

ผลของสารสกัดจาก *Spirulina platensis* ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และฤทธิ์
ต้านอนุมูลอิสระ



วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

กรกฎาคม 2566

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

ผลของสารสกัดจาก *Spirulina platensis* ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

กรกฎาคม 2566

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

EFFECT OF *SPIRULINA PLATENSIS* EXTRACT ON INHIBITION OF MICROORGANISMS AND
ANTIOXIDANTS



JIDAPA KOEWONG

A Thesis Submitted to University of Phayao
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Master of Science Degree in Environmental Science
July 2023

Copyright 2023 by University of Phayao

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของสารสกัดจาก *Spirulina platensis* ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ของ จิตาภา กอวงศ์

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

ของมหาวิทยาลัยพะเยา

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ดร. ทัดพร คุณประดิษฐ์)

ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

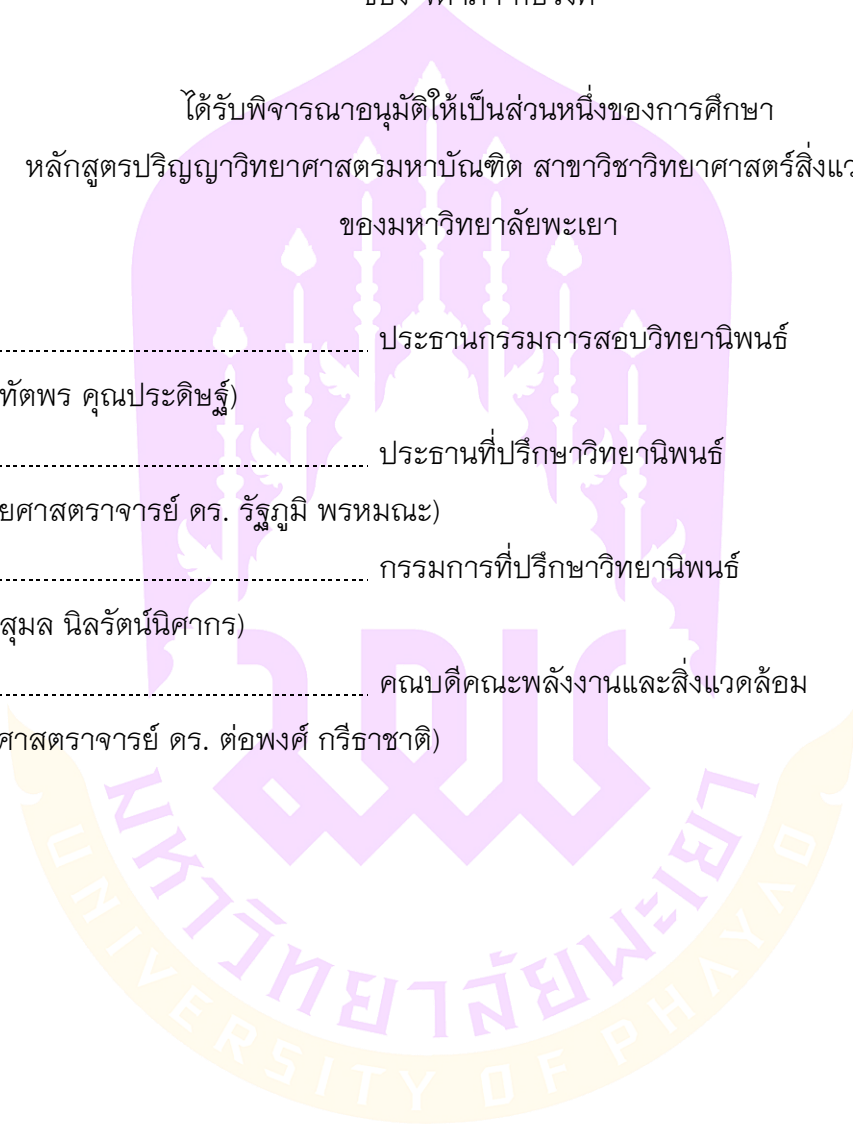
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิมลภูมิ พรหมณะ)

กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ดร. สุมล นิลรัตน์นิศากร)

คณบดีคณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ต่อพงศ์ กวีธาชาติ)



เรื่อง:	ผลของสารสกัดจาก <i>Spirulina platensis</i> ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ผู้วิจัย:	จิตาภา กอวงศ์, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2566
อาจารย์ที่ปรึกษา:	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัฐภูมิ พรหมณะ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.สุมล นิลรัตน์นิศากร
คำสำคัญ:	สารสกัด <i>Spirulina platensis</i> , กระบวนการเป็นมิตรต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม, ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสไปรูลินาต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยกระบวนการสกัดที่เป็นมิตรต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม พร้อมกับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยสกัดผงสไปรูลินาด้วยตัวทำละลายต่างกัน 6 ชนิด ได้แก่ น้ำและเอทานอล 95% อัตราส่วน 3:1, น้ำและเอทานอล 95% อัตราส่วน 1:1, น้ำและเอทานอล 95% อัตราส่วน 1:3, น้ำ, เอทานอล 95% และเมทานอล ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีเพียงสารสกัดจากน้ำและเอทานอล 95% ในอัตราส่วน 1:1 3:1 และ 1:3 ที่สามารถ ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ ตามลำดับ ซึ่ง *Ps. aeruginosa* ถือเป็นเชื้อที่อันตรายและทำให้เกิดอัตราการเสียชีวิตสูง ดังนั้นสารสกัดสไปรูลินาจึงเป็นทางเลือกสำหรับควบคุมหรือยับยั้งเพื่อลดความอันตรายของเชื้อนี้ได้ และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ของสารสกัดจากสไปรูลินาด้วยเทคนิค TLC (Silica gel, 100% เมทานอล) พบว่าสารสกัดสไปรูลินากลุ่มที่แสดงการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *Ps. aeruginosa* มีองค์ประกอบของจุดสารที่ค่า R_f 0.15 ซึ่งไม่พบในกลุ่มที่ไม่ออกฤทธิ์ จึงอนุมานได้ว่าสารชนิดนี้มีองค์ประกอบทางเคมีที่แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Ps. aeruginosa* และสันนิษฐานได้ว่าเป็นสารในกลุ่มแอลคาลอยด์เมื่อทดสอบด้วย Dragendroff's reagent ทั้งยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยสารละลาย DPPH ด้วย เทคนิค TLC ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงรายงานผลเป็นค่า IC_{50} (ug/ml) พบว่าสารสกัดสไปรูลินาที่ใช้ น้ำและเอทานอลอัตราส่วน 1:3 ให้ผลการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมาคือ 3:1 และ 1:1 ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุของสารสกัดสไปรูลินาพบว่าที่ใช้น้ำเป็นตัวสกัดให้ปริมาณไฟโคไซยานินสูงสุด ส่วนที่ใช้เอทานอลและเมทานอลเป็นตัวสกัดให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์สูง แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของปริมาณรงควัตถุในตัวทำละลายที่ต่างกันได้อย่างชัดเจน ซึ่งถือว่าเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคต นอกจากนี้ยังสามารถใช้ TLC fingerprint เข้ามาช่วยในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพอย่างง่ายสำหรับการสกัดสารจากสไปรูลินาได้อีกด้วย

Title: EFFECT OF *SPIRULINA PLATENSIS* EXTRACT ON INHIBITION OF MICROORGANISMS AND ANTIOXIDANTS

Author: JIDAPA KOEWONG, Thesis: M.S. (Environmental Science), University of Phayao, 2023

Advisor: Assistant Professor Dr. Rattapoom Prommana Co–advisor Dr.SUMOL NILRATNISAKON

Keywords: Spirulina platensis Extract, Environmental friendly, Inhibition Microbes, Antioxidants

ABSTRACT

This study aims to determine the efficacy of *Spirulina platensis* extracts on microbial inhibition and antioxidative activity based on green solvent and green chemistry with chemical composition analysis. The *Spirulina* was extracted with six different solvents, i.e. water, 95% ethanol, methanol, water and 95% ethanol ratio 3:1, 1:1 and 1:3. As the results, only extracts from water and 95% ethanol in the ratios of 1:1, 3:1 and 1:3 were able to inhibit *Ps. aeruginosa* respectively. *Ps. aeruginosa* was considered a resistant strain and causes a high mortality rate. Therefore, *Spirulina* extract may be an alternative for control or inhibition in order to reduce the hazard of infection. The chemical composition analysis of *spirulina* extract by TLC technique (Silica gel, 100% methanol) found that *Spirulina* extracts showed activity against *Ps. aeruginosa* with Rf 0.15, which were not found in all inactive extracts. So, it was indicated that the compound was an active compound against *Ps. aeruginosa*. Moreover, the compound at Rf 0.15 assumed was an alkaloid by Dragendroff's reagent test and also showed DPPH antioxidant activity with the TLC technique. The antioxidant activity test of ABTS and DPPH by absorbance was reported as IC₅₀ (ug/ml) so it was found that *spirulina* extracts using water and ethanol at the ratio of 1:3 gave the best antioxidant activity, followed by 3:1 and 1:1, respectively. Analysis of the pigment content of the *Spirulina* extract was found the highest phycocyanin content using water extraction. While, ethanol and methanol as an extractant gave high amounts of chlorophyll A and carotenoids. This clearly showed the difference in the amount of pigment in different solvents which was useful for application in the future. In addition, TLC fingerprint could also be used to facilitate simple qualitative analysis for *S. spirulina* extracts.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความสามารถอย่างยิ่งจากสมเด็จพระกนิษฐาธิราชเจ้า กรมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มีพระมหากรุณาธิคุณแก่นักเรียนในพระราชานุเคราะห์สืบเนื่องโดยลำดับ และผู้วิจัยเป็นผู้หนึ่งที่ได้รับพระราชทานทุนการศึกษาตลอดหลักสูตร จึงรู้สึกซาบซึ้งในพระเมตตาธิคุณอย่างหาที่สุดมิได้ ที่การจัดทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงด้วยดี และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.รัฐภูมิ พรหมณะ และที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.อัศจรรย์า ยศบุญเรือง ที่อนุเคราะห์การวางแผน ควบคุม ดูแลการทำวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจสอบ แก้ไข ให้คำแนะนำจนการศึกษานี้สำเร็จสมบูรณ์ ขอขอบคุณประธานกรรมการสอบ ดร.ทัตพร คุณประดิษฐ์ และกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.สุมล นิลรัตน์นิศากร ที่ให้ความกรุณาเป็นคณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งเพื่อให้การศึกษานี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบคุณ ดร.ตงเดช สวาสดีพันธ์ อาจารย์ประจำหลักสูตรเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้คำแนะนำด้านเทคนิควิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC) ตลอดจนช่วยแก้ไขเนื้อหาในการเผยแพร่งานวิจัยของการศึกษานี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการคณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่าง ๆ ในการปฏิบัติการ ตลอดจนอาจารย์เจ้าหน้าที่ประจำคณะพลังงานและสิ่งแวดล้อมที่คอยแนะนำแนวทาง และติดตามความก้าวหน้าของวิทยานิพนธ์ตลอดมา ขอขอบคุณนายพิทักษ์พงษ์ หอมมาน ที่คอยให้คำปรึกษา แนะนำ และให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัยจนลุล่วง เหนือสิ่งอื่นใดขอขอบคุณคุณพ่อคุณแม่ คนในครอบครัว และกัลยาณมิตรทุกท่านที่คอยดูแล ใส่ใจ และเป็นกำลังใจตลอดมา คุณค่าอันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบอุทิศแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะก่อประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจสืบไป จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

จิตาภา กอวงศ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
สมมติฐานของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ประวัติความเป็นมาของ <i>Spirulina platensis</i>	5
ลักษณะสัณฐานทางชีววิทยาของสาหร่าย <i>Spirulina platensis</i>	6
ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับ <i>Spirulina platensis</i>	6
รงควัตถุ (pigments) ของ <i>spirulina platensis</i>	7
การใช้ประโยชน์จากสาหร่าย <i>spirulina platensis</i>	11
จุลินทรีย์.....	12
จุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normal Flora)	13
ความสำคัญของจุลินทรีย์ที่นำมาศึกษา	16

อนุมูลอิสระ (Free Radical).....	19
สารต้านอนุมูลอิสระ.....	20
แหล่งที่พบสารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร.....	21
ค่า IC ₅₀	21
ผลกระทบของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (VOCs)	23
การสกัด (extraction).....	25
การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลินทรีย์.....	25
เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography, TLC)	26
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	30
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	35
กลุ่มตัวอย่าง.....	35
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	35
วิธีดำเนินงาน.....	37
การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ.....	43
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	45
สารสกัดจากสไปรูulinaในตัวทำละลายที่ต่างกัน.....	45
การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ โดยวิธี agar well diffusion.....	46
การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารสกัด และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย สารละลาย DPPH โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC).....	49
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ของสารสกัดสไปรูulina	52
การวิเคราะห์องค์ประกอบรงควัตถุของสารสกัดสไปรูulina.....	53
บทที่ 5 บทสรุป.....	58
สรุปผล.....	58

อภิปรายผล.....	58
บรรณานุกรม	65
ภาคผนวก	90
ภาคผนวก ก ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดสไปรูลินา.....	91
ภาคผนวก ข ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดสไปรูลินา	96
ภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์รงควัตถุของสารสกัดสไปรูลินา	101
ภาคผนวก ง ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของสาหร่ายและแบคทีเรีย	102
ภาคผนวก จ เปรียบเทียบสีของสารสกัด <i>Spirulina platensis</i> ในตัวทำละลายที่ต่างกัน....	103
ภาคผนวก ฉ ภาพประกอบการทำวิจัย	104
ประวัติผู้วิจัย	111



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ลักษณะและปริมาณของสารสกัดที่ได้จากผงสไปรูลีนา 100 กรัม ในตัวทำละลายที่ต่างกัน	45
ตาราง 2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของสารสกัดสไปรูลีนา ด้วยวิธี agar well diffusion	48
ตาราง 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ของสารสกัดสไปรูลีนา.....	52
ตาราง 4 การวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (Correlation) เพื่อหาความสัมพันธ์ของสารสกัดจาก สไปรูลีนา (<i>S. platensis</i>) ในตัวทำละลายที่ต่างกันต่อปริมาณรงควัตถุ	57
ตาราง 5 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดสไปรูลีนาในตัวทำละลายน้ำต่อเอทานอล อัตราส่วน 3:1	91
ตาราง 6 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดสไปรูลีนาในตัวทำละลายน้ำต่อเอทานอล อัตราส่วน 1:1.....	92
ตาราง 7 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดสไปรูลีนาในตัวทำละลายน้ำ ต่อเอทานอล อัตราส่วน 1:3.....	93
ตาราง 8 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของ Vitamin C.....	94
ตาราง 9 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของ Trolox.....	95
ตาราง 10 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดสไปรูลีนาในตัวทำละลายน้ำต่อเอทานอล อัตราส่วน 3:1.....	96
ตาราง 11 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดสไปรูลีนาในตัวทำละลายน้ำต่อเอทานอล อัตราส่วน 1:1	97
ตาราง 12 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดสไปรูลีนาในตัวทำละลายน้ำต่อเอทานอล อัตราส่วน 1:3.....	98
ตาราง 13 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของ Vitamin C.....	99
ตาราง 14 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของ Trolox.....	100

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1	สัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีโปรลูลินา <i>Spirulina platensis</i>	6
ภาพ 2	โครงสร้างทางเคมีของคลอโรฟิลล์ (Chemical structure of Chlorophyll)	8
ภาพ 3	โครงสร้างทางเคมีของบีตาแคโรทีน (Chemical structure of β -Carotene)	9
ภาพ 4	โครงสร้างทางเคมีของ ซี ไฟโคไซยานิน (Chemical structure of	10
ภาพ 5	การดูดแสงของรงควัตถุในช่วงคลื่นต่าง ๆ	11
ภาพ 6	แสดงแหล่งที่พบสารต้านอนุมูลอิสระได้ในอาหาร	21
ภาพ 7	ตัวอย่างกราฟความเข้มข้น (แกนนอน) และผลการตรวจวัด (แกนตั้ง)	22
ภาพ 8	แสดงสารสำคัญจากการสกัดน้ำมันหอมระเหยจาก <i>Spirulina platensis</i>	28
ภาพ 9	ตัวอย่างการหาค่า R_f ของโครมาโทแกรม	39
ภาพ 10	แผนผังการทดลอง	44
ภาพ 11	ตัวอย่างการไม่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของสารสกัดหยาบจากสีโปรลูลินา	46
ภาพ 12	ตัวอย่างการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ของสารสกัด	47
ภาพ 13	การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารสกัดโดยเทคนิค TLC	50
ภาพ 14	การทดสอบแอลคาลอยด์ด้วยสารละลาย Dragendroff's reagent โดยเทคนิค TLC	51
ภาพ 15	การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH โดยเทคนิค TLC	51
ภาพ 16	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ในสารสกัดสีโปรลูลินา (<i>Spirulina platensis</i>) ในตัวทำ	54
ภาพ 17	ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมในสารสกัดสีโปรลูลินา (<i>Spirulina platensis</i>) ในตัวทำ	55
ภาพ 18	ปริมาณกลุ่มไฟโคบิลินในสารสกัดสีโปรลูลินา (<i>Spirulina platensis</i>) ในตัวทำ	56
ภาพ 19	การสร้างกราฟเพื่อหาค่า ABTS (IC_{50} μ g/ml) ของสารสกัดสีโปรลูลินาในตัวทำ	91
ภาพ 20	การสร้างกราฟเพื่อหาค่าการยับยั้ง ABTS (IC_{50} μ g/ml) ของสารสกัดสีโปรลูลินา	92
ภาพ 21	การสร้างกราฟเพื่อหาค่าการยับยั้ง ABTS (IC_{50} μ g/ml) ของสารสกัดสีโปรลูลินา	93

ภาพ 22 การสร้างกราฟเพื่อหาค่าการยับยั้ง ABTS (IC ₅₀ µg/ml) ของ Vitamin C.....	94
ภาพ 23 การสร้างกราฟเพื่อหาค่าการยับยั้ง ABTS (IC ₅₀ µg/ml) ของ Trolox.....	95
ภาพ 24 การสร้างกราฟเพื่อหาค่า DPPH (IC ₅₀ µg/ml) ของสารสกัดสไปรูลินาในตัวทำ.....	96
ภาพ 25 การสร้างกราฟเพื่อหาค่า DPPH (IC ₅₀ µg/ml) ของสารสกัดสไปรูลินาในตัวทำ.....	97
ภาพ 26 การสร้างกราฟเพื่อหาค่า DPPH (IC ₅₀ µg/ml) ของสารสกัดสไปรูลินาในตัวทำ.....	98
ภาพ 27 การสร้างกราฟเพื่อหาค่าการยับยั้ง DPPH (IC ₅₀ µg/ml) ของ Vitamin C.....	99
ภาพ 28 การสร้างกราฟเพื่อหาค่าการยับยั้ง DPPH (IC ₅₀ µg/ml) ของ Trolox	100
ภาพ 29 สาหร่าย <i>Spirulina platensis</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย	102
ภาพ 30 แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X	102
ภาพ 31 เปรียบเทียบสีของสารสกัด <i>Spirulina platensis</i> ในตัวทำละลายที่ต่างกัน	103
ภาพ 32 เตรียมสารละลายและทำการแช่ผงสไปรูลินา	104
ภาพ 33 กรองสารสกัดสไปรูลินาที่ผ่านการแช่ด้วยตัวทำละลาย	104
ภาพ 34 การระเหยแห้งตัวทำละลาย และการชั่งน้ำหนักสารสกัดสไปรูลินาที่ได้	105
ภาพ 35 ทดสอบการยับยั้งเชื้อด้วยวิธี agar well diffusion	105
ภาพ 36 การทำจุดสารสกัดไว้บนแผ่น TLC	106
ภาพ 37 การนำแผ่น TLC จุ่มในตัวทำละลาย เพื่อให้ตัวทำละลายพาสารเคลื่อนที่	106
ภาพ 38 การนำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร.....	106
ภาพ 39 การย้อมแผ่น TLC ด้วยสารละลาย PMA reagent.....	107
ภาพ 40 การย้อมแผ่น TLC ด้วยสารละลาย Dragendroff's reagent	107
ภาพ 41 การย้อมแผ่น TLC ด้วยสารละลาย DPPH.....	108
ภาพ 42 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของสารสกัดสไปรูลินา.....	108
ภาพ 43 การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมของสารสกัดสไปรูลินา	109
ภาพ 44 การวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มไฟโคบิลินของสารสกัดสไปรูลินา	109
ภาพ 45 การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ.....	110

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สไปรูลินา (*Spirulina platensis*) เป็นไซยาโนแบคทีเรีย ที่กำเนิดบนโลกมาหลายล้านปี มีขนาดเล็ก เป็นพวกโปรคาริโอต ไม่มีนิวเคลียสและผนังเซลล์ สามารถสังเคราะห์แสงได้เอง และให้ออกซิเจนแก่บรรยากาศ พบได้ทั่วไปในน้ำ ดิน บริเวณชื้นแฉะ (HABIB et al., 2008) อีกทั้งมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลาย และมีคุณค่าทางโภชนาการที่โดดเด่น เนื่องจากมีคุณค่าทางสารอาหารที่สูง เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน กรดไขมันจำเป็น โอเมกา 3 และ 6 มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว แร่ธาตุ และยังมีรงควัตถุที่มีประโยชน์และสำคัญหลายชนิด ประกอบไปด้วย คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) และไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Liu et al., 2011) สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคชนิดที่ดื้อยาได้ บางชนิด (Kamble et al., 2013 ; Sarada et al., 2011) เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* ซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาสและก่อโรคตามร่างกาย และผิวหนัง (Usharani, 2015) เนื่องจากในปัจจุบันพบการดื้อยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น สาเหตุเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่ถูกวิธี และการดื้อต่อยาต้านยังส่งผลต่อการรักษาโรคทั้งในคนและในสัตว์ ทำให้อาการของโรคเพิ่มขึ้น รวมถึงอัตราการตายที่เพิ่มขึ้น และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการรักษาอีกด้วย (Tomlin et al., 1999) ดังนั้นสารสกัดจากพืชถือเป็นแหล่งทางเลือกที่สำคัญ สำหรับการพัฒนายารักษาโรคติดเชื้อ และจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากพืชหลายชนิดมีฤทธิ์ยับยั้ง เชื้อก่อโรคได้ (มณฑล วิสุทธิ, 2560) สไปรูลินาถือเป็นแหล่งสำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และสามารถต้านทานแบคทีเรียได้ (El-Sheekh, 2008) คุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีนั้นต้องไม่ส่งผลกระทบต่อหรือมีผลข้างเคียงน้อยที่สุด แต่ปัจจุบันการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมักใช้ตัวทำละลายที่อันตรายและส่งผลกระทบต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม รวมทั้งการดำเนินงานที่ขาดความรับผิดชอบและไม่คำนึงถึงผลกระทบต่อสุขภาพหลัง ฉะนั้นผู้วิจัยได้ตระหนักถึงความสำคัญของการดำเนินงานที่คำนึงถึงความปลอดภัยในการใช้สารเคมี ต้องไม่เป็นพิษหรือก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งคำนึงถึงการป้องกันหรือลดการปล่อยสารเคมีที่เป็นพิษออกสู่สิ่งแวดล้อม (ณปภัช พิมพ์ดี, 2560)

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสไปรูลินาโดยใช้น้ำและเอทานอลในอัตราส่วนที่ต่างกันในการสกัด เพราะน้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ช่วยพัฒนาสิ่งแวดล้อม ไร้มลพิษ มีโมเลกุลของออกซิเจนเป็นส่วนประกอบสูง เป็นมิตรต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม จากนั้นนำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ และยับยั้งเชื้อก่อโรคหลายชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans*

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากสไปรูลินาในตัวทำละลายที่ต่างกันต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากสไปรูลินาในตัวทำละลายที่ต่างกันต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ
3. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากสไปรูลินาในตัวทำละลายที่ต่างกันต่อปริมาณรงควัตถุ

สมมติฐานของการวิจัย

1. สารสกัดสไปรูลินาในตัวทำละลายที่ต่างกัน ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ต่างกัน
2. สารสกัดสไปรูลินาในตัวทำละลายที่ต่างกัน ให้ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ต่างกัน
3. สารสกัดสไปรูลินาในตัวทำละลายที่ต่างกัน ให้ปริมาณรงควัตถุที่ต่างกัน

ขอบเขตของการวิจัย

1. ขอบเขตด้านเนื้อหา
 - 1.1 ตัวอย่างสาหร่ายที่ใช้ในการวิจัย คือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สาหร่ายสายพันธุ์ *Spirulina platensis* ลักษณะเส้นสายบิดเกลียว (Spiral filament) ได้รับหัวเชื้อจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดเชียงใหม่ แล้วนำมาขยายชีวมวลในห้องปฏิบัติการคณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารมาตรฐานซาร์รูด (MZ) ภายใต้แสง LED แสงขาว ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ เปิดตลอด 24 ชั่วโมง
 - 1.2 สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผงสไปรูลินา โดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันได้แก่

- 1.2.1 น้ำ RO และเอทานอล 95% อัตราส่วน 3:1
- 1.2.2 น้ำ RO และเอทานอล 95% อัตราส่วน 1:1
- 1.2.3 น้ำ RO และเอทานอล 95% อัตราส่วน 1:3
- 1.2.4 น้ำ RO
- 1.2.5 เอทานอล 95%
- 1.2.6 เมทานอล
- 1.3 ทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์
 - 1.3.1 เชื้อที่นำมาทดสอบ
 - 1.3.2 *Staphylococcus aureus*
 - 1.3.3 *Staphylococcus epidermidis*
 - 1.3.4 *Escherichia coli*
 - 1.3.5 *Pseudomonas aeruginosa*
 - 1.3.6 *Candida albicans*
 - 1.3.7 ทดสอบการยับยั้งเชื้อโดยวิธี Agar well diffusion method
- 1.4 วิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยวิธี Thin layer chromatography; TLC
 - 1.4.1 การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม
 - 1.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัด
 - 1.4.3 ทดสอบการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH
- 1.5 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสไปรูลินา โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง
 - 1.5.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS
 - 1.5.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH
- 1.6 วิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ ได้แก่
 - 1.6.1 คลอโรฟิลล์ เอ
 - 1.6.2 แคโรทีนอยด์รวม
 - 1.6.3 ไฟโคไซยานิน
- 1.7 การวิเคราะห์ข้อมูลของผลการทดลองโดยการใช้สถิติ
2. ขอบเขตด้านพื้นที่
 - 2.1 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสไปรูลินา ที่ห้องปฏิบัติการคณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา

2.2 การทดสอบการยับยั้งต่อเชื้อจุลชีพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่ห้องปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา

2.3 การวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยวิธี Thin layer chromatography; TLC ที่ห้องปฏิบัติการคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

3. ขอบเขตด้านระยะเวลา

3.1 ระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาตั้งแต่ กุมภาพันธ์ พ.ศ.2564 ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2565 รวมระยะเวลา 1 ปี 8 เดือน

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสไปรูulinaเบื้องต้น
2. ทราบชนิดและสัดส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายที่สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสไปรูulinaที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้
3. ทราบชนิดและสัดส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายที่สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสไปรูulinaสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด
4. ได้ตัวทำละลายที่เป็นมิตรต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม
5. สามารถนำผลจากงานวิจัยในครั้งนี้ไปต่อยอด วิจัย เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประวัติความเป็นมาของ *Spirulina platensis*

Spirulina platensis อยู่ใน Division Cyanophyta หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue-green algae, Cyanobacteria) เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำประเภทโปรคาริโอตที่มีขนาดเล็กไม่มีนิวเคลียสและไม่มีผนังเซลล์ พบได้ทั่วไป ไม่ว่าจะในน้ำ บนดิน หรือบริเวณชื้นแฉะ จัดเป็นแบคทีเรีย แต่มีลักษณะที่แตกต่างจากแบคทีเรียตรงที่มีคลอโรฟิลล์ เอ จึงมีความสามารถในการสังเคราะห์แสงได้และให้ออกซิเจนออกมา และจากการศึกษาซากดึกดำบรรพ์หรือฟอสซิล (Fossil) และหลักฐานอื่น ๆ กล่าวได้ว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เป็นสิ่งมีชีวิตที่ถือกำเนิดขึ้นบนโลกเป็นพวกแรกและยังผลิตออกซิเจนให้กับบรรยากาศ สามารถพบสาหร่ายชนิดนี้ได้ทั่วไป ไม่ว่าจะในเขตหนาว เขตร้อน ในน้ำ บนบก ที่แห้งแล้ง หรือบนยอดเขาสูง (กาญจนภาชน์ ลีวมโนมนต์, 2527)

มนุษย์นำสาหร่ายสไปรูลินามาเป็นอาหารตั้งแต่ 800 กว่าปีก่อนพุทธกาล โดยพบหลักฐานว่าชนเผ่า Aztecs ที่อยู่ในประเทศเม็กซิโก เก็บสาหร่ายจากทะเลสาบมาเป็นอาหาร และในปี พ.ศ. 2370 พบว่าสไปรูลินามาเป็นอาหารประจำเผ่า Kanembu ที่อาศัยอยู่ในประเทศชาด โดยเก็บสาหร่ายที่เจริญในธรรมชาติตามทะเลสาบชาดด้วยตะกร้าใช้ช้อนสาหร่าย แล้วนำไปตากแห้ง บดเป็นผง แล้วนำไปใส่ในขนมปัง หรือในซूप (Venkataraman, 1983) ต่อมาในปี พ.ศ. 2387 นักวิทยาศาสตร์ได้ตั้งชื่อสไปรูลินาว่า *Spirulina jennei platensis* เป็นชื่อวิทยาศาสตร์ ต่อมาในปี พ.ศ. 2509 ศาสตราจารย์ สิริโรชิ นาคารมูระ ชาวญี่ปุ่น เริ่มทำวิจัยเกี่ยวกับสไปรูลินา และในปี พ.ศ. 2516 สไปรูลินาได้รับประกาศให้เป็นอาหารที่ดีที่สุด สำหรับอนาคต (The best food tomorrow) ในงานประชุมองค์การ อาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FOU) (กรีนไทมอนด์, 2544)

ก่อนหน้ามีเกิดความสับสนของการใช้ชื่อสาหร่ายในจีนี่สนี้ระหว่างชื่อ *Spirulina* หรือ *Arthrospira* โดย (Tamaselli, 1997) ได้กล่าวไว้ว่าในปี ค.ศ. 1989 ได้จัดให้อยู่ในจีนี่สน *Arthrospira* ตามการจัดและตั้งชื่อจีนี่สไว้ในปี ค.ศ. 1852 อยู่ใน Order Oscillatoriales พอศึกษาถึงถึงปีซีส์ในปี ค.ศ. 1892 จึงได้ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Arthrospira platensis* แต่ในปี ค.ศ. 1925-1932 ได้เปลี่ยนชื่อจีนี่สนของสาหร่ายเป็น *Spirulina* เพราะข้อเท็จจริงว่าเป็นสาหร่ายในจีนี่สนเดียวกัน

