การศึกษาฤทธิ์การต้านจุลชีพจากสารสกัดของปลิงทะเลที่เก็บจากบริเวณจังหวัดชลบุรี

STUDY ON ANTIMICROBIAL ACTIVITIES FROM THE EXTRACT OF SEA CUCUMBERS COLLECTED FROM CHONBURI PROVINCE, THAILAND

ปัณรสี ภิญโญ

PUNNARASEE PHINYO

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางทะเล

คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

ปีการศึกษา 2547

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
หมายเลข ... เลขหมู่ ...

การศึกษาฤทธิ์การต้านจุลชีพจากสารสกัดของปลิงทะเลที่เก็บจากบริเวณจังหวัดชลบุรี

STUDY ON ANTIMICROBIAL ACTIVITIES FROM THE EXTRACT OF SEA CUCUMBERS COLLECTED FROM CHONBURI PROVINCE, THAILAND

ปัณรสี ภิญโญ

PUNNARASEE PHINYO

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

1421

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางทะเล
คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
ปีการศึกษา 2547

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การศึกษาฤทธิ์การต้านจุลชีพจากสารสกัดของปลิงทะเลที่เก็บจากบริเวณจังหวัดชลบุรี STUDY ON ANTIMICROBIAL ACTIVITIES FROM THE EXTRACT OF SEA CUCUMBERS COLLECTED FROM CHONBURI PROVINCE, THAILAND
โดย	นางสาวปัณรสี ภิญโญ
คณะ	เทคโนโลยีทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. รวิวรรณ วัฒนดิลก
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์วรรณภา กสิฤกษ์และอาจารย์ดร. ชลี ไพบูลย์กิจกุล

คณะเทคโนโลยีทางทะเลได้พิจารณาปัญหาพิเศษฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางทะเล ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะเทคโนโลยีทางทะเล

(ดร. พิชัย สนแจ้ง)

กรรมการตรวจสอบปัญหาพิเศษ

.....ประธาน

(ดร. รวิวรรณ วัฒนดิลก)

.....กรรมการ

(อาจารย์วรรณภา กสิฤกษ์)

.....กรรมการ

(อาจารย์ดร. ชลี ไพบูลย์กิจกุล)

.....กรรมการ

(อาจารย์สุเมตต์ ปุจฉาการ)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประกาศคุณูปการ

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องด้วยผู้ทำปัญหาพิเศษได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ดร.รวิวรรณ วัฒนดิลก ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำตลอดกระบวนการศึกษา ตลอดจนแก้ไขปรับปรุงข้อบกพร่องปัญหาพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ทั้งเป็นผู้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ เสมอมา ผู้ทำปัญหาพิเศษจึงขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมปัญหาพิเศษอาจารย์วรรณภา กสิฤกษ์ นักวิทยาศาสตร์ประจำสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล และอาจารย์ดร.ชลี ไพบูลย์กิจกุล ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำการศึกษาตลอดมา ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของปัญหาพิเศษให้ถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์สุเมตต์ ปุจฉาการ นักวิทยาศาสตร์, ผู้เชี่ยวชาญด้านอนุกรมวิธานประจำสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลและกรรมการสอบที่ให้การช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง ตรวจสอบเอกลักษณ์ตัวอย่างปลิงทะเล รวมถึงอนุเคราะห์ข้อมูลและภาพถ่ายของปลิงทะเลบางส่วน

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์คณะเทคโนโลยีทางทะเลทุกท่านที่ให้ความรู้ และเจ้าหน้าที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลที่คอยช่วยเหลือสนับสนุนให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้ลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนด้านการศึกษา ทั้งให้ความอบอุ่นและให้กำลังใจอย่างสม่ำเสมอตลอดมา ทำให้ปัญหาพิเศษนี้เป็นผลสำเร็จ

ขอบคุณน้องสาวทั้ง 2 ที่ให้กำลังใจตลอดมา

ขอบคุณคุณปรัชฐา มาเจริญ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษ และคอยรับ-ส่งตลอดการทำปัญหาพิเศษ

ท้ายสุดนี้ขออโหสิกรรมแก่สิ่งมีชีวิตที่ได้สละชีวิตเพื่อการศึกษานี้

ปัณรสี ภิญโญ

มีนาคม 2548

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

44320166: สาขาวิชา: เทคโนโลยีทางทะเล; วท.บ (เทคโนโลยีทางทะเล)
คำสำคัญ: ปลิงทะเล/ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ

ปัณรสี ภิญโญ: การศึกษาฤทธิ์การต้านจุลชีพจากสารสกัดของปลิงทะเลที่เก็บจากบริเวณจังหวัดชลบุรี (STUDY ON ANTIMICROBIAL ACTIVITIES FROM THE EXTRACT OF SEA CUCUMBERS COLLECTED FROM CHONBURI PROVINCE, THAILAND) อาจารย์ที่ปรึกษา: รวิวรรณ วัฒนดิลก, Ph.D: อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: วรรณภา กสิฤกษ์, วท.ม และชลี ไพบูลย์กิจกุล, วท.ค 44 หน้า. 2548

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นทางด้านการต้านจุลชีพ (antimicrobial) ของสารสกัดหยาบจากปลิงทะเลที่เก็บจากบริเวณจังหวัดชลบุรี โดยทำการศึกษาสารสกัดหยาบจากผนังลำตัวของปลิงทะเล 5 ชนิด ได้แก่ *Bohadschia marmorata*, *Holothuria (Mertensiothuria) leucospilota*, *Holothuria (Thymiosycia) impatiens*, *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea* และ *Stichopus horrens* ในชั้น ethyl acetate (EtOAc) และ buthanol (BuOH) ตรวจสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพกับเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิดและเชื้อยีสต์ 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 250 µg/disc และ 100 µg/disc ผลการศึกษาวิจัยพบว่า

สารสกัดชั้น BuOH ของตัวอย่างปลิงทะเล *H. fuscocinerea* และสารสกัดชั้น EtOAc ของตัวอย่างปลิงทะเล *B. marmorata* สามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *Pichia kluyveri* และ *Schizosaccharomyces pombe* ได้ตามลำดับที่ระดับความเข้มข้น 250 µg/disc โดยบริเวณที่สารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ (clear zone) ที่เกิดขึ้นเป็นวงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 มิลลิเมตร และ 9 มิลลิเมตร ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

44320166: MAJOR: MARINE TECHNOLOGY; B.Sc (MARINE TECHNOLOGY)

KEYWORD: SEA CUCUMBER/ ANTIMICROBIAL

PUNNARASEE PHINYO: STUDY ON ANTIMICROBIAL ACTIVITIES FROM THE EXTRACT OF SEA CUCUMBERS COLLECTED FROM CHONBURI PROVINCE: ADVISOR'S NAME: RAWIWAN WATANADILOK, Ph.D, COMMITTEES' NAME: WANNAPA KASIROEK, M.Sc AND CHALEE PAIBULKICHKUL, Ph.D, 44 P. 2005.

The objective of this study is to screen on antimicrobial activity of the sea cucumber extracts collected from Chonburi province. The body wall of 5 species of sea cucumbers, *Bohadschia marmorata*, *Holothuria (Mertensiothuria) leucospilota*, *Holothuria (Thymiosycia) impatiens*, *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea* and *Stichopus horrens* were studied in different solvent extraction. The ethyl acetate extract (EtOAc) and buthanol (BuOH) extract were tested with 5 bacteria strains and 4 yeast strains at concentrations 250 µg/disc and 100 µg/disc.

In BuOH extract of *H. fuscocinerea* and EtOAc extract of *B. marmorata* exhibited antifungal activity against *Pichia kluyveri* and *Schizosaccharomyces pombe* at concentration 250 µg/disc. The inhibition zone of *H. fuscocinerea* and *B. marmorata* at 11 mm. and 9 mm., respectively.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 3

ขอบเขตของการวิจัย 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

ปลิงทะเล 5

ชีววิทยาปลิงทะเล 6

ปลิงทะเลที่ใช้ในการศึกษา 7

แบคทีเรีย 11

ลักษณะและโครงสร้างของแบคทีเรีย 11

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา 12

ยีสต์ 15

ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษา 15

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 18

3 วิธีดำเนินการวิจัย 20

สถานที่ทำการทดลอง 20

ระยะเวลาทำการทดลอง 20

อุปกรณ์ 20

สารเคมี 21

วิธีการทดลอง 22

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่		หน้า
4	ผลการวิจัย	25
	การเก็บตัวอย่าง	25
	การสกัดสาร	28
	การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากปลิงทะเล	28
	การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของยา	28
5	อภิปราย สรุปและข้อเสนอแนะ	34
	อภิปรายผล	34
	สรุปผล	36
	ข้อเสนอแนะ	36
บรรณานุกรม		37
ภาคผนวก		42
ประวัติย่อของผู้วิจัย		44

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงน้ำหนักของสารสกัดที่ได้จากตัวอย่างปลิงทะเล	29
2	แสดงผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (clear zone) (mm) จากสารสกัดของปลิงทะเลจำนวน 5 ชนิดในชั้น EtOAc และชั้น BuOH กับเชื้อจุลินทรีย์ 9 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น 250 µg/disc	30
3	แสดงผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (clear zone) (mm) จากสารสกัดของปลิงทะเลจำนวน 5 ชนิดในชั้น EtOAc และชั้น BuOH กับเชื้อจุลินทรีย์ 9 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น 100 µg/disc	31
4	แสดงผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (clear zone) (mm) ของยามาตรฐาน	33
5	Range of Zone Diameters (mm) Obtained with Control Cultures. (DIFCO MANUAL, 1994)	43

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	*Bohadschia marmorata* (Jaeger, 1833)	8
2	*Holothuria (Mertensiothuria) leucospilota* Brandt, 1835	8
3	*Holothuria (Thymiosycia) impatiens* (Forskål, 1775)	9
4	*Holothuria (Stauropora) fuscocinerea* Jaeger, 1833	10
5	*Stichopus horrens* Selenka, 1867	10
6	*Bacillus subtilis*	12
7	*Escherichia coli*	13
8	*Pseudomonas aeruginosa*	13
9	*Staphylococcus aureus*	14
10	*Vibrio* sp.	15
11	*Candida tropicalis*	16
12	*Pichia kluyveri*	17
13	*Schizosaccharomyces pombe*	18
14	ปลิงทะเล *Bohadschia marmorata* ที่ใช้ในการศึกษา	25
15	ปลิงทะเล *Holothuria (Mertensiothuria) leucospilota* ที่ใช้ในการศึกษา	26
16	ปลิงทะเล *Holothuria (Thymiosycia) impatiens* ที่ใช้ในการศึกษา	26
17	ปลิงทะเล *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea* ที่ใช้ในการศึกษา	27
18	ปลิงทะเล *Stichopus horrens* ที่ใช้ในการศึกษา	27
19	แสดง clear zone ของเชื้อ *P. kluyveri*	32
20	แสดง clear zone ของเชื้อ *S. pombe*	32

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลิงทะเล (sea cucumber) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังพบได้ทั่วไปในบริเวณแนวชายฝั่งทะเล และมีความสำคัญต่อระบบนิเวศทางทะเลในแง่ของการย่อยสลายสารอินทรีย์ในตะกอนดินให้มีขนาดเล็กลงและปลดปล่อยธาตุอาหารสู่วงจรอาหารในธรรมชาติ ปลิงทะเลเป็นสัตว์เศรษฐกิจของหลายประเทศในมหาสมุทรอินเดียและมหาสมุทรแปซิฟิกตอนใต้ซึ่งรวมทั้งประเทศไทยด้วย สำหรับประเทศไทยได้ทำการประมงปลิงทะเลเพื่อบริโภคภายในประเทศและส่งออกทั้งฝั่งทะเลอ่าวไทยและอันดามัน โดยการเอาอวัยวะภายในออกแล้วนำมาต้มและตากแห้ง (รู้จักกันในชื่อ Beche-de mer หรือ trepang ในประเทศอินโดนีเซีย) สำหรับนำไปประกอบอาหาร ปลิงทะเลของไทยถูกส่งออกไปยังประเทศมาเลเซียเพื่อใช้ทำยาและผลิตเป็นผงแคปซูลขายเป็นอาหารเพื่อสุขภาพอีกด้วย (สมชัย บุศราวิช และนลินี ทองแถม 2543) นอกจากนี้ปลิงทะเลตากแห้งยังแสดงคุณสมบัติลดความดันในเส้นเลือดและบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อ ในประเทศฟิลิปปินส์มัลดีฟและออสเตรเลียใช้อวัยวะ (cuvarian organ) ของปลิงทะเลบางชนิดมาใช้รักษาบาดแผลและบรรเทาอาการปวดข้อ อีกทั้งปลิงทะเลยังได้ชื่อว่าสามารถนำมาเป็นยาบำรุงทางเพศได้อีกด้วย (Joseph & Shakeel, 1991 อ้างถึงใน สมชัย บุศราวิช และนลินี ทองแถม, 2543) จากคุณสมบัติที่น่าสนใจทั้งหลายของปลิงทะเลทำให้หลายๆ ประเทศได้เริ่มทำการวิจัยและการพัฒนาปลิงทะเลกันอย่างเป็นระบบและจริงจัง ทั้งด้านการเพาะเลี้ยง และการค้นหาตัวยารักษาโรคเพื่อส่งเสริมให้ปลิงทะเลเป็นสัตว์เศรษฐกิจอย่างแท้จริง ซึ่งข้อมูลในส่วนนี้ของประเทศไทยยังมีน้อยมากดังนั้นปลิงทะเลจึงเป็นสัตว์ที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษา

จากข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตบนโลกที่มีอยู่ประมาณ 3-500 ล้านชนิด ซึ่งกระจายอยู่ใน 70 phyla หรือมากกว่านั้น พบว่าสิ่งมีชีวิตในทะเลพวก macrofauna มีอยู่ถึง 5 แสน-30 ล้านชนิด ซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพมากกว่าสิ่งมีชีวิตบนบก และกลุ่มของสิ่งมีชีวิตในทะเลที่นักวิจัยให้ความสนใจในการค้นหาตัวยาใหม่ ได้แก่ พวกกลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีการเคลื่อนที่ช้า หรืออยู่ติดกับที่ หรือพวกที่มีร่างกายอ่อนนุ่มไม่มีหนามหรือเปลือกหุ้ม เช่น ฟองน้ำ tunicate และพวกเอคไคโนเดิร์ม เป็นต้น สารประกอบที่ได้จากสัตว์ทะเลนี้นอกจากจะมีความหลากหลายทางด้านโครงสร้างทางเคมีแล้ว ยังแสดงคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่

หลากหลายอีกด้วย ดังนั้นจึงทำให้นักวิจัยเริ่มหันมาทำการศึกษาและค้นหาสารจากสิ่งมีชีวิตในทะเลกันมากขึ้น โดยที่สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้หลายตัวแสดงคุณสมบัติทางยาที่โดดเด่น

ปลิงทะเลจัดอยู่ในไฟลัม Echinodermata คลาส Holothuroidea จนถึงปัจจุบันได้มีรายงานว่ามีปลิงทะเลมากกว่า 1,000 ชนิดและอย่างน้อยที่สุด 60 ชนิดมีความเป็นพิษ (Nigrelli & Jakowska, 1960) โดยสารพิษเหล่านี้พบว่าอยู่ที่บริเวณผนังของร่างกาย (body wall) และท่อคูเวียร์ (cuvierian organ) ซึ่งรู้จักกันในชื่อ holothurin คุณสมบัติความเป็นพิษของสาร holothurin คือ สามารถฆ่าประชากรของปลาได้อย่างรวดเร็ว (ichthyotoxin) ซึ่ง Frey (1951) ได้รายงานถึงความน่าสนใจของสารพิษจากปลิงทะเลว่าจะฆ่าแต่ปลา ส่วนพวก invertebrates อื่นๆ จะไม่มีผลจากสารพิษนี้ ต่อมา Cunningham และ Goetz (1996) ได้รายงานถึงผลของสารพิษเหล่านี้ว่ามีผลต่อมนุษย์ โดยสามารถทำให้ตาบอดและผิวหนังระคายเคืองได้ ในบางกรณีที่มีการบริโภคด้วยวิธีที่ไม่เหมาะสมก็อาจส่งผลถึงแก่ชีวิตได้ ปลิงทะเลนั้นจะขับสารเหนียวซึ่งจะบรรจุสารพิษ holothurin ออกมาเป็นสายจาก cuvicrian tubles หรือจะปลิ้นอวัยวะภายใน (โดยที่อวัยวะเหล่านี้มีสารพิษ holothurin) นั้นก็เพื่อป้องกันตัวเองจากผู้ล่า หรือเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมอย่างกะทันหัน เช่น อุณหภูมิของน้ำ ความเป็นกรด-ด่าง หรือระดับปริมาณออกซิเจน เป็นต้น ปลิงทะเลที่มีรายงานความเป็นพิษต่อระบบนิเวศ (ecotoxicology) เมื่อถูกทำร้ายหรือเกิดอาการตึงเครียด ได้แก่ ปลิงทะเลสีชมพู *(Holothuria edulis)* ปลิงทะเลจุด (*Bohadschia argus* และ *Actinopyga agassizii*) เป็นต้น (Toonen, 2002) คุณสมบัติด้านหนึ่งของสารพิษ holothurin ที่ปลิงทะเลปล่อยออกมานั้นก็คือ คุณสมบัติทางยาที่น่าสนใจ ได้แก่ anti-tumor (Nigrelli *et al*., 1967); anti-microbial (Shimada, 1969) เป็นต้น ได้มีการรายงานถึงสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ๆ ที่แยกได้จากปลิงทะเลอยู่พอสมควร (Maltsev, *et al*., 1984; Encarnacion, *et al*., 1989; Avilov, *et al*., 1994; Yaw, *et al*., 1994; Carballeira, *et al*., 1996; Hegde *et al*., 2002; Avilov, *et al*., 2000a, 2000b; Avilov, *et al*., 2003) นอกจากนี้ยังพบว่ามีสารประกอบที่แยกจากปลิงทะเลแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์การต้านจุลชีพ (Murray *et al*., 2001; Kitagawa *et al*., 1976a, 1976b, 1985; Villasin & Pomory, 2000) ฤทธิ์ต้านไวรัส (Maier *et al*., 2001; Tsushima *et al*., 1996) ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Popov, 2002; Zou *et al*., 2003; Avilov, *et al*., 2000a) เป็นต้น

ปลิงทะเลพบได้ตามหาดทราย แนวปะการัง ซอกหิน แหล่งหญ้าทะเล รวมทั้งในเขตน้ำลึกนอกชายฝั่ง (อารมณ์ มุจรินทร์, 2545) ในส่วนของชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทยได้เริ่มทำการศึกษาอนุกรมวิธานของเอคไคโนเดิร์ม บริเวณจังหวัดชลบุรี พบว่ามีปลิงทะเลอยู่ 14 ชนิด (ปิยมาศ รอดมา, 2539 อ้างถึงใน อารมณ์ มุจรินทร์, 2545) อีก 2 ปีต่อมา อารมณ์ มุจรินทร์ (2541) ได้รายงานว่าพบปลิงทะเลบริเวณจังหวัดชลบุรีทั้งหมด 17 ชนิด โดยชนิดที่พบ ได้แก่ *Holothuria*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

impatiens, *H. leucospilota*, *H. flavomaculata*, *Bohadschia marmorata*, *Stichopus naso* เป็นต้น ซึ่งล่าสุดได้มีการรายงานจำนวนปลิงทะเลที่พบในแนวปะการังจังหวัดชลบุรีทั้งสิ้นมี 23 ชนิด (สุเมตต์ ปุจฉาการ และคณะ, 2547) ทั้งๆ ที่ประเทศไทยทำการประมงปลิงทะเลเพื่อการบริโภคและส่งออกมาเป็นเวลานานแล้วก็ตาม แต่เรายังขาดข้อมูลการค้นหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติซึ่งออกฤทธิ์ทางชีวภาพของปลิงทะเล รวมถึงทะเลทางฝั่งตะวันออกของไทยก็มีความหลากหลายของปลิงทะเลอยู่พอสมควร และจากข้อมูลต่างๆ ของปลิงทะเลดังที่กล่าวมาข้างต้นไม่ว่าจะเป็นความสำคัญต่อระบบนิเวศ หรือคุณสมบัติที่จะนำไปทำยาได้นั้น ทำให้ผู้ทำปัญหาพิเศษสนใจที่จะทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพบางประการของปลิงทะเลที่อยู่ในเขตจังหวัดชลบุรี

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นทางด้านการต้านจุลชีพ (antimicrobial activity) ของสารสกัดหยาบจากปลิงทะเล

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทำให้ทราบถึงข้อมูลเบื้องต้นของฤทธิ์การต้านจุลชีพของปลิงทะเลในประเทศไทย ซึ่งสามารถที่จะนำไปสู่การค้นหาสารประกอบที่น่าสนใจ

2. จากข้อมูลทางด้านฤทธิ์การต้านจุลชีพสามารถนำไปสู่การพัฒนาทางด้านเภสัชกรรมต่อไป

3. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิธีการสกัดสารจากปลิงทะเล เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้สกัดสิ่งมีชีวิตอื่นต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านจุลชีพจากสารสกัดจากปลิงทะเลโดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างปลิงทะเลแล้วทำการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1. ตัวอย่างปลิงทะเลที่ใช้ในการศึกษาในเขตจังหวัดชลบุรี ซึ่งอยู่ในพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของอ่าวไทยมี 5 ชนิด คือ

1.1 *Bohadschia marmorata* (Jaeger, 1833)

1.2 *Holothuria (Mertensiothuria) leucospilota* Brandt, 1835

1.3 *Holothuria (Thymiosycia) impatiens* (Forskål, 1775)

1.4 *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea* Jaeger, 1833

1.5 *Stichopus horrens* Selenka, 1867

2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากปลิงทะเลทางด้านการต้านจุลชีพกับเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ คือ

แบคทีเรียกรัมบวก ได้แก่

2.1 *Bacillus subtilis* (TISTR No. 008)

2.2 *Staphylococcus aureus* (TISTR No. 517)

แบคทีเรียกรัมลบ ได้แก่

2.3 *Escherichia coli* (TISTR No. 887)

2.4 *Pseudomonas aeruginosa* (TISTR No. 1467)

2.5 *Vibrio* sp. (BIMS. A829.2)

3. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากปลิงทะเลทางด้านการต้านจุลชีพกับเชื้อยีสต์ 4 สายพันธุ์ คือ

3.1 *Candida tropicalis* (TISTR No. 5045)

3.2 *Debaryomyces hansenii* (TISTR No. 5265)

3.3 *Pichai kluyveri* (TISTR No. 5150)

3.4 *Schizosaccharomyces pombe* (TISTR No. 5205)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากที่ผ่านมาได้มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาและค้นหาสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ จากปลิงทะเลกันอย่างต่อเนื่องในหลายๆ ประเทศ โดยเฉพาะกับประเทศที่เริ่มมีการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงปลิงทะเลอย่างจริงจังเพื่อการบริโภคและการส่งออก เช่น ออสเตรเลีย ญี่ปุ่น มาเลเซีย เป็นต้น ในปัจจุบันได้มีผลิตภัณฑ์หลายอย่างที่ได้จากปลิงทะเลทั้งที่นำมาปรุงเป็นอาหารหรือนำไปผลิตเป็นอาหารเสริมบรรจุแคปซูลเพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ มากมายในท้องตลาด เช่น สามารถลดการอักเสบหรือความเจ็บปวด ลดความดันโลหิต เป็นยาอายุวัฒนะ เป็นยาบำรุงทางเพศ เป็นต้น

ปลิงทะเลหรือที่รู้จักกันในชื่อ beche-de-mer (คนญี่ปุ่นเรียก iriko; คนจีนเรียก hai-shen หรือ trepang ในอินโดนีเซีย) ได้ถูกนำมาบริโภคกันอย่างกว้างขวาง โดยในประเทศญี่ปุ่นและเกาหลีจะบริโภคส่วนของผนังลำตัวของปลิงทะเลสดๆ หรืออาจจะนำไปดอง ในมาเลเซียจะนำน้ำต้มส่วนของผิวหนังมาดื่มเป็นยาบำรุงร่างกาย หรือทำออกมาในลักษณะของน้ำมัน (oilment) เพื่อใช้เป็นยาทารักษาโรคผิวหนัง หรือเพื่อลดอาการปวด บวมอักเสบ ส่วนในประเทศจีนจะบริโภคซุปปลิงทะเลกันเป็นประเพณี เพราะเชื่อว่าปลิงทะเลสามารถรักษาอาการท้องผูก อาการอ่อนเพลีย และอาการถ่ายปัสสาวะบ่อยได้ ในมุมมองทางการแพทย์ตะวันตกพบว่าปลิงทะเลเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วย polysaccharide condroiton sulfate ซึ่งเป็นที่รู้กันดีว่าสามารถลดการอาการปวดของข้ออักเสบ (arthritis) ดังนั้นปลิงทะเลจึงถูกนำไปใช้ในการรักษาโรค Rheumatoid Arthritis จากสรรพคุณทางยาต่างๆ ที่โดดเด่นของปลิงทะเล ทำให้งานวิจัยเพื่อค้นหาตัวยารักษาโรคจากปลิงทะเลมีจำนวนเพิ่มขึ้น

