



<https://li01.tci-thaijo.org/index.php/pajrmu/index>

บทความวิจัย

ประสิทธิภาพของการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในช่องปากและทางเดินหายใจของสารสกัดจากผลมะกอกป่าสุก และผลกระทบของสารสกัดต่อน้ำยาฆ่าเชื้อบางชนิด

วุฒิสักดิ์ คุณ¹ พิบูลณ์ เห่งณี² ปรีดา เพชรสุข² วราภรณ์ พันธุ์พรหม² และ สุภาวดี ปาทยานานนท์^{3*}

¹สาขาเทคนิคการสัตวแพทย์และการพยาบาลสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม 44000

²คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

³ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12110

ข้อมูลบทความ

Article history

รับ: 4 ตุลาคม 2565

แก้ไข: 28 พฤศจิกายน 2565

ตอบรับการตีพิมพ์: 28 พฤศจิกายน 2565

ตีพิมพ์ออนไลน์: 8 ธันวาคม 2565

คำสำคัญ

มะกอกป่า

ฤทธิ์ทางชีวภาพ

การอักเสบ

จุลชีพก่อโรค

การต้านเชื้อจุลินทรีย์

บทคัดย่อ

การดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในช่องปากและทางเดินหายใจ ส่งผลให้การรักษามีประสิทธิภาพที่ลดลง และมีผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ สุนัขและแมวที่เข้ารับการรักษาเป็นอย่งยิ่ง ได้มีการศึกษาสารออกฤทธิ์ในธรรมชาติ เพื่อใช้ในการรักษาและป้องกันการติดเชื้อในช่องปาก เป้าหมายของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในช่องปากและทางเดินหายใจของสารสกัดจากผลมะกอกป่าสุก และผลกระทบของสารสกัดต่อน้ำยาฆ่าเชื้อบางชนิด เชื้อจุลินทรีย์ที่มีการใช้ในช่องปาก สารตัวอย่าง HRIT70ET, HRIT95ET และ HRIPO60C70AC ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในช่องปากและทางเดินหายใจ ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดทั้งสามไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. albicans* และ *H. influenza* ได้ อย่างไรก็ตาม สารสกัด HRIT70ET สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ได้ ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 3.0 mg/ml นอกจากนี้ HRIT70ET มีบทบาทในการลดประสิทธิภาพของ Chlorhexidine ทำให้สารสกัด HRIT70ET ไม่สามารถนำไปใช้หรือเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ที่มียา Chlorhexidine เป็นองค์ประกอบได้

บทนำ

ปัญหาการติดเชื้อในช่องปาก และทางเดินอาหาร ยังเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยในประชากรทุกเพศ และวัย โดยเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือโรคเอดส์ ซึ่งมีพยาธิสภาพจากการติดเชื้อในช่องปากที่รุนแรงกว่าคนปกติทั่วไป เนื่องจากช่องปากจัดเป็นบริเวณที่พบเชื้อก่อโรคแฝงตัวอยู่หลากหลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และโปรโตซัว ซึ่งเชื้อบางชนิดจะก่อให้เกิดโรคฟันผุ และโรคปริทันต์อักเสบได้ รวมทั้งโรคลิ้นขาวที่เกิดจากการติดเชื้อรา *Candida albicans* (Paramaporn et.al., 2012) ซึ่งการสะสมของการอักเสบในระยะเวลานานอาจนำมาซึ่งการเกิดมะเร็ง นอกจากนี้การติดเชื้อในช่องปากยังเป็นปัญหาสำคัญในสุนัข โดยในสุนัขที่มีอายุ 3 ปีขึ้นไป พบโรคเหงือกอักเสบถึง 80-90 % ในกรณีที่รุนแรงที่มีการติดเชื้อในช่องปากแล้วเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่กระแสเลือด อาจทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบอื่นๆ ในร่างกายของสุนัขเช่น หัวใจ ตับ ไต เกิดการล้มเหลวของอวัยวะ อาจทำให้สุนัขเสียชีวิตได้ ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและปริมาณของเชื้อที่อยู่ในร่างกายของสุนัข (Daraneet et al., 2016)

การติดเชื้อในช่องปากและทางเดินหายใจ เป็นประเด็นปัญหาหนึ่งที่พบได้บ่อยทั้งในคน และสัตว์ ซึ่งปัญหานี้มีจุลชีพก่อโรคหลาย

ชนิดเป็นสาเหตุ จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าหนึ่งในสาเหตุหลักของโรคฟันผุ และโรคปริทันต์อักเสบ เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) แลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* และ *Porphyromonas gingivalis* (Ngamporn et.al., 2011) เชื้อรา แคนดิดา อัลบิแคน (*Candida albicans*) ที่ก่อโรคลิ้นขาว เชื้อ *Haemophilus influenzae* ที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ โดยพบว่า *S. mutans* และแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) สามารถก่อโรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบได้ทั้งในคนและสุนัข ถึงแม้จะมีการรักษาด้วยวิธีการต่าง ๆ มากมายแต่ยังมีหลายปัจจัยที่ส่งผลกระทบด้านลบต่อการรักษานั้นคือ การดื้อยาของเชื้อส่งผลให้การรักษามีประสิทธิภาพที่ลดลง และมีผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาเป็นอย่งยิ่ง เพื่อลดผลกระทบด้านลบต่อกระบวนการรักษาและป้องกันปัญหาเกี่ยวกับการติดเชื้อในช่องปาก ได้มีการศึกษาสารออกฤทธิ์ในธรรมชาติ เพื่อใช้ในการรักษาและป้องกันการติดเชื้อในช่องปาก และโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีสารออกฤทธิ์ในธรรมชาติที่ถูกพบจำนวนมาก และมีที่มาจากหลายแหล่งทั้งในพืช สัตว์ และจุลชีพต่าง ๆ (Gomes et.al., 2010)

*Corresponding author

E-mail address: Supawadee_P@rmu.ac.th (S. Patathananone)

Online print: 8 December 2022 Copyright © 2022. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. <https://doi.org/10.14456/paj.2022.24>

