

ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคและฤทธิ์การต้าน
อนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาบสาหร่าย
STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND
ANTIOXIDANT FROM MICROALGAE CRUDE EXTRACTS

วรยารัตน์ มหิตเชวงกุล
ศุภกานต์ เทียงตรง

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคและฤทธิ์การต้าน
อนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาบสาหร่าย

STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND
ANTIOXIDANT FROM MICROALGAE CRUDE EXTRACTS

วรยารัตน์ มหัตต์เซวงกุล

ศุภกานต์ เทียงตรง

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2560

STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND
ANTIOXIDANT FROM MICROALGAE CRUDE EXTRACTS

WORAYARATH MAHATCHAWENGKUL

SUPAKAN THIENGTRONG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY PROGRAM)

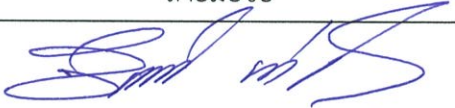
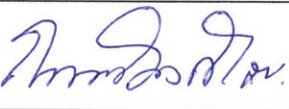

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงการพิเศษ	ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาบสาหร่าย Study of Antimicrobial Activity and Antioxidant from Microalgae Crude Extracts
ชื่อนักศึกษา	นางสาววรยารัตน์ มหัตต์เขวงกุล รหัสนักศึกษา 57050889 นางสาวศุภกานต์ เทียงตรง รหัสนักศึกษา 57050902
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.จิตติ ท่าไฉ่ ประธานกรรมการ	
ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการ	
ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาบสาหร่าย
ชื่อนักศึกษา	นางสาววรยารัตน์ มหัตต์เขวงกุล รหัสนักศึกษา 57050889 นางสาวศุภกานต์ เทียงตรง รหัสนักศึกษา 57050902
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิภาวี เดชตติศักดิ์

บทคัดย่อ

ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคจากสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59 ที่สกัดด้วยเอทานอล โดยใช้วิธี agar well diffusion ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ คือ *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* พบว่า สาหร่าย *Chlorella* sp. KU และ *Chlorella* sp. V55 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. mutans*, *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ โดยแสดงบริเวณยับยั้งเท่ากับ 12.42, 9.88 และ 10.32 มิลลิเมตร ตามลำดับ และ 10.41, 9.50 และ 7.93 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU และ *Chlorella* sp. V55 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ได้ โดย *Chlorella* sp. KU มีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 7.01, 7.36 และ 7.07 มิลลิเมตร ตามลำดับ และ *Chlorella* sp. V55 มีบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 7.21, 7.44 และ 7.05 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) พบว่า สารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. KU และ *Chlorella* sp. V55 มีค่า MIC ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* โดย *Chlorella* sp. KU มีค่า MIC เท่ากับ 25, 50, 50, 100, 100 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ *Chlorella* sp. V55 มีค่า MIC เท่ากับ 50, 6.25, 25, 100, 100 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตามลำดับ จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. N11/59 มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เท่ากับ 63.73 และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.8293 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. B2-59 มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 50.52 และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.7531 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ : การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อก่อโรค, คลอเรลลา, ทดสอบด้วยวิธีการแพร่, ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค, สารต้านอนุมูลอิสระ

Title	Study of Antimicrobial Activity and Antioxidant from Microalgae Crude Extracts
Students	Miss. Worayarath Mahatchawengkul Student ID 57050889 Miss. Supakan Thientrong Student ID 57050902
Degree	Bachelor of Science in Industrial Microbiology Program
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Dr.Wipawee Dejtsakdi

Abstract

In this study, we tested antimicrobial and antioxidant activities from *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 and *Chlorella* sp. N11/59 crude extracts. All crude extracts were extracted with ethanol and tested against to six pathogens; *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. For the agar well diffusion, we found 50 mg/mL of *Chlorella* sp. KU and *Chlorella* sp. V55 crude extracts could inhibit *S. mutans*, *B. subtilis* and *S. aureus* as shown for the clear zones at 12.42, 9.88 and 10.32 mm of *Chlorella* sp. KU and 10.41, 9.50 and 7.93 mm of *Chlorella* sp. V55, respectively. We increased both crude extracts concentration up to 100 mg/mL and found both crude extracts were able to inhibit *E. coli*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* as shown for the clear zones at 7.01, 7.36 and 7.07 mm of *Chlorella* sp. KU and 7.21, 7.44 and 7.05 mm of *Chlorella* sp. V55, respectively. After that, we performed Minimum Inhibitory Concentration (MIC) assay of *Chlorella* sp. KU and *Chlorella* sp. V55 found that MIC values of *Chlorella* sp. KU and *Chlorella* sp. V55 crude extracts could inhibit *S. mutans*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* at 25, 50, 50, 100, 100 and 100 mg/mL,

respectively and 50, 6.25, 25, 100, 100 and 100 mg/mL, respectively. We then measured the antioxidant activity of the four crude extracts by using DPPH radical scavenging assay and found that the *Chlorella* sp. N11/59 crude extract showed the highest antioxidant efficiency with 63.73 % and IC_{50} values 2.8293 mg/mL but *Chlorella* sp. B2-59 crude extract showed the lowest antioxidant efficiency with 50.52 % and IC_{50} values 8.7531 mg/mL.

Keyword : Agar well diffusion, Antimicrobial activity, Antioxidant, *Chlorella* sp., Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเรื่อง ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสาหร่าย สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์ของผู้มีพระคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาเสนอแนวทางการแก้ไขข้อบกพร่องระหว่างการดำเนินงาน ด้วยความเอาใจใส่ทุกขั้นตอนอย่างดียิ่ง และให้ความรู้ในการเขียนโครงการพิเศษ รวมทั้งตรวจแก้ไขให้โครงการพิเศษนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.จิตติ ท่าวัว ประธานกรรมการ และ ดร.กานต์ วงศาริยะ คณะกรรมการโครงการพิเศษ ที่กรุณามอบเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในช่องปาก *Streptococcus mutans* ATCC 25175 และเชื้อก่อโรคอื่น ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ให้ในการศึกษาครั้งนี้ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ความรู้ เพื่อให้โครงการพิเศษนี้ออกมาสมบูรณ์ที่สุด

ขอขอบพระคุณ ผศ.วีณา ชูโชติ อาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณามอบสาหร่าย *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59 ให้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.สุทธิจิต ศรีวิชรกุล อาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณามอบสารทดสอบการต้านอนุมูลอิสระและให้คำแนะนำในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ ประจำตีวิทยาศาสตร์อาคารเก่า ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการเก็บยืมอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ รวมทั้งคอยให้คำแนะนำในการใช้อุปกรณ์วิทยาศาสตร์

คณะผู้จัดทำรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของผู้มีพระคุณทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลืออย่างยิ่ง ทำให้โครงการพิเศษสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี หากมีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ โอกาสนี้

วรยารัตน์ มหัตตวงกุล

ศุภกานต์ เทียงตรง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการพิเศษ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ.....	3
1.3 ขอบเขตโครงการพิเศษ.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 สาหร่ายสกุล <i>Chlorella</i> sp.....	5
2.1.1 อนุกรมวิธาน.....	5
2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	5
2.1.3 แหล่งที่อยู่.....	6
2.1.4 การสืบพันธุ์.....	6
2.1.5 การเพาะเลี้ยง.....	6
2.1.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสกุล <i>Chlorella</i> sp.....	7
2.1.7 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์.....	8
2.2 โรคฟันผุ.....	9
2.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคฟันผุ.....	9
2.2.2 ระยะของการเกิดโรคฟันผุ.....	10
2.2.3 การป้องกันฟันผุ.....	12
2.3 เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในช่องปาก.....	12
2.3.1 <i>Streptococcus mutans</i>	12
2.3.2 การก่อโรคของเชื้อ <i>S. mutans</i>	13

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4 เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์.....	13
2.4.1 <i>Escherichia coli</i>	13
2.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.4.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.4.4 <i>Bacillus subtilis</i>	18
2.4.5 <i>Candida albicans</i>	19
2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดสำหรับ.....	20
2.5.1 การทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion	20
2.5.2 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสำหรับที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค (Minimum Inhibitory Concentration).....	20
2.6 อนุมูลอิสระ (Free radical).....	21
2.6.1 ปัจจัยในการเกิดอนุมูลอิสระ	21
2.7 สารต้านอนุมูลอิสระ	22
2.7.1 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ.....	22
2.7.2 สารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ.....	23
2.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการ DPPH (diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay)	25
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	26
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	29
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	29
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ	31
3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	32
3.4 วิธีการทดลอง	32
3.4.1 สภาวะการเพาะเลี้ยงสำหรับ.....	32
3.4.2 การเตรียมสารสกัดหยาบสำหรับ	32
3.4.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี agar well diffusion	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.4 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสาหร่ายที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค (Minimal inhibitory concentration)	34
3.4.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย ด้วยวิธี DPPH radical scavenging.....	34
3.4.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ	35
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	36
4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i> 4 สายพันธุ์ ด้วยวิธี agar well diffusion	36
4.2 การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i> KU และ <i>Chlorellsp.</i> V55 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค	45
4.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity	47
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	51
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	51
5.2 ข้อเสนอแนะ	52
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก.....	60
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	61
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการทดลอง	64
ภาคผนวก ค อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายสกุล <i>Chlorella sp.</i>	68
ภาคผนวก ง ผลการทดลอง.....	72
ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	97

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU และ <i>Chlorella</i> sp. V55 ด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาณสารที่ต่างกัน	37
4.2 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	38
4.3 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55 ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	40
4.4 เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเชื้อระหว่างสารสกัดสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU และ <i>Chlorella</i> sp. V55 ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	42
4.5 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU และ <i>Chlorella</i> sp. V55.....	45
4.6 แสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐาน และสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์.....	48
4.7 แสดงค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสาหร่ายและสารมาตรฐานวิตามิน ที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลงร้อยละ 50 (IC ₅₀).....	49
ก.1 สูตรอาหาร TAP medium.....	61
ก.2 สูตรอาหาร Brain Heart Infusion (BHI)	62
ก.3 สูตรอาหาร Mueller Hinton.....	62
ก.4 ส่วนประกอบ Normal saline 0.85%	63
ก.5 ส่วนประกอบ McFarland standard No. 0.5	63
ก.6 ส่วนประกอบสารละลาย DPPH.....	63
ค.1 แสดงจำนวนเซลล์เฉลี่ยของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU	68
ค.2 แสดงจำนวนเซลล์เฉลี่ยของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55	69
ค.3 แสดงจำนวนเซลล์เฉลี่ยของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. B2-59	70
ค.4 แสดงจำนวนเซลล์เฉลี่ยของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. N11/59	71
ง.1 บริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU ที่ปริมาณสารต่างกัน	72
ง.2 บริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55 ที่ปริมาณสารต่างกัน	73
ง.3 บริเวณการยับยั้งของสารสกัดสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. B2-59 ที่ปริมาณสารต่างกัน	74

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ง.4 บริเวณการยับยั้งของสารสกัดสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. N11/59 ที่ปริมาณสารต่างกัน	75
ง.5 บริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU ที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	80
ง.6 บริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55 ที่ความเข้มข้นต่างกัน	81
ง.7 บริเวณการยับยั้งของสารสกัดสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. B2-59 ที่ความเข้มข้นต่างกัน	82
ง.8 บริเวณการยับยั้งของสารสกัดสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. N11/59 ที่ความเข้มข้นต่างกัน	83
ง.9 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU	88
ง.10 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55.....	88
ง.11 ค่าการดูดกลืนแสงของการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร.....	92
ง.12 ค่าการดูดกลืนแสงของการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซี ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร.....	93
ง.13 ค่าการดูดกลืนแสงของการต้านอนุมูลอิสระของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ที่ความยาว คลื่น 517 นาโนเมตร.....	94
ง.14 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสาหร่ายที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH	96
จ.1 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบ สาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. mutans</i> ที่ปริมาณสารต่างกัน	97
จ.2 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ สาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. mutans</i> ที่ปริมาณสารต่างกัน.....	97
จ.3 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด	98
จ.4 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ <i>B. subtilis</i> ที่ปริมาณสารต่างกัน.....	98
จ.5 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบ สาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่ปริมาณสารต่างกัน.....	99
จ.6 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่ปริมาณสารต่างกัน	99
จ.7 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบ สาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. mutans</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน	100

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
จ.8 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. mutans</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน	100
จ.9 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด	101
จ.10 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ <i>B. subtilis</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน	101
จ.11 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบ สำหรับ <i>Chlorella</i> sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	102
จ.12 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	102
จ.13 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบ สำหรับ <i>Chlorella</i> sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน	103
จ.14 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	103
จ.15 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบ สำหรับ <i>Chlorella</i> sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	104
จ.16 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	104
จ.17 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบ สำหรับ <i>Chlorella</i> sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน	105
จ.18 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน	105
จ.19 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบ สำหรับ <i>Chlorella</i> sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. mutans</i> ที่ปริมาณสารต่างกัน.....	106
จ.20 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. mutans</i> ที่ปริมาณสารต่างกัน.....	106
จ.21 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบ สำหรับ <i>Chlorella</i> sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ <i>B. subtilis</i> ที่ปริมาณสารต่างกัน.....	107

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
จ.22 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ <i>B. subtilis</i> ที่ปริมาณสารต่างกัน	107
จ.23 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่ปริมาณสารต่างกัน	108
จ.24 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่ปริมาณสารต่างกัน	108
จ.25 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. mutans</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน	109
จ.26 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. mutans</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน	109
จ.27 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ <i>B. subtilis</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน	110
จ.28 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ <i>B. subtilis</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน	110
จ.29 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน	111
จ.30 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน	111
จ.31 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน	112
จ.32 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน	112
จ.33 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน	113
จ.34 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน	113

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
จ.35 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบ สำหรับ <i>Chlorella</i> sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	114
จ.36 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i> ที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	114
จ.37 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. mutans</i> ที่ความเข้มข้น 50 mg/mL.....	115
จ.38 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้ง <i>S. mutans</i> ที่ความเข้มข้น 50 mg/mL.....	115
จ.39 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อ <i>B. subtilis</i> ที่ความเข้มข้น 50 mg/mL.....	116
จ.40 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้ง <i>B. subtilis</i> ที่ความเข้มข้น 50 mg/mL.....	116
จ.41 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่ความเข้มข้น 50 mg/mL.....	117
จ.42 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> ที่ความเข้มข้น 50 mg/mL.....	117
จ.43 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. mutans</i> ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL.....	118
จ.44 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้ง <i>S. mutans</i> ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL.....	118
จ.45 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อ <i>B. subtilis</i> ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL.....	119
จ.46 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้ง <i>B. subtilis</i> ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL.....	119
จ.47 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสำหรับ <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL.....	120

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
จ.48 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL	120
จ.49 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบ สาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL	121
จ.50 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้ง <i>E. coli</i> ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL	121
จ.51 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL	122
จ.52 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้ง <i>P. aeruginosa</i> ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL.....	122
จ.53 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i> ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL	123
จ.54 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้ง <i>C. albicans</i> ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL.....	123
จ.55 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU.....	124
จ.56 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของค่าการต้านอนุมูลอิสระของ สารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU.....	124
จ.57 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55.....	125
จ.58 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของค่าการต้านอนุมูลอิสระของ สารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55.....	125
จ.59 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. B2-59.....	126
จ.60 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของค่าการต้านอนุมูลอิสระของ สารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. B2-59.....	126

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
จ.61 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. N11/59.....	127
จ.62 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. N11/59.....	127
จ.63 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินอี	128
จ.64 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินอี	128
จ.65 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซี	129
จ.66 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซี.....	129

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะเซลล์ของสาหร่ายสกุล <i>Chlorella</i>	5
2.2 ภาพวาดแสดงการเกิดเซลล์ใหม่ของ <i>Chlorella vulgaris</i> ระยะต่างๆ	6
2.3 รอยโรคจุดขาว.....	10
2.4 ภาพรังสีแสดงรอยฟุ่ที่มองไม่เห็นจากผิวเคลือบพื้น.....	11
2.5 ภาพแสดงรอยผุจากระยะต่างๆ.....	11
2.6 ภาพแสดงลักษณะการย้อมแกรมของเชื้อ <i>Streptococcus mutans</i>	12
2.7 ภาพแสดงลักษณะเชื้อแบคทีเรีย <i>Escheriachia coli</i>	14
2.8 ภาพแสดงลักษณะเซลล์ของเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.9 ภาพแสดงลักษณะของเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.10 ภาพแสดงลักษณะของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i>	18
2.11 ภาพแสดงลักษณะของเชื้อ <i>Candida albicans</i>	19
2.12 แสดงโครงสร้างสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ.....	23
2.13 การเปลี่ยนโครงสร้างของวิตามินซีโดยเอนไซม์ในร่างกาย	24
2.14 โครงสร้างวิตามินอี.....	25
3.1 ภาพวาดจำลองการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสาหร่าย	33
4.1 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU	39
4.2 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55	41
4.3 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์.....	49
4.4 แสดงค่า IC ₅₀ ของสารสกัดหยาบสาหร่าย 4 สายพันธุ์ สารมาตรฐานวิตามินอี และสาร มาตรฐานวิตามินซี	50
ข.1 แสดงสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อสาหร่ายสกุล <i>Chlorella</i> sp.....	64
ข.2 แสดงลักษณะของฮีมาไซโตมิเตอร์	64
ข.3 แสดงลักษณะตารางบนฮีมาไซโตมิเตอร์และช่องสำหรับการนับเซลล์.....	65
ข.4 ตัวอย่างวิธีการนับเซลล์สาหร่าย.....	65
ข.5 แสดงลักษณะวิธีการ Cross Streak.....	66
ข.6 แสดงการย้อมสีแกรมและลักษณะการติดสีของแบคทีเรีย	67
ค.1 กราฟมาตรฐานแสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU	68

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ค.2 กราฟมาตรฐานแสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55	69
ค.3 กราฟมาตรฐานแสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. B2-59	70
ค.4 กราฟมาตรฐานแสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. N11/59	71
ง.1 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU ที่ปริมาณสารต่างกัน.....	76
ง.2 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55 ที่ปริมาณสารต่างกัน.....	77
ง.3 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. B2-59 ที่ปริมาณสารต่างกัน.....	78
ง.4 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. N11/59 ที่ปริมาณสารต่างกัน.....	79
ง.5 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU ที่ความเข้มข้นต่างกัน	84
ง.6 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55 ที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	85
ง.7 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. B2-59 ที่ความเข้มข้นต่างกัน	86
ง.8 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. N11/59 ที่ความเข้มข้นต่างกัน	87
ง.9 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. KU.....	89
ง.10 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. V55	90
ง.11 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของตัวทำละลายเอทานอล	91
ง.12 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี	92
ง.13 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซี	93
ง.14 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. 4 สายพันธุ์	95
ง.15 กราฟแสดงค่า IC ₅₀ ของสารมาตรฐานวิตามินอี วิตามินซี และสารสกัดหยาบสาหร่าย.....	96

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการพิเศษ

ในปัจจุบัน โรคฟันผุเป็นโรคเรื้อรังที่ก่อโรคในเด็กเป็นส่วนใหญ่ มีสาเหตุหลักมาจากของเหลวและเชื้อแบคทีเรียสัมผัสกับฟันเป็นระยะเวลาเนานานการ ทำให้เกิดคราบจุลินทรีย์ในช่องปาก มีไบโอฟิล์ม (Biofilms) เคลือบที่ผิวฟัน แบคทีเรียจะย่อยสลายอาหารเพื่อผลิตกรดมาทำลายผิวฟัน เชื้อก่อโรคในช่องปากที่พบมากที่สุด คือ *Streptococcus mutans* (Gross et al., 2012) มีความสามารถในการทนกรดได้ โดยจะแสดงถึงความรุนแรงเพิ่มขึ้นในสภาวะที่เป็นกรด ในการรักษาโรคฟันผุจำเป็นที่จะต้องรักษาทันที เพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดโรค (สุภร, 2559)

นอกจากนี้ยังมีเชื้อที่สามารถก่อโรคในมนุษย์ได้อีก เช่น เชื้อ *Staphylococcus aureus* ก่อโรคทางผิวหนัง ได้แก่ หนอง, ฝี, โรคผุพอง และโรคผิวหนังหลุดลอก (นิติพงษ์ และเอกชัย, 2552) เชื้อ *Bacillus subtilis* มีส่วนทำให้อาหารเน่าเสีย เมื่อบริโภคอาหารที่มีเชื้อเจือปน อาจทำให้มีอาการอาเจียน และมีอาการท้องร่วง (Apetroaie et al., 2008) เชื้อ *Escherichia coli* เป็นสาเหตุของอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง เนื่องจากได้รับสารพิษ ที่เรียกว่า “Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)” (Tozzi et al., 2003) เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเชื้อฉวยโอกาสในโรงพยาบาล ทำให้มีการติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ (Zeng, 2004) และ เชื้อ *Candida albicans* จะก่อโรคที่บริเวณเยื่อเมือก และระบบของกล้ามเนื้อส่วนต่างๆ ไปสู่กระแสเลือดและไปยังอวัยวะที่สำคัญ (Nadeem et al., 2013)

ในปัจจุบันได้มีการคิดค้นยาปฏิชีวนะจากธรรมชาติเพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อกันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ เชื้อ *Streptomyces* สามารถนำมาผลิตเป็นยาปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา ไวรัส ยับยั้งการเจริญของเนื้องอก และป้องกันความดันโลหิตสูง (Procopio et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีรายงานที่ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อก่อโรค เช่น ปริมาณ และคณะ (2555) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรใบพญาวานร ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปาก *S. mutans* และ *Lactobacillus* spp. งานวิจัยของ Jarriyawattanachaikula et al. (2016) ศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพร 26 ชนิด เช่น ใบขี้เหล็ก ใบมะกรูด สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *S. aureus* และ *Campylobacter jejuni* และงานวิจัยของ Sabirin et al. (2015) ใช้สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Caulerpa lentillifera* และ *Kappaphycus alvarezii* ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปาก *S. mutans* ดังนั้นสาหร่ายจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ไวรัสและเชื้อราได้ มีประโยชน์และประสิทธิภาพอย่างมากเมื่อเทียบกับการรักษาแบบดั้งเดิม (Sanmukh, 2014)

Chlorella sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวขนาดเล็ก จัดอยู่ในดิวิชัน Chlorophyta คลาส Chlorophyceae ส่วนใหญ่พบในน้ำจืด (Chowdhury *et al.*, 2015) ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ กรดอะมิโนที่จำเป็นทั้งหมด 8 ชนิด เช่น วิตามินซี เบต้าแคโรทีน (provitamin A), B1, B2, B6, B12, วิตามินอี และวิตามินเค รวมถึงแร่ธาตุต่างๆ เช่น ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แมกนีเซียม กำมะถัน เหล็ก และแคลเซียม โดยส่วนใหญ่ใช้กันแพร่หลายในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ ซึ่งมีประโยชน์ ได้แก่ เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน เร่งการรักษาแผลบาดเจ็บและแผลพุพอง ช่วยป้องกันสารพิษที่เป็นพิษต่อการย่อยอาหารและการทำงานของลำไส้ กระตุ้นการเจริญเติบโตและซ่อมแซมเนื้อเยื่อเพื่อชะลอการแก่และปกป้องรังสียูวี เป็นต้น (Lee and Rosenbaum, 2003) จากการรายงานพบว่า กิจกรรมของสารสกัดสาหร่ายสามารถเป็นสารต้านจุลชีพได้ โดยทำหน้าที่เป็นยาปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อก่อโรคในคน (Alwathnani and Perveen, 2017) นอกจากนี้สาหร่ายคลอเรลล่ายังมีสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น เบต้าแคโรทีน แอสตาแซนทีน และคลอโรฟิลล์ ซึ่งจะทำหน้าที่เพิ่มประสิทธิภาพในการต่อต้านริ้วรอย ทำให้ผิวพรรณเต่งตึงและกระชับมากขึ้น (Lai and Sun, 2017)

จากความสำคัญที่กล่าวมาข้างต้นมีงานวิจัยหลายฉบับที่ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายเกี่ยวกับการยับยั้งเชื้อก่อโรค เช่น Lucas *et al.* (2016) รายงานว่า *Chlorella* sp. สามารถรักษาโรคที่เกี่ยวกับการอักเสบได้ Sujatha *et al.* (2012) ได้ศึกษาสาหร่ายสีเขียวในการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ที่เป็นสาเหตุก่อโรคฟันผุ โดยใช้สาหร่าย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chaetomorpha antennina*, *Cladophora fascicularis*, *Spongomorpha indica* และ *Ulva fasciata* นอกจากนี้ Entesar (2016) รายงานว่า *Chlorella vulgaris* มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

ดังนั้นโครงการพิเศษนี้จึงมีความสนใจในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย *Chlorella* sp. ในการยับยั้งเชื้อที่ก่อโรคในช่องปาก คือ *Streptococcus mutans* ที่เป็นสาเหตุก่อโรคฟันผุ และเชื้อก่อโรคอื่นๆ ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* และวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ โดยคาดหวังว่าสารสกัดสาหร่ายจะสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หากงานวิจัยประสบความสำเร็จสามารถนำมาศึกษาต่อยอดประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับช่องปาก และผลิตเป็นอาหารเสริมได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59 ที่สกัดด้วยเอทานอล ในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในช่องปาก *Streptococcus mutans* ATCC 25175 และเชื้อก่อโรคอื่น ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ด้วยวิธี agar well diffusion

2. เพื่อศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59 ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ATCC 25175 และเชื้อก่อโรคอื่น ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC 10231 ด้วยวิธี Minimum Inhibitory Concentration : MIC

3. เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59 ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity

1.3 ขอบเขตโครงการพิเศษ

ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59 โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำมาสกัดด้วยเอทานอล และนำสารสกัดหยาบมาทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปาก *S. mutans* และเชื้อก่อโรคอื่น ได้แก่ *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ด้วยวิธี agar well diffusion จากนั้นนำมาหาค่า MIC ด้วยวิธี macro broth dilution และนำสารสกัดหยาบสาหร่ายมาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH (diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59 ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในช่องปาก *S. mutans* และเชื้อก่อโรคอื่น ได้แก่ *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ด้วยวิธี agar well diffusion

2. ทราบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59 ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก *S. mutans* และเชื้อก่อโรคอื่น ได้แก่ *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ด้วยวิธี macro broth dilution

3. ทราบถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่ายสกุล *Chlorella* sp.

2.1.1 อนุกรมวิธาน (ยิวดี, 2546)

Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

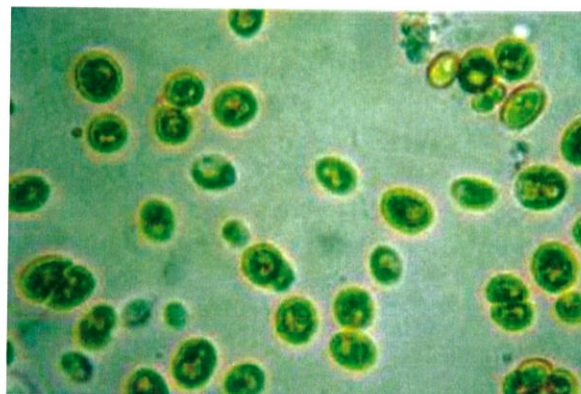
Order Chlorellales

Family Chlorellaceae

Genus *Chlorella*

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สาหร่าย *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีขนาดเล็กประมาณ 2-12 ไมโครเมตร ไม่มีแฟลกเจลลา รูปร่างของเซลล์มีหลายรูปแบบ คือ รูปทรงกลม รูปรี และรูปไข่ มีคลอโรพลาสต์ลักษณะเป็นรูปถ้วยหรือเป็นแถบด้านข้างเซลล์ ภายในมีรงควัตถุหลายชนิดเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสง เช่น คลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีน และแซนโทฟิลล์ ภายในคลอโรพลาสต์มีไพรีนอยด์ที่เป็นแหล่งสะสมอาหาร อาหารสะสมอยู่ในรูปของแป้ง นิเวศวิทยเป็นแบบไม่มีสีอยู่บริเวณกลางไซโทพลาสซึม มีกอลจิบอดีและไมโทคอนเดรีย มีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (ยิวดี, 2546) (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 ลักษณะเซลล์ของสาหร่ายสกุล *Chlorella*

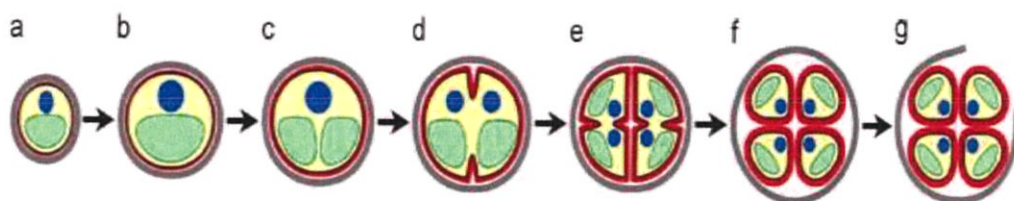
ที่มา : www.healthyposts.files.wordpress.com

2.1.3 แหล่งที่อยู่

สาหร่าย *Chlorella* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ในแหล่งของช่วงอาหารที่กว้างจึงสามารถพบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำธรรมชาติ ทั้งในแหล่งน้ำจืด น้ำทะเล สามารถเจริญเติบโตอย่างอิสระและแบบที่อาศัยอยู่ภายในของสัตว์อื่น เช่น ไฮดรา โปรโตซัว (Kumar and Singh, 1971)

2.1.4 การสืบพันธุ์

สาหร่าย *Chlorella* sp. มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เซลล์สืบพันธุ์คือ ออโตสปอร์ โดยมีการสร้าง 4, 8 และ 16 ออโตสปอร์ แต่โดยส่วนใหญ่สร้าง 4 ออโตสปอร์ ในระยะเริ่มต้นจะสร้างเซลล์อยู่ภายในเซลล์แม่ และจะเจริญเป็นเซลล์ใหม่เมื่อผนังเซลล์แม่แตกออก เซลล์ที่แตกออกจะกลายเป็นสารอาหารให้กับเซลล์ที่เกิดใหม่ (Safi *et al.*, 2014) (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 ภาพวาดแสดงการเกิดเซลล์ใหม่ของ *Chlorella vulgaris* ระยะต่างๆ (a) ช่วงแรกของการเจริญ (b) ช่วงปลายการเจริญ (c) แบ่งคลอโรพลาสต์ (d) ช่วงแรกของการแยก protoplast (e) ช่วงปลายของการแยก protoplast (f) เซลล์ใหม่เจริญเต็มที่ (g) เซลล์แม่แตกออก

ที่มา : Carl *et al.* (2014)

2.1.5 การเพาะเลี้ยง

สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ได้แก่ อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ โดยให้ช่วงของแสงสว่าง มีดกับสว่างเป็น 12/12 ชั่วโมง และการเพิ่มจำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. ทำโดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรของโบลด์ (Bold's Basal Medium) ใส่หัวเชื้อสาหร่ายปริมาณ 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารอยู่ 900 มิลลิลิตร มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่องและได้ผลผลิตสูงใน 4-5 วัน (ลัดดา, 2539)

Henrard *et al.* (2015) ได้ศึกษาการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. โดยเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ต่างกัน คือ BG11, BG11+NaHCO₃, H/2, H/2+NaHCO₃, MBM, MBM+NaHCO₃, MC and MC+NaHCO₃ พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG11+NaHCO₃ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตสูงสุดในระยะเวลา 10 วัน

2.1.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสกุล *Chlorella* sp.

