รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการเลี้ยงชันโรงเพื่อผลิตน้ำผึ้งสมุนไพร และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้

The Study of Stingless Bee Keeping for Medicinal Honey Production and The Biologically Active Compounds from it's Products

คณะผู้วิจัย

อรวรรณ ดวงภักดี ปรีชา รอดอิ่ม มนัญญา เพียรเจริญ และ สุภาวดี ชมภูพันธ์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปีงบประมาณ 2553

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2553 ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ศุภลักษณ์ สุดขาว มหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง ในข้อชี้แนะ ความช่วยเหลือและร่วมมืออย่างดียิ่งในการใช้เครื่องมือและทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์จากชันโรง ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. เฉลิมชัย วงษ์อารี สายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์การวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ขอบพระคุณ ดร. ธิติมา วงษ์ชีรี ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะต่างๆ ตลอดช่วงการทำวิจัยและขอขอบพระคุณเกษตรกรทุกท่าน ที่กรุณาให้ความร่วมมือและใช้พื้นที่ในการศึกษาวิจัย จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะวิจัย

กรกฎาคม 2554

Abstract

Honey from stingless bees has recently become of interest because of its medicinal properties. Comparisons of honey and propolis yields from four common species of stingless bee of Thailand (*Trigona pagdeni*, *Trigona laeviceps*, *Trigona terminata*, *Trigona fuscobalteata*) kept in the wooden boxes showed that the total yields from best to worst for honey production was *T. pagdeni*, *T. laeviceps, T. terminata* and then *T. fuscobalteata;* and for propolis *T. terminata*, *T. pagdeni*, *T. laeviceps* and *T. fuscobalteata* respectively.

The compositions of honey from three stingless bee species, *T. pegdeni*, *T.laeviceps* and *T. terminata*, collected from experimental areas in Ratchaburi province, Thailand were analyzed for apparent reducing sugar, calculated as invert sugar, moisture content, apparent sucrose, water insoluble solids, mineral (ash), acidity, diastase activity, hydroxymethylfurfural and food additives contents. The results revealed that stingless bee honey has free acidity and moisture content higher than maximum established for *A. mellifera* honey while total reducing sugars content were lower than a minimum established for *A. mellifera* honey.

Antimicrobial activity was assayed by agar well diffusion for products from *T. pagdeni*, *T. laeviceps* and *T. terminata* and paper disc diffusion for products from *T. laeviceps*. Honey and crude extracts of propolis was tested on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Micrococcus aeruginosa* (gram + bacteria), *Escherichia coli* (gram - bacteria) and *Candida albicans* (yeast). The results presented that stingless bee honey show antimicrobial activity. Honey from *T. laeviceps* show the highest zone of inhibition against all tested microbes. Honey from *T. pagdeni*, *T. terminata* and *T. fuscobalteata* has no effect against *C. albicans*. The tested microbes also showed clear zone against extracts of propolis. Ethly acetate extracts of propolis were found to contain higher antimicrobial activity than hexane and methanol extracts. The microbial inhibition efficiency was various depending on the origin of products and the microbe species.

Ethly acetate extracts were further analyzed by partial purification using column chromatography and then characterized by GC-MS. Their mass spectra were compared with an existent spectrum library. As a result, four chemical groups were identified: diterpenoids, triterpenoids, long chained hydrocarbons and phenol derivatives. Moreover, about eighteen compounds which were found in significant quantities in the positive fractions could not be identified by comparison to the spectra contained within the reference library.

Keyword: Meliponiculture, Stinglessbee honey, Propolis, Inhibition zone, Biological active compounds

บทคัดย่อ

ปัจจุบันน้ำผึ้งจากชันโรงได้รับความสนใจมากขึ้นเนื่องจากมีคุณสมบัติทางยาสูง ผลเปรียบเทียบการเลี้ยงชันโรงเพื่อเก็บผลผลิตจากชันโรง 4 ชนิดที่นิยมเลี้ยง คือ *Trigona pagdeni*, *Trigona laeviceps*, *Trigona terminata*, *Trigona fuscobalteata* โดยวิธีการเลี้ยงในกล่องไม้มาตรฐาน พบว่าปริมาณผลผลิตน้ำผึ้งเรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยคือ *T. pagdeni*, *T. laeviceps*, *T. terminata* และ *T. fuscobalteata* และปริมาณผลผลิตพรอพอลิสเรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อย คือ *T. terminata*, *T. pagdeni*, *T. laeviceps* และ *T. fuscobalteata* ตามลำดับ

การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำผึ้งจากชันโรง 3 ชนิด *T. pagdeni*, *T. laeviceps* and *T. terminata*ที่เก็บได้จากพื้นที่วิจัยในจังหวัดราชบุรี โดยวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำผึ้งตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม คือ น้ำตาลรีดิวซิงคิดเป็นน้ำตาลอินเวิร์ต ความชื้น ซูโครส สารที่ไม่ละลายน้ำ เถ้า ความเป็นกรด ค่าไดแอสเตสแอกติวิตี ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัล และวัตถุเจือปนอาหาร พบว่าน้ำผึ้งจากชันโรงมีความเป็นกรดและความชื้นสูงกว่ามาตรฐาน แต่มีน้ำตาลรีดิวซิงน้อยกว่ามาตรฐาน คุณลักษณะอื่นๆ ตรงตามเกณฑ์มาตรฐานตามที่กำหนด

ผลวิจัยประสิทธิภาพของน้ำผึ้งจาก *T. pagdeni*, *T. laeviceps* และ *T. terminata* ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีซึมผ่านของสารเข้าสู่เนื้อวุ้นและวิธีซึมผ่านของสารจากกระดาษกับเชื้อจุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ*Micrococcus aeruginosa* (แบคทีเรียแกรมบวก), *Escherichia coli* (แบคทีเรียแกรมลบ) และ *Candida albicans* (ยีสต์) พบว่าน้ำผึ้งจากชันโรงทั้ง 3 ชนิด แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี โดยน้ำผึ้งจากชันโรงชนิด *T. laeviceps* มีประสิทธิภาพสูงสุดและสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้ทุกชนิด ในขณะที่น้ำผึ้งจาก *T. padgeni*, *T. terminata* และ *T. fuscobalteata* ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ได้ ในส่วนของสารสกัดพรอพอลิสพบว่าสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี โดยสารสกัดเอทิลอะซิเตตแสดงประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อเทียบกับสารสกัดเฮกเซนและเมทานอล พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์มีความหลากหลายขึ้นอยู่กับลักษณะพื้นที่ที่เลี้ยงเพื่อเก็บผลิตภัณฑ์และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

การนำสารสกัดเอทิลอะซิเตตมาแยกต่อด้วยวิธีโครมาโทรกราฟีแบบคอลัมน์ และวิเคราะห์องค์ประกอบในส่วนย่อยที่แสดงฤทธิ์โดยใช้ GC-MS แล้วเปรียบเทียบกับสเปกตรัมในฐานข้อมูล พบว่าประกอบด้วยสารกลุ่ม ไดเทอร์ปินอยด์ ไตรเทอร์ปินอยด์ ไฮโดรคาร์บอนโซ่ยาว และอนุพันธ์ของฟีนอล และยังมีสารอีกประมาณ 18 ชนิดที่พบในปริมาณมากอย่างมีนัยสำคัญแต่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้

คำสำคัญ: การเลี้ยงชันโรง, น้ำผึ้งชันโรง, พรอพอลิส, ขอบเขตการยับยั้ง, สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)		ก
บทคัดย่อ		ข
สารบัญเรื่อง (Table of Contents)		ง
สารบัญตาราง (List of Tables)		ฉ
สารบัญภาพ (List of Illustrations)		ช
บทที่ 1	**บทนำ (Introduction)**	1
บทที่ 2	**วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods)**	5
2.1	ศึกษาพันธุ์ของชันโรงที่มีความเหมาะสมต่อการนำมาเลี้ยงเพื่อเก็บผลผลิต	5
2.2	วิเคราะห์น้ำผึ้งจากชันโรงเพื่อสร้างมาตรฐานสู่ท้องตลาด	8
2.3	ศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีที่สำคัญของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากชันโรง	8
2.4	การอบรมถ่ายทอดเทคโนโลยีให้เกษตรกรผู้เลี้ยงชันโรง	12
บทที่ 3	**ผลการวิจัย (Results)**	13
3.1	สายพันธุ์ชันโรงที่เหมาะสมจะนำมาเลี้ยงเพื่อเก็บผลผลิต	13
	3.1.1 สายพันธุ์ชันโรงที่เลี้ยงในประเทศไทย	13
	3.1.2 ชีววิทยาของชันโรงแต่ละชนิดและลักษณะพื้นที่วิจัย	14
	3.1.3 การเจริญเติบโตของรังชันโรงการวิเคราะห์ด้วยวิธี Image Analysis	16
	3.1.4 ผลผลิตที่ได้	17
3.2	การวิเคราะห์น้ำผึ้งจากชันโรงเพื่อสร้างมาตรฐานสู่ท้องตลาด	19
3.3	ผลการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำผึ้งและพรอพอลิสจากชันโรง	21
	3.3.1 ลักษณะทางกายภาพของน้ำผึ้งและสารสกัดพรอพอลิส	21
	3.3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Agar Diffusion Assay	21
	3.3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Paper disc diffusion assay	24
3.4	ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ต่อแบคทีเรียก่อโรคจากการแยกแฟรกชัน	25
3.5	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค	25
บทที่ 4	**ข้อวิจารณ์ (Discussion)**	39
4.1	สายพันธุ์ชันโรงที่เหมาะสมจะนำมาเลี้ยงเพื่อเก็บผลผลิต	39
4.2	คุณสมบัติของน้ำผึ้งชันโรง	40
4.3	ผลการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำผึ้งและพรอพอลิสจากชันโรง	41

หน้า

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Recommendation) 43

เอกสารอ้างอิง (References)

ภาคผนวก (Appendix)

สารบัญตาราง (List of Tables)

		หน้า
ตารางที่ 1	ผลการวิเคราะห์น้ำผึ้งจากชันโรงตามมาตรฐานอุตสาหกรรม	20
ตารางที่ 2	แสดงค่า MIC (mg/ml) และ MBC (mg/ml) ของสารสกัดในแต่ละกลุ่มตัวทำละลายที่แยกได้หลังการทำ partition ด้วยกรวยแยก	25
ตารางที่ 3	องค์ประกอบเคมีที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดพรอพอลิสชันโรงที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์	26
ตารางที่ 4	พฤติกรรมการทำรังของชันโรงแต่ละชนิดที่สำรวจได้ (พณัญญา พบสุข และ สาวิตรี มาไลยพันธุ์, 2550)	40

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

		หน้า
ภาพที่ 1	พื้นที่ทดลองบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตราชบุรี	5
ภาพที่ 2	พื้นที่ทดลองบริเวณบ้านที่ทำการเลี้ยงชันโรง บ้านรางบัว ต.รางบัว อ. จอมบึง จ. ราชบุรี	6
ภาพที่ 3	พื้นที่บริเวณสวนเกษตรของเกษตรกร บ้านระฆังทอง ต.เขาชะงุ้ม อ.โพธาราม จ.ราชบุรี	6
ภาพที่ 4	พื้นที่บริเวณรีสอร์ทบ้านสวนหงษ์เหิร	7
ภาพที่ 5	แสดงการติดแผ่นพลาสติกคลุมด้านบนของรัง	7
ภาพที่ 6	น้ำผึ้งจากชันโรง	8
ภาพที่ 7	แสดงลักษณะทั่วไปของ *T. pagdeni* (ก) ปากทางเข้ารังของ (ข) กลุ่มตัวอ่อนและดักแด้ เซลล์เก็บเกสร และน้ำหวาน	14
ภาพที่ 8	แสดงลักษณะทั่วไปของ *T. laeviceps* (ก) ปากทางเข้ารังของ (ข) กลุ่มตัวอ่อนและดักแด้ เซลล์เก็บเกสร และน้ำหวาน	15
ภาพที่ 9	แสดงลักษณะทั่วไปของ *T. terminata* แสดงลักษณะ (ก) ปากทางเข้ารัง (ข) กลุ่มตัวอ่อนและดักแด้ เซลล์เก็บเกสร และน้ำหวาน	15
ภาพที่ 10	แสดงลักษณะทั่วไปของ *T. fuscobalteata* แสดงลักษณะ (ก) ปากทางเข้ารัง (ข) กลุ่มตัวอ่อนและดักแด้ เซลล์เก็บเกสร และน้ำหวาน	16
ภาพที่ 11	แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาตรเซลล์ไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ น้ำหวานและเกสร (Gt Index) ของรังทุก 2 สัปดาห์ ตลอดช่วงการเลี้ยง 3 เดือน	16
ภาพที่ 12	แสดงการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักรังทุก 2 สัปดาห์ ตลอดช่วงการเลี้ยง 3 เดือน	17
ภาพที่ 13	ผลผลิตที่ได้จากชันโรง	18
ภาพที่ 14	น้ำหนักผลผลิตเฉลี่ยที่เก็บได้ น้ำผึ้ง (honey) และพรอพอลิส (propolis) จากชันโรงทั้ง 4 ชนิด	18
ภาพที่ 15	ขอบเขตการยับยั้ง (clear zone) จากการทดสอบด้วยน้ำผึ้งจากชันโรง 3 ชนิด (ด้วยวิธี agar diffusion assay)	21
ภาพที่ 16	ขอบเขตการยับยั้ง (clear zone) จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรงชนิด *T. pagdeni*	22
ภาพที่ 17	ขอบเขตการยับยั้ง (clear zone) จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรงชนิด *T. laeviceps*	23
ภาพที่ 18	ขอบเขตการยับยั้ง (clear zone) จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรงชนิด *T. terminata*	24
ภาพที่ 19	ขอบเขตการยับยั้ง (clear zone) จากการทดสอบด้วยน้ำผึ้งจากชันโรง *T. laeviceps* (ด้วยวิธี paper disc diffusion assay)	24

หน้า

ภาพที่ 20 โครมาโตแกรมของ สารสกัด Hexane ของพรอพอลิส จาก *T. pagdeni* 34
ภาพที่ 21 โครมาโตแกรมของ สารสกัด Ethly acetate ของพรอพอลิส จาก *T. pagdeni* 34
ภาพที่ 22 โครมาโตแกรมของ สารสกัด Methanol ของพรอพอลิส จาก *T. pagdeni* 35
ภาพที่ 23 โครมาโตแกรมของ สารสกัด Hexane ของพรอพอลิส จาก *T. laeviceps* 35
ภาพที่ 24 โครมาโตแกรมของ สารสกัด Ethly acetate ของพรอพอลิส จาก *T. laeviceps* 36
ภาพที่ 25 โครมาโตแกรมของ สารสกัด Methanol ของพรอพอลิส จาก *T. laeviceps* 36
ภาพที่ 26 โครมาโตแกรมของ สารสกัด Hexane ของพรอพอลิส จาก *T. terminata* 37
ภาพที่ 27 โครมาโตแกรมของ สารสกัด Ethyl acetate ของพรอพอลิส จาก *T. terminata* 37
ภาพที่ 28 โครมาโตแกรมของ สารสกัด Methanol ของพรอพอลิส จาก *T. terminata* 38

บทที่ 1
บทนำ

ชันโรงเป็นผึ้งเก็บสะสมน้ำหวานอยู่ในวงศ์ย่อย Apinae เช่นเดียวกับผึ้งให้น้ำหวาน (honeybees) ต่างจากผึ้งให้น้ำหวานตรงที่ชันโรงไม่มีเหล็กใน มีการกระจายทั่วป่าเขตร้อน (tropical forest) และป่าใกล้เขตร้อน (subtropical forest) ประเทศไทยพบชันโรงทั้งหมดแล้ว 32 ชนิด ชันโรงมีการเก็บยางไม้จากตาไม้หรือยางที่พืชสร้างขึ้นหลังจากเกิดบาดแผล นำมาสะสมไว้ใช้ประโยชน์ภายในรังที่รู้จักกันว่า พรอพอลิส (propolis) หรือชันผึ้ง ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์ทุกชนิดจากชันโรงจึงมีส่วนผสมของสารจากผึ้งและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากยางไม้ ทำให้ผลิตภัณฑ์จากชันโรงมีความเป็นสารอินทรีย์ชีวภาพที่มีคุณสมบัติเป็นสมุนไพร ผลิตภัณฑ์จากชันโรงจึงมีราคาจำหน่ายค่อนข้างสูงและได้รับความนิยมในท้องตลาดเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนมีการเลี้ยงในเชิงเศรษฐกิจแพร่หลายแถบประเทศทวีปอเมริกาใต้ ออสเตรเรียและญี่ปุ่น

ประเทศไทยมีความเหมาะสมทุกด้านในการเลี้ยงชันโรงในเชิงเศรษฐกิจ เนื่องจากมีความหลากหลายของชนิดชันโรงในท้องถิ่น ภูมิอากาศเหมาะสม และความหลากหลายของพรรณไม้ที่เป็นอาหาร ถึงแม้ว่าผลิตภัณฑ์จากชันโรงจะมีศักยภาพในการเลี้ยงในเชิงเศรษฐกิจและจะได้รับความนิยมทั้งตลาดในประเทศและต่างประเทศ แต่เนื่องจากการขาดงานวิจัยรองรับ ไม่ว่าจะเป็นด้านเทคนิคการเลี้ยงเพื่อเก็บผลผลิต งานวิจัยที่จะยกระดับมาตรฐานเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์และความเชื่อมั่นของผู้บริโภค ทำให้การใช้ประโยชน์จากชันโรงในประเทศไทยยังอยู่ในวงจำกัด คือเลี้ยงเพื่อรับประทานเป็นยาในครอบครัว และใช้เป็นแมลงผสมเกสรไม้ผลในพืชสวนเท่านั้น แนวคิดงานวิจัยนี้จึงเกิดขึ้นเพื่อพัฒนาการเลี้ยงชันโรงให้เป็นมาตรฐาน พร้อมทั้งสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ผู้บริโภคโดยทำวิจัยรองรับในคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เพื่อผลักดันผลิตภัณฑ์จากชันโรงและการแปรรูปสู่มาตรฐานตลาดสากล

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

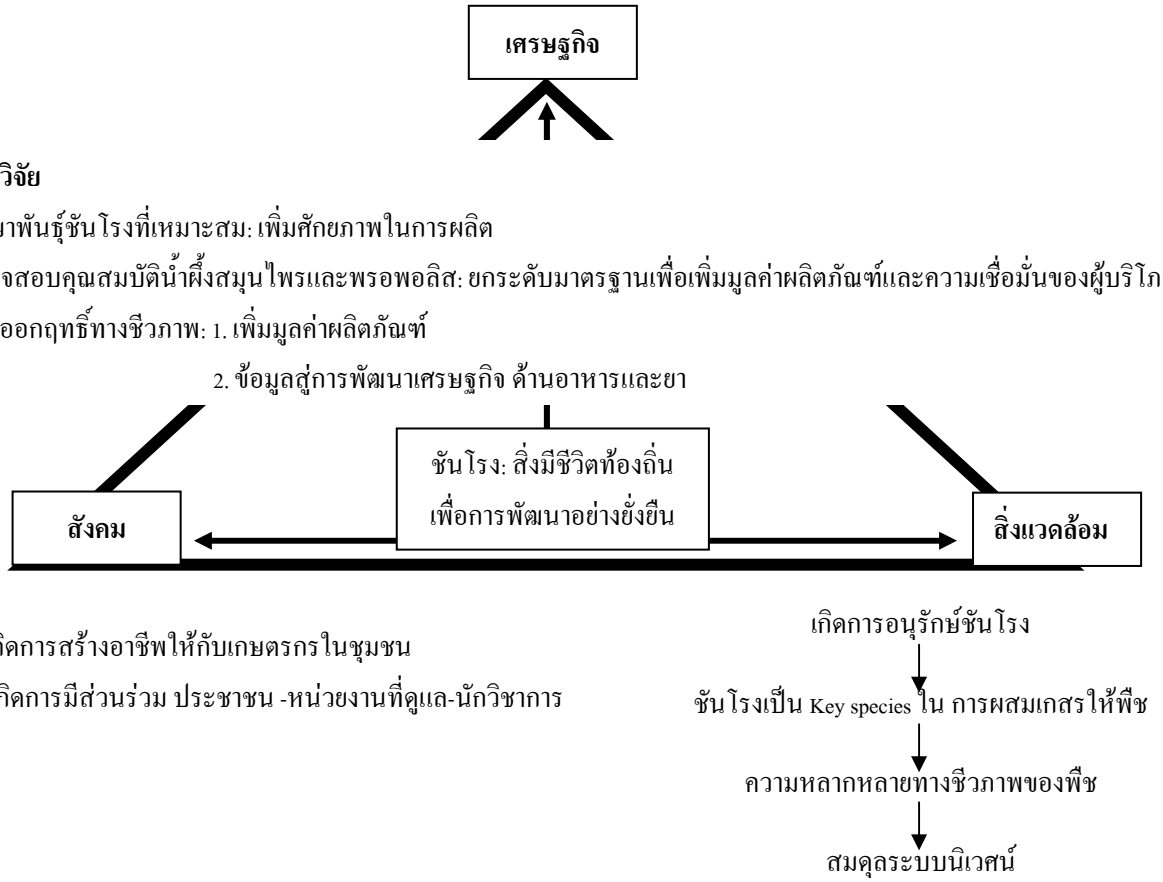
1. คัดเลือกสายพันธุ์ของชันโรงที่เหมาะสม ให้ผลผลิตและคุณภาพสูง
2. วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำผึ้งจากชันโรง
3. ทดสอบฤทธิ์ในน้ำผึ้งและพรอพอลิสจากชันโรงในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค คือ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*
4. แยกและวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ชีวภาพในน้ำผึ้งและพรอพอลิสจากชันโรง

