

ฤทธิ์ของนมผึ้งในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางผิวหนัง  
Antibacterial Activity of Royal Jelly Against Skin Pathogenic Bacteria

มนสรณ์ ลิขิตสุข

อีเมล: 6652003285@lamduan.mfu.ac.th

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

รองศาสตราจารย์ ดร.ภัครวรรณ ลิขิตประภาพร

อีเมล: wichian.sit@mfu.ac.th

สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของนมผึ้งต่อเชื้อก่อโรคผิวหนัง ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* และ *Cutibacterium acnes* โดยทำการทดสอบด้วยวิธี Agar Well Diffusion เพื่อหาค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) และด้วยวิธี Broth Microdilution เพื่อหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) จากการทดสอบด้วยวิธี Agar Well Diffusion พบว่านมผึ้งมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของ *S. aureus* ที่  $12.83 \pm 0.76$  mm และ *C. acnes* ที่  $20.67 \pm 0.58$  mm แต่ไม่สามารถยับยั้ง *S. pyogenes* ได้ จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Mann-Whitney U test พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของ นมผึ้งและ Levofloxacin (ค่า  $p = 0.029$ ,  $p < 0.05$ ) และผลการวิเคราะห์เชิงพรรณนาพบว่า ค่า MIC และ MBC ของนมผึ้งต่อ *S. aureus* และ *C. acnes* เท่ากับ 75,000  $\mu\text{g/mL}$  ขณะที่ยา Levofloxacin ใช้เพียง 5  $\mu\text{g/mL}$  แม้ว่านมผึ้งจะต้องใช้ในปริมาณที่สูงกว่า แต่นมผึ้งก็ยังแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้เป็นอย่างดี ในผลการศึกษาจึงสนับสนุนศักยภาพของนมผึ้งในด้านการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางผิวหนังซึ่งเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในยุคที่ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะเพิ่มสูงขึ้น

คำสำคัญ: นมผึ้ง, ฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย, Levofloxacin, MIC, MBC, โรคติดเชื้อทางผิวหนัง

## Abstract

This study aimed to evaluate the antibacterial activity of royal jelly against skin pathogenic bacteria, including *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Cutibacterium acnes*. Antibacterial activity was assessed using the agar well diffusion method to determine inhibition zone diameters, and the broth microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The agar well diffusion assay demonstrated that royal jelly produced inhibition zones of  $12.83 \pm 0.76$  mm against *S. aureus* and  $20.67 \pm 0.58$  mm against *C. acnes*, while no inhibitory effect was observed against *S. pyogenes*. Statistical analysis using the Mann–Whitney U test revealed a significant difference in antibacterial activity between royal jelly and levofloxacin ( $p = 0.029$ ,  $p < 0.05$ ). Descriptive analysis further showed that the MIC and MBC values of royal jelly against *S. aureus* and *C. acnes* were 75,000  $\mu\text{g/mL}$ , whereas levofloxacin required only 5  $\mu\text{g/mL}$ . Although royal jelly required a substantially higher concentration to exert antibacterial effects, it nonetheless demonstrated appreciable inhibitory potential. These findings support the potential role of royal jelly as a natural antibacterial agent against skin pathogens and suggest its value as an alternative approach in the era of rising antibiotic resistance.

