



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรง *Geniotrigona thoracica* ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส และการแสดงออกของยีน *cdc28* และ *clb2* ในยีสต์ก่อโรคผิวหนัง *Malassezia globosa*

The effect of propolis extract from stingless bee, *Geniotrigona thoracica*, on inhibition of lipase activity and expression of *cdc28* and *clb2* genes in *Malassezia globosa*

ชื่อนิสิต นางสาวกวิสรา ก้อนศิลา **เลขประจำตัว** 5932003423

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรง *Geniotrigona thoracica* ต่อการยับยั้งการทำงานของ
เอนไซม์ไลเปส และการแสดงออกของยีน *cdc28* และ *clb2* ในยีสต์ก่อโรคผิวหนัง *Malassezia globosa*

The effect of propolis extract from stingless bee, *Geniotrigona thoracica*, on inhibition
of lipase activity and expression of *cdc28* and *clb2* genes in *Malassezia globosa*

นางสาวกวิสรา ก้อนศิลา

อาจารย์ที่ปรึกษา

ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัครลาภสกุล

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	: ประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรง <i>Geniotrigona thoracica</i> ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส และการแสดงออกของยีน <i>cdc28</i> และ <i>clb2</i> ในยีสต์ก่อโรคผิวหนัง <i>Malassezia globosa</i>
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นางสาวกวิสรา ก้อนศิลา
อาจารย์ที่ปรึกษา	: ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	: รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัครลาภสกุล
ภาควิชา	: ชีววิทยา

บทคัดย่อ

Malassezia globosa เป็นยีสต์ที่สามารถก่อโรคผิวหนังชนิดเรื้อรังหลายชนิดในมนุษย์ โดยเป็นยีสต์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันได้เอง จึงทำให้การทำงานของเอนไซม์ไลเปส (lipase) มีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อการอยู่รอดและการก่อโรค ทั้งนี้มีรายงานพบว่ายาแผนปัจจุบันที่นิยมใช้ เช่น คีโตโคนาโซล (ketoconazole) เมื่อใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสมไปจะทำให้เกิดผลข้างเคียง ความเป็นพิษต่อเซลล์ และเกิดการติดยาของเชื้อ ในการศึกษานี้ได้เปลี่ยนแปลงหัวข้อโครงการจากเดิมเป็นประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรง *Geniotrigona thoracica* ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในยีสต์ก่อโรคผิวหนัง *M. globosa* ซึ่งได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบพรอพอลิสต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. globosa* ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่สามารถยับยั้งเชื้อได้มีค่าเท่ากับ 120 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงนำข้อมูลความกว้างหรือรัศมีโซนยับยั้งที่ได้และค่าลอการิทึมฐานธรรมชาติของความเข้มข้นมาประเมินค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดโดยการวิเคราะห์ค่า critical concentration (C_{cr}) ด้วย linear diffusion model โดยใช้ความสัมพันธ์เชิงเส้นจากสมการของ Cooper และ Woodman และสมการของ Bonev และคณะ (2008) และวิเคราะห์ด้วย radial diffusion model โดยใช้ความสัมพันธ์เชิงเส้นจากสมการของ Vesterdal เมื่อวิเคราะห์ด้วย linear diffusion model พบว่ามีค่า C_{cr} ที่ได้จากสมการของ Bonev และคณะ (2008) มีค่าเท่ากับ 30.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าค่า C_{cr} จากสมการของ Cooper และ Woodman โดยข้อมูลมีค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.917 และค่า C_{cr} จากการวิเคราะห์ด้วย radial diffusion model โดยสมการของ Vesterdal มีค่าเท่ากับ 44.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และข้อมูลมีค่า R^2 เท่ากับ 0.910 เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส พบว่าสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสได้ 68.31% ซึ่งการศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการทำงานของเอนไซม์ไลเปสของ *M. globosa* ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคผิวหนังชนิดเรื้อรังที่มีสาเหตุจาก *Malassezia* spp. ต่อไป

คำสำคัญ: ผลิตภัณฑ์จากชันโรง, สารสกัดจากธรรมชาติ, เชื้อก่อโรคผิวหนัง, ยาด้านเชื้อรา, ไลเปส

Research Title : The effect of propolis extract from stingless bee, *Geniotrigona thoracica*, on inhibition of lipase activity and expression of *cdc28* and *clb2* genes in *Malassezia globosa*

Student name : Miss Kawisara Konsila

Advisor : Professor Chanpen Chanchao, Ph.D.

Co-Advisor : Associate Professor Wanchai Assavalapsakul, Ph.D.

Department of : Biology

Abstract

Malassezia globosa is a lipophilic pathogenic yeast which causes many severe chronic skin diseases. Thus, Lipase activity plays an important role for growth and causing disease. Nowadays, available antifungal agents such as ketoconazole have various side effects, cytotoxicity and drug resistance. Consequently, the new curative agents are required. In this study, we change the research title to the effect of propolis extract from stingless bee, *Geniotrigona thoracica*, on inhibition of lipase activity and expression of *cdc28* and *clb2* genes in *M. globosa*. Ethanolic crude extract of propolis from stingless bee *G. thoracica* had been tested against *M. globosa* using agar well diffusion assay. The propolis extract concentration 120 mg/ml was an initial concentration that can inhibit growth of *M. globosa*. In addition, we determined critical concentration (C_{cr}) of propolis extract using linear regression analysis of (i) linear diffusion model, by Cooper and Woodman formula and Bonev et al. (2008) formula and (ii) radial diffusion model by Vesterdal formula. For linear diffusion model, C_{cr} from Bonev et al. (2008) 30.36 mg/ml was lower than C_{cr} Cooper and Woodman formula and coefficient of determination (R^2) of the formula was 0.917. The C_{cr} from radial diffusion model by Vesterdal was determined as 44.72 mg/ml and R^2 of this formula was 0.910. Moreover, the efficiency of propolis extract on inhibition of lipase activity was observed as 68.31% at concentration 200 mg/ml by lipase assay. This is the first report proved that propolis from stingless bee *G. thoracica* can inhibit growth and lipase activity of the pathogenic yeasts. The results of this study could be used as alternative therapy for *Malassezia* infections in the future.

Keywords: stingless bee product, natural extract, dermatophyte, antifungal agent, lipase

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในการปฏิบัติงาน การวิเคราะห์ข้อมูล ตลอดจนตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัครลาภสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมในโครงการ และสมาชิกในห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ กำลังใจ รวมทั้งเอื้อเฟื้อสถานที่ วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ผู้ประสานงานรายวิชา โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2562 ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับองค์ประกอบของเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการ

ขอขอบคุณนิสิตภาควิชาชีววิทยาทุกคนสำหรับกำลังใจและคำปรึกษาตลอดการทำโครงการวิจัย
สุดท้ายนี้ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำโครงการในครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
ABSTRACT	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ	1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ.....	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	3
2.1. ชั้นโรง	3
2.2. คุณสมบัติของพรอพอลิส	4
2.3. ยีสต์ก่อโรคผิวหนังสกุล <i>Malassezia</i>	5
2.4. การหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อด้วย linear diffusion model และ radial diffusion model	6
2.5. การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไลเปส	7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน.....	9
3.1. การเตรียมพรอพอลิส.....	9
3.1.1. การเก็บตัวอย่างพรอพอลิส.....	9
3.1.2. การเตรียมสารสกัดหยาบพรอพอลิส.....	9
3.2. การเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดลอง	9
3.2.1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	9
3.2.2. การเตรียมและการเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการทดลอง.....	10
3.2.2.1. ชนิดของเชื้อที่ใช้ในการทดลอง.....	10
3.2.2.2. การเตรียมเชื้อและการทำ stock culture	10
3.2.2.3. การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการทดลอง.....	10
3.2.2.4. การเตรียมเซลล์แขวนลอย (cell suspension).....	11
3.3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบพรอพอลิสต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ <i>M. globosa</i>	13

3.4. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบพรอพอลิสต่อการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของ <i>M. globosa</i>	13
3.5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	14
ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งชุดการทดลอง จากนั้นวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ความแปรปรวนของ ข้อมูล การถดถอยเชิงเส้น และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย One-Way ANOVA ที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS version 22 และ Microsoft Excel 2016	14
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	15
4.1. ผลการสกัดสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชั้นโรง <i>G. thoracica</i>	15
4.2. ลักษณะโคโลนี สัณฐานวิทยาเบื้องต้น และ ความหนาแน่นของเซลล์ <i>M. globosa</i> ตั้งต้น ภายใต้อาหารที่ใช้ทำการทดลอง.....	16
4.2.1. <u>ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์</u>	16
4.2.2. <u>ผลการคำนวณความหนาแน่นของเซลล์ตั้งต้น</u>	18
4.3. ผลการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ <i>M. globosa</i>	18
4.4. ผลการวิเคราะห์เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดพรอพอลิสที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ <i>M. globosa</i>	21
4.4.1. <u>ผลการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรง</u>	22
4.4.2. <u>ผลการคำนวณค่า critical concentration (C_{cr})</u>	23
4.4.2.1. <u>ผลการวิเคราะห์โดยใช้ความสัมพันธ์จากสมการของ Cooper และ Woodman</u>	23
4.4.2.2. <u>ผลการวิเคราะห์โดยใช้ความสัมพันธ์จากสมการของ Bonev et al. (2008)</u>	24
4.4.2.3. <u>ผลการวิเคราะห์โดยใช้ความสัมพันธ์จากสมการของ Vesterdal</u>	25
4.5. ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของ <i>M. globosa</i>	26
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา.....	29
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	32
6.1. สรุปผลการศึกษา.....	32
6.2. ข้อเสนอแนะ.....	32
6.2.1. <u>ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์</u>	32
6.2.2. <u>ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต</u>	32
เอกสารอ้างอิง	33
ภาษาไทย	33
ภาษาอังกฤษ	33

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2-1 สมการของ Cooper และ Woodman, Vesterdal และ Bonev และคณะ (2008).....	7
ตารางที่ 4-1 น้ำหนักของพรอพอลิสตั้งต้น น้ำหนักสารสกัดหยาบพรอพอลิส และร้อยละของ ผลผลิตของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชิ้นโรง <i>G. thoracica</i>	16
ตารางที่ 4-2 ผลการนับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer และผลการคำนวณความหนาแน่น ของเซลล์ที่ค่า O.D. ₆₀₀ เท่ากับ 1 หลังจากบ่มเป็นเวลา 7 วัน.....	18
ตารางที่ 4-3 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ที่หักลบด้วย blank และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของสารสกัดหยาบพรอพอลิส ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	28

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2-1 รูปแบบของโซนัยยับยั้งและตัวแปรที่เกี่ยวข้อง.....	7
ภาพที่ 2-2 การเปลี่ยน <i>p</i> -nitrophenol ให้อยู่ในรูปของ <i>p</i> -nitrophenolate ใน alkaline buffer	8
ภาพที่ 2-3 ค่าการดูดกลืนแสงของ <i>p</i> -nitrophenol ที่ความยาวคลื่นช่วง 300-500 นาโนเมตร ของปฏิกิริยาที่มีค่า pH ต่างกัน	8
ภาพที่ 3-1 รูปแบบการนับเซลล์และปริมาตรของ hemocytometer	11
ภาพที่ 3-2 แผนผังขั้นตอนการเตรียมเชื้อและการทำ stock culture เพื่อใช้ในการทดลอง	12
ภาพที่ 4-1 พรอพอลิสบริเวณปากทางเข้ารัง (a) และลักษณะปากทางเข้ารังของชันโรง <i>G. thoracica</i> (b)	15
ภาพที่ 4-2 ลักษณะสารสกัดที่ได้หลังการกรองตะกอน (a) และลักษณะสารสกัดหยาบ พรอพอลิส (b-c).....	16
ภาพที่ 4-3 ลักษณะโคโลนีเดี่ยวสีขาวครีมและขุ่น (a), รอยหยักบนผิวหน้าแบบ cerebriform และขอบ แบบ lobate ของโคโลนี <i>M. globosa</i> หลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 14 วัน (b), ลักษณะ สัณฐานวิทยาเบื้องต้นหลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน ซึ่งพบเซลล์ <i>M. globosa</i> ที่มี อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (กำลังขยาย 40x) (c), เซลล์ <i>M. globosa</i> มีลักษณะเป็นทรงกลมแบบ สมมาตร (กำลังขยาย 100x) (d), ลักษณะเซลล์ <i>M. globosa</i> ย้อมแกรม (กำลังขยาย 100x) โดยลูกศรแสดงตำแหน่งที่กำลังแตกหน่อ (e) และลักษณะการแตกหน่อที่ปลายด้านเดียว มี ฐานแคบ และแตกหน่อเป็นทรงกระบอกยาว (กำลังขยาย 100x) (f)	17
ภาพที่ 4-4 ผลการทดสอบ agar well diffusion assay ซึ่งตำแหน่งลูกศรสีดำคือตัวอย่างโซนัยยับยั้ง ที่เกิดขึ้นหลังการบ่ม 48 ชั่วโมง (a), โซนัยยับยั้งที่เกิดจากความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ พรอพอลิสเท่ากับ (1) 100, (2) 120 และ (3) 140 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (b), โซนัยยับยั้ง ที่เกิดจากความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสเท่ากับ (4) 200, (5) 300, (6) 400, (7) 500 และ (8) 600 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (c) และโซนัยยับยั้งที่เกิดจากความเข้มข้นของ สารสกัดหยาบพรอพอลิสเท่ากับ (9) 700, (10) 800, (11) 900 และ (12) 1,000 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร (d) โดยเครื่องหมายลบคือชุดควบคุมที่ให้ผลลบ (%100DMSO) และ เครื่องหมายบวกคือชุดควบคุมที่ให้ผลบวก (KTZ).....	19
ภาพที่ 4-5 ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนัยยับยั้งของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง <i>G. thoracica</i> ที่ความเข้มข้น 10-1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดย error bar คือส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน	20

ภาพที่ 4-6 ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชั้นโรง <i>G. thoracica</i> ที่ความเข้มข้น 100-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดย error bar คือส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน และ ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าเฉลี่ยมีค่าแตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%.....	20
ภาพที่ 4-7 Regression line จากความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสารสกัดหยาบพรอพอลิส 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (concentration) และเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (diameter of inhibition zone).....	22
ภาพที่ 4-8 Regression line จากความสัมพันธ์ของลอการิทึมธรรมชาติของความเข้มข้นของสาร สกัดหยาบพรอพอลิสที่ 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ln of concentration) และ ความกว้างของโซนยับยั้งยกกำลังสอง (width ² of inhibition zone)	23
ภาพที่ 4-9 Regression line จากความสัมพันธ์ของลอการิทึมธรรมชาติของความเข้มข้นของสาร สกัดหยาบพรอพอลิสที่ 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ln of concentration) และ ความกว้างของโซนยับยั้ง (width of inhibition zone).....	24
ภาพที่ 4-10 Regression line จากความสัมพันธ์ของลอการิทึมธรรมชาติของความเข้มข้นของสาร สกัดหยาบพรอพอลิสที่ 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ln of concentration) และ รัศมีจากจุดศูนย์กลางของโซนยับยั้งยกกำลังสอง (radius ² of inhibition zone).....	25
ภาพที่ 4-11 ค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของชุดควบคุมและชุดการ ทดลองที่เติมสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร โดย error bar คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึง ค่าเฉลี่ยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%	27

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

การศึกษานี้มีการเปลี่ยนแปลงหัวข้อโครงการจากหัวข้อเดิมเป็นประสิทธิภาพของสารสกัดพรอพอลิส จากชันโรง *Geniotrigona thoracica* ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในยีสต์ก่อโรคผิวหนัง *Malassezia globosa* ซึ่งพรอพอลิส (propolis) คือผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากผึ้งและชันโรง เป็นยางของต้นพืชที่ผึ้งงานหรือชันโรงงาน (worker) ได้รวบรวมมาเพื่อใช้ซ่อมแซมรัง ปกป้องรัง รวมทั้ง ป้องกันเชื้อโรคและแมลงศัตรูที่เข้ามาภายในรัง และเนื่องด้วยพรอพอลิสมีคุณสมบัติทางชีวภาพหลากหลาย เช่น ยับยั้งการเจริญของจุลชีพ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านการออกซิเดชัน และต้านการเกิดเนื้องอก จึงมีการ นำพรอพอลิสมาใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเครื่องสำอาง รวมถึงยา เช่น ยาสมานแผล ยาสำหรับใช้ทางทันตกรรม ยารักษาโรคมะเร็ง และ ยารักษาโรคผิวหนัง (ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย, 2551; Sforcin, 2016)

ปัจจุบันมีรายงานว่าพรอพอลิสสามารถต้านจุลินชีพได้หลายชนิด รวมทั้งยีสต์และเชื้อราก่อโรคผิวหนัง (Oliveira et al., 2006; Kumar et al., 2008; Khosravi et al., 2013; Wagh, 2013) ทั้งนี้ยีสต์ในสกุล *Malassezia* ได้รับความสนใจทางการแพทย์เป็นอย่างมาก เนื่องจากพบได้มากที่สุดบนผิวหนังของมนุษย์ (Seifert, 2016) โดยพบได้ทั่วไปบริเวณผิวหนังที่มีต่อมไขมันมากเพราะไม่มียีนในการสังเคราะห์ไขมันจึงต้อง จำเป็นต้องอาศัยไขมันจากผิวหนังของมนุษย์ในการดำรงชีวิต ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ไลเปส (lipase) เป็นกลไกมีบทบาทสำคัญต่อการอยู่รอดและการก่อโรค ซึ่ง *Malassezia* spp. จะหลั่งเอนไซม์ไลเปส ออกมาเพื่อย่อยไขมัน triglyceride บนผิวหนังเพื่อให้ได้กรดไขมันไปใช้ แต่จะทำให้เกิดกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น กรดไขมันโอเลอิก (oleic acid) ซึ่งหากมีการสะสมที่ผิวหนังในปริมาณมากจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการ ระคายเคืองและการอักเสบและนำไปสู่การเกิดโรคผิวหนังได้ (White et al., 2014; Velegriki et al., 2015) โดย *Malassezia* spp. สามารถก่อโรคผิวหนังเรื้อรังหลายชนิดในมนุษย์ เช่น เกื้ออ่อน (pityriasis versicolor), ผิวหนังอักเสบเซ็บเดิร์ม (seborrheic dermatitis), ผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง (atopic dermatitis) สะเก็ดเงิน (psoriasis) และรังแค (dandruff) ทั้งนี้ชนิดที่มักจะพบมากในผู้ป่วยโรคผิวหนัง ได้แก่ *M. globosa*, *M. restricta* และ *M. sympodialis* (Batra et al., 2005; Cabanes, 2014; Seifert, 2016)