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาสำรวจชนิดของชันโรงที่มีการเลี้ยงทั่วประเทศไทย จากนั้นนำมาเลี้ยงทดลองเพื่อเปรียบเทียบผลผลิต คือ น้ำผึ้งและพรอพอลิส โดยมีพื้นที่เป้าหมายเป็นพื้นที่ที่มีแหล่งอาหารของชันโรงสมบูรณ์ สภาพแวดล้อมในการดำรงชีพเหมาะสม และเป็นพื้นที่ที่สะดวกต่อการทำการวิจัยเก็บผลผลิตนำมาทดสอบคุณภาพตามมาตรฐานกำหนด จากนั้นทดสอบและวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผลผลิตเหล่านั้น

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

แนวคิดของโครงการคือการนำผลงานวิจัยสร้างมาตรฐานการเลี้ยงชันโรงเชิงเศรษฐกิจ โดยพัฒนาเทคนิคการเลี้ยง คัดแยกสายพันธุ์ ตีแผ่คุณภาพ และคุณสมบัติการเป็นสมุนไพรของผลิตภัณฑ์ เพื่อยกระดับมาตรฐานสู่ท้องตลาด อีกทั้งวิจัยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อนำมาต่อยอดประยุกต์ใช้ ลักษณะการวิจัยจะมีส่วนที่เกษตรกรมีส่วนร่วมในการเลี้ยงและเก็บผลผลิต (Participatory Technology Development) เพื่อปูพื้นไปสู่การนำไปปฏิบัติจริงในอนาคต ทั้งนี้จะผสานหน่วยงานรัฐบาลของกรมวิชาการเกษตรเป็นสื่อกลางในการติดต่อระหว่างเทคโนโลยีวิจัยกับชุมชนเกษตรกร โดยยึดหลัก “การใช้ประโยชน์จากทรัพยากรชีวภาพเพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน” ตามแผนภาพต่อไปนี้



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

11.1 ส่งเสริมการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากชันโรงสู่ตลาดในประเทศและนอกประเทศ

11.2 พัฒนาเทคโนโลยีเลี้ยงชันโรงเพื่อเพิ่มรายได้ให้เกษตรกร

11.3 รักษาสมดุลของระบบนิเวศวิทยาทางการเกษตรอย่างยั่งยืน

11.4 ได้งานวิจัยสู่การพัฒนายาและผลิตภัณฑ์ชีวภาพอื่นๆ

11.5 บทความเผยแพร่ทางวิชาการ

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ชันโรง (stingless bees) เป็นผึ้งอยู่ในวงศ์ย่อย Apinae เช่นเดียวกับผึ้งให้น้ำหวาน (honeybees) ที่รู้จักกันทั่วไปในประเทศไทย ชันโรงเป็นผึ้งที่เก็บสะสมน้ำหวานในรังเช่นกัน ต่างจากผึ้งให้น้ำหวานตรงที่ ชันโรง ไม่มีเหล็กใน มีการกระจายทั่วป่าเขตร้อน (tropical forest) และป่าใกล้เขตร้อน (subtropical forest) (Nates-Parra, 2001) ในประเทศไทยพบชันโรงทั้งหมด 32 ชนิด (Klakasikorn *et al*., 2005) คาดว่ายังมีอีกหลายชนิดที่ยังสำรวจไม่พบ ลักษณะเด่นของชันโรงคือ เป็นแมลงผสมเกสรที่สำคัญในระบบนิเวศน์ เนื่องจากมีพฤติกรรมในการเก็บเกสร โดยไม่เลือกชนิดดอกไม้ อีกทั้งชันโรงมีหลายขนาด ตั้งแต่ 2 มม. ถึง 1.5 ซม. ประสิทธิภาพในการเป็นแมลงผสมเกสรจึงหลากหลาย (Heard, 1999) ชันโรงสามารถต้านทานเชื้อโรคและปรสิตได้ดีจึงไม่ค่อยมีศัตรูหรือโรครบกวน (Eltz *et al*., 2002)

ชันโรงในเมืองไทยเชื่อว่ามีมานานตั้งแต่สมัยโบราณ เพราะมีปรากฏในภูมิปัญญาชาวบ้านกล่าวถึงการใช้น้ำผึ้งจากชันโรงรักษาโรคต่างๆ แต่ไม่มีหลักฐานบันทึก ในระหว่างปี พ.ศ. 2526-2527 ได้มีการริเริ่มเลี้ยงชันโรงเพื่อช่วยผสมเกสร พบว่าผลผลิตเพิ่มมากขึ้นกว่า 100% ในเวลาเพียง 3 ปี (สมนึก บุญเกิด, 2551) ทำให้การเลี้ยงชันโรงเพื่อผสมเกสรเป็นที่รู้จักและได้รับความนิยมตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา โดยเฉพาะเกษตรกรผู้ปลูกพืชสวน จังหวัดจันทบุรี (สมนึก บุญเกิด, 2551) ดังนั้นบทบาทชันโรงในประเทศไทยจึงเป็นที่รู้จักว่าเป็นแมลงผสมเกสรที่มีประสิทธิภาพสูง

ชันโรงไม่ได้มีบทบาทเฉพาะการเป็นแมลงผสมเกสรเท่านั้น ผลิตภัณฑ์จากชันโรงถือได้ว่ามีคุณค่าสูงเป็นที่ยอมรับกว้างขวางในต่างประเทศ ในประเทศบราซิลผลิตภัณพ์จากชันโรงมีการพัฒนาอย่างกว้างขวาง สถาบันการศึกษา ผู้ประกอบการและประชาชน ได้รวมตัวจัดตั้ง “Serie Meliponiculture” ให้บริการความรู้ด้านการเลี้ยงชันโรงแก่ผู้ที่สนใจเลี้ยงในเชิงเศรษฐกิจ ในออสเตรเรียมีการศึกษาวิจัยการเลี้ยงชันโรงอย่างแพร่หลายเช่นกัน ทั้งนี้น้ำผึ้งและพรอพอลิสจากชันโรงได้รับความสนใจอย่างดีจากผู้บริโภค (Heard and Dollin, 2000) ในประเทศญี่ปุ่นผลิตภัณฑ์จากชันโรงได้รับความนิยมสูง ในขณะที่ปริมาณการผลิตน้อยไม่เพียงพอต่อการบริโภค

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำผึ้งมีการศึกษาแพร่หลายในผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) งานวิจัยน้ำผึ้งจากชันโรงยังมีจำกัด แม้ว่าในปัจจุบันมีความสนใจในการศึกษาน้ำผึ้งจากชันโรงมากขึ้น การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งในกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ พบประสิทธิภาพตั้งแต่น้อยมากจนถึงสูงมาก (DeMera and Angert, 2004; Garedew *et al*., 2004; Miorin *et al*., 2003; Temaru *et al*., 2007) การศึกษาน้ำผึ้งจาก 21 แหล่งของชันโรงชนิด *T. carbonaria* ในออสเตรเรียและหนึ่งแหล่งจากชันโรงไม่ทราบชนิด (*Trigona* sp.) พบความหลากหลายของประสิทธิภาพการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* โดยมีประสิทธิภาพตั้งแต่ความเข้มข้น 17.5-32.1% (w/v) (Irish *et al*., 2008) เนื่องจากความหายากและคุณสมบัติทางยาดังกล่าว ส่งผลให้น้ำผึ้งจากชันโรงมีราคาในท้องตลาดสูงกว่าน้ำผึ้งจากผึ้งพันธุ์ถึง 3-10 เท่า (Souza *et al*., 2006) นอกจากนี้ชันโรงยังมีการเก็บยางไม้มาสะสมไว้ใช้ประโยชน์ภายในรัง ที่เรียกว่า พรอพอลิส หรือ ชันผึ้ง ผลวิจัยพรอพอลิสจากประเทศแถบอเมริกาใต้พบว่าอุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์มากมาย เช่น คุณสมบัติต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารและทางเดินหายใจ (Bankova and Popova, 2007) การศึกษาองค์ประกอบเคมีโดยทั่วไปเป็นการศึกษาพรอพอลิสจากผึ้งพันธุ์ ซึ่งพบว่าประกอบไปด้วย ยางไม้ 50% (resin and balsam) ไขผึ้ง 30% น้ำมันหอมระเหย 5% (essential and aromatic oils) เกสร 5% และอื่นๆ

รวมถึงซากต่างๆ (debris) อีก 5% (Cirasino *et al*., 1987; Monti *et al*., 1983; Burdock; 1998) โดยกลุ่มสารออกฤทธิ์หลักประกอบด้วย Phenolic acids Flavonoids และ อนุพันธ์ (Patricio *et al*., 2002; Popova *et al*., 2003; Pereira *et al*., 2003; Teixeira *et al*., 2005; Pisco *et al*., 2006) งานวิจัยที่วิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของพรอพอลิสจากชันโรง 12 ชนิดโดยเทคนิค GC-MS สามารถแบ่งองค์ประกอบเป็นกลุ่มต่างๆได้ดังนี้ คือ “Gallic acids” “Diterpene” และ “Triterpene” (Pereira *et al*., 2003) Pereira และคณะ (2003) ได้วิจัยเปรียบเทียบองค์ประกอบเคมีของพรอพอลิสจากผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) และชันโรง (*Tetragonisca angustula*) พบว่าองค์ประกอบหลักของพรอพอลิสนั้นเหมือนกัน รวมถึงมีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ได้เช่นเดียวกัน ต่างกันเล็กน้อยเฉพาะกรดอะมิโนบางชนิดและน้ำตาลอีริโทรส (erytrose) ทั้งนี้องค์ประกอบเคมีของพรอพอลิสจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับความหลากหลายและความจำเพาะเจาะจงของพืชที่ผึ้งไปเก็บยางไม้มา (Teixeira *et al*., 2005) สภาพภูมิศาสตร์และภูมิอากาศในแต่ละพื้นที่ (Bankova, 2005; Duagsch *et al*., 2007) นับได้ว่าผลผลิตทุกชนิดจากชันโรง มีคุณลักษณะเป็นสารอินทรีย์สมุนไพร ที่มีสรรพคุณทางยายืนยันแล้วโดยงานวิจัยหลายสิบชิ้น (Pereira *et al*., 2003; Souza *et al*., 2006; Bankova and Popova, 2007)

ถึงแม้ว่าประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ชันโรงมีมากมายทั้งในแง่การใช้ประโยชน์และมูลค่าเศรษฐกิจ แต่งานวิจัยเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ชันโรงของไทย ยังมีน้อย ที่ได้รับการยอมรับบ้างบางส่วนคือน้ำผึ้ง ส่วนพรอพอลิสยังไม่มีงานวิจัยรองรับ จึงไม่เพียงพอที่จะก่อให้เกิดการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและคัดเลือกสายพันธุ์ชันโรงเพื่อผลิตน้ำผึ้งและพรอพอลิส เนื่องจากชันโรงที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทยจะมุ่งวัตถุประสงค์ไปที่การผสมเกสร เท่านั้น จึงนิยมใช้ชนิดที่มีขนาดเล็ก สร้างรังใกล้บ้านเรือน คือ *T. laeviceps* และ *T. pagdeni* (Sawatthum, 2004) แต่ในแง่การเลี้ยงเพื่อผลผลิต มีชันโรงกว่า 32 ชนิดเป็นตัวเลือกให้ศึกษา เพื่อคัดสรรพันธุ์ที่ให้ทั้งปริมาณและคุณภาพผลผลิตดีที่สุด นอกจากนั้นจะสกัดและวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งในพรอพรอลิสและน้ำผึ้งจากชันโรง เพื่อให้สามารถพัฒนาไปสู่การแปรรูปผลิตภัณฑ์ต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 ศึกษาพันธุ์ของชันโรงที่มีความเหมาะสมต่อการนำมาเลี้ยงเพื่อเก็บผลผลิต

2.1.1 สำรวจ เก็บตัวอย่างและรวบรวมข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยา ของชันโรงชนิดที่เลี้ยงและมีศักยภาพที่จะเลี้ยงเชิงเศรษฐกิจในประเทศไทย

2.1.2 รวบรวมข้อมูล คัดเลือกชนิดเพื่อเลี้ยงเก็บผลผลิต

ทำการนำชันโรงที่ได้จากเกษตรกรในพื้นที่ที่ทำการสำรวจ มาคัดเลือกเพื่อแยกสายพันธุ์ที่ต้องการนำมาศึกษาวิจัย ได้แก่ *T. laeviceps T. pagdeni T.terminata และ T. fuscobalteata*

2.1.3 นำมาเลี้ยงทดลองเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสร้างผลผลิต โดยได้เลือกพื้นที่ศึกษาที่มีอาหารอุดมสมบูรณ์เพียงพอ 4 พื้นที่ ดังนี้ (ใช้เกณฑ์การวัดระดับอาหาร คือ 1-3 (1= ปริมาณอาหารน้อย ต้องให้อาหารเสริม 2= ปริมาณอาหารปานกลาง ให้อาหารเสริมไม่เกิน 1-2 ครั้งในระยะ 3 เดือน, 3= ปริมาณอาหารมากเพียงพอ ไม่จำเป็นต้องให้อาหารเสริมเลย)

ก. พื้นที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตราชบุรี (KR) ระดับความอุดมสมบูรณ์ของอาหารอยู่ในระดับปกติ จำนวนพืชให้น้ำหวานอยู่ในระดับ 3 จำนวนพืชให้เกสรอยู่ในระดับ 3 (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 พื้นที่ทดลองบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตราชบุรี

ข. หมู่บ้านรางบัว ต.รางบัว อ.จอมบึง จ.ราชบุรี (R) พื้นที่เป็นบริเวณบ้านลักษณะพืชอาหารโดยรอบรัศมี 100 เมตร มีไม้ดอกไม้ประดับ ไม้ผล พืชป่า หญ้า ระดับความอุดมสมบูรณ์ของอาหารอยู่ในระดับปกติ จำนวนพืชให้น้ำหวานอยู่ในระดับ 2 จำนวนพืชให้เกสรอยู่ในระดับ 3 (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 2 พื้นที่ทดลองบริเวณบ้านที่ทำการเลี้ยงชันโรง บ้านรางบัว ต.รางบัว อ. จอมบึง จ. ราชบุรี

ค. บ้านระฆังทอง ต.เขาชะงุ้ม อ.โพธาราม จ.ราชบุรี (NG) พื้นที่เป็นบริเวณบ้านลักษณะสวนเกษตรผสมผสาน ซึ่งเกษตรกรได้ปลูกพืชสวนครัว พืชไร่ พืชยืนต้น พื้นที่ 21 ไร่ และพื้นที่รอบๆ รัศมี 100 เมตร ที่ได้รับการเก็บรักษาไว้จากประชาชนในพื้นที่ ระดับความอุดมสมบูรณ์ของอาหารอยู่ในระดับดีมาก จำนวนพืชให้น้ำหวานอยู่ในระดับ 3 จำนวนพืชให้เกสรอยู่ในระดับ 3 (ภาพที่ 3)

ภาพที่ 3 พื้นที่บริเวณสวนเกษตรของเกษตรกร บ้านระฆังทอง ต.เขาชะงุ้ม อ.โพธาราม จ.ราชบุรี

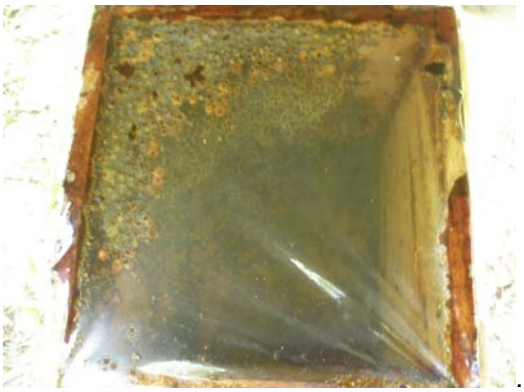
ง. บ้านสวนหงษ์เหิร บ้านห้วยผาก อ. สวนผึ้ง จ. ราชบุรี (HH) ลักษณะเป็นพื้นที่รีสอร์ท พืชอาหารโดยรอบรัศมี 100 เมตร มีไม้ดอกไม้ประดับ ไม้ผล พืชป่า หญ้า ระดับความอุดมสมบูรณ์ของอาหารอยู่ในระดับดี จำนวนพืชให้น้ำหวานอยู่ในระดับ 3 จำนวนพืชให้เกสรอยู่ในระดับ 3 (ภาพที่ 4)

ภาพที่ 4 พื้นที่บริเวณรีสอร์ทบ้านสวนหงษ์เหิร

2.1.4 เปรียบเทียบผลผลิตที่ได้ คือ น้ำผึ้งและพรอพอลิส เก็บผลผลิตทุก 3 เดือน เป็นเวลา 1 ปี บันทึกลักษณะทั่วไป เช่น สี น้ำหนัก ความแข็ง/เปราะ/เหนียว และกลิ่น ปริมาณที่เก็บได้ต่อรัง

การวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของรัง

เนื่องจากการติดตามการเติบโตขยายขององค์ประกอบต่างๆ ไม่สามารถเปิดรังและวัดได้โดยตรง เพราะจะเป็นการรบกวนรังมากเกินไป จึงได้นำพลาสติกใส (PVC หนา 0.03 มม.) คลุมฝาด้านบน (ภาพที่ 5) เพื่อให้เปิดเช็ครังได้โดยไม่รบกวนรัง และใช้วิธีการสองวิธีประกอบกันดังต่อไปนี้



ภาพที่ 5 แสดงการติดแผ่นพลาสติกคลุมด้านบนของรัง

ถ่ายภาพทุกสัปดาห์และนำภาพมาคำนวนหาดัชนีการขยายของรัง ดังนี้

Gt = P+F โดยที่

Gt = การเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (Intensive growth)

$$P = \frac{\text{ปริมาตรของเซลล์ไข่+ปริมาตรของเซลล์ตัวอ่อน+ปริมาตรของเซลล์ดักแก้}}{\text{½ ของปริมาตรกล่องทั้งหมด}} \times 100$$

$$F = \frac{\text{ปริมาตรของถุงเก็บน้ำหวาน+ปริมาตรของถุงเก็บเกสร}}{\text{½ ของปริมาตรกล่องเลี้ยง}} \times 100$$

การวัดการการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของรัง

. ชั่งน้ำหนักของรังและหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นทุกๆ สองสัปดาห์

