รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล

เรื่อง

องค์ประกอบทางเคมีและแอกทิวิตีทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ผึ้งจากผึ้งโพรง (*Apis cerana*) และชันโรง (*Tetragonula laeviceps*)

Chemical components and bioactivities of bee products from *Apis cerana* and *Tetragonula laeviceps*

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากมาจากการช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากนายกฤษฎิ์ จิรกาลวิศัลย์และนายจุฑากร ชาติไทย นิสิตภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนอุดหนุนการทำวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2555

เอกสาร
เลขทะเบียน 017629
วัน, เดือน, ปี 8 มี.ค. 61

1278999482

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคถือว่าอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ มนุษย์จึงพยายามหาสารปฏิชีวนะใหม่ๆ เพื่อต้านการเจริญของแบคทีเรียเหล่านั้นโดยเฉพาะจากผลิตภัณฑ์ตามธรรมชาติ เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะตัวเดิมเป็นเวลานานอันนำไปสู่การดื้อยาแล้ว ยังเป็นการลดรายจ่ายในการซื้อยาปฏิชีวนะอีกด้วย โดยงานวิจัยชิ้นนี้สนใจศึกษาน้ำผึ้งของชันโรงชนิด *Tetragonula laeviceps* โดยทำการเก็บน้ำผึ้งจากผึ้งดังกล่าวจากฟาร์มผึ้งในจังหวัดจันทบุรีในช่วงเดือนเมษายน 2553 นำน้ำผึ้ง 90 กรัม มาสกัดอย่างหยาบด้วย 96% EtOH และน้ำ นำมาทดสอบขั้นต้นด้วยวิธี paper disc diffusion method พบว่า สารสกัดอย่างหยาบของ EtOH มีสามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ส่วนสารสกัดจากน้ำไม่สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ จากนั้นนำสารสกัดอย่างหยาบของ EtOH มาวิเคราะห์แยกองค์ประกอบทางเคมีเพื่อหาสารออกฤทธิ์ในน้ำผึ้ง เริ่มจากการแยกกลุ่มของสารเบื้องต้นตามสภาพขั้ว โดยนำสารสกัดอย่างหยาบของ EtOH มาทำการแยกโดยใช้วิธีตามหลัก Bioassay-guided isolation ซึ่งทำการละลายอยู่ในชั้น 40% MeOH ไดคลอโรมีเทน และhexane โดยการทำ partition ด้วยกรวยแยก นำสารที่แยกได้ไปทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ methicillin resistant *S. aureus* (MRSA 20645 และ MRSA 20652) ด้วยวิธี Microbroth dilution assay พิจารณาผลจากค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และค่า Minimal Bactericidal Concentration (MBC) พบว่าสารสกัดในชั้นไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 10 และ 20 mg/mlและสารสกัดในชั้น hexane มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของ *M. luteus*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* ได้อย่างดี จึงเลือกสารสกัดทั้ง 2 ชนิดมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีต่อด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี โดยเลือกใช้ quick column chromatography แยกออกเป็นกลุ่มย่อยต่างๆ แล้วจึงนำมาทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์อีกครั้งด้วยวิธี microbroth dilution assay เช่นเดิม พบว่าไม่มีสารสกัดในกลุ่มใดเลยที่สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ จึงอาจสรุปได้ว่าฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ที่เลือกศึกษาต้องอาศัยองค์ประกอบทางเคมีหลายๆ ตัวอยู่ร่วมกันมาทำงานร่วมกัน

คำสำคัญ: *Tetragonula laeviceps*, จุลินทรีย์, น้ำผึ้งชันโรง, microbroth dilution assay, MIC

Abstract

Pathogenic bacteria are harmful to human health. Many researchers have tried to find a new antibiotic agent against the pathogenic microorganisms. A new agent should be from natural products in order to avoid drug resistance. To cut down the expense on antibiotic drugs is other advantage for using natural products. In this work, honey from stingless bee (*Trigona laeviceps*) was the interesting source. It was collected from an apiary in Chanthaburi province in April, 2010. 90 grams of the honey was extracted with 96% ethanol and water. Then, the activity was assayed by Paper disc diffusion method. The ethanol crude extract of honey showed the strong antimicrobial activity while the water crude extract performed none. In the second step, the ethanol crude extract was partitioned through their polarities by Bioassay-guided isolation method. The solvents used in this step were 40% methanol, dichloromethane and hexane. All parts were tested for their antimicrobial activities against *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and methicillin resistant *S. aureus* (MRSA 20645 and MRSA 20652) by Microbroth dilution assay. As the result of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bacterial Concentration (MBC) values, the dichloromethane part presented the highest antimicrobial activity against those mentioned isolates with the MIC and MBC at 10 and 20 mg/ml. Also, the hexane part could inhibit the growth of *M. luteus*, *P. aeruginosa*, and *E. coli* well. Therefore, the both parts were purified in the next step by quick column chromatography technique. From the technique, many fractions were collected. All of the fractions were determined in antimicrobial activities with Microbroth dilution assay again. The result indicaded that none of the fractions showed the active antimicrobial activity. In summary, the antimicrobial activity in this honey may be due to the combinations of antimicrobial agents with synergistic effects.

Keywords: *Tetrigonula leaviceps*, microorganism, stingless bee honey, microbroth dilution assay, MIC

สารบัญเรื่อง

	เลขที่หน้า
หน้าปก	1
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	8
บทนำ	9
วิธีดำเนินการวิจัย	11
ผลการวิจัย	15
อภิปราย / วิจารณ์ผลการทดลอง	28
สรุปผลการทดลอง	30
ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการทำวิจัยในขั้นต่อไป	30
เอกสารอ้างอิง	31
ประวัตินักวิจัย	33

สารบัญตาราง

	เลขที่หน้า
ตารางที่ 1	16
ตารางที่ 2	17
ตารางที่ 3	18
ตารางที่ 4	19
ตารางที่ 5	25
ตารางที่ 6	25
ตารางที่ 7	26
ตารางที่ 8	27

สารบัญภาพ

	เลขที่หน้า
ภาพที่ 1	17
ภาพที่ 2	20
ภาพที่ 3	20
ภาพที่ 4	21
ภาพที่ 5	21
ภาพที่ 6	22
ภาพที่ 7	22
ภาพที่ 8	23
ภาพที่ 9	23
ภาพที่ 10	24

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

Conc.	ความเข้มข้น
g	กรัม
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
mg	มิลลิกรัม
mM	มิลลิโมลาร์
ml	มิลลิลิตร
MRSA	methicillin resistant Staphylococcus aureus
OD	Optical Density
TLC	Thin Layer Chromatography
$^{\circ}C$	องศาเซลเซียส
µg	ไมโครกรัม
µl	ไมโครลิตร

บทนำ

จุลินทรีย์ถือเป็นอันตรายต่อชีวิตมนุษย์ ซึ่งมีผลทำให้มนุษย์ป่วยจนอาจอาการหนักถึงขั้นเสียชีวิตได้ โดย Robert Koch ศึกษาสาเหตุของโรคแอนแทรกซ์ที่เกิดกับวัวควายและติดต่อมาถึงคน จนสามารถแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ออกจากเลือดวัวที่ตายได้ และยังเป็นคนแรกที่รวบรวมข้อมูลและพิสูจน์ให้เห็นว่าจุลินทรีย์เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ [1] สำหรับวิธีการรักษานั้นก็จะใช้สารปฏิชีวนะในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อเหล่านั้น ซึ่งสารปฏิชีวนะนั้นมีการค้นพบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1929 โดย Alexander Fleming ได้สังเกตว่าแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ที่เลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานแก้วที่มีราปะปนด้วยจะเกิดบริเวณใส ซึ่งไม่มีแบคทีเรียเจริญเนื่องจากเชื้อราสร้างสารปฏิชีวนะไปยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย ต่อมาจึงพบว่าเชื้อรานั้นคือ *Penicillium* sp., Flemimg จึงเรียกสารปฏิชีวนะนี้ว่าเพนนิซิลลิน [1]

นอกจากนี้การกินสารปฏิชีวนะที่ไม่จำเป็นและการกินที่ไม่ถูกต้องจึงเกิดผลเสียได้และยังทำให้แบคทีเรียดื้อสารปฏิชีวนะง่ายขึ้นด้วย [2] ตัวอย่างที่พบเห็นได้ง่ายในประเทศไทย เช่น ผลการสำรวจการดื้อยาในโรงพยาบาลมหาราช นครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2548 นั้น พบเชื้อที่ทำให้เกิดอาการติดเชื้อเป็นหนองหลายชนิดดื้อยา โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β-lactam เช่น ยาในกลุ่มเพนนิซิลิน โดยเชื้อที่ดื้อยาได้แก่ เชื้อ methicilin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ซึ่งเป็นต้นเหตุให้เกิดโรคฝีหนองที่ผิวหนัง หรือแผลติดเชื้อบริเวณผิวหนัง [3] เชื้อ Ceftazidime – resistant *Enterobacter cloacae* (CREnC) ที่ดื้อต่อยาฉีด Ceftazidime จึงก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด [4]

MRSA คือ แบคทีเรีย *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ methicillin, *S. aureus* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่พบตามผิวหนังและเยื่อบุของร่างกาย เช่น ในรูจมูก โดยที่ไม่ก่อให้เกิดโรค แต่จากกลไกป้องกันตนเองหรือภูมิคุ้มกันของคนเราที่ต่ำลง และการมีบาดแผลที่ผิวหนัง เชื้อจะเข้าสู่ร่างกายและทำให้เกิดโรคได้หลายระบบ ซึ่งอาจทำให้เสียชีวิตได้ [5]

จากข้อมูลของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้รวบรวมเชื้อตามแบบแผนความไวของเชื้อแบคทีเรีย จากโรงพยาบาลศูนย์ และโรงพยาบาลทั่วไปทั่วประเทศกว่า 30 แห่ง ตั้งแต่ปี 2543 – 2548 พบเชื้อ MRSA มีความชุกร้อยละ 30 ในปี 2543 และเพิ่มขึ้นระหว่างร้อยละ 30 – 35 ในช่วง 5 ปี [6]

หลังจากนั้นเป็นต้นมาจึงมีวิจัยจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับการค้นหาสารปฏิชีวนะเพื่อนำมาต้านหรือชะลอการเจริญของแบคทีเรีย ยกตัวอย่างเช่น สารสกัดจากรากของ *Croton* zambesicus [2] สารสกัดจากพรอพอลิสของผึ้ง [7] สารสกัดจากพืชสมุนไพรในประเทศเม็กซิโก [8] เป็นต้น แต่ในโครงการวิจัยนี้สนใจฤทธิ์ดังกล่าวจากน้ำผึ้ง

