มหาวิทยาลัยฟาฏอนี ร่วมกับ เครือข่ายความร่วมมือ
มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ และมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

Proceedings

การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 6

เรื่อง

สร้างสรรค์งานวิจัยเพื่อขับเคลื่อนประเทศ
สู่ความมั่นคง มั่งคั่ง และยั่งยืนในยุค
Thailand 4.0

(วิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตรนวัตกรรม)

18 ตุลาคม 2017
ณ อาคารเรียนรวมเฉลิมพระเกียรติ
มหาวิทยาลัยฟาฏอนี

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์จากรังชันโรงและฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ของผลิตภัณฑ์สบู่ก้อน

ฮาซัน ดอปอ[1*],อามีเนาะ สาหะ[2],อิสมะแอ เจ๊ะหลง[3],อิมรอน มีชัย[4],สุนีย์ แวมะ[5]

[1]ดร. (เคมี), อาจารย์สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
[2]วท.บ. (เคมี), นักวิจัย สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
[3]ดร. (ชีววิทยา), อาจารย์สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
[4]ดร. (เคมี), อาจารย์สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
[5]วท.ม. (วิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ), นักวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

บทคัดย่อ

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลของตัวทำละลายและอุณหภูมิต่อปริมาณฟลาโวนอยด์และข้อมูลทางทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของสารสกัดจากรังชันโรง รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ในผลิตภัณฑ์สบู่ก้อนผสมสารสกัดจากรังชันโรง จากการศึกษาพบว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 °c ให้ค่าปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุดคือ 85.5 mg QE/g extract ข้อมูลทางทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีปรากฏสารทั้งหมด 4 จุด โดยแต่ละจุดมีค่า R_f ดังนี้ 0.14, 0.37, 0.51 และ 0.63 ส่วนการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของผลิตภัณฑ์สบู่ก้อน พบว่าสบู่ก้อนที่ผสมสารสกัดจากรังชันโรงสามารถยับยั้งเชื้อได้สูงที่สุดโดยมีค่า inhibition zone เท่ากับ 13.79±1.4

คำสำคัญ : พรอพอลิส, ชันโรง, ฟลาโวนอยด์, *Eschericial coli*, สบู่ก้อน

***ผู้ประสานงาน (Corresponding Author) email: hasan.d@yru.ac.th**

Determination of Total Flavonoid Content from Propolis Stingless Bee and Bacterial Inhibition of *Escherichia coli* in Soap Product

Hasan Daupor[1*], Armeenoh Saha[2], Isma-ae Chelong[3], Imron Meechai[4], Sunee Waema[5]

[1]Dr. (Chemistry), Lecturer of Chemistry, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University
[2]B.Sc. (Chemistry), Chemistry Major, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University
[3]Dr. (Biology), Lecturer of Biology, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University
[4]Dr. (Chemistry), Lecturer of Chemistry, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University
[5]M.Sc. (Food Science and Nutrition), Scientist, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University

Abstract

This study aimed to investigate the effect extraction solvents and temperatures on the total flavonoid content and thin layer chromatography (TLC) profile of the propolis extracts from stingless bee. As well as, the propolis soap product was evaluated the antibacterial activity against *Escherichia coli*. The result displayed that the ethanol extract at 40 °C showed the highest of flavonoid content with 85.5 mg QE/g extract. The TLC profile exhibited four spot with the R_f values of 0.14, 0.37, 0.51 and 0.63. The soap product ingredient with the propolis extract presented the highest potential antibacterial activity with the inhabitation zone of 13.79±1.4