2.1.6.1 แหล่งคาร์บอน สาหร่าย *Chlorella* sp. สามารถใช้คาร์บอนได้ในรูปของสารอินทรีย์และอนินทรีย์ โดยสารอินทรีย์ คือ กลูโคส ฟรุกโตส กาแลกโตส และสารอนินทรีย์ คือ คาร์บอนไดออกไซด์ กรดคาร์บอนิก ที่อยู่ภายในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ (Richmond, 1986)

Sharma *et al.* (2015) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ มีการเติมแหล่งคาร์บอน ที่เป็นสารอินทรีย์ที่แตกต่างกันลงไป คือ กลูโคส, กลีเซอรอล และซูโครส พบว่า ในอาหารที่มีการเติมกลูโคสลงไป ให้ผลผลิตสูงสุด 86.04 ± 3.2 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน รองลงมาคือ ซูโครสและกลีเซอรอล ตามลำดับ

2.1.6.2 แหล่งไนโตรเจน มีความสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน โปรตีน และเอนไซม์ โดยสาหร่ายมีปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 1-10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง หากมีปริมาณของไนโตรเจนจำกัด จะมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง และส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์บางชนิดลดลง (Widjaja *et al.*, 2009)

Agwa and Abu (2016) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตไขมันของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่มีส่วนประกอบของ Potassium nitrate 0.132 g/L, Sodium silicate 0.066 g/L, Monosodium phosphate 0.066 g/L และ EDTA 0.066 g/L ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน โดยมีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันลงไป 3 แหล่ง คือ Sodium nitrate (NaNO_3), Potassium nitrate (KNO_3) และ Urea (NH_2)₂CO พบว่า มีการเจริญสูงสุด และผลิตไขมันได้ร้อยละ 5.27 ในอาหารที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนเป็นยูเรีย

2.1.6.3 แสง เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์แสง ชนิดของแสง ความเข้มแสง ระยะเวลาของเซลล์สาหร่ายที่ได้รับแสง มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมไขมันภายในเซลล์ ความเข้มของแสงเพิ่มขึ้น ทำให้การเจริญของสาหร่ายเพิ่มขึ้นด้วย (ศิริวรรณ, 2555)

Gong *et al.* (2014) ได้ศึกษาผลของแสงและค่าความเป็นกรดต่าง ต่อความหนาแน่นของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยทำการเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร BG-11 เป็นเวลา 20 วัน มีการให้ความเข้มแสง 3 ระดับ คือ 3,960 7,920 และ 11,920 ลักซ์ ตามลำดับ พบว่า ถ้าไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดต่าง สาหร่าย *Chlorella vulgaris* จะมีความหนาแน่นของเซลล์สูงที่สุดที่ค่าความเข้มแสง 3,960 ลักซ์ แต่หากควบคุมค่าความเป็นกรดต่าง จะมีความหนาแน่นของเซลล์สูงที่สุดที่ค่าความเข้มแสง 7,920 ลักซ์

ศิริวรรณ (2555) ทำเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chorella vulgaris* ในอาหารสูตร BG-11 มีค่าความเป็นกรดต่าง 7.14 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้แสง 4 ชนิด คือแสงธรรมชาติ (Sunlight, SL) แสงสีฟ้า (Blue light, BL) แสงไฟสีขาว (Day light, DL) และแสงไฟสีส้ม (Warm white light, WL) โดยให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง พบว่าสาหร่ายที่ได้รับจากแสงธรรมชาติจะมีการเจริญเติบโตเร็วที่สุด รองลงมาคือแสงสีฟ้า แสงสีส้ม และแสงสีขาว ตามลำดับ เซลล์สาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงธรรมชาติจะให้ปริมาณเซลล์แห้งมากที่สุดเท่ากับ 1.993 กรัมต่อ 2 ลิตร โดยมีปริมาณ โปรตีนร้อยละ 53.18 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

2.1.6.4 อุณหภูมิ เป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. เมื่อมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญจะทำให้มีอัตราการเจริญที่เพิ่มสูงขึ้น โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Chlorella* sp. คือ 25-30 องศาเซลเซียส (Cassidy, 2011)

Singh (2015) ได้ศึกษาอุณหภูมิในการเจริญของ *C. minutissima* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-35 องศาเซลเซียส และ *C. pyrenoidosa* มีการผลิตไขมันสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *C. protothecoides* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

2.1.6.5 ค่าความเป็นกรดต่าง มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย โดย *Chlorella* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงกว้าง แต่จะเจริญได้ดีในช่วงที่เป็นกรดเล็กน้อย ประมาณ 6 (Richmond, 1986)

Rai et al. (2015) ได้ศึกษาค่าความเป็นกรดต่างในการผลิตไขมันของสาหร่าย *Chlorella* sp. โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Fogg's medium ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า มีการสร้างไขมันมากที่สุดที่ค่าความเป็นกรดต่าง เท่ากับ 8

2.1.7 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์

สาหร่าย *Chlorella* sp. มีความสำคัญในห่วงโซ่อาหาร และมีบทบาทสำคัญในการเพาะเลี้ยงพืชน้ำและสัตว์น้ำ เนื่องจาก ภายในเซลล์มีปริมาณโปรตีนสูง ประมาณร้อยละ 60 และ ร้อยละ 20 เป็นคาร์โบไฮเดรตและไขมัน มีปริมาณของกรดอะมิโนที่สำคัญหลายชนิด มีปริมาณกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย รวมทั้งยังมีวิตามิน แร่ธาตุ แคโรทีนอยด์ และมีปริมาณของคลอโรฟิลล์ที่สูง (Seyfabadi et al., 2010)

สาหร่าย *Chlorella* sp. สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์ได้ เนื่องจาก มีปริมาณของโฟเลต วิตามิน B12 และธาตุเหล็กมาก ซึ่งช่วยในการรักษาโรคโลหิตจาง โรคความดันโลหิตสูง และยังสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับหญิงตั้งครรภ์ได้ สาหร่าย *Chlorella* sp. นำมาใช้ประโยชน์ในการช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและช่วยในการรักษาโรคมะเร็ง ซึ่งมีการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดของ *Chlorella* sp. โดยให้สารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. ชนิดน้ำ

ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมและ 400 มิลลิกรัม เป็นเวลา 28 วัน กับกลุ่มผู้ทดลองที่มีอายุ 50-55 ปี พบว่า มีการสร้างแอนติบอดีเพิ่มมากขึ้น สารสกัดจากสาหร่ายจึงอาจมีประโยชน์ในด้านการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Tang and Suter, 2011)

สาหร่าย *Chlorella vulgaris* เป็นสาหร่ายที่เหมาะสมในการนำมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ เนื่องจากการเจริญที่รวดเร็วและเพาะเลี้ยงได้ง่าย และการผลิตไบโอดีเซลจากเซลล์สาหร่ายได้รับความนิยม เนื่องจากเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Saddam *et al.*, 2014)

2.2 โรคฟันผุ

โรคฟันผุเป็นโรคเรื้อรังที่พบได้มากในมนุษย์ ส่วนใหญ่พบในเด็ก เป็นการทำลายเนื้อเยื่อฟันอย่างรุนแรง โดยแบคทีเรียจะสร้างกรดที่เกิดจากการย่อยคาร์โบไฮเดรต เช่น ซูโครส ในสภาวะการทำงานแบบไม่ใช้ออกซิเจนมาทำลายเนื้อฟัน เป็นผลมาจากความไม่สมดุลกันภายในช่องปากระหว่างการเสียแร่ธาตุที่ผิวฟัน (demineralization) กับอัตราการสะสมกลับของแร่ธาตุที่ผิวฟัน (remineralization) คือ เมื่อกรดถูกผลิตออกมาทำให้ค่าความเป็นกรดต่างภายในช่องปากลดลง จึงทำให้เกิดการสูญเสียแร่ธาตุที่ผิวฟันออกมา จึงทำให้เป็นฟันผุในระยะแรก และเมื่อภายในช่องปากมีค่าความเป็นกรดต่างเพิ่มขึ้นทำให้เกิดกระบวนการสะสมกลับของแร่ธาตุที่ผิวฟัน จึงทำให้เป็นโรคฟันผุ ทำให้เกิดคราบจุลินทรีย์ในช่องปาก และมีไบโอฟิล์มเกาะติดที่ผิวฟัน ทำให้เกิดอาการปวดฟัน เป็นแผลในช่องปาก โดยโรคฟันผุเกิดจากปัจจัยหลายอย่าง คือ ตัวบุคคล ได้แก่ ฟัน และน้ำลาย, อาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต และแบคทีเรีย (Yadav and Prakash, 2016)

2.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคฟันผุ (ชุดิมา, 2554)

2.2.1.1 ตัวบุคคล ได้แก่ ฟัน และน้ำลาย

2.2.1.1.1 ฟัน ตำแหน่งของฟันโดยเฉพาะฟันบนที่อยู่บริเวณด้านหลัง ลักษณะของฟันที่มีร่องลึกและแคบ ฟันผิวฟันที่ขรุขระ การเรียงตัวและรูปร่างของฟัน ทำให้ยากในการทำความสะอาด จึงมีโอกาสเกิดการสะสมของเศษอาหาร และปัจจุบันมีการละลายของสารเคลือบฟันที่เพิ่มมากขึ้น เนื่องมาจากพฤติกรรมการใช้ชีวิตที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ความต้านทานของฟันลดลงและทำให้เกิดฟันผุได้

2.2.1.1.2 น้ำลาย การเคี้ยวจะเป็นการกระตุ้นกลไกการสร้างน้ำลายและทำให้เกิดการชะล้างของน้ำลายเพิ่มมากขึ้น กลไกของน้ำลายในการป้องกันฟันผุ คือ การชะล้างที่ทำให้กรดภายในช่องปากเจือจางลง โดยมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ที่ป้องกันการสร้างกรดจากแบคทีเรีย การไหลเวียนของน้ำลายภายในช่องปากทำให้มีอัตราการเกิดฟันผุลดลง ซึ่งน้ำลายสามารถช่วยลดความเสี่ยงของโรคฟันผุในรากฟันและตัวฟันได้ นอกจากนี้ผู้ป่วยที่มีปัญหาในการทำงานของต่อมน้ำลายใน

การผลิตน้ำลายลดลง จะมีโอกาสเกิดโรคฟันผุได้มาก มีสารอินทรีย์และอนินทรีย์ที่ช่วยยับยั้งการสูญเสียแร่ธาตุและช่วยเสริมการคืนกลับของแร่ธาตุได้ ภายในน้ำลายมีอิมมูโนโกลบิน เอ ที่ผลิตมาจากต่อมน้ำลาย มีหน้าที่ทำลายแบคทีเรีย และช่วยป้องกันการเกาะติดของแบคทีเรียที่ผิวฟัน

2.2.1.2 อาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต การรับประทานอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยสลายได้ง่าย ในความถี่สูงจะมีโอกาสที่ในการเกิดโรคฟันผุได้มาก ชนิดของคาร์โบไฮเดรตจำพวกน้ำตาล เช่น กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส เป็นต้น

น้ำตาลซูโครส เป็นน้ำตาลที่มีความสำคัญมากในการทำให้เกิดโรคฟันผุ เนื่องจากแบคทีเรียสามารถนำไปสร้างเด็กซ์แทรน (dextran) และ กลูแคน (glucan) เพื่อใช้ในการยึดติดกับผิวฟันได้ นอกจากนี้ กลูโคส และฟรุคโตส ที่พบในผลไม้ และ น้ำผึ้งก็สามารถทำให้ค่าความเป็นกรดต่างลดลงได้เช่นเดียวกับซูโครส ทำให้เกิดการสูญเสียแร่ธาตุที่ผิวฟันได้ (สุกรม, 2555)

2.2.1.3 แบคทีเรีย แบคทีเรียที่สำคัญในการก่อโรค คือ *Streptococcus mutans* ซึ่งจะพบได้ในช่องปาก ซึ่งมีความสามารถในการสร้างกรดภายในช่องปาก โดยมีกระบวนการย่อยคาร์โบไฮเดรตเกิดขึ้น เกิดการสร้างกรด ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

2.2.2 ระยะของการเกิดโรคฟันผุ (ชุดิมา, 2554)

2.2.2.1 ระยะต้น เป็นระยะเริ่มต้นของโรคฟันผุ ซึ่งเป็นการสูญเสียแร่ธาตุในเคลือบฟันหลังจากที่ค่าความเป็นกรดต่างภายในช่องปากลดลง สูญเสียเป็นครั้งแรก โดยอาจเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ง่าย

2.2.2.2 รอยโรคจุดขาว เป็นระยะที่สามารถตรวจพบได้ โดยจะเห็นเป็นรอยขุ่นขาวบริเวณฟัน หรือเกิดรอยดำติดตามหลุมฟัน ซึ่งมีสาเหตุมาจากการสูญเสียผิวเคลือบฟันไป ทำให้ความโปร่งแสงของผิวเคลือบฟันลดลงรอยจะมีความลึก 300-500 ไมโครเมตร รอยขาวขุ่นนี้สามารถลุกลามได้ (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 รอยโรคจุดขาว (ก) รอยโรคจุดขาวบริเวณคอฟันน้านมบน (ข) รอยโรคจุดขาวบริเวณคอฟันหน้าถาวรบนและล่าง (ค) รอยดำติดหลุมฟัน

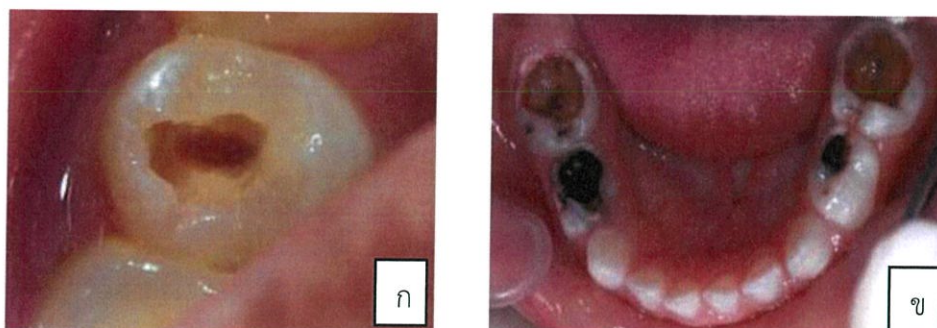
ที่มา : ชุดิมา (2554) และ Khushbu and Satyam (2016)

2.2.2.3 รอยฟุที่มองไม่เห็นจากผิวเคลือบฟันหรือฟุที่เนื้อฟัน เป็นรอยฟุของฟันที่เกิดการลุกลามจากผิวเคลือบฟันไปชั้นเนื้อฟัน โดยที่ผิวเคลือบฟันมีลักษณะปกติ เนื่องจากชั้นของเนื้อฟันมีความแข็งแรงน้อยกว่าชั้นเคลือบฟัน ฟันจะเริ่มเป็นรู จะมีอาการเสียวฟันเกิดขึ้นเมื่อมีการทานของหวานหรือของเย็น (รูปที่ 2.4)



รูปที่ 2.4 ภาพรังสีแสดงรอยฟุที่มองไม่เห็นจากผิวเคลือบฟัน
ที่มา : <http://www.dent.chula.ac.th/ForFon/Binde2>

2.2.2.4 รอยฟุที่เป็นรู รอยฟุจากระยะต่างๆมีการลุกลามมากขึ้น เกิดการลุกลามไปถึงโพรงประสาทฟัน เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน และรอยฟุใต้ผิวเคลือบฟันมีขนาดกว้างมากขึ้น จึงเกิดการทะลุของผิวฟันและทำให้มีรูฟุเกิดขึ้น ระยะนี้สามารถลุกลามไปได้อย่างรวดเร็ว เพราะแบคทีเรียสามารถไปสะสมในรูฟุนั้นได้ จะมีอาการปวดฟันมาก (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 ภาพแสดงรอยฟุจากระยะต่างๆ (ก) รอยฟุที่เป็นรู (ข) รอยฟุที่เป็นโพรงบนฟันกรามน้ำนมซี่ที่หนึ่งซ้าย และรอยฟุที่หยุดยั้งบนฟันกรามน้ำนมซี่ที่หนึ่งขวา
ที่มา : <http://www.dent.chula.ac.th/ForFon/Binde2>

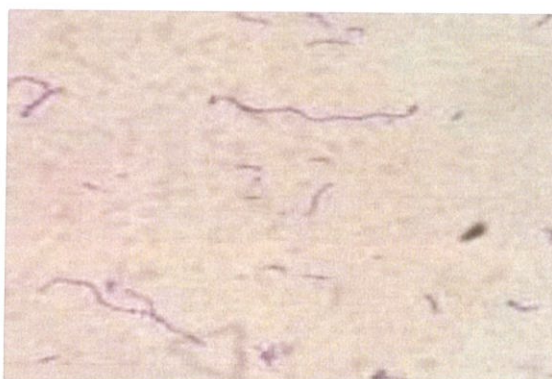
2.2.3 การป้องกันฟันผุ ในการป้องกันการลุกลามของโรคฟันผุ สามารถทำได้โดยการแปรงฟันด้วยยาสีฟันที่มีส่วนผสมของฟลูออไรด์ หรือใช้น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของฟลูออไรด์ การแปรงฟันจะช่วยป้องกันการก่อตัวของเชื้อ สามารถหยุดและชะลอการเกิดฟันผุในระยะเริ่มแรกได้ เพิ่มความถี่ของการแปรงฟัน ไปพบทันตแพทย์เป็นประจำทุกๆ 6 เดือน เพื่อตรวจสุขภาพของช่องปาก และรับประทานอาหารที่มีประโยชน์และหลีกเลี่ยงอาหารที่มีน้ำตาลในปริมาณมากๆ จะสามารถป้องกันการเกิดฟันผุได้ดี (ชุตินา, 2554)

ฟลูออไรด์ สามารถช่วยยับยั้งกระบวนการสูญเสียแร่ธาตุของฟันได้ มีหน้าที่ ยับยั้งเอนไซม์ อีโนเลส (enolase) ทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถย่อยสลายน้ำตาลได้ โดยลดอัตราการละลายของผิวฟัน และป้องกันไม่ให้อายุโรคซุนขาวลุกลาม ช่วยลดการสร้างกรดจากแบคทีเรีย (สุภร, 2559)

2.3 เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในช่องปาก

2.3.1 *Streptococcus mutans*

S. mutans เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม ขนาด 0.50-0.75 ไมโครเมตร เรียงตัวกันเป็นสายสั้นๆ หากเลี้ยงในอาหารที่มีสภาวะเป็นกรดหรืออาหารแข็ง เซลล์จะมีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ขนาด 1.5-3.0 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.6) โคโลนิมีลักษณะเป็นสีขาว รูปร่างกลม ขนาด 0.5-1.0 ไมโครเมตร เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ จัดอยู่ในกลุ่ม Facultative anaerobe และสามารถเจริญได้ดีในสภาวะไร้อากาศ (anaerobe) หรือมีออกซิเจนเพียงร้อยละ 5-10 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *S. mutans* อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้ออยู่ระหว่างช่วง 4.0-7.0 (ศิริลักษณ์, 2557)



รูปที่ 2.6 ภาพแสดงลักษณะการย้อมแกรมของเชื้อ *Streptococcus mutans* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า

2.3.2 การก่อโรคของเชื้อ *S. mutans*

S. mutans ส่วนใหญ่พบที่บริเวณผิวฟัน สามารถสังเคราะห์สาร extracellular polysaccharides ที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำได้ เช่น glucan และ fructan จากน้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อตัวของโรคฟันผุ เนื่องจากความสามารถในการยึดเกาะ การผลิตกรด ความทนทานต่อกรด และการผลิตกลูแคนที่ละลายในน้ำจึงทำให้เชื้อ *S. mutans* เป็นหนึ่งในเชื้อโรคในช่องปากหลัก มีส่วนเกี่ยวข้องกับก่อโรคติดเชื้อทุติยภูมิอื่น ๆ เช่น bacteremia และ endocarditis การสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่าง ในระหว่างการย่อยคาร์โบไฮเดรตของเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งจะอยู่ในช่วง 7.0 ขึ้นไป จนถึง 3.0

S. mutans สามารถนำน้ำตาลซูโครสไปใช้ได้อีกทางหนึ่ง คือ เมื่อซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปแล้ว จะถูกนำไปเผาผลาญให้กลายเป็นพลังงาน ซึ่งจะได้ผลิตออกมาเป็นกรด กรดที่ได้มีหลายชนิดด้วยกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม กล่าวคือ ถ้ามีซูโครสมากเกินไป ผลผลิตที่ได้จากการหมัก (fermentation) จะได้กรดแลคติก แต่ถ้ามีจำนวนซูโครสจำกัด ผลผลิตที่ได้จะเป็น กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล โดยกรดที่ได้จะไปละลายแร่ธาตุที่เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อฟัน ซึ่งฟอสฟอรัสที่ละลายออกมากก็จะถูกนำไปใช้ในขบวนการ phosphorylation เกิดเป็นกรดออกมาอีก หมุนเวียนเช่นนี้เรื่อยไป จนเนื้อเยื่อฟันถูกทำลายกลายเป็นแผลที่กว้าง (กรณีศึกษา และ ชัชวาล, 2549)

Krzysciak et al. (2013) กล่าวว่า โรคติดเชื้อในช่องปากส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์เจริญบนผิวฟันและเหงือก ทำให้เป็นโรคฟันผุ ซึ่งสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคดังกล่าวคือ *S. mutans*

2.4 เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์

2.4.1 *Escherichia coli*

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ มีความยาวประมาณ 2.0 ไมโครเมตร และ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.25 - 1.0 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.7) มีแฟลกเจลลา สามารถเคลื่อนที่ได้ แต่บางสายพันธุ์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ อยู่ในกลุ่ม facultative anaerobe สามารถหมักน้ำตาลได้ เช่น กลูโคส แลคโตส และมอลโตส เป็นต้น

สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *E. coli* อยู่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรือเจริญในช่วงระหว่าง 7-46 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.4-9.0 ส่วนใหญ่จะอาศัยอยู่ในลำไส้ส่วนล่าง ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น ซึ่งจะไม่ก่ออันตราย เนื่องจากเป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่ ทำหน้าเป็นประโยชน์ต่อโฮสต์ที่อาศัยอยู่ ที่อาจก่อโรคร้ายในลำไส้

นอกจากนี้ *E. coli* ยังถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนในอุจจาระ อาหารและน้ำ เนื่องจากสามารถเจริญได้ทั่วไปในอุจจาระและในน้ำ (Bachir and Abouni, 2015)



รูปที่ 2.7 ภาพแสดงลักษณะเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ที่มา : <http://2fmicrobiologia.blogspot.com/2012/05/citrobacter.html>

การก่อโรคของเชื้อ *E. coli* (Bachir and Abouni, 2015)

การก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* serotypes บางชนิดอาจทำให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ หากพบการปนเปื้อนในอาหาร น้ำ หรืออุจจาระ ได้แก่ enteropathogenic *E. coli*, enteroinvasive *E. coli*, enterotoxigenic *E. coli* และ enterohemorrhagic *E. coli*

1. Enteropathogenic *E. coli* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงในทารกโดยใช้เวลาก่อนโรคนานกว่า 2 สัปดาห์ และทำให้เสียชีวิตได้หากมีการคายน้ำรุนแรง ในผู้ใหญ่จะมีลักษณะอาการท้องร่วงรุนแรง คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ปวดศีรษะ เป็นไข้และหนาวสั่น ระยะเวลาของการเจ็บป่วยคือ 6 ชั่วโมงถึง 3 วัน สายพันธุ์นี้จะก่อโรคในคนเมื่อมีการแพร่กระจายในน้ำที่มีการปนเปื้อน

2. Enteroinvasive *E. coli* คล้ายกับ shigellosis และเกิดจากการแทรกซึมของแบคทีเรียและเข้าทำลายเยื่อเมือกในลำไส้ ผู้ป่วยจะมีอาการหนาวสั่น เป็นไข้ ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อท้อง ปวดท้องและท้องเสียมาก จะเกิดอาการหลังการกินอาหารหรือน้ำที่มีแบคทีเรียชนิดนี้ 8 ถึง 24 ชั่วโมง

3. Enterotoxigenic *E. coli* รวมถึงสายพันธุ์ที่ผลิต enterotoxins สายพันธุ์เหล่านี้มักก่อโรคที่ชื่อว่า "โรคอุจจาระร่วงในนักท่องเที่ยว" ซึ่งก่อโรคในประเทศอินเดีย ทหารสหรัฐอเมริกาที่อาศัยในประเทศเวียดนาม และนักเดินทางในประเทศเม็กซิโก จึงเป็นปัญหาสำหรับนักเดินทางจากประเทศที่พัฒนาแล้วที่มีสุขอนามัยที่ดีเข้าเยี่ยมชมประเทศที่มีมาตรฐานด้านสุขอนามัยที่ไม่ดี

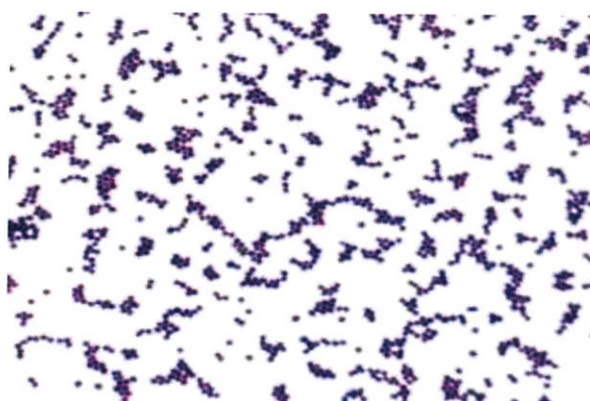
4. Enterohemorrhagic *E. coli* (*E. coli* O157: H7) เป็นสาเหตุของอาการปวดท้องในช่องท้องอย่างรุนแรง และมีอาการท้องร่วงที่มีเลือดออกร่วมด้วย (hemorrhagic colitis) ผู้ป่วยบางรายแสดงอาการท้องร่วงเท่านั้น หรืออาจมีอาการอาเจียน และบางครั้งอาจทำให้เกิดภาวะไตวายและเสียชีวิตได้ โดยเชื้อจะสร้างสารพิษที่ชื่อว่า Shiga toxin หรือรู้จักกันในชื่อ Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC)

Tozzi *et al.* (2003) รายงานว่า เกิดอุบัติการณ์ของโรค hemolytic uremic ในช่วง 1988-2000 ที่ประเทศอิตาลี พบว่ามีประชากรอายุมากกว่า 15 ปี ป่วยเป็นโรคดังกล่าวร้อยละ 0.28 ต่อประชากร 100,000 คน เกิดจากการได้รับสารพิษจากเชื้อ *E. coli* ที่เรียกว่า “Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)” ซึ่งผู้ป่วยจะติดเชื้อสายพันธุ์ STEC:O157 มากที่สุด ร้อยละ 73.1 และมีผู้ป่วยจำนวนมากที่มีการติดเชื้อที่ไม่ได้เกิดจากเชื้อสายพันธุ์ STEC:O157

Moulin and Fairbrother (1999) กล่าวไว้ว่า โรคใช้หวัดนก หรือ Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) ทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับท้องร่วง, ภาวะโลหิตเป็นพิษ และอื่นๆ ส่วนใหญ่เกิดในไก่วงและนกชนิดอื่นๆจากการศึกษาการติดเชื้อ แสดงให้เห็นว่าพื้นที่การแลกเปลี่ยนอากาศของปอดและ air sacs มีผลทำให้เชื้อ *E. coli* เข้าสู่กระแสเลือดของนกในระหว่างระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อ

2.4.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะทรงกลม เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายรวงองุ่น หรือเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ มีเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ประมาณ 0.5-1.5 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.8) ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ บางสายพันธุ์สามารถสร้างแคปซูลได้ ทำให้โคโลนีเป็นเมือก (slime) ช่วยให้เชื้อมีความทนทานต่อการทำลายของยาปฏิชีวนะและภูมิคุ้มกันของร่างกาย เชื้อสามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเล็กน้อย (microaerophilic) ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเติบโตอยู่ที่ 7-7.5 โคโลนีบนอาหารแข็งมีลักษณะกลม เรียบขุ่นและนูนเล็กน้อย มีสีขาวขุ่นหรือเหลืองทอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-4 มิลลิเมตร สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีและอาจมีชีวิตรอดได้ในหนองหรือเสมหะแห้งเป็นเวลานาน (นิติงษ์ และ เอกชัย, 2552)



รูปที่ 2.8 ภาพแสดงลักษณะเซลล์ของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

ที่มา : <https://www.gettyimages.com/detail/photo/staphylococcus-aureus-bacteria-gram-high-res-stock-photography/vis301174>

การก่อโรคของเชื้อ *S. Aureus* (นิติพงษ์ และ เอกชัย, 2552)

การก่อโรคของเชื้อ *S. aureus* ส่วนใหญ่ก่อโรคที่ผิวหนัง ได้แก่ หนอง (boils) , ฝีฝักบัว (carbuncles), โรคผิวหนัง และ โรคผิวหนังลอกหลุด นอกจากนี้ยังพบเป็นสาเหตุของ ฝี (abscess) การติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) การติดเชื้อที่กระดูก (osteomyelitis) ปอดบวม (pneumonia) การติดเชื้อที่ลิ้นหัวใจ (endocarditis) อาหารเป็นพิษ (food poisoning) และ อาการช็อกพิษเฉียบพลัน (toxic shock syndrome)

1. โรคติดเชื้อที่ผิวหนัง การเกิดตุ่มหนองที่บริเวณผิวหนัง (impetigo) มักเป็นตุ่มหนองตื้นๆ อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม พบบ่อยบริเวณใบหน้า แขน ขา เมื่อตุ่มหนองแตกออก กลายเป็นรอยถลอกตื้นๆ และถ้ามีการติดเชื้อที่ต่อมไขมันจะทำให้เกิดการอักเสบมีการสะสมของเม็ดเลือดขาวที่ตายแล้ว รวมทั้งแบคทีเรียที่เม็ดเลือดขาวกินเข้าไปทำให้เกิด ฝี (furuncle) และฝีฝักบัว (carbuncles) บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ epidermolytic toxin (ET) ทำให้เกิดโรคผิวหนังลอก ที่เรียกว่า Staphylococcal scalded skin syndrome

2. โรคปอดบวม (staphylococcal pneumonia) การติดเชื้อมักเกิดขึ้นกับผู้ป่วยที่มีร่างกายอ่อนแอ เช่น ป่วยเป็นไข้หวัดใหญ่ โรคหัดหรือคนที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้มีโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้อสูงกว่าคนปกติอาการของโรคอาจเกิดขึ้นทันทีที่ติดเชื้อ

3. การติดเชื้อที่กระดูก (osteomyelitis) และข้อ (pyoarthrosis) การติดเชื้อที่กระดูกมักมีสาเหตุจากการติดเชื้อในกระแสเลือด และเมื่อเชื้อเข้าไปอยู่ในส่วนของไดอะฟิซิส (diaphysis) ของกระดูกยาว (long bones) จะทำให้เกิดการติดเชื้อรุนแรงและมีการสะสมของหนองบริเวณผิวของกระดูก เกิดเป็นหนองใต้เยื่อหุ้มกระดูก

Zhang *et al.* (2017) รายงานว่าการกระตุ้นให้เกิด apoptosis โดยสารพิษของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ในระหว่างการติดเชื้อถือเป็นสิ่งสำคัญในกระบวนการของโรค อย่างเช่นเป็นโรคผิวหนังภูมิแพ้และภาวะติดเชื้อ ซึ่งกระบวนการ apoptosis มีอิทธิพลต่อความรุนแรงของการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus*

Mousavi *et al.* (2017) ได้ศึกษาบทบาทของ *S. aureus* ในการก่อโรคภูมิแพ้, การอักเสบ และ โรคปอดอักเสบ พบว่าโรคภูมิแพ้ เกิดจากเชื้อ *S. aureus* เข้าทำลายเนื้อเยื่อที่ระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้เกิดอาการอักเสบเรื้อรัง คนส่วนใหญ่ร้อยละ 20-30 จะติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถแพร่กระจายได้

2.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน โดยทั่วไปมีขนาดประมาณ 1.5-3.0 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.9) มีแฟลกเจลลาแบบ single polar flagella สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถผลิตเม็ดสี pyocyanin เมื่อมีการเจริญเติบโตบนอาหาร หรือพบการติดเชื้อ เชื้อจะมีลักษณะเป็นสีเขียวแกมน้ำเงิน ส่วนใหญ่แบคทีเรียชนิดนี้จะแพร่กระจายอยู่ในดินและน้ำ หรือพื้นที่ชื้นแฉะ สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะไร้อากาศ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตคือ 37 องศาเซลเซียส และสามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 42 องศาเซลเซียส ทนต่อสภาพแวดล้อมได้หลากหลาย เช่น อุณหภูมิสูง ทนทานต่อความเข้มข้นของเกลือสูง (Zeng, 2004)



รูปที่ 2.9 ภาพแสดงลักษณะของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*
ที่มา : www.flickr.com

การก่อโรคของ *P. aeruginosa*

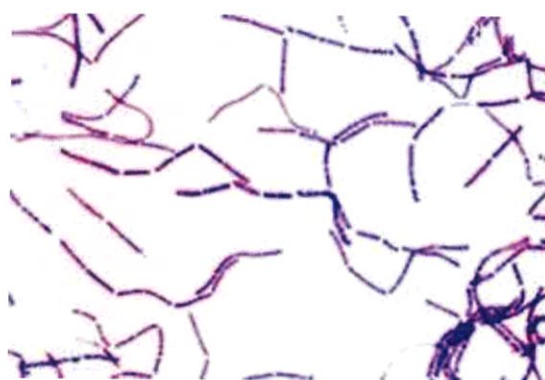
เชื้อ *P. aeruginosa* เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่พบมากที่สุดโรงพยาบาล เช่น การติดเชื้อ cystic fibrosis (CF) รวมถึงภาวะโลหิตเป็นพิษเฉียบพลันจากการติดเชื้อที่แผลหรือแผลหลังการผ่าตัด, การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ, แผลกระจกตา (จากการใส่คอนแทคเลนส์), endocarditis (เกิดจากการใช้ยาทางหลอดเลือดดำ ฯลฯ) และโรคปอดบวม (Zeng, 2004)

Stover *et al.* (2000) กล่าวว่า *P. aeruginosa* เป็นเชื้อฉวยโอกาสในมนุษย์โดยส่วนใหญ่จะติดเชื้อในผู้ป่วยที่ใช้สายสวนและโรคปอดบวมในโรงพยาบาล ผู้ป่วยที่ใช้เครื่องช่วยหายใจ นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคปอดเรื้อรัง เนื่องจากความต้านทานตามธรรมชาติของแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะทำให้ปอดล้มเหลวและเสียชีวิต

Sadikot *et al.* (2005) รายงานว่า ผู้ป่วยที่ได้รับการกดภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยที่มีการปลูกถ่ายอวัยวะ โดยเฉพาะผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวและผู้ป่วยเอชไอวี มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *P. aeruginosa* สูง เนื่องจากยังเป็นภัยคุกคามร้ายแรง เพราะเชื้อมีความต้านทานยาปฏิชีวนะจึงมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *P. aeruginosa* เพิ่มขึ้น

2.4.4 *Bacillus subtilis*

B. subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นหรือต่อกันเป็นสาย มีขนาด 0.5-10.0 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.10) สามารถสร้างแคปซูล และสร้างสปอร์ (endospore) มีแฟลกเจลลาใช้ในการเคลื่อนที่ ส่วนใหญ่จะพบที่บริเวณแหล่งน้ำ ดิน อากาศ หรือพืช ซึ่งจะอาศัยกันแบบอสิระ (Pearson, 1970) สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกาศน้อย(Facultative anaerobe) และเจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ (aerobe) ที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต อยู่ในช่วง pH เท่ากับ 7.0-7.2 นอกจากนี้สปอร์ยังสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น อุณหภูมิสูง ความแห้งแล้ง และสารเคมี ได้ ซึ่งเป็นสาเหตุของการทำให้อาหารเน่าเสีย (Guo *et al.*, 2017)



รูปที่ 2.10 ภาพแสดงลักษณะของเชื้อ *Bacillus subtilis*

ที่มา : <https://longshortreport.com>

การก่อโรคของเชื้อ *B. subtilis*

เชื้อ *B. subtilis* โดยทั่วไปถือว่าไม่ก่อให้เกิดโรค แต่มีส่วนทำให้อาหารเป็นพิษซึ่งเกิดจากผลิตภัณฑ์อาหารมีคุณภาพต่ำ เมื่อเกิดอาการอาหารเป็นพิษ *B. subtilis* จะเข้าโจมตีอย่างรวดเร็ว และมีอาการอาเจียนเฉียบพลัน และมีอาการท้องร่วงร่วมด้วย นอกจากนี้สปอร์ของ *B. subtilis* สามารถทนความร้อนที่ใช้ในระหว่างการปรุงอาหารได้อีกด้วย (Apetroaie *et al.*, 2008)

