

ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากกัญชงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

ปริยานุช ใจหาญ¹, กรกมล วงษ์ชู², พิมพ์นารา ตูลาธาร³, ลักขณา มีแสง⁴, ธเนศ นนท์ศรัราข⁵

(วันที่รับบทความ 27 มิถุนายน 2566, วันที่แก้ไข 25 กรกฎาคม 2566, วันที่ตอบรับ 25 กรกฎาคม 2566)

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจาก ดอก ใบ และ ลำต้นของกัญชง ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* sp., *Acinetobacter* spp. และ *Vibrio cholerae* โดยเก็บตัวอย่างกัญชง ได้แก่ ดอก ใบ และลำต้น นำมาสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 จากนั้นระเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุน แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ โดยใช้วิธี Agar well diffusion จากนั้นนำไปหาความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) และความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) โดยวิธี Broth Macro dilution ผลการศึกษาพบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด มีการตอบสนองของสารสกัดหยาบของ ดอก ใบ และลำต้นของกัญชงที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะสารสกัดหยาบของดอกกัญชง สามารถยับยั้งทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 คือ *S. aureus* รองลงมา คือ *B. cereus*, *B. subtilis*, *Acinetobacter* spp., *V. cholerae* และ *Klebsiella* sp. ตามลำดับ ทั้งนี้สารสกัดหยาบของดอกกัญชง มีค่า MIC ของแบคทีเรียแกรมบวกเท่ากับ 0.0244 มก./มล. และ ค่า MBC เท่ากับ 0.0244 มก./มล. และค่า MIC ของแบคทีเรียแกรมลบเท่ากับ 50 - 12.5 มก./มล. และ MBC เท่ากับ 50 มก./มล. ดังนั้นสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆ ของกัญชงมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ และกัญชงสามารถใช้เป็นสารสกัดทางเลือกจากธรรมชาติในการนำไปพัฒนาต่อเป็นยาปฏิชีวนะได้

คำสำคัญ: กัญชง, การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย, แบคทีเรียก่อโรค

¹โครงการ วมว. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, (², ³, ⁴)โรงเรียนสาธิต “พิบูลบำเพ็ญ” มหาวิทยาลัยบูรพา,

⁵สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 7 ขอนแก่น Corresponding author: ปริยานุช ใจหาญ, e-mail: piyanoot.jaihan05@gmail.com

Efficiency of Cannabis sativa subsp.sativa Crude Extract On Inhibition Of Pathogenic Bacteria

Piyanoot Jaihan¹, Kornkamon Wongchu², Pimnara Thulathan², Lakkana Meesang², Thanade Nonsrirach³

(Received 27th June 2023, Revised 25th July 2023, Accepted 25th July 2023)

Abstract

The purpose of this study was to investigate the potential use of crude extract of flowers, leaves and stems from hemp (*Cannabis sativa* subsp. *sativa*) to inhibit the growth of *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* sp., *Acinetobacter* spp. and *Vibrio cholerae*. The samples of hemp; flowers, leaves and stems were extracted using 95% ethanol and then processed using a rotary evaporator to obtain the crude extract. The crude extracts tested against six bacteria using the Agar well diffusion method, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) by Broth Macro dilution. The results showed that the six types of tested bacteria exhibited varying responses to crude extracts from the flowers, leaves, and stems of hemp. Of these extracts, the crude extract from the flowers of hemp was found to be the most effective for inhibiting both gram-positive and gram-negative bacteria, with *S.aureus* which is gram-positive bacteria being the statistically significant level of 0.05, followed by *B. cereus*, *B. subtilis*, *Acinetobacter* spp., *V. cholerae* and *Klebsiella* sp., respectively. The crude extract from the flowers of hemp had a MIC value of 0.0244 mg/ml and a MBC value of 0.0244 mg/ml against gram-positive bacteria, and a MIC value of 50-12.5 mg/ml and a MBC value of 50 mg/ml against gram-negative bacteria. Therefore, crude extract obtained from different parts of hemp possesses properties for inhibiting pathogenic bacteria. Hemp can be used as a natural alternative extract for the development of antibiotics.