ลักษณะพื้นฐานทางชีววิทยาของสาหร่าย *Spirulina platensis*

Spirulina platensis มีอนุกรมวิธาน ดังนี้ (Bold and Wynne, 1978 และ Venkataraman, 1983)

Kingdom: Monera

Division: Cyanophyta

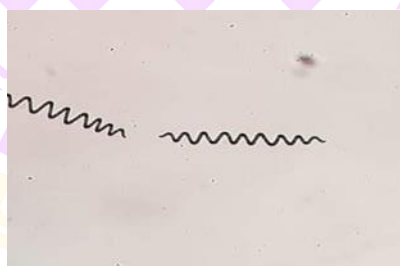
Order: Cyanophyceae

Family: Oscillatoriaceae

Genus: *Spirulina*

Species: *Spirulina platensis*

สาหร่าย *Spirulina platensis* จัดอยู่ในกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือที่เรียกว่าไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) และเป็นสิ่งมีชีวิตในประเภทโพรคาริโอต (Prokaryote) มีคลอโรฟิลล์ที่ช่วยในการสังเคราะห์แสง มีลักษณะรูปร่างเป็นทรงกระบอกตลอดทั้งสายปลายทั้งสองข้างมีลักษณะโค้งมน ประกอบด้วยเซลล์หลายๆเซลล์เรียงต่อกันเป็นสายปิดเป็นเกลียว ไม่แตกแขนง เรียกว่า ไตรโคม (Trichomes) มีความกว้างของเกลียว 2-4 ไมโครเมตร มีความยาวของไตรโคม 300-500 ไมโครเมตร มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยขาดออกเป็นท่อน ๆ (Fragmentation) ในแต่ละท่อนจะเกิดการแบ่งเซลล์เป็นเซลล์ใหม่จึงทำให้ไตรโคมยืดยาว มีการลอยตัวได้ดีเนื่องจากมีเม็ดอากาศ (gas vacuole) มีเม็ดสี (pigments) ที่หลากหลายและสำคัญ ได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ, ปีตาแคโรทีน, เบตาแคโรทีน, เมกโซแซนโทฟิลล์, ซีเอแซนทิน, ซีไฟโคไซยานิน, ออลโลไฟโคไซยานิน ซึ่งมีสีน้ำเงิน (เจียมจิตต์ บุญสม, 2531)



ภาพ 1 ลักษณะพื้นฐานทางชีววิทยาของสาหร่ายสไปรูลินา *Spirulina platensis*

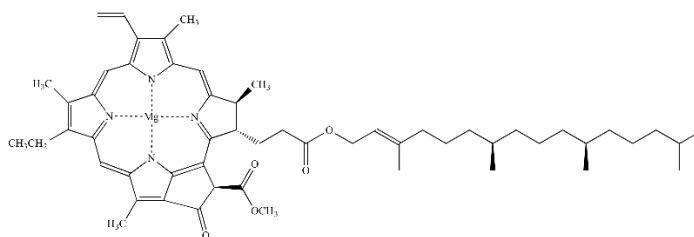
ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับ *Spirulina platensis*

สาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina*) มีหลายชนิด โดยเฉพาะ *Spirulina platensis* มีความสำคัญสำหรับการทดลองวิจัยและมีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อนำมาเป็นอาหาร

ของคนและสัตว์ (เจียมจิตต์ บุญสม, 2531) มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลาย และมีคุณค่าทางโภชนาการที่โดดเด่น เนื่องจากมีคุณค่าทางสารอาหารที่สูง เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน กรดไขมันจำเป็น โอเมกา 3 และ 6 มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว แร่ธาตุ และยังมีรงควัตถุที่มีประโยชน์และสำคัญหลายชนิด ประกอบไปด้วย คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) และไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) ที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Liu et al., 2011) คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) มีผลต่อการเจริญของสัตว์และแบคทีเรีย การหายใจ การเผาผลาญอาหาร การทำงานของฮอร์โมน กระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดง และการกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย (Pulz and Gross, 2004) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นสารสีเหลือง แบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ แคโรทีน (carotene) และแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ยังมีกลุ่มย่อยที่สำคัญคือ แอสตาแซนทีน (astaxanthin) นิยมเติมแอสตาแซนทีนลงในอาหารสัตว์ ทั้งสัตว์บก และสัตว์น้ำเพื่อให้ผลผลิตจากสัตว์มีสีส้มที่สวยงาม เช่น สีเนื้อหมู สีไข่แดง ทำให้ขายได้ในราคาที่สูง (Donkin, 1976 ; Johnson and Schroeder, 1995) นอกจากนี้แอสตาแซนทีนจากสาหร่ายยังมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่สูง สามารถป้องกันการเกิดมะเร็ง และเนื้องอกได้ (Palozza and Krinsky, 1992) ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) เป็นรงควัตถุที่มีมากที่สุดในสไปรูลินา (*Spirulina* sp.) มีคุณสมบัติเป็นสารเรืองแสง ละลายน้ำได้ ใช้เป็นสีผสมอาหารโดยได้รับอนุมัติจาก Federal Drug Administration (FDA) ส่วนในทางด้านเภสัชกรรมสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดที่ดื้อยาได้บางชนิด และยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Sarada et al., 2011; Kamble et al., 2013) สไปรูลินา เป็นแหล่งสำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย (El-Sheekh et al., 2008) สามารถต้านทานแบคทีเรียได้ (อรพิน คงภักดีพิกุล และคณะ, 2544) ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสไปรูลินาในระดับอุตสาหกรรมมีมากขึ้น จึงทำให้สไปรูลินาเป็นที่รู้จักกันอย่าง

รงควัตถุ (pigments) ของ *spirulina platensis*

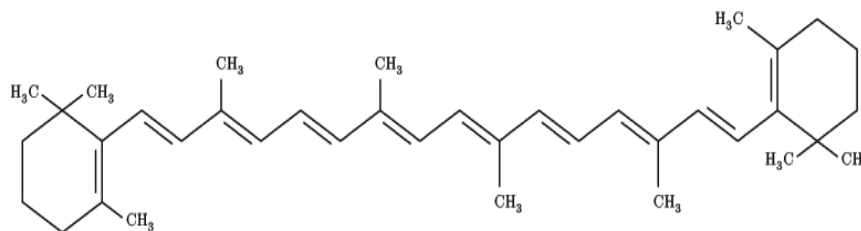
รงควัตถุ (pigments) คือ เม็ดสีภายในเซลล์ที่ทำหน้าที่รับแสงภายใต้กระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งรงควัตถุใน *s. platensis* แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ คลอโรฟิลล์ (chlorophylls) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) และไฟโคบิลิน (phycobilin) ซึ่งรงควัตถุแต่ละชนิดของสาหร่ายนั้นมีสีที่แตกต่างกันไป



ภาพ 2 โครงสร้างทางเคมีของคลอโรฟิลล์ (Chemical structure of Chlorophyll)

ที่มา: <https://www.toppr.com/ask/question/structure-of-chlorophyll/>

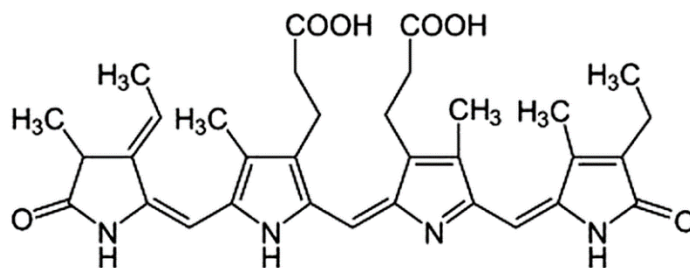
คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) เป็นรงควัตถุหลักในกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยพบว่า สาหร่ายทุกชนิดจะมี Chlorophyll a โดยคลอโรฟิลล์จะสามารถดูดกลืนแสงสีแดงหรือสีน้ำเงิน แต่สะท้อนสีเขียวออกมา คลอโรฟิลล์จึงเป็นรงควัตถุสีเขียว มีหลายชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี คลอโรฟิลล์ ซี คลอโรฟิลล์ ดี และคลอโรฟิลล์ อี ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จะมีคลอโรฟิลล์ เอ เท่านั้น โดยคลอโรฟิลล์ เอ จัดเป็น Primary photosynthetic pigments ส่วน คลอโรฟิลล์ บี ซี ดี และ อี จัดเป็น Secondary photosynthetic pigments คลอโรฟิลล์ เอ จัดว่าเป็นรงควัตถุสังเคราะห์แสงขั้นต้น ที่สามารถรับอิเล็กตรอนจากแสงได้ ส่วนคลอโรฟิลล์อื่น ๆ จัดว่าเป็นรงควัตถุสังเคราะห์แสงขั้นสอง คอยทำหน้าที่ดูดซับพลังงานอิเล็กตรอนจากแสงแล้ว ส่งต่อให้ คลอโรฟิลล์ เอ สารในกลุ่มคลอโรฟิลล์ถือว่าเป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ โดยปริมาณคลอโรฟิลล์ที่พบในสาหร่ายทั่วไปมีร้อยละ 0.5-1.5 ของน้ำหนักแห้ง และสามารถเพิ่มสูงถึงร้อยละ 6 ในสาหร่ายที่ถูกเลี้ยงไว้ในที่มีแสงอ่อน ๆ คลอโรฟิลล์ เอ เป็นดัชนีอย่างหนึ่งในการแสดงมวลสาหร่าย ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณมวล สาหร่าย ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ จะผันแปรได้ ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ความเข้มแสง อายุเซลล์สาหร่าย ปริมาณไนโตรเจนในอาหาร และอื่น ๆ



ภาพ 3 โครงสร้างทางเคมีของบีตาแคโรทีน (Chemical structure of β -Carotene)

ที่มา: Shankaranarayanan, 2018

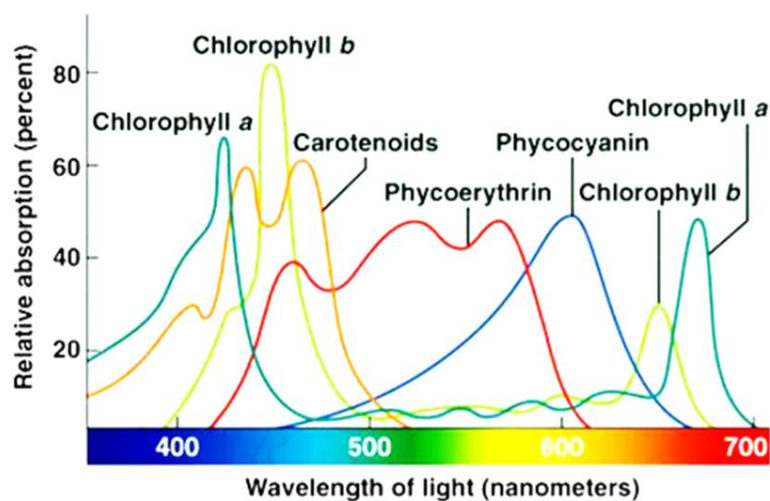
แคโรทีนอยด์ (Carotinoid) เป็นรงควัตถุที่พบได้ในเซลล์สังเคราะห์แสงทุกชนิด รงควัตถุกลุ่มนี้จะดูดกลืนแสงสีน้ำเงิน และสะท้อนแสงสีเหลืองส้ม แคโรทีนอยด์จะประกอบด้วย แคโรทีน (Carotene) ซึ่งสะท้อนแสงสีส้ม ส่วนแซนโทฟิลล์ (Xanthophyll) จะสะท้อนแสงสีเหลือง พืชและจุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์ บีตาแคโรทีน ซึ่งเป็นแหล่งวิตามินในมนุษย์ ร่างกายจะเปลี่ยนจากบีตาแคโรทีนเป็นวิตามินเมื่อร่างกายต้องการ และ *S. platensis* ถือเป็นแหล่งที่มีบีตาแคโรทีนสูง และพบว่าบีตาแคโรทีนมีความสามารถจับกับอนุมูลอิสระ Peroxyl โดยเฉพาะในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำ สมบัติการต้านออกซิเดชันของบีตาแคโรทีนขึ้นอยู่กับสมบัติในการจับ Singlet Oxygen และอนุมูลอิสระ Peroxyl ซึ่งขึ้นอยู่กับโครงสร้างของ โมเลกุลและจำนวนพันธะคู่ของโมเลกุล (Sergio et al., 1999) นอกจากนี้ยังช่วยรักษาโรคบางชนิด โรคกระดูก ความผิดปกติของผิวหนังเนื่องจากความไวต่อแสง โรคหัวใจ โดยเข้าไปยับยั้ง การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Low density lipoprotein (LDL) การมีฤทธิ์เป็นสารต้าน ออกซิเดชันของบีตาแคโรทีนและแคโรทีนอยด์ตัวอื่น ๆ ยังช่วยลดอัตราการเกิดโรคมะเร็ง (Tanumihardjo, 2002)



ภาพ 4 โครงสร้างทางเคมีของ ซี ไฟโคไซยานิน (Chemical structure of c-phycoerythrin)

ที่มา: Hosseini, 2013

ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) และอัลโลไฟโคไซยานิน (Allophycocyanin) รงควัตถุทั้งสองชนิดเป็นรงควัตถุสีน้ำเงินดูดช่วงคลื่นที่มีความยาวคลื่นมากกว่าไฟโคเออริทริน (ภาพ 5) ซึ่งพบในสาหร่าย 2 กลุ่ม คือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และสาหร่ายสีแดง ไฟโคไซยานินเป็นโปรตีนที่มีสีน้ำเงิน โดยน้ำหนักมีความเข้มข้นร้อยละ 14 ซึ่งจะพบแต่ในสาหร่าย *S. platensis* เท่านั้น ซึ่งรงควัตถุประเภทไฟโคบิลิโปรตีน (Phycobiliprotein) แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย ได้แก่ ซี-ไฟโคไซยานิน (C-phycoerythrin) ซี-อัลโลไฟโคไซยานิน (C-Allophycocyanin) ซี-ไฟโคอิริทริน (C-Phycoerythrin) (การมีหรือแสดงตัวอักษร C นำหน้า เพื่อบ่งบอกว่าเป็น รงควัตถุที่อยู่ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) สารกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีนมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ ที่สามารถละลายในน้ำได้ดี ซึ่งอยู่ใกล้กับโปรตีนจึงกลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเรียกว่า ไฟโคบิลิโปรตีน และในสาหร่าย *S. platensis* ซี-ไฟโคไซยานิน อยู่รวมกับไฟโคบิลิโปรตีนชนิดอื่น ๆ กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้น เรียกว่า ไฟโคบิลิโซม (Phycobilisomes) ซึ่งเกาะอยู่บนผิวด้านนอกของไทลาคอยด์ (Thylakoid) ซึ่งภายในไทลาคอยด์บรรจุคลอโรฟิลล์ เอ อยู่ ไฟโคบิลิโซมทำหน้าที่รับพลังงานรังสีจากแสงแล้วส่งให้คลอโรฟิลล์ เอ จากการที่ทำหน้าที่ เป็นรงควัตถุประกอบ จะทำให้ไฟโคบิลิโซมมีปริมาณลดลง หากความเข้มแสงเพิ่มขึ้น และนอกจากนี้ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มีไฟโคไซยานินเป็นแหล่งสะสมไนโตรเจนที่คอยให้ธาตุไนโตรเจนแก่เซลล์สาหร่ายเมื่อเกิดการขาดแคลนธาตุไนโตรเจน (สุมาลี ดุลยอนุกิจ, 2535)



ภาพ 5 การดูดแสงของรงควัตถุในช่วงคลื่นต่าง ๆ

ที่มา: สรรฉัตร เทียมดาว, 2559

การใช้ประโยชน์จากสาหร่าย *spirulina platensis*

สไปรูลิना ถูกจัดเป็นอาหารประเภทต่าง (Alkaline Food) ที่อุดมด้วยสารอาหาร วิตามิน, เกลือแร่, คลอโรฟิลล์ ไฟโคไซยานิน แคโรทีนอยด์ และยังมีกรดอะมิโนที่จำเป็นครบทั้ง 8 ชนิด โดยทั่วไปแล้วสไปรูลินามีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักประมาณ (69.5%) ซึ่งสูงกว่าปริมาณของโปรตีนที่มีใน เนื้อวัว 18% - 20%, ปลา (ปลาทู, ปลาอินทรีฯ เท่ากับ 20%) และไข่ 10% - 20% สไปรูลิना ยังมีอัตราการดูดซึมที่ดีสูงถึง 95.1% (จงกล พรหมยะ, 2546) โดยสไปรูลินามีปริมาณโปรตีนสูงแต่ก็มีความแตกต่างกันไปบ้างตามคุณสมบัติของอาหารที่นำมาใช้เลี้ยง นอกจากนี้ยังมี วิตามินเอ หรือเบต้า-แคโรทีนสูง เมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินจากแหล่งอื่น ๆ ส่วนเกลือแร่จะมีแคลเซียม ฟอสฟอรัส และโปรตีนสูง ค่อนข้างสูงกว่าแร่ธาตุอื่น ๆ

1. ทางด้านการแพทย์ เนื่องจากสไปรูลิना มีปริมาณสารอาหารสูง สามารถเป็นทั้งอาหารและยาที่ให้ผลในทางป้องกันโรคต่าง ๆ นอกจากนี้สไปรูลินายังเหมาะสมที่จะใช้รักษาแผลมีหนองได้เป็นอย่างดีเพราะมีปริมาณโปรตีนและซีสทีนที่สูง (เจียมจิตต์ บุญส, 2531) แอสตาแซนทีนจากสาหร่ายมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่สูง สามารถป้องกันการเกิดมะเร็งและเนื้องอกได้ (Palozza and Krinsky, 1992) ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) เป็นรงควัตถุที่มีมากที่สุดในสไปรูลิน่า (*Spirulina* sp.) มีคุณสมบัติเป็นสารเรืองแสง ละลายน้ำได้ ใช้เป็นสีผสมอาหารโดยได้รับอนุมัติจาก Federal Drug Administration (FDA)

ส่วนในทางด้านเภสัชกรรม สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดที่ดื้อยาได้บางชนิด และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

2. ใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์ เนื่องจากสไปรูลินามีคุณค่าทางอาหารสูง อุดมไปด้วย วิตามิน เกลือแร่ และโปรตีนสูง นอกจากนี้ยังมีสารไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งยังช่วยสร้างระบบภูมิคุ้มกันแก่ร่างกาย ช่วยควบคุมปริมาณและความหนาแน่นของเม็ดเลือดแดง ช่วยคลายความอ่อนเพลีย เร่งประสิทธิภาพการทำงานของเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย ช่วยบำรุงเลือด สร้างเม็ดเลือดใหม่ให้ร่างกาย ช่วยยับยั้งผมร่วงได้ และเนื่องจากเซลล์สาหร่ายไม่มีเซลลูโลส (Cellulose) เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ทำให้สิ่งมีชีวิตสามารถดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้ถึง 85 – 95 เปอร์เซ็นต์

3. ใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์ นอกจากจะเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตสูงแล้ว ยังประกอบไปด้วยแคโรทีน ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นวิตามินเอ เมื่อนำไปทดลองเลี้ยงไก่ทำให้สีของไข่แดงเพิ่มขึ้น และใช้เป็นส่วนผสมของปลาประเภทสวยงาม เนื่องจากบีตาแคโรทีนจากสาหร่ายจะช่วยเร่งสีผิวของปลาให้สวยเข้มขึ้น (Stanley and Jones, 1976) ได้ทดลองนำสาหร่ายสไปรูลินา ไปเป็นส่วนผสมอาหารปลา bigmouth buffalo และปลา blue tilapia พบว่าปลาทั้งสองชนิดมีการเจริญเติบโตดีมาก แต่เมื่อลดปริมาณของสาหร่ายลง อัตราการเจริญเติบโตก็ลดลงด้วย

4. ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย จากการศึกษาพบว่าสาหร่ายสไปรูลินาสามารถกำจัดน้ำเสียได้ เพราะขณะที่สาหร่ายสังเคราะห์แสงไม่เพียงแต่จะให้ออกซิเจนแก่แหล่งน้ำ แต่ยังต้องการสารอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจากแหล่งน้ำเพื่อใช้ในการดำรงชีวิตอีกด้วย (Ciferri and Tiboni, 1985) และ (Soong, 1980) และจากการทดลองนำของเสียที่เน่าสลายของมูลสัตว์มาใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ของเสียดังกล่าวยังไม่สมบูรณ์ จึงมีกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก จะเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับสาหร่ายได้ และได้พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้ดี (พิมพ์พรณ ตันสกุล และอารักษ์ จันทศิลป์, 2531)

จุลินทรีย์

ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับจุลินทรีย์

จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ สามารถอยู่ได้แบบอิสระในดิน น้ำ อากาศ หรือเป็นปรสิตในเซลล์ จุลินทรีย์สามารถให้คุณและให้โทษกับมันได้ ความก้าวหน้าของเทคโนโลยีและอุตสาหกรรม ตลอดจนเทคนิคทางชีวเคมี สามารถนำจุลินทรีย์มาใช้

ประโยชน์ได้มากขึ้น เช่น ใช้ในการกำจัดขยะมูลฝอย ใช้สำหรับผลิตยาปฏิชีวนะ หรือในการผลิตอาหาร เช่น ขนมปัง นมเปรี้ยว เนย โวห์น โยเกิร์ต เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคพันธุกรรมมาใช้กับจุลินทรีย์เพื่อผลิตอินซูลิน ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ช่วยในการเจริญเติบโต (Growth hormone) เพื่อใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ ส่งผลให้คุณภาพชีวิตของมนุษย์ดีขึ้น และยังสามารถนำจุลินทรีย์มาใช้ในด้านการเกษตร เช่น ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยจุลินทรีย์ (Control of insect disease) เป็นต้น ในธรรมชาติจุลินทรีย์ยังทำหน้าที่สำคัญโดยการเป็นผู้ย่อยสลายในระบบนิเวศ (จินตนา อัจฉินเทียะ, 2549) จุลินทรีย์มีหลากหลายประเภท ได้แก่ แบคทีเรีย รา โปรโตซัว สาหร่าย และไวรัส (ดวงพร คันธโชติ, 2545)

แบคทีเรีย (Bacteria) เป็นจุลินทรีย์ซึ่งมีขนาดเล็กที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ต้องอาศัยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูงส่องดู แบคทีเรียมีเซลล์เพียงเซลล์เดียว มีผนังเซลล์ (Cell wall) เป็นสารประกอบเพปทิโดไกลแคน มีเยื่อหุ้มเซลล์ (Plasma membrane) แบคทีเรียมีรูปร่างหลายแบบ ไม่ว่าจะเป็น รูปแท่ง รูปกลม รูปเกลียว หรือมีรูปร่างเป็นเส้นใย แบคทีเรียมีการสืบพันธุ์ทั้งแบบมีเพศและไม่มีเพศ การสืบพันธุ์แบบมีเพศนั้นเกิดจากการรวมตัวกันของเซลล์ 2 เซลล์ ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จะอาศัยการแตกหน่อ (Budding) สามารถพบแบคทีเรียได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็น ดิน น้ำ อากาศ มีทั้งที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษ

เชื้อรา (Fungi) เป็นจุลินทรีย์ที่มีทั้งชนิดเซลล์เดียว คือ ยีสต์ (Yeast) ซึ่งส่วนใหญ่สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ และหลายเซลล์ซึ่งได้แก่ รา (Mold) โดยมีรูปร่างเป็นเส้นใย ขนาดและรูปร่างของเชื้อราจะแตกต่างกันไป ราบางชนิดต้องใช้กล้องส่องดู แต่บางชนิด เช่น เห็ด (Mushroom) สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า เห็ดเกิดจากเส้นใยของเชื้อรามาอยู่รวมตัวกันแล้วกลายเป็นดอกเห็ดขนาดใหญ่ เชื้อราเจริญได้ดีในที่ที่มีความชื้น และความเป็นกรดสูง ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อรา จึงต้องปรับ pH ประมาณ 4 เชื้อราทุกชนิดเป็นพวกที่ต้องการอากาศ ส่วนใหญ่ชอบอุณหภูมิปานกลาง การสืบพันธุ์พบได้ทั้งแบบมีเพศ และไม่มีเพศ

จุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normal Flora)

จุลินทรีย์ประจำถิ่น หรือเชื้อประจำถิ่น หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ที่พบอยู่ตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ซึ่งจะไม่ก่อให้เกิดอันตราย หากบุคคลผู้นั้นมีสุขภาพแข็งแรง อีกทั้งเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นยังมีประโยชน์เพราะสามารถป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคเจริญเติบโต เชื้อประจำถิ่นสร้างสารยับยั้งขึ้นตามจุดต่าง ๆ ของร่างกาย ถือเป็นกลไกการป้องกันร่างกายที่มีความสำคัญมาก แต่อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ประจำถิ่น อาจทำให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้หากร่างกายอ่อนแอ

หรือภูมิต้านทานโรคลดลงไม่ว่าเกิดจากการเจ็บป่วย การได้รับยาต้านจุลชีพ การได้รับยากดภูมิคุ้มกัน หรือมีโรคประจำตัว ในภาวะเช่นนั้น เชื้อประจำถิ่นอาจกลายเป็นเชื้อฉวยโอกาสทำให้เกิดการเจ็บป่วยได้ เชื้อประจำถิ่นตามตำแหน่งของร่างกายที่สำคัญมีดังนี้ (อะเคื้อ อุดนเลขกะ, 2554)

1. ผิวหนัง : เป็นส่วนที่ปกคลุมทั่วร่างกาย จึงมีโอกาสทำให้สัมผัสกับจุลินทรีย์ได้มากที่สุด แบคทีเรียบางชนิดสามารถเจริญบนผิวหนังได้เป็นเวลานาน เพราะสามารถทนต่อเอนไซม์ Lysozyme ที่ขับออกมาจากต่อมเหงื่อ แบคทีเรียประจำถิ่นบนผิวหนัง มี 3 กลุ่ม กลุ่มแรก ได้แก่ Diphtheroids ซึ่งใช้กรดไขมันที่ต่อมไขมันขับออกมาเป็นสารอาหาร กลุ่มที่สองเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม ได้แก่ *S. epidermidis* *S. aureus* และ *Micrococci* ส่วนกลุ่มที่สามเป็นยีสต์ ซึ่งจะใช้ไขมันเป็นอาหาร ได้แก่ *Pityrosporum ovale* และ *Pityrosporum orbiculare* นอกจากนี้ยังมี เชื้อราที่ทำให้เกิดกลากเกลื้อน ส่วนมากจุลินทรีย์ที่พบอยู่บนผิวหนังจะถูกชะล้างออกโดยง่ายเมื่ออาบน้ำ

2. ตา: โดยปกติตาเป็นอวัยวะที่พบแบคทีเรียต่าง ๆ ได้น้อยมาก เนื่องจากน้ำตาเอนไซม์ Lysozyme เป็นจำนวนมาก เพราะเอนไซม์ Lysozyme สามารถกำจัดแบคทีเรียได้หลายชนิด ทำให้พบแบคทีเรียในตาได้น้อยมาก ส่วนใหญ่จะพบบริเวณเยื่อเปลือกตา ได้แก่ *S. epidermidis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria sp.*, *Corynebacterium xerosis* และ *Streptococcus viridans*

3. หู: เป็นอวัยวะที่มีช่องเปิดของร่างกาย แต่มีแบคทีเรียได้น้อยเช่นเดียวกับตา เนื่องจากมีขี้หูมีลักษณะคล้ายขี้ผึ้ง จึงช่วยป้องกันแบคทีเรียได้ดี ดังนั้นจึงมักพบแบคทีเรียเฉพาะบริเวณช่องหูส่วนนอกเท่านั้น แบคทีเรียที่พบ ได้แก่ *Corynebacterium sp.*, *Mycobacterium sp.*, *S. epidermidis* และ *S. Aureus*

4. จมูกและลำคอ: เป็นส่วนของร่างกายที่จะพบจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้โดยเฉพาะจุลินทรีย์ในอากาศ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย ชนิดที่พบได้เสมอ ได้แก่ *S. epidermidis*, *S. aureus* และ *Diphtheroids*

5. ปาก: เป็นอวัยวะสำคัญที่สัมผัสจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจากน้ำและอาหาร หลังรับประทานอาหารแต่ละครั้งจะมีเศษอาหารตกค้างในช่องปากเป็นจำนวนมาก จึงพบแบคทีเรียหลายชนิด และในช่องปากมีน้ำลายที่มีสารประกอบอินทรีย์ต่าง ๆ และยังมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หลายชนิด แบคทีเรียที่พบ ได้แก่ *Streptococcus*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Actinomyces* และ *Lactobacillus*

6. ลำคอส่วนบน: เป็นส่วนที่ต่อเนื่องจากปาก พบแบคทีเรียได้หลายชนิด ส่วนใหญ่ที่พบ ได้แก่ *S. epidermidis* และ *S. aureus* ส่วนแบคทีเรียที่มีความสำคัญ ได้แก่ *d-hemolytic Streptococci* หรือ *Viridans Streptococci* ยังพบ *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus spp.* (โดยเฉพาะ *H. Influenza* และ *H. parainfluenzae*) *diphtheroids* *Neisseria meningitidis* และเชื้อ *S. pneumoniae* สายพันธุ์ที่ไม่ทำให้เกิดโรค

7. ภาวะอาหาร: ปกติภาวะอาหารของบุคคลที่มีสุขภาพดีจะปราศจากจุลินทรีย์เนื่องจากมีกรดไฮโดรคลอริกและสารอื่น ๆ ที่ถูกขับออกมาจากภาวะอาหารสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ เมื่อรับประทานอาหารเข้าไป จะมีจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นในระยะแรก ๆ โดยปนเปื้อนไปกับอาหารและน้ำแต่ต่อมามีจำนวนลดลง เพราะมีการหลั่งกรดไฮโดรคลอริกและสารอื่น ๆ ที่มี คุณสมบัติทำลายจุลินทรีย์ได้ แต่ก็มีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถอาศัยในภาวะอาหารได้ เพราะทนต่อกรดไฮโดรคลอริก และสารที่ภาวะอาหารขับออกมาได้ดี ได้แก่พวก *Lactic acid bacteria*

8. ลำไส้เล็ก: โดยทั่วไปบุคคลที่มีสุขภาพดี ในลำไส้เล็กก็จะปราศจากจุลินทรีย์ หรือพบน้อยมาก โดยจะไม่มากกว่า 1,000 เซลล์/มิลลิลิตร ที่ลำไส้เล็กตอนบน (*Duodenum*) และ 100,000 เซลล์/มิลลิลิตรที่ลำไส้ตอนปลาย (*Ileum*) แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบในลำไส้เล็ก ได้แก่ *Lactobacilli*, *Diphtheroids*, *Streptococcus* และยีสต์ *Candida albicans*

9. ลำไส้ใหญ่: เป็นอวัยวะที่พบจุลินทรีย์จำนวนมากที่สุดในอุจจาระหนึ่งกรัม จะพบจุลินทรีย์ประมาณหนึ่งแสนล้านเซลล์หรือประมาณร้อยละ 50-60 ของน้ำหนักแห้งของอุจจาระ ในแต่ละวันลำไส้ใหญ่จะมีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นประมาณหนึ่งล้านล้านเซลล์หรือประมาณ 50 กรัม แบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ที่เจริญได้ดีในที่ไม่มีออกซิเจน ได้แก่ *Bacteroides spp.* (เช่น *B. Fragilis* *B. melaninogenicus* และ *B. oralis*) และ *Facultative anaerobic bacteria* ได้แก่ *Escherichia (E. coli)* *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Peptostreptococci* และ *Streptococcus. faecalis* ยีสต์ *C. albicans* รา *Geotrichum*, *Penicillium* และ *Aspergillus*