**Keywords:** Royal Jelly, Antibacterial activity, Levofloxacin, MIC, MBC, Skin infections

## บทนำ/หลักการและเหตุผล (Introduction)

การดื้อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic resistance) เป็นหนึ่งในปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญและทวีความรุนแรงมากขึ้นทั่วโลก โดยเฉพาะในเชื้อก่อโรคทางผิวหนังซึ่งเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยในทางคลินิก ปัจจุบันเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยา Methicillin หรือที่เรียกว่า Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ได้กลายเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน ขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus pyogenes* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคผิวหนัง เช่น แผลพุพอง (Impetigo) ก็เริ่มมีรายงานการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดรวมถึงยา Clindamycin และ Erythromycin (Lu et al., 2017; Gooskens et al., 2005) นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรีย *Cutibacterium acnes* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดสิวก็มีแนวโน้มการดื้อยาปฏิชีวนะชนิดทาเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะยา Clindamycin และ Erythromycin (George, et al., 2022) นมผึ้งได้รับความสนใจอย่างมากในฐานะสารธรรมชาติที่มีองค์ประกอบต้านจุลชีพหลายชนิด ซึ่งสามารถออกฤทธิ์แตกต่างกันต่อเชื้อก่อโรคผิวหนัง โดยในกรณีของ *Staphylococcus aureus* มีรายงานว่าสาร 10-hydroxy-2-decenoic acid (10-HDA) และโปรตีนในกลุ่ม Major Royal Jelly Proteins (MRJPs) สามารถยับยั้งการสร้างผนังเซลล์และการเจริญเติบโตของเชื้อได้ แม้ประสิทธิภาพจะด้อยกว่ายาปฏิชีวนะมาตรฐาน แต่ก็แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของนมผึ้งในการเป็นสารทดแทนจากธรรมชาติ (Bagameri et al., 2022; Bílikova et al., 2015) ส่วน *Streptococcus pyogenes* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง เช่น แผลพุพองและการติดเชื้อเนื้อเยื่ออ่อน กลับไม่พบฤทธิ์ยับยั้งที่ชัดเจนจากนมผึ้ง อันอาจเกิดจากลักษณะเฉพาะของผนังเซลล์ที่มีความทนทานต่อสารออกฤทธิ์หรือการแพร่กระจายที่จำกัดของสารต้านจุลชีพในนมผึ้ง (Lu et al., 2017) ในขณะที่ *Cutibacterium acnes* ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของสิว แสดงความไวต่อการออกฤทธิ์ของนมผึ้งได้อย่างชัดเจน โดยสาร 10-HDA และ antimicrobial peptides เช่น royalisin สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อและลดการอักเสบที่สัมพันธ์กับสิวได้ (Uthaibutra et al., 2023; Hassanien, 2012) ดังนั้น นมผึ้งจึงมีความสัมพันธ์ในการต้านเชื้อแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด โดยให้ผลเด่นชัดต่อ *C. acnes* รองลงมาคือ *S. aureus* และไม่พบผลต่อ *S. pyogenes* ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความจำเพาะของสารออกฤทธิ์ในนมผึ้ง และตอกย้ำความสำคัญของการศึกษาต่อยอดเพื่อเพิ่มศักยภาพในการนำไปใช้จริงทั้งในเชิงการแพทย์และเวชสำอาง แม้ว่ายาปฏิชีวนะยังคงเป็นวิธีการรักษาหลักในการควบคุมการติดเชื้อผิวหนัง แต่การใช้ในระยะยาวส่งผลให้เกิดการดื้อยาและลดประสิทธิภาพของการรักษา ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการค้นหาสารทดแทนที่มาจากธรรมชาติซึ่งสามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ โดยไม่เพิ่มแรงกดดันในการคัดเลือกเชื้อดื้อยา หนึ่งในนั้นคือ “นมผึ้ง” (Royal Jelly) ซึ่งมีรายงานว่ามีส่วนประกอบทางชีวภาพ เช่น กรดไขมันชนิด 10-hydroxy-2-decenoic acid (10-HDA) และโปรตีนสำคัญในกลุ่ม Major Royal Jelly Proteins (MRJPs) ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Bagameri et al., 2022; Bílikova et al.,

2015) จากข้อมูลดังกล่าว นมผึ้งจึงเป็นสารธรรมชาติที่น่าสนใจในการศึกษาศักยภาพด้านเชื้อก่อโรคผิวหนัง

### ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

#### 1. ประชากรและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

1) ประชากรเป็นแบคทีเรียก่อโรคทางผิวหนังทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* และ *Cutibacterium acnes*

2) กลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ นมผึ้ง จากผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ซึ่งเลี้ยงในพื้นที่ที่มี การเก็บเกสรจากดอกไม้ป่าในแหล่งธรรมชาติ และเก็บตัวอย่างนมผึ้งในช่วงฤดูฝน ระหว่าง เดือนกรกฎาคมถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2567 ซึ่งเป็นช่วงเวลาแห่งการบานสะพรั่งของดอกไม้ป่า ชนิด หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-2^{\circ}\text{C}$  โดยใช้นมผึ้งที่ความเข้มข้น 300 mg/mL ซึ่งเจือจางด้วยน้ำกลั่น และยาเลโวฟลอกซาซิน (Levofloxacin) เป็นยาปฏิชีวนะใช้เป็น positive control อยู่ในรูปแบบผงสำหรับการทดสอบ MIC และ MBC ด้วยวิธี Broth microdilution และใน รูปแบบแผ่นกระดาษ (disc) ขนาด 5  $\mu\text{g}/\text{disc}$  สำหรับวิธี Agar well diffusion

#### 2. เครื่องมือวิจัย

การศึกษาด้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางผิวหนังในครั้งนี้ดำเนินการโดยห้องปฏิบัติการของ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียว จังหวัดสมุทรปราการ ซึ่งเป็นหน่วยงานเอกชน ที่ได้รับรองตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการ โดยเครื่องมือที่ใช้สำหรับศึกษาด้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ทางผิวหนังของนมผึ้ง มีดังนี้ ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner), จานเพาะเชื้อ (Petri dish), ไม้ พั่นสำลีปลอดเชื้อ (Sterile Cotton Swab), ไมโครปิเปตต์ (Micropipette), ปิเปตต์ทิป (Pipette tip), เครื่องชั่งสารเคมี (Analytical Balance), ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator), โถบ่มเพาะเชื้อในสภาวะ ไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar), 96 Well Plate Flat-Bottle Sterile, Discs ของยา Levofloxacin, Biological safety cabinet, BSC Class II, ที่เจาะจุกคอร์ก (Cork borer), เครื่อง UV Visible spectrophotometer, อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางผิวหนัง Mueller-Hinton Agar (อาหาร แข็ง) และ Broth (อาหารเหลว) จะใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อให้กับ *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus pyogenes* ส่วน Brain Heart Infusion Agar (อาหารแข็ง) และ Broth (อาหาร เหลว) จะใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อให้กับ *Cutibacterium acnes*