2.1.5 เก็บรักษาโดยใส่ในขวดแก้วมีฝาปิดสนิทและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 C° เพื่อการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพขั้นต่อไป (ภาพที่ 6)

ภาพที่ 6 น้ำผึ้งจากชันโรง

2.2 วิเคราะห์น้ำผึ้งจากชันโรงเพื่อสร้างมาตรฐานสู่ท้องตลาด

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งที่เก็บได้จากชันโรงแต่ละชนิดในแต่ละช่วงเวลา โดยตรวจ วิเคราะห์ยีสต์รา Y/M ความชื้น (Moisture) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugars) ปริมาณน้ำตาลซูโครส (Sucrose Sugars) แร่ธาตุและวิตามินบางชนิด ของแข็งที่ไม่ละลายในน้ำสูงสุด เถ้า ค่าความเป็นกรด (acidity) ปริมาณ Hydroxymethylfural และ Diastase activity ทั้งนี้ยึดชนิดและหลักการตรวจตาม *มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.)* เป็นหลัก จากนั้นศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีที่สำคัญของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากชันโรง เพื่อนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ต่อไปในอนาคต

2.3 ศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีที่สำคัญของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากชันโรง เพื่อนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ต่อไปในอนาคต

2.3.1 การสกัดพรอพอลิสและการทดสอบ

สารสกัดหยาบ Hexane

สกัดยางไม้หรือพรอพอลิสโดยสกัดส่วนที่ไม่มีขั้วโดยเฮกเซน (Hexane) โดยแช่เป็นเวลา 7 วันต่อชนิดของสารละลายตามลำดับ ในอัตราส่วน 400 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 25 ^{O}C นำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนด้วย centrifuge ที่ 7,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บส่วนใส

นำตะกอนที่ได้มาสกัดด้วย Hexane อีกครั้ง แช่ทิ้งไว้ 3 วัน นำมาปั่นตกตะกอนด้วย centrifuge ที่ 7,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บส่วนใส นำสารสกัดที่ได้จากทั้งสองครั้งมารวมกัน

สารสกัดหยาบ Dichloromethane/Ethyl Acetate

นำส่วนตะกอนที่เหลือทั้งหมดมาสกัดด้วยไดครอโรมีเทน (Dichloromethane/Ethyl Acetate) ปริมาตร 1 ลิตร โดยแช่เป็นเวลา 7 วันต่อชนิดของสารละลายตามลำดับ ปั่นตกตะกอนและเก็บส่วนใสที่ได้จากการสกัดครั้งที่สองนี้มารวมกับส่วนที่สกัดได้ในครั้งแรก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนด้วย centrifuge ที่ 7,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บส่วนใส นำตะกอนที่ได้มาสกัดด้วย Hexane อีกครั้ง แช่ทิ้งไว้ 3 วัน นำมาปั่นตกตะกอนด้วย centrifuge ที่ 7,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บส่วนใส นำสารสกัดที่ได้จากทั้งสองครั้งมารวมกัน

สารสกัดหยาบ Methanol

นำตะกอนส่วนที่ 3 สกัดด้วยเมทานอล (Methanol) โดยวิธีการแบบเดียวกับการสกัดด้วยเฮกเซน จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้ทั้งหมดไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary Evaporator จนแห้ง จะได้ สารสกัดหยาบ Hexane Dichloromethane /Ethly Acetate และ Methanol ของพรอพอลิสชันโรง ชั่งน้ำหนักของสารสกัดแต่ละชนิดทั้งหมดที่สกัดได้ แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำผึ้งและสารสกัดพรอพอลิส

❖ **วิธี Agar Diffusion Assay**

จุลินทรีย์ที่ทดสอบด้วยวิธีนี้ มีทั้งสิ้น 5 ชนิดด้วยกันคือ

- เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด *Pseudomonas aeruginosa Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis*
- เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 1 ชนิด *Escherichia coli*
- เชื้อรา 2 ชนิด *Candida albicans ATCC5815*

1). เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Mueller-Hinton-agar (MHA), Difco^{tm})โดยวิธี Agar Well Diffusion Method (Allen *et al*., 1991) ดังนี้

เตรียมอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) ในอัตราส่วนสาร 38 g ในน้ำกลั่น 1000 ml แบ่งน้ำที่ทำการตวงประมาณ 1 ใน 3 ส่วนมาทำการละลายสารที่ชั่งไว้ ค่อยๆ เติมน้ำส่วนที่เหลือ คนจนสารละลายไม่มีตะกอน เพื่อป้องกันการจับตัวเป็นก้อน ให้ความร้อนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียว ใส่ภาชนะนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

2). เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมเชื้อสำหรับการทดลอง

เพาะเลี้ยงเชื้อที่จะทำการทดลองลงในอาหาร Nutrein agar Slant จนได้เชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมง เตรียมน้ำกลั่น (Sterilization) ทำการ dilution เชื้อด้วยน้ำหลั่น Sterilization ให้ได้ระดับความขุ่น 0.5 *McFarland* standard และได้ปริมาตรเชื้อที่ต้องการ

การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

ในระหว่างการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนการนำสารละลายใส่ภาชนะ ก่อนนำไปทำการ Sterile แบ่งอาหารใส่ภาชนะ 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อลงในขวด ขวดละ 100 ml สำหรับนำไปเทใส่ Pretri dish ส่วนที่ 2 ใช้ปิเปตดูดอาหารลงใน Test tube ขนาด 50 ml หลอดละ 10 ml แล้วปิดฝาหลอด

หลังจากการ sterilization อาหาร คงอุณหภูมิอาหารทั้ง 2 ส่วน ไว้ที่ 58 องศาเซลเซียสใน water bath เพื่อป้องกันการแข็งตัวของอาหาร

เตรียมอาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อในส่วนแรกโดยนำอาหารในขวดออกจาก water bath จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 55 องศาเซลเซียส ทำการเทลงใน Petri dish ประมาณ 10 - 15 ml ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ รอจนผิวหน้าอาหารเริ่มจับตัว จึงทำการเททับด้วยอาหารขั้นตอนที่ 3

การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อในส่วนที่ 2

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในส่วนที่ 2 (ใน Test tube) ออกจาก Water bath จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 55 องศาเซลเซียส นำปิเปตปลอดเชื้อดูด dilution เชื้อที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.1 ml ลงในหลอดอาหารเขย่าให้เข้ากัน นำไปเทลงใน Pretri dish ทับอาหารส่วนแรกที่เทไว้แล้ว หมุน Pretri dish ให้อาหารส่วนที่ 2 กระจายบนผิวหน้าอาหารส่วนแรกให้สม่ำเสมอและทั่วถึง

รอจนอาหารจับตัวแข็งเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ cork borer เบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะลงบนอาหารที่แข็งตัวจำนวน 5 จุด สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยพรอพอลิส และ 6 จุด สำหรับการทดลองประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยน้ำผึ้ง กำหนดระยะห่างเท่าๆ กัน เพื่อเป็นหลุมสำหรับใส่สารละลายพรอพอลิสหรือสารละลายน้ำผึ้งที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 5 และ 6 ระดับ

การเตรียมสารละลายในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

1. การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

การเตรียมสารละลายพรอพอลิส

นำพรอพอลิสแต่ละชนิด ทำการชั่งใส่ภาชนะปลอดเชื้อ ตามการคำนวณให้ได้เปอร์เซ็นต์การละลายในน้ำกลั่นได้ความเข้มข้น 20 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์

การเตรียมสารละลายน้ำผึ้ง

นำน้ำผึ้งแต่ละชนิด มาทำการชั่งใส่ภาชนะปลอดเชื้อตามการคำนวณให้ได้เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น 0 (control) 20 40 60 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารละลายพรอพอลิสและน้ำผึ้ง

การทดสอบด้วยพรอพอลิส

นำเชื้อที่เตรียมไว้ใน petri dish แต่ละชนิด ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายพรอพอลิสปริมาณ 0.001 ml ลงในหลุมที่เจาะไว้จำนวน 5 หลุม ในแต่ละหลุมประกอบด้วย สารละลายพรอพอลิส 20 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ และ control (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)

การทดสอบด้วยน้ำผึ้ง

นำเชื้อที่เตรียมไว้ใน petri dish แต่ละชนิด ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายน้ำผึ้งปริมาณ 0.001 ml ลงในหลุมที่เจาะไว้จำนวน 6 หลุม ในแต่ละหลุมประกอบด้วยสารละลายน้ำผึ้ง 20 40 60 80 100 เปอร์เซ็นต์ และ control (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เวลา 2 วัน

3. ตรวจสอบผล โดยวัดขนาด Clear zone เทียบกับกลุ่มควบคุม (การวัดขนาด Clear zone ทำการวัด 2 แนวระนาบให้ทั้ง 2 แนวระนาบตั้งฉากกัน นำความยาวที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยลักษณะการวัดเคลียร์โซนดังรูป ⊕

4. เปรียบเทียบและวิเคราะห์ผล

❖ **วิธี Paper Disc Diffusion Assay**

จุลินทรีย์ที่ทดสอบด้วยวิธีนี้ มีทั้งสิ้น 5 ชนิดด้วยกันคือ

- เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด *Pseudomonas aeruginosa* และ *Micrococcus aeruginosa*
- เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 1 ชนิด *Escherichia coli*
- เชื้อรา 2 ชนิด *Candida albicans ATCC5815, C. albican ATCC8684*

Spread เชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งในจานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำแผ่น Paper disc วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามจำนวนความเข้มข้นที่เตรียมไว้ ต่อมาหยดสารสกัดน้ำผึ้งแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น Paper disc แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสำหรับเชื้อแบคทีเรีย และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสำหรับเชื้อรา เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย (inhibition zone) ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวันเป็นเวลา 3 วัน ในแต่ละเชื้อและแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละชนิด หาค่า MIC ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ บันทึกผลการทดลอง แล้วเลือกเชื้อที่ถูกยับยั้งได้ดีไปทำการทดลองขั้นต่อไป (อ้างถึงข้อ คือ *M. luteus, P. aeruginosa* และ *E. coli)*

เตรียมสารสกัดอย่างหยาบของ 96% EtOH และน้ำจากขั้นตอนก่อนหน้านี้ ที่ความเข้มข้น 0, 64.5, 129, 193.5 และ 265 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง โดยหยดสารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงบนแผ่น paper disc จากนั้นนำไปบ่ม แล้ววัด clear zone เพื่อพิจารณาฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดอย่างหยาบว่ามีความสามารถในการต้านการเจริญเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เลือกศึกษาได้หรือไม่ แล้วจึงเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ดังกล่าวไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

2.3.3 การตรวจหาและวิเคราะห์สารออกฤทธิ์

เมื่อพบว่าสารสกัดมีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ นำสารสกัดดังกล่าวมาผ่านกระบวนการคัดแยกเพื่อหา Fraction ที่ดีที่สุด

2.3.4.1.การแยกองค์ประกอบโดยวิธีผสมผสานระหว่าง TLC และ Column Chromatography

Thin Layer Chromatography (TLC)

ทดสอบหาสภาวะและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อพัฒนา mobile phase ที่ใช้ในการแยกแบบ column chromatography

ติดตาม fraction เคมีที่แยกได้จาก column chromatography โดยการใช้หลอด capillary หยดสารแล้ววางไว้ใน developing chamber ที่มี solvent เคลื่อนที่นำพาเอาสารที่มีคุณสมบัติต่างกันขึ้นไปตามแผ่น TLC จากนั้นสังเกตผลโดยการนำไปส่องภายใต้แสง UV ความยาวคลื่นต่างๆ หรือทำปฏิกิริยากับกรด

Column Chromatography (CC)

ใส่ stationary phase (เฟสคงที่) คือ silica gel ลงไปใน column ปล่อยตัวทำละลายออกจนเหลือเพียงผิวหน้า แล้วใส่สารสกัดยางไม้หรือพรอพอลิส จากนั้นชะสารตัวอย่างออกด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม (เฟสเคลื่อนที่หรือ mobile phase) และเก็บ fraction

นำ fraction ที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท เพื่อชั่งน้ำหนักในการวิเคราะห์สัดส่วนขององค์ประกอบ และเพื่อนำไปตรวจหาชนิดของสารองค์ประกอบที่อยู่ในพรอพอลิสโดยวิธี GC-MS ต่อไป

2.3.4.2 วิเคราะห์ชนิดของสารออกฤทธิ์

เมื่อได้ Fraction ที่ออกฤทธิ์แล้ว วิเคราะห์หาชนิดของสารเคมีที่ออกฤทธิ์ ตามลำดับต่อไปนี้

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์

นำสารสกัดมาระเหยจนแห้ง 10 µl ผสม 100 µl pyridine, 200 µl bistrimetylsilyl trifluoroacetamide (BSTFA) + 1% trimethylchlorosilane (TMCS) ปิดฝาและทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 95 °C

การวิเคราะห์สารตัวอย่างด้วยเครื่อง GC - MS

นำสารที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง GC - MS Agilent Gas Chromatograph 6850 Series เชื่อมต่อด้วย Agilent 5973 mass spectrometer system (23 m, 0.25 mm id, 0.5 µm film thickness HP5-MS capillary) column โดยใช้แก๊สพาหะคือฮีเลียม อัตราการไหล 1.0 ml/min มีการปรับอุณหภูมิจาก 100 – 310 °C อัตราการแตกตัว 1:10 โดยฉีดสาร 1 µl ณ อุณหภูมิ 280 °C ความต่างศักย์ 70 eV จากนั้นตรวจวิเคราะห์หาชนิดสารโดยวิเคราะห์จากการแตกตัวของ molecular ions ของสาร library search (NIST98 MS data library)

2.4 การอบรมถ่ายทอดเทคโนโลยีให้เกษตรกรผู้เลี้ยงชันโรง

เป้าหมายในตอนต้นได้มุ่งถ่ายทอดเทคโนโลยีให้เกษตรกรใน ณ ต. บางขันแตก อ. เมือง จ. สมุทรสงคราม แต่เนื่องจากมีผู้สนใจเข้าร่วมอบรมจำนวนมากจึงได้ขยายเครือข่ายและจัดอบรม ตามโครงการการอบรมการส่งเสริมการเลี้ยงชันโรงเพื่อเก็บผลผลิตให้กับ เกษตรกร ชาวบ้านและครู จังหวัดสมุทรสงคราม ราชบุรี กาญจนบุรีและนครปฐม จำนวน 91 คน ณ บ้านดอนกระต่าย ตำบลสระสี่มุม อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

บทที่ 3

ผลการวิจัย (RESULTS)

3.1 สายพันธุ์ชันโรงที่เหมาะสมจะนำมาเลี้ยงเพื่อเก็บผลผลิต

3.1.1 สายพันธุ์ชันโรงที่เลี้ยงในประเทศไทย

โดยพื้นที่ที่ดำเนินการสำรวจชนิดของชันโรงและทำการคัดเลือกสายพันธุ์ มีดังนี้

3.1.1.1 ตำบลรางบัว อ.จอมบึง จ.ราชบุรี เป็นพื้นที่โดยรอบรัศมีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตราชบุรี ซึ่งมีป่าเต็งรังที่มีความสมบูรณ์ดี มีการเพาะปลูกพืชซึ่งเป็นอาหารของผึ้งได้กว่า 40 ชนิด บริเวณหมู่บ้านใกล้เคียงมีพืชอาหารที่ชันโรงสามารถนำมาใช้สร้างน้ำหวานและเกสรได้ตลอดปี เช่น มะขาม มะเฟือง ชมพู่ ชันโรงที่พบส่วนใหญ่จะเป็นชนิด *Trigona pagdeni Trigona laeviceps* และพบชันโรงชนิด *Trigona apicalis* ที่อาศัยอยู่ตามโพรงไม้ และ *Trigona collina* อาศัยอยู่ในโพรงใต้ดิน

3.1.1.2 เกษตรกรผู้เลี้ยงชันโรงในเขตจังหวัดจันทบุรี ครอบคลุมพื้นที่ อ.มะขาม อ.ท่าใหม่ เกษตรกรส่วนใหญ่เป็นชาวสวนผลไม้ซึ่งทำการเลี้ยงชันโรงไว้สำหรับใช้ผสมเกสร เพิ่มผลผลิตผลไม้และได้ประโยชน์ทางการค้าจากผลิตผลของชันโรง อาทิ น้ำผึ้ง พรอพอริส แม้กระทั่งการให้เช่ารังชันโรง พื้นที่จังหวัดจันทบุรีมีความอุดมสมบูรณ์ของพืชอาหารที่ชันโรงต้องการมาก ทั้งสภาพภูมิศาสตร์ของพื้นที่ยังเอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ ทำให้สามารถพบชันโรงได้หลากหลายชนิด

3.1.1.3 ศูนย์ผึ้งจังหวัดจันทบุรี การพัฒนา ขยายพันธุ์ชันโรง ให้ความรู้กับเกษตรกรภายในพื้นที่ ติดต่อประสานงานกับศูนย์ผึ้งทั่วประเทศ อาทิ เช่น ศูนย์ผึ้งจังหวัดพิษณุโลก เชียงใหม่ ขอนแก่น และชุมพรเกี่ยวกับความก้าวหน้าของการเพาะเลี้ยงชันโรง ให้ข้อมูลเกี่ยวกับพันธุ์ชันโรงที่ทางศูนย์ต่าง ๆ ทำการเพาะเลี้ยง วิธีการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ ประโยชน์ของชันโรง และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากชันโรง การแปรรูปผลผลิตจากชันโรงให้เป็นผลิตภัณฑ์ เช่น ยาหม่องจากไขผึ้ง สบู่น้ำผึ้ง ครีมบำรุงผิวผสมนมผึ้ง ชันโรงที่มีส่วนใหญ่เป็นชนิดที่ให้ประโยชน์ทางเศรษฐกิจ

3.1.1.4 พื้นที่จังหวัดภาคใต้ของประเทศไทย เช่น ชุมพร สุราษฎร์ธานี มีการรณรงค์ให้เกษตรกรเลี้ยงชันโรงเพื่อประโยชน์ทางการเกษตร เช่น การช่วยผสมเกสรในสวนผลไม้

3.1.1.5 กลุ่มเกษตรตำบลบางขันแตก อ. เมือง จ. สมุทรสงคราม สภาพแวดล้อมส่วนใหญ่เป็นสวนมะพร้าว ทำให้มีอาหารเพียงพอตลอดปี มีประชากรชันโรงมาทำรังจำนวนมากแต่ค่อนข้างมีความหลากหลายของชนิดชันโรงน้อย คือพบมากในชนิด *T. pagdeni* และ *T. laeviceps*

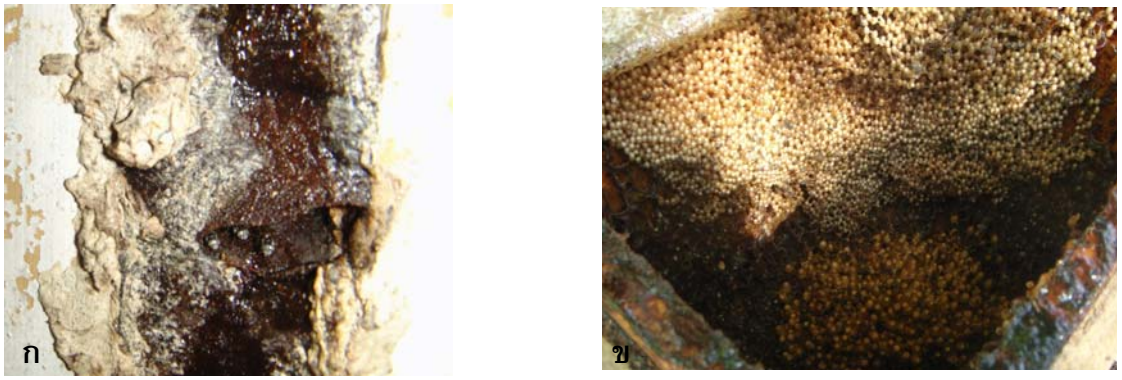
3.1.1.6 กลุ่มเกษตรตำบล อ. กำแพงแสน นครปฐม เป็นพื้นที่เลี้ยงชันโรงเชิงเศรษฐกิจอีกแห่งหนึ่ง เป็นเครือข่ายความร่วมมือกับกลุ่มผู้เลี้ยงชันโรงในจังหวัดจันทบุรี กลุ่มนี้มีจำนวนสมาชิกอยู่ถึง 41 คน และนับเป็นกลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงชันโรงที่มีความเข้มแข็งที่สุดในพื้นที่ภาคตะวันตก

