โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสและน้ำผึ้งจากชันโรง *Geniotrigona thoracica* ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อสิว *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*

The effect of propolis and honey extract from *Geniotrigona thoracica* to inhibit *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*

ชื่อนิสิต นางสาวกัณธิดา ภมรพล **เลขประจำตัว** 6032006823

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสและน้ำผึ้งจากชันโรง *Geniotrigona thoracica* ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อสิว *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*

The effect of propolis and honey extract from *Geniotrigona thoracica* to inhibit *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*

นางสาวกัณธิดา ภมรพล

อาจารย์ที่ปรึกษา
ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	: ประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสและน้ำผึ้งจากชันโรง *Geniotrigona thoracica* ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อสิว *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นางสาวกัณธิดา ภมรพล
อาจารย์ที่ปรึกษา	: ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า
ภาควิชา	: ชีววิทยา

บทคัดย่อ

สิว เป็นโรคอักเสบเรื้อรัง บริเวณรูขุมขนและต่อมไขมัน สาเหตุหนึ่งของการเกิดสิว คือการอักเสบเนื่องมาจากแบคทีเรีย ได้แก่ *Propionibacterium acnes* ซึ่งเป็น anaerobic bacteria ที่สามารถพบเจริญอยู่บริเวณส่วนลึกของรูขุมขน แบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งคือ *Staphylococcus aureus* เป็น aerobic bacteria เจริญบริเวณผิวหนัง แบคทีเรียเหล่านี้หลั่งสารต่าง ๆ กระตุ้นให้เกิดการอักเสบและเกิดเป็นสิวได้ โดยกลุ่มยารักษาสิวในปัจจุบัน ทำให้เกิดผลข้างเคียงหลายประการ ผู้ศึกษาจึงมีความสนใจในผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการเติบโตของแบคทีเรียนั่นคือ พรอพอลิส เนื่องจากมีองค์ประกอบสำคัญคือ ฟลาโวนอยด์ และสารกลุ่มฟีนอลิก งานวิจัยครั้งนี้จึงจัดทำขึ้นโดยมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง *Geniotrigona thoracica* ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. acnes* และ *S. aureus* โดยได้ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ด้วยวิธี agar well diffusion ซึ่งใช้สารสกัดหยาบความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500, และ 1,000 mg/ml ควบคู่กับ control (100% DMSO) และ positive control (penicillin-streptomycin) จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่าสารสกัดหยาบพรอพอลิสด้วยเมทานอล สามารถทำให้เกิดโซนยับยั้ง (clear zone inhibition) ในทุกความเข้มข้น โดยค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งมีค่าอยู่ในช่วง 14 – 18 mm โดยความเข้มข้นที่ให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งน้อยที่สุด คือ 62.5 mg/ml รองลงมาคือ 125, 250 mg/ml ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 500 และ 1,000 mg/ml มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *P. acnes* ได้ดีที่สุด เนื่องจากให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีค่ามากที่สุดด้วย และจากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. aureus* พบว่าทุกความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสามารถทำให้เกิดโซนยับยั้ง โดยมีค่าเฉลี่ยในช่วง 15 – 21 mm โดยที่ทุกความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ ให้ค่าโซนยับยั้งที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นคือมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ได้ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ผลของการหาปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ในสารสกัดหยาบพรอพอลิส จากการทดสอบด้วยวิธี Folin- Ciocalteu method และ aluminium chloride colorimetric assay ตามลำดับ พบว่ามี ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 20.67 mg gallic acid equivalent (GAE)/g และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 480.26 mg quercetin equivalent (QE)/g ดังนั้น จึงสามารถกล่าวได้ว่าพรอพอลิสจาก *G. thoracica* มีฤทธิ์ต้านการเติบโตของ *P. acnes* และ *S. aureus*

คำสำคัญ: แบคทีเรียก่อสิว, สารสกัดหยาบ, ฟลาโวนอยด์, ฟีนอลิก, พรอพอลิส

Research Title	: The effect of propolis and honey extract from *Geniotrigona thoracica* to inhibit *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*
Student name	: Miss Kanthida Pamornpol
Advisor	: Professor Chanpen Chanchao, Ph.D.
Department of	: Biology

Abstract

Acne vulgaris is a skin disease. One of the causes is inflammation by bacteria. The main bacterium is *Propionibacterium acnes*, which is anaerobic and lives within sebum-rich areas. The other one is *Staphylococcus aureus,* which is aerobic. However, the remedy for inflammatory acne has many side effects. Thus, a natural product with anti - acne causing bacteria activity is interesting. Propolis has become an option. The essential components those make propolis contain antibacterial activity are flavonoids and phenolic compounds. Accordingly, the objective of this research is to evaluate the antibacterial activity of propolis extract from *Geniotrigona thoracica* on *P. acnes* and *S. aureus* by agar well diffusion assay. In this study, working concentrations of crude methanol extract of propolis (CMEP) were 62.5, 125, 250, 500, and 1,000 mg/ml. Dimethyl sulfoxide (DMSO) and the mixed solution of penicillin and streptomycin were used as control and positive control, respectively. Results showed that CMEP inhibited the growth of *P. acnes* with the average diameter of clear zone of 14 – 18 mm. The lowest concentration providing the clear zone of inhibition was 62.5 mg/ml. Then, it was followed by 125 and 250 mg/ml, respectively. The concentrations of 500 and 1,000 mg/ml of CMEP were similar in inhibition. Both were the highest effective to inhibit the growth of *P. acnes* because the diameter of the clear zone of inhibition did not differ significantly. Consistently, all concentrations of CMEP were able to inhibit *S. aureus*. The average diameter of clear zone of inhibition was 15 – 21 mm. The potential of inhibition from each concentration was not different significantly. Moreover, the phenolic and flavonoid content of CMEP were determined by Folin-Ciocalteu method and aluminium chloride colorimetric assay, respectively. The result found that the content of total phenolic was 20.67 mg gallic acid equivalents (GAE)/g and the content of flavonoids was 480.26 mg quercetin equivalents (QE)/g. Thus, propolis from *G. thoracica* is potential for anti - *P. acnes* and anti - *S. aureus* activities.

Keywords: acne causing bacteria, crude extract, flavonoids, phenolics, propolis

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือ ในการจัดทำโครงการ และร่วมหาแนวทางการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในการจัดทำโครงการ ท่ามกลางสถานการณ์โรคระบาด COVID-19 คำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูล ตลอดจนตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ นางสาวพรรณทิวา คงคารัตน์ นิสิตระดับดุษฎีบัณฑิต และ นางสาวกวิสรา ก้อนศิลา นิสิตระดับมหาบัณฑิต ประจำห้องปฏิบัติการ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ ในการปฏิบัติงานตลอดการจัดทำโครงการ

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชัย ดำรงโรจน์วัฒนา, อาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวตี และ อาจารย์ ดร.มารุต เฟื่องอาวรณ์ อาจารย์ผู้ประสานงานรายวิชา โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2563 ที่ให้คำแนะนำในองค์ประกอบของเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการ

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ในห้องปฏิบัติการวิจัยอณูชีววิทยา และเพื่อน ๆ ในภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ และให้กำลังใจ จนโครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิจัยอณูชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ รวมถึงวัสดุและอุปกรณ์ ในการจัดทำโครงการนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณโครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการจัดทำโครงการนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ก
ABSTRACT ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญภาพ ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ 1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ 2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม 3
2.1. สิว (acne vulgaris) 3
2.1.1. แบคทีเรียก่อสิว (acne causing bacteria) 3
1) *Propionibacterium acnes* 3
2) *Staphylococcus aureus* 4
2.1.2. การรักษาสิวในปัจจุบัน 4
2.2. *Geniotrigona thoracica* 4
2.3. พรอพอลิส (propolis) 6
2.4. สารประกอบฟีนอลิก และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ 7
2.4.1. สารประกอบฟีนอลิก 7
2.4.2. สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ 7
2.4.3. การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 8
2.4.4. การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน 10
3.1. การเตรียมสารสกัดพรอพอลิส 10
3.2. การเตรียมเชื้อที่ใช้สำหรับการทดสอบ 10
3.2.1. การเตรียมเชื้อ *Propionibacterium acnes* 10
3.2.2. การเตรียมเชื้อ *Staphylococcus aureus* 10
3.3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสต่อการเติบโตของเชื้อด้วยวิธี agar well diffusion 11
3.3.1. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสต่อ *P. acnes* 11