#### 3. วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

การทดสอบ Agar well diffusion (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) โดยการทดสอบนี้ทำใน Biological safety cabinet, BSC Class II นำเชื้อแบคทีเรียแต่ละ ชนิดมาเขย่าด้วยเครื่อง Vortex mixer ใช้ปิเปตต์แก้วดูดเชื้อแบคทีเรียมา 0.1 mL แล้วหยดลงบน อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งบนจานเพาะเชื้อ *S. aureus* และ *S. pyogenes* ใช้ Mueller-Hinton Agar



ส่วน *C. acnes* ใช้ Brain Heart Infusion Agar จากนั้นใช้ไม้พันสำลีเกลี่ยเชื้อให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ Streak plate เตรียมสารตัวอย่าง ได้แก่ Disc ยา Levofloxacin 5 µg/disc และสารละลายนมผง 300 mg/mL โดยนำ micropipette ดูดสารละลายนมผงมา 20 µL แล้วปล่อยลงในหลุมที่เจาะไว้ด้วย cork borer และอีกหลุมใส่น้ำกลั่นลงไป นำ Disc สารตัวอย่าง ได้แก่ ยา Levofloxacin 5 µg มา โดยใช้เข็มหนี้นำ disc วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ spread plate ไว้แล้ว โดยวางห่างจากขอบ 15 mm และห่างจากสารตัวอย่างอื่น 10-15 mm จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้อ *S. aureus* และ *S. pyogenes* บ่มในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วน *C. acnes* บ่มในตู้เดียวกันแต่อยู่ในโถเพาะเชื้อที่สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาทั้งหมด 48 ชั่วโมงแล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเขตยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) รอบหลุม วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ทั้ง 2 ด้าน โดยให้ตั้งฉากกัน โดยให้  $X$  = เส้นผ่านศูนย์กลาง disc หรือหลุมที่เจาะใส่สารละลาย และ  $XX$  = เส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone ด้าน  $A = (XX-X)/2$  ด้าน  $B = (XX-X)/2$  โดยมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร (mm) จากนั้นนำค่าที่ได้ทั้ง 2 ค่า มาบวกกันแล้วหารสอง จะได้ค่า Inhibition Zone Diameter

การทดสอบหาค่าของ Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020) ให้ปรับความเข้มข้นของเชื้อ โดยนำเชื้อ stock เดิมมา 0.1 mL แล้วใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอีก 9.9 mL จะได้ปริมาณเชื้อ  $1.5 \times 10^6$  CFU/mL แล้วนำมาใส่ใน 96-well microplate ปริมาณ 50 µL/หลุม เตรียมการเจือจางสารตัวอย่างนมผงแบบสองเท่า (serial dilution) ใส่ใน 96-well microplate ปริมาณ 50 µL/หลุม แล้วเตรียมสารละลายนมผงที่ความเข้มข้น 10, 300, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.375, 4.6875, 2.3438, 1.1719 และ 0.5859 mg/mL และยา Levofloxacin ที่ความเข้มข้น 5 µg/mL จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อลงไปปริมาณ 50 µL/หลุม โดย Mueller Hinton Broth ใส่ในเชื้อ *S. aureus* และ *S. pyogenes* ส่วน Brain Heart Infusion Broth ใส่ใน *C. acnes* นำไปบ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม ดังนี้ โดย *S. aureus* และ *S. pyogenes* บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วน *C. acnes* บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการอ่านค่าของ MIC ให้สังเกตหลุมที่ไม่มีความขุ่นหรือใสจะแสดงให้เห็นว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ และดูความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ต่อมาการทดสอบหาค่า MBC ทำโดยเก็บตัวอย่างจากหลุมที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจากการทดสอบ MIC ก่อนหน้า และดูดสารละลายจากหลุมมา 10 µL หยอดสารละลายที่ได้ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเกลี่ยสารละลายให้ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม โดย *S. aureus* และ *S. pyogenes* บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วน *C. acnes* บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่ 37°C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง สำหรับการอ่านค่า MBC ให้สังเกตจากจานเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ

#### 4. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าที่แสดงผลจะอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean  $\pm$  SD) จากการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับการทดสอบ Agar well diffusion หากข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่ปกติได้ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มนมผึ้งและยา Levofloxacin ในเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* และ *C. acnes* ส่วนใน เชื้อ *S. pyogenes* จะวิเคราะห์ผลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ต่อมาสำหรับการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ได้วิเคราะห์ผลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มนมผึ้งและยา Levofloxacin ที่ทดสอบใน *S. aureus* และ *C. acnes* โดยการวิเคราะห์ข้อมูล ทั้งหมดดำเนินการด้วยโปรแกรมทางสถิติ Program SPSS (มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง) เลขสั่งซื้อ version 21.0 และเลขอ้างอิงการอัปเดตเป็น version 23.0

#### ผลวิจัย (Results)

##### 1. ผลการทดสอบ Agar Well Diffusion

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียของน้ำนมผึ้งต่อเชื้อก่อโรคทางผิวหนัง ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* และ *Cutibacterium acnes* โดยประเมินผ่านการทดสอบขนาด Zone of inhibition จากวิธี Agar Well Diffusion เพื่อใช้ในการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบเบื้องต้น ต่อมาจึงใช้วิธี Broth Microdilution เพื่อหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) และฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) และแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean  $\pm$  SD)

**ตารางที่ 1** ผลการวัดรัศมีการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Inhibition zone) โดยวัดเป็นขนาดรัศมีเฉลี่ยของการยับยั้งเชื้อ (millimeter; mm) โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

| กลุ่มตัวอย่าง  | Average Diameter of Inhibition (millimeter; mm) |                      |                      |
|----------------|-------------------------------------------------|----------------------|----------------------|
|                | <i>S. aureus</i>                                | <i>S. pyogenes</i>   | <i>C. acnes</i>      |
|                | ค่าเฉลี่ย $\pm$                                 | ค่าเฉลี่ย $\pm$      | ค่าเฉลี่ย $\pm$      |
|                | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน                            | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน |
| นมผึ้ง         | 12.83 $\pm$ 0.76                                | 0.00 $\pm$ 0.00      | 20.67 $\pm$ 0.58     |
| 300 mg/mL      |                                                 |                      |                      |
| Levofloxacin   | 28.33 $\pm$ 0.58                                | 20.00 $\pm$ 0.00     | 34.33 $\pm$ 1.15     |
| 5 $\mu$ g/disc |                                                 |                      |                      |

หมายเหตุ *S. aureus* = *Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes* = *Streptococcus pyogenes*, *C. acnes* = *Cutibacterium acnes*,  $\mu$ g = microgram, mg = milligram, mL = milliliter

จากผลการทดลองพบว่า นมผึ้งเข้มข้น 300 mg/mL มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ในระดับปานกลาง โดยให้ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอยู่ที่ 12.83  $\pm$  0.76 mm อย่างไรก็ตาม ไม่มีผลในการยับยั้ง *S. pyogenes* (0.00  $\pm$  0.00 mm) แสดงให้เห็นว่านมผึ้งอาจไม่มีประสิทธิภาพต่อเชื้อชนิดนี้ สำหรับเชื้อ *C. acnes* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคผิวหนังที่สำคัญ พบว่า นมผึ้งสามารถยับยั้งได้ในระดับดี โดยมีค่าเฉลี่ย Inhibition zone เท่ากับ 20.67  $\pm$  0.58 mm ขณะที่ ยา Levofloxacin 5  $\mu$ g/disc ให้ค่าที่สูงกว่าทุกกรณี โดยยับยั้ง *S. aureus* ได้ที่ 28.33  $\pm$  0.58 mm, *S. pyogenes* ได้ที่ 20.00  $\pm$  0.00 mm และยับยั้ง *C. acnes* ได้มากที่สุด คือ 34.33  $\pm$  1.15 mm

โดยจากผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยการใช้สถิติแบบ Mann-Whitney U test ของนมผึ้งเปรียบเทียบกับยา Levofloxacin ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Cutibacterium acnes* พบว่าจากผลการทดสอบระหว่างกลุ่มของนมผึ้งและยา Levofloxacin มีค่า  $p = 0.029$  ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) จึงแสดงให้เห็นว่ายา Levofloxacin นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *C. acnes* ได้สูงกว่านมผึ้งอย่างมีนัยสำคัญ

## 2. ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของนมผึ้งในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นอีกหนึ่งสาเหตุของปัญหาทางผิวหนัง โดยเปรียบเทียบกับยา Levofloxacin ค่าที่ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของสารทั้งสองชนิด ได้แก่ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum Bactericidal Concentration; MBC) โดยตัวอย่างนมผึ้งถูกเตรียมในช่วงความ

เข้มข้น 0.58 – 300 mg/mL และทำการทดสอบร่วมกับยา Levofloxacin ที่มีความเข้มข้น 5 µg/mL โดยทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้งในแต่ละกลุ่ม อ่านผลโดยใช้วิธี Broth Microdilution และการเพาะเลี้ยงเชื้ออาหารวุ้น และแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean  $\pm$  SD)

