

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1.1 ขวดโหลสำหรับแช่สาหร่ายเพื่อสกัดสาร
- 1.2 เครื่อง Rotary evaporator ยี่ห้อ Büchi รุ่น Rotavapor R-200
- 1.3 เครื่อง Lyophilizer ยี่ห้อ FTS Systems รุ่น Dura-Dry
- 1.4 เครื่อง Vortex mixer
- 1.5 เครื่องชั่งสาร ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น PG802-S
- 1.6 อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Julabo Eco Temp TW12
- 1.7 เครื่อง pH meter ยี่ห้อ Metrohm
- 1.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ยี่ห้อ Helosis
- 1.9 เครื่องปั่นไฟฟ้า ยี่ห้อ Phillips
- 1.10 เครื่อง centrifuge
- 1.11 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ ยี่ห้อ Olympus
- 1.12 ตู้อบ 60 °C
- 1.13 Autopipette ขนาด 10, 200 และ 1000 μ l
- 1.14 Pipette tip
- 1.15 บีกเกอร์ขนาด 250 ml
- 1.16 กระบอกตวง
- 1.17 หลอดทดลองขนาดเล็กและเครื่องแก้วชนิดและขนาดต่างๆ
- 1.18 กรวยกรอง
- 1.19 กระดาษกรอง Whatman No.1
- 1.20 นาฬิกาจับเวลา
- 1.21 เสื้อชูชีพ
- 1.22 หน้ากากดำน้ำ
- 1.23 ถุงพลาสติก
- 1.24 Karo syrup

- 1.25 Aniline blue
- 1.26 Formalin
- 1.27 Microplate reader Spectra (Dynex technologies)
- 1.28 Micro plate 48 หลุม
- 1.29 เครื่อง GPS ยี่ห้อ etrex

2. สารเคมี

2.1 การทดสอบกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity (Hou, *et al.*, 2001) (ภาคผนวก ก)

- 2.1.1 1 M Tris-HCl buffer (pH=7.9)
- 2.1.2 250 mM DPPH (Merck)
- 2.1.3 Metanol (Merck)
- 2.1.4 Gallic acid (Fluka)

2.2 การทดสอบสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Total Phenolic content (Chandler and Dodds, 1983) (ภาคผนวก ก)

- 2.2.1 50% Folin-Ciocalteu reagent
- 2.2.2 5% w/v Na₂CO₃

2.3 การวัดปริมาณรงควัตถุ (Bennet and Bogorad, 1973) (ภาคผนวก ก)

- 2.3.1 Methanol
- 2.3.2 Na₂HPO₄·7H₂O 1 N
- 2.3.3 NaH₂PO₄·H₂O 1 N
- 2.3.4 Phosphate buffer pH 7.0 ผสมสารละลาย Na₂HPO₄·7H₂O กับ NaH₂PO₄·H₂O ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

2.4 การรักษาตัวอย่างและจำแนกชนิดของสาหร่ายทะเลสีแดง (ภาคผนวก ก)

- 2.4.1 Karo syrup 50 %
- 2.4.2 Aniline blue 1 %
- 2.4.7 Formaldehyde 4 %

วิธีการวิจัย

1. การสำรวจภาคสนาม

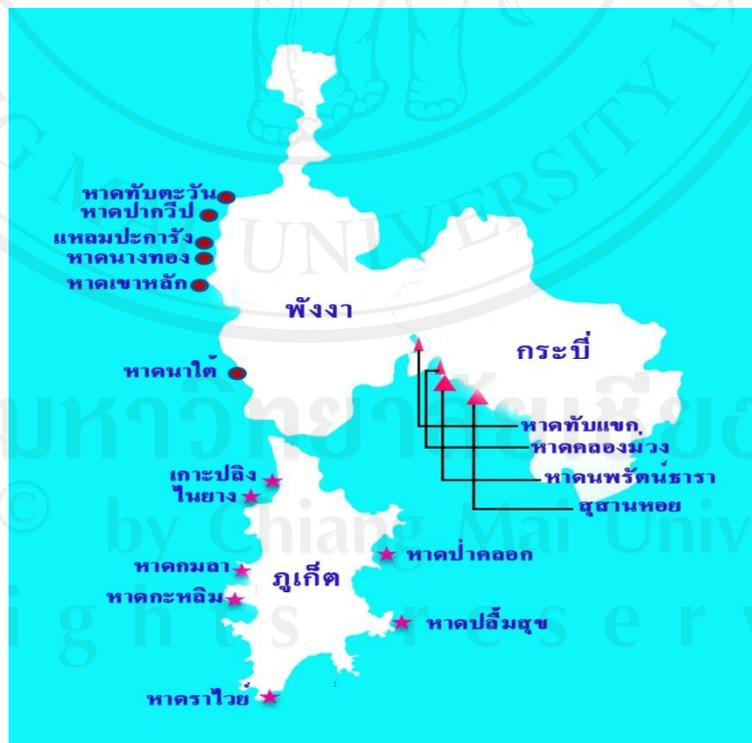
สำรวจพื้นที่ทำการศึกษาชายฝั่งทะเลของจังหวัดต่าง ๆ ดังนี้

