อนุมัติงบประมาณ

สัญญาเลขที่ R2560C137

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของยางไม้จากขันโรง *Tetrigona apicalis* (Smith, 1857) (Hymenoptera: Apidae) ในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย

คณะผู้วิจัย สังกัด

อาจารย์ ดร.จิรภาส จงจิตวิมล คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักวิทยทรัพยากร มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 06 ม.ค. 2564
เลขทะเบียน 1034760
เลขเรียกหนังสือ อ QL 569 .A6 จ419ร 2560

สนับสนุนโดย

งบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปี งบประมาณ 2560

สัญญาเลขที่ R2560C137

Executive Summary

ชื่อโครงการวิจัย	ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของยางไม้จากชันโรง *Tetrigona apicalis* (Smith, 1857) (Hymenoptera: Apidae) ในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย	อาจารย์ ดร.จิรภาส จงจิตวิมล
สังกัด	ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ความสำคัญ

ชันโรงเป็นแมลงกลุ่มเดียวกับผึ้ง แมลงกลุ่มนี้สามารถนำยางจากพืชมาเป็นองค์ประกอบหลักในการสร้างรังโพรพอลิส (propolis) และปากทางเข้ารัง โดยยางที่ถูกใช้โดยชันโรงในแต่ละพื้นที่จะมีความแตกต่างกัน เนื่องจากภูมิศาสตร์ของแต่ละพื้นที่จะทำให้พบชนิดพืชแตกต่างกัน ทั้งนี้คณะผู้วิจัยยังไม่พบว่ามีการศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ดังกล่าวในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย คณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงความเป็นไปได้ในการศึกษาคุณสมบัติของยางไม้ที่เป็นองค์ประกอบของปากทางเข้ารังของชันโรง *Tetrigona apicalis* (Smith, 1857) ในการเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ได้จากยางไม้ของชันโรง *Tetrigona apicalis* ในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย

งานวิจัยนี้สอดคล้องการยุทธศาสตร์พัฒนาประเทศในการพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานความหลากหลายทางชีวภาพ โดยใช้ความหลากหลายทางชีวภาพและทรัพยากรชีวภาพของท้องถิ่น มาเป็นต้นทุนในการผลิตผลงานวิจัยเพื่อค้นหาชีวมวลท้องถิ่นที่มีศักยภาพ เพื่อการแข่งขันในระดับชาติและหรือระดับนานาชาติได้ โดยส่งผลต่อการเพิ่มมูลค่าของชีวมวลท้องถิ่นในเชิงพาณิชย์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของยางไม้จากปากทางเข้ารังของชันโรง *Tetrigona apicalis* ในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย

ผลสำเร็จของโครงการที่ได้รับ

มีผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติคือ S Walailak Journal of Science and Technology (ในปี 2017 อยู่ในฐานข้อมูล Scopus Q3 และ มีค่า impact factor 0.16) โดยตีพิมพ์เมื่อปี ค.ศ. 2018 ปีที่ 15 ฉบับที่ 8 หน้า 599-607.

ลงชื่อ.....

หัวหน้าโครงการ

สัญญาเลขที่ R2560C137

Abstract

Stingless bees are a type of bees without sting. They construct their nest entrances from the plant resin, which is a major material like a propolis. *Tetrigona apicalis* is a common species of stingless bees found in the Lower Northern Thailand. In previous studies, propolis of stingless bees has antimicrobial activities because it chemically contains phenolic content. The aim was to evaluate the antimicrobial activities of resin collected from *T. apicalis'* nest entrances from Lower Northern Thailand areas by disk diffusion and broth microdilution methods. The samples were macerated in 30% ethanol and incubated in room temperature for 14 days. The supernatants were filtered and ethanol residues were then removed. For antibacterial activity, the extracted samples were examined against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. The result showed that the extracts from each area produced the inhibition zones against *S. aureus,* but not against the rest organisms. Using microdilution broth, the overall MICs of the samples against *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* were various; *S. aureus* MIC values 12-24 mg/ml, *E. coli* MIC values 24 mg/ml and *P. aeruginosa* MIC values 24-48 mg/ml. For antifungal activity, the extracted samples were examined against *Candida albicans* ATCC 90028 and *Cryptococcus neoformans* (a clinical isolate). The result showed that the extracts from every provinces did not produce the inhibition zones (6 mm equal to the disk's diameter) against both yeasts. Using microdilution broth, the overall MICs of all samples against two yeasts were more than 48 mg/ml. In conclusion, the nest entrance extracts from *T. apicalis* could have an antibacterial effect, but not antifungal effect.

บทคัดย่อ

ชันโรงเป็นผึ้งที่ไม่มีเหล็กใน มีการสร้างปากทางเข้ารัง ซึ่งมียางไม้เป็นองค์ประกอบหลักคล้ายกับโพรพอลิส โดยโพรพอลิสมีการศึกษาอย่างกว้างขวางและพบว่ามีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบทางเคมีและยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ของยางไม้ที่เก็บโดยชันโรงสายพันธุ์ *T. apicalis* (พบบ่อยในเขตภาคเหนือตอนล่าง) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและรา ด้วยวิธี disk diffusion และ broth microdilution จากตัวอย่างยางไม้ที่ได้จากปากทางเข้ารังชันโรงในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย โดยนำตัวอย่างยางไม้ที่เก็บโดย *T. apicalis* ในแต่ละพื้นที่ แช่ลงใน 30% เอธานอล ที่อุณภูมิห้อง นาน 14 วัน แล้วนำสารละลายไปกรองและทำการสกัดตัวทำละลายออก นำสารสกัดหยาบยางไม้ไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ผลการทดสอบ disk diffusion พบว่า eNEEs จากแต่ละพื้นที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ inhibition zone มากกว่า 6 มม. แต่ไม่ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* inhibition zone เท่ากับ 6 มม. และเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี microdilution broth พบว่าตัวอย่างสารสกัด eNEEs จากแหล่งต่างๆ ให้ MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* ระหว่าง 12-24 mg/ml, MIC ต่อเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 24 mg/ml และ MIC ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ระหว่าง 24-48 mg/ml สำหรับฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา ผู้วิจัยพบว่า เมื่อทดสอบด้วยวิธี disk diffusion สารสกัด eNEEs จากทุกแหล่งไม่สามารถยับยั้งเชื้อราชนิดยีสต์ได้ (inhibition zone เท่ากับ 6.0 mm) ต่อเชื้อ *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* รวมถึงเมื่อทดสอบด้วยวิธี broth microdilution พบว่าสารสกัด eNEEs จากทุกแหล่งให้ค่า MIC ต่อเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ มากกว่า 48 mg/ml คณะผู้วิจัยสรุปได้ว่าสารสกัดยางไม้จากปากทางเข้ารังชันโรงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ แต่ยังไม่พบฤทธิ์ในการยังยั้งเชื้อรา

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ชันโรงเป็นแมลงกลุ่มเดียวกับผึ้ง แมลงกลุ่มนี้สามารถนำยางจากพืชมาเป็นองค์ประกอบหลักในการสร้างรัง โพรพอลิส (propolis) และปากทางเข้ารัง โดยยางที่ถูกใช้โดยชันโรงในแต่ละพื้นที่จะมีความแตกต่างกัน เนื่องจากภูมิศาสตร์ของแต่ละพื้นที่จะทำให้พบชนิดพืชแตกต่างกัน ทั้งนี้การศึกษาถึงคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของยางส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในต่างประเทศ ส่วนประเทศไทยการศึกษาหลักเป็นการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลชีพของน้ำผึ้ง ทั้งนี้คณะผู้วิจัยยังไม่พบว่ามีการศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ดังกล่าวในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย คณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงความเป็นไปได้ในการศึกษาคุณสมบัติของยางไม้ที่เป็นองค์ประกอบของปากทางเข้ารังของชันโรง *Tetrigona apicalis* (Smith, 1857) ในการเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ได้จากยางไม้ของชันโรง *Tetrigona apicalis* ในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย

งานวิจัยนี้สอดคล้องการยุทธศาสตร์พัฒนาประเทศในการพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานความหลากหลายทางชีวภาพ โดยใช้ความหลากหลายทางชีวภาพและทรัพยากรชีวภาพของท้องถิ่น มาเป็นต้นทุนในการผลิตผลงานวิจัย เพื่อค้นหาชีวมวลท้องถิ่นที่มีศักยภาพ เพื่อการแข่งขันในระดับชาติและหรือระดับนานาชาติได้ โดยส่งผลต่อการเพิ่มมูลค่าของชีวมวลท้องถิ่นในเชิงพาณิชย์

การทบทวนวรรณกรรม

1. องค์ประกอบและคุณสมบัติของยางไม้

ยางของพืชเป็นองค์ประกอบหลักของปากทางเข้าออกของชันโรง และโพรพอลิสที่พบในแมลงกลุ่ม Apidae ซึ่งยางและโพรพอลิสเป็นผลผลิตที่สำคัญอย่างหนึ่งของแมลงกลุ่มนี้ (1, 10) มีสารประกอบทางเคมีและชีวเคมีที่หลากหลาย เช่นสารประกอบในกลุ่ม flavonoids (phenolic compounds), aromatic acids, esters, aldehydes, ketones, fatty acids, terpenes, steroids, polysaccharides, hydrocarbons, alcohols, hydroxybenzene และอื่นๆ เป็นต้น (2-5) อย่างไรก็ตามองค์ประกอบดังกล่าวมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของยางไม้และภูมิศาสตร์ของแต่ละพื้นที่ รวมไปถึงชนิดสายพันธุ์ของผึ้งด้วย (1) โดยสารประกอบทางเคมีดังกล่าวมีคุณสมบัติที่หลากหลาย เช่น มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (antibacterial and fungal properties) (3, 7-9) มีฤทธิ์ต่อต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (anti-proliferative properties) (11-14) มีฤทธิ์ต่อต้านปรสิต (antiparasitic properties) (15-17) เป็นต้น

2. ชันโรง

ชันโรงเป็นแมลงในกลุ่มเดียวกับผึ้งที่ให้น้ำหวาน วงศ์ Apidae อันดับ Hymenoptera (18) โดยชันโรงเป็นผึ้งซึ่งไม่มีเหล็กใน ขนาดตัวของชันโรงโดยเฉลี่ยมีขนาดเล็กกว่าผึ้งประมาณ 2-3 เท่า ชันโรงสามารถเก็บน้ำผึ้งและเก็บยางไม้เพื่อเป็นองค์ประกอบในโพรพอลิสได้เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามองค์ประกอบของน้ำผึ้งและโพรพอลิสจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งพืชที่ชันโรงไปเก็บมา (19) ชันโรงที่พบในประเทศไทยมี 35 ชนิด (20) ชนิดที่มีการกระจายตัวมากในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย คือ *Tetrigona apicalis* (21, 22)

3. การรายงานคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของยางไม้

ในยุโรปและอเมริกาเหนือ มีรายงานว่าผึ้งสายพันธุ์ *Apis mellifera* หาแหล่งยางไม้จากพืช *Populus* ซึ่งพบว่าในโพรพอลิสมี flavonoids เป็นสารประกอบทางชีวภาพหลัก ผึ้งสายพันธุ์นี้ยังสร้างรังหรือแม้กระทั่งห่อหุ้มผู้บุกรุกที่ตายแล้วด้วยโพรพอลิส ทั้งนี้เพราะคุณสมบัติการเป็นสารยั้งยับจุลชีพของโพรพอลิส (1) ในขณะที่ภูมิประเทศของบราซิล กลับมีรายงานว่า โพรพอลิสของผึ้งถูกผลิตจากแหล่งยางไม้ที่มีความหลากหลายมากกว่า รวมทั้งสารประกอบทางเคมีของโพรพอลิสก็มีความหลายหลากมากกว่าด้วย (1) ในประเทศอินเดีย มีการศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของโพรพอลิสที่ได้จากชันโรงในเขตพื้นที่หนึ่งในประเทศอินเดีย กล่าวคือ โพรพอลิสสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด เช่น *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp. เป็นต้น และแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด เช่น *Escherichia coli, Klebsiella* sp. เป็นต้น ทั้งนี้ฤทธิ์ดังกล่าวขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโพรพอลิส (6) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของโพรพอลิสที่ได้จากชันโรงสายพันธุ์ *Trigona laeviceps* พบว่า โพรพอลิสมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ดีกว่า *E. coli* (7)

นอกเหนือจากการมีฤทธิ์ยั้งยับเชื้อแบคทีเรียของโพรพอลิสแล้ว ในปี ค.ศ. 1998 Burdock มีการรายงานว่า โพรพอลิสถูกนำไปใช้ในการแพทย์ทางเลือก ยกตัวอย่างเช่น ใช้ในการรักษาหรือป้องกันการอักเสบ โรคหัวใจ โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง เป็นต้น (23) Umthong et al (2009) มีการรายงานถึงฤทธิ์ของ propolis ที่ได้จากชันโรงสายพันธุ์ *T. laeviceps* ในประเด็นการต้านการเพิ่มจำนวน (antiproliferative affect) ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon carcinoma cell line, SW620) พบว่า โพรพอลิสที่ผ่านการสกัดโดยใช้น้ำ มีคุณสมบัติการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ SW620 สูงกว่าโพรพอลิสที่ผ่านการสกัดโดยใช้เมธานอล (7)

4. การรายงานคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของน้ำผึ้ง

นอกเหนือจากการรายงานคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของโพรพอลิสแล้ว ยังมีการรายงานคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของน้ำผึ้งอีกด้วย เช่น น้ำผึ้งที่ได้จากผึ้งชนิด *A.*

mellifera และชันโรงในเขตเมือง Gondar ในเขตภาคตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศเอธิโอเปีย ถูกรายงานว่ามีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิด ได้แก่ *S. aureus, E. coli* และ *K. pneumoniae* (24)

สำหรับการรายงานในประเทศไทย ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของน้ำผึ้งในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เช่น ในปี ค.ศ. 2006 Chanchao และคณะ ได้ศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในน้ำผึ้งจากแหล่งต่างๆ ในไทย (25) ในปี ค.ศ. 2006 Taokaenchan and Sangsrichan ศึกษาปริมาณของสารกลุ่ม tetracycline ในน้ำผึ้ง โดยใช้ตัวอย่างน้ำผึ้งในเขตภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และพบว่าสารกลุ่มนี้ใช้บ่อยในวงการสัตวแพทย์ เพื่อรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อในสัตว์ (26) Jantakee และ Tragoolpua (2015) ศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังในน้ำผึ้งชนิดต่างๆ ในประเทศไทย ซึ่งรายงานว่าน้ำผึ้งบางชนิดจากแหล่งพืชต่างๆ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแตกต่างกันไป เช่นสามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*, methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), *Corynebacterium* sp. หรือ *Propionibacterium acnes* ได้ในปริมาณความเข้มข้นแตกต่างกันไป (27)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของยางไม้จากปากทางเข้ารังของชันโรง *Tetrigona apicalis* ในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย

ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ยางไม้ที่พบในโพรพอลิสของผึ้งและชันโรงมีองค์ประกอบทางเคมีที่ใกล้เคียง ได้แก่ สารประกอบในกลุ่ม flavonoids (phenolic compounds), aromatic acids, esters, aldehydes, ketones, fatty acids, terpenes, steroids, polysaccharides, hydrocarbons, alcohols, hydroxybenzene เป็นต้น (1-5) ทั้งขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของยางไม้และภูมิศาสตร์ของแต่ละพื้นที่ จากคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และเชื้อราของโพรพอลิส ที่ได้จากทั้งผึ้งและชันโรงในหลายพื้นที่ทั่วโลก (3, 6-9) รวมถึงประเทศไทย (7) จึงคาดว่ายางไม้จากชันโรงน่าจะคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เช่นกัน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของยางไม้จากชันโรงในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย น่าจะมีความเป็นไปได้ในการเป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

ขอบเขตของการวิจัย

เก็บตัวอย่างยางไม้ที่ได้จากปากทางเข้าออกของชันโรง *Tetrigona apicalis* ในเขตพื้นที่จังหวัดในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย โดยสุ่มเก็บในพื้นที่ 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดพิษณุโลก สุโขทัย กำแพงเพชร และเพชรบูรณ์ โดยนำมาสกัดด้วยเอธานอลเพื่อให้ได้เป็น crude extracts และนำ ethanolic crude extracts มาทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จาก clinical isolate ที่ได้จากโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จังหวัดนครสวรรค์ (หรือจาก ATCC) ประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และเชื้อรา 2 ชนิด ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 90028 และ *Cryptococcus neoformans* clinical isolates จากโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ นครสวรรค์ โดยการหา inhibition zone บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการป้ายเชื้อ หลังจากนั้น ethanolic crude extracts จะถูกทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลชีพนั้นๆ อีกครั้ง โดยใช้ broth microdilution method เพื่อหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ทั้งนี้จะมีการทดสอบควบคู่กับสารต้านจุลชีพที่ให้ผลบวกและผลลบกับเชื้อจุลชีพแต่ละชนิด

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ทราบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของยางไม้จากปากทางเข้าออกรังของชันโรง *Tetrigona apicalis* ในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย และทำให้มีข้อมูลเบื้องต้นเพื่อเป็นความรู้พื้นฐานในการต่อยอดงานวิจัยในระยะยาวทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างยางไม้ที่ได้จากปากทางเข้าออกของชันโรง *Tetrigona apicalis* ในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย โดยสุ่มเก็บในพื้นที่ 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดพิษณุโลก สุโขทัย กำแพงเพชร และเพชรบูรณ์ เพื่อนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอธานอล (เช่น 30%v/v, 70%v/v) ในห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม เพื่อให้ได้เป็น ethanolic crude extracts

2. ยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC) โดยใช้การทดสอบทางชีวเคมี และเชื้อรา 2 ชนิด ได้แก่ *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* จาก clinical isolates ด้วยการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

3. สารสกัดยางไม้หยาบ ethanolic crude extracts ที่ได้จะถูกทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยวางสารสกัดหยาบบนอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มเอชเอ (Muller Hinton Agar; MHA) ที่มีการป้ายเชื้อแต่ละชนิด สำหรับเชื้อแบคทีเรียบ่มที่ 35-37°C นาน 18-24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อราบ่มที่ 25-30°C นาน 2-3 วัน (ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา) โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง

4. วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขอบเขตการยับยั้ง (inhibition zone) บันทึกผลการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย โดยมีการควบคุมคุณภาพตลอดการทดสอบ (positive control และ negative control)

5. ทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์นั้นๆ อีกครั้ง โดยใช้วิธีเจือจางในหลอดทดลองขนาดเล็ก (broth microdilution method) เพื่อหาค่าความเข้มข้นระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (minimal inhibitory concentration; MIC)

6. วิเคราะห์ผลและสรุปผล เขียนรายงานฉบับสมบูรณ์ และเตรียมการเผยแพร่ผลงานวิจัย

บทที่ 3
ผลการวิจัย

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดยางไม้ที่ได้จากปากทางเข้ารังของชันโรง *T. apicalis* ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธี disk diffusion และ broth microdilution โดยตัวอย่างจำนวน 4 ตัวอย่าง จากจังหวัดพิษณุโลก สุโขทัย กำแพงเพชร และเพชรบูรณ์ จังหวัดละ 1 ตัวอย่าง สกัดด้วยตัวทำละลาย 30% ethanol แล้วนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 เชื้อรา 2 ชนิด ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 90028 และ *Cryptococcus neoformans* จาก clinical isolates ให้ผลการทดสอบดังนี้

3.1 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียวิธี disk diffusion

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial effect) ของสารสกัดจากยางไม้ที่ได้จากปากทางเข้ารัง (ethanolic nest entrance extracts: eNEEs) ด้วยวิธี disk diffusion ของตัวอย่างยางไม้จากแต่ละจังหวัด ให้ผลดังแสดงในตาราง 3.1, ภาพ 3.1 และ ภาพ 3.2 โดยผล inhibition zone ของ disk ที่มีมวลสารของ eNEEs 9 mg ให้ผล inhibition zone ต่อการทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* แตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ โดยตัวอย่างจากจังหวัดพิษณุโลก สุโขทัย กำแพงเพชร และเพชรบูรณ์ ให้ผล inhibition zone ของเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 9.4, 8.8, 7.8 และ 8.0 mm ตามลำดับ ขณะที่ตัวอย่างจากทั้ง 4 แหล่งให้ผลการยับยั้งต่อเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* เท่ากับ 6.0 มิลลิเมตร ทั้งหมด