10. ระบบทางเดินปัสสาวะ: ไต ภาวะปัสสาวะและท่อปัสสาวะปกติในบุคคลที่มีสุขภาพดีจะปราศจากเชื้อ แต่อาจพบแบคทีเรียที่ตอนปลายสุดของท่อปัสสาวะทั้งเพศชายและหญิง ได้แก่ *Streptococcus viridians*, *Neisseria*, *Mycobacteriu*, *Bacteroides* และ *Enterobacteria* บางชนิด แบคทีเรียเหล่านี้จะมีจำนวนลดลงเมื่ออยู่ในใกล้ภาวะปัสสาวะ เนื่องจากเซลล์เยื่อบุของทางเดินปัสสาวะสามารถขับสารบางชนิดออกมาที่ทำลายแบคทีเรียเหล่านี้ได้

11.ระบบสืบพันธุ์: ตามธรรมชาติแล้วจะพบแบคทีเรียในระบบสืบพันธุ์ของเพศหญิงมากกว่าเพศชาย และจุลินทรีย์เหล่านี้มีจำนวนที่เปลี่ยนแปลงไปตามวงจรรอบของการมีประจำเดือน เนื่องจากขึ้นอยู่กับอิทธิพลของฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen) ที่เซลล์บุผนังช่องคลอดขับออกมาอย่างสลายไกลโคเจนที่เซลล์บุผิวของช่องคลอด ได้เป็นกรดแลคติกทำให้ช่องคลอดมี pH ประมาณ 4.4- 4.6 แบคทีเรียที่ไม่ทนต่อกรดก็จะถูกทำลาย แต่พวกที่ทนกรดยังสามารถเจริญได้ดี ได้แก่ *Enterococci*, *Diphtheroids* และแบคทีเรียที่เจริญในที่ที่ไม่มีออกซิเจนหลายชนิด ยีสต์ *Candida albicans* และ โปรโตซัว *Trichomonas vaginalis* (บัญญัติสุขศรีงาม, 2532)

ความสำคัญของจุลินทรีย์ที่นำมาศึกษา

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าสารสกัดสไปรูลินาคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจทำการทดสอบสารออกฤทธิ์ของสไปรูลินาต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปากและผิวหนัง เนื่องจากปัญหาทางช่องปากเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งเพราะส่งผลต่อการดำเนินชีวิตในสังคม เช่น การเกิดกลิ่นปาก ซึ่งโรคทางช่องปากที่พบบ่อย คือ ฟันผุ สามารถเกิดจากหลายปัจจัยร่วมกัน เช่น พันธุกรรม พฤติกรรม และสิ่งแวดล้อม เป็นต้น (ซุติมา ไตรรัตน์วรกุล, 2553) โดยสาเหตุหลักที่สำคัญที่ทำให้เกิดฟันผุ คือ เกิดจากเชื้อ เช่น *Candida albicans* เป็นต้น (Houte,1996) ส่วนผิวหนังเป็นอวัยวะที่เป็นเกราะป้องกันร่างกาย มีคุณสมบัติหลายประการในการป้องกันการเชื้อไม่ให้เกิดโรค แต่หากมีการเสียสมดุลของร่างกาย หรือเกิดบาดแผลที่ผิวหนัง จะทำให้เชื้อเข้าสู่ผิวหนังและก่อโรคผิวหนังได้ เชื้อที่ส่วนมากพบบริเวณผิวหนัง ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* (จิตรา ตะเกาพงษ์, 2015)

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะกลม ขนาด 0.5-1.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นกลุ่มพวงองุ่น หรืออาจพบเรียงตัวเซลล์เดี่ยวเป็นคู่หรือเป็นสายสั้น ๆ ไม่เคลื่อนที่และไม่สร้างสปอร์ ลักษณะโคโลนิกรวม ขอบเรียบ นูน มีสีครีม เหลืองส้ม (ขึ้นอยู่กับชนิดของคาร์บอนไฮเดรตในเยื่อหุ้มเซลล์ อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาพแวดล้อมที่ทำให้เชื้อเจริญ) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 6-46 องศาเซลเซียส โดยมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 30-37 องศาเซลเซียส pH ที่มีการเจริญได้คือ 4.0-10.0 ส่วน pH ที่เหมาะสมคือ 7.0-7.5 ค่า A_w อยู่ในช่วง 0.85-0.999 สามารถทนเกลือได้ที่ 18-20% และถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Facultative anaerobe คือสามารถเจริญในที่ที่มีออกซิเจนมากกว่าในที่ที่ไม่มีออกซิเจน และสามารถสร้างสารพิษ enterotoxin แบ่งได้เป็น 8 ชนิด ได้แก่ A , B , C1 , C2 , C3 , D , E และ

H โดยสารพิษชนิด A และ D จะก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ ซึ่งสามารถทนความร้อน ไม่ถูกทำลายแม้มีการต้มานครั้งชั่วโมง ละลายได้ในน้ำและสารละลายเกลือ ทนความร้อนได้ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เชื้อสามารถสร้างสารพิษได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทนต่อรังสีแกมมาในปริมาณให้ใช้ได้กับอาหาร แหล่งที่พบเชื้อ *S. aureus* สามารถพบได้ที่ ผิวหนัง เยื่อบุทางเดินหายใจ โพรงจมูก กระจาอาหาร และบาดแผลที่เป็นหนอง ผิ รวมถึงสามารถพบได้ในดินฝุ่นละออง และพบได้ในอาหาร เนื้อและผลิตภัณฑ์จากเนื้อ ไข่ สลัด แชนวิช ผลิตภัณฑ์นม เป็นต้น (ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้อและพาหะ, 2557)

Staphylococcus epidermidis (กฤตภูมิ ภูกิตติวารงกูร และบุษยา มุสิกปาละ, 2556) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ขนาด 0.5–1.5 ไมโครเมตร อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น ลักษณะโคโลนีขนาดเล็ก สีขาว เจริญได้ทั้งภาวะที่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่ม *Staphylococcus* ที่ไม่สร้าง coagulase และยังไม่สามารถสร้างแอลฟาที่ออกซิน (α -toxin) , เอกซ์โฟลิเอติน (exfoliatin) และซูเปอร์แอนติเจนที่ออกซิน (superantigen toxins) ได้ *S. epidermidis* เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ที่ผิวหนัง โพรงจมูก รูหูและทางเดินปัสสาวะส่วนปลายเมื่อก่อนไม่ค่อยเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ แต่เนื่องมาจากการใช้ catheters และ prosthesis อย่างแพร่หลายมากขึ้น จึงพบว่า *S. epidermidis* มีความสำคัญในการก่อการติดเชื้อในโรงพยาบาลมากขึ้น ทำให้ยากต่อการรักษา เนื่องจาก *S. epidermidis* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ และมีแบบแผนการดื้อยาไม่แน่นอนและแตกต่างกับ *S. aureus* ดื้อยากลุ่ม penicillinase-resistant penicillin และ cephalosporin มากกว่า *S. aureus* ซึ่งยาทั้งสองกลุ่มนี้ ได้ผลดีกับ *S. aureus* การรักษาจึงจำเป็นต้องใช้ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะเพื่อเป็นแนวทาง

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเป็นรูปท่อน (Gram negative rod) ปกติอาศัยอยู่ในลำไส้ของคน และสัตว์เลือดอุ่น จะพบมากในอุจจาระ แต่ไม่พบในปัสสาวะ ด้วยเหตุนี้เชื้อ *E. coli* จึงมีความสำคัญในการตรวจเชื้อเพื่อควบคุมคุณภาพของน้ำ อาหารและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ โดยจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) ที่บ่งบอกถึงการปนเปื้อนของสิ่งปฏิภูลหรือไม่ ในสภาวะร่างกายปกติเชื้อ *E. coli* จะไม่ทำให้เกิดโรคได้ แต่จะก่อโรคในสภาวะที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรือบกพร่อง ร่างกายอ่อนแอ เรียกว่า เชื้อฉวยโอกาส (Opportunistic pathogen) ซึ่งถือว่าเป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล (Secondary infection) และกลุ่มที่มีความเสี่ยงในการติดเชื้อ *E. coli* คือผู้ที่ทำงานเกี่ยวกับเชื้อโรค ทำให้เกิดการติดเชื้อระหว่างการทำงาน (Occupational infection) ได้แก่ บุคลากรที่สัมผัสกับผู้ป่วยติดเชื้อ และผู้ที่ปฏิบัติการทางการแพทย์ที่ต้องสัมผัสกับสารคัดหลั่งของผู้ติดเชื้อ เป็นต้น เชื้อ *E. coli* ทำให้เกิดการติดเชื้อ

โดยการเกาะผนังเซลล์ของอวัยวะส่วนต่าง ๆ เช่น กระเพาะปัสสาวะ ไต และมีการสร้างสารเพื่อให้เซลล์ยึดเกาะบริเวณนั้นและทำลายเซลล์ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อ ทำให้เกิดกลุ่มอาการที่สำคัญ เช่น ท้องร่วง เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และทางเดินปัสสาวะอักเสบ โรคท้องร่วงมักเกิดกับทารก ผู้ที่เดินทางไปยังถิ่น ผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ หรือผู้ที่ได้รับเชื้อจากการปนเปื้อนของเชื้อ โดย *E. coli* บางสายพันธุ์สามารถผลิตสารพิษที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคที่รุนแรง 2 ชนิด คือ Shiga toxin และ Enterotoxin (เกษร เทพแพง, 2562)

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเป็นรูปท่อน ขนาด 0.5–1.0×1.5–5.0 ไมโครเมตร เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศ (anaerobe) เคลื่อนที่แบบ monotrichous flagella สามารถผลิตรงควัตถุสีฟ้า phycocyanin และ fluorescent Pyoverdine ซึ่ง *P. aeruginosa* จัดเป็น Saprophytes ในดิน สามารถพบ *P. aeruginosa* ได้ในสิ่งแวดล้อมดิน น้ำ ขยะหรือพืช เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) และเชื้อฉวยโอกาสในคน สามารถทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์ได้ ส่วนมากจะก่อโรคในคนที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นเวลานาน ผู้ป่วยมะเร็งระยะสุดท้าย และผู้ป่วยแผลไฟไหม้ เป็นต้น (ภัทรชัย, 2551) สามารถดื้อยาได้หลายขนาด (multidrug resistant: MDR) ทำให้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมีอัตราการเสียชีวิตสูง โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดมีอัตราเสี่ยงสูงถึงร้อยละ 29.00 (Dijkshoorn et al., 2007) และยังเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตเป็นอันดับ 1 (ร้อยละ 47.90) ในประเทศสหรัฐอเมริกา (Wisplinghoff et al., 2004) จากรายงานสถานการณ์เชื้อดื้อยายังพบว่า *Ps. aeruginosa* มีแนวโน้มการดื้อยาในกลุ่ม carbapenems ที่สูงขึ้นในแต่ละปี ซึ่งพบในอัตราที่สูงขึ้นถึงร้อยละ 52.5 ในปี 2561 (NARST, 2022)

Candida albicans เชื้อยีสต์ในสกุล *Candida* spp. พบได้ทั่วไปรอบตัว ในสิ่งแวดล้อมโดยมีมากกว่า 200 สายพันธุ์ ซึ่งสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และพบการก่อโรคที่พบได้บ่อย ได้แก่ *Candida albicans* ยีสต์ชนิดนี้สามารถแบ่งเซลล์แบบ (budding cell) มีรูปร่างกลมรี ขนาด 3.5–6.0×6.0–10 μm . เจริญได้ดี ที่อุณหภูมิ 25–37 องศาเซลเซียส (Markey et al., 2013) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar ค่อนข้างกลม สีขาวครีม สามารถพบได้บนผิวหนัง เยื่อเมือกของทางเดินอาหาร หรือ บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งในคนและสัตว์ ซึ่งก่อให้เกิด โรค Candidiasis โดยมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อซ้ำซ้อน การรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียด้วยยาปฏิชีวนะเป็นระยะเวลานาน หรือพบในสัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ มีภาวะขาดสารอาหาร และมักพบการติดเชื้อจากการใส่ท่อสวนปัสสาวะเป็นเวลานาน (Markey et al., 2013) เชื้อราในปากเกิดจากการติดเชื้อ *Candida albicans* ทำให้มีเชื้อราสะสมในปากจะเห็นเป็นครีมหิวขาวที่ลิ้น และกระพุ้งแก้ม และอาจจะกระจายไปยังเหงือก โคนลิ้น เมื่อแกะพื้น

อาจจะมีการเลือดออกและเจ็บ เชื้อนี้ไม่สามารถติดต่อกันจากคนหนึ่งไปยังอีกคนหนึ่ง กลุ่มคนที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อราในปากได้แก่ ผู้ที่ใส่ฟันปลอม, ผู้ป่วยโรค HIV, ผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 และ 2, เด็กทารก, คนที่ใช้ยา steroid ชนิดพ่น, คนไข้ที่ได้รับเคมีบำบัด

จากข้อมูลความอันตรายของเชื้อแต่ละชนิดที่มีความสามารถในการก่อโรคตามผิวหนังและช่องปาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะนำสารสกัดจากสไปรูลินาไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อดังกล่าวข้างต้น เพื่ออาจจะนำไปใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการควบคุมหรือลดความอันตรายจากเชื้อในช่องปากและผิวหนัง ซึ่งสารสกัดสไปรูลินาเป็นสารสกัดที่มาจากพืชและผ่านกระบวนการสกัดที่เป็นมิตรต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

อนุมูลอิสระ (Free Radical)

อนุมูลอิสระ (Free Radical) คือ โมเลกุลหรืออะตอมที่ไม่เสถียรเนื่องมาจากการขาดอิเล็กตรอน ซึ่งปกติร่างกายของเรามีโมเลกุลหรืออะตอมที่เป็นอิเล็กตรอนอยู่เป็นจำนวนมาก ในกรณีที่ร่างกายมีการสูญเสียอิเล็กตรอนเนื่องจากถูกอนุมูลอิสระแย่งจับ มีผลทำให้โมเลกุลของเซลล์ในร่างกายไม่เสถียร ขาดความสมดุล จึงส่งผลให้เซลล์ร่างกายเกิดความเสียหาย และอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเรื้อรังชนิดที่ไม่ติดต่อซึ่งเป็นสาเหตุการตายอันดับต้น ๆ ทั้งของคนไทยและประชาชนทั่วโลก เช่น โรคมะเร็ง, โรคเบาหวาน, โรคหัวใจและหลอดเลือด

แหล่งที่มาของอนุมูลอิสระ

แหล่งอนุมูลอิสระจากภายนอก ได้แก่ ฝุ่น มลพิษในอากาศ ไนโตรเจนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ ไอโซน ไนโตรเจนไดออกไซด์ แสงแดด ความร้อน รังสีแกมมา อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว ส่วนแหล่งอนุมูลอิสระภายใน คือ อนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง ตัวอย่างของสารอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้น ได้แก่

1. O₂⁻ Superoxide anion อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์
2. OH⁻ Hydroxyl radicle อนุมูลไฮดรอกซิล
3. ROO Peroxy radicle อนุมูลเปอร์ออกซี
4. H₂O₂ Hydrogen Peroxide ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
5. Lipid Peroxyl, LO₂ ลิพิดเปอร์ออกซี

การเข้าไปทำลายเซลล์ร่างกายของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระจะเข้าไปทำลายเซลล์ เมื่อร่างกายของเราไม่สามารถผลิตหรือได้รับสารต้านอนุมูลอิสระที่เพียงพอจะไปยังยังหรือไปจับกับอนุมูลอิสระได้ภายในเซลล์ของร่างกาย ผลคือทำให้เซลล์เกิดความเสียหายที่นำไปสู่การเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง หัวใจและหลอดเลือด

เลือด ทำให้แก่ก่อนวัย ตาเป็นต้อกระจก และโรคอื่น ๆ เช่น อนุมูลอิสระเข้าไปทำลายผนังหลอดเลือดแดง และเมื่อมีไขมันไปสะสมอยู่ในบริเวณหลอดเลือดแดงที่ถูกทำลาย ส่งผลให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดในที่สุด แต่ถ้าร่างกายของเราได้รับสารต้านอนุมูลอิสระที่เพียงพอ สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าไปป้องกันหรือแย่งที่จับกับอนุมูลอิสระ และนำอนุมูลอิสระเหล่านั้นไปทิ้งนอกเซลล์ จึงทำให้เซลล์ไม่ถูกทำลาย (รัชณี คงคาฉุยฉาย และคณะ, มปป.)

สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่อาจมีส่วนช่วยในการปกป้องเซลล์จากการถูกทำลายโดยสารที่ไม่เสถียรทางโมเลกุลหรือที่รู้จักกันในนามของสารอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคมะเร็งได้ โดยบทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระจะไปทำปฏิกิริยา ทำให้สารอนุมูลอิสระมีความเสถียร และอาจจะช่วยป้องกันการทำลายเซลล์ที่เกิดจากสารเหล่านี้ ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น บีตาแคโรทีน ไสโคพิน วิตามินอี วิตามินซี และ วิตามินเอ เป็นต้น

สารต้านอนุมูลอิสระช่วยให้สารอนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้น และไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ทำให้เซลล์เกิดการทำลายเนื่องจากสารอนุมูลอิสระมีจำนวนอิเล็กตรอนที่น้อยกว่าสารประเภทอื่น จึงเกิดปฏิกิริยาทางเคมีต่อเซลล์ได้ง่ายกว่าการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ไม่ว่าจะเป็นควันทันสุหรี่และรังสีถือเป็นตัวกระตุ้นการสร้างสารอนุมูลอิสระ ที่พบว่าอยู่ในรูปออกซิเจนมากที่สุด โดยโมเลกุลของออกซิเจนที่ไม่มีความเป็นกลางทางไฟฟ้าจะไปแย่งจับกับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลของสารตัวอื่นจึงทำให้เกิดเป็นสารอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการทำลายดีเอ็นเอในเซลล์ และหากเกิดปฏิกิริยาเหล่านี้เป็นเวลานาน จะส่งผลให้ร่างกายไม่สามารถซ่อมแซมความผิดปกติที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคมะเร็งตามมาได้ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงมีผลทำให้โมเลกุลของสารต่าง ๆ มีความเป็นกลางทางไฟฟ้า และช่วยป้องกันไม่ให้สารอนุมูลอิสระไปแย่งจับกับอิเล็กตรอนของสารอื่น

บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระ

บทบาทสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ เพราะการที่สารต้านอนุมูลอิสระ สามารถป้องกันหรือกำจัดอนุมูลอิสระได้นั้นถือว่ามีผลสำคัญ เนื่องจากมีงานวิจัยมากมายที่บ่งชี้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระสามารถช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคหลายโรค โดยเฉพาะโรคเรื้อรังที่สัมพันธ์ เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคอัลไซเมอร์ โรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น รวมทั้งยังช่วยชะลอกระบวนการในชั้นตอนที่ทำให้เกิดความแก่ โดยปกติแล้วร่างกายของเราสามารถกำจัดอนุมูลอิสระก่อนที่มันจะทำอันตราย แต่หากมีการสร้างอนุมูลอิสระที่เร็วหรือมากเกินไปกว่าที่ร่างกายของเราจะกำจัดได้ทัน จึงส่งผลกระทบต่อสุขภาพ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึง

ไปช่วยลดความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ โดยสามารถลดความเสียหายได้ 2 ทาง คือ ลดการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกาย และลดอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (งานโภชนาการ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์, 2552)

แหล่งที่พบสารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร

บีตาแคโรทีน	พบมากในผักและผลไม้ที่มีสีส้ม เช่น มะเขือเทศ แครอท น้ำเต้า แคนตาลูป ฟักทอง มะม่วงนอกจากนี้ยังพบได้ในผักใบสีเขียวบางประเภท เช่น ผักขม กะหล่ำปลี
ลูทีน	ซึ่งมีประโยชน์ช่วยในการมองเห็น พบได้มากในผักใบสีเขียว เช่น ผักขม กะหล่ำปลี
ไลโคพีน	เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในมะเขือเทศ แตงโม มะละกอ องุ่น ส้ม ฝรั่ง
สารซีลีเนียม	ไม่ได้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยตรง แต่มีส่วนช่วยในการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆพบได้พืชที่ปลูกลงดิน เช่น ข้าว นอกจากนี้ยังพบได้ในเนื้อสัตว์และนมผง
วิตามินเอ	พบได้มากในตับ มัน แครอท นม ไข่แดง เนยแข็ง
วิตามินซี	พบได้มากในผักผลไม้หลายประเภท ธัญพืช เนื้อสัตว์บางประเภท เช่น เนื้อวัว เป็ด ไก่ และปลา
วิตามินอี	พบได้ในถั่วอัลมอนต์ ข้าวโพด ข้าวสาลี ถั่วเหลือง มะม่วง ผักบล็อกโคลี

ภาพ 6 แสดงแหล่งที่พบสารต้านอนุมูลอิสระได้ในอาหาร

ที่มา: สาขาวิจัยรักษาและมะเร็งวิทยา ฝ่ายรังสีวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

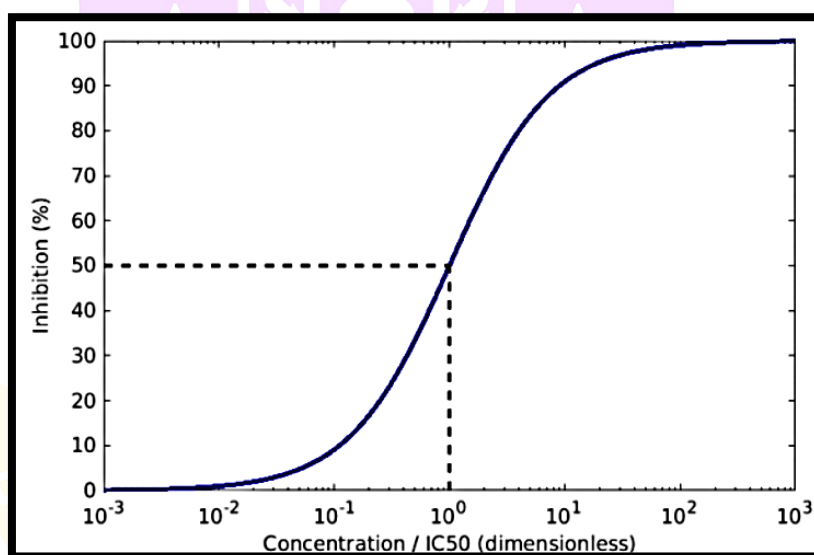
ค่า IC₅₀

IC₅₀ ย่อมาจากคำศัพท์เต็ม คือ half maximal inhibitory concentration หรือค่าความเข้มข้นสารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งปรากฏการณ์ที่ต้องการศึกษาได้ครึ่งหนึ่ง ความหมายของตัวเลข 50% คือเป็นการอ้างอิงถึงจำนวนประชากรในกลุ่มทดลอง ไม่ได้หมายถึงค่าที่ทำให้เกิดผลการรักษาหรือการยับยั้งได้ครึ่งหนึ่งของการรักษาแบบปกติ

มีสิ่งที่น่าสนใจ 2-3 เรื่องที่เกี่ยวกับ IC₅₀ ประเด็นที่ 1 คือ ค่า IC₅₀ เป็นค่าที่ผกผันกับประสิทธิภาพ หมายถึง ถ้าตัวเลขของ IC₅₀ ยิ่งมาก แปลว่า สารตัวอย่างมีประสิทธิภาพยิ่งน้อย

หากเทียบตัวอย่างในสารยับยั้งอนุมูลอิสระที่มี IC_{50} สูง เป็นสารที่ต้องใช้ปริมาณความเข้มข้นมากขึ้น เพื่อยับยั้งอนุมูลอิสระให้ได้ผลเท่ากับสารที่มี IC_{50} ต่ำกว่า

ประเด็นที่ 2 คือเรื่องของสภาวะในการทดลอง เนื่องจากความเข้มข้นที่ได้นั้น เป็นความเข้มข้นจากสภาวะในการทดลองที่เป็นมาตรฐาน อาจจะมีการเจริญเร็วกว่าหรือช้ากว่าในสภาพแวดล้อมอื่น ๆ จึงทำให้มีผลที่แตกต่างกันได้ นอกจากนี้ในกรณีของการทดลอง เป็นการทดลองในหลอดทดลองซึ่งสัมผัสกับสารเคมีโดยตรง จึงมีผลให้สภาวะการทดลองที่ได้ ย่อมไม่เหมือนสถานการณ์ในร่างกาย ความแตกต่างของการทดลองและสภาพแวดล้อมจริงนั้น จึงเป็นสิ่งที่เราต้องตั้งใจอ่าน และทำความเข้าใจอย่างระมัดระวัง เนื่องจากมีสารหลายชนิด ที่มีผลการศึกษาดีมากในการทดลองในหลอด แต่ไม่มีประสิทธิภาพหรือให้ผลตรงข้ามเมื่อนำมาศึกษาต่อในสภาพแวดล้อมอื่น ๆ เช่น ในสัตว์ทดลอง หรือในร่างกายมนุษย์



ภาพ 7 ตัวอย่างกราฟความเข้มข้น (แกนนอน) และผลการตรวจวัด (แกนตั้ง) เพื่อคำนวณค่า IC_{50}

ประเด็นที่ 3 คือ ค่า IC_{50} เป็นค่าจากการคำนวณกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารต่อการตอบสนองหรือการตรวจวัด กราฟนี้เป็นกราฟรูปตัว S โดยช่วงล่างและช่วงบนของกราฟที่มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยและเกือบจะเป็นเส้นขนานพื้น และมีช่วงกลางที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในการคำนวณค่า IC_{50} จะคำนวณเฉพาะช่วงที่เพิ่มอย่างรวดเร็วเท่านั้น ซึ่งโดยปกติแล้วกราฟนี้จะเพิ่มขึ้นแบบลอการิทึม หรือแบบเลขยกกำลัง ไม่ใช่แบบเส้นตรง หรือแบบ

คุณด้วยค่าอัตราส่วนโดยตรง แปลว่าถ้าสารชนิดหนึ่ง มีค่า IC_{50} ในการทำลายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (แปลว่า ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารนี้มีความสามารถในการทำลายได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารที่ไม่มีสารนี้อยู่) ซึ่งไม่ได้แปลว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเท่าตัว เป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะทำให้การทำลายเป็นเท่าตัว หรือทำลายได้ 100% หรือหากมีการลดความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง ไม่ได้แปลว่าทำลายน้อยลงครึ่งหนึ่ง แต่อาจมีผลทำให้การทำลายเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเพิ่มความเข้มข้น หรืออาจไม่สามารถสังเกตผลการตอบสนองได้เลยเมื่อลดความเข้มข้นลงก็ได้ (อนุชิต พลับรูการ, มปป.)

ผลกระทบของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (VOCs)

ผลกระทบของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (VOCs) ต่อสิ่งแวดล้อม

VOCs ย่อมาจาก Volatile Organic Compounds คือ สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย มักนำไปใช้เป็นสารประกอบและสารตัวทำละลายในงานอุตสาหกรรม เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่อยู่ในรูปของเหลวที่มีองค์ประกอบของคาร์บอนอินทรีย์ สามารถระเหยเป็นไอได้ง่ายในอุณหภูมิห้องและความดันปกติ เนื่องจากมีจุดเดือดต่ำและไวไฟ เมื่อระเหยสู่บรรยากาศสามารถคงตัวอยู่ในอากาศได้เป็นระยะเวลานาน และสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมรอบตัว ทั้งในดิน น้ำ และอากาศ มีผลร้ายแรงต่อสิ่งแวดล้อม ระบบนิเวศน์และสิ่งมีชีวิต

สาร (VOCs) มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีผลต่อชั้นโอโซนของโลก โดยปกติโอโซนจะอยู่ในชั้นบรรยากาศที่สูง ทำหน้าที่ในการกรองแสงอุตราไวโอเล็ต (UV) แต่สาร (VOCs) ส่งผลทำให้โอโซนที่อยู่บนชั้นบรรยากาศสูงเข้ามาสู่ในชั้นบรรยากาศใกล้โลก และโอโซนนี้จะทำให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ เช่น ทำให้เจ็บไข้ หายใจไม่สะดวก ไม่สบายเจ็บคอ ระคายเคืองต่อตา แก้วตา จมูก คอ ทรวงอก มีอาการไอ ปวดศีรษะ โอโซนยังเป็นตัวทำให้อาคารสร้างขำรูด ผลผลิตทางการเกษตรตกต่ำ และนอกจากนี้ยังทำให้โลกร้อนขึ้น จนเกิดภาวะโลกร้อนได้ (กองความปลอดภัยแรงงาน, ม.ป.ป.)