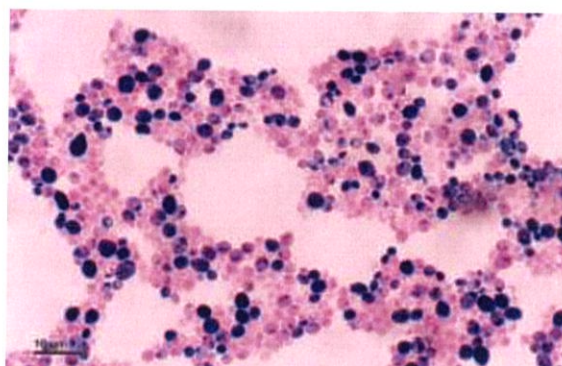
Apetroaie *et al.* (2008) รายงานว่า เชื้อก่อโรคที่เกี่ยวข้องกับอาหาร ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ *B. subtilis* และ *B. mojavensis* ซึ่งสามารถผลิตสารพิษ amylosin ที่ทนต่อความร้อนได้ โดยอุณหภูมิที่เชื้อสามารถผลิตสารพิษ amylosin ได้อยู่ระหว่าง 21-37 องศาเซลเซียสสำหรับ *B. subtilis* และ 11-21 องศาเซลเซียสสำหรับ *B. mojavensis*

Krasowska *et al.* (2014) รายงานว่า *B. subtilis* มีปนเปื้อนของตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารในเนเธอร์แลนด์ เช่น นม ยีสต์ แป้ง โกโก้ ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ และยังมีสปอร์ของเชื้อในแป้งสาลี ขนมปังโรย และเจลาติน

2.4.5 *Candida albicans*

C. albicans เป็นเชื้อยีสต์ ที่มีลักษณะเป็นรูปไข่ สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ (Budding) มีขนาดเซลล์ประมาณ $2-3 \times 4-6$ ไมโครเมตร (รูปที่ 2.11) โดยทั่วไปจะเจริญในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสและมอลโตส ได้ผลิตก๊าซเป็นกรดและแก๊ส แต่ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับน้ำตาลแลคโตสได้ นอกจากนี้ยังสามารถคาร์โบไฮเดรตได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติและสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Candida* แต่ละสายพันธุ์ (Nasution, 2013)

Nadeem *et al.* (2013) กล่าวว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อรา *C. albicans* สามารถเปลี่ยนรูปแบบจากเซลล์เดี่ยว (yeast cell) ไปเป็นรูปแบบเส้นใย (pseudohyphae หรือ hyphae) ได้ ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้หลากหลายรูปแบบ เช่น yeast, pseudohyphae และ hyphae นอกจากนี้ *C. albicans* ยังสามารถสร้าง chlamydo-spores ได้ กล่าวคือ เซลล์ที่มีผนังกลมหนาหรือสปอร์ที่เกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดย pseudohyphae daughter bud จะยืดอกออกและหลังจากนั้นจะอยู่ในรูปของ satum forms ซึ่งเซลล์ลูกยังติดอยู่กับเซลล์แม่



รูปที่ 2.11 ภาพแสดงลักษณะของเชื้อ *Candida albicans*

ที่มา : www.commonswikimedia.org

การก่อโรคของเชื้อ *Candida albicans*

เชื้อ *C. albicans* เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่อาศัยอยู่ในส่วนต่างๆ ของร่างกายมนุษย์เช่นบริเวณทางเดินอาหารและทางเดินปัสสาวะประมาณร้อยละ 70 ของมนุษย์ ซึ่งเป็นเชื้อราที่พบมากที่สุดที่เกี่ยวกับการติดเชื้อของมนุษย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยทั่วไปการติดเชื้อที่เกิดจาก *C. albicans* สามารถแยกออกได้เป็นสองประเภท คือ เยื่อเมือก เช่น เยื่อเมือกในช่องปาก และเยื่อเมือกในช่องคลอด และระบบของกล้ามเนื้อส่วนต่างๆ การติดเชื้อในระบบทำให้การแพร่กระจายของ *C. albicans* ไปสู่กระแสเลือดและไปยังอวัยวะที่สำคัญ และจะส่งผลต่อเยื่อเมือกต่างๆ ของร่างกาย ซึ่งเป็นอันตรายถึงชีวิต (Sayyada *et al.*, 2013)

Sardi *et al.* (2013) อธิบายไว้ว่า ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ *Candida* มีปัจจัยความรุนแรงที่สำคัญ คือ การยึดเกาะกับเนื้อเยื่อเซลล์เข้าบ้าน การสร้างไบโอฟิล์มและการหลั่งของเอนไซม์ไฮโดรไลติก เช่น proteases, phospholipases และ haemolysins นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงระหว่างเซลล์ยีสต์และเส้นใยยังส่งผลต่อความรุนแรงของการก่อโรค เนื่องจากการเจริญเติบโตแบบเส้นใยเจริญได้มากกว่าแบบยีสต์ ทำให้เชื้อราสามารถบุกรุกเข้าไปยังเซลล์เจ้าบ้านได้ง่ายขึ้น

2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดสาหร่าย

2.5.1 การทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion (Balouiri, 2015)

วิธี agar well diffusion เป็นการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสาหร่าย หรือพืชสมุนไพรต่างๆ เป็นวิธีการทดสอบเบื้องต้น ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากประหยัดและสะดวก ซึ่งจะมีหลักการที่คล้ายกับวิธี agar disc diffusion โดยถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบให้แพร่กระจายลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง แล้วทำการเจาะหลุมลงบนอาหารแข็ง ให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6-8 มิลลิเมตร หลังจากนั้น ใส่สารสกัดที่ต้องการทดสอบลงไป ในหลุม (20-100 ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อทดสอบนั้นๆ อ่านผลโดยการวัด เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (clear zone) รอบๆหลุม

2.5.2 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสาหร่ายที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค (Minimum Inhibitory Concentration) ด้วยวิธี broth dilution technique (Balouiri, 2015)

เป็นการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยแบ่งเป็นแบบ macro broth dilution ทำการทดลองในหลอดทดลอง ซึ่งมีปริมาตรรวมในหลอด 1-2 มิลลิลิตร และ micro broth dilution ทำในถาดหลุมทดสอบ (microtiter plate) วิธีการแบบ macro broth dilution เตรียมเชื้อโดยการเชยเชื้อจุลินทรีย์จากอาหารแข็ง แล้วนำไปเทียบความขุ่นกับ 0.5 McFarland standard แล้วทำการเจือจางสารสกัดที่ต้องการทดสอบแบบลำดับสอง (2-fold dilution) กับอาหารเลี้ยงเชื้อภายในหลอดทดลอง จากนั้นเติมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่เตรียมไว้ลงไป นำไปบ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อ ทำการอ่านผล โดยสังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรืออาหารภายในหลอดไม่ขุ่น

2.6 อนุมูลอิสระ (Free radical) (เจนจิรา, 2554)

อนุมูลอิสระ คือ โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอก จึงเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ โดยอนุมูลอิสระนี้จะไปดึงหรือแย่งจับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลที่อยู่ข้างเคียง เพื่อให้ตัวเองมีความเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับสารอื่นต่อไป จึงเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่สามารถส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบของเซลล์ภายในร่างกายได้ เช่น การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ การเปลี่ยนสภาพโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ อนุมูลอิสระจะเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลาในสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจน ปัจจัยการเกิดอนุมูลอิสระ เกิดจากผลการใช้ออกซิเจนของกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ และปัจจัยภายนอก ได้แก่ ยารักษาโรค รังสียูวี โอโซน คิวตินจากท่อไอเสีย และควันทันตะวัน ในการลดความรุนแรงหรือกำจัดอนุมูลอิสระ โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระ แล้วเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่เสถียรกว่า ส่งผลให้หยุดวงจร การเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่

2.6.1 ปัจจัยในการเกิดอนุมูลอิสระ

2.6.1.1 ปัจจัยภายในร่างกาย ในร่างกายจะมีกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งปฏิกิริยาในการสร้างและสลายโมเลกุลของสาร เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ได้แก่

1. ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเอง เช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมัน โดยกรดไขมันจะแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระเมื่อมีแสงและอุณหภูมิเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน เกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซี จากนั้นจะทำปฏิกิริยาต่อกับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสามารถทำปฏิกิริยาต่อไปได้เรื่อยๆ คล้ายปฏิกิริยาลูกโซ่

2. ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง คือ เอนไซม์แซนธินออกซิเดส และเอนไซม์ไลโปออกซิจีเนส หรือเกิดได้จากสภาวะร่างกายมีอาการผิดปกติ เช่น มีแผลอักเสบติดเชื้อ

2.6.1.2 ปัจจัยภายนอกในร่างกาย การเกิดอนุมูลอิสระจากปัจจัยภายนอก เกิดได้จากหลายสาเหตุ ได้แก่

1. รังสี การใช้รังสีเอกซ์ (X-ray), รังสีแกมมา (γ -ray) ในการรักษาโรคทางการแพทย์ต่างๆ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกาย หรือรังสีอัลตราไวโอเล็ตเอ จากแสงแดด

2. ยารักษาโรค ในกลุ่มของยาต้านมะเร็งที่ส่งผลในการส่งเสริมปฏิกิริยาออกซิเดชัน เช่น ยาบลีโอมัยซิน (bleomycin) และยาแอนทราไซคลินส์ (anthracyclines)

3. คาร์บอนที่มีองค์ประกอบของสารไนโตรเจนออกไซด์, ไนตริกออกไซด์, เพอรอกซีไนไตรท์, คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้เกิดการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์

4. โอโซน เป็นสารออกซิไดส์ที่มีความแรงสูง เมื่อได้รับการกระตุ้นจากแสงจะสามารถเปลี่ยนรูปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลได้

5. กระบวนการทำอาหาร เช่น การใช้น้ำมันทอดซ้ำหลายๆครั้ง การปิ้งย่างอาหารจนมีความไหม้เกรียม

2.7 สารต้านอนุมูลอิสระ (เจนจิรา, 2554)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่สามารถชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้โดยตรงหรือให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรเพิ่มมากขึ้น เป็นการกำจัดอนุมูลอิสระและหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่การเกิดอนุมูลอิสระ โดยมีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระโดยตรง (scavenge), เข้าจับกับโลหะเพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ (chelate)

ในร่างกายจะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระ แบ่งออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนแรกเกิดจากร่างกายสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมา เพื่อควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล เช่น เอนไซม์คะตะเลส (catalase) หรือสารประกอบโปรตีนบางอย่าง เช่น อัลบูมิน (albumin) เป็นต้น ถ้ามีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นปริมาณมากเกินกว่าที่จะยับยั้งได้จะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า “oxidative stress” จะเป็นอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่างในร่างกาย ส่วนที่สองเป็นกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากวิตามินเอ ซี อี หรือ เบต้าแคโรทีน นอกจากนี้ ในผัก ผลไม้ และพืชสมุนไพรยังมีสารประกอบโพลีฟีนอล เช่น สารแคปไซซิน ที่อยู่ในพริกชี้หนู สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ สามารถช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคต่างๆได้ เช่น โรคมะเร็ง โรคปอด โรคหัวใจขาดเลือด

2.7.1 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่ได้รับมาจากจุลินทรีย์ ผักและพืชสมุนไพร สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิดได้แก่

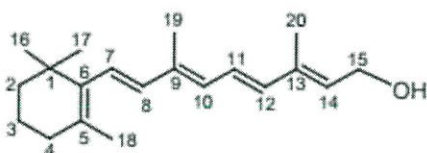
1. สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้เพื่อหยุดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ที่ส่งผลให้อาหารเกิดกลิ่น สี ที่แปลกไป สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์นี้ เป็นสารประกอบฟีนอลิกสังเคราะห์ 5 ชนิด ได้แก่ propyl gallate, 2- butylated hydroxyanisole, 3- butylate hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone สารต้านอนุมูลอิสระ

สังเคราะห์ทั้ง 5 ชนิดนี้ มีความคงตัว มีประสิทธิภาพ มากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้จากธรรมชาติ แต่มีข้อเสียในเรื่องของความปลอดภัยในการนำมาบริโภค

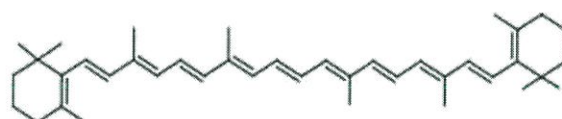
2. สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) มีความปลอดภัยในการนำมาบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระแบบสังเคราะห์ สารในกลุ่มนี้สามารถพบได้ทั้งในจุลินทรีย์ พืช และวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน มีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เช่น แซนโธน (xanthone) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้

2.7.2 สารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ (ศรมน, 2559)

2.7.2.1 วิตามินเอ มีโครงสร้างลักษณะเป็นผลึก มีสีเหลืองอ่อน ซึ่งสามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์และไขมัน ไม่สามารถทนรังสีอัลตราไวโอเล็ตได้ ภายในร่างกายมีอยู่ 2 รูป คือ เรตินอล (retinol) และเบตาแคโรทีน (β -carotene) (รูปที่ 2.12) โดยเรตินอลพบได้ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น ปลาทะเล น้ำมันตับปลา ค่ะน้ำ ตำลึง ส่วนเบตาแคโรทีนจะพบในผักและผลไม้ที่มีสีเหลืองหรือสีส้ม โดยร่างกายจะเก็บสะสมวิตามินเอไว้ที่ตับ วิตามินเอสามารถช่วยลดอาการอักเสบของผิวหนัง และช่วยเรื่องระบบหายใจ ในการการเก็บรักษาวิตามินเอ ควรเก็บในขวดสีชาเพื่อป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ต เนื่องจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในโครงสร้างของวิตามินเอ หรือเก็บรักษาโดยการเติมสารป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน



(ก) โครงสร้างวิตามินเอ

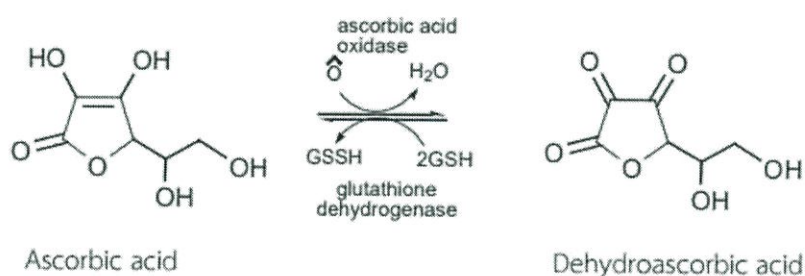


(ข) โครงสร้างของเบต้าแคโรทีน

รูปที่ 2.12 แสดงโครงสร้างสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ (ก) โครงสร้างของวิตามินเอ ประกอบด้วยวงแหวนเบตา-ไอโอโนน และไอโซพรีนต่อกันหลายหน่วย เรียกว่า ไอโซพรีนอยด์แอลกอฮอล์ (isoprenoid alcohol) มีการจัดเรียงตัวของพันธะคู่ในโมเลกุลเป็นแบบทรานส์ (trans-retinol) (ข) ภาพโครงสร้างของเบต้าแคโรทีน

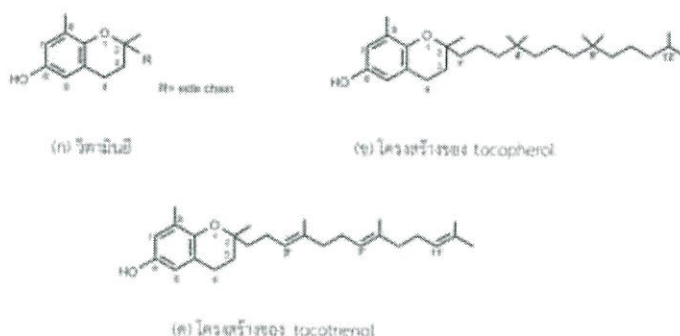
ที่มา : ศรมน (2559)

2.7.2.2 วิตามินซี หรือกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) เป็นผลึกสีขาว มีรสเปรี้ยว ละลายได้ในน้ำ สามารถถูกออกซิไดส์ได้ง่าย โดยเกิดจากออกซิเจนในอากาศ เมื่อเกิดการออกซิไดส์ จะเปลี่ยนไปเป็นดีไฮโดรแอสคอร์บิก (dehydroascorbic acid; DHA) การเปลี่ยนรูปของวิตามินซีมีสองรูป คือ กรดแอสคอร์บิก และ ดีไฮโดรแอสคอร์บิก (รูปที่ 2.13) และมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง คือ เอนไซม์แอสคอร์บิกออกซิเดส (ascorbic oxidase) และกลูตาไทโอนดีไฮโดรจีเนส (glutathione dehydrogenase) วิตามินซีสามารถสลายตัวได้เมื่อโดนความร้อนหรือตั้งทิ้งไว้ในอากาศ วิตามินซีพบได้มากในผักและผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เช่น ส้ม มะนาว หน้าที่ของวิตามินซี คือ ช่วยสร้างคอลลาเจน และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ



รูปที่ 2.13 การเปลี่ยนโครงสร้างของวิตามินซีโดยเอนไซม์ในร่างกาย
ที่มา : ศรมน (2559)

2.7.2.3 วิตามินอี จัดเป็นวิตามินที่ละลายได้ดีในไขมัน และจัดเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลือง ทนต่อความร้อนและกรด แต่ไม่ทนต่อแสง และรังสีอัลตราไวโอเล็ต วิตามินอีสามารถช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในร่างกายได้ เป็นวิตามินที่มีการสร้างขึ้นในพืชเท่านั้น α -tocopherol เป็นสารที่ว่องไวที่สุด โดยเป็นสารป้องกันการเกิดออกซิเดชันของสารอื่น เช่น วิตามินเอและเบตาแคโรทีน จะทำงานร่วมกับวิตามินซี พบได้มากในน้ำมันจากเมล็ดธัญพืช เช่น น้ำมันจากจมูกข้าวสาลี น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันรำข้าว วิตามินอีมีหน้าที่ในการช่วยขยายเส้นเลือด ด้านการแข็งตัวของเลือด ช่วยลดการจับตัวเป็นลิ่มเลือด ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจากการใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในร่างกาย และเป็นสารป้องกันอนุมูลอิสระ (รูปที่ 2.14)



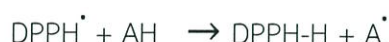
รูปที่ 2.14 โครงสร้างวิตามินอี (ก) โครงสร้างหลักของวิตามินอี (ข) โครงสร้างของ tocopherol

(ค) โครงสร้างของ tocotrienol

ที่มา : ศรมน (2559)

2.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการ DPPH (diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) (บุหริน, 2556)

การทดสอบด้วยวิธีนี้ ทดสอบโดยใช้สาร ดีพีพีเอช (DPPH[•], diphenyl-picrylhydrazyl radical) มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ เป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว และมีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จัดเป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมี ในการหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง เมื่อทำการเตรียมการทดสอบเสร็จ ก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง จะนำไปตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เมื่อสาร DPPH เข้าทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (สารสกัดตัวอย่างที่นำมาทดสอบ) ที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลงและเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ดังสมการ



การหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่างที่นำมาทดสอบ คำนวณได้จาก การนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่าง เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น สูตรการคำนวณเป็นดังนี้

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(\text{A}_{\text{control}} - \text{A}_{\text{sample}}) / \text{A}_{\text{control}}] \times 100$$

โดย $\text{A}_{\text{control}}$ = ค่าการดูดกลืนแสงสารตั้งต้น

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

วิธีนี้มีข้อดี คือ สามารถทำได้ง่าย มีความสะดวกและรวดเร็ว แต่มีข้อเสีย คือ สาร DPPH ค่อนข้างเสถียร ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนกับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย จึงเกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้มีค่าน้อยกว่าความเป็นจริง

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.9.1 Syed et al. (2015) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยใช้ตัวทำละลายเป็น อะซิโตน เอทานอล และคลอโรฟอร์ม ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp. และ *Pseudomonas* sp. วิเคราะห์ด้วยวิธี agar disc diffusion พบว่า สารสกัดสาหร่ายจากเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Klebsiella* sp. ได้ดีที่สุด สารสกัดจากอะซิโตนและคลอโรฟอร์ม สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. ได้ดีที่สุด และในการศึกษาได้ทำการตรวจสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดสาหร่าย ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทานอลของสาหร่าย *C. vulgaris* มีสารฟลาโวนอยด์, แทนนิน, สารประกอบฟีนอลิก, เทอร์ปีนอยด์, คาร์ดิแอกไกลโคไซด์, ซาโปนิน และคาร์โบไฮเดรต

2.9.2 Das and Pradhan (2010) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสาหร่าย 4 ชนิด คือ *Euglena viridis*, *Chlorella vulgaris*, *Microcystis aeruginosa* และ *Spirulina platensis* โดยใช้น้ำเอทานอล และเมทานอล เป็นตัวทำละลาย ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio fisheri*, *Escherichia coli* และ *Edwardsiella tarda* โดยใช้วิธี singer-disk diffusion ผลจากการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทานอลของสาหร่าย *E. viridis* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *P. putida* และ *E. coli* ได้

2.9.3 Entesar (2016) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดสาหร่ายขนาดเล็ก 5 สายพันธุ์ คือ *Nostoc caeruleum*, *Spirulina platensis*, *Cylindrospermum majus*, *Oscillatoria formosa* และ *Chlorella vulgaris* ที่สามารถแยกได้จากประเทศอียิปต์ โดยใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอล ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* รวมทั้งฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Geotrichum candidum* และ *Trichophyton mentagrophytes* วิเคราะห์โดยใช้วิธี agar well diffusion ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดหยาดของสาหร่าย *C. vulgaris* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด โดยยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae* และ *E. coli* ได้ และนำวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ที่สูงที่สุด พบว่า สารสกัดจากสาหร่าย *C. vulgaris* มีปริมาณฟีนอลิก 108.66 mg/g และฟลาโวนอยด์ 32.73 mg/g และผลการวิเคราะห์การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1000 µg/mL ให้ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระร้อยละ 133.1

2.9.4 Sujatha *et al.* (2012) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสาหร่ายสีเขียว 4 ชนิด คือ *Chaetomorpha antennina*, *Cladophora fascicularis*, *Spongomorpha indica* และ *Ulva fasciata* โดยใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอล ในการยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในช่องปาก 3 ชนิด คือ *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mitis* และ *Streptococcus mutans* วิเคราะห์โดยใช้วิธี agar disc diffusion ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากสาหร่าย *U. Fasciata* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ดีกว่าสาหร่าย *C. antennina*, *C. fascicularis* และ *S. indica* โดยสาหร่าย *C. fascicularis* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. viscosus* และ *S. mitis* ในขณะที่สาหร่าย *C. antennina* และ *S. Indica* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เพียง 1 ชนิด คือ *A. viscosus*

2.9.5 Ranga *et al.* (2010) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสาหร่าย 3 สายพันธุ์ คือ *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis* และ *Botryococcus braunii* โดยนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน เช่น เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, เอธิลอะซีเตท, อะซิโตน และเมทานอล ทดสอบกับเชื้อก่อโรค 13 สายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus subtilus*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus fecalis* และ *Yersinia enterocolitica* ด้วยวิธี agar well diffusion และ หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) ผลการทดลองพบว่าสารสกัดสาหร่าย *S. platensis* ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และเอธิลอะซีเตท มีการยับยั้งเชื้อ *B. subtilus* มากที่สุด 18.12 มิลลิเมตร และมีค่า MIC ที่ 200 ppm ในขณะที่สารสกัดสาหร่าย *H. pluvialis* ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม มีโซนการยับยั้ง *B. subtilus* สูงสุดที่ 17.32 มิลลิเมตรและมีค่า MIC ที่ 150 ppm ส่วนสารสกัดสาหร่าย *B. braunii* ที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตท มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. aerogenes* สูงสุดที่ 15.11 มิลลิเมตร และมีค่า MIC ที่ 300 ppm จึงสรุปได้ว่าสารสกัดสาหร่าย *S. platensis*, *H. pluvialis* และ *B. braunii* สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้

2.9.6 Sabirin *et al.* (2015) ได้ศึกษางานวิจัยนี้ของสาหร่าย *Caulerpa lentillifera* และ *Kappaphycus alvarezii* โดยนำสารสกัดจากสาหร่ายทะเลทั้งสองชนิดที่ถูกสกัดด้วยน้ำและเมทานอล มาทดสอบคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคติดเชื้อในช่องปาก *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus mutans* ด้วยวิธี agar disc diffusion ผลการทดลองพบว่าเมื่อตรวจวัดโซนการยับยั้ง สารสกัดสาหร่าย *C. lentillifera* และ *K. alvarezii* ด้วยเมทานอล มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *S. mutans*

2.9.7 Farasat et al. (2013) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก และ สารฟลาโวนอยด์ ของสารสกัดสาหร่ายสีเขียว 4 สายพันธุ์ คือ *Ulva clathrata*, *Ulva linza*, *Ulva flexuosa* และ *Ulva intestinalis* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล ทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า สารสกัดสาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยสารสกัดจาก สาหร่าย *U. clathrate* มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดจากสาหร่าย *U. linza*, *U. flexuosa* และ *U. intestinalis* ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงค่าร้อยละ การต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 90.3 และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.081 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และศึกษา สารประกอบฟีนอลิก และ สารฟลาโวนอยด์ พบว่า สารสกัดจากสาหร่าย *U. clathrate* มี สารประกอบฟีนอลิกสูงสุด 5.080 มิลลิกรัม GAE/g และมีสารฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 33.094 มิลลิกรัม RE/g

2.9.8 Rajendran et al. (2014) ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมี การยับยั้งเชื้อ ก่อโรค และการต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดสาหร่าย 5 สายพันธุ์ คือ *Tetraselmis* sp., *Dunaliella* sp., *Chlorella* sp., *Synechocystis* sp. และ *Oscillatoria* sp. สกัดสารโดยใช้ตัวทำ ละลาย อะซิโตน, เมทานอล, เอทานอล และคลอโรฟอร์ม พบว่า สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp., *Synechocystis* sp. และ *Oscillatoria* sp. ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด มีสารฟลาโวนอยด์ พบได้มากที่สุดในการสกัดที่สกัดด้วย อะซิโตน และ เมทานอล ส่วนสารอัลคาลอยด์ และสาร สปอโรนิน พบในสารสกัดทุกชนิด ยกเว้น สารสกัดจากอะซิโตน ของสาหร่าย *Synechocystis* sp. และ *Oscillatoria* sp. และนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า สารสกัดจากอะซิโตน และ เอทานอล ของสาหร่าย *Tetraselmis* sp. แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อ ได้มากที่สุด โดยยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่ 6.17 มิลลิเมตร และยับยั้งเชื้อ *Enterococcus* ที่ 4.05 มิลลิเมตร และเมื่อนำไปทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า สารสกัดจากสาหร่าย *Dunaliella* sp., *Chlorella* sp. และ *Synechocystis* sp. ที่สกัดด้วยอะซิโตน มีค่าการต้านอนุมูล อิศระที่ดีที่สุด

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่ายสกุล *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59

สารเคมี	ปริมาณ
1 M Tris Base	20 mL/L
Phosphate Buffer II ประกอบด้วย	1.0 mL/L
- Dipotassium Hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	108 g/L
- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	56 g/L
Solution A ประกอบด้วย	10 mL/L
- Ammonium chloride (NH_4Cl)	40 g/L
- Magnesium Sulfate Heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	10 g/L
- Calcium Chloride Dihydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	5 g/L
Hutner's Trace Element ประกอบด้วย	1.0 mL/L
- EDTA disodium salt	50 g/250 mL
- Zinc Sulfate Heptahydrate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	22 g/100 mL
- Boric acid (H_3BO_3)	11.4 g/200 mL
- Manganese (II) chloride Tatrahydrate ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	5.06 g/50 mL
- Cobalt (II) Sulfate Hexahydrate ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1.61 g/50 mL
- Copper (II) Sulfate Pentahydrate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	1.57 g/50 mL
- Ammonium Heptamolybdate tatrahydrate (NH_4) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4H ₂ O	1.10 g/50 mL
- Ferrous Sulfate heptahydrate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	4.99 g/50 mL
Glacial acetic acid	1.0 mL/L

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อก่อโรคในช่องปาก *S. mutans* สูตร Brain Heart Infusion

สารเคมี	ปริมาณ
อาหาร Brain Heart Infusion สำเร็จรูป	37 g/L
ประกอบด้วย	
- Calf Brains	7.7 g/L
- Beef Heart	9.8 g/L
- Proteose Peptone	10 g/L
- Dextrose	2 g/L
- Sodium Chloride	5 g/L
- Disodium Phosphate	2.5 g/L
Final pH 7.4±0.2	
Agar	15 g/L

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*,

C. albicans สูตร Mueller Hinton

สารเคมี	ปริมาณ
อาหาร Mueller Hinton สำเร็จรูป	21g/L
ประกอบด้วย	
- Beef Extract Powder	2 g/L
- Acid Digest of Casein	17.5 g/L
- Soluble Starch	1.5 g/L
Final pH 7.3±0.1	
Agar	15 g/L

3.1.4 เอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.98

3.1.5 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

3.1.6 วิตามินอี (α -tocopherol)

3.1.7 วิตามินซี (Ascorbic acid)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Bright Field Microscope)
2. เครื่องชั่งน้ำหนักที่ตำแหน่ง (Analytical Balance)
3. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
4. เครื่องเขย่า (Shaker)
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
6. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge)
8. ตู้เย็นเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับราย (Refrigerator)
9. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)
10. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric Flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร และ 100 มิลลิลิตร
11. กระจกตวง (Graduated Cylinder) ขนาด 100 มิลลิลิตร
12. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร
13. ปีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 250 มิลลิลิตร และ 1000 มิลลิลิตร
14. ขวดเก็บสารฝาเกลียว ยี่ห้อ Duran
15. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
16. หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Eppendorf)
17. หลอดเซนตริฟิวก์ (Falcon Tube)
18. ไมโครปิเปต (Micropipette)
19. ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tips)
20. เข็มเย็บเย็บ (Needle)
21. ห่วงเย็บเย็บ (Loop)
22. จานเพาะเชื้อ (Petri Dish)
23. กระจกใส่จานเพาะเชื้อ (Petri Dish Box)
24. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test Tube Rack)
25. หลอดทดลอง (Test tube)
26. เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum Pump)
27. กระดาษกรอง (Filter Papers)
28. ขวดสีชา (Vial)
29. ปากคีบ (Forceps)

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59

3.2.2 เชื้อก่อโรค *S. mutans* ATCC 25175, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC 10231

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 สภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

นำหัวเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59 จากหลอดอาหารเลี้ยงวางภายใต้ความเข้มแสง 3,720 ลักซ์ เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นเพาะเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Chlorella* ลงในอาหารเหลวสูตร TAP Medium (ภาคผนวก ก-1) ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่า (Orbital shaker) ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ภายใต้สภาวะความเข้มแสง 3,720 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (ภาคผนวก ข-2) และบันทึกอัตราการเจริญ (ภาคผนวก ค)

3.4.2 การเตรียมสารสกัดหยาบสาหร่าย

นำสาหร่าย *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน ปริมาตร 2 ลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 นาที นำส่วนเซลล์ที่ได้ไปอบในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเซลล์สาหร่ายแห้งมาชั่งน้ำหนัก และบดละเอียดด้วยโกร่ง แช่ในตัวทำละลายเอทานอล อัตราส่วนเอทานอล 10 มิลลิลิตรต่อเซลล์สาหร่ายแห้ง 1 กรัม แช่เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ และแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป (Syed *et al.* 2015)

3.4.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี agar well diffusion

3.4.3.1 การย้อมแกรมเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมสไลด์สำหรับการย้อมแบคทีเรีย ใช้ลูบเขี่ยเชื้อมา 1-2 โคโลนีจากอาหารแข็ง ทำการสเมียร์เชื้อให้เป็นแผ่นฟิล์มบางๆ นำมาผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง (Fix slide) หยดสารละลาย crystal violet จนท่วมสไลด์ ทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำ หยดสารละลายไอโอดีน ให้ท่วมสไลด์ พักทิ้งไว้ 1 นาที และหยด 95 % Ethanol เอียงสไลด์ไปมาจนกระทั่งสีน้ำเงินเริ่มจางแล้วจึงรีบล้างออกด้วยน้ำ หยด safranin ให้ท่วมทิ้งไว้ 30 วินาทีแล้วล้างออกด้วยน้ำ ชบน้ำด้วยผ้าหรือกระดาษ ทิ้งไว้ให้แห้ง (ภาคผนวก ข-4)

3.4.3.2 การเตรียมเชื้อ *S. mutans*

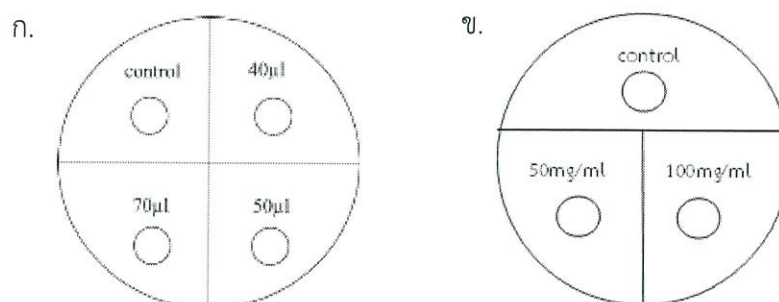
ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. mutans* ลงบนอาหารแข็ง Brain Heart Infusion (ภาคผนวก ก-2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ และนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาณ 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ *S. mutans* ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงอาหารเหลว 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และถ่ายเชื้อ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงอาหาร 9 มิลลิลิตร นำเชื้อมาวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.13

3.4.3.3 การเตรียมเชื้อก่อโรค

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ ลงบนอาหารแข็ง Mueller Hinton (ภาคผนวก ก-3) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเจือจางด้วย 0.85% นอมอลซาไลน์ (ภาคผนวก ก-4) และปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วย 0.5 McFarland standard (ภาคผนวก ก-5) (Balouiri *et al.*, 2015)

3.4.3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสาหร่ายในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. mutans*, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. Subtilis* และ *C. albicans* (ดัดแปลงจาก Jayshree *et al.*, 2016 และ Ibrahim *et al.*, 2015)