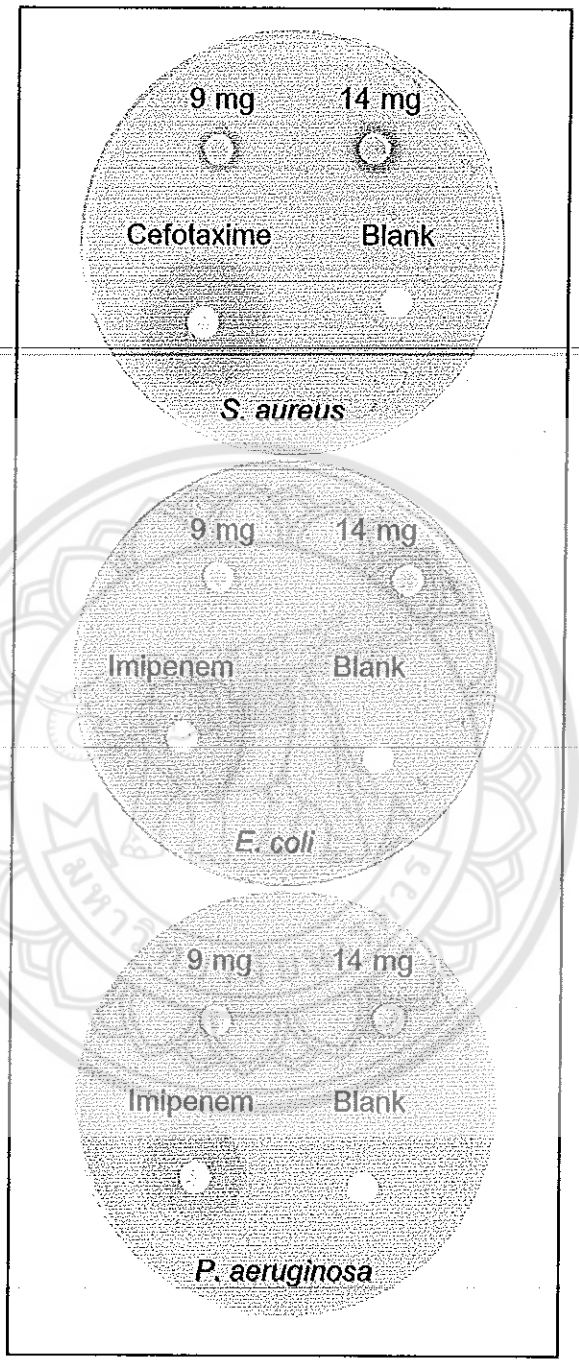
3.2 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อราวิธี disk diffusion

สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา (antifungal effect) ของสารสกัด eNEEs ด้วยวิธี disk diffusion ของตัวอย่างยางไม้จากแต่ละจังหวัด ให้ผลดังแสดงในตาราง 3.1 และ ภาพ 3.2 โดยผล inhibition zone ของ disk ที่มีสารสกัด eNEEs มวลสาร 9 mg ให้ผล inhibition zone ต่อการทดสอบกับเชื้อยีสต์ทั้งสามชนิดเหมือนกัน กล่าวคือ ให้ผล inhibition zone เท่ากับ 6.0 มิลลิเมตร ทั้งหมด

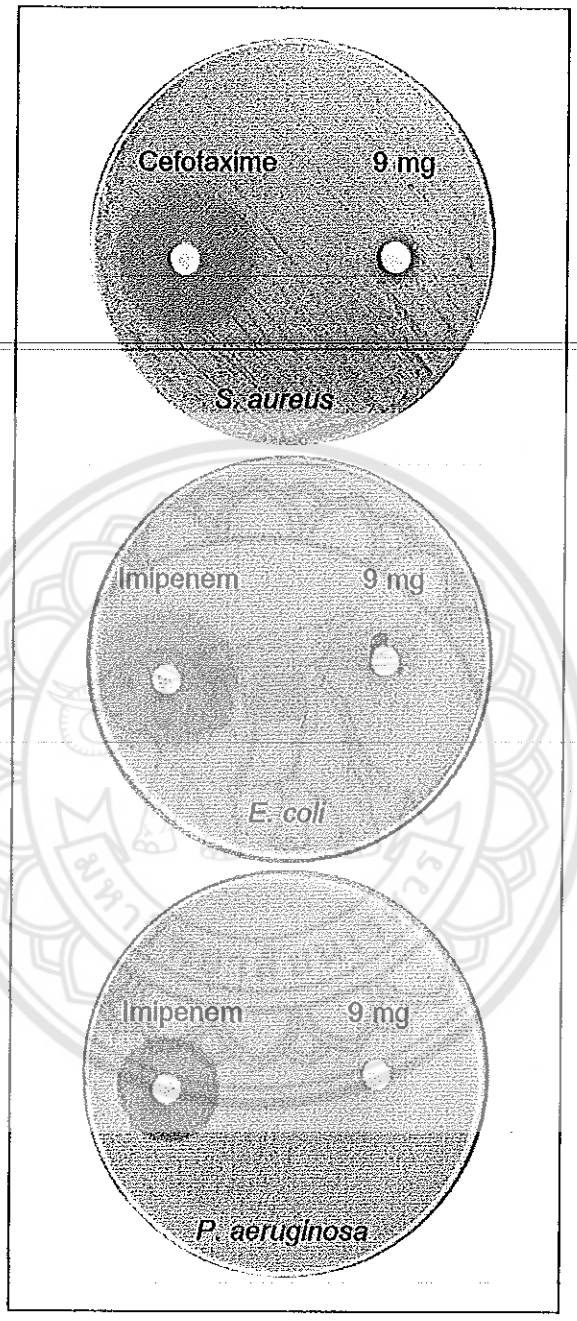
ตาราง 3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด eNEEs ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ (ปริมาณสาร 9 mg) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ใช้ทดสอบด้วยวิธี disk diffusion

แหล่งของตัวอย่าง eNEEs หรือสารควบคุม	Inhibition zone of bacteria (mm)			Inhibition zone of yeast (mm)	
	S. aureus	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*C. albicans*	*C. neoformans*
พิษณุโลก	9.4±0.6	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
สุโขทัย	8.8±0.3	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
กำแพงเพชร	7.8±0.2	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
เพชรบูรณ์	8.0±0.1	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
Positive control (antibiotics)	27.0±2.0 (cefotaxime)	29.0±3.0 (imipenem)	22.0±2.6 (imipenem)		
Negative control (blank disk)	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0

หมายเหตุ ขนาดของแผ่นยามีขนาดเท่ากับ 6 มิลลิเมตร



ภาพ 3.1 แสดงตัวอย่างการเกิด inhibition zone ของตัวอย่าง eNEEs (ขนาด 9 และ 14 mg) ที่ได้จากจังหวัดพิษณุโลก โดยเป็นการทดสอบต่อเชื้อ *S. aureus* (ภาพบน), *E. coli* (ภาพกลาง) และ *P. aeruginosa* (ภาพล่าง) โดยมียา cefotaxime หรือ imipenem เป็น positive control และ blank disk เป็น negative control



ภาพ 3.2 แสดงตัวอย่างการเกิด inhibition zone ของตัวอย่าง eNEEs (ขนาด 9) ที่ได้จากจังหวัดเพชรบูรณ์ โดยเป็นการทดสอบต่อเชื้อ *S. aureus* (ภาพบน), *E. coli* (ภาพกลาง) และ *P. aeruginosa* (ภาพล่าง) โดยมียา cefotaxime หรือ imipenem เป็น positive control และ blank disk เป็น negative control

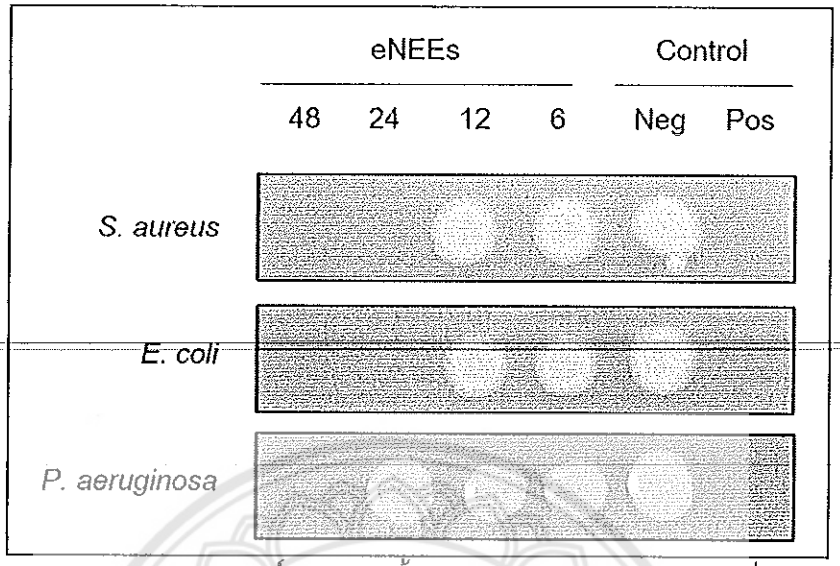
3.3 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและราด้วยวิธี broth microdilution

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของ eNEEs ด้วยวิธี broth microdilution ของตัวอย่างยางไม้จากแต่ละจังหวัด โดยทำการเจือจางตัวอย่าง eNEEs ในหลุมของ 96-well plate จากความเข้มข้น 48 mg/ml จนกระทั่ง 6 mg/ml ลดลงทีละสองเท่า (two-fold dilution) กล่าวคือ จากความเข้มข้นเริ่มต้น 48 mg/ml เป็น 24 mg/ml, 12 mg/ml และ 6 mg/ml ตามลำดับ พบว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ (minimal inhibitory concentration: MIC) และความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (minimal bactericidal concentration: MBC) ให้ผลดังแสดงในตาราง 3.2, ภาพ 3.3 และ ภาพ 3.4

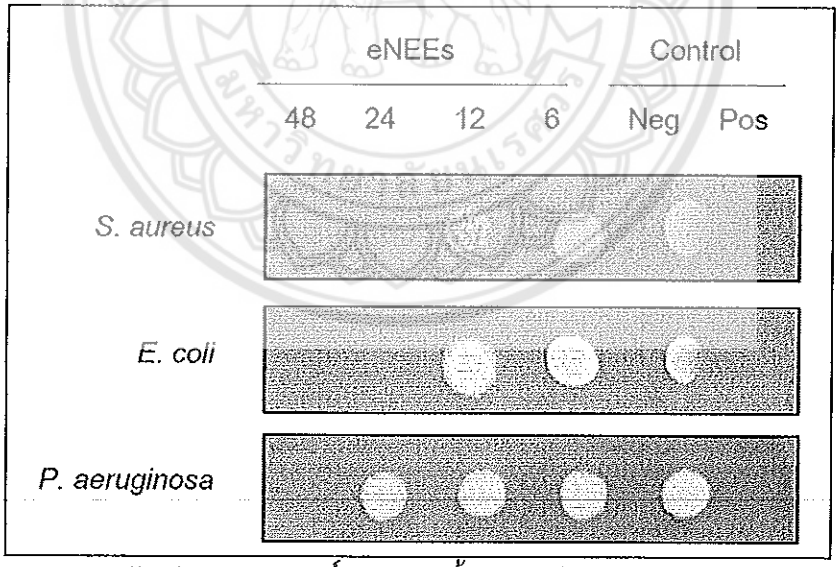
สำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสาร eNEEs แสดงเป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราแสดงเป็นค่า MIC เช่นกัน ส่วนความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ แสดงเป็นค่า minimal fungicidal concentration (MFC) โดยให้ผลดังแสดงในตาราง 3.3

ตาราง 3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด eNEEs ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี broth microdilution

