



องค์ประกอบ และฤทธิ์การต้านจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือยักษ์ *Anurostreptus sculptus* Demange, 1961 (Diplopoda : Spirostreptida : Harpagophoridae)

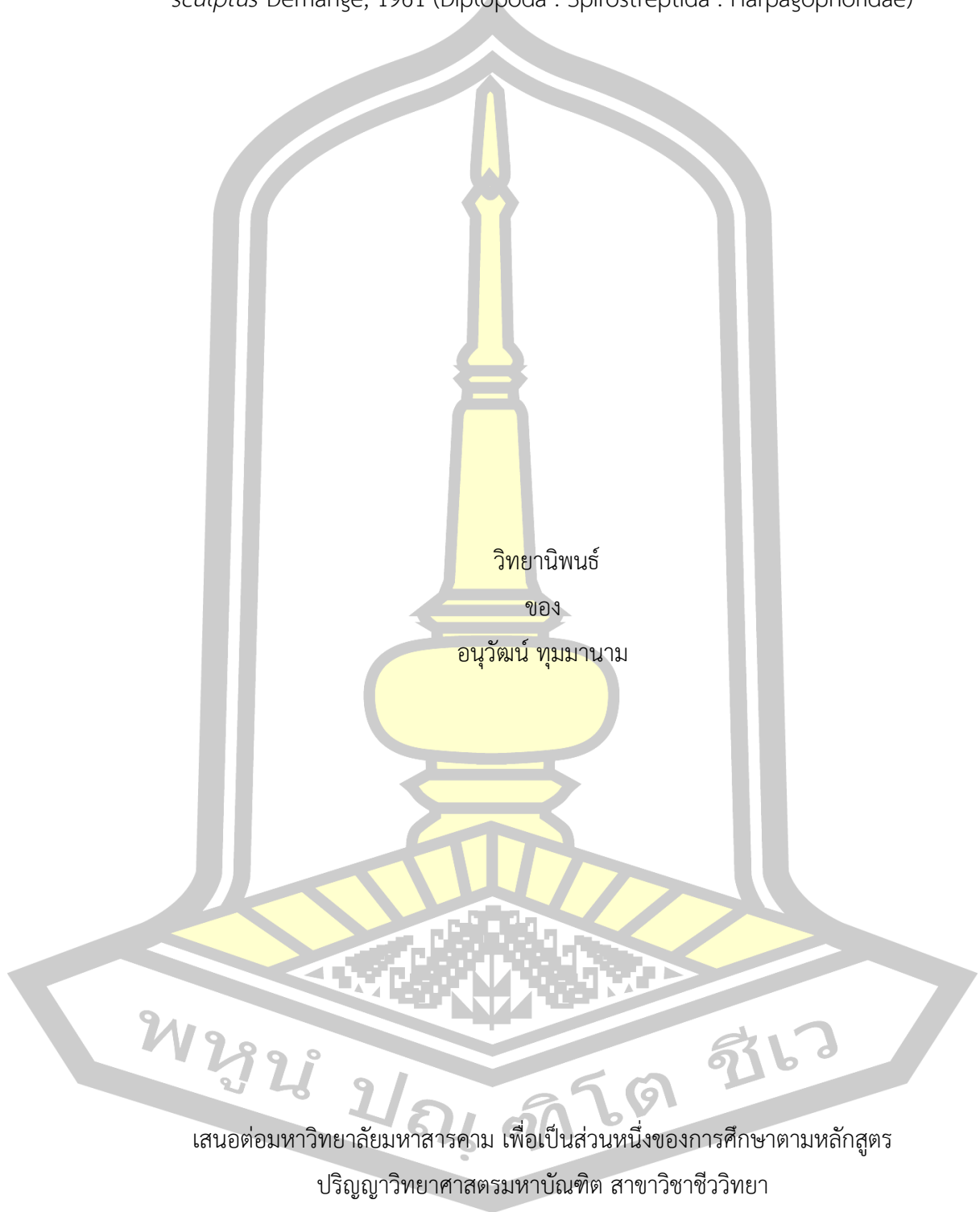
วิทยานิพนธ์
ของ
อนุวัฒน์ ทุมมานาม

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

สิงหาคม 2565

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

องค์ประกอบ และฤทธิ์การต้านจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือยักษ์ *Anurostreptus sculptus* Demange, 1961 (Diplopoda : Spirostreptida : Harpagophoridae)



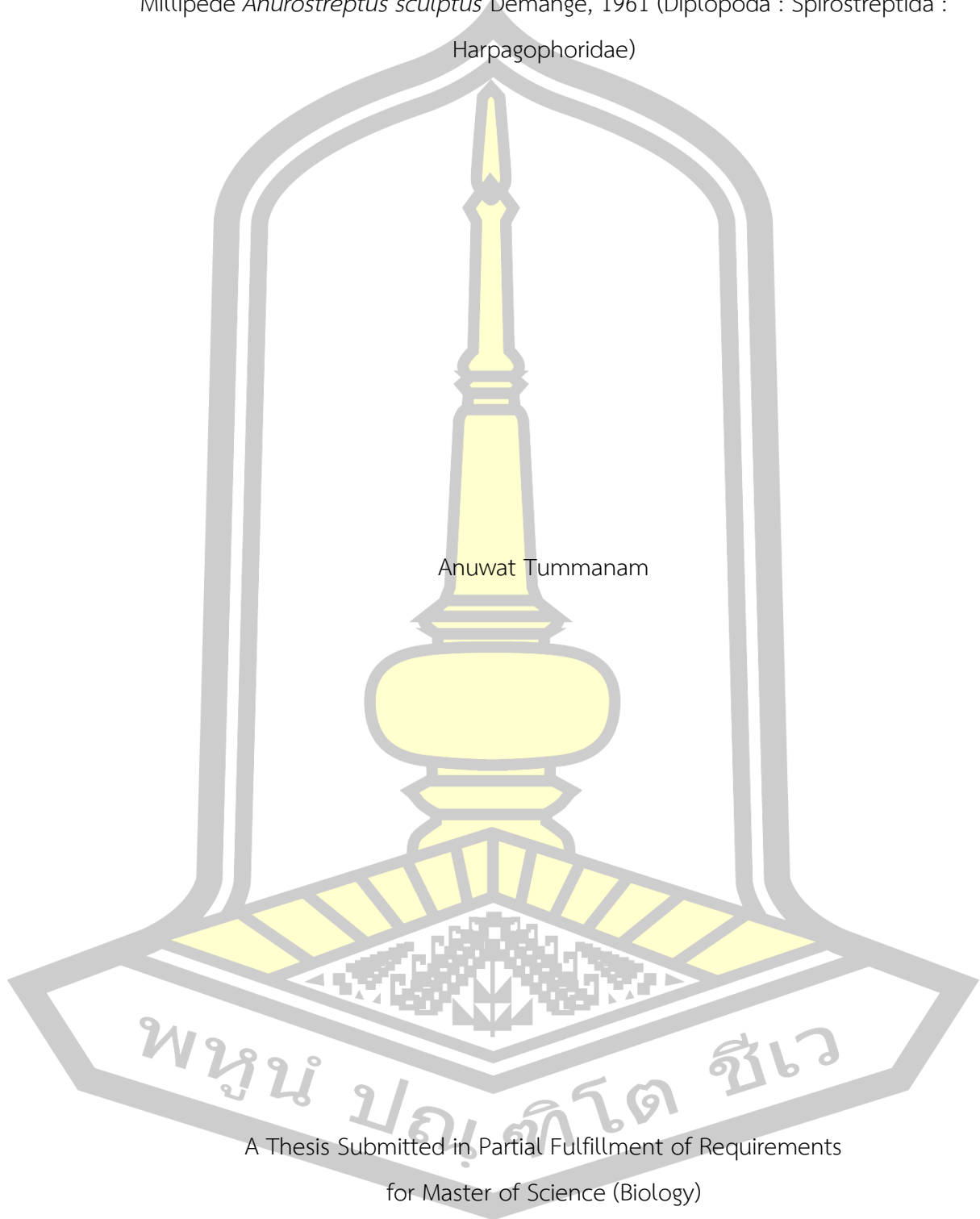
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

