าทะลายโจรที่ปลูกตามธรรมชาติ นำแก่นฝางมาตัดแยกสิ่งสกปรก ล้างทำความสะอาด อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ด้วยตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการหั่นและบดให้ละเอียด จากนั้นนำมาสกัดด้วยเอทานอลที่มีความเข้มข้น 70 % ตัดแปลงจากธนภัทร (2562) โดยใช้อัตราส่วนฝางต่อเอทานอล 70% เท่ากับ 1 ต่อ 10 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมารองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Vacuum rotary evaporator ต่อด้วยการระเหย (evaporation) จนได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) จากนั้นนำสารสกัดที่ได้นำไปพ่นแห้ง (Spray dry) ในสภาวะในการพ่นแห้ง ขนาดรูหัวฉีดพ่น 0.7 มม. ที่ความดันอากาศ 40 mbar การทำงานของเครื่อง Spray Dryer เริ่มจากอากาศจะถูกดูดผ่านตัวกรองและผ่านตัวให้ความร้อน จากนั้นจึงเข้าสู่ห้องอบแห้ง (drying chamber) ส่วนตัวอย่างของเหลว (feed) ที่นำมาฉีด ควรมีลักษณะเหลว และไม่ข้นมาก จากนั้นของเหลวจะถูกดูดโดยปั๊มผ่านอุปกรณ์ที่ทำให้เกิดละอองฝอยคือ atomizer ภายในห้องอบ เมื่อละอองสัมผัสกับอากาศร้อนจะทำให้เกิดการระเหยของน้ำอย่างรวดเร็ว และจะได้ผงของผลิตภัณฑ์ตกลงสู่ด้านล่างของ drying chamber ผงบางส่วนที่หลุดออกมากับอากาศจะถูกแยกโดยใช้ cyclone ซึ่งจะรวมเข้าเป็นผลิตภัณฑ์รวมในที่สุด ประโยชน์ของการพ่นแห้งเพื่อทำสารสกัดให้เป็นผง เพื่อง่ายต่อการใช้งาน การเก็บรักษา และสะดวกในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

วิธีการเตรียมซิลเวอร์ไอออน (Ag^+)

นำซิลเวอร์ไนเตรดเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ซิลเวอร์ไอออน จากบริษัท อาร์ซีไอ แล็บสแกน (RCI Labscan) นำมาผสมกับน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ปริมาณ 0.3397 กรัม ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 2 มล. ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 -45 นาที ที่อุณหภูมิไม่เกิน 37 องศาเซลเซียส (ตัดแปลงจาก Ali et al., 2016) สารเหล่านี้เป็นสารที่ละลายได้ง่ายทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ซิลเวอร์ไนเตรดและเกิดปฏิกิริยารีดักชัน มีผลทำให้เปลี่ยนจากซิลเวอร์ไนเตรดเป็นอนุภาคซิลเวอร์ไอออน นำมาทดสอบต่อไป

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของของสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) โดยวิธี Broth microdilution

เตรียมเชื้อก่อโรคได้นานอีกสัปดาห์ จำนวน 15 ชนิด ที่เพาะแยกได้จากน้ำนมของโคนมที่เป็นโรคได้นานอีกสัปดาห์ ได้แก่ เชื้อ *Escherichia coli* ATCC25945, *Staphylococcus aureus* ATCC6573, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cerues*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*, *Pseudomonas luteola*, *Rhodococcus spp.*, *Serratia plymuthica*, *Staphylococcus sciuri* และ *Streptococcus agalactiae* ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) ยี่ห้อ Himedia บ่มไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำโคโลนีที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton broth (MHB) ยี่ห้อ Himedia บ่มไว้ 24 ชั่วโมง 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นอยู่ที่ 0.5 McFarland standard CFU/mL จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาทำในจานหลุมเพาะเชื้อ (microtiter plate 96-well) ตามวิธีการของ

Golus et al. (2016) ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Agar (MHA) ยี่ห้อ Himedia 50 ไมโครลิตร และมีความเข้มข้นของพีชสมุนไพรที่ได้ทำการสกัดไว้แล้วที่ระดับ 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0.15, 0.07, 0.04 และ 0.02 มก./มล. ตามลำดับ ปริมาณ 50 ไมโครลิตร และความเข้มข้นของซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) ที่สังเคราะห์จากซิลเวอร์ไนเตรดแล้ว ที่ระดับความเข้มข้น 2, 1 และ 0.5 มล.ม./มล. ตามลำดับ จากนั้นใส่เชื้อที่ปรับขนาดเป็น 0.5 McFarland standard CFU/mL แล้วใช้ปิเปตดูดเชื้อปริมาณ 2 มก. ลงในแต่ละหลุมแล้วปิดฝา ก่อนนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแต่ละเชื้อแบคทีเรียจะทำทั้งหมด 3 ซ้ำ (Replication) และทำการทดสอบแยกกันระหว่างสมุนไพร กับซิลเวอร์ไอออน อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ได้และบันทึกข้อมูล