1. ปลิงทะเล

ปลิงทะเลจัดอยู่ในไฟลัม Echinodermata คลาส Holothuroidea จากการสำรวจเอคไคโนเดิร์มบริเวณแนวปะการังในภาคตะวันออกพบทั้งหมด 71 ชนิดจาก 28 วงศ์ ชนิดของเอคไคโนเดิร์มที่พบมากที่สุดคือ ปลิงทะเล 23 ชนิด รองลงมาคือ ดาวเปราะ 18 ชนิด เม่นทะเล เหรียญทะเลและเม่นหัวใจ 15 ชนิด และดาวขนนก 2 ชนิด ตามลำดับ โดยปลิงทะเลที่พบมากที่สุด ได้แก่ ปลิงทะเลสีดำ *Holothuria (Mertensiothuria) leucospilota*, ปลิงสีน้ำตาล *H. (Stauropora) fuscocinerea*, ปลิงสีเขียว *H. (Thymiosycia) impatiens*, ปลิงหิน *Stichopus horrens*, ปลิงสีชมพูเหลือง *Cercodemas*

anceps และปลิงสร้อยไข่มุก *Synaptula recta* ซึ่งเอคไคโนเดิร์มที่พบเกือบทั้งหมดเป็นสัตว์ทะเลที่มีคุณค่าทางระบบนิเวศมากกว่าทางเศรษฐกิจและสังคม ยกเว้นปลิงทะเลบางชนิด ได้แก่ *H. (Halodeima) atra*, ปลิงขาว *H. (Metriatyla) scabra* และ *S. horrens* ซึ่งจะมีคุณค่าในทางเศรษฐกิจมากกว่า (สุเมตต์ ปุจฉาการและคณะ, 2547)

ชีววิทยาปลิงทะเล

ปลิงทะเลอาศัยอยู่ในแนวชายฝั่ง ดำรงชีวิตเป็นสัตว์หน้าดินทั้งหมดมีการแพร่กระจายได้ทุกๆ ความลึก สามารถที่จะปรับตัวให้ดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งแนวหิน แนวสาหร่าย และแหล่งหญ้าทะเล หรือจะอาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น ฟองน้ำหรือปะการัง ลักษณะของลำตัวมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกยาว แกนสมมาตรในแนวรัศมีตามแนวนอนขนานกับพื้น ด้านที่นอนแนบกับพื้นและมีสีซีดกว่าเป็นด้านท้อง เท้าท่อทางด้านท้องจะเจริญดีกว่าด้านหลังและมีแผ่นดูด ซึ่งในปลิงทะเลบางกลุ่มอาจไม่มีเท้าท่อเลยก็ได้ ซึ่งเท้าท่อมีหน้าที่ในการรับสัมผัส ด้านหน้าของลำตัวมีช่องปากซึ่งมีหนวดอยู่รอบๆ ปาก ส่วนท้ายของลำตัวเป็นทวารหนัก มีโครงร่างภายในเป็นสารหินปูนที่มีลักษณะเป็นชิ้น เรียกว่า ossicle (บพิธ จารุพันธุ์ และ นันทพร จารุพันธุ์ , 2546)

ระบบหมุนเวียนและหายใจ การหมุนเวียนของของเหลวเกิดภายในช่องลำตัว (coelom) ขนาดใหญ่ และอวัยวะที่ใช้ในการแลกเปลี่ยนแก๊สมีลักษณะเป็นท่อแตกแขนงออกจาก cloaca คล้ายต้นพืชอยู่สองข้างทางของทางเดินอาหาร เรียกว่า respiratory tree บางชนิดไม่มี respiratory tree จะแลกเปลี่ยนแก๊สทางผิวหนัง

การเคลื่อนที่ ปลิงทะเลส่วนใหญ่อาศัยบนพื้นท้องทะเล เวลาที่ต้องการเคลื่อนที่จะใช้เท้าท่อ แต่ในกลุ่มที่ไม่มีเท้าท่อ ได้แก่ อันดับ Apodida การเคลื่อนที่จะมีบทบาทน้อยลง โดยอาศัยการยืดหดของผนังลำตัวร่วมกับการใช้หนวดที่มีความเหนียว

ระบบประสาท ยังไม่มีการเจริญมากนัก ประกอบด้วยประสาทรูปวงแหวนล้อมรอบปาก ใต้ฐานของหนวด จากวงแหวนนี้จะมีเส้นประสาทแยกออกไปยังอวัยวะใกล้เคียงเป็นเส้นสั้นๆ จึงทำให้ปลิงทะเลรับความรู้สึกและแสดงอาการตอบโต้ได้ช้ามาก

การสืบพันธุ์ ปลิงทะเลมีอวัยวะเพศเพียงอันเดียว (single gonad) บางชนิดมีเพศแยก บางชนิดมีเพศรวม พวกที่มีเพศแยกจากกัน อวัยวะสืบพันธุ์จะค่อนไปทางหัว ประกอบด้วยท่อแตกแขนงมากมายหรืออาจเป็นท่อเดียวรวมกันเป็นช่อ ต่อจากอวัยวะสืบพันธุ์จะเป็นท่อนำไข่หรือสเปิร์ม ส่วนพวกที่มีเพศรวมมีอวัยวะเพศสืบพันธุ์อันเดียวสร้างทั้งรังไข่และสเปิร์มผสมภายในตัว โดยสร้างไข่ขึ้นก่อน ไข่ที่ได้รับการผสมจะถูกส่งไปฟักที่ถุงฟักตัวอ่อน เมื่อเจริญเต็มที่ถุงนี้จะแตกตัวอ่อนจะออกมาทางช่องขับถ่าย

ถิ่นที่อยู่ ปลิงทะเลมีแหล่งที่อยู่หลายรูปแบบ และจะอาศัยอยู่ร่วมกันเป็นกลุ่ม บางกลุ่มจะซ่อนตัวอยู่ตามซอกหิน อาศัยอยู่ในแหล่งสาหร่ายทะเลหรือขุดรูอยู่ใต้พื้นทราย

การกินอาหาร กินด้วยวิธีกลืนเอาโคลนหรือทรายเข้าไปแล้วดูดเอาเฉพาะสิ่งมีชีวิตเล็กๆ ในนั้นเป็นอาหาร และกินอาหารที่แขวนลอยอยู่ในมวลน้ำ ซึ่งอาหารของปลิงทะเลเป็นพวกแพลงก์ตอนและอินทรียวัตถุที่ปนอยู่ในโคลนทรายโดยใช้เมือกบริเวณหนวดจับอาหารเข้าช่องปาก

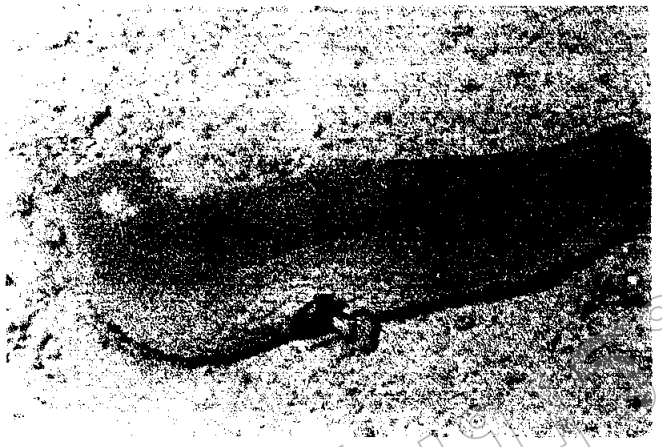
ระบบการป้องกันตัว โดยการขับอวัยวะภายในออกมาเมื่อพบกับสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น ช่วงอุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป น้ำเน่าเสีย หรือมีการเปลี่ยนแปลงทางฟิสิกส์และเคมีอย่างรวดเร็ว และปลิงทะเลหลายชนิดมีอวัยวะที่ใช้ในการสร้างท่อคูเวียร์ เรียกว่า cuvierian organ ซึ่งจะอยู่บริเวณฐานของอวัยวะช่วยหายใจ cuvierian tubles จะถูกขับออกมาทางทวารหนัก เมื่อพบศัตรูหรือมีสัตว์อื่นเข้ามารบกวน (อารมณ์ มุจรินทร์, 2545; บพิธ จารุพันธุ์ และ นันทพร จารุพันธุ์, 2540) สารพวกนี้หากเข้าตาอาจบอดได้ หากยังถูกรบกวนต่อไปจะพ่นเอาอวัยวะภายในออกมา ซึ่งอวัยวะภายในจะสามารถงอกขึ้นมาใหม่ได้ ซึ่งอวัยวะป้องกันตัว (cuvierian organ) จะมีสารพิษ Holothurin ซึ่งปล่อยออกทางผิวหนัง ใช้ในการป้องกันอันตราย หากนำปลิงทะเลไปใส่ในตู้เลี้ยงปลามันจะปล่อยสารพิษดังกล่าวออกมามากจนทำให้ปลาตายได้ (กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2535)

ปลิงทะเลที่ใช้ในการศึกษา

ปลิงทะเลที่นำมาศึกษาฤทธิ์การต้านจุลชีพครั้งนี้มีจำนวน 5 ชนิด ได้แก่

1.1 *Bohadschia marmorata* (Jaeger, 1833) รูปร่างเป็นทรงกระบอกยาว ด้านหลังมีสีเทาเข้ม ส่วนด้านท้องมีสีขาว-เหลืองนวล ปากอยู่ทางด้านท้อง มีหนวดสีเหลืองนวล ช่องทวารอยู่ทางด้านข้างท้ายของลำตัวค่อนไปทางด้านหลังเป็นช่องกลวงดำ สามารถพบในบริเวณขอบนอกแนวปะการัง โดยวางตัวหรือฝังตัวอยู่ใต้พื้นทราย (อารมณ์ มุจรินทร์, 2545)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 1 *Bohadschia marmorata* (Jaeger, 1833)
ภาพ: สุเมตต์ ปุจฉาการ และคณะ, 2547

1.2 *Holothuria (Mertensiothuria) leucospilota* Brandt, 1835 ลำตัวอ่อนนุ่มเป็นรูปทรง กระบอกยาว มีสีดำตลอดทั้งตัว ปากอยู่ส่วนหน้าค่อนไปทางด้านท้อง ทวารหนักอยู่ท้ายลำตัว ด้านท้องมีเท้าเทียมเป็นเส้นยาว พบบริเวณชายหาดที่เป็นทรายละเอียดหรือทรายหยาบที่เป็นกรวด และพื้นทรายในแนวปะการัง (อารมณ์ มุจรินทร์, 2545)

ภาพที่ 2 *Holothuria (Mertensiothuria) leucospilota* Brandt, 1835
ที่มา: http://www.forests.tn.nic.in/images%20final/GulfofMannar/Cucumber/Cucum_09.jpg, วันที่ค้นข้อมูล 22 กุมภาพันธ์ 2548.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.3 *Holothuria (Thymiosycia) impatiens* (Forskål, 1775) ลำตัวเป็นรูปทรงกระบอกยาว ผนังลำตัวหยาบและขรุขระ ส่วนท้ายของลำตัวจะมีขนาดใหญ่กว่าส่วนหน้า ปากอยู่ค่อนไปทางด้านท้อง ทวารหนักอยู่ท้ายลำตัว สามารถพบได้ในแนวปะการังโดยจะหลบซ่อนตัวอยู่ในซอกปะการัง (อารมณ์ มุจรินทร์, 2545)

ภาพที่ 3 *Holothuria (Thymiosycia) impatiens* (Forskål, 1775)
ที่มา: http://www.advancedaquarist.com/issues/jan2003/invert.htm, วันที่ค้นข้อมูล 22 กุมภาพันธ์ 2548.