มะกอกป่า (*Spondias pinnata*) เป็นไม้ยืนต้นที่มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงประเทศไทยด้วย โดยจัดเป็นไม้ยืนต้นผลัดใบ มีความสูงของต้นประมาณ 15-25 เมตร ลำต้นตั้งตรงและมีลักษณะกลม เรือนยอดเป็นพุ่มกลม แตกกิ่งก้านโปร่ง กิ่งมักห้อยลง เปลือกต้นเป็นสีเทา เปลือกหนาเรียบ มีปุ่มปมบ้างเล็กน้อย และมีรูอากาศตามลำต้น กิ่งอ่อนมีรอยแผลการหลุดร่วงของใบ ตามเปลือก ใบ และผลมีกลิ่นหอม มักพบขึ้นตามป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง ป่าแดง และป่าดิบแล้งทุกภาคของประเทศไทย (Homhual, 2015)

รายงานวิจัยก่อนหน้านี้ ได้ศึกษาส่วนประกอบของต้นมะกอกป่า โดยการใช้เปลือกของต้นมะกอกป่ามาสกัดสารออกฤทธิ์และแยกบริสุทธิ์ จากนั้นศึกษาคุณสมบัติด้านชีวภาพ จากผลการศึกษาพบว่าส่วนเปลือกลำต้นมีเมทิล แกลเลท (Methyl gallate) เป็นสารพฤกษเคมีหลักที่แสดงคุณสมบัติในการเป็นสารต้านมะเร็งสมอง (human glioblastoma) (Chaudhuri et.al., 2015) เซลล์มะเร็งปอดและมะเร็งเต้านม (Ghate et.al., 2014) ด้วยกลไกกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส นอกจากนี้ สารสกัดจากเปลือกลำต้นมะกอกป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายร้อยละ 70 โดยปริมาตรของเมทานอล (70%v/v Methanol) มีส่วนช่วยกระตุ้นให้กลุ่มเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzyme) ในตับของหนูไมค์ (mice) เพิ่มขึ้น ช่วยยับยั้งการเกิดลิพิด เพอออกซิเดชัน (lipid peroxidation) โปรตีน ออกซิเดชัน (protein oxidation) และไฟโบรซิส (liver fibrosis) ได้ด้วย (Hazra et.al., 2013) ยิ่งไปกว่านั้น ผลมะกอกป่าในสกุล สปอนดิแอส (Genus *Spondias*) ยังมีรายงานการค้นพบสารพฤกษเคมีในกลุ่มฟีนอลิก (phenolics) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เทอพินอยด์ (terpenoids) สเตอรอล (sterol) ซึ่งในผลมะกอกป่าดิบ พบสารบีตา อะไมริน (β -amyrin), โอลิอิก แอซิด (oleanolic acid), กรดซาลิไซลิก (salicylic acid), กรดเอลลาจิก (ellagic acid), กรดคลอโรเจนิค (chlorogenic acid), กรดพี-คัวมาริก (p-coumaric acid), แคทีชิน (catechin), รูทีน (rutin), เคอร์ซีทีน (quercetin) สารดังกล่าวแสดงคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระได้ และบางชนิดแสดงคุณสมบัติของการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เช่น กรดแกลลิก, เมทิล แกลเลท เคอร์ซีทีน เป็นต้น (Hazra et.al., 2008; Sameh et.al., 2018) อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่พบรายงานการศึกษาถึงฤทธิ์ของสารสกัดผลมะกอกป่าสุกในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในช่องปาก

งานวิจัยนี้ ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากผลสุกของมะกอกป่า โดยการใช้ตัวทำละลายระบบตัวทำละลายเอทานอล หรือระบบตัวทำละลายอะซิโตนจากส่วนเปลือกของมะกอกป่าสุก สารสกัดถูกทดสอบคุณสมบัติของการต้านเชื้อก่อโรคในช่องปาก *S. mutans* ATCC

25175, *C. albicans* (isolate stain 1-2486 #86, isolate stain 1-2850 #50, isolate stain 1-2851 #51) และ *H. influenza* (isolate stain 810) ด้วยวิธีทดสอบ ดิสก์ ดิฟฟิวชัน (Disc diffusion assay) รวมทั้งศึกษาการใช้สารสกัดที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อ ร่วมกับยาปฏิชีวนะ Chlorhexidine เพื่อประเมินความเป็นไปได้ของ การพัฒนาสารสกัดให้ใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ หรือใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะชนิดนี้

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การสกัดสารออกฤทธิ์ในมะกอกป่าสุกแบบผงด้วยระบบตัวทำละลายเอทานอล

การสกัดวิธีนี้ถูกประยุกต์ขึ้น (ดัดแปลงจาก Boeing et al., 2014) เพื่อใช้แก้ปัญหาเรื่องการเก็บรักษาสารสกัดจากผลมะกอกป่าสุก โดยได้แช่แข็งผลมะกอกป่าสุก จากนั้นใช้มีดหั่นเอาเฉพาะส่วนเนื้อผลที่ติดกับเปลือก นำมาปั่นกับน้ำปราศจากไอออน (DI) ในอัตราส่วน 1:1 ปั่นเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง Lyophilize จะได้ผงมะกอกป่าที่มีสีเหลืองอมเขียว นำผงมะกอกป่าจำนวน 5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมตัวทำละลายแต่ละขวดด้วยสารละลายเอทานอลร้อยละ 50, 70 และ 95 โดยปริมาตรต่อปริมาตร (50, 70 และ 95% v/v aqueous ethanol) ปริมาตร 100 ml (ทำสามซ้ำ) ปั่นด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 4 เก็บส่วนสารละลายใสมากรองซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำสารละลายทั้งหมดทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศได้สารเข้มข้นที่มีปริมาตรเหลือประมาณ 50 30 และ 5 ml ตามลำดับ (ตัวอย่างสารสกัดหลังระเหยเอทานอล Figure 1(A) จากนั้นเติมน้ำ DI จนปริมาตรเป็น 100 ml จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็งแบบสุญญากาศ (Lyophilize) ซึ่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ (Table 1) แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