แหล่งของ eNEEs หรือสารควบคุม	ผล MIC ต่อเชื้อ (mg/ml)			ผล MBC ต่อเชื้อ (mg/ml)		
	S. aureus	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*E. coli*	*P. aeruginosa*
พิษณุโลก	24	24	24	24	24	48
สุโขทัย	24	24	24	24	24	48
กำแพงเพชร	24	24	48	24	24	48
เพชรบูรณ์	12	24	48	24	24	48



ภาพ 3.3 แสดงตัวอย่างการออกฤทธิ์ต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด eNEEs ที่เก็บจากสุโขทัย ซึ่งสะท้อนถึงค่า MBC ต่อเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *P. aeruginosa* (ภาพล่าง) โดยมีการใส่เชื้อนั้นๆ เป็น negative control (growth) และ ไม่ใส่เชื้อเป็น positive control (sterility control)



ภาพ 3.4 แสดงตัวอย่างการออกฤทธิ์ต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด eNEEs ที่เก็บจากกำแพงเพชร ซึ่งสะท้อนถึงค่า MBC ต่อเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *P. aeruginosa* (ภาพล่าง) โดยมีการใส่เชื้อนั้นๆ เป็น negative control (growth) และ ไม่ใส่เชื้อเป็น positive control (sterility control)

ตาราง 3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด eNEEs ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ต่อการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี broth microdilution

แหล่งของ eNEEs หรือสารควบคุม	ผล MIC ต่อเชื้อ (mg/ml)		ผล MFC ต่อเชื้อ (mg/ml)	
	C. albicans	*C. neoformans*	*C. albicans*	*C. neoformans*
พิษณุโลก	>48	>48	>48	>48
สุโขทัย	>48	>48	>48	>48
กำแพงเพชร	>48	>48	>48	>48
เพชรบูรณ์	>48	>48	>48	>48

บทที่ 4
สรุป และวิจารณ์

ในการสกัดตัวอย่างยางไม้จากโพรพอลิสในงานวิจัยก่อนหน้า พบว่าตัวทำละลายที่นิยมใช้ คือ น้ำ และเอธานอล (ethanol) (43) ที่มีคุณสมบัติของการมีขั้วหรือไม่มีขั้วที่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาจากคุณสมบัติของปากทางเข้ารังซึ่งมียางไม้เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นตัวอย่างปากทางเข้ารังน่าจะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย ในส่วนของการเลือกความเข้มข้นที่ 30% ethanol นั้น เนื่องจากงานวิจัยก่อนหน้าที่เกี่ยวกับการสกัดสารจากพืชใช้ความเข้มข้นของ ethanol ที่แตกต่างกันไป โดยความเข้มข้นที่ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดคือ 70% แต่จากงานวิจัยของ Siripatrawan และคณะ (45) ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดโพรพอลิส ได้กล่าวถึงผลการทดสอบในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไว้ว่าโพรพอลิสที่สกัดด้วย 70% ethanol ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด แต่กลับให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อเป็นค่า inhibition zone น้อยกว่าโพรพอลิสที่สกัดด้วย 30% ethanol คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้ 30% ethanol ในการสกัดสารจากตัวอย่างยางไม้จากปากทางเข้ารัง (eNEEs) เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต้น (preliminary experiment) อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยควรทำการสกัดสารด้วยความเข้มข้นของตัวทำละลายที่แตกต่างกัน รวมถึงควรสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่นๆ เพื่อหาชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ดีที่สุดที่สามารถสกัดตัวอย่างปากทางเข้ารังของชันโรงได้ดี และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สูงที่สุด

ในการเลือกตัวแทนเชื้อเพื่อนำมาทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด eNEEs ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย คณะผู้วิจัยได้เลือกเชื้อ 3 สายพันธุ์ โดยเลือกจากตัวแทนของเชื้อในกลุ่ม Gram positive cocci, Gram negative bacilli และ Gram negative bacilli nonfermentative bacteria ได้แก่เชื้อ *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ตามลำดับ เนื่องจากเชื้อดังกล่าวมักเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในระบบต่าง ๆ (36) ร่วมกับผลจากการสำรวจการติดเชื้อในกระแสเลือดจากโรงพยาบาลในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าเชื้อที่มีอุบัติการณ์สูงในการติดเชื้อในกระแสเลือด เช่น เชื้อในกลุ่ม coagulase-negative staphylococci, *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *Acinetobacter baumannii* เป็น

ต้น (41) นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวยังเป็นเชื้อสำหรับควบคุมคุณภาพในการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ จึงมีช่วงความเข้มข้นและ inhibition zone ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ตามเกณฑ์ของ CLSI guideline M100-S24 ผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญของเชื้อดังกล่าวจึงนำมาเป็นเชื้อในการทดสอบในงานวิจัยครั้งนี้

ในทำนองเดียวกัน การเลือกเชื้อราเพื่อนำมาทดสอบต่อสาร eNEEs คณะผู้วิจัยมีการเลือกเชื้อรากลุ่มยีสต์ (yeast) เพื่อให้ครอบคลุมกลุ่มของเชื้อราที่มีความสำคัญทางการแพทย์มากที่สุด ในอนาคตผู้วิจัยควรอออกแบบการทดสอบ เพื่อขยายการทดสอบให้ครอบคลุมเชื้อรากลุ่มอื่นๆ เช่น ราสาย (mold) ราสองรูป (dimorphic fungi) เป็นต้น แต่เนื่องจากข้อจำกัดในด้านปริมาณของสารสกัดซึ่งสกัดได้ปริมาณน้อยกว่าที่คาดการณ์ไว้มาก จึงทำให้ผู้วิจัยสามารถทดสอบกับเชื้อยีสต์ 2 ชนิด ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 90028 และ *Cryptococcus neoformans* จาก clinical isolates ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์มีความสำคัญทางคลินิก กล่าวคือ เชื้อเหล่านี้ สามารถก่อโรคบริเวณผิวหนัง ระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบประสาทส่วนกลาง รวมทั้งในกระแสโลหิตได้

ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด eNEEs ผู้วิจัยเริ่มการทดสอบตัวอย่างจากจังหวัดพิษณุโลก เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย คณะผู้วิจัยได้เลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัด eNEEs ที่เติมลงบน disk ปริมาณน้อย คือ 1, 3 และ 5 มิลลิกรัม พบว่า เมื่อทดสอบด้วยวิธี disk diffusion ปริมาณสาร eNEEs ระดับต่ำๆ เหล่านี้ ไม่สามารถให้ inhibition zone ได้ แต่เมื่อผู้วิจัยเพิ่มปริมาณสารเป็น eNEEs ปริมาณ 9 มิลลิกรัม พบว่าให้ผล inhibition zone ต่อเชื้อ *S. aureus* เท่านั้น โดยไม่ให้ผล inhibition zone ต่อเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* :ซึ่งแสดงถึงการยับยั้งเพียงเชื้อ *S. aureus* ผู้วิจัยจึงได้พยายามเพิ่มความปริมาณ eNEEs เป็น 14 mg พบว่ายังคงให้ผลการทดสอบเช่นเดิม (ภาพ 3.1) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสรุปว่าสำหรับสารสกัด eNEEs ที่ได้จากแหล่งอื่นๆ คือ จังหวัดสุโขทัย กำแพงเพชร และเพชรบูรณ์ จะใช้ eNEEs ปริมาณ 9 mg เท่านั้น เพื่อทำการทดสอบด้วยวิธี disk diffusion (ดังแสดงในตาราง 3.1 และได้แสดงตัวอย่าง ภาพ 3.2) อย่างไรก็ตามในการเตรียม disk ของสารสกัดจากสารสกัด eNEEs เพื่อทดสอบด้วยวิธี disk diffusion ใช้วิธีหยดสารสกัดจากสารสกัด eNEEs ลงใน disk เปล่าขนาด 6 mm ที่ปราศจากเชื้อ การเตรียม disk ด้วยวิธีการนี้เกิดปัญหาคือ เมื่อหยดสารสกัดลงไปบน disk เปล่าและรอให้แห้ง จะมีสารสกัดบางส่วนไหลออกมาติดอยู่รอบ ๆ disk เปล่า ทำให้ปริมาณสารบางส่วนอาจคลาดเคลื่อนไปจากปริมาณที่ได้จากการคำนวณ

ในทองนองเดียวกัน ผลการทำ disk diffusion จากตัวอย่าง eNEEs ของแหล่งอื่นๆ พบว่า eNEEs จากจังหวัดสุโขทัย กำแพงเพชร และเพชรบูรณ์ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

S. aureus ได้ดี แต่ไม่ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *P. eruginosa* ทั้งนี้การสรุปผลดังกล่าว คณะผู้วิจัยได้ใช้เกณฑ์ในการอ่านผลการทดสอบ คือ การเกิด inhibition zone รอบ disk ที่มีสารสกัด ไม่ว่าจะขนาดเท่าใดก็ตาม จะแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ทั้งนี้จะต้องอ่านผลควบคู่กับ positive control เพื่อควบคุมสภาวะในการทดสอบ disk diffusion โดยการอ่านผล positive control จะต้องอยู่ใน quality control range ที่ CLSI guideline M100-S24 กำหนด

ในการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution คณะผู้วิจัยได้เลือกใช้ sterility control ที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้เป็น positive control และบ่งบอกถึงระดับความใสของอาหารหากไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ ซึ่งหากในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้เพิ่มการหาค่า MIC ของเชื้อมาตรฐานต่อยา Imipenem และ Cefotaxime ตามเกณฑ์ CLSI guideline จะช่วยควบคุมสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือของงานวิจัยได้

ตามเกณฑ์ของ CLSI guideline จะอ่านผลค่า MIC จากการทดลองด้วยวิธี broth microdilution โดยอ่านความขุ่นของหลุมที่ใสที่สุดที่สามารถดูได้ด้วยตาเปล่า เมื่อเทียบกับ positive control แต่ในงานวิจัยนี้ลักษณะทางกายภาพของสารสกัด eNEEs มีสีเหลืองและมีความขุ่นเล็กน้อยเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งรบกวนการอ่านผลด้วยตาเปล่า ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้วิธีการอ่านผลค่า MIC ด้วยเครื่อง microplate reader เพื่อเป็นการลดข้อจำกัดดังกล่าวลงโดยใช้การอ่านเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของทั้ง positive control และ negative control

จากผลการวิจัยฤทธิ์ของ eNEEs ที่เก็บโดยชันโรง *T. apicalis* ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี microdilution broth พบว่า ตัวอย่างสารสกัด eNEEs จากแหล่งต่างๆ ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* ระหว่าง 12-24 mg/ml ค่า MIC ต่อเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 24 mg/ml และค่า MIC ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ระหว่าง 24-48 mg/ml ขณะที่ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เหมือนกันในแต่ละแหล่งที่เก็บปากทางเข้ารัง กล่าวคือ ให้ค่า MBC ต่อเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *P. aeruginosa* ได้เท่ากับ 24, 24 และ 48 mg/ml ตามลำดับ

สำหรับฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา ผู้วิจัยพบว่า เมื่อทดสอบด้วยวิธี disk diffusion สารสกัด eNEEs จากทุกแหล่งไม่สามารถยับยั้งเชื้อราชนิดยีสต์ได้ โดยให้ผล inhibition zone เท่ากับ 6.0 mm ต่อเชื้อ *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* รวมถึงเมื่อทดสอบด้วยวิธี broth microdilution พบว่าสารสกัด eNEEs จากทุกแหล่งให้ค่า MIC และ MFC ต่อเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์มากกว่า 48 mg/ml ทั้งนี้ผลที่ได้ยังสรุปไม่ได้ว่าปากทางเข้ารังของชันโรงไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ เนื่องจาก

เป็นไปได้ว่าวิธีการสกัดปากทางเข้ารังยังไม่เหมาะสม รวมทั้งปริมาณของสารสกัดที่ใช้ทดสอบอาจมีความเข้มข้นน้อยเกินไป หากต้องการทราบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา จำเป็นต้องหาปริมาณและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดสอบด้วยวิธี disk diffusion และ broth microdilution ตามลำดับ

โดยสรุป การใช้วิธี disk diffusion และ broth microdilution ในการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จะเห็นได้ว่าสารสกัด eNEEs มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีกว่าเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* หรือจะกล่าวได้ว่าสารสกัด eNEEs มีแนวโน้มที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดยเป็นไปในทางเดียวกับงานวิจัยของ Kamonwannasit และคณะ (46) ซึ่งพบว่าสารสกัดจากธรรมชาติจากพืช สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ทั้งนี้อาจเกิดจากโครงสร้างและส่วนประกอบผนังเซลล์ของเชื้อทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม หากต้องการทราบถึงกลไกของสารสกัดที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อจะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จากผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของตัวอย่างสารสกัด eNEEs จากทั้ง 4 จังหวัด พบว่าตัวอย่างสารสกัด eNEEs ทั้งหมดมีฤทธิ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกันแม้แตกต่างกันไม่มาก ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kugumgiev และคณะ (6) ที่แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์จากผึ้งหรือชันโรง (เช่น โพรพอลิส) ที่ได้จากต่างพื้นที่จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ไม่เหมือนกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารชีวเคมีในธรรมชาติ ซึ่งแต่ละพื้นที่จะมีมากหรือน้อยแตกต่างกัน หากต้องการศึกษาถึงสาเหตุที่ทำให้ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมีความแตกต่างกันจะต้องศึกษาองค์ประกอบทางกายภาพหรือทางเคมีในตัวอย่างที่นำมาทำการทดสอบต่อไป

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาถึงผลการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (ไม่ได้แสดงข้อมูลเนื่องจากอยู่นอกเหนือการโครงการนี้) ซึ่งสัมพันธ์กับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัด eNEEs โดยจากงานวิจัยของ Ayoola และคณะ (47) Omogbai และคณะ (48) งานวิจัยของ Shan และคณะ (49) และงานวิจัยของปานทิพย์ บุญส่งและวัลภา เนตรดวงตา (28) ได้กล่าวไว้ว่าสารประกอบฟีนอลิกมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกอาจเป็นส่วนหนึ่งของสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา โดยสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารพฤกษเคมีชนิดหนึ่ง สามารถพบได้ในพืชทุกชนิด สารประกอบฟีนอลิกสามารถแบ่งออกได้หลายชนิด เช่น tannins, alkaloids และ flavonoids เป็นต้น ซึ่งได้มีรายงานถึงการใช้ tannins ในการรักษาอาการท้องร่วงท้องเสีย ดังนั้นฤทธิ์ของ tannins ในการรักษาอาการ

ท้องร่วงอาจสัมพันธ์กับฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ในส่วนของ alkaloids ยังถูกรายงานถึงฤทธิ์ต้านการอักเสบ บรรเทาอาการเจ็บปวด รักษาโรคเก๊าท์ และรักษาโรคมาลาเรีย สำหรับ flavonoids (6) ถูกรายงานถึงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงต้านการอักเสบ (28) แต่คณะผู้วิจัยยังไม่ได้ทำการตรวจแยกเพื่อหาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด eNEEs จึงไม่สามารถระบุชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากในตัวอย่างสารสกัดได้ หากต้องการทราบชนิดของสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก จะต้องทำการตรวจแยกชนิดของสารประกอบ ฟีนอลิกต่อไป

บรรณานุกรม

1. Sawaya AC, Barbosa da Silva Cunha I, Marcucci MC. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. Chem Cent J. 2011;5(27):1-10.
2. Bankova VS, Castro SLd, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie. 2000;31(1):3-15.
3. Farnesi AP, Aquino-Ferreira R, De Jong D, Bastos JK, Soares AE. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. Genet Mol Res. 2009;8(2):635-40.
4. Kubiliene L, Laugaliene V, Pavilonis A, Maruska A, Majiene D, Barcauskaite K, et al. Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. BMC Complement Altern Med. 2015;15:156.
5. Marcucci M, C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie. 1995;26(2):83-99.
6. Kothai S, Jayanthi B. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of stingless bee (*Tetragonula iridipennis*) of Tamilnadu, India. Int J Pharm Pharm Sci. 2014;6(8):81-5.
7. Umthong S, Puthong S, Chanchao C. *Trigona laeviceps* propolis from Thailand: antimicrobial, antiproliferative and cytotoxic activities. Am J Chin Med. 2009;37(5):855-65.
8. Majiene D, Macioniene I, Kursvietiene L, Bernatoniene J, Davalgiene J, Lazauskas R, et al. The effect of propolis on microbial vitality and oxygen consumption. J Med Plants Res. 2010;4(10):953-8.
9. Sawaya AC, Palma AM, Caetano FM, Marcucci MC, da Silva Cunha IB, Araujo CE, et al. Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of Candida. Lett Appl Microbiol. 2002;35(3):203-7.

10. Sawaya AC, Calado JCP, Santos LCd, Marcucci MC, Akatsu IP, Soares AEE, et al. Composition and antioxidant activity of propolis from three species of *Scaptotrigona* stingless bees. JAAS. 2009;1(2):37-42.

11. Kubina R, Kabala-Dzik A, Dziedzic A, Bielec B, Wojtyczka RD, Buldak RJ, et al. The ethanol extract of Polish propolis exhibits anti-proliferative and/or pro-apoptotic effect on HCT 116 colon cancer and Me45 malignant melanoma cells *in vitro* conditions. Adv Clin Exp Med. 2015;24(2):203-12.

12. Borges KS, Brassesco MS, Scrideli CA, Soares AE, Tone LG. Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. Genet Mol Biol. 2011;34(2):310-4.

13. Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Midorikawa K, Matsushige K, Message D, et al. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. J Ethnopharmacol. 2000;72(1-2):239-46.

14. Teerasripreecha D, Phuwapraisirisan P, Puthong S, Kimura K, Okuyama M, Mori H, et al. In vitro antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. BMC Complement Altern Med. 2012;12:27.

15. Alday-Provencio S, Diaz G, Rascon L, Quintero J, Alday E, Robles-Zepeda R, et al. Sonoran propolis and some of its chemical constituents inhibit *in vitro* growth of *Giardia lamblia* trophozoites. Planta medica. 2015;81(9):742-7.

16. Ayres DC, Marcucci MC, Giorgio S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2007;102(2):215-20.

17. Otoguro K, Iwatsuki M, Ishiyama A, Namatame M, Nishihara-Tsukashima A, Kiyohara H, et al. In vitro antitrypanosomal activity of some phenolic compounds from propolis and lactones from Fijian Kawa (Piper methysticum). J Nat Med. 2012;66(3):558-61.

18. Gomez-Escobar E, Liedo P, Montoya P, Vandame R, Sanchez D. Behavioral response of two species of stingless bees and the honey bee (Hymenoptera: Apidae) to GF-120. Journal of economic entomology. 2014;107(4):1447-9.

19. Simone-Finstrom M, Spivak M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. Apidologie. 2010;41(3):295-311.

20. Rasmussen C, Cameron SA. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. Biological Journal of the Linnean Society. 2010;99(1):206-32.

21. Jongjitvimol T, Petchsri S. Native bee pollinators and pollen sources of Apidae (Hymenoptera) in four forest types of lower Northern Thailand. Sains Malaysiana. 2015;44(4):529–36.

22. Jongjitvimol T, Poolprasert P. Pollen sources of stingless bees (Hymenoptera: Meliponinae) in Nam Nao national park. NU International Journal of Science. 2014;11(2):1-10.

23. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem Toxicol. 1998;36(4):347-63.

24. Ewnetu Y, Lemma W, Birhane N. Antibacterial effects of *Apis mellifera* and stingless bees honeys on susceptible and resistant strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* in Gondar, Northwest Ethiopia. BMC Complement Altern Med. 2013;13(269):1-7.

25. Chanchao C, Sintara K, Wongsiri S. Comparison of antibiotic and organoleptic properties of honey from various plant sources in Thailand. J Apic Sci. 2006;50(2):59-64.

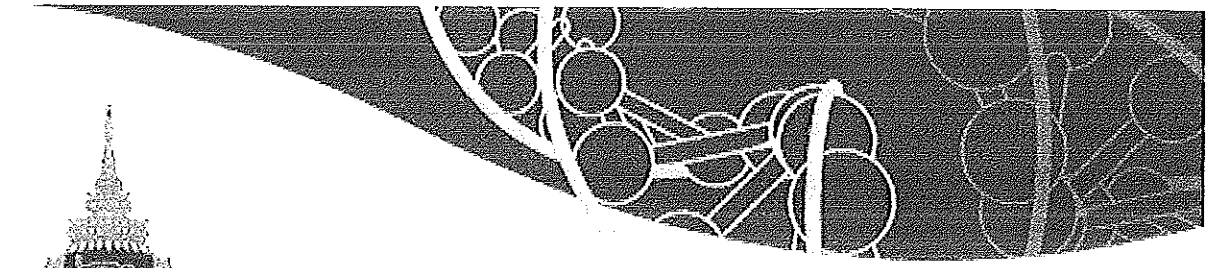
26. Taokaenchan N, Sangsrichan S. HPLC-fluorescence detection method for quantitative determination of tetracycline antibiotic residues in honey. NU Science Journal. 2010;6(2):147-55.

27. Jantakee K, Tragoolpua Y. Activities of different types of Thai honey on pathogenic bacteria causing skin diseases, tyrosinase enzyme and generating free radicals. Biol Res. 2015;48(1):4.

