รายงานการวิจัย

สารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำของสารสกัดสาหร่ายทะเล *Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing, 1845

Phytochemistry, Antioxidant Activities, Antibactrial Activities and Toxicity on Aquatic Animals of Marine Marcoalgae *Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing, 1845 Extracts

วรวุฒิ เกิดปราง Worawut Koedprang

สุนันทา ข้องสาย Sunanta Khongsai

ปรีดา เกิดสุข Preeda Kirdsook

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีพุทธศักราช 2561

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีพุทธศักราช 2561 ผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง ในการสนับสนุนทุนวิจัย รวมทั้งอุปกรณ์และสถานที่ และโรงพยาบาลตรังในการสนับสนุนเชื้อแบคทีเรียในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ ผู้ช่วยการวิจัย นักศึกษาสาขาวิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและเจ้าหน้าที่ศูนย์วิสาหกิจศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง ที่ให้การสนับสนุนต่าง ๆ จนกระทั่งการวิจัยสำเร็จลุล่วง

วรวุฒิ เกิดปราง
สุนันทา ข้องสาย
ปรีดา เกิดสุข
กรกฎาคม 2562

สารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำของสารสกัดสาหร่ายทะเล *Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing, 1845

วรวุฒิ เกิดปราง[1] สุนันทา ข้องสาย[2] ปรีดา เกิดสุข[1]

บทคัดย่อ

สาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing, 1845 จากบ่อน้ำกร่อย นำมาอบให้แห้ง และสกัดสารด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล พบว่าการสกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารสกัดสูงที่สุด เท่ากับ 9.77 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล และเมทานอล มีปริมาณสารสกัดเท่ากับ 1.39 และ 0.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยพบสารพฤกษเคมีประกอบด้วยสารแอลคาลอยด์ ซาโปนิน และน้ำตาลดีออกซี ในสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ ขณะที่พบสารแอลคาลอยด์ เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน และน้ำตาลดีออกซี ในสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอล ส่วนสารแทนนินพบเฉพาะในสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลเท่านั้น ขณะที่ไม่พบสารแอนทราควิโนน คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ สเรียรอยด์ และวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวในทุกสารสกัด การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์ พบว่ามีมากที่สุดในสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ รองลงมาคือ เอทานอล และเมทานอล ตามลำดับ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดที่สกัดจากน้ำ เอทานอล และเมทานอล เท่ากับ 1,950 1,420.83 และ 1,354.17 mg GAE/mg CE ตามลำดับ และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดที่สกัดจากน้ำ เอทานอล และเมทานอล เท่ากับ 808.33 756.67 และ 661.67 mg RE/mg CE ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาคือสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล และน้ำ ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยเมทานอล เอทานอล และน้ำ ด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 12.87 31.45 และ 84.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และด้วยวิธี ABTS เท่ากับ 3.01 7.11 และ 22.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล และละลายด้วย DMSO มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุด โดยสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอล และละลายด้วยน้ำ และ DMSO สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อ *Steptococcus agalectiae* ได้ ขณะที่สารสกัดที่ละลายด้วย DMSO มีประสิทธิภาพมากกว่าการละลายด้วยน้ำ และสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล และละลายด้วย DMSO สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ และเมื่อทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล และละลายด้วย DMSO ต่อสัตว์น้ำ มีค่า LC_{50} ที่ 48 ชั่วโมง ต่อลูกปลากะพงขาว ขนาด 1.5-2 เซนติเมตร เท่ากับ 0.064 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และลูกกุ้งขาวแวนนาไม PL15 เท่ากับ 0.035 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ : สาหร่ายทะเล สารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ ความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ

---

[1]สาขาเทคโนโลยีการประมง [2]สาขาวิทยาศาสตร์กายภาพ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง

Phytochemistry, Antioxidant Activities, Antibactrial Activities and Toxicity on Aquatic Animals of Marine Marcoalgae *Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing, 1845 Extracts

Worawut Koedprang[2] Sunanta Khongsai[2] Preeda Kirdsook[1]

Abstract

Macroalgae *Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing, 1845 was collected from the saline pond then cleaned and dried. The sample was extracted with several solvents; water, ethanol and methanol. The yield of crude extracts showed highest in aqueous extract (AE), 9.77 % and ethanolic extract (EE), 1.39 % and methanolic extracts (ME), 0.99 %, respectively. Phytochemical of crude extracts were screened. The AE revealed the presence of alkaloids, saponins and deoxy-sugar while EE and ME presented alkaloids, terpenoids, saponins and deoxy-sugar. Tannin was found in ME only. Nevertheless, antraquinone, cardiac glycoside, steroid and unsaturated lactone ring were not found in all crude extracts. The bioactive substances, phenolic compounds and flavonoids were found in all crude extracts with highest in AE, EE and ME, respectively. Phenolic compounds in AE, EE and ME were 1,950 1,420.83 and 1,354.17 mg GAE/mg CE, respectively while flavonoids in AE, EE and ME were 808.33 756.67 and 661.67 mg RE/mg CE, respectively. The antioxidant activities by DPPH and ABTS free radical scavenging activity methods were highest in ME, EE and AE, respectively. The antioxidant activity by DPPH method of ME, EE and AE were 12.87 31.45 and 84.91 µg/ml, respectively while by ABTS method of ME, EE and AE were 3.01 7.11 and 22.49 µg/ml, respectively. The antibacterial activity was found in EE and ME. The aqueous and DMSO diluted EE and ME able to inhibited and killed *Steptococcus agalectiae*. Moreover, the DMSO diluted EE and ME was higher than aqueous diluted crude extracts. The DMSO diluted EE able to inhibited and killed *Staphylococcus aureus*. The toxic of DMSO diluted EE was tested with 1.5-2 cm juvenile Asian seabass (*Lates calcarifer*) and White leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) PL15. The 48-hr LC_{50} of DMSO diluted EE on seabass was 0.064 mg/ml while on White leg shrimp was 0.035 mg/ml.

Keyword: marine macroalgae, *Rhizoclonium hieroglyphicum*, phytochemistry, antioxidant activities, antibactrial activities and toxicity on aquatic animals

---

[2]Department of Fisheries Technology, [2]Department of Physical Science
Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang Campus

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(ก)
สารบัญตาราง	(ข)
สารบัญภาพ	(ค)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
วิธีดำเนินการวิจัย	7
ผลการวิจัย	17
วิจารณ์ผลการวิจัย	33
สรุปผลการวิจัย	43
เอกสารอ้างอิง	45

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอลและเมทานอล	17
2	องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอลและเมทานอล	20
3	ปริมาณสารสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล	22
4	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล	24
5	ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Disc susceptibility test ของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง	26
6	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Bactericidal Concentration; MBC) ของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล	31
7	ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยเอทานอล และละลายด้วย DMSO ต่อลูกปลากะพงขนาด 1.5-2 เซนติเมตร และลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะ PL15 ในรูปของค่า LC_{50} ที่เวลา 48 ชั่วโมง	32

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำหลังจากกรองน้ำออก (ซ้าย) และสารสกัดหยาบแห้ง (ขวา)	18
2	สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอล	19

บทนำ

สาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing, 1845 เป็นสาหร่ายสีเขียว (Division Chlorophyta) ครอบครัว (Family) Cladophoraceae จัดเป็นสาหร่ายทะเลที่มีการแพร่กระจายทั่วไปในยุโรป อเมริกา แอฟริกา ออกเตรเลีย และเอเชีย (Guiry and Guiry, 2019) มีลักษณะเซลล์รูปทรงกระบอก กว้างประมาณ 10-37 ไมโครเมตร ความยาว 2-6 เท่าของความกว้าง มีผนังเซลล์บาง แต่ละเซลล์เรียงต่อกันเป็นเส้นสายเดี่ยว ไม่แตกแขนง (unbranched filamentous algae) ผนังหุ้มคลอโพลาสเป็นร่างแห ภายในประกอบด้วยไพรินอยด์ (pyrenoids) ขยายพันธุ์ด้วยวิธีอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ (Kociolek, 2012) พบทั้งลอยน้ำอย่างอิสระ หรือเกาะกับวัตถุใต้น้ำ ((Nienhuis, 1974) พบเจริญได้ทั้งในน้ำกร่อยและน้ำเค็ม (Guiry and Guiry, 2019) แต่มีรายงานว่าพบสาหร่ายชนิดนี้ในน้ำจืดเช่นกัน (Parodi and Cáceres, 1993; Mungmai *et al*., 2014) รวมถึงในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วและส่งผลกระทบต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำ ในการแย่งที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำ ก่อให้เกิดปัญหาการขาดออกซิเจนในบ่อ ทำให้บ่อเกิดการตื้นเขินและเน่าเสียจากการตายทับถม รวมทั้งทำให้ยากต่อการจับสัตว์น้ำ ด้วยเครื่องมืออวนลาก จึงต้องมีการกำจัดออกจากบ่ออยู่ตลอดเวลา และกลายเป็นขยะหรือเศษเหลือจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ขณะที่มีรายงานว่า ในสาหร่ายทะเลหลายชนิดมีกลไกในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อป้องกันไม่ให้อนุมูลอิสระทำอันตรายตนเอง ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายทะเลมีหลายกลุ่ม เช่น phlorotannin, ascorbic acid, carotenoid, bromophemols, catechins เป็นต้น (Fujimoto, 1990) และสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีประสิทธิภาพกลุ่มหนึ่ง คือ ฟีนอล (phenol) (Matsukawa *et al*., 1997; Lim *et al*., 2002; Li *et al*., 2007; Zhang *et al*., 2007; Zubia *et al*. 2007; Kumar *et al*., 2008; Boonchum *et al*., 2011a) เนื่องจากอนุมูลอิสระจะก่อให้เกิดการอักเสบ และมีผลต่อการแก่ของเซลล์ ทำให้เกิดริ้วรอยเหี่ยวย่น (ยุวดี และคณะ, 2555) ทำลายเนื้อเยื่อ ก่อให้เกิดโรคหลอดเลือดและมะเร็ง (Lee *et al*., 2004) ขณะที่สารประกอบฟีโนลิกทำหน้าที่เป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวให้ไฮโดรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟ ทำให้สารประกอบฟีโนลิกมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Halliwell *et al*., 1987) ซึ่งการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายหลายชนิดพบว่า สาหร่าย *Caulerpa racemoca* มีปริมาณสารประกอบฟีโนลิกในปริมาณที่มาก (Kumur *et al*., 2011) และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (พันทิพย์, 2556; Cavas and Yurdakoc, 2005; Chew *et al*., 2008; Kumer *et al*., 2011)

สาหร่าย *Sapirulina spp.* ที่สกัดสารด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ขนิษฐา, 2553) รวมทั้งสาหร่าย *Laurentia obtuse, Codium elongatum* และ *Cutleria multifida* (Ranković *et al.*, 2015) สาหร่าย *Enteromorpha prolifera* (Cho *et al*., 2011) *E. intestinalis* (นภัสสร และคณะ, 2553) สาหร่าย *Ulva clathrata* และ *U. prolifera* (Farasat *et al.*, 2013) สาหร่าย *U. fasciats* และ *Gracilaria salicornia* (Vijayavel and Martinez, 2010) และสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่พบในน้ำจืด (Mungmai *et al*., 2014) ซึ่งที่ชี้ให้เห็นว่าสาหร่ายทะเลเป็นแหล่งที่สำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพในการพัฒนาใช้ในการรักษาสุขภาพ อาหารเสริม เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมต่าง ๆ สำหรับมนุษย์ (Cornish and Garbary, 2010; Boonchum *et al*., 2011) และได้มีการนำคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายเหล่านี้มาใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น การใช้สาหร่าย *Laminaria* spp., *Ulva* spp., *Porphyra* spp. *Spirulina* spp. และ *Chlorella* spp. ในเครื่องสำอางรูปแบบครีมบำรุงผิว ช่วยทำให้ผิวชุ่มชื้น กระตุ้นการสร้างคลอลาเจนและต้านการเกิดริ้วรอยจากแสงแดด (Einarsson *et al.*, 2010) สารสกัดจากสาหร่าย *U. reticulata* สามารถยับยั้งการหลั่งกรดและเพิ่มความเป็นกรด-ด่างของน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร และยังยั้งฤทธิ์ของฮีสตามีนที่มีผลต่อการเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจของหนูขาว (Maytharit *et al.*, 2008) Sudsamai (2008) ศึกษาสารสกัดน้ำจากสาหร่าย *C. racemosa* พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และคาดว่าสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัดซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีบทบาทสำคัญในการต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ป้องกันตับ และลักษณะที่เป็นเจลของสารกลุ่มโพลีแซ็กคาไรด์อาจสามารถป้องกันเยื่อบุกระเพาะอาหารจากปัจจัยต่าง ๆ ได้ ในสัตว์น้ำมีการศึกษาการใช้สารต้านอนุมูลอิสระในปลา Three-spined stickleback fish (*Gasterosteus aculeatus*) พบว่าในสภาพน้ำที่มีออกซิเจนต่ำ ปลาที่ได้รับอาหารผสมสารต้านอนุมูลอิสระจะมีความแข็งแรงของกล้ามเนื้อและสามารถทำกิจกรรมได้ดีกว่าปลาที่ไม่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารนี้มีผลต่อความแข็งแรงของเซลล์ (Kaplan, 2007)

