PRAWARUN AGRICULTURAL JOURNAL

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

บทความวิจัย

ศักยภาพของสารสกัดกัญชาที่ยับยั้งเชื้อที่ก่อโรคในสัตว์

ยุวดี อินสำราญ[1*] เนตรชนก จันทร์สว่าง[2] ภานุวัตร รื่นเรืองฤทธิ์[3] และ เนตรนภา เรืองไชย[4]

[1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000

[2]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000

[3]สาขาการจัดการงานวิศวกรรม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000

[4]สาขาพลศึกษา คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000

ข้อมูลบทความ

Article history

รับ: 20 ธันวาคม 2565

แก้ไข: 12 เมษายน 2566

ตอบรับการตีพิมพ์: 24 เมษายน 2566

ตีพิมพ์ออนไลน์: 8 พฤษภาคม 2566

คำสำคัญ

กัญชา

สารสกัดหยาบ

การยับยั้งจุลินทรีย์

โรคเต้านมอักเสบ

แบคทีเรียก่อโรค

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการหาฤทธิ์ของสารสกัดกัญชาสองสายพันธุ์ (สายพันธุ์ฝอยทองภูผายลและสายพันธุ์หางกระรอกร้อยเอ็ด) ในการต้านจุลชีพก่อโรคชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนมจำนวน 9 สายพันธุ์ และยีสต์และเชื้อราที่ก่อโรคผิวหนังและระบบทางเดินหายใจจากสัตว์ที่เป็นโรค สารสกัดหยาบจากใบกัญชาได้มาจากการสกัดโดยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เอทานอล เมธานอล อะซีโตน และคลอโรฟอร์ม ทำการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดในการต้านจุลชีพต่าง ๆ ด้วยวิธี Disc diffusion และหาความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดในการต้านจุลชีพ (Minimum inhibition concentration, MIC) และความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดในการฆ่าจุลชีพ (Minimum bacteriocidal/Fungicidal concentration, MBC/MFC) ด้วยวิธี Microbroth dilution สารสกัดหยาบโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายมีประสิทธิภาพในวงกว้างในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอับเสบในโคนมทดสอบ ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรีย แกรมบวกสามสายพันธุ์: *Staphylococcus aureus* A0527, *Staphylococcus haemolyticus* A12321 และ *Staphylococcus pneumonia* 001.12, และกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ: *Pseudomonas aeruginosa* A11015, *Mycoplasma pneumoniae* 001.1, *Klebsiella pneumoniae* 001.3 และ *Escherichia coli* A24622 ที่ค่า MIC 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และ MBC 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ยกเว้นแบคทีเรีย *Staphylococcus faecalis* 001.9 ที่ทนทานต่อการยับยั้ง นอกจากนี้สารสกัดหยาบที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายยังสามารถยับยั้งและฆ่ายีสต์และเชื้อรากอ่โรคผิวหนังได้แก่ *Candida albican*, *Malassizia pachydermatis* และ *Trichophyton* sp. รวมถึงยีสต์ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจในสัตว์ *Cryptococcus neoformans* ได้ ที่ค่า MIC 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และค่า MBC 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบกัญชามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในสัตว์ จึงควรส่งเสริมมาผลิตยาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในทางคลินิกและมีความเป็นไปได้ในการนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคผิวหนังสำหรับสัตว์อีกหลายชนิด

บทนำ

ความต้านทานของแบคทีเรียจากการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพยังเป็นปัญหาสำคัญทั่วโลก เนื่องจากโรคติดเชื้อจากจุลินทรีย์เป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับสอง ส่งผลให้มนุษย์และสัตว์เสียชีวิตในแต่ละปีเกิดจากติดเชื้อจุลินทรีย์ (Karas et al., 2020) *Klebsiella pneumoniae* ที่ดื้อต่อยา Imipenem พบปริมาณ จากร้อยละ 0.70 เพิ่มสูงขึ้นร้อยละ 8.40 *Pseudomonas aeruginosa* พบร้อยละ 22ในปี 2558 พบเชื้อ *Escherichia coli* ที่มียีนดื้อยาชนิด MCR-1 (Arsheewa, 2016) ในหมูและเนื้อสัตว์ในประเทศจีน และระบาดไปสู่คน สามารถถ่ายทอดพันธุกรรมการดื้อยาทาง plasmid ไปสู่แบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น เช่น *Klebsiella* spp. หรือ *Pseudomanas* spp. จากรายงานในปี 2555-2556 ในประเทศไทย พบว่า เชื้อดื้อยา CRE เป็นเชื้อดื้อยาที่สร้างเอนไซม์ NDM-1 ร้อยละ 86 และพบได้ทุกภาคของประเทศ เป็นการสะท้อนให้เห็นว่าอาจจะพบเชื้อดื้อยา MCR-1 นอกจากนี้ในประเทศไทย ปี 2564 มีการรายงานพบการดื้อยา Carbapenems สูงที่สุดจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa, Escerichai coli, Acinetobacter baumannii* และ *Klebsiella pneumoniae* ถึงร้อยละ 34.20, 14.80, 80.00 และ 21.90 ตามลำดับ การดื้อยา Ciprofloxacin จากเชื้อ*Salmonella* spp. ร้อยละ 8.2 การดื้อยา MRSA Oxacillin จากเชื้อ *Staphylococcus aureus* ร้อยละ 15.90 และการดื้อยา NS Oxacillin จากเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* ร้อยละ 3.80 จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่ามีแนวโน้มของเชื้อดื้อยาเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเนื่องจากมีการใช้ยาปฏิชีวนะในปริมาณที่สูงขึ้น ในปัจจุบันมีจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถต้านยาปฏิชีวนะได้มากกว่าหนึ่งชนิด จากรายงาน จึงได้มีการจัดทำแผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยา พ.ศ. 2560 เป้าหมายให้มีการใช้ยาต้านจุลชีพในมนุษย์ลดลงร้อยละ 20 และการใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์ลดลงร้อยละ 30 และใช้พืชสมุนไพรธรรมชาติที่มีคุณประสิทธิภาพเท่ากับสารสังเคราะห์