3.3.2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสต่อ *S. aureus* 11
3.4. การหาปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัด 11
3.4.1. การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด 11
3.4.2. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัด 12
3.5. การประเมินผลทางสถิติ 12
บทที่ 4 ผลการศึกษา 13
4.1. ผลการเตรียมสารสกัดพรอพอลิส 13
4.2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสต่อการเติบโตของเชื้อด้วยวิธี agar well diffusion 14
4.2.1. ผลของสารสกัดพรอพอลิสต่อการเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acnes* 14
4.2.2. ผลของสารสกัดพรอพอลิสต่อการเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* 15
4.3. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ทั้งหมดในสารสกัด 16
4.3.1. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด 16
4.3.2. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัด 17
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา 19
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ 21
6.1. สรุปผลการศึกษา 21
6.2. ข้อเสนอแนะ 21
6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ 21
6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต 21
เอกสารอ้างอิง 22
ภาษาไทย 22
ภาษาอังกฤษ 22
ภาคผนวกที่ 1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 26
ภาคผนวกที่ 2 การคำนวณร้อยละผลผลิตของสารสกัด 26
ภาคผนวกที่ 3 การเตรียมสารสกัดพรอพอลิสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 27
ภาคผนวกที่ 4 การเตรียมสารเคมี 28
ภาคผนวกที่ 5 สถิติของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง จากโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 30
ภาคผนวกที่ 6 การคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดพรอพอลิส จากกราฟมาตรฐาน gallic acid 34

ภาคผนวกที่ 7 การคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดพรอพอลิส จากกราฟมาตรฐาน quercetin 35

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4-1 ค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัด 13
ตารางที่ 4-2 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง ของแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดพรอพอลิสที่ใช้ในการทดสอบ..... 14
ตารางที่ 4-3 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง ของแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดพรอพอลิสที่ใช้ในการทดสอบ..... 15
ตารางที่ 4-4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความยาวคลื่น 760 nm 16
ตารางที่ 4-5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน quercetin ที่ความยาวคลื่น 540 nm 17
ตารางที่ 5-1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ของพรอพอลิสจากแหล่งที่มาต่าง ๆ 19
ตารางที่ 0-1 ปริมาตรของ stock solution และ DMSO ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัด.. 27
ตารางที่ 0-2 การเตรียม สารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น ต่าง ๆ..... 28
ตารางที่ 0-3 การเตรียมสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น ต่าง ๆ..... 29
ตารางที่ 0-4 ค่าดูดกลืนแสง ที่ใช้คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ความเข้มข้นสารสกัดพรอพอลิส 0.1 mg/ml 34
ตารางที่ 0-5 ค่าดูดกลืนแสง ที่ใช้คำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่ความเข้มข้นสารสกัดพรอพอลิส 0.1 mg/ml 35

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2-1 *G. thoracica* (ชันโรงปากหมู) 5
ภาพที่ 2-2 ทางเข้ารังของชันโรง *G. thoracica* 5
ภาพที่ 2-3 พรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* 6
ภาพที่ 2-4 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก 7
ภาพที่ 2-5 สารในกลุ่มกรดฟีนอลิกที่พบในพรอพอลิส 8
ภาพที่ 2-6 สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในพรอพอลิส 8
ภาพที่ 4-1 สารสกัดพรอพอลิสจากชันโรง 13
ภาพที่ 4-2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid 17
ภาพที่ 4-3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน quercetin..... 18

บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

สิว (acne vulgaris) คือโรคอักเสบเรื้อรัง ของรูขุมขนและต่อมไขมัน หนึ่งในสาเหตุของการเกิดสิวคือ เกิดการอักเสบบริเวณต่อมไขมันและรูขุมขนเนื่องมาจากแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่สำคัญที่แยกได้จากผิวหนัง รูขุมขนและต่อมไขมันของผู้ป่วยโรคสิว (Marples, 1974) ได้แก่ *Propionibacterium acnes* ซึ่งเป็น anaerobic bacteria ที่สามารถพบเจริญอยู่บริเวณส่วนลึกของรูขุมขน ในสภาวะไร้ออกซิเจน แยกได้จาก บริเวณที่มีไขมันหนาแน่น (Boja and Holland, 2004) และ *Staphylococcus aureus* เป็น aerobic bacteria ที่เจริญบริเวณผิวหนัง สามารถหลั่งสารต่าง ๆ ทำให้เกิดเป็นหนองบริเวณผิวหนังและเป็นสิวได้

กลุ่มยารักษาสิวโดยทั่วไปที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ ยาในกลุ่ม benzoyl peroxide โดย benzoyl peroxide มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียโดยจะทำลาย *P. acnes* และ free fatty acids ทำให้ลดการอักเสบได้ แต่อย่างไรก็ตาม พบผลข้างเคียงหลายประการ เช่น ผิวแห้ง แสบบริเวณผิวหนัง ผิวหนังแดงลอก ไปจนถึงผิวหนังไหม้ (Yentzer et al, 2009)

พรอพอลิส (propolis) คือ ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากผึ้งและชันโรง ที่ผึ้งและชันโรงใช้ในการยับยั้งเชื้อโรคและซ่อมแซมภายในรัง ซึ่งได้จากการการเก็บรวบรวมยางไม้ แล้วนำมาผสมกับไข (wax) จึงมีลักษณะเป็นก้อนเหนียว องค์ประกอบสำคัญของพรอพอลิสที่ทำให้มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย คือ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) และ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ทำให้ปัจจุบันพรอพอลิสมีการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่มีจุดประสงค์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย, 2551) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Park et al., (2015) พบว่าพรอพอลิสมีฤทธิ์ต้านการเติบโตของแบคทีเรียก่อสิว โดยพรอพอลิสจากชันโรง *Geniotrigona thoracica* หรือชันโรงปากหมู ในประเทศไทยยังไม่ได้รับการศึกษามากนัก

งานวิจัยครั้งนี้จึงจัดทำขึ้นโดยมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของพรอพอลิส จากชันโรง *G. thoracica* ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. acnes* และ *S. aureus* ซึ่งมุ่งหวังเพื่อให้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษากับผู้ป่วยที่เป็นสิว โดยพัฒนายาหรือผลิตภัณฑ์รักษาสิว จากธรรชาติ ซึ่งเป็นการส่งเสริมการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ทั้งยังลดปัญหาของผลข้างเคียงในการใช้ยาที่ผลิตขึ้นจากสารเคมีสังเคราะห์

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- เพื่อศึกษาผลของสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรง *Geniotrigona thoracica* ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1. สิว (acne vulgaris)

สิว คือโรคทางผิวหนังชนิดหนึ่ง ที่พบได้ทั่วไป เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของต่อมไขมัน สิวมักเกิดบริเวณใบหน้า ลำคอ หลัง เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีต่อมไขมันจำนวนมาก สิวเกิดขึ้นจากการอุดตันของรูขุมขนด้วยไขมันและเซลล์ผิวที่ตายแล้ว (Salita, 2004) ซึ่งสิวสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ สิวไม่อักเสบ (non-inflammatory acne) เช่น สิวหัวดำ (blackheads) และ สิวหัวขาว (whiteheads) อีกประเภทคือ สิวอักเสบ เช่น สิวหัวช้าง (cystic acne) สิวที่มีตุ่มนูนแดง (papule) (Jacob et al, 2001) สาเหตุของการเกิดสิว ประการแรกเนื่องมาจาก ต่อมไขมันซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนเพศ มีการสร้างไขมัน (sebum) มากผิดปกติ ทำให้ต่อมไขมันมีขนาดใหญ่ขึ้นเกิดเป็นสิวหัวขาวได้ ประการที่สอง เกิดจากความผิดปกติในการสร้างเคราติน (keratinization) ที่เพิ่มขึ้นและอัดกันแน่นภายในรูขุมขนเกิดเป็นสิวหัวขาว และสิวหัวดำ ประการที่สาม เกิดการอักเสบบริเวณต่อมไขมันและรูขุมขนเนื่องมาจากแบคทีเรียก่อสิว ได้แก่ *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งแบคทีเรียก่อสิวนี้ ยังเป็นปัจจัยที่กระตุ้นให้สิวไม่อักเสบ กลายเป็นสิวอักเสบได้อีกด้วย และสาเหตุการเกิดสิวประการสุดท้ายคือ ปัจจัยภายนอก เช่น สิ่งแวดล้อม รังสีอัลตราไวโอเลต อุณหภูมิ และสารเคมี (Sakamoto and Anderson, 2010) เป็นต้น

2.1.1. แบคทีเรียก่อสิว (acne causing bacteria)

1) *Propionibacterium acnes*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) สามารถพบเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ภายในช่องปาก และหูชั้นนอก ซึ่ง *P. acnes* เป็น anaerobic bacteria ที่สามารถพบเจริญอยู่บริเวณส่วนลึกของรูขุมขน ในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แยกได้จาก บริเวณที่มี sebum หนาแน่น รอบ ๆ pilosebaceous follicle ซึ่ง *P. acnes* สามารถทำให้เกิดการอักเสบได้โดย ปล่อยเอนไซม์ lipase ไปย่อย ไขมัน ให้กลายเป็นกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) และยังสามารถหลั่งสารต่าง ๆ ที่เป็นสาเหตุของการอักเสบได้ เช่น protease hyaluronidase และ neutrophil chemotactic factors ซึ่งสารเหล่านี้จะไปกระตุ้นให้เกิดการอักเสบของผิวหนังได้ (Koreck et al, 2003)

