



โครงการ  
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ผลของสารสกัดอย่างหยาบจากพรอพอลิสของชันโรง *Tetragonula laeviceps* ที่มี  
ต่อการย่อยสลายดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Escherichia coli*  
Effect of crude extract of propolis from *Tetragonula laeviceps* on DNA  
degradation of bacteria *Escherichia coli*

ชื่อนิสิต นางสาวพิจามณูชู่ กวีผาดิ

เลขประจำตัว 5832051423

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้สำเร็จได้ตามเป้าหมาย เพราะได้รับความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการดำเนินการจากผู้มีพระคุณทั้งหลาย อาทิ

อาจารย์คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มอบวิชาความรู้และประสบการณ์อันมีค่า เป็นประโยชน์อย่างยิ่งมาตลอดสี่ปี

อาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร. จันทรพิชญ์ จันทรเจ้า ที่กรุณารับโครงการวิจัยของข้าพเจ้า ดูแลตั้งแต่เริ่มจนถึงปัจจุบัน ให้ความรู้คำปรึกษาในการค้นคว้าหาข้อมูล วิธีการทำการทดลอง ตรวจสอบแก้ไขการเขียนเรียบเรียงให้สมบูรณ์ขึ้น

พี่ ๆ ในแลป ที่ช่วยแนะนำการใช้เครื่องมือและให้คำแนะนำทางเทคนิคระหว่างทำการทดลอง

นอกจากนี้ ข้าพเจ้าขอขอบคุณครอบครัวและญาติมิตรทุกท่าน ที่มีส่วนสนับสนุนช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำโครงการเสมอมา ความรู้และประสบการณ์ที่ได้รับจากการทำโครงการนี้ ข้าพเจ้าสามารถนำไปใช้ได้ภายนอกหน้า ทั้งในการศึกษาต่อ การทำงาน และชีวิตประจำวัน ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการของข้าพเจ้าจะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจวิทยาศาสตร์ต่อไป

พิชามญช์ กวีผาดิ

## บทคัดย่อ

**Escherichia coli** เป็นแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารในมนุษย์ ส่วนเควอซิทิน เป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชและพรอพอลิสจากชันโรง สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษากิจกรรมต้านการเติบโตของแบคทีเรีย **E. coli top 10** ที่มีพลาสมิด **pGem-T vector** ของเควอซิทินที่ละลายใน **dimethyl sulfoxide (DMSO)** ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการเติบโตของของแบคทีเรียด้วยวิธี **disc diffusion assay** โดยความเข้มข้นของเควอซิทินที่เลือกใช้ในการทดลองนี้ คือ **0, 0.12, 0.24, 0.36** และ **0.48** กรัมต่อมิลลิลิตร จากการทำการทดลอง **3** ซ้ำ บันทึกผลของเส้นผ่านศูนย์กลางของ **clear zone** แล้ววิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของ **clear zone** แปรผันตามความเข้มข้นของเควอซิทิน ทั้งนี้ความเข้มข้นของเควอซิทินสูงสุดที่เลือกใช้ คือ **0.48** กรัมต่อมิลลิลิตรของ **DMSO** โดยให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของ **clear zone** กว้างที่สุด คือ **9.23 ± 0.15** มิลลิเมตร จึงเลือกใช้เควอซิทินที่ความเข้มข้นนี้มาเลี้ยงร่วมกับ **E. coli top 10** ใน **nutrient broth** จากนั้นนำไปบ่มที่ **37 °C, 130** รอบต่อนาทีเป็นเวลา **2** วัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่ามีการเติบโตของ **E. coli top 10** ในชุดควบคุมแต่ไม่มีการเติบโตของเชื้อเลยในชุดที่ได้รับเควอซิทินจึงไม่สามารถนำ **culture** ของเชื้อมาทำ **plasmid isolation** และ **agarose gel electrophoresis** เพื่อสังเกตการย่อยสลายพลาสมิดได้ ในการทดลองครั้งต่อไป จึงควรหาความเข้มข้นของเควอซิทินที่เหมาะสมต่อไป

**คำสำคัญ :** เควอซิทิน, clear zone, Escherichia coli

## Abstract

Escherichia coli are gram-negative pathogenic bacteria in human gut. Quercetin is a flavonoid compound found in plants and stingless bee propolis. It has a lot of bioactivities. In this work, it was focused on the antibacterial activity of quercetin on E. coli top 10 containing pGem-T vector by disc diffusion assay. Quercetin was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The chosen concentrations of quercetin were 0, 0.12, 0.24, 0.36 and 0.48 g/ml. From 3 replications in experiments, diameter of clear zone was recorded. Data were statistically analyzed by mean and standard deviation. According to the data, the diameter of clear zone was dependent on the concentration of quercetin. The highest concentration of 0.48 g/ml showed the widest diameter of clear zone of  $9.23 \pm 0.15$  mm. Thus, quercetin at this concentration was used to treat E. coli top 10 in nutrient broth at 37 °C, 130 rpm for 2 days. Considering the result, there was the growth of E. coli top 10 in control but not in the treated group at all. Hence, the quercetin treated culture could not be used for plasmid isolation and agarose gel electrophoresis. In the future, in order to observe the plasmid degradation, finding the optimal concentration of quercetin must be required.