นอกจากนั้นยังพบว่ามีการใช้น้ำผึ้งในการป้องกันการติดเชื้อตั้งแต่สมัย กรีกและอียิปต์โบราณ รวมถึงมีการใช้ในทางการแพทย์แผนโบราณมาเป็นระยะเวลานานแล้ว ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนั้นเป็นที่ทราบกันมานานกว่า 100 ปีแล้ว [9]

น้ำผึ้งนอกจากจะมีสารอาหาร วิตามินและแร่ธาตุต่างๆ แล้วยังมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic property) ใช้ในการรักษาบาดแผล โรคทางเดินอาหาร และใช้ในการรักษาอาการอักเสบของตาได้ด้วย [10] และผลการวิจัยจำนวนมากรายงานว่า มีจุลินทรีย์อย่างน้อย 80 ชนิด ถูกยับยั้งได้โดยน้ำผึ้ง [11,12]

ส่วนคุณสมบัติในการเป็นสารปฏิชีวนะต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของน้ำผึ้งประการแรกคือ มีความเป็นกรดสูง ประการที่สองคือ มีความสามารถในการดูดซับน้ำได้สูงหรือมีความเข้มข้นสูงนั้นเอง และประการสุดท้ายคือ มีองค์ประกอบของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ นอกเหนือจากประโยชน์ข้างต้นแล้ว ยังเป็นที่ยอมรับกันว่าน้ำผึ้งชันโรงมีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าน้ำผึ้งปกติด้วย [13]

ผึ้งในประเทศไทยนั้นมีมากมายหลายชนิด แต่ชันโรงหรือผึ้งจิ๋วเป็นที่รู้จักกันในวงแคบ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงชันโรง ได้แก่ น้ำผึ้งชันโรง ชันผึ้ง และเกสร น้ำผึ้งชันโรงสามารถจำหน่ายได้ในราคาค่อนข้างสูงกว่าน้ำผึ้งทั่วไป น้ำผึ้งชันโรงถูกจัดเป็นยาสมุนไพร เพราะมีคุณสมบัติในการบรรเทาอาการต่างๆ และรักษาโรคบางโรคในมนุษย์ได้ มีงานวิจัยในอเมริกาใต้และอเมริกากลาง ระบุว่าน้ำผึ้งชันโรงช่วยรักษาโรคกระเพาะและระบบทางเดินหายใจได้ น้ำผึ้งชันโรงประกอบไปด้วยน้ำผึ้งและชันผึ้ง ซึ่งหากวิเคราะห์คุณสมบัติของชันผึ้งจะพบว่ามีคุณสมบัติทางยาเช่นกัน กล่าวคือสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย รา และไวรัสได้ ดังนั้นการบริโภคน้ำผึ้งชันโรงจึงเสมือนได้รับประโยชน์หลายอย่างพร้อมกัน เพราะรวมประโยชน์ของน้ำผึ้งและชันผึ้งเข้าไว้ด้วยกันนั่นเอง [14]

งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาน้ำผึ้งจากชันโรง *T. laeviceps* เนื่องจากเป็นแมลงจำพวกผึ้งไม่มีเหล็กไน ทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อการเก็บตัวอย่างรวมทั้งเป็นแมลงพื้นเมืองของประเทศไทย ตลอดจนยังไม่ค่อยมีผู้ศึกษาองค์ประกอบของน้ำผึ้งชันโรงชนิดนี้นัก โดยนำน้ำผึ้งที่เก็บได้มาทำการสกัดอย่างหยาบด้วยEtOH และน้ำ แล้วศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดดังกล่าวตามหลักการ bioassay-guided isolation แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

เก็บน้ำผึ้งชันโรง *Tetragonula laeviceps* จากฟาร์มผึ้งที่ ตำบลวังแซ่ม อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี ในช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2553

การสกัดหยาบด้วย 96% EtOH และน้ำ

นำน้ำผึ้งมา 90 g แล้วทำการสกัดโดยใช้ 96% EtOH ปริมาตร 400 ml ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 15 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้มาปั่นตกตะกอนด้วย centrifuge ที่ 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แยกเก็บส่วนใสและนำส่วนตะกอนที่เหลือทั้งหมดมาสกัดซ้ำด้วย 96% EtOH ปริมาตร 100 ml ปั่นตกตะกอนและแยกเก็บส่วนใสที่ได้เพื่อนำมารวมกับส่วนใสที่แยกเก็บไว้ในการสกัดครั้งแรก ปริมาตรรวมจะเป็น 500 ml จากนั้นจึงแบ่งมา 200 ml และเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 mM ที่ pH 7.0 ไป 200 ml เพื่อจะทำเป็นสารสกัดด้วยน้ำ นำสารสกัดไปปั่นตกตะกอนด้วย centrifuge ที่ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และแยกเก็บส่วนใส นำส่วนใสทั้งจากสารสกัดด้วยEtOH และสารสกัดด้วยน้ำไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้สารเหลวข้นสีเหลือง เก็บสารไว้ในที่มืดในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 °C

การศึกษาองค์ประกอบของสารในน้ำผึ้ง

วิเคราะห์และแยกองค์ประกอบทางเคมีในน้ำผึ้งตามขั้นโรงหลัก bioassay-guided isolation เริ่มจากการแยกกลุ่มของสารเบื้องต้นตามความมีขั้ว โดยนำสารสกัด 96% EtOH ของน้ำผึ้งทั้งหมดมาทำละลายด้วย 80% MeOH จนเป็นสารละลายไม่เหนียว นำส่วนที่ละลายในชั้น 80% MeOH นี้มาทำ partition รวมกับ hexane แยกส่วนชั้น hexane ที่อยู่ด้านบนออกด้วยกรวยแยก จากนั้นนำชั้น 80% MeOH มาเติมน้ำปริมาตรเท่าตัวเพื่อทำให้เป็นสารละลาย 40% MeOH นำมาทำ partition รวมกับ CH_2Cl_2 แยกทั้งสองชั้น ออกจากกัน จากนั้นนำสารที่ได้ทั้งหมดจากชั้นต่างๆ ดังนี้ hexane, 40% MeOH และ CH_2Cl_2 มาระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator นำสารสกัดทั้งหมดที่ได้ คือ สารสกัดในชั้น hexane, 40% MeOH และ CH_2Cl_2 ไปทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี microbroth dilution assay เลือกเฉพาะต้านการเจริญของจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีต่อโดยใช้เทคนิคทางโครโมโตกราฟี โดยในเบื้องต้นจะใช้ quick column chromatography และเลือกตัวทำละลายที่ใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์โดยพิจารณาจากผลของ Thin Layer Chromatography (TLC) เพื่อแยกออกเป็นกลุ่มย่อย (ในขั้นตอนนี้เลือกใช้ TLC แทนการใช้ HPLC เนื่องจากจำนวนของตัวอย่างมีมากและเป็นเพียงการ screen เบื้องต้น ดังนั้นการทำ TLC จึงให้ผลเร็วกว่า โดยดูผลจากการแยกตัวของแถบและรูปแบบของแถบที่ได้จากแต่ละจุดของตัวอย่างบนแผ่น TLC แต่ทั้งนี้ Preparative HPLC และ Aml HPLC

ก็เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจ) นำกลุ่มของสารที่แยกได้ทั้งหมดจากคอลัมน์มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์อีกครั้ง ด้วยวิธี microbroth dilution assay เช่นเดิม

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อจุลินทรีย์ *Micrococcus luteus, Pseudomonas aeruginosa. Escherichia coli, Staphylococcus aureus* และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จำนวน 4 ไอโซเลต ด้วยกัน ได้แก่ MRSA 20645, MRSA 20646, MRSA 20651 และ MRSA 20652 ได้เชื้อตัวอย่างมาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial activity test)

paper disc diffusion method

เป็นการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญเบื้องต้น ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว LB broth โดยการลงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว LB broth แล้วเขย่าที่ 130 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °C จนกระทั่งมีค่า OD_{600} = 0.4-0.6 จากนั้น spread เชื้อในปริมาตร 200 µl บน agar plate ทิ้งไว้จนแห้ง แล้วทำการวางแผ่น paper disc หยดสารสกัดน้ำผึ้งชันโรงที่ได้ในความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0, 50, 100, 150 และ 200 mg/ml ลงบนแผ่น paper disc จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 วัน แล้วทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ (inhibition zone) ในแต่ละ agar plate ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

microbroth dilution assay

เป็นการทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จากสารสกัดน้ำผึ้ง กล่าวคือ ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว LB broth โดยบ่มเชื้อที่ 130 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °C ให้มีค่า OD_{600} = 0.3-0.5 จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำผึ้งชันโรงที่ทำการ serial dilution ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปใน 96-well plate ในปริมาตร 100 µl แล้วจึงปิเปตต์เชื้อแต่ละชนิดลงไปในปริมาตร 100 µl โดยมีกลุ่มควบคุมที่ใส่แต่อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว LB broth อย่างเดียวปริมาตร 200 µl และเชื้อจุลินทรีย์อย่างเดียวปริมาตร 200 µl จากนั้นจึงนำไปบ่มที่ 70 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 วัน แล้วทำการอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, abs) โดยใช้ microplate reader ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยการพิจารณาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และค่า Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ของสารสกัดที่ได้จากการแยกในแต่ละครั้งในเชื้อแต่ละชนิด ทั้งนี้ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัด

ในการทดลองมีขั้นตอนแบ่งออกเป็นข้อๆ ต่อเนื่องกันดังต่อไปนี้

การสกัดด้วย 96% EtOH (ethanol extract) และการสกัดด้วยน้ำ (water extract)