ภาคผนวก

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ที่กิจกรรมวางแผนไว้ และ กิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์ที่กิจกรรมวางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
1. เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของยางไม้จากปากทางเข้ารังของชันโรง *Tetrigona apicalis* ในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย	ได้ดำเนินการวิจัยสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของการวิจัย	ได้ข้อมูลผลของการวิจัยเป็นตามที่ได้ตั้งสมมติฐาน
2. ผลที่คาดว่าจะได้รับคือ ได้ทราบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของยางไม้จากปากทางเข้าออกรังของชันโรง *Tetrigona apicalis* ในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย และทำให้มีข้อมูลเบื้องต้นเพื่อเป็นความรู้พื้นฐานในการต่อยอดงานวิจัยในระยะยาวทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์	ได้ดำเนินการวิจัยสอดคล้องกับผลที่คาดว่าจะได้รับ	ได้ทราบข้อมูลคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของยางไม้จากปากทางเข้าออกรังของชันโรง *Tetrigona apicalis* ในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย และทำให้มีข้อมูลเบื้องต้นเพื่อเป็นความรู้พื้นฐานในการต่อยอดงานวิจัยในระยะยาวทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์
3. ผลสำเร็จและความคุ้มค่าของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ	ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติที่มีค่า Impact Factor	เป็นไปตาม KPI ของการได้รับทุนอุดหนุนงานวิจัย



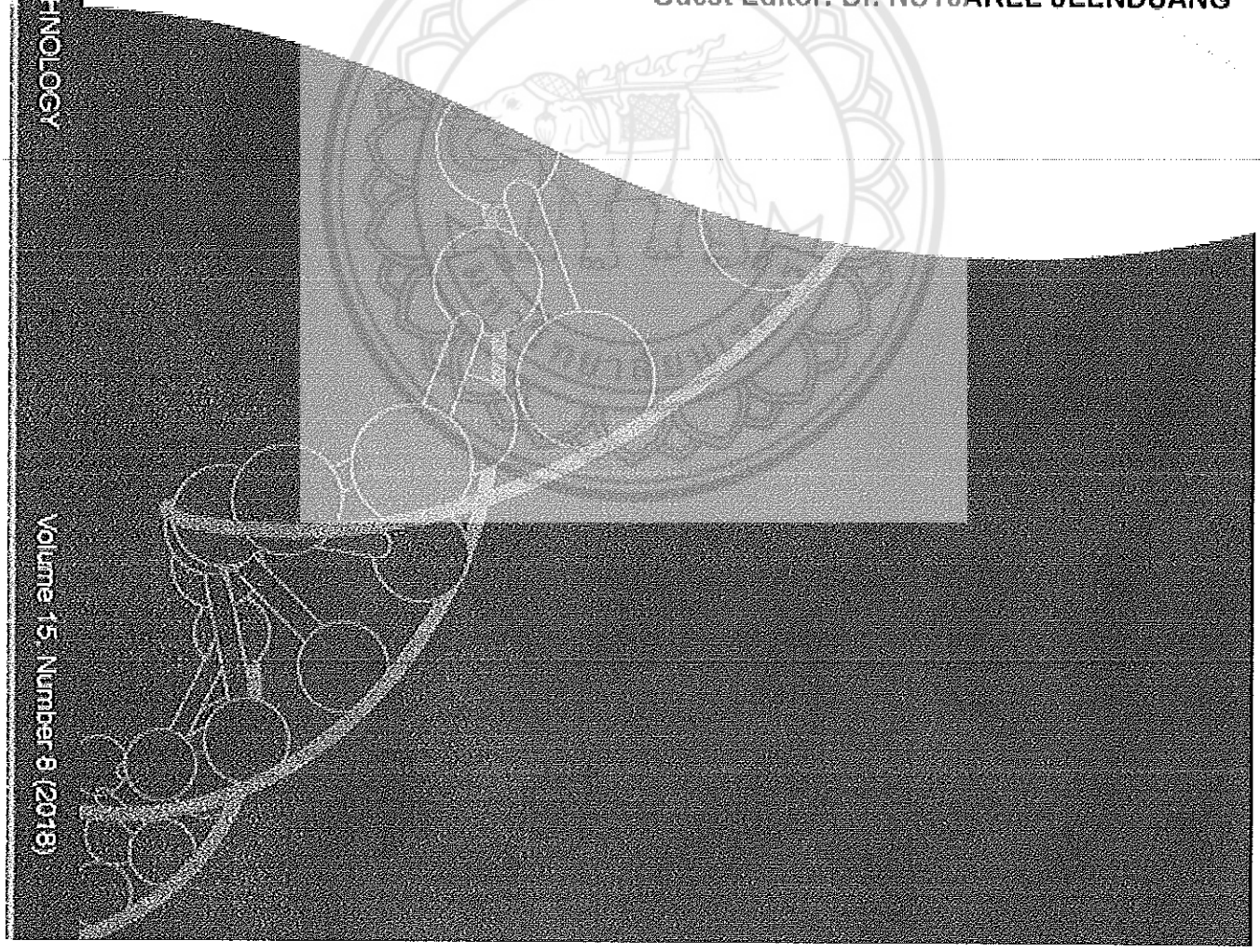
WALAILAK JOURNAL

OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

Volume 15, Number 8, 2018

Special Issues on **Medicinal Plants**

Guest Editor: Dr. NUTJAREE JEENDUANG



WALAILAK JOURNAL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY Volume 15 Number 8 (2018)

0 6 ต.ค. 2561
1034760

WALAILAK JOURNAL
http://wjst.wu.ac.th
Health Sciences

Antibacterial Effect of Plant Resin Collected from *Tetrigona apicalis* (Smith, 1857) in Thung Salaeng Luang National Park, Phitsanulok

Sathirapong KRAIKONGJIT[1], Touchkanin JONGJITVIMOL[2], Naklao MIANJINDA[3], Nutta SIRITHEP[3], Thodsaporn KAEWBOR[3], Noppadon JUMROON[3] and Jirapas JONGJITWIMOL[3,*]

[1]*Department of Biomedical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand*
[2]*Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat Phitsanulok, Phitsanulok 65000, Thailand*
[3]*Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, 65000, Thailand*

(*Corresponding author's e-mail: jirapasj@nu.ac.th)

Received: 30 March 2017, Revised: 3 November 2017, Accepted: 14 December 2017

Abstract

Tetrigona apicalis (Smith, 1857) is a common species of stingless bee found in lower northern Thailand. In previous studies, the propolis of stingless bees has been shown to have antibacterial properties, due to its chemically contained phenolic contents. The major component of propolis is resin. The purpose of this study, therefore, was to evaluate the antibacterial activities of crude resin extracts by disk diffusion and broth microdilution methods. We also determined the total phenolic contents using the Folin-Ciocalteau method and, to detect individual polyphenolic contents, we used the high performance liquid chromatographic method. Two samples of resin were collected from Thung Salaeng Luang National Park, Phitsanulok. The first sample was from fresh plants, which stingless bees used for nest construction. The second sample was taken from entrances of the bee's nest. All samples were macerated in 30 % ethanol and incubated at room temperature for 14 days. The supernatants were filtered and ethanol residues then removed as ethanolic resin extracts (eREs). The antibacterial activity of the extracted resins against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 was examined. The disks containing 9 and 14 mg of eREs produced obvious inhibition zones against *S. aureus*, but did not show zones against *E. coli* and *P. aeruginosa*. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the eREs against the bacterial strains tested were variously between 6 and 48 mg/ml, whereas the minimum bactericidal concentrations (MBCs) were from 12 to 48 mg/ml. The amount of the total phenolic compounds in the eREs from the fresh resin was 9,908 mg of pyrogallol equivalent (PGE) per kg of eREs, and from the nest entrances, 14,740 mg per kg. We also found that hydroquinin had the highest concentration in both extracts. In conclusion, the crude resin extracts demonstrated antibacterial properties against the *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* strains tested. They also contained phenolic compounds which were active antibacterial agents. We have identified new and novel knowledge which can be used as preliminary data, leading to further, more detailed, investigation of the mechanistic action of the resin against bacterial cells.

Keywords: Antibacterial activity, nest entrances, resin extracts, stingless bees, *Tetrigona apicalis*

Introduction

Stingless bees are a group of native eusocial pollinators, and are commonly found in tropical and subtropical countries [1,2], including Thailand, where stingless bees are endemic to all the regions of the country [3]. Stingless bees have been identified over 5 genera and 35 species, including *Tetrigona apicalis* (Smith, 1857), which is the most abundant species found in lower northern Thailand [4], especially in Thung Salaeng Luang National Park [3]. They normally collect plant resin as a major product for mixing with their biological materials (e.g., enzymes) and other components (e.g., pollen, soil) in order to form propolis and to build their nest entrance [5,6]. These structures are used for protection against their enemies [6].

Natural products (e.g., propolis, honey) from stingless bees and honey bees have been characterized as a food supplement, and are used in traditional medicines due to their having various biological activity, including antimicrobial activity, antiproliferative activity, and antioxidant activity [7]. However, the level of these properties vary depending on plant sources, geographical areas, and bee species [8,9].

Propolis is a resinous material produced by bees and used for sealing their nests. It consists of 50 % plant resin, 30 % wax, 10 % oil, 5 % pollen, and 5 % other organic compounds [8]. The chemical composition of propolis has been characterized as usually containing a group of phenolic compounds, fatty acids, amino acids, polysaccharides, and other compounds in trace amounts [10,11]. Antibacterial activity is the most studied aspect of the propolis produced by stingless bees [12,13]. However, the similarities and differences in the antibacterial activity of fresh plant resin and of the resin surrounding nest entrances have not yet been characterized, which led us to characterize both the former, which is collected by the bees and is a major component of the propolis, and the latter, used in the nest entrances.

Our assumption was that the antibacterial activity of the natural product could depend on the different sources of wood resin in each area, giving rise to the question of whether or not the resin from the fresh plant and the resin surrounding the nest entrances have the same antibacterial effects against certain pathogenic bacteria strains, in particular, the bacterial strains of the gram positive *Staphylococcus aureus* and the gram negative *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. These 3 strains are important causes of diseases in several human body systems, e.g., the blood system [14,15]. Given that *T. apicalis* is commonly found in Thung Salaeng Luang National Park, Phitsanulok, which is close to our facilities, we were able to conveniently use the species to guide us to the particular plant types from which they collected the resin. Additionally, there was an ample availability of nest entrances from which to collect that resin.

Samples of both resins were extracted *in vitro* and investigated to determine the antibacterial effects of the ethanolic resin extracts (eREs) from the 2 sources; the resin collected by the stingless bees, referred to as eREs-1, and the resin surrounding the nest entrances, referred to as eREs-2. Additionally, the expected phenolic contents of those extracts were also analyzed.