**Keywords:** clear zone, Escherichia coli, quercetin

## สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อ .....	ข
<b>Abstract</b> .....	ค
สารบัญเรื่อง .....	ง
สารบัญรูป .....	จ
สารบัญตาราง .....	ฉ
บทที่ 1 บทนำและการทบทวนวรรณกรรม .....	1
บทที่ 2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย .....	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย .....	5
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	9
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย.....	16
เอกสารอ้างอิง .....	17

## สารบัญรูป

รูปที่ 1	แสดงผลการทำ gel electrophoresis.....	9
รูปที่ 2	กราฟวิเคราะห์ผลของเควอซิทินที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของ E. coli.....	14
รูปที่ 3	กราฟวิเคราะห์ผลของตัวทำละลายของเควอซิทินที่สามารถยับยั้งการเติบโตของ E. coli.....	14

## สารบัญตาราง

<b>ตารางที่ 1</b>	
ผลการวัดค่า <b>absorbance ratio</b> ของพลาสมิดดีเอ็นเอของ <b>transformed E. coli top 10</b> .....	9
<b>ตารางที่ 2</b>	
แสดงความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของ <b>E. coli</b> ของเคออสิทินในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ .....	10
<b>ตารางที่ 3</b>	
แสดงความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของ <b>E. coli</b> ของเคออสิทินใน <b>DMSO</b> ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ .....	10
<b>ตารางที่ 4</b>	
วิเคราะห์ผลของเคออสิทินในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของ <b>E. coli</b> ทางสถิติด้วยวิธี <b>One-way Analysis of Variance (ANOVA)</b> ที่ความเชื่อมั่น <b>95%</b> .....	11
<b>ตารางที่ 5</b>	
วิเคราะห์ผลของเคออสิทินใน <b>DMSO</b> ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของ <b>E. coli</b> ทางสถิติด้วยวิธี <b>One-way Analysis of Variance (ANOVA)</b> ที่ความเชื่อมั่น <b>95%</b> .....	12
<b>ตารางที่ 6</b>	
วิเคราะห์ผลของเคออสิทินในน้ำกลั่นและ <b>DMSO</b> ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของ <b>E. coli</b> ทางสถิติด้วยวิธี <b>Two-way Analysis of Variance (ANOVA)</b> ที่ความเชื่อมั่น <b>95%</b> .....	13
<b>ตารางที่ 7</b>	
ผลการบ่มพลาสมิดดีเอ็นเอ ข้อมูลจากการทดลอง <b>3</b> ซ้ำ.....	15

## บทที่ 1

### บทนำและการทบทวนวรรณกรรม

ในปัจจุบันโรคต่าง ๆ แพร่ระบาด ทำให้ประชากรเจ็บป่วย เสียชีวิต เสียสุขภาพจิต เสียค่าใช้จ่ายในการรักษา สาเหตุหนึ่งคือโรคที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย **Escherichia coli** ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งขนาด **1.1-1.5x 2.0-6.0** ไมโครเมตร ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ด้วย **flagella** เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและมีออกซิเจนน้อย สามารถพบได้ทั่วไปในลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่นและมนุษย์ รวมถึงในสิ่งแวดล้อม สามารถปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่ายไปยังอาหารได้ง่าย ประกอบไปด้วยกลุ่มที่ก่อโรคและกลุ่มที่ไม่ก่อโรคเช่น สายพันธุ์ **shiga toxin-producing E. coli (STEC)** สามารถผลิตสารพิษซิก้า เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วง โรคอาหารเป็นพิษและการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อช่องท้องอักเสบ ไส้ติ่งอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และโลหิตติดเชื้อ ในโรคอุจจาระร่วง ทำให้เกิดอาการถ่ายเหลว คลื่นไส้ อาเจียน ปวดบิด ถ่ายเป็นมูกเลือด เป็นไข้ต่ำ อาจมีอาการแทรกซ้อนรุนแรงก่อให้เกิด **hemolytic uremic syndrome (HUS)** ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ไตวายอาจมีอาการแทรกซ้อนทางสมอง กล้ามเนื้อกระดูก และเสียชีวิตได้ (World Health Organization, 2018)

ในประเทศไทย ปีพ.ศ. 2553 สำนักระบาดวิทยาได้รับรายงานการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจากทั่วประเทศจำนวน 62 เหตุการณ์ โดยพบมากที่สุดที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ข้อมูลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร จากห้องปฏิบัติการฝ่ายตรวจวินิจฉัยแบคทีเรียทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ประจำปี พ.ศ. 2553 จำนวน 59 ตัวอย่าง จาก 7 จังหวัด พบแบคทีเรียก่อโรค 28 ตัวอย่าง คิดเป็น 47.5% โดยเป็น E.coli ถึง 23.73% (กระทรวงสาธารณสุข, 2554)

ในการกำจัดหรือต้านการเติบโตของ **E. coli** นั้น มักใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นสารเคมีที่ตกค้างในร่างกายได้ ก่อให้เกิดการดื้อยาของ **E. coli** และมีราคาสูง การใช้ผลิตภัณฑ์ผึ้งจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่ดี เพราะผึ้งเป็นแมลงเศรษฐกิจและยังให้ผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์จำนวนมาก ได้แก่ น้ำผึ้ง เกสรผึ้ง นมผึ้ง ไขผึ้ง พิษผึ้ง พรอพอลิส ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ถูกนำมาใช้เป็นยาแผนโบราณในหลายท้องถิ่น ทั้งในประเทศไทย อินเดีย ประเทศในแถบยุโรป อียิปต์ มีงานวิจัยต่อยอดเพื่อนำผลิตภัณฑ์ผึ้งมาใช้ในเชิงการแพทย์ทางเลือกจำนวนมาก โดยพบว่าพรอพอลิสได้รับความสนใจมากเป็นอย่างยิ่งในยุโรป ช่วงศตวรรษที่ 17 และ 20 (Wagh, 2013)

โดยทั่วไป พรอพอลิสมีลักษณะเป็นยางเหนียว มีทั้งสีเขียวย เหลือง แดง ไปจนถึงน้ำตาลเข้ม เป็นสารที่ผึ้งงานเก็บมาจากยางไม้หรือของเหลวที่ได้จากต้นไม้ผสมกับเอนไซม์และไขผึ้ง เพื่อปิดช่องโหว่ของรังทั้งด้านนอกและด้านใน ป้องกันการเปียกชื้น และห่อหุ้มรังศัตรูที่เข้ามาตายในรังและไม่สามารถนำออกไปทิ้งนอกรังได้ ไม่ให้เกิดการเน่าเหม็นและก่อโรคต่อผึ้ง ทั้งแบคทีเรีย ไวรัส และรา ชาวกรีกเรียกว่า **propolis** มาจากคำว่า **pro** แปลว่า