1.4 *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea* Jaeger, 1833 เป็นรูปทรงกระบอกยาว ลำตัวอ่อนนุ่มผิวขรุขระ มีสีน้ำตาล-ส้มตลอดทั้งลำตัว ปากอยู่ส่วนหน้าค่อนไปทางด้านท้อง ทวารหนักอยู่ด้านท้ายลำตัว ด้านท้องมีเท้าเทียมเป็นเส้นสั้นๆ cuvierian tubles เป็นเส้นใยสีขาว ขนาดค่อนข้างใหญ่ จะปล่อยออกมาจำนวนมากเมื่อถูกศัตรูรบกวน สามารถพบได้บริเวณในแนวปะการังที่มีความอุดมสมบูรณ์ โดยหลบซ่อนตัวในแนวปะการัง (อารมณ์ มุจรินทร์, 2545)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 4 *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea* Jaeger, 1833

ภาพ: สุเมตต์ ปุจฉาการ และคณะ, 2547

1.5 *Stichopus horrens* Selenka, 1867 ลำตัวมีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ยาว มีสีน้ำตาลอมเหลือง ด้านท้องมีสีน้ำตาลอ่อน ปากอยู่ทางด้านท้อง ช่องทวารอยู่ทางข้างท้ายลำตัวค่อนไปทางด้านท้อง ดำรงชีวิตบนพื้นทรายบริเวณนอกแนวปะการัง (อารมณ์ มุจรินทร์, 2545)

ภาพที่ 5 *Stichopus horrens* Selenka, 1867

ที่มา: http://www.trentstrip.com/Isa_snorkel.htm, วันที่ค้นข้อมูล 22 กุมภาพันธ์ 2548.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. แบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเซลล์เดียว เป็นพวก prokaryote คือมีผนังเซลล์และไซโทพลาสซึม นิวเคลียสมีกรดดีออกซีไรโบรนิวคลีอิก (DNA) แต่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้รยางค์เรียกว่า แฟลกเจลลัม

ลักษณะและโครงสร้างของแบคทีเรีย

ผนังเซลล์ (cell wall) มีความหนา 10- 25 นาโนเมตร มีอยู่ 10- 40% ของน้ำหนักแห้ง เป็นโครงสร้างที่ทำให้เซลล์แบคทีเรียคงรูปร่างอยู่ได้ ซึ่งมีหน้าที่ในการป้องกันเซลล์แตก ทำให้คงรูปร่างของแบคทีเรียแต่ละชนิดและทำให้เกิดการแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตต่อไป เป็นต้น

เยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) อยู่ใต้ผนังเซลล์ ทำหน้าที่เป็นเครื่องกั้นออสโมซิสควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร เยื่อหุ้มเซลล์มีความหนาประมาณ 7.5 นาโนเมตร มีอยู่ประมาณ 10-20% ของน้ำหนักแห้ง มีลักษณะเป็น unit membrane ประกอบด้วยฟอสโฟลิพิด 20-30% โปรตีน 60-70% ฟอสโฟลิพิดเป็นเยื่อ 2 ชั้น โดยหันส่วนที่ไม่ละลายน้ำเข้าหากันและหันส่วนที่ละลายน้ำออกข้างนอก ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ active transport ของสารเมทาบอไลท์, เกี่ยวข้องกับกระบวนการ oxidative phosphorylation ในการสร้างพลังงานของเซลล์สังเคราะห์ฟอสโฟลิพิดและช่วยให้ DNA ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้กระจายไปยังเซลล์ลูกในขณะแบ่งเซลล์ (วิจัย รักวิทยาศาสตร์, 2546)

รูปร่างของแบคทีเรีย มีได้หลายแบบ เช่น รูปกลม รูปไข่ ทรงกระบอกหรือเป็นรูปเกลียว แต่โดยทั่วไปแล้วจะจำแนกแบคทีเรียตามรูปร่างได้ 3 แบบ ได้แก่

1. ทรงกลม (coccus) เป็นแบคทีเรียที่มีรูปกลมหรือรูปไข่ อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ (เช่น *Micrococcus*) หรือต่อกันเป็นสายโซ่ (เช่น *Streptococcus*) หรืออยู่เป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (เช่น *Staphylococcus*)

2. ทรงกระบอก (bacillus) เป็นแบคทีเรียที่มีรูปท่อนบางชนิดเป็นท่อนสั้นๆ (เช่น *E. coli* และ *Enterobacter*) บางชนิดเป็นท่อนยาว (เช่น *Bacillus*)

3. แบบเกลียว (spirillusm) เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อนยาวหรือท่อนสั้นแต่จะโค้งงอ เช่น *Vibrio cholerae* ทำให้เกิดอหิวาตกโรคและ *Treponema pallidum* ทำให้เกิดโรคซิฟิลิส (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534)

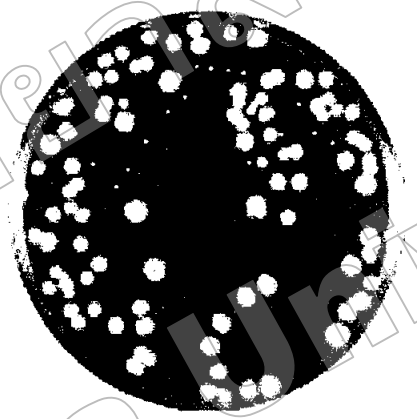
การที่แบคทีเรียมีรูปร่างแตกต่างกันเป็นการปรับตัวให้อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ดีขึ้น เช่น เซลล์ coccus มีทรงกลมทำให้รูปร่างเซลล์คงทนอยู่ในสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งได้ดี แต่พวกมีรูปท่อนจะมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรมากกว่าพวก coccus จึงช่วยในการแลกเปลี่ยนสารอาหารกับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สภาพแวดล้อมได้ดีกว่า ส่วนพวกบิดเป็นเกลียวเมื่อมีการเคลื่อนที่จะเคลื่อนที่ในลักษณะตะปูควง หรือสว่าน จึงไม่ค่อยมีแรงเสียดทานจากสิ่งแวดล้อมในขณะเคลื่อนที่ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2541)

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

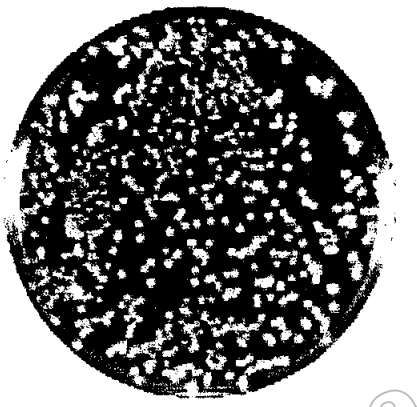
2.1 *Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรียกรัมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์และเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสได้จึงทำให้สามารถย่อยสลายโปรตีนในนมได้



ภาพที่ 6 *Bacillus subtilis*
ที่มา: http://www.miura-denshi.co.jp/dental4.html, วันที่ค้นข้อมูล 22 กุมภาพันธ์ 2548.

2.2 *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียกรัมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์และเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน เป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ โรคเยื่อบุตาอักเสบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 7 *Escherichia coli*

ที่มา: http://www.miura-denshi.co.jp/dental4.html, วันที่ค้นข้อมูล 22 กุมภาพันธ์ 2548.

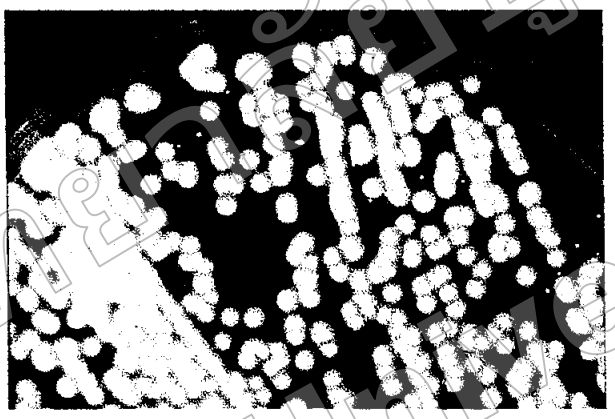
2.3 *Pseudomonas aeruginosa* เป็นแบคทีเรียกรัมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์และเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดกลิ่นเน่าในอาหาร สามารถสร้างสารพิษ exotoxin A ที่จะไปออกฤทธิ์ที่เนื้อเยื่อตับ (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534) ก่อให้เกิดโรคเยื่อบุตาอักเสบ (Ingraham & Ingraham, 2000)

ภาพที่ 8 *Pseudomonas aeruginosa*

ที่มา: http://www.shroomery.org/images/23418/P.aeruginosa_colonies.jpg, วันที่ค้นข้อมูล 22 กุมภาพันธ์ 2548.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.4 *Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียกรัมบวก รูปกลม สามารถสร้างสารพิษ enterotoxin ทำให้อาเจียนและอุจจาระร่วง จะมีเอนไซม์ streptodornase ที่จะย่อยสลาย DNA ของเซลล์ ทำให้เซลล์ถูกทำลาย เอนไซม์ leukocidin จะทำลายเซลล์เม็ดเลือดขาว ทำให้ความสามารถในการป้องกันโรคของร่างกายลดลง จึงเกิดการติดเชื้อได้ง่าย เอนไซม์ hemolysin จะทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ดี มีเอนไซม์ streptokinase ซึ่งจะไปย่อยสลายไฟบรินที่ตกตะกอนให้ได้ผลผลิตที่อยู่ในรูปสารละลาย ทำให้แบคทีเรียแทรกเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ง่าย ทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในวัวซึ่งสามารถแพร่ระบาดเข้าสู่มนุษย์ได้ ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ

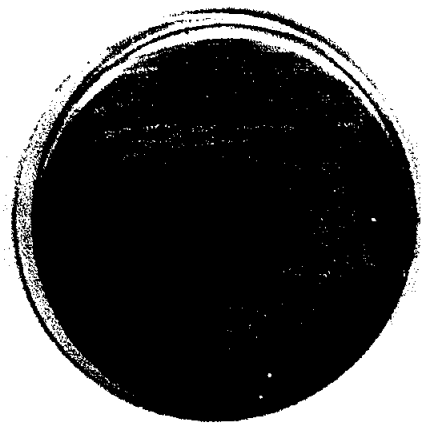


ภาพที่ 9 *Staphylococcus aureus*

ที่มา: http://micro.fhw.oka-pu.ac.jp/microbiology/g-positive/s_aureus.html, วันที่ค้นข้อมูล 22 กุมภาพันธ์ 2548.

2.5 *Vibrio* sp. เป็นแบคทีเรียกรัมลบ ทำให้เกิดอุจจาระร่วง อหิวาตกโรค บางชนิดจะไปมีผลให้เซลล์ขับน้ำและแร่ธาตุต่างๆ ออกมา ทำให้ร่างกายสูญเสียน้ำและแร่ธาตุจึงเกิดการช็อคขึ้นได้ (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534) ทำให้ปลาน้ำกร่อยและปลาทะเลมีอาการจุดเลือดบริเวณปาก กระพุ้งแก้ม บริเวณผิวตัวด้านท้องทั้งหมดและด้านบนของครีบอก ชั้นผิวหนังและกล้ามเนื้อเกิดฝีภายในมีน้ำเหลืองหนองเลือดคั่งที่ผิวหนังและครีบ ลำไส้อักเสบ ม้ามโต ไตบวมและเซลล์ไตตาย บางชนิดทำให้เกิดโรคกุ้งเรืองแสง โรคเสี้ยนดำ เป็นต้น (ปภาศิริ ศรีโสภาภรณ์, 2538)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 10 *Vibrio* sp.

ที่มา: http://service.merck.de/microbiology/tedisdata/prods/4973-1_10263_0500.html, วันที่ค้นข้อมูล 22 กุมภาพันธ์ 2548.

3. ยีสต์ (yeast)

ยีสต์ (yeast) อยู่ในไฟลัม Fungi ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา วิจัย รักวิทยาศาสตร์ (2546) ให้ความหมายของราไว้ว่า เป็นสิ่งที่มีชีวิตที่มีนิวเคลียสแบบ eukaryotic มี nuclear membrane ไม่มี chlorophyll โครงสร้างร่างกายของรา ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเส้นสาย (filament) เมื่ออยู่รวมกันเป็นกลุ่มเรียกว่า mycelium ราส่วนใหญ่สามารถสร้างสปอร์เพื่อใช้ในการสืบพันธุ์ ซึ่งมีทั้งแบบใช้เพศ (sexual) และไม่ใช้เพศ (asexual) ผนังเส้นใยของราประกอบด้วยสาร chitin หรือ cellulose มีทั้งชนิดเซลล์เดี่ยวคือยีสต์ (yeast) ซึ่งส่วนใหญ่สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ และหลายเซลล์ซึ่งได้แก่รา (mold) ราเจริญได้ดีในที่มีความเป็นกรดสูง ราทุกชนิดเป็นพวกที่ต้องการอากาศ ส่วนใหญ่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (ดวงพร คันธโชติ, 2545)

ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษา

3.1 *Candida tropicalis* โคโลนีเป็นรูปกลม มีสีขาวถึงครีม สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ มีลักษณะเป็นแบบ pseudohyphae หรือ septate hyphae ส่วนประกอบของเซลล์ประกอบด้วย glucose, mannose และ glucosamine และพบ coenzyme Q_9

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แหล่งที่พบ พบในภาชนะที่ใช้ในการหมักกรดซิตริกของโรงงานในประเทศโปแลนด์ หญ้าแห้งในประเทศเยอรมันและรัสเซีย ดินในประเทศญี่ปุ่นและฟินแลนด์ น้ำในอ่าว Chesapeake ประเทศสหรัฐอเมริกา น้ำมันพืชในอินเดีย ดอกซากุระและดอกไม้ในญี่ปุ่น กะหล่ำปลีดองของเยอรมัน กากน้ำตาลและสับปะรดเน่า

ภาพที่ 11 *Candida tropicalis*
ที่มา: http://www.troybio.com/images/Product_Images_BBL/C.TROPICALIS.DS1.gif, วันที่ค้นข้อมูล 22 กุมภาพันธ์ 2548.