3.1.2 ชีววิทยาของชันโรงแต่ละชนิดและลักษณะพื้นที่วิจัย

จากการสำรวจพบว่าในประเทศไทยมีชันโรงที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้อย่างน้อย 7 ชนิด ได้แก่ *T. pagdeni T. laeviceps T. terminata, T. fascobultiata*, *T. apicalis*, *T. collina* และ *T. minor* โดยมี 4 ชนิดเป็นที่นิยมเลี้ยงมากที่สุด ได้แก่

1. *T. pagdeni*

ปากทางเข้ารังเป็นท่อ ปากกว้าง ผนังแข็ง สีน้ำตาลออกดำจนถึงเทา ปากทางรังขยายออกทางด้านข้าง ภายในรังประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ตัวการเรียงตัวแบบแผงซ้อนแบบเป็นชั้นในแนวนอน ในรังแบบเลี้ยงอาจมองเห็นชั้นไม่ชัด ภายกลุ่มเซลล์ตัวอ่อน ประกอบด้วยหลอดเซลล์ตัวหนอน และหลอดเซลล์ดักแด้ กลุ่มเซลล์ตัวอ่อนไม่พบผนังปิด กลุ่มถ้วยที่เก็บอาหาร ประกอบด้วยถ้วยเก็บเกสรและถ้วยเก็บน้ำผึ้ง วางตัวปะปนอยู่ด้านล่างของรวงตัวอ่อน (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะทั่วไปของ *T.pagdeni* (ก) ปากทางเข้ารังของ (ข) กลุ่มตัวอ่อนและดักแด้ เซลล์เก็บเกสร และน้ำหวาน

2. *T. laeviceps*

*T. laeviceps มี*ปากทางเข้ารังน้ำตาลเข้มหรือสีอำพัน มีลักษณะแข็งตรงต้นฐานของปากทางและมีความเหนียวและอ่อนนุ่ม ส่วนปลายและขอบในปากทางเข้ารังค่อนข้างสั้นและไม่มีท่อยืดยาวออกมา เซลล์ตัวอ่อนเรียงเป็นแบบกลุ่มก้อนซ้อนกันหลายๆ ชั้น เซลล์เก็บน้ำผึ้งและเกสรเป็นถ้วยกลมวางเรียงซ้อนกันเป็นกลุ่ม (Sakagami et al., 1983; อัชลี, 2546; Dollin, 1996) (ภาพที่ 8)

ภาพที่ 8 แสดงลักษณะทั่วไปของ *T. laeviceps* (ก) ปากทางเข้ารังของ (ข) กลุ่มตัวอ่อนและดักแด้ เซลล์เก็บเกสร และน้ำหวาน

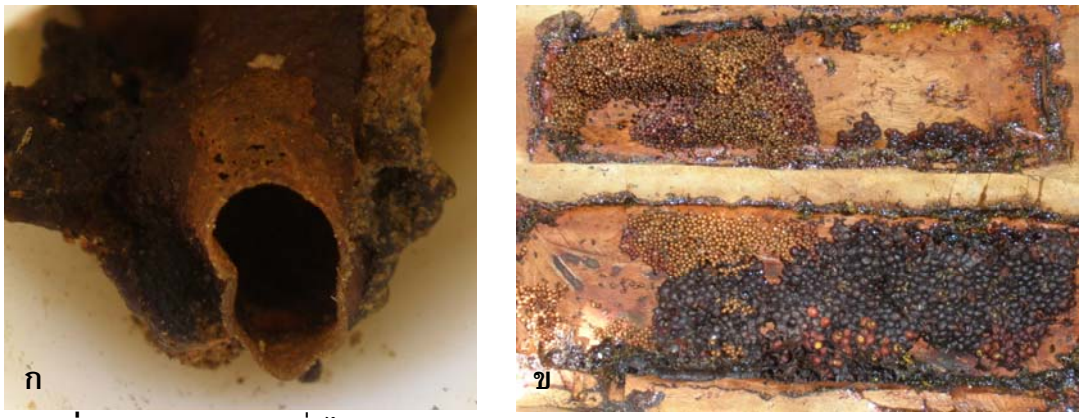
3. *T. terminata*

T. terminata อยู่ใน sub genus *Lepidotrigona* เป็นชันโรงที่ค่อนข้างบอบบาง มีขนาด 4.0 - 5.5 ม.ม. ปากทางเข้ารังมีสีเปลี่ยนแปลงได้ อ่อนนุ่ม ผนังลาดตรง ผิวเรียบ ไม่มีความเหนอะหนะ ชันโรงสามารถผ่านเข้าไปได้ครั้งหลาย ๆ ตัว ขอบด้านข้างขยายออกเป็นปากแตร เซลล์ตัวอ่อนเรียงตัวเป็นแบบรวงซ้อนตามแนวนอน เซลล์เก็บอาหาร มีลักษณะคล้ายถังหมักเบียร์วางซ้อนกันอยู่ เซลล์เก็บน้ำผึ้งมีสีน้ำตาลปนดำเป็นถ้วยรูปกลมขนาดใหญ่ แต่ละเซลล์เชื่อมกันมองเห็นเป็นลักษณะเครือข่าย แต่มีความบอบบางมาก เซลล์เก็บเกสรมีขนาดใกล้เคียงกับเซลล์เก็บน้ำผึ้ง (วันทา, 2546; Dollin, 1996) (ภาพที่ 9)

ภาพที่ 9 แสดงลักษณะทั่วไปของ *T. terminata* แสดงลักษณะ (ก) ปากทางเข้ารัง (ข) กลุ่มตัวอ่อนและดักแด้ เซลล์เก็บเกสร และน้ำหวาน

4. *T. fuscobalteata*

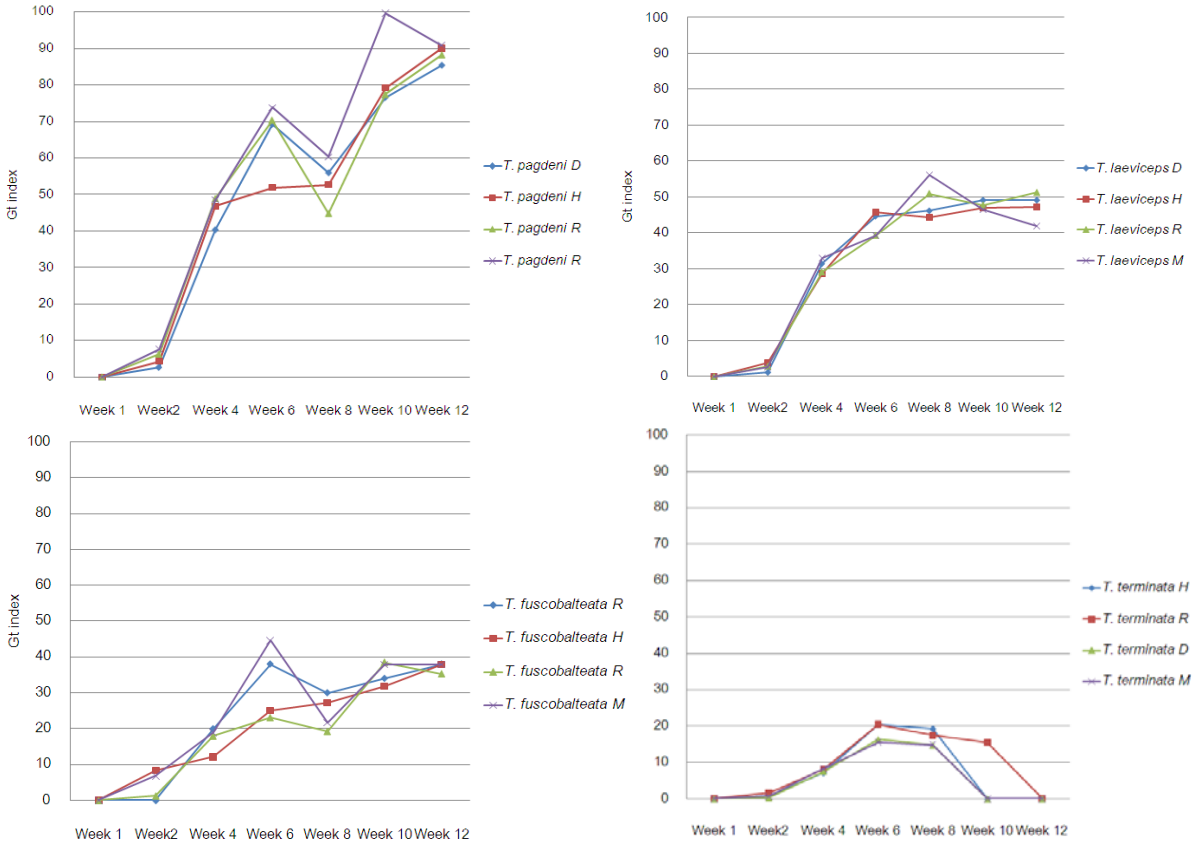
T. fuscobalteata มีลักษณะปากรังไม่มีท่อ สีอำพันหรือสี อำพันออกดำ อ่อนนุ่ม ผนังบางค่อนข้างเรียบ ปกติลาดตรง มีความเหนียวเหนอะหนะ ปากทางเข้าด้านข้างบางครั้งก็ขยาย ขนาดตัวเล็ก เซลล์น้ำหวานและเกสรมีลักษณะกลม อยู่เป็นกลุ่ม น้ำผึ้งมีสีอำพันสวยงาม เป็นชนิดที่มีขนาดเล็กที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทั้ง 3 ชนิด (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 แสดงลักษณะทั่วไปของ *T. fuscobalteata* แสดงลักษณะ (ก) ปากทางเข้ารัง (ข) กลุ่มตัวอ่อนและดักแด้ เซลล์เก็บเกสร และน้ำหวาน

3.1.3 การเจริญเติบโตของรังชันโรงการวิเคราะห์ด้วยวิธี Image Analysis

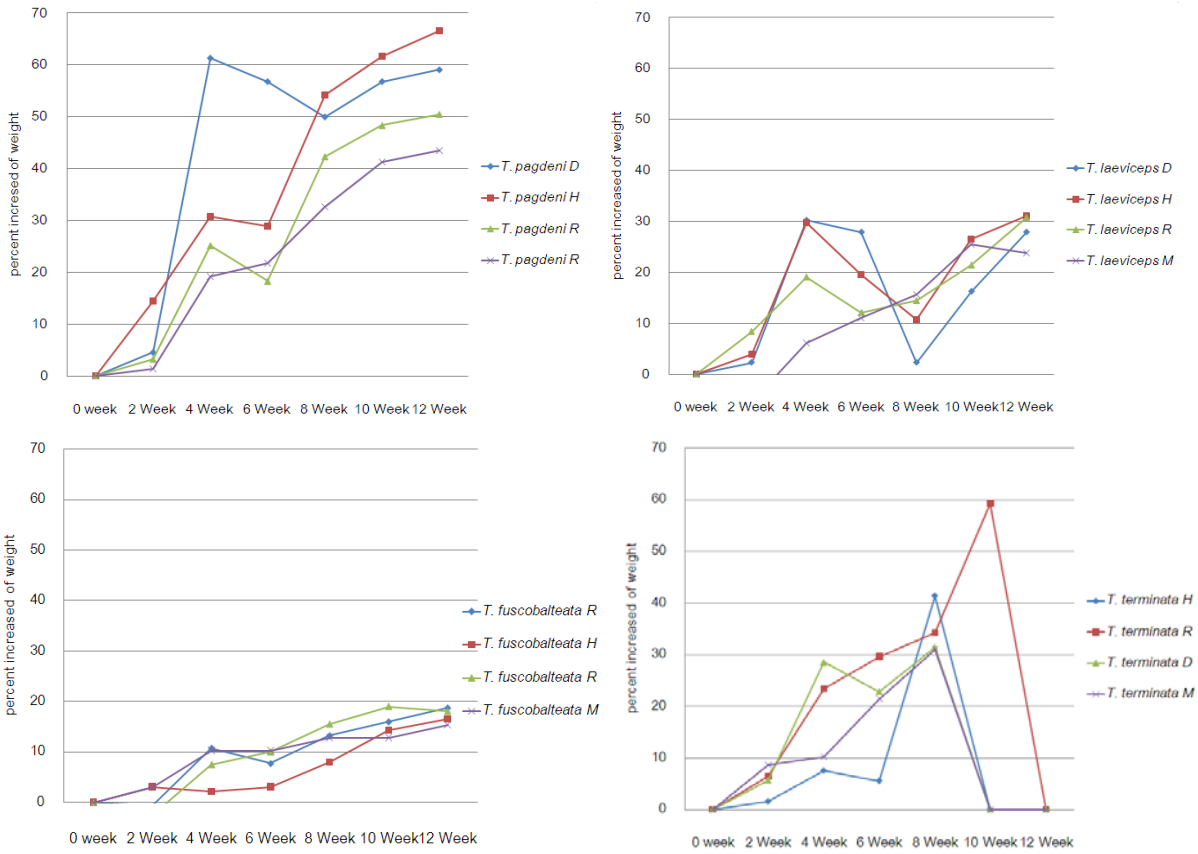
การเปลี่ยนแปลงปริมาตรของเซลล์ไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ น้ำหวานและเกสร รังมีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.01$) ในชันโรงทั้ง 4 ชนิด โดยชันโรงชนิด *T. pagdeni* (1,011.45 ± 121.27 g/week) และ *T. terminata* (786.93 ± 84.50 g/week) มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด จากนั้นเป็น *T. laeviceps* (628.23 ± 11.19 g/week) และ *T. fuscobalteata* (84.06 ± 31.02 g/week) ตามลำดับ (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาตรเซลล์ไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ น้ำหวานและเกสร (Gt Index) ของรังทุก 2 สัปดาห์ ตลอดช่วงการเลี้ยง 3 เดือน

การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักรัง

ร้อยละการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของรังมีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในชันโรงทั้ง 4 ชนิด โดยชันโรงชนิด *T. pagdeni* (37.20 ± 9.95) และ *T. laeviceps* (17.19 ± 3.15) มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด จากนั้นเป็น *T. terminata* (15.39 ± 7.12) และ *T.fuscobalteata* (10.22 ± 1.58) ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ชันโรงชนิด *T. terminata* มีอัตราการหนีรังสูงที่สุด โดยพบว่าทุกรัง (ที่เลี้ยงในกล่อง) หนีรังทั้งหมดเมื่อนำมาเลี้ยงได้ 3 เดือน (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 แสดงการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักรังทุก 2 สัปดาห์ ตลอดช่วงการเลี้ยง 3 เดือน

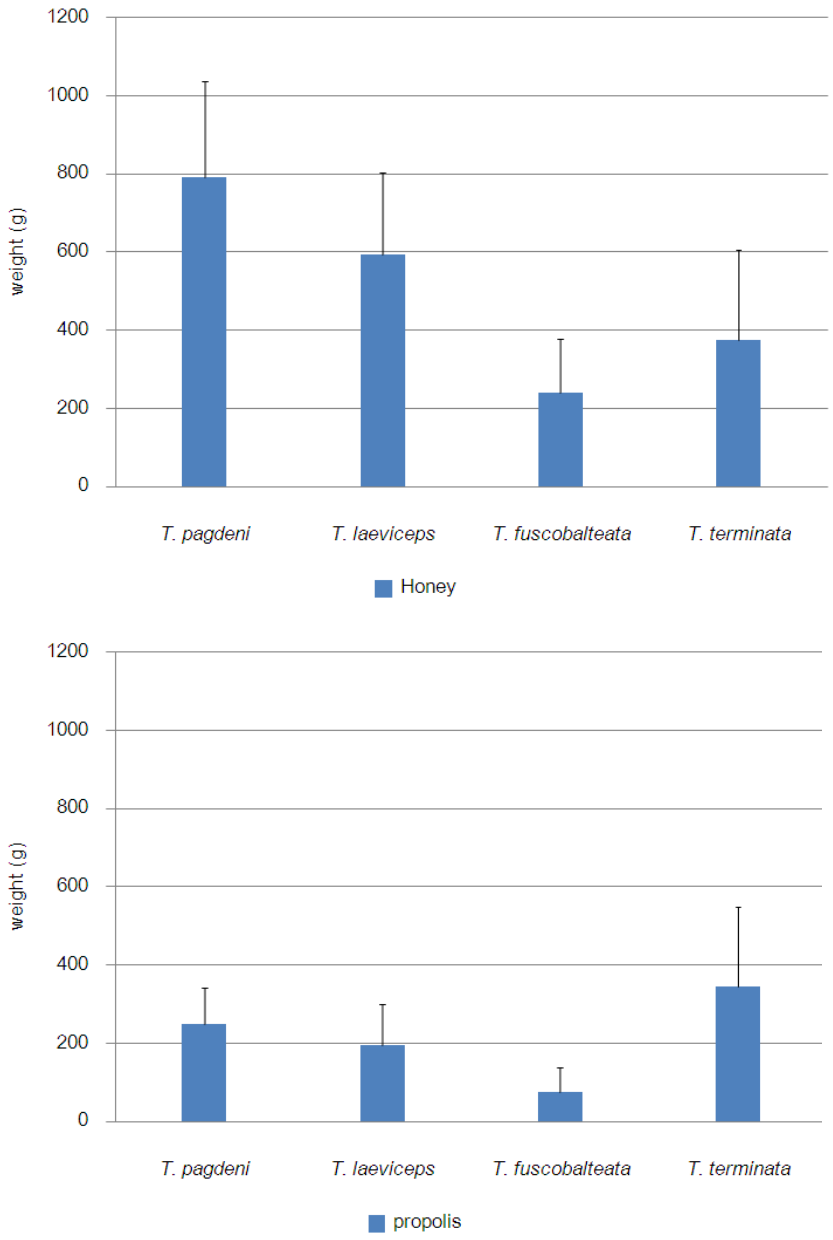
3.1.4 ผลผลิตที่ได้

3.1.4.1 น้ำผึ้งและพรอพอลิส

จากการเก็บผลผลิต (ภาพที่ 13) ชันโรงให้ผลผลิตน้ำผึ้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (n=5, p = 0.025) โดยเก็บได้เฉลี่ยต่อครั้ง 739 ± 245 กรัม ใน *T. pagdeni*, 594 ± 210 กรัม ใน *T. laeviceps*, 374 ± 230 กรัม ใน *T. terminata* และ 240 ± 245 กรัม ใน *T. fuscobalteata* (ภาพที่ 14)

ผลผลิตพรอพอลิสเก็บได้เฉลี่ยต่อครั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (n=5, p = 0.04) 346 ± 203 กรัม ใน *T. terminata*, 250 ± 92 กรัม ใน *T. pagdeni*, 196.6 ± 104.97 กรัม ใน *T. laeviceps* และ 76.56 ± 60.7 กรัม ใน *T. fuscobalteata* (ภาพที่ 14)

ภาพที่ 13 ผลผลิตที่ได้จากชันโรง (ก) น้ำผึ้ง (ข) พรอพอลิส



ภาพที่ 14 น้ำหนักผลผลิตเฉลี่ยที่เก็บได้ น้ำผึ้ง (honey) และพรอพอลิส (propolis) จากชันโรงทั้ง 4 ชนิด