*Corresponding author

E-mail address: yuwadee.in@rmu.ac.th (Y. Insumran)

Online print: 8 May 2023 Copyright © 2023. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. https://doi.org/10.14456/paj.2023.5

เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (Antimicrobial Resistance Surveillance Center, Thailand, 2022) จากสถานการณ์นี้ จึงมีทางเลือกเพื่อผลิตยาลดการต้านทานแบคทีเรียสายพันธุ์ชนิดต่าง ๆ การผลิตยาปฏิชีวนะเป็นกลไกการนำสารเคมีที่ได้จากสิ่งมีชีวิตมาผลิต เพื่อนำไปสู่การค้นหายาต้านจุลชีพซึ่งเป็นทางเลือกใหม่ ซึ่งพืชเป็นสิ่งมีชีวิตที่ถูกใช้เป็นแหล่งของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติของมนุษย์ สารสกัดจากพืชและองค์ประกอบหลายชนิดมีคุณสมบัติต้านจุลชีพในการต่อต้านเชื้อโรค รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อการรักษาทางคลินิก และได้มีการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชหลายชนิดที่ได้รับการทดสอบจากห้องปฏิบัติการของสัตว์ที่ติดเชื้อ สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านกลไกการดื้อต่อแบคทีเรียได้ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการผลิตยาปฏิชีวินะมากขึ้น และมียาปฏิชีวนะมากกว่า 15 ชนิดที่ผลิตขึ้นมาทำลายโครงสร้างต่าง ๆ และยับยั้งกลไกการทำงานของเซลล์แบคทีเรีย

กัญชา (*Cannabis sativa*) เป็นพืชที่นำมาใช้เป็นอาหารและใช้ทางการแพทย์ และมีรายงานว่ามีคุณสมบัติเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านจุลชีพใช้เป็นยาฆ่าเชื้อเพื่อรักษาบาดแผล เช่น ไฟลามทุ่ง โรคแอนแทรกซ์ ภาวะติดเชื้อ โรคบิด และมาลาเรีย (Schofs et al., 2021) สารแคนนาบินอยด์และสารประกอบที่ได้จากกัญชา มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา ใบกัญชาสดมีประโยชน์ที่ดีต่อสุขภาพมากมาย มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่สารแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) และสารอาหารต่าง ๆ ที่สำคัญ เช่น ใยอาหาร แคลเซียม ธาตุเหล็ก โพแทสเซียม สังกะสี อีกทั้งยังมีสารอีกหลายชนิด ได้แก่ สารเทอร์ปีน (Terpenes) เป็นสารให้กลิ่นเฉพาะช่วยให้ผ่อนคลาย บรรเทาความเครียด และสารแคนนาบินอยด์ (Cannabinoids) เช่น สารแคนนาบิไดออล (Cannabidiol, CBD) และเตตระไฮโดรแคนนาบินอล (Tetrahydrocannabinol, THC) ที่พบทั่วไปในกัญชา และได้มีรายงานนำพืชกัญชามาใช้ในการศึกษาการต้านแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escerichai coli* และ *Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis, Salmonella typhi* และ *Klebsiella* spp. (Galletta et al., 2020) และเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Candida albicans* และ *Fusarium* spp. (Gwinn et al., 2022; Khan & Javaid, 2020) จากความสำคัญของพืชกัญชาที่กล่าวมา การศึกษาประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบกัญชาทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ฝอยทองภูผายล และสายพันธุ์หางกระรอกร้อยเอ็ด ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์ จึงเป็นสิ่งที่มีประโยชน์เพื่อที่จะนำไปพัฒนาใช้ทั้งในด้านการแพทย์ และในด้านเภสัชศาสตร์ต่อไปได้

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างและสารสกัดจากกัญชา

นำใบกัญชา 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ฝอยทองภูผายล และสายพันธุ์หางกระรอกร้อยเอ็ด แสดงดัง Figure 1 ที่ได้จากวิสาหกิจชุมชนกลุ่มข้าวหอมมะลิบ้านหนองโดน อำเภอลำปลายมาศ จังหวัดบุรีรัมย์ โดยเก็บในช่วงเวลา 06.00-07.00 น. แล้วนำใบกัญชามาผึ่งลมในร่มธรรมชาติที่อุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน จากนั้นใบกัญชาที่แห้งมาบดให้ละเอียด และนำผงกัญชาที่ละเอียดมาแช่ในตัวละลาย เอทานอล เมทานอล อะซิโตน และคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วนผงใบกัญชาจำนวน 1 กรัม แช่ในตัวทำละลาย จำนวน 10 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำผงใบกัญชาที่แช่มากรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 93) นำส่วนใสที่ได้จากการกรองไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และได้สารสกัดจากใบกัญชา นำมาเป็นเก็บไว้ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย

Figure 1 Cannabis: (A) FoiThongphuphayon (B) Hanggrarok Roei-Et

การตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของจุลชีพก่อโรค

การเตรียมเชื้อจุลชีพสำหรับการทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำนมโคนมที่มีโรคเต้านมวัวอักเสบ โดยเก็บอย่างในครั้งนี้เลือกพื้นที่วิจัยแบบเฉพาะเจาะจงจาก 12 ฟาร์มเป็นฟาร์มรายย่อยในพื้นที่จังหวัดมหาสารคาม ในช่วงเดือนมกราคม-มีนาคม พ.ศ.2565 โดยการเก็บตัวอย่างจากน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนม ที่แจ้งว่ามีปัญหาโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ โดยเก็บน้ำนมจากการรีดจากโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบใส่ขวดพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว จำนวนปริมาตร 20-60 มิลลิลิตร และทำเครื่องหมายระบุรหัสฟาร์มและรหัสโคนม และเก็บตัวอย่างน้ำนมในกล่องที่มีอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส นำเข้าสู่ห้องปฏิบัติการในช่วงเวลาไม่เกิน 12 ชั่วโมง และได้จำแนกชนิดของแบคทีเรียตามวิธีของ (Oliver, 2004). ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus* A0527, *Streptococcus faecalis* 001. 9, *Staphylococcus haemolyticus* A12321 และ *Streptococcus pneumoniae* 001.12 และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* A11015, *Mycoplasma pneumonia* 001. 1, *Klebsiella pneumoniae* 001.3 และ *Escherichia coli* A24622 จากนั้นนำเชื้อดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) 5 มิลลิลิตร เมื่อครบเวลานำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญมา Streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง Mueller Hinton Agar (MHA) เพื่อแยกให้ได้เชื้อโคโลนีเดี่ยว นำเข้าบ่มในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทดสอบชนิดละ 1 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MHB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำเข้าบ่มในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ $1.5x10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร CFU/mL โดยเทียบกับสารมาตรฐาน 0.5 McFarland ยีสต์และเชื้อราก่อโรคผิวหนัง *Candida albican*, *Malassezia pachydermatis* และ *Trichophyton* sp. โดยได้คัดแยกมาจากผิวหนังแมวในเขตเทศบาลเมืองมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม (ห้องปฏิบัติการชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม) และเชื้อยีสต์ *Cryptococcus neoformans* ที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจที่แยกได้จากสุนัข (ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อจาก คณะสัตวแพทย์

ศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม) นำยีสต์และเชื้อรามาเพาะเลี้ยงในอาหาร Sabouraud dextrose broth (SDB) หลังจากนั้นนำเข้าบ่มในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน นำเชื้อราที่ต้องการทดสอบมาปรับระดับความเข้มข้นในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้นข้นร้อยละ 0.85 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยปรับความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ $1.5x10^8$ CFU/mL โดยเทียบกับสารมาตรฐาน 0.5 McFarland

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion

เตรียมอาหารแข็ง MHA ในจานเพาะเลี้ยง นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาปรับความเข้มข้นในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้นข้นร้อยละ 0.85 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ $1.5x10^8$ CFU/mL โดยเทียบกับสารมาตรฐาน 0.5 McFarland นำไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบแบคทีเรีย มาทำการ Swab เชื้อให้ทั่วบนผิวอาหาร จากนั้นวางแผ่นทดสอบ (Paper disc) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่มีปริมาตร 100 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารสกัดจากใบกัญชาปริมาณ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายด้วยสารไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide (DMSO) แผ่นทดสอบที่มียาปฏิชีวนะ Genfloxcin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม และแผ่นทดสอบที่มีสาร DMSO เป็นชุดควบคุม นำมาวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA แล้วนำมาบ่มในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) ส่วนเชื้อรา นำแผ่นทดสอบที่มีสารสกัดปริมาณ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงบนอาหาร SDA ใช้ยาปฏิชีวนะ Amphotericin B ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม และ DMSO เป็นชุดควบคุม แล้วนำมาบ่มในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) ตรวจวัดผลโดยการวัดขนาดเส้นผานศูนยกลางบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) วงใสที่ไม่มีเชื้อเจริญรอบ ๆ แผ่นทดสอบ โดยขนาดของโซนวงใส มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร ที่ได้จากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบและโซนใสของเชื้อ ลบด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ (6 มิลลิเมตร) (Sani et al., 2018) และคำนวณร้อยละประสิทธิภาพของการยับยั้งของแต่ละตัวทำละลายจากการนำค่า 100 หารด้วยหารด้วยจำนวนเชื้อทั้งหมดที่ใช้ทดสอบและคูณด้วยผลรวมทั้งหมดของเชื้อที่ทดสอบสารสกัดกัญชาสามารถยับยั้งได้จากตัวทะละลายโดยคิดจากแต่ละตัวทำละลาย

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum inhibitory concentration, MIC)

นำสารสกัดใบกัญชา มาปรับความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย Dimethyl Sulfoxide (DMSO) นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อหลอดละ 500 ไมโครลิตร จำนวน 11 หลอด ดูดสารสกัดใบกัญชาความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 1 และหลอดที่ 2 หลอดละ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารในหลอดที่ 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 3 ทำนองเดียวกัน จนถึงหลอดที่ 11 ดูดสารละลายทิ้งปริมาตร 500 ไมโครลิตร เป็นการเจือจางระดับความเข้มข้นเป็นลำดับ ส่วนจะได้ 400, 200, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่จะทดสอบปรับความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ $1.5x10^8$ CFU/mL เทียบกับสารมาตรฐาน 0.5 McFarland แล้วดูดเชื้อลงไปในทุกหลอดที่มีการเจือจางหลอดละ 200 ไมโครลิตร โดยมีชุดควบคุมประกอบด้วย หลอดที่ 1 มีอาหารเลี้ยงเชื้อและสารสกัด หลอดที่ 11 มีอาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อแบคทีเรีย และหลอดที่ 12 มีสารละลาย DMSO และเชื้อแบคทีเรีย และหลอดที่ 13 มีเพียงสารสกัดเพียงอย่างเดียว แล้วนำหลอดทดลองทั้งหมดไปบ่มที่ตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 1-7 วัน นำหลอดทดลองทั้งหมดมาสังเกตความขุ่น เทียบกับชุดควบคุม ขณะเดียวกัน การทดสอบเชื้อราก็ทำเช่นเดียวกันกับแบคทีเรีย โดยใช้สารอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา คือ อาหาร SDB

การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal bactericidal/Fungicidal concentration, MBC/MBC)

นำหลอดอาหารที่ทดสอบ MIC ทุกหลอดที่ทดสอบมา Streak plate โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อมาตรฐานที่มีปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร (Loop) นำห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อให้เต็ม Loop จำนวน 1 Loop นำมา Streak ลงบนอาหาร MHA แล้วนำมาบ่มในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อราทำการบ่มไว้ เป็นระยะเวลา 1-7 วัน จากนั้นให้สังเกตการเจริญของแบคทีเรียแต่ละความเข้มข้น ถ้าความเข้มข้นใดไม่พบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA จะเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC)

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

เมื่อศึกษาด้วยเทคนิค Disc diffusion ที่ระดับความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากใบกัญชาทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ กัญชาสายพันธุ์ฝอยทองภูผายล และกัญชาสายพันธุ์หางกระรอก ที่สกัดจากตัวทำละลาย เอทานอล เมทานอล อะซิโตน และคลอโรฟอร์ม สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและ แกรมลบ แต่มีเชื้อ *S. faecalis* 001.9 ที่สารสกัดจากใบกัญชาทั้งสองสายพันธุ์ที่สกัดจากตัวทำละลายทั้งหมดไม่สามารถยับยั้งได้ และพบว่าจากสารสกัดจากใบกัญชาสายพันธุ์หางกระรอก ที่สกัดด้วยเมทานอลมีประสิทธิภาพการยับยั้งในแบคทีเรีย *S. pneumoniae* 001.12 สูงสุด มีขนาดเส้นผานศูนยกลางวงใสที่ 33.25 ± 4.59 มิลลิเมตร ส่วนสารสกัดใบกัญชาสายพันธุ์ฝอยทองภูผายล มีขนาดเสนผานศูนยกลางวงใสที่ 26.00 ±1.41 มิลลิเมตร ส่วนเชื้อรามีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงสุดใน *M. pachydermatis* มีขนาดเส้นผานศูนยกลางวงใสที่ 9±2.82 มิลลิเมตร และ 7.5±0.70 มิลลิเมตร (Table 1 และ Figure 2) สอดคล้องกับการศึกษาของ Karas et al. (2020) สารสกัดจากใบกัญชาที่สกัดจากทำละลายเมทนอลมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* 25923 มีขนาดเส้นผานศูนยกลางวงใสที่ 14 มิลลิเมตร ส่วน MRSA *E. coli* และ *K. pneumoniae* มีขนาดเส้นผานศูนยกลางวงใสที่ 12, 10 และ 7 มิลลิเมตร โดยประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* 25923 สูงถึงร้อยละ 80 และสอดคล้องกับ Nadir et al. (2020) ที่ทดสอบกับเชื้อ *P. aeruginosa* และ *E. coli*

Table 1 Antibacterial activity of the *Cannabis sativa* leaf extracts against the selected pathogens using disc diffusion method

Microorganisms	Extract of *Cannabis sativa*	Inhibition zone (mm.) of concentrations 400 (µg/mL)					
		Ethanol	Methanol	Acetone	Chloroform	Antibiotic/antifungal control	DMSO
Bacteria							
S. aureus A0527	A	10.25 ± 6.01	20.00 ± 7.07	15.00 ± 2.82	14.00 ± 4.94	23.50 ± 0.70	-
	B	11.25 ± 1.76	19.00 ± 2.82	17.50 ± 6.36	17.00 ± 2.82	23.00 ± 8.48	-
S. faecalis 001.9	A	-	-	-	-	17.00 ± 8.48	-
	B	-	-	-	-	17.50 ± 0.70	-
S. haemolyicus A12321	A	-	3.50 ± 4.94	-	-	21.50 ± 2.12	-
	B	-	7.00 ± 0.00	3.50 ± 4.94	-	21.50 ± 0.70	-
S. pneumoniae 001.12	A	12.25 ± 3.18	26.00 ±1.41	23.00 ± 7.07	21.50 ± 0.70	22.25 ± 0.35	-
	B	13.50 ± 2.12	33.25 ± 4.59	30.00 ± 1.41	17.00 ± 2.82	22.50 ± 0.70	-
E. coil A24622	A	-	18.00 ± 4.24	11.75 ± 1.76	12.25 ± 1.76	25.30 ± 14.56	-
	B	-	19.50 ± 0.70	10.00 ± 0.00	12.00 ± 0.00	25.00 ± 0.00	-
K. pneumoniae 001.3	A	-	22.50 ± 3.53	18.25 ± 12.37	14.75 ± 0.35	20.00 ± 0.00	-
	B	-	23.50 ± 2.12	16.50 ± 4.94	30.00 ± 7.07	20.00 ± 0.00	-
M. pneumoniae 001.1	A	-	15.00 ± 2.82	11.00 ± 2.82	8.50 ± 2.12	20.50 ± 0.70	-
	B	-	16.00 ± 1.41	13.50 ± 0.70	12.00 ± 4.24	20.00 ± 1.41	-
P. aeruginosa A11015	A	-	21.50 ± 4.94	14.00 ± 5.65	16.75 ± 2.47	19.50 ± 3.53	-
	B	-	21.00 ± 7.07	15.00 ± 4.24	20.00 ± 0.00	19.00 ± 0.00	-
						Amphotericin B	
Fungi							
C. albicans	A	-	3.5±4.94	-	2.33±4.04	9.66±8.38	-
	B	-	5±7.07	-	3.25±4.59	9.66±8.38	-
C. neoformans	A	-	2.33±4.04	-	-	14.33±6.42	-
	B	-	2.00±0.00	-	-	20±1.73	-
M. pachydermatis	A	8.16±1.75	9±2.82	6.75±0.35	3.25±4.59	7.5±0.86	-
	B	4.66±4.07	7.5±0.70	7±0.00	9.5±2.12	7±0.50	-
Trichophyton sp.	A	-	10.16±0.76	-	-	7±0.00	-
	B	6.75±0.35	7±0.70	4±5.65	-	7±0.00	-

Zone of inhibition represented sensitivity. -: No inhibition zone (resistance), Control: DMSO, Genfloxcin: 10 µg/mL, Control of Bacteria, Amphotericin B: 10 µg/mL (Control of fungal), A: FoiThongphuphayon, B: Hanggrarok Roei-Et.