ความอันตรายของสารทำละลายต่อสุขภาพ

สารทำละลาย (Solvents) คือสารที่มีคุณสมบัติในการละลายสารตัวอื่นได้ดี สามารถระเหยได้ง่าย มีความไวไฟสูง มักมีใช้กัน ในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ หรือ มีผลสมอยู่ในผลิตภัณฑ์ที่ใช้กันโดยทั่วไป ตัวอย่างสารทำละลายที่ใช้กันอย่างมากในอุตสาหกรรมต่าง ๆ และห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์จากพืช เช่น เมทานอล เฮกเซน อะซิโตน และปีโตเลียม อินเทอร์ เป็นต้น

การระเหยของสาร คือการที่สารนั้นกลายเป็นส่วนหนึ่งของอากาศ เราหายใจเข้าไป แล้วสารจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด ผ่านหัวใจแล้วถูกสูบฉีดเข้าสู่อวัยวะต่าง ๆ ภายในร่างกายและทำให้เกิดอันตรายต่ออวัยวะนั้น ๆ เช่น ตับ ไต สมอง ซึ่งอันตรายต่อสุขภาพร่างกาย

อันตรายต่อระบบทางเดินหายใจ หากเราหายใจเอาไอของสารระเหยเข้าไปมาก ๆ จะทำให้หายใจขัด หายใจลำบาก มีอาการระคายเคืองในคอ มีน้ำมูก คัดจมูก และส่งผลระบบทางเดินอาหารอาจหยุดทำงานได้ ส่วนอาการเรื้อรัง เช่น สารเคมีเข้าสู่ถุงลมปอด ซึมเข้าสู่กระแสเลือด แล้วนำไปสู่อวัยวะต่าง ๆ ภายในร่างกาย ทำให้เกิดโรคตับ โรคไต หรือทำลายเนื้อเยื่อของระบบทางเดินหายใจ ทำลายระบบประสาทส่วนกลาง หากได้รับสารทำลายย่อย ๆ อาจทำให้ติดสารนั้นได้ เช่น การติดทินเนอร์ เป็นต้น (ณปภัช พิมพดี, 2560 ก)

เคมีสีเขียว (Green chemistry)

เคมีสีเขียว (Green chemistry) คือ แนวคิดของการนำหลักการพื้นฐานที่คำนึงถึงความปลอดภัยในการใช้สารเคมีเป็นอันดับแรก การใช้สารเคมีจะต้องไม่เป็นพิษหรือก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งคำนึงถึงการป้องกันหรือลดการปล่อยสารเคมีที่เป็นพิษออกสู่สิ่งแวดล้อม การใช้สารเคมีในแต่ละขั้นตอนของการผลิตจะต้องคำนึงและระลึกเสมอว่าสารเคมีชนิดนั้นจะไม่ใช่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และไม่ทำลายสิ่งแวดล้อมซึ่งถือเป็นหลักสำคัญของ Green chemistry ที่ให้ความสำคัญกับการป้องกันที่ต้นเหตุมากกว่าการแก้ปัญหาที่ปลายเหตุ (ณปภัช พิมพดี, 2560 ข)

จะเห็นได้ว่าสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายมีความอันตรายและส่งผลกระทบต่อร่างกายมนุษย์และสิ่งแวดล้อม หากมีการใช้สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายในการสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชก็อาจทำให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์และในสิ่งแวดล้อมได้ ดังนั้นหากมีตัวทำละลายที่สามารถทดแทนสารที่มีความอันตรายนี้ได้ ถือว่ามีความสำคัญอย่างยิ่ง งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะนำน้ำและเอทานอลมาเป็นตัวทำละลายเพื่อสกัดสารออกฤทธิ์จากสไปรูลินา และนำน้ำและเอทานอลมาผสมกันในอัตราส่วนต่าง ๆ เพื่อให้มีตัวทำละลายที่หลากหลายในการสกัดสารออกฤทธิ์ออกมา เพราะทั้งน้ำและเอทานอลถือเป็นตัวทำละลายที่ช่วยพัฒนาสิ่งแวดล้อม ไร้มลพิษ มีโมเลกุลของออกซิเจนเป็นส่วนประกอบสูง เป็นมิตรต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม

การสกัด (extraction)

เลือกตัวทำละลายในการสกัดสารออกฤทธิ์ที่มีความสามารถในการละลายสารสำคัญได้มาก แต่ละลายองค์ประกอบอื่น ๆ ได้น้อย มีความคงตัว หาได้ง่าย ราคาถูก และไม่เป็นพิษต่อสุขภาพ ไม่ระเหยยากหรือง่ายเกินไป

การสกัดด้วยวิธี มาเซอเรชัน (maceration) เป็นวิธีการหมักพืชกับตัวทำละลายแล้วสกัดจนกระทั่งเนื้อเยื่อของพืชอ่อนนุ่มจนตัวสกัดสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในพืช ออกมาได้ ควรทำในภาชนะที่มีฝาปิด และหมักไว้จนกระทั่งองค์ประกอบที่ต้องการละลายออกมาจนหมด วิธีนี้เหมาะกับพืชที่มีเนื้อเยื่อไม่แข็งแรงมาก และเป็นวิธีที่ไม่ใช้ความร้อน จึงเหมาะกับสารสกัดที่ไม่ทนต่อความร้อน แต่วิธีนี้ไม่ค่อยสมบูรณ์เนื่องจากเมื่อละลายองค์ประกอบออกมาระดับหนึ่ง จะเกิดความสมดุลทำให้กระบวนการเกิดการหยุดชะงักลง (รัตน อินทรานุกุล, 2550)

การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลินทรีย์

หลักการ

เชื้อมีความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันและความไวของเชื้อสามารถเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเชื้ออยู่ในสภาวะที่ต่างไปจากเดิม สามารถประเมินความไวของเชื้อได้โดยวิธี 2 วิธี หลัก ๆ คือ disc diffusion method และ tube dilution method

Disc diffusion method วิธีการนี้จะนำเชื้อที่ต้องการทดสอบนำมาป้ายบนผิวหน้าของอาหารแข็งและนำแผ่นกระดาษกรองลักษณะวงกลมซึ่งมีตัวยานชนิดต่าง ๆ อยู่ (antibiotic disc) มาวางไว้บนผิวหน้าของอาหารหลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อ ตัวยาค่อยๆซึมจากแผ่น disc แผลออกไปในรัศมีโดยรอบ แผ่จากที่ที่มีความเข้มข้นสูงไปยังที่ที่มีความเข้มข้นต่ำ ตัวยาที่มีประสิทธิภาพจะยับยั้งการเจริญของเชื้อ ทำให้พบวงในขอบแผ่นยา (Zone of inhibition) ให้วัดเส้นผ่าศูนย์กลางแล้วนำไปเทียบกับตารางมาตรฐานของยานชนิดนั้น ๆ ก็จะทำให้ทราบว่าเชื้อไวต่อยา (susceptible) ไวปานกลาง (intermediate susceptible) หรือคือต่อยา (resistance) วิธี Agar well diffusion method จะอาศัยหลักการเดียวกับวิธี Disc diffusion method แต่จะต่างกันตรงวิธี Agar well diffusion method จะไม่ใช้แผ่นกระดาษกรอง แต่จะเจาะหลุมในอาหารแข็งแล้วเติมตัวยาลงไป ส่วนมากจะใช้กับยาหรือสารสกัดที่การออกฤทธิ์ไม่ค่อยแรง จะใช้ปริมาณตัวยาที่มากกว่า

Tube dilution method วิธีการนี้จะใช้หลักการของการเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ (antibiotic) ในอาหารเหลวให้มีความเข้มข้นในแต่ละหลอดลดลงไปครึ่งหนึ่งเรื่อย ๆ (two fold

dilution) แล้วนำเชื้อที่ต้องการทดสอบเติมลงไป ในจำนวนที่จำกัดทุกหลอด หลังจากนั้นนำไปเพาะเลี้ยง เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ซึ่งเรียกว่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) โดยอ่านผลจากหลอดที่ไม่มีเชื้อเจริญซึ่งจะเป็นหลอดที่ใสไม่เกิดความขุ่นและมีความเข้มข้นของยาต่ำสุด จากนั้นถ้าหากทำการถ่ายเชื้อจากหลอดที่ไม่พบว่ามีเชื้อเจริญ นำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารรุ้นก็จะหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารรุ้นซึ่งเรียกว่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC) (คู่มือปฏิบัติการวิชาสรีรวิทยาและนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์, มหาวิทยาลัยพะเยา)

เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography, TLC)

โครมาโทกราฟี (chromatography) เป็นวิธีนิยมการแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัวของสารตัวอย่างระหว่างเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เฟสเคลื่อนที่จะทำหน้าที่ในการพาสารให้เคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ ทำให้องค์ประกอบต่าง ๆ ในสารตัวอย่างเกิดการเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกระหว่างเฟสทั้งสอง และมีการหน่วงเหนี่ยว (retention) ในเฟสอยู่กับที่ซึ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมี และกายภาพของสารในองค์ประกอบแต่ละชนิดในตัวอย่าง ทำให้องค์ประกอบหรือสารแต่ละชนิดเกิดการเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ในอัตราที่แตกต่างกัน จึงเกิดการแยกสารขึ้น (พอลดา ชัยกิจ, 2559)

ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography, TLC) เป็นเทคนิคที่อาศัยเฟสอยู่กับที่หรือแอดซอร์เบนต์ แผ่นบนแผ่นรองรับหรือซัพพอร์ตเตอร์ (supporter) ซึ่งทำด้วยแก้วหรืออะลูมิเนียมเมื่อหยดสารละลายของตัวอย่างลงไปบนแอดซอร์เบนต์แล้ว จึงจะนำแผ่น TLC ใสในภาชนะซึ่งบรรจุเฟสเคลื่อนที่ไว้หรือระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อให้เฟสเคลื่อนที่ได้เคลื่อนที่ไปบนเฟสอยู่กับที่ซึ่งจะเรียกว่า ดีเวลอปเมนต์ (development) จึงทำให้เกิดการแยกสารต่าง ๆ ออกจากกัน และหลังจากนั้นก็นำแผ่น TLC ไปตรวจสอบเพื่อดูว่าสารที่แยกได้เป็นสารกลุ่มใด ตรวจสอบโดยการใช้ยาตรวจสอบแบบต่าง ๆ ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis) โดยเทคนิคนี้ทำโดยการนำไปเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานจากสีและค่า R_f ของสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน ทำให้สามารถตรวจเอกลักษณ์ (identify) ของสารได้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การนำขนาดและความเข้มของจุดสารตัวอย่างไปเทียบกับสารมาตรฐาน, การหาปริมาณของสารโดยวัดการความเข้มของจุดด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์แล้วเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน, การหาปริมาณด้วยวิธีอีลูชัน (elution) โดยสกัดสารออกจากแผ่น TLC แล้วนำไปหาปริมาณด้วยวิธี

อื่น ๆ เช่น การวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) (รัตน์ อินทรานุปกรณ์, 2550)

การตรวจสอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (phytochemical screening)

พฤกษเคมี (Phytochemistry) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่พบในพืช โดยมีขอบเขตการศึกษาเกี่ยวกับการสกัดสารที่สำคัญจากพืช, การแยกสารให้บริสุทธิ์, การหาสูตรโครงสร้างและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารเคมีที่แยกได้จากพืช และกระบวนการสลายตัวของสารเคมีในพืช เป็นต้น กลุ่มสารที่สำคัญในพืชมีอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มตามสารตั้งต้นของสารเหล่านี้ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ สารปฐมภูมิ (primary metabolites) และสารทุติยภูมิ (secondary metabolites)

สารปฐมภูมิ (primary metabolites) จะพบได้ในพืชเกือบทุกชนิด และเป็นกลุ่มสารที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมที่จำเป็น (essential metabolism) ของเซลล์ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) ไขมัน (lipids) โปรตีน (protein) และเอนไซม์ (enzymes)

สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) จะพบได้แตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด ซึ่งเกิดขึ้นจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ในพืช จะมีการแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างชัดเจน แต่ยังคงมีความเกี่ยวข้องในวงจรเมแทบอลิซึมพื้นฐานในเซลล์ที่มีชีวิต โดยแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ได้เป็น อัลคาลอยด์ (alkaloids), สารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds), เทอร์ปีนอยด์และสเตอรอยด์ (terpenoids and steroids) (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2544)

No.	Compounds	Retention index IK(DB-1) ^c	Percentage (%)
1 ^a	1,6-Heptadiene	713	0.3
2 ^b	3-Methyl-2-pentanol	762	0.2
3 ^b	3-Hexanone	771	0.6
4 ^b	2-Hexanone	775	0.1
5 ^b	3-Hexanol	791	0.3
6 ^b	2-Ethyl-cyclobutanol	828	0.6
7 ^b	Hexanol	850	0.2
8 ^a	1-3-Dimethylbenzene	856	0.5
9 ^b	2,5-Hexadione	864	0.6
10 ^a	1,2-Dimethylbenzene	877	0.4
11 ^b	Heptanal	880	0.1
12 ^a	Ethyl benzene	893	5.5
13 ^b	Dihydro-5-methyl-2(3H) furanone	902	0.2
14 ^b	Benzaldehyde	927	0.1
15 ^b	6-Methyl-5-hepten-2-one	961	3.7
16 ^b	2-Pentylfuran	977	1.6
17 ^a	α -Phellandrene	995	0.8
18 ^a	Sylvestrene	1030	1.2
19 ^a	γ -Terpinene	1035	0.2
20 ^b	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1037	0.4
21 ^b	Thujone	1073	0.3
22 ^b	Linalol	1074	0.6
23 ^b	2-Phenylethanol	1083	0.4
24 ^b	Limonene oxide	1095	0.3
25 ^a	n-Undecane	1100	0.1
26 ^b	2,6-Dimethylcyclohexanol	1112	3.4
27 ^b	Benzoic acid	1160	t
28 ^b	Safranal	1160	0.1
29 ^b	Estragole	1163	0.1
30 ^b	β -Cyclocitral	1194	t
31 ^a	α -Ionene	1340	t
32 ^b	Geosmin*	1386	0.8
33 ^a	Tetradecane	1400	25.3
34 ^a	β -Caryophyllene	1414	0.2
35 ^b	Dihydro- α -ionone	1432	0.1
36 ^b	(E)- β -Ionone	1456	0.3
37 ^b	β -Ionone epoxide	1459	t
38 ^a	β -Selinene	1476	t
39 ^a	β -Curcumene	1500	0.2
40 ^a	Pentadecane	1512	0.2
41 ^a	2-Hexadecene	1586	0.2
42 ^a	Hexadecane	1612	0.2
43 ^a	Heptadecene ^d	1668	0.3

ภาพ 8 แสดงสารสำคัญจากการสกัดน้ำมันหอมระเหยจาก *Spirulina platensis* ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี (chromatography)

ที่มา: Touria et al, 2019

table 2. (continued).

No.	Compounds	Retention index IK(DB-1) ^c	Percentage (%)
44 ^a	n-Heptadecane	1700	41.7
45 ^a	8-Heptadecene	1719	0.1
46 ^b	Tetradecanoic acid	1723	t
47 ^b	Pentadecanoic acid	1776	t
48 ^a	Hexadecanenitrile	1857	0.1
49 ^b	3-Methoxy-4-hydroxy cinnamic acid	1881	0.1
50 ^b	Hexadecanoic acid,methyl ester	1907	0.2
51 ^b	Isophytol	1944	0.2
52 ^b	Hexadecanoic acid*	1975	0.1
53 ^b	1-Heptadecanol*	1986	0.4
54 ^a	Eicosane*	2000	0.5
55 ^b	Octadecanal*	2034	0.3
56 ^b	Heptadecanoic acid*	2065	0.2
57 ^b	Phytol	2086	0.6
58 ^b	Octyl methoxy cinnamate*	2088	t
59 ^b	1-Nonadecanol*	2181	0.1
60 ^a	1-Docosene*	2194	0.2
61 ^b	Octadecanoic acid*	2200	0.3
62 ^b	1-Eicosanol*	2210	0.1
63 ^b	1-Tetracosanol*	2456	0.5
64 ^b	1-Hexacosanol*	2852	0.2
65 ^a	Hexatriacontane*	3600	0.1
66 ^a	Tritetracontane*	4300	t
	Oxygenated fraction ^b		17.8
	Hydrocarbon fraction ^a		78.9
	Total		96.7

a = Hydrocarbon compounds

b = Oxygenated compounds

c = Compounds are listed in order of their elution from a DB1 column

*: Components which have not been previously described in the *S. platensis* essential oil in the literature

d = Mass spectrum of heptadecene is given in figure 1.

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Mona (2014) ได้ศึกษากิจกรรมการต้านไวรัสและต้านจุลชีพของสารสกัดจาก *Spirulina platensis* โดยใช้ (methanol, n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol and water) เป็นตัวสกัดแล้วทำให้แห้ง จากนั้นนำไปทดสอบการต้านไวรัสและจุลชีพ ซึ่งประกอบไปด้วยไวรัส 4 ชนิด ได้แก่ Rotavirus Wa strain, Adenovirus type 7, Adenovirus type 40, Coxsackievirus B4 ส่วนแบคทีเรียที่นำไปใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* เชื้อรา *Candida albicans* จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัด methanol และ n-hexane มีค่าการยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญกับไวรัสทุกชนิด สารสกัด ethyl acetate สามารถยับยั้งได้เฉพาะ Rotavirus Wa strain มีการยับยั้ง 53.3% ส่วนสารสกัด เฮกเซนปกติมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Salmonella senftenberg* มากที่สุด และพบว่ากรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัว และโมโนเทอร์พีนไฮโดรคาร์บอนในสไปรูลินามีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ของสารสกัด n-hexane ในการต้านไวรัสและต้านจุลชีพ และช่วยเสริมฤทธิ์กันระหว่างคาร์โบไฮเดรต และสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านไวรัสของสารสกัดเมทานอลทั้งหมด

เจนจิรา ผลโภคกุล และคณะ (2015) ได้ศึกษาการเปรียบเทียบสมบัติทางเคมีกายภาพ และความสามารถในการออกซิเดชันของสไปรูลินาแห้งเมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 0 และ 90 วัน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบสมบัติทางเคมีและกายภาพ ได้แก่ ความชื้น ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี ค่าสี และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และความสามารถในการออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP ของสไปรูลินาแห้งเมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 0 และ 90 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง คือ (1) การทำแห้งแบบอบลมร้อน (2) การทำแห้งแบบอบสุญญากาศ (3) และ (4) เป็นตัวอย่างสไปรูลินาแห้งทางการค้า โดยตัวอย่างจากสไปรูลินาแห้ง (1) และ (2) ผ่านการสกัดด้วยเมทานอล 80% และจากการทดสอบพบว่าในวันที่ 0 สไปรูลินาแห้งทั้ง 4 ตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าวันที่ 90 โดยผลที่ได้จากทั้ง 4 ตัวอย่าง ในวันที่ 0 มีค่า ABTS (IC_{50} $\mu\text{g/ml}$) เท่ากับ 1240 ± 70 , 870 ± 10 , 1510 ± 70 , 2800 ± 10 ตามลำดับ และผลที่ได้จากทั้ง 4 ตัวอย่าง ในวันที่ 90 มีค่า ABTS (IC_{50} $\mu\text{g/ml}$) เท่ากับ 1900 ± 30 , 1280 ± 60 , 2260 ± 50 , 3600 ± 60 ตามลำดับ ปริมาณค่าวอเตอร์แอกทิวิตีและความชื้นมีค่าเพิ่มขึ้นในทุกตัวอย่าง โดยสรุปแล้วตัวอย่างสไปรูลินาที่ทำแห้งด้วยวิธีอบสุญญากาศยังคงมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และมีความสามารถในการออกซิเดชันดีที่สุด

อรพรรณ พรหมชนพันธ์ และคณะ (2015) ได้ศึกษาผลของสารอาหารต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina platensis*) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อมุ่งหมายกำหนดหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายสไปรูลินาที่เพาะเลี้ยงจากต่างสารอาหารเพาะเลี้ยงและต่างความเข้มข้นเชิงเปรียบเทียบ ซึ่งเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหารต่างกัน 8 ชนิด ประกอบไปด้วย สารเพาะเลี้ยงการค้า 1, สารเพาะเลี้ยงการค้า 2, CMU, CMU free fertilizer, CFTRI, CMU 10% น้ำเสียปลาหมัก, CMU free fertilizer 10% น้ำเสียปลาหมักและ CFTRI 10% น้ำเสียปลาหมัก โดยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย ABTS ผลจากการศึกษาพบว่าในสูตรเพาะเลี้ยงที่มี 10% น้ำเสียอินทรีย์ทำให้สาหร่ายมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่ปราศจากน้ำเสียอินทรีย์ และน้ำเสียอินทรีย์ในสูตรเพาะเลี้ยงทำให้ได้ปริมาณชีวมวลสาหร่ายที่มากกว่าด้วย

Usharani (2015) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัด *Spirulina platensis* เพื่อต่อต้านแบคทีเรียและเชื้อราที่ทำให้เกิดโรค โดยใช้ (methanol, acetone, ethanol, hexane and petroleum ether) เป็นตัวทำละลายในการสกัด และทดสอบการต้านเชื้อในเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่คัดแยกได้จากร่างกายมนุษย์ ซึ่งมีดังนี้ เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Shigella flexneri* เชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans* และ *Candida glabrata* ทำการทดสอบการต่อต้านเชื้อด้วยวิธี Disc Diffusion Method และ Minimum inhibitory concentration (MIC) ผลจากการทดลองพบว่าสารสกัดสไปรูลินาที่ใช้เมทานอลในการสกัดมีโซนของที่ยับยั้งต่อแบคทีเรียและเชื้อรามากที่สุด ส่วนสารสกัดจากสไปรูลินาที่ใช้เฮกเซนในการสกัดพบว่าการยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราต่ำสุดเมื่อเทียบกับตัวอื่น ๆ

Katya (2018) ได้ศึกษากิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ในหลอดทดลองของสารสกัดจาก *Lemna minuta*, *Spirulina sp.*, และ *Chlorella vulgaris* โดยทำการสกัดสารจากพืชทั้ง 3 ชนิดด้วยเอทานอลและเมทานอลในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 จากนั้นนำสารสกัดไปทดสอบการต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar well diffusion โดยแบคทีเรียที่ทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* ส่วนเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium verrucosum* จากการทดสอบพบว่าโดยทั่วไปสารสกัดจากพืชทั้งสามชนิดที่สกัดโดยใช้เอทานอลสกัดมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อได้ดีกว่าที่ใช้เมทานอลสกัด และสารสกัดที่มีประสิทธิภาพดี

ที่สุดคือสารสกัดของ *Lemna minuta* ที่ใช้เอทานอลเป็นตัวสกัด สามารถต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ ทุกตัว ยกเว้น *Bacillus cereus* โดยถือว่าสารสกัดจากพืชทั้งสามชนิดสามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ หากเติมลงไปในการอาหารคนหรืออาหารสัตว์หรือใช้ในด้านเภสัชก็สามารถช่วยในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันและรักษาการติดเชื้อได้

อมรรัตน์ อุตสาหะ และธีญาภรณ์ แก้วทวี (2019) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับผลของสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio parahaemolyticus* และ *V. harveyi* ในกุ้งขาวแวนนาไม โดยเตรียมสารสกัดหยาบโดยแช่ผงสาหร่ายในตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ อะซิโตน เมทานอล เอทานอล และเฮกเซน ในอัตราส่วน 1:5 (w/v) นำไปเขย่า 24 ชั่วโมง แล้วกรองแยกตะกอนสาหร่าย แล้วนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยจนกระทั่งแห้ง แล้วเติมสารโพลีไวนิลไพโรลิโดน (polyvinylpyrrolidone) น้ำหนัก 4 เท่าของสารสกัด จากนั้นนำไประเหยแห้งจนได้สารสกัดหยาบเหนียวหนืด เก็บใส่ขวดสีชาที่ -20°C องศาเซลเซียส นำสารสกัดไปศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสไปรูลินาต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และ *V. harveyi* ด้วยวิธี Disc diffusion techniques, MIC และ MBC จากการทดสอบพบว่าสารสกัดในตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ได้ดีที่สุด ส่วนสารสกัดในตัวทำละลายอะซิโตนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้ง *V. harveyi* ได้ดีที่สุด ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* คือความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในทุกตัวละลาย แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาสามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Touria et al. (2019) ได้ศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจาก *Spirulina platensis* ในประเทศโมร็อกโก เมื่อได้น้ำมันหอมระเหยแล้วก็ทำการแยกองค์ประกอบโดยวิธี Thin layer chromatography; TLC จากนั้นทำการวิเคราะห์องค์ประกอบที่แยกได้โดยวิธี gas chromatography (GC) และ gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) แล้วทำการคำนวณหารปริมาณสารที่พบใน *S. platensis* ในส่วนน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้นั้นก็ได้นำไปทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion method และวิธี Minimum Inhibitory Concentration; MIC โดยเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบนั้น ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *B. anthracis* จากการทดลองในการแยกองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *S. platensis* พบว่ามีสารประกอบทั้งหมด 66 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 96.7% ของน้ำมันหอมระเหย องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจาก *S. platensis* คือ heptadecane (41.7 %), tetradecane (25.3 %),

ethyl benzene (5.5 %) และ 6-methyl-5-hepten-2-one (3.7 %). ส่วนฤทธิ์ในด้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจาก *S. platensis* ที่ได้ทดสอบกับแบคทีเรีย 6 ชนิดสายพันธุ์ พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้งหมด โดยเฉพาะยับยั้งเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สร้างปัญหาด้านสุขอนามัยที่ร้ายแรงไปทั่วโลก และจากการพบสารประกอบหลักที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหย เช่น heptadecane ซึ่งถือเป็นสารที่รู้จักกันดีในการแสดงฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์และด้านการอักเสบที่แข็งแกร่ง โดยสรุปแล้วนอกจากความแข็งแกร่งในการมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากสาหร่าย *S. platensis* และยังสามารถถือได้ว่าเป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากแหล่งธรรมชาติอีกด้วย

รัชนิกร สวามี และคณะ (2020) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ด้วยไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Arthrospira platensis* โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณความเข้มข้นสารไฟโคไซยานินที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้เนื่องจากสารไฟโคไซยานินสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพราะ *S. aureus* เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการก่อโรคที่รุนแรงที่สุดใน genus Staphylococci และมียีนที่ควบคุมการสร้าง adhesin และ toxin มากกว่า 20 ถึง 30 ตัว และเป็นเชื้อที่ก่อโรคผิวหนัง เช่น สร้างเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการก่อสิว และทำให้เกิดการติดเชื้อของแผลผ่าตัด หรือทำให้เกิดอาหารเป็นพิษได้หากมีการปนเปื้อนในอาหาร เป็นต้น ทำการทดสอบคุณสมบัติไฟโคไซยานินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion และ MIC จากการทดลอง พบว่าสารไฟโคไซยานินที่สกัดได้จาก *A. platensis* จะมีความเข้มข้นมากขึ้นเมื่อนำสารไฟโคไซยานินไปทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ และเมื่อนำสารไฟโคไซยานินที่สกัดได้ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ด้วยวิธี agar well diffusion และ MIC พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม และการทดสอบด้วยวิธี MIC สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่ชั่วโมงที่ 6

MANIGANDAN (2020) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดตัวทำละลายต่าง ๆ ของสาหร่ายสไปรูลินาต่อต้านเชื้อโรคของมนุษย์ ในการศึกษานี้วิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ สไปรูลินาและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในหลอดทดลองโดยสารสกัดตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 4 ชนิด (เมทานอล อะซิโตน คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน) ของสาหร่ายสไปรูลินา ทำการทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ด้วยวิธี Disc diffusion และ Agar well diffusion เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio vulnificus* และ *Cellulomonas cellulans* จากการทดสอบวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสไปรูลินานั้น พบองค์ประกอบที่สำคัญ เช่น มีโปรตีนสูง (68.42 ไมโครกรัม/กรัม)

คาร์โบไฮเดรต (10.73 ไมโครกรัม/กรัม), เถ้า (09.15 ไมโครกรัม/กรัม) และปริมาณไขมันต่ำ (2.05 ไมโครกรัม/กรัม), ฟีนอล ไตรเทอร์ฟีนอยด์ สเตียรอยด์ ฟลาโวนอยด์ และซาโปนิน และจากทดสอบการต้านแบคทีเรียของสารสกัดในตัวทำละลายต่าง ๆ พบว่าสารสกัดสไปรูลินาที่ใช้เมทานอลและคลอโรฟอร์ม แสดงโชนการยับยั้งเชื้อสูงสุดต่อ *E. coli* ตามด้วย *C. cellulans* และ *P. mirabilis* ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม ส่วนสารสกัดอะซิโตนแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับปานกลางต่อเชื้อแต่ละชนิด ส่วนสารสกัดจาก เฮกเซนที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมให้ผลการยับยั้งที่น้อยที่สุด จึงสรุปได้ว่าการวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการและฤทธิ์ต้านจุลชีพของการศึกษานี้ช่วยเพิ่มความสำคัญของการใช้ *S. Platensis*

Kareem (2020) ได้ศึกษาฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Spirulina platensis* ต่อการต้านแบคทีเรียและเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคบางชนิดที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ในร่างกายมนุษย์ โดยใช้เอทานอลในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แล้วทำการทดสอบเชื้อจุลชีพที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ในร่างกายที่ โดยเชื้อแบคทีเรียที่สามารถแยกได้ ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, เชื้อรา *Candida albicans*, *Aspergillus niger* จากนั้นทำการทดสอบการต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี agar well diffusion โดยเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดสไปรูลินาต่างกันที่ความเข้มข้นคือ (10–20–30–40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แล้วนำบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย ส่วนเชื้อราบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากการทดสอบพบว่า ฤทธิ์ต้านจุลชีพของ *Spirulina platensis* สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่แยกได้จากร่างกายได้ และพบว่าสารสกัดจาก *Spirulina platensis* ที่ใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอลสามารถแสดงโชนยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียได้สูงสุด

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างสาหร่ายที่ใช้ในการวิจัย คือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สาหร่ายสายพันธุ์ *Spirulina platensis* ลักษณะเส้นสายบิดเกลียว (Spiral filament) ได้รับหัวเชื้อจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดเชียงใหม่ แล้วนำมาขยายชีวมวลในห้องปฏิบัติการคณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารมาตรฐานซาร์รูด (MZ) ภายใต้แสง LED แสงขาว ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ เปิดตลอด 24 ชั่วโมง

ตัวอย่างแบคทีเรียและยีสต์ที่ใช้ในการวิจัย คือ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* จากห้องปฏิบัติการคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

วัสดุ อุปกรณ์ ที่ใช้ในการวิจัย

1. ฟ้าขาวบาง (ขนาดตาข่าย 60 ไมโครเมตร)
2. ไมโครปิเปต (Micropipette) และทีป (Tips)
3. คิวเวทท์ (Cuvette)
4. กระจาดกรอง Pore size 11 ไมโครเมตร
5. บีกเกอร์ (Beaker)
6. กระบอกตวง (Cylinder)
7. หลอดหยด (Droper)
8. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
9. หลอดเซนทริฟิว (Centrifuge tube)
10. คีมคีบ (Forceps)
11. กระจาดชำระ
12. สำลี
13. แผ่นฟรอยด์อะลูมิเนียม

14. หลอดทดลอง (Tube)
15. ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)
16. กรวยกรอง
17. จานเพาะเชื้อ (plate)
18. ตะเกียงแอลกอฮอล์
19. แท่งเจาะหลุม (cork borer)
20. กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
21. 96 well plate
22. แผ่น TLC
23. ขวดแก้ว (Vial)
24. ภาชนะปิด (developing chamber)
25. หลอดรูเล็ก (capillary tube)
26. ไม้จิ้มฟัน

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)
2. เครื่องผสม (Homogenizer)
3. เครื่องระเหยแห้งอัตโนมัติ (Rotary Evaporator)
4. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV-vis spectrophotometer)
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
6. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
7. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
9. เครื่องหนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
10. เครื่องปรับความขุ่น (McFarland densitometer)
11. ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina Air Flow)
12. เครื่องอ่านเพลท (microplate reader)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. เอทานอล (Ethanol)
2. เมทานอล (Methanol)
3. น้ำกลั่น (hydrodistillation)

4. น้ำดีไอ (deionized water)
5. เอทิล อะซิเตท (Ethyl acetate)
6. เฮกเซน (Hexane)
7. อะซิโตน (Acetone)
8. ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum Ether)
9. ไอโซโพรพานอล (Isopropanol)
10. อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)
11. Potassium Phosphate Buffer (PPB)
12. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
13. Dipotassium peroxodisulfate
14. Normal saline solution (NSS)
15. Mueller–Hinton Agar (MHA)
16. Yeast Malt Broth (YMB)
17. Gentamycin
18. Amphotericin B
19. 10% Phosphomolybdic acid/ ethanol (PMA reagent)
20. Dragendroff's reagent
21. DPPH radical
22. Vitamin C
23. Trolox