การรักษาโรคผิวหนังที่มีสาเหตุจาก *Malassezia* spp. นิยมใช้ยาในกลุ่มเอโซล (azole) เช่น คีโตโคนาโซล (ketoconazole), ไอทราโคนาโซล (itraconazole) และ โปซาโคนาโซล (posaconazole) แต่ทั้งนี้การใช้ยา ดังกล่าวอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงตามมาซึ่งการใช้ยาแบบรับประทานอาจทำให้คลื่นไส้ เบื่ออาหาร ปวดศีรษะ รวมถึงตับอักเสบ และยาใช้ภายนอกอาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง (Oakley, 2004; Multum, 2019) นอกจากนี้มีรายงานว่า *Malassezia* spp. สามารถดื้อยาในกลุ่มเอโซล โดยเฉพาะคีโตโคนาโซล (Leong et al., 2017) ซึ่งจากข้างต้นถือได้ว่าเป็นปัญหาสำคัญเพราะยาในกลุ่มเอโซลเป็นยาหลักที่ใช้สำหรับ

การรักษา ดังนั้นการรักษาโดยใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ จุลินชีพดั่งเช่นพรอพอลิสจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการลดปัญหาดังกล่าว เนื่องจากมีรายงานว่าพรอพอลิสมี คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Malassezia* spp. (Khosravi et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการศึกษาประสิทธิภาพพรอพอลิสต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Malassezia* spp. ที่เป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์ยังมีไม่มากและยังไม่มีรายงานถึงการศึกษากลไกของพรอพอลิสที่มีผลต่อยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Malassezia* spp. ดังนั้นการศึกษาคั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของและการทำงานของเอนไซม์ไลเปสใน *M. globosa* โดยมุ่งหวังเพื่อให้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ต่อไป โดยเฉพาะการพัฒนาสำหรับผู้ป่วยโรคผิวหนังให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น และส่งเสริมให้มีการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติซึ่งมีความปลอดภัยและส่งผลข้างเคียงน้อยกว่ายาที่ผลิตขึ้นจากสารสังเคราะห์ รวมถึงช่วยลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อ

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- เพื่อศึกษาผลของพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. globosa*
- เพื่อประเมินค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. globosa* ด้วย linear diffusion model และ radial diffusion model
- เพื่อศึกษาผลของพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสของ *M. globosa*

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1. ชันโรง

ชันโรง (stingless bee) เป็นแมลงสังคมชั้นสูง (eusocial insect) ซึ่งภายในรังแบ่งออกเป็น 3 วรรณะ ได้แก่ นางพญา (queen) ชันโรงเพศผู้ (drone) และ ชันโรงงาน (drone) โดยชันโรงจัดอยู่ใน Order Hymenoptera, Family Apidae, Subfamily Meliponinae ซึ่งมี 2 Tribe คือ Meliponini และ Trigonini ชันโรงมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับผึ้งพันธุ์ (honey bee) ผึ้งหึ่ง (bumble bee) และผึ้งกล้วยไม้ (bee orchid) แต่ชันโรงมีความแตกต่างจากผึ้งที่เด่นชัด คือ ชันโรงไม่มีเหล็กใน แต่จะต่อสู้และปกป้องรังด้วยการใช้มีฟันกราม (mandible) กัดศัตรูและบางชนิดสามารถปล่อยสารเหนียวออกมาเพื่อให้ศัตรูเป็นอัมพาต (Wille, 1983; Michener, 2013)

ชันโรงมีการกระจายตัวอยู่ทั่วโลก พบมากในภูมิภาคเขตร้อนและใกล้เขตร้อน มีความหลากหลายของชนิดพันธุ์มากที่สุดในแถบอเมริกากลางและอเมริกาใต้ซึ่งมีประมาณ 391 ชนิด พบในเอเชีย 60 ชนิด แอฟริกา 50 ชนิด และออสเตรเลีย 10 ชนิด ทั้งนี้มีรายงานว่าชันโรงในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีอายุยืนและมีอัตราการย้ายรังต่ำ (absconding) โดยพบว่าชันโรงบางชนิดสามารถอาศัยอยู่ในรังเดิมได้ถึง 20 ปี ทำให้ประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงชันโรง (meliponiculture) เป็นอย่างมาก (Velthuis, 1997; Rattanawanee and Duangphakdee, 2019)

ประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่เพาะเลี้ยงชันโรงเพื่อส่งเสริมการเกษตร รวมถึงเพาะเลี้ยงเพื่อการค้าอย่างแพร่หลาย เพื่อให้ชันโรงช่วยผสมเกสรของพืชผลทางการเกษตร และใช้ประโยชน์จากผลผลิตของชันโรง (จิตเกษม หล้าสะอาด และคณะ, 2562; Chuttong et al., 2014) โดยการเพาะเลี้ยงชันโรงมีทั่วทุกภาคของประเทศไทย เช่น จังหวัดจันทบุรี ตราด สมุทรสงคราม สุราษฎร์ธานี เชียงใหม่ และ เชียงราย ทั้งนี้มีชันโรงอย่างน้อย 6 ชนิดที่พบการกระจายตัวทั่วไปในประเทศไทย ได้แก่ *Tetragonula pagdeni*, *T. laeviceps*, *T. fuscobalteata*, *Lepidotrigona terminate*, *Heterotrigona itama*, และ *Geniotrigona thoracica* ซึ่ง *G. thoracica* และ *T. pagdeni* เป็นชนิดที่นิยมเลี้ยงเพื่อการค้า เนื่องจากย้ายสู่รังเทียมได้ง่ายและสามารถเพิ่มจำนวนได้เร็วจึงขยายรังได้มากขึ้น (Rattanawanee and Duangphakdee, 2019)

ชันโรงและผึ้งมีหน้าที่หลักในระบบนิเวศน์ คือ เป็นแมลงช่วยผสมเกสร (pollinator) นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์อื่น ๆ จากที่สามารถนำมาให้ประโยชน์ได้ เช่น น้ำผึ้ง (honey) เป็นผลิตผลของน้ำหวาน (nectar) จากดอกไม้และจากแหล่งน้ำหวานอื่น ๆ ที่ผึ้งหรือชันโรงไปเก็บเพื่อสะสมโดยเก็บไว้ที่กระเพาะพักน้ำผึ้ง (honey stomach) ก่อนนำมาเก็บเป็นอาหารไว้ในรังซึ่งจะผ่านการระเหยน้ำออกก่อนจะถูกปิดด้วยไขผึ้ง ซึ่งน้ำผึ้งมีกลิ่นและลักษณะทางกายภาพแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของดอกไม้ที่ให้น้ำหวานของดอกไม้, เกสรผึ้ง (bee pollen) เป็นเกสรของดอกไม้ที่ผึ้งงานหรือชันโรงงานรวบรวมไว้เป็นแหล่งอาหารในรัง โดยผึ้งงานจะใช้

ขาหน้าปั่นเกสรที่ติดตามตัวให้รวมกันเป็นก้อนขนาดเล็กและนำไปเก็บไว้ที่ปลายขาหลังบริเวณที่เรียกว่า ตะกร้าเก็บเกสร (pollen basket), นมผึ้ง (royal jelly) เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงตัวอ่อน มีลักษณะเป็นของเหลวสีขาวข้นซึ่งหลั่งออกมาจาก hypopharyngeal gland ของผึ้งงานหรือชันโรงงาน, พรอพอลิส (propolis) เป็นยางจากต้นพืชบริเวณส่วนที่แตกออกของเปลือกไม้ ตา และ ส่วนใบอ่อน ซึ่งผึ้งจะเก็บไว้ที่ขาหลังเช่นเดียวกับการเก็บเกสรผึ้งเพื่อนำมาไว้ในรัง โดยมีการผสมกับเอนไซม์ในน้ำลาย ไชผึ้ง และส่วนประกอบอื่น ๆ เช่น เกสรผึ้ง โดยจะใช้พรอพอลิสในการสร้างรัง ซ่อมแซมรัง ปิดรอยรั่วของรัง ปิดเซลล์ตัวอ่อนเพื่อป้องกันเชื้อโรค สร้างทางเข้ารัง ปิดรูทางเข้ารังให้มีขนาดเล็กเพื่อป้องกันศัตรูและควบคุมอุณหภูมิภายในรัง รวมถึงท่อหุ้มศัตรูที่เข้ามาในรัง (วันเพ็ญ เจริญจิต. 2554; Marieke et al., 2005; Sforcin, 2016)

2.2. คุณสมบัติของพรอพอลิส

องค์ประกอบทั่วไปที่พบในพรอพอลิส ได้แก่ ยางจากพืช 50%, ไชผึ้ง 30%, น้ำมันหอมระเหย 5%, เกสร 5% และสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ 5% :ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีที่พบมากในพรอพอลิส คือ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) และเทอร์ปีน (terpenes) โดยตัวทำละลายที่รายงานว่ามีประสิทธิภาพในการสกัดพรอพอลิส ได้แก่ โพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) และ เอทานอล (ethanol) เนื่องจากสามารถละลายสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในพรอพอลิสได้ดี แต่ทั้งนี้ การสกัดด้วยเอทานอลเป็นที่นิยมมากกว่าเพราะมีการปนเปื้อนของไขมันน้อยกว่า นอกจากนี้การสกัดด้วยเอทานอลยังนิยมใช้ในทางการแพทย์และเทคโนโลยีด้านอาหาร ในขณะที่การสกัดด้วยโพรพิลีนไกลคอลนิยมใช้ในด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าพรอพอลิสมีคุณสมบัติหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ต้านเนื้องอก ต้านออกซิเดชัน และต้านการอักเสบ (ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย, 2551; Pietta et al., 2002; Sforcin, 2016) จึงมีการนำพรอพอลิสมาเป็นส่วนประกอบของยาและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ซึ่งส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นคุณสมบัติการต้านจุลชีพของพรอพอลิสเป็นหลักเนื่องจากเป็นคุณสมบัติที่โดดเด่น โดยพรอพอลิสสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เชื้อราและยีสต์ โปรโตซัวก่อโรคในมนุษย์และสัตว์ รวมถึงไวรัส (Wagh, 2013)

Koc และคณะ (2011) รายงานว่าพรอพอลิสมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราและยีสต์สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์จากผึ้งอื่น ๆ ได้แก่ เกสรผึ้ง นมผึ้ง และ น้ำผึ้ง ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Kumar และคณะ (2008) ที่พบว่าพรอพอลิสมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้ง *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* และ *Trichosporon* spp. และยังมีการศึกษาพบว่าพรอพอลิสสามารถยับยั้งยีสต์ก่อโรคผิวหนังได้ เช่น จากการศึกษาของ Oliveira และคณะ (2006) พบว่าพรอพอลิสสามารถยับยั้งยีสต์ก่อโรคเชื้อราที่เล็บ (onychomycosis) เช่น *Candida* spp., *Trichosporon* sp., *Geotrichum candidum* และ *Saccharomyces cerevisiae* นอกจากนี้การศึกษาของ Khosravi และคณะ (2013) รายงานว่าพรอพอลิสมีคุณสมบัติในการ

ยับยั้งยีสต์ในสกุล *Candida* และ *Malassezia* รวมทั้งยังสามารถยับยั้งยีสต์ก่อโรคผิวหนังที่ติดต่อยาฟลูโคนาโซล (fluconazole)

2.3. ยีสต์ก่อโรคผิวหนังสกุล *Malassezia*

Malassezia เป็นเชื้อราชนิดเซลล์เดียวหรือยีสต์ใน Phylum Basidiomycota, Subphylum Ustilagomycotina, Class Malasseziomycetes, Order Malasseziales, Family Malasseziaceae ปัจจุบันมีรายงานทั้งหมด 18 ชนิด ได้แก่ *M. arunalokei*, *M. brasiliensis*, *M. caprae*, *M. cuniculi*, *M. dermatis*, *M. equina*, *M. furfur*, *M. globosa*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. obtuse*, *M. pachydermatis*, *M. psittaci*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. vespertilionis* และ *M. yamatoensis* (Cabanes, 2014; Wang, 2014; Honnavar, 2016; Lorch, 2018) เป็นยีสต์ที่พบในมนุษย์และสัตว์ ดำรงชีพแบบอิงอาศัยบริเวณผิวหนังที่มีการหลั่งของไขมันมาก เนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันได้เอง เพราะไม่มียีนของเอนไซม์ fatty acid synthase จึงต้องอาศัยไขมันจากสิ่งแวดล้อมหรือเจ้าบ้าน (host) ในการดำรงชีวิต (lipid-dependent) ยกเว้น *M. pachydermatis* ทั้งนี้จากการศึกษาไมโครไบโอม (microbiome) ของเชื้อรา 80 สกุลบนผิวหนังของมนุษย์พบว่า *Malassezia* spp. มีจำนวนมากที่สุด โดยส่วนมากจะพบบริเวณลำตัว แขน ใบหน้า และหู (Findley et al., 2013; Seifert, 2016) นอกจากนี้ยังสามารถก่อโรคผิวหนังเรื้อรังหลายชนิดในมนุษย์ แต่การก่อโรคจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม และปัจจัยส่วนบุคคล เช่น เพศ อายุ และ ระบบภูมิคุ้มกัน โดยตัวอย่างของโรคที่พบได้แก่ ผิวหนังอักเสบเซ็บเดิร์ม (seborrheic dermatitis), เกื้อน (pityriasis versicolor), รุขุมขนอักเสบ (folliculitis), ผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง (atopic dermatitis), สะเก็ดเงิน (psoriasis), เชื้อราที่เล็บ (Onychomycosis), โรคโกรเวอร์ (Grover's disease) รวมถึงรังแค (dandruff) ซึ่งมีรายงานว่า *M. globosa*, *M. restricta* และ *M. sympodialis* พบได้มากที่สุด ในผู้ป่วยโรคผิวหนัง (Batra et al., 2005; Cabanes, 2014; White et al., 2014; Seifert, 2016)

กลไกที่มีบทบาทสำคัญต่อการอยู่รอดและการก่อโรคของ *Malassezia* spp. คือ การทำงานของเอนไซม์ไลเปส (lipase) โดย *Malassezia* spp. จะหลั่งเอนไซม์ไลเปสออกมาภายนอกเซลล์เพื่อย่อยไขมัน triglyceride บนผิวหนังเพื่อให้อยู่ในรูปกรดไขมันที่สามารถดูดซึมใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อ รวมถึงการสร้างผนังเซลล์ที่เป็นชั้นไขมันหนา ในขณะที่กรดไขมันบางส่วนโดยเฉพาะกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น กรดไขมันโอเลอิก (oleic acid) ที่ไม่ได้ถูกดูดซึมไปใช้จะถูกดูดซึมไปที่ผิวหนัง และหากมีการสะสมปริมาณมากจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการระคายเคืองและการอักเสบของเซลล์ผิวหนังได้ ทั้งนี้การหลั่งเอนไซม์ไลเปสมากขึ้นจะทำให้เกิดกรดไขมันในปริมาณมากตามไปด้วยจึงเอื้อต่อการเจริญเติบโตและส่งผลให้ *Malassezia* spp. มีจำนวนเพิ่มขึ้น ทั้งนี้มีรายงานว่า *M. globosa* มีอัตราการทำงานของเอนไซม์ไลเปสสูง โดยเฉพาะช่วงฤดูร้อนซึ่งพบว่าองค์ประกอบของเหงื่อ เช่น โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) และ กรดแลคติก (lactic

acid) สามารถส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ไลเปสได้ (Dawson Jr, 2007; Akaza et al., 2012; White et al., 2014; Velegraki et al., 2015)

การรักษาในปัจจุบันนิยมใช้ยากำจัดเชื้อรากลุ่มเอโซล (azole) โดยมีการศึกษาพบว่า คีโตโคนาโซล (ketoconazole), ไอทราโคนาโซล (itraconazole) และ โปซาโคนาโซล (posaconazole) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสูง อย่างไรก็ตามการใช้ยาในกลุ่มเอโซลในปริมาณมากอาจส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ เกิดผลข้างเคียง และเกิดการดื้อยาของเชื้อได้ (Sugar et al., 1987; Oakley, 2004; Velegraki et al., 2015) โดยผลข้างเคียงของยาแบบรับประทานนั้นอาจก่อให้เกิดอาการข้างเคียงได้ เช่น คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร ปวดศีรษะ และตับอักเสบ สำหรับยาทาหรือแชมพูอาจก่อการระคายเคืองต่อผิวหนัง (Multum, 2019) นอกจากนี้การศึกษาของ Leong และคณะ (2017) รายงานว่า *Malassezia* spp. สามารถดื้อต่อยาในกลุ่มเอโซลโดยเฉพาะคีโตโคนาโซล เนื่องจากในการศึกษาพบว่าคีโตโคนาโซลมีค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดใน การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ 90% (Minimal inhibitory concentration, MIC) สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับไอทราโคนาโซลและโปซาโคนาโซล ดังนั้นการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อแก้ปัญหาอาการข้างเคียงจากยาและการดื้อยาของเชื้อ

