

**ประสิทธิภาพของสารเมแทโบไลต์ทุติยภูมิจากดาวทราย (*Astropecten* sp.)
ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในปลา
**Antibacterial Efficiency of Secondary Metabolites from
Sand Sea Star (*Astropecten* sp.) against Pathogenic Fish Bacteria****

ราโชว์ ขาวชำนาญ¹ และ อีรวัฒน์ เลิศสุทธิขวาล^{1,2*}

¹สาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

วิทยาเขตนครศรีธรรมราช อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช

²หน่วยวิจัยการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

วิทยาเขตนครศรีธรรมราช อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช

* E-mail: theerawootl@yahoo.com

บทคัดย่อ

ทำการรวบรวมตัวอย่างดาวทราย (*Astropecten* sp.) จากบริเวณหาดราชมงคล อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง นำไปแช่สกัดด้วยตัวทำละลาย 95 % ethyl alcohol และ hexane ตามลำดับ นำสิ่งสกัดหยาบทั้ง 2 ส่วนที่ผ่านการระเหยแห้ง มาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในปลา 3 ชนิด คือ *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila* และ *Vibrio harveyi* โดยประเมินค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี broth dilution method พบว่าสิ่งสกัดในชั้น hexane มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*, *A. hydrophila*, และ *V. harveyi* ได้ดีโดยมีค่า MIC ที่ 48 ชั่วโมงเท่ากับ 1,600, 2,200 และ 2,400 ส่วนในล้านส่วนตามลำดับ ขณะที่สิ่งสกัดหยาบที่สกัดด้วย 95% ethyl alcohol ไม่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด และเมื่อนำสิ่งสกัดที่ได้ผลดีจากสิ่งสกัดด้วย hexane มาแยกเพื่อให้ได้สารเมแทโบไลต์กึ่งบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Vacuum Liquid Column Chromatography (VLC) เลือกสารกึ่งบริสุทธิ์ที่ได้ปริมาณมากที่สุด 3 ลำดับแรก มาทดสอบการยับยั้งเชื้อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี broth dilution method พบว่าสิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์ Fraction ที่ 1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*, *A. hydrophila*, และ *V. harveyi* ได้ดีโดยมีค่า MIC ที่ 48 ชั่วโมงเท่ากับ 1,000, 1,200 และ 1,400 ส่วนในล้านส่วน แสดงให้เห็นว่าทั้งสิ่งสกัดหยาบและสิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากดาวทรายที่สกัดด้วย hexane มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ดี

คำสำคัญ: เมแทโบไลต์ทุติยภูมิ สารต้านแบคทีเรีย ดาวทราย แบคทีเรียก่อโรคในปลา

Abstract

Samples of sand sea star (*Astropecten* sp.) were collected from Rajamangala Beach, SiKao District, Trang Province. The samples were soaked in 95% ethyl alcohol and hexane respectively. Crude extracts were dried and assayed for their antibacterial activities. Three species of pathogenic fish bacteria were used as bacterial models, *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila*, and *Vibrio harveyi*. The broth dilution method was carried out to determine the minimal inhibitory concentration (MIC). The results showed that within 48 hours, MIC values of hexane extracts for *S. agalactiae*, *A. hydrophila*, and *V. harveyi* were 1,600, 2,000 and 2,200 ppm respectively, while ethanolic extracts provided more than 2,800 ppm. Hexane extracts were further run with the vacuum liquid column chromatography technique (VLC) for semi-purified metabolites. The first three

species of metabolites (by weight) were selected to examine their antibacterial efficiency. The best MIC values for *S. agalactiae*, *A. hydrophila*, and *V. harveyi* were 1,000 ppm, 1,200 ppm, and 1,400 ppm respectively. This suggested that hexane extracts and semi-purified metabolites could be used as antibacterial agents.

Keywords: Secondary metabolite, Antibacterial agent, Sand sea star, Pathogenic fish bacteria