วิธีดำเนินงาน

การเตรียมสารสกัด

นำผงสไปรูulina ในตัวทำละลาย 6 ชนิด ได้แก่ 1) น้ำและเอทานอล 95% อัตราส่วน 3:1, 2) น้ำและเอทานอล 95% อัตราส่วน 1:1, 3) น้ำและเอทานอล 95% อัตราส่วน 1:3, 4) น้ำ, 5) เอทานอล 95% และ 6) เมทานอล โดยแช่ผงสไปรูulina ในตัวทำละลายด้วยอัตราส่วน 1:10 (w/v) เป็นเวลา 2 วัน แล้วกรองแยกตะกอนสไปรูulina นำของเหลวที่ได้ไปทำแห้งโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilization) จากนั้นบันทึกลักษณะและคำนวณน้ำหนักสารสกัดที่ได้ แล้วทำการเก็บรักษาไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Pseudomonas aeruginosa* ในอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ถึง 24 ชั่วโมง และเชื้อ *Candida albicans* เลี้ยงในอาหาร Yeast Malt Agar (YMA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ถึง 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกเชื้อมา 3 ถึง 5 โคโลนี ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland NO. 0.5 ด้วย 0.85% normal saline solution (0.85% NSS) โดยจะมีเชื้ออยู่ประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml และทำการเจือจางต่อ โดยให้เชื้ออยู่ประมาณ 1.5×10^7 CFU/ml

การทดสอบเชื้อโดย วิธี agar well diffusion

1. cotton swab จุ่มเชื้อแบคทีเรียที่มีเชื้อ 1.5×10^7 CFU/ml นำมาเกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำอาหาร MHA จุ่มเชื้อยีสต์ที่มีเชื้อ 1.5×10^8 CFU/ml นำมาเกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำอาหาร YMA
2. ทิ้งไว้ให้ผิวน้ำอาหารแห้ง ใช้แท่งเจาะหลุม (Cork borer) เจาะลงบนจานอาหารขนาด 6 มิลลิเมตร
3. หยดสารสกัดสไปรูลินาความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ละลายใน 10%DMSO ลงไปในหลุม 50 ไมโครลิตร โดยใช้ Gentamicin เป็น positive control สำหรับแบคทีเรีย และ Amphotericin B เป็น positive control สำหรับยีสต์ และ ใช้ 10%DMSO เป็น negative control
4. ทิ้งไว้ให้สารสกัดซึมลงผิวน้ำอาหาร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง
5. ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (clear zone) หน่วยเป็น มิลลิเมตร โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง รายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD)

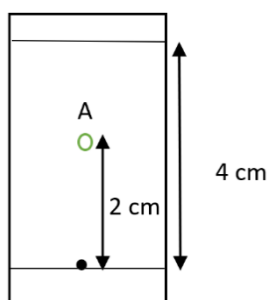
การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC)

1. การหาระบบตัวทำละลาย

เตรียมระบบตัวทำละลาย (mobile phase) ที่เหมาะสมในการแยกสารออกจากกันลงในภาชนะปิด (developing chamber) แล้วร่อนสารละลายอิมิตัว นำสารสกัดสไปรูลินาใส่ในขวด (Vial) แล้วเติมตัวทำละลาย จากนั้นทำการ Spot สารลงบนแผ่น TLC ด้วยหลอดรูเล็ก (capillary tube) แล้วนำแผ่น TLC จุ่มลงไปในภาชนะปิดที่เตรียมไว้ ปิดฝาแล้วปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปจนถึงระดับที่กำหนดไว้แล้วนำแผ่น TLC ออกมา ร่อนแห้ง

2. การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารสกัด

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารสกัดโดยจะนำแผ่น TLC ที่ได้ ไปส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร เพื่อดูตำแหน่งระยะที่สารเคลื่อนที่ แล้วคำนวณหาค่าคงที่อัตราไหล (Rate of flow หรือ R_f) โดยหาได้จากอัตราส่วนระหว่างระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้หารด้วยระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ ซึ่งค่า R_f เป็นค่าเฉพาะของแต่ละสาร



จากสูตร ค่า R_f = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่/ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่สูงสุด
แทนค่า; R_f ของสาร A = $2/4 = 0.5$

ภาพ 9 ตัวอย่างการหาค่า R_f ของโครมาโทแกรม

นำแผ่น TLC ไปย้อมด้วย 10% Phosphomolybdic acid/ ethanol (PMA reagent) และ Dragendroff's reagent ถ้าสารทำปฏิกิริยากับสารละลาย PMA reagent จะเกิดจุดสีเขียว และถ้าสารทำปฏิกิริยากับสารละลาย Dragendroff's reagent จะเกิดจุดสีแดง ซึ่ง Dragendroff's reagent โดยทั่วไปใช้สำหรับทำปฏิกิริยากับสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ จะให้จุดสีแดงบนแผ่น TLC

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH ในเมทานอล ที่มีความเข้มข้น 0.2 mM โดยการจุ่มแผ่น TLC ลงในสารละลาย DPPH ซึ่งมีสีม่วงเข้ม จากนั้นนำขึ้นมาทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วสังเกตตำแหน่งที่ปรากฏการฟอกจางสีบนพื้นสีม่วง แสดงว่าสารที่ตำแหน่งนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับ DPPH radical ทำให้สีม่วงของ DPPH นั้นหายไป

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ด้วยวิธีวัดการดูดกลืนแสง

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยวิธี 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical scavenging activity) โดยดัดแปลงวิธีของ (Blois, 1958)

1. เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.15 mM ที่ละลายด้วยเอทานอล ปริมาตร 100 μ L

2. ผสมกับสารสกัดหยาบสไปรูลินาที่ความเข้มข้น 156.25–25000 μ g/mL หรือ สารมาตรฐานวิตามินซีความเข้มข้น 0.625–10 μ g/mL สาร Trolox ความเข้มข้น 1.25–20 μ g/mL ปริมาตร 100 μ L แล้วเขย่าให้เข้ากัน ใน 96-well microplate

3. ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 517 nm

4. คำนวณค่า % radical scavenging activity ดังสมการ ดังนี้

$$\% \text{ DPPH radical scavenging activity} = \left[\frac{A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})}{A_{\text{control}}} \right] \times 100 \quad (1)$$

เมื่อ A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงควบคุม (สารละลาย DPPH และ 0.1 % DMSO)

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (สารละลาย DPPH และสารสกัดหยาบหรือสารมาตรฐาน)

A_{blank} = ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (เอทานอลที่ไม่มีสารละลาย DPPH และสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยวิธี 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS radical scavenging activity) โดยดัดแปลงวิธีของ (Re and et al., 1958)

1. ทำการเตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 mM ในน้ำดีไอ (deionized water)

2. ผสม กับ dipotassium peroxodisulfate ความเข้มข้น 2.45 mM ในอัตราส่วน 1 : 0.5

3. ป่มในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12–16 ชั่วโมง แล้วนำมาเจือจางด้วยเอทานอล วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm ให้มีค่า การดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.70 (± 0.02)

4. เตรียมสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 156.25–25000 μ g/mL หรือ สารมาตรฐานวิตามินซีความเข้มข้น 0.625–10 μ g/mL สาร Trolox ความเข้มข้น 1.25–20 μ g/mL ปริมาตร 20 μ L ผสมกับสารละลาย ABTS ปริมาตร 180 μ L เขย่าให้เข้ากันใน 96-well microplate

5. ตั้งทิ้ง ไว้ในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความ ยาวคลื่น 734 nm

6. คำนวณค่า % radical scavenging activity สมการเช่นเดียวกับวิธี DPPH

การหาค่า IC_{50} (IC_{50} μ g/ml)

1. หลังจากได้ค่า % radical scavenging activity ทั้งวิธี DPPH และ ABTS

2. นำไปหาค่า IC₅₀ โดยการสร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging activity และสารสกัดหยาบ หรือสารมาตรฐานวิตามินซีและ Trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป GraphPad Prism เวอร์ชัน 5.0

3. เนื่องจากค่า IC₅₀ คือ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้ค่า % radical scavenging activity ลดลงครึ่งหนึ่งจากค่าที่ยับยั้งสูงสุด ดังนั้นถ้าค่า IC₅₀ น้อยแสดงว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี

การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ด้วยวิธี Wintermans และ Demots (1965)

1. ชั่งตัวอย่างสไปรูลินาที่ผ่านการสกัดด้วยทำละลาย 6 ชนิด ปริมาณ 0.1 กรัม ใส่ลงในหลอดเซนทริฟิว (Centrifuge tube)

2. เติมน้ำ 95% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แช่เย็นทิ้งไว้ในความมืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

3. แยกสารละลายส่วนใส (supernatant) ลงในหลอดเซนทริฟิวหลอดใหม่ และนำไปปั่นให้ตกตะกอนอีกครั้ง

4. นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 665 และ 649 นาโนเมตร โดยใช้เอทานอล 95% เป็น Blank

สมการสำหรับคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ

$$\text{คลอโรฟิลล์ (ไมโครกรัมต่อลิตร)} = \frac{((13.7(A_{665}-A_{750}))-(5.76(A_{649}-A_{750}))) \times v}{V \times l} \quad (2)$$

เมื่อ v คือ ปริมาตรที่สกัด (มิลลิลิตร)

V คือ ปริมาตรตัวอย่างที่กรอง (มิลลิลิตร)

และ l คือ ความกว้างของคิวเวทท์ (เซนติเมตร)

การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ด้วยเทคนิคไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิทรี (Sommer, 1992)

1. ชั่งตัวอย่างสไปรูลินาที่ผ่านการสกัดด้วยทำละลาย 6 ชนิด 0.2 กรัม ลงในหลอดเซนทริฟิวขนาด 15 มิลลิลิตร

2. เติมน้ำ 95% เอทานอลปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ 60% โพแทสเซียม 0.5 มิลลิลิตร แล้วป้อนที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 10 นาที

3. นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

4. แยกสารละลายส่วนบนใส่ลงในหลอดเซนทริฟิวขนาด 50 มิลลิลิตร เติม 95% เอทานอลและ 60% โฟแทสเซียม ลงในส่วนที่เป็นตะกอนเพื่อสกัดซ้ำอีกครั้ง

5. เติม 9% โซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิลิตร และไดเอทิลอีเทอร์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น

6. เปิดสารละลายส่วนบนลงในหลอดใหม่ แล้วเติมไดเอทิลอีเทอร์ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนด้วยแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

สมการสำหรับคำนวณปริมาณแคโรทีนอยด์

$$\text{แคโรทีนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง)} = \frac{A_{450} \times 10}{260 \times W} \quad (3)$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนด้วยแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

10 คือ ปริมาตรไดเอทิลอีเทอร์ ที่ใช้สกัด

260 คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของแคโรทีนอยด์

และ W คือ น้ำหนักแห้ง (กรัม)

การวิเคราะห์ปริมาณไฟโคไซยานิน ด้วยวิธีของ Siegelman และ Kycia (1978)

1. ชั่งตัวอย่างสไปรูไลนาผ่านการสกัดด้วยทำละลาย 6 ชนิด ปริมาณ 0.01 กรัม ลงในหลอดเซนทริฟิว (Centrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร เติมโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2. นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยทำซ้ำอย่างน้อย 3 รอบ

3. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

4. นำสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 615 และ 652 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณ ไฟโคไซยานิน อัลโลไฟโคไซยานิน และ ไฟโคอิริทริน

สมการสำหรับคำนวณปริมาณไฟโคไซยานิน อัลโลไฟโคไซยานิน และไฟโคอิริทริน

$$\text{ไฟโคไซยานิน (มิลลิกรัมตอกรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{(A_{615} - (0.474 \times A_{652}))}{5.34} \quad (4)$$

$$\text{อัลโลไฟโคไซยานิน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{(A652 - (0.208 \times A615))}{5.09}$$

$$\text{ไฟโคอิริทริน (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{(A562 - (2.41 \times \text{ไฟโคไซยานิน}) - (0.849 \times \text{อัลโลไฟโคไซยานิน}))}{9.62}$$

เมื่อ A562 คือ ค่าการดูดกลืนด้วยแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร

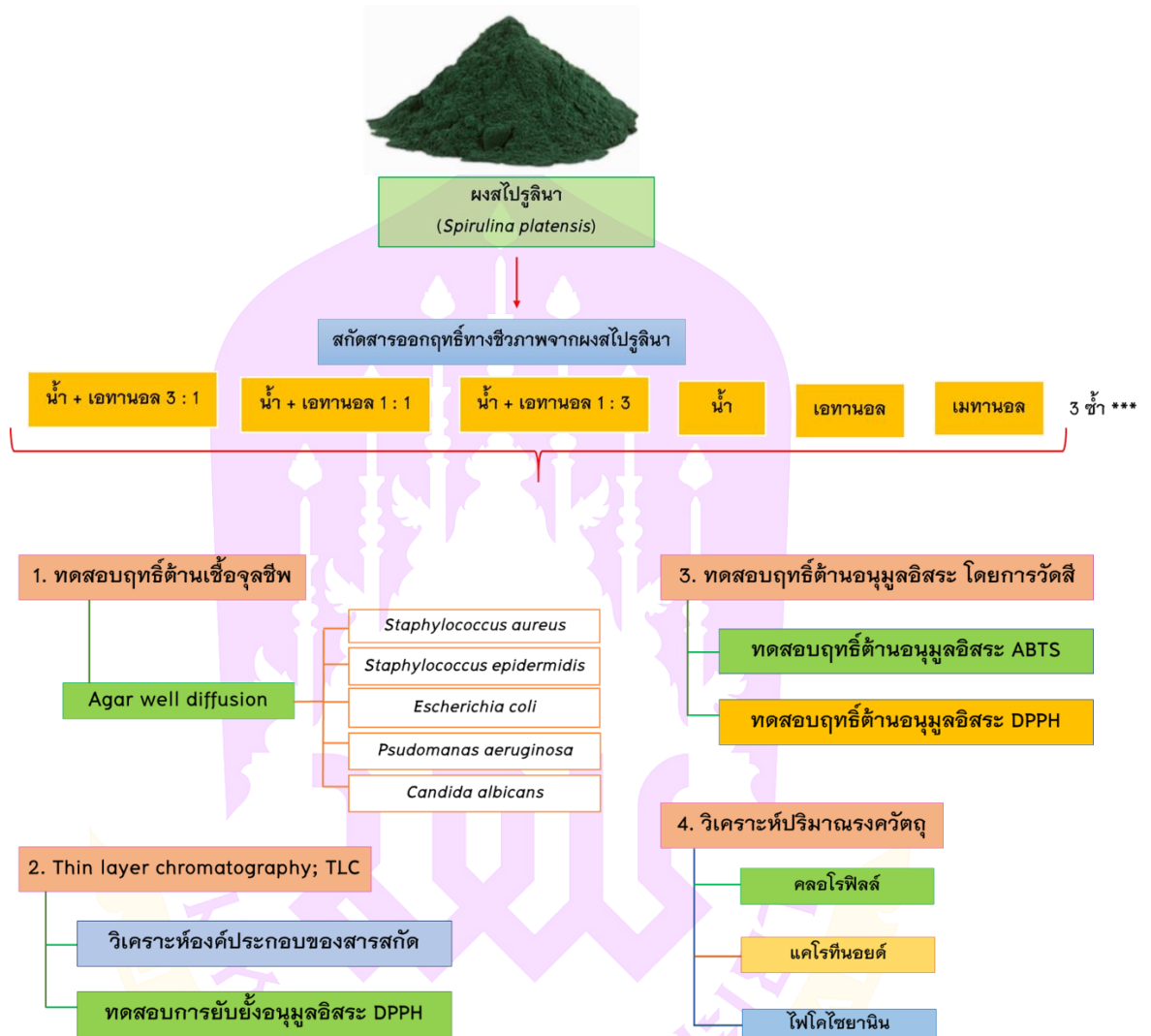
A615 คือ ค่าการดูดกลืนด้วยแสงที่ความยาวคลื่น 615 นาโนเมตร

A652 คือ ค่าการดูดกลืนด้วยแสงที่ความยาวคลื่น 652 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของข้อมูล 3 ซ้ำ (Mean \pm S.D.) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปในการวิเคราะห์ข้อมูลทางเดียว (one-way ANOVA) หรือข้อมูลสองทาง (Two-way ANOVA) โดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) เพื่อทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลอง และการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างผลของตัวทำละลายที่แตกต่างกันต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ชีวภาพ และฤทธิ์ต่อการยับยั้งเชื้อจุลชีพ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

แผนผังการทดลอง



ภาพ 10 แผนผังการทดลอง

บทที่ 4

ผลการวิจัย

สารสกัดจากสไปรูulinaในตัวอย่างละลายที่ต่างกัน

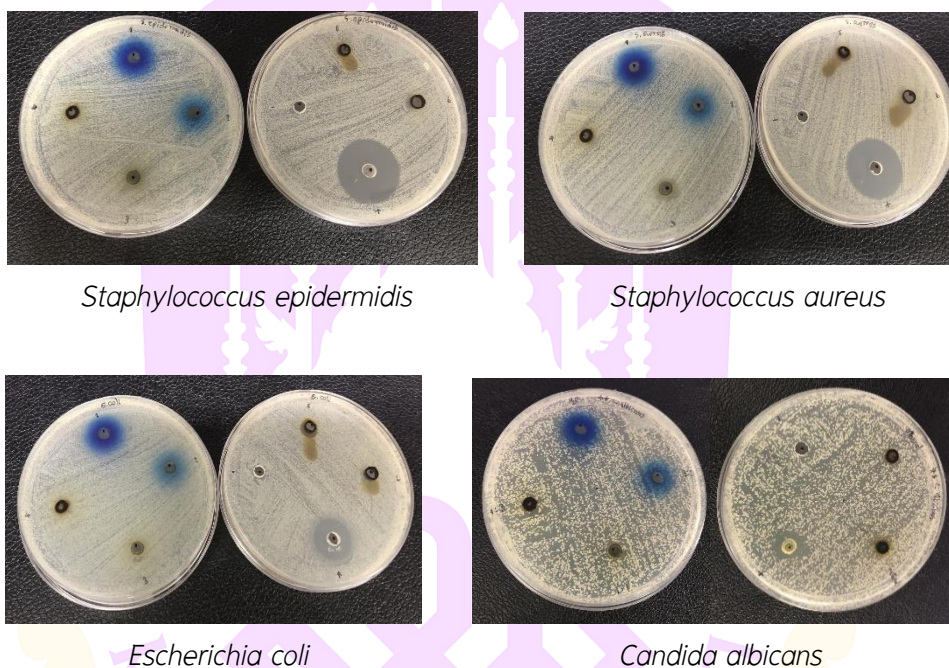
จากการนำผงสไปรูulinaไปแช่ในตัวอย่างละลายที่ต่างกัน 6 ชนิด ได้แก่ น้ำและเอทานอล 95% อัตราส่วน 3:1, น้ำและเอทานอล 95% อัตราส่วน 1:1, น้ำและเอทานอล 95% อัตราส่วน 1:3, น้ำ, เอทานอล 95% และ เมทานอล โดยแช่ผงสไปรูulinaในตัวอย่างละลายด้วยอัตราส่วน 1:10 (w/v) เป็นเวลา 2 วัน แล้วกรองแยกตะกอนสไปรูulina นำของเหลวที่ได้ไปทำแห้งโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilization) โดยผลจากการสกัดพบว่าสารสกัดสไปรูulinaที่ใช้ตัวอย่างละลายที่ต่างกันจะได้ลักษณะ สี และน้ำหนักที่ต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกันแล้วพบว่าสารสกัดสไปรูulinaที่สกัดด้วยน้ำให้ร้อยละสารสกัดมากที่สุด (14.26%w/w) ส่วนสไปรูulinaที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ให้ร้อยละสารสกัดน้อยสุด (3.66%w/w) (ตาราง 3)

ตาราง 1 ลักษณะและปริมาณของสารสกัดที่ได้จากผงสไปรูulina 100 กรัม ในตัวอย่างละลายที่ต่างกัน

ตัวอย่างละลายที่ใช้	ลักษณะสารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด
1) น้ำ : เอทานอล 95% ; 3:1	ของแข็งแห้งสีฟ้าอมเขียว	11.32	11.32
2) น้ำ : เอทานอล 95% ; 1:1	ของแข็งแห้งสีน้ำตาลอ่อน	9.05	9.05
3) น้ำ : เอทานอล 95% ; 1:3	ของแข็งแห้งสีน้ำตาลเข้ม	7.25	7.25
4) น้ำ	ของแข็งแห้งสีน้ำเงิน	14.26	14.26
5) เอทานอล 95%	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	3.66	3.66
6) เมทานอล	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม	6.36	6.36

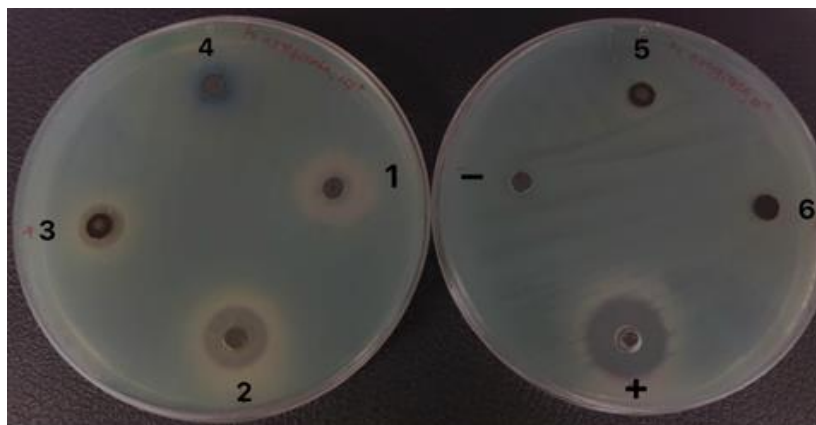
การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ โดยวิธี agar well diffusion

นำสารสกัดจากสไปรูลินาทั้ง 6 ตัวอย่าง ไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* ด้วยวิธี agar well diffusion เทียบกับสารมาตรฐาน Gentamicin เป็น positive control (แบคทีเรีย), Amphotericin B เป็น positive control (ยีสต์) และ 10%DMSO (negative control)



ภาพ 11 ตัวอย่างการไม่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของสารสกัดหยาบจากสไปรูลินา

หมายเหตุ: 1) น้ำต่อเอทานอล 3:1, 2) น้ำต่อเอทานอล 1:1, 3) น้ำต่อเอทานอล 1:3, 4) น้ำ
5) เอทานอล, 6) เมทานอล, + แทน Gentamicin, - แทน 10%DMSO



ภาพ 12 ตัวอย่างการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ของสารสกัด
หยาบจาก สไปรูลินา

หมายเหตุ: 1) น้ำต่อเอทานอล 3:1, 2) น้ำต่อเอทานอล 1:1, 3) น้ำต่อเอทานอล 1:3, 4) น้ำ
5) เอทานอล, 6) เมทานอล, + แทน Gentamicin, - แทน 10%DMSO

จากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อของสารสกัดหยาบจากสไปรูลินาทั้ง 6 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดหยาบจากสไปรูลินาในตัวทำละลายทุกชนิดไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* และยีสต์ *C. albicans* ได้ แต่สารสกัดหยาบจากสไปรูลินาเมื่อใช้ตัวทำละลายที่ 1, 2 และ 3 สามารถยับยั้งเชื้อ *Ps. aeruginosa* ได้ โดยสารสกัดที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุดคือสารสกัดที่ 2, 3, 1 (14.00 ± 1.00^b , 10.83 ± 1.26^b และ 8.67 ± 0.57^b) ตามลำดับ (ตาราง 4)

ตาราง 2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของสารสกัดสไปรูลิना ด้วยวิธี agar well diffusion

แบคทีเรีย	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (มิลลิเมตร) ±SD*						
	(1) น้ำ : 3 Ethanol : 1	(2) น้ำ : 1 Ethanol : 1	(3) น้ำ : 1 Ethanol : 3	(4) น้ำ	(5) Ethanol	(6) Methanol	Gentamicin (10µg)
<i>S. aureus</i>	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	27.00±0.00 ^d
<i>S. epidermidis</i>	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	29.33±0.58 ^e
<i>E. coli</i>	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	25.83±0.29 ^f
<i>Ps. aeruginosa</i>	8.67±0.57 ^b	14.00±1 ^b	10.83±1.26 ^b	NZ	NZ	NZ	25.00±0.29 ^b
ยีสต์							
<i>C. albicans</i>	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	12.83±0.29 ^b

หมายเหตุ: ศึกษารายละเอียดถึงฤทธิ์ของสารสกัดสไปรูลินาที่แสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05)

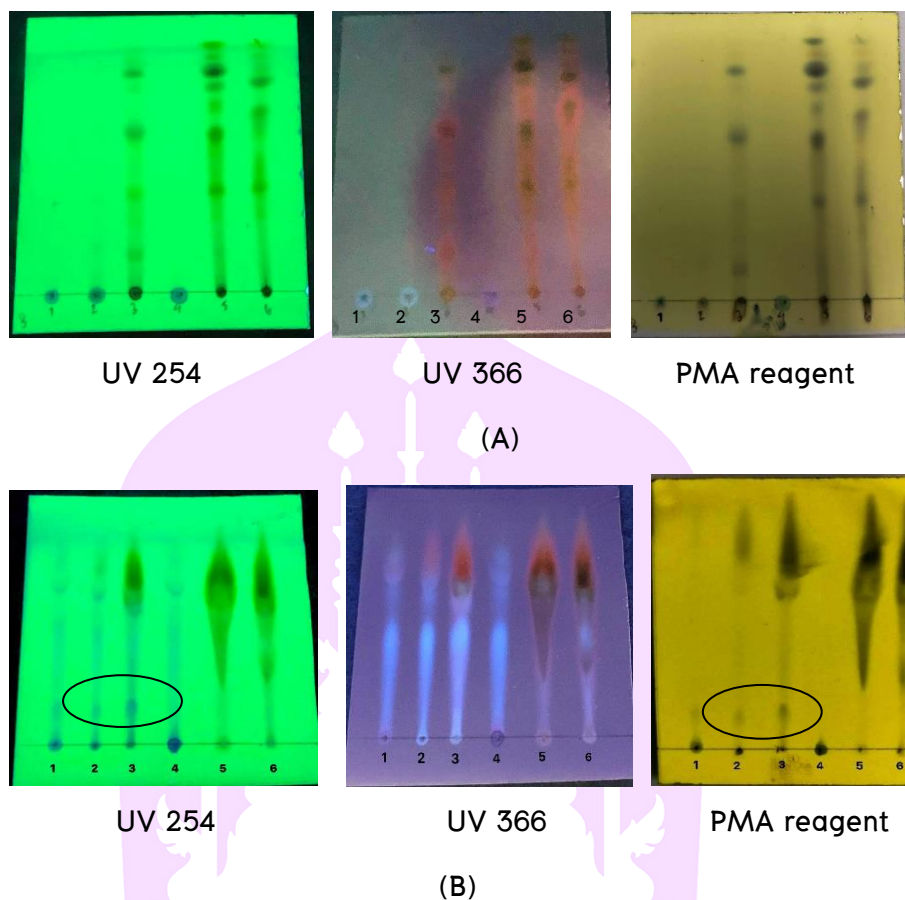
NZ หมายถึงไม่มี Inhibition zone

*ค่าที่ได้มาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารสกัด และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC)

เมื่อนำสารสกัดหยาบของสไปรูลินาทั้ง 6 ตัวอย่างมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารสกัด ทำการแยกสารโดยใช้เทคนิค TLC โดยใช้ 30% Ethyl acetate/Hexane และ 100% Methanol เป็นเฟสเคลื่อนที่ หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และนำไปย้อมด้วย 10% Phosphomolybdic acid/ ethanol (PMA reagent) (ภาพ 11) และย้อมด้วย Dragendroff's reagent (ภาพที่ 12)

จากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่สัมพันธ์กับผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Ps. aeruginosa* ผล TLC เมื่อใช้ระบบ 30% Ethyl Acetate/Hexane แสดงให้เห็นถึงกลุ่มองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใน 3 5 และ 6 แต่องค์ประกอบของสารสกัดที่ออกฤทธิ์ 1 และ 2 แสดงจุดของสารอยู่บริเวณ base line (ดังภาพที่ 11 A) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่ปรากฏบริเวณ base line ของสารสกัด 1 2 และ 3 น่าจะเป็นสารที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อทำการเพิ่มสภาพขั้ว mobile phase ให้เป็น 100% Methanol (ดังภาพที่ 11 B) พบว่าสารสกัดกลุ่มที่ออกฤทธิ์ได้แก่สารสกัด 1 2 และ 3 แสดงการมีอยู่ขององค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนกันคือจุดของสารที่ค่า R_f 0.15 ที่แสดงคุณสมบัติการดูดกลืนแสง UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และให้จุดสีเขียวเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย PMA reagent และที่สำคัญไม่พบการปรากฏของสารนี้ในสารสกัดกลุ่มที่ไม่ออกฤทธิ์ (สารสกัด 4 5 และ 6)



ภาพ 13 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารสกัดโดยเทคนิค TLC

หมายเหตุ: * ภาพ A mobile phase คือ 30% Ethyl Acetate/Hexane ภาพ B mobile phase คือ 100% Methanol

** 1) น้ำต่อเอทานอล 3:1, 2) น้ำต่อเอทานอล 1:1, 3) น้ำต่อเอทานอล 1:3, 4) น้ำ
5) เอทานอล, 6) เมทานอล

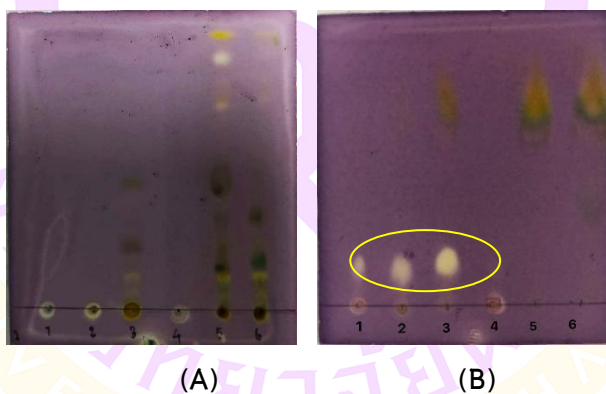
จากผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดทั้งสองกลุ่ม สามารถสรุปได้ว่าสารที่ R_f 0.15 น่าจะเป็นสารที่แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสไปรูลินา และเมื่อทดสอบกับสารละลาย Dragendroff's reagent พบว่าสารที่ R_f 0.15 ยังแสดงจุดสีแดงเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย Dragendroff's reagent แสดงให้เห็นว่าสารดังกล่าวน่าจะเป็นสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ (alkaloids) (ดังภาพ 12)



ภาพ 14 การทดสอบแอลคาลอยด์ด้วยสารละลาย Dragendorff's reagent โดยเทคนิค TLC

หมายเหตุ: 1) น้ำต่อเอทานอล 3;1, 2) น้ำต่อเอทานอล 1;1, 3) น้ำต่อเอทานอล 1;3, 4) น้ำ
5) เอทานอล, 6) เมทานอล

และจากการทดสอบในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยวิธี TLC ยังพบว่า สารที่ R_f 0.15 ยังเป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดจากสไปรูลินาที่แสดงการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วย (ภาพที่ 13)