นอกจากสารต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายแล้ว ยังพบว่าสาหร่ายหลายชนิดมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา ดังเช่น การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*) ในสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* (Khalid *et al*., 2010) สาหร่าย *Gracilaria corticata* และ *Spirulina platensis* (Kannan *et al*., 2014) สาหร่าย *Microspora floccosa* (Khalid *et al*, 2011) สาหร่าย *L. obtuse, C. elongatum* และ *C. multifida* (Ranković *et al.*,

2015) สาหร่าย *Sargassum polycystum* และ *S. tenerrimum* (Kausalya and Narasimha, 2015) สาหร่าย *G. corticata*, *U. fasciata* และ *E. compressa* (Choudhury *et al*., 2005) และสารสกัดจากสาหร่าย *S. platensis* ที่สกัดด้วยเฮกเซนและปิโตรเลียมอีเทอร์ สามารถยังยั้งเชื้อ *Staphylococus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albic*ans และ *Aspergillus niger* ได้ (*Santoyo* et al., 2006) สารสกัดจากสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 14 ชนิด และสามารถยับยั้งเชื้อราที่สาเหตุของโรคในคน 7 ชนิด ในพืช 5 ชนิด และเชื้อราที่ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ 8 ชนิด (Khalid *et al*., 2010) และให้ผลเช่นเดียวกันเมื่อใช้สารสกัดจากสาหร่าย *M. floccose* (Khalid *et al*., 2011) สารสกัดจากสาหร่าย *G. corticata* สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ได้ดี ขณะที่สาหร่าย *S. platensis* สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดี (Kannan *et al*., 2014)

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากสาหร่ายมีการทดสอบในสาหร่าย *Chara contraria* และ *Nitella flesilis* โดยทดสอบค่า LD_{50} ของสารสกัดจากสาหร่ายด้วยเมทานอลกับ ไรน้ำเค็ม (brine shrimp) ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่มีผลต่อไรน้ำเค็ม (Ghazala *et al*., 2004a) และ Ghazala *et al*. (2004b) ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากสาหร่าย *Tetraspora cylindrica* และ *T. gelatinosa* ที่สกัดด้วยเมทานอล โดยทดสอบค่า LD_{50} ของสารสกัดจากสาหร่ายกับไรน้ำเค็ม (brine shrimp) ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่มีผลต่อไรน้ำเค็มเช่นเดียวกัน และ Ghazala *et al*. (2010) ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากสาหร่าย *Aphanothece pallid*, *A. Stagnina*, *Nostoc eipsosporum*, *Arthrospira platensis*, *Lyngbya hieronymusii*, *L. mertensiana*, *Gloeotrichia natans*, *Enteromorpha intestinalis*, *Pithophora oedogonia และ Nitella flexilis* ที่สกัดด้วยเมทานอล โดยทดสอบค่า LD_{50} กับไรน้ำเค็ม พบว่า มีค่ามากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ วารุณี และคณะ (2547) พบว่าสารสกัดจากสาหร่าย *C. racemosa* สามารถยับยั้งการเกิดโรคจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำได้ และนอกจากนี้สารสกัดจากสาหร่าย *G. corticata*, *U. fasciata* และ *E. compressa* สามารถยับยังการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ ได้แก่ *Edwardsiella tarda*, *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* และ *Aeromonas hydrophila* (Choudhury *et al*, 2005) กัญญารัตน์ และ ฤทธิกร (2557) พบว่าสารสกัดจากสาหร่ายกลวง (*Solieria robusta* (Greville) Kylin)

ที่ระดับความเข้มข้น 25 ppm เมื่อฉีดเข้ากล้ามเนื้อของกุ้งกุลาดำร่วมกับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ระดับความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งกุลาดำตาย 100 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้กุ้งกุลาดำมีอัตรารอดตาย 88.89 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำของสารสกัดสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่เก็บรวบรวมได้จากฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกร่อย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง ซึ่งเป็นสาหร่ายที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่พบในน้ำจืดที่มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ (Mungmai *et al.*, 2014) และสาหร่าย *Microspora floccose* ที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (Khalid *et al.*, 2011) เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าและการนำกลับมาใช้ประโยชน์ของทรัพยากรในท้องถิ่น รวมถึงการลดการใช้การการตกค้างของสารเคมีในสัตว์น้ำด้วยการใช้สารจากธรรมชาติในการป้องกันโรค กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และอื่น ๆ แก่สัตว์น้ำ นำไปสู่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบอินทรีย์ และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ตลอดจนการนำไปพัฒนาการใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ทางยา อาหารเสริม หรือเครื่องสำอางในมนุษย์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดของสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* จากน้ำกร่อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิด
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* จากน้ำกร่อย ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิด
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* จากน้ำกร่อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิด
4. เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* จากน้ำกร่อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสารพฤกษเคมีของสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* เพื่อพัฒนานำไปใช้ประโยชน์ต่อไป
2. ทราบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* เพื่อพัฒนานำไปใช้ประโยชน์ต่อไป
3. ทราบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* เพื่อพัฒนานำไปใช้ประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์ต่อไป
4. ทราบความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* เพื่อพัฒนานำไปใช้ประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์ต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

การสกัดสารจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum*

เก็บรวบรวมสาหร่ายจากบ่อเพาะเลี้ยงน้ำกร่อยในฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง ในช่วงเดือนพฤศจิกายน ถึง ธันวาคม ล้างทำความสะอาด กำจัดสิ่งเจือปน อบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนสาหร่ายแห้งสนิท และบดให้ละเอียด เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เตรียมสารสกัดหยาบจากสาหร่ายด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ เอทานอล และเมทานอล ตามวิธีการดังนี้

การสกัดสารด้วยน้ำ (ดัดแปลงวิธีการของ ยุวดี และคณะ, 2555)[3]

นำสาหร่ายบดละเอียด 1 กิโลกรัม ผสมน้ำกลั่นปริมาตร 2 ลิตร คนให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส คนเป็นครั้งคราว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองหยาบด้วยผ้ากรองตาถี่ และกรองละเอียดอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เพื่อกำจัดสาหร่ายออก นำส่วนน้ำมาระเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เพื่อระเหยน้ำให้แห้ง และอบให้แห้งอีกครั้งด้วยตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

การสกัดสารด้วยเอทานอลและเมทานอล ดัดแปลงวิธีการของ Khalid *et al*., (2010)[4]

นำสาหร่ายบดละเอียด 1 กิโลกรัม ใส่ในขวดสีชา เติมตัวทำละลายเอทานอลจนท่วมสาหร่าย บันทึกปริมาตรที่แน่นอน ผสมให้เข้ากันใส่ในภาชนะที่ปิดสนิท เขย่าให้เข้ากันเป็นบางครั้ง ตั้งทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ โดยคนสาหร่ายให้ทั่วทุกวัน กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารละลายเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส สกัดสารจากกากสาหร่ายที่กรองได้ซ้ำอีก 2 ครั้ง ตามวิธีข้างต้น นำสารละลายที่ได้จากการสกัดมาผสมกันและระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และอบให้แห้งอีกครั้งด้วยตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ส่วนการสกัดสารด้วยเมทานอล นำสาหร่ายที่ผ่านการสกัด

---

[3] ยุวดี พีรพรพิศาส ฐิติกานต์ ปัญโญใหญ่ และ ดวงพร อมรเลิศพิศาล. 2555. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการ อักเสบของสาหร่ายเตา. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 40(1): 288-235.

[4] Khalid, M. N., Shameel, M., Ahmad, V.U., Shahzad, S. and Leghari, S. M. 2010. Studies on the bioactivity and phycochemisty of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophycota) from Sindh. Pak. J. Bot. 42(4): 2635-2646.

ด้วยเอทานอลแล้ว มาสกัดต่อ โดยดำเนินการเช่นเดียวกันกับการสกัดสารด้วยเอทานอล เพียงเปลี่ยนมาใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายแทน

การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum*

สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วย น้ำ เอทานอล และเมทานอลจากข้างต้น นำมาวิเคราะห์สารประ*กอบ*อินทรีย์ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยดัดแปลงวิธีการของ ศรินรัตน์และคณะ (2556)[5] ดังนี้

การทดสอบสารแอลคาลอยด์ (Alkaloids)

ชั่งสารสกัดสาหร่าย 0.2 กรัม ละลายด้วยสารละลาย 2 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปอุ่น 2-3 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายไปทำปฏิกิริยาของแอลคาลอยด์ด้วยตัวทำปฏิกิริยา (reagent) ที่ให้ตะกอนชัดเจน ได้แก่ สารละลายเมเยอร์ สารละลายวอลเสอร์ และสารละลายมาร์ม ซึ่งจะให้ตะกอนสีขาว สารละลายดราเจนดอร์ฟให้ตะกอนสีส้ม สารละลายแวกเนอร์ และสารละลายเคร้าท์ให้ตะกอนสีน้ำตาล

การทดสอบสารแอนทราควิโนน (Antraquinones)

ชั่งสารสกัดสาหร่าย 0.2 กรัม เติมสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลฟิวริก ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 5 นาที กรองสารละลายและทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม เติมสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนีย 2-3 หยด หากเกิดสีชมพูแดง แสดงว่ามีแอนทราควิโนน

การทดสอบสารเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids)

ชั่งสารสกัดสาหร่าย 0.2 กรัม สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ 3-5 มิลลิลิตร 2-3 ครั้ง เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น หากเกิดสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อของสารละลายแสดงว่ามีเทอร์พีนอยด์

การทดสอบสารซาโปนิน (Saponin)

ชั่งสารสกัดสาหร่าย 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดและกรองด้วยกระดาษกรอง เติมน้ำกลั่น 2-3 มิลลิลิตร เขย่าหลอดทดลองแรง ๆ หากเกิดฟองแสดงว่ามีสารซาโปนิน และ

[5] ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ วรางคณา สบายใจ และ สิริมาส นิยมไทย. 2556. การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของใบข่อยดำ. วารสารวิทยาศาสตร์ วิทยาลัยขอนแก่น. 40(3): 723-730.

เมื่อเติมกรดแล้วเขย่า ฟองจะหายไปและเกิดตะกอน ส่วนการทดสอบสีใช้ปฏิกิริยาลิเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด จะให้สีต่าง ๆ ขึ้นกับชนิดของซาโปนิน

การทดสอบสารแทนนิน (Tannin)

ชั่งสารสกัดสาหร่าย 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ กรองด้วยกระดาษกรอง หยดสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ เฟอร์ริกคลอไรด์ ใน 0.1 N HCL 2-3 หยด หากเกิดสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่ามีสารแทนนิน

การทดสอบสารคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac Glycoside)

ชั่งสารสกัดสาหร่าย 0.2 กรัม สกัดสีด้วยปิโตรเลียอีเทอร์ (petroleum ether) 2-3 ครั้ง ละลายสารสกัดด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบส่วนสเตียรอยด์ด้วยการทดสอบสีเบอร์แมน (Liebermann test) โดยเติมกรดแกลเซียลแอซีติก (glacial acetic acid) 3 หยด และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3 หยด ถ้าปรากฏสีน้ำเงิน หรือน้ำเงินเขียว แสดงว่าพบสเตียรอยด์ ทดสอบส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวด้วยน้ำยาเคดเด (Kedde reagent) จะปรากฏสีม่วง และทดสอบน้ำตาลดีออกซีด้วยการทดสอบเคลเลอร์-คิเลียนิ (Keller-Kiliani test) ประกอบด้วยกรดแกลเซียลแอซีติก สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (ferric chloride) และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น จะปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลบริเวณรอยต่อระหว่างสารสกัดกับกรดซัลฟิวริก การทดสอบต้องได้ผลบวกทั้ง 3 ปฏิกิริยา จึงถือว่ามีสารคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum*

สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วย น้ำ เอทานอล และเมทานอลจางข้างต้น นำมาวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ดังนี้

การทดสอบสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิกรวม วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method โดยดัดแปลงวิธีการของ Slinkard and Singleton (1997)[6] ใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นมาตรฐาน โดยใช้สารละลายสารสกัดสาหร่ายในเมทานอล ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ Folin-Ciocalteu ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 นาที เติม สารละลาย 7 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคาร์บอเนต

[6] Slinkard, K. and Singleton, V. L. 1997. Total phenolic analyses: automation and comparison with manual method. American J. Enology and Viticulture. 28: 49-55.