จังหวัดพังงา บริเวณหาดปากวีป หาดทับตะวัน แหลมปะการัง หาดนางทอง หาดเขาหลัก หาดนาใต้ (ภาพ 2)

จังหวัดภูเก็ต ได้แก่ หาดป่าคลอก หาดป้อมสุข หาดราไวย์ หาดกะหลิม หาดกมลา เกาะปลิง หาดไถยาง (ภาพ 2)

จังหวัดกระบี่ ได้แก่ คลองม่วง หาดนพรัตน์ธารา สุสานหอย หาดทับแขก (ภาพ 2)

ในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง ใช้วิธีดำน้ำสู่มเก็บตัวอย่างแบบผิวน้ำ (skin diving) ร่วมกับการเดินสำรวจสู่มเก็บตัวอย่างบริเวณชายหาดในระดับน้ำขึ้นลง โดยพื้นที่ทำการศึกษาเป็นชายหาดที่มีความลาดชันน้อย มีซากปะการัง ก้อนหิน ก้อนกรวด คลื่นลมสงบ ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย ทำการบันทึกภาพใต้น้ำ สภาพทั่วไปของสถานที่เก็บตัวอย่าง จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างด้วยสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ 4 % และทำตัวอย่างพรรณไม้อัดแห้งบนกระดาษ (herbarium specimen) เพื่อนำไปจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการต่อไป



ภาพ 2 พื้นที่จุดเก็บตัวอย่างบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดพังงา ภูเก็ต และกระบี่

พื้นที่จุดเก็บตัวอย่างจังหวัดพังงา

หาดทับตะวัน พิกัด N 08°48.495' E 098°15.265'

เป็นชายหาดยาวเปิดออกสู่ทะเล มีความลาดชันน้อย ประกอบด้วยโขดหิน ก้อนหิน ก้อนกรวด ทราบและแนวปะการัง เมื่อน้ำลงต่ำสุดชายหาดจะโผล่พื้นผิวน้ำมีระยะทางประมาณ 300-400 เมตร (ภาพ 3)



ภาพ 3 หาดทับตะวัน จังหวัดพังงา

หาดปากวิป พิกัด N 08° 75.123' E 098° 25.571'

เป็นชายหาดที่เปิดออกสู่ทะเล มีความลาดชันและความแรงของคลื่นมาก มีโขดหินขนาดใหญ่บริเวณชายหาดซึ่งเป็นพื้นที่ยึดเกาะของสาหร่าย โดยโขดหินจะโผล่พื้นผิวน้ำในระดับน้ำลงต่ำสุด และมีน้ำสาครกระเซ็นจากแรงของคลื่นถึงตลอดเวลา เป็นชายหาดที่สงบเนื่องจากยังไม่มี การพัฒนาเป็นแหล่งท่องเที่ยว (ภาพ 4)



ภาพ 4 หาดปากวิป จังหวัดพังงา

แหลมปะการัง พิกัด N 08° 43.620' E 098° 13.531'