Keywords: Hemp, Antibacterial activity, Pathogenic bacteria

¹ Science Classroom in University-Affiliated School Project, Science Burapha University

²Piboonbumpen Demonstration School, Burapha University, ³The Office of Disease Prevention and Control 7 Khon Kaen. Corresponding author: Piyanoot Jaihan, e-mail: piyanoot.jaihan05@gmail.com

บทนำ

กัญชา (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*) เป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ *cannabaceae* ที่มีประโยชน์ถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายตั้งแต่สมัยโบราณ ในเอกสารการแพทย์ของอินเดียกล่าวว่าในอินเดียมีการใช้ใบแห้งและดอกของกัญชาในการรักษาโรคหืด ลดไข้ และรักษาอาการติดเชื้อมาลาเรีย ส่วนในยุโรปนั้นจะคัดเลือกเมล็ดของกัญชาไปใช้เป็นอาหารและน้ำมันที่เรียกกันว่าน้ำมันกัญชา⁽¹⁾ นอกจากนี้ในปัจจุบันมีรายงานว่า ยาปฏิชีวนะมักจะเป็นพิษ และมีผลข้างเคียงต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ส่งผลเสียต่อความเป็นอยู่และสร้างความลำบากในด้านการรักษา จากปัญหาดังกล่าว การศึกษาค้นคว้าสารสกัดจากธรรมชาติชนิดใหม่จึงมีความสำคัญ สารสกัดจากพืชสมุนไพรจึงได้รับความสนใจนำมาปรับใช้เป็นยาในการต้านทานต่อแบคทีเรีย ทดแทนการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ เนื่องจากสมุนไพรส่วนมากมีต้นทุนต่ำ มีความเป็นพิษและมีผลข้างเคียงน้อยกว่าสารเคมี ในส่วนของกัญชานั้นคาดว่ากรยับยั้งต่อจุลินทรีย์น่าจะมีผลมาจากสารสำคัญที่มีในกัญชาที่มีมากกว่า 450 ชนิด โดยมากกว่า 60 ชนิด เป็นสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (cannabinoids) มีองค์ประกอบหลักคือ Tetrahydrocannabinol (THC) และสารชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกัน เช่น Cannabinol (CBN), Cannabidiol (CBD), Cannabichromene (CBC), Cannabigerol (CBG)⁽²⁾ เป็นต้น ทั้งนี้ยังมีรายงานว่ามีการนำส่วนต่างๆ ของกัญชามาศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์⁽³⁾ และมีรายงานประสิทธิภาพสารสกัด

จากเมล็ดกัญชาในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* รวมถึงสารสกัดจากใบกัญชาสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* และ *Enterococcus faecalis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽⁴⁾

จากงานวิจัยข้างต้นยังไม่มีรายงานประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากการสกัดหยาบส่วนของต้นกัญชาที่แตกต่างกัน เช่น ดอก ใบ และลำต้น เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ อาทิเช่น *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* sp. และ *Vibrio cholerae* เป็นต้น ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการนำสารสกัดหยาบจาก ดอก ใบ และลำต้นของกัญชามาใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ ทางผู้วิจัยคาดหวังว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในด้านจุลชีววิทยา เป็นทางเลือกในการเลือกใช้พืชสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเป็นสิ่งที่สามารถศึกษาค้นคว้าเพื่อให้เป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจและต้องการค้นคว้าหาข้อมูลต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากกัญชาในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์
2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ ดอก ใบ และลำต้นของกัญชา ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

สมมติฐานการวิจัย

1. สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ที่พบในสารสกัดกัญชามีความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

2. ความเข้มข้นของสารสกัดหยาดดอก ใบ และลำต้นของกัญชงที่ต่างกัน ส่งผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกัน

วิธีการศึกษา

การสกัดสารแบบหยาดที่ใช้ในการทดสอบ นำดอก ใบ และลำต้นของกัญชงโดยได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากกองพัฒนายาแผนไทยและสมุนไพร กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข ไปอบแห้งและบดให้ละเอียดแล้วไปสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ด้วยอัตราส่วนของกัญชงต่อตัวทำละลาย 1 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร ใช้หมักที่อุณหภูมิ 25 -28 °C เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้นนำส่วนของน้ำของดอก ใบ และลำต้นของกัญชงที่กรองไว้ มาทำการระเหยเอาส่วนที่เป็นสารละลายออก โดยใช้เครื่อง rotary evaporator (BUCHI, Switzerland Ltd.) ระเหยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สารที่มีลักษณะเหนียวเหนียวเก็บใส่ขวดสีชานำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการจะใช้สารสกัดหยาดในการทดสอบเชื้อแบคทีเรียนำสารสกัดหยาดนั้นไปละลายใน 10% DMSO โดยใช้ในอัตราส่วน 500 มก./มล. แล้วจึงเตรียมสารสกัดส่วนต่างๆ ของกัญชงเป็น stock solution ความเข้มข้น 500 มก./มล. กรองด้วยหัวกรองฆ่าเชื้อขนาด 0.45 ไมโครเมตร เพื่อให้ stock solution ปราศจากเชื้อและนำไปทดสอบในขั้นตอนถัดไป⁽⁵⁾

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

เตรียมเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Klebsiella* sp., *Acinetobacter* spp. และ *Vibrio cholerae* โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Nutrient agar (NA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาทำการละลายเซลล์ด้วย 1XPBS แล้ววัดความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland standard No. 0.5 โดยวัดค่า OD ที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ 0.1 จะมีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml)⁽⁵⁾

การศึกษาผลของสารสกัดหยาดของดอก ลำต้นและใบกัญชงต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการละลายเซลล์ใน 1XPBS มาศึกษาผลของสารสกัดต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion โดยใช้ไม้ปั่นสำลีปลอดเชื้อชุบสารละลายเซลล์ของแบคทีเรียที่เตรียมไว้แล้วเกลี่ยให้ทั่วบนอาหาร Muller Hinton agar (MHA) หลังจากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มม. ด้วย Cork borer No.7 แล้วเติมสารสกัดสกัดหยาดของดอก ใบ และลำต้นของกัญชง ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร และในแต่ละจานทดลองจะมี Tetracycline ความเข้มข้น 0.015 มก./มล. เป็น positive control และ 10% DMSO และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็น negative control แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

24 ชั่วโมง ทำการตรวจวัดผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (Inhibition zone) มิลลิเมตร โดยวัดคร่อมหลุมในแนว 3 ระนาบ ในแต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ⁽⁵⁾

การทดสอบหาค่าเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ Minimal Inhibitor Concentration (MIC) และการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของสารสกัดโดยวิธี Broth Macro dilution test⁽⁶⁾

เตรียมสารสกัดหยาบของดอก ลำต้น และใบกัญชงความเข้มข้นต่างๆ โดยเตรียมหลอด micro-centrifuge tube ปลอดเชื้อจำนวน 11 หลอด ใส่อาหารเหลว MHB ทุกหลอดหลอดละ 0.7 มิลลิลิตร ใช้ automatic pipettes ดูดสารสกัดหยาบของกัญชงส่วนต่างๆ ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดที่ 1 ผสมสารสกัดหยาบของดอก ใบ และลำต้นของกัญชงกับอาหารให้เข้ากันดีแล้วดูออกมา 0.7 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดที่ 2 ทำ two-fold dilution ให้มีความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8, 3.9, 1.95, 0.975, 0.488 และ 0.244 มก./มล. จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียให้เท่ากับ McFarland standard no. 0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) แล้ว dilute 1:2000 ด้วย MHB แล้วใส่สารสกัดหยาบของดอก ใบ และลำต้นของกัญชงความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วปราศจากเชื้อขนาด 12x75 มิลลิเมตร จากนั้นใส่เชื้อที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร ลงไปผสมเชื้อกับสารสกัดสมุนไพรให้เข้ากัน สารสกัดหยาบของดอก ลำต้นและใบกัญชงก็จะมี

