

## กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคและการยับยั้งการสร้าง ไบโอฟิล์มของสารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญชง

รัชну เมยดวง<sup>1,2\*</sup> เสาวนิต ทองพิมพ์<sup>5</sup> จริญญา ประจันบาล<sup>1</sup> รัตน์สุภา ธรรมมาภรณ์<sup>3</sup>  
เกษม คงนรินทร์สุข<sup>2,4</sup> ปิณฑนา เลิศสถิตธนกร<sup>2,4</sup> และศิริพร ทิพย์สิงห์<sup>1</sup>

<sup>1</sup>สาขาวิชาจุลชีววิทยา <sup>2</sup>ศูนย์วิจัยกัญชา กัญชงและกระท่อมเพื่อการแพทย์ <sup>3</sup>สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม  
และ <sup>4</sup>สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา  
กรุงเทพฯ 10600; <sup>5</sup>ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

\*E-mail: ratchanu.me@bsru.ac.th

รับบทความ: 14 สิงหาคม 2563 แก้ไขบทความ: 21 พฤศจิกายน 2563 ยอมรับตีพิมพ์: 7 ธันวาคม 2563

### บทคัดย่อ

การเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียที่ดื้อยาปฏิชีวนะส่งผลเสียร้ายแรงต่อสุขภาพของมนุษย์ การศึกษาค้นคว้าหาสารจากธรรมชาติมาใช้ยับยั้งเชื้อดื้อยาจึงมีความสำคัญ ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพของเปลือกลำต้นกัญชง (*Cannabis sativa* L.) ในการยับยั้งการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ก่อโรค ผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกลำต้นกัญชงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Serratia marcescens* และ *Candida albicans* ผลที่น่าสนใจคือสารสกัดดังกล่าวไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกสกุล *Lactobacillus* spp. โดยในกลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกลำต้นกัญชงสามารถยับยั้ง *B. cereus* และ *Salmonella* Typhimurium ได้สูงสุด เมื่อศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ (minimum inhibitory concentration: MIC) พบว่ามีค่า MIC ของสารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญชงต่อแบคทีเรีย *B. cereus* และ *Salmonella* Typhimurium คือ ความเข้มข้น 0.625 และ 1.25 mg/mL ตามลำดับ เมื่อทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญชงที่ฆ่าเชื้อได้ (minimum bactericidal concentration: MBC) พบว่า สารสกัดมีค่า MBC ต่อแบคทีเรีย *B. cereus* และ *Salmonella* Typhimurium ที่ความเข้มข้น 1.25 และ 2.50 mg/mL ตามลำดับ นอกจากนี้ยังศึกษาความสามารถของสารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญชงต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่าสารสกัดนี้สามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *B. cereus* และ *Salmonella* Typhimurium ได้ร้อยละ 70.63 และร้อยละ 63.79 ตามลำดับ ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญชงในการใช้เป็นสารชีวภาพในการต้านจุลินทรีย์

คำสำคัญ: เฮมพ์ โพรไบโอติกส์ เชื้อก่อโรค ไบโอฟิล์ม

## Antimicrobial Activity and Antibiofilm Formation of *Cannabis sativa* L. Bark Extract

Ratchanu Meidong<sup>1,2\*</sup>, Saowanit Tongpim<sup>5</sup>, Jaran Prajanban<sup>1</sup>, Ratsupa Thammaporn<sup>3</sup>,  
Kasem Kongnirundonsuk<sup>2,4</sup>, Pилanthana Lertsatitthanakorn<sup>2,4</sup> and Siriporn Tipsing<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Microbiology, <sup>2</sup>Cannabis, Hemp and, Kratom Research Center, <sup>3</sup>Division of Industrial Chemistry, and <sup>4</sup>Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok 10600, Thailand; <sup>5</sup>Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand  
\*E-mail: ratchanu.me@bsru.ac.th

Received: 14 August 2020 Revised: 21 November 2020 Accepted: 7 December 2020

### Abstract

The emergence of drug-resistant bacteria poses a serious threat to human health. Therefore, investigation of new natural substances for treating drug-resistant bacteria is important. This study aimed to investigate the potential use of hemp (*Cannabis sativa* L.) bark extract to inhibit growth and biofilm formation of some pathogens. It was found that the crude extract of hemp bark could inhibit growth of tested microbes including *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *S. enterica* serovar Typhi, *Serratia marcescens* and *Candida albicans*. Interestingly, the hemp bark extract showed no inhibitory effects on growth of probiotic *Lactobacillus* spp. Among the microorganisms tested, the hemp bark extract displayed the highest inhibitory effects on the growth of *B. cereus* and *Salmonella* Typhimurium. Therefore, the minimum inhibitory concentration (MIC) was further determined which resulted that the MIC of hemp bark extract against *B. cereus* and *Salmonella* Typhimurium were 0.625 and 1.25 mg/mL, respectively. In addition, the minimum bactericidal concentration (MBC) of hemp bark extract was also examined which resulted that the MBC of hemp bark extract against *B. cereus* and *Salmonella* Typhimurium were 1.25 and 2.50 mg/mL, respectively. The ability of hemp bark extract to inhibit bacterial biofilm formation was also investigated. It was found that the extract could reduce biofilm formation of *B. cereus* and *Salmonella* Typhimurium by 70.03% and 63.79%, respectively. The results from this study de-

monstrated the good potential of hemp bark extract to be employed as natural antimicrobial agents.