3.2 การวิเคราะห์น้ำผึ้งจากชันโรงเพื่อสร้างมาตรฐานสู่ท้องตลาด

ผลการวิเคราะห์น้ำผึ้งทั้ง 3 ชนิด ตามมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก.) น้ำผึ้ง (*T. fuscobalteata* สามารถเก็บน้ำผึ้งได้น้อยมาก ปริมาณไม่เพียงพอต่อการตรวจ) โดยน้ำผึ้งจากชันโรงทั้ง 3 ชนิด *T. pagdeni T. laeviceps* และ *T. terminata* มีระดับน้ำตาลรีดิวซิงน้อยกว่ามาตรฐาน ความชื้นและความเป็นกรดสูงกว่ามาตรฐาน โดยลักษณะอื่นๆ ได้แก่ ลักษณะทั่วไป ซูโครส สารที่ไม่ละลายน้ำ เถ้า ค่าไดแอสเตส แอกติวิตี ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัล กรดหรือเกลือของกรดเบนโซอิก กรดหรือเกลือของกรดซอร์บิก กรดหรือเกลือของกรดซาลิซิลิก อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน พร้อมทั้งยังไม่พบส่วนผสมของแซ็กคาริน ซัยคลาเมต สีผสมอาหาร (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์น้ำผึ้งจากชันโรงตามมาตรฐานอุตสาหกรรม

คุณสมบัติ	**ผลการทดสอบ**			
	เกณฑ์มาตรฐาน	***T. pegdeni***	***T. laeviceps***	***T. terminata***
ลักษณะทั่วไป		ของเหลวข้นสีน้ำตาล	ของเหลวข้นสีน้ำตาล	ของเหลวข้นสีน้ำตาล
น้ำตาลรีดิวซิงคิดเป็นน้ำตาลอินเวิร์ต (ร้อยละ)	≥ 65	61.4 *	55.5 *	42.5 *
ความชื้น (ร้อยละ)	≤ 21	23.3 *	23.6 *	23.3 *
ซูโครส (ร้อยละ)	≤ 5	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
สารที่ไม่ละลายน้ำ (ร้อยละ)	≤ 0.1	0.06	0.34	0.20
เถ้า (ร้อยละ)	≤ 0.6	0.25	0.24	0.25
ความเป็นกรด (มิลลิอีควิวาเลนท์ของกรด/กิโลกรัม)	≤ 40	113.6 *	112.4 *	206.8 *
ค่าไดแอสเตส แอกติวิตี (Gothe scale)	≥ 3	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัล (มิลิกรัม/กิโลกรัม)	≤ 80	28.8	20.2	20.0
สีผสมอาหาร (มิลิกรัม/กิโลกรัม)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
กรดหรือเกลือของกรดเบนโซอิก (มิลิกรัม/กิโลกรัม)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
กรดหรือเกลือของกรดซอร์บิก (มิลิกรัม/กิโลกรัม)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
กรดหรือเกลือของกรดซาลิซิลิก (มิลิกรัม/กิโลกรัม)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
แซ็กคาริน (มิลิกรัม/กิโลกรัม)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
ซัยคลาเมต (มิลิกรัม/กิโลกรัม)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

* คุณลักษณะข้อนี้ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานน้ำผึ้ง (ตามมาตรฐานอุตสาหกรรม)

3.3 ผลการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำผึ้งและพรอพอลิสจากชันโรง

3.3.1 ลักษณะทางกายภาพของน้ำผึ้งและสารสกัดพรอพอลิส

น้ำผึ้ง: จะมีลักษณะเหนียวข้น มีสีน้ำตาลทองคล้ายสีน้ำผึ้งแต่มีลักษณะใสกว่า

พรอพอลิส: สารสกัดจะมีลักษณะเหนียวข้นมาก มีสีแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของชันโรง

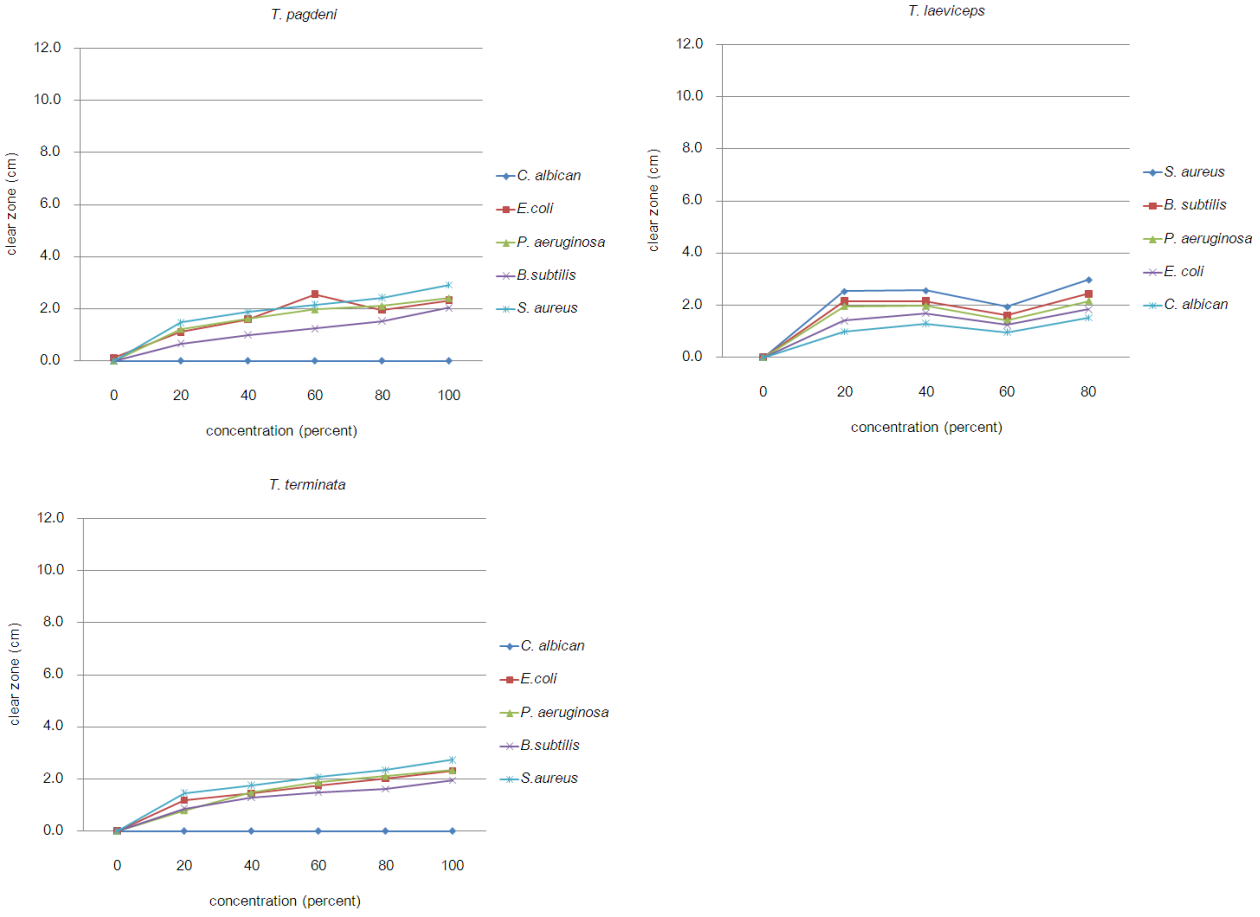
สารสกัดพรอพอลิสจาก T. pagdeni: มีสีน้ำตาลเข้ม ลักษณะเหนียวมาก

สารสกัดพรอพอลิสจาก T. laeviceps: มีสีน้ำตาลเข้ม มีความเหนียวมาก

สารสกัดพรอพอลิสจาก T. terminata: มีสีน้ำตาลน้ำตาลแดงทอง ลักษณะเหนียวน้อยกว่าสองชนิดข้างต้น

3.3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Agar Diffusion Assay

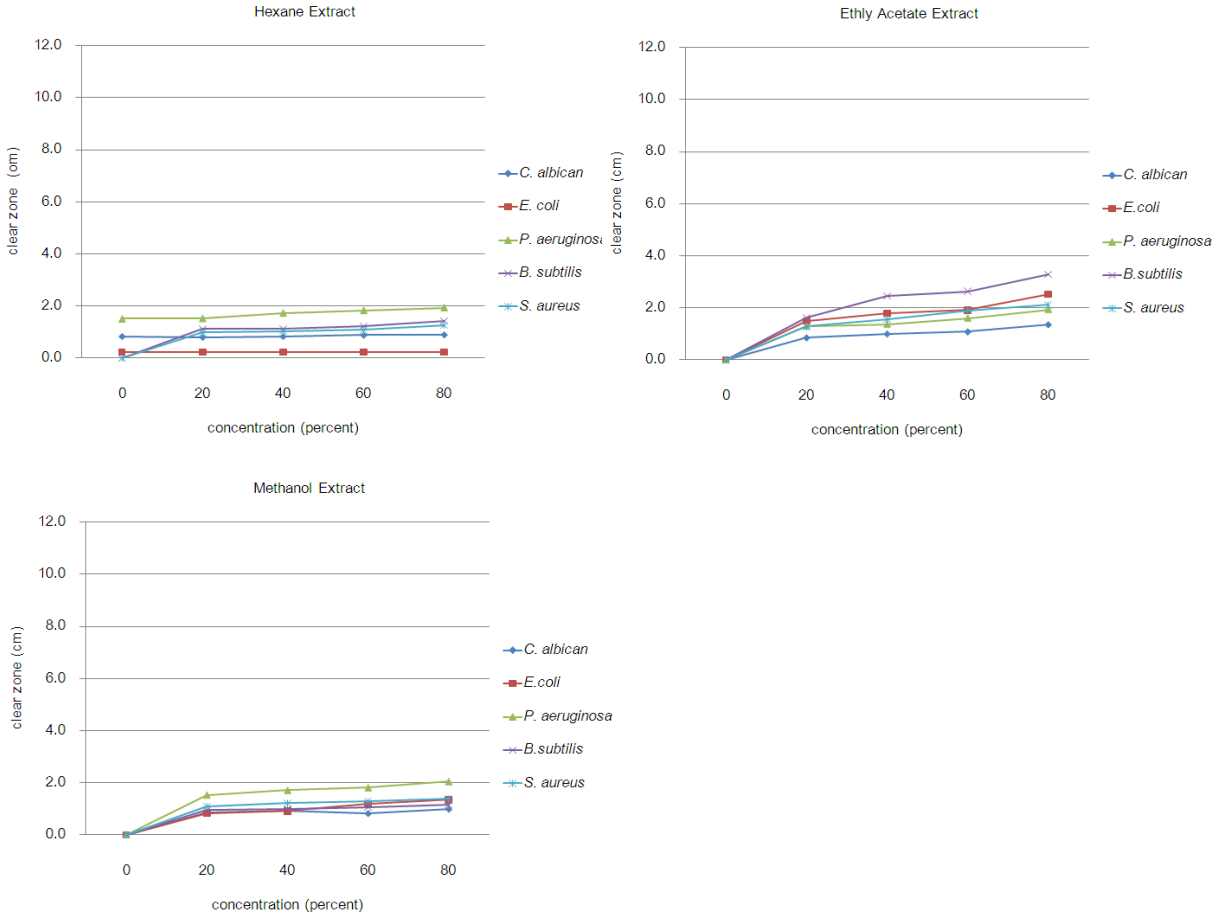
ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิดในเบื้องต้นด้วยน้ำผึ้ง พบว่าน้ำผึ้งจากชันโรงทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albican*, *E.coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtillis* และ *S. aureus* ได้อย่างดี (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 ขอบเขตการยับยั้ง (clear zone) จากการทดสอบด้วยน้ำผึ้งจากชันโรง 3 ชนิด (ด้วยวิธี agar diffusion assay)

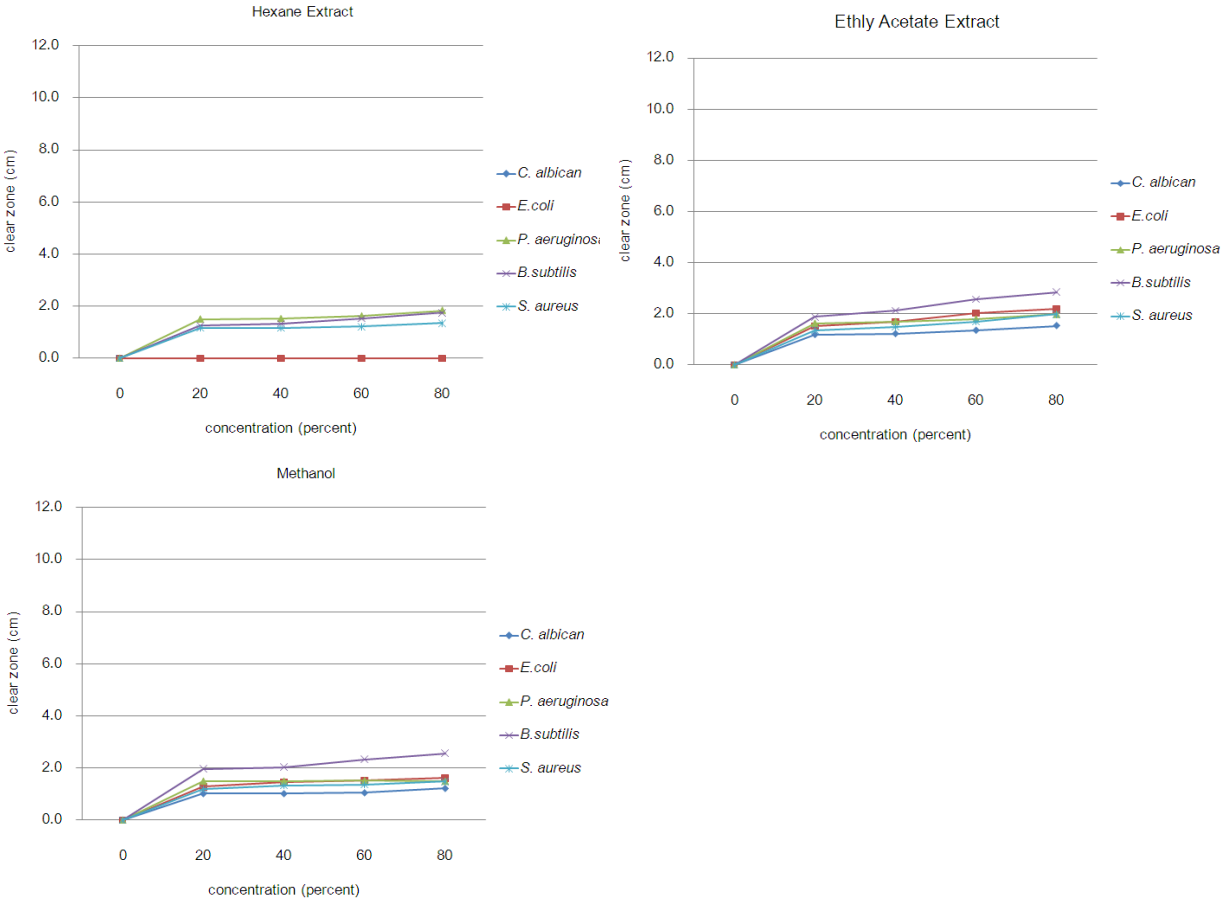
ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิดในเบื้องต้นด้วยสารสกัดหยาบพรอพอลิส พบว่าพรอพอลิส สามารถยับยั้งการเจริญของ *E.coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtillis* และ *S. aureus* ได้อย่างดี แต่มีพรอพอลิสจากบางชนิดเท่านั้นที่สามารถยับยั้ง *C. albican* ได้ (รูปที่ 16-18)

สารสกัดหยาบพรอพอลิสจาก *T. pagdeni* สารสกัดหยาบ Ethyl Acetate ให้ผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด จากนั้นคือสารสกัดหยาบ Methanol ส่วนสารสกัดหยาบ Hexane ยังยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้น้อยที่สุด และไม่สามารถยับยั้ง E. coli ได้เลย (ภาพที่ 16)



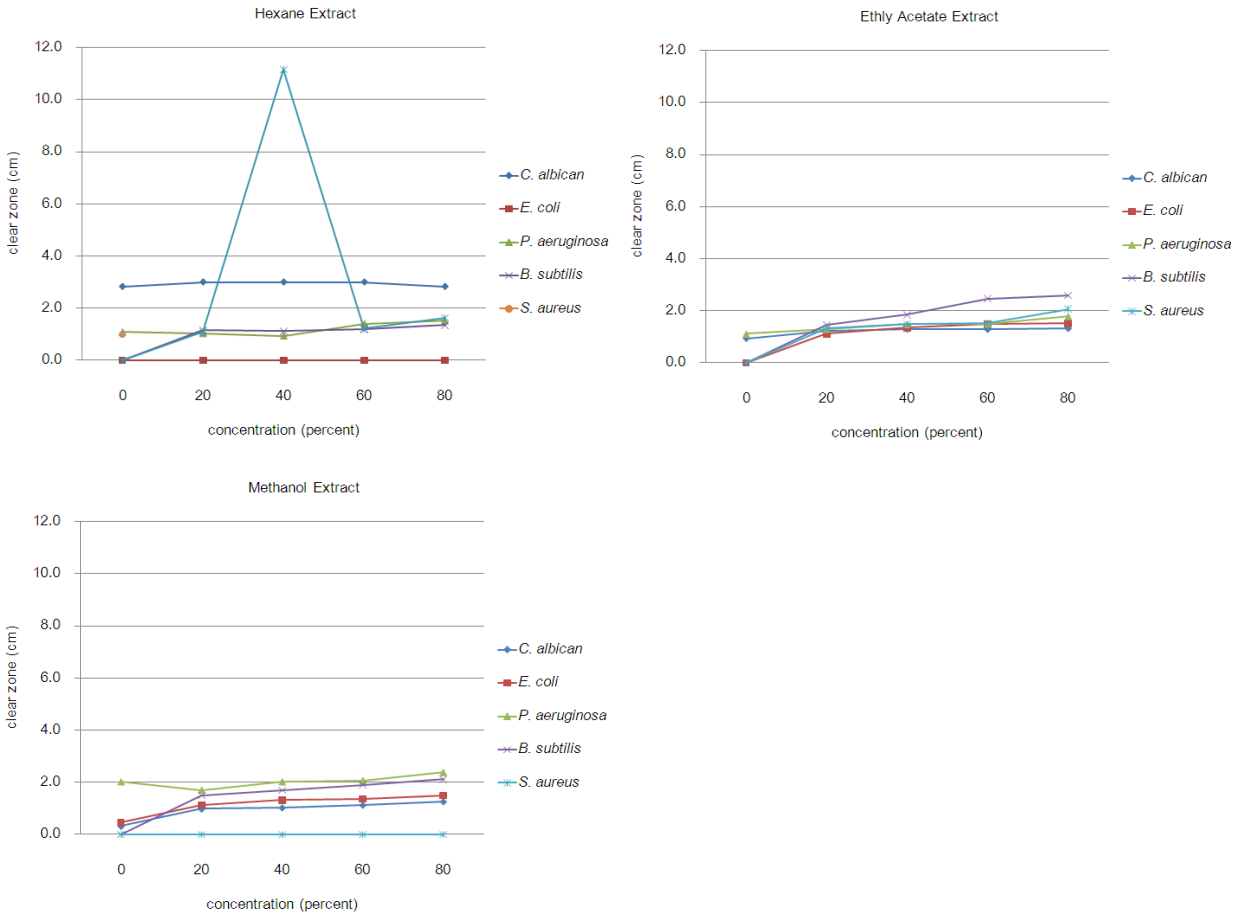
ภาพที่ 16 ขอบเขตการยับยั้ง (clear zone) จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรงชนิด *T. pagdeni*

สารสกัดหยาบพรอพอลิสจาก *T. laeviceps* สารสกัดหยาบ Ethyl Acetate และ Methanol ให้ผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด ส่วนสารสกัดหยาบ Hexane ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้เลย (ภาพที่ 17)