3.2 *Debaryomyces hansenii* โคโลนีมีสีขาวถึงครีม สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ มี filaments ส่วนประกอบของเซลล์ประกอบด้วย glucose และ mannose และพบ coenzyme Q_9 เป็นยีสต์ที่ได้จากทะเลสามารถทนระดับความเค็มได้ถึง 24% เชื้อนี้ถูกพิจารณาว่าเป็นพวกที่ไม่ก่อให้เกิดโรค แต่มีอยู่เพียงกรณีเดียวนั่นคือ การติดเชื้อที่กระดูก (Wong *et al*., 1982)

แหล่งที่พบ พบในสารสกัดจากกระเพาะลูกวัวที่ใช้ในการทำเนยแข็งที่ประเทศนิวซีแลนด์ เกล็ดผิวหนังที่เป็นโรคผิวหนัง ไส้กรอก เชื้อหมัก Kentucky และใบยาสูบในอิตาลี ชีสในประเทศรัสเซีย น้ำอุ่น ลำคอของผู้ป่วยที่เจ็บคอ การอักเสบในเนื้อเยื่อเมมเบรนที่หุ้มกระดูก เนื้อเค็ม เลือดจากซากศพ หัวสิว น้ำเกลือที่ใช้ล้างชีส น้ำที่ใช้ฟอกหนัง บรรยากาศและขยะ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.3 *Pichia kluyveri* โคโลนีมีสีขาวถึงครีม สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ มี filaments และพบ coenzyme Q_7

แหล่งที่พบ พบในต้นกระบองเพชร *Opuntia stricta* เน่า หอยกาบ *Tagelus plabeus* เพรียง *Neotredo reynei* กระบวนการหมักโกโก้ ผลไม้จาก *Flacourtia* sp. ผลมะกอก ต้นกระบองเพชร *Opuntia* sp. และ *Cephalocereus royenii*

ภาพที่ 12 *Pichia kluyveri*

ที่มา: http://jove.eng.yale.edu/twiki/bin/view/Experimentalproduct/PichiaKluyveri, วันที่ค้นข้อมูล 22 กุมภาพันธ์ 2548.

3.4 *Schizosaccharomyces pombe* โคโลนีมีสีครีมถึงสีน้ำตาล สืบพันธุ์โดยการ splitting ไม่มี filaments ส่วนประกอบของเซลล์ประกอบด้วย glucose, mannose และ galactose และพบ coenzyme Q_{10}

แหล่งที่พบ พบในไวน์ปาล์มที่ผลิตจาก *Borassus flabelliger* ในประเทศปากีสถาน การหมักกากน้ำตาลในประเทศญี่ปุ่น เบียร์ของชาวบันตูในประเทศแอฟริกาใต้ แอปเปิลในประเทศโปแลนด์และในน้ำตาลอ้อยของประเทศจาไมกา (Barnett *et al.*, 2000)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 13 *Schizosaccharomyces pombe*
ที่มา: http://www.didier-pol.net/4ftpomb1.htm, วันที่ค้นข้อมูล 22 กุมภาพันธ์ 2548.

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากอดีตจนถึงปัจจุบันมนุษย์ปลิงทะเลถูกใช้เพื่อเป็นยารักษาโรคเสมือนกับเป็นยาพื้นบ้าน มีสรรพคุณทางยามากมายดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น จึงทำให้นักวิจัยสนใจที่จะค้นหาถึงสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้ พร้อมทำการตรวจสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ของสารเพื่อนำไปพัฒนาเป็นยา มีรายงานการวิจัยดังนี้

สารประกอบที่เป็น characteristic ของปลิงทะเล ได้แก่ สารประกอบในกลุ่ม triterpene glycoside ซึ่งจะมีคุณสมบัติเป็น antifungal และ antitumor เป็นส่วนใหญ่ โดยสารประกอบที่แยกได้และแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา (antifungal glycosides) ได้แก่ สาร holotoxins A และ B (Kitagawa, *et al*., 1976b) และสาร stichopogenin A4 (Kitagawa, *et al*., 1976a) จากปลิงทะเล *Stichopus japonicus* ต่อมาในปี ค.ศ. 1985 Kitagawa *et al*. (1985) ได้แยกสารพวก antifungal lanostane-oligoside จากปลิงทะเล *Actinopyga echinites* ชื่อ echinosides A และ B

Ridzwan *et al*. (1995) ได้รายงานถึงผลการทดสอบเบื้องต้นของฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากปลิงทะเล 3 ชนิดที่เก็บได้จากบริเวณชายฝั่งทะเล Sabah ได้แก่ *Holothuria atra*, *H. scabra* และ *Bohadshia argus* กับแบคทีเรีย 7 ชนิด พบว่าสารสกัดในชั้น lipid และ methanol ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ในขณะที่สารสกัดชั้น phosphate buffered saline แสดงผลในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งกรัมบวกและกรัมลบ และผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียระหว่างสารสกัดของปลิงทะเล *H. atra* จากส่วนของผนังลำตัวและส่วนของอวัยวะภายในพบว่าสารสกัดที่ได้จากผนังลำตัวแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้น้อย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Villasin และ Pomory (2000) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากผนังลำตัวของปลิงทะเล *Parastichopus parvimensis* ด้วย methanol-acetone สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* และ *E. coli* ได้

Murray *et al.* (2001) รายงานการแยกสาร triterpene glycosides ชื่อ patagonicoside A ซึ่งแยกจากปลิง *Psolus patagonicus* แสดงคุณสมบัติเป็น antifungal ยับยั้งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรค *Cladosporium cucumerinum*

Haug *et al.* (2002) ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลชีพจากส่วนต่างๆ ของร่างกายสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Echinoderms 3 ชนิด ได้แก่ เม่นทะเล ดาวทะเล และปลิงทะเล ได้ผลว่าส่วนของผนังลำตัว (body wall) ของดาวทะเลสามารถยับยั้งเชื้อ *V. anguillarum*, *E. coli*, *Corynebacterium glutamicum* และ *S. aureus* ได้ในขณะที่เม่นทะเลสามารถยับยั้งได้ทุกเชื้อยกเว้น *E. coli* และสารสกัดจากปลิงทะเลสามารถยับยั้งเชื้อ *C. glutamicum* และ *S. aureus* ได้ และในปีเดียวกัน Chludil *et al.* (2002) ได้รายงานการแยกสาร hemoiedemosides A และ B จากปลิงทะเล *Hemoiedema spectabilis* และสารทั้ง 2 ตัวนี้แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cladosporium cucumerinum*

นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงสารประกอบที่แสดงฤทธิ์ antitumor ซึ่งแยกได้จากปลิงทะเลได้แก่ สารประกอบ holotoxins A1 และ B1 ซึ่งแยกได้จากปลิงทะเล *Stichopus japonicus* selenka (Maltsev, *et al.*, 1984) ซึ่งต่อมาได้มีรายงานว่าสาร holotoxin A1 นั้นมีฤทธิ์ต้าน tumor cell (Popov, 2002) ส่วนสาร calcigerosides B, C และ D แยกได้จากปลิงทะเล *Pentamera calcigera* แสดงคุณสมบัติยับยั้ง tumor cell line ของมนุษย์ที่ระดับความเป็นพิษปานกลาง (IC_{50} = 5 µg/ml) (Avilov *et al.*, 2000b)

Zou *et al.* (2003) ได้แยกสาร triterpene glycoside ชื่อ intercedensides A-C จากปลิง *Mensamaria intercedens* Lampert และแสดงฤทธิ์ในการต้าน tumor cell lines ที่ ED_{50} ในช่วง 0.6-4.0 µg/ml

นอกจากคุณสมบัติทางการต้านจุลชีพและต้านเซลมะเร็งแล้วปลิงทะเลบางชนิดยังแสดงฤทธิ์ที่น่าสนใจด้านอื่นๆ ด้วย ได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัส herpes simplex virus type 1 (HSV-1) โดยสารที่แสดงฤทธิ์ทางนี้ได้แก่ liouvillosides A และ B ซึ่งแยกได้จากปลิง *Staurocucumis liouvillei* (Maier *et al.*, 2001) เป็นต้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่ทำการทดลอง

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

ระยะเวลาทำการทดลอง

เมษายน พ.ศ. 2547– มกราคม พ.ศ. 2548

อุปกรณ์

การเก็บตัวอย่าง

1. ถุงซิป
2. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20°C

การสกัดแยกสาร

1. เครื่อง Homogenizer บริษัท Nihonseiki Kaisha LTD. รุ่น Nissei AM-12
2. เครื่อง Ultrasonic บริษัทไซทรอนิค จำกัด
3. เครื่อง Rotary vacuum evaporator บริษัท Yamato รุ่น EYELA WP-15
4. ชุดเครื่องมือผ่าตัด
5. บีกเกอร์หรือโถแก้วสำหรับแช่ตัวอย่าง
6. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
7. vial มีฝาปิด
8. ตาชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง
9. กรวยแก้ว

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

1. เครื่อง Whirl mixer บริษัท Fisons scientific apparatus
2. เครื่อง Autoclave
3. Sterile Petri dish
4. Antibiotic Assay discs (6 mm) บริษัท Whatman International LTD. CAT No. 2017

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

12. ยา Sulphamethoxazole (CT0052B) 25 µg บริษัท Oxoid Limited Basingstoke, Hampshire, England

13. ยา Neomycin (CT0033B) 30 µg บริษัท Oxoid Limited Basingstoke, Hampshire, England

14. เชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ได้แก่

แบคทีเรียกรัมบวก ได้แก่

14.1 *Bacillus subtilis* (TISTR No. 008)

14.2 *Staphylococcus aureus* (TISTR No. 517)

แบคทีเรียกรัมลบ ได้แก่

14.3 *Escherichia coli* (TISTR No. 887)

14.4 *Pseudomonas aeruginosa* (TISTR No. 1467)

14.5 *Vibrio* sp. (BIMS. A829.2)

15. เชื้อยีสต์ 4 สายพันธุ์ ได้แก่

15.1 *Candida tropicalis* (TISTR NO. 5045)

15.2 *Debaryomyces hansenii* (TISTR NO. 5265)

15.3 *Pichia kluyveri* (TISTR NO. 5150)

15.4 *Schizosaccharomyces pombe* (TISTR NO. 5205)

แหล่งที่มา: TISTR คือ ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

BIMS. คือ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างปลิงทะเล

1.1 เก็บตัวอย่างปลิงทะเลด้วยวิธี Scuba diving และ skin diving

1.2 นำตัวอย่างที่เก็บได้ใส่ถุงซิปพร้อมทั้งเติมน้ำทะเลให้พอท่วมตัวอย่าง

1.3 แช่ตัวอย่างในน้ำแข็งระหว่างการเดินทาง และนำตัวอย่างเข้าแช่ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C จนกระทั่งนำมาสกัด

1.4 จำแนกชนิดตัวอย่างโดย อาจารย์สุเมตต์ ปุจฉาการ นักวิทยาศาสตร์ประจำสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
วิทยาเขต ...

2. ขั้นตอนการสกัดสาร

2.1 นำตัวอย่างปลิงทะเล *Bohadschia marmorata*, *Holothuria* (*Mertensiothuria*) *leucospilota*, *Holothuria* (*Thymiosycia*) *impatiens*, *Holothuria* (*Stauropora*) *fuscocinerea* และ *Stichopus horrens* ออกจากตู้แช่เย็น ทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง

2.2 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ทำการผ่าเอาอวัยวะภายในออกแล้วเป็นน้ำหนักเปียก

2.3 หั่นตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปปั่นโดยใช้เครื่อง Homogenizer นำตัวอย่างที่ปั่นแล้วมาแช่ใน MeOH อย่างน้อย 24 ชั่วโมง

2.4 กรองตัวอย่างในข้อ 2.3 ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ทำการสกัดซ้ำด้วย MeOH อีก 2 ครั้ง รวมสารละลายแอลกอฮอล์ที่ได้นำไประเหยทำให้เข้มข้น

2.5 นำเอาสารละลายแอลกอฮอล์ที่ได้ในข้อ 2.4 มาทำการแยกส่วนโดยใช้ EtOAc-H_2O (ทำการสกัด 3 ซ้ำ) ไขชั้น EtOAc รวมกัน และนำไประเหยแห้ง โดยใช้เครื่อง rotary evaporator เก็บสารสกัดที่ได้ลงขวดที่มีฝาปิดเก็บไว้เป็นสารสกัดชั้น EtOAc และชั่งน้ำหนัก

2.6 นำสารละลายในชั้นน้ำจากข้อ 2.5 มาสกัดด้วย BuOH (ทำการสกัด 3 ซ้ำ) เก็บสารสกัดในชั้น BuOH รวมกัน นำไประเหยแห้ง เก็บสารสกัดที่ได้ลงขวดที่มีฝาปิดเก็บไว้เป็นสารสกัดชั้น BuOH และชั่งน้ำหนัก

3. ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

3.1 การเตรียมสารทดสอบ

3.1.1 เตรียมความเข้มข้นของสารสกัดจากปลิงทะเลให้ได้ความเข้มข้น 1000 ppm และ 2500 ppm ทั้งสารสกัดชั้น EtOAc และชั้น BuOH โดยใช้ Chloroform: Methanol (98: 2) เป็นตัวทำละลายในสารสกัดชั้น EtOAc และใช้ MeOH เป็นสารทำลายในสารสกัดชั้น BuOH

3.1.2 หยดสารสกัดลงบน Antibiotic Assay discs 100 µl/disc ทิ้งไว้ให้สารละลายระเหยที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 12 ชั่วโมง (จะได้เนื้อสารที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/disc และ 250 µg/disc)

3.1.3 blank disc หยดด้วยตัวทำละลายสารสกัดทั้ง 2 ส่วนด้วยปริมาตรที่เท่ากันทิ้งไว้ให้สารละลายระเหยที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 12 ชั่วโมง