บทนำ

ปัจจุบันนี้ปัญหาทางด้านโรคติดเชื้อในสัตว์น้ำ เป็นปัญหาสำคัญซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพเศรษฐกิจ และความเป็นอยู่ของมนุษย์ที่ยังคงรอคอยการพัฒนาหายารักษาใหม่ๆที่มีประสิทธิภาพมาใช้ในการรักษาเนื่องจากยาปฏิชีวนะที่เคยใช้ในอดีตบางชนิดไม่สามารถใช้รักษาโรคที่เคยรักษาได้เพราะเชื้อโรคจากแบคทีเรียมีการปรับตัวให้สามารถทนทานต่อยาปฏิชีวนะได้มากขึ้นการรักษาจึงจำเป็นต้องเพิ่มปริมาณยาให้มากขึ้นกว่าเดิมหรืออาจต้องเปลี่ยนตัวยาปฏิชีวนะชนิดอื่นแทนนอกจากนี้โรคจากแบคทีเรียยังมีการพัฒนาสายพันธุ์ชนิดใหม่อยู่ตลอดเวลาทำให้ในอนาคตมีแนวโน้มที่จะพบโรคติดเชื้อชนิดใหม่มากขึ้นตามไปด้วยซึ่งเชื้อโรคที่รู้จักกันดีในปัจจุบันและมีการระบาดในสัตว์น้ำสร้างความเสียหายเป็นจำนวนมาก เช่น *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลาโดยเฉพาะปลานิลและปลาทับทิมซึ่งเป็นสัตว์น้ำที่สร้างรายได้ให้กับเกษตรกรและเป็นสัตว์น้ำที่ส่งออกของประเทศไทย และ *Vibrio harveyi* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สร้างความเสียหายให้กับกุ้งของไทย โดยเฉพาะโรคเรืองแสง

ดังนั้นการวิจัยเพื่อเสาะแสวงหาแหล่งของสารยับยั้งจุลชีพที่จะนำไปพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องอยู่ตลอดเวลาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล ก็เป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและมีการศึกษา วิจัยพัฒนามาเป็นยาปฏิชีวนะในด้านรักษาโรค มนุษย์ และสัตว์บก และรวมไปถึงสัตว์น้ำมากมาย แต่มีสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งที่มีความน่าสนใจและยังมีนักวิจัยที่ศึกษาน้อยในการนำมาทดสอบการรักษาโรคสัตว์น้ำ นั่นคือ สิ่งมีชีวิตในกลุ่มเอโคไโคเดิร์ม ซึ่งเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่อาศัยอยู่ในทะเล มีความสามารถในการปรับตัวได้ดี และเคลื่อนที่ตามน้ำขึ้นน้ำลงได้ และเนื่องจากการที่ประชากรของสัตว์กลุ่มนี้ มีความผันแปรตามลักษณะทางภูมิอากาศ และฤดูกาล จึงมีรายงาน

การศึกษาการใช้ประโยชน์จากสัตว์กลุ่มนี้ในการเป็นเป็นตัวชี้วัดการเปลี่ยนแปลงทางสมุทรศาสตร์ [1] เมื่อทำการศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นทางเคมีทั้งหมด (screening test) ของดาวทราย (*Astropecten* sp.) เช่น steroids, fatty acid terpenoids โดย Liquid chromatography-mass spectrometry (LCMS) พบสารทุติยภูมิจากดาวทรายทั้งหมด 23 ชนิด ได้แก่ กลุ่มของ steroids จำนวน 5 ชนิด สารกลุ่ม saponins 6 ชนิด fatty acid 2 ชนิด และที่ไม่ปรากฏในฐานข้อมูลจำนวน 10 ชนิด ในเหรียญทะเลพบจำนวน 75 ชนิด ได้แก่ อนุพันธ์ของ สารสเตอรอล (cetonardosterol) steroids glycosides 1 ชนิด saponins 18 ชนิดที่เหลือ 56 ชนิด [2]

ปัจจุบันมีการค้นพบสารทุติยภูมิ จากกลุ่มเอโคไโคเดิร์มแล้วประมาณ 464 ชนิดสาร เป็นสารที่มีวิถีชีวสังเคราะห์มาจาก isoprenoid เป็นกลุ่มหลัก 317 ชนิด (68%) รองลงมาเป็น acetogenin 73 ชนิด (15%) shikimate (7%) amino acid (5%) และ carbohydrate อีกประมาณ 5% [3] ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactivities) ที่หลากหลาย เช่น ด้านเนื้องอกและมะเร็ง (anti-tumor / anti-cancer), ด้านการอักเสบ (anti-inflammation), ด้านอนุมูลอิสระ (antioxidant), ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (anti-bacteria) และยับยั้งการเจริญของไวรัส (anti-virus) [4], [5], [6], [7], [8], [9] การเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อสกัดสารทุติยภูมิเป็นเรื่องสำคัญ เนื่องจากสิ่งทุติยภูมิแต่ละชนิดมีความสามารถในการละลายต่างกัน สิ่งประกอบที่มีโครงสร้างที่มีประจุสูง อาจต้องเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีประจุสูง ขณะที่สิ่งประกอบที่มีขั้วต่ำ หรือไม่มีขั้ว ต้องเลือกสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ หรือไม่มีขั้วเช่นกัน ในกรณีของ เม่นทะเล, *Temnopleurus alexandri* สิ่งสกัดในชั้นของ hexane มีผลยับยั้งแบคทีเรีย แกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* และ แกรมลบ เช่น *Escherichia coli*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* ซึ่งจากการวิเคราะห์คุณลักษณะโดยวิธี GC - MS พบว่าสิ่งทุกติยภูมิประกอบด้วย *pentadecane*, *heptadecane*, *eicosane*, *heneicosane*, *docosane* [10]