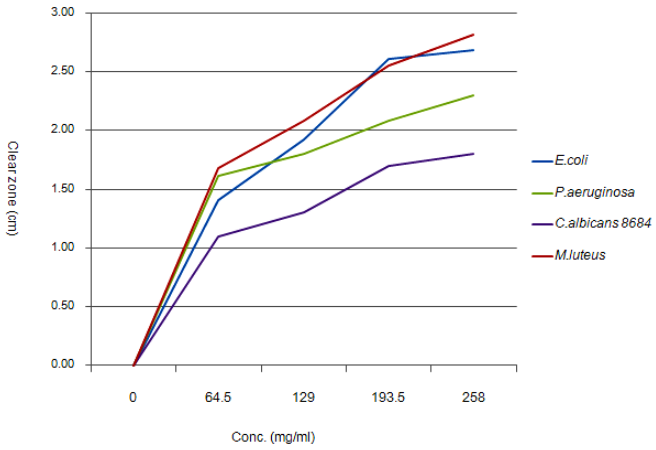
ภาพที่ 17 ขอบเขตการยับยั้ง (clear zone) จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรงชนิด *T. laeviceps*

สารสกัดหยาบพรอพอลิสจาก *T. terminata* สารสกัดหยาบ Ethyl Acetate ให้ผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดและยับยั้งได้ทุกชนิด ส่วนสารสกัดหยาบ Methanol ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* และสารสกัด Hexane ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 ขอบเขตการยับยั้ง (clear zone) จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรงชนิด *T. terminata*

3.3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Paper disc diffusion assay (อ้างอิงจาก จุฑากร ชาติไทย, 2553)



ภาพที่ 19 ขอบเขตการยับยั้ง (clear zone) จากการทดสอบด้วยน้ำผึ้งจากชันโรง *T. laeviceps* (ด้วยวิธี paper disc diffusion assay)

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิดในเบื้องต้นด้วยสารสกัดอย่างหยาบ โดยวิธี Paper disc diffusion assay ให้ค่า MIC คือ *M. luteus* (64.5) *P. aeruginosa* (*P. aeruginosa*) *E. coli* (64.5). *C. albicans* ATCC8684 (64.5) และ *C. albicans* ATCC5815 (เชื้อไม่เจริญ จึงทดสอบไม่ได้) (ภาพที่ 19)

3.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ต่อแบคทีเรียก่อโรคจากการแยกแฟรกชัน

Hexane, 40% MeOH และ CH_2Cl_2

การแยกสารเบื้องต้นตามความมีขั้วของสารโดยการทำ partition ด้วยกรวยแยก สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ต่อแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี microbroth dilution assay ของสารสกัดน้ำผึ้ง ทำให้ได้ค่า MIC ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงค่า MIC (mg/ml) และ MBC (mg/ml) ของสารสกัดในแต่ละกลุ่มตัวทำละลายที่แยกได้หลังการทำ partition ด้วยกรวยแยก ที่ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด

ชนิด	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	-	-

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

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

3.5 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

จากผลการวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบสารทั้งหมดกว่า 90 ชนิด ส่วนใหญ่เป็น terpinoids diterpinoids และ phenolic compounds และยังมีกลุ่มสารประกอบไฮโดรคาร์บอนบางส่วน ดังแสดงตามตารางที่ 3 (ภาพที่ 20-28)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบเคมีที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดพรอพอลิสซันโรงที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์

ลำดับ	องค์ประกอบ (Compounds)	RT	*T. pagdeni*			*T. laeviceps*			*T. terminata*		
			H	EtOAc	MeOH	H	EtOAc	MeOH	H	EtOAc	MeOH
1	(1-cyclohexen-1-yloxy)trimethyl-Silane	2.158	0.976								
2	2-[(trimethylsilyl)oxy]-Propanoic acid trimethylsilyl ester	2.17		3.136	1.319		2.912	2.225		1.422	0.973
3	Tetradecane	4.696		0.639	0.575						
4	Trimethylsilyl ether of glycerol	4.761	5.646	5.679	5.92	5.03	7.227	5.418	5.182	4.387	4.747
5	Tridecane	5.01	0.09						0.091		
6	Docosane	8.585	0.889	0.792	0.678	0.733	1.051	0.934	0.953	0.893	0.366
7	Triacontane	8.716	0.258	0.818		0.756				0.811	0.128
8	(R*,R*)-2,3,4-tris[(trimethylsilyl)oxy]-Butanal	9.338									1.196
9	1,2,3,4-tetrakis[(trimethylsilyl)oxy]-Butane	9.498			0.299						
10	.gamma.-lactone, l-2,3,5-tris-O-(trimethylsilyl)-Arabinoic acid	11.994									0.108
11	Dodecanoic acid, trimethylsilyl ester	12.071		0.103							
12	10-oxide, 2-chloro-8-ethyl-10-hydroxy-10H-Phenoxaphosphine	12.854					0.119				
13	Hexacosane	13.109		0.111			1.034	0.128		0.896	

ตารางที่ 3 องค์ประกอบเคมีที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดพรอพอลิสซันโรงที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (ต่อ)

ลำดับ	องค์ประกอบ (Compounds)	RT	*T. pagdeni*			*T. laeviceps*			*T. terminata*		
			H	EtOAc	MeOH	H	EtOAc	MeOH	H	EtOAc	MeOH
14	2-methyl-Eicosane	13.992	0.093								
15	1,2,3,4,5-pentakis-O-(trimethylsilyl)-Xylitol	14.087									1.262
16	1,2,3,4,5-pentakis-O-(trimethylsilyl)-Ribitol	14.176									0.177
17	2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-L-Altrose	14.378									0.347
18	1,4-Benzenedicarboxylic acid, bis(trimethylsilyl) ester	15.006	0.215	0.205	0.137	0.184	0.377	0.307	0.168	0.503	
19	Tetradecanoic acid, trimethylsilyl ester	16.109	0.314	0.239		0.288	0.477	0.399	0.401	0.289	
20	1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-D-Fructose	16.648			3.756		0.465	0.783			1.134
21	(1,2,4,5-cyclohexanetetrayltetraoxy)tetrakis[trimethyl-Silane	17.135									0.201
22	1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-Arabinofuranose	17.135		0.25							
23	methyl 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-.alpha.-D-Mannopyranoside	17.336								0.372	1.013
24	Heneicosane	17.425	0.164	0.14	0.643	0.94	0.209	0.989	0.71	1.043	0.382
25	Glucopyranose pentaTMS	17.538			12.938			0.478			
26	1,2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-.beta.-D-Glucopyranuronic acid, trimethylsilyl ester	17.544					0.772				

ตารางที่ 3 องค์ประกอบเคมีที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดพรอพอลิสซันโรงที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (ต่อ)

ลำดับ	องค์ประกอบ (Compounds)	RT	*T. pagdeni*			*T. laeviceps*			*T. terminata*		
			H	EtOAc	MeOH	H	EtOAc	MeOH	H	EtOAc	MeOH
27	2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-D-Galactose	17.55									22.693
28	1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-.alpha.-D-Galactopyranose	17.787									0.97
29	Methyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate	17.906	0.278			0.254	0.328	0.296	0.35	0.405	
30	Tetracosane	18.238	0.796								
31	Pentacosane	18.249		1.168	0.719	0.136	1.124	1.151	0.958	0.865	
32	1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(trimethylsilyl)-D-Mannitol	18.279			4.406						14.45
33	Hexadecanoic acid, ethyl ester	18.836		0.497	0.762	0.121	0.778	1.448	0.361	0.748	0.193
34	pentakis-O-trimethylsilyl-Glucose	19.406			8.127		0.372				
35	Germanicol	19.429									17.358
36	2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-Galactonic acid, trimethylsilyl ester	19.643			1.158						
37	2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-D-Gluconic acid, trimethylsilyl ester	19.648									1.814
38	Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester	19.898	23.988	27.329	19.384	23.19	31.17	33.568	27.137	28.024	11.784

ตารางที่ 3 องค์ประกอบเคมีที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดพรอพอลิสชันโรงที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (ต่อ)

ลำดับ	องค์ประกอบ (Compounds)	RT	*T. pagdeni*			*T. laeviceps*			*T. terminata*		
			H	EtOAc	MeOH	H	EtOAc	MeOH	H	EtOAc	MeOH
39	1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-.beta.-D-Glucopyranose	20.437									0.667
40	(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	20.674			0.711						
41	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester	20.799			1.26						
42	Triolein	20.811						1.002			
43	1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(trimethylsilyl)-Myo-Inositol	21.143									0.202
44	8-heptyl-Pentadecane	21.344		0.472							
45	Linoleic acid ethyl ester	21.896	0.693	1.382	1.589			1.157			0.668
46	9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester	21.896					0.629				
47	Ethyl Oleate	21.961					1.505	2.813		0.567	0.267
48	(Z,Z,Z)-9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester,	21.985		1.414	1.831						
49	Octadecanoic acid, ethyl ester	22.459			0.164			0.242			
50	(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic acid, trimethylsilyl ester	22.785	1.549		0.909	0.429					

ตารางที่ 3 องค์ประกอบเคมีที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดพรอพอลิสชันโรงที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (ต่อ)

ลำดับ	องค์ประกอบ (Compounds)	RT	*T. pagdeni*			*T. laeviceps*			*T. terminata*		
			H	EtOAc	MeOH	H	EtOAc	MeOH	H	EtOAc	MeOH
51	trans-9-Octadecenoic acid, trimethylsilyl ester	22.85				3.397		4.947			1.313
52	Oleic acid, trimethylsilyl ester	22.868		19.231					2.638		
53	Oleic acid TMS	22.892	3.344		3.003		3.943			2.325	
54	Retinoic acid, methyl ester	23.063				1.69					
55	Octadecanoic acid, trimethylsilyl ester	23.354	11.251	13.526	8.581	10.17	14.075	14.33	11.932	13.388	5.533
56	Tetratriacontane	24.967			0.449		0.483				0.201
57	2-methyl-Hexadecane	24.985					0.569				
58	2-O-Glycerol-.alpha.-d-galactopyranoside, hexa-TMS	25.127									0.691
59	1-iodo-Octadecane	25.619								0.556	
60	Eicosanoic acid, trimethylsilyl ester	26.562		1.715							
61	11-cis-Octadecenoic acid, trimethylsilyl ester	26.597						1.321			
62	(Z)-9-Tricosene	28.471								0.379	

ตารางที่ 3 องค์ประกอบเคมีที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดพรอพอลิสชันโรงที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (ต่อ)

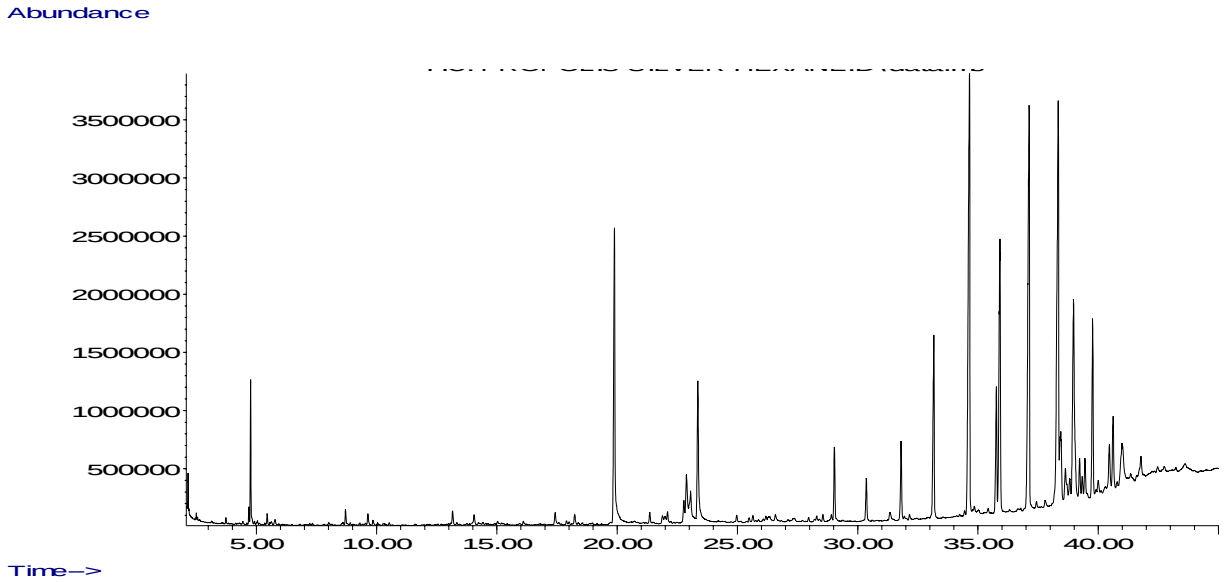
ลำดับ	องค์ประกอบ (Compounds)	RT	*T. pagdeni*			*T. laeviceps*			*T. terminata*		
			H	EtOAc	MeOH	H	EtOAc	MeOH	H	EtOAc	MeOH
63	Decanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-1-[[(trimethylsilyl)oxy]methyl]ethyl ester	28.554	0.441								
64	2-Monopalmitin trimethylsilyl ether	28.578			0.356			0.58		0.759	0.415
65	1,21-Docosadiene	28.844			0.092						
66	Heptacosane	30.374	0.975	0.601	0.302	0.595	2.66		0.412	2.249	0.36
67	3,8-dimethyl-Decane	30.38						0.784			
68	anhydrotetrakis-O-(trimethylsilyl)-D-Altro-2-Heptulose	30.86									0.165
69	3,4,5,6-tetrachloro-3,5-Cyclohexadiene-1,2-dione	31.364						1.094			
70	octakis(trimethylsilyl)-Maltose	31.649									
71	Octadecanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester	31.821					6.678				
72	Squalene	32.123							1.226		
73	4,9,13,17-Tetramethyl-4,8,12,16-octadecatetraenal	32.135								0.739	
74	17-Pentatriacontene	32.775							3.261		

ตารางที่ 3 องค์ประกอบเคมีที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดพรอพอลิสชันโรงที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (ต่อ)

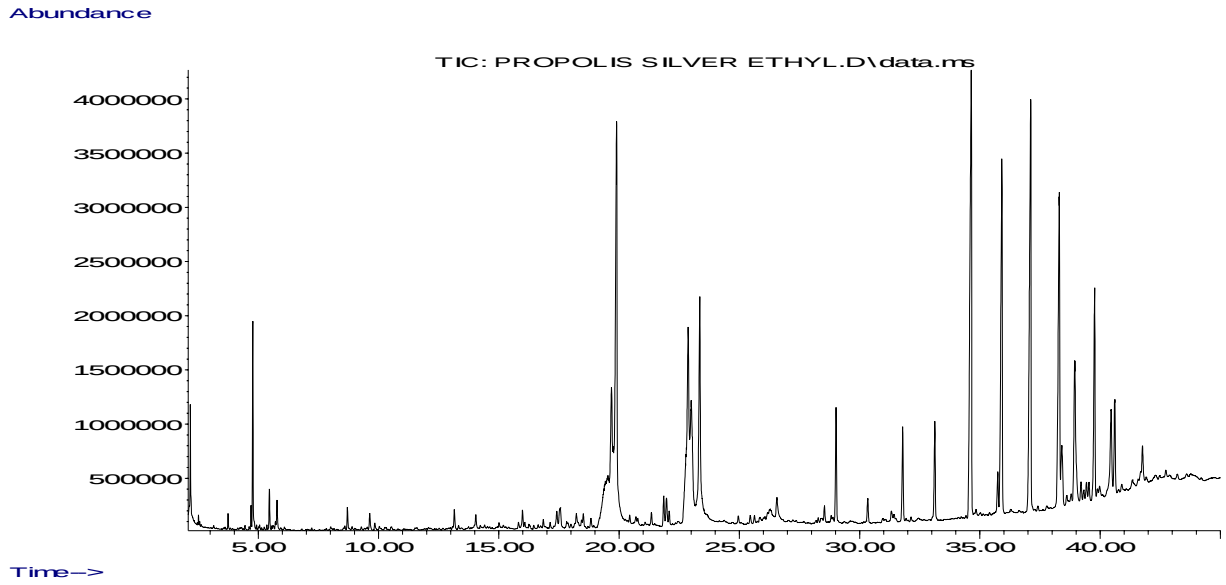
ลำดับ	องค์ประกอบ (Compounds)	RT	*T. pagdeni*			*T. laeviceps*			*T. terminata*		
			H	EtOAc	MeOH	H	EtOAc	MeOH	H	EtOAc	MeOH
75	9-Nonadecene	32.787								4.413	0.98
76	Nonacosane	33.143	13.056	4.386	0.184	3.547	7.826		2.311	14.451	0.271
77	Octacosane	33.196	0.552	0.994		18.16		0.983	0.505	2.021	
78	4-O-[2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-.beta.-D-galactopyranosyl]-1,2,3,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-D-Glucopyranose	33.706									0.879
79	4-O-[2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-.beta.-D-galactopyranosyl]-2,3,5,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-D-Glucose	34.382									0.957
80	Eicosane	35.769	8.438	0.325		0.156	0.993	0.643	1.128	0.747	
81	Hentriacontane	35.77					3.855		5.674		
82	Heptadecane	35.811				16.35			21.191		
83	4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-Octamethyl-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-octadecahydro-2H-picen-3-one	38.36		3.878	15.685	10.97		18.551	3.67	5.589	1.608
84	.beta.-Amyrin trimethylsilyl ether	38.835	2.288	0.726	1.766	2.914		3.43	6.827	4.056	2.379
85	.alpha.-Amyrin	38.935		10.242							
86	Urs-12-ene	38.971	21.385				8.37				

ตารางที่ 3 องค์ประกอบเคมีที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดพรอพอลิสชันโรงที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (ต่อ)

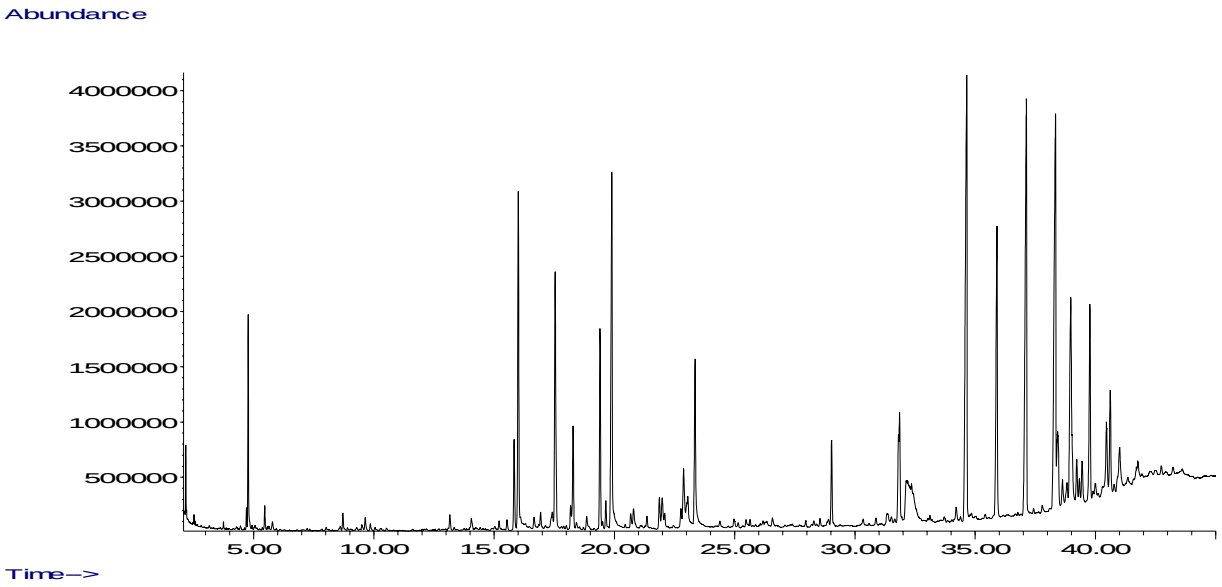
ลำดับ	องค์ประกอบ (Compounds)	RT	*T. pagdeni*			*T. laeviceps*			*T. terminata*		
			H	EtOAc	MeOH	H	EtOAc	MeOH	H	EtOAc	MeOH
87	[[(3.beta.)-lanosta-9(11),24-dien-3-yl]oxy]trimethyl-Silane	39.404							2.914		
88	[[(3.beta.)-lanosta-8,24-dien-3-yl]oxy]trimethyl-Silane	39.422								1.93	0.389
89	(9,19-cyclo-9.beta.-lanost-24-en-3.beta.-yloxy)trimethyl-Silane	39.445	2.32		2.297						
90	(+)-3-oxo-Urs-12-en-24-oic acid, methyl ester	39.866									0.761
91	Olean-12-ene	39.89								5.174	