2.4. การหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อด้วย linear diffusion model และ radial diffusion model

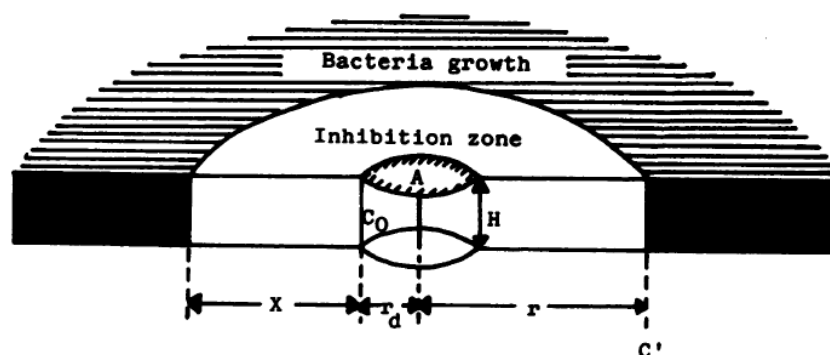
วิธีการที่นิยมใช้ในการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (antimicrobial susceptibility) ได้แก่ broth dilution เพื่อใช้หาค่า MIC และ agar diffusion เพื่อใช้หาค่า critical concentration (C_{cr}) ซึ่งมีค่าเทียบเคียงกับ MIC ทั้งนี้ agar diffusion เป็นวิธีทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งและเติมสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างกันลงในหลุมที่เจาะลงบนอาหารหรือหยดสารสกัดที่จะทดสอบลงบนแผ่น paper disc และวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อทดสอบอยู่ โดยสารที่ใช้ทดสอบจะแพร่จากจุดที่มีความเข้มข้นสูงที่สุด (C_0) ออกไปยังบริเวณที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าตาม Fick's law และหากสารทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้จะทำให้เกิดบริเวณใสหรือโซนยับยั้ง (zone of inhibition) ซึ่งขอบนอกสุดของโซนยับยั้งจะเป็นบริเวณที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดหรือเรียกว่า C_{cr} หรือ C' (ภาพที่ 2-1) โดยสมการของ Cooper และ Woodman (ตารางที่ 2-1) เป็นสมการที่อธิบายการเกิดโซนยับยั้งตามกฎการแพร่ของสารในหลอดทดลอง ดังนั้นสมการที่ได้จึงมีรูปแบบเป็น linear diffusion model ในขณะที่สมการของ Vesterdal (ตารางที่ 2-1) เป็นสมการที่ได้จากการทดลองในงานเพาะเชื้อ ทำให้สมการที่ได้มีรูปแบบเป็น radial diffusion model โดยจากสมการทั้งสองสามารถคำนวณ C_{cr} โดยใช้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความกว้าง (x) หรือรัศมีโซนยับยั้ง (r) ยกกำลังสอง และค่าลอการิทึมฐานธรรมชาติของความเข้มข้น (Drugeon et al., 1987; Galvao et al., 2016) นอกจากนี้จากรายงานของ Bonev และคณะ (2008) กล่าวว่าสมการของ Cooper และ Woodman เป็นสมการที่อธิบายการแพร่ของสารอย่างอิสระ แต่สารบางชนิด เช่น สารในกลุ่มที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายได้น้อย ไม่สามารถแพร่

ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งอย่างอิสระได้ ทำให้สูญเสียปริมาณสารไประหว่างการแพร่ จึงส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการคำนวณค่า C_{cr} ได้ จึงได้เสนอสมการที่พัฒนาจาก Cooper และ Woodman ซึ่งเป็นรูปแบบ linear diffusion model เช่นกัน แต่มีการแพร่ของสารแบบไม่เป็นอิสระ โดยจากสมการสามารถคำนวณ C_{cr} โดยใช้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความกว้างโซนยับยั้งและค่าลอการิทึมฐานธรรมชาติของความเข้มข้น

ตารางที่ 2-1 สมการของ Cooper และ Woodman, Vesterdal และ Bonev และคณะ (2008)

ชื่อสมการ	สมการ
Cooper และ Woodman	$x^2/4DT = \log(C_0) - \log C' + F$ หรือ $\ln(C') = \ln(C_0) - x^2/4DT$
Vesterdal	$r^2/4DT = \log(C_0) - \log C' + F$ หรือ $\ln(C') = \ln(C_0) - r^2/4DT$
Bonev และคณะ (2008)	$\ln(C') = \ln(C_0) - (2D)^{-1} (V \pm \sqrt{V^2 - 4D})x$

หมายเหตุ x คือ ความกว้างของโซนยับยั้ง, r คือ รัศมีของโซนยับยั้ง, D คือ สัมประสิทธิ์ของการแพร่ในอาหารเลี้ยง (มิลลิเมตรต่อชั่วโมง), T คือ critical time (ชั่วโมง), C_0 คือ ความเข้มข้นตั้งต้นหรือจุดที่มีความเข้มข้นสูงที่สุด, C' คือ ความเข้มข้นสุดท้ายหรือจุดที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุด, F คือ ตัวแปรซึ่งแทนค่าที่แตกต่างของสมการ และ V คือ สัมประสิทธิ์ลักษณะอัตราการแพร่ของสาร

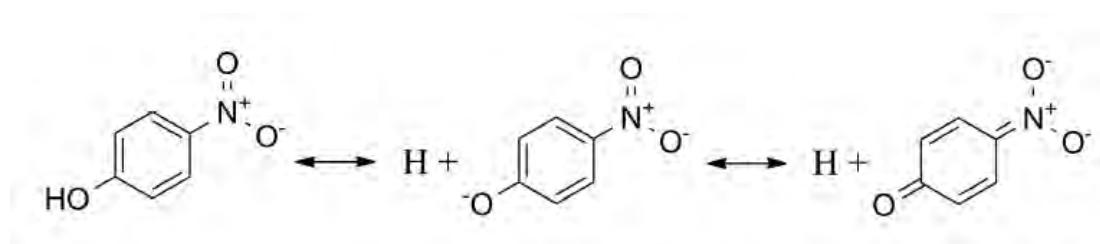


ภาพที่ 2-1 รูปแบบของโซนยับยั้งและตัวแปรที่เกี่ยวข้อง
ที่มา: Drugeon และคณะ (1987)

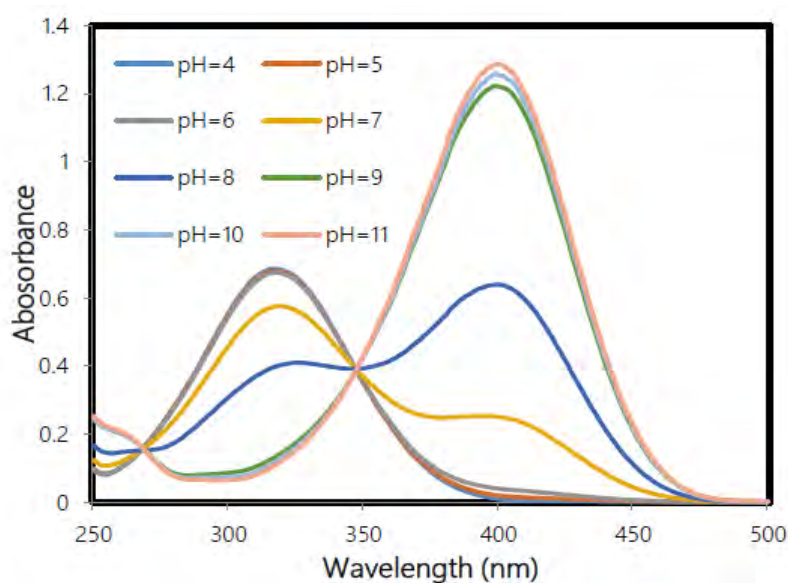
2.5. การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไลเปสด้วย colorimetric methods เป็นวิธีตรวจวัดที่สามารถสะดวก รวดเร็ว และใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อย โดยการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไลเปสสามารถใช้สารตั้งต้นของเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น *p*-nitrophenyl butyrate, *p*-nitrophenyl ester และ *p*-nitrophenyl palmitate แต่มีรายงานว่า *p*-nitrophenyl palmitate สามารถทำปฏิกิริยาได้เร็วและเหมาะกับการใช้

ทดสอบปฏิกิริยาที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ (Gomes et al., 2011) ซึ่งหากมีการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจะเกิดการทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสกับสารตั้งต้นทำให้ได้ *p*-nitrophenol ที่สามารถแตกตัวและอยู่ในรูปของ *p*-nitrophenolate ที่ให้สีเหลืองหลังจากหยุดปฏิกิริยา (ภาพที่ 2-2) จึงสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405-410 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงของ *p*-nitrophenol ได้ดีที่สุด (Pohanka, 2019) ทั้งนี้สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงของ *p*-nitrophenol โดยใช้ความยาวคลื่นประมาณ 300-450 นาโนเมตร (ภาพที่ 2-3) โดยที่ความสามารถในการวัดค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละความยาวคลื่นสามารถเปลี่ยนแปลงไปตามค่า pH ของปฏิกิริยา (Peng et al., 2016)



ภาพที่ 2-2 การเปลี่ยน *p*-nitrophenol ให้อยู่ในรูปของ *p*-nitrophenolate ใน alkaline buffer
ที่มา: Pohanka (2019)



ภาพที่ 2-3 ค่าการดูดกลืนแสงของ *p*-nitrophenol ที่ความยาวคลื่นช่วง 300-500 นาโนเมตร ของปฏิกิริยาที่มีค่า pH ต่างกัน

ที่มา: Peng และคณะ (2016)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

3.1. การเตรียมพรอพอลิส

3.1.1. การเก็บตัวอย่างพรอพอลิส

เก็บตัวอย่างพรอพอลิสจากชันโรง *Geniotrigona thoracica* ที่ศูนย์เพาะเลี้ยงชันโรง บ้านสวนภูผา ตำบลเหมืองใหม่ อำเภออัมพวา จังหวัดสมุทรสงคราม ประเทศไทย จากนั้นเก็บพรอพอลิสไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งาน

3.1.2. การเตรียมสารสกัดหยาบพรอพอลิส

ชั่งพรอพอลิสปริมาณ 150 กรัม จากนั้นตัดเป็นชิ้นขนาดเล็กและนำมาสกัดด้วย 95% เอทานอล ปริมาตร 900 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:6) นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 5,500 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และกรองแยกเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลว นำส่วนของตะกอนที่เหลืออยู่ไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง ตามวิธีข้างต้น หลังจากนั้นนำส่วนของเหลวที่สกัดได้มารวมกันและนำไปกลั่นเพื่อแยกตัวทำละลาย (95% เอทานอล) ออกจากสารสกัดโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส สังเกตลักษณะของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ได้และนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณร้อยละของผลผลิต (percentage yield) และเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งาน

ทำการเตรียม stock solution โดยละลายสารสกัดหยาบพรอพอลิสใน 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกรองผ่าน syringe membrane filter ชนิด Polyvinylidene fluoride (PVDF) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3.2. การเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองคือ modified Leeming-Notman media แบบแข็ง (modified Leeming-Notman agar, MLNA) และแบบเหลว (modified Leeming-Notman broth, MLNB) ซึ่งมี ส่วนประกอบคือ bacteriological peptone 10 กรัม, glucose 10 กรัม, yeast extract 2 กรัม, ox bile 8 กรัม, glycerol 10 มิลลิลิตร, 2-Stearoylglycerol 0.5 มิลลิกรัม, tween 60 5 มิลลิลิตร, olive oil 20 มิลลิลิตร, agar (สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง) 15 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมให้เข้ากันและทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3.2.2. การเตรียมและการเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

3.2.2.1. ชนิดของเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อที่ใช้ในการทดลองคือยีสต์ก่อโรคผิวหนัง *Malassezia globosa* (ATCC: MYA-4889) จาก American Type Culture Collection (ATCC) ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.2.2. การเตรียมเชื้อและการทำ stock culture

ขั้นตอนการเตรียมเชื้อและการทำ stock culture แสดงดังภาพที่ 3-2 โดยนำหลอด vial ที่บรรจุเชื้ออ้างอิง *M. globosa* ที่ได้จาก ATCC (reference culture) ซึ่งอยู่ในสภาพการเก็บรักษาแบบการแช่เยือกแข็งไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเปิดหลอดบรรจุเชื้อและเติมอาหารเลี้ยงแบบเหลว MLNB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดและผสมให้เข้ากัน ใช้ปิเปตต์ถ่ายเชื้ออ้างอิงในหลอด vial ทั้งหมดลงในหลอดเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MLNB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน shaking incubator ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยการทำสไลด์สด (wet mount) และการย้อมแกรม และใช้ลวดเขี่ยเชื้อและเชื้ออ้างอิงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง MLNA เพื่อแยกเชื้อเป็นโคโลนีเดี่ยวด้วยวิธี streak plate นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจสอบลักษณะโคโลนีเดี่ยวและการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ๆ จากนั้นเก็บรักษาเชื้ออ้างอิงโดยผสมเชื้อกับ glycerol ให้มีความเข้มข้นของ glycerol ร้อยละ 18 ผสมให้เข้ากันและถ่ายลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

เตรียม stock culture โดยถ่ายโคโลนีเดี่ยวด้วยเข็มเขี่ยเชื้อลงในหลอดเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MLNB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลง และนำไปบ่มใน shaking incubator ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นผสมเชื้อกับ glycerol ให้มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลร้อยละ 18 ผสมให้เข้ากันและถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

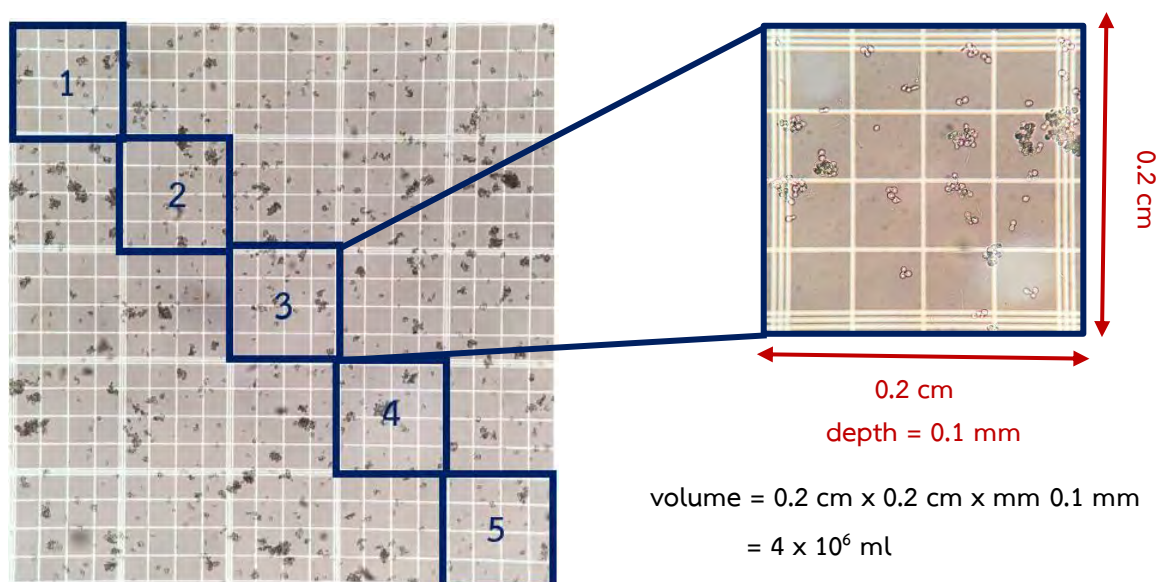
3.2.2.3. การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการทดลอง

นำ microcentrifuge tube ซึ่งเก็บเป็น stock culture จำนวน 1 หลอด มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลาย ใช้ท่วงเขี่ยเชื้อและเชื้อจาก stock culture ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง MLNA เพื่อแยกเชื้อเป็นโคโลนีเดี่ยวด้วยวิธี streak plate นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และใช้ปิเปตต์ถ่ายเชื้อจาก stock culture ที่เหลือลงในขวด flask ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MLNB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจสอบลักษณะโคโลนีเดี่ยวและลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์