จากการทดสอบด้วยวิธี Broth Microdilution เพื่อตรวจหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของนมผึ้ง และยา Levofloxacin ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่เกี่ยวข้องกับโรคติดเชื้อทางผิวหนังหลายชนิด และเชื้อแบคทีเรีย *Cutibacterium acnes* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดสิว พบผลการทดลองมีค่าคงที่ในแต่ละซ้ำในกลุ่มของนมผึ้ง โดยค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของนมผึ้งเท่ากับ  $75,000 \pm 0.00$  µg/mL และค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ก็เท่ากับ  $75,000 \pm 0.00$  µg/mL เช่นกัน โดยค่าเท่ากันทั้ง 2 เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Cutibacterium acnes* แสดงว่าค่าที่ได้จากการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ มีความคงที่สำหรับกลุ่ม Levofloxacin ค่า MIC ที่ได้จากการทดสอบมีค่าเท่ากับ  $5 \pm 0.00$  µg/mL และค่า MBC ก็เท่ากับ  $5 \pm 0.00$  µg/mL เช่นกัน โดยค่าทั้งสองแสดงผลการทดลองที่มีความคงที่ และไม่พบความแปรปรวนในแต่ละซ้ำ ถึงแม้ว่าค่าความเข้มข้นของนมผึ้งที่ใช้ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อจะอยู่ในระดับที่สูงกว่ายา Levofloxacin แต่จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่านมผึ้งสามารถแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อดังกล่าวได้อย่างชัดเจน อีกทั้งนมผึ้งมีศักยภาพในการเป็นสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Cutibacterium acnes* ดังนั้นจึงสามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการศึกษาเพิ่มเติมหรือพัฒนาในด้านผลิตภัณฑ์ทางผิวหนังต่อไปได้อีกทั้งยังจัดว่าเป็นสารทางธรรมชาติที่มีศักยภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย และสามารถใช้เป็นข้อมูลตั้งต้นพื้นฐานในการศึกษาต่อยอดเชิงวิจัยในอนาคตได้อีกด้วย

### อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ (Discussion and Suggestion)

#### 1. อภิปรายผล

จากผลการทดสอบด้วยวิธี Agar Well Diffusion พบว่านมผึ้งสามารถมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Cutibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดีในระดับหนึ่ง โดยได้มีค่าเฉลี่ยของขนาดบริเวณที่ไปยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) เท่ากับ  $20.67 \pm 0.58$  mm สำหรับ *C. acnes* และ  $12.83 \pm 0.76$  mm สำหรับ *S. aureus* ในขณะที่ *S. pyogenes* ไม่พบการยับยั้งการเจริญเติบโตเลย โดย Inhibition zone เท่ากับ  $0.00 \pm 0.00$  mm ซึ่งผลลัพธ์นี้ชี้ให้เห็นว่านมผึ้งมีการออกฤทธิ์เฉพาะต่อเชื้อแบคทีเรียบางชนิด โดยเฉพาะในเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ซึ่งเป็นเชื้อแกรมบวกที่ไม่พึงออกซิเจนที่เกี่ยวข้องกับการโน้มน้าวของสิวในมนุษย์ การยับยั้งเชื้อในระดับสูงถือเป็นจุดแข็งที่มีนัยสำคัญของนมผึ้ง และสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ระบุว่านมผึ้งมี



องค์ประกอบของ กรดไขมัน เช่น 10-Hydroxy-2-decenoic acid (10-HDA) และโปรตีนที่ต้านจุลชีพ ซึ่งจะไปช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Uthaibutra et al., 2023; Hassanien, 2012) ในกรณีของ *S. aureus* ซึ่งเป็นเชื้อแกรมบวกอีกชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับแผลติดเชื้อ ฝี และหนอง พบว่าน้ำมันผึ้งให้ผลยับยั้งในระดับปานกลาง แม้จะมีฤทธิ์ต้านเชื้อ แต่ประสิทธิภาพยังต่ำกว่ายาปฏิชีวนะมาตรฐาน Levofloxacin อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งอาจแสดงให้เห็นถึงความจำเป็นในการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันผึ้ง หรืออาจจะแยกสารสำคัญเพื่อเพิ่มความจำเพาะในการออกฤทธิ์ (George et al., 2022) สำหรับ *Streptococcus pyogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อให้เกิดการอักเสบในลำคอและโรคแทรกซ้อนอื่นๆ ไม่พบการยับยั้งจากน้ำมันผึ้ง ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากลักษณะเฉพาะของผนังเซลล์เชื้อชนิดนี้ที่อาจต้านทานต่อสารออกฤทธิ์ในนมผึ้ง หรือความสามารถของสารออกฤทธิ์ในการแพร่กระจายตัวผ่านเนื้อเยื่อของเชื้อชนิดนี้ได้ต่ำ (Lu et al., 2017) ดังนั้น ผลการทดลองด้วยวิธี Agar Well Diffusion จึงสอดคล้องกับสมมติฐานว่าน้ำมันผึ้งมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียบางชนิดโดยเฉพาะในเชื้อแบคทีเรียอย่าง *C. acnes* (Uthaibutra et al., 2023)

จากผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด (Minimum Bactericidal Concentration; MBC) ของน้ำมันผึ้งต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Cutibacterium acnes* พบว่า น้ำมันผึ้งมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 75,000  $\mu\text{g/mL}$  สำหรับทั้งสองชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ขณะที่ Levofloxacin มีค่า MIC และ MBC ต่ำกว่ามากที่ 5  $\mu\text{g/mL}$  ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่านมผึ้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดในระดับหนึ่ง แม้ว่าค่าความเข้มข้นที่จำเป็นจะต้องใช้จะสูงกว่ายาปฏิชีวนะมาตรฐานหลายเท่าตัวก็ตาม ซึ่งสอดคล้องกับข้อเท็จจริงว่าสารธรรมชาติส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านเชื้ออ่อนกว่ายาปฏิชีวนะ แต่มีความปลอดภัยต่อเซลล์มนุษย์สูงกว่า (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; EUCAST, 2025; Sabatini et al., 2009) ทั้งนี้ ค่า MIC และ MBC ของน้ำมันผึ้งที่ค่อนข้างสูง อาจเป็นข้อจำกัดที่ควรได้รับการแก้ไขในงานวิจัยต่อไป โดยเฉพาะการพัฒนาเทคนิคการแยกสารออกฤทธิ์อย่างเฉพาะเจาะจง และการศึกษาการออกฤทธิ์แบบเสริมกัน (Synergistic) กับสารอื่น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อโดยใช้ปริมาณน้อยลง (Collazo et al., 2021)

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าน้ำมันผึ้งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Cutibacterium acnes* ได้ดี รองลงมาคือ *Staphylococcus aureus* และไม่มีฤทธิ์ต่อ *Streptococcus pyogenes* ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Uthaibutra และคณะ (2023) ที่พบว่าน้ำมันผึ้งสามารถยับยั้งการเจริญของ *Cutibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* ได้ โดยฤทธิ์ต้านเชื้อของน้ำมันผึ้งมักสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสำคัญ เช่น 10-HDA และ MRJPs (Major Royal Jelly Proteins)

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยของ Sabatini และคณะ (2009) กล่าวถึงข้อจำกัดของสารออกฤทธิ์ในน้ำมันฝังที่อาจไม่สามารถเจาะทะลุผนังเซลล์ของเชื้อแกรมบวกบางชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงจัดได้ว่าเป็นเหตุผลที่สอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยนี้ ซึ่งไม่พบการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus pyogenes* เลยโดยสรุป ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับแนวโน้มของงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ว่าน้ำมันฝังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแกรมบวกบางชนิด โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย *Cutibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* แต่ยังไม่มีความข้อมูลที่แน่ชัดต่อ *Streptococcus pyogenes* ซึ่งเป็นช่องว่างที่ควรได้รับการศึกษาต่อไป

#### 1. ข้อเสนอแนะ

แม้ว่าผลการศึกษานี้จะแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของน้ำมันฝังที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิดได้อย่างชัดเจนนั้น แต่ก็ยังมีข้อจำกัดหลายประการที่ควรได้รับการพิจารณาและปรับปรุงในการศึกษาในอนาคต ประการแรกคือ การทดสอบ MIC และ MBC ใช้เพียงสารน้ำมันฝังในรูปแบบดิบ โดยไม่มีการแยกสารที่ออกฤทธิ์เฉพาะ ส่งผลให้ความเข้มข้นที่จำเป็นต่อการยับยั้งหรือฆ่า เชื้อยังอยู่ในระดับสูงเมื่อเทียบกับสารสังเคราะห์อย่าง Levofloxacin ซึ่งอาจส่งผลต่อการนำไปใช้จริง ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการความเข้มข้นต่ำและต้นทุนต่ำ (Hassanien et al., 2012) นอกจากนี้ การศึกษานี้ไม่ได้ประเมินฤทธิ์ร่วมกับสารอื่น ซึ่งอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพของน้ำมันฝังในทางคลินิก เนื่องจากในสภาพแวดล้อมของผิวหนังหรือการมีแผลเปิดนั้น อาจมีปัจจัยอื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น เอนไซม์จากเซลล์มนุษย์หรือสารอื่นๆ ที่อยู่ในเวชภัณฑ์ร่วมด้วย การทดสอบฤทธิ์ร่วมในอนาคตจึงเป็นสิ่งที่สำคัญที่จะช่วยให้เข้าใจศักยภาพของน้ำมันฝังได้ชัดเจนมากขึ้น (Collazo et al., 2021) สุดท้าย การทดสอบนี้ได้ถูกจำกัดเฉพาะเชื้อแบคทีเรียเพียง 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Cutibacterium acnes* และ *Streptococcus pyogenes* โดยยังไม่ได้ครอบคลุมเชื้ออื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อทางผิวหนัง เช่น *Pseudomonas aeruginosa* หรือ *Escherichia coli* ที่เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งมีความสำคัญในการพัฒนาเวชภัณฑ์ในวงกว้าง