การสกัดสารออกฤทธิ์ในเปลือกผลมะกอกป่าสุกด้วยระบบตัวทำละลายอะซิโตน

วิธีการแยกส่วนเปลือกของมะกอกป่าสุกออกจากเนื้อผล นำไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักเปลือกมะกอกป่าอบแห้งให้ได้จำนวน 10.0 กรัม เติมสารละลายอะซิโตนร้อยละ 70 โดยปริมาตรต่อปริมาตร (70% v/v Acetone) 100 ml (ดัดแปลงจาก Boeing et al., 2014) บ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาวะปิด เป็นเวลา 30, 60 และ 90 วัน นำสารละลายที่ได้ มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 4 จากนั้น ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ จนเหลือสารเข้มข้นปริมาตร 30 ml เติมน้ำ DI ให้ได้ปริมาตรเป็น 100 ml นำไปทำแห้งด้วย Lyophilize ตัวอย่างสีของสารสกัด และผงแห้งของสารสกัดถูกแสดงใน Figure 1 (B) และ (C) แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

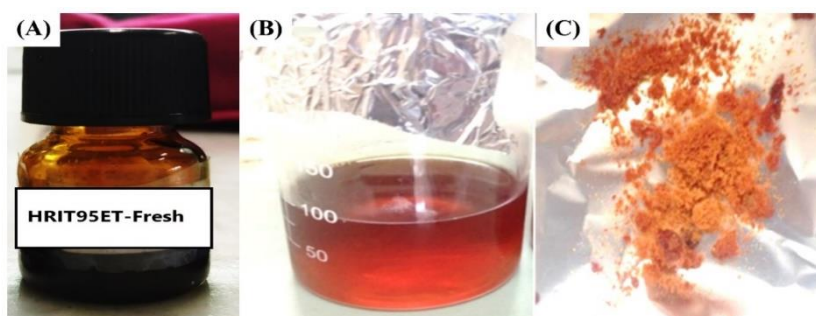


Figure 1 Characteristics of ripe wild olives fruit extracts (A) Ripe wild olives fruit extracted by 95 %v/v ethanol, (B) Ripe wild olives fruit peels that extract by 70 %v/v Acetone, and (C) extract powder of HRIPO70AC.

การตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในช่องปากและทางเดินหายใจ ด้วยวิธี disc diffusion assay

การเตรียมเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175

เชื้อก่อโรคในช่องปาก *S. mutans* ATCC25175 ถูกสั่งซื้อเชื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อนำมาทำวิจัยที่ห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยเชื้อถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นเลือดแข็ง (Blood agar medium) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ นาน 24-48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีของเชื้อมา 3-5 โคโลนี นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวเบร็น เอิร์ท อินฟิวชัน (Brain heart infusion broth; BHI) บ่มที่ 37°C ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เจือจางให้เชื้อมีความขุ่นเท่ากับ McFarland no. 0.5 ด้วย 1X PBS หรือ 0.85% normal saline solution จะมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml

การเตรียมเชื้อ *C. albicans* (isolate stain 1-2486 #86, isolate stain 1-2850 #50, isolate stain 1-2851 #51)

เชื้อก่อโรค *C. albicans* เป็นเชื้อก่อโรคที่แยกได้ประกอบด้วย isolate stain 1-2486 #86, isolate stain 1-2850 #50, isolate stain 1-2851 #51 โดยได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชั้นสูง หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2559 เชื้อก่อโรคเหล่านี้ถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็งซาบวอร์ด เดกซ์โทรส (Sabauraud dextrose agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 24 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีของเชื้อ *C. albicans* ลงใน 1X PBS pH 7.4 ปั่นล้างเซลล์ด้วย 1X PBS pH 7.4 ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เจือจางให้เชื้อมีความขุ่นเท่ากับ McFarland no. 0.5 ด้วย 1X PBS pH 7.4 หรือ 0.85% normal saline solution

การเตรียมเชื้อ *H. influenza* (isolate stain 810)

เชื้อก่อโรค *H. influenza* เป็นเชื้อก่อโรคที่แยกได้ระบุในชื่อ isolate stain 810 โดยได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชั้นสูง หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2559 เชื้อชนิดนี้ถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็งช็อกโกแลต (Chocolate agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5%

CO₂ นาน 24-48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีของเชื้อมา 3-5 โคโลนี นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวเบร็น เอิร์ท อินฟิวชัน (Brain heart infusion broth; BHI) บ่มที่ 37°C ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เจือจางให้เชื้อมีความขุ่นเท่ากับ McFarland no. 0.5 ด้วย 1X PBS pH 7.4 หรือ 0.85% normal saline solution จะมีเชื้อประมาณ 1.7×10^8 CFU/ml

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคด้วย disc diffusion assay

สารแขวนลอยเชื้อถูกปิเปตลงบนผิวหน้าอาหารแข็งที่จำเพาะกับเชื้อแต่ละชนิด จากนั้นใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาทำการเกลี่ยเชื้อให้สม่ำเสมอ ผึ่งให้แห้ง จากนั้นวางแผ่นทดสอบ (Paper Disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร วางลงไปตามแนวที่จะหยดสารละลายที่ต้องการทดสอบ จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง, สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (1X PBS) ซึ่งใช้เป็น ตัวควบคุมเชิงลบ (Negative control) และ คลอเฮกซิดีน (Chlorhexidine) หรือ แอมพลีซิลิน เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) ลงบนแผ่นทดสอบ 10 ไมโครลิตร รอจนแห้ง จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 และ *H. influenza* ขณะที่เชื้อ *C. albicans* ให้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้น (ดัดแปลงวิธีการจาก Rauha et al., 2000; Siripermool & Vimolmangkang, 2014)