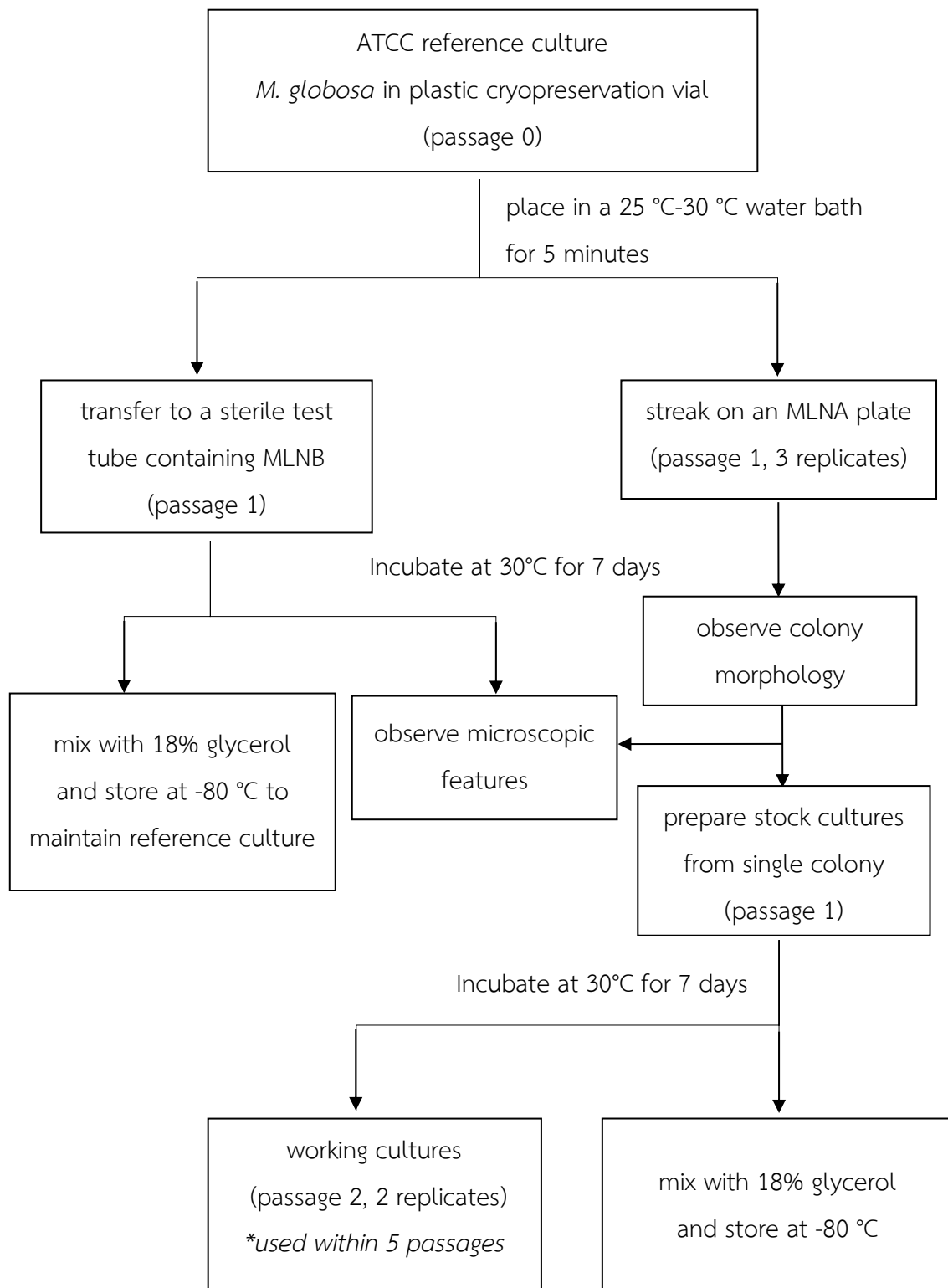
ด้วยการทำสไลด์สดและการย้อมแกรมก่อนนำเชื้อไปใช้ในการทดลอง (working culture) โดยต่อเชื้อ (subculture) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MLNB ใหม่ ทุก 7 วัน และเชื้อที่ใช้ในการทดลองมาจากการเพาะเลี้ยงไม่เกิน 5 รอบ (passage)

3.2.2.4. การเตรียมเซลล์แขวนลอย (cell suspension)

ใช้ปิเปตต์ถ่ายเชื้อ *M. globosa* ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน microcentrifuge tube และปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ 8,228 g เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ที่ได้โดยเติม phosphate buffered saline pH 7.2 (PBS) และใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลง เพื่อให้เซลล์กระจายเป็นเซลล์เดี่ยว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,228 g อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนของเหลวทิ้งแล้วเติม PBS pH 7.2 และใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, O.D.) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยใช้ PBS pH 7.2 เป็น blank จากนั้นปรับให้มีค่า O.D.₆₀₀ เท่ากับ 1 ด้วยการเติม PBS pH 7.2 และนับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemocytometer ภายใต้อ่างจุลทรรศน์เพื่อหาความหนาแน่นของเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ตั้งต้นที่ใช้ในการทดลอง โดยการนับเซลล์โดยใช้ hemocytometer จะนับในช่อง 1-5 ซึ่งมีปริมาตรเท่ากับ 4×10^{-6} มิลลิลิตรต่อหนึ่งช่อง (ภาพที่ 3-1)



ภาพที่ 3-1 รูปแบบการนับเซลล์และปริมาตรของ hemocytometer



ภาพที่ 3-2 แผนผังขั้นตอนการเตรียมเชื้อและการทำ stock culture เพื่อใช้ในการทดลอง

3.3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบพรอพอลิสต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. globosa*

หาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. globosa* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยนำเซลล์แขวนลอย *M. globosa* ที่ปรับได้ค่า O.D.₆₀₀ เท่ากับ 1 (ความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) มาเกลี่ย (swab) ให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MLNA ซึ่งมีความหนา 5 มิลลิเมตร ด้วยไม้พ่นสำลีที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นเจาะหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร และเติมสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 10-1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้ซีโตโคนาโซลที่ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control) และใช้ 100%DMSO เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control) ตรวจสอบผลการทดลองทุกวันและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (Inhibition zone) ในหน่วยมิลลิเมตร เมื่อครบ 7 วัน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression analysis) โดยใช้ข้อมูลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งและความเข้มข้น และประเมินค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของพรอพอลิสจากค่า C_{cr} ด้วย linear diffusion model โดยวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นด้วยความสัมพันธ์จากสมการของ Cooper และ Woodman และสมการของ Bonev และคณะ (2008) และ radial diffusion model จากสมการของ Vesterdal

วิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นด้วยความสัมพันธ์จากสมการของ Cooper และ Woodman ทำได้โดยสร้างกราฟเส้นตรงที่มีแกน X เป็นค่าลอการิทึมฐานธรรมชาติของความเข้มข้นและแกน Y เป็นความกว้างโซนยับยั้งยกกำลังสอง (x^2), สมการของ Bonev และคณะ (2008) ทำได้โดยสร้างกราฟเส้นตรงที่มีแกน X เป็นค่าลอการิทึมฐานธรรมชาติของความเข้มข้นและแกน Y เป็นความกว้างโซนยับยั้ง (x), สมการของ Vesterdal ทำได้โดยสร้างกราฟเส้นตรงที่มีแกน X เป็นค่าลอการิทึมฐานธรรมชาติของความเข้มข้นและแกน Y เป็นรัศมีโซนยับยั้งยกกำลังสอง (r^2) โดยค่า C_{cr} ของสมการทั้งสามสามารถหาได้จากแอนติลอการิทึมของค่าจุดตัดแกน X

3.4. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบพรอพอลิสต่อการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของ *M. globosa*

ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของ *M. globosa* ด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจาก Sivasankar et al. (2017) โดยเตรียม cell free culture supernatant (CFCS) ซึ่งเป็นส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ โดยใช้ปิเปตต์ถ่ายเชื้อ *M. globosa* ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน microcentrifuge tube และปั่นเหวี่ยงที่ 8,228 g เป็นเวลา 10 นาที ใช้ปิเปตต์ดูดเฉพาะส่วนของเหลว และนำไปกรองผ่าน syringe membrane filter ชนิด cellulose acetate ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำของเหลวที่กรองได้หรือ CFCS ไปผสมกับสารละลายผสมของสารตั้งต้น (substrate mixture) ซึ่งใช้ *p*-nitrophenylpalmitate (*p*NPP) เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ [ประกอบด้วย 0.3% (w/v) *p*NPP ใน propanol, 0.2% (w/v) sodium desoxycholate และ 0.1% (w/v) gummi arabicum ใน 50 mM

sodium phosphate buffer (pH 8.0)] ในอัตราส่วน 1:9 ซึ่งจะได้เป็นสารละลายผสมในการทำปฏิกิริยา (reaction mixture) โดยทำการทดลองใน 24 well plate ใช้ปริมาตรต่อหลุมสุทธิ 1 มิลลิลิตร ซึ่งมีชุดการทดลองหลักดังนี้

ชุดทดลองที่ 1 ชุดทดสอบจำนวน 3 ชุดหลัก ซึ่งเติมสารละลายผสมในการทำปฏิกิริยาและสารสกัดหยาบพรอพอลิสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (X) ที่ 0.5X, 1X และ 2X มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชุดทดลองที่ 2 blank ของแต่ละชุดทดสอบจำนวน 3 ชุดหลัก คือสารละลายผสมในการทำปฏิกิริยาและสารสกัดหยาบพรอพอลิสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายครอบคลุมความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (X) ที่ 0.5X, 1X และ 2X มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารละลายผสมในการทำปฏิกิริยาจะประกอบด้วย CFCS ที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวไม่เติมเชื้อ *M. globosa* ที่บ่มเป็นเวลา 7 วัน ผสมกับสารละลายผสมของสารตั้งต้น

ชุดทดลองที่ 3 blank คือน้ำกลั่นผสมกับสารละลายผสมในการทำปฏิกิริยาที่อัตราส่วน 1:9

ชุดทดลองที่ 4 ชุดควบคุม คือสารละลายผสมในการทำปฏิกิริยา

ชุดทดลองที่ 5 ชุดควบคุมที่ให้ผลลบ คือน้ำกลั่นผสมกับสารละลายผสมของสารตั้งต้นที่อัตราส่วน 1:9 หลังจากนั้นนำ 24 well plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงใช้ปิเปตต์ดูดสารในแต่ละชุดการทดลอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน microcentrifuge tube และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,294 g เป็นเวลา 5 นาที ใช้ปิเปตต์ดูดเฉพาะส่วนของเหลวของแต่ละชุดการทดลอง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate จากนั้นเติม 1 M sodium carbonate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 405-450 นาโนเมตร

3.5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งชุดการทดลอง จากนั้นวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ความแปรปรวนของข้อมูล การถดถอยเชิงเส้น และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย One-Way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS version 22 และ Microsoft Excel 2016

บทที่ 4 ผลการศึกษา

ผลการศึกษาแบ่งออกเป็น 5 หัวข้อหลัก ดังนี้

ส่วนที่ 4.1 ผลการสกัดสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica*

ส่วนที่ 4.2 ลักษณะโคโลนี สัมฐานวิทยาเบื้องต้น และ ความหนาแน่นของเซลล์ *M. globosa* ตั้งต้นภายใต้สภาวะที่ใช้ทำการทดลอง

ส่วนที่ 4.3 ผลการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. globosa*

ส่วนที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์เพื่อประเมินความเข้มข้นของสารสกัดพรอพอลิสที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเติบโตของ *M. globosa*

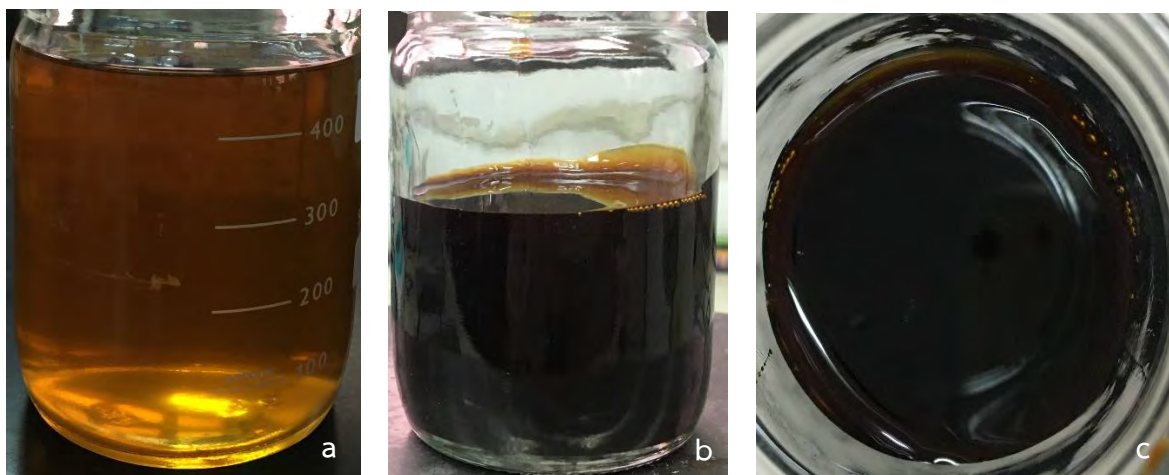
ส่วนที่ 4.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของ *M. globosa*

4.1. ผลการสกัดสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica*

พรอพอลิสที่เก็บจากชันโรง *G. Thoracica* จากแหล่งเก็บตัวอย่างมีลักษณะเป็นของแข็งสีดำเข้ม (ภาพที่ 4-1) เมื่อนำมาสกัดด้วย 95% เอทานอล บั่นเหวี่ยง และกรองแยกตะกอนจะได้สารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวใสและมีสีเหลืองเข้ม (ภาพที่ 4-2 a) และเมื่อระเหยตัวทำละลายที่ใช้สกัดออกพบว่าสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ได้มีลักษณะข้นเหนียว เป็นเนื้อเดียวกัน และมีสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 4-2 b-c) มีร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 40.23 (ตารางที่ 4-1)



ภาพที่ 4-1 พรอพอลิสบริเวณปากทางเข้ารัง (a) และลักษณะปากทางเข้ารังของชันโรง *G. thoracica* (b)



ภาพที่ 4-2 ลักษณะสารสกัดที่ได้หลังการกรองตะกอน (a) และลักษณะสารสกัดหยาบพรอพอลิส (b-c)

ตารางที่ 4-1 น้ำหนักของพรอพอลิสตั้งต้น น้ำหนักสารสกัดหยาบพรอพอลิส และร้อยละของผลผลิตของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica*

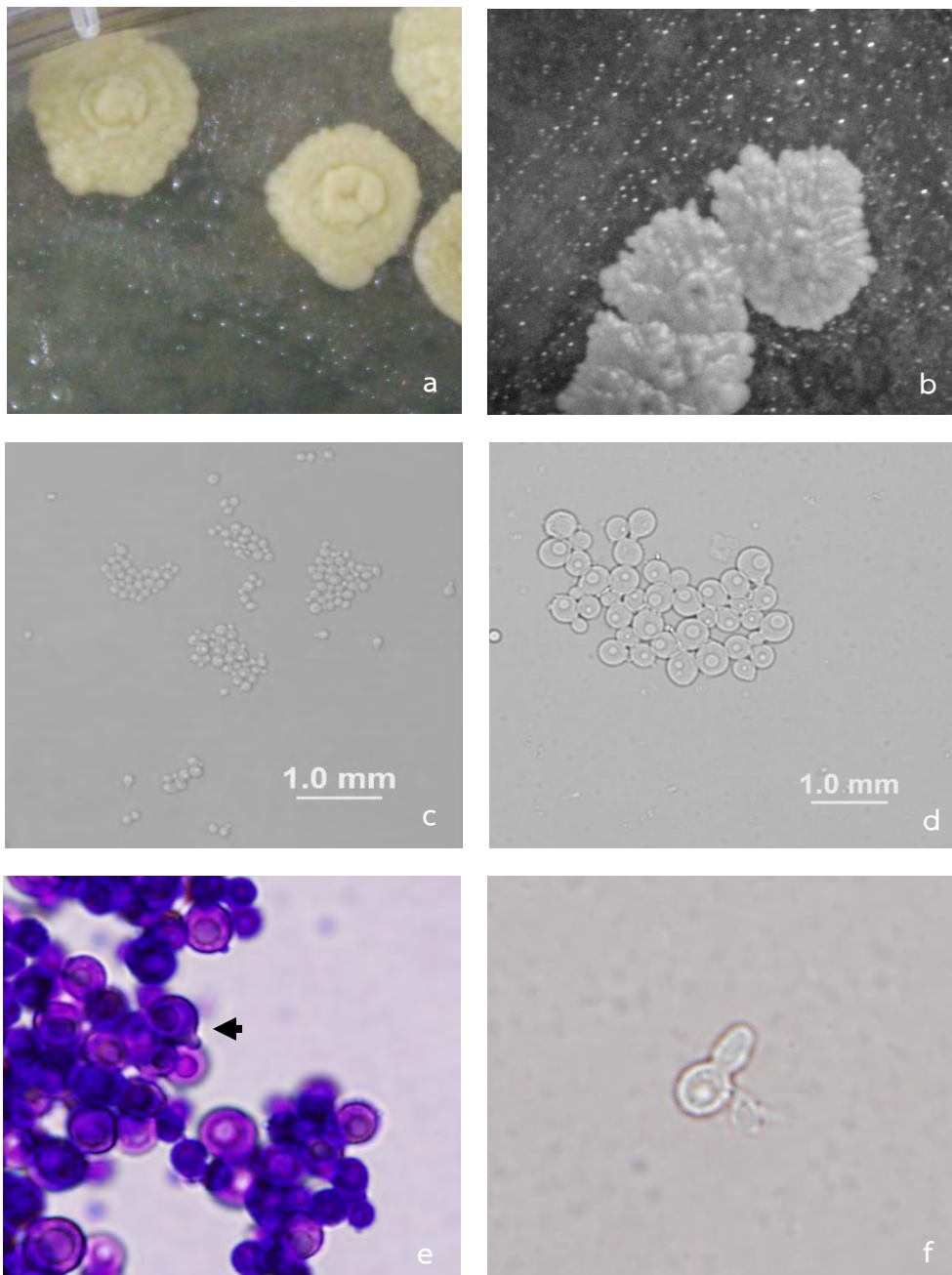
น้ำหนักพรอพอลิสตั้งต้นที่ใช้สกัด (กรัม)	150.00
น้ำหนักสารสกัดหยาบพรอพอลิส (กรัม)	60.35
ร้อยละของผลผลิต (%)	40.23

4.2. ลักษณะโคโลนี สัณฐานวิทยาเบื้องต้น และ ความหนาแน่นของเซลล์ *M. globosa* ตั้งต้นภายใต้สภาวะที่ใช้ทำการทดลอง