ก่อน polis แปลว่าเมือง รวมแล้วแปลว่าป้องกันเมือง ฮิปพอกراطีส บิดาแห่งการแพทย์นำพรอพอลิสมาใช้รักษาบาดแผลและฝีทั้งภายในและภายนอก พิตาเนียส ไดออสคوريدีส ได้กล่าวถึงการใช้พรอพอลิสรักษาแผลอักเสบ แผลตกสะเก็ด ผื่นผิวหนัง และอาการไอในหนังสือ *De material Medica* (Kuropatnicki et al., 2013)

ความแข็งของพรอพอลิสขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ พรอพอลิสจะมีลักษณะเหนียวระหว่างอุณหภูมิ 25-45 องศาเซลเซียส หากแข็งจะแข็งตัว เมื่ออุณหภูมิมากกว่า 45 องศาเซลเซียสจะเหนียวขึ้น จะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส และมีจุดหลอมเหลวกว่า 100 องศาเซลเซียส สามารถละลายได้ในน้ำ เมทานอล เอทานอล คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน อีเทอร์ และ อะซิโตน พรอพอลิสมีคุณสมบัติที่ใช้ในการแพทย์ได้หลากหลาย ด้านจุลชีพ ด้านอนุมูลอิสระ ด้านการเจริญของเนื้องอก ด้านการอักเสบ ด้านโปรโตซัว ป้องกันดับจากสารพิษ ลดระดับน้ำตาลในเลือด เพิ่มภูมิคุ้มกัน รักษาการติดเชื้อของช่องคลอด อาการผดผื่นในสตรี และใช้เป็นวัสดุทางทันตกรรม (Wagh, 2013)

ส่วนประกอบของพรอพอลิสขึ้นอยู่กับพืชในภูมิภาคนั้น ๆ และเวลาที่เก็บ ประกอบไปด้วย เรซิน 40-50% ไขมัน 30% น้ำมันหอมระเหย 5-10% สารประกอบฟีนอลิก 3-10% โดยพบสารฟลาโวนอยด์เป็นจำนวนมาก โดยอาจรวมตัวระหว่างสารประกอบฟีนอลด้วยกัน หรือรวมอยู่ในรูปของหมู่แอลคิลและหมู่ฟีนิลเอสเทอร์ (Batlas et al., 2016) สารออกฤทธิ์หลักทางชีวภาพในพรอพอลิสแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ 1) caffeic acid phenethyl ester (CAPE) พบในพรอพอลิสแถบยุโรป เอเชีย นิวซีแลนด์ 2) artemillin C (ARC) เป็นพรอพอลิสบราซิลสีเขียว และพรอพอลิสบราซิลสีแดง ซึ่งจะพบสารฟลาโวนอยด์จำเพาะ เช่น ไอโนเซมบริน ไดซิน และ ไบโอบาคานิน (de Castro et al., 2011)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญคือสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิกพบในส่วนต่างๆ ของพืช ใบ เปลือกไม้ ผลไม้ เมล็ด ไรโซม มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวน ที่เป็นอนุพันธ์ของวงแหวนเบนซีน มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่ มีสารต้านอนุมูลอิสระ ด้านแบคทีเรีย และออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถป้องกันและรักษาโรคได้หลากหลาย เช่น โรคเบาหวาน โรคตับ โรคอ้วน โรคความดันโลหิตสูงโรคกระดูกพรุน โรคหลอดเลือด และโรคไขข้อ (Kala et al., 2016) โดยสารประกอบฟีนอลิกจะไปยับยั้งความสามารถในการซ่อมแซมดีเอ็นเอของแบคทีเรีย กลุ่มไฮดรอกซิลและอิเล็กตรอนที่เคลื่อนที่ได้ของสารประกอบฟีนอลิกจะทำให้เกิดความไม่เสถียรของเยื่อหุ้มเมมเบรน เกิดการตายของเซลล์โดยเปลี่ยนระดับพลังงานขับเคลื่อนโปรตอนทั่วเยื่อหุ้มเมมเบรน (Ankolekar, 2013)

ส่วนฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลิก ประเภทฟอลิฟีนอล มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนแอโรมาติก ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล รวมอยู่ในโมเลกุล ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป มีโครงสร้าง benzo-y-pyrone สามารถละลายในน้ำได้ ส่วนใหญ่มักพบอยู่รวมกับน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ มีสาร apigenin, galangin, flavone และ flavonol, glycosides, isoflavones, flavanones และ chalcones ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบจาก

แบคทีเรีย (Kumar and Pandey, 2013) โดยฟลาโวนอยด์จะเข้าผ่านเข้าช่องของเยื่อหุ้มเมมเบรนและชักนำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ (Du et al., 2017)

เคอควิทิน ( $C_{15}H_{10}O_7$ ) เป็น 1 ใน 6 subclasses ของฟลาโวนอยด์ที่สำคัญ พบได้ในพืชและพรอพอลิส มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองเข้ม มีรากศัพท์มาจากภาษาละตินคือ **quercetum** สามารถละลายได้น้อยในน้ำ ละลายได้มากในไขมันและแอลกอฮอล์ มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการแข็งตัวของหลอดเลือด ต้านการอักเสบ ต้านสารก่อมะเร็ง ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ปกป้องระบบประสาท ได้รับการรับรองความปลอดภัย GRAS (Generally Recognized As Safe) จึงเป็นที่นิยมในการใช้รักษาโรค (Jaisinghani, 2017) ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแทบทุกสายพันธุ์ โดยเฉพาะแบคทีเรียในทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ ระบบขับถ่าย ผิวหนัง (David et al., 2016)

Dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นสารอินทรีย์ที่มีขี้ผึ้ง ไม่มีสี กลิ่นคล้ายกระเทียม มีคุณสมบัติในการขนส่งโมเลกุลขนาดเล็กผ่านเยื่อหุ้มและแนวกันที่หลากหลายนาน DMSO ถูกนำมาใช้เป็นตัวทำละลายในทางการเภสัชศาสตร์ เนื่องจากทำละลายได้ดีทั้งสารมีขี้ผึ้งและไม่มีขี้ผึ้ง อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นตัวยา (Capriotti and Capriotti, 2012)

การย่อยสลายดีเอ็นเอ (DNA degradation) คือการสลาย **phosphodiester bond** หรือพันธะ **phosphodiester** ภายในสาย DNA และ/หรือการสลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างสาย DNA ทำให้ DNA ถูกทำลายลง อาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น ได้รับความร้อน สารเคมี หรือรังสีบางชนิด ทำให้เซลล์นั้นไม่สังเคราะห์โปรตีนอีก การทำลายในลักษณะนี้เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ แบบที่เรียกว่า **apoptosis** เป็นการตายของเซลล์โดยเซลล์มีการหดตัวเล็กลง นิวเคลียสแตกออกเป็นชิ้น (Kawane et al., 2014)

จะเห็นได้ว่า พรอพอลิสสามารถต้านแบคทีเรียก่อโรคได้ อย่างไรก็ตาม ยังขาดข้อมูลในส่วนที่ว่ามีการย่อยสลาย DNA ของแบคทีเรียหรือไม่ จึงเลือกศึกษาการออกฤทธิ์ของพรอพอลิสต่อการย่อยสลายพลาสมิด DNA ของ *E.coli* ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

## บทที่ 2

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อทำการศึกษาผลของสารสกัดเควอซิทินบริสุทธิ์ที่มีต่อการย่อยสลายดีเอ็นเอ (DNA degradation) ของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่ก่อโรคในมนุษย์

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. ทำการเลี้ยงแบคทีเรีย **Escherichia coli**

การทดลองนี้ใช้ **E. coli strain top 10**

##### เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง **nutrient agar (NA)** ด้วย **NA Himedia 14** กรัม น้ำกลั่น **500** มิลลิลิตร
2. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว **nutrient broth (NB)** ด้วย **NB Conda 4** กรัม น้ำกลั่น **500** มิลลิลิตร
3. นำ **NA** และ **NB** ไปทำให้ปลอดเชื้อโดย **autoclave** ที่อุณหภูมิ **121** องศาเซลเซียส เป็นเวลา **15** นาที ที่ความดัน **15** ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
4. เก็บ **NB** ในอุณหภูมิห้อง
5. เติมน้ำ **NA** ที่อุ่นแล้วลงในจานเพาะเชื้อ **20** ใบปริมาณพอประมาณใน **laminar flow** รอจนแห้งตัว เก็บที่ **4** องศาเซลเซียส

##### ทำการ **heat shock transformation**

นำ **pGEM-T easy vector (50 ng)** 1 ไมโครลิตร มาบ่มกับ **culture** ของ **E. coli top 10** ปริมาตร **50** ไมโครลิตร ที่ **4** องศาเซลเซียส เป็นเวลา **30** นาที แล้วนำไปทำ **heat shock** ที่ **42** องศาเซลเซียส **40** วินาที และนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา **5** นาที ทำการเติมน้ำ **NB** ปริมาตร **200** มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลิน **100** ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไป **incubate** ที่ **37** องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า **130** รอบต่อนาที เป็นเวลา **12** ชั่วโมงหลังจากนั้นทำการเพาะเชื้อใน **NA** โดยเตรียมจานเพาะเชื้อที่มี **NA** แล้ว **2** จาน หยด **transformed culture** ลงจานละ **100** ไมโครลิตร ทำการ **sterile** ฆ่าเชื้อที่ **spreader** ด้วยความร้อนจากตะเกียงแอลกอฮอล์ก่อนใช้ทุกครั้ง ปล่อยให้เย็นแล้วทำการเกลี่ยเชื้อให้ทั่วจานจากนั้นนำไป **incubate** **37** องศาเซลเซียสข้ามคืน ทำการสังเกตโคโลนีเดี่ยว ๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ **NA**

## คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว

ทำการ sterile ข่าเชื้อที่ **needle loop** ด้วยความร้อนจากตะเกียงแอลกอฮอล์ ปล่อยให้เย็นใช้ **needle loop** เชี่ยโคโลนีให้ติดขึ้นมาเล็กน้อย แล้วใส่ลงใน **NB** ปริมาตร **250** มิลลิลิตรนำไป **incubate** ที่ **37** องศาเซลเซียส ที่อัตราการเขย่า **130** รอบต่อนาที เป็นเวลา **12** ชั่วโมง

## ทำ **plasmid purification**

ใช้ชุด **QIAGEN Plasmid Mini Kit (Cat No./ID: 12123, Qiagen)** ขั้นตอนต่าง ๆ มีดังนี้