2) *Staphylococcus aureus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นทรงกลม (coccus shape) และเป็น aerobic bacteria พบเจริญบริเวณผิวหนัง สามารถกระตุ้นให้เกิดสิวได้โดย หลั่งสาร neutrophil chemotactic factors ทำให้เกิดการอักเสบเป็นหนองบริเวณผิวหนัง เกิดเป็นสิวอักเสบได้

2.1.2. การรักษาสิวในปัจจุบัน

การรักษาสิวมุ่งเน้นในการลดปริมาณการสร้างไขมัน (sebum) ลดการสร้าง comedone หรือก้อนไขมันที่จับกับเซลล์ผิวหนังที่ตายแล้ว และลดการอักเสบเพื่อหลีกเลี่ยงรอยแผลเป็น ซึ่งการรักษาที่นิยมในปัจจุบัน ได้แก่ การใช้ยาในกลุ่ม retinoids, azelaic acid และที่นิยมมากคือยาในกลุ่ม benzoyl peroxide รวมถึงการใช้ยาทาภายนอก (topical antibiotics) (Kanlayavattanakul and Lourith, 2011) โดยยาในกลุ่ม benzoyl peroxide มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย และทำลายกรดไขมันอิสระทำให้การอักเสบลดลง ซึ่งผลข้างเคียงในการใช้ยากลุ่มนี้ คือ ทำให้เกิดการระคายเคืองผิวหนังแดง ลอก (Lyons, 1978) กลุ่มยาทาภายนอก เช่น tetracycline และ clindamycin มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย และลดโอกาสเกิดผลข้างเคียงต่อผิวหนัง อย่างไรก็ตามการใช้ในระยะยาว มีรายงานว่าทำให้เกิดการดื้อยา (antibiotic resistant) ของเชื้อได้ (Swanson, 2003)

2.2. *Geniotrigona thoracica*

G. thoracica อยู่ใน family Hymenoptera, subfamily Meliponinae เป็นชันโรงที่สามารถพบได้ในประเทศเขตร้อนและเขตอบอุ่น รวมถึงประเทศไทย โดยในประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงชันโรงชนิดนี้เพื่อช่วยผสมเกสร ให้กับพืชพรรณของเกษตรกร เช่น ที่ศูนย์เพาะเลี้ยงชันโรงบ้านสวนภูผา ตำบลเหมืองใหม่ อำเภออัมพวา จังหวัดสมุทรสงคราม

G. thoracica มีขนาดตัวอยู่ที่ 7.44 ± 2.05 มิลลิเมตร ลำตัวมีสีน้ำตาล ปีกสีน้ำตาลเข้ม ปลายปีกมีสีขาว (Azmi, 2019) ดังภาพที่2-1 ทางเข้ารังมีลักษณะเป็นท่อคล้ายปากหมู ดังภาพที่2-2 ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของชันโรงชนิดนี้ จึงเป็นที่รู้จักในชื่อของชันโรงปากหมู

ภาพที่ 2-1 *G. thoracica* (ชันโรงปากหมู)

ภาพที่ 2-2 ทางเข้ารังของชันโรง *G. thoracica* ซึ่งสร้างจากพรอพอลิส

G. thoracica สามารถผลิตน้ำผึ้ง และพรอพอลิสได้ เช่นเดียวกับชันโรงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย เช่น*Trigona pegdeni, Tetragonula laeviceps, Lepidotrigona terminate* และ *Lepidotrigona ventralis doipaensis* (Sawatthum, 2004) อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์จากชันโรง *G. thoracica* ยังไม่ได้รับการศึกษามากนัก เนื่องจากยังไม่เป็นที่นิยมในการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์จากชันโรง *G. thoracica* จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง

2.3. พรอพอลิส (propolis)

พรอพอลิส เกิดจากการเก็บรวบรวมยางไม้จากพืชชนิดต่าง ๆ ของผึ้งและชันโรง ซึ่งมีส่วนผสมของ wax รวมถึงเอนไซม์ต่าง ๆ โดยสีของพรอพอลิสมีตั้งแต่สีเขียวไปจนถึงน้ำตาลเข้ม ขึ้นกับชนิดของยางไม้จากพืชที่ผึ้งหรือชันโรงเก็บรวบรวม ลักษณะเป็นก้อนเหนียว คล้ายเรซิน ดังภาพที่ 2-3 ผึ้งและชันโรงจึงใช้คุณสมบัติทางกายภาพของพรอพอลิสนี้ ในการสร้างรัง และซ่อมแซมภายในรัง ซึ่งชันโรงจะมีการเก็บสะสมพรอพอลิสที่มากกว่าผึ้ง เนื่องจากเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างรังของชันโรง ในขณะที่ผึ้งใช้เพื่อซ่อมแซมรัง (Chen et al., 2017) นอกจากนี้คุณสมบัติทางชีวภาพของพรอพอลิสในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก็เป็นประโยชน์กับผึ้งและชันโรง ในการใช้เพื่อยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา และแบคทีเรียภายในรัง เช่นเดียวกับมนุษย์ มีการนำพรอพอลิสมาใช้ประโยชน์ในด้านการยับยั้งแบคทีเรีย และต้านอนุมูลอิสระ มาอย่างยาวนาน ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ของพรอพอลิสอย่างมากมาย จึงมีการนำพรอพอลิส มาใช้ประโยชน์ในการต้านแบคทีเรียมากยิ่งขึ้น เนื่องจากเป็นทางเลือกจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีความปลอดภัยสูง (Ghisalberti, 1979) ซึ่งองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้พรอพอลิสมีฤทธิ์ทางชีวภาพก็คือ สารประกอบฟีนอลิก (phenolics compound) และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ที่พบในพรอพอลิส (Bankova et al., 2000) ตัวอย่างเช่น *p*-cumaric acid และ quercetin (Przybylek and Karpinski, 2019) โดยคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย หรือคุณสมบัติทางชีวภาพของพรอพอลิสจะแตกต่างกันไปตาม ภูมิภาค ฤดูกาล และชนิดของผึ้งหรือชันโรง (Kujumgiev et al., 1999) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Park et al. (2015) พบว่าพรอพอลิส มีฤทธิ์ในการต้านการเติบโตของแบคทีเรียก่อสิว *P. acnes* และ *S. aureus* อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อสิวของ พรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ในประเทศไทยยังไม่ได้รับการศึกษา

ภาพที่ 2-3 พรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica*

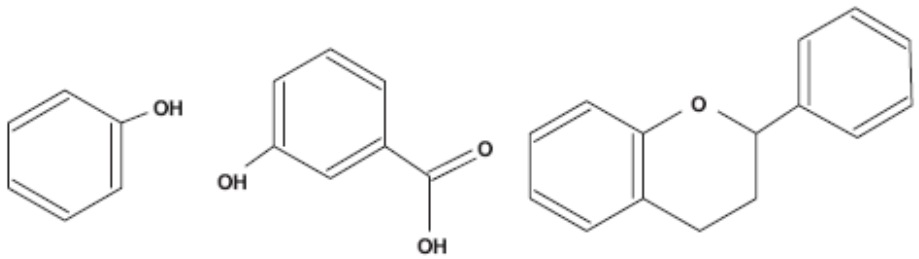
2.4. สารประกอบฟีนอลิก และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

2.4.1. สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีโนลิกพบ ในธรรมชาติมากกว่า 8,000 ชนิด เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่สร้างขึ้นโดยพืช มีโครงสร้างหลักประกอบด้วย หมู่ hydroxy เกาะอยู่กับวงแหวนเบนซีน :ประกอบขึ้นเป็นสารฟีนอลิกพื้นฐาน หรือ ฟีนอล (phenol) สารประกอบฟีนอลิกสามารถจำแนก เป็นกลุ่มต่าง ๆ เช่น กลุ่มโครงสร้างอย่างง่าย กลุ่มกรดฟีโนลิก (phenolic acids) และ กลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบ คือกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) (พินิจ เจ๊กอิน และสโรยา แก้วลา, 2556)