4.2.1. ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เริ่มสังเกตเห็นโคโลนีของ *M. globosa* บนอาหารเลี้ยงแบบแข็ง MLNA หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ซึ่งโคโลนีเดี่ยวมีขนาดเล็ก กลมมน และมีสีขาวครีม และเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าโคโลนีเดี่ยวมีลักษณะหนา ยกนูน และแผ่ออก ผิวหน้าขรุขระ มีรอยหยักแบบ cerebriform ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นคลื่นเว้าแบบ lobate มีสีขาวครีมและขุ่น (ภาพที่ 4-3 a-b)

เมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของ *M. globosa* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าเซลล์มีลักษณะเป็นทรงกลมแบบสมมาตร (spherical) เซลล์มักจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ไม่กระจายเป็นเซลล์เดี่ยว แยกหน่อที่ปลายด้านเดียว โดยตำแหน่งที่แตกหน่อมีปลายฐานแคบและแตกหน่อเป็นทรงกระบอกยาว (ภาพที่ 4-3 c-f)



ภาพที่ 4-3 ลักษณะโคโลนีเดี่ยวสีขาวครีมและชุ่น (a), รอยหยักบนผิวหน้าแบบ cerebriform และขอบแบบ lobate ของโคโลนี *M. globosa* หลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 14 วัน (b), ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น หลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน ซึ่งพบเซลล์ *M. globosa* ที่มีกัอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (กำลังขยาย 40x) (c), เซลล์ *M. globosa* มีลักษณะเป็นทรงกลมแบบสมมาตร (กำลังขยาย 100x) (d), ลักษณะเซลล์ *M. globosa* ย้อมแกรม (กำลังขยาย 100x) โดยลูกศรแสดงตำแหน่งที่กำลังแตกหน่อ (e) และลักษณะการแตกหน่อที่ปลายด้านเดียว มีฐานแคบ และแตกหน่อเป็นทรงกระบอกยาว (กำลังขยาย 100x) (f)

4.2.2. ผลการคำนวณความหนาแน่นของเซลล์ตั้งต้น

จากการคำนวณความหนาแน่นของเซลล์ที่ค่า O.D.₆₀₀ เท่ากับ 1 หลังบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 3.49×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4-2)

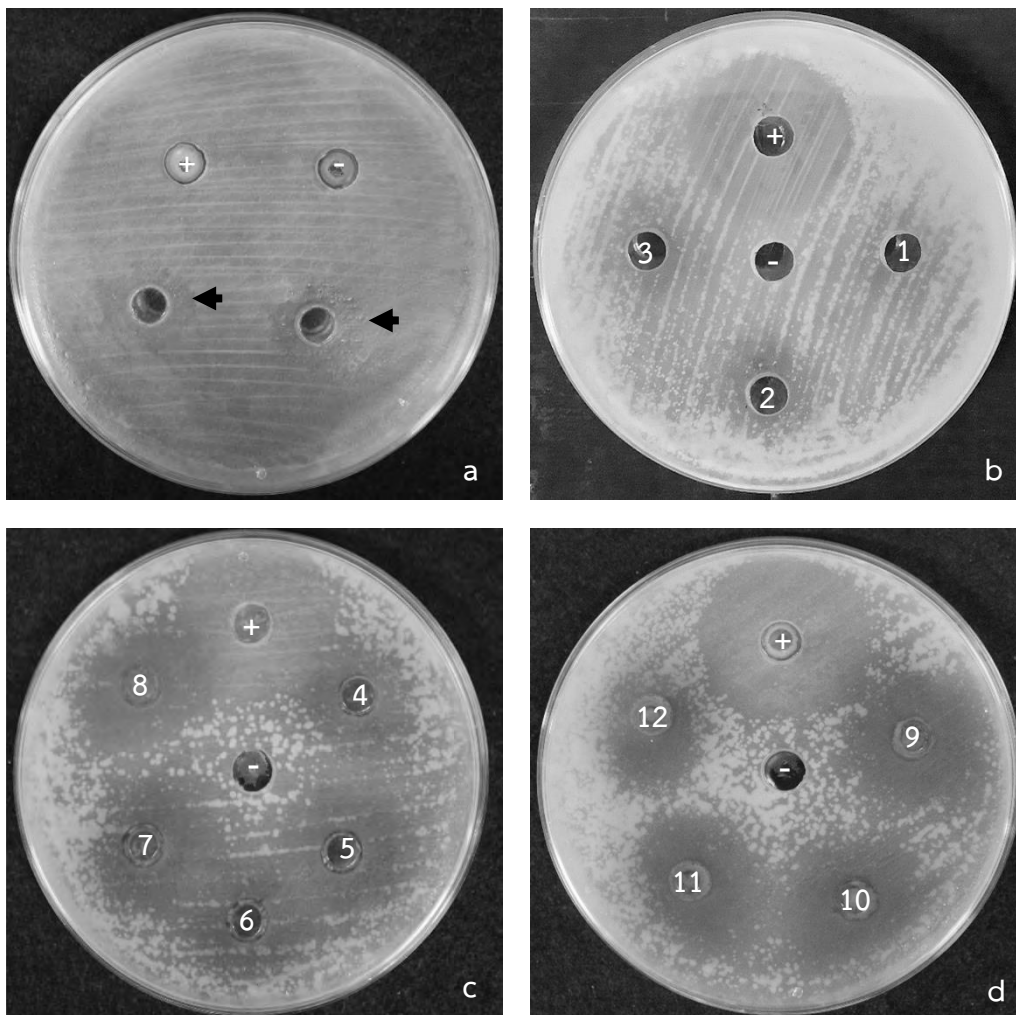
ตารางที่ 4-2 ผลการนับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer และผลการคำนวณความหนาแน่นของเซลล์ที่ค่า O.D.₆₀₀ เท่ากับ 1 หลังจากบ่มเป็นเวลา 7 วัน

ช่องที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1	169	140	132
2	155	161	128
3	224	148	141
4	161	125	95
5	149	90	110
ค่าเฉลี่ยต่อช่อง	151.60	132.80	135.20
ค่าเฉลี่ยรวม	139.87 เซลล์		
ปริมาตรต่อช่อง	4×10^{-6} มิลลิลิตร		
คำนวณความหนาแน่นของเซลล์	3.49×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร		

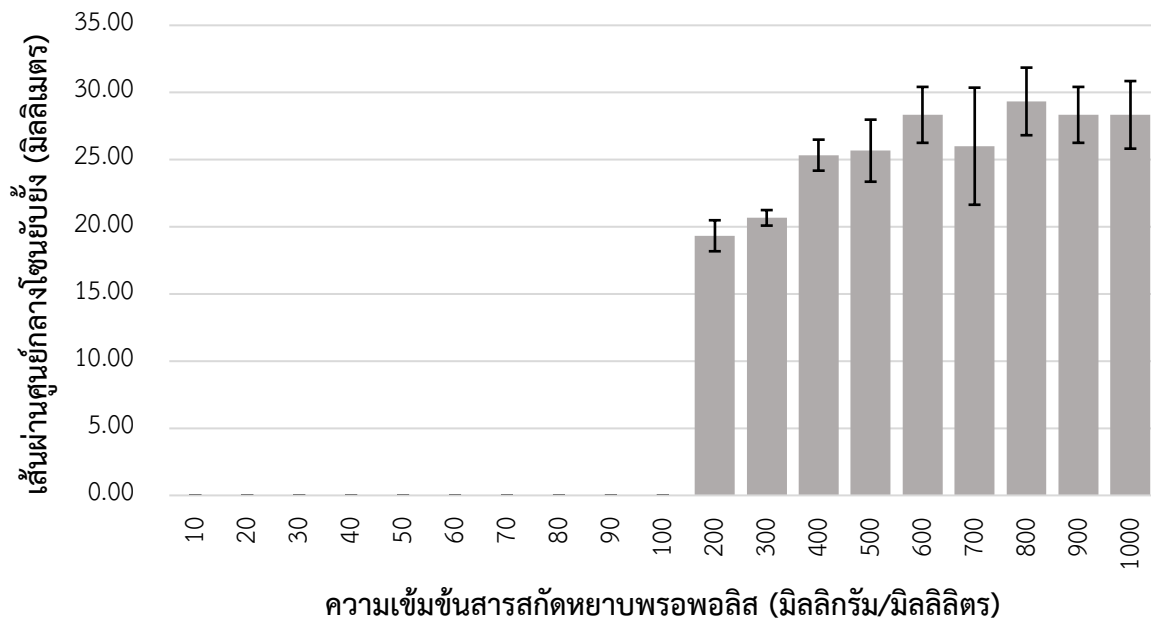
4.3. ผลการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. globosa*

จากการทดสอบความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. globosa* โดยใช้สารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 10-1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าหลังการบ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง เริ่มเกิดบริเวณใสหรือโซนยับยั้งของสารสกัดหยาบพรอพอลิสตั้งแต่ความเข้มข้น 200-1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างจาก KTZ ซึ่งจะเกิดโซนยับยั้งหลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 5-7 วัน (ภาพที่ 4-4 a) เมื่อวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งหลังบ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน (ภาพที่ 4-4 c-d) พบว่าที่ความเข้มข้น 200-1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยรวมของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ 25.70 ± 3.91 มิลลิเมตร โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 29.33 ± 2.52 ที่ความเข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ความเข้มข้นแรกที่เกิดโซนยับยั้งคือ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ 19.33 ± 1.15 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4-5 และ ภาคผนวกที่ 1) และจากการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลาง

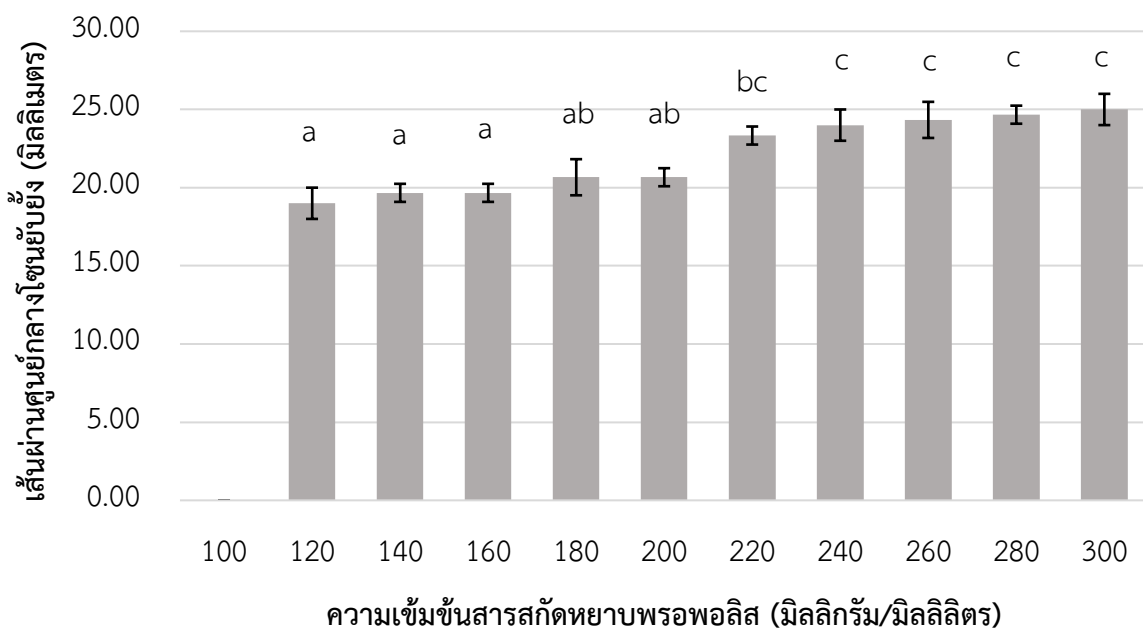
โซนยับยั้งและความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ 200-1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าข้อมูลที่ได้มีความสัมพันธ์กัน 86.9% โดยเมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นจะทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ภาคผนวกที่ 2)



ภาพที่ 4-4 ผลการทดสอบ agar well diffusion assay ซึ่งตำแหน่งลูกศรสีดำคือตัวอย่างโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นหลังการบ่ม 48 ชั่วโมง (a), โซนยับยั้งที่เกิดจากความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสเท่ากับ (1) 100, (2) 120 และ (3) 140 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (b), โซนยับยั้งที่เกิดจากความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสเท่ากับ (4) 200, (5) 300, (6) 400, (7) 500 และ (8) 600 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (c) และโซนยับยั้งที่เกิดจากความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสเท่ากับ (9) 700, (10) 800, (11) 900 และ (12) 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (d) โดยเครื่องหมายลบคือชุดควบคุมที่ให้ผลลบ (%100DMSO) และเครื่องหมายบวกคือชุดควบคุมที่ให้ผลบวก (KTZ)



ภาพที่ 4-5 ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางไขนัยยั้งของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ที่ความเข้มข้น 10-1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดย error bar คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 4-6 ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางไขนัยยั้งของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ที่ความเข้มข้น 100-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดย error bar คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าเฉลี่ยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

เนื่องด้วยความเข้มข้นแรกที่เกิดโซนยับยั้งคือ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเพิ่มเติม โดยทดสอบสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ความเข้มข้นระหว่าง 100-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าความเข้มข้นแรกที่เกิดโซนยับยั้งคือ 120 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4-4 b) ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ 19.00 ± 1.00 มิลลิเมตร (ภาคผนวกที่ 3) และจากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งพบว่า จากการทดสอบ One-Way ANOVA โดยมีสมมุติฐานการทดสอบคือ H_0 : ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของกลุ่มตัวอย่างทุกกลุ่มมีค่าเท่ากัน และ H_1 : ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของกลุ่มตัวอย่างอย่างน้อย 2 กลุ่มมีค่าไม่เท่ากัน ซึ่งจากตาราง One-Way ANOVA มีค่า Sig. เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธ H_0 แล้วยอมรับ H_1 กล่าวคือ ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (ภาคผนวกที่ 4) และจากการทดสอบความเท่ากันของค่าความแปรปรวน (Test of Homogeneity of Variances) ด้วย Levene's Test โดยมีสมมุติฐานการทดสอบคือ H_0 : ค่าความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของกลุ่มตัวอย่างทุกกลุ่มมีค่าเท่ากัน และ H_1 : ค่าความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของกลุ่มตัวอย่างอย่างน้อย 2 กลุ่มมีค่าไม่เท่ากัน ซึ่งจากตาราง Levene's Test มีค่า Sig. เท่ากับ 0.720 ซึ่งมากกว่า 0.05 จึงไม่ปฏิเสธ H_0 กล่าวคือ ค่าความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งไม่แตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (ภาคผนวกที่ 5) จึงเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลของแต่ละชุดการทดลองด้วย Tamhane's T2 test พบว่า เส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งที่ความเข้มข้น 120-180 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าไม่แตกต่างจากเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าเท่ากับ 20.67 ± 0.58 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4-6 ภาคผนวกที่ 6 และ 7)

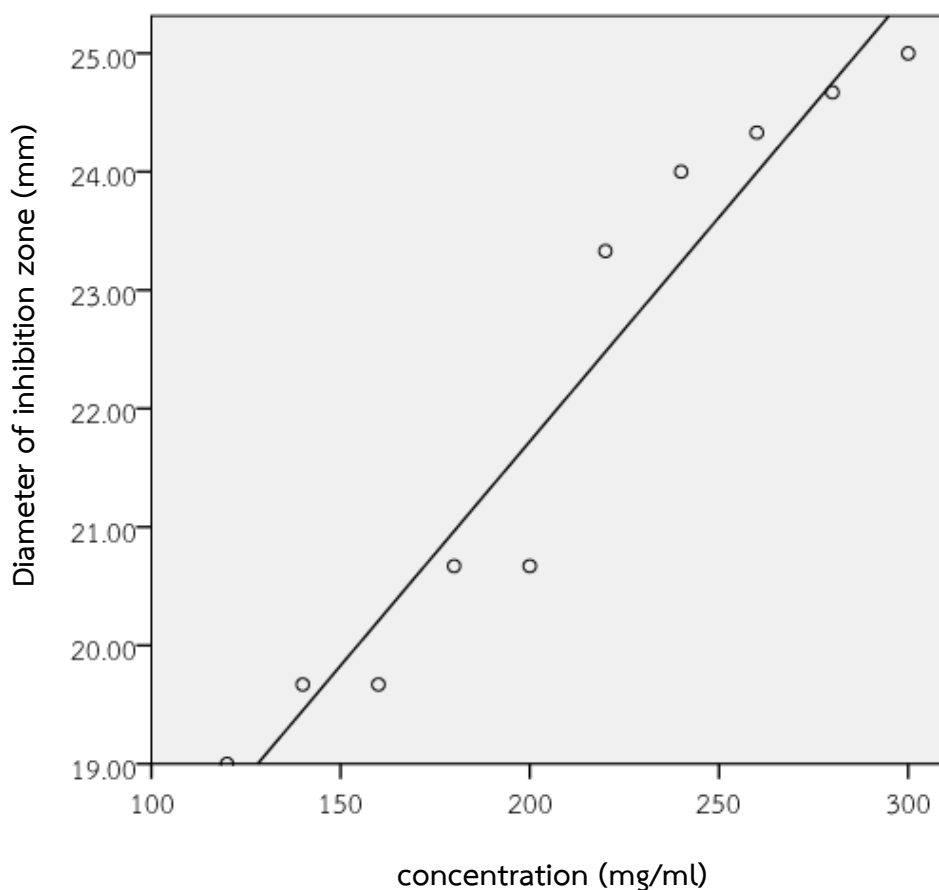
4.4. ผลการวิเคราะห์เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดพรอพอลิสที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ

M. globosa

จากการหาความเข้มข้นของสารสกัดพรอพอลิสที่ต่ำที่สุดโดยนำข้อมูลค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 100-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression analysis) ซึ่งมีสมมุติฐานสำหรับการวิเคราะห์ถดถอยเชิงเส้นตรงคือ H_0 : ค่าความชันของ regression line ที่ดีที่สุดไม่ต่างจาก 0 และ H_1 : ค่าความชันของ regression line ที่ดีที่สุดต่างจาก 0 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของข้อมูลและเพื่อคำนวณค่า critical concentration ตาม linear diffusion model จากสมการของ Cooper and Woodman และสมการของ Bonev et al. (2008) และ radial diffusion model จากสมการของ Vesterdal สำหรับประเมินความเข้มข้นของสารสกัดพรอพอลิสที่ต่ำที่สุด ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

4.4.1. ผลการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรง

วิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงโดยใช้ตัวแปร 2 ตัวแปร ได้แก่ ตัวแปรอิสระ (X) และ ตัวแปรตาม (Y) คือ ความเข้มข้นสารสกัดหยาบพรอพอลิส 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (concentration) และ เส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (diameter of inhibition zone) ตามลำดับ และมีรูปแบบสมการเป็น $Y = a + bX$ เมื่อ a คือ ค่าจุดตัดแกน Y และ b คือ สัมประสิทธิ์ของตัวแปรอิสระ



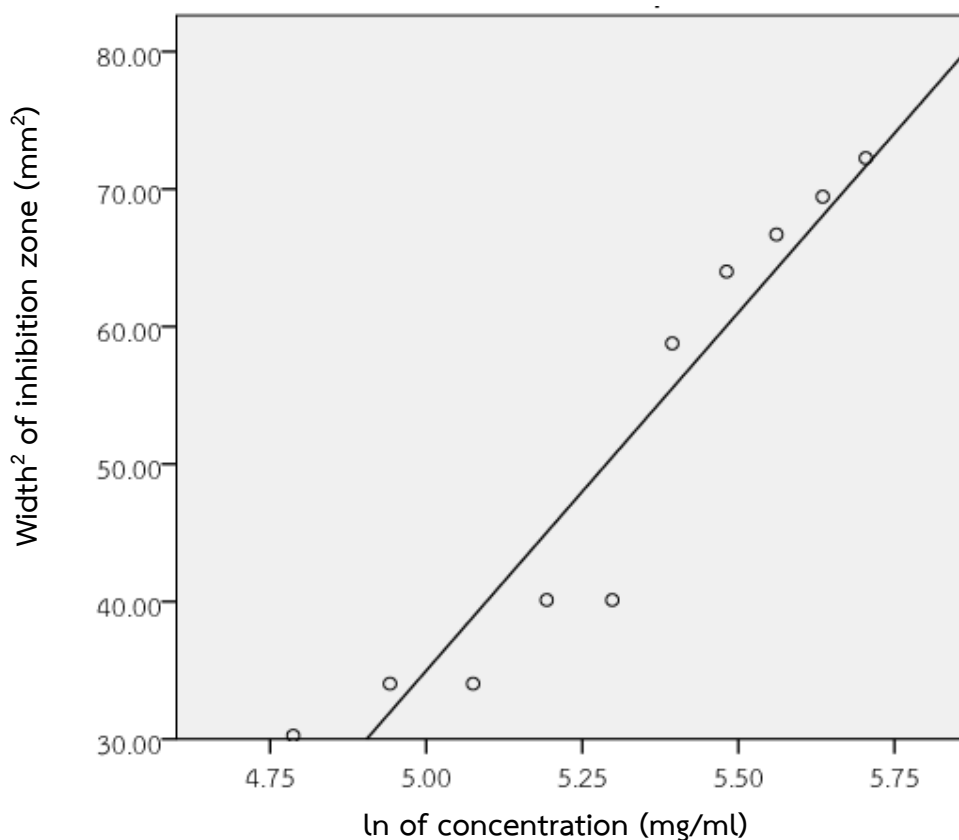
ภาพที่ 4-7 Regression line จากความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสารสกัดหยาบพรอพอลิส 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (concentration) และเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (diameter of inhibition zone)

จากตาราง model summary พบว่า regression line ที่สร้างขึ้นมีค่า R^2 หรือ coefficient of determination เท่ากับ 0.935 โดยตัวแปรความเข้มข้นสารสกัดหยาบพรอพอลิสและเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งมีค่า goodness of fit หรือความพอดีของสมการถดถอยเชิงเส้นตรงเท่ากับ 93.5% และจากตาราง ANOVA พบว่ามีค่า Sig. เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธ H_0 แล้วยอมรับ H_1 กล่าวคือ ตัวแปรทั้ง 2 ตัวแปรมีความสัมพันธ์กันเชิงเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% โดยมีสมการถดถอยเชิงเส้นตรง คือ $Y = 0.038X + 14.150$ (ภาพที่ 4-7 และ ภาคผนวกที่ 9)

4.4.2. ผลการคำนวณค่า critical concentration (C_c)

4.4.2.1. ผลการวิเคราะห์โดยใช้ความสัมพันธ์จากสมการของ Cooper และ Woodman

วิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงโดยใช้ตัวแปร 2 ตัวแปร ได้แก่ ตัวแปรอิสระ (X) และตัวแปรตาม (Y) คือ ลอการิทึมธรรมชาติของความเข้มข้นของสารสกัดหยาดพรอพอลิสที่ 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความกว้างของโซนยับยั้งยกกำลังสอง ตามลำดับ (ภาคผนวกที่ 10) และมีรูปแบบสมการเป็น $Y = a + bX$ เมื่อ a คือ ค่าจุดตัดแกน Y และ b คือ สัมประสิทธิ์ของตัวแปรอิสระ



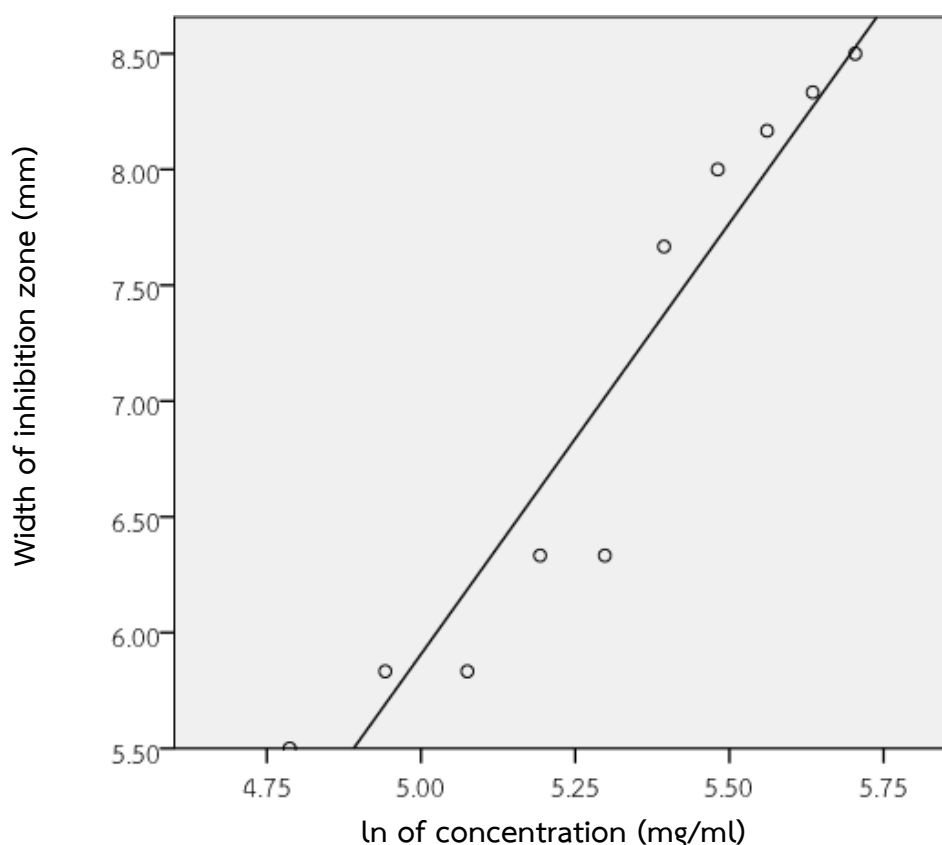
ภาพที่ 4-8 Regression line จากความสัมพันธ์ของลอการิทึมธรรมชาติของความเข้มข้นของสารสกัดหยาดพรอพอลิสที่ 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ln of concentration) และ ความกว้างของโซนยับยั้งยกกำลังสอง (width² of inhibition zone)

จากตาราง model summary พบว่า regression line ที่สร้างขึ้นมีค่า R^2 หรือ coefficient of determination เท่ากับ 0.906 โดยตัวแปรความเข้มข้นสารสกัดหยาดพรอพอลิสและความกว้างของโซนยับยั้งยกกำลังสองมีค่า goodness of fit เท่ากับ 90.6% และจากตาราง ANOVA พบว่ามีค่า Sig. เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธ H_0 แล้วยอมรับ H_1 กล่าวคือ ตัวแปรทั้ง 2 ตัวแปรมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% โดยมีสมการถดถอยเชิงเส้นตรง คือ $Y = 52.110X - 225.579$

(ภาพที่ 4-8 และ ภาคผนวกที่ 11) โดยจากสมการได้ค่าจุดตัดแกน X คือ 4.329 จึงสามารถหาค่า C_{cr} ได้จากการแอนติลอการิทึมของค่าจุดตัดแกน X ได้เท่ากับ 75.87 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.4.2.2. ผลการวิเคราะห์โดยใช้ความสัมพันธ์จากสมการของ Bonev et al. (2008)

วิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงโดยใช้ตัวแปร 2 ตัวแปร ได้แก่ ตัวแปรอิสระ (X) และตัวแปรตาม (Y) คือ ลอการิทึมธรรมชาติของความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ ความกว้างของโซนยับยั้ง ตามลำดับ (ภาคผนวกที่ 10) และมีรูปแบบสมการเป็น $Y = a + bX$ เมื่อ a คือ ค่าจุดตัดแกน Y และ b คือ สัมประสิทธิ์ของตัวแปรอิสระ



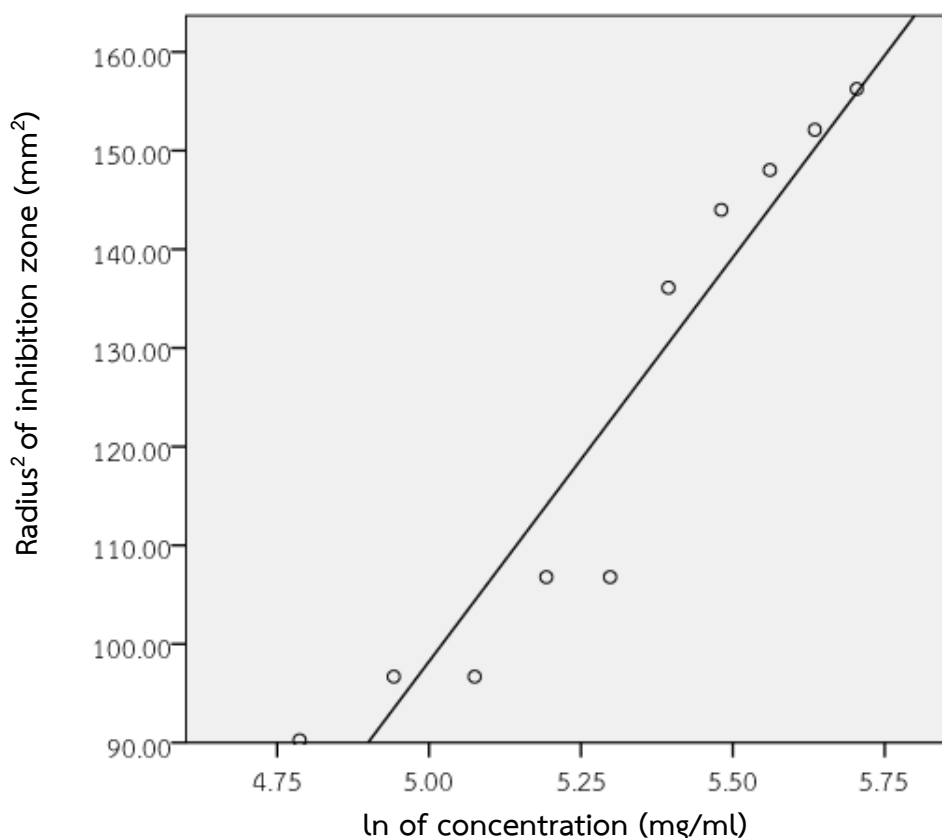
ภาพที่ 4-9 Regression line จากความสัมพันธ์ของลอการิทึมธรรมชาติของความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ln of concentration) และ ความกว้างของโซนยับยั้ง (width of inhibition zone)

จากตาราง model summary พบว่า regression line ที่สร้างขึ้นมีค่า R^2 หรือ coefficient of determination เท่ากับ 0.917 โดยตัวแปรความเข้มข้นสารสกัดหยาบพรอพอลิสและรัศมีโซนยับยั้งมีค่า goodness of fit เท่ากับ 91.7% และจากตาราง ANOVA พบว่ามีค่า Sig. เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05

จึงปฏิเสธ H_0 แล้วยอมรับ H_1 กล่าวคือ ตัวแปรทั้ง 2 ตัวแปรมีความสัมพันธ์กันเชิงเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% โดยมีสมการถดถอยเชิงเส้นตรง คือ $Y = 3.723X - 12.706$ (ภาพที่ 4-9 และภาคผนวกที่ 12) โดยจากสมการได้ค่าจุดตัดแกน X คือ 3.413 จึงสามารถหาค่า C_{cr} ได้จากการแอนติลอการิทึมของค่าจุดตัดแกน X ได้เท่ากับ 30.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.4.2.3. ผลการวิเคราะห์โดยใช้ความสัมพันธ์จากสมการของ Vesterdal

วิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงโดยใช้ตัวแปร 2 ตัวแปร ได้แก่ ตัวแปรอิสระ (X) และตัวแปรตาม (Y) คือ ลอการิทึมธรรมชาติของความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และรัศมีจากจุดศูนย์กลางของโซนยับยั้งยกกำลังสอง (ภาคผนวกที่ 10) ตามลำดับ และมีรูปแบบสมการเป็น $Y = a + bX$ เมื่อ a คือ ค่าจุดตัดแกน Y และ b คือ สัมประสิทธิ์ของตัวแปรอิสระ



ภาพที่ 4-10 Regression line จากความสัมพันธ์ของลอการิทึมธรรมชาติของความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ln of concentration) และ รัศมีจากจุดศูนย์กลางของโซนยับยั้งยกกำลังสอง (radius² of inhibition zone)

จากตาราง model summary พบว่า regression line ที่สร้างขึ้นมีค่า R^2 หรือ coefficient of determination เท่ากับ 0.910 โดยตัวแปรความเข้มข้นสารสกัดหยาบพรอพอลิสและรัศมีจากจุดศูนย์กลางของโชนัยยังมีค่า goodness of fit เท่ากับ 91.0% และจากตาราง ANOVA พบว่ามีค่า Sig. เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธ H_0 แล้วยอมรับ H_1 กล่าวคือ ตัวแปรทั้ง 2 ตัวแปรมีความสัมพันธ์กันเชิงเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% โดยมีสมการถดถอยเชิงเส้นตรง คือ $Y = 81.893X - 311.236$ (ภาพที่ 4-10 และ ภาคผนวกที่ 13) โดยจากสมการได้ค่าจุดตัดแกน X คือ 3.801 จึงสามารถหาค่า C_{cr} ได้จากการแอนติลอกการี่ทิมของค่าจุดตัดแกน X ได้เท่ากับ 44.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

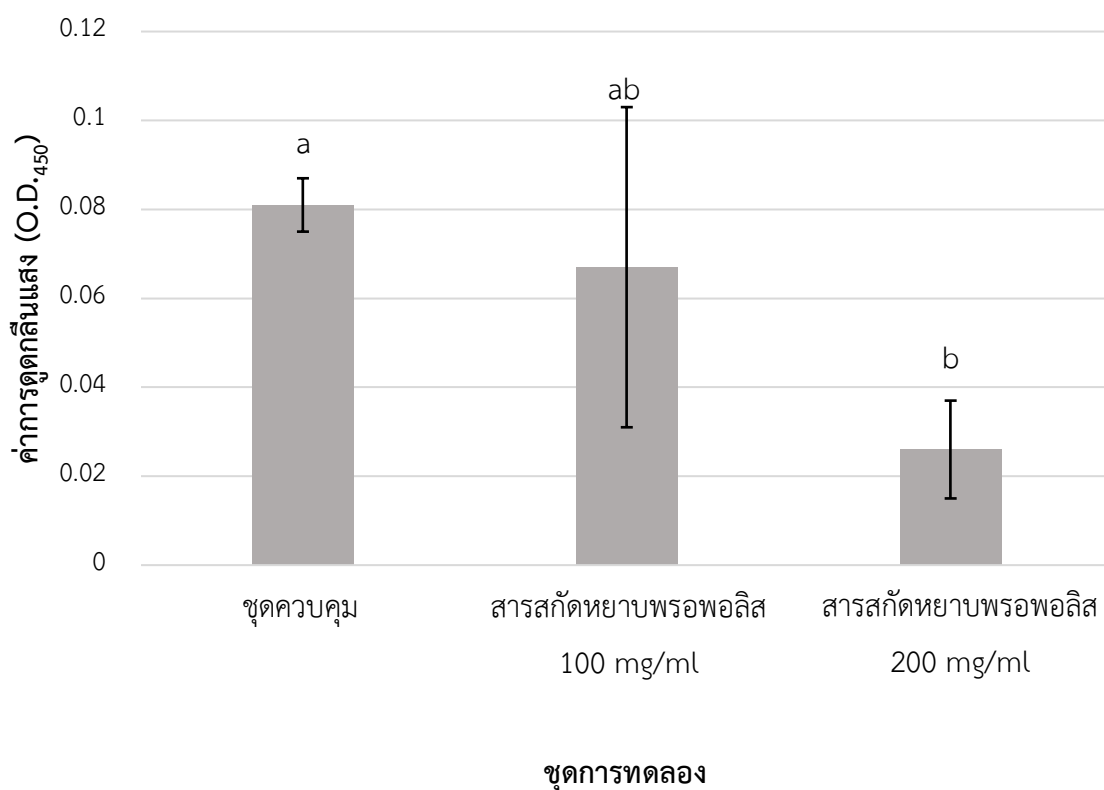
จากการวิเคราะห์ C_{cr} จากทั้งสามสมการ พบว่าค่า C_{cr} ที่ได้จาก linear diffusion model จากสมการของ Bonev และคณะ (2008) มีค่าเท่ากับ 30.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่า C_{cr} จากสมการของ Cooper และ Woodman มีค่าเท่ากับ 75.87 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเส้นตรงสมการของ Bonev และคณะ (2008) มีค่า goodness of fit เท่ากับ 91.7% ซึ่งมากกว่าเส้นตรงจากสมการของ Cooper และ Woodman ซึ่งมีค่าเท่ากับ 90.6% และจากการวิเคราะห์ค่า C_{cr} ด้วย radial diffusion model พบว่ามีค่าเท่ากับ 44.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า goodness of fit เท่ากับ 91.0%