3.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เขี่ยโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (TISTR No. 008), *Escherichia coli* (TISTR No. 887), *Pseudomonas aeruginosa* (TISTR No. 1467), *Staphylococcus aureus* (TISTR No. 517) และ *Vibrio* sp. (BIMS. A829.2) และเชื้อยีสต์ *Candida tropicalis* (TISTR No. 5045),

ปก.
ป วิจัย ก
2547
421

Debaryomyces hansenii (TISTR No. 5265), *Pichia kluyveri* (TISTR No. 5150) และ *Schizosaccharomyces pombe* (TISTR No. 5205) ที่จะทดสอบใส่ลงในน้ำกลั่น (หากเป็นเชื้อ *Vibrio* sp. ทำลงในน้ำเกลือ) ผสมเชื้อให้เข้ากับน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือโดยใช้เครื่อง Whirl mixer ให้ได้ความขุ่นประมาณ 0.5 Mc Farland (ภาคผนวก)

3.3 การเตรียม Petri dish ทดสอบ

3.3.1 เตรียมอาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ เทลง Petri dish ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

3.3.2 ใช้ Sterile cotton swab จุ่มเชื้อที่จะทดสอบในข้อ 3.2 เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่ว

3.4 วิธีการทดสอบ

3.4.1 นำ Antibiotic Assay discs ที่หยดสารสกัดจากปลิงทะเลแล้ว และยามาตรฐาน Erythromycin (CT0020B), ยา Penicillin G (CT0043B), ยา Gentamicin (CT0024B) 10 µg, ยา Tetracycline (CT0054B), ยา Sulphamethoxazole (CT0052B) และยา Neomycin (CT0033B) วางลงบน Petri dish ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.2

3.4.2 นำ Petri dish ทั้งหมดบ่มเพาะที่ 35°C สำหรับเชื้อแบคทีเรีย และที่ 30°C สำหรับเชื้อยีสต์ สังเกตผลที่ 24 ชั่วโมง (ทำ 2 ซ้ำ)

3.5 การบันทึกผล โดยสังเกตบริเวณที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (clear zone) (mm)

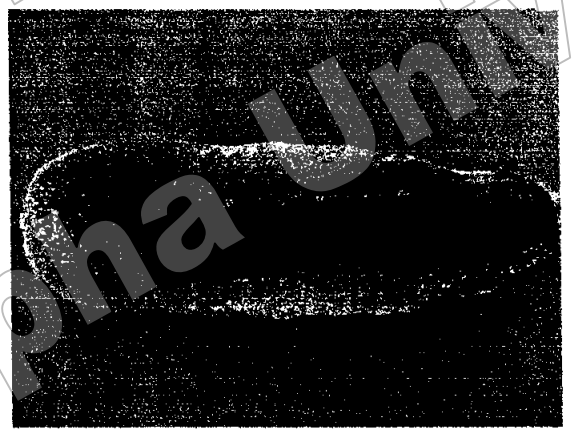
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างปลิงทะเล 5 ชนิดได้แก่ *Bohadschia marmorata*, *Holothuria (Mertensiothuria) leucospilota*, *Holothuria (Thymiosycia) impatiens*, *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea* และ *Stichopus horrens* จากบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของอ่าวไทย ในเดือนเมษายน พ.ศ. 2547 ดังมีรายละเอียดต่างๆ ดังนี้

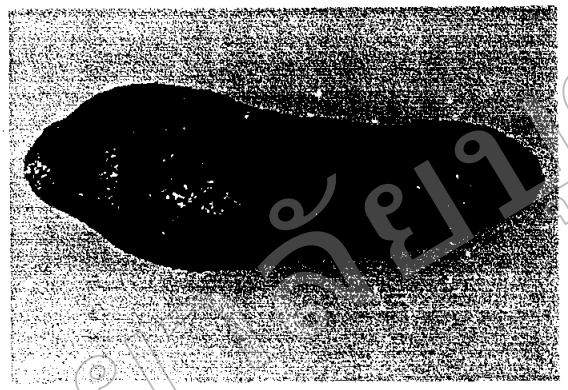
Bohadschia marmorata เก็บได้จากบริเวณเกาะล้าน จังหวัดชลบุรี ที่ความลึก 12 เมตร ลักษณะภายนอกมีสีขาว บริเวณหัวและท้ายมีสีดำเป็นบางส่วน และมีจุดดำเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วตัว ด้านหลังมีสีเทาเข้มกว่าด้านท้องซึ่งมีสีค่อนข้างขาว ลำตัวเป็นทรงกระบอกยาว ผนังลำตัวมีผิวขรุขระที่ค่อนข้างแข็งและหนา



ภาพที่ 14 ปลิงทะเล *Bohadschia marmorata* ที่ใช้ในการศึกษา
ภาพ: รวิวรรณ วัฒนดิลก, 2547

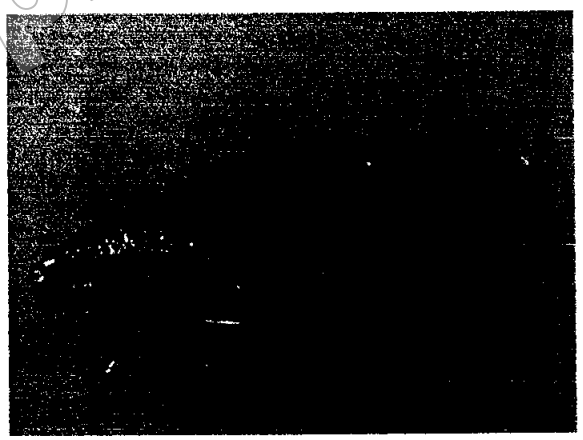
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Holothuria (Mertensiothuria) leucospilota เก็บได้จากบริเวณเกาะสาก จังหวัดชลบุรี ที่ความลึก 2-3 เมตร ลักษณะภายนอกมีสีดำสนิททั้งตัว ด้านหลังจะมีสีเข้มกว่าด้านท้อง ลำตัวเป็นทรงกระบอกยาว ผนังลำตัวค่อนข้างอ่อนนุ่มและเหนียว อวัยวะภายในมีทรายอยู่ในลำไส้เป็นส่วนใหญ่



ภาพที่ 15 ปลิงทะเล *Holothuria (Mertensiothuria) leucospilota* ที่ใช้ในการศึกษา
ภาพ: รวิวรรณ วัฒนดิลก, 2547

Holothuria (Thymiosycia) impatiens เก็บได้จากบริเวณเกาะสาก จังหวัดชลบุรี ที่ความลึก 4 เมตร ลักษณะภายนอกมีสีน้ำตาลค่อนข้างดำ ลำตัวเป็นทรงกระบอกเรียวยาว ผนังลำตัวขรุขระ ด้านท้องมีสีค่อนข้างเหลือง



ภาพที่ 16 ปลิงทะเล *Holothuria (Thymiosycia) impatiens* ที่ใช้ในการศึกษา
ภาพ: รวิวรรณ วัฒนดิลก, 2547

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Holothuria (Stauropora) fuscocinerea เก็บได้จากบริเวณเกาะสาก จังหวัดชลบุรี ที่ความลึก 4 เมตร ลักษณะภายนอกมีสีน้ำตาล-เหลือง ผนังลำตัวขรุขระและมีปุ่มเล็กๆ นูนขึ้นมาด้านบน ด้านท้องมีสีค่อนข้างขาว

ภาพที่ 17 ปลิงทะเล *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea* ที่ใช้ในการศึกษา
ภาพ: รวิวรรณ วัฒนดิลก, 2547

Stichopus horrens เก็บได้จากบริเวณเกาะสาก จังหวัดชลบุรี ที่ความลึก 4 เมตร ลักษณะภายนอกมีสีเหลืองและมีแถบคาดสีดำตลอดลำตัว มีการปล่อยอวัยวะภายในออกมาก่อนทำการผ่าเอาอวัยวะภายในออกทำให้ลำตัวมีลักษณะค่อนข้างเละ

ภาพที่ 18 ปลิงทะเล *Stichopus horrens* ที่ใช้ในการศึกษา
ภาพ: รวิวรรณ วัฒนดิลก, 2547

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การสกัดสาร

จากการนำตัวอย่างปลิงทะเลที่เก็บได้จากบริเวณจังหวัดชลบุรี 5 ชนิด ได้แก่ *Bohadschia marmorata*, *Holothuria (Mertensiothuria) leucospilota*, *Holothuria (Thymiosycia) impatiens*, *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea* และ *Stichopus horrens* มาทำการสกัดสาร โดยผ่าเอาอวัยวะภายในออก แล้วนำส่วนผนังลำตัวมาสกัดโดยใช้ EtOAc และ BuOH ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากปลิงทะเล

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านจุลชีพจากสารสกัดของปลิงทะเล 5 ชนิดในชั้น EtOAc และชั้น BuOH ที่นำมาศึกษา กับเชื้อแบคทีเรียกรัมบวกและกรัมลบรวม 5 สายพันธุ์ในอาหาร TSA และเชื้อยีสต์ 4 สายพันธุ์ในอาหาร YM agar พบว่า

สารสกัดของปลิงทะเลที่แสดงฤทธิ์ในการต้านจุลชีพมี 2 ชนิด คือ *H. fuscocinerea* ในชั้น BuOH และ *B. marmorata* ในชั้น EtOAc ที่ระดับความเข้มข้นของเนื้อสาร 250 µg/disc โดยสารสกัดของปลิงทะเล *H. fuscocinerea* ในชั้น BuOH สามารถแสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อยีสต์ *P. kluyveri* ซึ่งแสดงผลของ clear zone ที่ 11 mm (ภาพที่ 19) และสารสกัดของปลิงทะเล *B. Marmorata* ในชั้น EtOAc แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อยีสต์ *S. pombe* แสดงผลของ clear zone ที่ 9 mm. (ภาพที่ 20) ดังแสดงในตารางที่ 2 ในขณะที่สารสกัดของปลิงทะเลที่ความเข้มข้นของเนื้อสาร 100 µg/disc ไม่แสดงฤทธิ์ในการต้านจุลชีพเลย ดังแสดงในตารางที่ 3

และจากการทดสอบครั้งนี้ใช้ blank ของตัวทำละลายเป็นตัวควบคุม ซึ่งพบว่า ตัวทำละลายไม่มีผลยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ (ดังตารางที่ 2 และ 3)

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของยา

ในการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพครั้งนี้ ได้ทำการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพของยามาตรฐาน ซึ่งผลที่แสดงแสดงบริเวณยับยั้งจุลชีพ (clear zone) (mm) แสดงไว้ดังตารางที่ 4

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักของสารสกัดที่ได้จากตัวอย่างปลิงทะเล

ตัวอย่าง	น้ำหนักผนังลำตัว (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดที่ได้ (กรัม)	
		ชั้น EtOAc	ชั้น BuOH
Bohadschia marmorata	314	1.0378	2.4475
Holothuria leucospilota	354	1.0684	2.571
Holothuria impatiens	50	0.2013	0.1002
Holothuria fuscocinerea	134	0.587	0.945
Stichopus horrens	80	0.1507	0.0992

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2 แสดงผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (clear zone) (mm) จากสารสกัดของปลิงทะเลจำนวน 5 ชนิดในชั้น EtOAc และชั้น BuOH กับเชื้อจุลินทรีย์ 9 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น 250 µg/disc

ตัวอย่าง	Bacteria										Yeast							
	Gram - positive				Gram - negative													
	B. subtilis		*S. aureus*		*E. coli*		*P. aeruginosa*		*Vibrio* sp.		*C. tropicalis*		*D. hansenii*		*P. kluyveri*		*S. pombe*	
	EtOAc	BuOH	EtOAc	BuOH	EtOAc	BuOH	EtOAc	BuOH	EtOAc	BuOH	EtOAc	BuOH	EtOAc	BuOH	EtOAc	BuOH	EtOAc	BuOH
B. marmorata	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-
H. leucospilota	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H. impatiens	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H. fuscocinerea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-
S. horrens	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blank ($CHCl_3$: MeOH)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blank (MeOH)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