นำไม้พ่นสำลีที่ปราศจากเชื้อ จุ่มลงในเชื้อทดสอบ แล้วนำมาป้าย (Swab) ให้ทั่วอาหาร Brain Heart Infusion Agar (ภาคผนวก ก-2) สำหรับเชื้อ *S. mutans* และอาหาร Mueller Hinton Agar (ภาคผนวก ก-3) สำหรับเชื้อ *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. Subtilis* และ *C. albicans* ทั้งให้เชื้อแห้ง ทำการเจาะหลุม หยดสารสกัดสาหร่ายความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ปริมาณสารต่างกันคือ 40, 50 และ 70 ไมโครลิตร และเลือกปริมาณสารที่ดีที่สุดมาใช้ทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค โดยใช้ความเข้มข้นสารสกัดที่ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เอทานอลเป็นตัวควบคุม (รูปที่ 3.1) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเชื้อ



รูปที่ 3.1 ภาพวาดจำลองการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสาหร่าย

ก. ปริมาณสารสกัดที่ต่างกัน ข. ความเข้มข้นสารสกัดที่ต่างกัน

3.4.4 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสาหร่ายที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค (Minimal inhibitory concentration)

3.4.4.1 การเตรียมเชื้อ *S. mutans*

เพาะเลี้ยงเชื้อ *S. mutans* บนอาหารแข็ง Brain heart infusion (ภาคผนวก ก-2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เชื้อเชื้อจากอาหารแข็งมา 1 โคลินี้ ถ่ายลงในอาหารเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงอาหารเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อมา 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว 9 มิลลิลิตร วัดค่าความขุ่นให้อยู่ในช่วง 0.08-0.13 (10^8 CFU/mL) ทำการถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว 9 มิลลิลิตร นำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

3.4.4.2 การเตรียมเชื้อก่อโรคอื่น

เพาะเลี้ยงเชื้อ ลงบนอาหารแข็ง Mueller Hinton (ภาคผนวก ก-3) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางกับ 0.85% นอมอลซาไลน์ (ภาคผนวก ก-4) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วย 0.5 McFarland standard (ภาคผนวก ก-5) (Balouiri *et al.*, 2016)

3.4.4.3 ทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อก่อโรค (ดัดแปลงจากอมรรัตน์ และคณะ, 2551)

เตรียมหลอดทดลอง 12 หลอด เติมอาหารเลี้ยงเชื้อลงไปหลอดที่ 1-12 หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เติมสารสกัดที่มีความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงในหลอดที่ 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำการเจือจางสารสกัดแบบ two-fold dilution ไปยังหลอดที่ 2 ถึงหลอดที่ 11 เมื่อผสมสารเข้ากันแล้วให้ดูดสารในหลอดที่ 11 ทิ้งไป 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ในหลอดที่ 1-12 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ใช้อาหารผสมกับสารสกัดเป็นตัวควบคุม

3.4.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity (ดัดแปลงจาก Farasat *et al.*, 2013)

การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่าย ด้วยวิธี DPPH มีขั้นตอนดังนี้ นำสารสกัดสาหร่ายมาเจือจางความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยดูดสารสกัดมาปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.16 mM DPPH ที่ละลายในเอทานอล (ภาคผนวก ก-6) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

หลังจากนั้นนำมาอ่านผลด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ค่าการดูดกลืนแสง 517 นาโนเมตร โดยใช้วิตามินอี (α -tocopherol) และวิตามินซี (Ascorbic acid) เป็นตัวควบคุม คำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สมการต่อไปนี้

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[A-B]}{A} \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลาย DPPH

B คือ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายตัวอย่างที่ใส่สารละลาย DPPH

การประเมินค่า IC_{50} ของสารสกัดที่ต้านอนุมูลอิสระ ทำได้โดยการสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบกับค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ได้มาจากการคำนวณ

3.4.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่ม Complete Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยข้อมูลด้วยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS Version 20.0

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella sp.* KU , *Chlorella sp.* V55, *Chlorella sp.* B2-59 และ *Chlorella sp.* N11/59 ด้วยวิธี agar well diffusion

จากการทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella sp.* KU, *Chlorella sp.* V55, *Chlorella sp.* B2-59 และ *Chlorella sp.* N11/59 ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ด้วยวิธี agar well diffusion ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาณสารที่แตกต่างกัน คือ 40, 50 และ 70 ไมโครลิตร โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง ผลการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella sp.* KU และ *Chlorella sp.* V55 ที่ปริมาณสาร 40, 50 และ 70 ไมโครลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans*, *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ โดยปริมาณสาร 70 ไมโครลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด สารสกัดสาหร่าย *Chlorella sp.* KU ที่ปริมาณสาร 70 ไมโครลิตร มีบริเวณยับยั้งเชื้อเท่ากับ 11.53, 11.13 และ 9.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสกัดสาหร่าย *Chlorella sp.* V55 ที่ปริมาณสาร 70 ไมโครลิตร มีบริเวณยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 9.69, 10.26 และ 9.78 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่สารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella sp.* KU และ *Chlorella sp.* V55 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ได้ (ตารางที่ 4.1)

สำหรับสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella sp.* B2-59 และ *Chlorella sp.* N11/59 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. mutans*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* (ภาคผนวก ง)

ตารางที่ 4.1 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU และ *Chlorella* sp. V55 ด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาณสารที่ต่างกัน

สาหร่าย	เชื้อก่อโรค	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
		ปริมาณสาร 40 μ l	ปริมาณสาร 50 μ l	ปริมาณสาร 70 μ l
<i>Chlorella</i> sp. KU	<i>S. mutans</i>	8.65 \pm 1.23 ^b	10.24 \pm 1.48 ^{ab}	11.53 \pm 0.42 ^a
	<i>B. subtilis</i>	9.14 \pm 0.84 ^b	10.64 \pm 0.45 ^a	11.13 \pm 0.09 ^a
	<i>S. aureus</i>	8.22 \pm 0.90 ^a	8.94 \pm 0.55 ^a	9.58 \pm 0.90 ^a
	<i>E. coli</i>	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-
	<i>C. albicans</i>	-	-	-
<i>Chlorella</i> sp. V55	<i>S. mutans</i>	8.67 \pm 0.41 ^b	9.06 \pm 0.47 ^{ab}	9.69 \pm 0.40 ^a
	<i>B. subtilis</i>	8.79 \pm 0.22 ^c	9.57 \pm 0.18 ^b	10.26 \pm 0.21 ^a
	<i>S. aureus</i>	8.95 \pm 0.69 ^a	9.69 \pm 0.50 ^a	9.78 \pm 0.53 ^a
	<i>E. coli</i>	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-
	<i>C. albicans</i>	-	-	-

หมายเหตุ - เส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมมีขนาด 6 มิลลิเมตร

- เครื่องหมาย “-” ไม่มีการยับยั้ง

- ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

- ตัวอักษร a-b ในแนวนอนที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

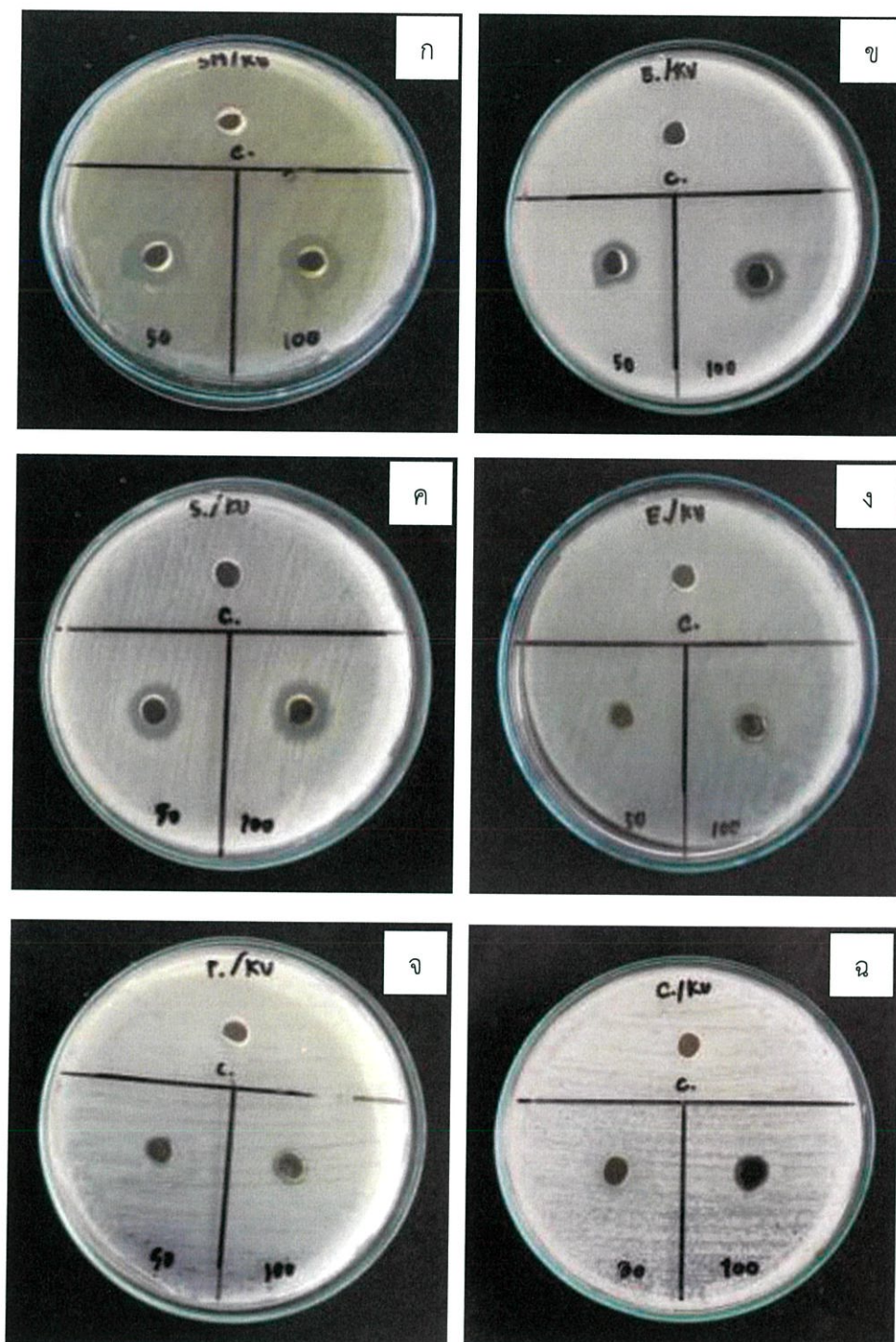
จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU ด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ปริมาณสาร 70 ไมโครลิตร พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อ *S. mutans*, *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ โดยมีบริเวณยับยั้งเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 12.42, 9.88 และ 10.32 มิลลิเมตร ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณสาร 70 ไมโครลิตร สารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. KU สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ได้ ซึ่งมีบริเวณยับยั้งเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 7.01, 7.36 และ 7.07 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1)

ตารางที่ 4.2 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อก่อโรค	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)	
	ความเข้มข้นสารสกัด	ความเข้มข้นสารสกัด
	50 mg/mL	100 mg/mL
<i>S. mutans</i>	12.42±0.80 ^a	13.41±0.48 ^a
<i>B. subtilis</i>	9.88±0.59 ^a	10.74±0.61 ^a
<i>S. aureus</i>	10.32±0.19 ^b	11.49±0.39 ^a
<i>E. coli</i>	-	7.01±0.45
<i>P. aeruginosa</i>	-	7.36±0.10
<i>C. albicans</i>	-	7.07±0.05

หมายเหตุ - เส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมมีขนาด 6 มิลลิเมตร

- เครื่องหมาย “-” ไม่มีการยับยั้ง
- ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ
- ตัวอักษร a-b ในแนวนอนที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.1 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. KU ด้วยวิธี agar well diffusion ต่อเชื้อก่อโรค ก) *S. mutans* ข) *B. subtilis* ค) *S. aureus* ง) *E. coli* จ) *P. aeruginosa* ฉ) *C. albicans*

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณสาร 70 ไมโครลิตร พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อ *S. mutans*, *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ โดยมีบริเวณการยับยั้งเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 10.41, 9.50 และ 7.93 มิลลิเมตร และที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณสาร 70 ไมโครลิตร สารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. V55 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ได้ โดยมีบริเวณยับยั้งเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 7.21, 7.44 และ 7.05 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.2)

ตารางที่ 4.3 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. V55 ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

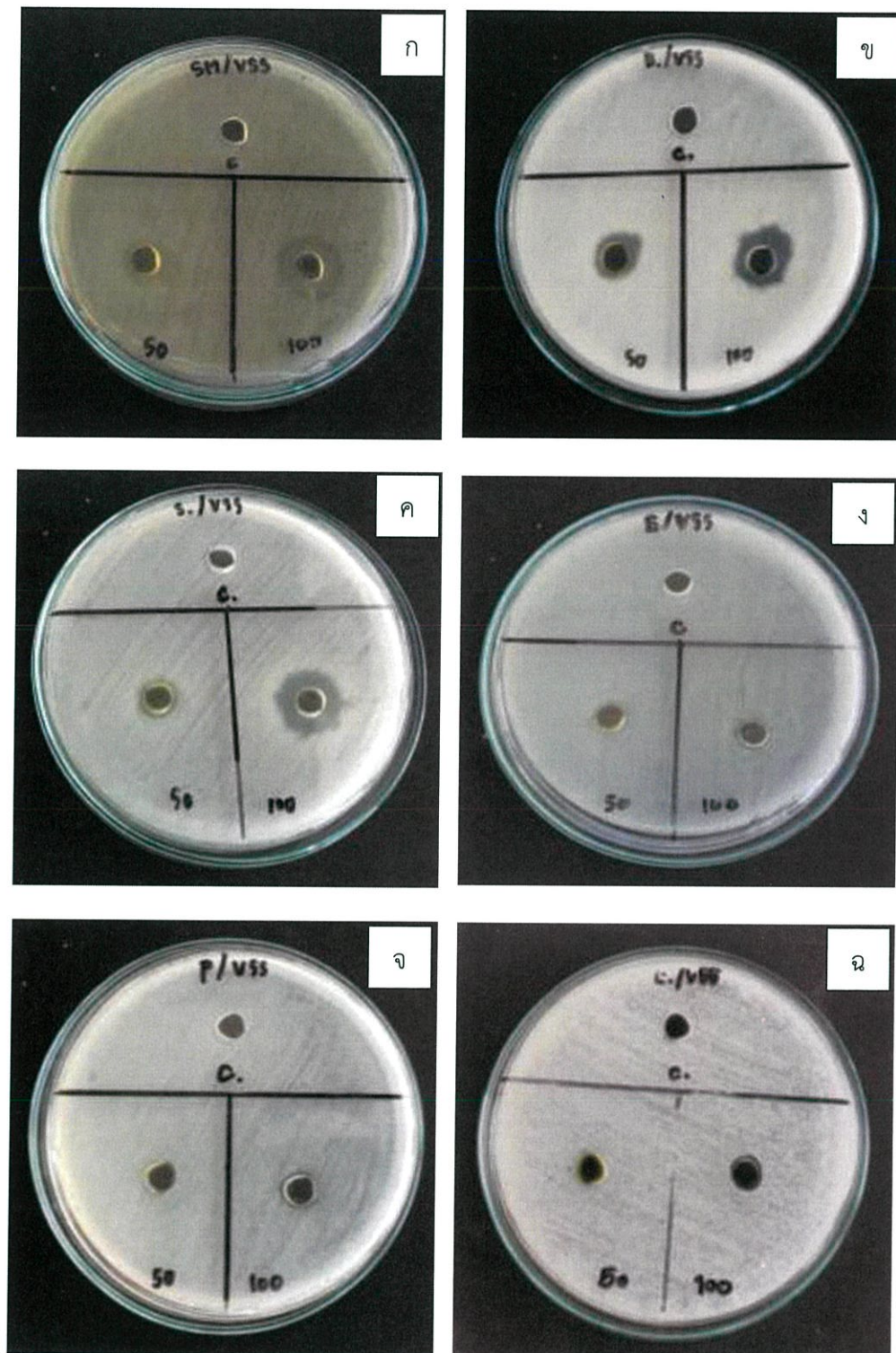
เชื้อก่อโรค	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)	
	ความเข้มข้นสารสกัด	ความเข้มข้นสารสกัด
	50 mg/mL	100 mg/mL
<i>S. mutans</i>	10.41±0.18 ^b	13.71±1.34 ^a
<i>B. subtilis</i>	9.50±0.86 ^b	12.09±0.58 ^a
<i>S. aureus</i>	7.93±0.31 ^b	13.77±1.12 ^a
<i>E. coli</i>	-	7.21±0.27
<i>P. aeruginosa</i>	-	7.44±0.26
<i>C. albicans</i>	-	7.05±0.41

หมายเหตุ - เส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมมีขนาด 6 มิลลิเมตร

- เครื่องหมาย “-” ไม่มีการยับยั้ง

- ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

- ตัวอักษร a-b ในแนวนอนที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.2 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. V55 ด้วยวิธี agar well diffusion ต่อเชื้อก่อโรค ก) *S. mutans* ข) *B. subtilis* ค) *S. aureus* ง) *E. coli* จ) *P. aeruginosa* ฉ) *C. albicans*

จากนั้นนำมาวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเชื้อระหว่างสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. KU และสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. V55 พบว่า สารสกัดสำหรับ *Chlorella* sp. KU สามารถยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ได้ดีกว่าสารสกัดสำหรับ *Chlorella* sp. V55 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่สารสกัดสำหรับ *Chlorella* sp. V55 สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ดีกว่าสารสกัดสำหรับ *Chlorella* sp. KU ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.4) ซึ่งจากผลการทดลองสรุปได้ว่า สารสกัดสำหรับ *Chlorella* sp. KU ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปากและเชื้อก่อโรคอื่นได้ดีที่สุด

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเชื้อระหว่างสารสกัดสำหรับ *Chlorella* sp. KU และ *Chlorella* sp. V55 ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้นของสาร		
	สกัดหยาบสำหรับ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	<i>Chlorella</i> sp. KU	<i>Chlorella</i> sp. V55
<i>S. mutans</i>	50	12.42±0.80 ^a	10.41±0.18 ^b
	100	13.41±0.48 ^a	13.71±1.34 ^a
<i>B. subtilis</i>	50	9.88±0.59 ^a	9.50±0.86 ^a
	100	10.74±0.61 ^b	12.09±0.58 ^a
<i>S. aureus</i>	50	10.32±0.19 ^a	7.93±0.31 ^b
	100	11.49±0.39 ^b	13.77±1.12 ^a

หมายเหตุ - ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ
 - ตัวอักษร a-b ในแนวนอนที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการศึกษางานวิจัยของ Sujatha *et al.* (2012) ที่ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสาหร่ายสีเขียว 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chaetomorpha antennina*, *Cladophora fascicularis*, *Spongomorpha indica* และ *Ulva fasciata* ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปาก *Streptococcus mutans* ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ทดสอบด้วยวิธี agar disc diffusion พบว่าสารสกัดสาหร่าย *U. fasciata* สามารถยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ได้ ซึ่งมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 2.83 มิลลิเมตร (เส้นรัศมี) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสาหร่าย *Chlorella sp. KU* และ *Chlorella sp. V55* สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ได้ดีกว่า และจากการศึกษาของ Ibrahim *et al.* (2015) ที่ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสาหร่าย *C. vulgaris* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า สารสกัดสาหร่าย *C. vulgaris* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* ได้ โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 6.58, 6 และ 8 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สาหร่าย *Chlorella sp. KU* และ *Chlorella sp. V55* สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus* ได้ดีกว่าเนื่องจากใช้ความเข้มข้นน้อยกว่าในการทดลอง แต่ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ได้ โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งใกล้เคียงกันกับงานวิจัยข้างต้น ทั้งนี้เนื่องจากสายพันธุ์สาหร่ายที่ใช้ในการทดลองอาจจะสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีกว่า

ปัจจัยของการสกัดสารสาหร่ายที่แตกต่างกัน มีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้แก่ (1) การใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน จะมีประสิทธิภาพในการสกัดสารออกมาได้แตกต่างกัน ซึ่งมีผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแตกต่างกัน (Gacheva and Gigova, 2014) เช่น เมทานอล มีขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่า มีสภาพขั้วที่แรงกว่าเอทานอล ทำให้สามารถแพร่กระจายเข้าสู่ชั้นผนังเซลล์ได้ดีกว่า จึงทำให้สกัดสารทางชีวภาพที่มีขั้วออกมาได้ดีกว่าและได้สารออกฤทธิ์ที่ต่างกัน (Jayshree *et al.*, 2016) (2) สภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย มีผลต่อองค์ประกอบของสารสกัดสาหร่าย เช่น อาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง เวลาในการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และรูปแบบในการเพาะเลี้ยง ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารสกัดสาหร่าย (Mashhadinejad *et al.*, 2017)

นอกจากนี้ยังพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย *Chlorella sp.* ที่มีชื่อว่า Chlorellin (fatty acid mixture) ที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอล ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบได้ (Gacheva and Gigova, 2014) และสารสกัดสาหร่าย *C. vulgaris* ที่สกัดด้วยเอทานอล จะสกัดสารที่ชื่อว่า Octadecylene ซึ่งเป็นสารต้านจุลชีพ (Adhoni *et al.*, 2016)

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสาหร่ายแดงให้เห็นว่า สารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. KU และ *Chlorella* sp. V55 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อยีสต์ได้ เนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดมีผลต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสามารถซึมผ่านเข้าผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างของผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่า ทำให้การซึมผ่านของสารสกัดนั้นเป็นไปได้ยาก (Alwathnani and Perveen, 2017) และแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นไขมันล้อมรอบเพียง 1 ชั้น เรียกว่า Cytoplasmic membrane และ ชั้น peptidoglycan สารสกัดสาหร่ายจึงเข้าทำลายได้ง่ายกว่า ซึ่งต่างจากแบคทีเรียแกรมลบจะมีชั้นไขมัน 2 ชั้น จึงช่วยปกป้องเซลล์จากสารต้านจุลชีพและทำให้เซลล์แบคทีเรียมีความต้านทานต่อสารสกัดสาหร่ายได้ดีขึ้น (Mashhadinejad *et al.*, 2017)

4.2 การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU และ *Chlorella* sp. V55 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (Minimum Inhibitory Concentration : MIC)

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. KU และ สารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. V55 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุด จึงเลือกนำมาศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU และ *Chlorella* sp. V55 โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบกับเชื้อก่อโรค 6 สายพันธุ์ คือ *S. mutans*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* จากผลการทดลองพบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. KU สามารถยับยั้งเชื้อ *S. mutans*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ได้โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 25, 50, 50, 100, 100 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. V55 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 6 สายพันธุ์ได้เช่นกัน โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 50, 6.25, 25, 100, 100 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) (ภาคผนวก-2)

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU และ *Chlorella* sp. V55

เชื้อทดสอบ	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (MIC) (mg/mL)	
	<i>Chlorella</i> sp. KU	<i>Chlorella</i> sp. V55
<i>S. mutans</i>	25	50
<i>B. subtilis</i>	50	6.25
<i>S. aureus</i>	50	25
<i>E. coli</i>	100	100
<i>P. aeruginosa</i>	100	100
<i>C. albicans</i>	100	100

จากการศึกษางานวิจัยของ Jayshree *et al.* (2012) ทำการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของ สารสกัดสาหร่าย *C. vulgaris* ด้วยตัวทำละลายเอทานอล โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้น 25 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 3.12, 25, 1.5 และ 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า สารสกัดสาหร่าย *Chlorella sp. KU* และ *Chlorella sp. V55* มีประสิทธิภาพในการ ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้น้อยกว่า เพราะมีค่า MIC ที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยข้างต้น แต่ สารสกัดสาหร่าย *Chlorella sp. V55* มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *S. aureus* ได้ เช่นเดียวกับงานวิจัย ทั้งนี้เนื่องจากสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella sp.* และวิธีการสกัดสารที่ใช้ในการ ทดสอบแตกต่างกัน จึงอาจทำให้ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่างกัน ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพในการ ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสาหร่ายด้วยวิธีการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ของสาหร่าย *Chlorella sp. KU* และ *Chlorella sp. V55* สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดสาหร่าย *Chlorella sp. KU* และ *Chlorella sp. V55* สามารถยับยั้งการ เจริญของเชื้อ *S. mutans*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี MIC จะให้ผลการทดสอบที่ดีกว่าการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion เนื่องจากวิธี MIC ทำให้ทราบถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ ซึ่งเป็นการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคโดยตรง ต่างจากวิธี agar well diffusion ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบเบื้องต้นโดยการแพร่ของสารสกัดสาหร่าย ทำให้สารที่มีโมเลกุลใหญ่ไม่สามารถ แพร่กระจายได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ

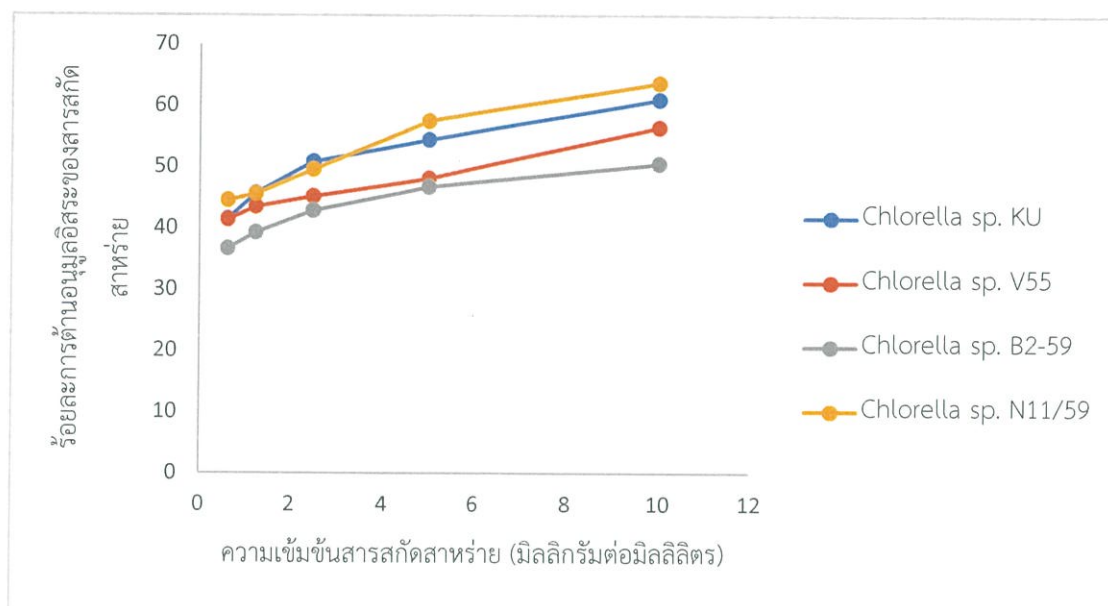
4.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity จากการนำสารสกัดหยาบสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. ได้แก่ *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59 ที่สกัดด้วยเอทานอล ทำการเจือจางสารสกัดหยาบให้มีความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร พบว่า เมื่อสารละลาย DPPH ที่มีสีม่วง ทำปฏิกิริยากับสารสกัดหยาบสาหร่าย สีของสารละลาย DPPH จะมีการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเขียวอมเหลืองเพิ่มมากขึ้น จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Chlorella* sp. N11/59 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นสูงที่สุดที่ทำการทดสอบ มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เท่ากับ 63.73 รองลงมาเป็นสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Chlorella* sp. KU และ *Chlorella* sp. V55 มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 60.67 และ 56.50 สำหรับสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. B2-59 มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด มีค่าเท่ากับ 50.52 และที่ความเข้มข้น 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำการทดสอบ พบว่า สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Chlorella* sp. N11/59, *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55 และ *Chlorella* sp. B2-59 มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 44.55, 41.51, 41.40 และ 36.69 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้น โดยที่สารมาตรฐานวิตามินอี มีค่าการร้อยละการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 82.49 และสารมาตรฐานวิตามินซี มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 88.78 (ตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.3)

ตารางที่ 4.6 แสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐานวิตามินอี วิตามินซี และสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella sp.* 4 สายพันธุ์

ความเข้มข้นของสารสกัด สาหร่าย (mg/mL)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดสาหร่าย				ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของ สารมาตรฐาน	
	<i>Chlorella sp.</i> KU	<i>Chlorella sp.</i> V55	<i>Chlorella sp.</i> B2-59	<i>Chlorella sp.</i> N11/59	วิตามินอี	วิตามินซี
0.625	41.51±0.94 ^e	41.40±0.18 ^e	36.69±0.48 ^e	44.55±0.79 ^e	47.38±0.96 ^e	45.18±1.10 ^e
1.5	45.84±0.34 ^d	43.50±0.36 ^d	39.31±0.83 ^d	45.60±1.13 ^d	52.51±0.83 ^d	55.14±1.58 ^d
2.5	50.84±0.48 ^c	45.18±0.48 ^c	42.87±0.48 ^c	49.68±1.13 ^c	62.05±0.96 ^c	65.72±1.26 ^c
5	54.40±1.37 ^b	48.11±1.26 ^b	46.75±0.18 ^b	57.55±0.63 ^b	71.28±1.01 ^b	74.01±0.81 ^b
10	60.67±0.85 ^a	56.50±0.36 ^a	50.52±0.90 ^a	63.73±0.48 ^a	82.49±0.79 ^a	88.78±1.27 ^a

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตาราง หมายถึง ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
ตัวอักษรในแนวตั้ง (a-e) ที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

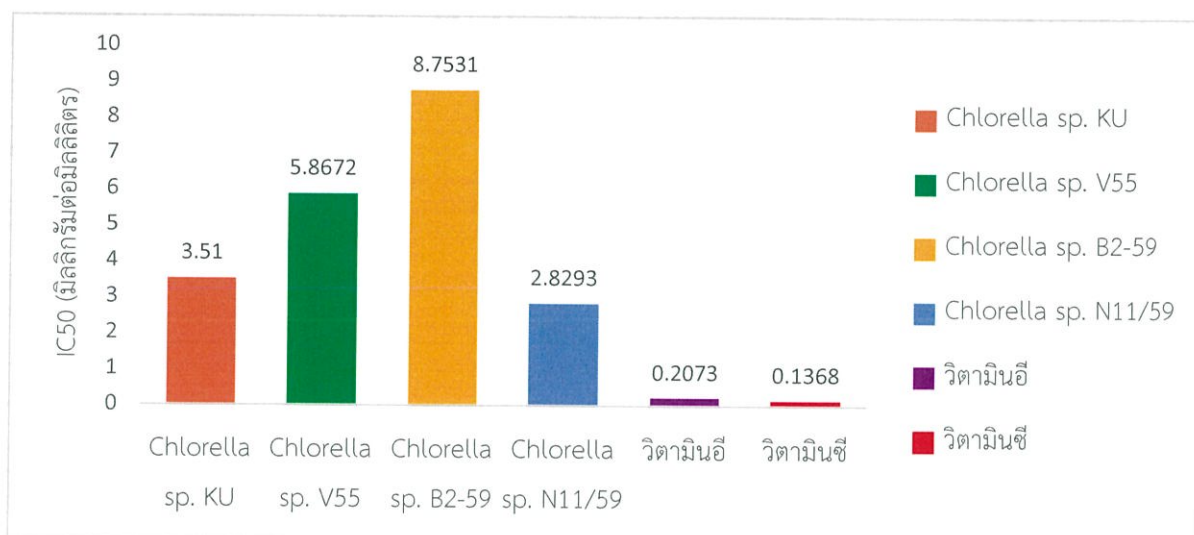


รูปที่ 4.3 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์

นอกจากนี้ สามารถคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสาหร่ายที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลงร้อยละ 50 ได้ ถ้าค่า IC_{50} ยิ่งต่ำ แสดงว่า สารสกัดสามารถต้านอนุมูลอิสระได้สูง จากผลการทดสอบ พบว่า สารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. N11/59 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.8293 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55 และ *Chlorella* sp. B2-59 ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.5100, 5.8672 และ 8.7531 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีวิตามินอีและวิตามินซีเป็นตัวเปรียบเทียบ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.2073 และ 0.1368 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.4)

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสาหร่ายและสารมาตรฐาน ที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลงร้อยละ 50 (IC_{50})

ตัวอย่างสารสกัด	IC_{50} (mg/mL)
<i>Chlorella</i> sp. KU	3.5100
<i>Chlorella</i> sp. V55	5.8672
<i>Chlorella</i> sp. B2-59	8.7531
<i>Chlorella</i> sp. N11/59	2.8293
วิตามินอี	0.2073
วิตามินซี	0.1368



รูปที่ 4.4 แสดงค่า IC₅₀ ของสารสกัดหยาบสาหร่าย 4 สายพันธุ์ สารมาตรฐานวิตามินอี และสารมาตรฐานวิตามินซี

จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59 มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ali *et al.* (2016) ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดสาหร่ายสีเขียว *chlorella* sp. ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความบริสุทธิ์ร้อยละ 70 พบว่า ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 0.225 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดสาหร่าย *chlorella* sp. มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 42.00 และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซี เท่ากับ 94.6 ซึ่งจะเห็นได้ว่า สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. N11/59 จะมีค่าใกล้เคียงกันกับสาหร่าย *chlorella* sp. เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Jayshree *et. al.* (2016) ได้ทำการทดลอง โดยนำสารสกัดสาหร่าย *Chlorella vulgaris* สกัดโดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลร้อยละ 95 นำมาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า สารสกัดสาหร่าย *C. vulgaris* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 92.57 และมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.397 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยที่สารมาตรฐานวิตามินซี มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 94.08 และมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.127 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่างานวิจัยเบื้องต้นของ Jayshree *et. al.* (2016) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่า สารสกัดหยาบสาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง อาจเนื่องจากชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารต่างชนิดกัน มีผลต่อค่าการต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งวิธีการสกัดสารและสปีชีส์ของสาหร่ายที่แตกต่างกัน ทำให้การแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระออกมาได้แตกต่างกัน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสาหร่ายในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ของสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59 ที่สกัดด้วยเอทานอล มาทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. mutans*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ด้วยวิธี agar well diffusion จากการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU และ *Chlorella* sp. V55 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณสาร 70 ไมโครลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans*, *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ โดย *Chlorella* sp. KU มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 12.42, 9.88 และ 10.32 มิลลิเมตร ตามลำดับ และ *Chlorella* sp. V55 มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.41, 9.50 และ 7.93 มิลลิเมตร ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณสาร 70 ไมโครลิตร สารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU และ *Chlorella* sp. V55 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ได้ โดย *Chlorella* sp. KU มีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 7.01, 7.36 และ 7.07 มิลลิเมตร ตามลำดับ และ *Chlorella* sp. V55 มีบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 7.21, 7.44 และ 7.05 มิลลิเมตร ตามลำดับ และนำมาหาค่า MIC พบว่าสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Chlorella* sp. KU มีค่า MIC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ เท่ากับ 25, 50, 50, 100, 100 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ *Chlorella* sp. V55 มีค่า MIC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 50, 6.25, 25, 100, 100 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดสาหร่ายที่สกัดด้วยเอทานอล โดยทำการเจือจางสารสกัดหยาบให้ได้ความเข้มข้น 10, 5, 2.5, 1.5 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อหาค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระและค่า IC_{50} จากการทดลอง พบว่า สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Chlorella* sp. N11/59 มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เท่ากับ 63.73 ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.8293 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. B2-59 มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด เท่ากับ 50.52 ค่า IC_{50} เท่ากับ 8.7531 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. อาจทำการศึกษาสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสายพันธุ์อื่นเพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในช่องปากและเชื้อก่อโรคอื่น เช่น *Haematococcus pluvilis*
2. อาจทำการศึกษาหองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบสาหร่าย เพื่อจะได้ทราบข้อมูลที่ชัดเจนของสารที่สำคัญในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
3. ศึกษาการสกัดสารสาหร่ายโดยใช้ตัวทำละลายชนิดอื่น เพื่อเป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารอ้างอิง

- กรณิศ วิรานูวัตร และ ชัชวาล ฐานมโนวงศ์. 2549. น้ำยาบ้วนปากชนิดแกรนูโลฟูของสารสกัดชาเขียว ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อในช่องปาก. วารสารคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 9-10
- เจนจิรา จิรัมย์ และ ประสงค์ สีหนาม. 2554. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและ กลไกการ เกิดปฏิกิริยา. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์. ภาควิชาเคมี คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, 59-70
- ชุตินันท์ ไตรรัตน์วรกุล. 2554. ทันตกรรมป้องกันในเด็กและวัยรุ่น. กรุงเทพฯ : ภาควิชาทันตกรรม สำหรับเด็กคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ทัศนีย์ นวลชัย และ จิตรดา ดวงแก้ว. (2559). ผลของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งเจริญเติบโต ของเชื้อ *Aromonas hydrophila*. แก่นเกษตร.
- นิตติพงษ์ ศิริวงศ์ และ เอกชัย ชูเกียรติโรจน์. 2552. การดื้อยาปฏิชีวนะของ *Staphylococcus aureus* และแนวทางการควบคุม. สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง, 27(4): 347-358.
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. 2556. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสาร วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม วิทยาลัยพลังงาน และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา.
- ปรมาภรณ์ จิวพัฒนกุล, พีรพัฒน์ กวีวงศ์ประเสริฐ, วิบุลย์ ไพศาลกอบฤทธิ์ และ ทิพาพร วงศ์สุรสิทธิ์. 2555. ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรต่อเชื้อก่อโรคทางทันตกรรม. บท วิชาการ ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์และทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 5(1): 34-41.
- ยุวดี พีรพรพิศาล. 2546. สหรัยวิทยา. เชียงใหม่ : ภาควิชาวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่. ลัดดา วงศ์รัตน์. 2539. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน. กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศรมน สุทิน. 2559. วิตามินกับอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีหัวเฉียวเฉลิมพระ เกียรติ. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์กายภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัว เฉียวเฉลิมพระ เกียรติ.
- ศิริลักษณ์ หอมละเอียต. 2557. ฤทธิ์การยับยั้งไปโอฟิล์มของเชื้อ *Streptococcus mutans* จากสาร สกัดใบกะทือ. วารสารวิทยาศาสตร์. สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ศิริวรรณ ศรีสรณ์. 2555. การศึกษาสภาวะการเลี้ยงจุลสาหร่ายที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนและไขมัน. วารสาร วิศวกรรมศาสตร์ เดือนกรกฎาคม-ธันวาคม มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
- สุภร ตันตินิรามย์. 2559. สาเหตุ การรักษาและการป้องกันโรคฟันผุในเด็กปฐมวัย (ECC). J Prapokklao Hosp Clin Med Educat Center, 33(2) : 167-175.