การวิเคราะห์ทางสถิติ

สถิติเชิงพรรณนาอธิบายค่าความเข้มข้นของสารสกัดผิวและซิลเวอร์ไอออนที่น้อยที่สุด (minimum inhibitory concentration: MIC) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคเต้านมอักเสบ ที่สามารถบอกค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ ว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นเท่าใด สามารถใช้ประกอบการพิจารณาในการใช้ในปริมาณที่เหมาะสม โดยการวิเคราะห์ค่าของ MIC โดยค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric mean)

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่น้อยที่สุด MIC (Minimum inhibitory concentration) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบ พบว่ามีค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 0.04 – 2.5 มก./มล. โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* มีค่า MIC น้อยที่สุดคือ 0.04 มก./มล. *Streptococcus uberis* ที่ 2.5 มก./มล. (Table 1)

Table 1 Minimum inhibitory concentration (MIC) of *Caesalpinia sappan* L. on Mastitis-causing bacteria pathogens

Bacteria	MIC (mg/mL)
<i>Escherichia coli</i> ATCC25945	1.25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6573	1.25
<i>Escherichia coli</i>	0.31
<i>Enterococcus durans</i>	0.15
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.04
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.07
<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>pneumonia</i>	0.50
<i>Pseudomonas luteola</i>	1.25
<i>Rhodococcus</i> spp.	0.07
<i>Serratia plymuthica</i>	0.15
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0.62
<i>Staphylococcus agalactiae</i>	1.25
<i>Streptococcus uberis</i>	2.5
<i>Bacillus cereus</i>	1.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	1

ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) ที่น้อยที่สุด (minimum inhibitory concentration : MIC) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบ พบว่าซิลเวอร์ไอออนสามารถยับยั้งทุกเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบที่นำมาทดสอบมีค่า MIC อยู่ที่ 0.5 มก./มล. ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของซิลเวอร์ไอออนในการนำมาทดสอบในการหาค่าในครั้งนี้ (Table 2)

Table 2 Minimum inhibitory concentration (MIC) of Silver ions (Ag^+) on Mastitis-causing bacteria pathogens

Bacteria	MIC (mM/mL)
<i>Escherichia coli</i> ATCC25945	0.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6573	0.5
<i>Escherichia coli</i>	0.5
<i>Enterococcus durans</i>	0.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp pneumonia	0.5
<i>Pseudomonas luteola</i>	0.5
<i>Rhodococcus</i> spp.	0.5
<i>Serratia plymuthica</i>	0.5
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0.5
<i>Staphylococcus agalactiae</i>	0.5
<i>Streptococcus uberis</i>	0.5
<i>Bacillus cereus</i>	0.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.5

วิจารณ์

ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรนางพญาเสือ (minimum inhibitory concentration : MIC) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบ พบว่ามีค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 0.04 – 2.5 มก./มล. โดยเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* มีค่า MIC น้อยที่สุดคือ 0.04 มก./มล. *Streptococcus uberis* ที่ 2.5 มก./มล. สอดคล้องกับการศึกษาของ Xu and Lee (2004) ที่ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดนางพญาเสือพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 อยู่ที่ 256 มก./มล. *Streptococcus agalactiae* (Group B Strep) A909 อยู่ที่ 8 มก./มล. และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ที่ 256 มก./มล.

การศึกษาของ Pielta (2000) สกัดผงด้วยเอธานอล 70 % สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* และ *Vibrio parahaemolyticus* ที่ความเข้มข้น 5 มก./มล. และสารสกัดผงด้วยเอธานอล 95 % ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Shigella dysenteriae* และ *Escherichia coli* และ ได้ที่ความเข้มข้น 100 มก./มล. (Nirmal et al., 2015) โดยเฉพาะบราซิลินมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactams ได้ (Kim et al., 2004) การศึกษาของ Safitri et al. (2020) ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของผง ต่อเชื้อ *Haemophilus influenza* ในห้องปฏิบัติการ พบว่า MIC ที่ระดับความเข้มข้น 103 และ 105 CFU/mL คือ 16 ppm และค่า MBC เท่ากับ 32 ppm ความเข้มข้นของสารสกัดผงที่ 16 ppm และ 32 ppm สามารถยับยั้งเชื้อ *Haemophilus influenza* ได้ 98.64 % และ 100 % ในการเจือจาง