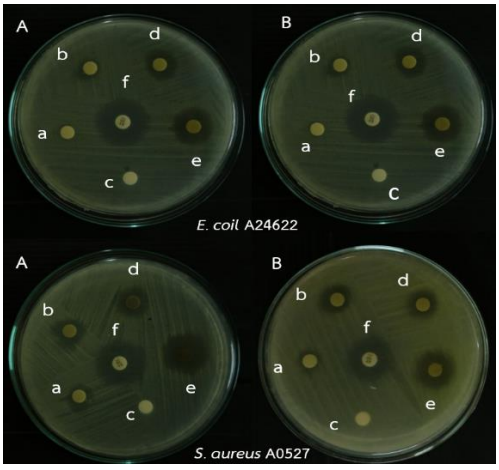

Figure 2 Ihibititory effects of crude leaf extracts of two varieties of *Cannabis sativa*: FoiThongphuphayon var. (A) and Roei-Et var. (B) using different solvents against of *E. coil* A24622 and *S. aureus* A0527 by disc diffusion method using 400 µg of each crude extract. a: crude ethanol extract, b: crude acetone extract, d: crude chloroform extract, e: crude methanol extract, c: negative control (100% v/v DMSO) and f, 10 µg of Genfloxcin

Table 2 Minimal inhibitory concentration (MIC) of *Cannabis sativa* extracts: from FoiThongphuphayon cv. (A) and Hanggrarok Roei-Et cv. (B) using ethanol, methanol, acetone, and chloroform as solvent agains the selective pathogens

Microorganisms	Extract of *Cannabis sativa*	Minimal inhibitory concentration (µg/mL)			
		Ethanol	Methanol	Acetone	Chloroform
S. aureus A0527	A	50.00	50.00	50.00	50.00
	B	100.00	50.00	50.00	50.00
S. faecalis 001.9	A	-	-	-	-
	B	-	-	-	-
S. haemolyicus A12321	A	-	50.00	-	-
	B	-	50.00	-	-
S. pneumoniae 001.12	A	50.00	50.00	50.00	50.00
	B	50.00	50.00	50.00	50.00
E. coil A24622	A	-	50.00	50.00	50.00
	B	-	50.00	50.00	50.00
K. pneumoniae 001.3	A	-	50.00	50.00	50.00
	B	-	50.00	50.00	50.00
M. pneumoniae 001.1	A	-	50.00	50.00	50.00
	B	-	50.00	50.00	50.00
P. aeruginosa A11015	A	-	50.00	50.00	50.00
	B	-	50.00	50.00	50.00
C. albicans	A	-	50.00	-	200.00
	B	-	50.00	-	200.00
C. neoformans	A	-	50.00	-	-
	B	-	50.00	-	-
M. pachydermatis	A	50.00	50.00	50.00	100.00
	B	50.00	50.00	50.00	50.00
Trichophyton sp.	A	-	50.00	-	-
	B	100.00	50.00	50.00	-
% Resistance	A	25.00	91.67	58.33	66.67
	B	33.33	91.67	66.67	66.67

Table 3 Minimal bactericidal concentration (MIC) of *Cannabis sativa*, FoiThongphuphayon cv. (A) and Hanggrarok Roei-Et cv. (B) extracts using various solvents against the selected pathogens

Microorganisms	Extract of *Cannabis sativa*	Minimal bactericidal concentration (µg/mL)			
		Ethanol	Methanol	Acetone	Chloroform
S. aureus A0527	A	>400	>400	>400	>400
	B	>400	>400	>400	>400
S. faecalis 001.9	A	-	-	-	-
	B	-	-	-	-
S. haemolyicus A12321	A	-	>400	-	-
	B	-	>400	-	-
S. pneumoniae 001.12	A	>400	>400	>400	>400
	B	>400	>400	>400	>400
E. coil A24622	A	-	>400	>400	>400
	B	-	>400	>400	>400
K. pneumoniae 001.3	A	-	>400	>400	>400
	B	-	>400	>400	>400
M. pneumoniae 001.1	A	-	>400	>400	>400
	B	-	>400	>400	>400
P. aeruginosa A11015	A	-	>400	>400	>400
	B	-	>400	>400	>400
C. albicans	A	-	>400	-	>400
	B	-	>400	-	>400
C. neoformans	A	-	>400	-	-
	B	-	>400	-	-
M. pachydermatis	A	>400	>400	>400	>400
	B	>400	>400	>400	>400
Trichophyton sp.	A	-	>400	-	-
	B	>400	>400	>400	-
% Resistance	A	25	91.67	58.33	66.67
	B	33.33	91.67	66.67	66.67