1. นำหลอด **eppendorf** ที่บรรจุ **culture** 4 หลอด ๆ ละ **1** มิลลิลิตรไป **centrifuge** **15** นาที ที่อัตราเร็ว **8,000** รอบต่อนาที ดูดส่วนใสทิ้ง
2. ทำการ **lysis** ด้วย **buffer ATL 300** ไมโครลิตรต่อหลอด ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกด้วย **vortex auto** รวมตัวอย่างให้เหลือ **2** หลอด
3. เติม **buffer P2 300** ไมโครลิตรต่อหลอด ผสมสารด้วยเทคนิคกลับ **invert** หัวท้าย **4-6** ครั้งแล้ว บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา **5** นาที
4. เติม **buffer P3 300** ไมโครลิตรต่อหลอด ผสมสารด้วยเทคนิคกลับ **invert** หัวท้าย **4-6** ครั้งแล้วบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา **5** นาที
5. นำไป **centrifuge** **10** นาที ที่อัตราเร็ว **13,000** รอบต่อนาที
6. ปิเปตส่วนใสมาใส่ใน **spin column** นำไป **centrifuge** **60** วินาทีที่อัตราเร็ว **13,000** รอบต่อนาที ทิ้งส่วน **flow through**
7. ล้าง **column** ด้วย **buffer PB 500** ไมโครลิตร นำไป **centrifuge** **60** วินาทีที่อัตราเร็ว **13,000** รอบต่อนาที ทิ้งส่วน **flow through**
8. ล้าง **column** ด้วย **buffer PE** นำไป **centrifuge** **60** วินาทีที่อัตราเร็ว **13,000** รอบต่อนาที ทิ้งส่วน **flow through**
9. ทำการชะพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น **50** ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง **60** วินาที และ **centrifuge** **60** วินาที ที่อัตราเร็ว **13,000** รอบต่อนาที นำส่วน **elution** ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ **260** และ **280** นาโนเมตร
10. เก็บส่วน **elution** ที่ **-20** องศาเซลเซียส

## เตรียม glycerol stock

เตรียม eppendorf ที่ปลอดเชื้อจำนวน 10 หลอด เติมหีสเฮอร์อลที่ปลอดเชื้อ 500 ไมโครลิตร และ culture ของ transformed E. coli 500 ไมโครลิตร ทำการผสมสารด้วยเทคนิค pipette up and down เก็บเชื้อแบคทีเรียไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## วัดค่า absorbance ratio

วัดค่า absorbance ratio ระหว่าง A 260 ต่อ A 280 ของพลาสมิดด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น Genesys 10 series ทำการเจือจางพลาสมิด 200 เท่าในน้ำกลั่น ใช้พลาสมิด 5 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 995 ไมโครลิตร ผสมโดยการ vortex, นำไป centrifuge แบบ quick spin เติมน้ำที่ได้ออกในแก้วควอตซ์ 800 ไมโครลิตร บันทึกผล

## ทำ gel electrophoresis

1. ชั่ง OmniPuragarose gel 0.32 กรัม นำไปผสมกับ 1X TBE buffer 40 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำเข้าไมโครเวฟเป็นเวลา 1 - 2 นาที รอจนอุ่น
2. เทลงใน tray, ใส่ comb, ทิ้งไว้จนอุ่นแห้งตัว แล้วจึงเติม 1X TBE buffer เป็น running buffer ให้ท่วมแผ่นวุ้น
3. ผสม 6X DNA loading dye 2 ไมโครลิตร กับ plasmid E. coli top 10 5 ไมโครลิตรและ Ecodeye 2 ไมโครลิตรลงบนแผ่นพาราฟิน ใช้เทคนิค pipette up and down ให้สารเข้ากัน
4. ปิเปตสาร 9 ไมโครลิตร ลงใน well ของแผ่นวุ้น
5. ใช้ 100bp DNA ladder เป็น marker
6. ต่อสายเข้ากับเครื่อง EPS-300 X ตั้งค่าที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที นำไปส่องใต้รังสี ultraviolet บันทึกผลที่ได้

## 2. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านการเติบโตของ E. coli

เตรียม quercetin ความเข้มข้นต่าง ๆ

1. เตรียมหลอด eppendorf 5 หลอด
2. เติม quercetin SIGMA ปริมาณ 0, 0.002, 0.004, 0.006, 0.008 กรัม ลงในแต่ละหลอดตามลำดับ
3. เติมน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร

4. ทำขั้นตอนย่อยที่ 1-2 ซ้ำ แต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น dimethyl sulfoxide (DMSO) 500 ไมโครลิตร
5. เก็บสารไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### ใช้วิธี disc diffusion assay

1. ทำการเกลี่ย transformed E. coli top 10 culture ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ในจานแก้วที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้แห้ง
2. จากนั้นนำแผ่น paper disc จุ่มลงในสารละลายเคอวอซิทินตามความเข้มข้นที่เตรียมไว้ วาง paper disc ลงบน NA กดเบา ๆ
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่พบแบคทีเรีย (clear zone) ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย vernier caliper
4. ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ นำเสนอข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี One-way Analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ โดยพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 95% ( $p < 0.05$ )

### 3. ตรวจสอบการย่อยสลายพลาสติกดีเอ็นเอ E. coli

ทำการบ่มพลาสติกดีเอ็นเอร่วมกับสารละลายเคอวอซิทิน โดยใช้ค่าความเข้มข้น 0.004 กรัม/มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นตัวควบคุม มีขั้นตอนการเตรียมสารที่ใช้ 2 ชุด ดังนี้

1. เตรียมชุด control ด้วย NB 30 มิลลิลิตร, E. coli glycerol stock 100 ไมโครลิตร
2. เตรียมชุด treatment ด้วย NB 29 มิลลิลิตร, E. coli glycerol stock 100 ไมโครลิตร, สารละลายเคอวอซิทินใน DMSO 1 มิลลิลิตรที่มีเคอวอซิทิน 0.012 กรัม

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 คืน

จากนั้นหยดเชื้อที่ได้รับการบ่มลงในจานเพาะเชื้อชุดละ 3 ใบ ๆ ละ 100 ไมโครลิตร ทำการ sterile ฆ่าเชื้อ spreader ก่อนใช้เกลี่ยเชื้อลงบน NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน บันทึกผลที่ได้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 1. การเลี้ยงเชื้อ **transformed Escherichia coli top 10**