(sodium carbonate) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดโดยเขย่าเป็นบางครั้งเป็นเวลา 60 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่นแสง 760 นาโนเมตร หาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกรวมจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (mg GAE/g CE)

การทดสอบสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

สารฟลาโวนอยด์ วิเคราะห์ด้วยวิธี Down Method (Meda *et al*., 2005)[7] ใช้สารรูติน (rutin) เป็นสารมาตรฐาน โดยใช้สารละลายสารสกัดสาหร่ายในเมทานอล ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไนไตรต์ (sodium nitrite) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นวลา 6 นาที เติมสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไตรคลอไลด์ (aluminium trichloide) ในเมทานอล ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที เติม 1 M โซเดียมไฮดรกไซด์ (sodium hydroxide) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1.5 มิลลิลิตร นำสารผสมบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่นแสง 510 นาโนเมตร หาความเข้มข้นของสารฟลาโวนอยด์จากกราฟมาตรฐานสารรูตินในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของสารรูตินต่อมิลลิกรัมของสารสกัด (mg RE/mg CE)

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ ที่พบในสารสกัดสาหร่ายที่สกัดจากตัวทำละลายแต่ละชนิดด้วยการทดสอบความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

[7] Meda, A., Lamien, E. E., Romito, M., Millogo, J. and Nacoulma, O. G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkian Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chemistry. 91: 571-577.

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum*

สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วย น้ำ เอทานอล และเมทานอล นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ดังนี้

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging activity ตามวิธีของ Zhang *et al.* (2007)[8]

เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบให้มีความเข้มข้นในช่วง 0 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่สารละลายปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ เติมด้วยสารละลาย DPPH 0.16 mM ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ 1 นาที ทิ้งไว้ 30 นาที ในที่มืดวัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่นแสง 517 นาโนเมตร และใช้สารต้านอนุมูลอิสระ BHT (butylated hydroxytoluene) และกรดแอสคอร์บิค (ascorbic acid) เป็น positive control คำนวณค่า scavenging effect ตามสูตร ดังนี้

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}})/A_{\text{control}}] \times 100$$

โดย A_{sample} = ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดที่เติมสารละลาย DPPH

$A_{\text{sample blank}}$ = ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ไม่เติมสารละลาย DPPH

A_{control} = ค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่เติมสารสกัด

จากนั้นใช้เป็นค่าเบื้องต้นในการค่า scavenging activity ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และนำมาสร้างกราฟเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (inhibitory concentration ที่ 50 เปอร์เซ็นต์; IC_{50})

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS free radical scavenging activity ตามวิธีของ Rahim et al. (2008)[9]

เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบให้มีความเข้มข้นในช่วง 0 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่สารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ เติมสารละลายผสมระหว่าง ABTS

---

[8] Zhang, W. W., Duan, X. J., Huang, H. L., Zhang, Y. and Wang, B. G. 2007. Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidantive capacity and determination of antioxcidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphyocladia latiuscula* (Rhodomelaceae). J. Applied Phycology. 19: 97-108.

[9] Rahim, A. A., Rocca, E., Steinmetz, J., Kassim, M. J., Ibrahim, M. S. and Osman, H. 2008. Antioxidant activities of mangrove Rhizophora apiculata bark extracts. Food Chemistry. 107(1): 200-207.

75 mM และโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (potassium persulfate) 1.225 mM ที่ผสมทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเจือจาง 10 เท่า ด้วยเอทานอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่นแสง 414 นาโนเมตร และใช้กรดแอสคอร์บิค เป็น positive control คำนวณค่า scavenging activity ตามสูตร ดังนี้

$$\text{ABTS scavenging effect (\%)} = [(A_{control} - A_{sample}/A_{control})] \times 100$$

โดย $A_{control}$ = ค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS

A_{sample} = ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัด

จากนั้นใช้เป็นค่าเบื้องต้นในการค่า scavenging activity ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และนำมาสร้างกราฟเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (inhibitory concentration ที่ 50 เปอร์เซ็นต์; IC_{50})

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของค่า IC_{50} ของสารสกัดสาหร่ายที่สกัดจากตัวทำละลายแต่ละชนิดด้วยการทดสอบความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum*

สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วย น้ำ เอทานอลและเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ด้านแบคทีเรีย ตัวอย่างละ 4 ซ้ำ โดยใช้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังในคน ได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR2329 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR2329 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ได้แก่ *Escherichia coli* TISTR527, *Salmonella typhimurium* TISTR2519 และ *Vibrio cholerae* (โรงพยาบาลตรัง) และเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำ ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* TISTR1321, *V. harvei* และ *Steptococcus agalectiae* จากคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง ตามวิธีการดังนี้

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc susceptibility test ตามวิธีการ disc diffusion method (Kirby-Bauer procedure) (Bauer *et al*., 1966[10] specified in CLSI, 2006[11])

การเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ โดยดัดแปลงวิธีการของ Sritunyalucksana *et al*. (2005)[12] เตรียมสารละลายสารสกัดสาหร่าย ด้วยตัวทำละลาย น้ำกลั่น และ DMSO (dimethyl sulfoxide) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (100,000 ppm) นำแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตร ชุบสารละลาย ทิ้งให้แห้ง นำแบคทีเรียความเข้มประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร (เปรียบเทียบกับ McFarland standard No. 0.5) เพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ HMA (Muller Hinton Agar) โดยใช้สำลีพันก้าน (swop) ที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มในสารละลายเชื้อที่ต้องการทดสอบมา streak ถี่ ๆ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้เกิดพื้นที่ของการเจริญของแบคทีเรีย ปล่อยให้จานอาหารแห้งประมาณ 5 นาที นำแผ่นกระดาษกรองที่ชุบสารสกัดสาหร่ายวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและกดเบาๆ เพื่อให้แผ่นกระดาษกรองติดกับวุ้นอาหาร โดยใช้แผ่นยา (antibiotic susceptibility test discs) Chloramphenicol และ Oxytetracycline เป็น positive control และใช้ แผ่นกระดาษกรองชุบน้ำกลั่น และ DMSO เป็น negative control บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง นำมาวัดขนาด inhibition zone (มิลลิเมตร) โดยพิจารณาจาก clear zone รอบ ๆ แผ่นยาซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ในบริเวณนั้น ทั้งนี้การวัด inhibition zone สามารถคำนวณได้ ดังนี้

Inhibition zone (mm) = Diameter of clear zone and paper disc - Diameter of paper disc

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของค่า Inhibition zone ของสารสกัดสาหร่ายที่สกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดต่อเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วยการทดสอบความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

---

[10] Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. and Truck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45: 493-496.

[11] Clinical and Laboratory Standards Institutes. 2006. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests. Approved standard M2-A9. CLSI. Wayne, Pa.

[12] Sritunyalucksana, K., Gangnonnigw, W., Archakunakorn, S., Fegan, D. and Flegel, T. W. 2005. Bacterial clearance rate and a new differential hemocyte staining method to assess immunostimulant activity in shrimp. Dis. Aquat. Org. 63: 89-94.

การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) โดยดัดแปลงวิธีการของ Eloff (1998)[13]

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ โดยดัดแปลงวิธีการของ ของ Sritunyalucksana *et al*. (2005)[10] และเตรียมเชื้อให้มีความเข้มข้น $1x10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตร เตรียมสารละลายสารสกัดสาหร่ายที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ตัวทำละลายที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ดีที่สุดจาการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc susceptibility test และเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB) ครั้งละ 2 เท่า (2-flod) ใน 96 well microtiter plate และให้มีปริมาณสารในแต่ละหลุม 50 ไมโครลิตร เติมเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในแต่ละหลุมปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน ปิดฝาและบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบความขุ่นของสารละลายในหลุม และเติม *p*-Iodonitrotetrazolium chloride (INT) ในแต่ละหลุม จะเกิดสีชมพูหากมีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ตรวจสอบความเข้มข้นต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) โดยดูจากความเข้มต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และใช้ตัวทำละลายสารสกัดสาหร่ายที่ให้ผลดีที่สุดจาการทดสอบการฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Disc susceptibility test negative control

การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Bactericidal Concentration; MBC) ตามวิธีการของ NCCLS (2000)[14]

หลังจากทำการทดสอบหาค่า MIC นำสารละลายในหลุมที่ใสหรือไม่เกิดสีชมพูทุกความเข้มข้น มาเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบหาค่า MBC จากระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายที่ไม่มีการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ต่อสัตว์น้ำ

เลือกสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีค่า MBC ต่ำที่สุด มาทำการทดสอบพิษเฉียบพลัน โดยทดสอบกับ ลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาร์วา (Post

---

[13] Eloff, J. N. 1998. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria**.** Planta Med. 64: 711-713.

[14] National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Growth Aerobically. Approved Stand-5th Edition. NCCLS. 20 (2): 26 pp.

larva 5; PL5) และลูกปลากะพงขาว ขนาดประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร โดยการศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่มีต่อลูกกุ้งขาวแวนนาไมและลูกปลากะพงขาว ในรูปของค่า 48hr-LC_{50} ด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจาก Marine Acute Toxicity Test Procedure and Protocol (U.S.EPA, 2012)[15] ดังนี้

การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำลูกปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) อายุ 20 วันจากโรงเพาะฟัก ความยาวประมาณ 1.3–1.5เซนติเมตร ประมาณ 1,000 ตัว มาเลี้ยงปรับสภาพในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 500 ลิตร ที่เติมน้ำปริมาตร 400 ลิตร ความเค็มน้ำ 30 พีพีทีเป็นเวลา 3 วัน ให้อาร์ทีเมียเป็นอาหารเช้า–เย็น จนลูกปลามีความยาว 1.5-2.0 เซนติเมตร จึงงดให้อาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทำการทดลองที่อุณหภูมิ 25±1องศาเซลเซียส

นำลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 10 ประมาณ 2,000 ตัว มาเลี้ยงปรับสภาพในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 500 ลิตร ที่เติมน้ำปริมาตร 400 ลิตร ความเค็มน้ำ 30 พีพีที เป็นเวลา 3 วัน ให้อาร์ทีเมียเป็นอาหารเช้า–เย็น จากนั้นงดให้อาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทำการทดลองที่อุณหภูมิ 25±1องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum*

ละลายสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ปริมาณ 2 กรัม ลงในตัวทำละลายสารไดเม็ทธิลซัลโฟไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นสารละลายตั้งต้น (stock solution) ที่มีความเข้มข้น 200,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)

การศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่มีต่อลูกปลากะพงขาวและลูกกุ้งขาวแวนนาไม ในรูปของค่า 48hr-LC_{50}

นำลูกปลากะพงขาวและลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ปรับสภาพเรียบร้อยแล้ว ใส่โหลแก้วโหลละ 20 ตัว เพื่อทดลองหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 48 ชั่วโมง (48hr-LC_{50}) ด้วยวิธีชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง (Static Bioassay) แต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ และจะเติมสารเคมีในระดับความเข้มข้นที่

---

[15] U.S.EPA (United State Environmental Protection Agency). 2012. Marine Acute Toxicity Test Procedure and Protocol. [Online] Available from https://www3.epa.gov/region1/npdes/permits/generic/marinewateracutetoxtest-rev.pdf (1 July 2016)

ต้องการเมื่อเริ่มต้นการทดลองเพียงครั้งเดียวเท่านั้น โดยจัดการทดลองตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Marine Acute Toxicity Test Procedure and Protocol (U.S.EPA, 2012)[13]

การคำนวณค่า 48hr- LC_{50}

นำอัตราการตายสะสมของลูกปลากะพงขาวและลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ในเวลา 48 ชั่วโมง ที่ระดับความเค็ม 30 ppt ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาคำนวณหาค่า LC_{50} ที่เวลา 48 ชั่วโมง พร้อมช่วงความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีของ Finney (1971)[16]

[16] Finney, D. 1971. Probit Analysis. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.