Keyword: Propolis, Stingless bee, Flavonoid, *Escherichia coli*, Soap

บทนำ

ชันโรงเป็นแมลงขนาดเล็กที่มีพฤติกรรมเก็บน้ำหวานจากดอกไม้ และละอองเกสร (เรณู) มาใช้เป็นอาหารคล้ายผึ้งแต่ชันโรงไม่มีเหล็กใน จึงไม่สามารถต่อยได้ ในประเทศไทยเราสามารถพบชันโรงได้ในทุกภาค โดยมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามภูมิภาค เช่น ทางภาคเหนือเรียกชันโรงที่มีขนดเล็กกว่า แมลงขี้ตึง หรือตัวขี้ตังนี้ แต่ถ้าเป็นชันโรงที่มีขนาดใหญ่จะเรียกว่า ขี้ย้า โดยเรียกว่า ขี้ย้าดำ หรือขี้ย้าแดง ตามสีของลำตัวของชันโรง ภาคใต้เรียกขนาดเล็กว่า อุง หรืออุงแมลงโลม และเรียกชันโรงขนาดใหญ่ว่า อุงหมี (อุงแดงหรืออุงดำ) ภาคตะวันตกเรียกว่า ตัวตุ้งติ้งหรือตัวติ้ง จากพฤติกรรมการขนส่งเกสรที่ขาหลัง ส่วนภาคตะวันออกเรียก ชำมะโรงหรือแมลงอีโลม ส่วนคำว่าชันโรงน่าจะเป็นชื่อที่เรียกจากพฤติกรรมการเก็บชันของแมลงชนิดนี้ ส่วนการจำแนกทางวิทยาศาสตร์นั้น ชันโรงไว้ดังนี้ วงศ์ (Family) Apidae วงศ์ย่อย (Subfamily) Apinae ไทรบ์ (Tribe) Meliponini และมีการค้นพบพันธุ์ชันโรงประมาณ 9 สกุล 32 ชนิด (อัญชลี, 2556) ชันโรงตรงข้ามกับผึ้งตรงที่ผึ้งจะใช้พรอพอลิส (Propolis) เพียงรอบนอกเท่านั้น ส่วนชันโรงจะสร้างรังโดยใช้ไขผึ้งบริสุทธิ์และซีรูเมน (Cerumen) ซึ่งเป็นไขผึ้งผสมกับพรอพอลิสที่มีอยู่มากมาย โดยพรอพอลิสเป็นส่วนผสมที่มีลักษณะเหนียวข้นเป็นยาง (Resinous) ได้มาจากยางของเปลือกไม้ที่ผึ้งงานรวบรวมมา โดยเฉพาะยางที่เคลือบอยู่บริเวณตาใบ (Leaf buds) หรือยางที่ไหลออกมาจากส่วนต่าง ๆ ของต้นพืช โดยนำมาผสมกับไขผึ้งแล้วนำมาซ่อมแซมรัง อุดชันรอยรั่ว ตลอดจนรักษาความสะอาด และป้องกันการระบาดของเชื้อโรคภายในรังได้ด้วย โดยเมื่อมีซากของศัตรูผึ้งตายอยู่ในรังและมีขนาดใหญ่ที่ผึ้งไม่สามารถจะนำออกไปทิ้งนอกรังได้ ผึ้งจะนำสารพรอพอลิสมาหุ้มไว้ ทำให้ซากนั้นไม่เน่า ซึ่งในสมัยโบราณมนุษย์ได้นำเอาชันมาใช้ประโยชน์ โดยในประเทศจีนได้นำชันมาทำเป็นยาอายุวัฒนะ ชาวอียิปต์นำชันมาผสมกับน้ำยาทำศพมัมมี่ ส่วนประเทศไทยนำชันมาใช้ประโยชน์ในกิจกรรมต่าง ๆ เช่น การทำแคน ทำด้ามมีด และนอกจากนี้ยังพบว่าชันโรงมีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา (สรจักร, 2547)