- อมรรัตน์ สีสุทอง, กัลยาภรณ์ จันตรี และ ศรีสุดา หาญภาคภูมิ. 2559. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากวัชพืชบางชนิด. วารสารวิจัยและพัฒนาวไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์.กลุ่มวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต.
- Adhoni, S. A., Thimmappa, S. C. and Kaliwal, B. 2016. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Chorella vulgaris* isolated from Unkal Lake. Journal of Coastal Life Medicine, 4(5): 368-373.
- Agwa, O .K. and Abu, G. O. 2016. Influence of Various Nitrogen Sources on Biomass and Lipid Production by *Chlorella vulgaris*. British Biotechnology Journal, 15(2): 1-13.
- Ali, H. E. A., Shanab, S. M. M., State Mervat, A. M. A., Shalaby E. A. A., Demerdash, U. M. N. and Abdullah M. A.. 2014. Screening of Microalgae for Antioxidant Activities, Carotenoids and Phenolic Contents. Applied Mechanics and Materials, 625: 156-159.
- Alwathnani, H. and Perveen K. 2017. Antibacterial activity and morphological changes in human pathogenic bacteria caused by *Chlorella vulgaris* extracts. Biomedical Research, 28(4): 1610-1614.
- Apetroaie, C. C., Mikkola, R., Andersson, MA., Teplova, V., Suominen, I., Johansson, T. and Salkinoja S. M. 2008. *Bacillus subtilis* and *B. mojavensis* strains connected to food poisoning produce the heat stable toxin amyloisin. Journal of Applied Microbiology, 1976–1985.
- Balouiri, M., Sadiki, M. and Idnsouda, S. K. 2016. methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6: 71-79.
- Cassidy, K. O. 2011. Evaluating algal growth at different temperatures. Biosystems and Agricultural Engineering Lexington, Kentucky.
- Chowdhury, M. M., Kubra, K., Hossain M. B., Mustafa, M. G., Jainab, T., Karim M. R. and Mehedy, M. E. 2015. Screening of Antibacterial and Antifungal Activity of Freshwater and Marine Algae as a Prominent Natural Antibiotic Available in Bangladesh. International Journal of Pharmacology, 11(7): 828-833.
- Das, B. K. and Pradhan J. 2010. Antibacterial properties of selected freshwater microalgae against pathogenic bacteria. Indian J. Fish, 57(2): 61-66.

- Entesar A. A. 2016. Antimicrobial Activity of Microalgal Extracts Isolated From Baharia Oasis, Egypt. *Global Advanced Research Journal of Microbiology*, 5(3): 33-41.
- Farasat, M., Ali, R., Nejad, K. and Namjooyan, F. (2013). Antioxidant Properties of two Edible Green Seaweeds From Northern Coasts of the Persian Gulf. *Jundishapur Journal of Natural*, 8(1): 47-52.
- Frank, J. F. 1988. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Food Technol*, 42(4): 192-193.
- Gacheva, G. V. and Gigova L. G.. 2014. Biological activity of microalgae can be enhanced by manipulating the cultivation temperature and irradiance. *Central European Journal of Biology*, 9(12): 1168-1181.
- Gong, Q., Feng, Y., Kang, L., Luo, M. and Yang J. 2014. Effects of light and pH on cell density of *Chlorella vulgaris*. *Energy Procedia*.
- Gross, E. L., Beall, C. J., Kutsch, S. R., Firestone, N. D., Leys, E. J. and Griffen A. L. 2012. Beyond *Streptococcus mutans*: Dental Caries Onset Linked to Multiple Species by 16S rRNA Community Analysis. *PLoS ONE*. 7(10)
- Henrard, A. A., Rosa, G. M., Moraes, L., Morais, M. G. and Costa, J. A. V. 2015. The cultivation of microalgae *Cyanobium* sp. and *Chlorella* sp. in different culture media and stirring setting. *African Journal of Microbiology Research*, 9(21): 1431-1439.
- Ibrahim, K., Ramil, R., Rashid, A. H. A. and Yusof Y. A. M. 2015. Antimicrobial Property of Water and Ethanol Extract *Chlorella vulgaris*: A Value-Added Advantage for a New Wound Dressing Material. *International Medical Journal*, 22 (5): 399-401.
- Jarriyawattanachai, W., Chaveerachb, P. and Chokesajjawateeb, N. 2016. Antimicrobial Activity of Thai-herbal Plants against Food-borne Pathogens *E. coli*, *S. aureus* and *C. jejuni*. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 11: 20 – 24.
- Jayshree, A., Jayashree, S. and Thangaraju N. 2012. Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *International Journal of Current Research and Review*, 4 (7): 33-38.

- Jayshree A., Jayashree, S. and Thangaraju, N. 2016. *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*: Effective Antioxidant, Antibacterial and Anticancer Mediators. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 78(5): 575-581.
- Krasowska, A., Biegalska, A., Augustyniak, D., Aov, M., Richert, M. and Aukaszewicz M. 2014. Isolation and Characterization of Phages Infecting *Bacillus subtilis*. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. 1-10.
- Krzysciak, W., Pluskwa, K. K., Jurczak, A. and Koscielniak, D. 2013. The pathogenicity of the *Streptococcus* genus. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 32: 1361–1376.
- Kumar H. D. and Singh, H. N. 1971. A Textbook on Algae. Affiliated East-West Press PVT. Ltd. NewDelhi, india. 200.
- Lai, P. F. and Sun, T. C.. 2017. Optimizing Extraction Process and Characterization of Antioxidant Ingredients from *Chlorella Sorokiniana*. MOJ Food Process and Technology, 5(1): 1-10.
- Lee, J. H. 2014. Anti-bacterial Effect of Marine Algae against Oral-borne Pathogens. Research Journal of Medicinal Plant, 8(4): 196-203.
- Lee, W. H. and Rosenbaum, M. (2003). *Chlorella* The sun-powered supernutrient and its beneficial properties. *Chlorlla europe*.
- Lucas, S. H., Rozan, P., Deremaux, L. G., Baert, B. and Violle N. 2016. Benefits of Preventive Administration of *Chlorella* sp. on Visceral Pain and Cystitis Induced by a Single Administration of Cyclophosphamide in Female Wistar Rat. Journal of Medicinal Food, 19(5) : 450–456.
- Mahfuzur R. Shah, YuanmeiLiang , Jay J. Cheng, and Maurycy Daroch. 2016. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis* : From Single Cell to High Value Commercial Products. Frontiers in Plant Science, 1-28.
- Mashhadinejad, A., Zamani, H. and Sarmad, J. 2017. Effect of growth conditions and extraction solvents on enhancement of antimicrobial activity of the microalgae *Chlorella vulgaris*. Pharmaceutical and Biomedical Research, 2(4): 65-73.
- Moulin, M. D. and Fairbrother, J. M. 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Veterinary Research, BioMed Central, 30(2-3): 299-316.

- Mousavi, N. S., Mehramuz, B., Sadeghi, J., Alizadeh, N., Oskouee M. A. and Kafil H. S. 2017. The pathogenesis of *Staphylococcus aureus* in autoimmune diseases. *Microbial Pathogenesis*. 1-16.
- Nadeem, S. G., Shafiq, A., Hakim, S. T., Anjum, Y. and Kazm S. U. 2013. Effect of Growth Media, pH and Temperature on Yeast to Hyphal Transition in *Candida albicans*. *Open Journal of Medical Microbiology*, 3: 185-192.
- Nasution, A. I. 2013. Virulence Factor and Pathogenicity of *Candida albicans* in Oral Candidiasis. *World Journal of Dentistry*, 4(4): 267-271.
- Procopio, R. E., Silva, I. R., Martins, M. K., Azevedo, J. L. and Araujo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5): 466-471.
- Rai, M. P., Gautam, T. and Sharma N. 2015. Effect of Salinity, pH, Light Intensity on Growth and Lipid Production of Microalgae for Bioenergy Application. *Journal of Biological Sciences*, 15(4): 260-267.
- Rajendran, N., Selvan, K. B., Piriya, S. P., Logeswari, V., Kathiresan, E., Tamilselvi, A. and Vennison, J. S. 2014. Phytochemicals, antimicrobial and antioxidant screening from five different marine microalgae. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*. 78-85.
- Ranga A. R., Harshavardhan A. R. and Aradhya S. M. 2010. Antibacterial properties of *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Botryococcus braunii* microalgal extracts. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 4(3): 807-817
- Ranga, A. R. and Ravishankar, G. A. 2018. Algae as Source of Functional Ingredients for Health Benefits. *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal*. 14(2): 001-004.
- Richmond A. 1986. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Inc. Boca Raton Florida. 528.
- Sabirin, F., Kazi, J. A., Ibrahim, I. S. and Rashit M. M. 2015. Screening of Seaweeds Potential Against Oral Infections. *Journal Of Applied Sciences Research*, 11(15): 1-6.
- Saddam, H. A., Yusaf, T. and Raed, A. A. 2014. Biofuels from the Fresh Water Microalgae *Chlorella vulgaris* (FWM-CV) for Diesel Engines. *Energies*, 7: 1829-1851.

- Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman J. W., and Prince A. S.. 2005 Pathogen–Host Interactions in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. American Journal of Respiratory and Critical care medicine, 171: 1209–1223.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. and Garcia C. V. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*. Renewable and Sustainable Energy, 35: 265-278.
- Sanmukh, S., Bruno, B., Ramakrishnan, U., Khairnar, K., Swaminathan, S. and Paunikar W. 2014. Bioactive Compounds Derived from Microalgae Showing Antimicrobial Activities. Journal of Aquaculture Research & Development. 5(3).
- Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M. and Mendes M. J. S. 2013. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. Journal of Medical Microbiology, 62: 10–24.
- Seyfabadi, J., Ramezani, Z. and Khoeyi Z. A. 2011. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. Journal of Applied Phycology, 23: 721–726.
- Sharma, A. K., Sahoo P. K. and Singhal S. 2015. Influence Of Different Nitrogen And Organic Carbon Sources On Microalgae Growth And Lipid Production IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 10(1): 48-53.
- Singh, S. P. and Singh, P. 2015. Effect of temperature and light on the growth of algae species. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 50: 431–444.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman, S., Yuan Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K. S., Wu, Z., Paulsen I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S. and Olson M. V. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature, 406: 959-964.
- Sujatha, L., Govardhan T. L. and Rangaiah G. S. 2012. Antibacterial activity of green seaweeds on oral bacteria. Indian Journal of Natural Products and Resources, 3(3) : 328-333.

- Syed, S., Arasu, A. and Ponnuswamy I. 2015. The Uses of *Chlorella vulgaris* as Antimicrobial Agent and as a Diet: the Presence of Bio-active Compounds which caters the Vitamins, Minerals in General. International Journal of Bio-Science and Bio-Technology, 7(1) : 185-190.
- Tang, G. and Suter, P. M. 2011. Vitamin A, nutrition, and health values of algae: *Spirulina*, *Chlorella*, and *Dunaliella*. Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences, 1: 111-118.
- Tozzi, A. E., Caprioli, A., Minelli, F., Gianviti, A., Petris L. D., Edefonti, A., Montini, G., Ferretti, A., Palo, T. D., Gaido, M., Rizzoni, G., and the Hemolytic Uremic Syndrome Study Group. 2003. Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infections Associated with Hemolytic Uremic Syndrome, Italy, 1988–2000. Emerging Infectious Diseases, 9(1): 106-108.
- Widjaja, A., Chien, C. C. and Ju Y. H. 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 40: 13-20.
- Yadav, K. and Prakash, S. 2016. Dental Caries. Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, 6(53): 1-7.
- Zeng, L. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenicity and antibiotic resistance. University of Florida.
- Zhang, X., Hu, X. and Rao X. 2017 Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* toxins. Microbiological Research.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ ก.1 สูตรอาหาร TAP medium

สารเคมี	ปริมาณ
1 M Tris Base	20 mL/L
Phosphate Buffer II	2.0 mL/L
ประกอบด้วย	
- Dipotassium Hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	108 g/L
- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	56 g/L
Solution A	10 mL/L
ประกอบด้วย	
- Ammonium chloride (NH_4Cl)	40 g/L
- Magnesium Sulfate Heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	10 g/L
- Calcium Chloride Dihydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	5 g/L
Hutner's Trace Element	1.0 mL/L
ประกอบด้วย	
- EDTA disodium salt	50 g/250 mL
- Zinc Sulfate Heptahydrate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	22 g/100 mL
- Boric acid (H_3BO_3)	11.4 g/200 mL
- Manganese (II) chloride Tetrahydrate ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	5.06 g/50 mL
- Cobalt (II) Sulfate Hexahydrate ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1.61 g/50 mL
- Copper (II) Sulfate Pentahydrate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	1.57 g/50 mL
- Ammonium Heptamolybdate tetrahydrate (NH_4) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4H ₂ O	1.10 g/50 mL
- Ferrous Sulfate heptahydrate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	4.99 g/50 mL
Glacial acetic acid	1.0 mL/L

เตรียมสารละลายดังตาราง เติมน้ำกลั่นปริมาณ 1 ลิตร ละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*

ตารางที่ ก.2 สูตรอาหาร Brain Heart Infusion (BHI)

สารเคมี	ปริมาณ
อาหาร Brain Heart Infusion สำเร็จรูป	37 g/L
ประกอบด้วย	
- Calf Brains	7.7 g/L
- Beef Heart	9.8 g/L
- Proteose Peptone	10 g/L
- Dextrose	2 g/L
- Sodium Chloride	5 g/L
- Disodium Phosphate	2.5 g/L
Final pH 7.4±0.2	
Agar	15 g/L

ชั่งอาหาร 37 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ

ตารางที่ ก.3 สูตรอาหาร Mueller Hinton

สารเคมี	ปริมาณ
อาหาร Mueller Hinton สำเร็จรูป	21g/L
ประกอบด้วย	
- Beef Extract Powder	2 g/L
- Acid Digest of Casein	17.5 g/L
- Soluble Starch	1.5 g/L
Final pH 7.3±0.1	
Agar	15 g/L

ชั่งอาหาร 21 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลาย Normal saline 0.85%

ตารางที่ ก.4 ส่วนประกอบ Normal saline 0.85%

สารเคมี	ปริมาณ
Sodium Chloride (NaCl)	8.5 g/L

เติมน้ำกลั่นปริมาณ 1 ลิตร ละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลาย McFarland standard No. 0.5

ตารางที่ ก.5 ส่วนประกอบ McFarland standard No. 0.5

สารเคมี	ปริมาณ
Conc. H ₂ SO ₄ 1%	995 mL
Barium Chloride Dihydrate (BaCl ₂ •2H ₂ O) 1%	5 mL

การเตรียมสารละลาย

เตรียม Conc. H₂SO₄ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณ 1 ลิตร และเตรียม BaCl₂•2H₂O 1 กรัม ละลายให้น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย Conc. H₂SO₄ ปริมาณ 995 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย BaCl₂•2H₂O ปริมาณ 5 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน และนำมาบรรจุให้หลอดทดลองปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 2-30 องศาเซลเซียส เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนใช้งาน และตรวจสอบความขุ่นทุกเดือน

การเตรียมสารละลาย DPPH

ตารางที่ ก.6 ส่วนประกอบสารละลาย DPPH

สารเคมี	ปริมาณ
2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH)	6.3 mg
Absolute Ethanol	100 mL

ชั่งสาร DPPH 2.4 มิลลิกรัม ปรับปริมาณด้วย Absolute Ethanol ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บรรจุในขวดสีชา

หมายเหตุ ควรใช้ทันทีหลังจากเตรียมสารละลายเสร็จ หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีอายุการใช้งาน 1-3 วัน

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการทดลอง

ข-1 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย

นำหัวเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59 จากหลอดอาหารเลี้ยงมาวางภายใต้ความเข้มแสง 3,720 ลักซ์ เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นเพาะเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ ลงในอาหารเหลวสูตร TAP Medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่า (Orbital shaker) ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ภายใต้สภาวะความเข้มแสง 3720 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส

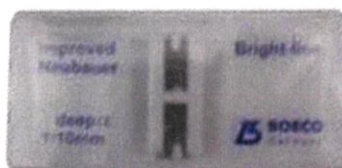


รูปที่ ข.1 แสดงสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อสาหร่ายสกุล *Chlorella* sp.

ข-2 การนับจำนวนเซลล์สาหร่าย

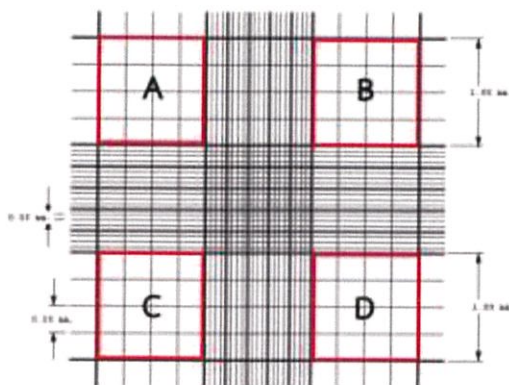
ข-2.1 ลักษณะของฮีมาไซโตมิเตอร์

การนับจำนวนเซลล์สาหร่ายสกุล *Chlorella* ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) ซึ่งเป็นอุปกรณ์สำหรับการนับเซลล์ ประกอบด้วย ส่วนที่เป็นสไลด์ ทำด้วยวัสดุที่เป็นแก้วรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า มีช่องว่างสำหรับใส่สารตัวอย่าง และกระจกปิดสไลด์ (ดังรูปที่ ข-2) โดยภายในสไลด์จะมีตารางสี่เหลี่ยมทั้งหมด 9 ช่อง ขนาด 1 มิลลิเมตร มีความลึก 0.1 มิลลิเมตร ในการนับจำนวนเซลล์จะนับที่บริเวณตาราง A, B, C และ D ประกอบด้วย 16 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 0.25 มิลลิเมตร (ดังรูปที่ ข-3)



รูปที่ ข.2 แสดงลักษณะของฮีมาไซโตมิเตอร์

ที่มา : <https://labglobal.co.th/product/counting-chamber-v-shape-boeco/>



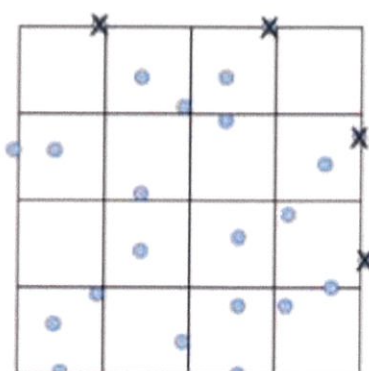
รูปที่ ข.3 แสดงลักษณะตารางบนฮีมาไซโตมิเตอร์และช่องสำหรับการนับเซลล์

ที่มา : <https://www.microscope.com/omano-plain-glass-hemocytometer-with-cover-slips.html>

ข-2.2 วิธีการนับจำนวนเซลล์

1. ทำการวางกระจกปิดสไลด์ลงบนสไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์
2. ทำการเจือจางตัวอย่างสาหร่ายในอัตราส่วน 1:9 (สาหร่าย:น้ำ) ใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างมาปริมาตร 10 ไมโครลิตร วางปลายปิเปตบริเวณช่องว่างระหว่างสไลด์และกระจกปิดสไลด์ และค่อยๆปล่อยสารตัวอย่างลงไป ตัวอย่างจะไหลเข้าไปจนเต็มพื้นที่ตาราง
3. นำตัวอย่างมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ปรับเลนส์ใกล้วัตถุเป็นกำลังขยาย 40 เท่า และทำการนับจำนวนเซลล์ บริเวณตาราง A, B, C และ D (ดังรูปที่ ข-3)

หมายเหตุ ถ้าเซลล์สาหร่ายทับเส้นให้เลือกนับแบบใดแบบหนึ่ง เช่น ทับเส้นแนวนอน และเส้นแนวขวาให้นับ (ไม่นับซ้าย-ล่าง) หรือ ทับเส้นแนวล่างและเส้นแนวซ้ายให้นับ (ไม่นับบน-ขวา) (ดังรูปที่ ข-4)



รูปที่ ข.4 ตัวอย่างวิธีการนับเซลล์สาหร่าย

ที่มารูป : <http://www.socmucimm.org/using-hemocytometer-count-cells/>

ข-2.3 การคำนวณจำนวนเซลล์

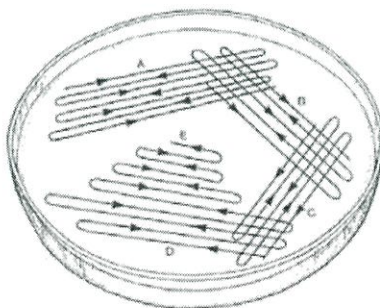
การนับจำนวนเซลล์ จะสามารถคำนวณปริมาตรน้ำได้จาก พื้นที่ตาราง × ความลึก โดยพื้นที่ช่อง A, B, C และ D มีความกว้างและความยาว เท่ากับ 1 มิลลิเมตร และมีความลึกเท่ากับ 0.1 มิลลิเมตร

$$\begin{aligned} \text{ปริมาตรน้ำในช่อง A, B, C และ D จะมีค่า} &= \text{ความกว้าง} \times \text{ความยาว} \times \text{ความลึก} \\ &= 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} \\ &= 0.1 \text{ cm} \times 0.1 \text{ cm} \times 0.01 \text{ cm} \\ &= 0.0001 \text{ cm}^3 \text{ หรือ } 0.0001 \text{ mm} \\ &= 10^{-4} \text{ mm} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น จำนวนเซลล์ที่นับได้} &= (A + B + C + D) \div 4 = E \\ \text{ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์} &= \text{จำนวนเซลล์ที่นับได้} \times \text{พื้นที่ตาราง} \\ &= E \times 10^4 \text{ cells /ml} \end{aligned}$$

ข-3 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ Cross streak

1. เตรียมอาหาร Mueller Hinton Agar สำหรับเลี้ยงเชื้อ
2. ใช้ลูปเขี่ยเชื้อเผาไฟให้ร้อนแดง พักทิ้งไว้ประมาณ 10-15 วินาที รอให้เย็น
3. ใช้ลูปเขี่ยเชื้อจากจานเพาะเลี้ยงมา 1-2 โคโลนี จากนั้นลากเส้นเป็นระนาบเดียวกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4-5 เส้น
4. เผลลูปเพื่อฆ่าเชื้อทุกครั้ง จากนั้นลากเชื้อจากรอยขีดแรกมายังรอยขีดที่สอง ให้ตั้งฉากกับรอยขีดแรกโดยรอยขีดของเชื้อจะไม่ทับกับเส้นแรก ทำเช่นเดียวกันประมาณ 3-4 ระนาบ
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
6. จากนั้นนำเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวไปศึกษารูปร่างลักษณะ



รูปที่ ข.5 แสดงลักษณะวิธีการ Cross Streak

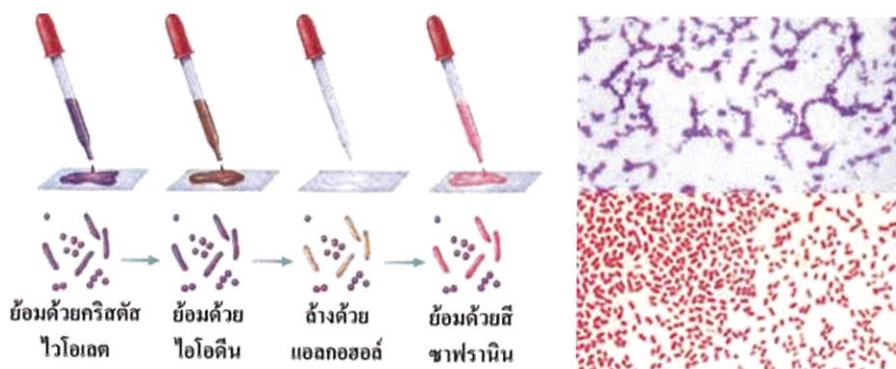
ที่มา : <http://anonmicrobiology.blogspot.com/2013/07/blog-post.html>

ข-4 การย้อมสีแกรม (gram staining)

การย้อมแกรม (gram staining) เป็นเทคนิคหนึ่งในการย้อมสีเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อศึกษารูปร่างลักษณะ และจัดจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ แบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) และ แบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) เนื่องจากโครงสร้างผนังเซลล์ (cell wall) มีแตกต่างกัน จึงทำให้การติดสีเซลล์มีความต่างกัน ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวก จะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) และแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของซาฟรานิน (safranin)

ขั้นตอนการย้อมแกรม มีดังนี้

1. เตรียมสไลด์สำหรับการย้อมแกรม โดยทำการล้างสไลด์ด้วยน้ำยาซักล้าง และล้างด้วยน้ำสะอาด เช็ดให้แห้ง เพื่อไม่ให้มีฝุ่นหรือคราบไขมันเกาะบนสไลด์
2. หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนสไลด์ประมาณ 1 หยด จากนั้นใช้ลูบเปียะเชื้อลงบนสไลด์ที่เตรียมไว้ และเกลี่ยเชื้อให้กระจาย (Smear) จนเกิดเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ พักทิ้งไว้ให้แห้ง
3. ทำการตรึงเชื้อ (Fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์ โดยการนำสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อทิ้งไว้จนแห้งแล้วนำไปผ่านไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง เพื่อให้เชื้อไม่หลุดออกขณะย้อมสี
4. หยดสีคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเททิ้ง
5. หยดสารละลายไอโอดีน (Iodine) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที เติสารละลายทิ้ง สารละลายไอโอดีนจะทำหน้าที่เป็น มอแดนท์ (mordant) ช่วยให้เซลล์ติดสีย้อมได้ดีขึ้น
6. ล้างสีออกด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 95 % (Ethyl alcohol) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อเป็นเวลาประมาณ 15 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น
7. หยดสีซาฟรานิน (Safranin) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 15-30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์



รูปที่ ข.6 แสดงการย้อมสีแกรมและลักษณะการติดสีของแบคทีเรีย

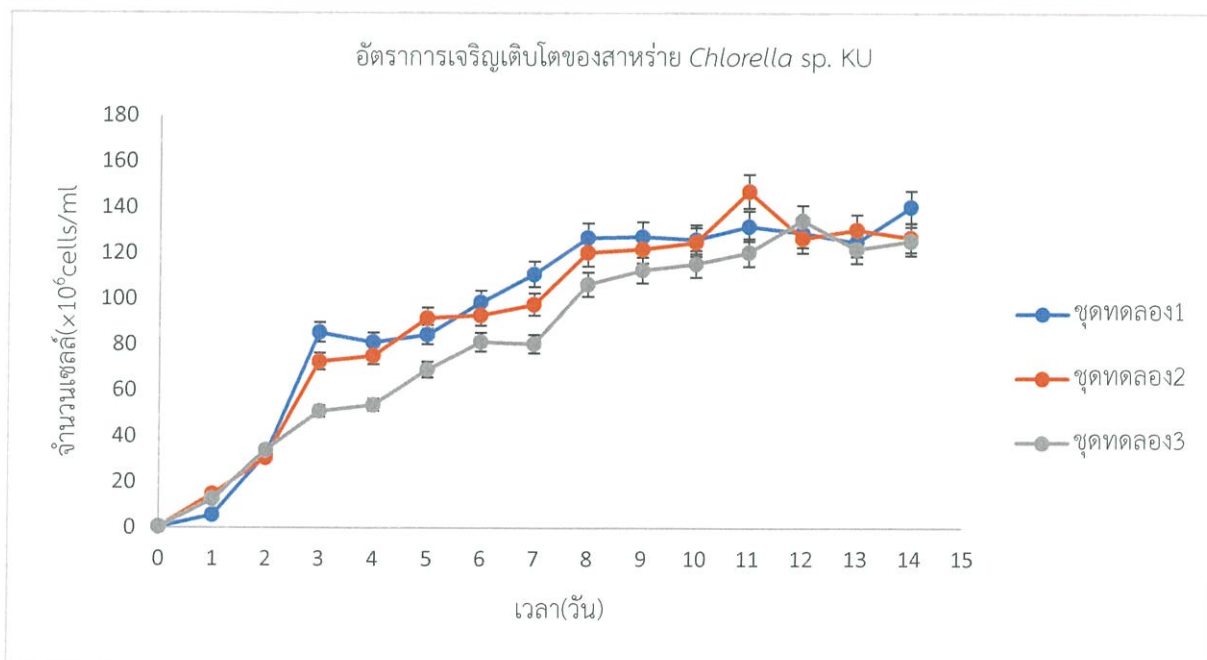
ที่มา : http://119.46.166.126/self_all/selfaccess12/m6/684/lesson1-4/

ภาคผนวก ค

อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายสกุล *Chlorella* sp.