ตัวอย่างสารสกัดที่มีคุณสมบัติการต้านเชื้อถูกนำมาวิเคราะห์ผลที่เกิดขึ้นกับยาปฏิชีวนะคลอเฮกซิดีน (Chlorhexidine) ซึ่งนิยมใช้ในการยับยั้งกลุ่มเชื้อก่อโรคในช่องปาก โดยมีเป้าหมายของการศึกษาคือวิเคราะห์โอกาสของการลดการใช้ยาปฏิชีวนะ หรือทดแทนยาปฏิชีวนะด้วยการใช้สารสกัดจากแหล่งธรรมชาติ วิธีการทดสอบคือใช้สารละลายตัวอย่าง 0.06% Chlorhexidine บ่มกับตัวอย่างสารสกัดมะกอกป่าที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง (30 นาที) ก่อนนำสารผสมไปโหลดบนแผ่นกระดาษทดสอบที่มีเชื้อ จากนั้นบ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ผลการทดสอบจากการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น

ผลการวิจัย

ผลการสกัดตัวอย่างผลมะกอกป่าสุกด้วยตัวทำละลายเอทานอล

Table 1 Ripe wild olive extract powder weight extracted by ethanol solvent system.

Extract name		Dry weight (g)
HRIT50ET		0.30
HRIT70ET		0.75
HRIT95ET		0.38
Note	HRIT50ET	Ripe wild olive extract powder extracted with 50% v/v ethanol
	HRIT70ET	Ripe wild olive extract powder extracted with 70% v/v ethanol
	HRIT95ET	Ripe wild olive extract powder extracted with 95% v/v ethanol

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Candida albican* isolate stain 1-2850 #50, 1-2851 #51 และ 1-2486 #86 ด้วย HRIT70ET, HRIT95ET, HRIPO70AC

สารสกัดมะกอกป่า HRIT70ET, HRIT95ET, HRIPO70AC ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 mg/ml - 5.0 mg/ml และใช้ 1X PBS pH 7.4 เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (Negative control) ไม่ปรากฏวงใส รอบแผ่นทดสอบ (disc) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดมะกอกป่า HRIT70ET, HRIT95ET, HRIPO70AC ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida albicans* ทั้งสามสายพันธุ์ได้ทุกช่วงความเข้มข้นที่นำมาใช้ในการทดสอบ ดัง Figure 2 (A-C), 18 (A-C) และ 19 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ในส่วนของตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) ซึ่งใช้ Chlorhexidine 0.02, 0.04, 0.12% v/v มีวงใสเกิดขึ้นรอบแผ่นทดสอบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยในทั้ง 3 สายพันธุ์ แสดงใน Figure 5 จากผลวิจัยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันมาก ผู้วิจัยจึงจะทดสอบตัวอย่างกับเชื้อ *C. albicans* เพียง 1 isolate stain และใช้ความเข้มข้นของ Chlorhexidine ที่ 0.12%v/v ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ปรากฏวงใสที่ชัดเจน และเป็นความเข้มข้นที่ผสมในส่วนประกอบของน้ำยาบ้วนปากโดยทั่วไป

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ด้วย HRIT70ET, HRIT95ET และ HRIPO70AC

สารสกัดมะกอกป่า HRIT70ET, HRIT95ET สามารถยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ที่ระดับความเข้มข้น > 3.5 mg/ml ดัง Figure 6 (A), 6(B) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสแสดงใน Figure 7 ซึ่งผลการทดลองนี้ ผู้วิจัยสามารถนำสารสกัดที่ได้ ไปใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพในช่องปากได้ อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากส่วนของเปลือกผลด้วยระบบตัวทำละลายอะซิโตนในน้ำ

(HRIPO70AC) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ได้ในทุกความเข้มข้นที่นำมาทดสอบ ดังแสดงใน Figure 6(C) ผลการทดสอบนี้ชี้ให้เห็นว่า ผลมะกอกป่าสุกที่สกัดด้วยร้อยละของเอทานอล 70 และ 95 มีสารที่แสดงคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ในขณะที่ระบบตัวทำละลายอะซิโตนให้ผลในทิศทางตรงข้ามกัน ดังนั้น สารสกัดที่มีบทบาทต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในช่องปากทั้งสอง ได้แก่ HRIT70ET และ HRIT95ET จึงมีโอกาของการพัฒนาใช้เพื่อเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพช่องปากได้

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Haemophilus influenzae* isolate stain 810 ด้วย HRIT70ET, HRIT95ET, HRIPO70AC

สารสกัดมะกอกป่า HRIT70ET, HRIT95ET, HRIPO70AC ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *H. influenzae* ทุกช่วงความเข้มข้นที่นำมาใช้ในการทดสอบ ดัง Figure 8

ผลการทดสอบผลของสารสกัดต่อประสิทธิภาพของ Chlorhexidine กับเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175

ผลการทดสอบบทบาทของสารสกัด HRIT70ET กับประสิทธิภาพของ Chlorhexidine ทั้งแบบเชิงเดี่ยว และแบบผสม ถูกแสดงใน Figure 9 สารสกัด HRIT70ET ที่มีความเข้มข้น 1.0 - 5.0 mg/ml บ่มกับ 0.12% v/v Chlorhexidine เป็นเวลา 30 นาที (โดยคำนวณให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ Chlorhexidine เป็น 0.06 % v/v รวมทั้ง positive control) จากนั้นนำไปทดสอบกับเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า สารสกัด HRIT70ET มีผลในการลดประสิทธิภาพการทำงานของ Chlorhexidine โดยจะพบว่า เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส จะค่อย ๆ ลดลง เมื่อสารสกัดมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 9 นั้นแสดงให้เห็นว่า สารพหุเคมีของสารสกัด HRIT70ET มีบทบาทในการต้านเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ในรูปแบบเชิงเดี่ยว แต่ไม่สามารถใช้ร่วมกับตัวยา Chlorhexidine ได้