หนึ่งในข้อได้เปรียบที่สำคัญของน้ำมันฝังเมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ คือ ความปลอดภัย ในการใช้งาน โดยเฉพาะในกลุ่มผลิตภัณฑ์ที่ดูแลผิวหนังและจำพวกเวชสำอาง จากการรายงาน Safety Data Sheet ของบริษัท Natural Sourcing, LLC. ที่ได้รับรองจากมาตรฐานด้านความปลอดภัยของสหรัฐอเมริกา (Occupational Safety and Health Administration; OSHA) ระบุว่าน้ำมันฝังจัดอยู่ในกลุ่มสารที่ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองผิว และสามารถใช้ได้แม้ในผู้ที่มีผิวแพ้ง่าย ต่อมาข้อได้เปรียบเชิงสิ่งแวดล้อมก็เป็นอีกประเด็นหนึ่งที่ควรกล่าวถึงยาปฏิชีวนะที่มีการใช้ในทาง การแพทย์นั้นเมื่อเข้าสู่สิ่งแวดล้อมสามารถก่อให้เกิดการสะสมของยาปฏิชีวนะในน้ำและดิน ซึ่งส่งเสริมการเกิดเชื้อดื้อยาในสิ่งแวดล้อมได้ แต่สารชีวภาพจากธรรมชาติ เช่น นมผึ้ง มักย่อยสลายได้ดี และไม่ตกค้างในธรรมชาติ (Sabatini et al., 2009) จากเหตุผลข้างต้นจึงสามารถสรุปได้ว่า นมผึ้งนั้นมีศักยภาพในการเป็นสารธรรมชาติทางเลือกที่ปลอดภัย และมีข้อได้เปรียบหลายประการเหนือกว่า

สำหรับโอกาสและแนวทางในการพัฒนางานวิจัยต่อยอด ผลการศึกษานี้พบว่า นมผึ้งสามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Cutibacterium acnes* ได้ แม้ประสิทธิภาพจะต่ำกว่ายามาตรฐาน Levofloxacin และต้องใช้ความเข้มข้นที่สูง แต่ก็ยังมีศักยภาพเป็นสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่น่าสนใจ ดังนั้นในอนาคตจึงสามารถทำการศึกษาต่อยอดได้ โดยให้ทดลองโดยเพิ่มความเข้มข้นของนมผึ้ง โดยใช้ความเข้มข้นมากกว่า 300 mg/mL เช่น 350–500 mg/mL เพื่อดูว่าขนาด Zone of inhibition และค่า MIC/MBC จะเพิ่มขึ้นหรือไม่ และทดสอบเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับงานวิจัยนี้ เช่น ใช้ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ดื้อยา คือ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) หรือใช้เชื้อ *Cutibacterium acnes* อีกหลายสายพันธุ์ เพื่อไปดูความแตกต่างของผลการทดลอง (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; EUCAST, 2025) อาจนำไปเปรียบเทียบกับสารต้านจุลชีพธรรมชาติอื่น เช่น เหงือกปลาหมอ พญายอ เปลือกมังคุด พลู น้ำมันทีทรี ว่านหางจระเข้ และบัวบก เพื่อหาว่าสารใดมี ประสิทธิภาพดีกว่าหรือใช้ร่วมกันแล้วให้ผลเสริมฤทธิ์ (ชาฟาวิ มะแม และคณะ, 2565; Arbab et al., 2021; Hammer et al., 2012) และลองปรับวิธีการสกัดหรือเตรียมสาร โดยอาจลองใช้นมผึ้งสด หรือนมผึ้งแช่เย็นเทียบกับนมผึ้งผงว่ามีผลต่างกันหรือไม่ หรืออาจใช้ตัวทำละลายต่างกัน เช่น น้ำกลั่นกับเอทานอล เพื่อตรวจสอบการละลายและประสิทธิภาพ รวมไปถึงประเมินความคงตัวของนมผึ้ง จากการเก็บตัวอย่างในอุณหภูมิต่าง ๆ เช่น ต่ำเย็นและอุณหภูมิห้อง แล้วทดสอบประสิทธิภาพซ้ำ เพื่อดูว่าฤทธิ์เปลี่ยนไปหรือไม่ทั้งหมดนี้จึงเป็นข้อเสนอแนะที่น่าจะมีประโยชน์ในงานวิจัยต่อยอดในอนาคต