4.5. ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของ *M. globosa*

จากการทดสอบผลของสารสกัดหยาบพรอพอลิสต่อการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของ *M. globosa* โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (O.D.₄₅₀) ของชุดควบคุมและชุดทดลองที่เติมสารสกัดหยาบพรอพอลิสความเข้มข้น 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าชุดทดลองที่เติมสารสกัดหยาบพรอพอลิสความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.058 ± 0.036 และ 0.026 ± 0.011 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.081 ± 0.006 (ภาพที่ 4-11 และ ตารางที่ 4-3) ทั้งนี้ชุดทดลองที่เติมสารสกัดหยาบพรอพอลิสความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงติดลบเนื่องจากมีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงน้อยกว่า blank ของชุดการทดลอง ดังนั้นจึงไม่นำมาข้อมูลของชุดการทดลองดังกล่าวมาวิเคราะห์ผล (ภาคผนวกที่ 14)

จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงโดยมีสมมุติฐานคือ H_0 : ค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของกลุ่มตัวอย่างทุกกลุ่มมีค่าเท่ากัน และ H_1 : ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของกลุ่มตัวอย่างอย่างน้อย 2 กลุ่มมีค่าไม่เท่ากัน โดยจากตาราง One-Way ANOVA และ Levene's Test พบว่าค่า Sig. เท่ากับ 0.040 และ 0.013 ตามลำดับ (ภาคผนวกที่ 16-17) ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธ H_0 แล้วยอมรับ H_1 กล่าวคือ ค่าเฉลี่ยและค่าความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้มีความแตกต่างกัน จึงเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลของแต่ละชุดการทดลองด้วย Tamhane's T2 test พบว่าค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดลองที่ให้ผลลบและชุดทดลองที่เติมสาร

สกัดหยาบพรอพอลิสความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงในชุดทดลองที่เติมสารสกัดหยาบพรอพอลิสความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ภาพที่ 4-11 และภาคผนวกที่ 18 และ 19) โดยสารสกัดหยาบพรอพอลิสความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของ *M. globosa* เท่ากับ 18.40% และ 68.31% ตามลำดับ (ตารางที่ 4-3)



ภาพที่ 4-11 ค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดย error bar คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าเฉลี่ยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4-3 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ที่หักลบด้วย blank และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชุดการทดลอง	ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของค่าดูดกลืนแสง	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เอนไซม์ไลเปส (%)
ชุดควบคุม	0.081 ± 0.006	-
สารสกัดหยาบพรอพอลิส ความเข้มข้น 100 mg/ml	0.058 ± 0.036	18.40
สารสกัดหยาบพรอพอลิส ความเข้มข้น 200 mg/ml	0.026 ± 0.011	68.31
สารสกัดหยาบพรอพอลิส ความเข้มข้น 400 mg/ml	$-0.062 \pm 0.071^*$	-

หมายเหตุ เครื่องหมาย * คือค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ติดลบ จึงไม่นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

Malassezia เป็นยีสต์ที่พบทั่วไปบริเวณผิวหนังของมนุษย์มากที่สุดและสามารถก่อโรคผิวหนังเรื้อรังหลายชนิด ปัจจุบันมีการรักษาโดยใช้ยาในกลุ่มเอโซลแต่อาจส่งผลข้างเคียงและทำให้การดีดของเชื้อส่งผลให้การรักษาโดยใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่เข้ามามีบทบาทในแก้ไขปัญหา ซึ่งในประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงชันโรงอย่างแพร่หลายและยังมีรายงานการศึกษาพบว่าพรอพอลิสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากชันโรงมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราและยีสต์ก่อโรคผิวหนังหลายชนิดรวมถึงยีสต์สกุล *Malassezia* อย่างไรก็ตามการศึกษาผลของพรอพอลิสต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Malassezia* ยังมีน้อยและยังไม่มีรายงานการศึกษาทั่วโลกของเชื้อที่ถูกยับยั้งโดยพรอพอลิส ทั้งนี้ *G. thoracica* เป็นชันโรงที่นิยมเพาะเลี้ยงในประเทศไทยและยังไม่มีการศึกษาผลของพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ในการยับยั้งยีสต์สกุล *Malassezia* ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ทดสอบประสิทธิภาพของพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ในการยับยั้งเจริญเติบโตและการทำงานของเอนไซม์ไลเปสของ *Malassezia* โดยทำการทดสอบใน *M. globosa* เนื่องจากเป็นหนึ่งในชนิดที่พบได้มากในผู้ป่วยโรคผิวหนัง

จากการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. globosa* ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิส 120 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นเริ่มต้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อและจากการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นสารสกัดหยาบพรอพอลิส 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง พบว่าตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์กัน 93.5% มีสมการเส้นตรงคือ $Y = 0.038X + 14.150$ ซึ่งสามารถใช้ในการคาดคะเนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งจากความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ใช้ได้ ทั้งนี้จากการศึกษาของ Khosravi และคณะ (2013) รายงานว่าค่า MIC ของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่สามารถยับยั้ง *M. globosa* มีค่าอยู่ในช่วง 2-6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบพรอพอลิสขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีซึ่งมีความแตกต่างกันตามชนิดพืชพรรณที่เป็นแหล่งอาหาร ฤดูกาล และสภาพแวดล้อมของแหล่งเพาะเลี้ยงชันโรง (Sforcin and Bankova, 2011; Badiazaman et al., 2019)

การทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion มีปัจจัยที่ส่งผลต่อความเข้มข้นของสารทดสอบเนื่องจากสารจะแพร่จากบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงไปยังบริเวณที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า จึงเกิดระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (concentration gradient) ตามระยะทางที่สารแพร่ผ่านซึ่งเป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของ Fick (Poirier and Geiger, 2016) ทำให้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากบริเวณแรกที่เติมสารและบริเวณสุดท้ายที่เกิดโซนยับยั้งมีความเข้มข้นที่ต่างกัน ดังนั้นความเข้มข้นที่บริเวณสุดท้ายจึงเป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้หรือเรียกว่า critical concentration หรือ C_c โดยสมการที่สามารถใช้อธิบายปรากฏการณ์ดังกล่าวมีสองรูปแบบ ได้แก่ linear diffusion model โดยสมการของ Cooper และ

Woodman และสมการของ Bonev และคณะ (2008) และ radial diffusion model โดยสมการของ Vesterdal ทั้งนี้เมื่อพิจารณาสมการทั้งสามตามความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงจะสามารถหาค่า C_{cr} ได้จากการสร้างกราฟเชิงเส้นตรงโดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างหรือรัศมีโซนยับยั้งและค่าลอการิทึมฐานธรรมชาติของความเข้มข้น โดยค่า C_{cr} คือ แอนติลอการ์ิทึมของค่าจุดตัดแกน X ซึ่งค่าความเข้มข้นที่ต่ำกว่าจุดตัดแกน X จะไม่เกิดโซนยับยั้ง (Galvao et al., 2016) จากการวิเคราะห์ด้วย linear diffusion model พบว่าค่า C_{cr} จากสมการของ Bonev และคณะ (2008) มีค่าเท่ากับ 30.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าน้อยกว่า C_{cr} จากสมการของ Cooper และ Woodman โดยเส้นตรงจากสมการของ Bonev และคณะ (2008) มีค่า goodness of fit เท่ากับ 91.7% มากกว่าเส้นตรงจากสมการของ Cooper และ Woodman ซึ่งมีค่าเท่ากับ 90.6 % แสดงให้เห็นว่าข้อมูลที่ได้จากสมการของ Bonev และคณะ (2008) มีความสอดคล้องกับค่าที่ได้จากผลการทดลองมากกว่า ซึ่งสมการของ Bonev และคณะ (2008) เป็น linear diffusion model ที่คำนึงถึงการแพร่ของสารแบบไม่เป็นอิสระซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของพรอพอลิสซึ่งมีส่วนประกอบหลักเป็นยางจากต้นพีช ทำให้มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ (Hamdi et al., 2019) จึงมีการแพร่แบบไม่เป็นอิสระหรืออาจมีการสูญเสียสารไประหว่างการแพร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก จึงส่งผลให้ความเข้มข้นบริเวณสุดท้ายมีค่าลดลงมาก และจากการวิเคราะห์ด้วย radial diffusion model พบว่าค่า C_{cr} มีค่าเท่ากับ 44.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า goodness of fit เท่ากับ 91.0% ซึ่งจากรายงานของ Drugeon และคณะ (1987) พบว่า critical concentration จาก radial diffusion model ที่ได้จากสมการของ Vesterdal มีค่าใกล้เคียงกับ MIC มากกว่า critical concentration จากสมการของ Cooper และ Woodman นอกจากนี้ยังเป็นรูปแบบสมการที่ใช้อธิบายการแพร่ของสารในแนวรัศมีซึ่งสอดคล้องกับการทำการทดลองด้วยวิธี agar well diffusion อย่างไรก็ตาม critical concentration ในการศึกษานี้เป็นค่าที่ได้จากการคำนวณตามความสัมพันธ์ของข้อมูลที่ได้ ดังนั้นการนำไปประยุกต์ใช้ควรมีการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการจริง ทั้งนี้ค่า C_{cr} ที่ได้อาจมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อ ปริมาตรสารทดสอบ และ ความหนาแน่นของเชื้อที่ใช้ทดสอบ

การทำงานของเอนไซม์ไลเปสเป็นกลไกที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการก่อโรค เพราะ *Malassezia* ไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันเอง ดังนั้นการศึกษายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจึงเป็นอีกหนึ่งเป้าหมายที่น่าสนใจ โดยจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของ *M. globosa* พบว่าสารสกัดหยาบพรอพอลิสสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสได้ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 68.31% ทั้งนี้สารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถตรวจวัดค่าได้เนื่องจากชุดทดลอง blank ของความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสูงกว่าชุดทดลองที่ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้พรอพอลิสที่ความเข้มข้นสูงขึ้น จะทำให้ละลายในสารละลายที่ใช้ทำทดสอบได้ลดลงและสารสกัดหยาบพรอพอลิสเป็นสารที่มีสีจึงรบกวนสีของ

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ซึ่งสาเหตุดังกล่าวยังสามารถส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวัดค่าการดูดกลืนแสงจึงอาจส่งผลต่อการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสได้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่พบว่าสารสกัดหยาบพหุพอลิสจาก *G. thoracica* สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสของ *M. globosa* ได้ ซึ่งเป็นข้อมูลที่ยังไม่มีรายงานการศึกษาในปัจจุบัน

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

6.1. สรุปผลการศึกษา

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. globosa* ด้วยวิธี agar well diffusion มีค่าเท่ากับ 120 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อประเมินค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของพรอพอลิสจากการวิเคราะห์ค่า C_{cr} ด้วย linear diffusion model พบว่าค่า C_{cr} ที่ได้จากการสมการของ Bonev และคณะ (2008) มีความสอดคล้องของข้อมูลมากกว่าสมการของ Cooper และ Woodman โดยมีค่าเท่ากับ 30.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การวิเคราะห์ด้วย radial diffusion model มีค่า C_{cr} เท่ากับ 44.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาบพรอพอลิสสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสของ *M. globosa* ได้ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 68.31% โดยศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการทำงานของเอนไซม์ไลเปสของ *M. globosa*

6.2. ข้อเสนอแนะ

6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์

สามารถนำข้อมูลจากการศึกษาไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ต่อไป โดยเฉพาะในด้านการพัฒนายาสำหรับรักษาผู้ป่วยโรคผิวหนังที่มีสาเหตุมาจากยีสต์ *Malassezia* spp.

6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต

ทดสอบประสิทธิภาพของพรอพอลิสต่อกลไกอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการก่อโรคของ *Malassezia* spp. และศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* เพื่อระบุชนิดของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลัก

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

- จิตเกษม หล้าสะอาด, เกษร เมืองทิพย์ และ วสันต์ สุทธิโส. 2562. ความหลากหลายชนิดของชั้นโรงในจังหวัดสุราษฎร์ธานี. วารสารวิทยาศาสตร์ มช. 47(1): 93–100.
- วันเพ็ญ เจริญจิต. 2554. ผลิตภัณฑ์ไล่ค่าจากผึ้ง [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://soclaimon.wordpress.com/2011/12/31> [4 พฤษภาคม 2563]
- ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย. 2551. พรอพอลิสของขี้ผึ้งจากธรรมชาติ. วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ. 3: 286–296.

ภาษาอังกฤษ

- Akaza, N., Akamatsu, H., Takeoka, S., Sasaki, Y., Mizutani, H., Nakata, S. and Matsunaga, K. 2012. *Malassezia globosa* tends to grow actively in summer conditions more than other cutaneous *Malassezia* species. The Journal of Dermatology. 39(7): 613–616.
- Badiazaman, A.A.M., Zin, N.B.M., Annisava, A.R., Nafi, N.E.M. and Mohd, K.S. 2019. Phytochemical screening and antioxidant properties of stingless bee *Geniotrigona thoracica* propolis. Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences. 15(2-1): 330-335.
- Batra, R., Boekhout, T., Gueho, E., Cabanes, F.J., Dawson, T.L. and Gupta, A.K. 2005. *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts. FEMS Yeast Research. 5: 1101–1113.
- Bonev, B., Hooper, J. and Parisot, J. 2008. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 61(6): 1295–1301.
- Cabanes, F.J. 2014). *Malassezia* yeasts: how many species infect humans and animals. PLoS pathogens. 10(2): e1003892.
- Chuttong, B., Chanbang, Y. and Burgett, M. 2014. Meliponiculture: Stingless Bee Beekeeping in Thailand. Bee World. 91(2): 41–45.
- Dawson Jr, T.L. 2007. *Malassezia globosa* and *Malassezia restricta*: breakthrough understanding of the etiology and treatment of dandruff and seborrheic dermatitis through whole-genome analysis. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings. 12: 15–19.

- Drugeon, H.B., Juvin, M.E., Caillon, J. and Courtieu, A.L. 1987. Assessment of formulas for calculating critical concentration by the agar diffusion method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 31(6): 870–875.
- Findley, K., Oh, J., Yang, J., Conlan, S., Deming, C., Meyer, J.A., Schoenfeld, D., Nomicos, E., Park, M., NISC Comparative Sequencing Program, Kong, H.H. and Becker, J. 2013. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*. 498(7454): 367–370.
- Galvao, G.V., Saviano, A.M. and Lourenço, F.R. 2016. Reduced incubation time for inhibition zone formation based on diffusion and growth mechanism elucidation. *Analytical Methods*. 8(19): 3885–3891.
- Gomes, N., Gonçalves, C., García-Román, M., Teixeira, J.A. and Belo, I. 2011. Optimization of a colorimetric assay for yeast lipase activity in complex systems. *Analytical Methods*. 3(4): 1008–1013.
- Hamdi, D., Wijanarko, A., Hermansyah, H., Asih, S.C. and Sahlan, M. 2019. Production of nanopropolis using high pressure ball mill homogenizer. In *IOP Conference Series*, pp. 012014. England: IOP Publishing.
- Honnavar, P., Prasad, G.S., Ghosh, A., Dogra, S., Handa, S. and Rudramurthy, S.M. 2016. *Malassezia arunaloeki* sp. nov., a novel yeast species isolated from seborrheic dermatitis patients and healthy individuals from India. *Journal of Clinical Microbiology*. 54(7): 1826-1834.
- Khosravi, A. R., Shokri, H., Nikaein, D., Mansouri, P., Erfanmanesh, A., Chalangari, R. and Katalin, M. 2013. Yeasts as important agents of onychomycosis: in vitro activity of propolis against yeasts isolated from patients with nail infection. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 19(1): 57–62.
- Koc, A.N., Silici, S., Kasap, F., Hormet-Oz, H.T., Mavus-Buldu, H. and Ercal, B.D. 2011. Antifungal activity of the honeybee products against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. *Journal of Medicinal Food*. 14(1–2): 128–134.
- Kumar, N., Mueen, A. K., Dang, R. and Husain, A. 2008. Antioxidant and antimicrobial activity of propolis from Tamil Nadu zone. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2(12): 361–364.