ภาพ 15 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH โดยเทคนิค TLC

หมายเหตุ: จุดสีเข้ขาวหมายถึงมีการฟอกจางสี DPPH

ภาพ A mobile phase คือ 30% Ethyl Acetate/Hexane

ภาพ B mobile phase คือ 100%Methanol

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ของสารสกัดสไปรูลินา

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ของสารสกัดสไปรูลินาที่สกัดในตัวทำละลายต่างกัน 3 ชนิด คือ น้ำและเอทานอลอัตราส่วน 3:1, น้ำและเอทานอลอัตราส่วน 1:1, น้ำและเอทานอลอัตราส่วน 1:3 ซึ่งทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Ps. aeruginosa* และใช้ Vitamin C กับ Trolox เป็นตัวควบคุมเชิงบวก โดยผลการทดสอบทั้งสองวิธีรายงานผลเป็นค่า IC₅₀ (µg/ml) พบว่าสารสกัดจากสไปรูลินาที่ใช้น้ำ และ เอทานอลอัตราส่วน 1:3 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ดีที่สุด (ABTS = 749.69±26.82, DPPH = 1290.93±9.13) รองลงมาคือน้ำและเอทานอลอัตราส่วน 3:1 (ABTS = 926.70±14.92, DPPH = 1627.47±33.40) น้ำและเอทานอลอัตราส่วน 1:1 (ABTS = 2057.07±712.01, DPPH = 3024.89±50.29) ตามลำดับ (ดังตารางที่ 3) และพบว่าค่า IC₅₀ (µg/ml) ของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS มีค่าต่ำกว่าการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในทุกตัวอย่าง อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตาราง 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ของสารสกัดสไปรูลินา

สารสกัดสไปรูลินา (<i>Spirulina platensis</i>)	IC ₅₀ (mean±SD) µg/ml	
	ABTS	DPPH
น้ำ : เอทานอล ; 3:1	926.70±14.92 ^b	1627.47±33.40 ^c
น้ำ : เอทานอล ; 1:1	2057.07±712.01 ^c	3024.89±50.29 ^d
น้ำ : เอทานอล ; 1:3	749.69±26.82 ^b	1290.93±9.13 ^b
Vitamin C	4.91±0.03 ^a	5.84±0.26 ^a
Trolox	9.36±0.02 ^a	10.00±0.03 ^a

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กหลังตัวเลขแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

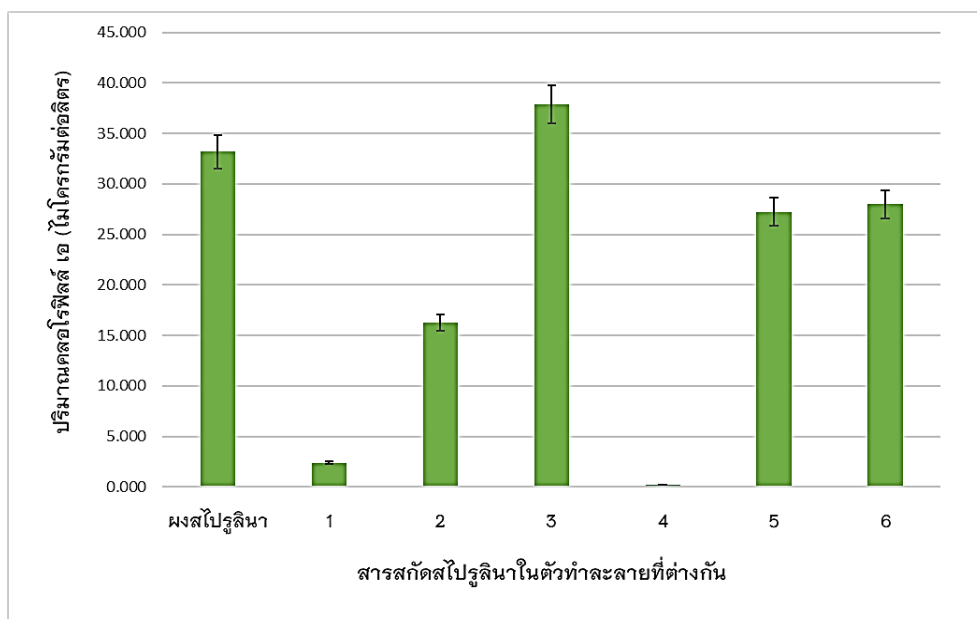
การวิเคราะห์องค์ประกอบรงควัตถุของสารสกัดสไปรูไลนา

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบรงควัตถุของสารสกัดจากสไปรูไลนาในตัวทำละลายที่ต่างกัน 6 ชนิด เปรียบเทียบกับผงสไปรูไลนาที่ไม่ผ่านการสกัดโดยกำหนดให้เป็นตัวควบคุม เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ ซึ่งทำการวิเคราะห์รงควัตถุ 3 ชนิด คือ คลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีนอยด์ กลุ่มไฟโคบิลิน ประกอบไปด้วย ไฟโคไซยานิน อัลโลไฟโคไซยานิน และไฟโคเอริทริน

จากการวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ พบว่าสารสกัดสไปรูไลนาในตัวทำละลายที่ใช้น้ำและเอทานอลอัตราส่วน 1:3 มีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ มากที่สุด รองลงมาคือผงสไปรูไลนาที่ไม่ผ่านการสกัด รองลงมาคือสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอลและเอทานอล ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดสไปรูไลนาที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายนั้นมีปริมาณคลอโรฟิลล์ที่น้อยมากที่สุด (ดังภาพ 4)

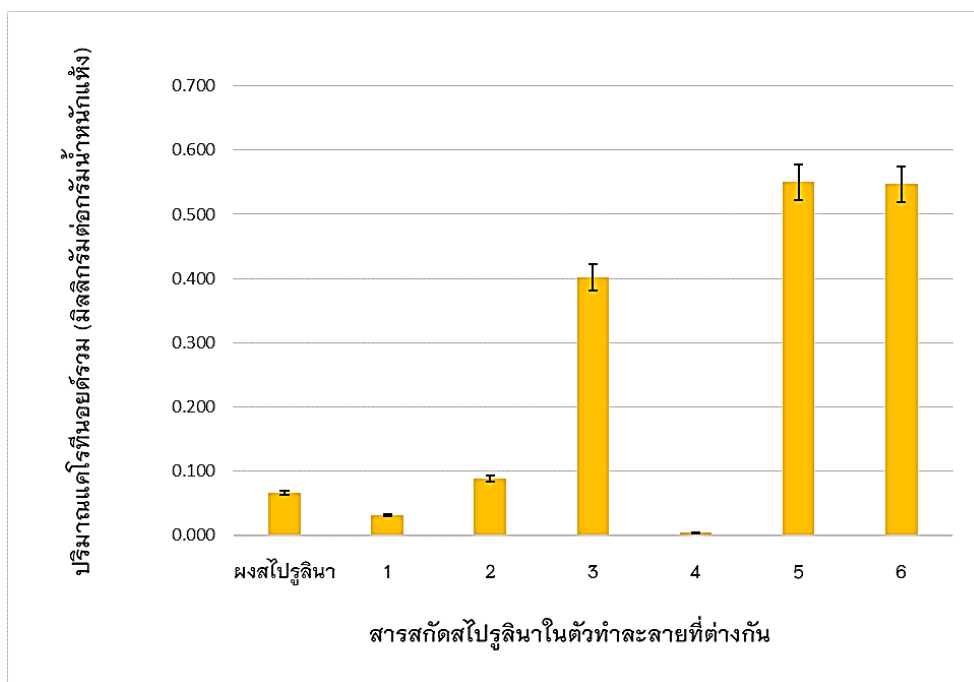
จากการวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์รวมพบว่าสารสกัดสไปรูไลนาที่ใช้เอทานอลและเมทานอลให้ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมมากที่สุดตามลำดับ รองลงมาคือสารสกัดสไปรูไลนาที่ใช้น้ำและเอทานอลอัตราส่วน 1:3 ส่วนสารสกัดที่ใช้น้ำหรือที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในตัวทำละลายนั้นให้ปริมาณแคโรทีนอยด์น้อย และน้อยกว่าผงสไปรูไลนา โดยเฉพาะสารสกัดที่ใช้น้ำพบว่าให้ปริมาณแคโรทีนอยด์น้อยที่สุด (ดังภาพ 5)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณกลุ่มไฟโคบิลิน พบว่าสารสกัดสไปรูไลนาที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายให้ปริมาณไฟโคไซยานินสูงที่สุด รองลงมาคือตัวทำละลายที่ใช้น้ำและเอทานอลอัตราส่วน 3:1 และผงสไปรูไลนาที่ไม่ผ่านการสกัด ตามลำดับ ส่วนสารสกัดชนิดอื่น ๆ พบว่ามีปริมาณในกลุ่มไฟโคบิลินที่ต่ำมาก ๆ (ดังภาพ 6) ซึ่งเมื่อเทียบตัวทำละลายที่ต่างกันแล้วจะเห็นได้ว่าปริมาณกลุ่มไฟโคบิลินมีความตรงข้ามกับปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์รวมซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (Correlation) พบว่าปริมาณไฟโคไซยานินมีความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และ แคโรทีนอยด์รวมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ส่วนปริมาณไฟโคเอริทรินนั้นมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับไฟโคไซยานินและอัลโลไฟโคไซยา ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) (ตาราง 4)



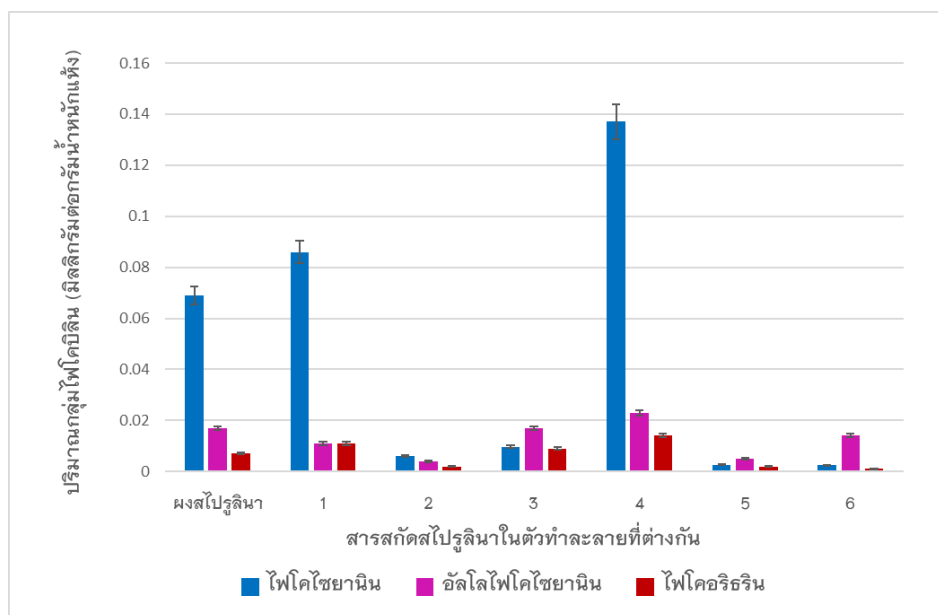
ภาพ 16 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ในสารสกัดสไปรูลินา (*Spirulina platensis*) ในตัวทำละลายที่ต่างกัน

หมายเหตุ: 1) น้ำต่อเอทานอล 3;1, 2) น้ำต่อเอทานอล 1;1, 3) น้ำต่อเอทานอล 1;3, 4) น้ำ
5) เอทานอล, 6) เมทานอล



ภาพ 17 ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมในสารสกัดสปิรูลินา (*Spirulina platensis*) ในตัวทำละลายที่ต่างกัน

หมายเหตุ: 1) น้ำต่อเอทานอล 3;1, 2) น้ำต่อเอทานอล 1;1, 3) น้ำต่อเอทานอล 1;3, 4) น้ำ
5) เอทานอล, 6) เมทานอล



ภาพ 18 ปริมาณกลุ่มไฟโคบิลินในสารสกัดสปิรูลินา (*Spirulina platensis*) ในตัวทำละลายที่ต่างกัน

หมายเหตุ: 1) น้ำต่อเอทานอล 3;1, 2) น้ำต่อเอทานอล 1;1, 3) น้ำต่อเอทานอล 1;3, 4) น้ำ
5) เอทานอล, 6) เมทานอล

ตาราง 4 การวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (Correlation) เพื่อหาความสัมพันธ์ของสารสกัด
จาก สไปรูลินา (*S. platensis*) ในตัวทำละลายที่ต่างกันต่อปริมาณรงควัตถุ

		Correlations				
		Chlo-A	Car	Phyco	Alophy	PhycoEr
Chlo-A	Pearson Correlation	1	.642	-.706*	-.909	-.525
	Sig. (2-tailed)		.060	.038	.424	.113
Car	Pearson Correlation		1	-.759*	-.275	-.637
	Sig. (2-tailed)			.024	.275	.062
Phyco	Pearson Correlation			1	.657	.863**
	Sig. (2-tailed)				.054	.006
Alophy	Pearson Correlation				1	.716*
	Sig. (2-tailed)					.035
PhycoEr	Pearson Correlation					1
	Sig. (2-tailed)					

หมายเหตุ: *. Correlation is significant at the 0.05 level (1-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (1-tailed).

Chlo-A หมายถึง คลอโรฟิลล์เอ

Car หมายถึง แคโรทีนอยด์รวม

Phyco หมายถึง ไฟโคไซยานิน

Alophy หมายถึง อัลโลไฟโคไซยานิน

PhycoEr หมายถึง ไฟโคเอริทริน

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผล

สารสกัดสไปรูลินาที่ใช้ น้ำและเอทานอล 95% ในอัตราส่วน 1:1 1:3 และ 3:1 เป็นตัวทำละลายที่เป็นมิตรต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังสามารถยับยั้ง *Ps. aeruginosa* ได้และจากผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารสกัดและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH โดยเทคนิค (Thin Layer Chromatography, TLC) สามารถบ่งบอกได้ว่าสารสกัดทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Ps. aeruginosa* เป็นสารชนิดเดียวกัน ทั้งยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยังแสดงจุดสีแดงเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย Dragendroff's reagent ที่อนุมานได้ว่าเป็นสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ด้วยวิธีวัดค่าดูดกลืนแสง พบว่าสารสกัดสไปรูลินาที่ใช้ น้ำและเอทานอล อัตราส่วน 1:3 ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมาคือ 3:1 และ 1:1 ตามลำดับ และสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุของสารสกัดจาก สไปรูลินาพบว่าในตัวทำละลายที่เป็นน้ำให้ปริมาณไฟโคไซยานินสูงสุด ตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์สูง

อภิปรายผล

การสกัดสารสไปรูลินาโดยใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน 6 ชนิด ได้แก่ 1) น้ำและเอทานอล 95% อัตราส่วน 3:1, 2) น้ำและเอทานอล 95% อัตราส่วน 1:1, 3) น้ำและเอทานอล 95% อัตราส่วน 1:3, 4) น้ำ, 5) เอทานอล 95% และ 6) เมทานอล โดยแช่ผงสไปรูลินาในตัวทำละลายด้วยอัตราส่วน 1:10 (w/v) เป็นเวลา 2 วัน แล้วกรองแยกตะกอนสไปรูลินา นำของเหลวที่ได้ไปทำแห้งโดยวิธี Lyophilization ทำให้ได้สารสกัดหยาบ 6 ชนิด เพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อ 5 สายพันธุ์ คือแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และยีสต์ *Candida albicans* ด้วยวิธี agar well diffusion เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารสกัดและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ด้วยวิธีวัดการดูดกลืนแสง และเพื่อวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ ได้ผลดังนี้

ปริมาณสารสกัดหยาบจากสไปรูลินาโดยใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน 6 ชนิด ให้ผลการสกัดคิดเป็นร้อยละ 11.32 9.05 7.25 14.26 3.66 และ 6.36 ของน้ำหนักแห้งตามลำดับสารสกัดที่ 1-6 จะเห็นได้ว่าตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบจะได้น้ำหนักของสารสกัดที่มากกว่าที่ไม่มีน้ำเป็นส่วนประกอบหรือที่มีน้ำน้อย ซึ่งน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูง ดังนั้นสารต่าง ๆ ในสไปรูลินาส่วนใหญ่ น่าจะเป็นสารที่มีคุณสมบัติละลายน้ำและเป็นสารมีขั้วสูงด้วย (ณปภัช พิมพ์ดี, 2560)

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคของสารสกัดหยาบจากสไปรูลินาพบว่าในตัวทำละลายทุกชนิดไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* *S. aureus* *S. epidermidis* และ *C. albicans* ได้ แต่สารสกัดสไปรูลินาที่ใช้น้ำและเอทานอล 95% ในอัตราส่วน 3:1 1:1 และ 1:3 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Ps. aeruginosa* ได้ โดยสารสกัดที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุดคือ น้ำและเอทานอล 95% ในอัตราส่วน 1:1 1:3 และ 3:1 ตามลำดับ การใช้เอทานอลและเมทานอลเป็นตัวสกัดไม่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mostafa, (2014) พบว่าสารสกัดสไปรูลินาที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Ps. aeruginosa* และที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* และงานวิจัยของ Katya, (2018) พบว่าสารสกัดจากสไปรูลินาที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* *S. aureus* *Ps. aeruginosa* ในขณะที่งานวิจัยของ Usharani, (2015) พบว่าสารสกัดสไปรูลินาที่ใช้เอทานอลและเมทานอลเป็นตัวทำละลายสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* *S. aureus* *S. epidermidis* *Ps. aeruginosa* และ *C. albicans* ได้ทั้งหมด มีงานวิจัยที่รายงานว่าสารที่มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์จากสไปรูลินาอาจเนื่องมาจากกรด γ -linolenic, กรดไขมัน, ผลเสริมฤทธิ์กันของกรด lauric และ palmitoleic (Mostafa et al., 2014) และ Heptadecane (Touria et al., 2019)

จากผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากสไปรูลินาที่สกัดจากตัวทำละลายแต่ละชนิดที่สัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ยับยั้ง *Ps. aeruginosa* ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสอยู่กับที่ และใช้เมทานอล 100% เป็นเฟสเคลื่อนที่ พบการปรากฏจุดของสารที่ค่า R_f 0.15 ที่มีคุณสมบัติดูดกลืน UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และให้จุดสีเขียวเมื่อทำปฏิกิริยากับ PMA reagent ที่สัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ของสารสกัด ซึ่งผลดังกล่าวอนุมานได้ว่าจุดของสารที่ค่า R_f 0.15 คือสารที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Ps. aeruginosa* และจากการทดสอบด้วยสารละลาย Dragendorff's reagent สันนิษฐานว่าเป็นสารในกลุ่ม แอลคาลอยด์ (alkaloids) ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Katircioglu, (2006) ที่รายงานว่าฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารหยาบขนาดเล็กสามารถอธิบายได้จากการมีอยู่ของ cyclic peptides, alkaloids และ lipopolysaccharides (Katircioglu, 2006) ซึ่งเป็นสารพิษที่เกิดจากกิจกรรมที่เซลล์สร้าง

ขึ้นมา เช่น สหาร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ผลิตสารพิษออกมาแล้วถูกนำไปประยุกต์ใช้ทางเภสัชกรรมอย่างมีศักยภาพ (Volk, 2006) เมื่อทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค TLC ยังพบว่าจุดของสารที่ค่า R_f 0.15 ยังแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วย มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ อรพรรณ, (2015) ที่กำหนดหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสไปรูลินา ด้วยวิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS ได้รายงานว่ สไปรูลินามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลจากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่สามารถยับยั้ง *Ps. aeruginosa* ถือว่ามีความสำคัญ เพราะอาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำสารสกัดสไปรูลินาไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมหรือลดความอันตรายของเชื้อ *Ps. aeruginosa* ลงได้ เช่น การใช้สารสกัดสไปรูลินาช่วยในการรักษาการติดเชื้อบริเวณบาดแผลหรือผิวหนัง เป็นต้น

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ของสารสกัดสไปรูลินาที่สกัดในตัวทำละลายต่างกัน 3 ชนิด พบว่าค่า IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS มีค่าต่ำกว่าการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในทุกตัวอย่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยสารสกัดสไปรูลินาที่ใช้ น้ำและเอทานอลอัตราส่วน 1:3 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ดังนี้ (ABTS = 749.69 ± 26.82 , DPPH = 1290.93 ± 9.13) รองลงมาคือน้ำและเอทานอลอัตราส่วน 3:1 (ABTS = 926.70 ± 14.92 , DPPH = 1627.47 ± 33.40) น้ำและเอทานอลอัตราส่วน 1:1 (ABTS = 2057.07 ± 712.01 , DPPH = 3024.89 ± 50.29) ตามลำดับ ค่า IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัด สไปรูลินาในตัวทำละลายต่างกัน 3 ชนิด ที่คำนวณได้นั้นมีความใกล้เคียงและสอดคล้องกับงานวิจัยของ เจนจิรา, (2558) ที่ได้เปรียบเทียบความสามารถในการออกซิเดชันของสไปรูลินาแห่งทั้งหมด 4 ตัวอย่าง คือ (1) การทำแห้งแบบอบลมร้อน (2) การทำแห้งแบบอบสุญญากาศ (3) และ (4) เป็นตัวอย่างสไปรูลินาแห่งทางการค้า โดยตัวอย่างสไปรูลินาแห่ง (1) และ (2) ผ่านการสกัดด้วยเมทานอล 80% และจากการทดสอบพบว่าการทำแห้งแบบสุญญากาศที่สกัดด้วยเมทานอลให้ผลการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด (เจนจิรา, 2558) เมื่อนำมาเทียบกับงานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดสไปรูลินาในตัวทำละลายที่ใช้ น้ำและเอทานอลอัตราส่วน 1:3 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าทั้ง 4 ตัวอย่าง และสารสกัดสไปรูลินาในตัวทำละลายที่ใช้ น้ำและเอทานอลอัตราส่วน 1:3 และ 3:1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าตัวอย่างสไปรูลินาแห่งทางการค้าทั้ง 2 ยี่ห้อ และยังมีข้อมูลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสไปรูลินาจาก Mano, (1992) ที่รายงานว่สารสกัดจากสไปรูลินาที่ใช้แอลกอฮอล์ในการสกัดสามารถยับยั้ง lipid peroxidation (เป็นสารอนุมูลอิสระ) ยับยั้งได้ 65% ซึ่งยับยั้งได้ดีกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น α -tocopherol (35%), BHA (45%) และ β -

carotene (48%) ส่วนสารสกัดสไปรูลินาที่ใช้ น้ำเป็นตัวทำละลายพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (76%) ซึ่งมากกว่ากรดแกลลิก (54%) และกรดคลอโรเจนิค (56%) (Mano, 1992)

สาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina*) มีรงควัตถุที่มีประโยชน์และสำคัญหลายชนิด ประกอบไปด้วยคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) มีผลต่อการเจริญของสัตว์และแบคทีเรีย การหายใจ การเผาผลาญอาหาร การทำงานของฮอร์โมน กระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดง และการกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย (Pulz and Gross, 2004) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) มีประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น ช่วยป้องกันโรคหัวใจ ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Low density lipoprotein (LDL) มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ช่วยลดอัตราการเกิดโรคมะเร็ง ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) ถือว่าเป็นรงควัตถุที่มีมากที่สุดในสไปรูลินา (*Spirulina* sp.) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดที่ดื้อยาได้บางชนิด และมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Sarada et al., 2011; Kamble et al., 2013)

จากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบรงควัตถุของสารสกัดจากสไปรูลินาในตัวทำละลายที่ต่างกัน 6 ชนิด เปรียบเทียบกับผงสไปรูลินาที่ไม่ผ่านการสกัดโดยกำหนดให้เป็นตัวควบคุม เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ โดยวิเคราะห์รงควัตถุ 3 ชนิด ในสารสกัดสไปรูลินา คือ คลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีนอยด์ และกลุ่มสารไฟโคบิลิน ได้แก่ ไฟโคไซยานิน อัลโลไฟโคไซยานิน และไฟโคอีริทริน พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ในตัวทำละลายที่ใช้ น้ำและเอทานอล อัตราส่วน 1:3 มีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ มากที่สุด รองลงมาคือผงสไปรูลินาที่ไม่ผ่านการสกัด รองลงมาคือสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอลและเอทานอล และจากการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดสไปรูลินาที่ใช้ น้ำเป็นตัวทำละลายนั้นมีปริมาณคลอโรฟิลล์ น้อยที่สุด ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่บอกว่าคลอโรฟิลล์ เป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดที่ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น เอทานอล (สรนัตร์ เทียมดาว, 2559) ด้วยเหตุผลนี้จึงอธิบายได้ว่าสารสกัดจาก สไปรูลินาในตัวทำละลายที่มีการใช้เอทานอล และเมทานอล หรือที่ใช้ น้ำและเอทานอลอัตราส่วน 1:3 ถึงมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ที่สูง เพราะทั้งเอทานอล และเมทานอลเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่สามารถละลายคลอโรฟิลล์ได้ และสารสกัดสไปรูลินาในตัวทำละลายดังกล่าวก็มีลักษณะสีเขียวซึ่งสอดคล้องกับสีของคลอโรฟิลล์อีกด้วย

ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม พบว่าสารสกัดที่ใช้เอทานอลและเมทานอลเป็นตัวทำละลายให้ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดที่ใช้ น้ำและเอทานอล อัตราส่วน 1:3 ส่วนสารสกัดที่ใช้ น้ำหรือที่มี น้ำเป็นองค์ประกอบในตัวทำละลายนั้นให้ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมน้อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่บอกว่าแคโรทีนอยด์นั้นเป็นอนุพันธ์ของไขมัน ดังนั้นจึงไม่สามารถละลายในน้ำแต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายไขมัน เช่น ไดเอทิลอีเทอร์

อะซิโตน แอลกอฮอล์ และคลอโรฟอร์ม (Fox & Ververse, 1960) โดยแคโรทีนอยด์ชนิดที่เป็นแคโรทีน นั้นละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน และปีโตรเลียม อีเทอร์ ส่วนชนิดที่เป็น แชนโทฟิลล์ ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น แอลกอฮอล์ เป็นต้น (Simpson et al., 1989) ด้วยเหตุนี้จึงอธิบายได้ว่าสารสกัดในตัวทำละลายที่ใช้เอทานอลและเมทานอลถึงมีปริมาณ แคโรทีนอยด์สูงมากเมื่อเทียบกับตัวทำละลายอื่น ๆ และจากข้อมูลนี้ยังสามารถบอกได้อีกว่า แคโรทีนอยด์ที่วิเคราะห์ได้น่าจะเป็นในกลุ่มแชนโทฟิลล์เพราะสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วอย่างแอลกอฮอล์

การวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มไฟโคบิลิน พบว่าสารสกัดสไปรูลินาที่ใช้ น้ำเป็นตัวทำละลายให้ปริมาณไฟโคไซยานินสูงที่สุด รองลงมาคือตัวทำละลายที่ใช้ น้ำและเอทานอล อัตราส่วน 3:1 และผงสไปรูลินาที่ไม่ผ่านการสกัด ส่วนสารสกัดชนิดอื่นพบว่ามีปริมาณกลุ่มไฟโคบิลินที่ต่ำมาก ๆ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่บอกว่าสารในกลุ่มไฟโคบิลินเป็นรงควัตถุที่มีสีน้ำเงินหรือเป็นสารประกอบสีฟ้าเรืองแสงได้ มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี (สุมาลี ดุลยอนุกิจ, 2535) และการศึกษาก่อนหน้านี้พิสูจน์ว่าไฟโคไซยานินเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของมวลชีวภาพ ซึ่งได้ระบุว่าปริมาณไฟโคไซยานินในสไปรูลินามีค่าตั้งแต่ 99.2 mg.g^{-1} ถึง 148.1 mg.g^{-1} หรือบางงานวิจัยรายงานว่าไฟโคไซยานินมีประมาณ 14.8% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (รชนิมุข และคณะ, 2015) ด้วยเหตุนี้จึงอธิบายได้ว่าสารสกัดในตัวทำละลายที่ใช้ น้ำหรือที่มีน้ำเป็นอัตราส่วนถึงมีปริมาณกลุ่มไฟโคบิลินมากกว่ากลุ่มที่เป็น แอลกอฮอล์ อีกทั้งยังมีปริมาณร้อยละของชีวมวลในสารสกัดมากที่สุดด้วย และสีของสารสกัดมีความสอดคล้องกับสีของสารกลุ่มไฟโคบิลิน คือสีฟ้า น้ำเงิน

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุของสารสกัดจากสไปรูลินาทั้ง 3 กลุ่ม ในตัวทำละลายที่ต่างกันนั้น มีความสอดคล้องกับการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (Correlation) เพราะวิเคราะห์ผลได้ว่าปริมาณไฟโคไซยานินมีความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ส่วนปริมาณไฟโคอริธรินนั้นมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับไฟโคไซยานินและอัลโลไฟโคไซยา ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) ยิวดีและคณะ (2535) ได้รายงานการมีอยู่ของคลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบรงควัตถุในสไปรูลินา

การศึกษาก่อนหน้านี้มักใช้ เมทานอล อะซิโตน เฮกเซน และปีโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวทำละลายในการสกัดสารออกฤทธิ์ เช่นงานวิจัยของ (Usharani, 2015; Katya, 2018 และ อมรรัตน์, 2019) ซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ระเหยง่ายที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม เช่น หากสูดดมเข้าไปจะทำให้เกิดการระคายต่อระบบทางเดินหายใจ ระคาย

ผิวหนัง วึ่งเวียน ไอ เป็นต้น ส่วนผลต่อสิ่งแวดล้อมคือทำให้โอโซนที่อยู่บนชั้นบรรยากาศสูงเข้ามาสู่ในชั้นบรรยากาศใกล้โลก และโอโซนนี้จะทำให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ เช่น ทำให้เจ็บไข้ หายใจไม่สะดวก ไม่สบายเจ็บคอ ระคายเคืองต่อตา แก้วตา จมูก คอ ทรวงอก มีอาการไอ ปวดศีรษะ โอโซนยังเป็นตัวทำให้สิ่งก่อสร้างชำรุด ผลผลิตทางการเกษตรตกต่ำ และนอกจากนี้ยังทำให้โลกร้อนขึ้น จนเกิดภาวะโลกร้อนได้ (กองความปลอดภัยแรงงาน, ม.ป.ป.) ส่วนน้ำและเอทานอลถือเป็นตัวทำละลายที่ช่วยพัฒนาสิ่งแวดล้อม ไร้มลพิษ มีโมเลกุลของออกซิเจนเป็นส่วนประกอบสูง เอทานอลที่ใช้ในการรับประทานได้โดยตรง (Portable Alcohol) ส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสุรา เครื่องสำอาง และยา (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2552) จากการนำน้ำและเอทานอลมาผสมกันในอัตราส่วนที่แตกต่างกันนั้นยังช่วยลดความเข้มข้นของเอทานอล และทำให้ได้ตัวทำละลายใหม่ ๆ ที่สามารถใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชได้ และเมื่อนำตัวทำละลายที่ใช้น้ำและเอทานอลในอัตราส่วนที่ต่างกัน ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณรงควัตถุแล้วทำการเปรียบเทียบกับตัวทำละลายที่ใช้เมทานอล ซึ่งพบว่าให้ผลการยับยั้งเชื้อ *Ps. aeruginosa* ที่ดีกว่า ได้ปริมาณสารสกัดที่มากกว่า ส่วนปริมาณรงควัตถุมีความแตกต่างกันตามคุณสมบัติของสารแต่ละชนิด แต่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของปริมาณรงควัตถุในตัวทำละลายที่ต่างกันได้อย่างชัดเจน ซึ่งถือว่าเป็นประโยชน์เพื่อง่ายต่อการนำไปประยุกต์การใช้งานได้ในอนาคต

จะเห็นได้ว่าการใช้วัตถุดิบ ตัวทำละลาย และเชื้อชนิดเดียวกันก็ให้ผลที่แตกต่างกันได้ แสดงว่ายังมีปัจจัยอื่นที่ทำให้ผลการทดลองนั้นต่างกัน เช่น กระบวนการสกัดที่ต่างกัน อัตราส่วนที่ต่างกัน เนื่องจากสารประกอบในพืชมีหลายชนิด และมีคุณสมบัติที่ต่างกัน การเลือกตัวทำละลายที่จะให้ได้สารทุกกลุ่มนั้นจึงเป็นไปได้ยาก (รัตนา อินทรานุกกรณ์, 2550) ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ นรินทร์ และคณะ, (2022) ที่ได้ศึกษาการเปรียบเทียบอัตราส่วนของสารสกัดและวิธีการสกัดที่ต่างกันของกระชายดำ พบว่าการใช้อัตราส่วนและวิธีสกัดที่ต่างกัน ทำให้ได้ปริมาณน้ำหนัก และชนิดของสารสำคัญต่างกันด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่ใช้ตัวทำละลายที่ต่างกันส่งผลให้ได้สารองค์ประกอบและการออกฤทธิ์ในสารสกัดสไปรูลินาที่ต่างกัน (นรินทร์ และคณะ, 2022)

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

1. ควรแยกสารให้บริสุทธิ์ แล้วนำสารที่ได้ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมี เพื่อหาสารตัวอย่างที่ไม่ทราบชื่อ

2. ควบการศึกษาเพิ่มเติมในด้านการมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Ps. aeruginosa* เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้ที่เฉพาะทาง



บรรณานุกรม

- กมลวิช เลขาประสพวัฒนา. (2552). **โรคติดเชื้อในโรงพยาบาล** (พิมพ์ครั้งที่ 1). สงขลา: ชานเมืองการพิมพ์.
- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. (2552). **คู่มือการพัฒนาและลงทุนผลิตเอทานอลเพื่อเป็นเชื้อเพลิง**. สืบค้นเมื่อ 17 พฤศจิกายน 2565, จาก webkc.dede.go.th.
- กองความปลอดภัยแรงงาน. (ม.ป.ป.). **สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile Organic Compounds)**. สืบค้นเมื่อ 19 มีนาคม 2566, จาก <https://www.si.mahidol.ac.th/research-academics/research/division>
- กรีนโดมอนต์ จำกัด. (2554). สำหรับเกลียวทอง. **Ftibusiness**. สืบค้นเมื่อ 20 มีนาคม 2565, จาก <https://ftiebusiness.com/shop4/profile.php?uid=39074>.
- กฤติภูมิ ภูักิตติวารากร และบุษยา มุสิกปะปาละ. (2556). **ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากต้นบัวบก (*Centella asiatica*) และโพล (*Zingiber cassumunar Roxb.*) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว (*Staphylococcus epidermidis*)**. โครงการงานวิทยาศาสตร์. โรงเรียนบดินทรเดชา, กรุงเทพมหานคร.
- กานตกานท์ เทพณรงค์. (2557). **ประสิทธิภาพการใช้น้ำหมักชีวภาพ และอีเอ็มบอลในการบำบัดน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- กาญจนภาชน์ ลีวมโนมนต์. (2557). **สาหร่าย (Algae)**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เกษร เทพแปง. (2562). **รู้จักกับเชื้ออีโคไล (*Escherichia coli*)**. สืบค้นเมื่อ 6 มิถุนายน 2564, จาก <https://www.bbc.com/thai/features-46427220>.
- คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2558). **บทปฏิบัติการเรื่องการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ**. คู่มือปฏิบัติการวิชาสรีรวิทยาและนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ พะเยา: คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์, มหาวิทยาลัยพะเยา.
- งานโภชนาการ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์. (2552). **สารต้านอนุมูลอิสระ**. สืบค้นเมื่อ 25 กุมภาพันธ์ 2566, จาก <http://medinfo2.psu.ac.th/cancer/db/news>.