การสำรวจสัตว์หน้าดินกลุ่มเอคไคโนเดิร์มในประเทศไทยปี 2004 [11] พบทั้งหมด 381 ชนิด ได้แก่ crinoids (39 ชนิด), asteroids (69 ชนิด), ophiuroids (112 ชนิด), echinoids (67 ชนิด) และ holothurians (94 ชนิด) ซึ่งพบ 14 สกุลในบริเวณอ่าวไทย และ 4 สกุล พบในฝั่งอันดามัน แม้บริเวณภาคใต้ฝั่งอันดามันของประเทศไทยจะยังคงมีความหลากหลาย ทั้งในแง่ชนิดและปริมาณของสัตว์กลุ่มนี้ก็ตาม หากแต่ไม่มีรายงานการศึกษาสารทุกติยภูมิ รวมทั้งข้อมูลการใช้ประโยชน์จากกลุ่มดังกล่าวทั้งด้านการแพทย์และ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำยังมีน้อย โดยเฉพาะดาวทราย (*Astropecten* sp.) ดังนั้นจึงควรที่จะได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารเมแทโบไลต์ทุกติยภูมิจากสัตว์กลุ่มนี้ เพื่อประโยชน์ด้านการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำต่อไป

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดาวทราย (*Astropecten* sp.) จากบริเวณหาดราชชมงคล อ. สีเกา จ.ตรัง ระยะห่างจากชายหาด 20 เมตร (N 0534076, UTM 0832250) ตัวอย่างจะถูกเก็บในถุงและแช่เย็นทันทีนำมาเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ณ สาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช

2. การสกัดแยก

นำตัวอย่างดาวทราย หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ บดละเอียด และแช่ในตัวทำละลาย 95% ethyl alcohol ในอัตราส่วนน้ำหนักตัวอย่าง (กิโลกรัม) ต่อปริมาตรตัวทำละลาย (ลิตร) 1: 2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกส่วนที่เป็นน้ำ และกากตัวอย่างที่เหลือนำไปแช่ด้วยตัวทำละลายอีก 5 ครั้ง เพื่อให้การสกัดเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จากนั้นแบ่งสารสกัดออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไประเหยโดยตรงด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบในตัวทำละลาย 95% ethyl alcohol อีกส่วนนำไปแยกชั้นด้วยตัวทำ

ละลาย hexane ใช้อัตราส่วน 1:1 แล้วจึงไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจนแห้งจะได้สิ่งสกัดหยาบในตัวทำละลาย hexane เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ใส่ภาชนะปิดสนิทเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่อไป

3. การศึกษาการออกฤทธิ์ของสิ่งสกัดหยาบ 95% ethyl alcohol, hexane ต่อการต้านแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ

3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila* และ *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้านี้ได้รับการเชื้อจากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจการ ศุภมาตย์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ มาบ่มไว้ในอุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญเติบโตเต็มที่ละลายด้วยน้ำเกลือ 0.85% ให้มีความเข้มข้นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No.0.5 (10^8 c/ml) ก่อนนำไปทดสอบด้วยสิ่งสกัดหยาบและสิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์

3.2 การเตรียมสิ่งสกัดหยาบ

นำสิ่งสกัดหยาบและสิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์ แต่ละ Fraction ของดาวทรายมาชั่งในปริมาณ 0.1 กรัม ละลายในตัวทำละลาย 95% ethyl alcohol และ hexane 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี broth dilution method [12]

3.3 การดำเนินการทดลอง

นำสารละลายเชื้อแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ใส่ในอาหารเหลว trypticase soy broth (TSB) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นใส่สิ่งสกัดทั้งสองตามปริมาณความเข้มข้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเชื้อ 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงบนอาหาร TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง ประเมินค่าความเข้มข้นของสิ่งสกัดที่ต่ำที่สุดที่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้

4. การแยกสิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ Vacuum Liquid Column Chromatography (VLC)

เลือกใช้ตัวดูดซับ silica gel 60 โดยวิธีแบบแห้ง (dry packing) นำตัวอย่างละลายด้วยตัวทำละลาย dichloromethane ในปริมาณเล็กน้อยแล้วนำมาผสมกับ silica gel โดยใช้ปริมาณ silica gel น้อยที่สุด หลังจากนั้นนำมาบรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาด 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ methanol เป็น วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) แบบ gradient นำสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ไปประเหด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจนแห้ง จะได้สิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์ (Fraction) ออกมาตามลำดับ และนำมาเก็บรักษาในภาชนะปิดสนิทรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่อไป

5. การศึกษาการออกฤทธิ์ของสิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์ต่อการต้านแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ

นำ Fraction ของสิ่งสกัด จากขั้นตอนที่ 4 โดยเลือกใช้สารที่มีปริมาณสูงสุด 3 อันดับแรก มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อพาหะ เช่น แบคทีเรีย เช่นเดียวกับขั้นตอนการศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกัด

ผลการทดลอง

1. ประสิทธิภาพในการยับยั้งของสิ่งสกัดหยาบ

จากการทดลองขั้นต้น เมื่อนำสิ่งสกัดหยาบจากดาวทราย (*Astropecten* sp.) มาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในปลา 3 ชนิด คือ *S. agalactiae*, *A. hydrophila* และ *V. harveyi* พบว่าสิ่งสกัดหยาบในชั้นของ hexane ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*, *A. hydrophila* และ *V. harveyi* ได้ดีโดยมีค่า MIC ที่ 48 ชั่วโมงเท่ากับ 1,600, 2,200 และ 2,400 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ตามลำดับ ส่วนที่สกัดด้วย 95 % ethyl alcohol ไม่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 1)

2. การแยกสิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ VLC

จากการแยกสิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์ ซึ่งได้สิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์จำนวน 7 Fractions แต่ละ Fraction มีปริมาณที่ต่างกันคือ Fraction ที่ 1 มีปริมาณมากที่สุด ตามด้วย Fraction 7, 6, 3, 2, 4 และ 5 (ตารางที่ 2)

3. ประสิทธิภาพในการยับยั้งของสิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์

จากการนำสิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์มาทดสอบการยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิด ผลที่ได้นั้น สิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์ Fraction ที่ 1 ยับยั้งเชื้อ ทั้ง 3 ได้ดี มีค่า MIC ที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 1,000, 1,200 และ 1,400 ส่วนในล้านส่วนและสิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์ Fraction ที่ 6 และ 7 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย มีค่า MIC ที่ 48 ชั่วโมงสูงกว่า 1,400 ส่วนในล้านส่วน (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของสิ่งสกัดหยาบจากดาวทราย ในการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae*, *A. hydrophila* และ *V. harveyi*

ความเข้มข้น (ppm)	<i>S. agalactiae</i>				<i>A. hydrophila</i>				<i>V. harveyi</i>			
	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง	
	(CFU /ml)		(CFU /ml)		(CFU /ml)		(CFU /ml)		(CFU /ml)		(CFU /ml)	
	SSA	SSH	SSA	SSH	SSA	SSH	SSA	SSH	SSA	SSH	SSA	SSH
0	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
400	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
800	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
1,000	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
1,200	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
1,400	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
1,600	>300	96	>300	54	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
1,800	>300	12	>300	7	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
2,000	>300	2	>300	0	>300	103	>300	76	>300	>300	>300	>300
2,200	>300	0	>300	0	>300	24	>300	13	>300	>300	>300	>300
2,400	>300	0	>300	0	>300	4	>300	1	>300	64	>300	27
2,600	>300	0	>300	0	>300	0	>300	0	103	8	137	2
2,800	>300	0	>300	0	>300	0	>300	0	98	0	88	0

หมายเหตุ SSA สิ่งสกัดหยาบจากดาวทรายในชั้น 95% ethyl alcohol, SSH สิ่งสกัดหยาบจากดาวทรายในชั้น hexane

ตารางที่ 2 สิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากดาวทราย ในชั้นของ hexane ที่ทำการสกัดโดยวิธี VLC