เข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.195, 0.098, 0.0488 และ 0.0244 มก./มล. โดยมี negative control เป็นอาหารเหลวกับเชื้อแบคทีเรีย และ positive control เป็นยา Tetracycline ความเข้มข้น 0.015 มก./มล. กับเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และอ่านผลโดยสังเกตความขุ่นของอาหารที่เกิดจากเชื้อเจริญ ค่า MIC คือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (อ่านผลหลอดสุดท้ายที่ใส คือไม่มีเชื้อเจริญให้เห็นด้วยตาเปล่า) จากนั้นนำหลอดที่ใสมา spread ลงบน MHA plate เพื่อดูว่า plate ไດไม่มีเชื้อขึ้นให้อ่านค่า MBC (Minimal Bactericidal Concentration) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์สถิติจากผลการสกัดหยาบของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์จาก ดอก ใบ และลำต้นของกัญชงความเข้มข้นที่ความความแตกต่างกัน โดยแต่ละสิ่งทดลอง (Treatment) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำมาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์ ใช้วิธีของดันแคน (Duncan's multiple range test: DMRT) โดยทดสอบค่าเฉลี่ยของกลุ่มต่างๆที่มีความแตกต่างทางสถิติในระดับความเชื่อมั่น 95% ($p=0.05$) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติสำเร็จรูป

ผลการวิจัย

ผลสกัดสารสกัดหยาบจากกัญชง

จากการสกัดสารสกัดกัญชง ลักษณะของสารสกัดหยาบของดอก และใบของกัญชงพบว่า

สารสกัดมีสีเขียวเข้มปนน้ำตาล มีความข้น และจับตัวกันเป็นก้อนเล็กน้อย ขณะที่ลักษณะของสารสกัดหยาบของลำต้นกัญชง ที่มีลักษณะเป็นสารหนืดสีเขียวอ่อน ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลการศึกษาสารสกัดจากกัญชงต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Agar well diffusion

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากดอก ใบ และลำต้นกัญชงในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ พบว่า สารสกัดหยาบจากดอก ใบ และลำต้นกัญชงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus*, *B. cereus* และ *B. subtilis* ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *V. Cholerae* และ *Acinetobacter* spp. แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Klebsiella* sp. โดยสังเกตได้จากค่าบริเวณใสในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 2 นอกจากนี้จะเห็นได้ว่า สารสกัดหยาบจากดอกกัญชงมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด โดยมีบริเวณใสเฉลี่ยเท่ากับ 8.00 (S.D.=0.00) มิลลิเมตร ถึง 33.00 (S.D.=5.00) มิลลิเมตร ขณะที่ไม่พบบริเวณใสในการยับยั้งเชื้อ *Klebsiella* sp. เท่ากับ 0.00 (S.D.=0.00) มิลลิเมตร

ผลการทดสอบหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของสารสกัดโดยวิธี Broth Macro dilution test

จากการวิเคราะห์หาค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากดอก ใบ และลำต้นของกัญชง

ต่อแบคทีเรียก่อโรค พบว่า ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากดอกของกัญชงในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *B. cereus* และ *B. subtilis* เท่ากับ 0.0244 มก./มล. ขณะที่ค่า MIC ของเชื้อ *V. cholerae* และ *Acinetobacter* spp. เท่ากับ 12.5 มก./มล. และ 50 มก./มล. ตามลำดับ สำหรับค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากใบของกัญชง ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *V. cholerae* และ *Acinetobacter* spp. เท่ากับ 0.0244, 6.25, 3.12, 12.5 และ 12.5 มก./มล. ตามลำดับ และ ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากลำต้นของกัญชงในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, และ *Acinetobacter* spp. เท่ากับ 50 มก./มล. ในขณะที่ค่า MIC ของ *B. subtilis* เท่ากับ 12.5 มก./มล. และ *V. cholerae* เท่ากับ 25 มก./มล. จะเห็นได้ว่า สารสกัดหยาบจากดอกของกัญชงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 3