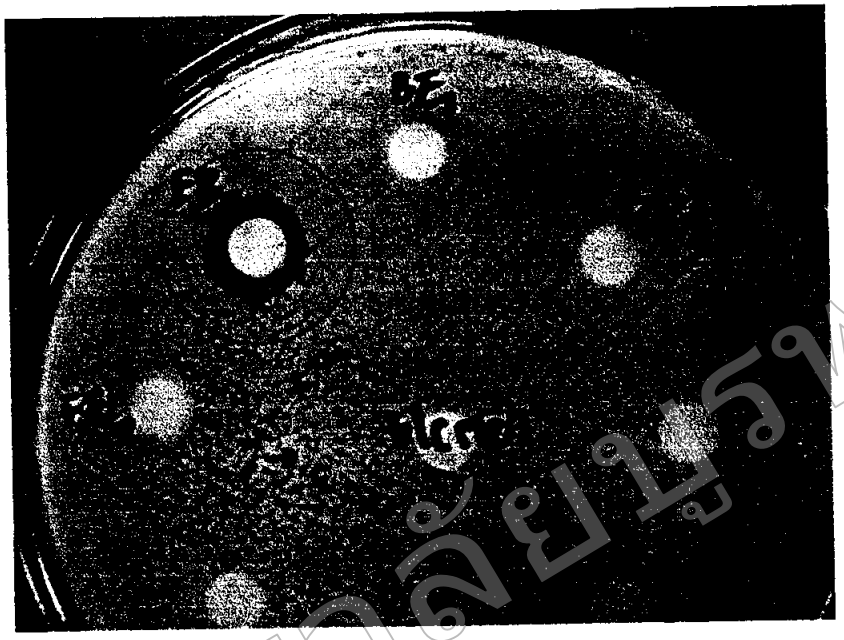
หมายเหตุ * ผลการทดลองทั้ง 2 ครั้งให้ค่าที่เหมือนกัน - แสดงถึงไม่แสดงผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Clear zone)

-*B. marmorata* คือ *Bohadschia marmorata*, *H. leucospilota* คือ *Holothuria leucospilota*, *H. impatiens* คือ *Holothuria impatiens*, *H. fuscocinerea* คือ *Holothuria fuscocinerea*, *S. horrens* คือ *Stichopus horrens*, *B. subtilis* คือ *Bacillus subtilis* (TISTR NO. 008), *S. aureus* คือ *Staphylococcus aureus* (TISTR NO. 517), *E. coli* คือ *Escherichia coli* (TISTR NO. 887), *P. aeruginosa* คือ *Pseudomonas aeruginosa* (TISTR NO. 1467), *Vibrio* sp. คือ *Vibrio* sp. (BIMS. A829.2), *C. tropicalis* คือ *Candida tropicalis* (TISTR NO. 5045), *D. hansenii* คือ *Debaryomyces hansenii* (TISTR NO. 5265), *P. kluyveri* คือ *Pichia kluyveri* (TISTR NO. 5150), *S. pombe* คือ *Schizosaccharomyces pombe* (TISTR NO. 5205)

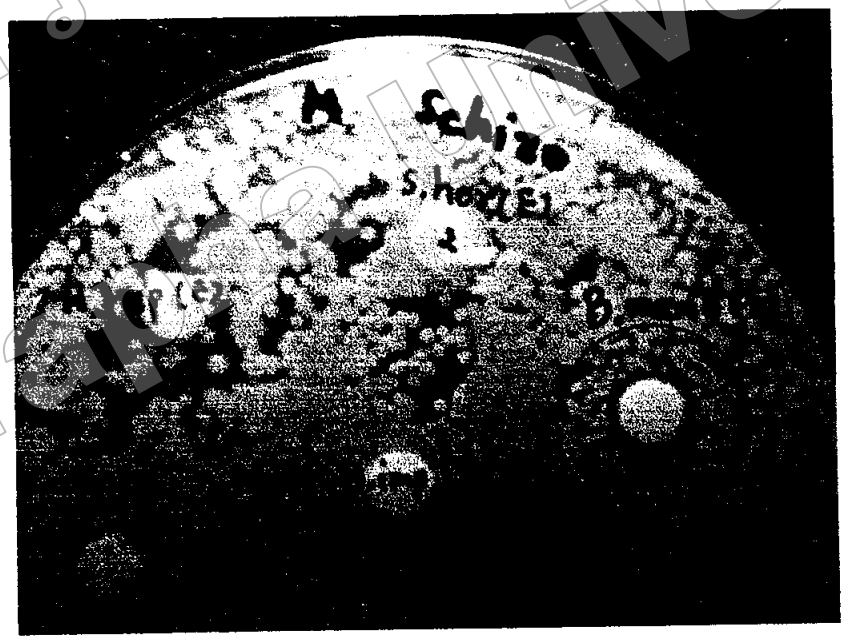
ตารางที่ 3 แสดงผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (clear zone) (mm) จากสารสกัดของปลิงทะเลจำนวน 5 ชนิดในชั้น EtOAc และชั้น BuOH กับเชื้อจุลินทรีย์ 9 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น 100 µg/disc

ตัวอย่าง	Bacteria										Yeast							
	Gram - positive				Gram - negative													
	B. subtilis		S. aureus		E. coli		*P. aeruginosa*		*Vibrio* sp.		*C. tropicalis*		*D. hansenii*		*P. kluyveri*		*S. pombe*	
	EtOAc	BuOH	EtOAc	BuOH	EtOAc	BuOH	EtOAc	BuOH	EtOAc	BuOH	EtOAc	BuOH	EtOAc	BuOH	EtOAc	BuOH	EtOAc	BuOH
B. marmorata	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H. leucospilota	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H. impatiens	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H. fuscocinerea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. horrens	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blank ($CHCl_3$: MeOH)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blank (MeOH)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 19 แสดง clear zone ของเชื้อ *P. kluyveri*



ภาพที่ 20 แสดง clear zone ของเชื้อ *S. pombe*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4 แสดงผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (clear zone) (mm) ของยามาตรฐาน

ยา	Bacteria					Yeast			
	B. subtilis	*S. aureus*	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*Vibrio* sp.	*C. tropicalis*	*D. hansenii*	*P. kluyveri*	*S. pombe*
Tetracycline	20	31	26	13	25	-	23	-	-
Gentamicin	nt	nt	nt	nt	nt	17	-	-	-
Sulphamethoxazole	nt	nt	nt	nt	nt	-	13	-	-
Penicillin G	nt	nt	nt	nt	nt	-	-	-	-
Neomycin	nt	nt	nt	nt	nt	-	-	-	-
Erythromycin	33	30	11	-	17	-	9	-	-

หมายเหตุ - แสดงถึงไม่แสดงผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (clear zone)

nt แสดงถึงไม่ได้ทำการทดสอบ (not tested)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 5
อภิปราย สรุปและข้อเสนอแนะ

อภิปรายผล

จากผลการสกัดสารสกัดหยาบของปลิงทะเลทั้ง 5 ชนิดในชั้น EtOAc และชั้น BuOH (ตารางที่ 1) พบว่าสารสกัดที่ได้ส่วนใหญ่จะอยู่ในชั้น BuOH ซึ่งจะเป็นสารประกอบจำพวกที่มีความมีขั้วสูง (high polarity) หรือเป็นพวกที่สามารถละลายน้ำได้ จากนั้นได้นำสารสกัดทั้ง 2 ชั้น (EtOAc และ BuOH) ของปลิงทะเลทั้ง 5 ชนิดมาทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งได้ทำการทดสอบทั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อยีสต์ โดยเชื้อแบคทีเรียทั้งกรัมบวกและกรัมลบที่นำมาใช้ในการทดสอบเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic) และพบได้ทั่วไปจึงถูกนำมาใช้เป็นตัวแทนของเชื้อแบคทีเรีย ส่วนเชื้อยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์เป็นพวกไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic) และพบได้ทั่วไปในขบวนการหมัก ซึ่งเชื้อพวกนี้อยู่ในกลุ่มเดียวกับพวก *Candida* spp. ซึ่งเป็นพวกที่ก่อให้เกิดโรคและแพร่กระจายได้ง่าย ดังนั้นจึงได้นำยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์นี้มาใช้เป็นตัวแทนในการทดสอบหาสารประกอบที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อยีสต์หรือเชื้อรา

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากปลิงทะเล 5 ชนิดในชั้น EtOAc และชั้น BuOH ที่ระดับความเข้มข้นของเนื้อสาร 250 µg/disc และ 100 µg/disc (ตารางที่ 2 และ 3) ผลการทดสอบแสดงว่าปลิงทะเลทั้ง 5 ชนิดในชั้น EtOAc และชั้น BuOH ไม่แสดงผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเลย ซึ่ง Shimada (1969) ก็ได้เคยรายงานถึงผลของสาร holothurin ที่ได้จากปลิงทะเล *Stichopus japonicus* ไว้ว่าไม่แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียเช่นกัน และจากการศึกษาการทดสอบเบื้องต้นสำหรับการหาสาร antibacterial จากปลิงทะเลของ Ridzwan *et al.* (1995) พบว่าสารที่สกัดได้ในชั้น lipid และชั้น MeOH ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แต่สารที่สกัดด้วยสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งจากผลของข้อมูลต่างๆเหล่านี้ก็พบว่า กลุ่มของสารที่ได้จากการสกัดด้วยพวก non-polar และพวก methanol ของปลิงทะเลส่วนใหญ่จะไม่มีฤทธิ์เป็น antibacterial แต่สารที่สกัดได้จากพวก PBS ซึ่งน่าจะเป็นกลุ่มพวก peptide จะมีคุณสมบัติทาง antibacterial ซึ่งก็มีข้อมูลที่สอดคล้องของ Haug *et al.* (2002) ซึ่งได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลชีพจากสารสกัดจากผนังลำตัวของปลิงทะเล *Cucumaria frondosa* พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Corynebacterium glutamicum* และ *S. aureus* ได้ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีน 62.5 µg/ml และ 31.25 µg/ml ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราในครั้งนี้ พบว่าสารสกัดจากตัวอย่างปลิงทะเล *H. fuscocinerea* และสารสกัดของตัวอย่างปลิงทะเล *B. marmorata* ที่ความเข้มข้น 250 µg/disc สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *P. kluyveri* และ *S. pombe* ได้ตามลำดับ (ตารางที่ 2) และจากการทบทวนเอกสารมีรายงานถึงสารประกอบที่แยกได้จากปลิงทะเลส่วนมากจะสามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้ดี เช่น Shimada (1976) โดยได้นำสาร holotoxin ซึ่งเป็นสารพวก triterpene glycoside หรือพวก saponin ที่แยกได้จากปลิงทะเลไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ก็พบว่าแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา (antifungal activity) และ Chludil *et al.* (2001) ก็ได้รายงานการแยกสาร Hemoicdemosides A และ B จากปลิงทะเล *Hemoiedema spectabilis* โดยที่สารทั้ง 2 ตัวนี้แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cladosporium cucumerinum* และ Murray *et al.* (2001) ก็สามารถแยกสาร triterpene glycosides ชื่อ patagonicoside A จากปลิง *Psolus patagonicus* ซึ่งแสดงคุณสมบัติเป็น antifungal ยับยั้งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรค *Cladosporium cucumerinum* เป็นต้น

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อยีสต์ในครั้งนี้สามารถวัดระยะของเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone ได้ที่ 11 mm. และ 9 mm. ของปลิงทะเล *H. fuscocinerea* ซึ่งยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *P. kluyveri* และปลิงทะเล *B. marmorata* สามารถยับยั้งเชื้อ *S. pombe* ตามลำดับ จากการทดลองนี้อาจไม่สามารถสรุปผลความรุนแรงของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อได้ว่าอยู่ในระดับใด เนื่องจากยามาตรฐานที่นำมาใช้ไม่แสดง clear zone กับเชื้อ *P. kluyveri* และเชื้อ *S. pombe* จึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบระดับความรุนแรงของผลการทดสอบในครั้งนี้ได้ แต่จากการสังเกตจากรัศมีของ clear zone ไม่กว้างมากนัก ทั้งที่ใช้สารสกัดในระดับความเข้มข้นสูง (250 µg/disc) ก็พอจะบอกได้ว่าสารสกัดจากปลิงทะเลที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อยีสต์ทั้ง 2 ตัวนั้นออกฤทธิ์ที่ไม่รุนแรง และจากการศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้สารสกัดหยาบในการทดสอบซึ่งจะประกอบไปด้วยสารประกอบอื่นๆ มากมาย โดยการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพอาจจะถูกบดบังโดยสารอื่นได้ ดังนั้นจึงควรจะทำการศึกษาและแยกสารประกอบให้บริสุทธิ์ ก็จะทำให้สารที่ออกฤทธิ์เหล่านี้แสดงผลในการทดสอบที่รุนแรงและชัดเจนมากขึ้น

ในการทดลองทุกครั้งได้ทำการควบคุมผลการทดลอง โดยใช้แผ่น disc ของเฉพาะตัวทำละลายเท่านั้น ซึ่งก็พบว่าแผ่น disc ของ blank นี้ทั้ง 2 ชนิดไม่มีผลต่อการทดลอง ดังนั้นผลในการยับยั้งที่เกิดขึ้นจึงเกิดมาจากตัวสารสกัดของปลิงทะเลเอง และจากการทดลองได้ใช้แผ่น disc ของยามาตรฐานหลายชนิดเพื่อใช้เปรียบเทียบผล ก็พบว่ายาแสดงฤทธิ์ยับยั้งที่รุนแรงกับเชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 4) ได้ใกล้เคียงกับค่ามาตรฐานที่แสดงไว้ในตารางที่ 5 (ภาคผนวก) ทำให้เชื่อมั่นผลการทดลองการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพในครั้งนี้ได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สรุปผล

การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพของสารสกัดจากปลิงทะเลทั้ง 5 ชนิดพบว่า

1. สารสกัดของปลิงทะเลทั้ง 5 ชนิดไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

2. สารสกัดของปลิงทะเล *H. fuscocinerea* ในชั้น BuOH สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ *P. kluyveri* ได้โดยแสดงระยะ clear zone ที่ 11 มิลลิเมตร ที่ระดับความเข้มข้น 250 µg/disc

3. สารสกัดของปลิงทะเล *B. marmorata* ในชั้น EtOAc สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ *S. pombe* ได้โดยแสดงระยะ clear zone ที่ 9 มิลลิเมตร ที่ระดับความเข้มข้น 250 µg/disc

ข้อเสนอแนะ

1. หากต้องการนำเอาสารสกัดที่ได้จากปลิงทะเลไปใช้ประโยชน์ควรทำการหาสารประกอบที่บริสุทธิ์ก่อน และนำสารประกอบบริสุทธิ์ที่ได้นั้นไปหาฤทธิ์ในด้านต่างๆ อีกครั้ง ซึ่งอาจจะทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์รุนแรงมากยิ่งขึ้น

2. จากผลที่ได้พบว่าปลิงทะเลบางชนิดมีสาร toxic อยู่แต่ไม่ฤทธิ์เป็น antibacterial ควรนำสารนี้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น antitumor, antiinflamatory เป็นต้น

3. การสกัดสาร หากเปลี่ยนวิธีการสกัดอาจจะได้สารกลุ่มใหม่ที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บรรณานุกรม

กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2535). *ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย*. กรุงเทพฯ: องค์การค้าของคุรุสภา.