สิงหาคม 2565

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Composition and Antimicrobial Activity of Defensive Secretions of the Giant
Millipede *Anurostreptus sculptus* Demange, 1961 (Diplopoda : Spirostreptida :
Harpagophoridae)



Anuwat Tummanam

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Biology)

August 2022

Copyright of Maharakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนายอนุวัฒน์ ทุมมานาม
แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(รศ. ดร. ผ่องพรรณ ประสารก)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผศ. ดร. ปิยะธิดา พิมพ์วิชัย)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผศ. ดร. วราภรณ์ สุทธิสา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผศ. ดร. วิชญ รัชตเวชกุล)

กรรมการ

(ผศ. ดร. สุธีรา มณีฉาย)

กรรมการ

(ผศ. ดร. ชีรพร กทิตศาสตร์)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	องค์ประกอบ และฤทธิ์การต้านจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือยักษ์ <i>Anurostreptus sculptus</i> Demange, 1961 (Diplopoda : Spirostreptida : Harpagophoridae)		
ผู้วิจัย	อนุวัฒน์ ทุมมานาม		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะธิดา พิมพ์วิชัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ สุทธิสา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิชญ รัชตเวชกุล		
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชา	ชีววิทยา
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีที่พิมพ์	2565

บทคัดย่อ

กิ้งกือยักษ์ *Anurostreptus sculptus* จัดอยู่ในอันดับ Spirostreptida เป็นกิ้งกือในกลุ่มกิ้งกือกระบอก Superorder Juliformia ร่วมกับอันดับ Spirobolida และ Julida ที่มีสารคัดหลั่งป้องกันตัวกลุ่มเบนโซควิโนน (benzoquinone) เป็นสารประกอบหลัก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัว และฤทธิ์การต้านจุลชีพจากกิ้งกือสปีชีส์นี้ โดยสกัดสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากต่อม repugnatorial ในตัวทำลายจากความมีขี้ขี้ น้อยไปหาความมีขี้ขี้มาก ได้แก่ เฮกเซน เอทิลแอสีเทต และเมทานอล นอกจากนี้ยังทดสอบสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงที่ไม่ผ่านการสกัดด้วย องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัววิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS) พบว่าคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีสารองค์ประกอบหลัก 2 ชนิด ได้แก่ bicyclo(3.3.1)nonane-2,6-dione (58.58 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเป็นครั้งแรกที่พบในกิ้งกือ และ 2-methyl-p-benzoquinone (15.71 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเป็นสารควิโนนหลักที่พบในสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือกลุ่มกิ้งกือกระบอก ส่วนในสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลแอสีเทต และเมทานอล พบ (Z)-9-octadecenamamide เป็นองค์ประกอบหลัก การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพทำการทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวก 3 สายพันธุ์ (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus aureus* DMST20654) แบคทีเรียแกรมลบ 4 สายพันธุ์ (*Escherichia coli*, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella Typhi* ATCC16122) และยีสต์ 2 สายพันธุ์ (*Candida albicans* และ *Candida albicans* ATCC10231) การทดสอบด้วยวิธี broth microdilution พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและ *C. albicans* ได้ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.25 - 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MBC ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรม

บวก 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ส่วนสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทั้งหมด โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.002 - 0.250 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ค่า MBC สำหรับแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบอยู่ในช่วง 0.063 - 0.125 และ 0.250 - 0.500 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ตามลำดับ และค่า MFC อยู่ในช่วง 0.0039 - 0.0078 เปอร์เซ็นต์ (v/v) โดยสามารถยับยั้ง และทำลายยีสต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่ายาปฏิชีวนะฟลูโคนาโซล

คำสำคัญ : กิ่งกือกระบอก ฤทธิ์การต้านจุลชีพ สารคัดหลั่งป้องกันตัว องค์ประกอบทางเคมี



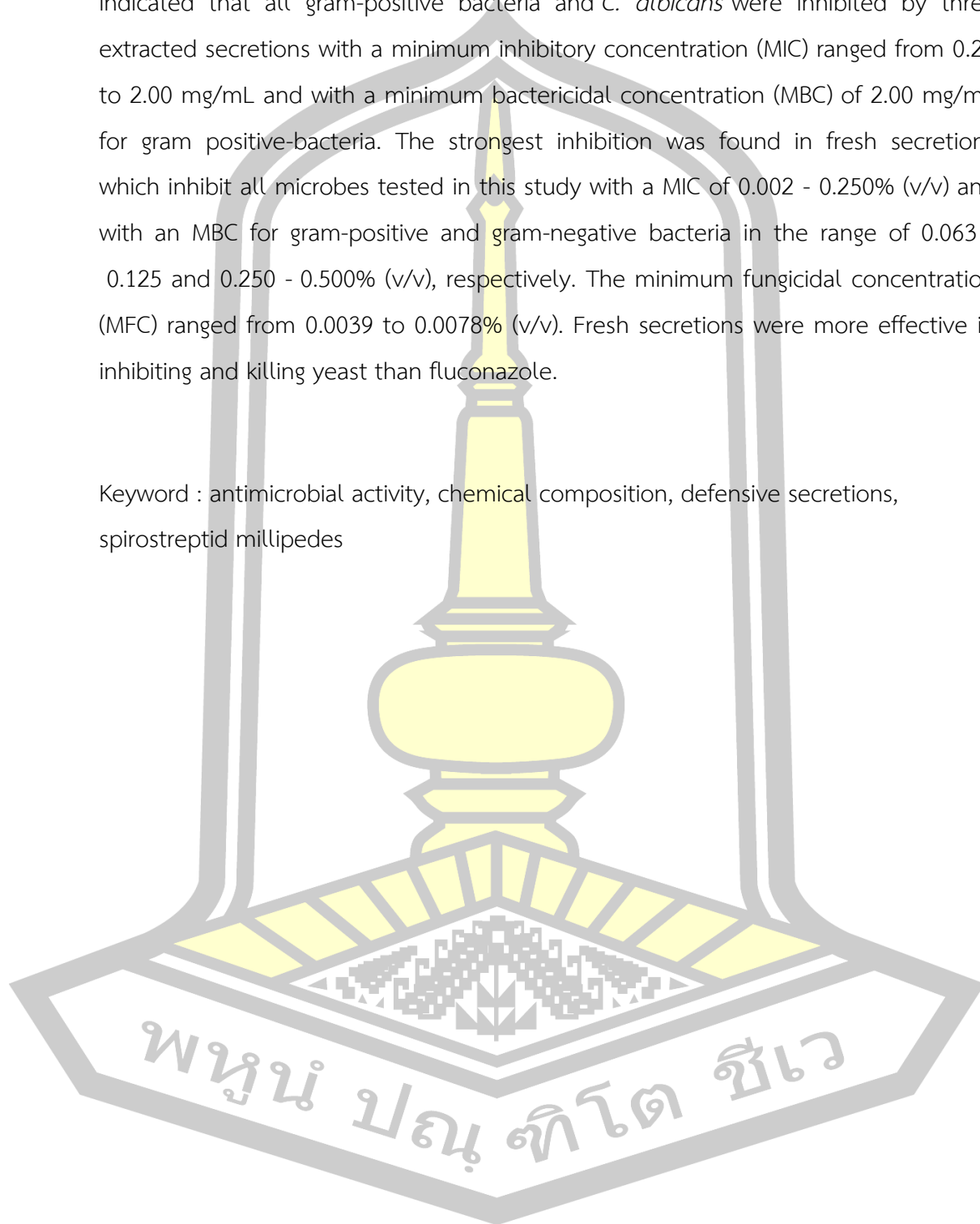
TITLE	Composition and Antimicrobial Activity of Defensive Secretions of the Giant Millipede <i>Anurostreptus sculptus</i> Demange, 1961 (Diplopoda : Spirostreptida : Harpagophoridae)		
AUTHOR	Anuwat Tummanam		
ADVISORS	Assistant Professor Piyatida Pimvichai , Ph.D. Assistant Professor Waraporn Sutthisa , Ph.D. Assistant Professor Widchaya Radchatawedchakoon , Ph.D.		
DEGREE	Master of Science	MAJOR	Biology
UNIVERSITY	Maharakham University	YEAR	2022