ตารางที่ ค.1 แสดงจำนวนเซลล์เฉลี่ยของสาหร่าย *Chlorella* sp. KU

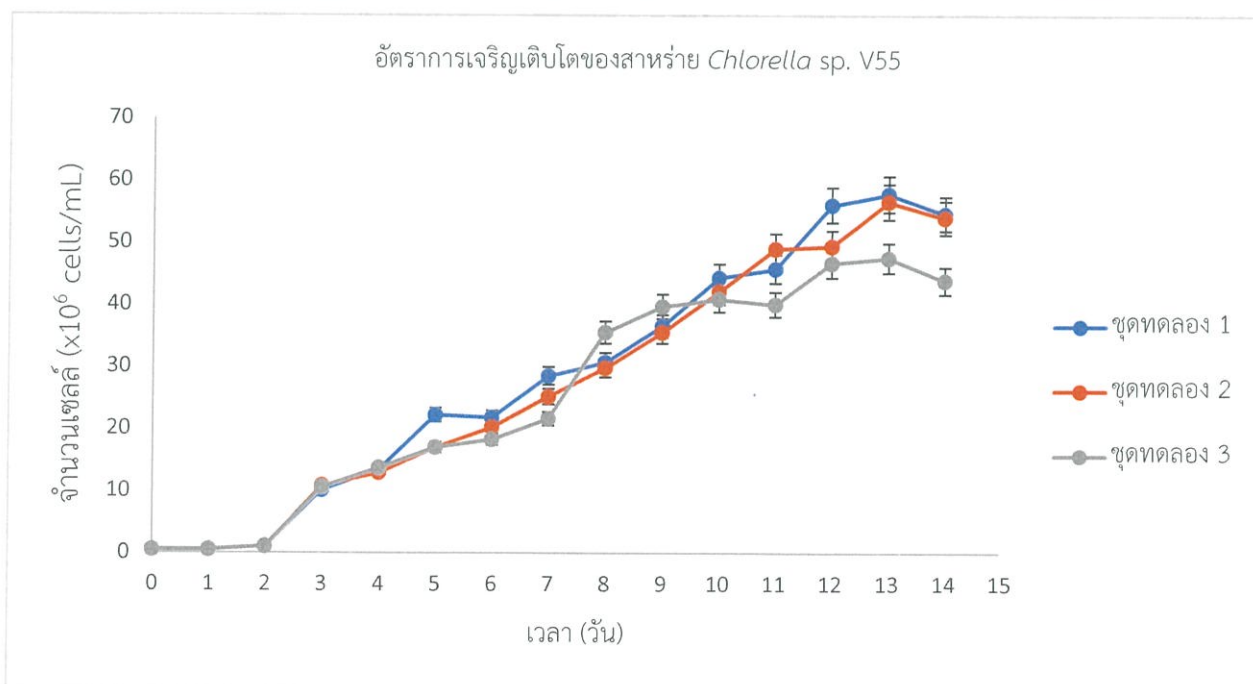
สาหร่าย	วันที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
		ชุดทดลอง 1	ชุดทดลอง 2	ชุดทดลอง 3
<i>Chlorella</i> sp. KU	0	0.51×10^6	0.48×10^6	0.51×10^6
	1	5.72×10^6	14.75×10^6	12.47×10^6
	2	32.03×10^6	30.73×10^6	34.10×10^6
	3	85.50×10^6	72.75×10^6	51.00×10^6
	4	81.25×10^6	75.25×10^6	53.75×10^6
	5	84.50×10^6	91.75×10^6	69.25×10^6
	6	98.75×10^6	93.00×10^6	81.25×10^6
	7	111.00×10^6	97.75×10^6	80.50×10^6
	8	127.00×10^6	120.50×10^6	106.50×10^6
	9	127.50×10^6	122.0×10^6	112.75×10^6
	10	126.25×10^6	125.00×10^6	115.50×10^6
	11	132.00×10^6	147.25×10^6	120.50×10^6
	12	129.25×10^6	126.75×10^6	134.50×10^6
	13	125.00×10^6	130.50×10^6	122.00×10^6
	14	140.50×10^6	127.00×10^6	125.50×10^6



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานแสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. KU

ตารางที่ ค.2 แสดงจำนวนเซลล์เฉลี่ยของสาหร่าย *Chlorella* sp. V55

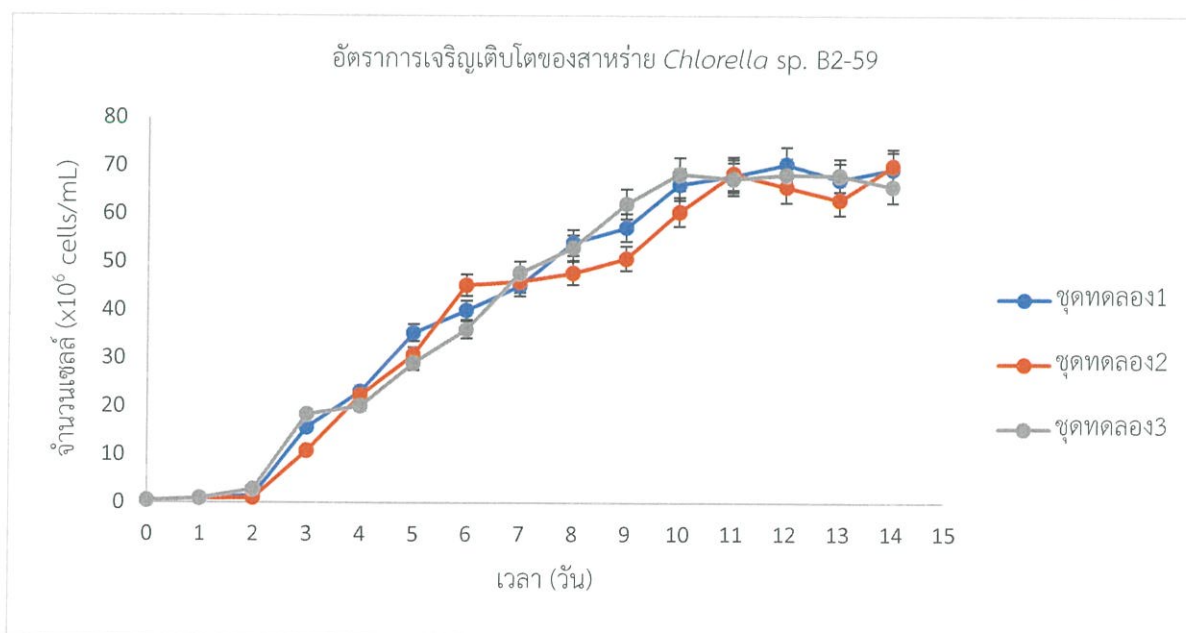
สาหร่าย	วันที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
		ชุดทดลอง 1	ชุดทดลอง 2	ชุดทดลอง 3
<i>Chlorella</i> sp. V55	0	0.49×10^6	0.50×10^6	0.48×10^6
	1	0.50×10^6	0.55×10^6	0.49×10^6
	2	1.00×10^6	1.03×10^6	1.01×10^6
	3	10.13×10^6	10.82×10^6	10.58×10^6
	4	13.42×10^6	12.90×10^6	13.67×10^6
	5	22.21×10^6	16.97×10^6	16.97×10^6
	6	21.80×10^6	20.17×10^6	18.25×10^6
	7	28.50×10^6	25.17×10^6	21.58×10^6
	8	30.67×10^6	29.75×10^6	35.50×10^6
	9	36.50×10^6	35.50×10^6	39.67×10^6
	10	44.33×10^6	42.08×10^6	40.83×10^6
	11	45.75×10^6	49.00×10^6	40.00×10^6
	12	56.08×10^6	49.42×10^6	46.67×10^6
	13	57.83×10^6	56.58×10^6	47.5×10^6
	14	54.65×10^6	54.00×10^6	43.83×10^6



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานแสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. V55

ตารางที่ ค.3 แสดงจำนวนเซลล์เฉลี่ยของสาหร่าย *Chlorella* sp. B2-59

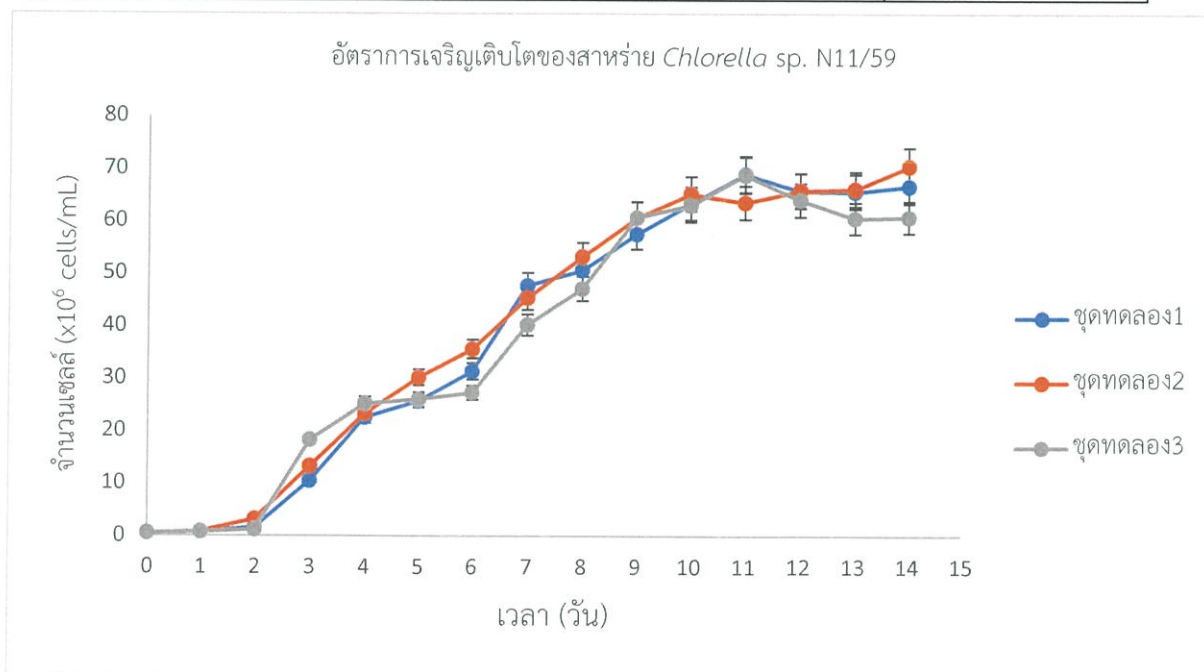
สาหร่าย	วันที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
		ชุดทดลอง 1	ชุดทดลอง 2	ชุดทดลอง 3
<i>Chlorella</i> sp. B2-59	0	0.50×10^6	0.48×10^6	0.48×10^6
	1	0.98×10^6	0.88×10^6	0.93×10^6
	2	1.56×10^6	1.05×10^6	2.80×10^6
	3	15.70×10^6	10.80×10^6	18.40×10^6
	4	23.13×10^6	22.34×10^6	20.08×10^6
	5	35.33×10^6	30.75×10^6	29.00×10^6
	6	40.00×10^6	45.25×10^6	35.98×10^6
	7	45.17×10^6	46.00×10^6	47.75×10^6
	8	54.08×10^6	47.75×10^6	53.00×10^6
	9	57.25×10^6	50.80×10^6	62.18×10^6
	10	66.25×10^6	60.50×10^6	68.38×10^6
	11	68.00×10^6	68.50×10^6	67.38×10^6
	12	70.50×10^6	65.75×10^6	68.25×10^6
	13	67.25×10^6	63.00×10^6	68.13×10^6
	14	69.45×10^6	70.13×10^6	65.75×10^6



รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานแสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. B2-59

ตารางที่ ค.4 แสดงจำนวนเซลล์เฉลี่ยของสาหร่าย *Chlorella* sp. N11/59

สาหร่าย	วันที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
		ชุดทดลอง 1	ชุดทดลอง 2	ชุดทดลอง 3
<i>Chlorella</i> sp. N11/59	0	0.50×10^6	0.48×10^6	0.49×10^6
	1	0.84×10^6	0.83×10^6	0.75×10^6
	2	1.58×10^6	3.15×10^6	1.21×10^6
	3	10.50×10^6	13.25×10^6	18.27×10^6
	4	22.58×10^6	23.33×10^6	25.16×10^6
	5	25.68×10^6	30.15×10^6	26.00×10^6
	6	31.33×10^6	35.56×10^6	27.25×10^6
	7	47.67×10^6	45.33×10^6	40.17×10^6
	8	50.58×10^6	53.17×10^6	47.08×10^6
	9	57.50×10^6	60.58×10^6	60.67×10^6
	10	63.33×10^6	65.17×10^6	63.00×10^6
	11	68.92×10^6	63.50×10^6	68.75×10^6
	12	65.75×10^6	65.83×10^6	64.00×10^6
	13	65.58×10^6	66.08×10^6	60.50×10^6
	14	66.67×10^6	70.42×10^6	60.72×10^6



รูปที่ ค.4 กราฟมาตรฐานแสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. N11/59

ภาคผนวก ง

ผลการทดลอง

ง-1 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสาหร่ายสกุล *Chlorella* ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ตารางที่ ง.1 บริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU ที่ปริมาณสารต่างกัน

เชื้อทดสอบ	ปริมาณสารสกัด สาหร่าย (ไมโครลิตร)	บริเวณยับยั้งที่วัดได้ (มิลลิเมตร)			บริเวณยับยั้ง เฉลี่ยที่วัดได้ (มิลลิเมตร)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
<i>S. mutans</i>	40	8.24	10.03	7.67	8.65
	50	11.02	11.17	8.53	10.24
	70	11.34	12.01	11.25	11.53
	control	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	40	10.08	8.82	8.53	9.14
	50	11.13	10.54	10.25	10.64
	70	11.22	11.05	11.12	11.13
	control	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	40	7.26	9.05	8.34	8.21
	50	8.31	9.22	9.30	8.94
	70	8.54	10.06	10.13	9.57
	control	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	control	0	0	0	0

ตารางที่ ง.2 บริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. V55 ที่ปริมาณสารต่างกัน

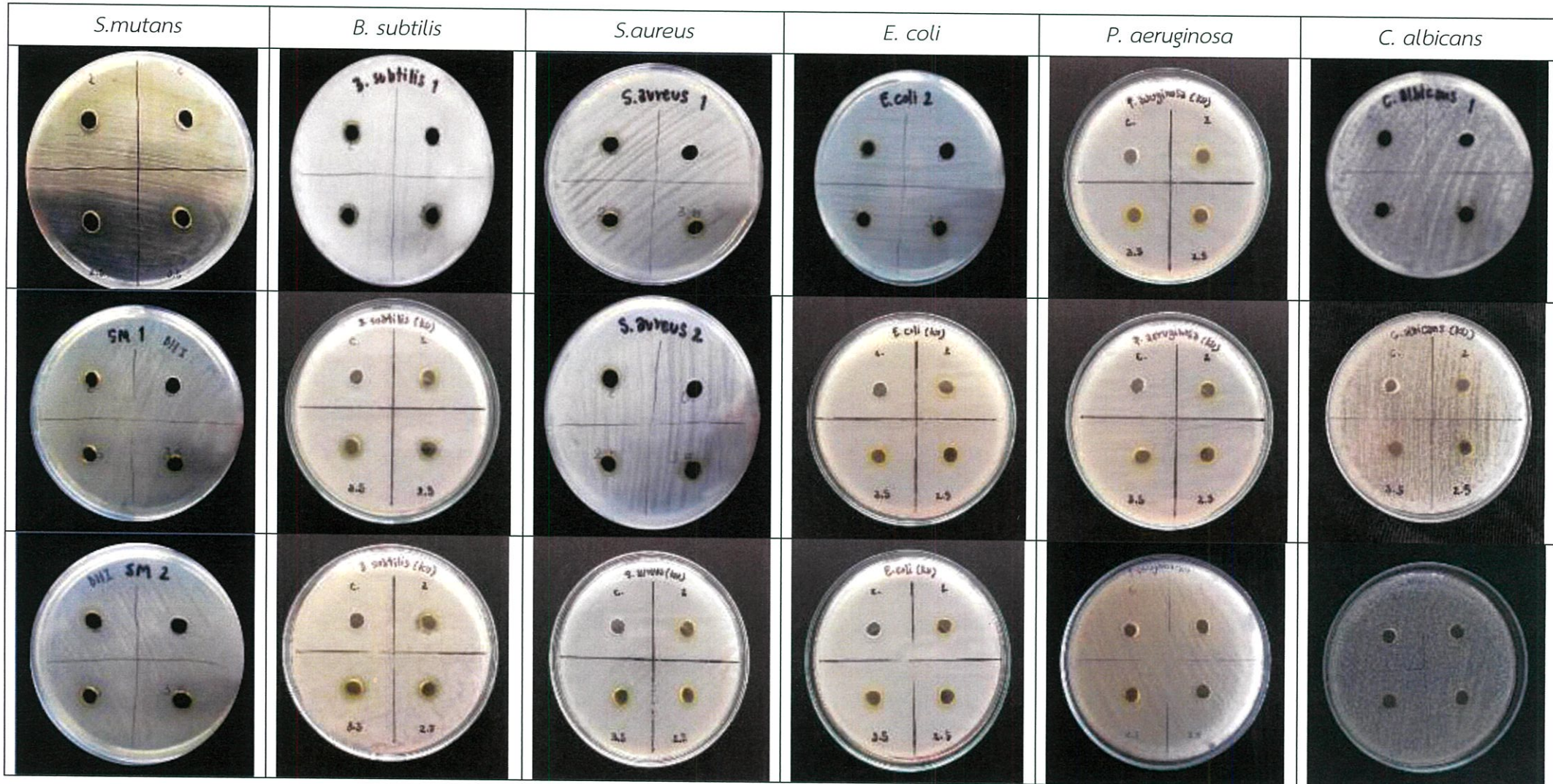
เชื้อทดสอบ	ปริมาณสารสกัดหยาบสาหร่าย (ไมโครลิตร)	บริเวณยับยั้งที่วัดได้ (มิลลิเมตร)			บริเวณยับยั้งเฉลี่ยที่วัดได้ (มิลลิเมตร)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
<i>S. mutans</i>	40	8.21	9.02	8.77	8.67
	50	8.53	9.41	9.25	9.06
	70	9.27	10.06	9.74	9.69
	control	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	40	9.02	8.76	8.58	8.79
	50	9.54	9.41	9.76	9.57
	70	10.38	10.02	10.39	10.26
	control	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	40	9.08	9.53	8.23	8.95
	50	9.12	10.04	9.92	9.69
	70	9.17	10.15	10.01	9.78
	control	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	control	0	0	0	0

ตารางที่ ง.3 บริเวณการยับยั้งของสารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. B2-59 ที่ปริมาณสารต่างกัน

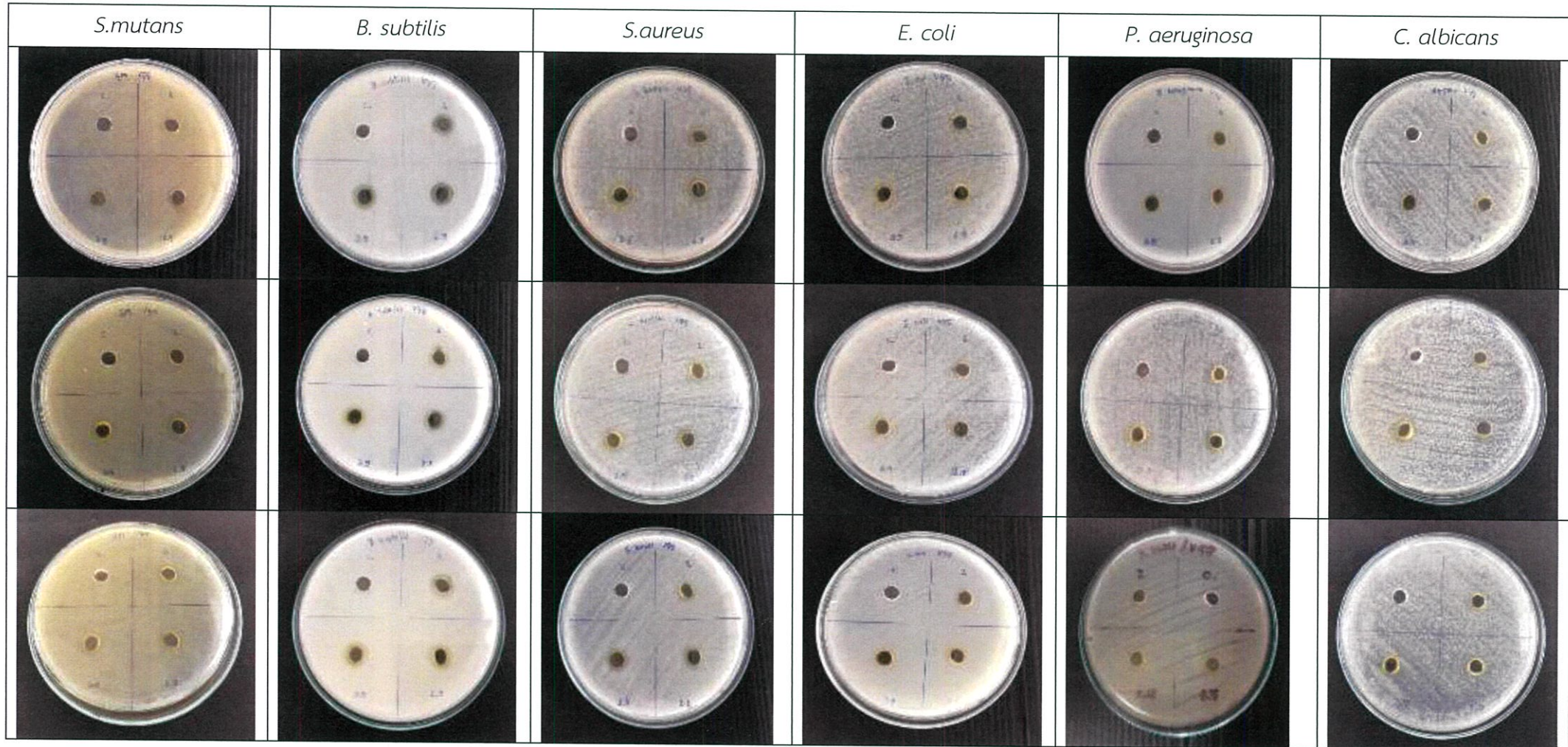
เชื้อทดสอบ	ปริมาณสารสกัดหยาบสาหร่าย (มิลลิกรัม)	บริเวณยับยั้งที่วัดได้ (มิลลิเมตร)			บริเวณยับยั้งเฉลี่ยที่วัดได้ (มิลลิเมตร)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
<i>S. mutans</i>	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	control	0	0	0	0

ตารางที่ ง.4 บริเวณการยับยั้งของสารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. N11/59 ที่ปริมาณสารต่างกัน

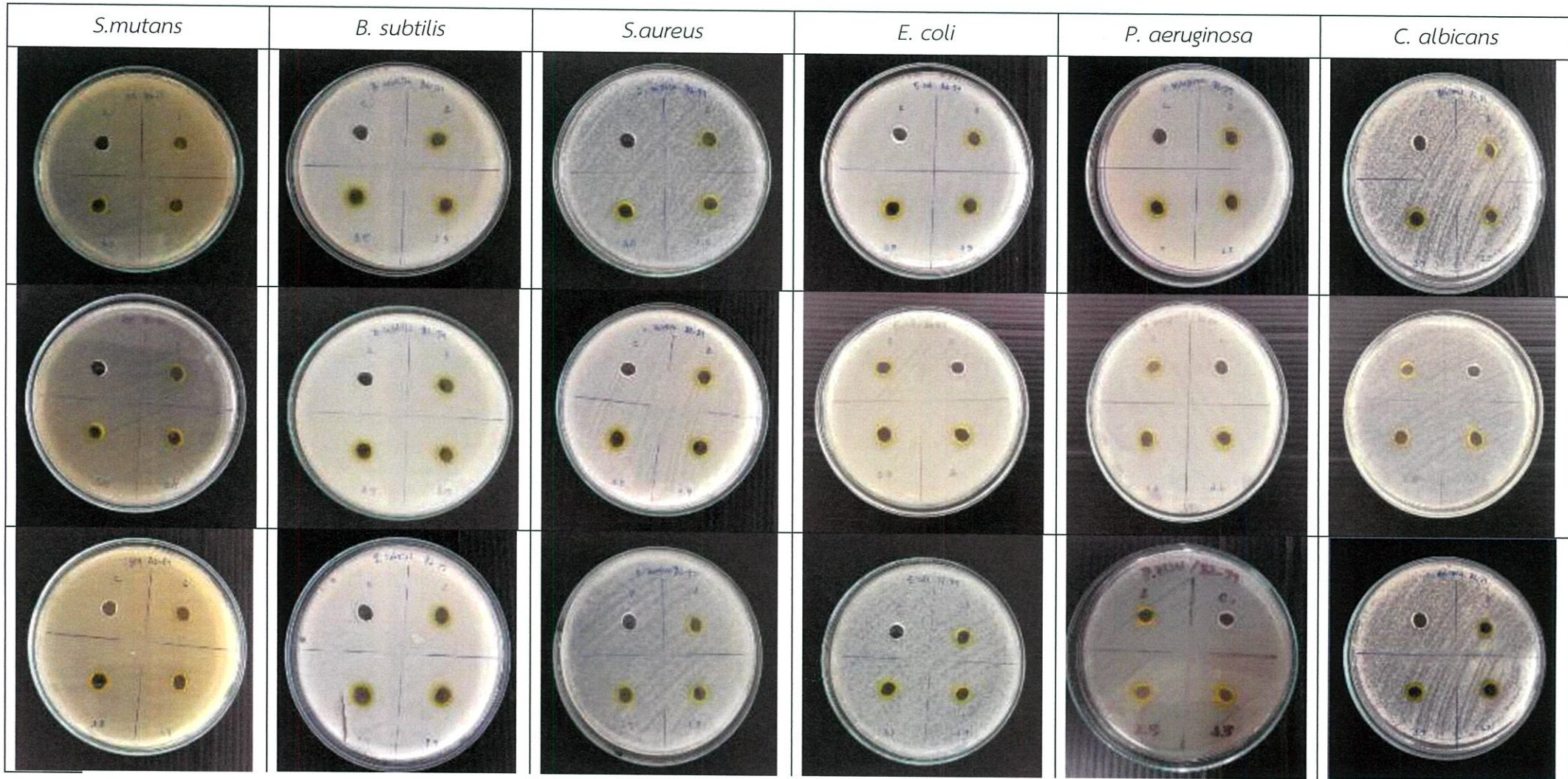
เชื้อทดสอบ	ปริมาณสารสกัดหยาบสาหร่าย (มิลลิกรัม)	บริเวณยับยั้งที่วัดได้ (มิลลิเมตร)			บริเวณยับยั้งเฉลี่ยที่วัดได้ (มิลลิเมตร)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
<i>S. mutans</i>	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	control	0	0	0	0



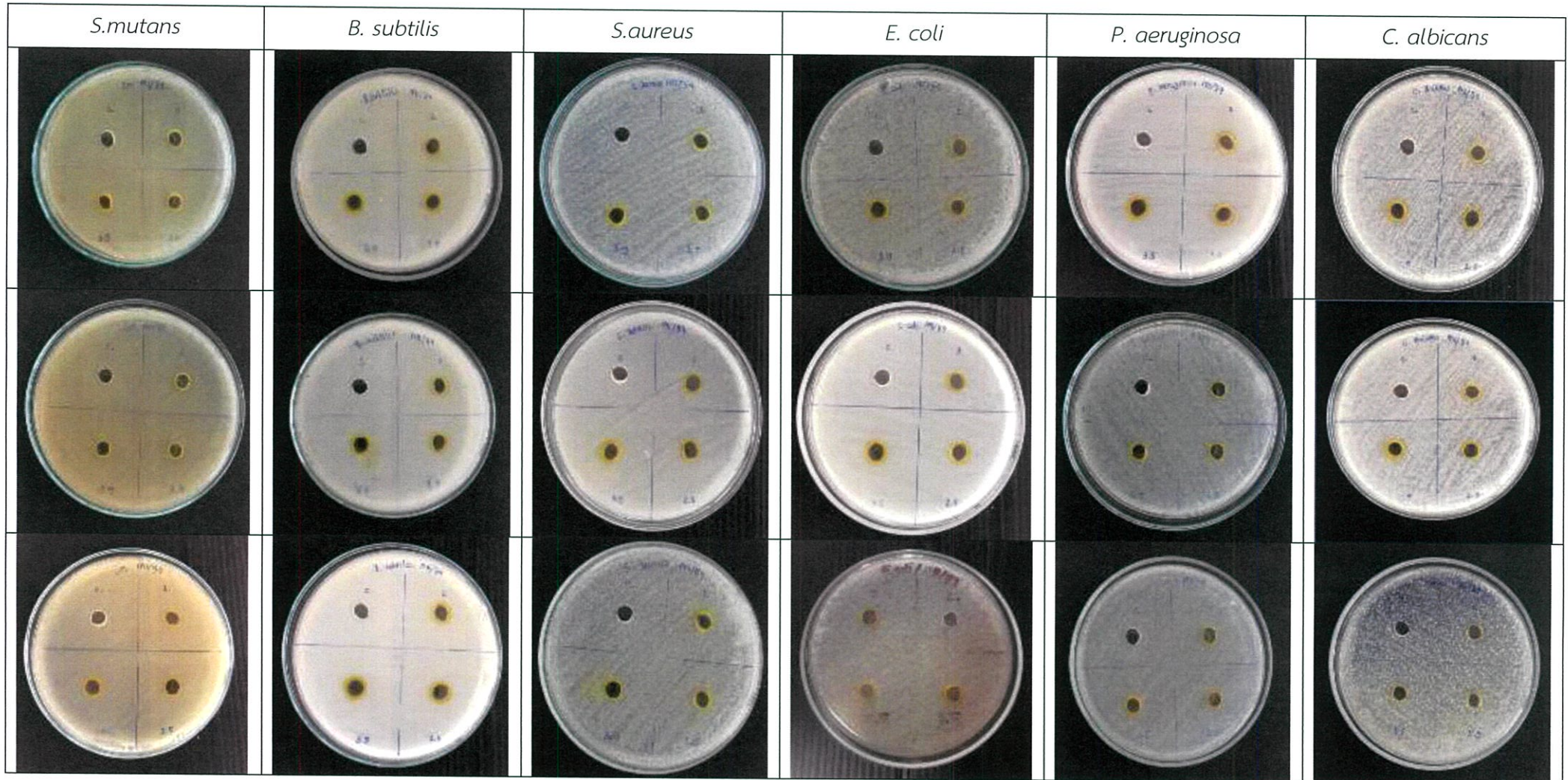
รูปที่ ง.1 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella sp.* KU ที่ปริมาณสารต่างกัน ด้วยวิธี agar well diffusion ต่อเชื้อก่อโรค *S. mutans*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* จำนวน 3 การทดลอง



รูปที่ ง.2 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสำหรับยีส *Chlorella* sp. V55 ที่ปริมาณสารต่างกัน ด้วยวิธี agar well diffusion ต่อเชื้อก่อโรค *S. mutans*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* จำนวน 3 การทดลอง



รูปที่ ๓.3 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. B2-59 ที่ปริมาณสารต่างกัน ด้วยวิธี agar well diffusion ต่อเชื้อก่อโรค *S. mutans*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* จำนวน 3 การทดลอง



รูปที่ ง.4 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. N11/59 ที่ปริมาณสารต่างกัน ด้วยวิธี agar well diffusion ต่อเชื้อก่อโรค *S. mutans*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* จำนวน 3 การทดลอง

ตารางที่ ง.5 บริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU ที่ความเข้มข้นต่างกัน

เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น ของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	บริเวณยับยั้งที่วัดได้ (มิลลิเมตร)			บริเวณยับยั้ง เฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
<i>S. mutans</i>	50	11.55	12.60	13.12	12.42
	100	12.90	13.89	13.48	13.41
	control	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	50	10.23	9.19	10.21	9.88
	100	11.23	10.06	10.94	10.74
	control	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	50	10.35	10.49	10.11	10.32
	100	11.29	11.95	11.23	11.49
	control	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	50	-	-	-	-
	100	7.48	6.96	6.58	7.01
	control	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	50	-	-	-	-
	100	7.27	7.34	7.47	7.36
	control	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	50	-	-	-	-
	100	7.07	7.02	7.12	7.07
	control	0	0	0	0

ตารางที่ ง.6 บริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. V55 ที่ความเข้มข้นต่างกัน

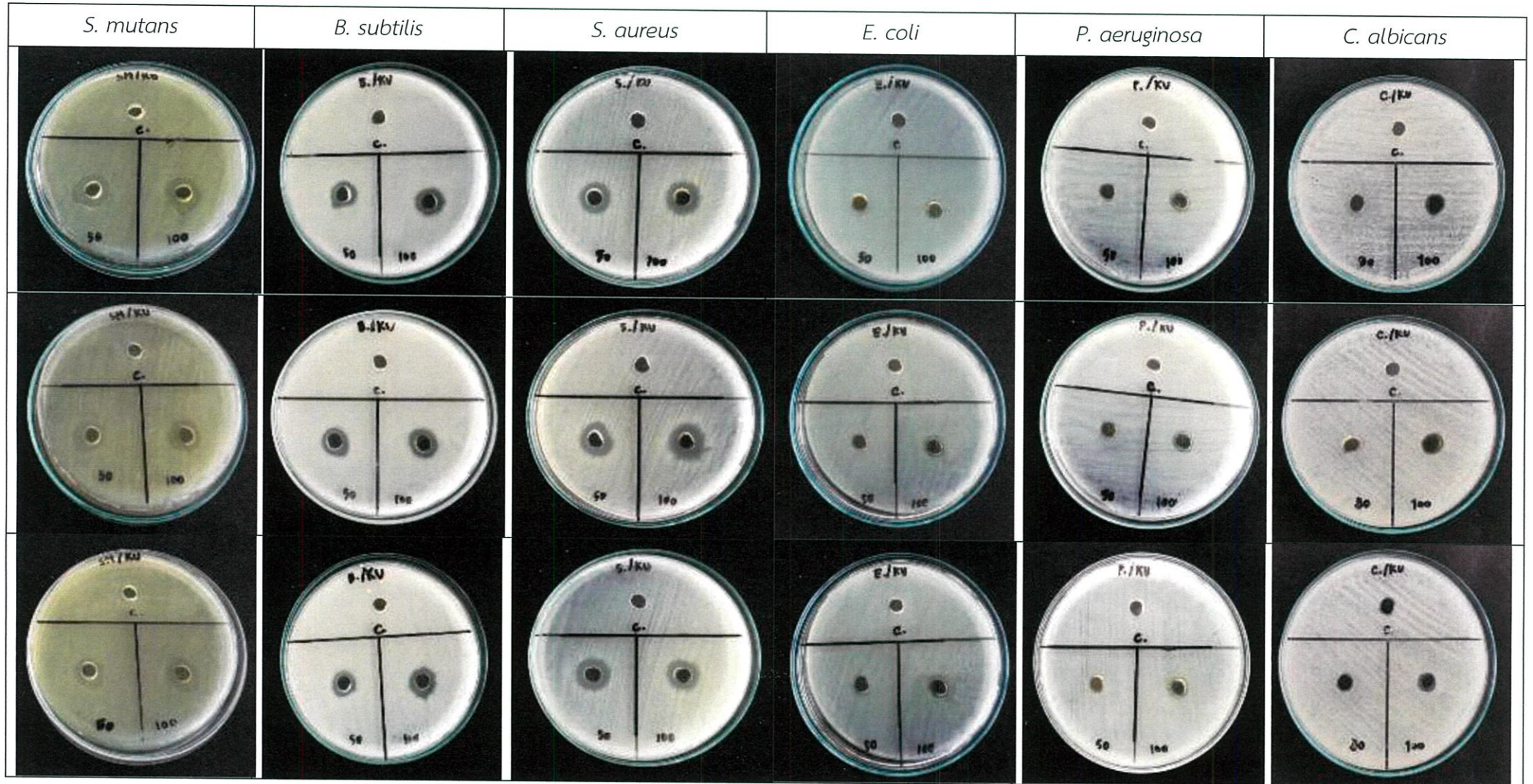
เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น ของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	บริเวณยับยั้งที่วัดได้ (มิลลิเมตร)			บริเวณยับยั้ง เฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
<i>S. mutans</i>	50	10.62	10.61	10.35	10.41
	100	15.23	12.67	13.24	13.71
	control	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	50	10.11	8.51	9.87	9.50
	100	11.97	12.72	11.57	12.09
	control	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	50	7.97	7.61	8.22	7.93
	100	12.51	14.16	14.64	13.77
	control	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	50	-	-	-	-
	100	7.47	7.23	6.92	7.21
	control	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	50	-	-	--	-
	100	7.30	7.74	7.27	7.44
	control	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	50	-	-	-	-
	100	7.10	7.02	7.04	7.05
	control	0	0	0	0