10^{-3} และ 10^{-5} ตามลำดับ การศึกษาของ Juwitaningsih et al. (2021) การหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของผงที่สกัดด้วยอะซิโตน พบว่ามีค่า MIC 312 - 5000 มก./มล. และ MBC 625 - 5000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดอะซิโตนของผงออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ด้วย MIC 312 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร การศึกษาของ Hemthanon and Ungcharoenwivat (2022) ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของผงในผ้าพันแผล พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ค่า MIC อยู่ที่ 1.95, 1.95 และ 0.98 มก./มล. ในขณะที่ค่า MBC เท่ากับ 62.5, 3.91 และ 31.25 มก./มล. สำหรับ *S. aureus*, *Bacillus cereus* และ *Vibrio parahaemolyticus* ตามลำดับ การศึกษาของ Xia et al. (2017) การสกัดผงด้วยอัลตราโซนิกที่ใช้ของเหลวไอออนิกร่วมกับโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูงแบบย้อนกลับ พบว่าสารสกัดของเหลวไอออนิกมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. aureus* ที่ทนต่อเมทิซิลิน (ค่า MIC ของแผ่นยา 37.5 มก./มล.), β -Lactamases ที่สร้าง *S. aureus* (ค่า MIC เท่ากับ 18.8 มก./มล.) แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*, Extended Spectrum β -Lactamases *E. coli* และ *P. aeruginosa* เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดของเหลวไอออนิก พบว่าสารสกัดเมธานอลมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียต่อ *S. aureus* และ *S. aureus* ที่ทนต่อเมทิซิลิน (ค่า MIC ของยาดิบ 75.0 มก./มล.), β -Lactamase ที่สร้าง *S. aureus* (ค่า MIC ของแผ่นยา 150.0 มก./มล.) พบว่าสารสกัดผงมีฤทธิ์ถึงไโบรบลาสต์ของเยื่อเมือกของมนุษย์ (HMFs) และมีความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ผงที่สกัดด้วยเมทานอลต่อ MRSA คือ 312.5 ก./มล. และ 312.5–156.25 ก./มล. ตามลำดับ พบว่าการเพิ่มขึ้นของ MRSA ลดลงอย่างเห็นได้ชัดกับกลุ่มผงที่สกัดด้วยเมทานอลที่ปริมาณ 20–80 ก./มล. เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ต้านจุลชีพมีความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของยาปฏิชีวนะ β -lactam ต่อ MRSA (Kima et al., 2004) *S. aureus*, methicillin (MRSA), enterococci ที่ทนต่อ vancomycin (VRE) และ *Burkholderia cepacia* ที่ดื้อต่อยาหลายขนาน โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) อยู่ระหว่าง 4 ถึง 32 มก./มล. (Pattananandecha et al., 2022) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammation) สารบราซิลิน (10 มก./กก. น้ำหนักตัว) ที่แยกได้จากผง ช่วยลดการอักเสบของอาการบวมที่อุ้งเท้าอักเสบเฉียบพลันในหนูทดลอง CIA ที่ทดสอบเป็นเวลา 21 วัน (Jung et al., 2015) sappanchalcone 124 มก. จากแก่นผง ช่วยควบคุมระดับของไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ เช่น TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในหนูทดลองของ CIA, Sappanchalcone มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูที่ไวต่อคอลลาเจนโดยควบคุมไซโตไคน์ในซีรัมที่ทำให้เกิดการอักเสบและลดการสูญเสียมวลกระดูก แก่นผงยังสามารถใช้เป็นสารต้านการอักเสบและป้องกันกระดูกในการรักษาโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Hikino et al., 1977) การศึกษาของ Mickymary (2019) พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผง ได้แก่ Flavonoids และ Tannin เมื่อทำงานร่วมกันแล้วจะมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นพิษต่อโฮสต์ ยับยั้งการสังเคราะห์พลังงาน การจำลอง DNA ของเชื้อจุลินทรีย์ ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ กระตุ้นการผลิตออกซิเจนและการย้อนกลับของการดื้อยาต้านจุลชีพและผลเสริมฤทธิ์กันของยาปฏิชีวนะ สารฟลาโวนอยด์สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนและเอนไซม์ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย (Gill and Holley, 2006) ทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ของไมโทคอนเดรียของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสาเหตุให้โครงสร้างเซลล์แบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ความสามารถในการให้สารซึมผ่านเปลี่ยนแปลงไปด้วย (Tiwareti et al., 2009) นอกจากนี้สาร Tannin ที่พบในสมุนไพรมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยมีคุณสมบัติในการลดการยึดเกาะของแบคทีเรียบนพื้นผิว ชัดขวางการเกิดปฏิกิริยา oxidative phosphorylation และยับยั้งการสร้างเอนไซม์นอกเซลล์ของแบคทีเรีย รวมไปถึงแทนนินมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยมีคุณสมบัติในการลดการยึดเกาะของแบคทีเรียบนพื้นผิว บราซิลินที่มีคุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) และโปรตีนของแบคทีเรียได้ (Xu and Lee, 2004) สารแทนนินในสมุนไพรผงสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) ที่แยกได้จากเชื้อแบคทีเรียดื้อยาทางคลินิกได้ รวมไปถึงแก่นของผงมีสารบราซิลิน (brazilin) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคเนื่องจากสารบราซิลินมีความสามารถในการยับยั้งดีเอ็นเอและการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ของแบคทีเรีย (Das and Goswami, 2019)

ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) ที่น้อยที่สุด (minimum inhibitory concentration : MIC) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบ พบว่าทุกเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบที่นำมาทดสอบมีค่า MIC อยู่ที่ 0.5 มลม./มล. สอดคล้องกับการศึกษาของ Swathy et al. (2014) ได้ทำการทดสอบว่าซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) 50 ส่วนในพันล้านส่วน (ppb) (0.05 มก./

ลิตร) พบว่าซิลเวอร์ไอออน มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* มากกว่าซิลเวอร์นาโน (AgNPs) มีรายงานความแตกต่างกันของอนุภาคซิลเวอร์นาโนเมทัลลิกและซิลเวอร์ไอออนกับเชื้อซิสเทอีน (Cys) ในด้านการทดสอบความเป็นพิษต่อเชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* พบว่าการดูดซึมซิลเวอร์ไอออนทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากเติมซิสเทอีนปริมาณ 5 ถึง 50 มล. ในบางกลุ่มที่เสริมด้วยซิลเวอร์ไอออน 1 มล. และ 10 มล. อัตราส่วนระหว่าง 1 Cys: 5 Ag มีประโยชน์หลายอย่าง เช่น ไวรัสโรคมะเร็งที่คุกคามคนบกพร่องของมนุษย์ (HIV) ไวรัสตับอักเสบบี เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยาเมธิซิลิน (MRSA) ไวรัสโรคมะเร็งที่คุกคามคนบกพร่องของมนุษย์ HIV-1 และเชื้อ *E.coli* ที่ดื้อต่อยาแอมพิซิลิน

การศึกษาของ Radzig et al. (2010) ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของซิลเวอร์ไอออนต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบและการสร้างฟิล์ม พบว่าค่าเฉลี่ยความเข้มข้นในการยับยั้งขั้นต่ำ (MICs) ของซิลเวอร์ไอออน ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* K12, *Serratia proteamaculans* 94 และ *Serratia liquefaciens* MG1 อยู่ที่ 0.075–0.3 มก./มล. และเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 และ *P. chlororaphis* 449 มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.15–0.3 มก./มล. การสร้างฟิล์มของเชื้อ *Escherichia coli* AB1157 และ *S. proteamaculans* 94 ถูกยับยั้งโดยซิลเวอร์ไอออนที่ระดับ 0.3 มก./มล. และเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ยับยั้งที่ปริมาณ 0.6 มก./มล. แบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกที่ดื้อยาหลายชนิด (MDR) ทั้งหมด 270 สายพันธุ์ (*Acinetobacter baumannii* (n = 45), *Pseudomonas aeruginosa* (n = 25), *Escherichia coli* (n = 79), *Klebsiella pneumoniae* (n = 58), *Staphylococcus aureus* (n = 34), *Staphylococcus epidermidis* (n = 14) และสายพันธุ์ *Enterococcus* (n = 15)) ถูกนำมาทดสอบหาค่า MIC พบว่ามีค่าเท่ากับ 90 คือ 4–8 มก./มล. สำหรับทุกสายพันธุ์ นอกจากนี้พบว่าซิลเวอร์ไอออนเพิ่มการผลิต ROS อย่างมีนัยสำคัญในแกรมลบเมื่อเทียบกับแบคทีเรียแกรมบวกที่ 24 ชั่วโมงของการเจริญเติบโต ผลลัพธ์เหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าซิลเวอร์ไอออนสามารถรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรีย MDR Gram-negative และ Gram-positive ได้ อย่างมีประสิทธิภาพ (Domínguez et al., 2020) ค่า MIC ของซิลเวอร์ไอออนต่อเชื้อ *Escherichia coli* อยู่ระหว่าง 0.1 มก./ล. และ 0.05 มก./มล. (Michael, 2003) การศึกษาของ Salari et al. (2016) ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์การซิลเวอร์ไอออนที่สังเคราะห์ได้จากสาหร่ายเกลียวทอง พบว่ามีค่า MIC 0.5 มก./มล. ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, และ *Klebsiella* ค่า MIC ที่ 0.25 มก./มล. สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* และ *E.coli* ได้