**Keywords:** Hemp, Probiotics, Pathogen, Biofilm

## บทนำ

ความปลอดภัยของอาหารเป็นเรื่องสำคัญเนื่องจากส่งผลต่อสุขภาพของประชาชน อีกทั้งโรคที่เกิดจากอาหารเป็นสาเหตุสำคัญของการเจ็บป่วยและเสียชีวิตของคน ซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมทั่วโลก เชื้อโรคที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ เช่น *Bacillus cereus* *Salmonella* spp. พบรายงานการปนเปื้อนอยู่ในอาหารที่รับประทานทั่วไป เช่น ผัก ข้าว นํ้านมและผลิตภัณฑ์นม เส้นก๋วยเตี๋ยว สมุนไพร ไข่ เนื้อไก่ เนื้อหมู (Bunpatanasak and Siriyota, 2019; Fogelet *et al.*, 2018) อาหารที่ปนเปื้อนแบคทีเรีย *B. cereus* สามารถทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษชนิดท้องร่วงและชนิดอาเจียน (Park *et al.*, 2019) ส่วนอาหารที่ปนเปื้อน *Salmonella* spp. อาจทำให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหาร ส่งผลให้มีอาการท้องเสียและมีไข้ (Bonardi, 2017) แบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษหลายชนิดสามารถสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ซึ่งไบโอฟิล์มที่เชื้อสร้างขึ้นทำให้เซลล์ของเชื้อก่อโรคสามารถเกาะติดกับพื้นผิวของสิ่งต่าง ๆ ได้ดี การสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียมีอิทธิพลจากหลายปัจจัย เช่น ชนิดของเชื้อ ลักษณะของพื้นผิว รวมถึงอุณหภูมิและความชื้น (Hayrapetyan *et al.*, 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคทีเรียก่อโรคที่สร้างไบโอฟิล์มนั้นสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและสารเคมีได้ดี ส่งผลให้การใช้ยาและสารเคมีเพื่อการกำจัดเชื้อก่อโรคที่สร้างไบโอฟิล์มมีประสิทธิภาพลดลง (Kaur *et al.*, 2018) ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการ

ศึกษาสารที่นำมาใช้ในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคและลดการสร้างไบโอฟิล์ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่นำมาใช้ต้องมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เช่น การใช้แบคทีเรียโอซิน (Kim *et al.*, 2019; Reda, 2019) และสารที่สกัดได้จากพืชชนิดต่าง ๆ เช่น พืชตระกูลส้ม (Tsiraki and Savvaidis, 2016) ขมิ้นชัน ขิง กระเทียม มะกรูด ฟ้าทะลายโจร กะเพรา และทองพันชั่ง (Nonwachai and Duangkaew, 2016) ว่านหางจระเข้ (Elisha *et al.*, 2017) จากเมล็ดกัญชง (Frassinetti *et al.*, 2020)

กัญชง (*Cannabis sativa* L.) เป็นพืชที่ให้เส้นใยที่มีคุณภาพ เนื่องจากเป็นเส้นใยที่เหนียวนุ่ม ให้ความอบอุ่นได้ดี และดูดซับความชื้นได้ดี อีกทั้งได้ถูกนำไปศึกษาเพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตกระดาษ สิ่งทอหรือวัสดุชีวภาพเพื่อใช้งานด้านต่าง ๆ (Wang *et al.*, 2007) โดยส่วนเปลือกแห้ง แกนลำต้นแห้ง เส้นใยแห้ง และผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากเปลือกแห้ง และเส้นใยกัญชงไม่จัดเป็นยาเสพติดให้โทษประเภท 5 อ้างอิงตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2562 ในราชกิจจานุเบกษาเล่ม 136 ตอนพิเศษ 218 ง ลงวันที่ 30 สิงหาคม 2562 มีรายงานผลการศึกษาพบว่าพืชหลายชนิด เช่น ว่านหางจระเข้ ขมิ้นชัน ขิง กระเทียม มะกรูด ฟ้าทะลายโจร กะเพรา ทองพันชั่ง (Elisha *et al.*, 2017; Nonwachai and Duangkaew, 2016) เป็นแหล่งของสารประกอบทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ ดังนั้นในปัจจุบันสารสกัดจากพืชจึงได้รับความสนใจ