2.4.2. สารกลุ่มฟลาโวนอยด์

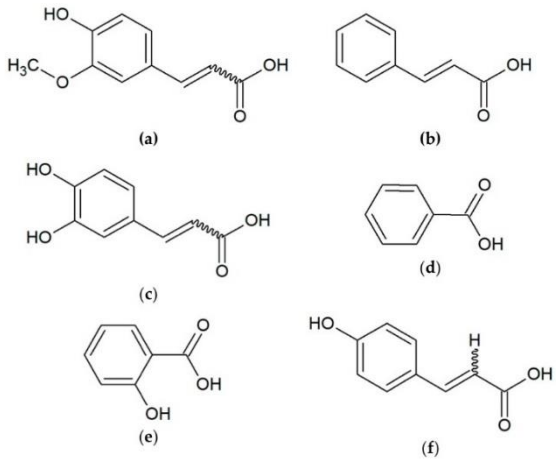
สารกลุ่มฟลาโวนอยด์มีโครงสร้างหลัก ที่ประกอบไปด้วย phenyl 2 วง และ heterocyclic ring 1 วง ดังแสดงในภาพที่ (Mierziak et al., 2014; Panche et al., 2016) ฟลาโวนอยด์สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่ม เช่น flavones, flavanones และ flavonols เป็นต้น



phenols phenolic acid flavonoids

ภาพที่ 2-4 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก

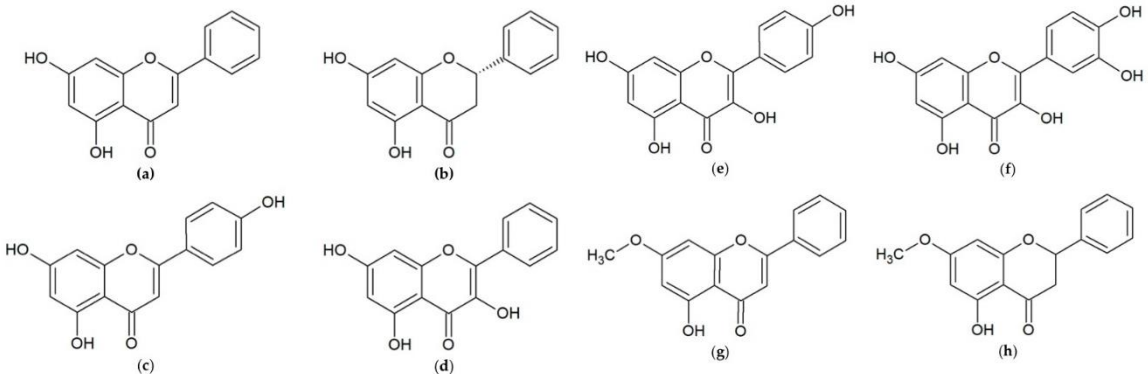
ซึ่งจากการศึกษาและรวบรวมข้อมูลของ Przybylek และ Karpinski (2019) พบว่าพรอพอลิส มีสารในกลุ่มกรดฟีนอลิก และ กลุ่มฟลาโวนอยด์ หลายชนิด ดังแสดงในภาพที่ 2-5 และ ภาพที่ 2-6 ตามลำดับ



ภาพที่ 2-5 สารในกลุ่มกรดฟีนอลิกที่พบในพรอพอลิส

(a) ferulic acid; (b) cinnamic acid; (c) caffeic acid; (d) benzoic acid;

(e) salicylic acid; (f) *p*-cumaric acid



ภาพที่ 2-6 สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในพรอพอลิส

(a) chrysin; (b) pinocembrin; (c) apigenin; (d) galangin; (e) kaempferol;

(f) quercetin; (g) tectochrysin; (h) pinostrobin.

ที่มา: Przybylek และ Karpinski, 2019

2.4.3. การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด (total phenolics contents) ด้วยวิธี Folin–Ciocalteu method ที่พัฒนาขึ้นโดย Singleton และ Rossi. (1965) ซึ่งใช้ Folin reagent เป็นสารละลายที่มีสีเหลือง มีส่วนประกอบสำคัญคือ phosphomolybdate และ phosphotungstate

ทำปฏิกิริยากับสารฟีนอลิก โดยสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงหรือสีน้ำเงิน ซึ่งเป็นสีของ molybdate และสามารถตรวจหาปริมาณของ molybdate ได้โดยวิธีสเปคโตรโฟโตมิตรี (spectrophorometry)

2.4.4. การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoids contents) ด้วยวิธีสเปคโตรโฟโตมิตรี (spectrophorometry) เป็นวิธีในการทดสอบโครงสร้างสารประกอบเชิงซ้อนของอะลูมิเนียม ซึ่งเป็นหนึ่งในวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดในการหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยวิธี aluminium chloride colorimetric assay นี้ ถูกพัฒนาโดย Zhishen et al. ในปี 1999 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยวัดจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากันระหว่างอะลูมิเนียมไอออน และกลุ่ม o-dihydroxyl ในโมเลกุลของสารประกอบฟลาโวนอยด์ เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ อะลูมิเนียมกับฟลาโวนอยด์ (aluminium-flavonoid complex) วิธีนี้ถูกใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ในตัวอย่างหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น สารสกัดสมุนไพร ผลไม้ ชา หรือสารสกัดพรอพอลิส (Pekal and Pyrzynska, 2014)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

3.1. การเตรียมสารสกัดพรอพอลิส

การเตรียมสารสกัดพรอพอลิสของชันโรง *G. thoracica* ดัดแปลงจากวิธีการของ Mohdaly et al. (2015) เริ่มจากนำพรอพอลิสมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ชั่งให้ได้ 20 กรัม แล้วทำการสกัดโดยใช้เมทานอล ปริมาตร 200 ml สกัดที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) แช่ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นระยะเวลา 48 – 96 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วย centrifuge ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสที่ได้ เพื่อนำมากลั่นแยกเอาตัวทำละลาย (เมทานอล) ออก โดยใช้ rotary evaporator (เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และนำสารสกัดพรอพอลิสที่ได้ ชั่งน้ำหนัก จากนั้นเตรียมสารสกัดพรอพอลิส 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 62.5, 125, 250, 500 และ 1,000 mg/ml โดยใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลาย และเก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2. การเตรียมเชื้อที่ใช้สำหรับการทดสอบ

3.2.1. การเตรียมเชื้อ *Propionibacterium acnes*

เริ่มจากการนำเชื้อ *P. acnes* จาก glycerol stock ปริมาตร 200 µl นำมา inoculated ลงใน Brain Heart Infusion broth (BHI broth) ในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยนำไปวางใน anaerobic jar (ที่ใส่เทียนไขจุดไฟ) แล้วปิดฝา anaerobic jar รอจนเทียนไขดับ จะเกิดสภาพ anaerobic conditions จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.2. การเตรียมเชื้อ *Staphylococcus aureus*

เริ่มจากการนำเชื้อ S. *aureus* จาก glycerol stock ปริมาตร 200 µl นำมา inoculated ลงใน Luria-Bertani broth (LB broth) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic conditions)

3.3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสต่อการเติบโตของเชื้อด้วยวิธี agar well diffusion

3.3.1. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสต่อ *P. acnes*

นำเชื้อ *P. acnes* ใน BHI broth ที่เตรียมไว้ในขั้นตอนที่ 3.2.1 ปริมาตร 200 µl เกลี่ยให้ทั่ว BHI agar จากนั้นสร้างหลุม (well) โดยใช้ pipett tip ทั้งหมด 7 หลุม เพื่อหยดสารสกัดพรอพอลิสทั้ง 5 ความเข้มข้น ที่เตรียมจากขั้นตอนที่ 1 ควบคู่กับชุดควบคุม (control) 100% DMSO และชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) penicillin-streptomycin ปริมาตร 100 µl จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ สังเกตการเติบโตของเชื้อและบันทึกผลเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (clear zone inhibition)

3.3.2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสต่อ *S. aureus*

นำเชื้อ *S. aureus* ใน LB broth ที่เตรียมไว้ในขั้นตอนที่ 3.2.2 ปริมาตร 200 µl เกลี่ยให้ทั่ว LB agar จากนั้นสร้างหลุม (well) โดยใช้ pipett tip ทั้งหมด 7 หลุม เพื่อหยดสารสกัดพรอพอลิสทั้ง 5 ความเข้มข้น ที่เตรียมจากขั้นตอนที่ 1 ควบคู่กับชุดควบคุม 100% DMSO และชุดควบคุมเชิงบวก penicillin-streptomycin ปริมาตร 100 µl จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ สังเกตการเติบโตของเชื้อและบันทึกผลเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง

3.4. การหาปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัด

3.4.1. การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด

การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดพรอพอลิส ด้วยวิธี Folin–Ciocalteu method ดัดแปลงจากการศึกษาของ Marghitas et al.(2009) เริ่มจากเตรียมสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 mg/ml และสารสกัดพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำ gallic acid หรือ สารสกัดพรอพอลิส ปริมาตร 25 µl ลงใน 96-well plate เติม Folin reagent (0.2 N) ปริมาตร 125 µl แล้วบ่มในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม สารละลาย sodium carbonate (Na_2CO_3) เข้มข้น 75g/L ปริมาตร 100 µl แล้วบ่มในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก นำไปเทียบกับ

กราฟมาตรฐาน gallic acid และแสดงผลเป็นค่าในหน่วยน้ำหนักสมมูล มิลลิลิกรัมของ gallic acid (gallic acid equivalents) ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (GAE/g crude extract)