Materials and methods

Collection and species identification of stingless bees

Stingless bees were collected from Thung Salaeng Luang National Park, Phitsanulok Province and, following correct identification of them as being *T. apicalis*, were preserved in 70 % ethanol solution. Species identification was made according to the key characteristics stated in Rasmussen *et al* [16]. The preserved specimens were then kept in the Entomology Laboratory at Pibulsongkram Rajabhat University in Phitsanulok.

Plant resin extraction

Two samples of plant resin were collected from different locations in Thung Salaeng Luang National Park. The first sample was from plant resin (known from *Dipterocarpus turbinatus*) which was known to be collected by *T. apicalis* (no. 1). The second sample was from the nest entrances of *T. apicalis* (no. 2). A sample of 100 g was ground and then added into 100 ml of 30 % ethanol. The mixtures were left at room temperature and shaken once a day for 14 days, after which time they were filtrated. The

solvents were then totally evaporated using a rotary evaporator (Buchi R-124, Switzerland) at 40 °C. Finally, the ethanolic resin extract from the plant resin, which we named eREs-1, and from the nest entrance sample, eREs-2, were kept at 4 °C for further analysis. The eREs were then dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) before use.

Bacterial strains and identification

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were obtained from Dr. Noppadon Jumroon, Naresuan University, Thailand, for use in this study. All strains were cultured on blood agar (HIMEDIA, India) at 37 °C for 18 h, and then the species identified using phenotypically biochemical media (HIMEDIA, India) according to the manual of clinical microbiology [17].

Preparation of inoculations

The bacterial strains were inoculated onto 2 ml of trypticase soy broth (TSB, HIMEDIA, India) at 37 °C for 3 - 4 h. The cultured strains were then suspended in sterile saline solution to adjust the turbidity by comparison with a No. 0.5 McFarland standard. The final number of bacteria was approximately 1.5×10^8 CFU/ml.

Antimicrobial susceptibility test using disk diffusion agar

The surfaces of Müller Hinton agar plates (MHA, OXOID, Thermo Fisher Scientific, USA) were totally inoculated using a sterile swab containing the prepared inoculations of each stain and allowed to dry for a few minutes. Paper disks (6 mm in diameter) containing 9 and 14 mg of the eREs were placed on the MHA plates. Antibiotic disks (30 µg cefotaxime or 10 µg imipenem) were also placed on the plates as positive controls, and blank disks placed as negative controls (OXOID, Thermo Fisher Scientific, USA). The plates were incubated at 37 °C for 16 - 20 h, and the inhibition zones were then measured using a vernier caliper. All tests were independently performed in triplicate.

Antimicrobial susceptibility test using broth microdilution method

After preparation of the inoculated bacterial strains, 100 µl of the bacterial suspension was diluted into 1.9 ml of sterile saline (dilution as 1:20) to obtain about 5×10^6 CFU/ml. To determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) of the eREs, 96-well plates (flat bottom type) were used. Two-fold serial dilutions of the eREs were performed on a 100 µl final volume of Müller Hinton broth (MHB, HIMEDIA, India) in order to contain 48, 24, 12, and 6 mg/ml concentrations of the eREs. Then, 10 µl of the 1:20 bacterial suspension was added into each well. The plates were incubated at 37 °C for 16 - 20 h to observe the turbidity as optical density (OD) using a microplate reader (EnSpire, PerkinElmer, USA) at a wavelength of 620 nm by comparison with the OD values of positive (only MHB without antibiotics or eREs) and negative (saline solution) controls. The minimum bactericidal concentration (MBC) was also determined by subculturing 10 µl of the MHB mixture from the previous MIC tests on MHA plates in order to observe bacterial growth after 24 h incubation at 37 °C. Having no growth on the plates indicated the MBC values of the eREs. The samples for these tests were independently performed in triplicate.

Measurement of total phenolic compounds and polyphenolic contents

The total phenolic compounds of the eREs were determined using the Folin-Ciocalteau method [18]. Briefly, 4 µl of the eREs and standard solutions were diluted with 100 µL of deionized water. Then, 20 µl of the mixtures were added into 100 µL of the diluted (1:10) Folin-Ciocalteau reagent. The reaction tubes were incubated at room temperature for 5 min. Eighty µL of 4 % sodium carbonate solution was added and incubated at room temperature for 2 h. The ODs of the eREs samples and pyrogallol standards were then measured at 740 nm using the microplate reader. The absorbance of the samples was compared with the curve of the standard concentrations, and the total phenolic compounds of eREs were recorded in mg pyrogallol equivalent/mg of dry extracts. For the measurement of the polyphenolic contents, the eREs were analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC) with a diode array detector and

mass spectrometry method (HPLC-DAD/MSD) from Agilent Technologies (1100 series, Waldbronn, Germany). The procedure was described in previous work [19].

Results and discussion

Disk diffusion demonstrated inhibition zones against *S. aureus*

In our study, we used the disk diffusion method as a screening tool for detecting the antibacterial activity of the ethanolic resin extracts. The results showed that the representative sample of the gram positive microorganism *S. aureus* ATCC 25923 was narrowly inhibited by both the fresh plant resin (eREs-1) and the resin material from nest entrances (eREs-2) (**Figure 1** and **Table 1**).

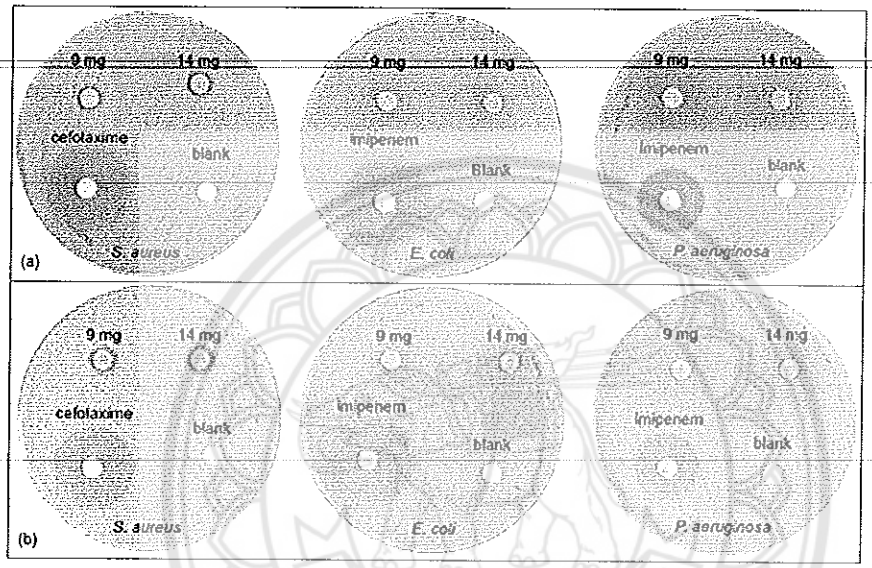


Figure 1 The antibacterial effect of the eREs was shown by disk diffusion agar. There were 2 samples of eREs, namely (a) eREs from plant resin, and (b) eREs from the nest entrance, which showed inhibition zones (mm) against *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, and *P. aeruginosa* ATCC 27853.
Note: "9 mg" and "14 mg" represented the disks containing 9 mg and 14 mg of eREs, respectively. "cefotaxime" and "imipenem" represented the disks containing 30 µg cefotaxime and 10 µg imipenem, respectively, as positive controls whereas "blank" represented empty disks as negative controls.

Unlike the result of *S. aureus*, neither extract sample obviously showed a clear inhibition zone around the paper disk against *E. coli* ATCC 25922 or *P. aeruginosa* ATCC 27853. These results suggest that, while the eREs-1 and eREs-2 both manifested similar bacterial inhibition against the *S. aureus* strain, neither resin type fully inhibited *E. coli* ATCC 25922 or *P. aeruginosa* ATCC 27853. Therefore, it is suggested that the gram positive bacteria is more sensitive to the resin extracts than the gram negative bacteria. However, while the eREs appear to have an ability to interrupt the synthesis of the bacterial cell wall, their roles in this effect are still unknown [20].

It is possible that the amount of the eREs used (9 and 14 mg) in our tests was not enough for them to present antibacterial activity against the 2 gram negative strains when tested under the disk diffusion method. Previous studies have shown that a higher amount of natural products (e.g., propolis) had a greater inhibitory effect on the bacteria, demonstrating a dose-dependent effect [21]. However, we were not able to increase the amount of the eREs used in our tests because we had a limited amount of the extracts available. Our intention to do further analysis by the antimicrobial susceptibility technique using

the broth microdilution method required our available extract. The inhibition zone occurring on the plate means only bacterial growth inhibition, not mean bacterial death, and it was necessary to apply the broth microdilution method to further distinguish the bacteriostatic and bactericidal effects [22].

Table 1 The antibacterial results of the eREs determined by disk diffusion method, demonstrating inhibition zones (mm) against the 3 strains tested.

eREs or control disks	Inhibition zone of bacteria (mm)					
	S. aureus		*E. coli*		*P. aeruginosa*	
	9 mg	14 mg	9 mg	14 mg	9 mg	14 mg
eREs-1	8.1±0.1	8.8±0.2	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
eREs-2	9.4±0.6	10.4±0.3	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
Positive control (antibiotics)	27.0±2.0 (cefotaxime)		29.0±3.0 (imipenem)		22.0±2.6 (imipenem)	
Negative control (blank disk)	6.0±0.0		6.0±0.0		6.0±0.0	

Note: *S. aureus* used was *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E. coli* used was *Escherichia coli* ATCC 25922, and *P. aeruginosa* used was *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

The ethanolic resin extracts obviously inhibited the 3 bacterial strains using broth microdilution methods

The antibacterial properties of the ethanolic samples were also analyzed using broth microdilution methods, modified from the CLSI guidelines. It was found that there were a wide range of antibacterial activities against *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* strains (**Table 2**). The overall MIC values of the 2 eREs showed a range between 6 and 48 mg/ml (**Table 2**), while the MBC values ranged from 12 to 48 mg/ml (**Table 2** and **Figure 2**) in the 3 bacterial strains.

Specifically, the MIC values of eREs-1 were higher against the *S. aureus* (12 mg/ml) and *E. coli* (24 mg/ml) strains than against those of the eREs-2 (6 and 12 mg/ml, respectively), whereas the MIC value of the eREs-1 (48 mg/ml) against the *P. aeruginosa* was observed to be higher than that of the eREs-2 (24 mg/ml). This suggests that the eREs from fresh plant resin had a lesser bacterial inhibition effect than the eREs from nest entrances. Similar to the MIC values, the MBC values of the eREs-1 were higher than those of the eREs-2. This may be because the nest entrances do not only contain the resin, but also contain other organic and inorganic components, e.g., soil, pollen, etc. [6], which may affect the antibacterial activities of hive entrances in terms of both the inhibition and killing effects against the microorganisms.