ABSTRACT

The defensive secretions of the giant millipede *Anurostreptus sculptus* (Diplopoda: Spirostreptida) contain benzoquinone as a major chemical component. The present work aims to further examine the chemical composition of the defensive secretions of this species and their antimicrobial activity. To this end, the repugnatorial glands were extracted by soaking the glands in different chemical solutions to increase the polarity viz., hexane, ethyl acetate, and methanol. Moreover, fresh defensive secretions derived directly from the repugnatorial glands were also tested. The chemical composition of defensive secretions was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Two main components were found in fresh secretions: 1) bicyclo(3.3.1)nonane-2,6-dione (58.58%), which was demonstrated for the first time in millipedes and 2) 2-methyl-*p*-benzoquinone (15.71%), the common benzoquinone found in juliform millipedes. The three polarizing solutions, furthermore demonstrated the presence of (*Z*)-9-octadecenamide as a major component (80.02%, 54.87% and 58.33%, respectively). Antimicrobial activity was tested with three gram-positive bacteria (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus aureus* DMST20654), four gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella Typhi* ATCC16122), and two yeast strains (*Candida*

albicans and *Candida albicans* ATCC10231). A broth microdilution technique indicated that all gram-positive bacteria and *C. albicans* were inhibited by three extracted secretions with a minimum inhibitory concentration (MIC) ranged from 0.25 to 2.00 mg/mL and with a minimum bactericidal concentration (MBC) of 2.00 mg/mL for gram positive-bacteria. The strongest inhibition was found in fresh secretions which inhibit all microbes tested in this study with a MIC of 0.002 - 0.250% (v/v) and with an MBC for gram-positive and gram-negative bacteria in the range of 0.063 - 0.125 and 0.250 - 0.500% (v/v), respectively. The minimum fungicidal concentration (MFC) ranged from 0.0039 to 0.0078% (v/v). Fresh secretions were more effective in inhibiting and killing yeast than fluconazole.

Keyword : antimicrobial activity, chemical composition, defensive secretions, spirostreptid millipedes



กิตติกรรมประกาศ

การทำงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณา และความช่วยเหลืออย่างสูงจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะธิดา พิมพ์วิชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ สุทธิสา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชญ รัชตเวชกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.ผ่องพรรณ ประสารก ก ประธานกรรมการสอบ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุธิรา มณีฉาย กรรมการสอบ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรพร กทิตศาสตร์ กรรมการสอบ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ และตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.รุ่งฤดี ทิวทอง ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณสาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา ที่เอื้อเพื่อเชื้อทดสอบ สถานที่ วัสดุ และ อุปกรณ์ ที่ใช้ในการทำวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่อำนวยความสะดวกในการเบิกอุปกรณ์ ที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณทุนพัฒนานักวิจัยรุ่นกลาง สกว. และ มมส. ของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะธิดา พิมพ์วิชัย (สัญญาเลขที่ RSA6280051) และโครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2564 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (สัญญาเลขที่ 6404003/2564)

อนุวัฒน์ ทุมมานาม

พูน ปณ ทิโต ชีเว

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญรูปภาพ.....	ท
บทที่ 1	
บทนำ.....	1
1.1 ที่มา และความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การศึกษา.....	2
1.3 ขอบเขตการศึกษา.....	2
1.5 สถานที่ดำเนินการวิจัย.....	3
1.4 ระยะเวลาดำเนินการ.....	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2	
ปริทัศน์เอกสารข้อมูล.....	5
2.1 อนุกรมวิธาน และลักษณะทั่วไปของกิ้งกือ.....	5
2.2 กิ้งกือยักษ์ <i>Anurostreptus sculptus</i> Demange, 1961.....	6
2.3 สัณฐานวิทยาของกิ้งกือ.....	8
2.4 ถิ่นที่อยู่อาศัย และการกระจาย.....	8
2.5 บทบาทในทางนิเวศวิทยา.....	9
2.6 การสืบพันธุ์และวงจรชีวิต.....	9