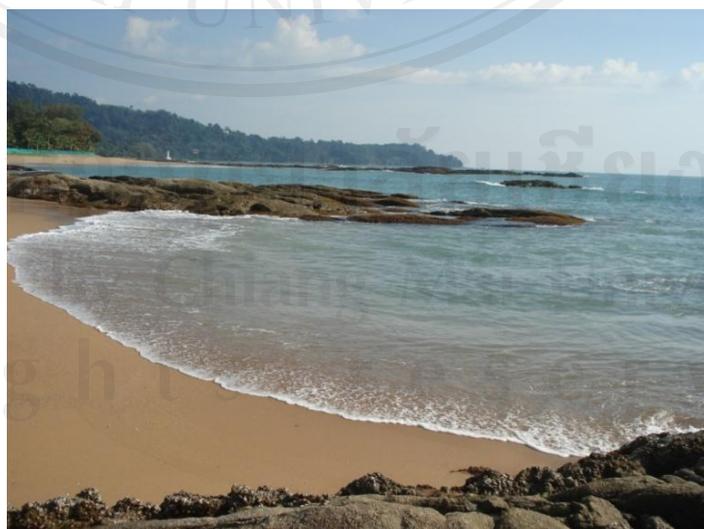
เป็นแหลมยื่นออกไปในทะเล เมื่อระดับน้ำลงต่ำสุดชายหาดจะโผล่พื้นผิวน้ำประมาณ 400-500 เมตร ชายหาดมีความลาดชันน้อย ประกอบด้วยโขดหิน ก้อนหิน ก้อนกรวดทราย และซากปะการังจำนวนมาก มีคลื่นลมแรงตลอดเวลา (ภาพ 5)



ภาพ 5 แหลมปะการัง จังหวัดพังงา

หาดนางทอง พิกัด N 08° 38.712' E 098° 14.807'

เป็นชายหาดที่เปิดออกสู่ทะเล มีความลาดชันและความแรงของคลื่นมาก มีโขดหินขนาดใหญ่บริเวณชายหาดและกลางน้ำซึ่งเป็นพื้นที่ยึดเกาะของสาหร่าย โดยโขดหินจะโผล่พื้นผิวน้ำในระดับน้ำลงต่ำสุด (ภาพ 6)



ภาพ 6 หาดนางทอง จังหวัดพังงา

หาดเขาหลัก พิกัด N. 08° 62.922' E. 098° 23.905'

เป็นชายหาดที่เปิดออกสู่ทะเล มีความลาดชันและความแรงของคลื่นมาก มีหน้าผาที่เป็นก้อนหินและโขดหินขนาดใหญ่บริเวณชายหาดซึ่งเป็นพื้นที่ยึดเกาะของสาหร่าย โดยโขดหินจะไหลพัดผิวน้ำในระดับน้ำลงต่ำสุด และมีน้ำสาดกระเซ็นจากแรงของคลื่นถึงตลอดเวลา (ภาพ 7)



ภาพ 7 หาดเขาหลัก จังหวัดพังงา

หาดนาใต้ พิกัด N 08° 22.429' E 098° 14.055'

เป็นชายหาดที่เปิดออกสู่ทะเล มีความลาดชันและความแรงของคลื่นมาก มีแผ่นหินขนาดใหญ่บริเวณชายหาดซึ่งเป็นพื้นที่ยึดเกาะของสาหร่าย โดยแผ่นหินจะไหลพัดผิวน้ำในระดับน้ำต่ำสุด และมีน้ำสาดกระเซ็นจากแรงของคลื่นถึงตลอดเวลา (ภาพ 8)



ภาพ 8 หาดนาใต้ จังหวัดพังงา

พื้นที่จุดเก็บตัวอย่างจังหวัดภูเก็ต

เกาะปลิง พิกัด N 08° 86.593' E 098° 29.459'

เป็นชายหาดที่เปิดออกสู่ทะเล มีความลาดชันน้อยและความแรงของคลื่นมาก บริเวณใกล้ฝั่ง เป็นแอ่งทรายที่มีแนวหญ้าทะเลขึ้นบางส่วน และบริเวณที่ห่างฝั่งออกไป ประกอบด้วยหินและซากปะการัง และแนวปะการัง (ภาพ 9)



ภาพ 9 เกาะปลิง จังหวัดภูเก็ต

หาดไฉนยาง พิกัด N 08° 89.567' E 098° 29.699'

เป็นชายหาดที่เปิดออกสู่ทะเล มีความลาดชันและความแรงของคลื่นปานกลาง ประกอบไปด้วยหินและซากปะการัง และแนวปะการัง ซึ่งเป็นที่เจริญของสาหร่าย (ภาพ 10)



ภาพ 10 หาดไฉนยาง จังหวัดภูเก็ต

หาดกมลา พิกัด N 08° 91.862' E 098° 30.171'