จากการศึกษาพบว่าพรอพอลิสมีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด ได้แก่ เทอร์พีนอยด์ สเตอรอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ โดยสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้เกิดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (วันเพ็ญ, 2554: ศิริวรรณ, 2008) ฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบหลักที่พบในพรอพอลิส จากการวิเคราะห์หาชนิดของฟลาโวนอยด์ด้วยเครื่อง NMR และแมสสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยเก็บตัวอย่างพรอพอลิสจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศแอลจีเรีย พบว่ามีฟลาโวนอยู่ 5 ชนิด ได้แก่ Pectolinarigenin, Pilosin, ladanein, Chrysin และ Apigenin (Seguen et al. 2016) ฟลาโวนอยด์สามารถต้านอนุมูลอิสระ ต้านโรคภัยต่าง ๆ ได้แก่ โรคหัวใจ เบาหวาน ต้อกระจก หืด หอบ หลอดลมอักเสบ และโรคมะเร็ง เป็นต้น และนอกจากนี้สารประกอบฟลาโวนอยด์ในพรอพอลิสยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต หรือการเพิ่มปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อไวรัส ได้อีกด้วย (Cushnie and Andrew, 2005) มีการใช้สารสกัดพรอพอลิสร่วมกับยาต้านไวรัส AZT และ Indinavir แบบ in vitro โดยทำการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง CD^{4+} lymphocyte และ microglial cell พบว่าประสิทธิภาพในการต้านไวรัสของพรอพอลิสเมื่อให้ร่วมกับยา AZT เท่ากับ ผลบวกของยา AZT รวมกับพรอพอลิสที่เรียกว่า additive effect (Gekker et al. 2005) ได้มีการรวบรวมพรอพอลิสจากประเทศในภูมิประเทศที่แตกต่างกันได้แก่ อาร์เจนตินา ออสเตรเลีย บราซิล บัลแกเรีย ชิลี จีน ฮังการี นิวซีแลนด์ แอฟริกาใต้ ไทย ยูเครน อุรุกวัย สหรัฐอเมริกา และอุซเบกิสถาน จากนั้นนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพรอพอลิสแต่ละแหล่งด้วยเครื่อง HPLC ควบคู่ไปกับการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของตัวอย่างพรอพอลิสทั้ง 16 ชนิด พบว่า พรอพอลิสมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีที่สุด คือ พรอพอลิสที่มีองค์ประกอบ

ของสารต้านออกซิเดชัน เช่น quercetin, kaempferol, cafeic acid และ cafeic acid phenethyl ester หรือเรียกว่า CAPE เป็นต้น (kumazawa et al. 2004) ได้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของพรอพอลิสที่ได้จากชันโรงชนิด *Trigona Spp.* กับ *Campylobacter Spp.* พบว่าพรอพอลิส *Trigona Spp.* อุดมไปด้วยฟลาโวนอยด์และเทนนิน โดยพรอพอลิสมีองค์ประกอบทางเคมีที่มีความซับซ้อน ทำให้มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ ซึ่งส่งผลต่อเยื่อหุ้มนิวเคลียสและยับยั้งการเคลื่อนไหวของแบคทีเรีย กลไกการกระทำโดยการรบกวนกระบวนการซึมผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ไมโครโซม และไลโซโซม (Fatoni et al. 2008) สารสกัดพรอพอลิสจากผึ้งพันธุ์สามารถยับยั้งการจริญของเชื้อ *B. cereus, B. licheniformis, B. pumilus* และ *B. subtilis* พรอพอลิสจากผลิตภัณฑทางการค้าของผึ้งพันธุสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus, B. licheniformis* และ *B. subtilis* และสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* สวนสารสกัดพรอพอลิสจากผึ้งมิ้มไมสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ เมื่อหาคา minimal inhibitory concentrations (MICs) ดวยวิธี agar dilution พบวา คา MIC ของสารสกัดพรอพอลิสจากผึ้งพันธุตอเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทั้งหมดเทากับ 625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่า MIC ของสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรงเทากับ 2,500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ปาณิสรา ศรีทั่ง, 2551) โดยพรอพอลิสจะแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อต่อแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus, beta hem Streptococus*) แต่จะมีฤทธิ์อ่อนแอต่อแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli, P. aeruginosa*) (Keskin et al. 2001) จากคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้ปัจจุบันมีการนำเอาคุณสมบัติที่ดีของพรอพอลิสมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากมาย ทั้งทางการแพทย์ ด้านยา ด้านบรรจุภัณฑ์ และนำมาเป็นส่วนผสมในการทำผลิตภัณฑ์เสริมความงาม เช่น อาหารเสริม โลชั่นบำรุง สบู่ แชมพู ลิปสติก

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดฟลาโวนอยด์จากรังชันโรงโดยการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium Chloride Colorimetry ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และจะนำสารสกัดฟลาโวนอยด์ ไปเติมเป็นส่วนผสมของสบู่ก้อนพร้อมศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เพื่อนำข้อมูลดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาตัวทำละลายและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสกัดฟลาโวนอยด์จากรังชันโรง
2. เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากรังชันโรง
3. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

วิธีดำเนินการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่าง

ใช้ตัวอย่างพรอพอลิสของชันโรงจากพื้นที่ป่าชุมชนปะเสยะวอ อำเภอสายบุรี จังหวัดปัตตานี (6.72481N, 101.624683E)

2. ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด

นำพรอพอลิสน้ำหนัก 100 กรัม มาหุ้มด้วยผ้าขาวบางแล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ Hexane, Dichloromethane, Ethyl acetate และ Ethanol ในปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (อัตราส่วน

ระหว่างพรอพอลิสและตัวทำละลายเป็น 1 ต่อ 10) สกัดด้วยเครื่อง Ultrasonicator เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิต่าง ๆ แล้วนำส่วนผสมของสารสกัดมากรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารสกัดพรอพอลิสที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยแห้ง (Rotary Evaporator) นำสารสกัดที่ระเหยตัวทำละลายออกเก็บใส่ในขวด Vial แล้วเก็บไว้ให้พ้นแสงในเดซิเคเตอร์ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก นำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium Chloride Colorimetry เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Quercetin

3. ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสกัด

นำพรอพอลิสมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล โดยทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองWhatman No. 1 นำสารสกัดพรอพอลิสที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยแห้ง (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ระเหยตัวทำละลายออกเก็บใส่ในขวด Vial เก็บไว้ให้พ้นแสงในเดซิเคเตอร์แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก นำสารสกัดฟลาโวนอยด์ไปวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium Chloride เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Quercetin

4. การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium Chloride

นำสารสกัดฟลาโวนอยด์ที่มีความเข้มข้น 100 µg/mL ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติม 2% $AlCl_3$ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร แล้วทำการวิเคราะห์ผลโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Quercetin

5. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin

ชั่งสาร Quercetin มา 0.01 g ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย Ethanol แล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 400 µg/mL เจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 µg/mL นำสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติม 2% $AlCl_3$ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร แล้วสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ในตัวอย่างสารสกัดข้างต้น

6. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพรอพอลิสโดยเทคนิค Thin layer Chromatography

นำสารสกัดฟลาโวนอยด์มาจุดลงบนแผ่น TLC plate ชนิด Silica gel 60 F_{254} จากนั้นนำแผ่น TLC ไปแช่ใน mobile phase ซึ่ง mobile phase ประกอบด้วย Hexane : Ethyl acetate (70 : 30) ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสารด้วยการส่องภายใต้แสงยูวี แล้วทำเครื่องหมายตรง Solvent front และคำนวณหาระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้ บันทึกระยะทางที่สารเคลื่อนที่ คำนวณค่า Retention factor (R_f) ของสารสกัดแต่ละชนิด

7. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

7.1. เตรียมอาหารแข็ง โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient Agar (NA) และ Mueller Hinton Agar (MHA) ตามที่คำนวณ ผสมกับน้ำกลั่น บรรจุในขวดปิดฝา

7.2. การเตรียมอาหารเหลว โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient Broth (NB) ตามที่คำนวณ ผสมกับน้ำกลั่น ปิเปตอาหารเหลว (NB) ใสหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปิดปากทดลองด้วยฝาจุกให้เรียบร้อย

7.3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมทั้งหมด (NA, MHA และ NB) และอุปกรณ์ เช่น ไม้พันสำลี ปากคีบ (Forceps) แผ่นดิสก์ (กระดาษกรองขนาด 6 มิลลิเมตร) นำเข้าเครื่อง Autoclave เพื่อทำการปลอดเชื้อที่ปนเปื้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

8. การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

จะใช้แบคทีเรียที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง และความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ต้องในปริมาณที่เหมาะสม วิธีการทำมีดังต่อไปนี้

8.1. เขี่ยโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เพาะเลี้ยงไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง มาประมาณ 2-3 โคโลนี นำมาใส่ในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในหลอดทดสอบ ปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร

8.2. นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 13.1 ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8.3. นำเชื้อจากข้อ 13.2 มาเจือจางให้ได้จำนวนแบคทีเรีย 105–107 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปวัดความขุ่นให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 5