Chaloupka et al. (2010) รายงานว่าเนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังเซลล์หนา ความเข้มข้นของซิลเวอร์ไอออนยิ่งทำให้มีการหยุดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้ Cao et al. (2010) ยังเสนอว่าซิลเวอร์ไอออนที่ละลายนั้นจะทำปฏิกิริยากับผนังเซลล์และโปรตีนของไซโตพลาสซึม ส่งผลให้ฟังก์ชันการทำงานไม่ดีหรือทำให้พิการได้ การแลกเปลี่ยนซิลเวอร์ไอออนระหว่างสารเชิงซ้อนของกำมะถันอนินทรีย์ (Adams and Kramer, 1999; Pal et al., 2007) Lee et al. (2007) เสนอว่าซิลเวอร์ไอออนป้องกันเอนไซม์ไม่ทำงานในวัฏจักรฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ และไนโตรเจนของแบคทีเรีย มีการพบว่าซิลเวอร์ไอออนทำหน้าที่เป็นสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในวงกว้าง นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าสามารถเพิ่มการสมานแผลได้ (Hamad et al., 2020) มีรายงานว่าซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) มีความเป็นพิษต่อ *Pseudomonas putida* mt-2 มากกว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs) ถึง 1,600 เท่า (Hachicho et al., 2014) ในทางตรงกันข้าม ซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) มีผลความเป็นพิษคล้ายกันกับอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อเชื้อ *E. coli* ในขณะที่มีขนาดใหญ่มากกว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs) ในกรณี *S. aureus* ปฏิกริยาระดับต่างๆ ของซิลเวอร์ไอออนกับเซลล์แบคทีเรียสำหรับส่วนประกอบของผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ไซโตพลาสซึม DNA และโปรตีน จากการศึกษาโปรตีนโอมิกของเซลล์เชื้อ *E. coli* พบว่าการตอบสนองของเซลล์ต่อซิลเวอร์ไอออนเห็นได้จากการเพิ่มระดับระยะของสารตั้งต้นของโปรตีนเมมเบรนชั้นนอกทั้ง 3 ชั้นที่เกิดขึ้นหลังจากทำปฏิกิริยากับซิลเวอร์ไอออน เพื่อดูปฏิกิริยาของซิลเวอร์ไอออนกับผนังเซลล์ ซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) (Adams and Kramer, 1999) ส่งผลต่อ cis – trans isomerization ของกรดไขมันเมมเบรนที่ไม่อิ่มตัว แสดงการทำลายเซลล์เมมเบรนและการสลายตัวของฟังก์ชันเป็นการซึมผ่านสิ่งกีดขวาง (Hachicho et al., 2014)

อย่างไรก็ตาม จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคด้านมอเสบจากพืชสมุนไพรและซิลเวอร์ไอออนช่วยป้องกันและลดการเกิดขึ้นของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้านมอเสบในโคนม ทั้งนี้ควรมีการจัดการฟาร์มที่ดี ถูกสุขลักษณะ สอดคล้องกับการศึกษาของ Yanuartono et al. (2020) กล่าวถึงการจัดการฟาร์มโคนมมีความสำคัญต่อการผลิตน้ำนมดิบเพื่อให้ได้น้ำนมดิบที่มีคุณภาพและความปลอดภัย ซึ่งการจัดการฟาร์มที่ดีประกอบด้วย ความสะอาดของเครื่องรีดนม สุขศาสตร์การรีดนม ความสะอาดของสิ่งแวดล้อม การระบายอากาศ อาหารสัตว์ สุขภาพสัตว์ และการเก็บรักษาน้ำนมหลังรีด (Izquierdo et al., 2017) ซึ่งวิธีการควบคุมและจัดการโรคด้านมอเสบโดยการใช้อนุพันธ์จุลินทรีย์ตัวก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่พิสูจน์แล้วว่ามีประสิทธิภาพ และสามารถป้องกันการเกิดโรคด้านมอเสบได้ (Hassan et al., 2009) จากการศึกษาของ Oliver et al. (2001) พบว่าการใช้น้ำยาจุ่มหัวนมโคทั้งก่อนและหลังการรีดนมเป็นขั้นตอนที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการป้องกันการเกิดโรคด้านมอเสบชนิดใหม่ในโคนมได้ รวมไปถึงการใชยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้านมอเสบ