ลำดับที่	ชนิดสิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์	ลักษณะของสิ่งสกัด	ปริมาณที่สกัดได้ (กรัม)
1	S1	ตะกอน สีเหลือง	2.83*
2	S2	ตะกอน สีขาวขุ่น	1.12
3	S3	ไข สีชมพูอ่อน	2.01
4	S4	ไข สีเหลืองอ่อน	0.94
5	S5	ตะกอน สีเหลืองอ่อน	0.2
6	S6	ก้อนเหนียว สีส้ม	2.15*
7	S7	ผง สีขาว	2.73*

หมายเหตุ : S1, S6 และ S7 สิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์แต่ละ Fraction ที่ผ่านคอลัมน์จากการวิเคราะห์ VLC

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของสิ่งสกัดกั้นไวรัสจากดาวทรายในการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae*, *A. hydrophila* และ *V. harveyi*

ความ เข้มข้น (ppm)	<i>S. agalactiae</i>						<i>A. hydrophila</i>						<i>V. harveyi</i>					
	24 ชั่วโมง			48 ชั่วโมง			24 ชั่วโมง			48 ชั่วโมง			24 ชั่วโมง			48 ชั่วโมง		
	(CFU /ml)			(CFU /ml)			(CFU /ml)			(CFU /ml)			(CFU /ml)			(CFU /ml)		
	S1	S6	S7	S1	S6	S7	S1	S6	S7	S1	S6	S7	S1	S6	S7	S1	S6	S7
0	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
400	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
800	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
1,000	71	>300	>300	58	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
1,200	12	>300	>300	3	>300	>300	83	>300	>300	54	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
1,400	0	>300	>300	0	>300	>300	9	>300	>300	3	>300	>300	64	>300	>300	39	>300	>300
1,600	0	>300	>300	0	>300	>300	0	>300	>300	0	>300	>300	12	>300	>300	8	>300	>300
1,800	0	>300	>300	0	>300	>300	0	>300	>300	0	>300	>300	3	>300	241	0	>300	225
2,000	0	>300	>300	0	>300	>300	0	>300	>300	0	>300	>300	0	>300	179	0	>300	186
2,200	0	>300	>300	0	>300	>300	0	>300	169	0	>300	146	0	221	152	0	217	141
2,400	0	146	172	0	127	133	0	211	121	0	198	110	0	184	109	0	177	123
2,600	0	84	136	0	57	77	0	146	98	0	157	56	0	136	84	0	121	73
2,800	0	56	103	0	23	46	0	114	65	0	121	21	0	103	75	0	98	44

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดสอบดังกล่าวทำให้ยืนยันได้ว่าสิ่งสกัดจากดาวทราย (*Astropecten* sp.) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้งสามชนิด ซึ่งเชื่อดังกล่าวเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม ประสิทธิภาพของสิ่งสกัดหยาบและสิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้นั้น เพราะมีส่วนอนุพันธ์ของสารกลุ่ม peptides, glycosides และ saponins ที่สามารถยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียไม่ให้เจริญเติบโต และตัวทำละลายก็มีผลต่อการแยกสิ่งสกัดบางชนิดที่สามารถเป็นพิษหรือแสดงปฏิกิริยาออกฤทธิ์ต้านจุลชีพชนิดต่างๆ และหน้าที่ของสารสกัดที่ออกมาในตัวทำละลายที่ต่างกัน ทำหน้าที่ต่างกันด้วย เมื่อแยกออกเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์จะเห็นได้ว่าสารที่ออกมาจะรวมกันเป็นกลุ่มสาร เนื่องมาจากการจับกันระหว่างพันธะของสารซึ่งสารบางกลุ่มจะมีพันธะคู่สลับเดี่ยว และสารเหล่านี้จะจับกลุ่มในหมู่เดียวกันจากการนำสิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์มาทดสอบ ทำให้เห็นผลที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากความเข้มข้นของสารมีมากขึ้นและประสิทธิภาพการยับยั้งก็มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Uma and Parvathavarthini [10] ที่พบสิ่งสกัดหยาบจากเม่นทะเลในชั้นของ hexane เช่นเดียวกัน นอกจากนั้นมีรายงานพบสารทุติยภูมิที่แยกได้จากดาวทะเลโดยมี sulfate เป็นองค์ประกอบโมเลกุล เช่นสาร Lysasteroide A sterols glycoside ได้จากดาวทะเลชนิด *Lysastrosoma anthosticta* สาร certonardoside ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม saponin แยกได้จาก ดาวทะเลชนิด *Certonardoa semiregularis* และยังพบสาร benzyltetrahydroisoquinoline และ imbricatine จากดาวทะเลชนิด *Dermaterias imbricata* สารทั้งหมดมีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเอดส์ (anti-HIV) ซึ่งสารทุติยภูมิที่แยกได้จากดาวทราย ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ จุลชีพ ด้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง ยับยั้งเชื้อราและไวรัส [13] , [14]