9. การเตรียมสารสกัดที่จะทดสอบ

นำสารตัวอย่างจำนวน 4 ชนิด ทำให้มีความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ แต่ละชนิดลงบนแผ่นดิสก์ (กระดาษกรองขนาด 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) หยดสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 40 ไมโครลิตรต่อดิสค์ และปล่อยให้แห้งนำมาวางบนอาหารที่เตรียมไว้ตามตำแหน่งต่าง ๆ

10. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ

10.1. เทอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar (MHA) ในจานเลี้ยงเชื้อตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว นำแบคทีเรียที่ก่อโรคที่เลี้ยงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient Broth (NB) มา Swab บนผิวอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) และทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารโดยวิธี Disc diffusion test (ทำ 3 ซ้ำ)

10.2. ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบแบคทีเรียแล้วบิดให้แห้งพอหมาด ๆ กับข้างหลอดทดลอง จากนั้นทำการ swab ให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยลากเส้นผ่านศูนย์กลาง จานเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วป้ายเป็นเส้นตั้งฉากผ่านเส้นที่ลากไว้ถี่ ๆ ให้ทั่วผิวหน้าแล้วหมุนจานเพาะเชื้อ ไปประมาณ 60 องศา แล้วป้ายเช่นกันทำเช่นนี้ 3ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 3 - 5 นาทีเพื่อให้ส่วนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

10.3. การทดสอบสารสกัด โดยใช้แผ่นดิสก์ปราศจากเชื้อ หยดตัวอย่างสารสกัดด้วยตัวทำละลาย (DMSO) และใช้ปากคีบ คีบแผ่นดิสก์วางบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้แล้วกดเบาๆ มาวางที่ตำแหน่งที่กำหนดไว้ นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจวัดขนาดบริเวณใส ที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Clear Zone, Inhibition Zone) ที่เกิดขึ้นรอบแผ่นดิสค์ โดยวัดเป็นหน่วยมิลลิเมตร

11. การอ่านผลการทดสอบ

เมื่อบ่มเชื้อจนครบ 16-18 ชั่วโมง วัดขนาดของโซนใสที่เกิดขึ้น โดยวัดจากขอบโซนข้างหนึ่งไปยังขอบโซนอีกข้างหนึ่ง โดยให้ผ่านจุดศูนย์กลางของ paper disc บันทึกหน่วยเป็นมิลลิเมตร (ขอบโซนที่วัดต้องเป็นโซนที่ชัด ถ้ามีเชื้อขึ้นบาง ๆ ให้ถือว่าบริเวณนั้นยังมีปริมาณยาหรือสารสกัดชีวภาพสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

ผลการวิจัย

1. ลักษณะของสารสกัดฟลาโวนอยด์ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

พรอพอลิสที่ใช้ในการทดลองมีลักษณะเหนียวสีน้ำตาล ลักษณะดังภาพที่ 1a ซึ่งเมื่อนำมาศึกษาการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด จะได้สารละลายที่มีลักษณะแตกต่างกันและเมื่อนำสารสกัดมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง (Rotary evaporator) จะได้สารเหนียวที่มีลักษณะของสีต่างกันดังแสดงในภาพที่ 1b-2e แล้วนำมาชั่งน้ำหนักของสารสกัดและคำนวณหาผลผลิต ร้อยละของสารสกัดจะได้สารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ดังตารางที่ 1

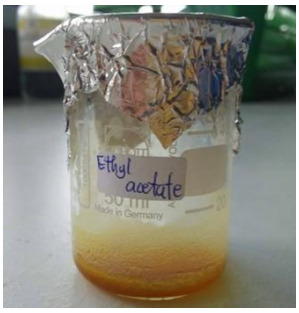
(a)

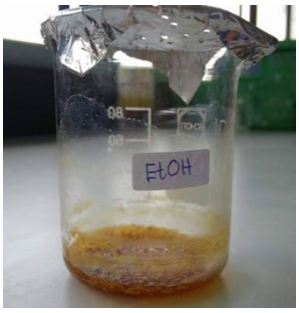
(b)

(c)

(d)

(e)





ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของพรอพอลิสจากรังชันโรง (a) ลักษณะของสารสกัดพรอพอลิสจากตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด (b)-(e)