นำมาประยุกต์ใช้การยับยั้งจุลินทรีย์เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ เนื่องจากมีรายงานว่าในปัจจุบันยาปฏิชีวนะทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้คนและความยุ่งยากในด้านการรักษา (Ben *et al.*, 2019; Manyi-Loh *et al.*, 2018) จากปัญหาดังกล่าว การศึกษาและค้นคว้าสารสกัดจากธรรมชาติชนิดใหม่จึงมีความสำคัญ อีกทั้งมีรายงานว่ามีการนำส่วนต่าง ๆ ของกัญชงมาศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์เนื่องจากสารที่สกัดได้มี cannabidiol (CBD) เป็นองค์ประกอบ (Tayyab and Shahwar, 2015) ซึ่งสารประกอบนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิด Frassinetti *et al.* (2020) รายงานประสิทธิภาพสารสกัดจากเมล็ดกัญชงในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* รวมถึงสารสกัดจากใบกัญชงสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* และ *Enterococcus faecalis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Naveed *et al.*, 2014)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญชงต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญชงต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *B. cereus* และ *S. enterica* serovar Typhimurium

### วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างเปลือกลำต้นกัญชงและการสกัด

เปลือกแห้งลำต้นกัญชงที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ชื้อมาจากกลุ่มผ้าทอใยกัญชง บ้านใหม่ยอดคีรี อำเภอพบพระ จังหวัดตาก ก่อนเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัด นำเปลือกต้นกัญชงมาทำ

ให้สะอาดโดยแช่ในน้ำกลั่นให้ท่วมเป็นเวลา 10 นาที 3 ครั้ง จากนั้นอบให้แห้งโดยใช้ตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และตัดลดขนาดเปลือกต้นกัญชงให้เป็นชิ้นเล็ก (ภาพที่ 1ก) บั่นให้ละเอียดนำไปสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.9 (Merck, Germany) โดยใช้เปลือกลำต้นกัญชงปริมาณ 1 กรัม ต่อเอทานอล 100 mL บ่มแบบเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สกัดซ้ำจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นรวมสารสกัดที่ได้นำไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator (IKA, Germany) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเก็บสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบในขั้นตอนถัดไป (Pellati *et al.*, 2018)

การตรวจสอบกิจกรรมของสารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญชงต่อการยับยั้งจุลินทรีย์

นำสารสกัดเปลือกลำต้นกัญชงมาศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. enterica* serovar Typhimurium, *S. enterica* serovar Typhi และ *Serratia marcescens* แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. cereus*, *Staphylococcus aureus* และ methicillin-resistant *S. aureus* (MSRA) และแบคทีเรียโปรโตติคัส ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* BL60a, *L. plantarum* TISTR 8014 และ *L. casei* TISTR 389 ราที่ใช้ทดสอบคือ *Aspergillus niger* และ *Rhizopus oryzae* และยีสต์ที่ใช้คือ *Candida albicans* อาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์มีรายละเอียดดังนี้ แบคทีเรียก่อโรคลี้นในอาหาร Mueller Hinton (MH) broth (Himedia, India) แบคทีเรียโปรโตติคัสเลี้ยงในอาหาร de Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth (BioMérieux, France) ราเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose agar (Himedia, India) และยีสต์เลี้ยงในอาหาร Yeast

Malt agar ศึกษาสารสกัดจากเปลือกลำต้นกล้วยง ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ ด้วยวิธี agar well diffusion assay (Tipping *et al.*, 2019) โดยใช้สารสกัดหลังการระเหยแห้งที่ความเข้มข้น 10 mg/mL (เจือจางใน Dimethyl sulfoxide (DMSO), Sigma-Aldrich) ก่อนทดสอบปรับแบคทีเรียและยีสต์ให้มีความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  CFU/mL ส่วนเชื้อราเตรียมสปอร์และปรับสปอร์สำหรับใช้ทดสอบให้มีความเข้มข้น  $10^6$  spores/ mL จากนั้นใช้เชื้อก่อโรคแขวนลอยปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมนลงในอาหาร soft agar (0.75% agar) ผสมให้เข้ากันก่อนเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ปล่อยให้อาหารแข็งและเจาะหลุมให้มีขนาด 6 มิลลิเมตร และหยดสารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะไว้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยีสต์และราบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน และ 5 วัน ตามลำดับ ตรวจสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวัดจากโซนใสที่เกิดขึ้นหลังการบ่ม

การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (*minimum inhibitory concentration; MIC*)

การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *B. cereus* และ *Salmonella* Typhimurium ซึ่งเลือกให้เป็นตัวแทนแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ในการทดสอบนี้ โดยทั้งสองชนิดนี้เป็นเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยในอาหาร เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบใน MH broth บ่มในตู้บ่มแบบเขย่า (150 rpm) อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนปรับให้มีความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  CFU/mL เพื่อนำไปใช้ทดสอบต่อไป