ผลการวิจัย

การสกัดสารจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum*

การสกัดสารจากสาหร่าย *R. Hieroglyphicum* ด้วยตัวทำลาย (solvent) แต่ละชนิด คือ น้ำ เอทานอล และเมทานอล พบว่า การสกัดด้วยน้ำให้ผลผลิตสารสกัดหยาบในปริมาณสูงที่สุด คิดเป็น 9.77 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เอทานอล และเมทานอล คิดเป็น 1.40 และ 0.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำมีสีเขียวอมน้ำตาล สามารถอบให้แห้งได้ และพบมีเกล็ดของเกลือเจือปนอยู่ในสารสกัด (ภาพที่ 1) ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอล มีสีเขียวเข้ม ลักษณะเป็นครีมข้น ไม่สามารถอบให้แห้งสนิทได้ เนื่องจากมีน้ำมันเป็นส่วนประกอบ โดยพบน้ำมันอยู่บนส่วนผิวหน้าของสารสกัดค่อนข้างมาก (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล

ตัวทำละลาย	น้ำหนักสาหร่ายแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)	ปริมาณสารสกัดหยาบ (เปอร์เซ็นต์)
น้ำ	1,000	97.68	9.77
เอทานอล	1,000	13.96	1.39
เมทานอล	1,000	9.89	0.99

หมายเหตุ การสกัดด้วยเมทานอลเป็นการสกัดต่อเนื่องจากการสกัดด้วยเอทานอล

ภาพที่ 1 สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำหลังจากกรองน้ำออก (ซ้าย) และสารสกัดหยาบแห้ง (ขวา)

ภาพที่ 2 สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยเอทานนอล และเมทานอล

การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum*

การทดสอบสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากสาหร่าย *R. Hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล พบว่ามี สารแอลคาลอยด์ ซาโปนิน และน้ำตาลดีออกซี ในสารสกัดที่สกัดด้วยทุกตัวทำละลาย ส่วนสารเทอร์พีนอยด์ พบเฉพาะในสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอล และสารแทนนิน พบเฉพาะในสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล ขณะที่ไม่พบสารแอนทราควิโนน และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ในสารสกัดที่สกัดด้วยทุกตัวทำละลาย ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล

องค์ประกอบทางพฤกษเคมี	ตัวทำละลาย		
	น้ำ	เอทานอล	เมทานอล
แอลคาลอยด์ (Alkaloids)	+	+	+
แอนทราควิโนน (Antraquinones)	–	–	–
เทอร์พีนอยด์ (Terpenoids)	–	+	+
ซาโปนิน (Saponin)	+	+	+
แทนนิน (Tannin)	–	–	+
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac Glycoside)	–	–	–
สเตียรอยด์	–	–	–
วงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัว	–	–	–
น้ำตาลดีออกซี	+	+	+

หมายเหตุ + คือตรวจพบ (positive test) และ – คือตรวจไม่พบ (negative test)

การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum*

การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล โดยศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้น $y = 0.004 x + 0.009$, $R^2 = 0.993$ และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบเทียบกับกราฟมาตรฐานของรูตินที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้น $y = 0.0049 x + 0.0092$, $R^2 = 0.993$ สารสกัดที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกรวม และสารฟลาโวนอยด์ สูงที่สุด เท่ากับ 1,950 mg GAE/mg CE (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม) และ 808.33 mg RE/mg CE (มิลลิกรัมสมมูลของรูตินต่อสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม) ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกรวม เท่ากับ 1,420.83 และ 1,354.17 mg GAE/mg CE และสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 756.67 และ 661.67 mg RE/mg CE ตามลำดับ ดังตารางที่ 3

เมื่อทดสอบความแตกต่างของปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทางสถิติ พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกรวม และสารฟลาโวนอยด์แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล

ตัวทำละลาย	ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	
	สารประกอบฟีนอลิกรวม (mg GAE/mg CE)	สารฟลาโวนอยด์ (mg RE/mg CE)
น้ำ	1,950.00±37.05[a]	808.33±12.58[a]
เอทานอล	1,420.83±19.09[b]	756.67±7.64[b]
เมทานอล	1,354.17±14.43[c]	661.67±16.07[c]

หมายเหตุ: mg GAE/mg CE หมายถึง มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม และ mg RE/mg CE หมายถึง มิลลิกรัมสมมูลของรูตินต่อสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum*

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล ด้วยวิธี DPPH และ ABTS free radical scavenging activity โดยเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระ BHT (Butylated hydroxytoluene) และกรดแอสคอร์บิค (Ascorbic acid) พบว่า การทดสอบด้วยวิธี DPPH free radical scavenging activity สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด มีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}; 50 percent inhibitory concentration) เท่ากับ 12.87 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทานอล และน้ำ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 31.45 และ 84.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่สาร BHT และกรดแอสคอร์บิค มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.07 และ 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตาราง ที่ 4

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS free radical scavenging activity สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทานอล และน้ำ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.11 และ 22.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่สาร BHT และกรดแอสคอร์บิค มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.01 และ 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตาราง ที่ 4

เมื่อทดสอบความแตกต่างของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทางสถิติ พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยทั้งวิธี DPPH และ ABTS แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.01$) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล

สารสกัด	ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})	
	DPPH (µg/ml)	ABTS (µg/ml)
น้ำ	84.91±2.40^{d}	22.49 ± 1.97^{d}
เอทานอล	31.45±0.52^{c}	7.11±0.02^{c}
เมทานอล	12.87±0.12^{b}	3.01±1.08^{b}
BHT	0.07±0.00^{a}	0.008±0.00^{a}
Ascobic acid	0.006±0.00^{a}	0.005±0.00^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum*

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล โดยการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Disc susceptibility test การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) และ การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Bactericidal Concentration; MBC) มีผลการทดสอบดังนี้

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Disc susceptibility test

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังในคน ได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR2329 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR2329 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ได้แก่ *Escherichia coli* TISTR527, *Salmonella typhimurium* TISTR2519 และ *Vibrio cholerae* (โรงพยาบาลตรัง) และเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำ ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* TISTR1321, *V. harvei* จากคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (KU) และเชื้อ *Steptococcus agalectiae* และ *V. parahaemolyticus* จากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง (DOF) ด้วยสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (100,000 ppm) โดยละลายสารสกัดด้วยน้ำ และ DMSO พบว่า สารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล ที่ละลายด้วยน้ำ และ DMSO ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella typhinurium*, *V. cholerae*, *V. harvei* และ *V. parahaemolyticus* โดยไม่เกิดบริเวณยังยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (clear zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และกลุ่มควบคุมที่ใช้ DMSO เป็นตัวยับยั้งการเจริญของเชื้อ ก็ไม่พบบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อเช่นเดียวกัน ส่วนกลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะ Oxytertacyclin และ Cholramphenicol พบบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ดังตารางที่ 5

ขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* สามารถถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วยสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยเอทานอล และละลายด้วย DMSO เท่านั้น โดยมีบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 0.55±0.24 มิลลิเมตร ขณะที่กลุ่มควบคุมที่ใช้ DMSO เป็นตัวยับยั้งการเจริญของเชื้อ ไม่พบบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ ส่วนกลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะ Oxytertacyclin และ Cholramphenicol พบบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ ดังตารางที่ 5 ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* สามารถยับยั้ง

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Disc susceptibility test ของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง

สารสกัด/สาร	ตัวทำละลาย	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)		
		Staphylococcus aureus TISTR2329	*Pseudomonas aeruginosa* TISTR2329	*Escherichia coli* TISTR527
สารสกัดด้วยน้ำ	น้ำ	0^{d}	0^{b}	0^{c}
	DMSO	0^{d}	0^{b}	0^{c}
สารสกัดด้วยเอทานอล	น้ำ	0^{d}	0^{b}	0^{c}
	DMSO	0.55 ± 0.24^{c}	0^{b}	0^{c}
สารสกัดด้วยเมทานอล	น้ำ	0^{d}	0^{b}	0^{c}
	DMSO	0^{d}	0^{b}	0^{c}
DMSO		0^{d}	0^{b}	0^{c}
Oxytetracycline		26.85 ± 0.74^{a}	8.57 ± 0.31^{a}	14.90 ± 0.94^{b}
Cholramphenicol		24.40 ± 0.50^{b}	7.90 ± 0.58^{a}	18.12 ± 0.65^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สารสกัด/สาร	ตัวทำละลาย	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)		
		Salmonella typhimurium TISTR2519	*Vibrio cholerae* Trang Hospital	*Aeromonas hydrophila* TISTR1321
สารสกัดด้วยน้ำ	น้ำ	0^{c}	0^{c}	0^{d}
	DMSO	0^{c}	0^{c}	0.70 ± 0.70^{c}
สารสกัดด้วยเอทานอล	น้ำ	0^{c}	0^{c}	0^{d}
	DMSO	0^{c}	0^{c}	1.26 ± 0.92^{c}
สารสกัดด้วยเมทานอล	น้ำ	0^{c}	0^{c}	0^{d}
	DMSO	0^{c}	0^{c}	1.39 ± 0.73^{c}
DMSO		0^{c}	0^{c}	1.47 ± 0.24^{c}
Oxytetracycline		13.32 ± 0.31^{b}	1.47 ± 0.24^{c}	18.97 ± 0.43^{b}
Cholramphenicol		16.10 ± 0.79^{a}	24.08 ± 0.39^{a}	22.73 ± 0.44^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สารสกัด/สาร	ตัวทำละลาย	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)		
		Vibiro harvei	*Steptococcus agalectiae*	*V. parahaemolyticus*
		KU	DOF	DOF
สารสกัดด้วยน้ำ	น้ำ	0^{c}	0^{e}	0^{c}
	DMSO	0^{c}	0^{e}	0^{c}
สารสกัดด้วยเอทานอล	น้ำ	0^{c}	5.46 ± 0.48^{d}	0^{c}
	DMSO	0^{c}	9.70 ± 1.02^{b}	0^{c}
สารสกัดด้วยเมทานอล	น้ำ	0^{c}	7.12 ± 0.71^{c}	0^{c}
	DMSO	0^{c}	8.67 ± 1.02^{b}	0^{c}
DMSO		0^{c}	0^{e}	0^{c}
Oxytetracycline		17.75 ± 0.60^{b}	19.09 ± 1.17^{a}	13.75 ± 0.82^{b}
Cholramphenicol		23.38 ± 0.63^{a}	18.48 ± 0.75^{a}	18.55 ± 0.39^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การเจริญของเชื้อ ได้ด้วยสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยน้ำ เมทานอล และเอทานอล และละลายด้วย DMSO เท่านั้น โดยมีบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 0.70±0.70, 1.26±0.92 และ 1.39±0.73 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่พบว่ากลุ่มควบคุมที่ใช่ DMSOเป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* สามารถยับยั้งเชื้อได้เช่นกัน โดยมีบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 1.47±0.24 มิลลิเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้สารสกัดจากสาหร่ายทั้ง 3 กลุ่มข้างต้น ขณะที่ยาปฏิชีวนะ Oxytertacyclin และ Cholramphenicol พบบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ ดังตารางที่ 5

การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Steptococcus agalectiae* พบว่าสารสกัดหยาบจากสาหร่ายที่สกัดด้วยเอทานอล ที่ละลายด้วยน้ำ และ DMSO มีบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ เท่ากับ 5.46±0.48 และ 9.70±1.02 มิลลิเมตร ตามลำดับ และบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อของสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยเมทานอล ที่ละลายด้วยน้ำ และ DMSO มีบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 7.412±0.71 และ 8.67±1.02 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05) ขณะที่กลุ่มควบคุมที่ใช้ DMSO เป็นตัวยับยั้งการเจริญของเชื้อ ก็ไม่พบบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ ส่วนกลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะ Oxytertacyclin และ Cholramphenicol พบบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ดังตารางที่ 5

จากผลการศึกษาพบว่า สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยเอทานอล มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งจะนำไปศึกษาทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Bactericidal Concentration; MBC) ต่อไป

การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Bactericidal Concentration; MBC)

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Disc susceptibility test พบว่าสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยเอทานอล ประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยังการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* TISTR2329, *Aeromonas hydrophila* TISTR1321 และ *Steptococcus agalectiae* DOF บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ จึงทำการทดสอบค่า MIC และ MBC ของสารสกัดดังกล่าวกับเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* มีค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยเอทานอลและละลายด้วย DMSO มีค่าเท่ากับ 0.391 และ 1.563 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่กลุ่มควบคุมที่ใช้ DMSO พบว่ามีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 125 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เท่ากัน ดังตารางที่ 6 เชื้อ *A. hydrophila* มีค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล ที่ละลายด้วย DMSO เท่ากับ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากันทั้งหมด และกลุ่มควบคุมที่ใช้ DMSO เท่ากับ 31.25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เท่ากันทั้ง 2 ค่า และเชื้อ *Steptococcus agalectiae* มีค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยเอทานอล และละลายด้วยน้ำ เท่ากับ 6.25 และ 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนที่ละลายด้วย DMSO มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.049 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากันทั้ง 2 ค่า ขณะที่สารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยเมทานอล และละลายด้วยน้ำ มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 3.125 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนที่ละลายด้วย DMSO มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 1.563 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากันทั้ง 2 ค่า กลุ่มควบคุมที่ใช้ DMSO มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 62.50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เท่ากันทั้ง 2 ค่า ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Bactericidal Concentration; MBC) ของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล

สารสกัด/สาร	ตัวทำละลาย	MIC/MBC (มิลลิกรัมสารสกัดต่อมิลลิลิตร หรือ ไมโครลิตร DMSO ต่อมิลลิลิตร)					
		Staphylococcus aureus TISTR2329		*Aeromonas hydrophila* TISTR1321		*Steptococcus agalectiae* DOF	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
สารสกัดด้วยน้ำ	DMSO	NA	NA	3.125 (5)*	3.125 (5)	NA	NA
สารสกัดด้วยเอทานอล	น้ำ	NA	NA	NA	NA	6.25 (4)	12.50 (3)
	DMSO	0.391 (8)	1.563 (6)	3.125 (5)	3.125 (5)	0.049 (11)	0.049 (11)
สารสกัดด้วยเมทานอล	น้ำ	NA	NA	NA	NA	3.125 (5)	6.25 (4)
	DMSO	NA	NA	3.125 (5)	3.125 (5)	1.563 (6)	1.563 (6)
DMSO		125 (3)	125 (3)	31.25 (5)	31.25 (5)	62.50 (4)	62.50 (4)

หมายเหตุ NA หมายถึง not applicable (ไม่ได้ทำการทดสอบ)

*หมายเลขในวงเล็บ หมายถึง ลำดับที่ของหลุมของไมโครเพลท (microtiter plate) ที่เกิดปฏิกิริยา MIC หรือ MBC

การทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ต่อสัตว์น้ำ

จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียพบว่า สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยเอทานอล และละลายด้วย DMSO มีประสิทธิภาพที่สุดในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นในการศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* จึงได้ศึกษาพิษของสารสกัดที่มีต่อลูกปลากะพงขาว ความยาว 1.5–2.0 เซนติเมตร และลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL15 โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย ในรูปของค่า LC_{50} ที่เวลา 48 ชั่วโมง (48hr- LC_{50}) และช่วงแห่งความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ (95% confidence interval) พบว่า ค่า 48hr- LC_{50} ของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยเอทานอล และละลายด้วย DMSO ของลูกปลากะพงขาว และลูกกุ้งขาวแวนนาไม เท่ากับ 0.064 และ 0.035 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยเอทานอล และละลายด้วย DMSO ต่อลูกปลากะพง ขนาด 1.5-2 เซนติเมตร และลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL15 ในรูปของค่า LC_{50} ที่เวลา 48 ชั่วโมง

ชนิดสัตว์	48-hr LC_{50} (mg/ml)	95% Lower limit (mg/ml)	95% Upper limit (mg/ml)
ลูกปลากะพงขาว ขนาด 1.5-2 เซนติเมตร	0.064	0.051	0.090
ลูกกุ้งขาวแวนนาไม PL15	0.035	0.022	0.049

วิจารณ์ผลการวิจัย

สารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum*

สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล พบว่าปริมาณสารที่สกัดได้จากแต่ละตัวทำลายมีความแตกต่างกัน โดยปริมาณสารที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือเอทานอล และเมทานอลตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการสกัดสารจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่พบในแหล่งน้ำจืดของ Mungmai *et al*. (2014) โดยปริมาณสารที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำมีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือเอทานอล เช่นเดียวกับ Boonchum *et al*. (2011) รายงานว่าการสกัดสารจากสาหร่ายทะเลด้วยน้ำจะให้ปริมาณสารมากกว่าการสกัดด้วยเอทานอล โดย Matanjun *et al.* (2008) ให้เหตุผลว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้ว (polarity) สูงขึ้น มีผลต่อการเพิ่มปริมาณผลผลิตสารสกัดจากสาหร่ายทะเล ซึ่งน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูงกว่าเอทานอล เมื่อเปรียบเทียบปริมาณผลผลิตสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* พบว่าในการศึกษาครั้งนี้ได้ปริมาณสารสกัดน้อยกว่า เมื่อเทียบกับการศึกษาของ Mungmai *et al*. (2014) ทั้งนี้อาจเนื่องจากในการสกัดสารจากสาหร่ายครั้งนี้ใช้ตัวอย่างสาหร่ายแห้งที่ตัดให้มีขนาดเล็กโดยไม่ได้บดเป็นผง ขณะที่การสกัดของ Mungmai *et al*. (2014) ได้บดสาหร่ายให้เป็นผงละเอียดก่อนการสกัดจึงทำให้ได้สารสกัดในปริมาณที่มากกว่า

นอกจากนี้สารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอล พบว่ามีปริมาณน้ำมันอยู่ค่อนข้างมาก แต่การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการศึกษาในส่วนของน้ำมันนี้ ซึ่งจากการรายงานของ Ghazala *et al.* (2004a) พบกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) 9 ชนิด และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) 7 ชนิด ในสาหร่าย *Chara contraria* และกรดไขมันอิ่มตัว 9 ชนิด และกรดไขมันไม่อิ่มตัว 14 ชนิด ในสาหร่าย *Nitella flexilis* และ Ghazala *et al.* (2004b) พบกรดไขมันอิ่มตัว 9 ชนิด และกรดไขมันไม่อิ่มตัว 15 ชนิด ในสาหร่าย *Tetraspora cylindrica* ส่วน Khalid *et al.* (2010) พบกรดไขมันอิ่มตัว 7 ชนิด และกรดไขมันไม่อิ่มตัว 20 ชนิด ในสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* และ Khalid *et al.* (2011) พบกรดไขมันอิ่มตัว 11 ชนิด และกรดไขมันไม่อิ่มตัว 11 ชนิด ในสาหร่าย *Microspora floccose* ขณะที่ Ghazala and Shameel (2005) พบว่าสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่เก็บจากบ่อน้ำเค็ม ในปากีสถาน กรดไขมันอิ่มตัว 9 ชนิด และกรดไขมันไม่อิ่มตัว 14 ชนิด ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาในส่วนน้ำมันที่สกัดได้จากสาหร่ายชนิดนี้ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum*

การทดสอบสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากสาหร่าย *R. Hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล พบว่ามี สารแอลคาลอยด์ ซาโปนิน และน้ำตาลดีออกซี ในสารสกัดที่สกัดด้วยทุกตัวทำละลาย ส่วนสารเทอร์พีนอยด์ พบเฉพาะในสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอล และสารแทนนิน พบเฉพาะในสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล ดังตารางที่ 2 และพบประกอบฟินอลิกรวม และฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยทุกตัวทำละลาย ดังตารางที่ 3 เช่นเดียวกับที่ Ghazala and Shameel (2005) รายงานการพบสารเทอร์พีนในสาหร่าย *R. Hieroglyphicum* ขณะที่ Azhagu Raj *et al*. (2015) พบว่าสารสเตียรอยด์ (steroids) แทนนิน เทอร์พีนอยด์ คาร์โบไฮเดรต แอนทราควิโนน น้ำตาลดีออกซี ฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก ในสาหร่ายขนนก (*Caulerpa racemes*)

Mungmai *et al*. (2014) พบว่าสารสกัดจากสาหร่าย *R. Hieroglyphicum* ที่พบในน้ำจืดด้วยน้ำ และเอทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 0.1505 และ 0.7349 mg GAE/g CE (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัดหยาบ 1 กรัม) ตามลำดับ ส่วนการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสาหร่ายเตา (*Spirogyra* sp.) ที่สกัดด้วยน้ำของ ธีระวัฒน์ และคณะ (2555) พบว่ามีค่าระหว่าง 77.66-92.95 mg GAE/g CE ขณะที่ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ และเอทานอลสูงกว่า การศึกษาของ Mungmai *et al*. (2014) และ ธีระวัฒน์ และคณะ (2555) ข้างต้น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1,950 และ 1,420 mg GAE/mg CE (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม) ตามลำดับ นอกจากนี้ มนต์สรวง และคณะ (2558) พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากสาหร่าย *Brachytrichia quoyi* สาหร่าย *Dictyota ciliolata,* สาหร่ายเห็ดหูหนู (*Padina minor*) สาหร่ายทุ่น (*Sargassum binderi* และ *S. polycystum*) และ สาหร่ายกระบอง (*Turbinaria conoides*) ที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณมากกว่าการสกัดด้วยเอทานอล เช่นเดียวกัน

จากผลการศึกษาสารพฤกษเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในสารสกัดจากสาหร่าย *R. Hieroglyphicum* ในครั้งนี้พบว่าสารดังกล่าวเป็นสารที่มีคุณสมบัติในทางยา เช่น สารแทนนิน มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อไวรัส (antiviral) เชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) พยาธิ (antiparasitic) และยังมีคุณสมบัติป้องกันการอักเสบ (anti-imflammatory) และต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

เป็นต้น (Rievere *et al.*, 2005) ส่วนซาโปนินมีคุณสมบัติในการรักษาสภาวะคลอเรสเตอรอลสูง (hyper cholesterolaemia) และน้ำตาลในเลือด (hyperglycemia) ต้านอนุมูลอิสระ ด้านมะเร็ง (anticancer) และป้องกันการอักเสบ เป็นต้น (Jeeva *et al*., 2012) และมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา (antifungal) และ แบคทีเรีย (Mohanta *et al*. 2007) นอกจากนี้สารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิกยังมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราและแบคทีเรีย ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการก่อมะเร็ง ต้านภูมิแพ้ (antiallergic) และต้านการอักเสบ (Yadav *et al.* 2011)

ดังนั้นจากคุณสมบัติของสารพฤษเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ในการศึกษานี้อาจนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในเวชภัณฑ์ เครื่องสำอาง หรือผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ได้ ซึ่งจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของสาหร่ายชนิดนี้ และเป็นใช้ทรัพยากรให้เกิดประโยชน์ยิ่งขึ้น

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum*

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ด้วยวิธี DPPH และ ABTS free radical scavenging activity พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เอทานอลและน้ำ ตามลำดับ ในการทดสอบทั้ง 2 วิธี ดังตารางที่ 4 โดยค่า IC_{50} โดยวิธี DPPH มีค่าระหว่าง 12.87-84.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และวิธี ABTS มีค่าระหว่าง 3.01-22.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ Mungmai *et al.* (2014) พบว่าค่า IC_{50} สารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่พบในน้ำจืด ที่สกัดด้วยน้ำ และเอทานอลมีค่าเท่ากับ 23.883 และ 29.144 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (23,883 และ 29,114 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วน Boonchum *et al*. (2011b) พบค่า IC_{50} ของสาหร่ายใบมะกรูด (*Halimeda macroloba*) สาหร่ายทุ่น (*S. binderi*) และสาหร่ายกระบอง (*T. conoides*) ด้วยวิธี DPPH มีค่าระหว่าง 0.84-113.49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (840-113,490 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และวิธี ABTS มีค่าระหว่าง 5.29-96.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (5,290-96,240 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ วสันต์ และคณะ (2556) พบว่าค่า EC_{50} (half maximal effective concentration หรือค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ครึ่งหนึ่งจากจำนวนเริ่มต้น) ด้วยวิธี DPPHของสารสกัดจากสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera)* สาหร่ายทุ่น (*S. oligocystum*) และสาหร่ายเขากวาง (*Gracilaria changii*) ที่สกัดด้วยเอทานอล มีค่าระหว่าง 121.33-336.68 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ มนต์สรวง และคณะ (2558) พบว่าสารสกัดจากสาหร่ายทุ่น (*Sargassum binderi* และ *S. polycystum*) และ

สาหร่ายกระบอง (*T. conoides*) ที่สกัดด้วยน้ำมีค่า IC_{50} ที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH ระหว่าง 2.64-3.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (2,640-3,250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ขณะที่สารสกัดจากสาหร่าย *B. quoyi* สาหร่าย *D. ciliolate* และสาหร่ายเห็ด หูหนู (*P. minor*) ที่สกัดด้วยน้ำ และสารสกัดจากสาหร่ายทั้ง 6 ที่สกัดด้วยเอทานอล ไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทดสอบด้วยวิธีเดียวกัน และ ธีระวัฒน์ และคณะ (2555) พบว่าค่า IC_{50} ของสาหร่ายเตาที่สกัดด้วยน้ำ ด้วยวิธี ABTS มีค่าระหว่าง 0.053-0.117 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (53-117 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในสาหร่ายชนิดอื่น ๆ ข้างต้น พบว่าสารสกัดจากสาหร่ายในการศึกษานี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าค่อนข้างมาก สอดคล้องกับปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิกรวมที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพในการนำไปใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์ยา เครื่องสำอาง หรืออาหารต่อไปในอนาคต