เป็นชายหาดที่เปิดออกสู่ทะเล มีความลาดชันและความแรงของคลื่นปานกลาง มีก้อนหินขนาดใหญ่บริเวณชายหาดซึ่งเป็นพื้นที่ยึดเกาะของสาหร่าย โดยก้อนหินจะโผล่พ้นผิวน้ำในระดบน้ำลงต่ำสุด (ภาพ 11)



ภาพ 11 หาดกมลา จังหวัดภูเก็ต

หาดกะหลิม พิกัด N 08° 21.155' E 098° 29.467'

เป็นชายหาดที่เปิดออกสู่ทะเล มีความลาดชันและความแรงของคลื่นมากลักษณะคล้ายแอ่งกระทะ มีก้อนหินขนาดใหญ่ และซากปะการัง บริเวณชายหาดซึ่งเป็นพื้นที่ยึดเกาะของสาหร่าย โดยก้อนหินจะโผล่พ้นผิวน้ำในระดบน้ำลงต่ำสุด ซึ่งไม่ได้รับการลาดกระเซ็นของน้ำจากแรงของคลื่นทำให้ก้อนหินจะโผล่พ้นผิวน้ำแห้งและร้อนในช่วงน้ำลง (ภาพ 12)



ภาพ 12 หาดกะหลิม จังหวัดภูเก็ต

หาดราไวย์ พิกัด N 07° 77.528' E 098° 32.763'

เป็นชายหาดยาว เปิดออกสู่ทะเล มีความลาดชันน้อย ประกอบด้วยโขดหิน ก้อนหิน ก้อนกรวด ทราย แนวปะการังและซากปะการังจำนวนมาก เป็นสถานที่ท่องเที่ยว และเป็นแหล่งจอดเรือของชาวประมง บริเวณริมชายฝั่งมีผู้คนอยู่อาศัยจำนวนมาก (ภาพ 13)



ภาพ 13 หาดราไวย์ จังหวัดภูเก็ต

หาดป่าคลอก พิกัด N 07° 99.155' E 098° 41.295'

ลักษณะเป็นหาดโคลนปนทราย บริเวณชายฝั่งมีพืชป่าชายเลนขึ้นประปราย มีแนวหญ้าทะเล และรากแสมเป็นที่ยึดเกาะของสาหร่ายทะเล (ภาพ 14)



ภาพ 14 หาดป่าคลอก จังหวัดภูเก็ต

หาดปลื้มสุข พิกัด N 07° 89.398' E 098° 43.753'

เป็นชายหาดยาว เปิดออกสู่ทะเล มีความลาดชันน้อย ประกอบด้วยโขดหิน ก้อนหิน ก้อนกรวด ทราย แนวปะการัง และซากปะการัง (ภาพ 15)



ภาพ 15 หาดปลื้มสุข จังหวัดภูเก็ต

พื้นที่จุดเก็บตัวอย่างจังหวัดกระบี่

หาดทับแขก พิกัด N 08° 84.384' E 098° 74.408'

เป็นชายหาดยาว เปิดออกสู่ทะเล มีความลาดชันน้อย ประกอบด้วยโขดหิน ก้อนหิน ก้อนกรวด ทราย ซากปะการังและแนวปะการัง (ภาพ 16)



ภาพ 16 หาดทับแขก จังหวัดกระบี่

หาดคลองม่วง พิกัด N 08° 42.488' E 098° 82.734'

เป็นชายหาดยาว เปิดออกสู่ทะเล มีความลาดชันน้อย ประกอบด้วยโขดหิน ก้อนหิน ก้อนกรวด ทราย แนวปะการังและซากปะการังจำนวนมาก (ภาพ 17)



ภาพ 17 หาดคลองม่วง จังหวัดกระบี่

หาดนพรัตน์ธารา พิกัด N 08° 43.570' E 098° 81.778'

เป็นชายหาดยาว เปิดออกสู่ทะเล มีความลาดชันน้อย ประกอบด้วย ก้อนกรวด ทรายละเอียด แนวและปะการังซากปะการังเล็กน้อย จำนวนมาก (ภาพ 18)



ภาพ 18 หาดนพรัตน์ธารา จังหวัดกระบี่

อุทยานหอย พิกัด N 08° 25.450' E 098° 88.347'

เป็นชายหาดที่เปิดออกสู่ทะเล มีความลาดชันและความแรงของคลื่นมาก มีแผ่นหินขนาดใหญ่บริเวณชายหาดซึ่งเป็นพื้นที่ยึดเกาะของสาหร่าย โดยแผ่นหินจะโผล่พ้นผิวน้ำในระดับน้ำลงต่ำสุด และมีน้ำสาครกระเซ็นจากแรงของคลื่นถึงตลอดเวลา (ภาพ 19)