จงกล พรหมยะ. (2546). **การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาเพื่อเป็นอาหารปลาสำเร็จรูป.**

วิทยานิพนธ์ กษ.ม., มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.

จิตรรา ตะเกาพงษ์, สันต์ สุวรรณมณี และนัฏฐเนศวร์ ลับเลิศลพ. (2015). การตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพก่อโรคในคลินิกผิวหนังในฤดูฝน. **Journal of Medicine and Health Sciences**, 22(2), 8–14.

จินตนา อาจสันเทียะ. (2549). **จุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยาสำหรับพยาบาล** (พิมพ์ครั้งที่ 1).

กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บางกอกบลิ๊อค.

จूरिरัตน์ ลีสmith. (2552). **ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป** (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เจนจิรา ผลโภคกุล และคณะ. (2558). การเปรียบเทียบสมบัติทางเคมี กายภาพ และความสามารถในการออกซิเดชันของสไปรูลินาแห้งเมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 0 และ 90 วัน.

Princess of Naradhiwas University Journal, 15(2), 112–121.

เจียมจิตต์ บุญสม. (2531). **ความลับของสาหร่ายเกลียวทอง:ผลการรักษาที่นายแพทย์ชาวญี่ปุ่นค้นพบ.** สืบค้นเมื่อ 9 เมษายน 2563, จาก <http://nates.pus.ac.th>.

ชุตินา ไตรรัตน์วรกุล. (2553). **พันธุ.** กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ณปภัช พิมพ์ดี. (2560 ก). การละลาย (Solubility). **Scimath**. สืบค้นเมื่อ 19 มีนาคม 2566, จาก <https://www.scimath.org/lesson-chemistry/item/7178-solubility>.

ณปภัช พิมพ์ดี. (2560 ข). **เคมีสีเขียว (Green chemistry)**. สืบค้นเมื่อ 19 มีนาคม 2564, จาก <https://www.scimath.org/lesson-chemistry/item/7167-green-chemistry>

ดวงพร ดันธโชติ. (ม.ป.ป.). **นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์** (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ธนภพ โสรัตโยม และคณะ. (2015). **การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.* ของสารสกัดจากหอมหัวใหญ่.** โครงการวิจัย

มหาวิทยาลัยราชมงคพลพระนคร, กรุงเทพฯ

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. (2544). **ยาละผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ** (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: แสงเทียนการพิมพ์.

นรินทร์ ท้าวแก่นจันทร์ และคณะ. (2565). การเปรียบเทียบวิธีการสกัดและอัตราส่วนของสาร

สัปดาห์ที่แตกต่างกันต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในกระชายดำ. **ว.ผลิตภัณฑ์การเกษตร**. 4(1), 77–90.

บัญญัติ สุขศรีงาม. (2532). **จุลชีววิทยาเล่ม 2** (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

พอดา ชัยกิจ. (2559). **การทดสอบสารสำคัญทางพฤกษเคมี การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของขุมเห็ดเทศ**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยนบูรพา, ชลบุรี.

พิมพ์วรรณ ต้นสกุล และอารักษ์ จันทศิลป์. (2531). การเพาะเลี้ยง *Spirulina* spp. ในน้ำทิ้งจากโรงงานยางพารา. **วารสารสงขลานครินทร์**, (10), 149–155.

พัชรวรรณ ต้นอมตยรัตน์ และคณะ. (2558). **การพัฒนาผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียในช่องปากจากสารสกัดผลมะเขว่น**. โครงการวิจัย มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา.

มณฑล วิสุทธิ. (2560). ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococci* ของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นบางชนิดในจังหวัดนครราชสีมา. **วารสารวิทยาศาสตร์ มข.** 45(4) 805–816.

รชนิมุข หิรัญส์จจาเลิศ และคณะ. (2558). ผลของความเข้มแสงต่อปริมาณ ซี ไฟโคไวยานินในสาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp. **KHON KAEN AGR. J.** 43(1), 1–12.

รัชณี คงคาอุยฉาย, วิญญู เจริญศิริ, อภิชาติ วรรณวิจิตร และศิริพัฒน์ เรืองพยัคฆ์. (ม.ป.ป.).

อนุมูลอิสระ (Free Radical). สืบค้นเมื่อ 25 กุมภาพันธ์ 2566, จาก <https://dna.kps.ku.ac.th/index.php/article>.

รัชนิกร สวามี, ภริตาภรณ์ ผากกลาง, ภควรรณ เศรษฐมงคล, มะลิวัลย์ คุณตะโค และรชนิมุข หิรัญส์จจาเลิศ. (2020). การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ด้วยไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Arthrospira platensis*. **KHON KAEN AGR. J.** 48(1), 20–28.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2550). **การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร** (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. (2557 ก). **Escherichia coli**. สืบค้นเมื่อ 2 กุมภาพันธ์ 2564, จาก file:///C:/Users/Asus/Desktop/.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. (2557 ข). **ใช้หุดับ**. สืบค้นเมื่อ 2 กุมภาพันธ์ 2564, จาก file:///C:/Users/Asus/Desktop/New.

สรณ์ตร เทียมดาว. (2559). **สาหร่ายวิทยา Phycology**. เอกสารประกอบการสอนวิชาสาหร่ายวิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี, อุดรธานี.

สาขารังสีรักษาและมะเร็งวิทยา ฝ่ายรังสีวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์. (ม.ป.ป.). **สารต้านอนุมูลอิสระกับการป้องกันการเกิดมะเร็ง**. สืบค้นเมื่อ 25 กุมภาพันธ์ 2566, จาก <https://www.chulacancer.net/patient-list>

สุมาลี ดุลยอนุกิจ. (2535). **ผลของระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในสูตรอาหาร Zarrouk ต่อการเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทอง**. วิทยานิพนธ์ กษ.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้อและพาหะ. (2557). **โรคอาหารเป็นพิษสาเหตุจากเชื้อ *Staphylococcus aureus***. สืบค้นเมื่อ 18 เมษายน 2564, จาก moph.go.th.

อมรรัตน์ อุตสาหะ และธีญาภรณ์ แก้วทวี. (2562). **ผลของสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio harveyi* ในกุ้งขาวแวนนาไม**. *KHON KAEN AGR. J.* 47(2), 1–12.

อรพรรณ พรหมชนพันธ์ คมศักดิ์ พิณระ และรัฐภูมิ พรหมณะ. (2558). **ผลของสารอาหารต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina platensis*)**. *Naresuan Phayao Journal.* 8(3), 150–154.

อรพิน คงศักดิ์พิกุล, จีรวาณิช ไพศาล และสถาพร ดิเรกบุษราคม (ผู้บรรยาย). (5–7 กุมภาพันธ์ 2544). **ผลของสารสกัดหยาบจากสไปรูลินาต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเรืองแสงในการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 39 สาขาประมง สาขาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**. (หน้า 175–183). กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนุชิต พลับรู้งการ. (ม.ป.ป.). **ถอดรหัสคำศัพท์งานวิจัยด้านสมุนไพร IC₅₀ กับสิ่งที่เห็นกับความเป็นจริง**. สืบค้นเมื่อ 25 กุมภาพันธ์ 2566, จาก <https://pcog.psu.ac.th/images/Article>

อะเคื่อ อุณหเลขกะ. (ม.ป.ป.). **การป้องกันการติดเชื้อในโรงพยาบาล (พิมพ์ครั้งที่ 1)**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ หจก เจ.ซี.ซี. การพิมพ์.

Blois, MS., (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*,

4617, 1199–1200.

Britton, G. (1995). UV/Visible spectroscopy, In Carotenoids: Spectroscopy. Britton G.,

Liaaen-Jensen S., Pfander H, 1, 13–63.

Dijkshoorn, L., Nemec, A., Seifert, H. (2007). An increasing threat in hospital:

multidrugresistant *Acinetobacter baumannii*. **Nat Rev Microbiol.** 5, 939–51.

Donkin, P. (1976). Ketocarotenoid biosynthesis by *Haematococcus lacustis*. **Phytochemistry.** 15,

711– 715.

El-Sheekh, MM., Dawah, AM., El-Rahman, AMA., El-Adel, HM. and El-Hay, RAA.

(2008). Antimicrobial activity of the cyanobacteria *Anabaena wisconsinense* and *Oscillatoria curviceps* against pathogens of fish in aquaculture. **Ann. Microbiol.** 58, 527– 534.

Fox, HM. & Vevers, G. (1960). The nature of animal colors. **J. Nutr.** 50, 59–72.

Gordon Anthon and Diane M.Barrett. (2007). Standardization of a rapid Spectrophometric method for lycopene analysis. **Acta Hort.** 758, 111–127.

Hoseini SM., Khosravi-Darani and Mozafari MR. (2013). Nutritinal and Medical Application of *Spirulina* Microalgae. **Mini-Reviews in Medicinanal Chemistry.** 13, 1231–1237.

Intesar, KAH., Ammar, Adnan T. and Khamael, AK. (2020). Antibacterial Activity of Crude Extracts of *Spirulina Platensis* Against Some Pathogenic Bacteria and Fungi Isolated from Different Sites on Human Body. **Journal of Forensic Medicine & Toxicology.** 14(1), 1–12.

Johnson, EA. and Schroeder, WA. (1995). **Microbial carotenoids.** In **Advances biochemical engineering and biotechnology.** Heidelberg: Springer-Verlag.

Kamble, SP., Gaikar, RB., Padalia, RB. and Shinde, K.D. (2013). Extraction and purification of C- phycocyanin from dry *Spirulina* powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** 3, 149–153.

Katircioglu. H., Beyatli. Y., Aslim. B., Yuksekdog. Z., Atici. T. (2006). Screening for

- antimicrobial agent production of some microalgae in freshwater. **Internet J Microbiol**; 2(2), 1–15.
- Katya, V., Ivaylo, S. and Nikolina, R. (2018). In vitro Antimicrobial activity *Lemna minuta*, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina* sp. Extracts. **Fresenius Bulletin**. 27(8), 5736–5741.
- Liu, JG., CW. Hou., Lee., Y. Chuang, and C.C. Lin. (2011). Antioxidant effects and UVB protective activity of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) products fermented with lactic acid bacteria. **Process Biochem**. 46, 1405–1410.
- Manigandan, M. and Kolanjinathan, K. (2017). Antibacterial activity of Various solvent extracts of *Spirulina platensis* against human pathogens. **Innovare Journal of Health Sciences**, 5(1), 10–12
- Manoj G, Venkataraman LV, Srinivas L. (1992). Antioxidant properties of *Spirulina* (*Spirulina platensis*). In: Seshadri and Bai. *Spirulina*. **MCRC**, 1, 48–154.
- Markey, B., Finola L., Marie A., Ann C., Dores M. (2013). **Clinical veterinary microbiology**. China: Elsevier Ltd.
- Mona, HRM., Waled, ES., Mohamed, I., Gamila, ET. and Gamila, A. (2014). Antiviral and Antimicrobial activities of *Spirulina platensis*. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 3(6), 31–39.
- Mostafa, M., El-Sheekh, Said M., Daboor and Mahmoud A. (2014). Production and characterization of antimicrobial active substance from *Spirulina platensis*. **IRAN. J. MICROBIOL**, 6(2), 112–119.
- NARST. (2018). **National antimicrobial resistance surveillance center Thailand**. Retrieved September 8, 2022, from <http://narst.dmsc.moph.go.th/data/AMR%202000–2018–6 M.pdf>.
- Palozza P. and Krinsky N.I. (1992). Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro an overview. **Method Enzymol**. 213, 403–420.
- Pletz, MW., Burkhardt, O., Welte, T. (2010). Nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pneumonia: linezolid or vancomycin? – Comparison of pharmacology and

- clinical efficacy. **Eur J Pharm Med Res**, 15, 507–513.
- Pulz, O. and Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 65, 635–648.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice–Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, **Free Radic. Biol.Med.** 26, 1231–1237.
- Sanchez, S., Stevenson, MAM., Hudson, CR., Maier, M., Buffington, T., Dam, Q., et al. (2002). Characterization of multidrug resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dog. **J Clin Microbiol.** 40, 35–86.
- Sarada, VL., Kumar, C. and Rengasamy, R. (2011). Purified C–phycocyanin from *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geitler: a novel and potent agent against drug resistant bacteria. **World J Microbiol Biotechnol**, 27, 779–783.
- Sergio, AR., and Russel, RM. (1999). β –carotene and other carotenoids as antioxidants. **Journal of the American College of Nutrition**, 18, 426–433.
- Siegelman, HW. and Kycia, JH. (1978). Algal Biliproteins. In Hellebust, JA. and Craigie, JS. (Eds.). **Handbook of Physiological and Biochemical Methods**. Cambridge: Cambridge University Press.
- Simpson, KL., Tsou, ISTC. & Chichester, CO. (1989). **Biochemical methodology for the assessment of carotene**. The International Vitamin A Consultative Group (IVACG).
- Soong, P. (1980). **Production and Development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan**, pp. 97–133. In G. Shelef and C.J. Soeder (eds.). Holland: Algae Biomass. Elsevier/North–Biomedical Press Amsterdam.
- Stanley, JG. and Jones JB. (1976). Feeding algae to fish. **Aquaculture**. 7(3), 219 – 223.
- Tamaselli, L. (1997). **Morphology, Uitrasturcture and Taxonomy of Arthrospira (Spirulina) maxima and Arthrospira (Spirulina) platensis**. In *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology. Cell–biology and Biotechnology,

Vanshak, A. (ed). London: Taylor & Francis Publishers.

- Tanumihardjo, SA. (2002). Factor influencing the conversion of carotenoids to retinol: bioavailability to bioconversion to bioefficacy. **Int J Vitam Nutr Res**, 72, 40–45.
- Tomlin, J., Pead, MJ., Lloyd, DH., Howell, S., Hartmann, F. and Jackson, H.A. (1999). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Infections in 11 Dogs. **The Veterinary Record**. 144(3), 60–64.
- Touria, OB., Mounia, C., Jose, ACS., Abdelmjid, C. and Abdelaziz, ELA. (2019). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Spirulina platensis* from Morocco. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**. 22(5), 1265 – 1276.
- Usharani, G., Srinivasan, G., Sivasakthi, S. and Saranraj, P. (2015). Antimicrobial Activity of *Spirulina platensis* Solvent Extracts Against Pathogenic Bacteria and Fungi. **Advances in Biological Research**. 9(5), 292–298.
- Van, HJ., Lopman, J., Kent, R. (n.d.). (1996). The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. **J Dent Res**, 75, 1008–14.
- Venkataraman, LV. (1983). **Bluegreen Alge: *Spirulina***. Central Food Technological Research Institute, Mysore, India.
- Volk, RB. and Furkert, FH. (2006). Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and extracted by cyanobacteria during growth. **Microbiol Res**, 161, 180–186.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, SM., Seifert, H., Wenzel, RP., Edmond, MB. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin Infect Dis**, 39, 309–317.

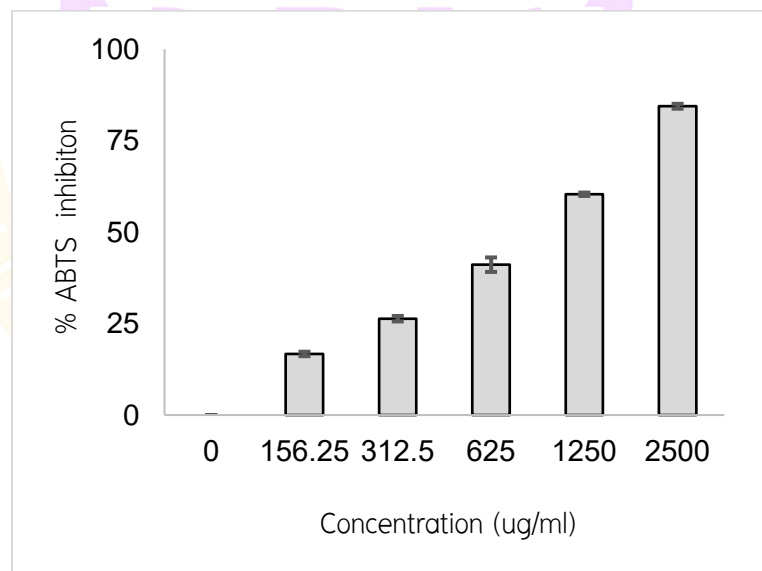


ภาคผนวก

ภาคผนวก ก ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดสไปรูลินา

ตาราง 5 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดสไปรูลินาในตัวทำละลายน้ำ ต่อเอทานอล อัตราส่วน 3:1

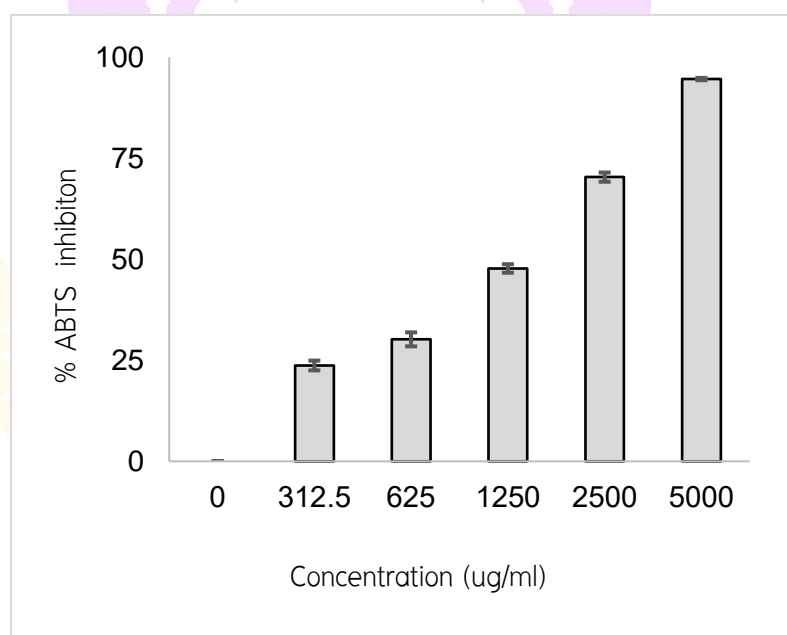
water: ethanol_3:1 (µg/ml)	% inhibition				
	1	2	3	Mean	SD
0	0	0	0	0	0
156.25	16	17	17	17	0.62
312.5	26	27	26	26	0.75
625	39	44	41	41	1.98
1250	61	61	60	60	0.46
2500	85	84	84	84	0.66
IC ₅₀ (µg/ml)	936.33	907.441	936.33	926.70	14.92



ภาพ 19 การสร้างกราฟเพื่อหาค่า ABTS (IC₅₀ µg/ml) ของสารสกัดสไปรูลินาในตัวทำละลายน้ำต่อเอทานอล อัตราส่วน 3:1

ตาราง 6 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดสไปรูลินาในตัวทำละลายน้ำ ต่อเอทานอล อัตราส่วน 1:1

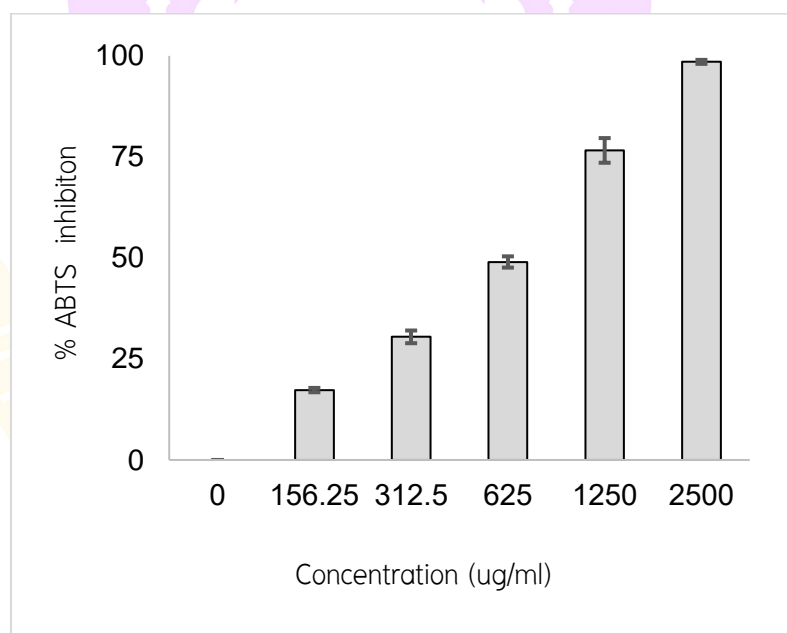
water: ethanol_1:1 ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition				
	1	2	3	Mean	SD
0	0	0	0	0	0
312.5	25	22	24	24	1.21
625	32	29	30	30	1.73
1250	47	47	49	48	1.06
2500	69	71	71	70	1.14
5000	94	95	95	95	0.29
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	1607.72	1587.3	2976.19	2057.07	712.01



ภาพ 20 การสร้างกราฟเพื่อหาค่าการยับยั้ง ABTS (IC_{50} $\mu\text{g/ml}$) ของสารสกัดสไปรูลินา ในตัวทำละลายน้ำต่อเอทานอล อัตราส่วน 1:1

ตาราง 7 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดสไปรูลินาในตัวทำละลายน้ำ ต่อเอทานอล อัตราส่วน 1:3

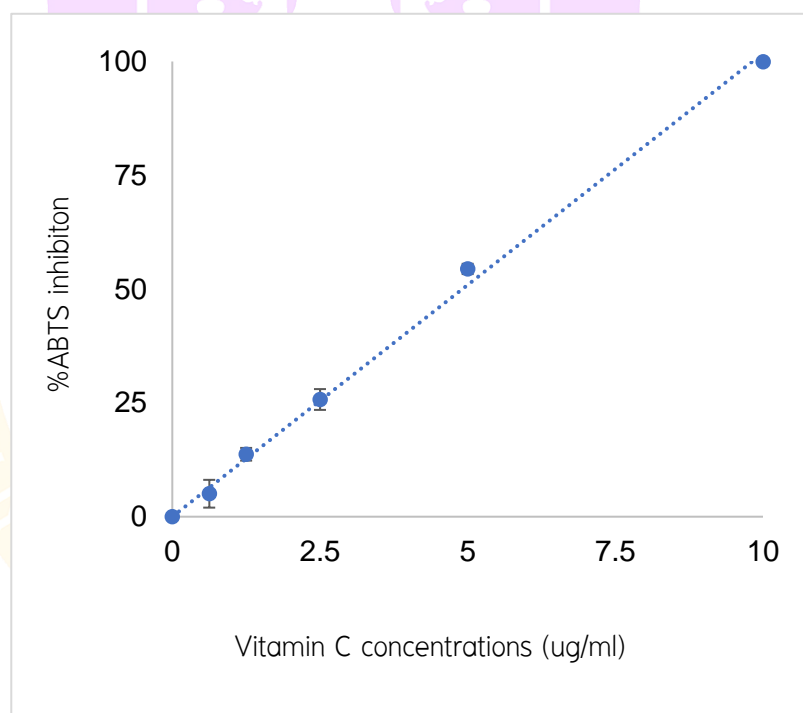
Water: ethanol_1:3 ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition				
	1	2	3	Mean	SD
0	0	0	0	0	0
156.25	18	17	17	17	0.54
312.5	30	29	32	30	1.57
625	49	48	51	49	1.39
1250	75	75	81	77	3.05
2500	98	98	99	99	0.49
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	763.359	770.416	715.308	749.69	26.82



ภาพ 21 การสร้างกราฟเพื่อหาค่าการยับยั้ง ABTS (IC_{50} $\mu\text{g/ml}$) ของสารสกัดสไปรูลินา ในตัวทำละลายน้ำต่อเอทานอล อัตราส่วน 1:3

ตาราง 8 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของ Vitamin C

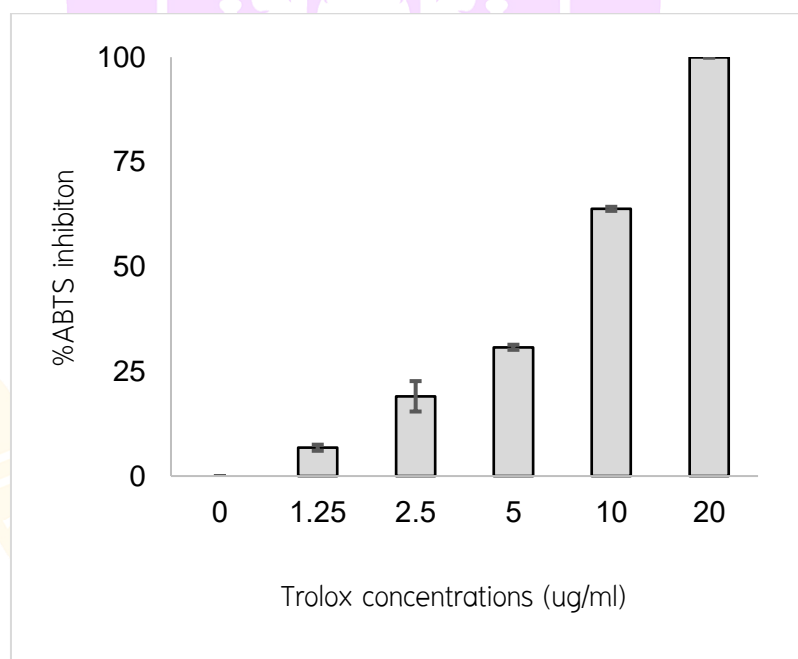
Vitamin C ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition				
	1	2	3	Mean	SD
0	0	0	0	0	0
0.625	5	9	2	5	3.05
1.25	12	15	14	14	1.40
2.5	28	23	26	26	2.29
5	55	53	55	54	1.13
10	100	100	100	100	0.14
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	4.87	4.94	4.92	4.91	0.03



ภาพ 22 การสร้างกราฟเพื่อหาค่าการยับยั้ง ABTS (IC_{50} $\mu\text{g/ml}$) ของ Vitamin C

ตาราง 9 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของ Trolox

Trolox ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition				
	1	2	3	Mean	SD
0	0	0	0	0	0
1.25	6	7	8	7	0.73
2.5	19	23	15	19	3.63
5	31	30	31	31	0.61
10	63	64	64	64	0.49
20	100	100	100	100	0.09
IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	9.38	9.33	9.37	9.36	0.02

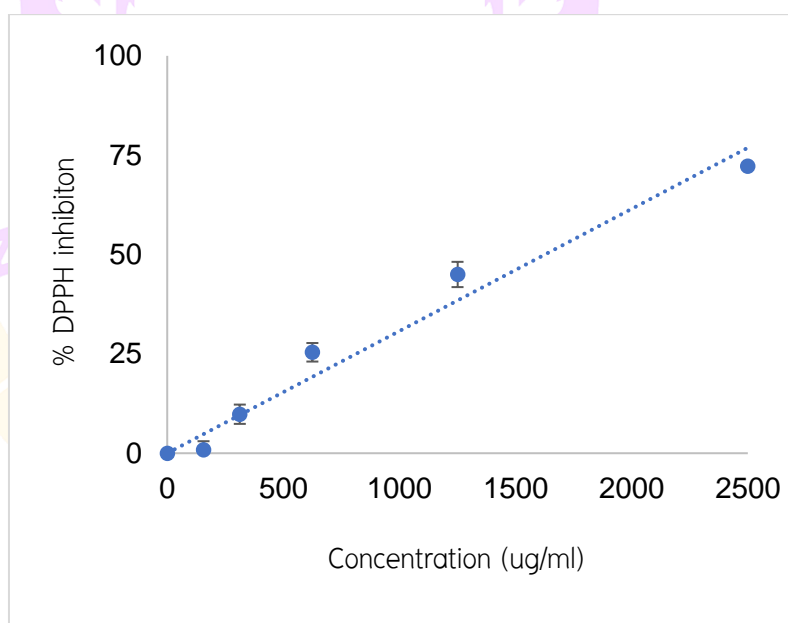


ภาพ 23 การสร้างกราฟเพื่อหาค่าการยับยั้ง ABTS (IC₅₀ $\mu\text{g/ml}$) ของ Trolox

ภาคผนวก ข ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดสไปรูulina

ตาราง 10 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดสไปรูulinaในตัวทำละลายน้ำ ต่อเอทานอล อัตราส่วน 3:1