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum*

จากผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารกสัดหยาบจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล และละลายด้วยน้ำ และ DMSO ด้วยวิธี Disc susceptibility test พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญจำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR2329, *Escherichia coli* TISTR527, *Salmonella typhimurium* TISTR2519, *Vibrio cholerae* (Trang hospital), *V. harvei* (KU), *V. parahaemolyticus* (DOF) และ *Aeromonas hydrophila* TISTR1321 ขณะที่เชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR2329 สามารถยับยั้งการเจริญด้วยสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยเอทานอล และละลายด้วย DMSO เท่านั้น และเชื้อ *Steptococcus agalectiae* (DOF) TISTR2329 สามารถยับยั้งการเจริญด้วยสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอล ที่ละลายด้วยน้ำ และ DMSO เท่านั้น ส่วนที่สกัดด้วยน้ำไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ แม้ว่าเชื้อ *A. hydrophila* สามารถทำให้เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญด้วยสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล ที่ละลายด้วย DMSO แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าในกลุ่มควบคุมที่ใช้ DMSO ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* ก็พบบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ (clear zone) ไม่แตกต่างกัน (ดังตารางที่ 5) เช่นเดียวกับผลการทดสอบค่า MIC และ MBC โดยการใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายสารสกัดจากสาหร่าย ให้ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากสาหร่ายต่อเชื้อ *A. hydrophila* ในลำดับหลุมของ microtiter plate เดียวกันกับกลุ่มควบคุมที่ใช้

DMSO ดังตารางที่ 6 ดังนั้นความสามารถในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *A. hydrophila* น่าจะเป็นผลมาจาก DMSO ไม่ใช่ฤทธิ์ของสารสกัดจากสาหร่าย ผลการทดสอบครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* โดย Shanker *et al*. (2010) ให้เหตุผลถึงความสามารถในการละลายได้ที่แตกต่างกันของสารชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในสารที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ขณะที่ อุทร และคณะ (2562) รายงานว่าการใช้น้ำในการสกัดสารจากสาหร่ายขนนก *Caulerpa racemes* var. corynephora สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อ *A. hydrophila*, *S. teptococcus agalectiae*, *V. harvei* และ *V. parahaemolyticus* ได้ แต่ก็ได้ผลน้อยกว่าการสกัดด้วยสารชนิดอื่น เช่น เฮกเซน (hexane) ไดคลอโลมีเทน (dichloromethane) เอทิลอะซีเตท (ethyl acetate) เอทานอล และเมทานอล

ถึงแม้การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* พบว่าในสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์สูงกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอล ดังตารางที่ 3 แต่อาจจะไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ดังที่ Buer *et al*. (2010) รายงานว่าสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีมากกว่า 9,000 ชนิด และในพืชแต่ละชนิดประกอบด้วยสารฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (antimicrobial compound) ที่แตกต่างกัน เช่น สาร isoflavone พบใน ถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) และถั่ว *Medicago truncatula* สาร isoorientin, isovitexin และ vitexin พบในเมล็ดต้นปอป่น (*Linum usitatissimum*) สาร chalcones และ flavans พบในต้น *Mariscus psilostachys* เป็นต้น และ Irfan *et al*. (2014) รายงานว่า สารสกัดจากพืชสมุนไพร *Sphaeranthus indicus* มีส่วนประกอบของสารแอลคาลอยด์ แทนนิน เทอร์พีนอยด์ และฟลาโวนอยด์ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ขณะที่ในการทดลองครั้งนี้ พบสารเทอร์พีนอยด์ เฉพาะในสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอล และสารแทนนินพบในสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล แต่ไม่พบในสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ ดังตารางที่ 2 จึงทำให้สารสกัดที่สกัดด้วยน้ำไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เลย ซึ่งรายงานของ Guimarães *et al.* (2019) พบว่าสารเทอร์พีนอยด์มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli* และ *Salmonella* Typhimurium

นอกจากนี้การสกัดสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ด้วยเอทานอล และเมทานอลในการศึกษาครั้งนี้ มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเพียง 2 ชนิด เท่านั้น ดังนั้นจึงควรมี

การศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของตัวทำละลายที่นำมาใช้ในการสกัดซึ่งอาจมีผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดแตกต่างออกไป ดังเช่นรายงานของ Rajasulochana *et al.* (2009) พบว่าการสกัดสารจากสาหร่าย Padina ด้วยตัวทำละลายต่างกัน ได้แก่ Benzene, n-hexane, ethylacetate, methanol และ chloroform : methanol มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ที่แตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาตัวทำละลายสารสกัดจากสาหร่ายพบว่า การใช้น้ำเป็นตัวทำละลายสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอล มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเชื้อ *S. agalectiae* เท่านั้น แต่ก็มีประสิทธิภาพด้อยกว่าการใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย ส่วนการใช้ DMSO เพียงอย่างเดียวสามารถการยับยั้งการเจริญเชื้อ *S. agalectiae* และ *S. aureus* ได้เช่นกัน แต่มีประสิทธิภาพด้อยกว่าเมื่อใช้ร่วมกับสารสกัด เมื่อพิจารณาจากค่า MIC และ MBC ดังตารางที่ 6 ทั้งนี้อาจเนื่องจากลักษณะของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วย เอทานอล และเมทานอล มีลักษณะเป็นครีมข้นสีเขียว ไม่สามารถอบให้แห้งสนิทได้ และมีน้ำมันเป็นส่วนประกอบค่อนข้างมาก จึงละลายน้ำได้ยาก มีสารประกอบเพียงบางส่วนเท่านั้นที่สามารถละลายได้ในน้ำ มีผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ด้อยกว่าการใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เช่นเดียวกับที่ Lipkovska *et al.* (2014) กล่าวว่า สารประกอบฟลาโวนอยด์หลายชนิดที่มีความสามารถละลายในน้ำได้ต่ำ จึงมีผลให้การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของฟลาโวนอยด์ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า DMSO มีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ในระดับหนึ่ง ดังที่กล่าวแล้วข้างต้น ซึ่ง Wadhwani *et al.* (2008) รายงานว่าการใช้ DMSO ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* MTCC 435, *P. oleovorans* MTCC 617, *V. cholerae* MTCC 3906, *Shigella flexneri* MTCC 1457 และ *Salmonella paratyphi* A พบว่าเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้สามารถเจริญได้เพียง 33.20 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ Kirkwood *et al.* (2018) รายงานว่า DMSO 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Mycobacterium abscessus* ได้ แต่เมื่อเจือจางเหลือ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่มีผลต่อการยับยั้งเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้พบว่า DMSO 12 เปอร์เซ็นต์ (125 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร) สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. aureus* และ 6.25 เปอร์เซ็นต์ (62.50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร) สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. agalectiae* และ 3.125 เปอร์เซ็นต์ (31.25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร) สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อ *A.*

hydrophila ได้ และเมื่อใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดจากสาหร่ายมีผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. agalectiae* มีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังตารางที่ 6

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยพิจารณาจากการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารกสัดหยาบจากสาหร่ายด้วยวิธี Disc susceptibility test การทดสอบค่า MIC และ MBC พบว่าสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยเอทานอลมีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยเฉพาะเมื่อละลายด้วย DMSO พบว่าค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 0.391 และ 1.563 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ มีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *S. agalectiae* เท่ากับ 0.049 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากันทั้ง 2 ค่า ขณะที่ Mungmai *et al*. (2014) ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar diffusion พบว่าสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่พบในแหล่งน้ำจืด ที่สกัดด้วยน้ำ และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (20 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213, methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) และ *Propionibacterium acne* ATCC 6919 ซึ่งอาจเป็นเพราะความเข้มข้นที่ใช้ต่ำเกินไป ขณะที่การทดลองนี้ใช้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาการใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่ายขนนก (*Caulerpa racemes* var. corynephora) ที่สกัดด้วยเอทานอล และละลายด้วย DMSO มีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *S. agalectiae* เท่ากับ 1.563 และ 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (อุทร และคณะ, 2562) และมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 12.50 และมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (สุนันทา และคณะ, 2560) แสดงว่าสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* มีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. agalectiae* และ *S. aureus* สูงกว่าสารสกัดหยาบจากสาหร่ายขนนก จากทั้ง 2 การทดลองดังกล่าว

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ ณัฏฐา (2555) ที่ใช้สารสกัดจากต้นสิรินธรวัลลี (*Bauhinia sirindhorniae*) หรือชื่อพื้นเมืองว่า สามสิบสองประดง ที่สกัดด้วยเอทานอล ที่ละลายด้วยน้ำ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. agalectiae* ได้ โดยมีค่า MIC ของสารสกัดจากส่วนดอกเท่ากับ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเท่ากับค่า MIC ของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยเอทานอล และละลายด้วยน้ำ ในการศึกษาครั้ง แต่สารสกัดจากส่วนของใบมีค่า MIC เท่ากับ 1.562 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าค่า MIC ของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยเอทานอล และละลายด้วยน้ำ ในการศึกษาครั้ง ขณะที่สารสกัดจากทั้งส่วนของใบและดอก

ไม่สามารรถฆ่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ แต่การทดลองครั้งนี้สามารถฆ่าเชื้อชนิดนี้ได้ โดยมีค่า MCB เท่ากับ 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเทียบกับสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยเอทานอล และละลาย DMSO พบว่าสารสกัดจากการทดลองครั้งมีประสิทธิภาพสูงกว่า โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.049 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ในการศึกษาครั้งนี้ ถึงแม้ว่าจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. agalectiae* และ *S. aureus* ได้ดี จากการศึกษากับเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 9 สายพันธุ์ ซึ่งถือว่ายังมีประสิทธิภาพในวงจำกัด ดังนั้นควรทำการศึกษาฤทธิ์ในการการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย หรือเชื้อรา สายพันธุ์อื่น ๆ ตลอดจนการใช้ตัวทำละลายชนิดอื่นในการสกัดสารจากสาหร่ายชนิดนี้เพิ่มเติม

การทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* ต่อสัตว์น้ำ

ค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* จากตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยเอทานอล มีความเป็นพิษต่อลูกกุ้งขาวแวนนาไมมากกว่าลูกปลากะพงขาวอย่างเห็นได้ชัด ขณะที่ Ghazala *et al*. (2004a) ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากสาหร่าย *Chara contraria* และ *Nitella flesilis* และ Ghazala *et al*. (2004b) ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากสาหร่าย *Tetraspora cylindrica* และ *T. gelatinosa* ที่สกัดด้วยเมทานอล โดยทดสอบค่า LD_{50} ของสารสกัดจากสาหร่ายกับไรน้ำเค็ม (brine shrimp) ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือคิดเป็น 1,000 ppm พบว่าไม่มีผลต่อไรน้ำเค็ม นอกจากนี้ Ghazala *et al*. (2010) ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากสาหร่าย *Aphanothece pallid*, *A. Stagnina*, *Nostoc eipsosporum*, *Arthrospira platensis*, *Lyngbya hieronymusii*, *L. mertensiana*, *Gloeotrichia natans*, *Enteromorpha intestinalis*, *Pithophora oedogonia* และ *Nitella flexilis* ที่สกัดด้วยเมทานอล โดยทดสอบค่า LD_{50} กับไรน้ำเค็ม พบว่า มีค่ามากกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือ 100 ppm และ Khalid *et al*. (2010) ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* กับไรน้ำเค็ม พบว่าค่า LD_{50} น้อยกว่า 0.165 มิลลิกรัมต่อมิลิลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารสกัดในการทดลองนี้ พบว่าในการทดลองนี้สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยเอทานอล มีความเป็นพิษสูงกว่า โดยค่า 48-hr LC_{50} ในลูกปลากะพง