สารสกัดจากใบกัญชาที่สกัดด้วยสารเมทานอลมีประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรามากที่สุด โดยที่สารสกัดจากกัญชาสายพันธุ์ฝอยทองภูผายล และสารสกัดกัญชาจากสายพันธุ์หางกระรอก ร้อยละ 91.67 รองลงมาคือ สารสกัดกัญชาจากสารอะซิโตน ร้อยละ 66.67 และคลอโรฟอร์มร้อยละ 66.67 และ 58.33 ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราได้ ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดจากสารเอทานอลพบว่ามีประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราที่พบในสารสกัดใบกัญชาสายพันธุ์ฝอยทองภูผายล และสารสกัดกัญชาจากสายพันธุ์หางกระรอกร้อยละ 33.33 และ 25.00 จากการศึกษาในครั้งนี้ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา คือ 50.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้น *S. faecalis* 001.9 และเชื้อรา *Candida albicans* และ *Cyrptococcus neoformans* ที่สารสกัดจากใบกัญชาทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งได้ (Table 2)

โดยระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียและเชื้อรา คือ มากกว่า 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงใน Table 3

จากรายงานในสารสกัดใบกัญชามีกลุ่มสาร Cannabinoids และมีสาร Cannabidiol (CBD) ที่สามารถเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียและทำลายเซลล์ ส่งผลเข้าไปยับยั้งหรือรบกวนกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ได้แก่ ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตต่อไปได้ (Appendino et al., 2008; Isahq et al., 2015) สอดคล้องกับการศึกษา Blaskovich, et al. (2021) ซึ่งสารสกัดใบกัญชาสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ และจากรายงาน Frassinetti et al. (2020) พบว่าสารสกัดจากเมล็ดกัญชาสามารถลดการสร้างไบโอฟิลม์แบคทีเรียโปรไบโอติก (*Lactobacillus* และ *Bifidobacterium*) ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้ นอกจากนั้นสาร CDB ในกัญชาสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *S. aureus* ได้สูงและรวดเร็วเนื่องจากสารชนิดนี้ไม่มีประจุสามารถซึมผ่านเข้าไปในเหยื่อหุ้มเซลล์ได้ง่ายและรวดเร็ว (Sharma et al., 2019) ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตและมีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือรบกวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และยีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถแบ่งเซลล์ได้ต่อไป ดังนั้นทำให้สารแคนาบิไดออลมีฤทธิ์เหมือนยาปฏิชีวนะ Cephalothin ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ และจากรายงาน Anjum et al. (2018) ได้ทำการศึกษาสารสกัด *Cannabis sativa* L. ที่ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา คือ *E. coli, S. aureus, P. aeruginosa, A. niger* และ *Fusarium* spp. ด้วยเทคนิค Disc diffusion และ Agar well diffusion method สารสกัดใบกัญชาจากเอทานอล (Ethanol) และสารสกัดอะซิโตน (Acetone) สามารถยับยั้งจุลินทรีย์สูงสุด รองลงมา คือ สารสกัดจากน้ำกลั่น และสารสกัดคลอโรฟอร์ม (Chloroform) ของกัญชา ซึ่งจากศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบกัญชาต่อเชื้อราที่ก่อโรค ด้วยตัวทำละลายเอทานอล เมทานอล (Methanol) อะซิโตน และคลอโรฟอร์ม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารสกัดใบกัญชาจากตัวทำละลายเอทานอลไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก คือ *E. coil* A24622, *K. pneumoniae* 001.3, *M. pneumoniae* 001.1 และ *P. aeruginosa* A11015 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Chakraborty et al. (2018) ที่ทดสอบสารสกัดกัญชาจากเชื้อ Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) Farha et al. (2020) และ Martinenghi et al. (2020) ที่ทดสอบสารสกัดจากใบกัญชาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* และ *S. epidermidis* แต่ไม่สามารถที่จะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *E. coil, K. Pneumonia, P. Aeruginosa, S. aureus* A0527

สารสกัดใบกัญชาสายพันธุ์ฝอยทองภูผายลที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล สามารถยับยั้งเชื้อราประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Candida albicans* มีค่า MIC ที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากใบกัญชาทั้ง 2 สายพันธุ์ อาจมีปริมาณสารประกอบ Terpenes, Cannabinoids, Flavonoids และ Phenols (Singh et al., 2018) ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. flavipes* และ *C. albicans* ที่ก่อโรคในมนุษย์ ได้ดีกว่าสารสกัดจากพืชชนิดอื่น ๆ (Nalli et al., 2018) จากรายงานของ Swain et al. (2016) ใช้สารสกัดจาก *C. sativa* สามารถต้านเชื้อรา *A. Fumigatus, A. Flavus, Fusarium, Penicillium* และ *Mucor*

จากการศึกษานี้พบว่าสารสกัดกัญชาจากตัวทะลายเมทานอลมีประสิทธาภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดี สอดคล้องกับ Khan & Javaid (2020) ได้ศึกษาสารสกัดจาก *C. sativa* ที่สกัดด้วยด้วยสารละลายเมทานอลในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavipes* สารสกัดกัญชาจากเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. flavipes* ได้ดีกว่าตัวทะลายอื่น ๆ โดยมีค่าประสิทธิภาพการยับยั้งร้อยละ 68-82 รองลงมาที่สกัดด้วยด้วยคลอโรฟอร์ม และเฮกเซน มีค่าร้อยละ 52-82 และ 42-82 ตามลำดับ รองลงมาสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทธิล อะซีเตทมีค่าร้อยละ 47-76 และที่สกัดด้วยน้ำมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. flavipes* ได้น้อยที่สุด มีค่าร้อยละ 38-73 ตัวทำละลายเมทานอลอาจมีประสิทธิภาพการดึงสาระสำคัญในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าตัวทำละลายอื่น ๆ จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าประสิทธิภาพของสารกัดใบกัญชาทั้ง 2 สายพันธุ์จากตัวทำละลายจากเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราสูงสุด ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาส่วนสารสกัดกัญชาจากตัวทำละลายอะซิโตนและคลอโรฟอร์มส่วนสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำสุด