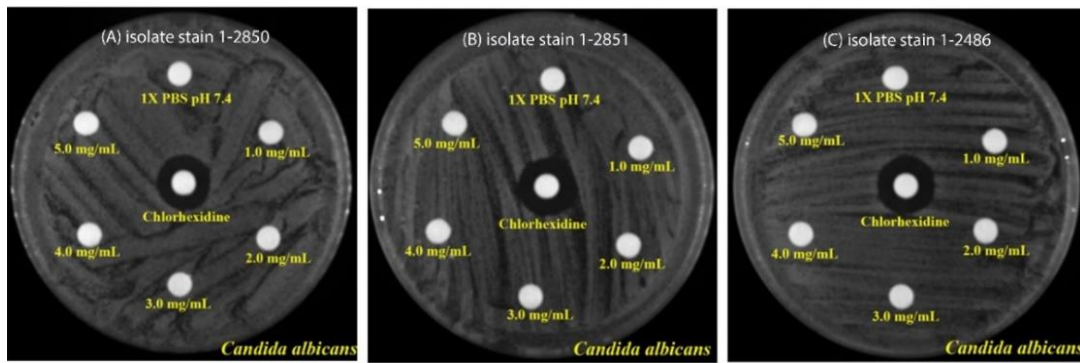


Figure 2 The results of the efficacy test of the extract HRIT70ET with *Candida albicans* isolate stain 1-2850 #50 (A), 1-2851 #51 (B) and 1-2486 #86 (C)

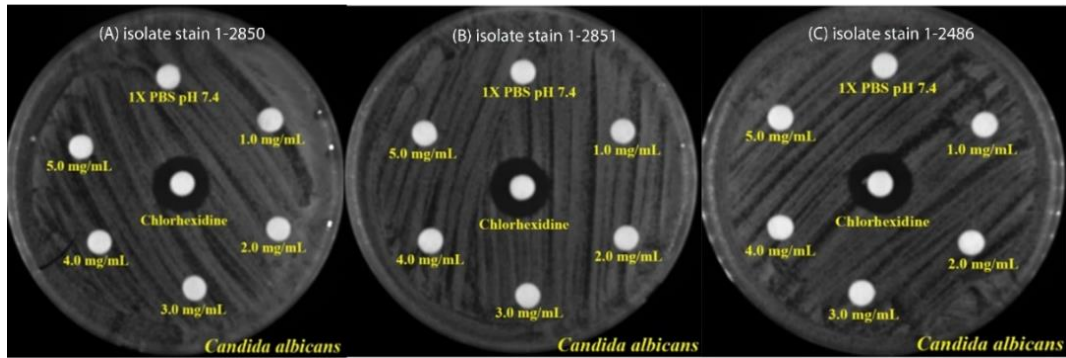


Figure 3 The results of the efficacy test of the extract HRIT95ET with *Candida albicans* isolate stain 1-2850 #50 (A), 1-2851 #51 (B) and 1-2486 #86 (C)

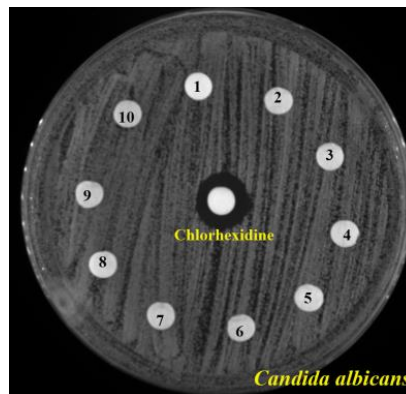


Figure 4 The efficacy test results of the extract HRIPO70AC with *Candida albicans* isolate stain 1-2850 #50 by 0.12% v/v Chlorhexidine (positive control) number 1 = 1X PBS pH 7.4 (negative control). The following numbers show the concentrations of the extracts. number 2 = 1.0 mg/mL, number 3 = 1.5 mg/mL, number 4 = 2.0 mg/mL, number 5 = 2.5 mg/mL, number 6 = 3.0 mg/mL, number 7 = 3.5 mg/mL, number 8 = 4.0 mg/mL, number 9 = 4.5 mg/mL, number 10 = 5.0 mg/mL

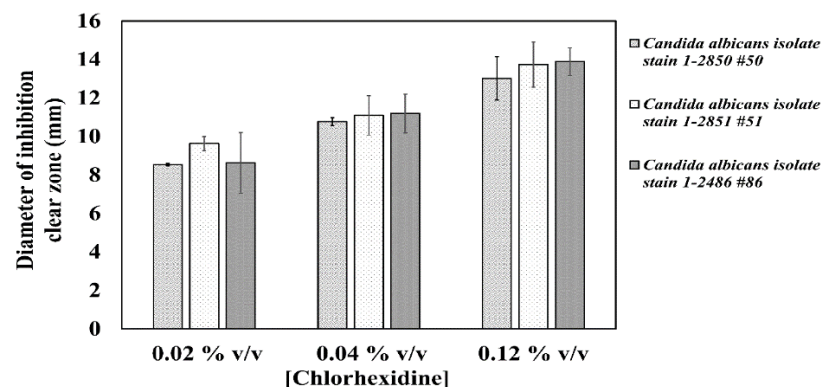


Figure 5 Show the clear zone diameter of inhibition *Candida albicans* isolate stain 1-2850 #50, *Candida albicans* isolate stain 1-2851 #51, and *Candida albicans* isolate stain 1-2486 #86, which is tested with disc diffusion assay.