3.4.2. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัด

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารพรอพอลิส ด้วยวิธี aluminium chloride colorimetric assay ดัดแปลงจากการศึกษาของ Marghitas et al.(2009) เริ่มจากการเตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml (stock solution) และเจือจางให้ได้สารละลายความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.25 mg/ml เตรียมตัวอย่างสารสกัดพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารละลาย quercetin หรือสารสกัด ปริมาตร 20 µl ลงใน 96-well plate เติม น้ำกลั่น 80 µl และ 5% sodium nitrate ($NaNO_2$) ปริมาตร 6 µl บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม 10% aluminium chloride ($AlCl_3$) ปริมาตร 6 µl และ 1 M sodium hydroxide (NaOH) 40 µl จากนั้นเติม น้ำกลั่น 48 µl จะได้สารประกอบเชิงซ้อนที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader และนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์จากกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของ quercetin ซึ่งแสดงในหน่วยน้ำหนักสมมูล มิลลิกรัมของ quercetin (mg quercetin equivalent) ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (QE/g crude extract)

3.5. การประเมินผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วย One-Way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS version 22

บทที่ 4
ผลการศึกษา

ผลการศึกษาแบ่งออกเป็น 3 หัวข้อหลัก ดังนี้

ส่วนที่ 4.1 ผลการเตรียมสารสกัดพรอพอลิส แสดงรายละเอียดของสารสกัดพรอพอลิสที่ได้

ส่วนที่ 4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสต่อการเติบโตของเชื้อด้วยวิธี agar well diffusion

ส่วนที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ทั้งหมดในสารสกัด

4.1.ผลการเตรียมสารสกัดพรอพอลิส

ผลของการเตรียมสารสกัดพรอพอลิส พบว่าสารสกัดที่ได้ มีลักษณะเหนียวข้น หนืด สีน้ำตาลเข้ม ดังภาพที่ 4-1 น้ำหนักของสารสกัดมีค่า 5.96 กรัม ซึ่งเมื่อคำนวณหาปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้ของสารสกัด (% yield crude extract) มีค่าเท่ากับ 29.8% แสดงดังตารางที่ 4-1

ภาพที่ 4-1 สารสกัดพรอพอลิสจากชันโรง

ตารางที่ 4-1 ค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัด

น้ำหนักพรอพอลิส (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)	ค่าร้อยละผลผลิตที่ได้
20.06	5.96	29.71%

4.2.ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสต่อการเติบโตของเชื้อด้วยวิธี agar well diffusion

4.2.1. ผลของสารสกัดพรอพอลิสต่อการเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acnes*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสต่อการเติบโตของเชื้อ *P. acnes* พบว่าสารสกัดพรอพอลิสที่ทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 mg/ml สามารถทำให้เกิดโซนยับยั้ง (clear zone inhibition) ได้ โดยค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งที่แต่ละความเข้มข้นของสารสกัดแสดงดังตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง ของแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดพรอพอลิสที่ใช้ในการทดสอบ

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	**ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง ± S.D. (mm)**	**LSD**
0	0.000 ± 0.000	1
2.5	14.333 ± 0.577	2
125	15.667 ± 1.528	3
250	17.000 ± 1.000	4
1000	18.000 ± 1.000	5
500	18.667 ± 1.155	5
Pc	31.667 ± 1.1528	6

หมายเหตุ - ความเข้มข้น 0 mg/ml หมายถึง ชุดควบคุม (100%DMSO)
- Pc หมายถึง ชุดควบคุมเชิงบวก (penicillin-streptomycin)

จากตารางเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งโดยใช้ สถิติ LSD ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05เนื่องจากค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกัน พบว่าสามารถแบ่งค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งได้เป็น 6 กลุ่ม(ดังท้ายตาราง) ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเรียงจากน้อยไปมากได้ดังนี้ ความเข้มข้นที่ทำให้เกิดโซนยับยั้งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยที่สุดได้แก่ 0 mg/ml รองลงมาคือ 62.5, 125 และ 250 mg/ml

ตามลำดับ ซึ่งที่ความเข้มข้น 500 และ 1000 mg/ml ทั้งสองความเข้มข้นให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งที่มากที่สุดจากทุกความเข้มข้นของสารสกัด และไม่แตกแตกกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชุดควบคุมเชิงบวก (penicillin-streptomycin) .ให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางที่มากที่สุดในการทดสอบ

4.2.2. ผลของสารสกัดพรอพอลิสต่อการเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสต่อการเติบโตของเชื้อ *S. aureus* พบว่า สารสกัดพรอพอลิสที่ทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ สามารถทำให้เกิดโซนยับยั้งได้ โดยค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งที่แต่ละความเข้มข้นของสารสกัดแสดงดังตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง ของแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดพรอพอลิสที่ใช้ในการทดสอบ

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	**ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง ± S.D. (mm)**	**Dunnett's T3**
0	0.000 ± 0.000	A
62.5	15.333 ± 1.528	B
125	17.000 ± 1.000	B
250	19.667 ± 1.155	B
1000	20.333 ± 0.577	B
500	21.000 ± 1.732	B
Pc	29.000 ± 8.888	AB

หมายเหตุ - ความเข้มข้น 0 mg/ml หมายถึง ชุดควบคุม (100%DMSO)
- Pc หมายถึง ชุดควบคุมเชิงบวก (penicillin-streptomycin)

จากตารางเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งโดยใช้ สถิติ Dunnett's T3 ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05เนื่องจากค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างทุกกลุ่มมีค่าแตกต่างกัน พบว่าสามารถแบ่งค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งได้เป็น 3 กลุ่ม (ดังท้ายตาราง) ที่มี

ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเรียงจากน้อยไปมากได้ดังนี้ ความเข้มข้นที่ทำให้เกิดโซนยับยั้งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยที่สุดได้แก่ 0 mg/ml รองลงมาคือกลุ่มความเข้มข้นที่ 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 mg/ml .ให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งที่ไม่แตกแตกกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และชุดควบคุมเชิงบวก (penicillin-streptomycin) .ให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางที่มากที่สุดในการทดสอบ

4.3.ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ทั้งหมดในสารสกัด

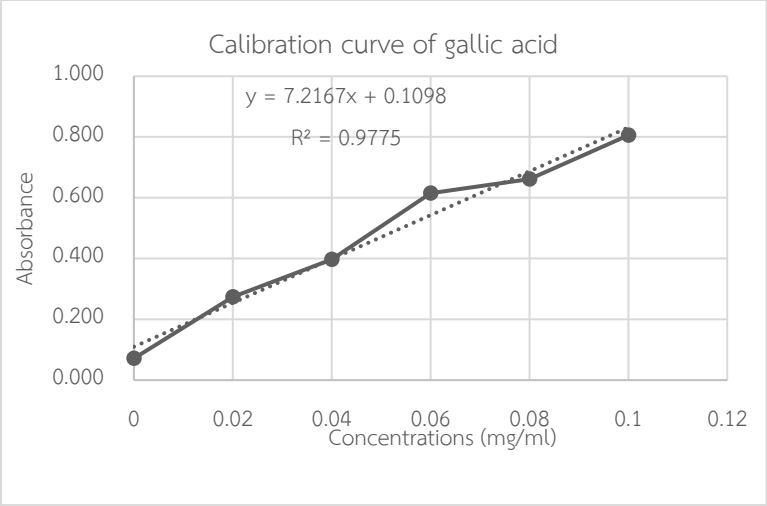
4.3.1. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน gallic acid ซึ่งได้ค่าดูดกลืนแสงดังตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความยาวคลื่น 760 nm

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid (mg/ml)	**ค่าการดูดกลืนแสง ± S.D.**
0	0.071±0.027
0.02	0.274±0.001
0.04	0.397±0.001
0.06	0.615±0.008
0.08	0.661±0.009
0.1	0.806±0.006

จากตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ดังภาพที่ 4-2



ภาพที่ 4-2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid และค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm

จากกราฟมาตรฐานได้สมการความสัมพันธ์คือ y = 7.741x + 0.0713 และได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9775 เมื่อนำมาคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรง พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 20.67 mgGAE/g