จากการวิเคราะห์หาค่า MBC ของสารสกัดหยาบจากดอก ใบ และลำต้นของกัญชง ต่อแบคทีเรียก่อโรค พบว่า ค่า MBC ของสารสกัดหยาบจากดอกของกัญชงในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* เชื้อ *B. cereus* และเชื้อ *B. subtilis* เท่ากับ 0.0244 มก./มล. ในขณะที่เชื้อ *V. cholerae* และ *Acinetobacter* spp. เท่ากับ 50 มก./มล. สำหรับค่า MBC ของสารสกัดหยาบจากใบของกัญชงในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 0.0244 มก./มล. ส่วนเชื้อ *B. cereus* และเชื้อ *B. subtilis* เท่ากับ 6.25 มก./มล. ในขณะที่เชื้อ *V. cholerae* และ *Acinetobacter* spp. เท่ากับ 50 มก./มล. และ ค่า MBC

ของสารสกัดหยาบจากลำต้นของกัญชงในการฆ่าแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด เท่ากับ 50 มก./มล. ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดหยาบจากดอกของกัญชงมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดีที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 3

อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาสารสกัดหยาบจากกัญชงต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion การหาค่าความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ พบว่า ดอกกัญชงและใบกัญชงที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 95% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุด โดยจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าดอกกัญชงและใบกัญชงมีโซนยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 33.00 (S.D.=5.00) และ 18.00 (S.D.=0.00) มิลลิเมตร ตามลำดับ และมีค่า MIC คือ 0.0244 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC คือ 0.0244 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยการสกัดจากใบกัญชงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* และ *Enterococcus faecalis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽⁴⁾ เนื่องจากสาร Cannabinoid ที่มีอยู่ในสารสกัดของใบกัญชง สามารถผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ และยังสามารถทำลายโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งอาจส่งผลให้เซลล์ตายได้ในที่สุด โดยสารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่สกัดจากกัญชง ได้แก่ cannabidiolic acid (CBDA) และ cannabidiol (CBD) มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้⁽⁷⁾ จากผลการทดลองในตาราง 2 ผลการทดสอบ

สารสกัดหยาบจากดอก ใบ และลำต้นของกัญชงต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่า สารสกัดหยาบจากกัญชงมีบริเวณใสในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมากกว่าเอทานอลมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 5.00 ถึง 33.00 มิลลิเมตรขณะที่เอทานอลมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.00 มิลลิเมตร แสดงถึงการใช้อีทานอลในการสกัดสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ไม่มีผลต่อการทดลองเนื่องจากกระบวนการสกัดสารผ่านเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนเหวี่ยง ซึ่งมีคุณสมบัติในการระเหยสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ออกจากสารสกัดได้มากที่สุด และคงเหลือแค่สารสกัดหยาบเท่านั้น⁽⁸⁾ นอกจากนี้การทดสอบสารสกัดหยาบของดอกกัญชงมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. cereus* และ *B. subtilis* ได้ดีโดยมีโซนยับยั้งเท่ากับ 18.00 ± 0.00 มิลลิเมตร มีค่า MIC คือ 0.0244 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC คือ 0.0244 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับผลงานวิจัยพบน้ำมันหอมระเหยจากช่อดอกกัญชง สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* และ *B. subtilis*⁽⁹⁾ นอกจากนี้มีผลรายงานสารสกัดจากเส้นใยกัญชงสามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* (MRSA) และ *S. epidermidis* ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ และยังพบว่าบริเวณ trichome ของดอกกัญชงสามารถพบสาร cannabidiol (CBD) ได้ในปริมาณมาก ซึ่งสาร cannabidiol (CBD) มีบทบาทสำคัญในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽¹⁰⁾ อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนของกัญชง มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบโดยเชื้อ *V. cholerae* และ *Acinetobacter* spp. โดยมีโซนยับยั้งอยู่