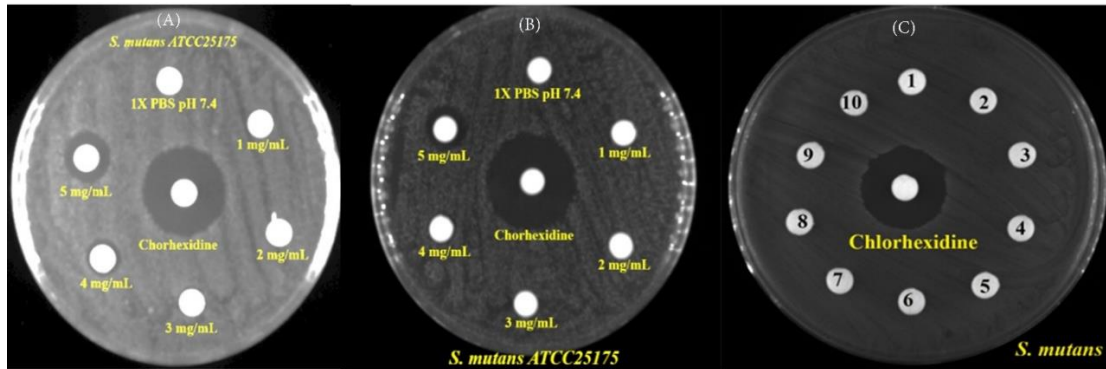


Figure 6 The results of the efficacy test of the extract HRIT70ET (A) and HRIT95ET (B) with *Streptococcus mutans* ATCC25175 by 0.12% v/v Chlorhexidine (positive control) number 1 = 1X PBS pH 7.4 (negative control). The following numbers show the concentrations of the extracts. number 2 = 1.0 mg/ml, number 3 = 1.5 mg/ml, number 4 = 2.0 mg/ml, number 5 = 2.5 mg/ml, number 6 = 3.0 mg/ml, number 7 = 3.5 mg/ml, number 8 = 4.0 mg/ml, number 9 = 4.5 mg/ml, number 10 = 5.0 mg/ml

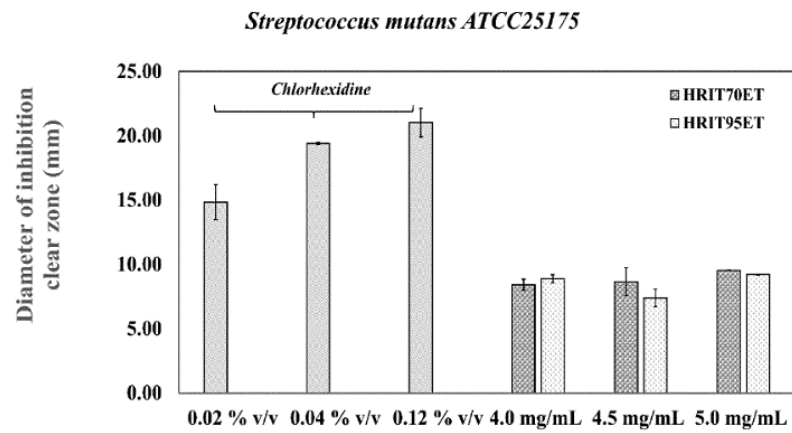


Figure 7 Shows the apparent zone diameter of inhibition *S. mutans* ATCC25175 by HRIT70ET and HRIT95ET with 1X PBS as negative control and Chlorhexidine at the concentration 0.02, 0.04, 0.12% v/v as the positive control, which tested with disc diffusion assay

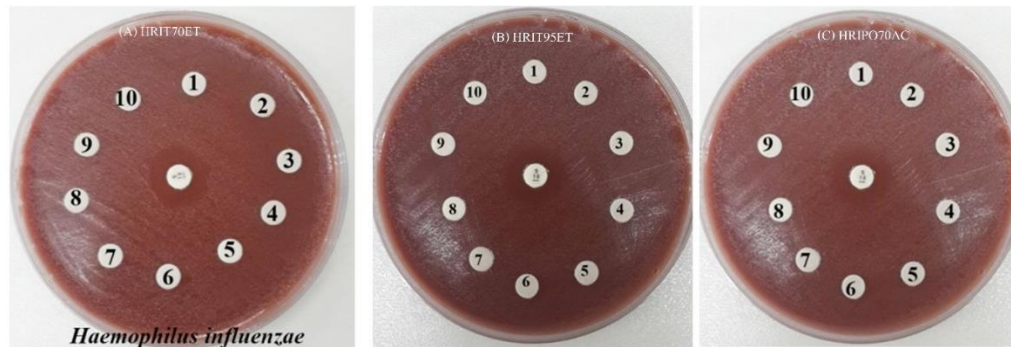


Figure 8 The results of the efficacy test of the extract HRIT70ET (A), HRIT95ET (B), and HRIP070AC (C) with *H. influenzae* isolate stain 810 by used 10 µg streptomycin (positive control), number 1 = 1X PBS pH 7.4 (negative control). The following numbers show the concentrations of the extracts. number 2 = 1.0 mg/ml, number 3 = 1.5 mg/ml, number 4 = 2.0 mg/ml, number 5 = 2.5 mg/ml, number 6 = 3.0 mg/ml, number 7 = 3.5 mg/ml, number 8 = 4.0 mg/ml, number 9 = 4.5 mg/ml, number 10 = 5.0 mg/ml

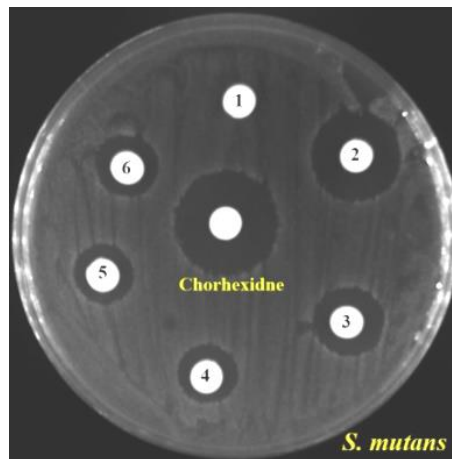


Figure 9 Testing the effect of the extract on the efficacy of Chlorhexidine with *S. mutans* ATCC 25175 by using 0.06% v/v Chlorhexidine, number 1 = 1X PBS pH 7.4 (negative control). The following numbers show the concentrations of the extracts. number 2 = 1.0 mg/ml HRIT70ET + 0.06% v/v Chlorhexidine, number 3 = 2.0 mg/ml HRIT70ET + 0.06% v/v Chlorhexidine, number 4 = 3.0 mg/ml HRIT70ET + 0.06% v/v Chlorhexidine, number 5 = 4 mg/ml HRIT70ET + 0.06% v/v Chlorhexidine, number 6 = 5 mg/ml HRIT70ET + 0.06% v/v Chlorhexidine.