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย **transformed E. coli top 10** ใน NB พบว่าหลังนำไปบ่ม culture จะมีลักษณะขุ่นขึ้น และเมื่อนำไปเลี้ยงบน NA จะพบโคโลนีมีลักษณะเป็นสีขาว เมื่อทดลองทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอของ **transformed E. coli top 10** ได้ผลดังในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการวัดค่า **absorbance ratio** ของพลาสมิดดีเอ็นเอของ **transformed E. coli top 10**

plasmid	Abs 260	Abs 280	Abs 260 / 280
1 (control)	0.000	0.000	0.000
2	0.010	0.007	1.429
3	0.001	0.002	0.500

จากตารางที่ 1 ผลการวัดค่า **absorbance ratio** ของพลาสมิดดีเอ็นเอของ **transformed E. coli top 10** พบว่าในหลอดที่ 2 และ 3 เป็น 1.429 และ 0.500 ตามลำดับ เมื่อนำพลาสมิดดีเอ็นเอของ **transformed E. coli top 10** มาทำ **agarose gel electrophoresis** ได้ผลดังในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงผลการทำ gel electrophoresis



## 2. การตรวจสอบฤทธิ์ด้านการเติบโตของ *E. coli*

ตารางที่ 2 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของ *E. coli* ของเควอซิทินในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ เควอซิทิน (กรัม/มิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลาง <b>clear zone</b> (มิลลิเมตร)			
	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	$\bar{A} \pm SD$
<b>0</b>	7.20	7.30	7.15	$7.22 \pm 0.08$
<b>0.12</b>	8.10	8.10	7.50	$7.90 \pm 0.35$
<b>0.24</b>	8.65	8.60	8.65	$8.63 \pm 0.03$
<b>0.36</b>	8.75	8.65	8.60	$8.67 \pm 0.08$
<b>0.48</b>	8.85	8.65	8.90	$8.80 \pm 0.13$

หมายเหตุ เมื่อทดสอบการทดลองจริงได้เพิ่มเวลา **incubate** เป็น 2 คืน เนื่องจากผลในคืนที่ 1 สังเกตได้ไม่ชัดเจน

จากตารางที่ 2 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของ *E. coli* ของเควอซิทินในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าเควอซิทินในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0, 0.12, 0.24, 0.36 และ 0.48 กรัม/มิลลิลิตร หลังผ่านการบ่มจะทำให้เกิดเส้นผ่านศูนย์กลาง **clear zone** ที่  $7.22 \pm 0.08$ ,  $7.90 \pm 0.35$ ,  $8.63 \pm 0.03$ ,  $8.67 \pm 0.08$  และ  $8.80 \pm 0.13$  มิลลิเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 3 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของ *E. coli* ของเควอซิทินใน DMSO ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ เควอซิทิน (กรัม/มิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลาง <b>clear zone</b> (มิลลิเมตร)			
	<b>B5</b>	<b>B2</b>	<b>B3</b>	$\bar{B} \pm SD$
<b>0</b>	7.20	7.45	7.15	$7.27 \pm 0.16$
<b>0.12</b>	8.35	8.30	8.20	$8.28 \pm 0.08$

<b>0.24</b>	8.55	8.35	8.55	8.48 ± 0.12
<b>0.36</b>	8.65	8.75	8.65	8.68 ± 0.06
<b>0.48</b>	9.20	9.10	9.40	9.23 ± 0.15

จากตารางที่ 3 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของ *E. coli* ของเควอซิทินใน DMSO ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าเควอซิทินในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0, 0.12, 0.24, 0.36 และ 0.48 กรัม/มิลลิลิตร หลังผ่านการบ่มจะทำให้เกิดเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone ที่  $7.27 \pm 0.16$ ,  $8.28 \pm 0.08$ ,  $8.48 \pm 0.12$ ,  $8.68 \pm 0.06$  และ  $9.23 \pm 0.15$  มิลลิเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4 วิเคราะห์ผลของเควอซิทินในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของ *E. coli* ทางสถิติด้วยวิธี One-way Analysis of Variance (ANOVA) ที่ความเชื่อมั่น 95%

ANOVA					
Source	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F	Sig.
Between groups	4	5.439	1.3560	45.328	.000
Within groups	10	.300	0.03		
Total	14	5.739			

ความเข้มข้นของเควอซิทิน (กรัม/มิลลิลิตร)	$\bar{A} \pm SD$	Tukey HSD
<b>0</b>	$7.22 \pm 0.08$	a
<b>0.12</b>	$7.90 \pm 0.35$	b

<b>0.24</b>	8.63 ± 0.03	c
<b>0.36</b>	8.67 ± 0.08	c
<b>0.48</b>	8.80 ± 0.13	c

จากตารางที่ 4 ค่า Sig. มีค่าเท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงยอมรับว่าค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone อย่างน้อย 2 ความเข้มข้นมีค่าแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Tukey HSD ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกัน หมายความว่า ค่าเฉลี่ยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 5 วิเคราะห์ผลของเควอซิทินใน DMSO ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของ E. coli ทางสถิติด้วยวิธี One-way Analysis of Variance (ANOVA) ที่ความเชื่อมั่น 95%

ANOVA					
Source	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F	Sig.
Between groups	4	6.238	1.559	108.797	.000
Within groups	10	.143	.014		
Total	14	6.381			

ความเข้มข้นของเควอซิทิน (กรัม/มิลลิลิตร)	$\bar{B} \pm SD$	Tukey HSD
<b>0</b>	7.27 ± 0.16	a
<b>0.12</b>	8.28 ± 0.08	b
<b>0.24</b>	8.48 ± 0.12	bc