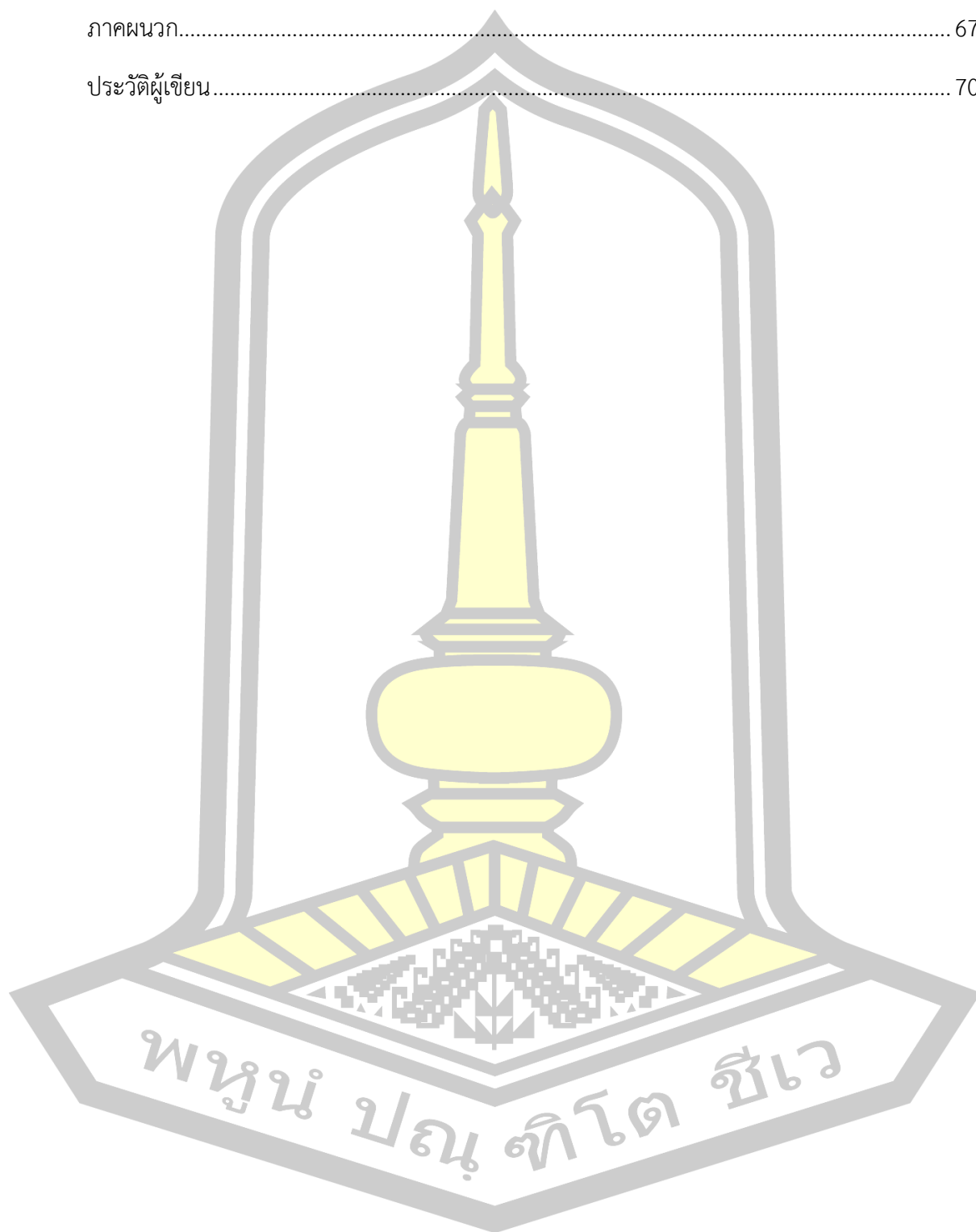
2.7 ผู้ล่า และภาวะปรสิต.....	10
2.8 หน้าที่ และความสำคัญของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือ.....	10
2.9 ต่อม repugnatorial.....	12
2.10 การหลั่งสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือ	14
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
2.11.1 การศึกษาเกี่ยวกับสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือยักษ์ในอันดับ Spirostreptida... ..	14
2.11.2 การศึกษาเกี่ยวกับสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกืออันดับอื่น ๆ.....	16
บทที่ 3	
วิธีการดำเนินการวิจัย	19
3.1 การเก็บตัวอย่างกิ้งกือ	19
3.2 การเก็บตัวอย่างสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือ	20
3.3 การสกัดสารคัดหลั่งป้องกันตัว	20
3.4 การเตรียมสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง.....	22
3.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัว.....	22
3.5.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารคัดหลั่งป้องกันตัวด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี- แมสสเปกโตรเมตรี.....	22
3.6 การเตรียมสารคัดหลั่งป้องกันตัวเพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพ	22
3.7 เชื้อจุลชีพที่ใช้ทดสอบ และการเตรียมเชื้อ.....	23
3.8 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพ	23
3.8.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของ <i>A. sculptus</i> เบื้องต้น.....	23
3.8.2 การหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ (minimum inhibitory concentration: MIC).....	24

3.7.3 ค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration: MBC) และเชื้อรา (minimum fungicidal concentration: MFC)	25
.....	
บทที่ 4	
ผลการดำเนินการวิจัย	26
.....	
4.1 ผลการสกัดสารคัดหลั่งป้องกันตัว	26
4.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือ <i>A. sculptus</i> ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี	28
4.2.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง	28
4.2.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชั้นเฮกเซน	30
4.2.3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต	32
4.2.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชั้นเมทานอล	32
4.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพ	36
4.3.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของ <i>A. sculptus</i> เบื้องต้น	36
4.3.2 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ (minimum inhibitory concentration: MIC)	45
4.3.3 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration: MBC) และเชื้อรา (minimum fungicidal concentration: MFC)	48
.....	
บทที่ 5	
สรุป และอภิปรายผลการดำเนินการวิจัย	52
5.1 การสกัดสารคัดหลั่งป้องกันตัว	52
5.2 องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือ <i>A. sculptus</i>	52
5.3 ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และสารสกัด	54
5.4 ข้อเสนอแนะ	57

บรรณานุกรม..... 58

ภาคผนวก..... 67

ประวัติผู้เขียน..... 70



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ขั้นตอน และระยะเวลาดำเนินการวิจัย.....	3
ตารางที่ 2 ปริมาณของสารที่สกัดได้ (yield) จากต่อม repugnatorial ในตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลแอสีเทต และเมทานอล.....	26
ตารางที่ 3 องค์ประกอบของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากต่อมโดยตรงที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS.....	28
ตารางที่ 4 องค์ประกอบของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่สกัดในตัวทำละลายเฮกเซนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS.....	31
ตารางที่ 5 องค์ประกอบของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่สกัดในตัวทำละลายเอทิลแอสีเทตที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS.....	32
ตารางที่ 6 องค์ประกอบของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่สกัดในตัวทำละลายเมทานอลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS.....	33
ตารางที่ 7 เปรียบเทียบชนิดของสารประกอบที่พบในสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง สารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต และสารสกัดชั้นเมทานอล	34
ตารางที่ 8 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต สารสกัดชั้นเมทานอล และสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงด้วยวิธี paper disc diffusion	38
ตารางที่ 9 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ (MIC) ของสารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต สารสกัดชั้นเมทานอล และสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง.....	46
ตารางที่ 10 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (MBC) และเชื้อรา (MFC) ของสารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต สารสกัดชั้นเมทานอล และสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง	49

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 กิ่งกือยักซ์ <i>Anurostreptus sculptus</i> Demange, 1961.....	6
ภาพที่ 2 โครงสร้างโกโนพอดของ <i>A. sculptus</i>	7
ภาพที่ 3 ต่อม repugnatorial ของ <i>A. sculptus</i>	13
ภาพที่ 4 ช่อง ozopore ที่อยู่ด้านข้างของลำตัวของ <i>A. sculptus</i>	13
ภาพที่ 5 พื้นที่เก็บตัวอย่าง	19
ภาพที่ 6 ขั้นตอนการสกัดสารจากต่อม repugnatorial.....	21
ภาพที่ 7 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวด้วยวิธี paper disc diffusion	24
ภาพที่ 8 สารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	27
ภาพที่ 9 สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง	27
ภาพที่ 10 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>B. cereus</i>	40
ภาพที่ 11 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i>	40
ภาพที่ 12 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> DMST20654	41
ภาพที่ 13 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i>	41
ภาพที่ 14 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> ATCC25922	42
ภาพที่ 15 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>P. aeruginosa</i>	42
ภาพที่ 16 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>Salmonella</i> Typhi ATCC16122	43
ภาพที่ 17 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i>	43
ภาพที่ 18 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i> ATCC10231.....	44
ภาพที่ 19 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงที่สามารถทำลายยีสต์ได้.....	51