สรุป

การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคด้านมอเสบจากพืชสมุนไพรและซิลเวอร์ไอออน พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้านมอเสบ ทั้งการนำเอาสารสกัดสมุนไพรมาประยุกต์ใช้นอกจากมีฤทธิ์ในการยับยั้งและลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้แล้วนั้น ถือเป็นนวัตกรรมใหม่ในการป้องกันโรคด้านมอเสบในโคนม สามารถพัฒนาประยุกต์ใช้ในกระบวนการเชิงพาณิชย์ ในการผลิตผลิตภัณฑ์จุ่มเต้านมก่อนและหลังรีดนมเพื่อป้องกันเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้านมอเสบในโคนมต่อไป

คำขอบคุณ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อาจารย์ที่ปรึกษาทุกท่าน ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในด้านวิชาการและด้านการดำเนินงานวิจัย ขอขอบพระคุณทุนการศึกษา ทุนศิษย์ก้นกุฏิ ที่ได้ช่วยให้การสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานวิจัย อันนำไปสู่การต่อยอดองค์ความรู้ในด้านงานวิจัย ขอขอบพระคุณบุคลากรห้องปฏิบัติการ และคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้อำนวยความสะดวก ช่วยเหลือในการทำวิจัย ขอขอบคุณครอบครัว เพื่อนบัณฑิตศึกษา น้องนักศึกษาที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจที่ดีเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

- ชนัญ ผลประไพ และศรีบุญ อุ๋นทวี. 2562. การพัฒนากระบวนการเตรียมสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารแก่นเกษตร. 8: 479-492.
- ธัญญาพร ไชยคุณ, ศุภณิดา สุระวงศ์, ศุภรัตน์ บุญยยาตรา และวิทยา สุริยาสาพร. 2548. ปัจจัยที่สัมพันธ์กับการเกิดเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการในแม่โครีดนมหลังคลอดในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และลำพูน. เชียงใหม่สัตวแพทยสาร. 3: 31-42.
- ธนภัทร ศิริพงศ์ทต. 2562. การเสริมสารสกัดหยาบจากบอระเพ็ดในอาหารไก่เนื้อ. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่.
- ศุภรัตน์ บุญยยาตรา, จุฬานี ภาบุญเป็ง, ขวัญชาย เครือสุคนธ์ และวิทยา สุริยาสาพร. 2550. การดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียที่สัมพันธ์กับเต้านมอักเสบในแม่โครีดนมในเขตจังหวัดเชียงใหม่. เชียงใหม่สัตวแพทยสาร. 5: 135-145.
- Adams, N. W., and J. R. Kramer. 1999. Silver speciation in wastewater effluent, surface waters, and pore waters. Environmental Toxicology and Chemistry: International Journal. 18: 2667-2673.
- Ali, A., H. Zafar, M. Zia, I. ul Haq, A. R. Phull, J. S. Ali, and A. Hussain. 2016. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. Nanotechnology, Science and Applications. 9: 49-67.
- Cao, X., and W. Harris. 2010. Properties of dairy-manure-derived biochar pertinent to its potential use in remediation. Bioresource Technology. 101: 5222-5228.