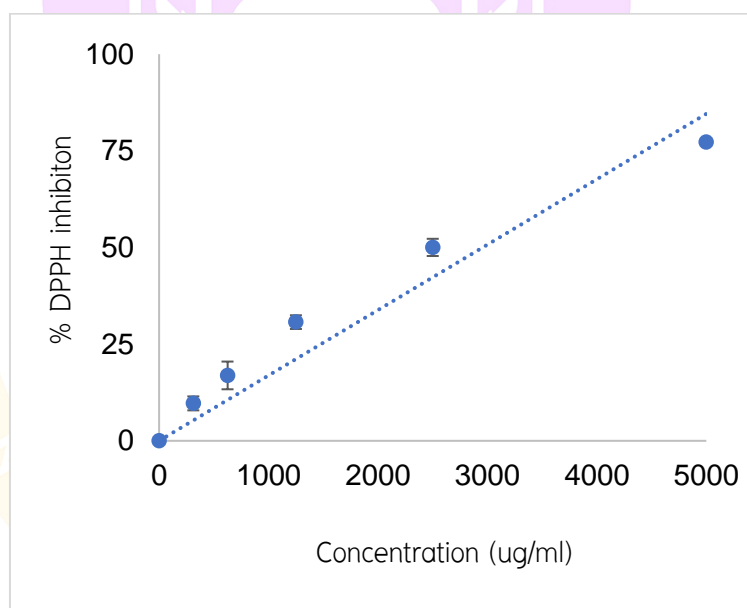
water: ethanol_3:1 (µg/ml)	% inhibition				
	1	2	3	Mean	SD
0	0	0	0	0	0
156.25	3	1	-2	1	2.18
312.5	12	11	7	10	2.43
625	28	23	26	25	2.33
1250	44	49	42	45	3.18
2500	70	73	74	72	2.08
IC ₅₀ (µg/ml)	1661.13	1587.3	1633.99	1627.47	33.40



ภาพ 24 การสร้างกราฟเพื่อหาค่า DPPH (IC₅₀ µg/ml) ของสารสกัดสไปรูulinaในตัวทำละลายน้ำต่อเอทานอล อัตราส่วน 3:1

ตาราง 11 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดสไปรูulinaในตัวทำละลายน้ำ ต่อเอทานอล อัตราส่วน 1:1

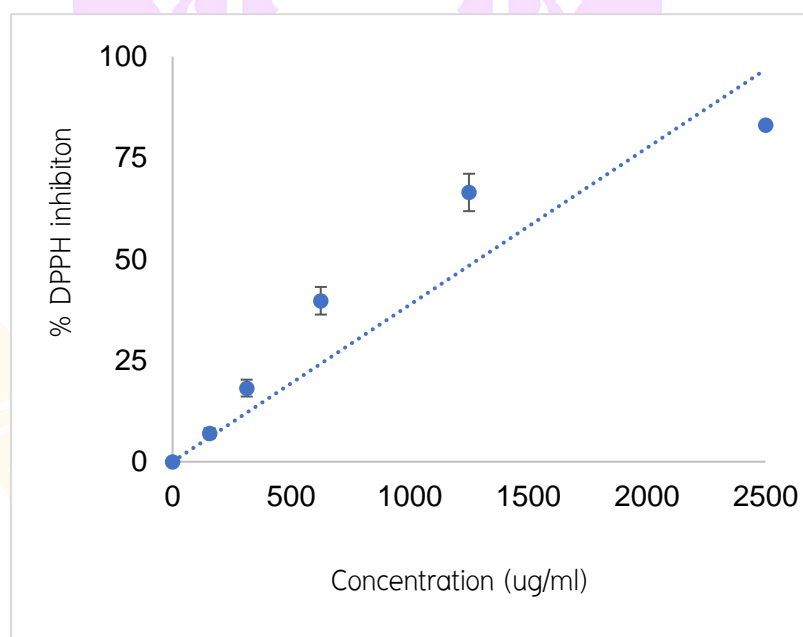
water: ethanol_1:1 ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition				
	1	2	3	Mean	SD
0	0	0	0	0	0
312.5	9	12	8	10	1.80
625	19	20	12	17	3.58
1250	32	31	28	31	1.77
2500	47	51	52	50	2.23
5000	81	74	77	77	3.19
IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	3086.42	3012.05	2976.19	3024.89	50.29



ภาพ 25 การสร้างกราฟเพื่อหาค่า DPPH (IC₅₀ $\mu\text{g/ml}$) ของสารสกัดสไปรูulinaในตัวทำละลายน้ำต่อเอทานอล อัตราส่วน 1:1

ตาราง 12 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดสไปรูulinaในตัวทำละลายน้ำ ต่อเอทานอล อัตราส่วน 1:3

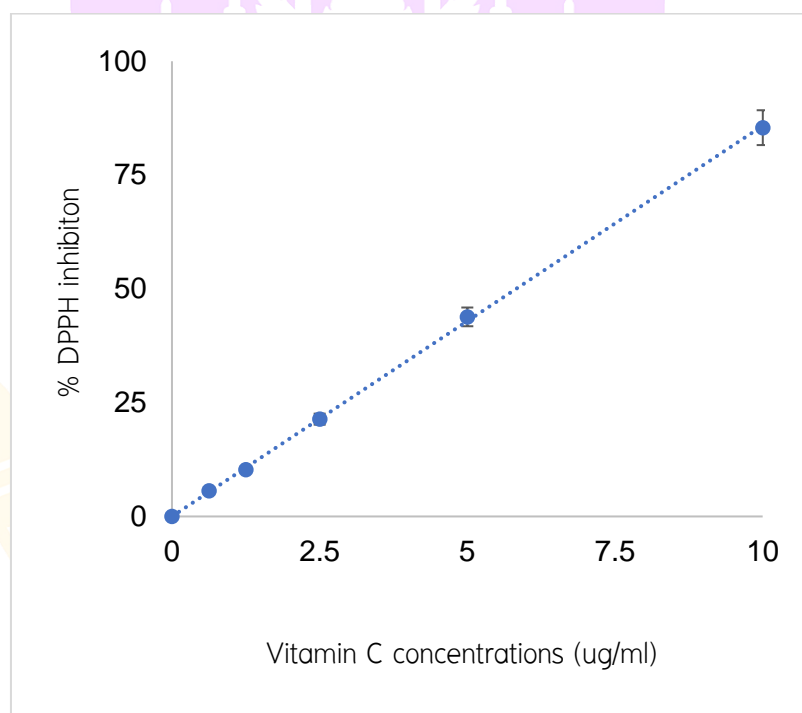
water: ethanol_1:3 (µg/ml)	% inhibition				
	1	2	3	Mean	SD
0	0	0	0	0	0
156.25	8	7	6	7	1.22
312.5	21	17	16	18	2.08
625	40	36	43	40	3.41
1250	71	68	61	66	4.62
2500	80	84	84	83	2.03
IC ₅₀ (µg/ml)	1288.66	1282.05	1302.08	1290.93	9.13



ภาพ 26 การสร้างกราฟเพื่อหาค่า DPPH (IC₅₀ µg/ml) ของสารสกัดสไปรูulinaในตัวทำละลายน้ำต่อเอทานอล อัตราส่วน 1:3

ตาราง 13 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของ Vitamin C

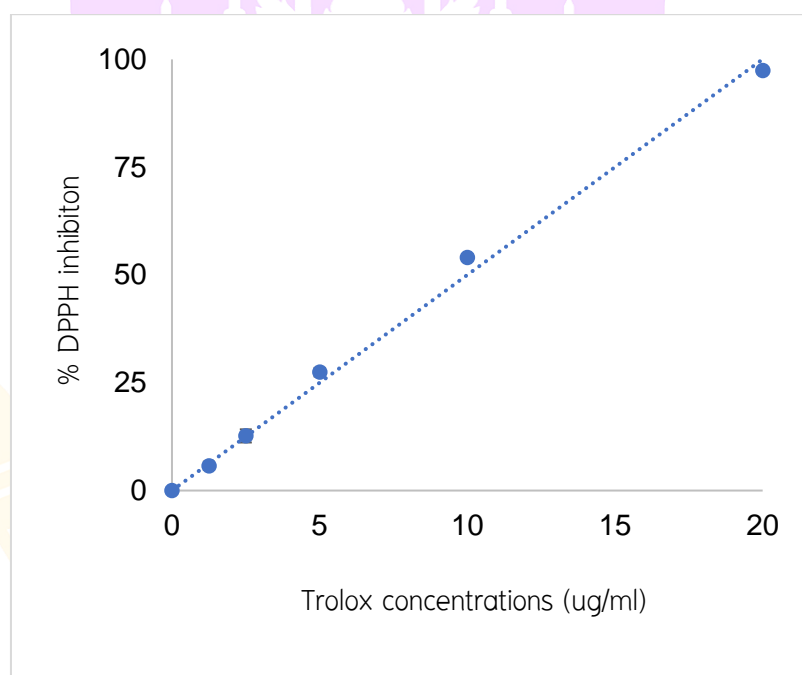
Vitamin C ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition				
	1	2	3	Mean	SD
0	0	0	0	0	0
0.625	6	5	6	6	0.70
1.25	10	10	10	10	0.17
2.5	23	21	21	21	1.21
5	46	44	41	44	2.06
10	89	86	81	85	3.83
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	5.56	5.81	6.14	5.84	0.26



ภาพ 27 การสร้างกราฟเพื่อหาค่าการยับยั้ง DPPH (IC_{50} $\mu\text{g/ml}$) ของ Vitamin C

ตาราง 14 ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของ Trolox

Trolox ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition				
	1	2	3	Mean	SD
0	0	0	0	0	0
1.25	5	6	7	6	0.95
2.5	11	12	14	13	1.52
5	27	27	29	27	1.00
10	55	54	54	54	0.44
20	98	97	97	97	0.20
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	9.99	10.03	9.97	10.00	0.03



ภาพ 28 การสร้างกราฟเพื่อหาค่าการยับยั้ง DPPH (IC_{50} $\mu\text{g/ml}$) ของ Trolox

ภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์รังควัตถุของสารสกัดสไปรูลินา

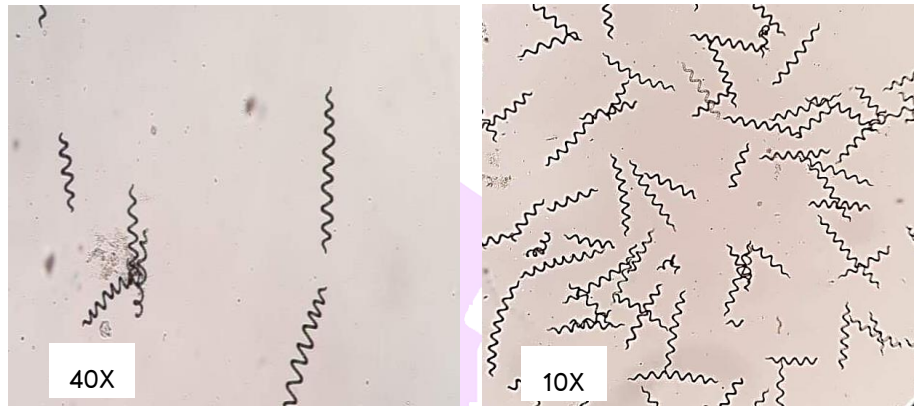
ตาราง 17 ผลการวิเคราะห์รังควัตถุของสารสกัดสไปรูลินา

สารสกัดสไปรูลินา	ไมโครกรัม/ลิตร		มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง		
	คลอโรฟิลล์	แคโรทีนอยด์รวม	ไฟโคไซยานิน	อัลโลไฟโคไซยานิน	ไฟโคเอริธริน
ผงสไปรูลินา	33.210	0.066	0.069	0.017	0.007
1	2.384	0.032	0.086	0.011	0.011
2	16.297	0.089	0.006	0.004	0.002
3	37.897	0.402	0.010	0.017	0.009
4	0.1839	0.004	0.137	0.023	0.014
5	27.237	0.550	0.003	0.005	0.002
6	27.974	0.547	0.003	0.014	0.001

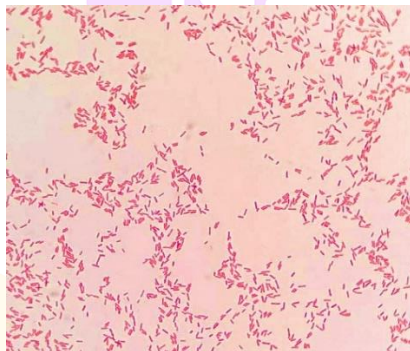
หมายเหตุ: 1) น้ำต่อเอทานอล 3;1, 2) น้ำต่อเอทานอล 1;1, 3) น้ำต่อเอทานอล 1;3, 4) น้ำต่อเอทานอล, 5) เอทานอล, 6) เมทานอล



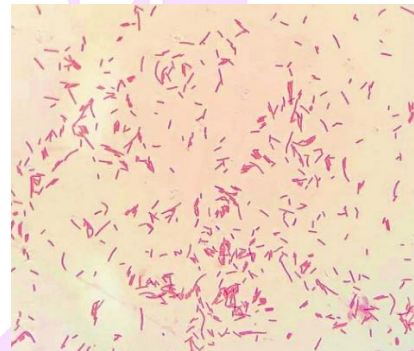
ภาคผนวก ง ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของสาหร่ายและแบคทีเรีย



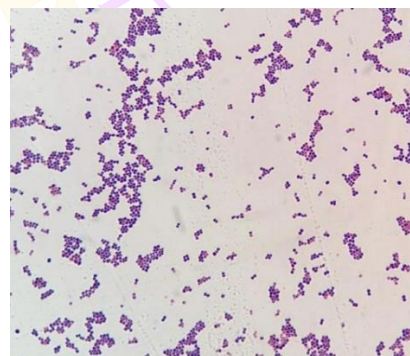
ภาพ 29 สาหร่าย *Spirulina platensis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X และ 10X



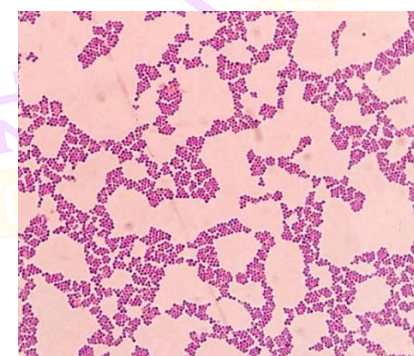
Pseudomonas aeruginosa



Escherichia coli



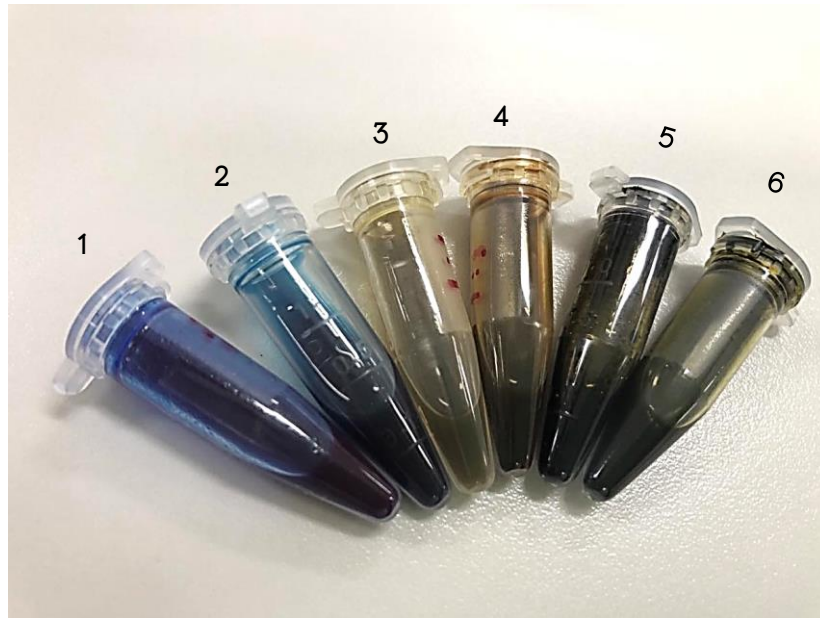
Staphylococcus epidermidis



Staphylococcus aureus

ภาพ 30 แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X

ภาคผนวก จ เปรียบเทียบสีของสารสกัด *Spirulina platensis* ในตัวทำละลายที่ต่างกัน



ภาพ 31 เปรียบเทียบสีของสารสกัด *Spirulina platensis* ในตัวทำละลายที่ต่างกัน

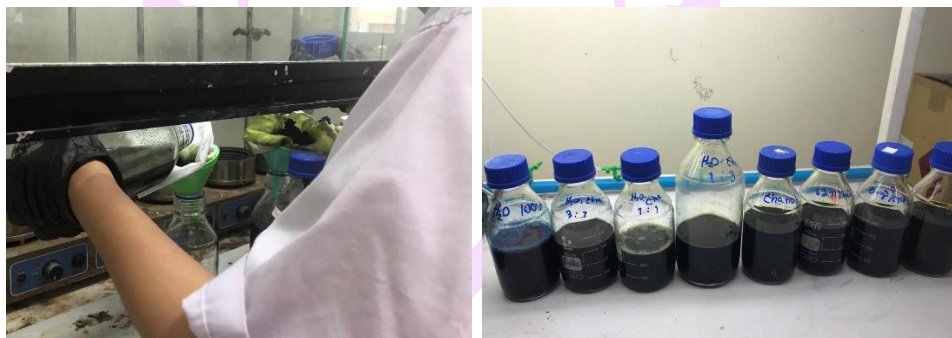
หมายเหตุ: หมายเลข 1 สกัดด้วยน้ำ, หมายเลข 2 สกัดด้วยน้ำ:เอทานอล (3:1), หมายเลข 3 สกัดด้วยน้ำ:เอทานอล (1:1), หมายเลข 4 สกัดด้วยน้ำ:เอทานอล (1:3), หมายเลข 5 สกัดด้วยเอทานอล, หมายเลข 6 สกัดด้วยเมทานอล

ภาคผนวก จ ภาพประกอบการทำวิจัย

1. การเตรียมสารสกัด *Spirulina platensis* ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ



ภาพ 32 เตรียมสารละลายและทำการแช่ผงสไปรูลินา

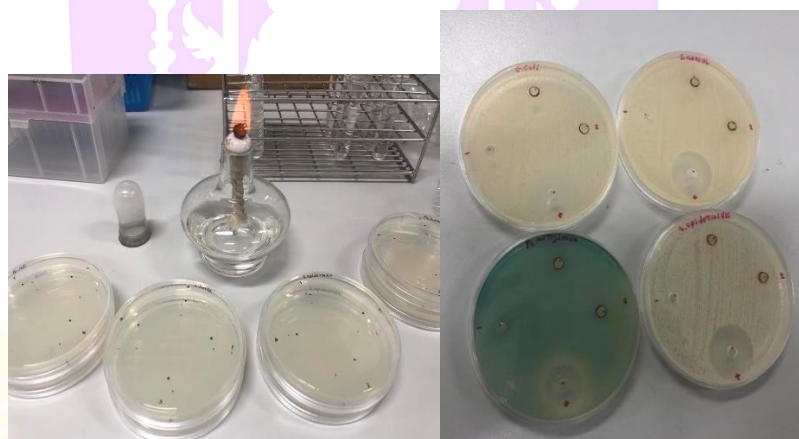


ภาพ 33 กรองสารสกัดสไปรูลินาที่ผ่านการแช่ด้วยตัวทำละลาย



ภาพ 34 การระเหยแห้งตัวทำละลาย และการชั่งน้ำหนักสารสกัดสไปรูลินาที่ได้

1. การเตรียมเชื้อและทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ



ภาพ 35 ทดสอบการยับยั้งเชื้อด้วยวิธี agar well diffusion

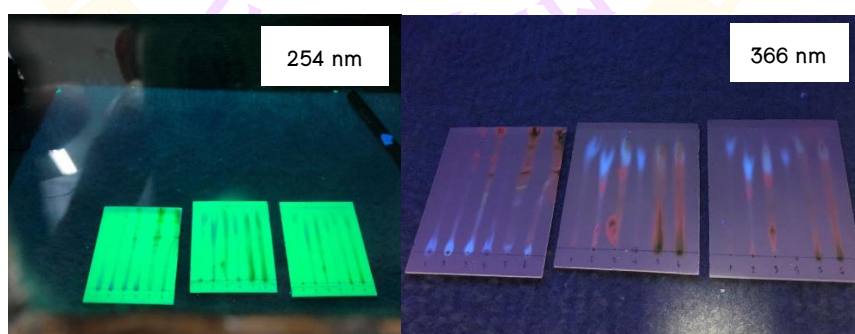
2. การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารสกัดและการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) ในห้องปฏิบัติการ



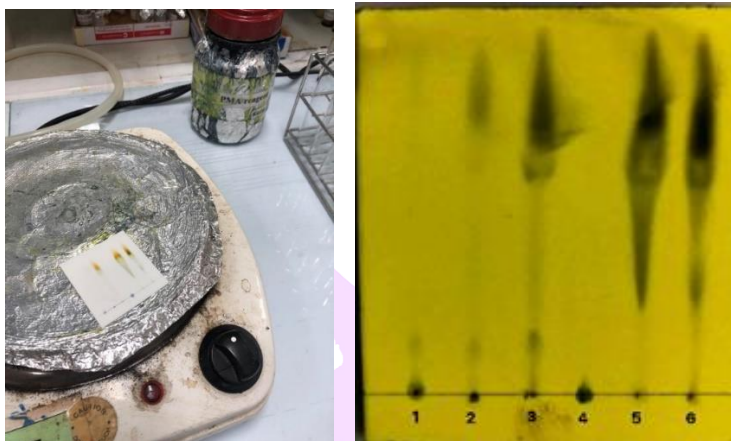
ภาพ 36 การทำจุดสารสกัดไว้บนแผ่น TLC



ภาพ 37 การนำแผ่น TLC จุ่มในตัวทำละลาย เพื่อให้ตัวทำละลายพาสารเคลื่อนที่



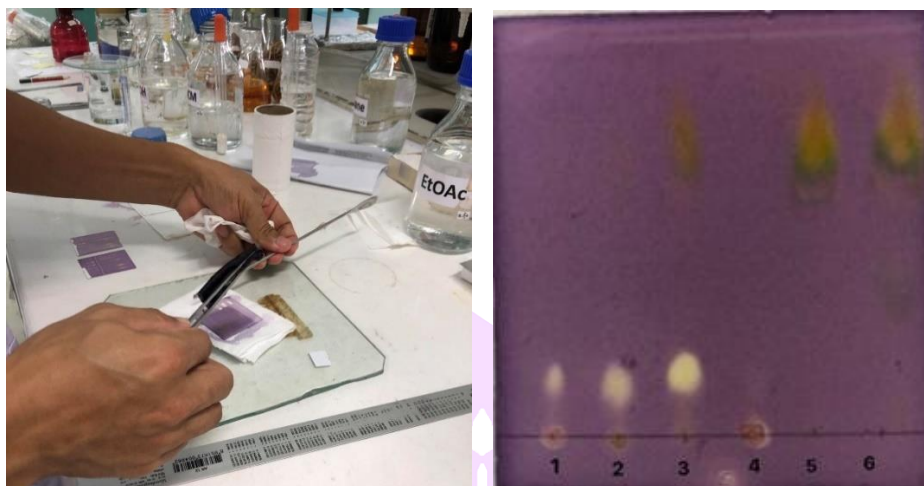
ภาพ 38 การนำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร



ภาพ 39 การย้อมแผ่น TLC ด้วยสารละลาย PMA reagent



ภาพ 40 การย้อมแผ่น TLC ด้วยสารละลาย Dragendorff's reagent

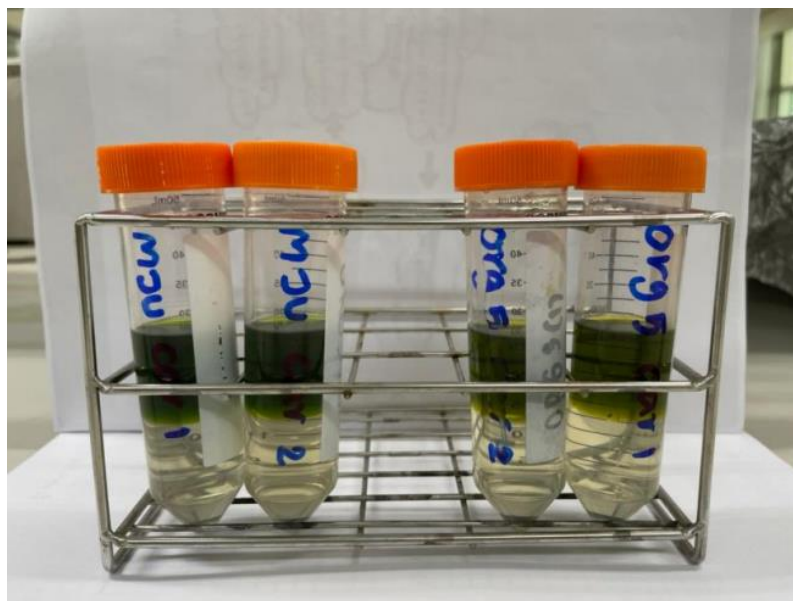


ภาพ 41 การย้อมแผ่น TLC ด้วยสารละลาย DPPH

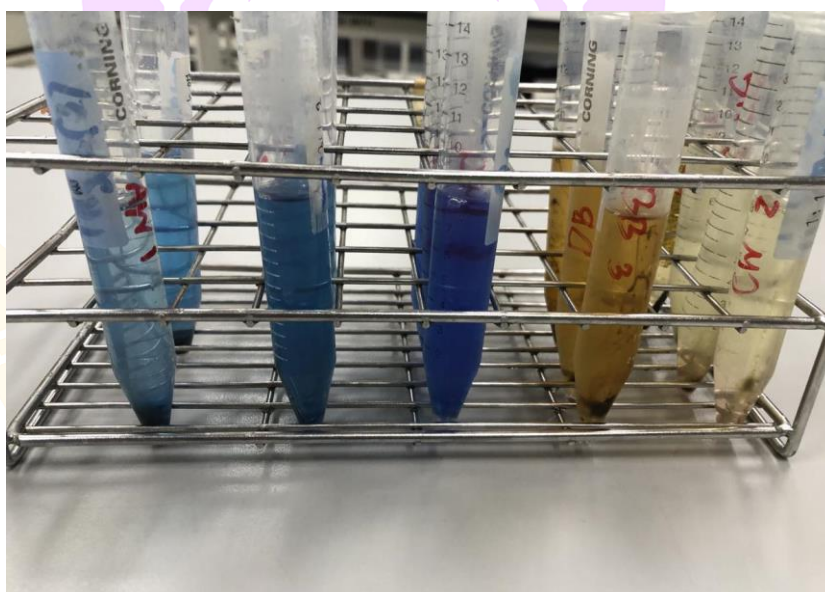
3. การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุของสารสกัดสไปรูulina ในห้องปฏิบัติการ



ภาพ 42 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของสารสกัดสไปรูulina



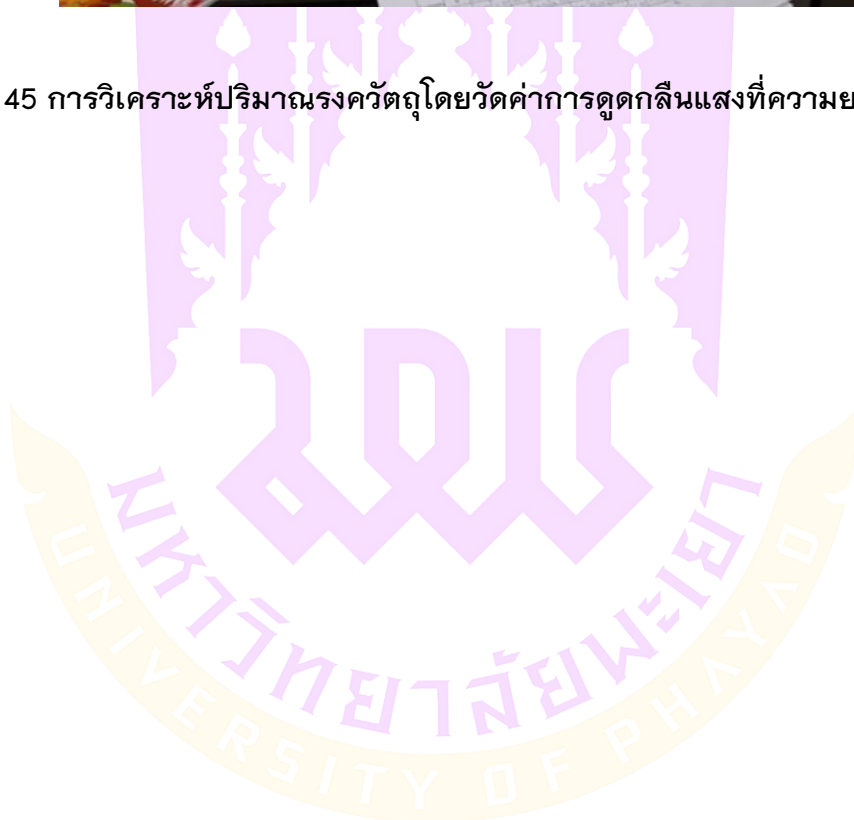
ภาพ 43 การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมของสารสกัดสไปรูulina



ภาพ 44 การวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มไฟโคบิลินของสารสกัดสไปรูulina



ภาพ 45 การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	จิตาภา กอวงศ์
วัน เดือน ปี เกิด	23 พฤษภาคม 2540
สถานที่เกิด	จังหวัดเชียงใหม่
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2562 วท.บ., (จุลชีววิทยา), มหาวิทยาลัยพะเยา, จังหวัดพะเยา
ที่อยู่ปัจจุบัน	49/1 ม.6 ต. ม่อนจอง อ. อมก๋อย จ. เชียงใหม่ 50310
ผลงานตีพิมพ์	จิตาภา กอวงศ์, อัจฉริยา ยศบุญเรือง, คงเดช สวาสดีพันธ์ และ รัฐภูมิ พรหมณะ (ผู้บรรยาย). (25-27 มกราคม 2566). ผลของสารสกัดจาก <i>Spirulina platensis</i> ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ ในการประชุมวิชาการระดับชาติพะเยาวิจัย ครั้งที่ 12. (หน้า62-73). พะเยา: มหาวิทยาลัยพะเยา.
รางวัลที่ได้รับ	รางวัลการนำเสนอผลงานวิจัยดีเด่น ประเภท Oral Presentation. ในการประชุมวิชาการระดับชาติพะเยาวิจัย ครั้งที่ 12. หนังสือรวมบทความวิจัย กลุ่มวิจัย: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ด้านพลังงานและสิ่งแวดล้อม), หน้า 62-73, พะเยา: มหาวิทยาลัยพะเยา