ตารางที่ 1 ตารางแสดงผลผลิตร้อยละของสารสกัดพรอพอลิส

ชนิดของสารสกัด	ผลผลิตร้อยละ (% w/w)
สารสกัดพรอพอลิสจากเฮกเซน	57.67
สารสกัดพรอพอลิสจากไดคลอโรมีเทน	28.38
สารสกัดพรอพอลิสจากเอธิลอะซิเตด	0.86
สารสกัดพรอพอลิสจากเอทานอล	0.77

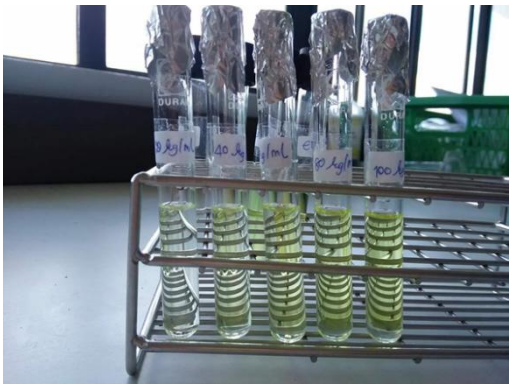
2. ผลของอุณหภูมิและชนิดของตัวทำละลายที่มีผลต่อการสกัด

ซึ่งการศึกษาผลของตัวทำละลายต่อการสกัดสารพรอพอลิสทำได้โดยการวัดหาปริมาณ ฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium Chloride Colorimetry โดยที่สารสกัดฟลาโวนอยด์เมื่อทำปฏิกิริยากับอะลูมิเนียมคลอไรด์จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน Al—Flavonoids ซึ่งจะเกิดเป็นสารละลายสีเหลืองแกมเขียว ดังภาพที่ 2a แล้วนำมาวัดด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer โดยใช้สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน Quercetin วิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบ ฟลาโวนอยด์ ดังภาพที่ 2b จากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์ โดยสารสกัดพรอพอลิสที่สกัดได้จากตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด พบว่าในสารสกัดจากเอทานอลจะมีสารประกอบของ ฟลาโวนอยด์อยู่สูงที่สุด คือ 108.13 mg QE/g crude extract ดังตารางที่ 2 ซึ่งในการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์นี้จะขึ้นอยู่กับตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารตัวอย่างด้วย เนื่องจากระบบของตัวทำละลายที่มีขั้วสูงจะสามารถสกัดปริมาณฟลาโวนอยด์ออกมาได้มาก สอดคล้องกับผลการทดลองนี้ที่พบว่าสารสกัดพรอพอลิสที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลจะมีสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงที่สุด

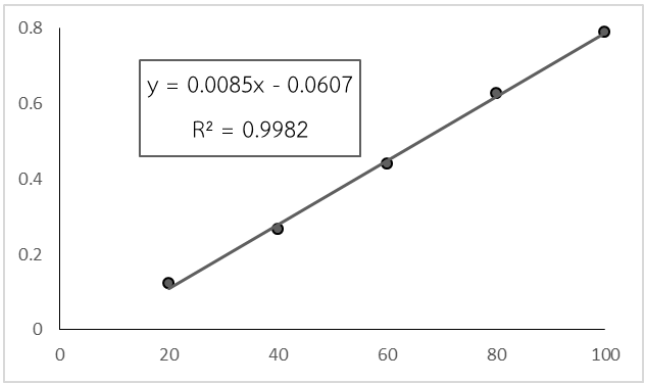
ตารางที่ 2 แสดงปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด

ชนิดตัวทำละลายของสารสกัดพรอพอลิส	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg QE/g crude extract)
เฮกเซน	42.27
ไดคลอโรมีเทน	43.8
เอทิลอะซิเตด	96.57
เอทานอล	108.13

(a)



(b)



ภาพที่ 2 แสดงสีของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารสกัด Flavonoid กับโลหะ Al (a) และแสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย Quercetin