ดวงพร คันธโชติ. (2545). *นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์*. (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2541). *จุลชีววิทยาทั่วไป*. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

บัญญัติ สุขศรีงาม. (2534). *จุลชีววิทยาทั่วไป*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

บพิธ จารุพันธุ์, และนันทพร จารุพันธุ์. (2540). *สัตววิทยา*. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____. (2546). *สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง II แอนเนลิดาถึงโพรโทคอร์ดาทา*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปภาศิริ ศรีโสภารณ์. (2538). *โรคและพยาธิของสัตว์น้ำ*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ปิยมาศ รอดมา. (2539). *การศึกษาชนิดของเอไคโนเดิร์มบริเวณชายฝั่ง จังหวัดชลบุรีและจังหวัดระยอง*. ปัญหาพิเศษ, สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. อ้างถึงใน อารมณ์ มุจรินทร์. (2545). *ปลิงทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย*. วิทยานิพนธ์, สาขาวิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. (2546). *ราวิทยาเบื้องต้น*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

สุเมตต์ ปุจฉาการ, สุชา มั่นคงสมบูรณ์, ธิดารัตน์ น้อยรักษา และพิชัย สนแจ้ง. (2547). การศึกษาความหลากหลายของชนิดสัตว์ทะเลในแนวปะการังในภาคตะวันออก (จังหวัดชลบุรี). ใน *รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์*. หน่วยวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.

สมชัย บุศราวิช, และนลินี ทองแถม. (2543). การประมงและการค้าปลิงทะเลในประเทศไทย. *วารสารการประมง*, 53(2), 161-167.

อารมณ์ มุจรินทร์. (2541). *การศึกษาอนุกรมวิธานของปลิงทะเล บริเวณหมู่เกาะล้านและหมู่เกาะไผ่ จังหวัดชลบุรี*. ปัญหาพิเศษ, ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

_____. (2545). *ปลิงทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย*. วิทยานิพนธ์, สาขาวิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

Avilov, S.A., Kalinin, V.I., Kalinovsky, A.I., Makarieva, T.N., Stonik, V.A. & Kalinovsky, A.I. (1994). Structue of cucumarioside G, a novel nonholostane glycoside from the sea Cucumber *Eupentacta fraudatrixa. J. Nat. Prod* 57(8): 1166-1171.

Avilov, S. A., Antonov, A. S., Drozdova, O. A., Kalinin, V. I., Kalinovsky, A. I., Stonik, V. A., Riguera, R., Lenis, L. A. & Jimenez, C. (2000a). Triterpene Glycosides from the Far-Eastern sea cucumber *Pentamera calcigera*. 1. Monosulfated glycosidesand cytotoxicity of their unsulfated derivatives. *J. Nat. Prod* 63: 65-71.

Avilov, S. A., Antonov, A. S., Drozdova, O. A., Kalinin, V. I., Kalinovsky, A. I., Riguera, R., Lenis, L. A. & Jimenez, C. (2000b). Triterpene Glycosides from the Far Eastern Sea Cucumber *Pentamera calcigera* II: Disulfated Glycosides. *J. Nat. Prod* 63(10): 1349-1355.

Avilov, S. A., Antonov, A. S., Silchenko, A. S., Kalinin, V. I., Kalinovsky, A. I., Dmitrenok, P. S., Stonik, V. A., Riguera, R. & Jimenez, C. (2003). Triterpene glycosides from the far eastern sea cucumber *Cucumaria conicospermium*. *J. Nat. Prod* 66: 910-916.

Barnett, J.A., Payne, R.W. & Yarrow, D. (2000). *Yeast: Characteristics and identification* (3 rd ed.). Cambridge: The United Kingdom at the University Press. Carballeira, N.M., Cruz, C., Sostre, A. (1996). Identification of the Novel 7-Methyl-6-octadecenoic Acid in *Holothuria mexicana*. *J. Nat. Prod* 59(11): 1076-1078.

Carballeira, N. M., Cruz, C. & Sostre, A. (1996). Identification of the Novel 7-Methyl-6-octadecenoic Acid in *Holothuria mexicana*. *J. Nat. Prod* 59(11): 1076-1078.

Chludil, H.D., Muniain, C.C., Seldes, A.M. & Maier, M.S. (2001). Cytotoxic and Antifungal Triterpene Glycosides from the Patagonian Sea Cucumber *Hemoiedema spectabilis*. *J. Nat. Prod* 65: 860-865.

Cunningham, P. & Goetz, P. (1996). Venomous & Toxic Marine Life of the world. Pisces Books, Houston, TX.

DIFCO MANAUL. (1994). *Dehydrated culture media and reagents for microbiology* (10 th ed.). DIFCO LABORATORIES, U.S.A.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Encarnacion, R.,Carrasco, G. & Bpinow, M. (1989). Neothyoside A, proposed structure of a triterpenoid tetraglycoside from the Pacific sea cucumber, *Neothyone gibbosa. J. Nat. Prod* 52(2): 248-251.

Frey, D.G. (1951). *The use of sea cucumbers in poisoning fishes.* Copeia: 175-176.

Haug, T., Kjuul, A.K., Styrvold, O.B., Sandsdalen, E., Olsen, Ø.M. & Stensvåg, K. (2002). Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology* 81: 94-102.

Hegde, V. R., Chan, T. M., Pu, H., Gullo, V. P., Patel, M. G., Das, P., Wagner, N., Parameswaran, P. S. & Naik, C. G. (2002). Two selective novel triterpene glycosides from sea cucumber, Telenata ananas: inhibitors of chemokine receptor-5. *Bioorg. Med. Chem. Lett* 12(21): 3202-3205.

Ingraham, J.L. & Ingraham, C.A. (2000). *Introduction to microbiology* (2 nd ed.). United States of America: BROOKS/COLE.

Joseph, L., & Shakeel, H. (1991). The Beche-de mer fishery in the Maldives; only a few year old, but already in need management. Bay of Bengal News, Issue 43: 2-5.

Kitagawa I, Sugawara T, Yosioka I. & Kuriyama K (1976). Saponin and sapogenol. XIV. Antifungal glycosides from the sea cucumber *Stichopus japonicus* selenka. (1). Structure of stichopogenin A4, the genuine aglycone of holotoxin A. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 24(2): 266-274.

Kitagawa I, Sugawara T & Yosioka I. (1976). Saponin and sapogenol. XV. Antifungal glycosides from the sea cucumber *Stichopus japonicus* Selenka. (2). Structures of holotoxin A and holotoxin B. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 24(2): 275-284.

Kitagawa, I., Kobayashi, M., Inamoto, T., Fuchida, M. & Kyogoku, Y. (1985). Marine natural products. XIV. Structures of echinosides A and B, antifungal lanostane-oligocosides from the sea cucumber *Actnopyga echinites* (Jaeger). *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 33(12): 5214-5224.

Maier, M.S., Roccatagliata, A.J., Kuriss, A., Chludil, H., Seldes, A.M., Pujol, C.A. & Damonte, E.B. (2001). Two new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from the Antarctic sea cucumber *Staurocucumis liouvillei. J. Nat. Prod* 64: 732-736.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Maltsev, I.I., Stonik, V. A., Kalinovsky, A. I. & Elyakov. G. B. (1984). Triterpene glycosides from sea cucumber *Stichopus japonicus* Selenka. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 78(2): 421-426.

Murray, A.P., Muniaín, C., Seldes, A.M. & Maier, M.S. (2001). Patagonicoside A: a novel antifungal disulfated triterpene glycoside from the sea cucumber *Psolus patagonicus*. *Tetrahedron* 57: 9563-9568.

Nigrelli, R.F., & S. Jakowska. (1960). Effects of holothurin, a steroid saponin from the Baharnian sea cucumber (*Actinopyga agassizi*), on various biological systems. Ann NY. *Acad Sci* 90: 884-892.

Nigrelli, R.F., Stempien, M.F., Ruggieri, G.D., Liguori, V.R. & Cecil, J.T. (1967). Substances of potential biomedical importance from marine organisms. *Fed. Proc.*26(4): 1197-1205.

Popov, A. M. (2002). Comparative study of cytotoxic and hemolytic effects of triterpenoids isolated from ginseng and sea cucumber. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.*, Mar-Apr (2): 155-164.

Ridzwan, B.H., Kaswandi, M.A., Azman, Y. & Fuad, M. (1995). Screening for Antimicrobial Agents in three species of sea cucumbers from Coastal areas of Sabah. *Gen.Pharmac* 26(7): 1539-1543.

Shimada, S. (1969). Antifungal steroid glycoside from sea cucumber. *Science* 163: 1462 .

Toonen, R. (2002). Aquarium science: The captive breeding of tropical reef species for the aquarium trade, with specific attention to long-term planktotrophic larvae. *Tropical Fish Hobbyist* 557: 66-72.

Tsushima, M., Fujiwara, Y. & Matsuno, T. (1996). Novel Marine *di-Z*-Carotenoids: Cucumariaxanthins A, B and C from the Sea Cucumber *Cucumaria japonica*. *J. Nat. Prod* 59(1): 30-34.

Villasin, J. & Pomory, C.M. (2000). Antibacterial activity of extracts from the body wall of *Parastichopus parvimensis* (Echinodermata: Holothuroidea). *Fish & Shellfish Immunoligy* 10: 465-467.

Wong, B., Kiehn, T. E., Edwards, F., Bernard, E. M., Marcove, R. C., de Harven, E. & Armstrong, D. (1982). Bone infection caused by *Debaryomyces hansenii* in a normal host: a case repor. *J. Clin. Micro* 16(3): 545-548.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Yaw, N. R. & Findlay, J. A. (1994). Polar metabolites from the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. *J. Nat. Prod* 57(1): 84-89.

Zou, Z. R., Yi, Y. H., Wu, H. M., Wu, J. H., Liaw, C. C. & Lee, K. H. (2003). Intercedensides A-C, three new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Mensamaria intercedens* Lampert. *J. Nat. Prod* 66: 1055-1060.

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ตารางที่ 5 Range of Zone Diameters (mm) Obtained with Control Cultures. (DIFCO MANUAL, 1994)

Antimicrobic Agent	Disc Content	Zone Resistant mm or Less	Diameter to Nearest Intermediate mm range	Whole mm Susceptible mm or More
Erythromycin	15 µg	13	14-17	18
Gentamicin	10 µg	12	13-14	15
Neomycin	30 µg	12	13-16	17
Penicillin G	10 units	11	12-21	22
Tetracycline	30 µg	14	15-18	19
Sulphamethoxazole	23.75 µg	10	11-15	16

0.5 Mc Farland. (DIFCO MANUAL, 1994)

1. ชั่ง $BaCl_2$ $2H_2O$ 0.587 กรัม ในน้ำกลั่น 50 ml

2. Conc. H_2SO_4 0.5 ml ในน้ำกลั่น 50 ml

3. ผสม $BaCl_2.2H_2O$ ในข้อ 1 กับ Conc. H_2SO_4 ในข้อ 2 ในอัตราส่วน 4.75 ml: 0.25 ml จะได้ความขุ่น 0.5 Mc Farland.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1421

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ- สกุล	ปัณรสี ภิญโญ
วัน เดือน ปีเกิด	30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2525
สถานที่เกิด	จ. ชลบุรี
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2540	จบการศึกษาระดับมัธยมต้น โรงเรียนระยองวิทยาคม
พ.ศ. 2543	จบการศึกษาระดับมัธยมปลาย โรงเรียนระยองวิทยาคม
พ.ศ. 2547	จบการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพาวิทยาเขตจันทบุรี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University