ขาว ขนาด 1.5-2 เซนติเมตร เท่ากับ 0.064 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และลูกกุ้งขาวแวนนาไม PL15 เท่ากับ 0.035 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 64.04 และ 34.77 ppm ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดชนิดนี้ตามตารางที่ 2 มีความเป็นไปได้ว่าความเป็นพิษที่มีผลต่อการตายของลูกปลากะพงขาวและลูกกุ้งขาวแวนนาไมในการทดสอบครั้งนี้เกิดจากสารซาโปนิน ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์เลือดเย็น เช่น ปลา หอย กบ และสัตว์ที่หายใจด้วยเหงือก โดยทำให้เกิดอัมพาต (paralysis) ที่เหงือก (สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553) สังเกตได้จากพฤติกรรมของลูกกุ้งขาวแวนนาไมและลูกปลากะพงขาวกลุ่มควบคุมจะกระจายตัวอยู่ทั่วโหลทดลอง แต่ในหน่วยทดลองที่ใส่สารสกัดจากสาหร่ายความเข้มข้นต่าง ๆ ลูกปลากะพงขาวบางส่วนจะว่ายน้ำช้าลงอย่างเห็นได้ชัดและมักว่ายน้ำอยู่ใกล้บริเวณผิวหน้าน้ำหรือกลางน้ำ ไม่ลงมาอยู่ที่ก้นภาชนะ ส่วนตัวที่ตายจะจมอยู่ก้นภาชนะ ปากจะอ้า และกระดูกปิดเหงือก (operculum) เปิด ส่วนลูกกุ้งขาวแวนนาไม สังเกตอาการผิดปกติได้น้อยกว่า จะพบเฉพาะในหน่วยทดลองที่ใส่สารสกัดความเข้มข้นสูง โดยกุ้งจะว่ายน้ำอยู่ใกล้ผิวน้ำหรือกลางน้ำ ส่วนตัวที่ตายจะอยู่ที่ก้นภาชนะ เปลี่ยนสีเป็นขาวขุ่นและสภาพไม่สมบูรณ์ เนื่องจากถูกตัวที่มีชีวิตกัดกิน พฤติกรรมการตายที่พบทั้งหมดสอดคล้องกับสภาพการตายที่พบจากการศึกษาของ ลิลลา และคณะ (2554) ซึ่งศึกษาพิษเฉียบพลันของกากชาต่อปลานิล ปลากะพงขาว และกุ้งขาวแวนนาไม อย่างไรก็ตาม ค่า 48-hr LC_{50} ที่ได้จากการศึกษานี้มีความแตกต่างกับการศึกษาของนักวิจัยอื่นที่มักพบว่า ความเป็นพิษของสารซาโปนิน มีต่อปลามากกว่ากุ้ง (ลิลลา และคณะ, 2554; ประยุทธ, 2551; ประพันธ์, 2524) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า การศึกษาอื่นเป็นการศึกษาความเป็นพิษของสารซาโปนินที่มีในกากชาโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายแต่การศึกษานี้ใช้ DMSO (dimethyl sulfoxide) เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากสารสกัดที่ได้จากสาหร่ายอยู่ในสภาพครีมเหนียวข้นสีเขียว ไม่ละลายในน้ำจึงจำเป็นต้องใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายสำหรับ stock solution ซึ่งคุณสมบัติของ DMSO นอกจากจะเป็นตัวทำละลายที่ดีแล้ว ยังถูกใช้เป็นส่วนผสมในสารปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อราในพืช เนื่องจากช่วยให้ยาและสารเข้าสู่ระบบหมุนเวียนของพืชได้เร็วยิ่งขึ้นและลึกมากขึ้น โดยสารนี้สามารถคลายความตึงของกล้ามเนื้อและสามารถฉุดสารอื่น ๆ เข้าไปในร่างกายร่วมกับมันได้ จึงถูกใช้ในทางการแพทย์ในลักษณะของการทาที่ผิวหนัง (สุวิชญ์, มปป.) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายในการศึกษานี้มีผลให้สารซาโปนินในสารสกัดจากสาหร่ายซึมเข้าสู่ร่างกายของลูกกุ้งแวนนาไมที่เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังได้เร็วและมากกว่าการศึกษาอื่นที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน

จึงมากกว่าเมื่อเทียบกับลูกปลากะพงขาวที่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง นอกจากนี้อายุของสัตว์ทดลองก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ ยิ่งอายุของสัตว์ทดลองน้อย ความไวต่อความเป็นพิษของสารมักจะเพิ่มขึ้น ข้อสังเกตที่พบจากการศึกษาครั้งนี้ได้จากการนำกุ้งระยะ PL12 มาทำการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากสาหร่ายในช่วงกว้าง (Preliminary test) เปรียบเทียบกับลูกกุ้งระยะ PL15 พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 40 ppm ลูกกุ้งขาวแวนนาไม PL12 ตายทั้งหมด ในขณะที่ลูกกุ้งระยะ PL15 ต้องใช้สารความเข้มข้นมากกว่า 100 ppm จึงจะตายหมด

จากค่า 48-hr LC_{50} ของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* ที่สกัดด้วยเอธานอลและละลายด้วย DMSO ที่มีต่อลูกปลากะพงขาว ขนาด 1.5-2 เซนติเมตร และลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL15 เมื่อพิจารณาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดนี้ที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ (ตารางที่ 6) พบว่า สามารถใช้ในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ *Steptococcus agalectiae* ในลูกปลากะพงขาว ที่มีค่า MIC และ MCB เท่ากับ 0.049 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่านั้น ส่วนเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น มีค่า MIC และ MBC สูงกว่าค่า 48-hr LC_{50} ในการศึกษาครั้งนี้ ดังนั้นการจะนำสารสกัดนี้ไปใช้ในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในลูกกุ้งขาวแวนนาไมและลูกปลากะพงขาวโดยการละลายด้วยตัวทำลาย DMSO จึงไม่เหมาะสม เพราะอาจทำให้เกิดอันตรายจนเกิดการตายได้ โดยเฉพาะการแช่ด้วยสารละลายของสารสกัดจากสาหร่าย อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในตัวอย่างสัตว์น้ำที่มีอายุหรือขนาดใหญ่กว่านี้ซึ่งอาจมีความทนทานต่อความเป็นพิษของสารสสกัดได้ดีกว่า รวมถึงการใช้สารสกัดในรูปแบบอื่น เช่น การทาหรือป้ายที่ผิวหนังเนื่องจากคุณสมบัติของสารสกัดที่เป็นสารเหนียวข้น ไม่ละลายน้ำสามารถติดที่ผิวหนังของสัตว์น้ำได้อย่างดี

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* จากน้ำกร่อยที่สกัดด้วยน้ำ พบสารแอลคาลอยด์ ซาโปนิน และน้ำตาลดีออกซี สารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอล พบสารแอลคาลอยด์ เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน และน้ำตาลดีออกซี ส่วนสารแทนนินพบเฉพาะในสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล เท่านั้น

2. การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสาหร่าย *Rhizoclonium hieroglyphicum* จากน้ำกร่อยที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล พบสารประกอบฟีนอลิกรวม และฟลาโวนอยด์ ทั้งหมด โดยพบมากที่สุดในสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ รองลงมาคือ เอทานอล และเมทานอล ตามลำดับ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดที่สกัดจากน้ำ เอทานอล และเมทานอล เท่ากับ 1,950 1,420.83 และ 1,354.17 mg GAE/mg CE ตามลำดับ และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดที่สกัดจากน้ำ เอทานอล และเมทานอล เท่ากับ 808.33 756.67 และ 661.67 mg RE/mg CE ตามลำดับ

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* จากน้ำกร่อยที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด โดยสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาคือสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล และน้ำ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยเมทานอล เอทานอล และน้ำ ด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 12.87 31.45 และ 84.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยเมทานอล เอทานอล และน้ำ ด้วยวิธี ABTS เท่ากับ 3.01 7.11 และ 22.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* จากน้ำกร่อยที่สกัดด้วย เอทานอล และเมทานอล และละลายด้วยน้ำ และ DMSO สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อ *Steptococcus agalectiae* ได้ โดยสารสกัดที่ละลายด้วย DMSO มีประสิทธิภาพมากกว่าการละลายด้วยน้ำ และสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล และละลายด้วย DMSO สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ สรุปได้ว่าสารสกัดจากสาหร่ายที่สกัดด้วยเอทานอล และละลายด้วย DMSO มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุด

5. การทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดจากสาหร่าย *R. hieroglyphicum* จากน้ำกร่อยที่สกัดด้วย เอทานอล และละลายด้วย DMSO ต่อสัตว์น้ำ มีค่า LC_{50} ที่ 48 ชั่วโมง ต่อลูกปลากะพง

ขาว ขนาด 1.5-2 เซนติเมตร เท่ากับ 0.064 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และลูกกุ้งขาวแวนนาไม PL15 เท่ากับ 0.035 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารอ้างอิง

กัญญารัตน์ สุนทรา และ ฤทธิกร ศรแก้ว. 2557. การศึกษาประสิทธิภาพของสาหร่ายกลวง (*Solieria robusta* (Greville) Kylin) ในการยับยั้งและป้องกันเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ (Penaeus monodon Fabricius, 1798). **เอกสารวิชาการฉบับที่ 12/2557**. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง, กรมประมง. 16 น.

ขนิษฐา คงยอด. 2553. ผลการต้านแบคทีเรียและอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายเกลียวทอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ธีระวัฒน์ รัตนพจน์ เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน ชุติมา ศรีมะเริง รัตนาภรณ์ จันทร์ทิพย์ และ ดวงพร อมรเลิศพิศาล. 2555. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและผลการเสริมสาหร่ายเตาต่อการเจริญเติบโตของปลานิลในกระชัง. **วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง**. 6(2): 23-34

นภัสสร เพียสุระ ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์ อรพิน เกิดชูชื่น และ โศรดา วัลภา. 2553. คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของไบโอพอลิแซคคาไรด์จาก *Enteromorpha intestinalis*. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**. 41(3/1)(พิเศษ): 681–684.

ณัฏฐา นิธิกุลวรวงศ์. 2555. ประสิทธิภาพของสารสกัดสิรินธรวัลลีต่อความต้านทานเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). **วารสารวิจัย มข.** 17(5): 715-724.

ประพันธ์ ธารบุปผา. 2524. การศึกษาและทดลองค้นคว้าการใช้เมล็ดกากชากำจัดศัตรูกุ้ง. **เอกสารวิชาการ 2524**. กองประมงน้ำกร่อย, กรมประมง. กรุงเทพมหานคร. 16 น.

ประยุทธ รัตนสุวรรณ. 2551. การศึกษาผลของกากชาในการกำจัดศัตรูกุ้งขาวแวนนาไม. ปัญหาพิเศษ วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่. 27 น.

พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธุ์ พลชา จิตรมิตรสัมพันธ์ ชัชรี แก้วสุรลิขิต และ อรรถวุฒิ กันทะวงศ์. 2556. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายทะเล. น. 414-421 *ใน* การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ครั้งที่ 51. 5 - 7 กุมภาพันธ์ 2556. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

มนต์สรวง ยางทอง จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ และ นงพร โตวัฒนะ. 2558. ปริมาณฟีนอลและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลสาหร่ายทะเล. **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า.** 33(2): 73-81.

ยุวดี พีรพรพิศาล ฐิติกานต์ ปัญโญใหญ่ และ ดวงพร อมรเลิศพิศาล. 2555. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของสาหร่ายเตา. **วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น**. 40(1): 228–235.

ลิลลา หงส์คณารัตน์ ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ นิติ ชูเชิด. 2554. การศึกษาพิษเฉียบพลันของกากชาต่อปลานิล (*Oreochromis niloticus*), ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) และกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*). *ใน* การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49: สาขาประมง. วันที่ 1-4 กุมภาพันธ์ 2554 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. น. 49-56.

วสันต์ สุมินทิลี่ ปนิดา บรรจงสินศิริ จันทนา ไพรบูรณ์ และ วรรณวิมล คล้ายประดิษฐ์. 2556. กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lintillifera*) สาหร่ายทุ่น (*Sargassum oligocystum*) และสาหร่ายเขากวาง (*Gracilaria changii*). **วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม**. 9(1): 63-75.

วารุณี หะยีมะสา อนุชิต ชินาจริยวงศ์ และ สถาพร ดิเรกบุษราคม. 2547. ผลของสำรสกัดจากสาหร่ายบางชนิดต่อการยับยั้งไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลำดำ น. 283–288. *ใน* การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. 3-6 กุมภาพันธ์ 2547. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ วรางคณา สบายใจ และ สิริมาส นิยมไทย. 2556. การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของใบข่อยดำ. **วารสารวิทยาศาสตร์ วิทยาลัยขอนแก่น.** 40(3): 723-730.

สุนันทา ข้องสาย อุทร เจริญเดช และ ชาคริยา ฉลาด. 2560. ประสิทธิภาพของสารสกัดสาหร่าย *Caulerpa racemosa* ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด. **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย**. 9(1): 68-75.

สุวิชญ์ ปรัชญาปารมิตา. มปป. **การรักษาโรคด้วย DMSO (DMSO Therapy)**. ที่มา: http://www.healthcarethai.com/dmso-therapy (23 กรกฎาคม 2562)

สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2553. **ประมวลสารสนเทศพร้อมใช้ ซาโปนิน (Saponins)**. กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ที่มา: http://siweb.go.th/repack/fulltext/IR10.pdf (23 กรกฎาคม 2562)

อุทร เจริญเดช สุนันทา ข้องสาย ลักษมี วิทยา และ ชัชชษา เทพอุบล. 2562. ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายขนนก (*Caulerpa racemes* var. corynephora) ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ. **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย**. 11(1): 30-40.

Azhagu Raj, R., Mala. K. and Prakasam, A. 2015. P hytochemical analysis of marine macroalga *Caulerpa racemosa* (J. AGARDH) (Chlorophyta-Caulerpales) from Tirunelveli district, Tamilnadu, India. J. **Global Biosci**. 4(8): 3055-3067.

Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. and Truck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.** 45: 493-496.

Boonchum, W., Peerapornpisal, Y., Kanjanapothi, D., Pekkoh, J., Amornlerdpison, D., Pumas, C., Sangpaiboon, P. and Vacharapiyasophon, P. 2011a. Antimicrobial and anti-inflammatory properties of various seaweeds from the Gulf of Thailand. **Int. J. Agric. Biol.** 13(1): 100-104.