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มา และความสำคัญ

กิ้งกือ (millipedes) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จำแนกอยู่ในไฟลัมอาร์โทรพอดา (Phylum Arthropoda) ไฟลัมย่อยไมเรียพอดา (Myriapoda) ซึ่งประกอบไปด้วย 4 ชั้น (class) ได้แก่ Pauropoda Symphyla Chilopoda และ Diplopoda โดยกิ้งกือจัดอยู่ในชั้น Diplopoda มีลักษณะเฉพาะโดดเด่นที่สามารถใช้ในการจำแนกเบื้องต้นคือ มีขา 2 คู่ต่อ 1 วงปล้องลำตัว โดยชั้น Diplopoda เป็นอาร์โทรพอดที่อาศัยอยู่บนบกที่มีความหลากหลายมากเป็นอันดับ 3 รองจากชั้น Insecta และ Arachnida ปัจจุบันมีการรายงานจำนวนชนิดของกิ้งกือ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวโมเลกุลแล้วประมาณ 12,000 สปีชีส์ และคาดว่าจะมีจำนวนมากถึง 80,000 สปีชีส์ (Golovatch & Kime, 2009; Sierwald & Bond, 2007) ในภาษาละติน คำว่า milli หมายถึง จำนวนพัน และ pede หมายถึง ขา ดังนั้นตามชื่อ millipedes จึงกล่าวกันว่ากิ้งกือเป็นสัตว์พันขา แต่โดยส่วนใหญ่จะมีประมาณ 100 - 300 ขา และในปัจจุบันกิ้งกือที่มีจำนวนขาสูงสุด 1,306 ขา คือ *Eumillipes persephone* Marek, 2021 โดยกิ้งกือถือเป็นสัตว์ที่มีจำนวนขามากที่สุดในบรรดาสัตว์บกทั้งหมด (Alagesan, 2016; Marek *et al.*, 2021)

กิ้งกือถือกำเนิด และปรากฏอยู่บนโลกมากกว่า 400 ล้านปี ยาวนานมากกว่ามนุษย์ถึง 100 เท่า และจากรายงานการพบซากดึกดำบรรพ์ (fossil) แสดงให้เห็นว่ากิ้งกือมีการกระจายไปทั่วโลก (Alagesan, 2016) ยกเว้นในเขตขั้วโลก ส่วนใหญ่พบการกระจายของกิ้งกือตามป่าเขตอบอุ่น และเขตร้อน กิ้งกือมีบทบาทที่สำคัญอย่างยิ่งในระบบนิเวศ โดยทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายเศษซากอินทรีย์ (detritivore) ร่วมกับจุลินทรีย์ให้เป็นธาตุอาหารหมุนเวียนกลับสู่ดิน จึงเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญมากกับคุณภาพของดินเช่นเดียวกับสัตว์หน้าดินชนิดอื่น ๆ โดยมูลของกิ้งกือที่ขับถ่ายออกมา มีลักษณะเป็นเม็ดคล้ายยาลูกกลอน จึงเป็นปุ๋ยอินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีธาตุอาหารครบถ้วน

นอกจากนี้หนึ่งในลักษณะที่โดดเด่นของกิ้งกือ คือการมีสีสันทึบภายนอกที่สวยงามซึ่งส่วนใหญ่เป็นสีที่ใช้เตือนภัย (warning coloration) เนื่องจากกิ้งกือมีกลไกการป้องกันตัวจากศัตรูตามธรรมชาติ ได้แก่ กลไกการป้องกันตัวขั้นปฐมภูมิ (primary mechanism) คือ การมีโครงร่างแข็งภายนอก (exoskeleton) และกลไกการป้องกันตัวขั้นทุติยภูมิ (secondary mechanism) คือ การหลั่งสารคัดหลั่งป้องกันตัว (defensive secretion) (Klem, 2017) ผ่านช่องเปิดข้างลำตัวที่เรียกว่า ozopore โดยช่องเปิดข้างลำตัวนี้มีการพบในซากดึกดำบรรพ์ของกิ้งกือจากยุคคาร์บอนิเฟอรัส (carboniferous) ซึ่งต่อมที่ผลิตสารคัดหลั่งเหล่านี้คือ ต่อม repugnatorial ต่อมนี้สามารถผลิตสารได้หลากหลายกลุ่ม เช่น ฟีนอล (phenol) แอลคาลอยด์ (alkaloid) เทอร์พีน (terpene) ควิโนน

(quinone) และสารประกอบไซยาโนเจน (cyanogenic compound) สารคัดหลั่งป้องกันตัวเหล่านี้ นอกจากใช้ป้องกันตัวจากผู้ล่าที่ส่วนใหญ่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง อาจมีหน้าที่อื่น ๆ เช่น ใช้เป็นฟีโรโมน ใช้กำจัดเชื้อจุลินทรีย์ และกำจัดปรสิตที่อาจเป็นอันตรายต่อร่างกาย (Shear, 2015; Sierwald & Bond, 2007)

อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบ และหน้าที่ของสารคัดหลั่งที่ใช้ป้องกันตัวของกิ้งกือในประเทศไทยยังมีน้อยมาก โดยเฉพาะกิ้งกือในอันดับ Spirostreptida ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกิ้งกือขนาดใหญ่ มีความหลากหลายสปีชีส์มาก โดยปัจจุบันมีรายงานการค้นพบในประเทศไทยประมาณ 64 สปีชีส์ (Enghoff, 2005; Likhitrakarn *et al.*, 2020; Pimvichai *et al.*, 2009a, 2009b, 2011a, 2011b, 2016) และการรายงานเกี่ยวกับสารคัดหลั่งที่ใช้ป้องกันตัวในอันดับนี้ยังมีน้อย งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ของสารคัดหลั่งที่ใช้ป้องกันตัวจากกิ้งกือยักษ์ *Anurostreptus sculptus* Demange, 1961 ที่จำแนกอยู่ในวงศ์ Harpagophoridae ซึ่งเป็นวงศ์ของกิ้งกือที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในประเทศไทย (ความยาวลำตัวมากกว่า 20 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางลำตัวมากกว่า 15 มิลลิเมตร) (Enghoff, 2005) มี ozopore ที่สามารถมองเห็นได้อย่างเด่นชัด และในปัจจุบันพบเขตการกระจายเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น (Pimvichai *et al.*, 2010)

1.2 วัตถุประสงค์การศึกษา

- 1.2.1 เพื่อศึกษาองค์ประกอบของสารคัดหลั่งที่ใช้ป้องกันตัวจากกิ้งกือยักษ์ *A. sculptus*
- 1.2.2 เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือยักษ์ *A. sculptus*

1.3 ขอบเขตการศึกษา

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาองค์ประกอบ และฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ที่ก่อโรคด้วยวิธี paper disc diffusion รวมทั้งทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ค่า minimum bactericidal concentration (MBC) และค่า minimum fungicidal concentration (MFC) ของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือยักษ์ *Anurostreptus sculptus* ต่อยีสต์ 2 สายพันธุ์คือ *Candida albicans* และ *Candida albicans* ATCC10231 แบคทีเรียแกรมบวก 3 สายพันธุ์คือ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus aureus* DMST20654 และแบคทีเรียแกรมลบ 4 สายพันธุ์คือ *Escherichia coli*, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella Typhi* ATCC16122

1.5 สถานที่ดำเนินการวิจัย

1.5.1 เก็บรักษาตัวอย่างกิ่งกือ ณ ห้องปฏิบัติการ SC2-304/2 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัว ณ ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล (BSL2) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1.5.2 วิเคราะห์ข้อมูลองค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1.4 ระยะเวลาดำเนินการ