นำน้ำผึ้งซันโรงที่เก็บได้จากฟาร์มผึ้ง ต. วังแซ่ม อ. มะขาม จ. จันทบุรี ในช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2553 จำนวน 90 กรัม มาทำการสกัดโดยใช้ 96% EtOH ปริมาตร 400 ml ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 15 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้มาปั่นตกตะกอนด้วย centrifuge ที่ 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แยกเก็บส่วนใสและนำส่วนตะกอนที่เหลือทั้งหมดมาสกัดซ้ำด้วย 96% EtOH ปริมาตร 100 ml ปั่นตกตะกอนและแยกเก็บส่วนใสที่ได้เพื่อนำมารวมกับส่วนใสที่แยกเก็บไว้ในการสกัดครั้งแรก ปริมาตรรวมจะเป็น 500 ml จากนั้นจึงแบ่งมา 200 ml และเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 mM ที่ pH 7.0 ไป 200 ml เพื่อจะทำเป็นสารสกัดด้วยน้ำ นำสารสกัดไปปั่นตกตะกอนด้วย centrifuge ที่ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และแยกเก็บส่วนใส นำส่วนใสทั้งจากสารสกัดด้วย EtOH และสารสกัดด้วยน้ำไประเหยด้วยเครื่อง evaporator จะได้สารเหลวข้นสีเหลือง เก็บสารไว้ในที่มืด อุณหภูมิ -20 °C

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดน้ำผึ้งอย่างหยาบในข้อ 2.1

นำสารสกัดอย่างหยาบของน้ำผึ้งซันโรงที่ได้ในข้อ 2.1 มาทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของจุลินทรีย์ โดยที่ใช้ความเข้มข้นที่ 0, 64.5, 129,193.5 และ 258 mg/ml ตามลำดับ นำไปทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ spread ลงบน agar plate โดยปิเปตต์สารสกัดอย่างหยาบลงบนแผ่น paper disc ตามวิธี paper disc diffusion method ที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

เลือกสารสกัดอย่างหยาบที่ให้ผลการการทดลองที่ดีที่สุดคือมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด คือ สารสกัดอย่างหยาบจาก 96% EtOH และเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความไวต่อสารสกัดอย่างหยาบมาจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ *S. aureus*, MRSA 20645 และ MRSA 20652 มาทดสอบเพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่จะนำไปทดสอบขั้นต่อไปด้วยวิธี microbroth dilution assay โดยนำสารสกัดอย่างหยาบมาละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว LB broth เจือจางให้ได้มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 mg/ml ตามลำดับ นำไปทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลต ตามวิธี microbroth dilution assay ที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

การแยกกลุ่มของสารสกัดน้ำผึ้งซันโรงตามความมีขั้วโดยวิธีการทำ partition

การแยกกลุ่มของสารเบื้องต้นตามความมีขั้วโดยการทำ partition ด้วยกรวยแยก นำสารสกัดอย่างหยาบ 96% EtOH ของน้ำผึ้งซันโรงมาละลายด้วย 80% MeOH จนสารละลายไม่เหนียว จากนั้นเติม hexane ลงไปในปริมาตรเท่ากับ 80% MeOH ที่ใช้ไป กลุ่มสารที่ไม่มีขั้วจะแยกอยู่ในชั้น hexane ซึ่งจะลอยอยู่ทางด้านบน ในขณะที่กลุ่มสารมีขั้วมากกว่าจะละลายในชั้น 80% MeOH ซึ่งจะแยกชั้นอยู่ด้านล่าง แยกสารในชั้น hexane ทั้งหมดออก ส่วนสารละลายในชั้น 80% MeOH นั้นนำมาเติมน้ำลงไปปริมาตรเท่าที่มีอยู่ให้กลายเป็นชั้น 40% MeOH เพื่อเพิ่มความมีขั้วของสารละลายให้มากขึ้น จากนั้นเติม CH_2Cl_2

ลงไปเท่ากับปริมาตรที่มีอยู่ สารที่มีขั้วมากจะละลายอยู่ในชั้น 40% MeOH ซึ่งจะอยู่ด้านบน และสารที่มีขั้วปานกลางจะละลายอยู่ในชั้น CH_2Cl_2 ซึ่งจะอยู่ด้านล่าง แยกสารทั้งสองชั้นนี้ออกจากกันและนำไปสารชั้นต่างๆ ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ก็จะได้สารสกัดในชั้น hexane, CH_2Cl_2 และ 40% MeOH ซึ่งเป็นสารที่มีขั้วน้อย ขั้วปานกลาง และมีขั้วมาก ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดที่แยกได้ในชั้น hexane, CH_2Cl_2 และ 40% MeOH จากข้อ 2.3 (microbroth dilution assay #1)

นำสารสกัดที่แยกได้ในชั้น hexane, CH_2Cl_2 และ 40% MeOH มาละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว LB broth เจือจางให้ได้มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 mg/ml ตามลำดับ จากนั้นนำไปทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่เลือกศึกษาด้วยวิธี microbroth dilution assay เช่นเดิม พิจารณาหาค่า MIC และ MBC

การแยกสารจาก fraction hexane โดยวิธีการทำ quick column chromatography

เลือก fraction ที่ให้ผลในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดซึ่งคือ fraction CH_2Cl_2 และ fraction hexane นำมาทำการแยกสารออกฤทธิ์ให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้ quick column chromatography และเลือกชนิดของตัวทำละลายที่ใช้เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์โดยพิจารณาจากผลการทำ Thin Layer Chromatography (TLC) เพื่อแยกสารออกเป็นกลุ่มย่อย ผลที่ได้จากการทำ TLC และนำไปเป็นชนิดของตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน เริ่มจากสารละลายที่มีขั้วน้อยแล้วเพิ่มความมีขั้วของสารละลายให้มากขึ้นตามลำดับ 75% CH_2Cl_2-hexane, 100% CH_2Cl_2, 5% MeOH-CH_2Cl_2, 5% MeOH-CH_2Cl_2, 10% MeOH-CH_2Cl_2, 10% MeOH-CH_2Cl_2, 15% MeOH-CH_2Cl_2, 20% MeOH-CH_2Cl_2 และ 25% MeOH-CH_2Cl_2 ตามลำดับ วิธีการทำ quick column chromatography เริ่มจากการบรรจุ silica gel ลงในคอลัมน์ให้แน่น นำสารใน fraction CH_2Cl_2 และ fraction hexane ผสมกับ silica gel แล้วบรรจุลงในด้านบนของคอลัมน์ จากนั้นจึงชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายโดยเริ่มจากตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยจนถึงตัวทำละลายที่มีขั้วมากที่สุด ใช้ vacuum ช่วยในการดูดอากาศให้ตัวทำละลายถูกชะผ่านคอลัมน์ เก็บ fraction ที่ชะได้ทั้งหมดจากสารละลายที่มีขั้วต่างกัน นำสารที่เก็บได้ทุก fractions ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดที่แยกได้จาก fraction (microbroth dilution assay #2)

นำสารสกัดที่แยกได้ทุก fractions มาละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว LB broth เจือจางให้ได้มีความเข้มข้น 2.5, 5, 10 และ 20 mg/ml ตามลำดับ จากนั้นนำไปทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่เลือกศึกษาด้วยวิธี microbroth dilution assay เช่นเดิม พิจารณาหาค่า MIC และ MBC

ผลการวิจัย

ผลการสกัดน้ำผึ้งชันโรงด้วย 96% EtOH (ethanol extract) **และน้ำ** (water extract)

สารสกัดน้ำผึ้งชันโรงอย่างหยาบด้วย EtOH มีน้ำหนัก 13.49 g ปริมาตร 9 ml ดังนั้นสารสกัดน้ำผึ้งชันโรงอย่างหยาบด้วย EtOH จะมีความเข้มข้น 1.49 g/ml สารสกัดน้ำผึ้งชันโรงอย่างหยาบมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองใสและสารสกัดน้ำผึ้งชันโรงอย่างหยาบด้วยน้ำมีน้ำหนัก 11.09 g ปริมาตร 7.5 ml ดังนั้นสารสกัดน้ำผึ้งชันโรงอย่างหยาบด้วยน้ำจะมีความเข้มข้น 1.48 g/ml สารสกัดน้ำผึ้งชันโรงอย่างหยาบมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองใสเช่นเดียวกัน แต่มีความหนืดมากกว่าสารสกัดน้ำผึ้งชันโรงอย่างหยาบด้วย EtOH

ส่วนที่ 1 จาก *S. aureus* และ MRSA

ส่วนที่ 2 จาก *M. luteus, P. aeruginosa* และ *E. coli*

i17899482

ส่วนที่ 1 จาก *S. aureus* และ MRSA

1.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดน้ำผึ้งอย่างหยาบ

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดน้ำผึ้งชันโรงอย่างหยาบที่สกัดด้วย 96% EtOH และน้ำ ด้วยวิธี paper disc diffusion method ดังในตารางที่ 1

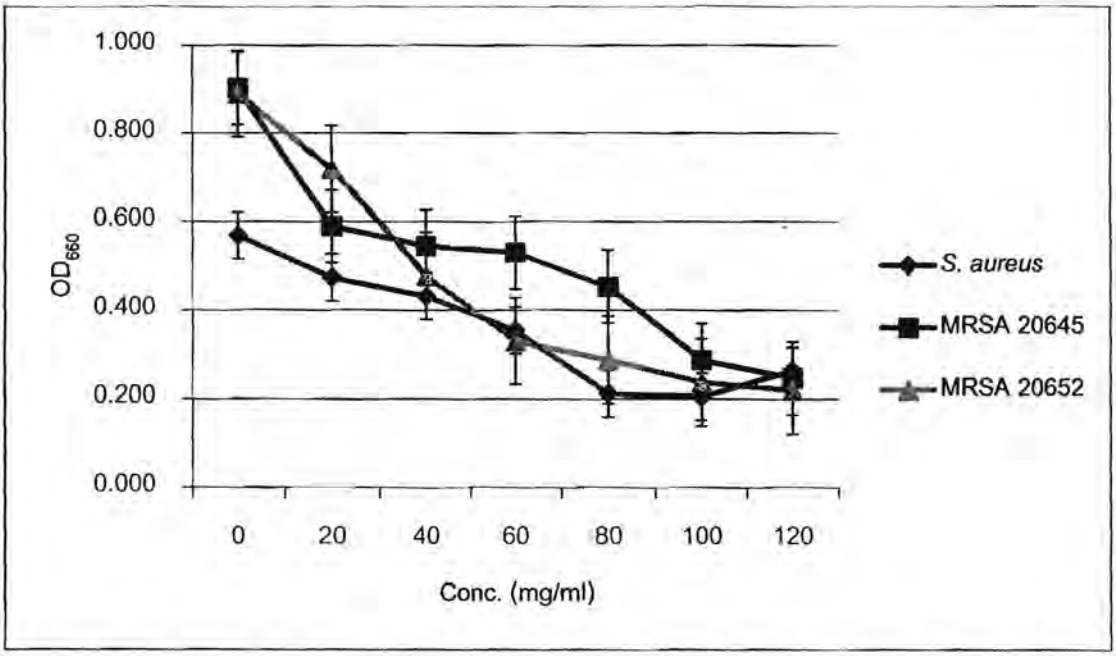
ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ (inhibition zone) ในหน่วยเซนติเมตร (mean ± S.D.) ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 ไอโซเลต จากสารสกัดอย่างหยาบจาก 96% EtOH