ภาพ 19 อุทยานหอย จังหวัดกระบี่

2. การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

จำแนกชนิดสาหร่ายทะเลสีแดงภายในห้องปฏิบัติการ โดยการศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอก และศึกษาโครงสร้างภายใน โดยนำสาหร่ายที่เก็บในน้ำยารักษาสภาพหรือตัวอย่างอัดแห้งมาตัดให้เป็นชิ้น บ้างๆ โดยใช้ใบมีดภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ ย้อมสีด้วย aniline blue 1 % ทำสไลด์ถาวรโดยใช้ 50 % Karo syrup เพื่อใช้ศึกษารายละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกรายละเอียดโดยการถ่ายภาพ เอกสารที่ใช้ในการจำแนกชนิดสาหร่ายทะเลสีแดงได้แก่ Dawson (1954), Egerod (1974), Taylor (1979), Cribb (1983), Millar (1990), Lewmanomont and Ogawa (1995), Trono (1997), Abbott (1999), Huisman (2000) และ Littler and Littler (2000)

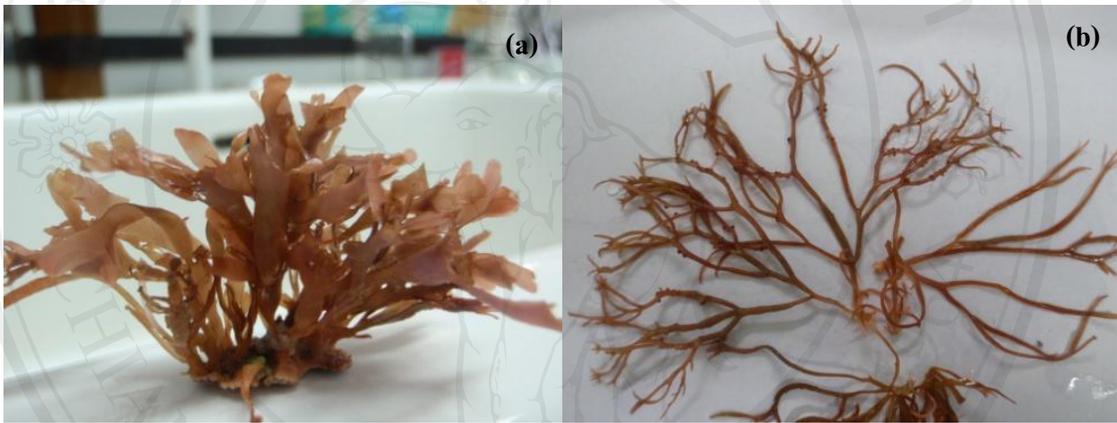
3. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายทะเลสีแดง

3.1 การเตรียมส่วนสกัดสาหร่ายทะเล

นำสาหร่ายทะเลสีแดง 2 ชนิดคือ *Gracilaria* sp.1 และ *Gracilaria* sp.2 (ภาพ 20) ซึ่งจากการศึกษาความหลากหลายพบว่าเป็นชนิดที่พบมากที่สุด (dominant species) ทั้ง 2 ฤดูกาล

นำมาล้างให้สะอาดแล้วมาตากแดดจนแห้งสนิท แล้วนำสาหร่ายแห้งหนัก 100 กรัม มาสกัดกับน้ำ และเอทานอลในปริมาตร 2 ลิตร เวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยขาวบางหนา 2 ชั้น แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 6000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนที่เป็นน้ำมาระเหยอบเอา น้ำ ออกโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 70 °C จากนั้นทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง Lyophilizer ชั่งน้ำหนักคำนวณหา % yield จากสูตร

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดที่ได้} \times 100}{\text{น้ำหนักสาหร่ายแห้งที่ใช้ในการสกัด}}$$



ภาพ 20 a. *Gracilaria* sp. 1 b. *Gracilaria* sp.2

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity โดยดัดแปลงจาก Hou, *et al.* (2001)

3.2.1 ผสมสารสกัด 0.8 ml. เข้ากับ สารละลาย 1 M Tris-HCl buffer (pH 7.9) 67 μ l. แล้วเติมสารละลาย DPPH (250 mM) 0.8 ml. ผสมให้เข้ากัน