อภิปรายผลการวิจัย

ผลการทดสอบเชื้อก่อโรคในช่องปากละทางเดินหายใจของ สารสกัดมะกอกป่าสุก แสดงให้เห็นว่า สารสกัดมะกอกป่าสุกที่ใช้ ระบบตัวทำละลายเอทานอล (HRIT70ET และ HRIT95ET) มีผลยับยั้ง การเจริญเติบโตของเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 แต่ไม่แสดงผลการยับยั้งกับเชื้อ *Candida albicans* isolate stain 1-2850 #50, *Candida albicans* isolate stain 1-2486 #86 และ *Haemophilus influenzae* isolate stain 810 ผลการศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลใหม่ที่ แสดงให้เห็นว่าสารพฤษเคมีในผลมะกอกป่าสุกสามารถพัฒนาใช้ใน กิจกรรมการต้านเชื้อก่อโรคในช่องปาก ซึ่งมีโอกาสของการใช้ใน กลุ่ม สัตว์เศรษฐกิจที่พบภาวะติดเชื้อในช่องปากและทางเดินอาหารได้ หรือ พัฒนาใช้ใน กลุ่มผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพช่องปากของมนุษย์

ยาปฏิชีวนะ Chlorhexidine นิยมใช้ใน กลุ่มผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพช่องปาก แต่การใช้ความเข้มข้นสูงเพื่อประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ที่มีผล สะท้อนจากกลุ่มผู้ใช้จากความแสบร้อนกับระบบเนื้อเยื่อในช่องปากที่ เกิดขึ้นจาก Chlorhexidine การศึกษาการทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ Chlorhexidine โดยการแทนที่หรือนำสารสกัดมาใช้ร่วมกัน จึงเป็น ปัจจัยหนึ่ง ที่ช่วยให้ผลิตภัณฑ์ลดข้อจำกัดจากผลข้างเคียงของ Chlorhexidine ได้ จากผลการทดสอบการใช้สารสกัดมะกอกป่าสุก HRIT70ET ร่วมกับ Chlorhexidine ให้ผลการทดสอบที่น่าสนใจ และเป็นข้อมูลใหม่ที่เกิดขึ้น เนื่องจากสารพฤษเคมีในตัวอย่าง HRIT70ET มีผลต่อการลดประสิทธิภาพของ Chlorhexidine ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด ลักษณะของวงใส (Clear zone) ของสารสกัดตัวอย่างที่ทดสอบกับ Chlorhexidine มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่แตกต่างจากการทดสอบแบบ เชิงเดี่ยว โดยวงใสที่มีการบ่มสารสกัดร่วมกับ Chlorhexidine มีขนาด ลดลง ผลการทดสอบที่พบนี้ อาจมีความเกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานของ Chlorhexidine โดยผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่า สารพฤษเคมีในสาร สกัดบางชนิดน่าจะมีส่วนในการขัดขวางการจับกันระหว่าง Chlorhexidine กับประจุบนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย หรือ มีความ เป็นไปได้อย่างยิ่งที่สารเหล่านี้จะออกฤทธิ์ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ของ Chlorhexidine ทำให้สารมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อที่ต่ำลง

โดยงานวิจัยที่ผ่านมาได้ระบุว่าสาร Chlorhexidine ใน pH ของร่างกาย จะเกิดการแตกตัวเป็นประจุบวก และจะเข้าไปจับกับโมเลกุลที่มีประจุลบ บนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้เกิดการขัดขวางการทำงานในเยื่อหุ้ม เซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียตาย (Leikin & Paloucek, 2008) อย่างไรก็ตาม Chlorhexidine ถูกทำลายฤทธิ์จากการเกิดรูป ของเกลือที่ไม่ละลายน้ำในสารประกอบที่เป็นแอนไอออนิก รวมทั้ง สารประกอบสารลดแรงตึงผิวกลุ่มแอนไอออนิก ซึ่งใช้เป็นสารซักล้าง ในยาสีฟันและน้ำยาบ้วนปาก (Denton, 2000) จากผลการศึกษา นี้ ทำให้ผู้วิจัยทราบว่า สารสกัดจากผลมะกอกป่าอาจมีสารกลุ่มแอนไอออนิก เป็นส่วนประกอบอยู่ หรือมีสารบางชนิดที่ไปรบกวนและลด ประสิทธิภาพของยา Chlorhexidine ทำให้สารสกัด HRIT70ET ใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Chlorhexidine ไม่ได้ แต่ยังสามารถใช้เป็นส่วนประกอบร่วมกับกลุ่มสารอื่น ซึ่งผู้วิจัย จะได้วางแผนในการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องต่อไป

ผลการศึกษา นี้ จึงเป็นแนวทางของการเพิ่มโอกาสของ การศึกษาพัฒนาให้น้ำพิชท้องถิ่นมาใช้ประโยชน์ และยังเป็น การสนับสนุนให้เกิดการปลูกและขยายพันธุ์ต้นมะกอกป่าในแหล่งชุมชน อย่างยั่งยืน สามารถช่วยลดต้นทุนในการรักษาเนื่องจากช่วยลดการ นำเข้ายาหรือสารเคมีต่างๆจากต่างประเทศและยังได้นำพืชสมุนไพร ที่มีอยู่ตามธรรมชาติไปใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น นำไปพัฒนาต่อยอดเป็น ผลิตภัณฑ์ป้องกันการติดเชื้อในช่องปาก เช่น ผสมกับน้ำยาบ้วนปาก พัฒนาเป็นเม็ดยอมป้องกันการติดเชื้อในช่องปาก ใช้เป็นอาหารเสริม เพื่อป้องกันการติดเชื้อในช่องปากให้กับสัตว์บางชนิด หรือนำมาใช้กับ ผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพช่องปากและฟันสำหรับสุนัขเช่นผสมในขนม ชัดฟันหรือยาสีฟันสำหรับสุนัขได้ไม่ล้าสมัยต่อไป

สรุปผลการวิจัย

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปากและ ทางเดินหายใจของสารสกัด HRIT70ET พบว่าสารสกัด HRIT70ET สามารถยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ได้ ที่ความเข้มข้น มากกว่า 3.0 mg/ml แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* และ *H. influenzae* ได้ ที่ระดับความเข้มข้นที่นำมาใช้ทดสอบ สอดคล้องกับ

งานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งไม่พบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากผลมะกอกป่าในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปากในกลุ่มของ *C. albicans* และ *H. influenza* ซึ่งก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ อย่างไรก็ตาม สารสกัด HRIT70ET จะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ได้ แต่ถ้าสารออกฤทธิ์เก็บไว้นาน จะทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพลดลง ส่งผลให้ความเข้มข้นที่ต้องใช้ในการยับยั้งเชื้อเพิ่มมากขึ้น

สารสกัด HRIT70ET มีผลในการลดประสิทธิภาพการทำงานของ Chlorhexidine โดยจะพบว่า เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส จะค่อย ๆ ลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ) ปีงบประมาณ 2559 ที่เป็นผู้สนับสนุนทุนวิจัยกับโครงการวิจัย “การศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสกัดและน้ำหมักมะกอกป่า เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ” และ ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชั้นสูง หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อก่อโรคในช่องปากและทางเดินหายใจ

References

- Boeing, J. S., Barizao, E. O., Silva, B. C. E, Montanher, P. F., de Cinque Almeida, V., & Visentainer, J. V. (2014). Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 48. doi.org/10.1186/s13065-014-0048-1.
- Chaudhuri, D., Ghate, N. B., Singh, S. S., & Mandal, N. (2015). Methyl gallate isolated from *Spondias pinnata* exhibits anticancer activity against human glioblastoma by induction of apoptosis and sustained extracellular signal-regulated kinase $\frac{1}{2}$ activation. *Pharmacognosy Magazine*, 11(42), 269-276. doi: 10.4103/0973-1296.153078.
- Chiewpattanakul, P., Kaweewongprasert, P, Paisankobrit, V., & Vongsurasit, T. (2012). The antimicrobial activity of *Pseuderanthemum Palatiferum* (Hoan Ngoc) crude leaf extract against dental pathogens. *Srinakharinwirot University Dental Journal*, 5(1), 34-41. (in Thai)
- Denton, G. W. (2001). *Chlorhexidine In Block, Seymour S. Disinfection, Sterilization, and Preservation*. (5th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Ghate, N. B., Hazra, B., Sarkar, R., & Mandal, N. (2014). In vitro anticancer activity of *Spondias pinnata* bark on human lung and breast carcinoma. *Cytotechnology*, 66(2), 209-218. doi: 10.1007/s10616-013-9553-7.
- Gomes, A., Bhattacharjee, P., Mishra, R., Biswas, A. K., Dasgupta, S. C., & Giri, B. (2010). Anticancer potential of animal venom and toxins. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(2), 93-103.
- Hazra, B., Sarkar, R., & Mandal, N. (2013). *Spondias pinnata* stem bark extract lessens iron overloaded liver toxicity due to hemosiderosis in Swiss albino mice. *Annals of Hepatology*, 12(1), 123-129.
- Homhual, S. (2015). *Makok*. Accessed August 30, 2022. Retrieved from: <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=87> (in Thai)
- Leikin, J. B., & Paloucek, F. P. (2008). *Chlorhexidine Gluconate", Poisoning and Toxicology Handbook* (4th ed.). Minnesota: CRC Press.
- Phuket, D., Charbang, P., Sthitmatee, N., & Prachasilchai, W. (2016). Study of bacterial species and antimicrobial sensitivity in canine oral cavity at Small Animal Teaching Hospital, Chiang Mai University. *Chiang Mai Veterinary Journal*, 14(3), 108-117. (in Thai)
- Rauha, J. P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahkonen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., & Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56(1), 3-12.
- Sameh, S., Al-Sayed, E., Labib, R.M., Singab, A.N. (2018). Genus *Spondias*: A Phytochemical and Pharmacological Review. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 1-13.
- Siripermool, C., & Vimolmangkang, S. (2014). Herbs: An adjunctive treatment for periodontitis. *Songklanagarind Medical Journal*, 32(6), 417-425. (in Thai)
- Thunyakitpisal, N., Phetcharakupt, V., Thunyakitpisal, P., & Pongsamart, S. (2011). A study of durian-rind polysaccharide mouthwash on the level of *S.mutans* in fixed orthodontic patient. *Thai Journal of Orthodontics* 1, 11-17. (in Thai)

Research article

Antimicrobial Efficacy of Oral and Respiratory Pathogenic Microorganisms of Ripe Wild Olive Fruit Extract and the effect of the extract on some antiseptics

Wuttisak Kunu¹ Piboon Ngaonee² Porada Phetsuk² Waraporn Phanphrom²
and Supawadee Patathananone^{3*}

¹Program of Veterinary Technology and Veterinary Nursing, Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham, Maha Sarakham, 44000

²Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002

³Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani, Thailand, 12110

ARTICLE INFO

Article history

Received: 4 October 2022

Revised: 28 November 2022

Accepted: 28 November 2022

Online published: 8 December 2022

Keyword

Spondias pinnata

Biological activity

Inflammation

Pathogenic microorganisms

Antimicrobial

ABSTRACT

Drug resistance of pathogenic microorganisms of the oral cavity and respiratory tract. This study aimed to determine the antimicrobial activity of extracts from ripe wild olive fruit against pathogenic microorganisms of the oral cavity and respiratory tract and the effect of the extracts on oral disinfectants. HRIT70ET, HRIT95ET, and HRIPO60C70AC samples were tested for their inhibitory activity against oral cavity pathogens and the respiratory tract. The results showed that the three extracts could not inhibit the growth of *C. albicans* and *H. influenza*. However, HRIT70ET extract inhibited the growth of *S. mutans* ATCC 25175 at concentrations greater than 3.0 mg/ml. Furthermore, HRIT70ET exhibited the decreasing potential of chlorhexidine effect due to HRIT70ET being unusable to formulate in products with chlorhexidine as the active ingredient.

*Corresponding author

E-mail address: Supawadee_P@rmutt.ac.th (S. Patathananone)

Online print: 8 December 2022 Copyright © 2022. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. <https://doi.org/10.14456/paj.2022.24>