ตารางที่ ๗.7 บริเวณการยับยั้งของสารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. B2-59 ที่ความเข้มข้นต่างกัน

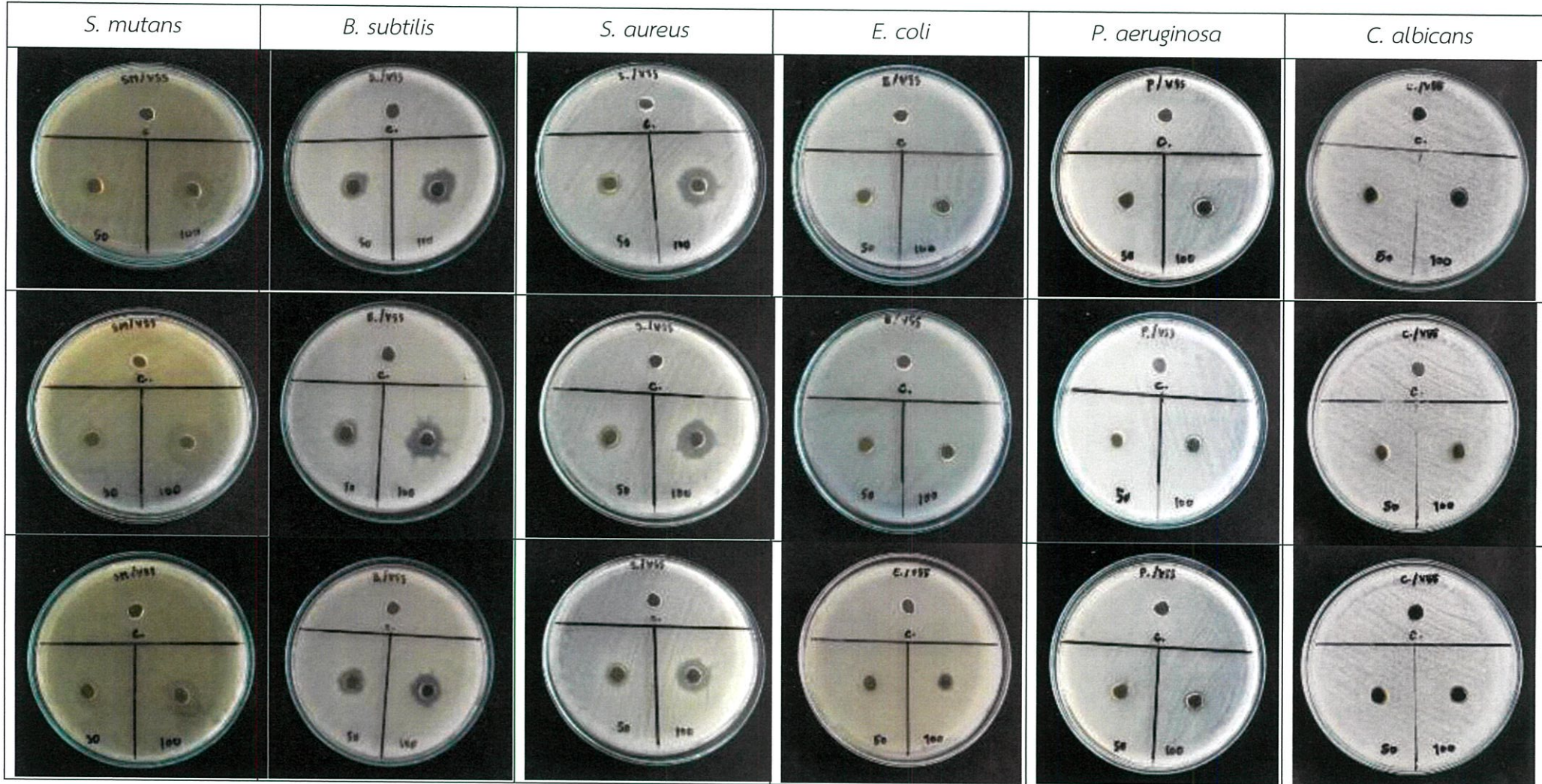
เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น ของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	บริเวณยับยั้งที่วัดได้ (มิลลิเมตร)			บริเวณยับยั้ง เฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
<i>S. mutans</i>	50	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	50	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	50	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	50	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	50	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	50	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	control	0	0	0	0

ตารางที่ ๘.8 บริเวณการยับยั้งของสารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. N11/59 ที่ความเข้มข้นต่างกัน

เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น ของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	บริเวณยับยั้งที่วัดได้ (มิลลิเมตร)			บริเวณยับยั้ง เฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
<i>S. mutans</i>	50	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	50	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	50	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	50	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	50	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	control	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	50	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	control	0	0	0	0

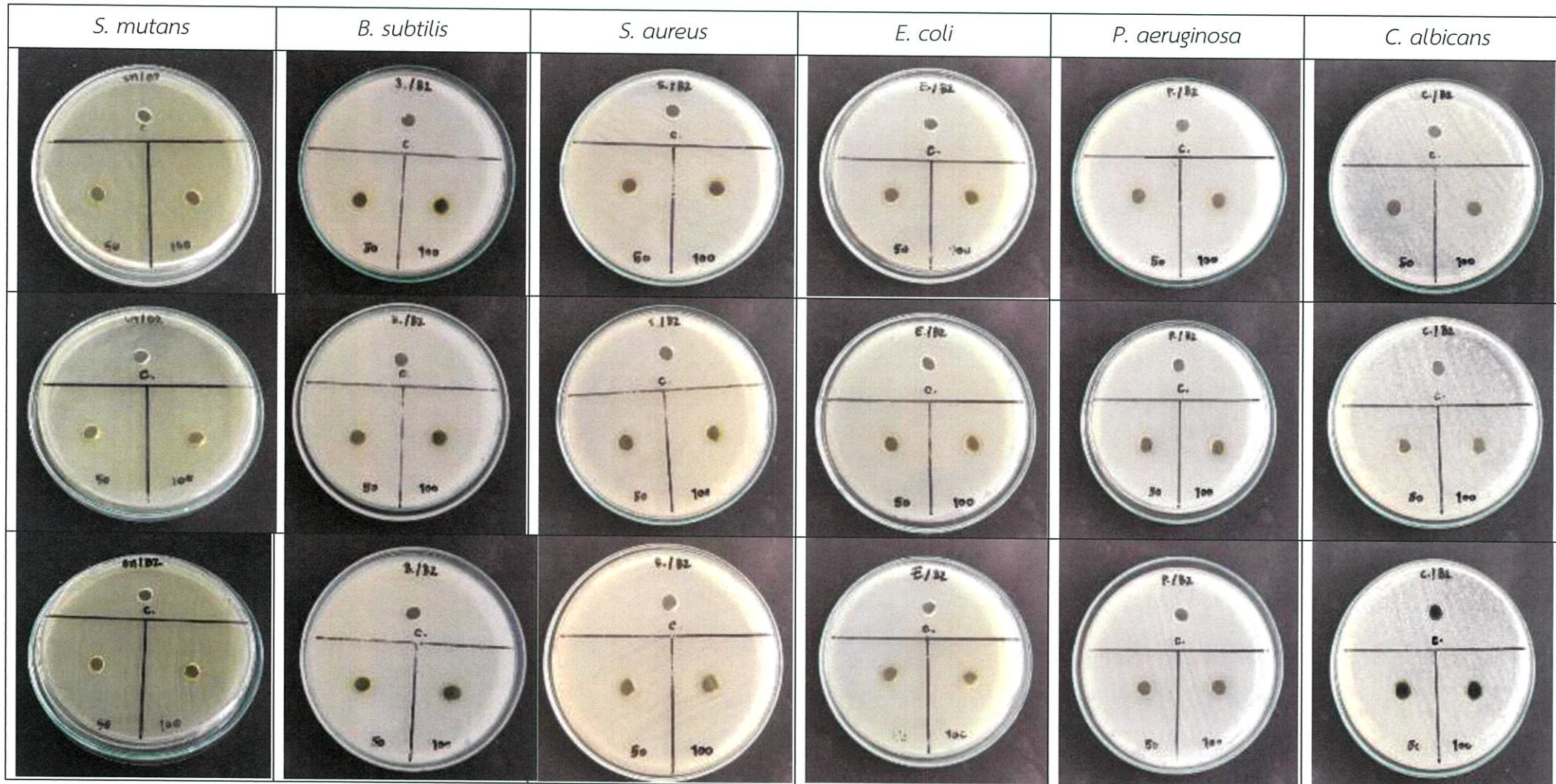


รูปที่ ๓.5 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาดสำหรับ *Chlorella* sp. KU ที่ความเข้มข้นต่างกัน ด้วยวิธี agar well diffusion ต่อเชื้อก่อโรค *S. mutans*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* จำนวน 3 การทดลอง

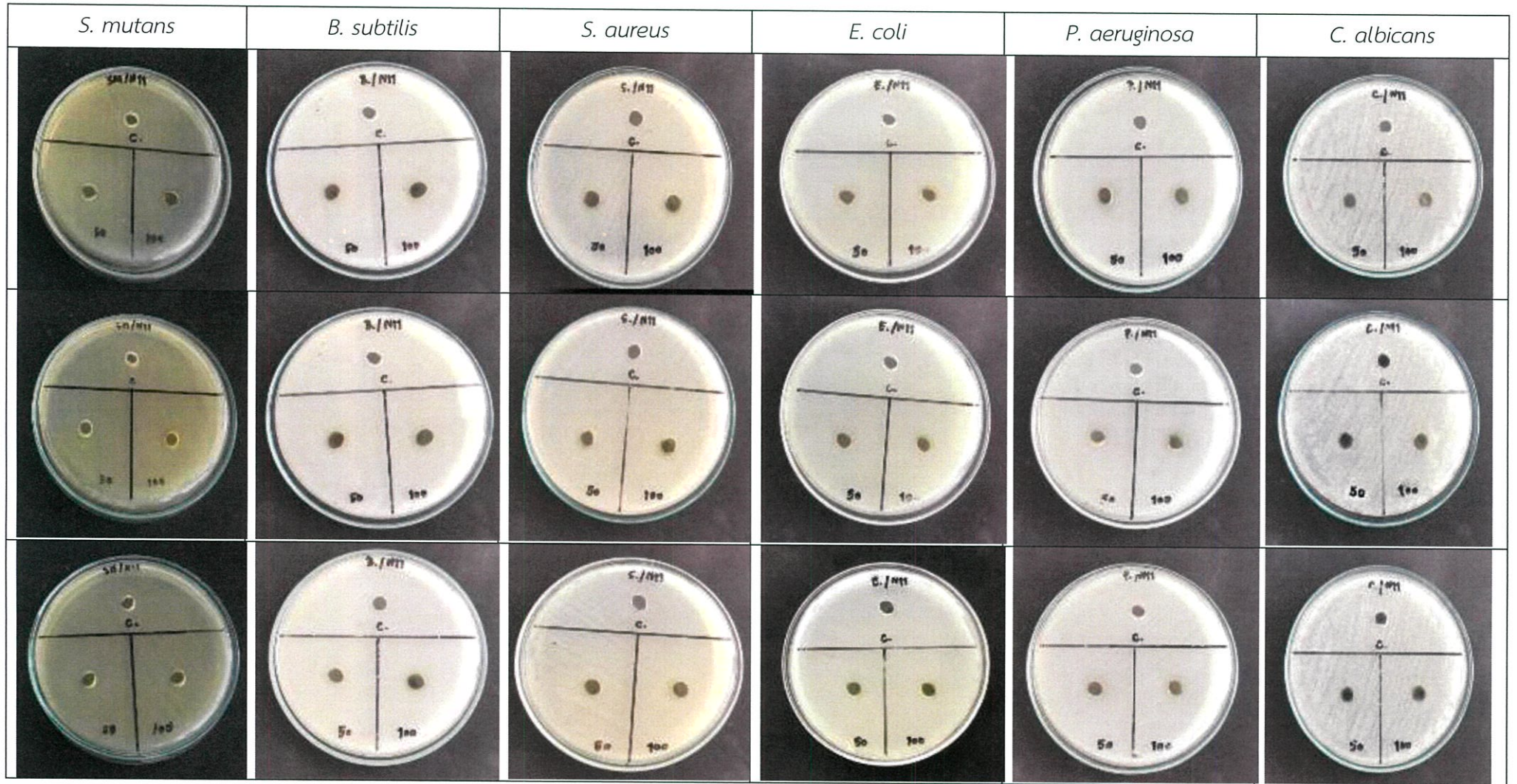


รูปที่ ๖.6 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella sp.* V55 ที่ความเข้มข้นต่างกัน ด้วยวิธี agar well diffusion ต่อเชื้อก่อโรค

S. mutans, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* จำนวน 3 การทดลอง



รูปที่ ๗.7 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสำหรับยีส *Chlorella* sp. B2-59 ที่ความเข้มข้นต่างกัน ด้วยวิธี agar well diffusion ต่อเชื้อก่อโรค *S. mutans*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* จำนวน 3 การทดลอง



รูปที่ ๘.8 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. N11/59 ที่ความเข้มข้นต่างกัน ด้วยวิธี agar well diffusion ต่อเชื้อก่อโรค *S. mutans*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* จำนวน 3 การทดลอง

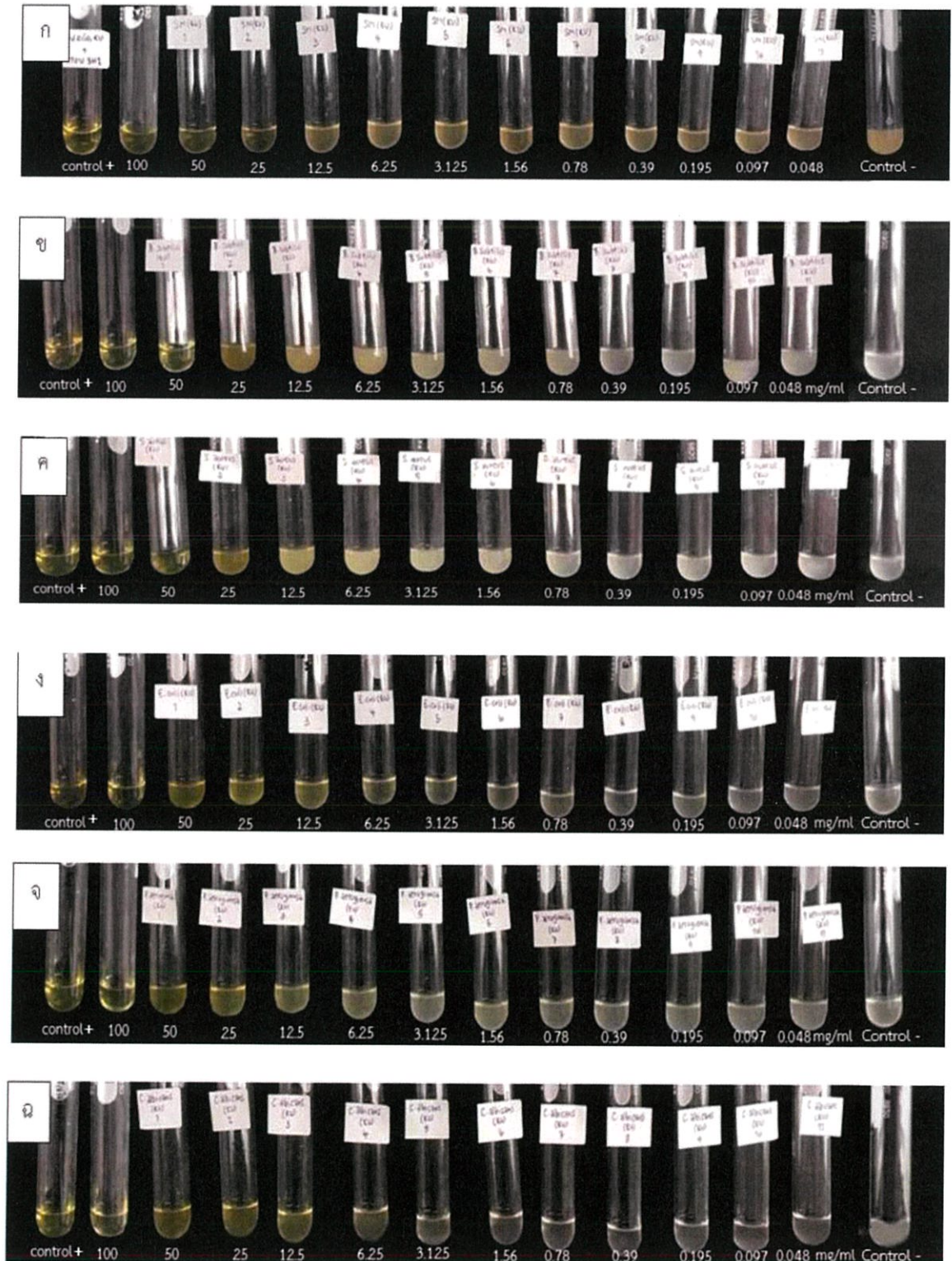
ง-2 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสำหรับในการยับยั้งเชื้อทดสอบ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

ตารางที่ ง.9 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. KU

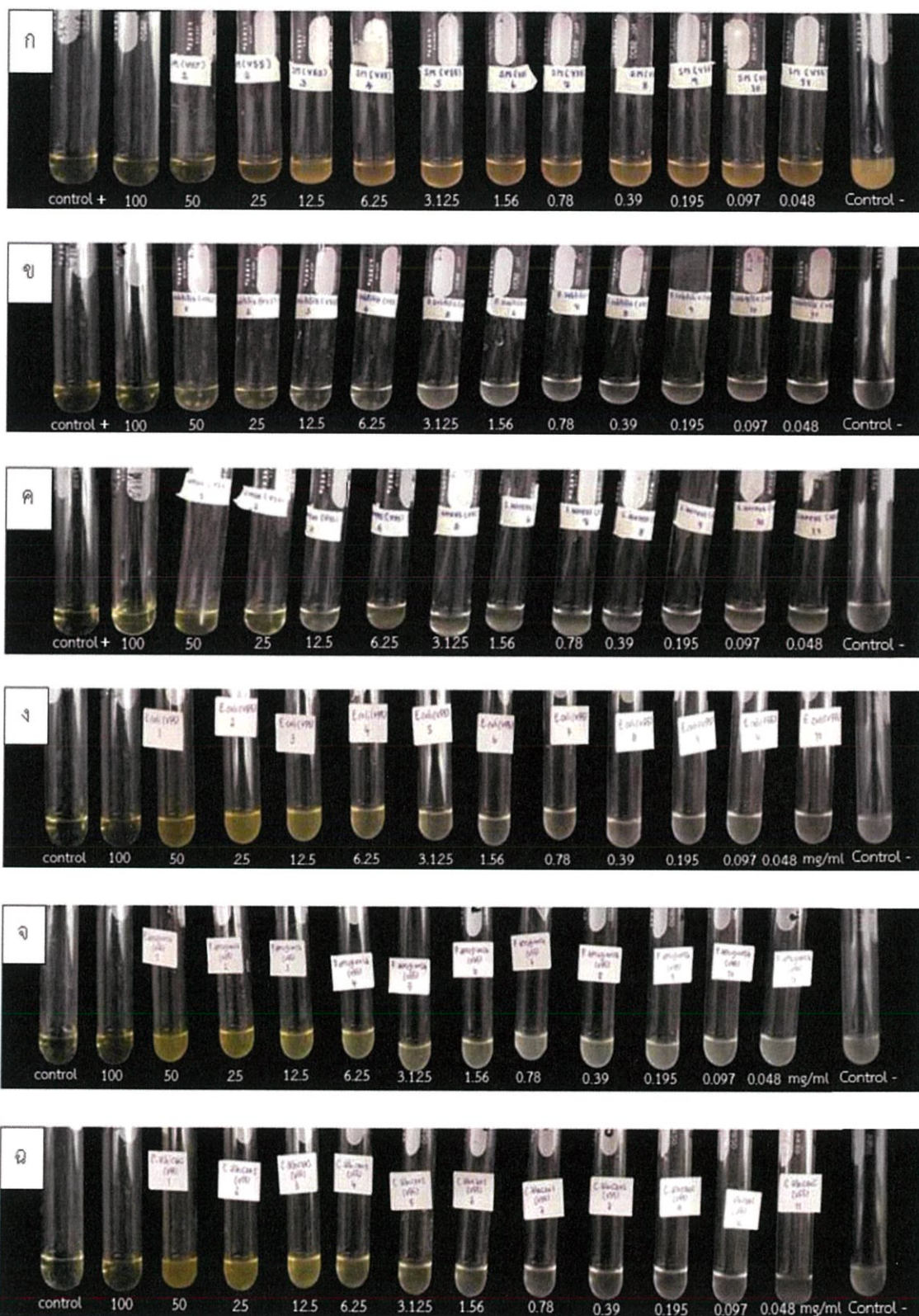
เชื้อทดสอบ	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (MIC) (mg/mL)
<i>S. mutans</i>	25
<i>B. subtilis</i>	50
<i>S. aureus</i>	50
<i>E. coli</i>	100
<i>P. aeruginosa</i>	100
<i>C. albicans</i>	100

ตารางที่ ง.10 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. V55

เชื้อทดสอบ	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (MIC) (mg/mL)
<i>S. mutans</i>	50
<i>B. subtilis</i>	6.25
<i>S. aureus</i>	25
<i>E. coli</i>	100
<i>P. aeruginosa</i>	100
<i>C. albicans</i>	100

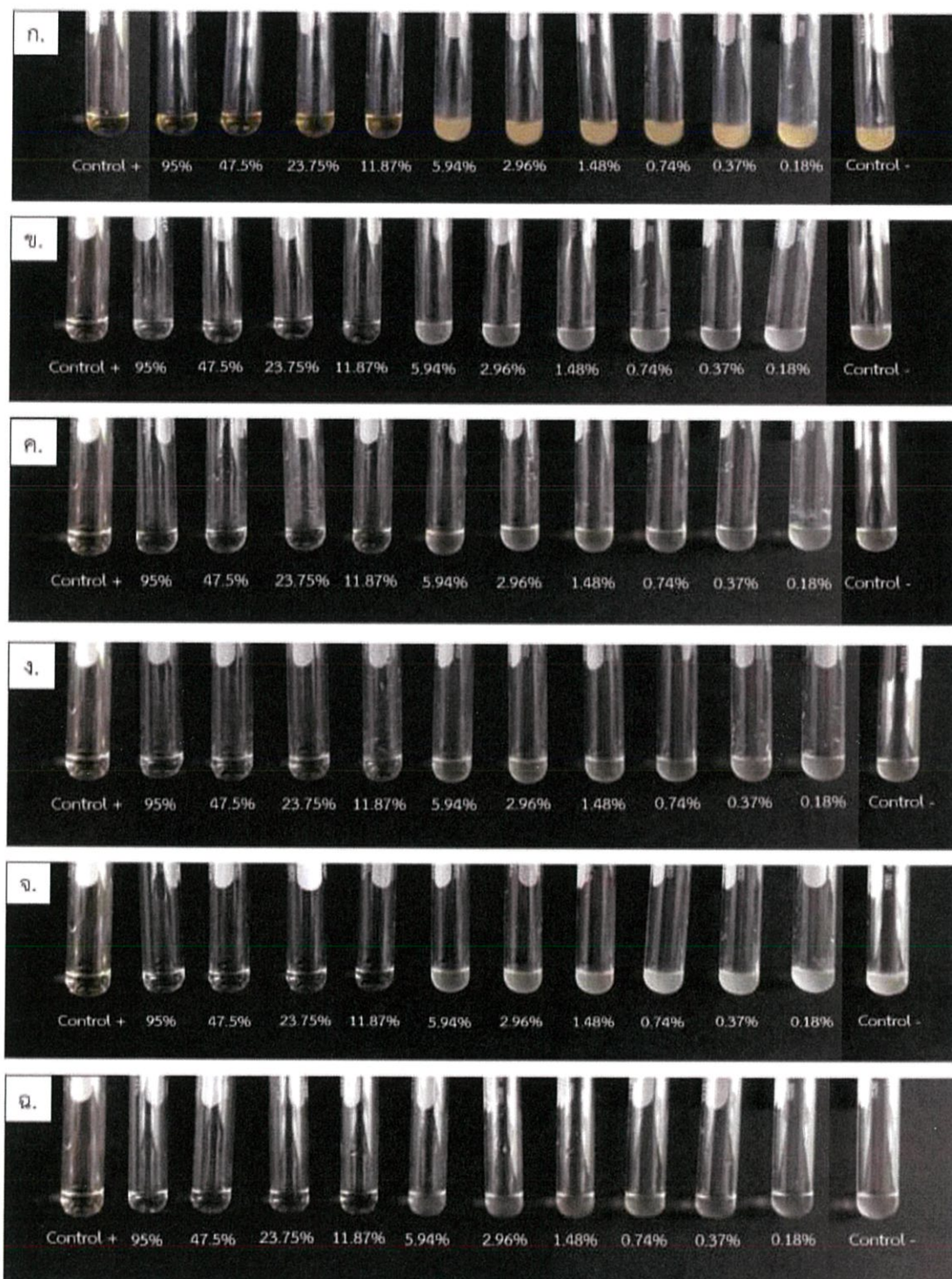


รูปที่ ๙.๙ แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. KU ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ก) *S. mutans* ข) *B. subtilis* ค) *S. aureus* ง) *E. coli* จ) *P. aeruginosa* ฉ) *C. albicans*



รูปที่ ๑.๑๐ แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. V55 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ก) *S. mutans* ข) *B. subtilis* ค) *S. aureus* ง) *E. coli* จ) *P. aeruginosa* ฉ) *C. albicans*

ง-3 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของตัวทำละลายเอทานอลในการยับยั้งเชื้อทดสอบ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

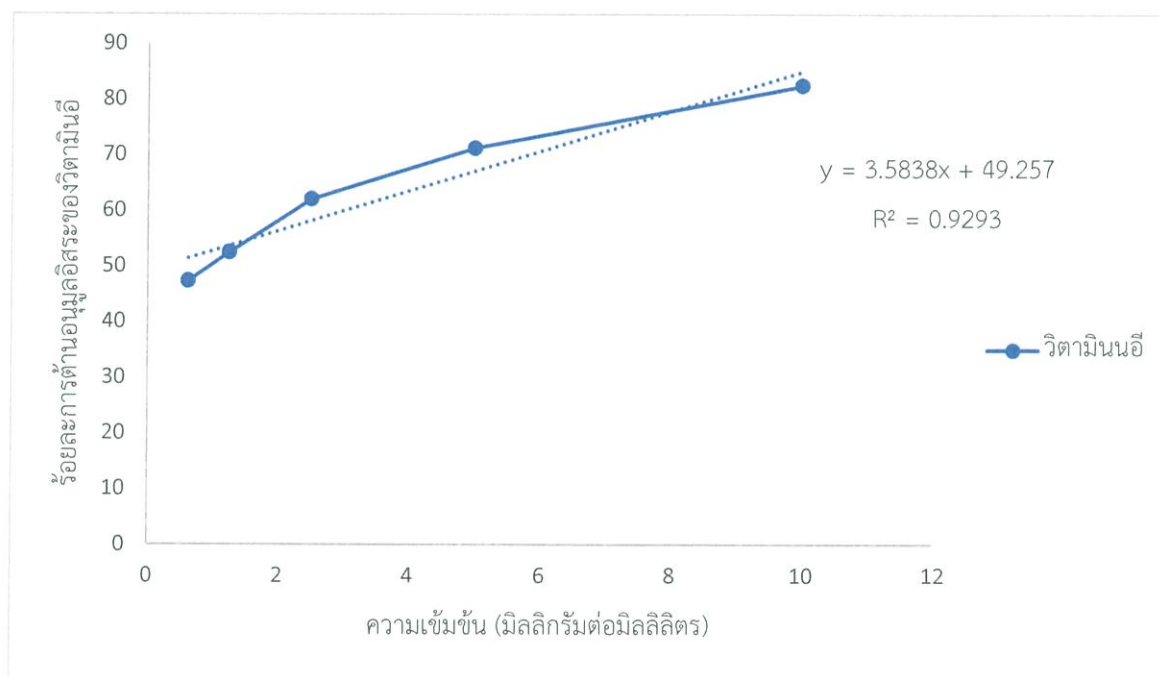


รูปที่ ง.11 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของตัวทำละลายเอทานอลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ก) *S. mutans* ข) *B. subtilis* ค) *S. aureus* ง) *E. coli* จ) *P. aeruginosa* ฉ) *C. albicans*

ง-4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ *Chlorella* sp. N11/59 ด้วยวิธี DPPH (diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay)

ตารางที่ ง.11 ค่าการดูดกลืนแสงของการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

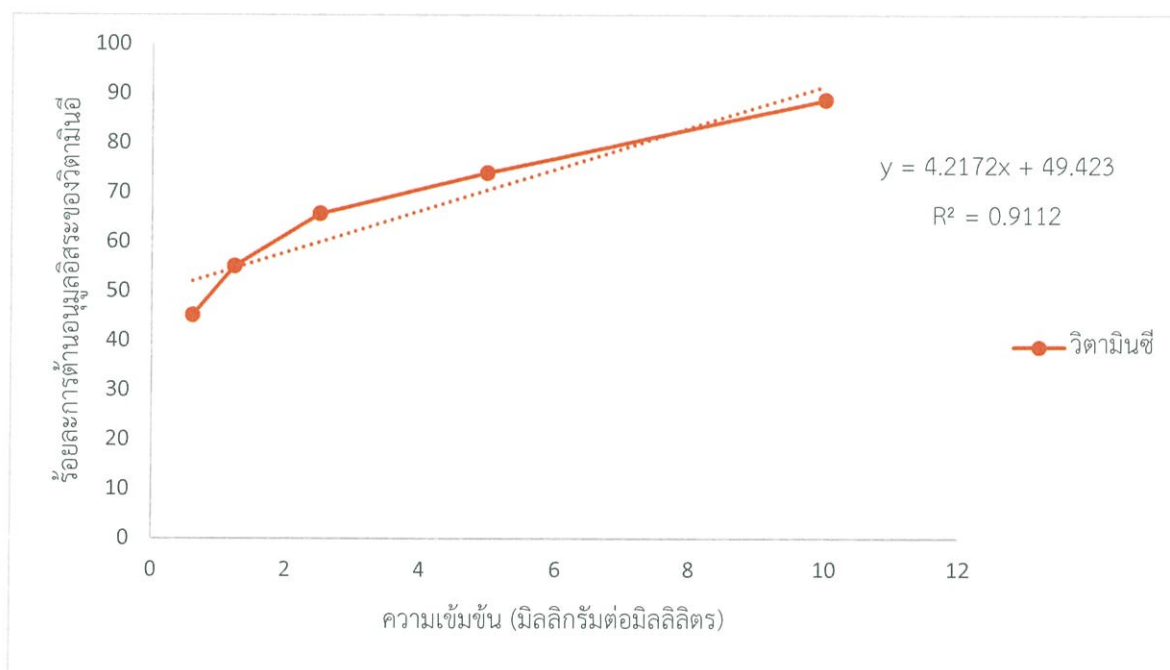
ความเข้มข้น (มก./มล.)	วิตามินอี			ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
10	0.056	0.058	0.053	82.3899	81.7610	83.333	82.4947
5	0.095	0.089	0.090	70.1258	72.0126	71.6981	71.2788
2.5	0.118	0.120	0.124	62.8930	62.2641	61.0063	62.0545
1.25	0.154	0.150	0.149	51.5723	52.8302	53.1447	52.5157
0.625	0.168	0.164	0.170	47.1698	48.4277	46.5408	47.3794



รูปที่ ง.12 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี

ตารางที่ ง.12 ค่าการดูดกลืนแสงของการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซี ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