- Leong, C., Buttafuoco, A., Glatz, M. and Bosshard, P.P. 2017. Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* spp. with an optimized colorimetric broth microdilution method. *Journal of Clinical Microbiology*. 55(6): 1883–1893.
- Lorch, J.M., Palmer, J.M., Vanderwolf, K.J., Schmidt, K.Z., Verant, M.L., Weller, T.J. and Blehert, D.S. 2018. *Malassezia vespertilionis* sp. nov.: a new cold-tolerant species of yeast isolated from bats. *Persoonia*. 41: 56.
- Marieke, M., Blitterswijk, H., Leven, L., Kerkvliet, J. and Waerd, J. 2005. Bee products (properties, processing and marketing). *Agrodok*, 42. Netherland: Wageningon University.
- Michener, C.D. 2013. The Meliponini. In: P. Vit, S.R.M Pedro and D. Roubik (Eds.), *Pot-honey: a legacy of stingless bees*, pp. 3–17. New York: Springer.
- Multum, C. 2019. Ketoconazole [online]. Available from: <https://www.drugs.com/sfx/ketoconazole-side-effects.html> [2019, March 28]
- Oakley, A. 2004. Skin conditions associated with *Malassezia* [online]. Available from: <https://www.dermnetnz.org/topics/malassezia-infections> [2019, February 15]
- Oliveira, A.C.P., Shinobu, C.S., Longhini, R., Franco, S. L., and Svidzinski, T.I.E. 2006. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 101(5): 493–497.
- Peng, Y., Fu, S., Liu, H. and Lucia, L.A. 2016. Accurately determining esterase activity via the isosbestic point of *p*-nitrophenol. *BioResources*. 11(4): 10099–10111.
- Pietta, P.G., Gardana, C. and Pietta, A.M. 2002. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia*. 73: 7–20.
- Pohanka, M. 2019. Biosensors and bioassays based on lipases, principles and applications, a review. *Molecules*. 24(3): 616.
- Poirier D.R. and Geiger G.H. 2016. *Transport Phenomena in Materials Processing*. Cham: Springer.
- Rattanawanee, A. and Duangphakdee, O. 2019. Southeast asian meliponiculture for sustainable livelihood [online]. Available from: <https://www.intechopen.com/online-first/southeast-asian-meliponiculture-for-sustainable-livelihood> [2020, April 26]
- Seifert, K.A. 2013. The human microbiome project: fungi on human skin. *IMA Fungus*. 4(1): 16–18.
- Sforcin, J. M. and Bankova, V. 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs. *Journal of Ethnopharmacology*. 133(2): 253–260.

- Sforcin, J.M. 2016. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy Research*. 30(6): 894–905.
- Sivasankar, C., Bhaskar, J.P., Krishnan, V. and Pandian, S.K. 2017. Evaluation of selected Indian medicinal plants for antagonistic potential against *Malassezia* spp. and the synergistic effect of embelin in combination with ketoconazole. *Microbial Pathogenesis*. 110: 66–72.
- Sugar, A.M., Alsip, S.G., Galgiani, J.N., Graybill, J.R., Dismukes, W.E., Cloud, G.A., Craven, P.C. and Stevens, D.A. 1987. Pharmacology and toxicity of high-dose ketoconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 31(12): 1874–1878.
- Velegraki, A., Cafarchia, C., Gaitanis, G., Iatta, R. and Boekhout, T. 2015. *Malassezia* infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. *PLoS pathogens*, 11(1): e1004523
- Velthuis, H.H.W. 1997. The biology of stingless bee. Netherlands: Utrecht University.
- Wagh, V.D. 2013. Propolis a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*. 2013: 308249.
- Wang, Q.M., Theelen, B., Groenewald, M., Bai, F.Y. and Boekhout, T. 2014. Moniliellomycetes and Malasseziomycetes, two new classes in Ustilaginomycotina. *Persoonia*. 33: 41–47.
- White, T.C., Findley, K., Dawson, T.L., Scheynius, A., Boekhout, T., Cuomo, C.A., Jun, X. and Saunders, W.C. 2014. Fungi on the skin: dermatophytes and *Malassezia*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 4(8): a019802.
- Wille, A. 1983. Biology of the stingless bees. *Annual Review of Entomology*. 28(1): 41–64

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 เส้นผ่านศูนย์กลางโคนยับยั้ง ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเส้นผ่านศูนย์กลางโคนยับยั้งของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ที่ความเข้มข้น 100-1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางโคนยับยั้ง (มิลลิเมตร)			ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคนยับยั้ง (มิลลิเมตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
10	0	0	0	0.0 ± 0.0
20	0	0	0	0.0 ± 0.0
30	0	0	0	0.0 ± 0.0
40	0	0	0	0.0 ± 0.0
50	0	0	0	0.0 ± 0.0
60	0	0	0	0.0 ± 0.0
70	0	0	0	0.0 ± 0.0
80	0	0	0	0.0 ± 0.0
90	0	0	0	0.0 ± 0.0
100	0	0	0	0.0 ± 0.0
200	20	18	20	19.33 ± 1.15
300	21	20	21	20.67 ± 0.58
400	24	26	26	25.33 ± 1.15
500	27	23	27	25.67 ± 2.31
600	29	30	26	28.33 ± 2.08
700	28	29	21	26.00 ± 4.36
800	32	29	27	29.33 ± 2.52
900	30	29	26	28.33 ± 2.08
1,000	28	31	26	28.33 ± 2.52
ค่าเฉลี่ยรวม				25.70 ± 3.91*

หมายเหตุ เครื่องหมาย * คือค่าเฉลี่ยรวมของค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคนยับยั้งที่ความเข้มข้น 200-1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางโคนยับยั้งและความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ 200-1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย Pearson correlation

Pearson Correlation	Sig. (2-tailed)	N
0.869	0.002	9

ภาคผนวกที่ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ที่ความเข้มข้นระหว่าง 100-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (มิลลิเมตร)			ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (มิลลิเมตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
100	0	0	0	0.0 ± 0.0
120	19	20	18	19.00 ± 1.00
140	19	20	20	19.67 ± 0.58
160	20	20	19	19.67 ± 0.58
180	20	20	22	20.67 ± 1.15
200	21	21	20	20.67 ± 0.58
220	24	23	23	23.33 ± 0.58
240	25	24	23	24.00 ± 1.00
260	25	23	25	24.33 ± 1.15
280	25	25	24	24.67 ± 0.58
300	25	24	26	25.00 ± 1.00

ภาคผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ที่ความเข้มข้นระหว่าง 100-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย One-Way ANOVA

Optical density at 450 nm	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	152.033	9	16.893	23.035	0.000
Within Groups	14.667	20	0.733	-	-
Total	166.700	29	-	-	-

ภาคผนวกที่ 5 ผลการทดสอบความเท่ากันของค่าความแปรปรวน (Test of Homogeneity of Variances) ของค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ที่ความเข้มข้นระหว่าง 100-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วย Levene's Test

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
0.678	9	20	0.720

ภาคผนวกที่ 6 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางไซนัยบั้งของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชันโรง *G. thoracica* ที่ความเข้มข้นระหว่าง 100-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย Scheffe test

concentration (mg/ml)		Sig.	concentration (mg/ml)		Sig.
120	140	0.999	180	120	0.757
	160	0.999		140	0.986
	180	0.757		160	0.986
	200	0.757		200	1.000
	220	0.003*		220	0.178
	240	0.001*		240	0.041*
	260	0.000*		260	0.018*
	280	0.000*		280	0.008*
	300	0.000*		300	0.003*
140	120	0.999	200	120	0.757
	160	1.000		140	0.986
	180	0.986		160	0.986
	200	0.986		180	1.000
	220	0.018*		220	0.178
	240	0.003*		240	0.041*
	260	0.001*		260	0.018*
	280	0.001*		280	0.008*
	300	0.000*		300	0.003*
160	120	0.999	220	120	0.003*
	140	1.000		140	0.018*
	180	0.986		160	0.018*
	200	0.986		180	0.178
	220	0.018*		200	0.178
	240	0.003*		240	0.999
	260	0.001*		260	0.986
	280	0.001*		280	0.918
	300	0.000*		300	0.757

concentration (mg/ml)		Sig.	concentration (mg/ml)		Sig.
240	120	0.001*	280	120	0.000*
	140	0.003*		140	0.001*
	160	0.003*		160	0.001*
	180	0.041*		180	0.008*
	200	0.041*		200	0.008*
	220	0.999		220	0.918
	260	1.000		240	0.999
	280	0.999		260	1.000
	300	0.986		300	1.000
260	120	0.000*	300	120	0.000*
	140	0.001*		140	0.000*
	160	0.001*		160	0.000*
	180	0.018*		180	0.003*
	200	0.018*		200	0.003*
	220	0.986		220	0.757
	240	1.000		240	0.986
	280	1.000		260	0.999
	300	0.999		280	1.000

หมายเหตุ เครื่องหมาย * คือค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ภาคผนวกที่ 7 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคนยับยั้งของสารสกัดหยาบพรอพอลิสจากชั้นโรง *G. thoracica* ที่ความเข้มข้นระหว่าง 100-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย Scheffe test

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยและส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน	Scheffe test*
100	19.00 ± 1.00	a
120	19.67 ± 0.58	a
140	19.67 ± 0.58	a
160	20.67 ± 1.15	a
180	20.67 ± 0.58	ab
200	23.33 ± 0.58	ab
220	24.00 ± 1.00	bc
240	24.33 ± 1.15	c
260	24.67 ± 0.58	c
280	25.00 ± 1.00	c
300	19.00 ± 1.00	c

หมายเหตุ เครื่องหมาย * คือค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกัน หมายความว่า ค่าเฉลี่ยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

ภาคผนวกที่ 8 ผลการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางโคนยับยั้งและความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย Pearson correlation

Pearson Correlation	Sig. (2-tailed)	N
0.967	0.000	10

ภาคผนวกที่ 9 ผลการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นสารสกัดหยาบพรอพอลิส 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ เส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง

Type of table	Result		
Model Summary	R	0.967	
	R Square	0.935	
ANOVA	Sig.	0.000	
Coefficients	Unstandardized Coefficients: B	Constant (a)	14.150
		Concentration (b)	0.038
	Sig.	Constant (a)	0.000
		Concentration (b)	0.000

ภาคผนวกที่ 10 ลอการิทึมธรรมชาติของความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความกว้างของโซนยับยั้ง รัศมีจากจุดศูนย์กลางของโซนยับยั้ง ความกว้างของโซนยับยั้งยกกำลังสอง และ รัศมีจากจุดศูนย์กลางของโซนยับยั้งยกกำลังสอง

ln of concentration (mg/ml)	width of inhibition zone (mm)	radius of inhibition zone (mm)	width ² of inhibition zone (mm ²)	radius ² of inhibition zone (mm ²)
4.787	5.50	9.50	30.25	90.25
4.942	5.83	9.83	34.03	96.69
5.075	5.83	9.83	34.03	96.69
5.193	6.33	10.33	40.11	106.78
5.298	6.33	10.33	40.11	106.78
5.394	7.67	11.67	58.78	136.11
5.481	8.00	12.00	64.00	144.00
5.561	8.17	12.17	66.69	148.03
5.635	8.33	12.33	69.44	152.11
5.704	8.50	12.50	72.25	156.25

ภาคผนวกที่ 11 ผลการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นระหว่างลอการิทึมธรรมชาติของความเข้มข้นของสารสกัด
หยาบพรอพอลิสที่ 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ ความกว้างของโซนยับยั้งกำลังสอง

Type of table	Result		
Model Summary	R	0.952	
	R Square	0.906	
ANOVA	Sig.	0.000	
Coefficients	Unstandardized Coefficients: B	Constant (a)	-225.579
		ln(c) (b)	52.110
	Sig.	Constant (a)	0.000
		Concentration (b)	0.000

ภาคผนวกที่ 12 ผลการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นระหว่างลอการิทึมธรรมชาติของความเข้มข้นของสารสกัด
หยาบพรอพอลิสที่ 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ ความกว้างของโซนยับยั้ง

Type of table	Result		
Model Summary	R	0.957	
	R Square	0.917	
ANOVA	Sig.	0.000	
Coefficients	Unstandardized Coefficients: B	Constant (a)	-12.706
		ln(c) (b)	3.723
	Sig.	Constant (a)	0.000
		Concentration (b)	0.000

ภาคผนวกที่ 13 ผลการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นระหว่างลอการิทึมธรรมชาติของความเข้มข้นของสารสกัด
 หยาบพรอพอลิสที่ 120-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ รัศมีจากจุดศูนย์กลางของโซนยับยั้งก้ำลึงสอง

Type of table	Result		
Model Summary	R		0.954
	R Square		0.910
ANOVA	Sig.		0.000
Coefficients	Unstandardized Coefficients: B	Constant (a)	-311.236
		ln(c) (b)	81.893
	Sig.	Constant (a)	0.000
		Concentration (b)	0.000

ภาคผนวกที่ 14 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของ *M. globosa* ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และ ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

ชุดทดลอง	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยของค่า การดูดกลืนแสง
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
blank	0.429	0.441	0.436	0.435 ± 0.006
blank ของสารสกัดหยาบพรอพอลิส ความเข้มข้น 100 mg/ml	1.610	1.569	1.625	1.601 ± 0.029
blank ของสารสกัดหยาบพรอพอลิส ความเข้มข้น 200 mg/ml	1.674	1.771	1.769	1.738 ± 0.055
blank ของสารสกัดหยาบพรอพอลิส ความเข้มข้น 400 mg/ml	2.348	2.325	2.47	2.381 ± 0.078*
สารสกัดหยาบพรอพอลิสความเข้มข้น 100 mg/ml	1.643	1.701	1.634	1.659 ± 0.036
สารสกัดหยาบพรอพอลิสความเข้มข้น 200 mg/ml	1.774	1.753	1.764	1.764 ± 0.011
สารสกัดหยาบพรอพอลิสความเข้มข้น 400 mg/ml	2.379	2.337	2.241	2.222 ± 0.144*
ชุดควบคุม	0.522	0.513	0.512	0.516 ± 0.006
ชุดควบคุมที่ให้ผลลบ	0.512	0.497	0.507	0.505 ± 0.008

หมายเหตุ เครื่องหมาย * คือชุดการทดลองที่เติมสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงน้อยกว่า blank ของชุดการทดลอง

ภาคผนวกที่ 15 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ที่หักลบด้วย blank ของแต่ละชุดการทดลอง

ชุดการทดลอง	ความแปรปรวนของค่าดูดกลืนแสง
ชุดควบคุม	0.00003
ชุดควบคุมที่ให้ผลลบ	0.00006
สารสกัดหยาบพรอพอลิสความเข้มข้น 100 mg/ml	0.00132
สารสกัดหยาบพรอพอลิสความเข้มข้น 200 mg/ml	0.00011
สารสกัดหยาบพรอพอลิสความเข้มข้น 400 mg/ml	0.00500

ภาคผนวกที่ 16 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วย One-Way ANOVA

Optical density at 450 nm	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.005	3	0.002	4.494	0.040
Within Groups	0.003	8	0.000	-	-
Total	0.008	11	-	-	-

ภาคผนวกที่ 17 ผลการทดสอบความเท่ากันของค่าความแปรปรวน (Test of Homogeneity of Variances) ของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วย Levene's Test

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6.921	3	8	0.013

ภาคผนวกที่ 18 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วย Tamhane's T2 test

treatment		Standard Error	Sig.
control	100 mg/ml	0.021234	0.953
	200 mg/ml	0.006848	0.023*
	negative control	0.005437	0.587
100 mg/ml	control	0.021234	0.953
	200 mg/ml	0.021853	0.831
	negative control	0.021453	0.997
200 mg/ml	control	0.006848	0.023*
	100 mg/ml	0.021853	0.831
	negative control	0.007498	0.031*
negative control	control	0.005437	0.587
	100 mg/ml	0.021453	0.997
	200 mg/ml	0.007498	0.031*

หมายเหตุ เครื่องหมาย * คือค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ภาคผนวกที่ 19 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วย Tamhane's T2 test

ชุดการทดลอง	ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของค่าดูดกลืนแสง	Tamhane's T2 test*
ชุดควบคุม	0.081 ± 0.006	a
ชุดควบคุมที่ให้ผลลบ	0.070 ± 0.008	a
สารสกัดหยาบพรอพอลิส ความเข้มข้น 100 mg/ml	0.058 ± 0.036	ab
สารสกัดหยาบพรอพอลิส ความเข้มข้น 200 mg/ml	0.026 ± 0.011	b

หมายเหตุ เครื่องหมาย * คือค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกัน หมายความว่า ค่าเฉลี่ยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

ภาคผนวกที่ 20 ตัวอย่างการคำนวณความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสในตัวทำละลาย DMSO เพื่อใช้ในการทดลอง

$$\text{คำนวณความเข้มข้นด้วยสมการ } C1 \times V1 = C2 \times V2$$

เมื่อ C1 คือ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสเริ่มต้น หรือ stock solution

V1 คือ ปริมาตรของสารสกัดหยาบพรอพอลิสเริ่มต้น

C2 คือ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสสุดท้าย

V2 คือ ปริมาตรของสารสกัดหยาบพรอพอลิสสุดท้าย

ตัวอย่าง วิธีคำนวณเมื่อต้องการสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จาก stock solution ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

$$\text{แทนค่าในสมการ } 2,000 \times V1 = 200 \times 1$$

$$V1 = (200 \times 1)/2,000$$

$$V1 = 0.1 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้นจะสามารถเตรียมสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยปิเปตต์สารสกัดหยาบพรอพอลิสจาก stock solution ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 0.1 มิลลิลิตร หรือ 100 ไมโครลิตร และเติม DMSO 900 ไมโครลิตร