หาค่า MIC ของสารสกัดจากเปลือกลำ

ต้นกล้วยงด้วยวิธี microdilution method ดัดแปลงจาก Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI] (2009) โดยเตรียมสารสกัดหยาบให้มีความเข้มข้น 20 mg/mL จากนั้นนำมาเจือจางลงครั้งละ 2 เท่า ด้วยอาหาร MH broth ใน 96-well microtiter plate (Nunc, Thermo Scientific, Denmark) ให้มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบอยู่ระหว่าง 0.019–10 mg/mL จากนั้นเติมเชื้อทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ได้ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ  $1 \times 10^6$  CFU/mL ลงในแต่ละหลุม ชุดควบคุมเติมเชื้อทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่มีเพียงอาหาร MHB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ตรวจสอบผลโดยใช้ microplate reader (SPECTROstar Nano, BGM LABTECH, Germany) สังเกตความใสของอาหารที่ไม่มีเชื้อเจริญเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อกับสารสกัดจากเปลือกลำต้นกล้วยง โดยความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียให้บันทึกผลการทดลองเป็นค่า MIC

การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (*minimum bactericidal concentration; MBC*)

หลังตรวจสอบค่า MIC แล้วนำมาตรวจสอบหาค่า MBC โดยใช้วิธี drop plate technique (CLSI, 2009) ด้วยการหยดอาหารในหลุมที่ทดสอบกับสารสกัดจากเปลือกลำต้นกล้วยงที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MH agar แล้วปล่อยให้แห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ตรวจสอบค่าความเข้มข้นน้อยที่สุด

ของสารสกัดที่ทำให้เชื้อทดสอบไม่สามารถเจริญสร้างโคโลนีบนอาหาร MH agar ได้ บันทึกค่าความเข้มข้นนั้นเป็นค่า MBC

*การตรวจสอบผลของสารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญชงต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรค*

การทดลองนี้เลือกสารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญชงที่ความเข้มข้น 0.313, 0.625 และ 1.25 mg/mL มาทดสอบเนื่องจากครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (MIC) โดยทดสอบตามวิธีของ Bag and Chattopadhyay (2017) เริ่มจากเลี้ยง *B. cereus* และ *Salmonella* Typhimurium ในอาหาร MH broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นปรับเชื้อแขวนลอยให้มีความขุ่น OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.08 (~1×10<sup>6</sup> CFU/mL) จากนั้นเติมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียแต่ละชนิดปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well microtiter plate แล้วจึงเติมสารสกัดหยาบจากเปลือกลำต้นกัญชงที่ความเข้มข้น 0.313, 0.625 และ 1.25 mg/mL ปริมาณ 100 ไมโครลิตร โดยชุดควบคุมเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนสารสกัดหยาบ นำไปบ่มแบบไม่เขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากบ่ม นำมาเทส่วนใสทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 3 ครั้ง เพื่อล้างเซลล์ที่ไม่เกาะกับพื้นผิวหลุมออกไป จากนั้นตั้งเซลล์ที่สามารถเกาะอยู่กับหลุมได้ด้วยเมทานอล (Merck, Germany) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร เป็นเวลา 15 นาที ทำให้แห้ง แล้วนำ microtiter plate มาย้อมด้วยสีคริสตัลไวโอเลต (ความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่ละลายในน้ำกลั่น) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นจนสีจางหายไป จากนั้นสกัดสีออกจากเซลล์โดยใช้

กรดอะซิติก (ความเข้มข้นร้อยละ 33 ที่ละลายในน้ำกลั่น) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และนำสารละลายสีนั้นไปวัดค่า A<sub>595</sub> ด้วยเครื่องอ่าน microplate reader นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาความสามารถของสารสกัดในการลดการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm reduction) ตามสมการที่ (1) –

$$\text{Biofilm reduction} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \text{ --- (1)}$$

*การวิเคราะห์ผลด้วยวิธีทางสถิติ*

การทดลองซ้ำ 3 ครั้งทุกการทดลอง และวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way analysis of variance: ANOVA) ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และ 99

#### ผลการทดลอง

*ผลของสารสกัดต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค*

จากการทดสอบสารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญชงต่อการยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ ด้วยวิธี agar well diffusion assay (ตาราง 1) พบว่าสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 10 mg/mL ไม่ยับยั้งการเจริญของรา *A. niger* และ *R. oryzae* และแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ที่ศึกษาทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *L. plantarum* BL60a, *L. plantarum* TISTR 8014 และ *L. casei* TISTR 389 แต่สารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญชงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ MRSA และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Typhi และ *S. marcescens* รวมถึงสามารถยับยั้งยีสต์ *C. albicans* โดยสารสกัดหยาบจากเปลือก