สรุป

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าตัวทำละลายในชั้น hexane มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*, *A. hydrophila*, และ *V. Harveyi* ได้ดี และเมื่อ

แยกสิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์ พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ ทั้งสามชนิดได้ดีกว่าสิ่งสกัดหยาบ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่องการใช้ประโยชน์ของสารทุติยภูมิจากสัตว์กลุ่มเอคไคโน-เดิร์มเพื่อการป้องกันรักษาโรคสัตว์น้ำซึ่งได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขต นครศรีธรรมราช ประจำปีงบประมาณ 2554-2555 โดยมี ผศ.ดร.ธีรวุฒิ เลิศสุทธิขวาล เป็นหัวหน้าโครงการ ขอขอบคุณ ผศ.ดร. พชรเพชรประดับ สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการสกัดสิ่งสกัดกึ่งบริสุทธิ์ในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- [1] ธีรวุฒิ เลิศสุทธิขวาล, พชร เพ็ชรประดับ และทวีศักดิ์ ศรีชนะ. 2552. การใช้ประโยชน์ของสัตว์ทะเลในกลุ่มเอคไคโน-เดิร์มในการเป็นตัวชี้วัดการเปลี่ยนแปลงทางสมุทรศาสตร์. รายงานผลการวิจัยเสนอมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช. 40 น.
- [2] วุฒิชัย ทองบำรุง, พชร เพ็ชรประดับ และธีรวุฒิ เลิศสุทธิ-ขวาล. 2554. การสำรวจสารทุติยภูมิในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังกลุ่มเอคไคโน-เดิร์มโดยวิธี TLC และ LCMS, น. 59. ใน บทคัดย่อการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.
- [3] Lawrence, J. A. 1987. **Functional Biology of Echinoderms**, Baltimore: Johns Hopkins University Press, 350 p.
- [4] Marino, S. D., Iorizzi, I., Aollo, F., Palagiano, E., and Rosssakis, C. 1998. "Starfish saponin isolation, structure elucidation and biological activity of the steroid oligoglycoside from

- Antarctic starfish family Asteroidea.” **Journal Natural Products**. 62 (11): 1321-1328.
- [5] Hagu, T., Kjuul, A. K., Styrvold, O. B., Sandsdalen, E., Orjan, M.O. and Stensvag, K. 2002. “Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea) *Cucumaria frondosa* (Holothu-roidea), and *Asterias rubens* (Asteroi-dea).” **Journal of Invertebrate Pathology**. (81): 94–102
- [6] Jawahar, A. T., Nagarajan, J. and Shanmugam, S. A. 2002. “Antimicrobial substances of potential biomedical importance form holothurians species.” **Journal of Marine Sciences**. 31(2): 161-164.
- [7] Zhang, W., Guo, Y. and Gu, Y. 2006. “Secondary metabolites from the South China Sea invertebrates: Chemistry and biological activity.” **Current Medicinal Chemistry**. 13 (17): 204-209.
- [8] Ogushi, M., Yoshie-Stark, Y. and Suzuki, T. 2005. “Apoptosis-inducing activity of hot water extracts from the sea cucumber in human colon tumor cells.” **Food Science and Technology Research**. 12 (4): 290-294.
- [13] Mayer, A. M. S. and Gustafson, K. R. 2006. “Marine pharmacology in 2003-2004: antitumor and cytotoxic compound.” **European Journal of Cancer**. 42: 42-22.
- [9] Li, C. T., Haug, O. B., Styrvold, T. and Jorgensen, K. S. 2008. “Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*.” **Developmental and Comparative Immunology**. (32): 1430–1440.
- [10] Uma, B. and Parvathavarthini, R. 2010. “Antibacterial effect of hexane extract of sea urchin, *Temnopleurus alexandri* (Bell, 1884)”. **International Journal of PharmTech Research**. 2(3): 1677-1680.
- [11] Puchakarn, S. and Sonchaeng, P. 2004. “Echinoderm Fauna of Thailand: History and Inventory Reviews.” **ScienceAsia** 30: 417-428.
- [12] European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). 2003. “Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. Eucast discussion document.” **Clinical microbiology and infection**. 9: 7.
- [14] Bhakuni, D. S. and Rawat, D. S. 2006. **Bioactive Marine Natural Products**. Springer, New Delhi, 382 p.