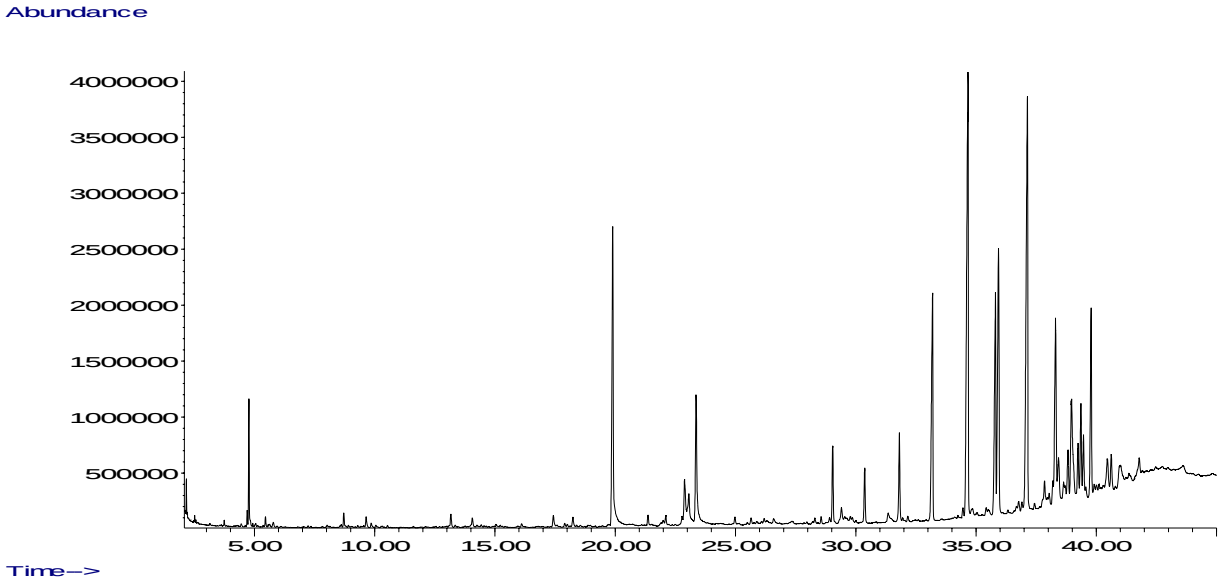
ภาพที่ 20 โครมาโตแกรมของ สารสกัด Hexane ของพรอพอลิส จาก *T. pagdeni*



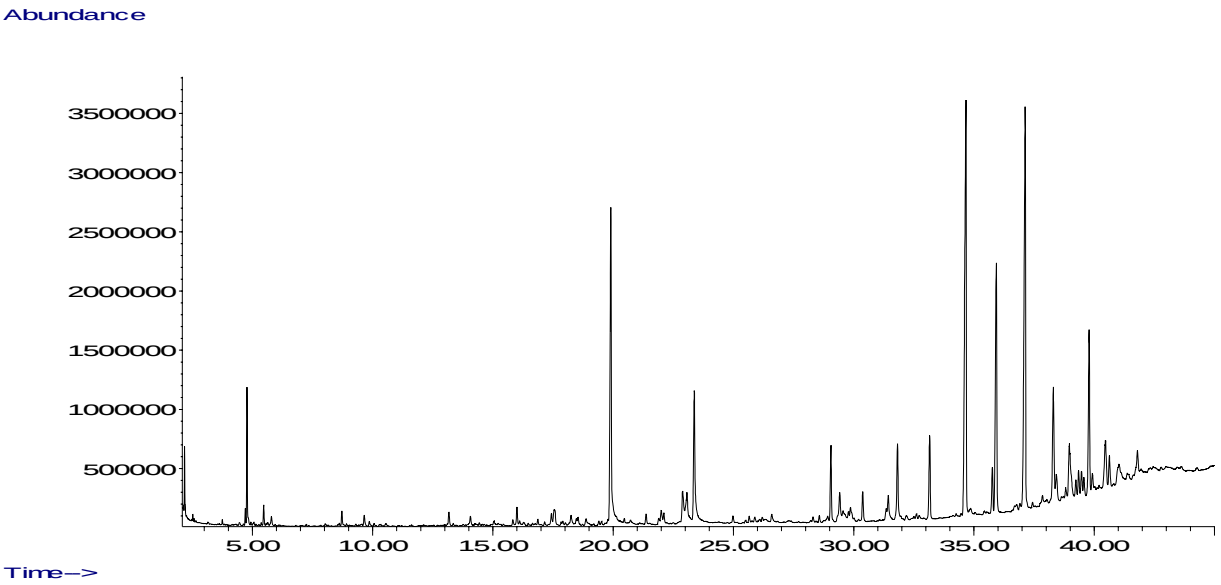
ภาพที่ 21 โครมาโตแกรมของ สารสกัด Ethly acetate ของพรอพอลิส จาก *T. pagdeni*



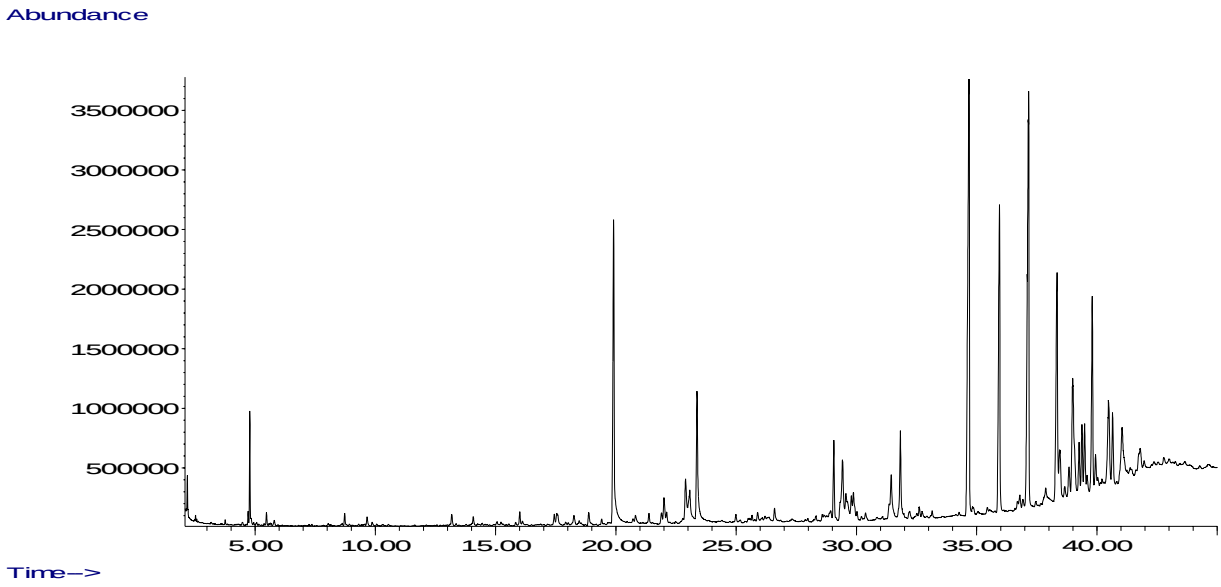
ภาพที่ 22 โครมาโตแกรมของ สารสกัด Methanol ของพรอพอลิส จาก *T. pagdeni*



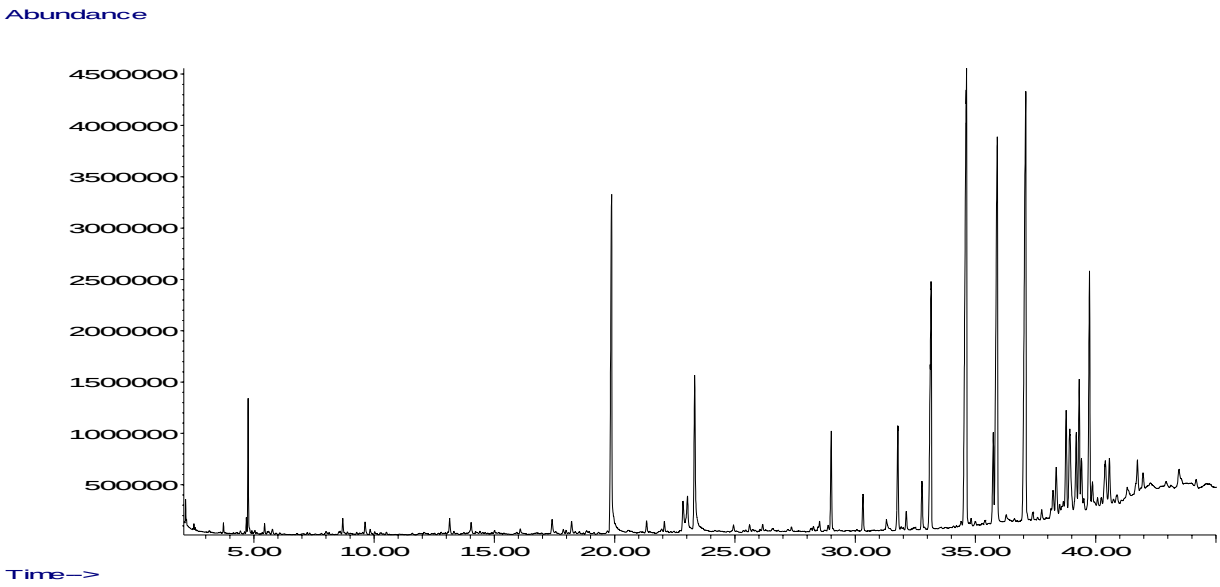
ภาพที่ 23 โครมาโตแกรมของ สารสกัด Hexane ของพรอพอลิส จาก *T. laeviceps*



ภาพที่ 24 โครมาโตแกรมของ สารสกัด Ethly acetate ของพรอพอลิส จาก *T. laeviceps*

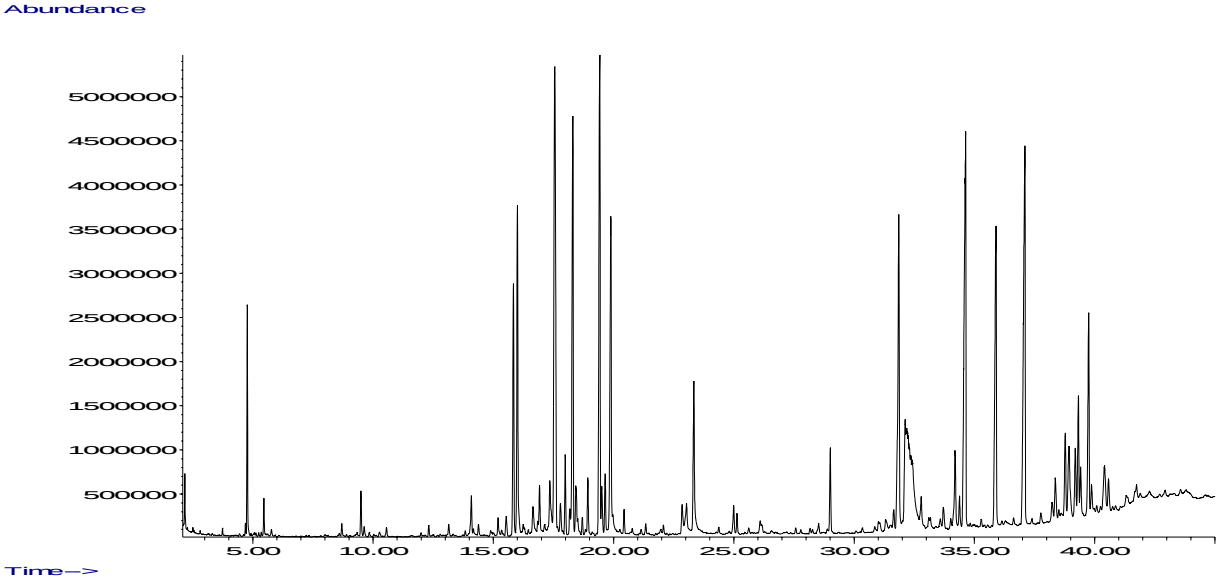


ภาพที่ 25 โครมาโตแกรมของ สารสกัด Methanol ของพรอพอลิส จาก *T. laeviceps*



ภาพที่ 26 โครมาโตแกรมของ สารสกัด Hexane ของพรอพอลิส จาก *T. terminata*

ภาพที่ 27 โครมาโตแกรมของ สารสกัด Ethyl acetate ของพรอพอลิส จาก *T. terminata*



ภาพที่ 28 โครมาโตแกรมของ สารสกัด Methanol ของพรอพอลิส จาก *T. terminata*

บทที่ 4

ข้อวิจารณ์ (DISCUSSION)

4.1 สายพันธุ์ชันโรงที่เหมาะสมจะนำมาเลี้ยงเพื่อเก็บผลผลิต

จากการสำรวจพบว่าในประเทศไทยมีชันโรงที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้อย่างน้อย 7 ชนิด ได้แก่ *T. pagdeni T. laeviceps T. terminate, T. fuscobulteata*, *T. apicalis*, *T. collina* และ *T. minor* โดยมี 4 ชนิดเป็นที่นิยมเลี้ยงมากที่สุด ได้แก่ *T. pagdeni T. laeviceps T. terminata* และ*T. fuscobalteata*

การเปลี่ยนแปลงปริมาตรของเซลล์ไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ น้ำหวานและเกสร พบว่าชันโรงชนิด *T. pagdeni* มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด รองลงมาคือ *T. terminata T. laeviceps* และ *T. fuscobalteata* ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักรัง มีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในชันโรงทั้ง 4 ชนิด โดยชันโรงชนิด *T. pagdeni* , *T. laeviceps, T. terminata* และ *T. fuscobalteata* ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ชันโรงชนิด *T. terminata* มีอัตราการหนีรังสูงที่สุด โดยพบว่าทุกรัง (ที่เลี้ยงในกล่อง) หนีรังทั้งหมดหลังระยะการเลี้ยง

ผลการวิเคราะห์น้ำผึ้งทั้ง 3 ชนิด ตามมาตรฐาน มอก. น้ำผึ้ง *T. fuscobalteata* สามารถเก็บน้ำผึ้งได้น้อยมาก ปริมาณไม่เพียงพอต่อการตรวจ โดยน้ำผึ้งจากชันโรงทั้ง 3 ชนิด *T. pagdeni T. laeviceps* และ *T. terminata* มีระดับน้ำตาลรีดิวซิงน้อยกว่ามาตรฐาน ความชื้นและความเป็นกรดสูงกว่ามาตรฐาน

การคัดเลือกสายพันธุ์ชันโรงที่เหมาะสำหรับนำมาศึกษาในการวิจัยครั้งนี้ พิจารณาจาก

1). ความสามารถในการดำรงชีวิตภายใต้สภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย

2). ความสามารถในการเพิ่มประชากร และจำนวนปริมาณประชากรที่พบในแต่ละชนิด ชนิดที่มีปริมาณประชากรมาก และมีประสิทธิภาพในการเพิ่มประชากรสูง ทำให้ผลผลิตต่อรังเพิ่มขึ้นตามไปด้วย

3). ประสิทธิภาพในการให้ผลผลิต ชันโรงมีความสามารถในการเก็บเกี่ยววัตถุดิบต่างกัน ชนิดที่มีประสิทธิภาพสูง จะให้ผลผลิตสูงตามไปด้วย

4). กระแสความต้องการของตลาด น้ำผึ้งชันโรงบางชนิดเป็นที่นิยม บางชนิดไม่ค่อยมีการเคลื่อนไหวในการค้าขาย อาจขึ้นอยู่กับชนิดที่มีความต้องการมาก มีรสชาติดี ให้ผลผลิตมาก ได้ทันต่อความต้องการของผู้บริโภค หรือบางชนิดอยู่ในกระแสความนิยมในการนำไปทำยารักษาโรค

T. collina แหล่งที่อยู่อาศัยมักจะทำรังใต้ดิน ในโพรงปลวก มีความยากในการนำพันธุ์จากธรรมชาติมาเลี้ยงเนื่องจากโครงสร้างของรังใต้ดินมีความสลับซับซ้อนมาก บางรังท่อทางเข้ามีความยาวถึง 40 เมตร

อยู่ลึกลงไปใต้ดินได้ถึง 10 เมตร (Sakagami, 1993) นอกจากนี้การนำมาเลี้ยงในหีบเลี้ยงจึงไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากสภาพหีบไม้แตกต่างจากดินพอสมควร

T. terminata อาศัยอยู่ตามโพรงไม้ที่มีชีวิต (ตารางที่ 4) การนำพันธุ์จากธรรมชาติมาเลี้ยงในหีบเลี้ยง โอกาสการเลี้ยงสำเร็จค่อนข้างต่ำ ถึงแม้ขนาดรังจะใหญ่และให้ผลผลิตสูง เนื่องจากต้องควบคุมอุณหภูมิให้ใกล้เคียงกับสภาวะภายในโพรงไม้ที่ยังมีชีวิตอยู่ (Sakagami, 1993) นั่นจึงเป็นสาเหตุที่ว่าชันโรงชนิดนี้ หนีรังในอัตราที่สูงมากในการทดลอง

หากวิเคราะห์ตามคุณลักษณะดังกล่าว *T. pagdeni* จึงเป็นพันธุ์ที่มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีความทนทาน ปรับตัวให้เข้ากลับพื้นที่เลี้ยงได้ดีในทุกพื้นที่ ให้ผลผลิตได้ในระดับดีมาก นอกจากนี้ *T. laeviceps* ก็มีความเหมาะสมในการเลี้ยงอีกหนึ่งชนิด ด้วยคุณลักษณะทนทานและสามารถให้ผลผลิตได้ดีหากไม่สามารถหาชันโรง *T. pagdeni* ได้

ตารางที่ 4 พฤติกรรมการทำรังของชันโรงแต่ละชนิดที่สำรวจได้ (พณัญญา พบสุข และ สาวิตรี มาไลยพันธุ์, 2550)

ชนิดชันโรง	ลักษณะการสร้างรัง				
	โพรงต้นไม้ที่มีชีวิต	รังในดิน		โพรงไม้ที่ไม่มีชีวิต	โพรงเทียม เช่น วัสดุหรือภาชนะต่าง ๆ
		โพรงดิน	โพรงปลวก		
T. terminata	√				
T. apicalis	√	√			√
T. colina	√	√	√		
T. pagdeni	√			√	√
T. laeviceps	√			√	√
T. fuscobalteata	√			√	√

4.2 คุณสมบัติของน้ำผึ้งชันโรง

ผลการวิเคราะห์น้ำผึ้งทั้ง 3 ชนิด ตามมาตรฐาน มอก. พบว่าชันโรงทั้ง 3 ชนิด *T. pagdeni T. laeviceps* และ *T. terminata* มีระดับน้ำตาลรีดิวซิงน้อยกว่ามาตรฐาน ความชื้นและความเป็นกรดสูงกว่ามาตรฐาน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sawasthum และคณะ (2009) ซึ่งเปรียบเทียบคุณสมบัติของน้ำผึ้งจากชันโรงกับน้ำผึ้งจากผึ้งพันธุ์ พบว่าน้ำผึ้งชันโรงมีความชื้นสูงกว่า แต่มีปริมาณน้ำตาลน้อยกว่าน้ำผึ้งจากผึ้งพันธุ์ ซึ่งน้ำผึ้งจากชันโรงในต่างประเทศก็มีระดับความชื้นค่อนข้างสูงเช่นกัน (Bijlsma et al. 2006; Torres et al., 2004; De Bruijn and Sommeijer, 1997) ดังนั้นจึงเริ่มเป็นประเด็นถกเถียงกันเรื่อง

มาตรฐานน้ำผึ้งชันโรงโดยระบุว่าน้ำผึ้งชันโรงไม่สามารถใช้มาตรฐานเดียวกันกับน้ำผึ้งจากผึ้งให้น้ำหวานได้ จึงควรกำหนดมาตรฐานสำหรับน้ำผึ้งชันโรงขึ้นโดยเฉพาะ (Souza et. al., 2006)