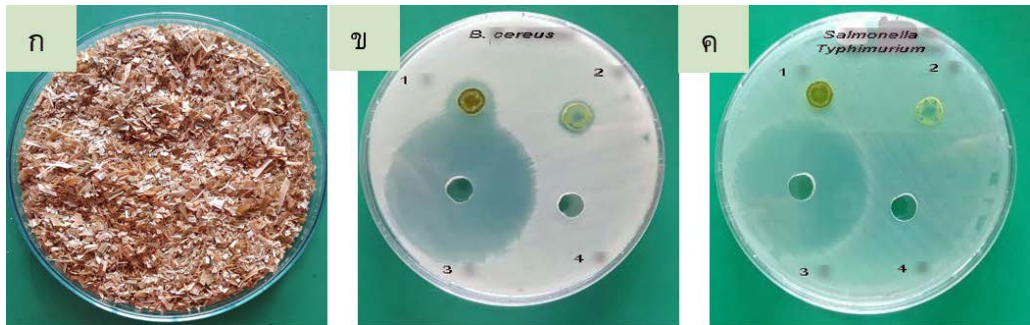
ลำต้นกล้วยซึ่งแสดงประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* (ให้บริเวณใสกว้าง  $47.83 \pm 1.25$  mm) และแบคทีเรียแกรมลบ *Salmonella Typhimurium* (ให้บริเวณใสกว้าง  $41.46 \pm$

$2.15$  mm) ( $p < 0.01$ ) ดังในภาพที่ 1ข และ 1ค ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียก่อโรคทั้งสองชนิดไปทดสอบในการทดลองถัดไป

ตาราง 1 ผลของสารสกัดหยาบเปลือกลำต้นกล้วย (10 mg/mL) ในการยับยั้งจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา	บริเวณใสในการยับยั้ง (mm) <sup>a</sup>	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา	บริเวณใสในการยับยั้ง (mm) <sup>a</sup>
แบคทีเรีย		โพรไบโอติกส์	
<i>Escherichia coli</i>	$37.86^{de} \pm 1.02$	<i>L. plantarum</i> BL60a	$0.00^a \pm 0.00$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$27.66^c \pm 0.57$	<i>L. plantarum</i> TISTR 8014	$0.00^a \pm 0.00$
<i>Salmonella Typhimurium</i>	$41.46^{fg} \pm 2.15$	<i>L. casei</i> TISTR 389	$0.00^a \pm 0.00$
<i>Salmonella Typhi</i>	$39.23^{ef} \pm 1.08$	ยีสต์และรา	
<i>Bacillus cereus</i>	$47.83^g \pm 1.25$	<i>Candida albicans</i>	$35.95^d \pm 0.93$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$42.66^h \pm 0.57$	<i>Aspergillus niger</i>	$0.00^a \pm 0.00$
MRSA	$39.0^{ef} \pm 0.95$	<i>Rhizopus oryzae</i>	$0.00^a \pm 0.00$
<i>Serratia marcescens</i>	$17.66^b \pm 0.57$		

<sup>a</sup>ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหนือค่าเฉลี่ยแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 99



ภาพที่ 1 (ก) เปลือกลำต้นกล้วยหลังอบแห้ง และการทดสอบยับยั้ง (ข) *B. cereus* และ (ค) *Salmonella Typhimurium* ด้วยสารสกัดจากเปลือกลำต้นกล้วย โดยหลุมที่ 1 ใส่สารหลังสกัดด้วยเอทานอล, หลุมที่ 2 ใส่สารหลังสกัดด้วยเอทานอลและเจือจาง 10 เท่า, หลุมที่ 3 ใส่สารสกัดหลังผ่านการระเหยแห้ง (10 mg/mL) และหลุมที่ 4 ใส่สาร DMSO

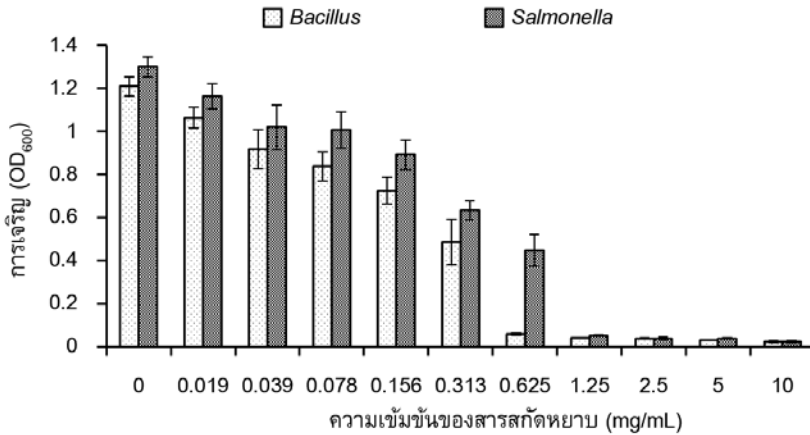
ผลการทดสอบหาค่า MIC และ MBC

จากการวิเคราะห์ค่า MIC ของสารสกัดจากเปลือกลำต้นกล้วยต่อเชื้อก่อโรค (ภาพที่ 2) พบว่า ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากเปลือกลำ-