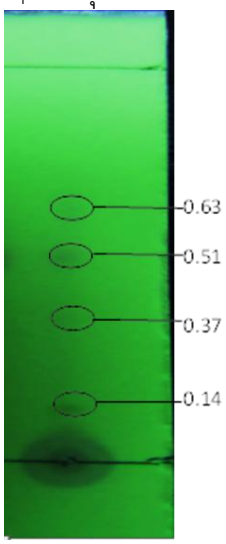
การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการสกัดฟลาโวนอยด์จากพรอพอลิส โดยได้ทำการศึกษาที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 40 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ด้วยการนำไปสกัดด้วยเทคนิค อัลตร้าโซนิคในตัวทำละลายเอทานอล จากนั้นนำไปวัดหาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium Chloride Colorimetry เช่นเดียวกับการศึกษาผลของตัวทำละลายต่อการสกัดสารฟลาโวนอยด์ในพรอพอลิส ซึ่งพบปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและรองลงมาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แต่ที่พบน้อยที่สุดที่อุณหภูมิห้องดังตารางที่ 3 ดังนั้นผลการศึกษาของอุณหภูมิต่อการสกัดสารพรอพอลิสได้ดีที่สุด คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการสกัดฟลาโวนอยด์

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg QE/g crude extract)
อุณหภูมิห้อง	41.23
40	85.8
60	84.5

3. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบฟลาโวนอยด์จากตัวทำละลายเอทานอลโดยการแยกด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีชนิด Silica gel 60 F_{254} ที่แช่ใน mobile phase ที่ประกอบด้วย Hexane : Ethyl acetate (70 : 30) และตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสารภายใต้แสงยูวี แล้วทำเครื่องหมายตรง solvent front วัดค่าของสารเคลื่อนที่แล้วนำมาคำนวณค่า Retention factor (R_f) หรือระยะการเคลื่อนที่ของสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอลเกิด โครมาโทแกรมดังภาพที่ 3 โดยเกิดการแยก 4 จุด ซึ่งมีค่า R_f จากจุดที่ 1 ถึง 4 ตามลำดับดังนี้ 0.14, 0.37, 0.51 และ 0.63



ภาพที่ 3 ภาพแสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอล บนแผ่น TLC ชนิด Silica gel 60 F_{254} ที่แช่ใน mobile phase ที่ประกอบด้วย Hexane : Ethyl acetate (70 : 30) แล้วส่องภายใต้แสงยูวี

4. ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดย*วิธี Escherichia coli*

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจะใช้ตัวอย่าง ดังนี้ สารสกัดหยาบฟลาโวนอยด์, สบู่ก้อนที่ผสมสารสกัดหยาบฟลาโวนอยด์, สบู่ก้อนที่ผสมพรอพอลิสจากรังชันโรงโดยตรง และสบู่ก้อนที่ไม่ผสมทั้งพรอพอลิสและสารสกัดฟลาโวนอยด์ โดยทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียชนิด

Escherichia coli ด้วยวิธี Disc diffusion techniques บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ใช้ Dimethyl Sulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลายและใช้เป็นตัว control ในการทดสอบ

การศึกษาการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Disc diffusion techniques บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) พบว่าสารสกัดที่ใช้ทดสอบทั้ง 4 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ โดยสารสกัดหยาบ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 16.05±0.6 มิลลิเมตร สำหรับสบู่ก้อนที่ผสมสารสกัดฟลาโวนอยด์ สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* รองลงมาโดยมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 13.79±1.4 มิลลิเมตร และสบู่ก้อนที่ผสมพรอพอลิสจากรังชันโรงโดยตรง มีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 13.49±0.7 มิลลิเมตร และสบู่ก้อนที่ไม่เติมทั้งพรอพอลิสและสารสกัด ยังคงสามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* มีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 13.38±0.3 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4 ตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ได้ดีที่สุด โดยดูจากอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ของสารสกัดแต่ละชนิด เทียบกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ negative control รองลงมาคือ สบู่ก้อนที่ผสมสารสกัดฟลาโวนอยด์ สบู่ก้อนที่ผสมพรอพอลิสโดยตรง ตามลำดับ เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในร่างกายของมนุษย์ โดยพบได้ในระบบทางเดินอาหาร เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และเชื้อบางสายพันธุ์ก่อโรคอุจจาระร่วง (วัชรินทร์ และคณะ, 2559)

หมายเหตุ :
ตำแหน่งที่ 1 สารสกัดหยาบฟลาโวนอยด์
ตำแหน่งที่ 2 สบู่ที่ผสมพรอพอลิสโดยตรง
ตำแหน่งที่ 3 สบู่ที่ผสมสารสกัด
ตำแหน่งที่ 4 สบู่ที่ผสมพรอพอลิสและไม่ผสมสารสกัด
ตำแหน่งที่ 5 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)