ชาฟาวี มะแม, นัสรีย แวมะ, มูฮำหมัดเปาซี คาเร้ง, อนันส เป็ญจมาตร, ศิริรัตน์ ศรีรักษา และพิรุณ  
รัตน์ แซ่ลิ้ม. (2565). การศึกษาความคงตัวและฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากตำรับสมุนไพรร  
ไทยในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบนผิวหนัง. วารสารหมอโยไทยวิจัย, 8(1), 115–128.  
<https://he02.tci-thaijo.org/index.php/ttm/article/view/256147/176079>

แพลตฟอร์มการเรียนรู้ตลอดชีวิต (Lifelong education) CMU MOOC. หลักสูตรอบรม  
ความปลอดภัยทางชีวภาพเบื้องต้น มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. สืบค้นเมื่อ 15 มกราคม 2568,  
จาก <https://learning.mooc.cmu.ac.th/courses/230>

- Arbab, S., Ullah, H., Wang, W., Wei, X., Ahmad, S. U., Wu, L.,...Zhang, J. (2021). Comparative study of antimicrobial action of Aloe vera and antibiotics against different bacterial isolates from skin infection. *Veterinary Medicine and Science*, 7(5), 2061–2067. <https://doi.org/10.1002/vms3.488>
- Bagameri, L., Baci, G.-M., & Dezmirean, D. S. (2022). Royal jelly as a nutraceutical natural product with a focus on its antibacterial activity. *Pharmaceutics*, 14(6), 1142. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061142>
- Bílikova, K., Huang, S.-C., Lin, I.-P., Šimuth, J., & Peng, C.-C. (2015). Structure and antimicrobial activity relationship of royalisin, an antimicrobial peptide from royal jelly of *Apis mellifera*. *Peptides*, 68, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.03.001>
- Cockerill, F. R., III, Wikler, M. A., Alder, J., Dudley, M. N., Eliopoulos, G. M., Ferraro, M. J.,...Zimmer, B. L. (2012). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard Eleventh edition* (CLSI document M02-A11, Vol. 32, No. 1). Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Collazo, N., Carpena, M., Nuñez-Estevez, B., Otero, P., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). Health promoting properties of bee royal jelly: Food of the queens. *Nutrients*, 13(2), 543. <https://doi.org/10.3390/nu13020543>
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2025). Breakpoint tables for interpretation of MICs and diameters zones. <https://mic.eucast.org/search/>
- George, S., Muhaj, F. F., Nguyen, C. D., & Tying, S. K. (2022). Part I: Antimicrobial resistance: Bacterial pathogens of dermatologic significance and implications of rising resistance. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 86(6), 1189– 1204. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2021.11.066>
- Gooskens, J., De Neeling, A. J., Willems, R. J., Van 't Wout, J. W., & Kuijper, E. J. (2005). Streptococcal toxic shock syndrome by an iMLS resistant M type 77 *Streptococcus pyogenes* in the Netherlands. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 37(2), 85–89. <https://doi.org/10.1080/00365540510027192>



- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (2012). Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(2), 909–915. <https://doi.org/10.1128/AAC.05741-11>
- Hassanien, M. F. R. (2012). Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.12.007>
- IBM Corp. (2015). *IBM SPSS Statistics for Windows*, version 23.0 [Computer software]. Mae Fah Luang University.
- Lu, B., Fang, Y., Fan, Y., Chen, X., Wang, J., Zeng, J.,...Wang, D. (2017). High prevalence of macrolide-resistance and molecular characterization of *Streptococcus pyogenes* isolates circulating in China from 2009 to 2016. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1052. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01052>
- Natural Sourcing, LLC. (2023, August 8). Safety data sheet: Royal jelly powdered herbal extract 1X (EXTROYJEL1XCN100). [https://www.praannaturals.com/downloads/msds/SDS\\_Powdered\\_Extract\\_Royal\\_Jelly\\_1X\\_EXTROYJEL1XCN100.pdf](https://www.praannaturals.com/downloads/msds/SDS_Powdered_Extract_Royal_Jelly_1X_EXTROYJEL1XCN100.pdf)
- Sabatini, A. G., Marazzan, G. L., Caboni, M. F., & Bogdanov, S. (2009). Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(1), 1–6. <https://doi.org/10.3896/IBRA.4.01.1.04>
- Uthaibutra, V., Kaewkod, T., Prapawilai, P., Pandith, H., & Tragoolpua, Y. (2023). Inhibition of skin pathogenic bacteria, antioxidant and anti-inflammatory activity of royal jelly from Northern Thailand. *Molecules*, 28(3), 996. <https://doi.org/10.3390/molecules28030996>
- Weinstein, M. P., Lewis, J. S., II, Acharya, A. S., Campeau, S., Cullen, S. K., Gold, H.,... Tamma, Y. (2020). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (30th ed., CLSI document M100)*. Clinical and Laboratory Standards Institute.