ต้นกล้วยในการยับยั้ง *B. cereus* และ *Salmonella Typhimurium* คือ  $0.625$  mg/mL และ  $1.25$  mg/mL ตามลำดับ และเมื่อตรวจสอบค่า MBC พบว่าของสารสกัดหยาบมีค่า MBC ในการทำ-

ลาย *B. cereus* และ *Salmonella* Typhimurium ที่ความเข้มข้น 1.25 mg/mL และ 2.5 mg/mL ตามลำดับ ผลที่ได้จากการทดลองนี้พบว่าสารสกัด

หยาบจากเปลือกลำต้นกล้วยงมีประสิทธิภาพในการฆ่าแบคทีเรีย *B. cereus* ได้ดีกว่าการฆ่าแบคทีเรีย *Salmonella* Typhimurium

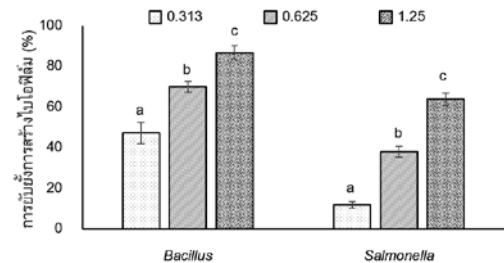


ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกลำต้นกล้วยงในการยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* และ *Salmonella* Typhimurium

ผลของสารสกัดจากเปลือกลำต้นกล้วยงต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรค

จากผลของสารสกัดหยาบจากเปลือกลำต้นกล้วยงในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรค (ภาพที่ 3) พบว่า สารสกัดหยาบจากเปลือกลำต้นกล้วยงที่ความเข้มข้น 0.313, 0.625 และ 1.25 mg/mL ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *B. cereus* ที่ร้อยละ 47.22, 70.03 และ 86.67 ตามลำดับ โดยค่า MIC ของสารสกัดจากเปลือกลำต้นกล้วยงต่อ *B. cereus* (0.625 mg/mL) สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ถึงร้อยละ 70.03 ขณะที่สารสกัดหยาบจากเปลือกลำต้นกล้วยงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังกล่าวมีร้อยละของการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *Salmonella* Typhimurium ที่ 11.67, 38.01 และ 63.79 ตามลำดับ โดยค่า MIC ของสารสกัดจากเปลือกลำต้นกล้วยงต่อ *Salmonella* Typhimurium (1.25 mg/mL) สามารถ

ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ถึงร้อยละ 63.79



ภาพที่ 3 ผลของสารสกัดหยาบจากเปลือกลำต้นกล้วยงที่ความเข้มข้น 0.313, 0.625 และ 1.25 mg/mL ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแบคทีเรียชนิดเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95)

### อภิปรายผล

กล้วยงเป็นพืชที่มีประโยชน์หลายด้าน โดยเส้นใยของกล้วยงเป็นเส้นใยที่มีคุณภาพในการ



ทำสิ่งทอประเภทต่าง ๆ ักัญขงมีปริมาณสาร tetra hydrocannabinol (THC) ไม่เกินร้อยละ 0.2 จึงไม่มีฤทธิ์ต่อระบบประสาท อีกทั้งจากการวิเคราะห์ ส่วนของใบและเมล็ดของกัญขงพบว่า มีสาร CBD (Tayyab and Shahwar, 2015) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิด (Frassinetti *et al.*, 2020; Naveed *et al.*, 2014) ในงานวิจัยนี้ได้นำส่วนของเปลือก ลำต้นกัญขงซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ใช่ยาเสพติดและไม่ต้องขออนุญาตครอบครองมาศึกษาทั้งในด้าน ประโยชน์คือการยับยั้งและทำลายเชื้อก่อโรค รวมถึงการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรคเพื่อเป็นข้อมูลของสารสกัดจากธรรมชาติอีก แหล่งหนึ่งในการนำไปประยุกต์ใช้ยับยั้งจุลินทรีย์ ก่อโรคต่อไป

การศึกษานี้เริ่มต้นจากการทดสอบประสิทธิ ภาพของสารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญขงในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อก่อโรค ผลจากการ ศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกลำต้นกัญขงมีประสิทธิ ภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus*, *S. aureus* และ MRSA) และแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Typhi และ *S. marcescens*) รวมทั้งยีสต์ (*C. albicans*) แต่ไม่ยับยั้งราที่ใช้ทดสอบ อีกทั้งสารสกัดจากเปลือก ลำต้นกัญขงไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โพรไบโอติกส์กลุ่ม *Lactobacillus* spp. สอดคล้องกับ Naveed *et al.* (2014) ที่รายงานว่าสารสกัด จากใบกัญขงยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* และ *Enterococcus faecalis* และน้ำมันที่สกัดจากเมล็ดกัญขงสามารถยับยั้ง การเจริญของ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *B. subtilis*, *Micrococcus luteus*, *S. aureus* และยีสต์ *C. albicans* (Nafis *et al.*,