Conc. (mg/ml)	Isolate				
	S. aureus	MRSA 20645	MRSA 20646	MRSA 20651	MRSA 20652
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
64.5	1.60 ± 0.20	1.60 ± 0.05	1.48 ± 0.10	1.58 ± 0.13	1.70 ± 0.26
129	2.17 ± 0.21	2.20 ± 0.00	2.13 ± 0.32	2.17 ± 0.15	2.43 ± 0.13
193.5	2.33 ± 0.25	2.60 ± 0.10	2.53 ± 0.25	2.33 ± 0.15	2.63 ± 0.15
258	2.62 ± 0.24	2.83 ± 0.06	2.70 ± 0.20	2.60 ± 0.00	2.80 ± 0.20

หมายเหตุ: กลุ่มควบคุม ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแทนสารสกัดจากน้ำผึ้ง ในการทดลองส่วนนี้ ไม่ได้นำตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ มาทดสอบเป็นตัวควบคุมด้วย เนื่องจากสารสกัดที่ได้ ถูกทำระเหยให้ตัวทำละลายอินทรีย์เหล่านี้ระเหยออกไปหมดแล้ว

ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 5 ไอโซเลต ของสารสกัดน้ำผึ้งชันโรงอย่างหยาบที่สกัดด้วยน้ำ พบว่าสารสกัดหยาบจากน้ำไม่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 ไอโซเลต จากการพิจารณาค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ในตารางที่ 1 จึงเลือก *S. aureus*, MRSA 20645 และ MRSA 20652 มาเพื่อทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลต ได้แก่ *S. aureus*, MRSA 20645 และ MRSA 20652 ของสารสกัดน้ำผึ้งชันโรงอย่างหยาบที่สกัดด้วย 96% EtOH ด้วยวิธี microbroth dilution assay (เลือกใช้วิธีนี้แทนการทำ agar well diffusion assay เนื่องจากการทำ microbroth dilution assay สามารถใช้ตัวอย่างจำนวนมากได้ จึงใช้เวลาน้อยกว่าและใช้ปริมาณสารสกัดน้อยกว่า จึงเป็นการประหยัดสาร) ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง (absorbance, abs) ที่วัดได้ที่ช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากการทำ microbroth dilution assay ของสารสกัดน้ำผึ้งชันโรงอย่างหยาบจาก 96% EtOH ต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลต

1.2 ผลการแยกกลุ่มสารที่อยู่ในน้ำผึ้งชันโรงที่สกัดอย่างหยาบตามความมีขั้วโดยวิธีการทำ partition ด้วยกรวยแยก

การแยกสารเบื้องต้นตามความมีขั้วของสารโดยการทำ partition ด้วยกรวยแยกสามารถแยกสารได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะของสารที่แยกได้จากการทำ partition ด้วยกรวยแยก

ตัวทำละลาย	ระดับความมีขั้วของตัวทำละลาย	ลักษณะของสารที่แยกได้
Hexane	ต่ำ	ของเหลวใส
CH_2Cl_2	ปานกลาง	ของเหลวสีเหลืองใส
40% MeOH	สูง	ของเหลวเหนียวสีเหลืองใส

1.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารที่แยกได้ในชั้น hexane, CH_2Cl_2 **และ** 40% MeOH (microbroth dilution assay #1)

ในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการทำ microbroth dilution assay ของสารสกัดน้ำผึ้งซันโรงหลังทำการแบ่งกลุ่มสารตามความมีขั้วด้วยกรวยแยก เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่วัดได้ที่ช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วสามารถพิจารณาค่า MIC และ MBC (mg/ml) ของสารในแต่ละตัวทำละลาย 3 กลุ่มที่แยกได้ในเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลต ดังในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่า MIC และ MBC ในเชื้อจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลต ของสารสกัดที่ได้จากการทำ partition ด้วยกรวยแยก ในแต่ละกลุ่มของตัวทำละลาย

Isolates	MIC (mg/ml)			MBC (mg/ml)		
	Hexane	CH_2Cl_2	40% MeOH	Hexane	CH_2Cl_2	40% MeOH
S. aureus	-	20	20	-	20	>120
MRSA 20645	-	10	20	-	20	>120
MRSA 20652	-	10	20	-	20	> 120
Negative control	0	0	0	0	0	0

หมายเหตุ: Negative control ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแทนสารสกัดต่างๆ

1.4 ผลการแยกสารจาก fraction CH_2Cl_2 โดยวิธีการทำ quick column chromatography

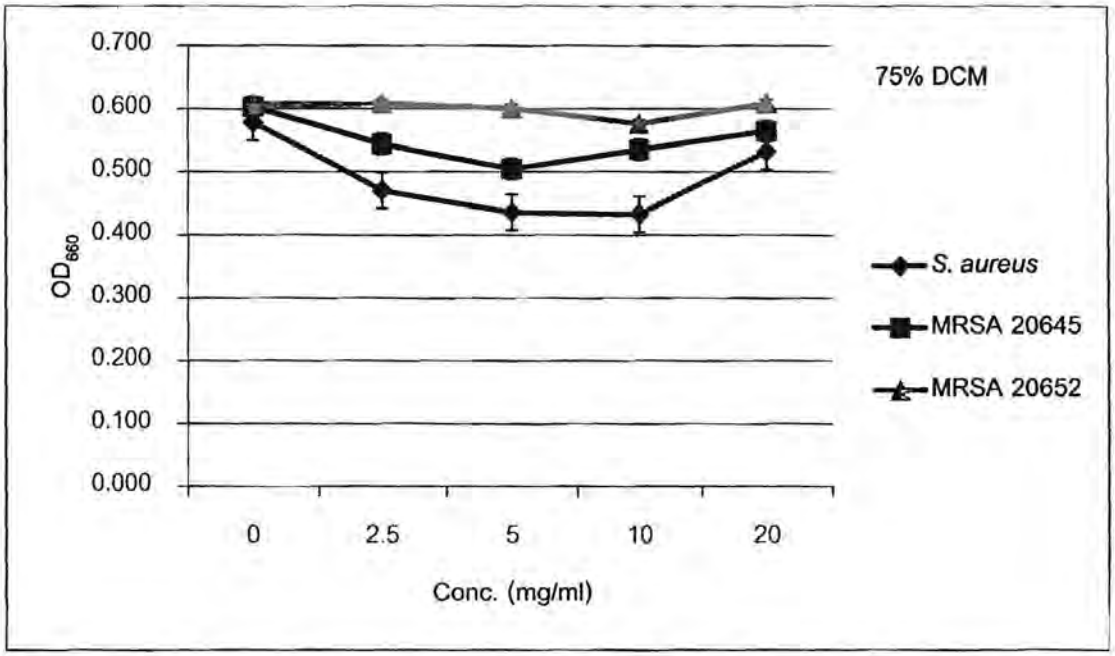
การแยกสารจาก fraction CH_2Cl_2 ซึ่งเป็น fraction ที่ให้ผลดีที่สุดในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (MIC และ MBC ต่ำที่สุด) โดยการทำ quick column chromatography สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 9 กลุ่มด้วยกัน ซึ่งมีชื่อเรียกแต่ละกลุ่ม และคุณลักษณะของสารในแต่ละกลุ่มดังในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะของสารที่แยกได้จาก quick column chromatography ในแต่ละกลุ่ม

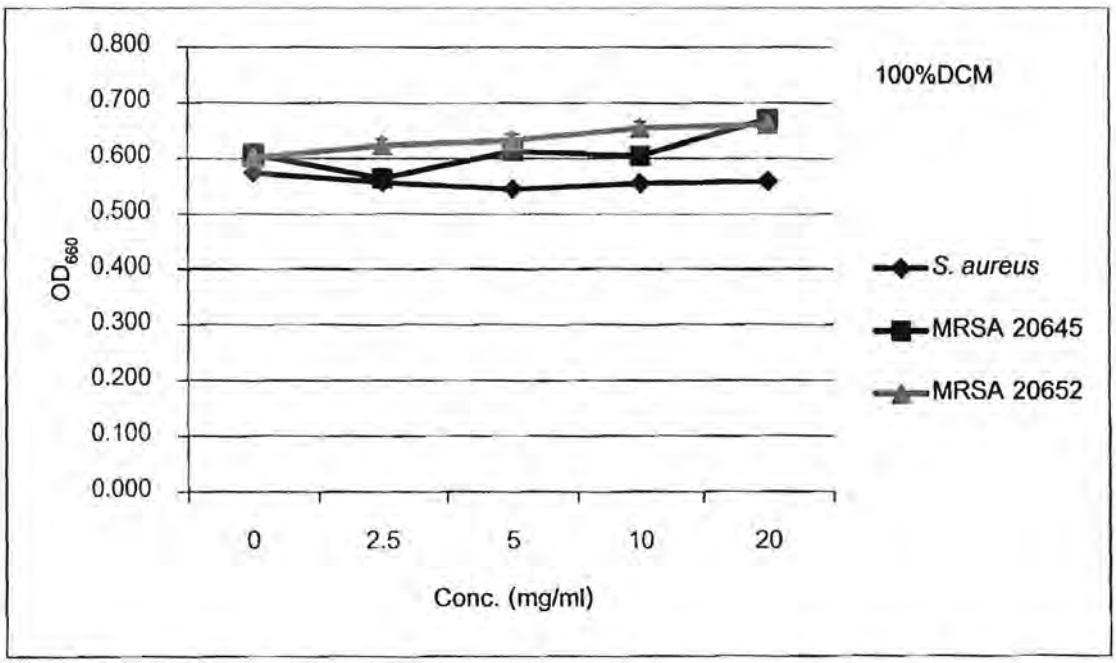
กลุ่มสาร	ลักษณะของสารที่แยกได้
1. 75% CH_2Cl_2-hexane (75% DCM)	ของเหลวใส
2. 100% CH_2Cl_2 (100% DCM)	ของเหลวใสสีเหลืองอ่อน
3. 5% MeOH-CH_2Cl_2 (5% MET1)	ของเหลวใสสีเหลือง
4. 5% MeOH-CH_2Cl_2 (5% MET2)	ของเหลวใสสีเหลือง
5. 10% MeOH-CH_2Cl_2 (10% MET1)	ของเหลวใสสีเหลืองเข้ม
6. 10% MeOH-CH_2Cl_2 (10% MET2)	ของเหลวใสสีเหลืองเข้ม
7. 15% MeOH-CH_2Cl_2 (15%MET)	ของเหลวใสสีเหลืองเข้ม
8. 20% MeOH-CH_2Cl_2 (20%MET)	ของเหลวใสสีเหลืองเข้ม
9. 25% MeOH-CH_2Cl_2(25%MET)	ของเหลวใสสีเหลืองเข้ม