ตารางที่ 1 ขั้นตอน และระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินงาน	ระยะเวลา					
	ก.ค. 2564	ส.ค. 2564	ก.ย. 2564	ต.ค. 2564	พ.ย. 2564	ธ.ค. 2564
1. ศึกษาเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	←————→					
2. เก็บตัวอย่างภาคสนาม	←————→					
3. สกัดสาร	←————→					
4. นำสารไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง GC-MS	←————→					
5. ทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพด้วยวิธี paper disc diffusion	←————→					
	ม.ค. 2565	ก.พ. 2565	มี.ค. 2565	เม.ย. 2565	พ.ค. 2565	มิ.ย. 2565
6. ทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ (MIC)	←————→					

ตารางที่ 1 ขั้นตอน และระยะเวลาดำเนินการวิจัย (ต่อ)

ขั้นตอนการดำเนินงาน	ระยะเวลา					
	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.
	2565	2565	2565	2565	2565	2565
7. ทดสอบค่าความเข้มข้น ของสารที่ต่ำที่สุดในการ ทำลายเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration: MBC) และ เชื้อรา (minimum fungicidal concentration: MFC)	↔					
8. วิเคราะห์และสรุปผลการ ทดลอง	↔					
9. เตรียมเขียนเล่ม วิทยานิพนธ์และต้นฉบับ ผลงานวิจัย	↔					

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ทราบถึงองค์ประกอบของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือยักษ์ *A. sculptus*

1.6.2 ทราบถึงฤทธิ์การต้านจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือยักษ์ *A. sculptus*

1.6.3 ทราบถึงค่า MIC ค่า MBC และค่า MFC ของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือยักษ์ *A. sculptus* ต่อเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราก่อโรค

1.6.4 เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาการนำสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์

บทที่ 2

ปริทัศน์เอกสารข้อมูล

2.1 อนุกรมวิธาน และลักษณะทั่วไปของกิ้งกือ

กิ้งกือเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งจัดจำแนกในลำดับทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Kingdom Animalia

Phylum Arthropoda

Subphylum Myriapoda

Class Diplopoda

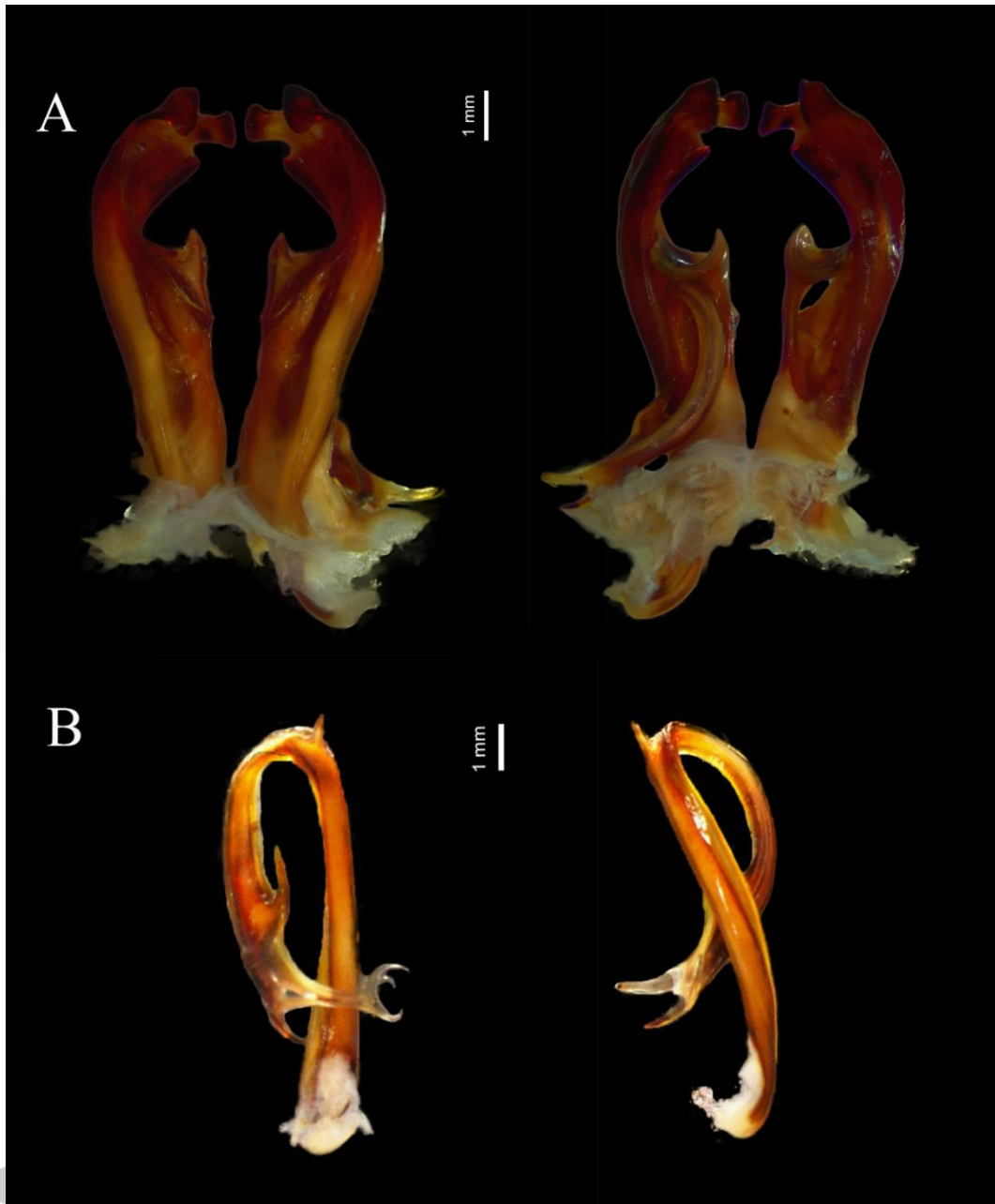
กิ้งกือเป็นสัตว์ขาข้อ (arthropods) จัดอยู่ในไฟลัมย่อยไม่เรียโปดา (Subphylum Myriapoda) ชั้น Diplopoda ร่วมกับสัตว์อีก 3 ชั้นย่อย ได้แก่ Pauropoda Symphyla และ Chilopoda โดยชั้น Diplopoda เป็นชั้นที่มีความหลากหลายมากที่สุดในไฟลัมย่อยไม่เรียโปดา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทั้ง 4 ชั้นนี้มีความคล้ายคลึงกัน ลักษณะของสัตว์ชั้น Pauropoda นั้นเป็นสัตว์ที่มีขนาดเล็กความยาวลำตัวประมาณ 0.3 - 1.7 มิลลิเมตร ตัวสีขาว ตาบอด และมีหนวดที่แตกแขนงมาก อาศัยอยู่ตามพื้นดิน ได้เศษใบไม้ ได้ท่อนไม้ (Scheller, 2004) สัตว์ในชั้น Symphylan มีความยาวไม่เกิน 10 มิลลิเมตร ลำตัวมีสีขาวหรือไม่มีสี คล้ายกับตะขาบขนาดเล็กแต่ไม่มีเขี้ยวพบได้ตามพื้นดิน ตามเศษใบไม้เช่นเดียวกัน (Burden, 2004) และชั้น Chilopoda นั้นเป็นผู้ล่าที่มีเขี้ยวพิษ (forcipule) ซึ่งเป็นรยางค์คู่แรกที่เปลี่ยนแปลงมาทำหน้าที่เฉพาะ หนวดขนาดยาว และมีขา 1 คู่ต่อ 1 ปล้องลำตัว ส่วนสัตว์ในชั้น Diplopoda หรือกิ้งกือมีลักษณะเฉพาะที่โดดเด่นที่สามารถใช้ในการจำแนกได้คือมีขา 2 คู่ต่อ 1 วงปล้องลำตัว เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า diplosegment กิ้งกือที่พบเห็นโดยส่วนใหญ่มีรูปร่างทรงกระบอกมีหลายขนาด กิ้งกือในอันดับ Glomerida และ Sphaerotheriida หรือกิ้งกือกระสุน (pill millipede) มีความสามารถในการกลิ้งโดยการม้วนตัวเป็นลูกกลมแน่น นอกจากนี้กิ้งกือยังมีบทบาทที่สำคัญในทางนิเวศวิทยา ช่วยย่อยสลายเศษซากพืชที่เน่าเปื่อย มักพบอยู่ใต้เศษใบไม้ มีความหลากหลายสปีชีส์มาก และคาดว่าจะมีจำนวนมากถึง 80,000 สปีชีส์ และมีขอบเขตการกระจายกว้าง ส่วนใหญ่พบในป่าผลัดใบเขตอบอุ่น ป่ากึ่งเขตร้อน ไปจนถึงป่าเขตร้อน (Kime & Golovatch, 2000; Sierwald & Bond, 2007; Stoev *et al.*, 2010)