- Chaloupka, K., Y. Malam, and A. M. Seifalian. 2010. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*. 28: 580-588.
- Chinmayee, S., M. A. Kuma, M. T. Kuma, and C. Deepak. 2024. Strategies for preventing environmental mastitis in Dairy farming: A reviews. *Asian Journal of Advances in Agricultural Research*. 24: 7-15.
- Cheesman, M. J., A. Ilanko, B. Blonk, and I. E. Cock. 2017. Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution?. *Pharmacognosy Reviews*. 11: 57-72.
- Das, M., and S. Goswami. 2019. Antifungal and antibacterial property of guava (*Psidium guajava*) leaf extract: Role of phytochemicals. *International Journal of Health Science Research*. 9: 39-45.
- Domínguez, A. V., R. A. Algaba, A. M. Canturri, A. R. Villodres, and Y. Smani. 2020. Antibacterial Activity of Colloidal Silver against Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Antibiotics*. 9: 36.
- Golus, J., R. Sawicki, J. Wideliski, and G. Ginalska. 2016. The agar microdilution method—a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 121: 1291-1299.
- Gupta, P. D., and T. J. Birdi. 2017. Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. 8: 266-275.
- Hachicho, N., P. Hoffmann, K. Ahlert, and H. J. Heipieper. 2014. Effect of silver nanoparticles and silver ions on growth and adaptive response mechanisms of *Pseudomonas putida* mt-2. *FEMS Microbiology Letters*. 355: 71-77.
- Hamad, A., K. S. Khashan, and A. Hadi. 2020. Silver nanoparticles and silver ions as potential antibacterial agents. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 30: 4811-4828.
- Hagner, K. A., H. S. Nordgren, K. Sarjokari, A. Sukura, and P. J. Rajala-Schultz. 2024. Role of mastitis in on-farm deaths of Finnish dairy cows. *Journal of dairy science*. TBC. 1-13.
- Hassan, K. J., S. Samarasinghe, and M. G. Lopez-Benavides. 2009. Use of neural networks to detect minor and major pathogens that cause bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*. 92: 1493-1499.
- Hemthanon, T., and P. Ungcharoenwiwat. 2022. Antibacterial activity, stability, and hemolytic activity of heartwood extract from *Caesalpinia sappan* for application on nonwoven fabric. *ScienceDirect*. 55: 9-17.
- Hikino, H., T. Taguchi, H. Fujimura, and Y. Hiramatsu. 1977. Antiinflammatory principles of *Caesalpinia sappan* wood and of *Haematoxylon campechianum* wood1. *Planta Medica*. 31: 214-220.
- Hwang, H. S., and J. H. Shim. 2018. Brazilin and *Caesalpinia sappan* L. extract protect epidermal keratinocytes from oxidative stress by inducing the expression of GPX7. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 16: 203-209.
- Izquierdo, G. 2017. Multiple sclerosis symptoms and spasticity management: new data. *Neurodegenerative Disease Management*. 7: 7-11.
- Jung, E. G., K. I. Han, H. J. Kwon, B. B. Patnaik, W. J. Kim, G. M. Hur, and M. D. Han. 2015. Anti-inflammatory activity of sappanchalcone isolated from *Caesalpinia sappan* L. in a collagen-induced arthritis mouse model. *Archives of Pharmacal Research*. 38: 973-983.

- Juwitaningsih, T., S. A. Sari, I. S. Jahro, and N. Windayani. 2021. Phytochemical analysis and antibacterial activity of acetone extract of secang (*Caesalpinia sappan* L). *Journal Jamu Indonesia*. 6: 2407-7178.
- Kampa, J., V. Sukolapong, A. Chaiyotwittakun, S. Rerk-u-suke, and A. Polpakdee. 2010. Chronic mastitis in small dairy cattle herds in Muang Khon Kaen. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 40: 265-272.
- Kim, K. J., H. H. Yu, S. I. Jeong, J. D. Cha, S. M. Kim, and Y. O. You. 2004. Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 91: 81-87.
- Kima, P. E., and M. E. Rasche. 2004. Sex determination using PCR. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 32: 115-119.
- Lee, K. J., B. H. Jun, J. Choi, Y. I. Lee, J. Joung, and Y. S. Oh. 2007. Environmentally friendly synthesis of organic-soluble silver nanoparticles for printed electronics. *Nanotechnology*. 18: 335601.
- Makovec, J. A., and P. L. Ruegg. 2003. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 samples (1994–2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 222: 1582-1589.
- Michael, A., L. Edling, and P. Labare. 2003. The efficacy of silver as a bactericidal agent: advantages, limitations and considerations for future use. *Journal of Water Infrastructure, Ecosystems and Society*. 52: 407-416.
- Mickymaray, S. 2019. Efficacy and mechanism of traditional medicinal plants and bioactive compounds against clinically important pathogens. *Antibiotics*. 8: 257.
- Moteriya, P., and S. Chanda. 2020. Green synthesis of silver nanoparticles from *Caesalpinia pulcherrima* leaf extract and evaluation of their antimicrobial, cytotoxic and genotoxic potential (3-in-1 system). *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 30: 3920-3932.
- Nirmal, N. P., M. S. Rajput, R. G. Prasad, and M. Ahmad. 2015. Brazilin from *Caesalpinia sappan* heartwood and its pharmacological activities: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 8: 421-430.
- Oliver, S. P., B. E. Gillespie, M. J. Lewis, S. J. Ivey, R. A. Almeida, D. A. Luther, and H. H. Dowlen. 2001. Efficacy of a new premilking teat disinfectant containing a phenolic combination for the prevention of mastitis. *Journal of Dairy Science*. 84: 1545-1549.
- Orwa, J., M. Mantel, M. Mugerwa, S. Brownie, E. S. Pallangyo, L. Mwashia, K. Isangula, L. Subi, S. Mrema, and G. Edwards. 2019. Maternal healthcare services use in Mwanza Region, Tanzania: a cross-sectional baseline survey. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 19: 1-11.
- Pal, S., Y. K. Tak, and J. M. Song. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 1712-1720.
- Pattananandecha, T., S. Apichai, J. Julsrigival, F. Ogata, N. Kawasaki, and C. Saenjum. 2022. Antibacterial activity against foodborne pathogens and inhibitory effect on anti-inflammatory mediators' production of brazilin-enriched extract from *Caesalpinia sappan* Linn. *Plants*. 11: 1698.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*. 63: 1035-1042.
- Radzig, M. A., O. A. Koksharova, and I. A. Khmel. 2010. Antibacterial effects of silver ions on growth of gram-negative bacteria and biofilm formation. *Microbiology and Virology*. 24: 194-199.