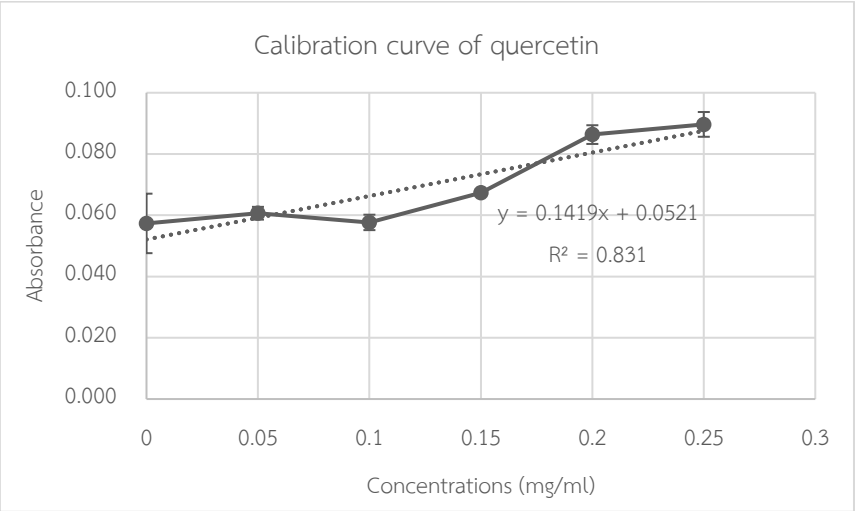
4.3.2. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัด

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน quercetin ซึ่งได้ค่าดูดกลืนแสงดังตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน quercetin ที่ความยาวคลื่น 540 nm

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน quercetin (mg/ml)	**ค่าการดูดกลืนแสง ± S.D.**
0.00	0.057±0.010
0.05	0.061±0.002
0.10	0.058±0.003
0.15	0.067±0.001
0.20	0.086±0.003
0.25	0.096±0.004

จากตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) แสดงดังภาพที่ 4-3



ภาพที่ 4-3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน quercetin และค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm

จากกราฟมาตรฐานได้สมการความสัมพันธ์คือ $y = 0.1419x + 0.0521$ และได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.831 เมื่อนำมาคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดพรอพอลิสจากซันโรง พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 480.26 mgQE/g

บทที่ 5
อภิปรายผลการศึกษา

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสต่อการเติบโตของเชื้อด้วยวิธี agar well diffusion แสดงให้เห็นว่า สารสกัดพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ที่สกัดด้วยเมทานอล ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดที่ไม่ซับซ้อน มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อสิวทั้งสองชนิด ถึงแม้ว่าจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากกลุ่มควบคุมเชิงบวก (penicillin streptomycin) เป็นสารบริสุทธิ์ (pure compound) จึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่า สารสกัดหยาบ

นอกจากนี้ เมื่อนำปริมาณฟีนอลิก และ ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ประเทศไทย เปรียบเทียบกับพรอพอลิสของผึ้งพันธุ์ และพรอพอลิสของชันโรง *G. thoracica* ประเทศบรูไน ดังตารางที่ 5-1

ตารางที่ 5-1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ของพรอพอลิสจากแหล่งที่มาต่าง ๆ

แหล่งที่มาของพรอพอลิส	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g)	ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g)
ผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera*	19.6-219.7	5.3-74.6
ชันโรง *G. thoracica* ประเทศบรูไน	2192.7	299.4
ชันโรง *G. thoracica* ประเทศไทย	20.7	480.3

ที่มา: (Segueni et al., 2020; Abdullah et al., 2020)

จากตารางแสดงให้เห็นว่า แหล่งที่มาของพรอพอลิส ทั้งภูมิประเทศ และชนิดของผึ้งหรือชันโรง ที่ต่างกัน ส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ มีค่าแตกต่างกันด้วย ซึ่งพรอพอลิส ของผึ้งพันธุ์ มีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ น้อยกว่าในพรอพอลิสของชันโรง จึงทำให้การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพรอพอลิสจากชันโรงเป็นที่นิยมมากกว่าในผึ้ง

จากการรวบรวมข้อมูลของ Przybylek และ Karpinski (2019) พบว่าสารประกอบฟีนอลิก เช่น phenolic acid และ flavonoids ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ที่พบในพรอพอลิส มีมากมายหลายชนิด เช่น benzoic acid, salicylic acid, *p*-cumaric acid, quercetin, tectochrysin และ pinostrobin ซึ่งสารออกฤทธิ์เหล่านี้ สามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียได้ โดยมีกลไกในการทำลายผนังเซลล์ (cell wall) เยื่อหุ้มไซโตพลาซึม (cytoplasmic membrane) ของแบคทีเรีย (Esekhiagbe et al., 2009) และยังทำลายโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane protein) ส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียแตก (cell lysis) (Karaca and Newman, 2015)

บทที่ 6
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

6.1. สรุปผลการศึกษา

จากผลการศึกษาสามารถกล่าวได้ว่า พรอพอลิสจาก *G. thoracica* ที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านการเติบโตของแบคทีเรียก่อสิว *P. acnes* และ *S. aureus* โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และ ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 20.67 mg GAE/g และ 480.26 mg QE/g ตามลำดับ

6.2. ข้อเสนอแนะ

6.2.1. <u>ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์</u>

- สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเป็นแนวทางในการพัฒนายาและผลิตภัณฑ์เพื่อใช้รักษาสิวที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *P. acnes* และ *S. aureus*
- ส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากชันโรง เพื่อสนับสนุนเกษตรกรและการเลี้ยงชันโรง G. *thoracica* ในประเทศไทย

6.2.2. <u>ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต</u>

- ควรมีการแยกสารออกฤทธิ์ (bioactive compound) ที่อยู่ในสารสกัด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย
- ควรมีการวิเคราะห์หาสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีเพิ่มเติม ด้วยเครื่องมือขั้นสูง เช่น HPLC
- ควรทดสอบถึงความปลอดภัยของสารสกัดต่อสิ่งมีชีวิตอื่น เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนสำหรับการสนับสนุนการนำสารสกัดไปใช้ประโยชน์ทางคลินิก

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย. (2551). พรอพอลิสของขวัญจากธรรมชาติ. วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ. 3: 286-296.

ภาษาอังกฤษ

Abdullah, N. A., Zullkiflee, N., Zaini, S. N., Taha, H., Hashim, F., and Usmana, A. (2020). Phytochemicals, mineral contents, antioxidants, and antimicrobial activities of propolis produced by Brunei stingless bees *Geniotrigona thoracica*, *Heterotrigona itama*, and *Tetrigona binghami*. Saudi Journal of Biological Sciences. 27(11): 2904-2905.

Azmi, W. A., Ghazi, R., and Nasharuddin, I. S. (2019). Morphological, nest architecture and colony characteristics of stingless bees (Hymenoptera; Apidae; Meliponini) from Tasik Kenyir, Terengganu. Greater Kenyir Landscapes:111-112.

Bankova, V. S., Castro, S. L., and Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie. 31: 3-10.

Boja, R. A. and Holland, K. T. (2004). Acne and *Propionibacterium acnes*. Clinics in Dermatology. 22(5): 375-377.

Chen, Y. W., Ye, S. R., Ting, C., and Yu, Y. H. (2018). Antibacterial activity of propolis from Taiwanese green propolis. Journal of Food and Drug Analysis. 26: 761-763.

Esekhiagbe, M., Agatemor, M. M., and Agatemor, C. (2009). Phenolic content and antimicrobial potentials of *Xylopia aethiopica* and *Myristica argentea*. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering. 28(2): 159-161.

Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: a review. Bee World. 60: 59-62.

Jacob, C. I., Dover, J. S., and Kaminer, M. S. (2001). Acne scarring: A classification system and review of treatment options. Journal of the American Academy of Dermatology. 45(1): 109-111.

Kanlayavattanakul, M., and Lourith, N. (2011). Therapeutic agents and herbs in topical application for acne treatment. International Journal of cocmetic Science. 33(4): 289-297.

Karaca, H. C., and Newman, M. C. (2015). Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and *Escherichia coli*. Food Bioscience. 11: 8-12.

Koreck, A., Pivarcsi, A., Dobozy, A. and Kemeny, L. (2003). The role of innate immunity in the pathogenesis of acne. Dermatology. 206(2): 96-125.

Kujumgiev, A., Tsvetkovaa, L., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., and Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. Journal of Ethnopharmacology. 64: 235-240.

Lyons, R. E. (1978). Comparative effectiveness of benzoyl peroxide and tretinoin in acne vulgaris. International Journal of Dermatology:246-251.

Marghitas, L. A., Stanciu, O. G., Dezmirean, D. S., Bobis, O., Popescu, O., Bogdanov, S., and Campos, M. G. (2009). In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. Food Chemistry. 115: 879.

Marpels, R. R. (1974). The microflora of the face and acne lessions. Journal of Investigative Dermatology. 62: 326-328.

Mierziak, J., Kostyn, K., and Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. Molecules. 19(10): 16240-16265.

Mohdaly, A. A., Mahmoud, A. A., Roby, M. H., Smetanska, I., and Ramadan, M. F. (2015). Phenolic extract from propolis and bee pollen: composition, antioxidant and antibacterial activities. Journal of Food Biochemistry. 39: 539.

Panche, A. N., Diwan, A. D., and Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. Journal of Nutrition Science. 5: 1-4.

Park, H., Bae, S. H., Park, Y., Choi, H. S., and Suh, H. J. (2015). Lipase-mediated lipid removal from propolis extract and its antiradical and antimicrobial activity. Journal of the Science of Food and Agriculture. 95(8): 1697-1699.