ระหว่างเฉลี่ยเท่ากับ 5.00 (S.D.=0.00) ถึง 12.33 (S.D.=1.15) มิลลิเมตร มีค่า MIC อยู่ระหว่าง คือ 50 ถึง 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Klebsiella* sp. โดยมีโซนยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 0.00 (S.D.=0.00) และมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับผลการรายงานการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากกัญชงไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* แต่สามารถยับยั้งเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* ได้เล็กน้อย⁽¹⁰⁾ และสารสกัดจากกัญชงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. cholerae* ได้⁽¹¹⁾ ดังนั้นจะเห็นได้ว่า สารสกัดหยาบจากกัญชงแต่ละส่วนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยสารสกัดจากกัญชงสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีความซับซ้อนน้อยกว่าแบคทีเรียแกรมลบ⁽¹²⁾ จากผลการทดลองเห็นได้ว่า สารสกัดหยาบจากกัญชงแต่ละส่วนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยสารสกัดหยาบจากดอกกัญชง มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบบางชนิด ในขณะที่ใบกัญชง และลำต้นกัญชง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรครองลงมาตามลำดับ โดยปริมาณสารสำคัญกลุ่ม cannabinoid ซึ่งพบในพืชตระกูล *Cannabis* นั้นขึ้นอยู่กับส่วนต่างๆ ของพืช โดยส่วนดอกจะเป็นบริเวณที่พบสารสำคัญได้มากที่สุด ในส่วนของ ใบ และลำต้น มีปริมาณสารสำคัญรองลงมาตามลำดับ ซึ่งมีสาเหตุมาจากการสืบพันธุ์และกระบวนการทางสรีรวิทยาในส่วนต่างๆ ของพืชกัญชง⁽¹³⁾

ยาต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งช่วยให้ระบบป้องกันของเราสามารถต่อสู้กับการติดเชื้อได้ หรือสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยตรง ยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพกว้าง มีความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด โดยความทนต่อต้านเชื้อแบคทีเรียเกิดขึ้นเมื่อเชื้อแบคทีเรียมีพัฒนาการต้านการฆ่าโดยยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่เคยใช้ได้ผลกับเชื้อนั้น ซึ่งในปัจจุบันพบรายงานการดื้อยาต้านเชื้อแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาเมทิซิลลิน (MRSA)⁽¹⁴⁾ จึงทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องค้นหาสารใหม่ที่สามารถใช้เป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งสารสกัดหยาบจากกัญชง มีประโยชน์ในการต้านกับเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาต้านเชื้อแบคทีเรียทั่วไป และช่วยลดภาวะการดื้อยาในเชื้อแบคทีเรียที่สามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ได้โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก⁽⁹⁾ จึงทำให้สารสกัดหยาบจากกัญชงที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลากหลายชนิดมีความสำคัญต่อมนุษย์ อย่างไรก็ตามการวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับสารสกัดหยาบจากกัญชงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค รวมถึงศึกษาผลข้างเคียง ความปลอดภัย และวิธีการใช้ที่เหมาะสม ยังคงเป็นสิ่งที่จำเป็น

สรุปผลการวิจัย

การวิจัยเกี่ยวกับสารสกัดหยาบจากกัญชงแสดงให้เห็นฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โดยส่วนต่างๆ ของกัญชงประกอบไปด้วย ดอก ใบ และลำต้นของกัญชงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่แตกต่างกัน โดยพบว่าสารสกัดหยาบจากดอกของกัญชงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกมาก

ที่สุด และแบคทีเรียก่อโรคแกรมลบบางชนิด ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น ดอกกัญชงซึ่งเป็นพืชสมุนไพรจากธรรมชาติมีประโยชน์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และช่วยลดภาวะการดื้อยาในเชื้อแบคทีเรีย ทดแทนการใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะ อันจะมีประโยชน์ในด้านจุลชีววิทยาและการแพทย์ต่อไป

ข้อเสนอแนะทั่วไป

1. ควรศึกษาสารสกัดจากส่วนอื่นๆ ของและกัญชงเพิ่มเติม เช่น ราก เป็นต้น เพื่อเก็บเป็นข้อมูลในการศึกษาและพัฒนาต่อยอดในอนาคต
2. ควรทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในด้านอื่นๆ ด้วย เช่น ฤทธิ์การต้านการอักเสบ หรือฤทธิ์การฆ่าและไล่แมลง เป็นต้น
3. องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถนำไปใช้ในการรักษาหรือด้านจุลินทรีย์ได้โดยตรง จะต้องมีการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากกัญชง และทดสอบด้านอื่นๆ เพื่อความปลอดภัยในการนำไปใช้ประโยชน์ในผู้บริโภค

กิตติกรรมประกาศ

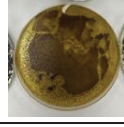
งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากโครงการสนับสนุนการจัดตั้งห้องเรียนวิทยาศาสตร์ในโรงเรียนโดยการกำกับดูแลของมหาวิทยาลัย (โครงการ วมว.) สนับสนุนโดยกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ขอขอบคุณกองพัฒนายาแผนไทยและสมุนไพรกรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้คำปรึกษาและสนับสนุนตัวอย่างกัญชง และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้อุปกรณ์และเครื่องมือ สถานที่ และอุปกรณ์

เอกสารอ้างอิง

1. รมลวรรณ เนื่องกันทา. ศักยภาพการผลิตพืชกัญชงบนพื้นที่สูงในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. มหาวิทยาลัยแม่โจ้; 2555.
2. ผกาทิพย์ รื่นระเรึงศักดิ์. กัญชากับการรักษาโรค. มหาวิทยาลัยมหิดล; 2562.
3. Tayyab M, Shahwar D. GCMS analysis of Cannabis sativa L. from four different areas of Pakistan. Egyptian J Forensic Sci. 2015; 5(3): 114–25.
4. Naveed M, Khan TA, Ali I, Hassan A, Ali H, Din ZU, et al. In vitro antibacterial activity of Cannabis sativa leaf extracts to some selective pathogenic bacterial strains. Int J Biosci. 2014; 4: 65–70.
5. Federica P, Vittoria B, Virginia B, Marco B, Stefania B, Lorenzo C. Cannabis sativa L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. Biomed Pharmacother. 2018.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition: proposed standard NCCLS document M38-A2 (ISBN 1-56238-469-4); Clinical and Laboratory

- Standards Institute. Wayne, Pennsylvania 19087, USA; 2008.
7. Martinenghi LD, Jönsson R, Lund T, Jenssen H. Isolation, purification, and antimicrobial Characterization of cannabidiolic acid and cannabidiol from *Cannabis sativa* L. *Biomolecules*. 2020; 10(6): 900.
 8. กาญจนา ศรีประเสริฐ. การควบคุมเชื้อโรคในเมล็ดพันธุ์ข้าวโดยการเคลือบด้วยสารอินทรีย์. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2551.
 9. Iseppi R, Brighenti V, Licata M, et al. Chemical characterization and evaluation of the antibacterial activity of essential oils from fibre-type *Cannabis sativa* L. (Hemp). *Molecules*. 2019; 24(12): 2302.
 10. Schofs L, Mónica S, Sergio B. The antimicrobial effect behind *Cannabis sativa*. *Pharmacology Res Perspect*. 2021; 9(2).
 11. Lone TA, Lone RA. Extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. plant and its potential antimicrobial activity. *Univ J Med Dent*. 2012; 1(4): 51-55.
 12. วชิรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, พชร กัมมารเจษฎากุล, อธิยา จันทรวิทยานุชิต.ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิด ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* ATCC 25922. *วารสาร มฉก.วิชาการ*. 2559; 38(19): 35-48.
 13. Hemphill JK, Turner JC, Mahlberg PG. Cannabinoid content of individual plant organs from different geographical strains of *Cannabis sativa* L. *J Nat Prod*. 1980; 43(1): 112-22.
 14. Farha MA, El-Halfawy OM, Gale RT, Macnair CR, Carfrae LA, Zhang X, et al. Uncovering the hidden antibiotic potential of cannabis. *ACS Infect Dis*. 2020; 6(3): 338-46.