2.2 กิ้งกือยักษ์ *Anurostreptus sculptus* Demange, 1961

กิ้งกือยักษ์ *Anurostreptus sculptus* Demange, 1961 จัดอยู่ในอันดับ Spirostreptida เป็นอันดับที่มีกิ้งกือกระบอกขนาดใหญ่ อยู่ในวงศ์ Harpagophoridae มีขนาดลำตัวใหญ่ที่สุดจากกิ้งกือที่พบในประเทศไทยทั้งหมด โดยมีความยาวมากกว่า 20 เซนติเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางลำตัวประมาณ 15 - 20 มิลลิเมตร (ภาพที่ 1) มีโกโนพอด (gonopod) อยู่ที่ปล้องลำตัวที่ 7 ใช้ในการสืบพันธุ์ของเพศผู้ (ภาพที่ 2) และในปัจจุบันพบเขตการกระจายเฉพาะในประเทศไทย (Enghoff, 2005; Pimvichai *et al.*, 2010)



ภาพที่ 1 กิ้งกือยักษ์ *Anurostreptus sculptus* Demange, 1961



ภาพที่ 2 โครงสร้างโกโนพอดของ *A. sculptus*

A: ด้านหน้า และด้านหลังของโกโนพอด B: ด้านหน้า และด้านหลังของ telopodite

2.3 ลักษณะวิทยาของกิ้งกือ

ลำตัวของกิ้งกือแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วนดังนี้

ส่วนหัว กิ้งกือมีหนวดอยู่ข้างหัว 1 คู่ประกอบด้วย 7 ข้อ (ยกเว้นใน Subclass Penicillata มี 8 ข้อ) บริเวณโคนหนวดมีอวัยวะที่ชื่อว่า Tömösváry organ (TO) ซึ่งเป็นอวัยวะที่ใช้รับสัมผัส แต่กิ้งกือบางกลุ่มอาจไม่พบอวัยวะนี้ ตาของกิ้งกืออยู่ข้างหัวส่วนใหญ่เป็นตาประกอบเรียกว่า ommatidia แต่ในบางชนิดอาจไม่พบอวัยวะนี้โดยเฉพาะกิ้งกือที่อาศัยอยู่ในถ้ำ ส่วนปากประกอบด้วย 2 ส่วนคือ mandible ใช้ในการบดเคี้ยว และ gnathochilarium ประกอบด้วยแผ่นแข็งที่เรียกว่า sclerite มีลักษณะเป็นเอกลักษณ์ในแต่ละอันดับ ซึ่งสามารถใช้จำแนกในระดับอันดับได้ นอกจากนี้โครงสร้าง mandible ของกิ้งกือ และตะขามีความคล้ายคลึงกันซึ่งสนับสนุนความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการที่เป็นวงศ์วานวิวัฒนาการเดี่ยว (monophyly) ของกลุ่ม myriapod

ส่วนลำตัว ลำตัวของกิ้งกือมีลักษณะเป็นวงปล้อง (body ring) โดยวงปล้องของลำตัวกิ้งกือส่วนใหญ่เกิดจากการรวม 2 วงปล้องเข้าด้วยกัน จึงทำให้มีขา 2 คู่ต่อ 1 วงปล้อง แต่ส่วนแรกที่ถัดจากส่วนหัวคือคอลัม (collum) เป็นส่วนที่ไม่มีขาพบได้ใน Pauropoda ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด (sister group) กับ Diplopoda วงปล้องที่ 2 - 4 มีขาเพียง 1 คู่ต่อ 1 วงปล้อง ขาของกิ้งกือประกอบด้วย 7 ข้อ ได้แก่ coxa, prefemur, femur, postfemur, tibia, tarsus และ claw ด้านข้างวงปล้องของกิ้งกือส่วนใหญ่จะมีรูที่ใช้ในการหลังสารคัดหลั่งป้องกันตัว เรียกว่า ozopore ส่วนท้ายสุดของลำตัวกิ้งกือคือส่วน telson ซึ่งมี preanal ring ที่ประกอบด้วย anal, valve และ subanal scale และในหลาย ๆ อันดับจะมีหนาม ที่เรียกว่า terminal spinneret พบอยู่ในส่วนท้ายของร่างกายด้วย (Sierwald & Bond, 2007 และ สมศักดิ์ ปัญญา, 2549)

2.4 ถิ่นที่อยู่อาศัย และการกระจาย

โดยส่วนใหญ่สามารถพบการกระจายของกิ้งกือได้ในป่าผลัดใบกึ่งเขตร้อน (subtropical) หรือป่าเขตร้อน (tropical) ถิ่นที่อยู่อาศัยที่พบมากที่สุดคือ บริเวณที่มีเศษซากใบไม้ทับถมกัน บริเวณชั้นต่าง ๆ ของดิน และบริเวณเศษซากต้นไม้ที่ตายแล้ว หรือผลไม้ที่ร่วงหล่น บางสปีชีส์อาศัยบนต้นไม้ เช่น *Tachypodoiulus niger* (Leach, 1814) และ *Nemasoma varicorne* C.L.Koch, 1847 (Sridhar & Ashwini, 2016) รวมไปถึงกิ้งกือยักษ์ *Anurostreptus sculptus* ด้วย กิ้งกือมังกรสกุล *Desmoxytes* Chamberlin, 1923 อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่เป็นเขาหินปูน หรือภูเขาหินแกรนิต เนื่องจากมีความจำเป็นในการใช้แคลเซียมเพื่อสร้างส่วนต่อหุ้มลำตัว และมีบางสปีชีส์ที่อาศัยอยู่บนโขดหิน (Srisonchai *et al.*, 2018) นอกจากนี้ยังพบว่ากิ้งกือสามารถอาศัยอยู่ได้หลากหลายพื้นที่หรือแม้กระทั่งในสภาพแวดล้อมที่มีความรุนแรง บางสปีชีส์สามารถพบได้ทั่วไปในทะเลทราย เช่น *Orthoporus ornatus* (Girard, 1853) ที่อาศัยอยู่ทางตอนใต้ของสหรัฐอเมริกาโดยการซ่อนตัวอยู่