Pekal, A., and Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. Food Analytical Methods. 7: 1776–1782.

Przybylek, I., and Karpinski, T. M. (2019). Antibacterial properties of propolis. Molecules. 24(11): 1-5.

Sakamoto, F.H., Lopes, J.D. and Andetson, R.R. (2010). Photodynamic therapy for acne vulgaris: when and why consider photodynamic therapy? Journal of the American academy of Dermatology. 63(2): 193-194.

Sawatthum, A. (2004). Stingless beekeeping in Thailand. Proceedings of the 8th IBRA International Conference. 5: 382-385.

Segueni, N., Keskin, M., Keskin, S., Kadour, B., Kolaylı, S., and Salah, A. (2020). Comparison between phenolic content, antioxidant and antibacterial activity of Algerian and Turkish propolis. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. 23: 128-129.

Singleton, V. L., and Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 16: 144- 158.

Swanson, J. K. (2003). Antibiotic resistance of *Propionibacterium acnes* in acne vulgaris. Dermatology Nursing. 15(4): 359-361.

Yentzer, B. A., McClain, R. W., and Feldman, S. R. (2009). Do tropical retinoids cause acne to flare? Journal of Drugs Dermatology. 8(9): 799-801.

Zhishen, J., Mengcheng, T., and Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry. 64: 555-559.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Brain Heart Infusion broth (BHI broth)

ชั่ง BHI broth 0.74 กรัม ใส่บีกเกอร์ เติมน้ำกลั่น 20 ml ใช้แท่งแก้วคนให้ละลาย จากนั้นใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 ml ปิดปากขวดด้วยอลูมิเนียมฟอยด์

2. Luria-Bertani broth (LB broth)

ชั่ง LB broth 0.5 กรัม ใส่บีกเกอร์ เติมน้ำกลั่น 20 ml ใช้แท่งแก้วคนให้ละลาย จากนั้นใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 ml ปิดปากขวดด้วยอลูมิเนียมฟอยด์

จากนั้นนำ BHI broth และ LB broth เข้า autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว นำออกจากเครื่อง autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. BHI agar

ชั่ง BHI agar 26 กรัม ใส่บีกเกอร์ เติมน้ำกลั่น 500 ml ใช้แท่งแก้วคนให้ละลาย จากนั้นใส่ลงในขวดแก้ว ขนาด 1000 ml ปิดฝา

4. LB agar

ชั่ง LB agar 12.5 กรัม ใส่บีกเกอร์ เติมน้ำกลั่น 500 ml เติมผง agar 5 กรัม ใช้แท่งแก้วคนให้ละลาย จากนั้นใส่ลงในขวดแก้ว ขนาด 1000 ml ปิดฝา

จากนั้นนำ BHI aga และ LB agar r เข้า autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว นำออกจากเครื่อง autoclave รอให้อุณหภูมิลดลง เทอาหารเลี้ยงเชื้อลง petri dish ที่ปลอดเชื้อ (sterile) รอจนอาหารแข็งตัว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวกที่ 2 การคำนวณร้อยละผลผลิตของสารสกัด

$$\text{ร้อยละผลผลิตของสารสกัด} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดที่ได้} \times 100}{\text{น้ำหนักพรอพอลิสที่ใช้}}$$

$$= \frac{5.96 \times 100}{20.26}$$

$$= 29.71\%$$

ภาคผนวกที่ 3 การเตรียมสารสกัดพรอพอลิสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เตรียมสารสกัดพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500 และ 1,000 mg/ml จาก stock solution ความเข้มข้น 2,000 mg/ ml

การเตรียม stock solution สารสกัดพรอพอลิส

ชั่งสารสกัดพรอพอลิส 2,000 mg ละลายลงใน DMSO 1 ml จากนั้นเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ รายละเอียดดังตาราง

ตารางที่ 0-1 ปริมาตรของ stock solution และ DMSO ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัด

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	ปริมาตร stock solution (µl)	ปริมาตร DMSO (µl)
62.5	31.25	968.75
125	62.5	937.5
250	125	875
500	250	750
1,000	500	500

หมายเหตุ: เตรียมสารละลายพรอพอลิสความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ปริมาตรสุทธิ 1 ml (1,000 µl)

ภาคผนวกที่ 4 การเตรียมสารเคมี

1. **การเตรียมสารมาตรฐาน gallic acid**

การเตรียมสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 mg/ml เตรียมจาก stock solution gallic acid ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml

การเตรียม stock solution gallic acid

การเตรียม stock solution gallic acid ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml เตรียมโดยชั่งสาร gallic acid 10 mg ละลายลงใน DMSO 10 mlจากนั้นเจือจางด้วย DMSO เพื่อให้ได้สารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ รายละเอียดดังตาราง

ตารางที่ 0-2 การเตรียม สารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น ต่าง ๆ

ความเข้มข้น gallic acid (mg/ml)	ปริมาตร stock solution (µl)	ปริมาตร DMSO (µl)
0.02	4	196
0.04	8	192
0.06	12	188
0.08	16	184
0.10	20	180

หมายเหตุ: เตรียมสารละลาย gallic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ปริมาตรสุทธิ 200 µl

2. **Folin reagent (0.2 N) ปริมาตร 6 ml**

เตรียมจาก Folin reagent 2 N 600 µl จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5,400 µl

3. **sodium carbonate (Na_2CO_3) เข้มข้น 75g/L ปริมาตร 4 ml**

เตรียมจาก Na_2CO_3 0.3 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่น 4 ml

4. การเตรียมสารมาตรฐาน quercetin

การเตรียมสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.25 mg/ml เตรียมจาก stock solution quercetin ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml

การเตรียม stock solution quercetin

การเตรียม stock solution quercetin ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml เตรียมโดยชั่งสาร quercetin 10 mg ละลายลงใน DMSO 10 ml จากนั้นเจือจางด้วย DMSO เพื่อให้ได้สารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ รายละเอียดดังตาราง

ตารางที่ 0-3 การเตรียมสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น ต่าง ๆ

ความเข้มข้น quercetin (mg/ml)	ปริมาตร stock solution (µl)	ปริมาตร DMSO (µl)
0.05	150	2850
0.1	300	2700
0.15	450	2550
0.2	600	2400
0.25	750	2250

หมายเหตุ: เตรียมสารละลาย quercetin ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ปริมาตรสุทธิ 3 ml (3000 µl)

5. 5% (w/v) sodium nitrate ($NaNO_2$) ปริมาตร 100 ml

เตรียมโดยชั่ง $NaNO_2$ 5 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 ml

6. 10% (w/v) aluminium chloride ($AlCl_3$) ปริมาตร 100 ml

เตรียมโดยชั่ง $AlCl_3$ 10 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 ml

7. 1 M sodium hydroxide (NaOH) ปริมาตร 100 ml

เตรียมโดยชั่ง NaOH 4 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 ml

ภาคผนวกที่ 5 สถิติของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง จากโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

1. สถิติของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของสารสกัดพรอพอลิส ต่อ *P. acnes*

Descriptives

clear zone inhibition (*P. acnes*)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
conc0	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
conc62.5	3	14.3333	.57735	.33333	12.8991	15.7676	14.00	15.00
conc125	3	15.6667	1.52753	.88192	11.8721	19.4612	14.00	17.00
conc250	3	17.0000	1.00000	.57735	14.5159	19.4841	16.00	18.00
conc500	3	18.6667	1.15470	.66667	15.7982	21.5351	18.00	20.00
conc1000	3	18.0000	1.00000	.57735	15.5159	20.4841	17.00	19.00
pc	3	31.6667	1.52753	.88192	27.8721	35.4612	30.00	33.00
Total	21	16.4762	8.83526	1.92801	12.4544	20.4980	.00	33.00

Test of Homogeneity of Variances

clear zone inhibition (*P. acnes*)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.796	6	14	.172

ANOVA

clear zone inhibition (*P. acnes*)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1544.571	6	257.429	216.240	.000
Within Groups	16.667	14	1.190		
Total	1561.238	20			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: clear zone inhibition (*P. acnes*)