3.2.2 ทิ้งไว้ในที่มืด 20 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 nm และคำนวณ % inhibition ดังสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{517 \text{ control}} - A_{517 \text{ test sample}}) / A_{517 \text{ control}}] \times 100$$

เมื่อ $A_{517 \text{ control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม (ตัวทำละลาย + DPPH)

$A_{517 \text{ test sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (สารสกัด + DPPH)

เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารทดสอบกับความเข้มข้นของ gallic acid ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่แสดงฤทธิ์เท่ากัน (gallic acid antioxidant equivalent, GAE)

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (total phenolic content) ซึ่งดัดแปลงจาก Chandler and Dodds (1983)

โดยใช้สาร Follin-Ciocalteu ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารฟีนอลิกตัวใดตัวหนึ่ง แต่สามารถทำปฏิกิริยากับสารฟีนอลิกทุกกลุ่มที่สามารถพบได้จากสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อละลาย Follin-Ciocalteu ใน deionized water ได้สารละลายสีเหลืองและเมื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดที่มีฟีนอลิกจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

3.3.1 ผสมสารสกัด 250 μ l. เข้ากับน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน 1,250 μ l. เดิมเอทานอล 250 μ l. และสารละลาย Folin-Ciocalteu 125 μ l. บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

3.3.2 จากนั้นเติมสารละลาย 5% w/v Na_2CO_3 250 μ l. ทิ้งไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 725 nm จำนวนปริมาณ total phenolic content โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของ gallic acid

4. การวิเคราะห์หาปริมาณรงควัตถุในสาหร่ายทะเลสีแดง

4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ โดยดัดแปลงจาก Bennet and Bogorad (1973)

4.1.1 นำสาหร่าย *Gracilaria* spp. สด 3 g. มาบดให้ละเอียด เติม 90% v/v เมทานอลปริมาตร 10 ml. บ่มที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 20 นาที

4.1.2 กรองเศษเซลล์ทิ้ง ทิ้งให้สารละลายเย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml. ด้วย 90% v/v เมทานอล บั่นที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 650 และ 665 nm

4.1.3 คำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ จากสูตร

$$\text{คลอโรฟิลล์ เอ (mg/ g cell dry weight)} = \frac{[(16.5 \times A_{665}) - (8.3 \times A_{650})] \times 10}{\text{mg cell dry weight}}$$

4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไฟโคไซยานินและไฟโคเออร์ทริน โดยดัดแปลงจาก Kursar, *et al.* (1983)

4.2.1 ชั่งสาหร่ายแห้ง 0.5 g. ทำการบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบด

4.2.2 เติมบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ซึ่งมี pH 7.0 ลงไป 2 ml.

4.2.3 ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปแช่แข็งที่ -80 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาละลายในอ่าง

น้ำร้อน 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำซ้ำจำนวน 5 รอบ

4.2.4 นำสารละลายในข้อ 4.2.3 ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm 20 นาที

4.2.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 250-700 nm

4.2.6 คำนวณหาปริมาณไฟโคไซยานิน จากสูตร

$$PC \text{ (mg/ g cell dry weight)} = 151.1 A_{614} - 99.1 A_{650}$$

4.2.7 คำนวณหาปริมาณไฟโคเออร์ทริน จากสูตร

$$PE \text{ (mg/ g cell dry weight)} = 155.8 A_{498} - 40.0 A_{614} - 10.5 A_{650}$$

5. การวิเคราะห์หาปริมาณโพลีแซคคาไรด์ โดยดัดแปลงจาก Marinho-Soriano and Bourret (2003)

5.1 ใช้สาหร่ายแห้งในอัตราส่วน 5 g. ต่อน้ำ 250 ml. บรรจุในขวดทนความร้อน สกัดโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

5.2 นำสารละลายวุ้นในข้อ 5.1 มากรองแยกกากออกโดยใช้ผ้าขาวบางทิ้งไว้ให้เย็น เพื่อให้วุ้นเกิดเจล นำวุ้นไปแช่แข็งในตู้ทำความเย็นอุณหภูมิ -20 °C

5.3 นำนำสารละลายวุ้นที่ได้ในข้อ 5.2 มาทำละลายและแยกเอาน้ำออก นำวุ้นที่แยกน้ำออกแล้วไปทำแห้งในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วทำการชั่งน้ำหนักแห้ง