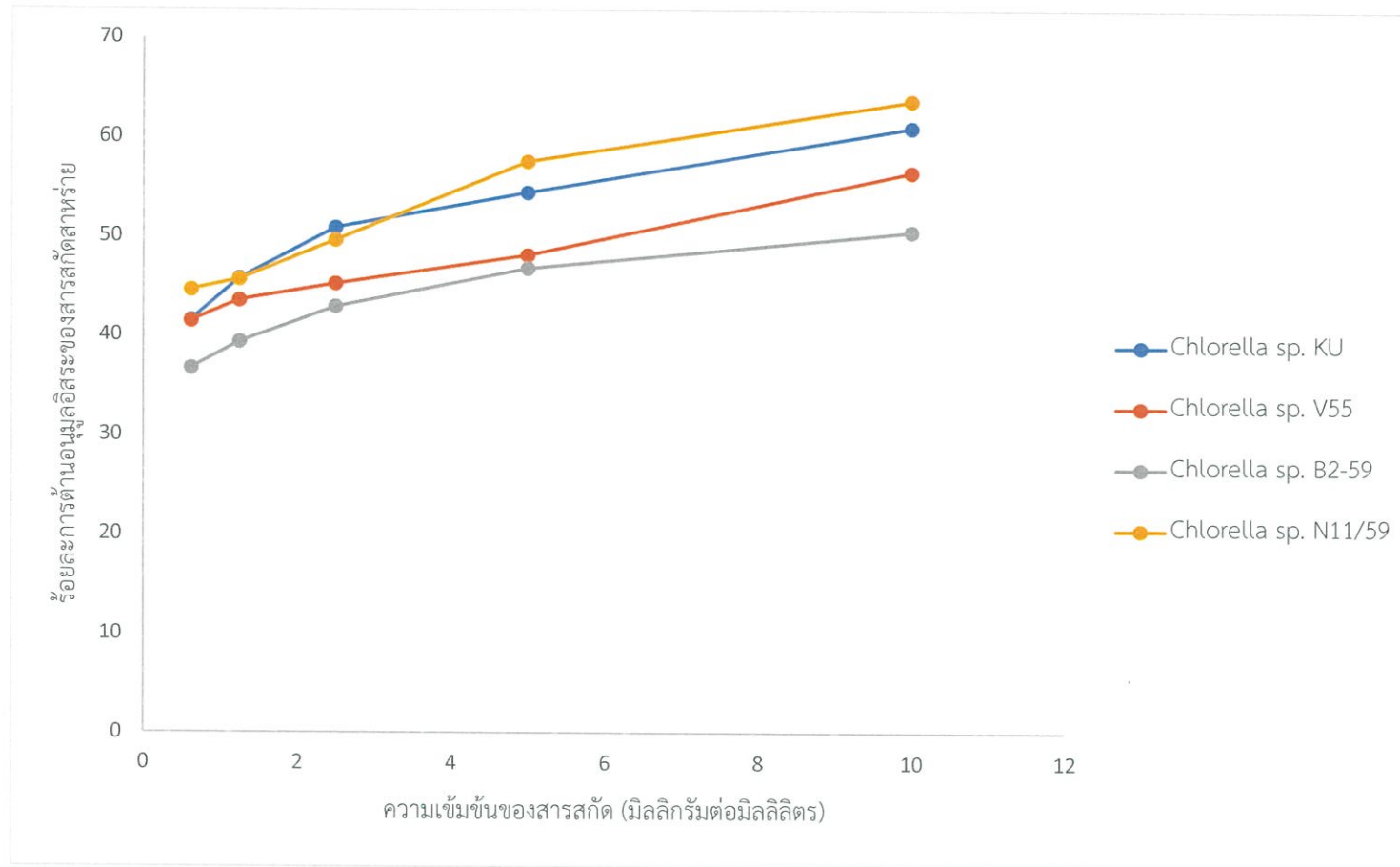
ความเข้มข้น (มก./มล.)	วิตามินซี			ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
10	0.032	0.040	0.035	89.9371	87.4214	88.9937	88.7941
5	0.075	0.080	0.083	73.2704	74.8727	73.8994	74.0042
2.5	0.109	0.113	0.105	65.7232	64.4654	66.9811	65.7232
1.25	0.138	0.142	0.148	56.6038	55.3459	53.4591	55.1363
0.625	0.174	0.171	0.178	45.2830	46 ^{.2264}	44.0252	45.1782



รูปที่ ง.13 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซี

ตารางที่ ง.13 ค่าการดูดกลืนแสงของการต้านอนุมูลอิสระของสาหร่าย *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ที่ ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

สาหร่าย	ความเข้มข้น (มก./มล.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร			ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
<i>Chlorella</i> sp. KU	10	0.126	0.122	0.124	60.3773	61.6352	61.0062	61.0062
	5	0.142	0.143	0.150	55.3459	55.0314	52.8302	54.4025
	2.5	0.158	0.156	0.155	50.3144	50.9433	51.2578	50.8385
	1.25	0.171	0.173	0.174	46.2264	45.5974	45.2830	45.7022
	0.625	0.186	0.183	0.189	41.5094	42.4528	40.5660	41.5094
<i>Chlorella</i> sp. V55	10	0.137	0.139	0.139	56.9182	56.2893	56.2893	56.4989
	5	0.161	0.169	0.165	49.3710	46.8553	48.1132	48.1131
	2.5	0.173	0.174	0.176	45.5974	45.2830	44.6540	45.1781
	1.25	0.179	0.179	0.181	43.7106	43.7106	43.0817	43.5009
	0.625	0.187	0.186	0.186	41.1949	41.5094	41.5094	41.4045
<i>Chlorella</i> sp.B2-59	10	0.159	0.154	0.159	50.0000	51.5723	50.0000	50.5241
	5	0.169	0.169	0.170	46.8553	46.8553	46.5408	46.7504
	2.5	0.182	0.180	0.183	42.7672	43.3962	42.4528	42.8720
	1.25	0.194	0.190	0.195	38.9937	40.2515	38.6792	39.3081
	0.625	0.201	0.200	0.203	36.7924	37.1069	36.1635	36.6876
<i>Chlorella</i> sp. N11/59	10	0.114	0.117	0.115	64.1509	63.2075	63.8365	63.7316
	5	0.137	0.133	0.135	56.9182	58.1761	57.5472	57.5472
	2.5	0.159	0.164	0.157	50.0000	48.4277	50.6289	49.6855
	1.25	0.176	0.169	0.174	44.6540	46.8553	45.2830	45.5974
	0.625	0.174	0.179	0.176	45.2830	43.7107	44.6540	44.5492

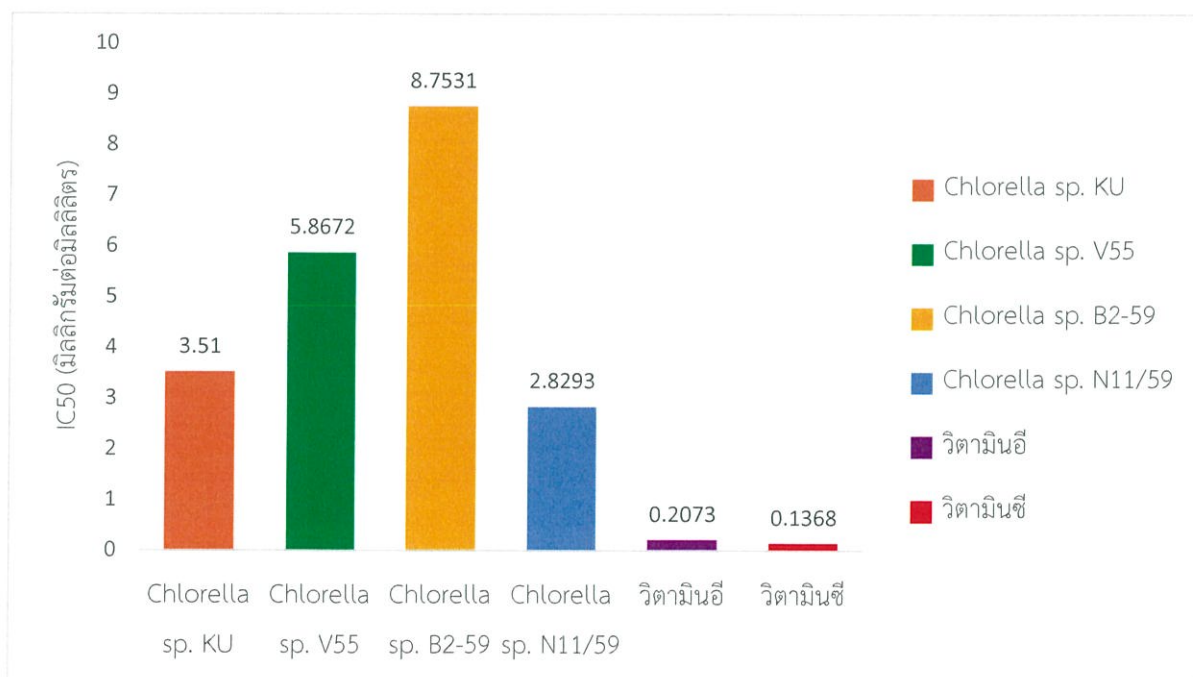


รูปที่ ๑.14 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสาหร่าย *Chlorella* sp. KU, *Chlorella* sp. V55, *Chlorella* sp. B2-59 และ

Chlorella sp. N11/59

ตารางที่ ง.14 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสาหร่ายที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลงร้อยละ 50 (IC₅₀)

ตัวอย่างสารสกัด	สมการเส้นตรง	IC ₅₀ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
<i>Chlorella</i> sp. KU	$y = 1.894x + 43.352$ $R^2 = 0.909$	3.5100
<i>Chlorella</i> sp. V55	$y = 1.5365x + 40.985$ $R^2 = 0.992$	5.8672
<i>Chlorella</i> sp. B2-59	$y = 1.3882x + 37.849$ $R^2 = 0.9039$	8.7531
<i>Chlorella</i> sp. N11/59	$y = 2.1065x + 44.04$ $R^2 = 0.9533$	2.8293
วิตามินอี	$y = 3.5838x + 49.257$ $R^2 = 0.9293$	0.2073
วิตามินซี	$y = 4.2172x + 49.423$ $R^2 = 0.9112$	0.1368



รูปที่ ง.15 กราฟแสดงค่า IC₅₀ ของสารมาตรฐานวิตามินอี วิตามินซี และสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

จ-1 การวิเคราะห์ทางสถิติของผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสาหร่ายสกุล *Chlorella* ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ด้วยวิธี agar well diffusion

จ-1.1 สาหร่าย *Chlorella* sp. KU

ตารางที่ จ.1 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ที่ปริมาณสารต่างกัน

Descriptives

S. mutans

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
40	3	8.6467	1.23144	.71097	5.5876	11.7057	7.67	10.03
50	3	10.2400	1.48280	.85610	6.5565	13.9235	8.53	11.17
70	3	11.5333	.41525	.23975	10.5018	12.5649	11.25	12.01
Total	9	10.1400	1.59371	.53124	8.9150	11.3650	7.67	12.01

ANOVA

S. mutans

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12.544	2	6.272	4.840	.056
Within Groups	7.775	6	1.296		
Total	20.319	8			

ตารางที่ จ.2 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ที่ปริมาณสารต่างกัน

S. mutans

Duncan

KU	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
40	3	8.6467	
50	3	10.2400	10.2400
70	3		11.5333
Sig.		.137	.213

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.3 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ที่ปริมาณสารต่างกัน

Descriptives

B. subtilis

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					40	3		
50	3	10.6400	.44844	.25891	9.5260	11.7540	10.25	11.13
70	3	11.1300	.08544	.04933	10.9178	11.3422	11.05	11.22
Total	9	10.3044	1.01254	.33751	9.5261	11.0827	8.53	11.22

ANOVA

B. subtilis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.427	2	3.213	10.863	.010
Within Groups	1.775	6	.296		
Total	8.202	8			

ตารางที่ จ.4 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ที่ปริมาณสารต่างกัน

B. subtilis

Duncan

KU	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
40	3	9.1433	
50	3		10.6400
70	3		11.1300
Sig.		1.000	.312

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.5 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ปริมาณสารต่างกัน

Descriptives

S. aureus

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
40	3	8.2167	.90135	.52040	5.9776	10.4557	7.26	9.05
50	3	8.9433	.54994	.31751	7.5772	10.3095	8.31	9.30
70	3	9.5767	.89846	.51873	7.3448	11.8086	8.54	10.13
Total	9	8.9122	.90987	.30329	8.2128	9.6116	7.26	10.13

ANOVA

S. aureus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.779	2	1.389	2.169	.196
Within Groups	3.844	6	.641		
Total	6.623	8			

ตารางที่ จ.6 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ปริมาณสารต่างกัน

S. aureus

Duncan

KU	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
40	3		8.2167
50	3		8.9433
70	3		9.5767
Sig.			.091

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.7 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

Descriptives

S. mutans

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
50	3	12.4233	.79977	.46175	10.4366	14.4101	11.55	13.12
100	3	13.4133	.48346	.27913	12.2124	14.6143	12.90	13.86
control	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	9	10.6122	3.51681	1.17227	7.9090	13.3155	6.00	13.86

ANOVA

S. mutans

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	97.197	2	48.598	166.935	.000
Within Groups	1.747	6	.291		
Total	98.944	8			

ตารางที่ จ.8 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

S. mutans

Duncan

KU	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
control	3	6.0000	
50	3		12.4233
100	3		13.4133
Sig.		1.000	.066

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.9 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

Descriptives

B. subtilis

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					50	3		
100	3	10.7433	.60929	.35177	9.2298	12.2569	10.06	11.23
control	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	9	8.8733	2.22847	.74282	7.1604	10.5863	6.00	11.23

ANOVA

B. subtilis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	38.279	2	19.139	79.201	.000
Within Groups	1.450	6	.242		
Total	39.729	8			

ตารางที่ จ.10 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

B. subtilis

Duncan

KU	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
control	3	6.0000	
50	3		9.8767
100	3		10.7433
Sig.		1.000	.074

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.11 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

Descriptives

S. aureus

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					50	3		
100	3	11.4900	.39950	.23065	10.4976	12.4824	11.23	11.95
control	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	9	9.2689	2.51355	.83785	7.3368	11.2010	6.00	11.95

ANOVA

S. aureus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	50.150	2	25.075	382.763	.000
Within Groups	.393	6	.066		
Total	50.543	8			

ตารางที่ จ.12 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

S. aureus

Duncan

KU	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
control	3	6.0000		
50	3		10.3167	
100	3			11.4900
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.13 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

Descriptives

E. coli

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					50	3		
100	3	7.0067	.45181	.26085	5.8843	8.1290	6.58	7.48
control	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	9	6.3356	.55170	.18390	5.9115	6.7596	6.00	7.48

ANOVA

E. coli

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.027	2	1.013	14.893	.005
Within Groups	.408	6	.068		
Total	2.435	8			

ตารางที่ จ.14 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

E. coli

Duncan

KU	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
50	3	6.0000	
control	3	6.0000	
100	3		7.0067
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.15 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

Descriptives

P. aeruginosa

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					50	3		
100	3	7.3600	.10149	.05859	7.1079	7.6121	7.27	7.47
control	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	9	6.4533	.68189	.22730	5.9292	6.9775	6.00	7.47

ANOVA

P. aeruginosa

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.699	2	1.850	538.718	.000
Within Groups	.021	6	.003		
Total	3.720	8			

ตารางที่ จ.16 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

P. aeruginosa

Duncan

KU	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
50	3	6.0000	
control	3	6.0000	
100	3		7.3600
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.17 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

Descriptives

C. albicans

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					50	3		
100	3	7.0700	.05000	.02887	6.9458	7.1942	7.02	7.12
control	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	9	6.3567	.53558	.17853	5.9450	6.7684	6.00	7.12

ANOVA

C. albicans

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.290	2	1.145	1373.880	.000
Within Groups	.005	6	.001		
Total	2.295	8			

ตารางที่ จ.18 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. KU ในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

C. albicans

Duncan

KU	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
50	3	6.0000	
control	3	6.0000	
100	3		7.0700
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

จ-1.2 สำหรับ *Chlorella* sp. V55

ตารางที่ จ.19 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ที่ปริมาณสารต่างกัน

Descriptives

S. mutans

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
40	3	8.6667	.41477	.23947	7.6363	9.6970	8.21	9.02
50	3	9.0633	.46876	.27064	7.8989	10.2278	8.53	9.41
70	3	9.6900	.39737	.22942	8.7029	10.6771	9.27	10.06
Total	9	9.1400	.58058	.19353	8.6937	9.5863	8.21	10.06

ANOVA

S. mutans

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.597	2	.799	4.359	.068
Within Groups	1.099	6	.183		
Total	2.697	8			

ตารางที่ จ.20 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ที่ปริมาณสารต่างกัน

S. mutans

Duncan

V55	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
40	3	8.6667	
50	3	9.0633	9.0633
70	3		9.6900
Sig.		.300	.123

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.21 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ที่ปริมาณสารต่างกัน

Descriptives

B. subtilis

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					40	3		
50	3	9.5700	.17692	.10214	9.1305	10.0095	9.41	9.76
70	3	10.2633	.21079	.12170	9.7397	10.7870	10.02	10.39
Total	9	9.5400	.66372	.22124	9.0298	10.0502	8.58	10.39

ANOVA

B. subtilis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.275	2	1.637	39.403	.000
Within Groups	.249	6	.042		
Total	3.524	8			

ตารางที่ จ.22 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ที่ปริมาณสารต่างกัน

B. subtilis

Duncan

V55	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
40	3	8.7867		
50	3		9.5700	
70	3			10.2633
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.23 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ปริมาณสารต่างกัน

Descriptives

S. aureus

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
40	3	8.9467	.66018	.38115	7.3067	10.5866	8.23	9.53
50	3	9.6933	.50013	.28875	8.4509	10.9357	9.12	10.04
70	3	9.7767	.53003	.30601	8.4600	11.0933	9.17	10.15
Total	9	9.4722	.63118	.21039	8.9871	9.9574	8.23	10.15

ANOVA

S. aureus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.253	2	.627	1.944	.223
Within Groups	1.934	6	.322		
Total	3.187	8			

ตารางที่ จ.24 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ปริมาณสารต่างกัน

S. aureus

Duncan

V55	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
40	3	8.9467	
50	3	9.6933	
70	3	9.7767	
Sig.		.134	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.25 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

Descriptives

S. mutans

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					50	3		
100	3	13.7133	1.34404	.77598	10.3746	17.0521	12.67	15.23
control	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	9	10.0400	3.41920	1.13973	7.4118	12.6682	6.00	15.23

ANOVA

S. mutans

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	89.848	2	44.924	73.267	.000
Within Groups	3.679	6	.613		
Total	93.527	8			

ตารางที่ จ.26 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

S. mutans

Duncan

V55	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
control	3	6.0000		
50	3		10.4067	
100	3			13.7133
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.27 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

Descriptives

B. subtilis

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					50	3		
100	3	12.0867	.58381	.33706	10.6364	13.5369	11.57	12.72
control	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	9	9.1944	2.69613	.89871	7.1220	11.2669	6.00	12.72

ANOVA

B. subtilis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	55.982	2	27.991	77.369	.000
Within Groups	2.171	6	.362		
Total	58.153	8			

ตารางที่ จ.28 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

B. subtilis

Duncan

V55	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
control	3	6.0000		
50	3		9.4967	
100	3			12.0867
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.29 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

Descriptives

S. aureus

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					50	3		
100	3	13.7700	1.11727	.64506	10.9945	16.5455	12.51	14.64
control	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	9	9.2344	3.55074	1.18358	6.5051	11.9638	6.00	14.64

ANOVA

S. aureus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	98.177	2	49.089	109.709	.000
Within Groups	2.685	6	.447		
Total	100.862	8			

ตารางที่ จ.30 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

S. aureus

Duncan

V55	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
control	3	6.0000		
50	3		7.9333	
100	3			13.7700
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.31 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

Descriptives

E. coli

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					50	3		
100	3	7.2067	.27574	.15920	6.5217	7.8916	6.92	7.47
control	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	9	6.4022	.61889	.20630	5.9265	6.8779	6.00	7.47

ANOVA

E. coli

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.912	2	1.456	57.450	.000
Within Groups	.152	6	.025		
Total	3.064	8			

ตารางที่ จ.32 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

E. coli

Duncan

V55	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
50	3	6.0000	
control	3	6.0000	
100	3		7.2067
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.33 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

Descriptives

P. aeruginosa

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					50	3		
100	3	7.4367	.26312	.15191	6.7830	8.0903	7.27	7.74
control	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	9	6.4789	.73028	.24343	5.9175	7.0402	6.00	7.74

ANOVA

P. aeruginosa

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.128	2	2.064	89.437	.000
Within Groups	.138	6	.023		
Total	4.266	8			

ตารางที่ จ.34 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

P. aeruginosa

Duncan

V55	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
50	3	6.0000	
control	3	6.0000	
100	3		7.4367
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.35 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

Descriptives

C. albicans

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					50	3		
100	3	7.0533	.04163	.02404	6.9499	7.1568	7.02	7.10
control	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	9	6.3511	.52708	.17569	5.9460	6.7563	6.00	7.10

ANOVA

C. albicans

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.219	2	1.110	1920.308	.000
Within Groups	.003	6	.001		
Total	2.222	8			

ตารางที่ จ.36 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. V55 ในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นต่างกัน

C. albicans

Duncan

V55	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
50	3	6.0000	
control	3	6.0000	
100	3		7.0533
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

จ-1.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดสาหร่าย ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

ตารางที่ จ.37 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ที่ความเข้มข้น 50 mg/mL

Descriptives

S. mutans

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					KU	3		
V55	3	10.5267	.15308	.08838	10.1464	10.9069	10.35	10.62
B2	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
N11	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	12	8.7375	2.96417	.85568	6.8542	10.6208	6.00	13.12

ANOVA

S. mutans

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	95.323	3	31.774	191.681	.000
Within Groups	1.326	8	.166		
Total	96.649	11			

ตารางที่ จ.38 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้ง *S. mutans* ที่ความเข้มข้น 50 mg/mL

S. mutans

Duncan

algae	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
B2	3	6.0000		
N11	3	6.0000		
V55	3		10.5267	
KU	3			12.4233
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.39 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ที่ความเข้มข้น 50 mg/mL

Descriptives

B. subtilis

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					KU	3		
V55	3	9.4967	.86286	.49817	7.3532	11.6401	8.51	10.11
B2	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
N11	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	12	7.8433	1.98145	.57200	6.5844	9.1023	6.00	10.23

ANOVA

B. subtilis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	40.991	3	13.664	49.765	.000
Within Groups	2.197	8	.275		
Total	43.188	11			

ตารางที่ จ.40 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้ง *B. subtilis* ที่ความเข้มข้น 50 mg/mL

B. subtilis

Duncan

algae	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
B2	3	6.0000	
N11	3	6.0000	
V55	3		9.4967
KU	3		9.8767
Sig.		1.000	.400

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.41 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 50 mg/mL

Descriptives

S. aureus

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
KU	3	10.3167	.19218	.11096	9.8393	10.7941	10.11	10.49
V55	3	7.9333	.30665	.17704	7.1716	8.6951	7.61	8.22
B2	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
N11	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	12	7.5625	1.86058	.53710	6.3803	8.7447	6.00	10.49

ANOVA

S. aureus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	37.817	3	12.606	385.007	.000
Within Groups	.262	8	.033		
Total	38.079	11			

ตารางที่ จ.42 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้ง *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 50 mg/mL

S. aureus

Duncan

algae	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
B2	3	6.0000		
N11	3	6.0000		
V55	3		7.9333	
KU	3			10.3167
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.43 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL

Descriptives

S. mutans

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					KU	3		
V55	3	13.7133	1.34404	.77598	10.3746	17.0521	12.67	15.23
B2	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
N11	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	12	9.7842	4.00083	1.15494	7.2422	12.3262	6.00	15.23

ANOVA

S. mutans

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	171.965	3	57.322	111.637	.000
Within Groups	4.108	8	.513		
Total	176.073	11			

ตารางที่ จ.44 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้ง *S. mutans* ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL

S. mutans

Duncan

algae	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
B2	3	6.0000	
N11	3	6.0000	
KU	3		13.4233
V55	3		13.7133
Sig.		1.000	.633

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.45 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL

Descriptives

B. subtilis

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					KU	3		
V55	3	12.0867	.58381	.33706	10.6364	13.5369	11.57	12.72
B2	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
N11	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	12	8.7075	2.89353	.83529	6.8690	10.5460	6.00	12.72

ANOVA

B. subtilis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	90.673	3	30.224	169.785	.000
Within Groups	1.424	8	.178		
Total	92.098	11			

ตารางที่ จ.46 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้ง *B. subtilis* ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL

B. subtilis

Duncan

algae	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
B2	3	6.0000		
N11	3	6.0000		
KU	3		10.7433	
V55	3			12.0867
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.47 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL

Descriptives

S. aureus

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
KU	3	11.4900	.39950	.23065	10.4976	12.4824	11.23	11.95
V55	3	13.7700	1.11727	.64506	10.9945	16.5455	12.51	14.64
B2	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
N11	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	12	9.3150	3.59904	1.03895	7.0283	11.6017	6.00	14.64

ANOVA

S. aureus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	139.668	3	46.556	132.271	.000
Within Groups	2.816	8	.352		
Total	142.484	11			

ตารางที่ จ.48 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้ง *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL

S. aureus

Duncan

algae	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
B2	3	6.0000		
N11	3	6.0000		
KU	3		11.4900	
V55	3			13.7700
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.49 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL

Descriptives

E. coli

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
KU	3	7.0067	.45181	.26085	5.8843	8.1290	6.58	7.48
V55	3	7.2067	.27574	.15920	6.5217	7.8916	6.92	7.47
B2	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
N11	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	12	6.5533	.62482	.18037	6.1563	6.9503	6.00	7.48

Test of Homogeneity of Variances

E. coli

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.784	3	8	.059

ANOVA

E. coli

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.734	3	1.245	17.771	.001
Within Groups	.560	8	.070		
Total	4.294	11			

ตารางที่ จ.50 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้ง *E. coli* ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL

E. coli

Duncan

algae	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
B2	3	6.0000	
N11	3	6.0000	
KU	3		7.0067
V55	3		7.2067
Sig.		1.000	.382

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.51 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
หยาบสำหรับ *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ความเข้มข้น 100
mg/mL

Descriptives

P. aeruginosa

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
KU	3	7.3600	.10149	.05859	7.1079	7.6121	7.27	7.47
V55	3	7.4367	.26312	.15191	6.7830	8.0903	7.27	7.74
B2	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
N11	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	12	6.6992	.74063	.21380	6.2286	7.1697	6.00	7.74

Test of Homogeneity of Variances

P. aeruginosa

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
10.780	3	8	.003

ANOVA

P. aeruginosa

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.875	3	1.958	98.488	.000
Within Groups	.159	8	.020		
Total	6.034	11			

ตารางที่ จ.52 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบ
สำหรับ *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ ในการยับยั้ง *P. aeruginosa* ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL

P. aeruginosa

Duncan

algae	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
B2	3	6.0000	
N11	3	6.0000	
KU	3		7.3600
V55	3		7.4367
Sig.		1.000	.524

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ.53 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสำหรับ *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL

Descriptives

C. albicans

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
KU	3	7.0700	.05000	.02887	6.9458	7.1942	7.02	7.12
V55	3	7.0533	.04163	.02404	6.9499	7.1568	7.02	7.10
B2	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
N11	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
Total	12	6.5308	.55517	.16026	6.1781	6.8836	6.00	7.12

Test of Homogeneity of Variances

C. albicans

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.734	3	8	.060

ANOVA

C. albicans

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.382	3	1.127	1065.142	.000
Within Groups	.008	8	.001		
Total	3.390	11			

ตารางที่ จ.54 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของสารสกัดหยาบสำหรับ *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ที่ความเข้มข้น 100 mg/mL

C. albicans

Duncan

algae	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
B2	3	6.0000	
N11	3	6.0000	
V55	3		7.0533
KU	3		7.0700
Sig.		1.000	.548

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

จ-2 การวิเคราะห์ทางสถิติค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ระดับความเข้มข้น 0.625, 1.5, 2.5, 5 และ 10 ของสาหร่ายสกุล *Chlorella* ด้วยวิธี DPPH

จ-2.1 สาหร่าย *Chlorella* sp. KU

ตารางที่ จ.55 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU

Descriptives

Chlorella sp. KU

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
10	3	60.672900	.8537826	.4929316	58.551986	62.793814	60.0062	61.6352
5	3	54.399167	1.3684178	.7900564	50.999828	57.798505	52.8302	55.3459
2.5	3	50.838500	.4803521	.2773314	49.645239	52.031761	50.3144	51.2578
1.25	3	45.842000	.3369989	.1945664	45.004848	46.679152	45.5974	46.2264
0.625	3	41.509400	.9434000	.5446722	39.165864	43.852936	40.5660	42.4528
Total	15	50.652393	6.9247216	1.7879554	46.817610	54.487176	40.5660	61.6352

ANOVA

Chlorella sp. KU

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	663.653	4	165.913	216.268	.000
Within Groups	7.672	10	.767		
Total	671.325	14			

ตารางที่ จ.56 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. KU

Chlorella sp. KU

Duncan

concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0.625	3	41.509400				
1.25	3		45.842000			
2.5	3			50.838500		
5	3				54.399167	
10	3					60.672900
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

จ-2.2 สาหร่าย *Chlorella* sp. V55

ตารางที่ จ.57 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. V55

Descriptives

Chlorella sp. V55

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					10	3		
5	3	48.113167	1.2578500	.7262200	44.988494	51.237839	46.8553	49.3710
2.5	3	45.178133	.4803630	.2773377	43.984845	46.371421	44.6540	45.5974
1.25	3	43.500967	.3630956	.2096333	42.598987	44.402946	43.0817	43.7106
0.625	3	41.404567	.1815767	.1048333	40.953505	41.855628	41.1949	41.5094
Total	15	46.939153	5.4719034	1.4128394	43.908914	49.969392	41.1949	56.9182

ANOVA

Chlorella sp. V55

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	414.965	4	103.741	245.881	.000
Within Groups	4.219	10	.422		
Total	419.184	14			

ตารางที่ จ.58 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. V55

Chlorella sp. V55

Duncan

concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0.625	3	41.404567				
1.25	3		43.500967			
2.5	3			45.178133		
5	3				48.113167	
10	3					56.498933
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

จ-2.3 สาหร่าย *Chlorella* sp. B2-59

ตารางที่ จ.59 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. B2-59

Descriptives

Chlorella sp. B2-59

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					10	3		
5	3	46.750467	.1815767	.1048333	46.299405	47.201528	46.5408	46.8553
2.5	3	42.872400	.4799268	.2770859	41.680196	44.064604	42.4538	43.3962
1.25	3	39.308133	.8319754	.4803412	37.241392	41.374875	38.6792	40.2515
0.625	3	36.687600	.4803521	.2773314	35.494339	37.880861	36.1635	37.1069
Total	15	43.228540	5.1806575	1.3376400	40.359587	46.097493	36.1635	51.5723

ANOVA

Chlorella sp. B2-59

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	371.728	4	92.932	231.144	.000
Within Groups	4.021	10	.402		
Total	375.749	14			

ตารางที่ จ.60 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. B2-59

Chlorella sp. B2-59

Duncan

concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0.625	3	36.687600				
1.25	3		39.308133			
2.5	3			42.872400		
5	3				46.750467	
10	3					50.524100
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

จ-2.4 สาหร่าย *Chlorella* sp. N11/59

ตารางที่ จ.61 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ สาหร่าย *Chlorella* sp. N11/59

Descriptives

Chlorella sp. N11/59

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					10	3		
5	3	57.547167	.6289500	.3631245	55.984768	59.109565	56.9182	58.1761
2.5	3	49.685533	1.1337933	.6545959	46.869035	52.502032	48.4277	50.6289
1.25	3	45.597433	1.1338349	.6546199	42.780831	48.414035	44.6540	46.8553
0.625	3	44.549233	.7913683	.4568967	42.583365	46.515101	43.7107	45.2830
Total	15	52.222200	7.6424761	1.9732789	47.989938	56.454462	43.7107	64.1509

ANOVA

Chlorella sp. N11/59

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	810.057	4	202.514	264.817	.000
Within Groups	7.647	10	.765		
Total	817.704	14			

ตารางที่ จ.62 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสาหร่าย *Chlorella* sp. N11/59

Chlorella sp. N11/59

Duncan

concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0.625	3	44.549233			
1.25	3	45.597433			
2.5	3		49.685533		
5	3			57.547167	
10	3				63.731633
Sig.		.173	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

จ-2.5 สารมาตรฐานวิตามินอี

ตารางที่ จ.63 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินอี

Descriptives

Vitamin E

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					10	3		
5	3	71.278833	1.0108620	.5836214	68.767713	73.789954	70.1258	72.0126
2.5	3	62.054467	.9606606	.5546377	59.668053	64.440880	61.0063	62.8930
1.25	3	52.515733	.8320321	.4803740	50.448851	54.582616	51.5723	53.1447
0.625	3	47.379433	.9607588	.5546944	44.992776	49.766091	46.5408	48.4277
Total	15	63.144640	13.1427816	3.3934516	55.866410	70.422870	46.5408	83.3333

ANOVA

Vitamin E

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2409.885	4	602.471	719.571	.000
Within Groups	8.373	10	.837		
Total	2418.258	14			

ตารางที่ จ.64 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินอี

Vitamin E

Duncan

concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0.625	3	47.379433				
1.25	3		52.515733			
2.5	3			62.054467		
5	3				71.278833	
10	3					82.494733
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

จ-2.6 สารมาตรฐานวิตามินซี

ตารางที่ จ.65 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารวิตามินซี

Descriptives

Vitamin C

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					10	3		
5	3	74.014167	.8072917	.4660901	72.008743	76.019590	73.2704	74.8727
2.5	3	65.723233	1.2578500	.7262200	62.598561	68.847906	64.4654	66.9811
1.25	3	55.136267	1.5827963	.9138279	51.204383	59.068151	53.4591	56.6038
0.625	3	45.178200	1.1043358	.6375886	42.434878	47.921522	44.0252	46.2264
Total	15	65.767187	15.6280205	4.0351375	57.112677	74.421696	44.0252	89.9371

ANOVA

Vitamin C

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3404.143	4	851.036	561.825	.000
Within Groups	15.148	10	1.515		
Total	3419.290	14			

ตารางที่ จ.66 แสดงค่าความสม่ำเสมอของข้อมูล (Homogeneous Subsets) ของค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซี

Vitamin C

Duncan

concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0.625	3	45.178200				
1.25	3		55.136267			
2.5	3			65.723233		
5	3				74.014167	
10	3					88.784067
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ

วันที่ 5 เดือน กรกฎาคม พ.ศ 2561

ข้าพเจ้า	นางสาว วรยารัตน์	มหัตต์เชวงกุล	รหัสประจำตัว 57050889
	นางสาว ศุภกานต์	เที่ยงตรง	รหัสประจำตัว 57050902

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา
ขอรับรองว่าโครงการพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ
จากสารสกัดหยาบสาหร่าย

ชื่อภาษาอังกฤษ Study of Antimicrobial Activity and Antioxidant from
Microalgae Crude Extracts

ปีการศึกษา 2560

เป็นผลงานวิจัยที่มีได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความ
ซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่
ตรวจสอบจากเล่มโครงการพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.00 %

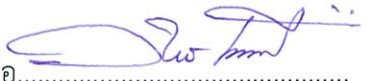
ลงชื่อ..... วรยารัตน์ มหัตต์เชวงกุล

ลงชื่อ..... ศุภกานต์ เที่ยงตรง

(นางสาววรยารัตน์ มหัตต์เชวงกุล)
นักศึกษา

(นางสาวศุภกานต์ เที่ยงตรง)
นักศึกษา

ข้าพเจ้า ดร. วิภาวี เดชตติศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการงานพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงการงานพิเศษ
ของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์
จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....

(ดร. วิภาวี เดชตติศักดิ์)
อาจารย์ที่ปรึกษา