2019; Nissen *et al.*, 2010) และ Frassinetti *et al.* (2020) ที่รายงานว่าน้ำมันที่สกัดจากเมล็ดกัญขง ยับยั้ง *S. aureus* และ *En. faecalis* แต่ไม่มีผล ต่อการยับยั้งการเจริญของโพรไบโอติกส์ในกลุ่ม *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. สารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญขงมีฤทธิ์ที่ดีในการ ยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ใช้ทดสอบทั้งแบคทีเรียและ ยีสต์ และไม่ส่งผลในการยับยั้งเชื้อที่ดีต่อสุขภาพ มนุษย์และสัตว์ นั่นคือแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ (*L. plantarum* BL60a, *L. plantarum* TISTR 8014 และ *L. casei* TISTR 389) จากผลการศึกษา นี้ทำให้ทราบฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญขงมีศักยภาพนำไปต่อยอดในการวิจัยและพัฒนา โดยเฉพาะในอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ เนื่องจากมีสมบัติในการทำละลายเชื้อก่อโรคได้สูงแต่ไม่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่เป็นประโยชน์ต่อ สุขภาพ

*B. cereus* และ *Salmonella* Typhimurium เป็นเชื้อก่อโรคที่ไวต่อสารสกัดจากเปลือกลำต้น กัญขงมากที่สุด โดยมีค่า MIC ของสารสกัด หยาบต่อ *B. cereus* และ *Salmonella* Typhimurium คือ 0.625 และ 1.25 mg/mL ตามลำดับ และมีค่า MBC ต่อ *B. cereus* ที่ 1.25 mg/mL มี ประสิทธิภาพสูงกว่าการฆ่า *Salmonella* Typhimurium ซึ่งมีค่า MBC ที่ 2.5 mg/mL ทั้งนี้ในงานวิจัยของ Frassinetti *et al.* (2020) พบว่าสาร สกัดจากเมล็ดกัญขงที่ทดสอบการยับยั้ง *E. coli*, *E. faecalis*, *Salmonella* sp. และ *S. aureus* มีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิจัยนี้พบว่าสารสกัดจากส่วนเมล็ดของ กัญขงมีสารที่มีประสิทธิ ภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคสูงกว่าเปลือกจากลำต้น รวมถึงสารสกัดจาก เปลือกลำต้นกัญขงมีประสิทธิ ภาพในการทำละลาย

แบคทีเรียก่อโรคได้เช่นเดียวกับแบคทีเรียโอซิน อาจเป็นแนวทางในการใช้สารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญชาร่วมกับแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อก่อโรคให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่น Bag and Chattopadhyay (2017) ที่ใช้แบคทีเรียโอซินร่วมกับสารประกอบสารฟีนอลิก (*p*-coumaric) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อก่อโรค

นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่อธิบายว่า *B. cereus* และ *Salmonella* sp. สามารถเกาะที่ผิวของอาหารหรือพื้นผิววัสดุในการเตรียมอาหารได้เนื่องจากความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม (Lequette *et al.* 2010) จากการทดลองนี้พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับค่า MIC สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *B. cereus* และ *Salmonella* Typhimurium ได้ถึงร้อยละ 70.03 และ ร้อยละ 63.79 ตามลำดับ จากรายงานของ Bag and Chattopadhyay (2017) พบว่าไนซินที่ค่า MIC ที่ 0.01 และ 0.02 mg/mL สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *B. cereus* และ *Salmonella* sp. ได้ถึงร้อยละ 25.64 และ 12.29 ตามลำดับ และ Frassinetti *et al.* (2020) รายงานว่าสารสกัดจากเมล็ดกัญชงที่ความเข้มข้น 0.5 mg/mL สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ได้

### สรุปผลการทดลอง

ปัจจุบันมีเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น จึงมีความจำเป็นในการหาสารใหม่ ๆ ที่สามารถทำลายเชื้อดื้อยาเหล่านั้น ในงานนี้มุ่งเน้นหาสารจากธรรมชาติเพื่อใช้ยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร สารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญชงมีความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และ

ยีสต์ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *B. cereus* และ *Salmonella* Typhimurium รวมถึงสารสกัดจากเปลือกลำต้นกัญชงยังมีข้อดีโดยไม่เป็นอันตรายต่อเชื้อโพรไบโอติกส์ซึ่งเป็นเชื้อที่ดีต่อสุขภาพมนุษย์และสัตว์ ซึ่งจะนำไปวิจัยประยุกต์ใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ร่วมกับสารสกัดกัญชงในการยับยั้งและทำลายเชื้อก่อโรคต่อไป