จากการศึกษาในครั้งนี้สารสกัดจากใบกัญชามีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในสัตว์ ดังนั้งจึงมีความจำเป็นในการนำสารสกัดจากใบกัญชาไปพัฒนายาปฏิชีวนะ ในพรีคลินิกรักษาโรคเต้านมอักเสบในวัว และเชื้อราก่อโรคผิวหนังสัตว์ที่สามารถใช้เป็นทางเลือกได้ในอนาคต จากใบกัญชา 2 สายพันธุ์ คือ กัญชาสายพันธุ์ฝอยทองภูผายล และกัญชาสายพันธุ์หางกระรอกร้อยเอ็ดยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคเต้านมอักเสบและเชื้อราจากผิวหนังแมว บ่งชี้ได้ว่าการนำพืชกัญชาเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำมาเป็นยาต้านจุลชีพต่อไปได้ อย่างไรก็ตามควรนำสารสกัดมาใช้วิเคราะห์แยกชนิดและปริมาณของสารสกัดในใบกัญชาก่อนการนำมาใช้ทดสอบเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพ เนื่องจากการทดลองนี้ไม่ได้แยกส่วนของชนิดองค์ประกอบของสารในการนำมาทดสอบ

สรุปผลการวิจัย

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราจากของสารสกัดสารสกัดจากใบกัญชา 2 สายพันธุ์ คือ กัญชาสายพันธุ์ฝอยทองภูผายล และกัญชาสายพันธุ์หาง

กระรอกร้อยเอ็ดสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคเต้านมอักเสบในวัว และเชื้อราจากผิวหนังแมวได้ โดยประสิทธิภาพการยับยั้งของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกัน ความเข่มข่นต่ำสุดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณรายได้ ปีงบประมาณ ประจำปี พ.ศ. 2565 มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม และขอขอบคุณ นางสุกันยา เฮย์วอร์ด ที่ให้ความอนุเคราะห์ใบกัญชาในการทำวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือในการศึกษาวิจัย จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

References

Abdullah Sani, N., Sawei, J., Ratnam, W., & Abdul Rahman, Z. (2018). Physical, antioxidant and antibacterial properties of rice (*Oryza sativa* L.) and glutinous rice (*Oryza sativa* var. glutinosa) from local cultivators and markets of Peninsular, Malaysia. *International Food Research Journal*, *25*(6), 2328-2336.

Anjum, M., Arooj, Z. E., Azam, S., Rehman, P., & Khadim, J. (2018). Evaluation of antimicrobial activity and ethnobotanical study of *Cannabis sativa* L.*Pure and Applied Biology*, *7*(2),706-713.

Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., Smith, E., & Rahman, M. M. (2008). Antibacterial Cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure–activity study*Journal of Natural Products*, *71*(8), 1427–1430. doi: 10.1021/np8002673

Arsheewa, W. (2016). Prevalence of carbapenemase enzyme in clinical isolates of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from Prapokklao Hospital in 2012 – 2013. *The Journal of Prapokklao Hospital Clinical Medical Education Center*, *33*(4), 314-325. (in Thai)

Blaskovich, M. A. T., Kavanagh, A. G., Elliott, A. G., Zhang, B., Ramu, S., Amado, M., Lowe, G. J., Hinton, A. O., Pham, D. M. T., Zuegg, J., Beare, N., Quach, D., Sharp, M. D., Pogliano, J., Rogers, A. P., Lyras, D., Tan, L., West, N. P., Crawford, D. W., Peterson, M. L., Callahan, M., & Thurn, M. (2021).The antimicrobial potential of cannabidiol. *Communications Biology*, *4*(1), 7. doi: 10.1038/s42003-020-01530-y

Chakraborty, S., Afaq, N., Singh, N., & Majumdar, S. (2018). Antimicrobial activity of *Cannabis sativa*, *Thuja orientalis* and *Psidium guajava* leaf extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Integrative Medicine*, *16*(5), 350-357. doi: 10.1016/j.joim.2018.07.005

Farha, M. A., El-Halfawy, O. M., Gale, R. T., MacNair, C. R., Carfrae, L. A., Zhang, X., Jentsch, N. G., Magolan, J., & Brown, E.D.(2020). Uncovering the hidden antibiotic potential of Cannabis. *American Chemical Society Infectious diseases*, *6*(3), 338-346. doi: 10.1021/acsinfecdis.9b00419

Frassinetti, S., Gabriele, M., Moccia, E., Longo, V., & Gioia, D. D. (2020). Antimicrobial and antibiofilm activity of *Cannabis sativa* L. seeds extract against *Staphylococcus aureus* and growth effects on probiotic *Lactobacillus* spp. *LWT-Food Science and Technology*, *124*(5), 109149. doi:10.1016/j.lwt.2020.109149

Gwinn, K. D., Hansen, Z., Kelly, H. , & Ownley, H. B. (2022). Diseases of *Cannabis sativa* caused by diverse *Fusarium* species. *Frontiers in Agronomy*, *3*, 796062. doi: 10.3389/fagro.2021.796062

Galletta, M., Reekie, T. A., Nagalingam, G., Bottomley A. L., Harry, E. J., Kassiou, M., & Triccas, J. A. (2020). Rapid antibacterial activity of cannabichromenic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics, 9*(8), 523. doi: 10.3390/antibiotics9080523

Isahq, M. S, Afridi, M. S., Ali, J., Hussain, M. M., Ahmad, S., & Kanwal, F. (2015). Proximate composition, phytochemical screening, GC-MS studies of biologically active cannabinoids and antimicrobial activities of *Cannabis indica*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *5*(11), 897–902. doi: 10.1016/s2222-1808(15)60953-7

Khan, I. H., & Javaid, A. (2020). Antifungal activity of leaf extract of *Cannabis sativa* against *Aspergillus flavipes*. *Pakistan Journal of Weed Science Research*, *26*(4), 447-453. doi: 10.28941/pjwsr.v26i4.883