	(I) conc	(J) conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	95% Confidence Interval Upper Bound
LSD	conc0	conc62.5	-14.33333*	.89087	.000	-16.2441	-12.4226
		conc125	-15.66667*	.89087	.000	-17.5774	-13.7559
		conc250	-17.00000*	.89087	.000	-18.9107	-15.0893
		conc500	-18.66667*	.89087	.000	-20.5774	-16.7559
		conc1000	-18.00000*	.89087	.000	-19.9107	-16.0893
		pc	-31.66667*	.89087	.000	-33.5774	-29.7559
	conc62.5	conc0	14.33333*	.89087	.000	12.4226	16.2441
		conc125	-1.33333	.89087	.157	-3.2441	.5774
		conc250	-2.66667*	.89087	.010	-4.5774	-.7559
		conc500	-4.33333*	.89087	.000	-6.2441	-2.4226
		conc1000	-3.66667*	.89087	.001	-5.5774	-1.7559
		pc	-17.33333*	.89087	.000	-19.2441	-15.4226
	conc125	conc0	15.66667*	.89087	.000	13.7559	17.5774
		conc62.5	1.33333	.89087	.157	-.5774	3.2441
		conc250	-1.33333	.89087	.157	-3.2441	.5774
		conc500	-3.00000*	.89087	.005	-4.9107	-1.0893
		conc1000	-2.33333*	.89087	.020	-4.2441	-.4226
		pc	-16.00000*	.89087	.000	-17.9107	-14.0893
	conc250	conc0	17.00000*	.89087	.000	15.0893	18.9107
		conc62.5	2.66667*	.89087	.010	.7559	4.5774
		conc125	1.33333	.89087	.157	-.5774	3.2441
		conc500	-1.66667	.89087	.082	-3.5774	.2441
		conc1000	-1.00000	.89087	.281	-2.9107	.9107
		pc	-14.66667*	.89087	.000	-16.5774	-12.7559
	conc500	conc0	18.66667*	.89087	.000	16.7559	20.5774
		conc62.5	4.33333*	.89087	.000	2.4226	6.2441
		conc125	3.00000*	.89087	.005	1.0893	4.9107
		conc250	1.66667	.89087	.082	-.2441	3.5774
		conc1000	.66667	.89087	.467	-1.2441	2.5774
		pc	-13.00000*	.89087	.000	-14.9107	-11.0893
	conc1000	conc0	18.00000*	.89087	.000	16.0893	19.9107
		conc62.5	3.66667*	.89087	.001	1.7559	5.5774
		conc125	2.33333*	.89087	.020	.4226	4.2441
		conc250	1.00000	.89087	.281	-.9107	2.9107
		conc500	-.66667	.89087	.467	-2.5774	1.2441
		pc	-13.66667*	.89087	.000	-15.5774	-11.7559
	pc	conc0	31.66667*	.89087	.000	29.7559	33.5774
		conc62.5	17.33333*	.89087	.000	15.4226	19.2441
		conc125	16.00000*	.89087	.000	14.0893	17.9107
		conc250	14.66667*	.89087	.000	12.7559	16.5774
		conc500	13.00000*	.89087	.000	11.0893	14.9107
		conc1000	13.66667*	.89087	.000	11.7559	15.5774

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

2. สถิติของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของสารสกัดพรอพอลิส ต่อ *S. aureus*

Descriptives

clear zone inhibition (*S. aureus)*

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
conc0	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
conc62.5	3	15.3333	1.52753	.88192	11.5388	19.1279	14.00	17.00
conc125	3	17.0000	1.00000	.57735	14.5159	19.4841	16.00	18.00
conc250	3	20.3333	.57735	.33333	18.8991	21.7676	20.00	21.00
conc500	3	21.0000	1.73205	1.00000	16.6973	25.3027	20.00	23.00
conc1000	3	19.6667	1.15470	.66667	16.7982	22.5351	19.00	21.00
pc	3	29.0000	8.88819	5.13160	6.9205	51.0795	19.00	36.00
Total	21	17.4762	8.88605	1.93910	13.4313	21.5211	.00	36.00

Test of Homogeneity of Variances

clear zone inhibition (*S. aureus)*

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8.004	6	14	.001

ANOVA

clear zone inhibition (*S. aureus)*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1405.238	6	234.206	18.844	.000
Within Groups	174.000	14	12.429		
Total	1579.238	20			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: clear zone inhibition (*S. aureus)*

	(I) conc	(J) conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Dunnett T3	conc0	conc62.5	-15.33333*	.88192	.016	-24.0171	-6.6496
		conc125	-17.00000*	.57735	.006	-22.6849	-11.3151
		conc250	-20.33333*	.33333	.001	-23.6155	-17.0512
		conc500	-21.00000*	1.00000	.011	-30.8465	-11.1535
		conc1000	-19.66667*	.66667	.006	-26.2310	-13.1023
		pc	-29.00000	5.13160	.143	-79.5282	21.5282
	conc62.5	conc0	15.33333*	.88192	.016	6.6496	24.0171
		conc125	-1.66667	1.05409	.833	-7.9707	4.6374
		conc250	-5.00000	.94281	.115	-12.1428	2.1428
		conc500	-5.66667	1.33333	.115	-12.9986	1.6653
		conc1000	-4.33333	1.10554	.156	-10.6237	1.9570
		pc	-13.66667	5.20683	.486	-61.5980	34.2647
	conc125	conc0	17.00000*	.57735	.006	11.3151	22.6849
		conc62.5	1.66667	1.05409	.833	-4.6374	7.9707
		conc250	-3.33333	.66667	.096	-7.5354	.8688
		conc500	-4.00000	1.15470	.243	-11.2782	3.2782
		conc1000	-2.66667	.88192	.296	-7.5298	2.1964
		pc	-12.00000	5.16398	.572	-61.3509	37.3509
	conc250	conc0	20.33333*	.33333	.001	17.0512	23.6155
		conc62.5	5.00000	.94281	.115	-2.1428	12.1428
		conc125	3.33333	.66667	.096	-.8688	7.5354
		conc500	-.66667	1.05409	1.000	-9.0287	7.6953
		conc1000	.66667	.74536	.992	-4.3442	5.6776
		pc	-8.66667	5.14242	.783	-58.7910	41.4576
	conc500	conc0	21.00000*	1.00000	.011	11.1535	30.8465
		conc62.5	5.66667	1.33333	.115	-1.6653	12.9986
		conc125	4.00000	1.15470	.243	-3.2782	11.2782
		conc250	.66667	1.05409	1.000	-7.6953	9.0287
		conc1000	1.33333	1.20185	.972	-5.8040	8.4707
		pc	-8.00000	5.22813	.838	-55.2797	39.2797
	conc1000	conc0	19.66667*	.66667	.006	13.1023	26.2310
		conc62.5	4.33333	1.10554	.156	-1.9570	10.6237
		conc125	2.66667	.88192	.296	-2.1964	7.5298
		conc250	-.66667	.74536	.992	-5.6776	4.3442
		conc500	-1.33333	1.20185	.972	-8.4707	5.8040
		pc	-9.33333	5.17472	.742	-58.3140	39.6473
	pc	conc0	29.00000	5.13160	.143	-21.5282	79.5282
		conc62.5	13.66667	5.20683	.486	-34.2647	61.5980
		conc125	12.00000	5.16398	.572	-37.3509	61.3509
		conc250	8.66667	5.14242	.783	-41.4576	58.7910
		conc500	8.00000	5.22813	.838	-39.2797	55.2797
		conc1000	9.33333	5.17472	.742	-39.6473	58.3140

*. The mean difference is significant at the 0.05 level (แสดงว่าค่าเฉลี่ยคู่ดังกล่าวมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

ภาคผนวกที่ 6 การคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดพรอพอลิส จากกราฟมาตรฐาน gallic acid

คำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดพรอพอลิส จากค่าดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสารสกัดพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml แสดงรายละอียดดังตาราง

ตารางที่ 0-4 ค่าดูดกลืนแสง ที่ใช้คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ความเข้มข้นสารสกัดพรอพอลิส 0.1 mg/ml

ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm ของสารสกัดพรอพอลิสเข้มเข้ม 0.1 mg/ml			
ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0.084	0.086	0.092	0.0873

จากสมการ $y = 7.741x + 0.0713$ (จากกราฟมาตรฐาน gallic acid)

แทนค่า $y = 0.0873$

$0.016 = 7.741x$

$x = 0.0020669$

ในสารสกัดพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ ml มีปริมาณฟีนอลิก 0.0020669 mg ดังนั้น ในสาสกัดพรอพอลิส 1 กรัม มีปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ 20.67 GAE/g crude extract

ภาคผนวกที่ 7 การคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดพรอพอลิส จากกราฟมาตรฐาน quercetin

คำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดพรอพอลิส จากค่าดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสารสกัดพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml แสดงรายละอียดดังตาราง

ตารางที่ 0-5 ค่าดูดกลืนแสง ที่ใช้คำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่ความเข้มข้นสารสกัดพรอพอลิส 0.1 mg/ml

ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ของสารสกัดพรอพอลิสเข้มเข้ม 0.1 mg/ml			
ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0.054	0.05	0.073	0.059

จากสมการ $y = 0.1419x + 0.0521$ (จากกราฟมาตรฐาน quercetin)

แทนค่า $y = 0.059$

$0.0069 = 0.1419x$

$x = 0.0486258$

ในสารสกัดพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ ml มีปริมาณฟลาโวนอยด์ 0.0486258 mg ดังนั้นในสารสกัดพรอพอลิส 1 กรัม มีปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 486.27 QE/g crude extract