1.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารที่แยกได้จาก fraction CH_2Cl_2 (microbroth dilution assay #2)

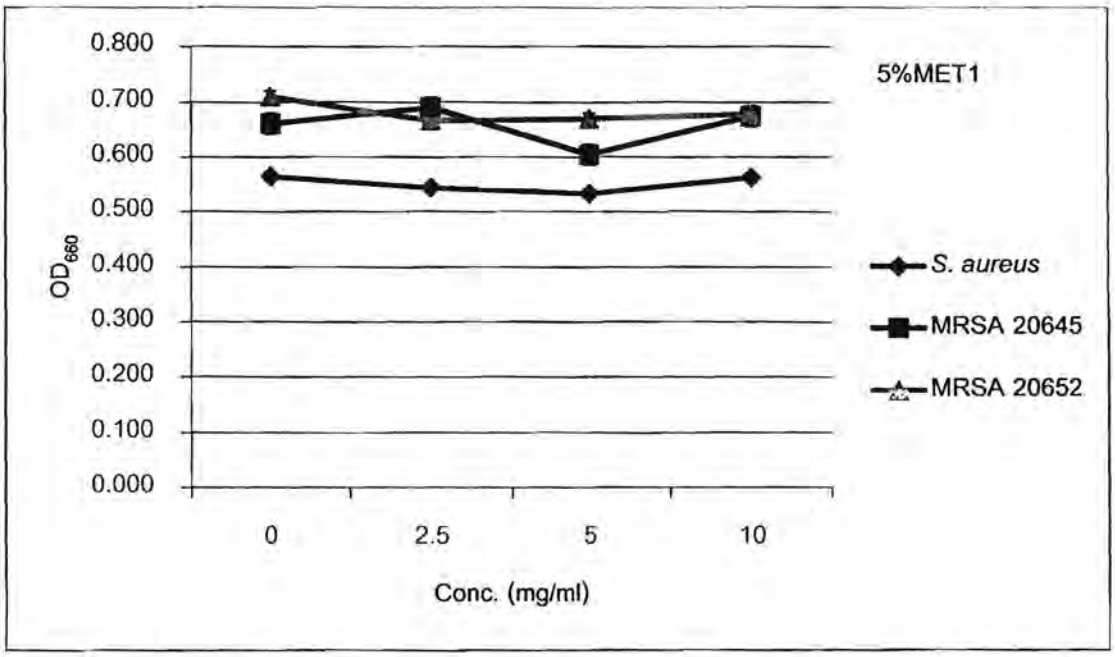
ในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการทำ microbroth dilution assay ของสารสกัดน้ำผึ้งชันโรงหลังทำการแยกจาก fraction CH_2Cl_2 โดยการทำ quick column chromatography ซึ่งได้สารทั้งหมด 9 กลุ่ม และสารแต่ละกลุ่มที่แยกได้จาก fraction CH_2Cl_2 สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในเชื้อแต่ละไอโซเลต ดังแสดงในภาพที่ 2-10 ดังต่อไปนี้



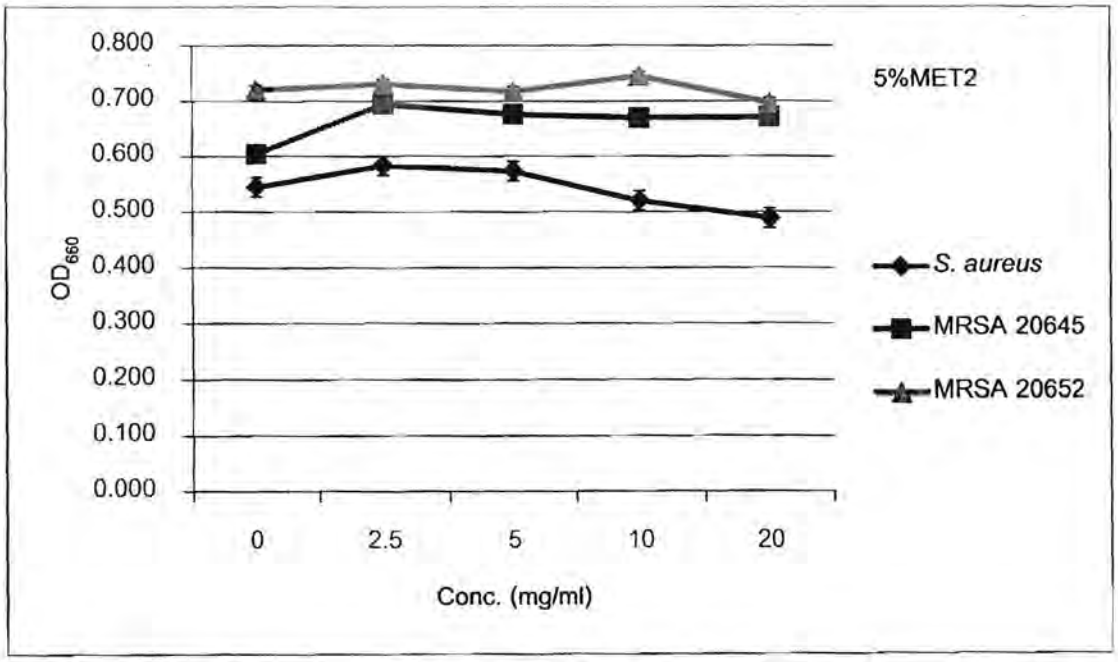
ภาพที่ 2 แสดงค่า abs ที่ช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากการทำ microbroth dilution assay ของสารสกัด fraction ที่ 1 (75% CH_2Cl_2-hexane) ต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลต



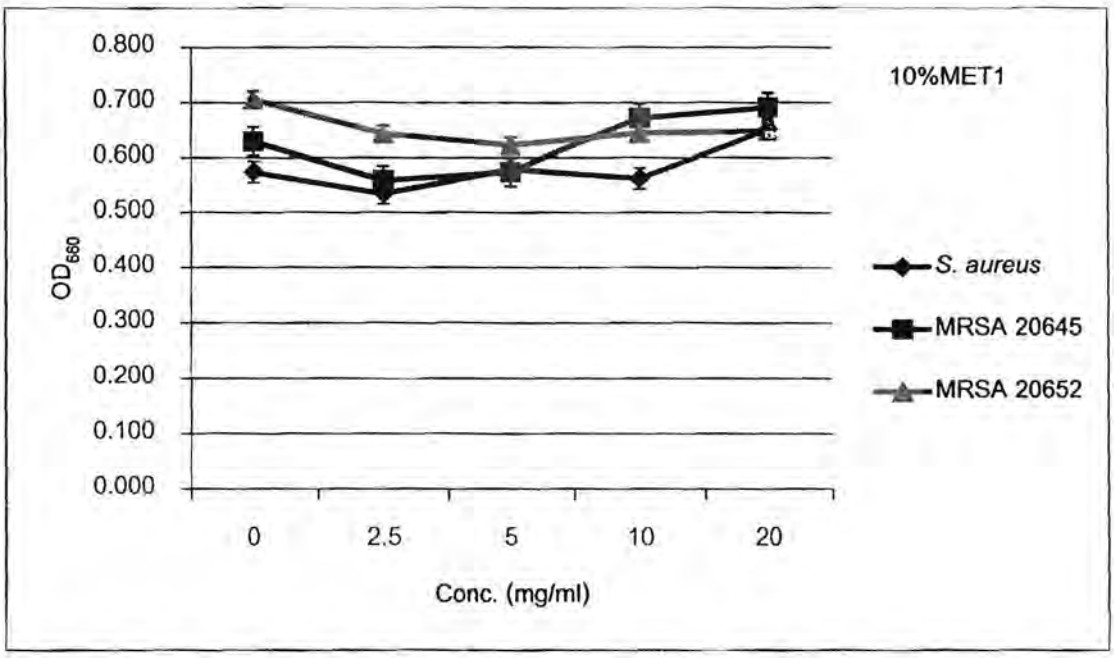
ภาพที่ 3 แสดง abs ที่ช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากการทำ microbroth dilution assay ของสารสกัด fraction ที่ 2 (100% CH_2Cl_2) ต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลต



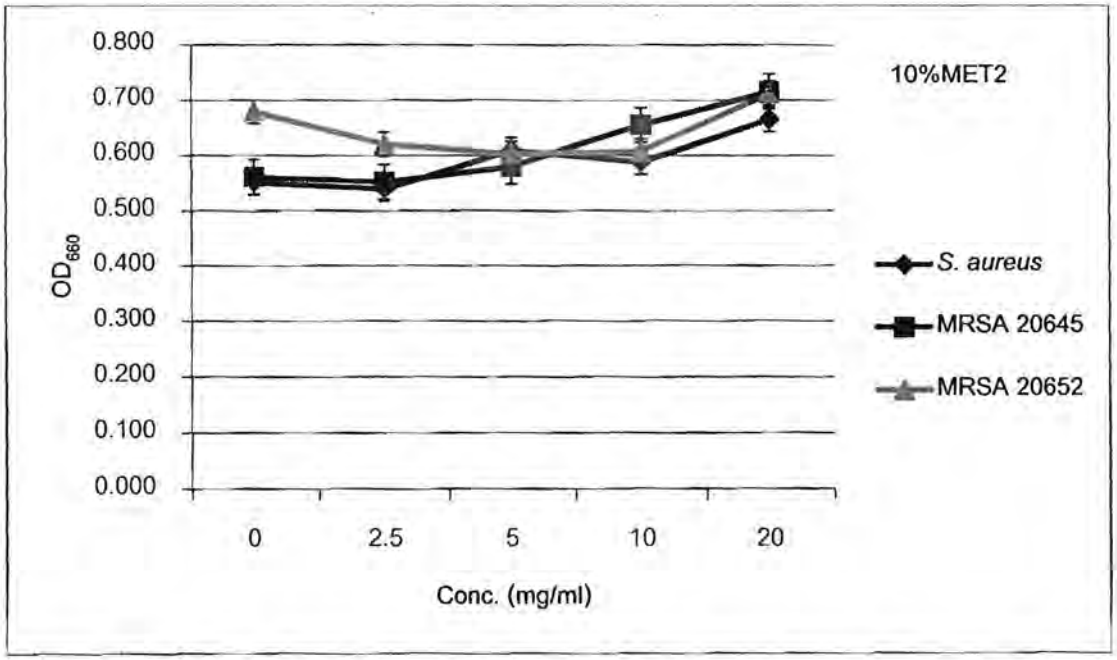
ภาพที่ 4 แสดงค่า abs ที่ช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากการทำ microbroth dilution assay ของสารสกัด fraction ที่ 3 (5% MeOH-CH_2Cl_2) ต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลต



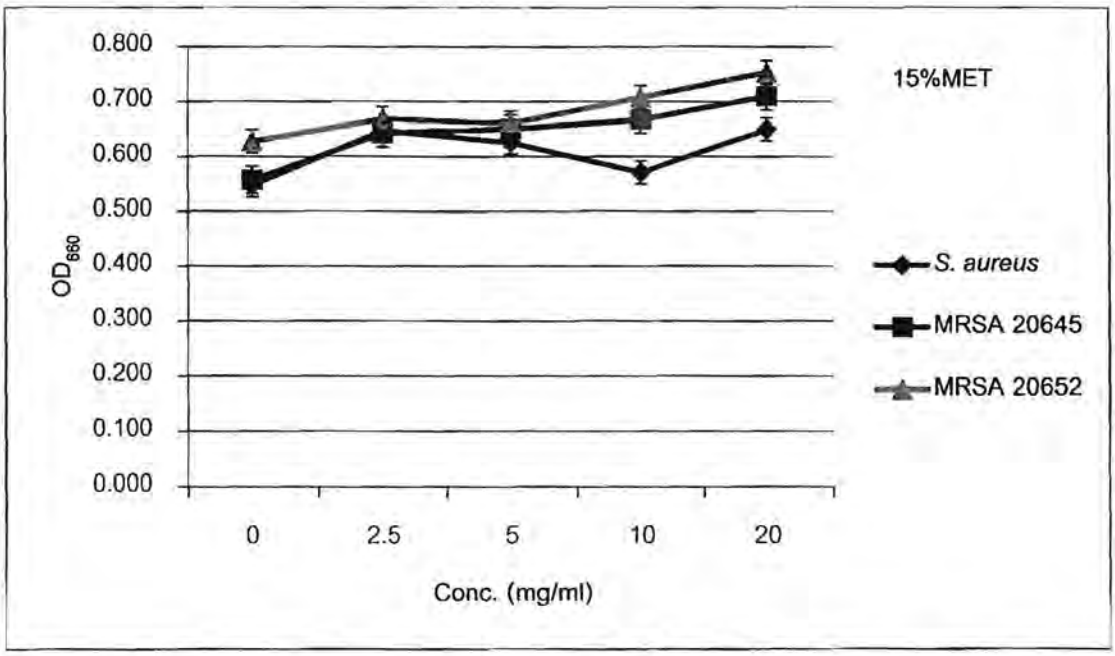
ภาพที่ 5 แสดงค่า abs ที่ช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากการทำ microbroth dilution assay ของสารสกัด fraction ที่ 4 (5% MeOH-CH_2Cl_2) ต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลต



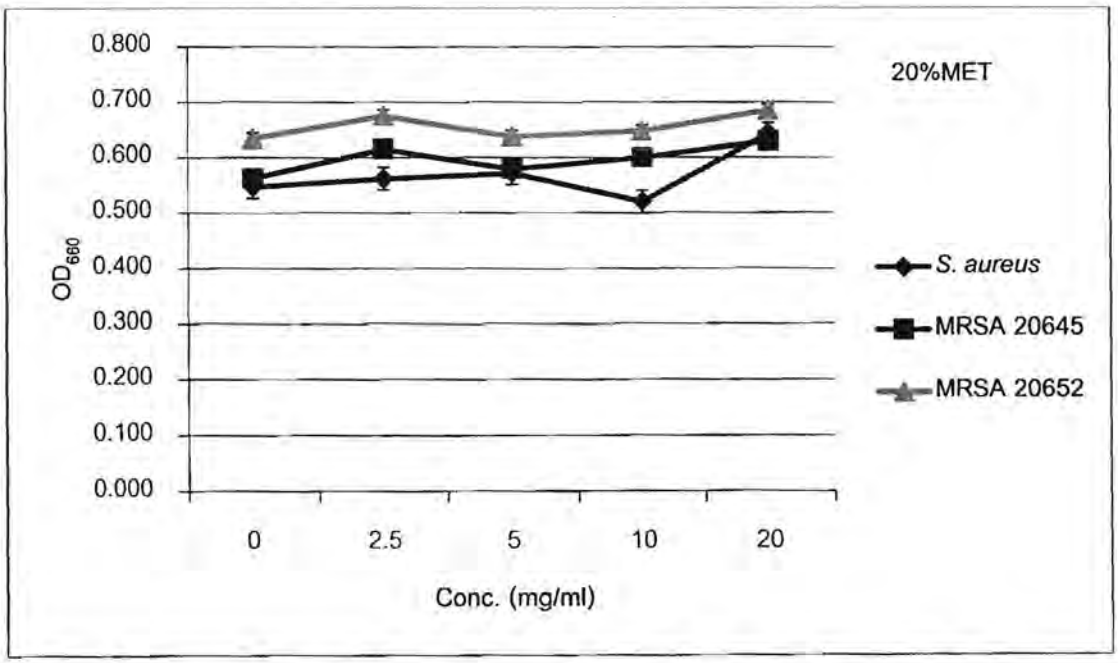
ภาพที่ 6 แสดงค่า abs ที่ช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากการทำ microbroth dilution assay ของสารสกัด fraction ที่ 5 (10% MeOH-CH_2Cl_2) ต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลต



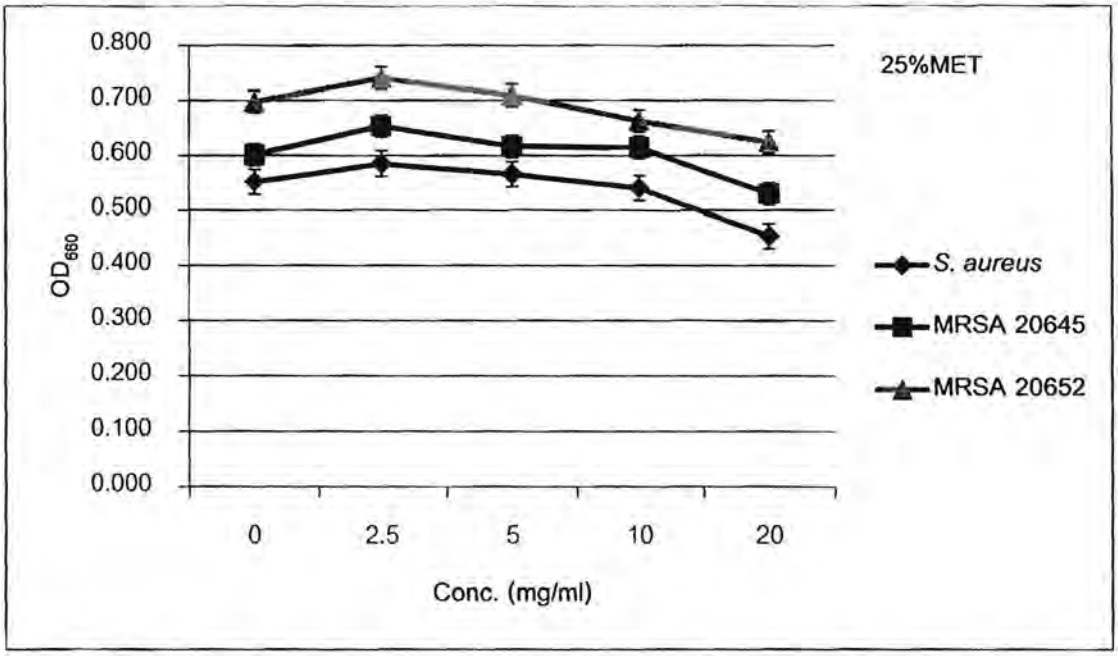
ภาพที่ 7 แสดงค่า abs ที่ช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากการทำ microbroth dilution assay ของสารสกัด fraction ที่ 6 (10% MeOH-CH_2Cl_2) ต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลต



ภาพที่ 8 แสดงค่า abs ที่ช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากการทำ microbroth dilution assay ของสารสกัด fraction ที่ 7 (15% MeOH-CH_2Cl_2) ต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลต



ภาพที่ 9 แสดงค่า abs ที่ช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากการทำ microbroth dilution assay ของสารสกัด fraction ที่ 8 (20% MeOH-CH_2Cl_2) ต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลต



ภาพที่ 10 แสดงค่า abs ที่ช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากการทำ microbroth dilution assay ของสารสกัด fraction ที่ 9 (25% MeOH-CH_2Cl_2) ต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลต

ส่วนที่ 2 จาก *M. luteus*, *P. aeruginosa* และ *E. coli*

2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้นด้วยสารสกัดอย่างหยาบ โดยวิธี paper disc diffusion assay

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดในเบื้องต้นด้วยสารสกัดอย่างหยาบ โดยวิธี paper disc diffusion assay ให้ค่า MIC ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่า MIC (mg/ml) ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ที่ทดสอบด้วยสารสกัดอย่างหยาบ 96% EtOH

แบคทีเรีย		
M. luteus	*P. aeruginosa*	*E. coli*
64.5	64.5	64.5

2.2 ผลการแยกกลุ่มสารที่อยู่ในน้ำผึ้งที่สกัดอย่างหยาบตามความมีขั้วโดยวิธีการทำ partition **ด้วยกรวยแยก**

การแยกสารเบื้องต้นตามความมีขั้วของสารโดยการทำ partition ด้วยกรวยแยก สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม ซึ่งมีลักษณะของสารที่แยกได้ดังในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะของสารที่แยกได้จากการทำ partition ด้วยกรวยแยก

ตัวทำละลาย	ระดับความมีขั้วของตัวทำละลาย	ลักษณะของสารที่แยกได้
Hexane	ต่ำ	ของเหลวเหนียวสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นเฉพาะตัว
CH_2Cl_2	ปานกลาง	ของเหลวเหนียวสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นเฉพาะตัว
40% MeOH	สูง	ของเหลวเหนียวข้น สีน้ำตาลเหลืองใส มีกลิ่นเฉพาะตัว