ตารางที่ 1 พืชที่ใช้ในการศึกษาและลักษณะของสารสกัดหยาบ

ชื่อพืช	ส่วนที่ใช้ศึกษา	ลักษณะ crude ของสารสกัด	รูปลักษณะ crude ของสารสกัด
กัญชง	ดอก	สารหนืดสีเขียวเข้มปนน้ำตาล	
	ใบ	สารหนืดสีเขียวเข้มปนน้ำตาล	
	ลำต้น	สารหนืดสีเขียวอ่อน	

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาสารสกัดของกัญชง ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Agar well diffusion

สารสกัดพยับ	บริเวณใสในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มม.)					
	<i>Staphylococcus aureus</i> (Mean±S.D.)	<i>Bacillus cereus</i> (Mean±S.D.)	<i>Bacillus subtilis</i> (Mean±S.D.)	<i>Klebsiella</i> sp. (Mean±S.D.)	<i>Vibrio cholerae</i> (Mean±S.D.)	<i>Acinetobacter</i> spp. (Mean±S.D.)
ดอกกัญชง	33.00±5.00 ^a	18.00±0.00 ^b	18.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^c	8.00±0.00 ^b	12.33±1.15 ^b
ใบกัญชง	18.00±0.00 ^c	15.33±2.51 ^{cd}	8.00±0.00 ^{de}	0.00±0.00 ^c	5.33±0.57 ^b	7.33±0.57 ^c
ลำต้นกัญชง	11.00±0.00 ^d	8.33±1.52 ^e	8.00±0.00 ^{de}	0.00±0.00 ^c	5.00±0.00 ^b	11.66±1.15 ^b
Ethanol	1.00±0.00 ^s	1.00±0.00 ^f	1.00±0.00 ^s	1.00±0.00 ^c	1.00±0.00 ^c	1.00±0.00 ^e
DMSO	0.00±0.00 ^s	0.00±0.00 ^f	0.00±0.00 ^s	0.00±0.00 ^c	8.00±5.00 ^b	0.00±0.00 ^e
ยา	26.00±0.00 ^b	21.00±0.00 ^a	20.00±0.00 ^a	23.00±0.00 ^a	26.66±1.15 ^a	28.66±0.57 ^a

หมายเหตุ : positive control คือ tetracycline ความเข้มข้น 0.015 มก./มล. negative control คือ Ethanol 95% และ DMSO
: ^{a-s} คือ สัญลักษณ์แสดงความแตกต่าง โดยอักษรเหมือนกันจะไม่มี ความแตกต่างกันที่สำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากกัญชงที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากกัญชงที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC) ของสารสกัดโดยวิธี Broth Macro dilution test (หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

สารสกัดหยาบ	เชื้อแบคทีเรีย											
	Staphylococcus aureus			Bacillus cereus			Bacillus subtilis			Klebsiella sp.		
	MIC	MBC		MIC	MBC		MIC	MBC		MIC	MBC	
ดอกกัญชง	0.0244	0.0244	0.0244	0.0244	0.0244	0.0244	0.0244	0.0244	0.0244	50	12.5	50
ใบกัญชง	0.0244	0.0244	6.25	6.25	3.12	6.25	6.25	50	50	12.5	50	50
ลำต้นกัญชง	50	50	50	50	12.5	50	50	50	50	25	50	50

หมายเหตุ : MIC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้
MBC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้