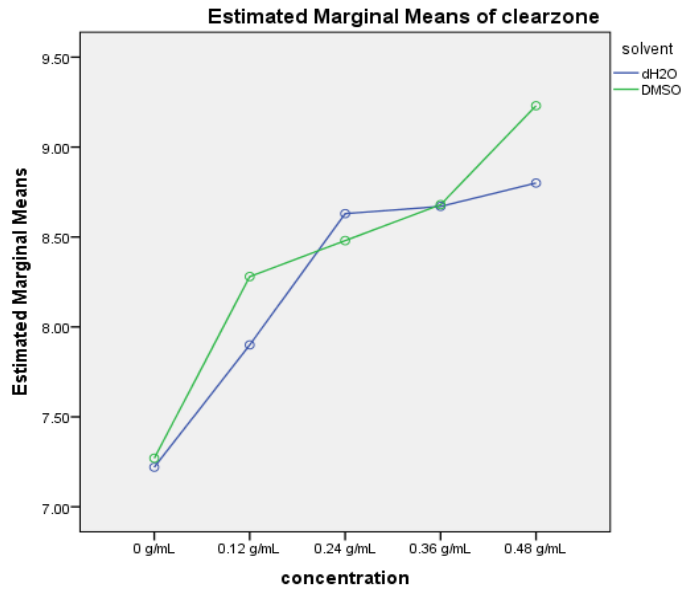
<b>0.36</b>	$8.68 \pm 0.06$	<b>c</b>
<b>0.48</b>	$9.23 \pm 0.15$	<b>d</b>

จากตารางที่ 5 ค่า **Sig.** มีค่าเท่ากับ **0.000** ซึ่งน้อยกว่า **0.05** จึงยอมรับว่าค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลาง **clear zone** อย่างน้อย 2 ความเข้มข้นมีค่าแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ **Tukey HSD** ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกัน หมายความว่า ค่าเฉลี่ยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น **95%**

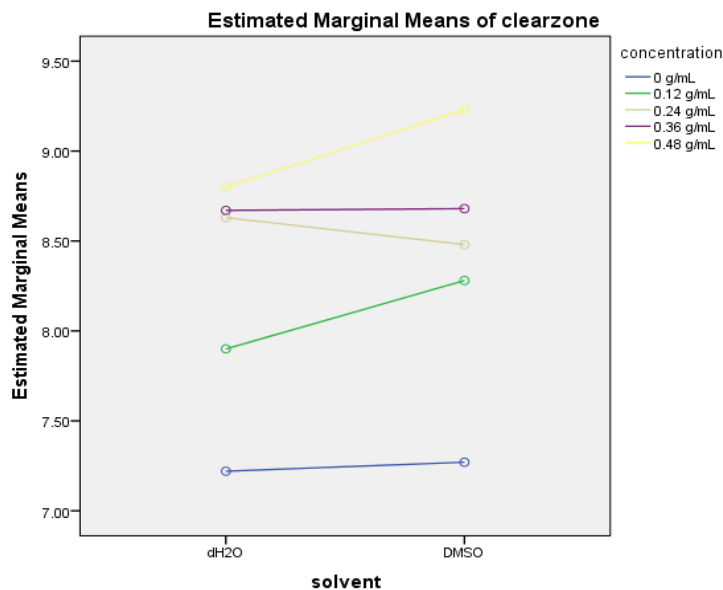
ตารางที่ 6 วิเคราะห์ผลของเคอวอซิทินในน้ำกลั่นและ **DMSO** ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของ **E. coli** ทางสถิติด้วยวิธี **Two-way Analysis of Variance (ANOVA)** ที่ความเชื่อมั่น **95%**

<b>ANOVA</b>					
<b>Source</b>	<b>Degrees of freedom</b>	<b>Sum of squares</b>	<b>Mean square</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>Intercept</b>	2075.008	1	2075.008	60584.185	.000
<b>Concentration</b>	11.298	4	2.825	82.470	.000
<b>Solvent</b>	.161	1	.161	4.710	.040
<b>Error</b>	.822	24	.034		
<b>Total</b>	2087.290	30			

จากตารางที่ 6 ค่า **Sig.** ของ **concentration** มีค่าเท่ากับ **0.000** ซึ่งน้อยกว่า **0.05** จึงยอมรับว่าค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลาง **clear zone** อย่างน้อย 2 ความเข้มข้นมีค่าแตกต่างกัน ค่า **Sig.** ของ **solvent** มีค่าเท่ากับ **0.040** ซึ่งน้อยกว่า **0.05** จึงยอมรับว่าค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลาง **clear zone** ในตัวทำละลายที่ต่างกันมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น **95%**



รูปที่ 2 กราฟวิเคราะห์ผลของเควอซิทีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของ *E. coli*



รูปที่ 3 กราฟวิเคราะห์ผลของตัวทำละลายของเควอซิทีนที่สามารถยับยั้งการเติบโตของ *E. coli*

### 3. ตรวจสอบการย่อยสลายพลาสติกดีเอ็นเอ *E. coli*

ในชุด treatment ผู้วิจัยเลือกใช้เควอซิทีนที่มีความเข้มข้นสูงสุดที่เลือกใช้ซึ่งมีความเข้มข้น 0.48 กรัม/มิลลิลิตร แต่เนื่องจากชุด treatment ไม่มีการเจริญของ *E. coli* เลย จึงไม่สามารถนำไปตรวจสอบการย่อยสลายพลาสติกดีเอ็นเอได้

ตารางที่ 7 ผลการบ่มพลาสมิดดีเอ็นเอ ข้อมูลจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ชุดการทดลอง	การเติบโตของ <b>E. coli</b>
ชุด <b>control</b>	มี
ชุด <b>treatment</b>	ไม่มี

จากตารางที่ 7 แสดงผลการบ่มพลาสมิดดีเอ็นเอ ข้อมูลจากการทดลอง 3 ซ้ำ พบว่าในชุด **control** มีการเติบโตของ **E. coli** และในชุด **treatment** ไม่มีการเติบโตของ **E. coli** ทั้ง 3 ซ้ำ