The MIC values of the eREs-1 and eREs-2 against *S. aureus* were observed at 12 and 6 mg/ml, whereas the MBC values were observed at 24 and 12 mg/ml. For the antibacterial effect against *E. coli*, the MIC and MBC values of the eREs-1 were both 24 mg/ml, while the MIC and MBC values of the eREs-2 were equal at 12 mg/ml. The MIC and MBC values against the *P. aeruginosa* tested were 48 mg/ml for eREs-1, and 24 mg/ml for eREs-2. This means that both samples were observed to show greater inhibition of the growth of *S. aureus* ATCC 25923 than that of both *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853. It was found that the ethanolic resin extracts could kill *S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 25922 more effectively than killing *P. aeruginosa* ATCC 27853. In summary, the results indicate that both eREs inhibit and kill all organisms tested and, further, that the resin extracts inhibit and kill gram positive bacteria more effectively than gram negative bacteria, *in vitro*. This is consistent with other research, demonstrating that these natural products inhibit gram positive bacteria more effectively than gram negative bacteria [21,23]. The mechanism of this is not yet known; the possible reasons may involve the inhibition of cell wall synthesis in gram positive bacteria or the penetration of some molecules in eREs through the outer membrane of gram negative bacteria.

Table 2 The antibacterial results of the eREs determined by the broth microdilution method, demonstrating MIC and MBC (mg/ml) against the 3 strains tested.

Bacterial strains	Resin collected by *T. apicalis* (eREs-1)		Resin from the nest entrance of *T. apicalis* (eREs-2)	
	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
S. aureus ATCC 25923	12	24	6	12
E. coli ATCC 25922	24	24	12	12
P. aeruginosa ATCC 27853	48	48	24	24

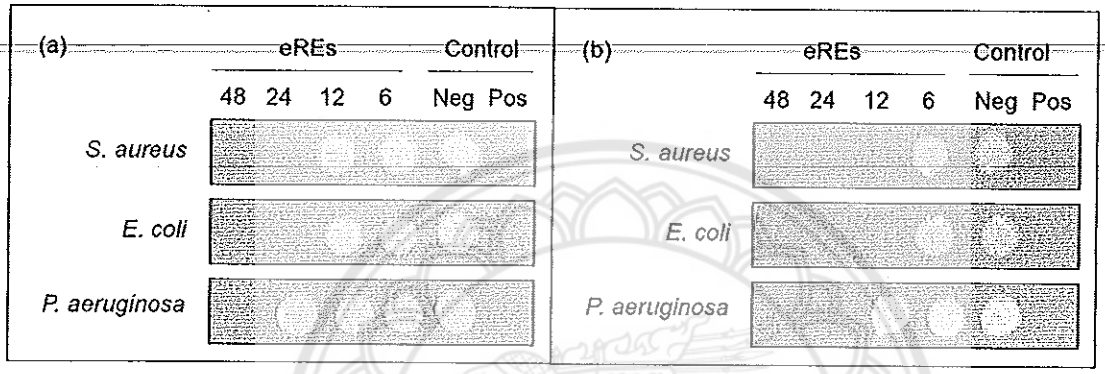


Figure 2 The MBC analysis of the eREs from (a) plant resin, collected by *T. apicalis*, and (b) the nest entrance, showing as a spot of colonies grown on MHA.

Phenolic compounds and the specific compositions of the eREs presented

We also investigated the chemical components of the eREs, particularly the total phenolic compounds (TPCs) and the specific chemicals related to the phenolic compounds. The results are shown in **Table 3**. The amount of the TPCs in the eREs from the fresh resin was 9,908 mg of PGE per kg of eREs and, from the nest entrances, 14,740 mg of PGE per kg. As we expected, phenolic compounds were detected in both resin extracts, because the compounds are normally found in most plants and plant-related products [21,24]. Hydroquinin was the major phenolic content found in both of the eREs, while quercetin and tannic acid were the second and third most abundant phenolic compounds. In addition, gallic acid, eriodictyol, isoquercetin, and catechin were also detected in both samples, but in quantities of 68 mg/kg of dried eREs or less, whereas apigenin and kaempferol were not detectable. Rutin was only found in the eREs from the nest entrances. These results are similar to other reports on the antimicrobial properties of propolis and honey, but are different in terms of the component variety [8,21,25-27]. The results suggest that phenolic compounds might be active molecules which have bacteriostatic and bactericidal properties. However, to fully demonstrate this, it will be necessary to perform further work, whereby the specific substances would be purified and the antibacterial activities of the purified chemicals re-evaluated.

Table 3 The total phenolic compounds and specific compositions in the eREs

Chemical contents	Amount of phenolic compound	
	Resin collected by *T. apicalis* (eREs-1)	Resin from the nest entrance of *T. apicalis* (eREs-2)
Total phenolic compounds (mg of PGE/kg of the eREs)	9,908	14,740
Polyphenolic content (mg/kg of dried eREs)		
Gallic acid	25	36
Eriodictyol	42	68
Apigenin	Not detected	Not detected
Isoquercetin	12	30
Kaempferol	Not detected	Not detected
Quercetin	181	321
Hydroquinin	205	352
Rutin	Not detected	27
Catechin	35	48
Tannic acid	69	191

Conclusions

The ethanolic resin extracts in this study were proven to have antibacterial properties, containing as they did phenolic compounds which may be actively antibacterial. This previously untested information is useful as preliminary data, and should lead to a deeper investigation of these resins. We suggest that these resins can also be used in alternative medical applications. However, it will be necessary to further determine the antibacterial activities of the specific substances in the resins, and also to investigate their mechanistic actions against extended pathogenic bacterial cells.

Acknowledgements

This study was funded by the Higher Education Research Promotion (HERP) and Plant Genetic Conservation Project Under the Royal Initiation of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn - Pibulsongkram Rajabhat University (RSPG - PSRU), the Faculty of Allied Health Sciences Research Funding, Naresuan University, Thailand, and the Naresuan University Research funds, Naresuan University, Thailand (R2560C137). Many thanks to Mr. Roy Morien of the Naresuan University Language Centre for his editing assistance and advice on the English expression used in this document.

References

[1] CD Michener. *The Bees of the World*. Vol I. 2nd ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2007, p. 803-29.
[2] C Rasmussen and SA Cameron. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biol. J. Linnean Soc.* 2010; **99**, 206-32.
[3] T Jongjitvimol and S Petchsri. Native bee pollinators and pollen sources of Apidae (Hymenoptera) in four forest types of lower Northern Thailand. *Sains Malays.* 2015; **44**, 529-36.
[4] T Jongjitvimol and P Poolprasert. Pollen sources of stingless bees (Hymenoptera: Meliponinae) in Nam Nao national park. *NU. Int. J. Sci.* 2014; **11**, 1-10.

[5] SD Leonhardt and N Bluthgen. A sticky affair: Resin collection by bornean stingless bees. *Biotropica* 2009; **41**, 730-6.
[6] DW Roubik. Stingless bee nesting biology. *Apidologie* 2006; **37**, 124-43.
[7] A Rattanawannee and C Chanchao. *Bee Diversity in Thailand and the Applications of Bee Products. In*: O Grillo and G Venora (eds.). Changing Diversity in Changing Environment. InTech, Rijeka, 2011, p. 133-62.
[8] S Huang, CP Zhang, K Wang, G Li and FL Hu. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* 2014; **19**, 19610-32.
[9] A Kujumgiev, I Tsvetkova, Y Serkedjieva, V Bankova, R Christov and S Popov. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.* 1999; **64**, 235-40.
[10] MC Marcucci. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 1995; **26**, 83-99.
[11] VS Bankova, SLD Castro and MC Marcucci. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000; **31**, 3-15.
[12] MK Choudhari, SA Punekar, RV Ranade and KM Paknikar. Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona* sp.) propolis used in the folk medicine of Western Maharashtra, India. *J. Ethnopharmacol.* 2012; **141**, 363-7.
[13] S Kothai and B Jayanthi. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of stingless bee (*Tetragonula iridipennis*) of Tamilnadu, India. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2014; **6**, 81-5.
[14] J Wu, T Gan, Y Zhu, J Cao, C Ji, Y Wu and B Lv. Epidemiology and microbiology of nosocomial bloodstream infections: analysis of 482 cases from a retrospective surveillance study. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 2015; **16**, 70-7.
[15] H Wisplinghoff, T Bischoff, SM Tallent, H Seifert, RP Wenzel and MB Edmond. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* 2004; **39**, 309-17.
[16] C Rasmussen. Catalog of the Indo-Malayan/Australasian stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Zootaxa* 2008; **1935**, 1-80.
[17] JH Jorgensen, MA Pfaller, KC Carroll, G Funke, ML Landry, SS Richter and DW Warnock. *Manual of Clinical Microbiology*. Vol I. 11th ed. ASM Press, Washington DC, 2015, p. 350-790.
[18] I Margeretha, DF Suniarti, E Herda and ZA Masud. Optimization and comparative study of different extraction methods of biologically active components of Indonesian propolis *Trigona* spp. *J. Nat. Prod.* 2012; **5**, 233-42.
[19] C Srimaroeng, A Ontawong, N Saowakon, P Vivithanaporn, A Pongchaidecha, D Amornlerdpison, S Soodvilai and V Chatsudthipong. Antidiabetic and renoprotective effects of cladophora glomerata Kützing extract in experimental type 2 diabetic rats: A potential nutraceutical product for diabetic nephropathy. *J. Diabetes Res.* 2015; **2015**, 320167.
[20] S Kamonwannasit, N Nantapong, P Kumkrai, P Luecha, S Kupittayanant and N Chudapongse. Antibacterial activity of *Aquilaria crassna* leaf extract against *Staphylococcus epidermidis* by disruption of cell wall. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2013; **12**, 20.
[21] CF Massaro, TJ Smyth, WF Smyth, T Heard, SD Leonhardt, M Katouli, HM Wallace and P Brooks. Phloroglucinols from anti-microbial deposit-resins of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*). *Phytother. Res.* 2015; **29**, 48-58.
[22] M Balouiri, M Sadiki and SK Ibnsouda. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 2016; **6**, 71-9.
[23] VD Wagh. Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2013; **2013**, 308249.
[24] L Kubiliene, V Laugaliene, A Pavilonis, A Maruska, D Majiene, K Barcauskaite, R Kubilius, G Kasparaviciene and A Savickas. Alternative preparation of propolis extracts: Comparison of their composition and biological activities. *BMC Compl. Altern. Med.* 2015; **15**, 156.

[25] Y Ewnetu, W Lemma and N Birhane. Antibacterial effects of *Apis mellifera* and stingless bees honeys on susceptible and resistant strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* in Gondar, Northwest Ethiopia. *BMC Compl. Altern. Med.* 2013; **13**, 1-7.
[26] ZH Israili. Antimicrobial properties of honey. *Am. J. Ther.* 2014; **21**, 304-23.
[27] K Ramanauskienė, AM Inkėnienė, V Petrikaitė and V Briedis. Total phenolic content and antimicrobial activity of different Lithuanian propolis solutions. *Evid. Based Compl. Alternat. Med.* 2013; **2013**, 842985.