Karas, J. A., Wong, L. J. M., Paulin, O. K. A., Mazeh, A. C., Hussein, M. H., Li, J., & Velkov, T. (2020). The antimicrobial activity of cannabinoids. *Antibiotics*, *9* (7), 406. doi: 10.3390/antibiotics9070406

Martinenghi, L. D., Jonsson, R., Lund, T., & Jenssen, H. (2020). Isolation, purification, and antimicrobial characterization of cannabidiolic acid and cannabidiol from *Cannabis sativa* L. *Biomolecules*, *10*(6), 900. doi: 10.3390/biom10060900

National Antimicrobial Resistance Surveillance Center, Thailand. (2022). *Thailand's integrate antimicrobial resistance surveillance with one health approach guideline*. Accessed March 11, 2023. Retrieved from http://narst.dmsc.moph.go.th/. (in Thai)

Nadir, I., Rana, N. F., Ahmad, N. M., Tanweer, T., Batool, A., Taimoor, Z., Riaz, S., & Ali, S. M. (2020). Cannabinoids and terpenes as an antibacterial and antibiofouling promotor

for PES water filtration membranes. *Molecules*, *25*(3)), 691. doi: 10.3390/molecules25030691

Nalli, Y., Arora, P., Hassan, S. R. U., & Ali, A. (2018). Chemical investigation of *Cannabis sativa* leading to the discovery of a prenylspirodinone with anti-microbial potential. *Tetrahedron Letters*, *59*(25), 2470-2472.

Oliver., S. P. (2004). *Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality* (4th ed.). Wisconsin: National Mastitis Council (NMC).

Schofs, L., Sparo, M. D., & Bruni, S. F. S. (2021). The antimicrobial effect behind *Cannabis sativa*. *Pharmacology Research and Perspectives*, *9* (2), e00761. doi: 10.1002/prp2.761

Sharma, A., Gupta, V. K., & Pathania, R. (2019). Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian Journal of Medical Research*, *149*(2), 129-145. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_2079_17

Singh, P., Pandit, S., Garnæs, J., Tunjic, S., Mokkapati, V. R., Sultan, A., Thygesen, A., Mackevica, A., Mateiu, R. V., Daugaard, A. E., Baun, A., & Mijakovic, I. (2018). Green synthesis of gold and silver nanoparticles from *Cannabis sativa* industrial hemp) and their capacity for biofilm inhibition. *International Journal of Nanomedicine*, *13*, 3571-3591. doi: 10.2147/IJN.S157958

Swain, S., Barik, S. K., Behera, T., Nayak, S. K., Sahoo, S. K., Mishra, S. S., & Swain, P. (2016). Green synthesis of gold nanoparticles using root and leaf extracts of *Vetiveria zizanioides* and *Cannabis sativa* and its antifungal activities. *BioNanoScience*, *6*,(3)205-213. doi: 10.1007/s12668-016-0208-y

Research article

The potential of Cannabis sativa extract to inhibit pathogens in animals

Yuwadee Insumran[1*] Natchanok Jansawang[2] Panuwat Ruenruangrit[3] and Netnapha Ruangchai[4]

[1]*Depatment of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajabhat Maha Sarakham University, Mueang, Maha Sarakham, 44000*
[2]*Depatment of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rajabhat Maha Sarakham University, Mueang, Maha Sarakham, 44000*
[3]*Department of Engineering Management, Faculty of Engineering, Rajabhat Maha Sarakham University, Maha Sarakham,44000*
[4]*Department of Physical Education, Faculty of Education, Rajabhat Maha Sarakham University, Mueang, Maha Sarakham 44000*

ARTICLE INFO

Article history
Received: 20 December 2022
Revised: 12 April 2023
Accepted: 24 April 2023
Online published: 8 May 2023

Keyword
Cannabis sativa
Crude extract
Antimicrobial
Mastitis
Pathogenic microorganism

ABSTRACT

This research was aimed to screen the antimicrobial activities of two varieties of *Cannabis sativa* (FoiThongphuphayon cv. and Hanggrarok Roei-Et cv.) leaf extracts against pathogens including bacteria causing mastitis in dairy cows and some yeasts and filamentous fungi isolated from dermatitis and respiratory disease affected animals. Crude extracts from the leaves of cannabis were obtained using extractions by various solvents including ethanol, methanol, acetone, and chloroform. Disc diffusion was used as an antimicrobial and antifungal activity screening method, and minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bacteriocidal/fungicidal concentration (MBC/MFC) were further measured using the micro broth dilution method. The methanol extracts from both varieties of cannabis were generally effective in inhibiting most of the tested bacterial strains including three gram-positive: *Staphylococcus aureus* A0527, *Staphylococcus haemolyticus* A12321, and *Staphylococcus pneumonia* 001.12, and four gram-negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa* A11015, *Mycoplasma pneumoniae* 001. 1, *Klebsiella pneumoniae* 001. 3 and *Escherichia coli* A24622 at 50 µg/ml MIC and 400 µg/ml MBC, except for *Staphylococcus faecalis* 001.9 resisting inhibition. The methanol extracts were also effective against the tested dermatitis-causing yeasts and fungus including *Candida albican*, *Malassesia pachydermatis*, *Trichopyton* sp., as well as the respiratory system-affecting fungus, *Cryptococcus neoformans*, at 50 µg/ml MIC and 400 µg/ml MBC. Thus, the extracts from Cannabis are promising and should be promoted to be used clinically for clinical usage as treatment agents against pathogens, and also contain the potential to be used in the pharmaceutical industry going forward.

*Corresponding author
E–mail address: yuwadee.in@rmu.ac.th (Y. Insumran)

Online print: 8 May 2023 Copyright © 2023. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. https://doi.org/10.14456/paj.2023.5