2.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ต่อแบคทีเรียก่อโรคโดยสารสกัดในชั้น hexane, 40% MeOH และ CH_2Cl_2 (microbroth dilution assay #1)

ในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ต่อแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี microbroth dilution assay ของสารสกัดน้ำผึ้ง ทำให้ได้ค่า MIC ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงค่า MIC (mg/ml) และ MBC (mg/ml) ของสารสกัดในแต่ละกลุ่มตัวทำละลายที่แยกได้หลังการทำ partition ด้วยกรวยแยก ที่ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด

isolate	MIC (mg/ml)			MBC (mg/ml)		
	40% MeOH	CH_2Cl_2	hexane	40% MeOH	CH_2Cl_2	Hexane
M. luteus	60	10	20	80	20	40
P. aeruginosa	40	10	20	60	10	20
E. coli	100	-	-	120	-	-

2.4 ผลการแยกสารจากชั้น hexane และ ชั้น CH_2Cl_2 โดยวิธีการทำ quick column chromatography

การแยกสารจากชั้น hexane และ CH_2Cl_2 ซึ่งมีค่า MIC ต่ำเมื่อเทียบกับ 40% MeOH แสดงว่ามีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ต่อแบคทีเรียก่อโรคได้ดีที่สุด โดยการทำ quick column chromatography นั้นสามารถแยกสารได้ทั้งหมด 13 กลุ่ม คือ จาก hexane 4 กลุ่ม และจาก CH_2Cl_2 อีก 9 กลุ่ม ซึ่งมีชื่อเรียกและลักษณะดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงลักษณะของสารที่แยกได้จาก quick column chromatography ในแต่ละกลุ่ม

กลุ่มสาร		ลักษณะของสารที่แยกได้
hexane	100% hexane	ของเหลวสีเหลืองอ่อน มีกลิ่น
	75% hexane-CH_2Cl_2	ของเหลวสีเหลืองน้ำตาลใส มีกลิ่น
	50% hexane-CH_2Cl_2	ของเหลวสีเหลืองอ่อน มีกลิ่น
	25% hexane-CH_2Cl_2	ของเหลวใสไม่มีสี
CH_2Cl_2	75% CH_2Cl_2-hexane	ของเหลวใสไม่มีสี
	100% CH_2Cl_2	ของเหลวสีเหลืองอ่อน มีกลิ่น
	95% CH_2Cl_2-MeOH	ของเหลวสีเหลืองน้ำตาลใส มีกลิ่น
	95% CH_2Cl_2-MeOH2	ของเหลวสีเหลืองน้ำตาลใส มีกลิ่น
	90% CH_2Cl_2-MeOH	ของเหลวสีเหลืองน้ำตาลใสแต่อ่อนกว่า 95% มีกลิ่น
	90% CH_2Cl_2-MeOH2	ของเหลวสีเหลืองน้ำตาลใสแต่อ่อนกว่า 95% มีกลิ่น
	85% CH_2Cl_2-MeOH	ของเหลวสีเหลืองอ่อน มีกลิ่น
	80% CH_2Cl_2-MeOH	ของเหลวใสไม่มีสี
	75% CH_2Cl_2-MeOH	ของเหลวใสไม่มีสี

2.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ต่อแบคทีเรียก่อโรคโดยสารสกัดที่แยกได้จากข้อ 2.4 **ทั้ง** 13 fractions (microbroth dilution assay #2)

ในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ต่อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธี microbroth dilution assay ของสารสกัดน้ำผึ้ง ครั้งที่ 2 จากสารทั้ง 13 fractions โดยบาง fraction มีแนวโน้มที่สามารถต้านการเจริญ แต่เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่าไม่สามารถต้านการเจริญได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

อภิปราย วิจารณ์ผลการทดลอง

เลือกทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำผึ้งชันโรง *Tetragonula laeviceps* เพราะว่า 1) ชันโรงเป็นผึ้งที่ไม่มีเหล็กไน ทำให้ไม่มีอันตรายต่อผู้ทำการทดลอง 2) เป็นผึ้งที่มีการกระจายตัวอยู่ทั่วไป จึงสะดวกต่อการเก็บตัวอย่าง และสามารถนำมาเลี้ยงในกล่องไม้หรือขอนไม้เจาะรูได้ง่าย ไม่มีพฤติกรรมทิ้งรัง และ 3) มีการนำน้ำผึ้งและพรอพอลิสจากชันโรงมาใช้ทางด้านยาแผนโบราณมานาน ส่วนการเลือกเก็บในช่วงเมษายนนั้นเป็นช่วงที่น้ำผึ้งจะมีเปอร์เซนต์ของความชื้นน้อย และน้ำผึ้งจะมีความเข้มข้นสูง

ในขั้นตอนของการสกัดอย่างหยาบนั้น เลือกใช้น้ำและ EtOH เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากเป็นรูปแบบที่นิยมใช้ในชีวิตประจำวัน เช่น ในการทำขนม ใช้ในยาหม้อ ใช้ผสมในเครื่องดื่ม เป็นต้น และน้ำผึ้งมีลักษณะเป็นของเหลวที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้นองค์ประกอบที่ออกฤทธิ์จึงน่าจะเป็นพวกที่มีขั้วบ้างไม่มากก็น้อย

จากขั้นตอนของการสกัดสารสกัดพบว่า เมื่อทำการ partition ด้วยกรวยแยกแล้ว สารสกัดที่ได้หลังจากระเหยแห้งแล้ว จะมีปริมาตรของสารที่ต้องการในปริมาณน้อย โดยจะพบว่า น้ำผึ้ง 90 g สามารถได้สารสกัดจาก MeOH 75 ml, CH_2Cl_2 0.3 ml และ hexane 0.2 ml ตามลำดับ จึงต้องทำการสกัดสารหลายครั้งทำให้เสียเวลาในการทดลอง โดยที่สามารถแก้ไขได้ด้วยการเพิ่มปริมาณของน้ำผึ้งและปริมาณของสารตั้งต้นที่ใช้ในการสกัด ก็จะทำให้ได้สารสกัดที่เพียงพอต่อการทดลอง และประหยัดเวลาในการสกัดซ้ำใหม่

จากผลการทดลองการทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion assay พบว่า สารออกฤทธิ์ในน้ำผึ้งชนิดนี้สามารถพบอยู่ในสารสกัดอย่างหยาบ 96% EtOH แต่ไม่พบในสารสกัดอย่างหยาบของน้ำ แสดงว่าสารออกฤทธิ์ดังกล่าวนั้นสามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งมีความมีขั้วน้อยกว่าน้ำ และจากการค้นคว้าพบว่าในขั้นตอนการสกัดสารจากน้ำผึ้งนั้นส่วนใหญ่มักจะใช้ EtOH หรือ MeOH จะไม่ค่อยพบการใช้น้ำสกัดเท่าใดนัก และนอกจากนั้น จากงานวิจัยของ Molan และคณะ ยังกล่าวว่าสารออกฤทธิ์เป็นสารกลุ่ม phenolic compound ซึ่งเป็นสารที่มีความมีขั้วต่ำ ซึ่งน้ำนั้นมีขั้วมากจึงไม่น่าที่พบสารออกฤทธิ์ดังกล่าวได้ [15]

และจากผลการทดลองการทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion assay ยังพบอีกว่า สารสกัดอย่างหยาบ 96% EtOH ของน้ำผึ้งชนิดนี้มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อราได้ ซึ่งสารสกัดจากธรรมชาตินั้นมักไม่พบฤทธิ์ดังกล่าว มากเท่าใดนัก และเหตุผลที่ไม่เลือกเชื้อรามาทดสอบต่อเพราะระยะเวลาในการเลี้ยงของเชื้อรานั้น ใช้เวลามากกว่าถึง 3 วัน จึงทำให้การทำวิจัย ไม่สามารถดำเนินงานไปได้พร้อมๆ กับขั้นตอนอื่น จึงเลือกที่จะไม่ศึกษาเชื้อราต่อ แต่ก็น่าสนใจที่จะนำเชื้อรามาศึกษาต่อ เพราะยังมีคนศึกษาอยู่น้อย และส่วนใหญ่จะศึกษาเพียงสารสกัดอย่างหยาบเท่านั้น ซึ่งถ้าหากศึกษาถึงโครงสร้าง

ทางเคมีของน้ำผึ้ง ที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อราได้อาจจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางเลือกใหม่ในการกำจัดเชื้อก็เป็นได้

จากผลการทดลองการทดสอบด้วยวิธี microbroth dilution assay พบว่า เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกน่าจะมีความไวต่อสารสกัดมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ อาจเนื่องมาจากลักษณะทางโครงสร้างของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีชั้นของ peptidoglycan ที่หนากว่า จึงทำให้สารสกัดน้ำผึ้งซึ่งมีลักษณะเหนียวข้นสามารถจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ดีกว่าและแทรกซึมไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย และทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเสียสภาพและตายไปในที่สุด ซึ่งจะสอดคล้องกับงานวิจัยของ Koru และคณะ ที่สารสกัดสามารถต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ [16]

จากผลการทดลองการทดสอบด้วยวิธี microbroth dilution assay หลังจากทำ partition พบว่าสารออกฤทธิ์ของน้ำผึ้งนั้นอยู่ในกลุ่มของสารละลายที่มีขั้วต่ำ นั้นก็คือ hexane และ CH_2Cl_2 ซึ่งจะสอดคล้องกับหลายๆ งานวิจัยที่กล่าวว่า สารออกฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์เป็นสารกลุ่ม phenolic compound ซึ่งเป็นสารที่มีความมีขั้วต่ำ

หลังจากทำการแยกสารให้มีความบริสุทธิ์ด้วยวิธี quick column chromatography แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ต่อแบคทีเรียก่อโรคแล้วพบว่า สารสกัดแต่ละ fraction ไม่มีฤทธิ์ดังกล่าว แต่หากพิจารณาจากกราฟแล้วจะพบว่ามีแนวโน้มในบางความเข้มข้น และเพียงบาง fraction เท่านั้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อาจจะเป็นเพราะว่า สารออกฤทธิ์นั้นน่าจะทำงานร่วมกันจึงจะสามารถมีฤทธิ์ดังกล่าวได้ ซึ่งเรียกว่า การออกฤทธิ์แบบเสริมกัน (synergistic effect) โดยที่จะสอดคล้องกับงานของ Koru และคณะ [16] ที่กล่าวถึงการทำงานแบบ synergistic effect ของสารสกัดจากพรอพอลิส ว่าเป็นการทำงานร่วมกันของหลายองค์ประกอบถึงจะสามารถต้านการเจริญต่อแบคทีเรียก่อโรคในช่องปากได้