Boonchum, W., Peerapornpisal, Y., Vacharapiyasophon, P., Pekkoh, J., Pumas, C., Jamjai, U., Amornlerdpison, D., Noiraksar, T. and Kanjanapothi, D. 2011b. Antioxidant activity of some seaweed from the gulf of Thailand. **Int. J. Agric. Biol.** 13(1): 95–99.

Buer, C. S., Imin, N. and Djordjevic, M. A. 2010. Flavonoids: New roles for old molecules. **J. Integr. Plant Biol.** 52(1): 98-111.

Cavas, L., and Yurdakoc, K. 2005. An investigation on the antioxidant status of the invasive alga *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* (Sonder) Verlaque, Huisman, et Boudouresque (Caulerpales, Chlorophyta). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol**. 325(2): 189–200.

Chew, Y. L., Lima, Y. Y., Omara, M. and Khoo, K.S. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. **Food Sci. Technol**. 41(6): 1067–1072.

Cho, M. L., Lee, H. S., Kang, I. J., Wond, M. H. and You, S. G. 2011. Antoxoidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. **Food Chem**. 127(3): 999-1006.

Choudhury, S., Sree, A., Mukherjee, S. C., Pattnaik, P. and Bapuji, M. 2005. *In vitro* antibacterial activity of extracts of selected marine algae and mangroves against fish pathogens. **Asian Fish. Sci**. 18(3): 285-294.

Clinical and Laboratory Standards Institutes. 2006. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests. **Approved standard M2-A9**. CLSI. Wayne, Pa.

Cornish, M. L. and Garbary, D. J. 2010. Antioxidants from macroalgae: potential applications in human health and nutrition. **Algae**. 25(4): 155–171.

Eloff, J. N. 1998. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria**. Planta Med.** 64: 711-713.

Einarsson, S., Brynjolfsdottir, A and krutmann, J. 2010. **Pharmaceutical and cosmetic use of extracts from algae obtainable from saline hot water sources**. [Online] Available from http://www.patentsencyclopedia.com/app/20100028376#ixzz0flu0nbos (5 August 2019).

Farasat, M., Rhavari-Nejad, R., Nabavi, S. M. B. and Namjooyan, F. 2013. Antioxidant properties of two edible green seaweeds from Northern coasts of the Persian gulf. **Jundishapur J. Natural Pharmaceutical Products**. 8(1): 47-52.

Finney, D. 1971. **Probit analysis** 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Fujimoto, K. 1990. Antioxidant activity of algal extracts, pp 199–208. *In* Akatsuka, I. (ed) **Introductio to Applied Phycology**. SPB Academic Publishing. The Hague.

Ghazala, B., Naila, B., Shameel, M, Shahzad, S. and Leghari, S.H. 2004a. Phycochemistry and bioactivity of two stonewort algae (Charophyta) of Sindh. **Pak. J. Bot**. 36(4): 733-743.

Ghazala, B., Shameel, M., Iqbal Choudhary, M., Shahzad, S., and Leghari, S.M. 2004b. Phycochemistry and bioactivity of Tetraspora (Volvocophyta) from Sindh. **Pak. J. Bot**. 36(3): 531-547.

Ghazala, B. and Shameel, M. 2005. Phytochemistry and bioactivity of some freshwater green algae from Pakistan. **Pharm. Biol**. 43(4): 358–369.

Ghazala, B., Naila, B. and Shameel, M. 2010. Fatty acids and biological activities of crude extracts of freshwater algae from Sindh. **Pak. J. Bot**. 42(2): 1201-1212.

Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Guimarães, M. C. C., Endringer, D. C., Fronza, M. and Scherer, R. 2019. Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. **Molecules.** 24(13): 2471. doi: 10.3390/molecules24132471

Guiry, M. D. and Guiry, G. M. 2019. *Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing, 1845. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National Universtiy of Ireland, Galway [Online]. Available from http://www.algaebase.org (5 August 2019).

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. and Aruoma, O. I. 1987. The deoxyribose method: A simple "test tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Analyti. Biochem**. 165(1): 215–219.

Irfan, M., Ahmed, S. and Sharma, M. 2014. Antimicrobial activity of terpenoids from *Sphaeranthus indicus* L. **Asian J. Plant Sci. Res.** 4(1): 1-6.

Jeeva, S., Antonisamy, J. M., Domettila, C., Anantham, B. and Mahesh, M. 2012. Preliminary phytochemical studies on some selected seaweeds from Gulf of Mannar, India. **Asian Pacific J. Tropical Biomed**. 2(1): 30-33.

Kannan, M., Dheeba, B., Nageshwari, K. and Venkatesan, S. 2014. Antibacterial and antiobesity activities of marine algae *Garcilaria corticata* and *Spirulina platensis*. **Inter. J. Pharmacy and Pharmaceutical Sci**. 6(6): 420-424.

Kaplan, M. 2007. Antioxidants can change fish behaviour. **Nature**. Doi:10.1038/news.2007.228

Kausalya, M. and Narasimha Rao, G. M. 2015. Antimicrobial activity of marine algae. **J. Algal Biomass Utilization**. 6(1): 78-87.

Khalid, M. N., Shameel, M., Ahmad, V. U., Shahzad, S. and Leghari, S. M. 2010. Studies on the bioactivity and phycochemistry of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophycota) from Sindh. **Pak. J. Bot**. 42(4): 2635-2646.

Khalid, M. N., Shameel, M. and Ahamad, V. U. 2011. Bioactivity and Phycochemical studies on *Microspora floccosa* (Chlorophycota) from Sindh. **Pak. J. Bot**. 43(5): 2557-2560.

Kirkwood, Z. I., Millar, B. C., Downey, D. G. and Moore, J. E. 2018. Antimicrobial Effect of Dimethyl sulfoxide and *N, N*-Dimethylformamide on *Mycobacterium abscessus*: Implications for Antimicrobial Susceptibility Testing. **Inter. J. Mycobacteriology.** 7(2): 134-136.

Kociolek, J. P. 2012. Soft-Bodied Stream Algae of California. [Online] Available from http://dbmuseblade.colorado.edu/DiatomTwo/dscb_site/index.php (22 June 2016)

Kumar, C. S., Ganesan, P. and Bhaskar, N. 2008. *In vitro* antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. **Food Chem**. 107(2): 707–713.

Kumar, M., Gupta, V., Kumari, P., Reddy, C. R. K. and Jha, B. 2011. Assessment of nutrient composition and antioxidant potential of Caulerpaceae seaweeds. **J. Food Compos. Anal**. 24(2): 270 – 278.

Lee, J., Koo, N. and Min D. B. 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 3(1): 21–33.

Li, K., Li, X. M., Ji, N. Y. and Wang, B. G. 2007. Natural bromophenols from the marine red alga *Polysiphonia urceolata* (Rhodomelaceae) : structural elucidation and

DPPH radical scavenging activity. **Bioorganic and Medicinal Chem**. 15(21): 6627–6631.

Lim, S. N., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C. and Ang, P. O. 2002. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. **J. Agric. Food Chem**. 50(13): 3862–3866.

Lipkovska, N. A., Barvinchenko, V. N. and Fedyanina, T. V. 2014. Dependence of the Solubility of natural flavonoids in water on the concentration of miramistin, polyvinylpyrrolidone and human serum albumin. **Russian J. Physical Chem. A**. 88(5): 881–885.

Matanjun, P., Mohamed, S., Mohamed Mustaphaj, N., Muhammad, K. and Ming, C. H. 2008. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo**. J. Appl. Phycol**. 20(4): 367–373.

Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Kishimoto, E., Masaki, K., Masuda, Y.,Takeuchi, T., Chihara, M., Yamamoto, Y., Niki, E. and Karube, I. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **J. Appl. Phycol**. 9: 29–35.

Maytharit, B. 2008. Anti–gastric Ulcer Activity of a Marine alga : *Ulva reticulata* Forsskal. Master of Science Thesis. Graduate School, Chiang Mai University. Chiang Mai.

Meda, A., Lamien, E. E., Romito, M., Millogo, J. and Nacoulma, O. G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkian Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chem.** 91: 571-577.

Mohanta, T. K., Patra, J. K., Rath, S. K, Pal, D. K, and Thatoi, H. N. 2007. Evaluation of antimicrobial activity and phytochemical screening of oils and nuts of *Semicarpus anacardium.* **Sci. Res. Essay**. 2(11): 486-490.

Mungmai, L., Jiranusornkul, S. Peerapornpisal, Y. Sirithunyalug, B. and Leelapornpisid, P. 2014. Extraction, craracterization and biological activities of extracts from

freshwater macroalga (*Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing) cultivated in northern Thailand. **Chiang Mai J. Sci**. 41(1): 14-26.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Growth Aerobically. Approved Stand-5th Edition. NCCLS. 20 (2): 26 pp.

Nienhuis, P. H. 1974. Variability in the life cycle of *Rhizodonium riparium* (Roth.) Harv. (Chlorophyceae, Cladophorales) under Dutch estuarine conditions. **HydrobioI. Bull**. 8:172-178.

Okai, Y. and Higashi-Okai, K. 2006. Radical-scavenging of hot water extract of Japanese rice bran association with phenolic acids. **J. UOEH**. 28(1): 1-12.

Parodi, E. R. and Cáceres, E. J. 1993. Life history of freshwater populations of *Rhizoclonium hieraglyphicum* (Cladophorales**,** Chlorophyta). **Eur. J. Phycol**. 28(1): 69-74.

Ranković, B., Kosanić, M. and Stanojković, T. 2015. Marine macroalgae with antioxidant, antimicrobial and cytotoxic potential. pp 142-151. *In* Bulucea, A. (ed) **Advances in Energy and Environmental Science and Engineering**. 232 p.

Rahim, A. A., Rocca, E., Steinmetz, J., Kassim, M. J., Ibrahim, M. S. and Osman, H. 2008. Antioxidant activities of mangrove Rhizophora apiculata bark extracts. **Food Chem**. 107(1): 200-207.

Rajasulochana, P., Dhamotharan, R., Krishnamoorthy, P. and Murugesan, S. 2009. Antibacterial activity of the extracts of marine red and brown algae. **J. American Sci**. 5(3): 20-25.

Rievere, C., Van Nguyen, J. H., Pieters, L., Dejaegher. B., Heyden, Y. V. and Minh, C. V. 2009. Polyphenols isolated from antiradical extracts of *Mallotus metcalfianus*. **Phytochem**. 70(1): 86-94.

Santoyo, S., Herrero, M., Senorans, F. J., Cifuentes, A., Ibanez, E. and Jaime, L. 2006. Functional characterization of pressurizes liquid extracts of *Spirulina platensis*. **Eur. Food Res. Technol**. 224(1): 75–81.

Shanker, S. R., Rangarajan, R., Sarada, D. V. L. and Kumar, C. S. 2010. Evaluation of Antibacterial activity and phytochemical sceening of *Wrightia tinctoria* L. **Pharmacognosy J.** 2(14): 19-22.

Slinkard, K. and Singleton, V. L. 1997. Total phenolic analyses: automation and comparison with manual method. **American J. Enology and Viticulture**. 28: 49-55.

Sritunyalucksana, K., Gangnonnigw, W., Archakunakorn, S., Fegan, D. and Flegel, T. W. 2005. Bacterial clearance rate and a new differential hemocyte staining method to assess immunostimulant activity in shrimp. **Dis. Aquat. Org.** 63: 89-94.

Sudsamai, J. 2008. Ant–gastric Ulcer, Hepatoprotective and Antioxidant Activities of Aqueous Extract of *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea*. Master of Science Thesis. Graduate School, Chiang Mai University. Chiang Mai.

U.S.EPA (United State Environmental Protection Agency). 2012. Marine Acute Toxicity Test Procedure and Protocol. [Online] Available from https://www3.epa.gov/region1/npdes/permits/generic/marinewateracutetoxtest-rev.pdf (1 July 2016)

Vijayavel, K., Martinez, J. A. 2010. *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of two Hawaiian marine limu: *Ulva fasciata* (Chlorophyta) and *Garcilaria salicornia* (Rhodophyta). **J. Med. Food**. 13(6):1494-1499.

Wadhwani, T., Desai, K., Patel, D., Lawani, D, Bahaley, P., Joshi, P. and Kothari, V. 2008. Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials. **Internet J. Microbiol**. 7(1): 1-6.

Yadav, R. N. S., Agarwala, M. 2011. Phytochemical analysis of some medicinal plants. **J. Phytology**. 3(12): 10-14.

Zhang, W. W, Duan, X. J., Huang, H. L., Zhang, Y. and Wang, B. G. 2007. Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidantive capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphyocladia latiuscula* (Rhodomelaceae). **J. Appl. Phycol**. 19(2): 97–108.

Zubia, M., Robledo, D. and Freile-Pelegrin, Y. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. **J. Appl. Phycol**. 19(5): 449–458.