- Russell, A. D., and W. B. Hugo. 1994. 7 antimicrobial activity and action of silver. *Progress in Medicinal Chemistry*. 31: 351-370.
- Sampimon, O. C., H. W. Barkema, I. M. Berends, J. Sol, and T. J. Lam. 2009. Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. *Veterinary Microbiology*. 134: 37-44.
- Safitri, R., D. Kartikasari, I. Sulistiyorini, D. M. Malini, M. Ghazali, and A. Melani. 2020. Antimicrobial activity of sappan wood (*Caesalpinia sappan* L) extract against *Haemophilus influenza* and its iron chelation activities in vitro. *University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Lasi*. 74: 20-28.
- Salari, Z., F. Danafar, S. Dabaghi, and S. A. Ataei. 2016. Sustainable synthesis of silver nanoparticles using macroalgae *Spirogyra varians* and analysis of their antibacterial activity. *Journal of Saudi Chemical Society*. 20: 459-464.
- Smith, K. L., and J. S. Hogan. 1993. Environmental mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 9: 489-498.
- Swathy, J. R., M. U. Sankar, A. Chaudhary, S. Aigal, and T. Pradeep. 2014. Antimicrobial silver: an unprecedented anion effect. *Scientific Reports*. 4: 7161.
- Tiwari, B. K., V. P. Valdramidis, C. P. O'Donnell, K. Muthukumarappan, P. Bourke, and P. J. Cullen. 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 5987-6000.
- Tiwari, R., S. Chakraborty, K. Dhama, S. Rajagunatan, and V. Singh. 2013. Antibiotics resistance an emerging health problem: causes, worries, challenges and solution: a review. *International Journal of Current Research*. 5: 1880-1892.
- Todtong, P., T. Nilnont, and R. Pilachai. 2021. Prevalence and antimicrobial susceptibility on bacterial pathogens of clinical and subclinical mastitis in lactating cows in Udon Thani Province. *KKU Veterinary Journal*. 31.
- Vij, T., P. P. Anil, R. Shama, K. K. Dash, R. Kalsi, V. K. Pandey, E. Harsányi, B. Kovács, and A. M. Shaikh. 2023. A comprehensive review on bioactive compounds found in *Caesalpinia sappan*. *Molecules*. 28: 6247.
- Vissers, M. M. M., and F. Driehuis. 2009. Chapter 1, On-farm hygienic milk production. *Milk processing and quality management*. Blackwell Publishing Ltd., UK.
- Xia, Z., D. Li, Q. Li, and Y. Zhang. 2017. Simultaneous determination of brazilin and protosappanin B in *Caesalpinia sappan* by ionic-liquid dispersive liquid-phase microextraction method combined with HPLC. *Chemistry Central Journal*. 11: 114.
- Xu, H. X., and S. F. Lee. 2004. The antibacterial principle of *Caesalpinia sappan*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 18: 647-651.
- Yanuartono, Y., A. Nururrozi, S. Indarjulianto, H. Purnamaningsih, and D. Ramandani. 2020. The benefits of teat dipping as prevention of mastitis. *Journal of Livestock Science and Production*. 4: 231-249.