จากงานวิจัยชิ้นนี้ทำให้เห็นว่า งานวิจัยชิ้นนี้อาจเป็นหนึ่งในอีกหลายงานวิจัยที่ชี้ให้เห็นถึงคุณสมบัติในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของน้ำผึ้งชันโรงชนิดนี้ได้ในเบื้องต้น ถึงแม้ไม่สามารถแยกสารที่บริสุทธิ์ได้แต่ก็อาจทำให้มูลค่าของน้ำผึ้งชันโรง *T. laeviceps* มีมูลค่าเพิ่มขึ้นได้ ซึ่งอาจจะช่วยส่งเสริมรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งได้ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

น้ำผึ้งชันโรง Tetragonula laeviceps จากจังหวัดจันทบุรี สามารถยับยั้งการเติบโตของ *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ MRSA 20645, MRSA 20646, MRSA 20651 และ MRSA 20652 ได้ดีในระดับของสารสกัดอย่างหยาบเมื่อสกัดด้วย CH2Cl2 และ hexane แต่เมื่อนำสารสกัดข้างต้นไปสกัดบริสุทธิ์มากขึ้น พบว่ามีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้น้อยลงมาก จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารที่ออกฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์นั้นอยู่ในรูปแบบของ synergistic effect ดังนั้นเมื่อสารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นความสามารถในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์จะน้อยลงไปด้วย

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

ควรทำการแยกสารเดี่ยวออกมาจากน้ำผึ้ง พร้อมทั้งจำแนกชื่อของสารเดี่ยวนั้น แล้วนำทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่เลือกศึกษาอีกครั้ง

เอกสารอ้างอิง

1. ปรีชา สุวรรณพินิจ และ นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. *จุลชีววิทยาทั่วไป* (โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552).
2. Alcamos, I.E. *Fundamentals of Microbiology* (The Benjamin Cummings Publishing Company Inc., 1994).
3. Kong, K.F., Scheper, L. & Mathee, K. Beta – lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *Apmis.* **118**, 1-36 (2010).
4. สำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย, เร่งวิจัยข่าเป็นยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ต้านเชื้อหนองดื้อยา. http://www.trf.or.th/News/Content.asp?Art_ID=74.
5. Loomfield, B. *et al.* Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the community: assessing the ploblem and controlling the spread. *Am. J. Infect. Con.* **35**, 86-88 (2007).
6. ชิดชนก อ่อนสา ปวีณา มามั่ง และ ศิริวรรณ จันทร์พยัคฆ์. การพัฒนารูปแบบการปฏิบัติการพยาบาลเพื่อป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายเชื้อ MRSA ในหอผู้ป่วยศัลยกรรมชาย โรงพยาบาลวิเชียรบุรี ปีงบประมาณ 2551. 203.157.203.3/academic/data/present/20100902_162317.doc.
7. Raghukumar, R., Vali, L., Watson, D., Fearnley, J. & Seidel, V. Antimethicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of 'pacific propolis' and isolated prenyl flavanones. *Phytother. Res.* **24**, 1181-1187 (2010).
8. Ruiz-Bustos, E., Velazquez, C. & Garibay-Escobar, A. Antibacterial and antifungal activities of some Mexican medicinal plants. *J. Med. Food.* **12**, 1398-1402 (2009).
9. Al-Waili, N. S. Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. *J. Med. Food.* **7**, 210-222 (2004).
10. Molan, P. C. Why honey is effective as a medicine: a review. *Econ. Bot.* **51**, 78-87 (1999).
11. Molan, P. C. The antibacterial nature of honey: the nature of antibacterial activity. *Bee World.* **73**, 5-28 (1992).
12. Blair, S. E. & Cater, D. A. The potential for honey in the management of wounds and infection. *Aust. Infect. Con.* **10**, 24-30 (2005).
13. สมนึก บุญเกิด และ ธนานิช เสือวรรณศรี. *ผึ้ง* (สำนักพิมพ์มติชน, 2544).

14. Umthong, S., Puthong, S. & Chanchao, C. *Trigona laeviceps* propolis from Thailand: antimicrobial, antiproliferative and cytotoxic activities. *Am. J. Chin. Med.* **37**, 1-11 (2009).

15. Molan, P.C., Smith, I.M. & Reid, G.M. A comparison of antibacterial activity of some New Zealand honeys. *J. Apis. Res.* **27**, 252-256 (1988).

16 Koru, O. *et al.* In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographic origins against certain oral pathogens. *Anaerobe.* **13**, 140-145 (2007).

ประวัตินักวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า

ประวัติการศึกษา

BS ชีววิทยา (เกียรตินิยมอันดับสอง) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. ประเทศไทย (พ.ศ. 2531-2535)

MS ชีววิทยา (ชีววิทยาระดับโมเลกุลและเซลล์), Virginia Polytechnic Institute and State University, มลรัฐ Virginia, สหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2537-2539)

PhD ชีววิทยา (ชีววิทยาระดับโมเลกุลและเซลล์), Virginia Polytechnic Institute and State University, มลรัฐ Virginia, สหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2539-2542)

ประวัติการทำงาน

พ.ศ. 2551-ปัจจุบัน

รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330 ประเทศไทย

พ.ศ. 2544-2551

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330 ประเทศไทย

พ.ศ. 2542-2544

อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330 ประเทศไทย

ผลงานตีพิมพ์

Kaewmuangmoon, J. and **Chanchao, C.** (2013) Over-expression and characterization of recombinant alpha – glucosidase I from *Apis cerana indica* in *E. coli*. Journal of Apiculture. 28: 97-111.

Kaewmuangmoon, J., Kilaso, M., Leartsakulpanich, U., Kimura, K., Kimura, A., and **Chanchao, C.** (2013) Expression of a secretory α-glucosidase II from *Apis cerana indica* in *Pichia pastoris* and its characterization. *BMC Biotechnology*. 13: 16. doi: 10.1186/1472-6750-13-16.

Kaewmuangmoon, J., Yoshiyama, M., Kimura, K., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A., and **Chanchao, C.** (2012) Characterization of some enzymatic properties of recombinant α-glucosidase III from the Thai honeybee, *Apis cerana indica* Fabricus. African Journal of Biotechnology. 11: 16220-16232.

Chantarudee, A., Phuwapraisirisan, P., Kimura, K., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A., and **Chanchao, C.** (2012) Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12: 45. doi: 10.1186/1472-6882-12-45.

Teerasripreecha, D., Phuwapraisirisan, P., Puthong, S., Kimura, K., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A., and **Chanchao, C.** (2012) *In vitro* antiproliferative / cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12: 27. doi: 10.1186/1472-6882-11-37.

Rattanawannee, A., **Chanchao, C.**, and Wongsiri, S. (2012) Geometric morphometric analysis of giant honeybee (*Apis dorsata* Fabricius, 1793) populations in Thailand. *Journal of Asia Pacific Entomology*. 15: 611-618. doi: 10.1016/j.aspen.2012.07.001.

Rattanawannee, A., **Chanchao, C.**, Wongsiri, S., and Oldroyd, B.P. (2012) No evidence that habitat disturbance

affects mating frequency in the giant honey bee *Apis dorsata*. *Apidologie*. doi: 10.1007/s13592-012-0150-0.

Rattanawannee, A., **Chanchao, C.**, Lim, J., Wongsiri, S., and Oldroyd, B.P. (2012) Genetic structure of a giant honey bee (*Apis dorsata*) population in northern Thailand: implications for conservation. *Insect Conservation and Diversity*. doi: 10.1111/j.1752-4598.2012.00193.x.

Kaewmuangmoon, J., Nonthapa, P., Rattanawannee, A., Winayanuwattikun, P., and **Chanchao, C.** (2012) Preliminary screening for various bioactivities in honey and propolis extracts from Thai bees. *European Journal of Medicinal Plants*. 2(2): 74-92.

Almehmadi, R.M., Alghamdi, A.A., Wongsiri, S., **Chanchao, C.**, and Aljedani, D.M. (2011) Histological studies on ovary differentiation in Yemini queen honeybees, *Apis mellifera jemenitica* (Hymenoptera: Apidae), during post-embryonic development. *The Pan-Pacific Entomologist*. 87(3): 177-187.

Kilaso, M., Kaewmuangmoon, J., Kamchanatat, A., Sangvanich, P., and **Chanchao, C.** (2011) Expression and characterization of *Apis dorsata* α-glucosidase III. *Journal of Asia Pacific Entomology*. 14: 479-488.

Umthong, S., Phuwapraisirisan, P., Puthong, S., and **Chanchao, C.** (2011) *In vitro* antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 11: 37. doi: 10.1186/1472-6882-11-37.

Rattanawannee, A., **Chanchao, C.**, and Wongsiri, S. (2010) Gender and species identification of four native honeybees (Apidae: *Apis*) in Thailand based on wing morphometic analysis. *Annals of the Entomological Society of America*. 103(6): 965-970.

Kaewmuangmoon, J., Suwanvijitr, T., Cherdshewasart, W., and **Chanchao, C.** (2010) Leaf morphometric and genetic variation of *Butea superba* in Thailand. *ScienceAsia*. 36: 180-186.

Suwanvijitr, T., Kaewmuangmoon, J., Cherdshewasart, W., and **Chanchao, C.** (2010) Morphometric and genetic variation in *Pueraria mirifica* cultivars across Thailand. *Pakistan Journal of Botany*. 42(1): 97-109. **(ISI, IF2007 = 0.470)**

Umthong, S., Puthong, S., and **Chanchao, C.** (2009) *Trigona laeviceps* propolis from Thailand: antimicrobial, antiproliferative and cytotoxic activities. *The American Journal of Chinese Medicine*. 37(5): 855-865.

Chanchao, C. (2009) Antimicrobial activity by *Trigona laeviceps* (stingless bee) honey from Thailand. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 25(3): 364-369.

Chanchao, C. (2009) Properties and antimicrobial activity of *Apis dorsata* honey from Thailand. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 25(2): 313-318.

Chanchao, C., Pilalam, S., and Sangvanich, P. (2008) Purification and characterization of alpha – glucosidase in *Apis cerana indica*. *Insect Science*. 15: 217-224.