4.3 ผลการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำผึ้งและพรอพอลิสจากชันโรง

น้ำผึ้ง มีลักษณะเหนียวข้น มีสีน้ำตาลทองคล้ายสีน้ำผึ้งแต่มีลักษณะใส สารสกัดพรอพอลิสมีลักษณะเหนียวข้นมาก มีสีแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของชันโรง โดยสารสกัดพรอพอลิสจาก *T. pagdeni*: มีสีน้ำตาลเข้ม ลักษณะเหนียวมาก สารสกัดพรอพอลิสจาก *T. laeviceps*: มีสีน้ำตาลเข้ม มีความเหนียวมากและสารสกัดพรอพอลิสจาก *T. terminata* มีสีน้ำตาลน้ำตาลแดงทอง ลักษณะเหนียวน้อยกว่าสองชนิดข้างต้น

สีและคุณลักษณะทางกายภาพของน้ำผึ้งและพรอพอลิสสามารถแปรผันได้ตามชนิดของพืชอาหาร (Bruijn de and Sommeijer, 1997).และพืชให้ยาง (ชามา อินซอน และ สาวิตรี มาไลยพันธุ์, 2549) อย่างไรก็ตาม *T. fuscobalteata* ให้น้ำผึ้งสีน้ำตาลอ่อนทอง มีความสวยงามมาก เพียงแต่ให้ผลผลิตค่อนข้างน้อยต่อรัง การนำมาเลี้ยงเพื่อเก็บผลผลิตจึงอาจจะไม่คุ้มค่า

4.3.1 ฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิดในเบื้องต้นด้วยน้ำผึ้ง พบว่าน้ำผึ้งจากชันโรงทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albican*, *E.coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtillis* และ *S. aureus* ได้อย่างดี

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิดในเบื้องต้นด้วยสารสกัดหยาบพรอพอลิส พบว่าพรอพอลิส สามารถยับยั้งการเจริญของ *E.coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtillis* และ *S. aureus* ได้อย่างดี แต่มีพรอพอลิสจากบางชนิดเท่านั้นที่สามารถยับยั้ง *C. albican* ได้

สารสกัดหยาบ Ethyl Acetate ของพรอพอลิสจากชันโรงทั้ง 3 ชนิด *T. pagdeni T. laeviceps* และ *T. terminata* ให้ผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด

พบคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ในสารสกัด Methanol ของพรอพอลิสและบางส่วนในสารสกัด Hexane แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัดหยาบ Hexane ของ *T. pagdeni* และ *T. laeviceps* ไม่แสดงผลยับยั้ง *E. coli* และในพรอพอลิสจาก *T. terminata* สารสกัดหยาบ Methanol ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ Hexane ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้

จากการทดลองสารสกัดหยาบ Ethly Acetate แสดงฤทธิ์ยับยั้งการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด แสดงว่าเป็นสารกลุ่มที่มีขั้วเล็กน้อยถึงปานกลาง อย่างไรก็ตามมีสารออกฤทธิ์บางชีวภาพบางกลุ่มละลายใน Methanol และ Hexane

สารสกัดจากพรอพอลิสชันโรงแสดงผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอย่างชัดเจน แม้จะมีความแตกต่างในรายละเอียด แต่ก็มีประสิทธิภาพค่อนข้างสูงในการยับยั้ง (Pereira *et al*., 2003; Chanchao, 2006, Souza *et al*., 2006; Bankova and Popova, 2007) เป็นที่ยอมรับกว้างขวางและได้รับความสนใจอย่างดีจากนักวิจัย (Heard and Dollin, 2000, Duagsch et al., 2007) ในบราซิล อเมริกาใต้ ออสเตรเลีย

และญี่ปุ่น ทั้งนี้คุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์จะมาจากยางไม้ที่ผึ้งเก็บมาเป็นส่วนผสมของรัง ดังนั้น น้ำผึ้งจึงมีคุณสมบัตินี้ในความเข้มข้นน้อยกว่าพรอพอลิสสกัดโดยตรง

งานวิจัยส่วนใหญ่ได้มุ่งเน้นไปที่พรอพอลิสมากกว่าน้ำผึ้ง และได้ทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามคุณสมบัติการต้านเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำผึ้งก็มีความคล้ายคลึงกับสารสกัดพรอพอลิสมากเช่นกัน (Bankova and Popova, 2007) โดยส่วนใหญ่ผลวิจัยชี้ว่าสารสกัดพรอพอลิสสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแกรมบวก และพรอพอลิสจากชันโรงจาก *Partamona* spp. (Fernandes et al., 2001), *Melipona* spp.(Fernandes et al., 2001), *Melipona quadrifasciata* (Velikova et al., 2000), *Tetragonsisca angustula* (Miorin et al., 2003) มีประสิทธิภาพสูงกว่าพรอพอลิสจากผึ้งพันธุ์

ในประเทศไทยก็มีงานวิจัยหลายชิ้นที่ศึกษากับจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด พบคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และ รา *Candida albican* จากน้ำผึ้งและพรอพอลิสของ *T. laeviceps* จังหวัดสมุทรสงคราม (Chanchao, 2009) นอกจากนี้ Supawadee and Chanchao (2008) ยังพบการยับยั้งแบ่งเซลล์ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วย

4.3.2 องค์ประกอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

จากผลการวิเคราะห์ด้วย GC - MS พบสารทั้งหมดกว่า 90 ชนิด ส่วนใหญ่เป็น terpinoids diterpinoids และ phenolic compounds และยังมีกลุ่มสารประกอบไฮโดรคาร์บอนบางส่วน ซึ่งก็สอดคล้องกับงานวิจัยหลายชิ้นที่กล่าวถึง คือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะเป็นกลุ่มที่มีขั้วปานกลาง จึงพบสารออกฤทธิ์ในสารสกัดเฮกเซนมากที่สุด (รายละเอียดกล่าวไว้ในหน้า 3-4) ในพรอพอลิสจาก *Melipona quadrifasciata* พบ diterpenic acids เป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (Velikova et al., 2000) ทั้งนี้ประสิทธิภาพของพรอพอลิสก็แตกต่างกันตามแต่ชนิดของพรอพอลิส เช่น พรอพอลิสจากชันโรงในประเทศบราซิล 12 ชนิด ให้ผลยับยั้งไม่ชัดเจนนักกับ *S. aureus* และมีประสิทธิภาพต่ำกว่าพรอพอลิสจากผึ้ง (Popova et al., 2004)

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Recommendation)

ประเทศไทยมีชันโรงที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้อย่างน้อย 7 ชนิด ได้แก่ *T. pagdeni T. laeviceps T. terminata, T. fuscobalteata*, *T. apicalis*, *T. collina* และ *T. minor* โดยมี 4 ชนิดเป็นที่นิยมเลี้ยงมากที่สุด ได้แก่ *T. pagdeni T. laeviceps T. terminata* และ*T. fuscobalteata*

T. pagdeni และ *T. laeviceps* เป็นพันธุ์ที่มีความเหมาะสมในการเลี้ยงที่สุด เนื่องจากทนทาน สามารถปรับตัวให้เข้ากลับพื้นที่เลี้ยงได้ดีในทุกพื้นที่ ให้ผลผลิตคือน้ำผึ้งและพรอพอลิสดี *T. terminata* ให้ผลผลิตสูง แต่เลี้ยงยาก เนื่องจากมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมากจึงทิ้งรังได้ง่าย อีกทั้งชันโรงชนิดนี้มักอาศัยในโพรงไม้ที่ยังมีชีวิตอยู่ การหาพันธุ์มาเลี้ยงจึงยากกว่าเพราะไม่ควรที่จะตัดต้นไม้เพื่อการเก็บพันธุ์ชันโรงชนิดนี้มาเลี้ยง สำหรับงานวิจัยของ *T. terminata* ในอนาคตควรมุ่งเน้นไปในเรื่องการควบคุมอุณหภูมิในหีบเลี้ยงให้มีสภาวะใกล้เคียงกับอุณหภูมิในโพรงต้นไม้ที่ยังมีชีวิตอยู่

สีและคุณลักษณะทางกายภาพของน้ำผึ้งและพรอพอลิสที่ศึกษาได้ มีการแปรผันได้ตามชนิดของพืชอาหาร และพืชให้ยาง น้ำผึ้งจาก *T. fuscobalteata* ให้น้ำผึ้งสีน้ำตาลอ่อน แต่ให้ผลผลิตน้อย น้ำผึ้งจากชันโรง *T. pagdeni T. laeviceps* และ *T. terminata* มีระดับน้ำตาลรีดิวซิงน้อยกว่าน้ำผึ้งจากผึ้งให้น้ำหวานรสชาติจึงไม่หวานจัด มีความเป็นกรดสูงกว่ามาตรฐาน รสชาติจึงปนรสเปรี้ยวเล็กน้อย นอกจากนี้ น้ำผึ้งจาก *T. terminata* มีความรสชาติค่อนข้างเปรี้ยวกว่าน้ำผึ้งจากชันโรงชนิดอื่น คุณสมบัติน้ำผึ้งจากชันโรงควรอ้างอิงมาตรฐานจากน้ำผึ้งชันโรง (ซึ่งมีใช้แล้วในประเทศบราซิล) แทนการอ้างอิงจากมาตรฐานน้ำผึ้งจากผึ้งพันธุ์ น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะวิจัยเพื่อสนับสนุนการสร้างมาตรฐานของน้ำผึ้งชันโรงในประเทศไทย นอกจากนี้น้ำผึ้งจากชันโรงมีความชื้นที่ค่อนข้างสูง จึงควรต่อยอดการวิจัยด้านอายุการเก็บรักษาน้ำผึ้งชันโรงและวิธีการเก็บผลผลิตที่ถูกวิธีต่อไป

น้ำผึ้งและพรอพอลิสจากชันโรงแสดงฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีมาก และในสารสกัดพรอพอลิสมีประสิทธิภาพสูงกว่าในน้ำผึ้ง อย่างไรก็ตามสารสกัด Ethly acetate ของพรอพอลิสให้ประสิทธิภาพสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัด Hexane และ Methanol อย่างไรก็ตามพบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียในสารสกัด Hexane และ Methanol บ้างแต่ต่ำกว่าและไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์บางตัวได้ ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบ สารในกลุ่มออกฤทธิ์ คือ terpinoids, diterpinoids และ phenolic compounds และยังมีกลุ่มสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสายยาวบางส่วน สารในกลุ่มออกฤทธิ์มีความเป็นไปได้สูงที่จะเป็นแบบทำงานร่วมกัน (Synergistic activity) ซึ่งน้ำผึ้งและพรอพอลิสจากชันโรงแสดงประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งแบคทีเรีย จึงนับเป็นทางเลือกที่น่าสนใจที่จะทำวิจัยต่อเนื่องเพื่อการประยุกต์ใช้ด้านอุตสาหกรรมอาหารและยาต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง (References)

ชามา อินซอน และ สาวิตรี มาไลยพันธ. 2549. ความหลากหลายของชนิดชันโรง (Apidae: *Trigona* spp. และ *Hypotrigona* spp.) และพฤติกรรมการเก็บยางไม้จากธรรมชาติ ในโครงการทองผาภูมิ 72 พรรษามหาราช อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี. *รายงานวิจัยโครงการ BRT*: 20-31

พณัญญา พบสุขและ สาวิตรี มาไลยพันธุ์. 2550. ชีววิทยาของชันโรงสกุล *Trigona* และสกุล *Hypotrigona* ในโครงการทองผาภูมิ 72 พรรษามหาราช อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี. *รายงานการวิจัยในโครงการ BRT*: 327 - 333

วันทา ทวีผล. 2546. *การศึกษาชีววิทยาของชันโรง Trigona (Lepidotrigona) terminata Smith และประสิทธิภาพการช่วยผสมเกสรทุเรียนพันธุ์ชะนี (Durio zibethinus L.) Cultivar Chane*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สมนึก บุญเกิด. 2551. บทสัมภาษณ์: *ไทยรัฐ* 1 พ.ค. 51

อัชลี นามวงษ์. 2546. *ประสิทธิภาพของชันโรง (Trigona laeviceps) (Hymenoptera: Apidae) ในการเพิ่มผลผลิตของแก้วมังกร*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Allen, K.L., Molan, P.C., Reid, G.M. 1991. A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *J. Pharm. Pharmacol.* **43**: 817 – 22.

Bankova, V. 2005. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence - based Complementary and Alternative Medicin*e. **2**: 29 - 32.

Bankova, V. and Popova, M. 2007. Propolis of stingless bees: a promising source of biologically active compounds. *Pharmacognosy Reviews* **1**: 88 - 92.

Bijlsma, L., de Bruijn, L L.M., Martens, E.P.and Sommeijer, M.J. 2006. Water content of stingless bee honeys (*Apidae, Meliponini)*: interspecific variation and comparison with honey of *Apis mellifera. Apidologie* **37**: 480 – 486.

Bruijn de, L.L.M.and M.J. Sommeijer. 1997. The composition and properties of honeys of stingless bees (*Melipona)*, in: Sommeijer M.J., Beetsma J., Boot W.-J., Robberts E.-J., Vries de R. (Eds.), Perspectives for honey production in the tropics, NECTAR:IBRA, pp. 149 - 168.

Burdock, G.A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology* **36**: 347 - 363.

Chanchao, C. 2009. Antimicrobial activity by *Trigona laeviceps* (stingless bee) honey from Thailand. Pak. *J. Med. Sci* (Part-II) **25**: 364 – 369.

Chanchao, C. Sintara, K. and Wongsiri, S. 2006. Comparison of antibiotic and organoleptic properties of honey from Various plant sources in Thailand. *Journal of Apicultural Scince* **50**: 59 - 64.

Cirasino, L., Pisati, A. and Fasani, F. 1987. Contact der-matitis from propolis. *Contact Dermatitis* **16**: 110 - 111.

DeMera, J.H., Angert, E.R. 2004. Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytogeographic regions of Costa Rica. *Apidologie* **35**: 411 – 17.

Dollin, A. 1996. Introductiom to Australian Native bees. Native bees of Australia Series Booklet 1 North Richmond NSW 2754.

Duagsch, A., Moraes, C.S., Patricia, F. and Park, Y.K. 2007. Brazilian red propolis-chemical composition and botanical origin. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. July. 1-7.

Eltz, T., Brühl, C.A., Van Der Kaars, S. and Linsenmair, K.E. 2002. Determinants of stingless bee density in lowland dipterocarp forests of Sabah, Malaysia. *Oecologia.* **131**: 27 – 34.

Fernandes Jr., A., Leomil, L., Fernandes, A.A.H., Sforcin, J.M. 2001. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. *J.Venom. Anim. Toxins* **7**: 137 – 182.

Garedew, A. Schmolz, E. and Lamorecht, I. 2004. Microcalorimetric investigation on the antimicrobial activity of honey of the stingless bee Trigona spp. and comparison of some parameters with those obtained with standard methods. *Thermochimica Acta* **415**: 99 – 106.

Heard, T.A.. 1999. The role of stingless bees in crop pollination. *Annu. Rev. Entomol.* **44**: 183 – 206.

Heard, T.A. and Dollin, A.E. 2000. Stingless bee-keeping in Australia: snapshot of an infant industry. *BeeWorld* **81**: 116 - 126.

Irish, J., Carter, D.A., Blair, S.E. and Heard, T.A. 2008. Antibacterial activity of honey from the Australian stingless bee *Trigona carbonaria*. *International Journal of Antimicrobial Agents* **32**: 89-98.

Klakasikorn, A., Wongsiri, S., Deowanish, S. and Dunagphakdee, O. 2005. New Record of Stingless bees (Meliponini: *Trigona*) in Thailand. *The Natural History Journal of Chulalongkorn University* **5**: 1 - 7.

Markham, K.R., Mitchell, K.A., Wilkins, A.L., Daldy, J.A. and Lu, Y. 1996. HPLC and GC-MS Identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry* **42**: 205 - 211.

Monti, M., Berti, E., Carminati, G. and Cusini , M. 1983. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis* **9**: 163.

Miorin, P.L., Levy, Jr N.C., Custodio, A.R., Bretz, W.A., Marcucci M.C. 2003. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and*Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol* **95**: 913 – 20.

Nates-Parra, G. 2001. Stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) of Colombia. *Biote Colombiana* **2**: 235 – 242.

Patricio, E.F.L.R.A., Cruz-Lopez, Leopoldo, Maile, R., Tentschert, J., Jone, G.R. and David-Morgan, E. 2002. The propolis of stingless bees: terpenes from the tibia of three *Frieseomelitta* species. *Journal of Insect of Phisiology* **48**: 249 - 254.

Pereira, A.S., Bicalho, B and Aquino Neto, F. R. 2003. Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. *Apidologie* **34**: 291 – 298.

Pisco, L., Kordian, M., Peseke, K., Feist, H., Michalik, D. Estrada, E., Carvolho, J., Hamilton, G., Rando, D. and Quincoces, J. 2006. Synthesis of compounds with antiproliferative activity as analogues of prenylated natural products existing in Brazilian propolis. *European Journal of Medicinal Chemistry* **41**: 401 - 407.

Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Damyanova, B., Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L., and Bogdanov, S. 2003. Poplar type propolis and analysis of its biologically active components. *Honeybee Science* **24**: 61 – 66.

Popova M., Bankova V., Naydenski H., Tsvetkova I., Kujumgiev A. 2004. Comparative study of the biological activity of propolis from different geographic origin: a statistical approach. *Mac. Pharm. Bull.* **50**: 9 – 14.

Sakagami, S. F, Inoue, T., Yamane, S. and Salmah, S. 1983. Stingless bees in: *Ecological Study on Social Insects in Central Sumatra with Special Reference to Wasps and Bees*, Reports for Oversea Scientific Survey. 37 - 56.

Sawatthum A. 2004. Stingless beekeeping inThailand. *8th International Conference on Tropical Bees and VI Encontro sobre Abelhas - 2004*. Ribelrao Preto, SP.Brazil

Souza, B., Roubik, D., Barth, O, Heard, T., Enri′quez, E., Carvalho, C., Villas-Boas, J., Marchini, L., Locatelli, J., Persano-Oddo, L., Almeida-Muradian, L., Bogdanov, S. and Vit, P. 2006. Composition of stingless bee honey: setting quality standards. *Interciercia* **31**: 867 - 875.

Sawatthum A., Vaithanomsat P. and Tadakittisarn S. 2552. Comparative composition of honey from Thai stingless bee and European honeybee (*Apis mellifera* L.). Proceedings of 47th Kasetsart University Annual Conference: Plants, Bangkok (Thailand). 139 - 144.

Teixeira, E.W., Negri, G., Meira, R.M., Message, D., Salatino, A. 2005. Plant origin of green propolis : bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2**: 85 - 92.

Temaru, E., Shimura, S., Amano, K., Karasawa, T. 2007. Antibacterial activity of honey from stingless honeybees (Hymenoptera; Apidae; Meliponinae). *Pol J Microbiol* 56:281 – 5.

Torres, A., Garedew, A., Schmolz, E., Lamprecht, I. 2004. Calorimetric investigation of the antimicrobial action and insight into the chemical properties of “angelita” honey – a product of the stingless bee *Tetragonisca angustula* from Columbia, *Thermochim. Acta* **415**: 107 - 113.

Umthong, S. and Chanchao, C. 2008. Antimicrobial activity and antiproliferative activity of *Trigona laeviceps* propolis on intestine cancer cell line. *34th Congress on Science and Technology of Thailand* 31 October - 2 November, 2008

Velikova, M., Bankova V., Tsvetkova I., KujumgieA. v, Marcucc M. C. i. 2000. Antibacterial *ent*-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia* **71**: 693 – 696.

ภาคผนวก

โครงการการอบรมการส่งเสริมการเลี้ยงชันโรงเพื่อเก็บผลผลิต

ภาพกิจกรรมวิทยากรบรรยายชีววิทยาทั่วไปของชันโรง

ภาพกิจกรรมวิทยากรสาธิตการแยกขยายรังชันโรง

ภาพแสดงตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้น

ภาพแสดงการทำแชมพูและครีมอาบน้ำพรอพอลิส