ภาพที่ 4 แสดง Inhibition zone ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ของสารสกัดทุกชนิดโดยวิธี Disc diffusion technique

สารสกัดที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (mean ± SD) (มิลลิเมตร) ต่อเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*
1. Crude Extract	16.05±0.6
2. สบู่ที่ใส่รังชันโรงโดยตรง	13.49±0.7
3. สบู่ที่ใส่สารสกัดฟลาโวนอยด์	13.79±1.4

4. สบู่ที่ไม่ใส่รังชันโรงและไม่ใส่สารสกัดฟลาโวนอยด์	13.38±0.3
5. DMSO (ตัวควบคุมผลลบ)	NI

หมายเหตุ: NI = no inhibition zone, เส้นผ่านศูนย์กลางของ Disc เท่ากับ 6 มิลลิเมตร

สรุปผล

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและตัวทำละลายในการสกัดสารฟลาโวนอยด์จากรังชันโรงด้วยการนำวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium Chloride Colorimetry พบว่าตัวทำละลายที่สกัดสารฟลาโวนอยด์ได้มากที่สุด คือ ตัวทำละลายเอทานอล ซึ่งสภาวะที่เหมาะต่อการสกัดสารฟลาโวนอยด์ คือ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาเป็นส่วนผสมของการทำสบู่ก้อน โดยเพิ่มความมีประสิทธิภาพของสบู่ก้อนด้วยการนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ผลปรากฏว่าสารสกัดหยาบ (Crude extracts) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย E.coli ได้ดีที่สุด โดยดูจากอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ของสารสกัดแต่ละชนิด เทียบกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ negative control รองลงมาคือ สบู่ที่ใส่สารสกัดฟลาโวนอยด์ สบู่ที่ใส่รังชันโรงโดยตรง และสบู่ที่ไม่ใส่รังชันโรงและไม่ใส่สารสกัดฟลาโวนอยด์ ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบบำรุงการศึกษา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ประจำปีงบประมาณ 2560

เอกสารอ้างอิง

ปาณิสรา ศรีทั่ง. 2551. ประสิทธิภาพของพรอพอลิสในการยับยั้งการเจริญของ Bacillus spp. สาขาจุลชีววิทยา.

วันเพ็ญ เจริญจิต. (2547). พรอพอลิสจากผึ้งผลิตภัณฑ์ธรรมชาติต้านโรค. ชมรมการจัดการทรัพยากรเกษตร. ค้นเมื่อ 19 กรกฎาคม 2559, จาก www. Matichon.co.th

ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย. (2008). พรอพอลิส: ของขวัญจากธรรมชาติ. สาขาวิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

สรจักร ศิริบริรักษ์. (2547). พรอพอลิสคืออะไร. Herbs for Health แพรว รายปักษ์ ปีที่ 26, ฉบับที่ 602, ผู้เชี่ยวชาญเภสัชสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข.

อัญชลี สาสดิ์ธรรม. (2556). มหัศจรรย์ชันโรง. พิมพ์ครั้งที่ 1, บริษัท ทริปเพิ้ล กรุ๊ป จำกัด. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญญบุรี.

Cushnie, T. P. T. and Andrew, J. L. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Antimicrobial Agents*. **26**: 343-356.

Fatoni, A., Artika, I. M., Hasan, A. E. and Kuswandi. 2008. Antibacterial Activity of Propolis Produced by *Trigona Spp*. Against *Campylobacter Spp*. *Bioscince*. **15(4)**: 161-164.

Gekker, G., Hu, S., Spivak, M., Lokensgard, J. R. and Peterson, P. K. 2005. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *Ethnopharmacology*. **102**: 158-163.

Keskin, N., Hazir, S., Baser, K. H. C. and Kurkcuoglu, M. 2001. antibacterial activity and chemical composition of turkish propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung C*. **56**: 1112-1115.

Kumazawa, S. H., Hamasaka, T. and Nakayama, T. S. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*. **84**: 329-339.

Segueni, N., Zellagui, A., Moussaoui, Lahouel, F., Lahouel, M. and Rhouati, S. 2016. Flavonoid from Algerian propolis. *Arabian Journal of chemistry*. **9**: S425- S428.