### เอกสารอ้างอิง

- Bag, A., and Chattopadhyay, R. R. (2017). Synergistic antibacterial and antibiofilm efficacy of nisin in combination with *p*-coumaric acid against food-borne bacteria *Bacillus cereus* and *Salmonella typhimurium*. **Letters in Applied Microbiology** 65(5): 366–372.
- Ben, Y., Fu, C., Hu, M., Liu, L., Hung, M., and Zheng, C. (2019). Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. **Environmental Research** 169: 483–493.
- Bonardi, S. (2017). *Salmonella* in the pork production chain and its impact on human health in the European Union. **Epidemiology and Infection** 145: 1513–1526.
- BunpatanasaK, S., and Siriyota, K. (2019). Bacterial pathogens causing food poisoning in health region 2 and Phichit Province in 2013–2017. **Journal of disease Prevention and Control** 6: 1–15. (in Thai)

- Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]. (2009). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard—Eighth Edition. CLSI Documents M07–A8**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute.
- Elisha, I. L., Botha, F. S., McGaw, L. J., and Eloff, J. N. (2017). The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 17(1): 1–10.
- Fogele, B., Granta, R., Valcina, O., and Berzinš, A. (2018). Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices and herbs. **Food Control** 83: 69–74.
- Frassinetti, S., Gabriele, M., Moccia, E., Longo, V., and Di, D. (2020). Antimicrobial and antibiofilm activity of *Cannabis sativa* L. seeds extract against *Staphylococcus aureus* and growth effects on probiotic *Lactobacillus*. **LWT – Food Science and Technology** 124: 109149.
- Hayrapetyan, H., Muller, L., Tempelaars, M., Abee, T., and Groot, M. N. (2015). Comparative analysis of biofilm formation by *Bacillus cereus* reference strains and undomesticated food isolates and the effect of free iron. **International Journal of Food Microbiology** 200: 72–79.
- Kaur, S., Sharma, P., Kalia, N., Singh, J., and Kaur, S. (2018). Anti-biofilm properties of the fecal probiotic lactobacilli against *Vibrio* spp. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 8: 120.
- Kim, N., Kim, W.J. and Kang, S. (2019). Anti-biofilm effect of crude bacteriocin derived from *Lactobacillus brevis* DF01 on *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. **Food Control** 98: 274–280.
- Lequette, Y., Boels, G., Clarisse, M., and Faille, C. (2010). Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food–industry. **Biofouling** 26: 421–431.
- Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., and Okoh, A. (2018). Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. **Molecules** 23(4): 1–48.
- Nafis, A. Kasrati, A., Jamali, C. A., Mezrioui, N., Setzer, W. Abbad, A., and Hassani, L. (2019). Antioxidant activity and evidence for synergism of *Cannabis sativa* (L.) essential oil with antimicrobial standards. **Industrial Crops and Products** 137: 396–400.
- Naveed, M., Khan, T.A., Ali, I., Hassan, A., Ali, H., Din, Z. U., Hassan, Z., Saqib, T. S., Majid, A., and Rehman, M.U. (2014). *In vitro* antibacterial activity of *Cannabis sativa* leaf extracts to some selective pathogenic bacterial strains. **International**

- Journal of Biosciences** 4: 65–70.
- Nissen, L., Zatta, A., Stefanini, I., Grandi, S., Sgorbati, B., Biavati, B., and Mo, A. (2010). Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). **Fitoterapia** 81: 413–419.
- Nonwachai, T., and Duangkaew, C. (2016). Effect of Thai herbs extracted on growth inhibition of *Aeromonas hydrophila*. **Khon Kaen Agriculture Journal** 44: 124–129.
- Park, E. J., Hussain, M. S., Wei, S., Kwon, M., and Oh, D.H. (2019). Genotypic and phenotypic characteristics of biofilm formation of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains. **Food Control** 96: 527–534.
- Pellati, F., Brighenti, V., Sperlea, J., Marchetti, L., Bertelli, D., and Benvenuti, S. (2018). New methods for the comprehensive analysis of bioactive compounds in *Cannabis sativa* L. (hemp). **Molecules** 23(10): 2639.
- Reda, F. M. (2019). Antibacterial and anti-adhesive efficiency of *Pediococcus acidilactici* against foodborne biofilm producer *Bacillus cereus* attached on different food processing surfaces. **Food Science and Biotechnology** 28(3): 841–850.
- Tayyab, M., and Shahwar, D. (2015). GCMS analysis of *Cannabis sativa* L. from four different areas of Pakistan. **Egyptian Journal of Forensic Sciences** 5(3): 114–125.
- Tipsing, S., Tongpim, S., and Meidong, R. (2019). Screening of bacteriocin-producing *Bacillus* against fish pathogens from fermented foods and preliminary characterization of the bacteriocin. **Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning** 10(1): 1–13. (in Thai)
- Tsiraki, M. I., and Savvaidis, I. N. (2016). The effects of citrus extract (Citrox©) on the naturally occurring microflora and inoculated pathogens, *Bacillus cereus* and *Salmonella enterica*, in a model food system and the traditional Greek yogurt-based salad Tzatziki. **Food Microbiology** 53: 150–155.
- Wang, B., Sain, M., and Oksman, K. (2007). Study of structural morphology of hemp fiber from the micro to the nanoscale. **Applied Composite Materials** 14: 89–103.