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

แบคทีเรีย *E. coli* สามารถเจริญเติบโตได้เร็ว ค่าการดูดกลืนแสงหาจากตารางที่ 1 ค่า Abs260/280 หลอดที่ 2 อยู่ที่ 1.429 หลอดที่ 2 อยู่ที่ 0.500 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีน เมื่อนำไปทำ gel electrophoresis ก็ให้ผลดังรูปที่ 1 ซึ่งแถบดีเอ็นเอสังเกตุได้ไม่ชัดเจน ทั้งนี้อาจเกิดจากข้อผิดพลาดของผู้ทดลอง หรือชุดเครื่องมือที่ใช้ไม่เหมาะสม

จากการศึกษาการหาความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของ *E. coli* ของเควอซิทินให้ผลดังตารางที่ 2 และตารางที่ 3 คือเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone แปรผันตามความเข้มข้นของเควอซิทิน ผลการวิจัยนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Torres et al. (2018) ที่รายงานว่า สารสกัดพอลิฟอสฟอไรต์จากชั้นโรงมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ขึ้นอยู่กับปริมาณฟลาโวนอยด์ ซึ่งเควอซิทินเป็น สารประกอบที่ให้ประสิทธิภาพสูง (Ristivojević et al, 2016) โดยจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย เซลล์แบคทีเรีย เกิดการรั่ว

เมื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 22 พบว่าได้ผลดังตารางที่ 4 ตารางที่ 5 และตารางที่ 6 กล่าวคือ DMSO มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวทำละลายเพราะละลายได้ง่าย และยังสามารถกระตุ้นประสิทธิภาพของเควอซิทินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งความเข้มข้นที่ให้ผลการยับยั้งการเติบโตของ *E. coli* ที่ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ 0.48 กรัม/มิลลิลิตร จึงเลือกใช้ไปตรวจสอบการย่อยสลาย พลาสมิดดีเอ็นเอ

หลังจากนำสารชุด control และ treatment ไปทำการเพาะเชื้อ เมื่อผ่านไป 2 คืนพบว่าในชุด control มีการเจริญของ *E. coli* โดยสังเกตุได้จากการขึ้นตะกอนขาวขุ่น แต่ในชุด treatment ไม่มีการเจริญของ *E. coli* เมื่อสังเกตุด้วยตาเปล่า กล่าวคือสารมีลักษณะเป็นสีเหลืองเข้มตามสีของเควอซิทินแต่ไม่มีตะกอนของเชื้อ และเมื่อนำไปเลี้ยงบน NA ได้ผลตามตารางที่ 7 คือ *E. coli* ในชุด control สามารถเจริญได้ตามปกติ แต่ในชุด treatment ไม่สามารถเจริญได้เลย จึงไม่สามารถนำ culture ของเชื้อมาทำ plasmid isolation และ agarose gel electrophoresis เพื่อสังเกตุการย่อยสลายพลาสมิดดีเอ็นเอได้ ในการทดลองครั้งต่อไปจึงควรหาความเข้มข้นของเควอซิทินที่เหมาะสมต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงสาธารณสุข, กรมควบคุมโรค, สำนักระบาดวิทยา 2554. การติดตามการระบาดของเชื้อ Escherichia coli ปีพ.ศ. 2554. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์, 2554.
- Ankolekar C. 2013. Lactic Acid Bacteria Mediated Phenolic Bioactive Modulation From Fruit Systems For Health Benefits. University of Massachusetts Amherst ScholarWorks@UMass Amherst.
- Batlas N, Karaoglu SA, Tarakci C, Kolayli S. 2016. Effect of propolis in gastric disorders: inhibition studies on the growth of *Helicobacter pylori* and production of its urease. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 31:46-50.
- Capriotti K, Capriotti JA. 2012. Dimethyl sulfoxide:history, chemistry and clinical utility in dermatology. Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology. 5: 24–26.
- David DVA, Arulmoli R, Parasuraman S. 2016. Overviews of biological importance of quercetin: a bioactive flavonoid. Pharmacognosy Reviews. 10: 84–89.
- de Castro PA, Savoldi M, Bonatto D, Barros MH, Goldman MH, Berretta AA, Goldman GH. 2011. Molecular characterization of propolis-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryotic Cell. 10:398-411.
- Du YK, Liu J, Li XM, Pan FF, Wen ZG, Zhang TC, Yang PL. 2017. Flavonoids extract from *Portulaca oleracea* L. induce *Staphylococcus aureus* death by apoptosis-like pathway. International Journal of Food Properties. 20: S534-S542.
- Jaisinghani RN. 2017. Antibacterial properties of quercetin. Microbiology Research. doi: 10.4081/mr.2017.6877.
- Kala H, Mehta R, Tandey R, Sen KK, Mandal V. 2016. Ten years of research on phenolics (2005–2015): a status report. Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering. 18: 1-4.
- Kawane K, Motani K, Nagata S. 2014. DNA Degradation and Its Defects. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. New York.
- Kumar S, Pandey AK. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. ScientificWorldJournal. doi: 10.1155/2013/162750.



- Kuopatnicki AK, Szliszka E, Krol W. 2013. Historical aspects of propolis research in modern times. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. doi: 10.1155/2013/964149.
- Ristivojević P, Dimkić I, Trifković J, Berić T, Vovk I, Milojković-Opsenica D and Stanković S. 2016. Antimicrobial activity of Serbian propolis evaluated by means of MIC, HPTLC, bioautography and chemometrics. Public Library of Science One. doi: 10.1371/journal.pone.0157097.
- Torres AR, Sandjo LP, Friedemann MT, Tomazzoli MM, Maraschin M, Mello CF and Santos ARS. 2018. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Meliponaquadrifasciata* and *Tetragoniscaangustula* stingless bees. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 51:e7118.
- Wagh VD. 2013. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. Advances in Pharmacological Sciences. doi: 10.1155/2013/308249.
- World Health Organization, E. coli, fact sheet, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>, 2018. (Access 27 March 2018).