ตามรอยแยกใต้ก้อนหิน กิ้งกือบางสปีชีส์ในยุโรปสามารถทนต่อการจมน้ำในฤดูหนาวได้ เช่น *Polydesmus denticulatus* C. L. Koch, 1847 ที่สามารถมีชีวิตอยู่ใต้น้ำได้ถึง 74 วัน (ในห้องปฏิบัติการ) และนอกจากนี้ยังมีรายงานการพบกิ้งกือในเขตทุนดรา (zonal tundra) คือ *Proteroiulus fuscus* (Am Stein, 1857) ซึ่งพบอยู่ทางเหนือสุดของยูเรเชีย และ *Polyxenus lagurus* (Linnaeus, 1758) ซึ่งพบอยู่บริเวณวงกลมอาร์กติก (arctic circle) เป็นต้น (Golovatch & Kime, 2009)

2.5 บทบาทในทางนิเวศวิทยา

กิ้งกือส่วนใหญ่ทำหน้าที่เป็นผู้บริโภคซากอินทรีย์ (detritivore) บทบาทหลักคือการย่อยสลายซากพืชที่ตายแล้ว (Hopkin and Read, 1992) ซึ่งช่วยกระตุ้นกิจกรรมของจุลินทรีย์เพราะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวให้จุลินทรีย์สามารถทำงานได้มากขึ้นทำให้เกิดการหมุนเวียนธาตุอาหารที่จำเป็นกลับสู่ดิน การย่อยสลายซากอินทรีย์ที่กิ้งกือบริโภคเข้าไปเกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร มูลที่กิ้งกือขับถ่ายออกมามีลักษณะเป็นก้อนกลมคล้ายลูกกลอนซึ่งประกอบด้วยสารอินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ (สมศักดิ์ ปัญหา และคณะ, 2552) บางสปีชีส์กินพืชสด และถือได้ว่าเป็นศัตรูพืช บางสปีชีส์ในอันดับ Polyzoniida และ Siphonophorida มีการดัดแปลงส่วนของปากเพื่อใช้ดูดน้ำจากพืช (โดยเฉพาะจากราก) และอาจมีการสะสมแอลคาลอยด์ไว้ในเนื้อเยื่อที่ได้จากพืชเหล่านั้น กิ้งกือในอันดับ Platydesmida บางชนิดอาจกินเชื้อราและสาหร่าย penicillata จากเปลือกไม้ บางสปีชีส์อาศัยบนต้นไม้ และในบางชนิดต้องกินมูลตัวเอง (coprophagy) เพื่อเพิ่มน้ำหนัก และเพื่อให้อยู่รอด (Sierwald & Bond, 2007)

2.6 การสืบพันธุ์และวงจรชีวิต

กิ้งกือเพศผู้กลุ่ม Helminthomorpha มีอวัยวะที่สามารถส่งถ่ายสเปิร์มโดยใช้ยางค์ในปล้องลำตัวที่ 7 ที่มีการดัดแปลงมาทำหน้าที่นี้โดยเฉพาะเรียกว่า โคโนพอด ซึ่งเป็นลักษณะที่มีความจำเพาะในแต่ละสปีชีส์ สามารถนำมาใช้จำแนกในทางอนุกรมวิธานได้ ส่วนเพศผู้กลุ่มอื่น ๆ เช่น กลุ่ม Pentazonia แม้ว่าจะมีขนาดเล็กกว่ามากแต่โคโนพอดที่บริเวณส่วนท้าย (telopod) ทำหน้าที่ส่งถ่ายสเปิร์ม และจับคู่กับเพศเมียได้เช่นเดียวกัน สเปิร์มของกิ้งกือนั้นถือเป็นลักษณะวิวัฒนาการที่เป็นเอกลักษณ์ (apomorphy) มีหลักฐานวิทยาศาสตร์ที่ค่อนข้างซับซ้อนแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตชั้นอื่น ๆ (Sierwald & Bond, 2007) ส่วนในเพศเมียอวัยวะเพศเรียกว่า cyphopods และจะมีท่อนำไข่เปิดผ่านช่องบริเวณด้านหลังขาคู่ที่ 2 กิ้งกือสามารถสืบพันธุ์ได้ตั้งแต่อายุ 1 ปี เมื่อผสมพันธุ์ตัวผู้และตัวเมียจะม้วนรัดกันเป็นเกลียว จากนั้นกิ้งกือจะวางไข่ในดินในรูปแบบที่แตกต่างกัน และจำนวนของไข่ก็แตกต่างกันเช่นเดียวกัน โดยมีจำนวนตั้งแต่ 3 ถึง 4 ฟองไปจนถึง 2,000 ฟอง โดยทั่วไปแล้วไข่ของกิ้งกือจะมีสีเหลือง และมีคุณค่าทางโภชนาการในการเลี้ยงดูลูกจนกว่าจะเกิดการลอกคราบครั้งที่สอง

เนื่องจากลูกกิ้งกือจำนวนมากยังคงอยู่ในเปลือกไข่ และจะไม่กินอาหารจนกว่าจะถึงเวลาที่เหมาะสม ในอันดับ Platydesmida ตัวผู้จะทำหน้าที่ปกป้องไข่ แรกฟักลูกกิ้งกือจะไม่มีขาแต่จะมีการพัฒนา และสร้างวงปล้องลำตัวจากการลอกคราบในแต่ละครั้ง ลูกกิ้งกือจะมีสีอ่อนกว่าตัวเต็มวัย และใช้เวลานาน 12 เดือนจึงจะโตเต็มวัย โดยขั้นตอนการลอกคราบของกิ้งกือใช้เวลานานถึง 3 สัปดาห์ระหว่างนั้นจะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (Alagesan, 2016)

2.7 ผู้ล่า และภาวะปรสิต

กิ้งกือมีผู้ล่า และปรสิตจำนวนมากโดยเฉพาะไร ส่วนรายงานเกี่ยวกับผู้ล่าของกิ้งกือในปัจจุบันยังมีน้อยมาก แต่วิวัฒนาการของการหลั่งสารคัดหลั่งป้องกันตัว การมีสีเตือนภัย (aposematic coloration) ในกิ้งกือกลุ่มต่าง ๆ และการมีต่อมที่สามารถสร้างสารคัดหลั่งป้องกันตัวได้ในบางสปีชีส์เป็นการบ่งบอกถึงการมีอยู่ของผู้ล่า

สัตว์หลายชนิด เช่น ตัวงู สัตว์เลื้อยคลาน นก แมงมุม สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (กบ) และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่าง ๆ มีการล่ากิ้งกือเป็นอาหาร Weldon *et al.*, (2006) รายงานว่าโคอาทิ (Coati) ล่ากิ้งกือขนาดใหญ่โดยการถูกิ้งกือกับพื้นเพื่อทำลายสารคิวโนนที่กิ้งกือหลั่งออกมา พังพอนสามารถเหวี่ยงกิ้งกือผ่านขาหลังแล้วทุบกิ้งกือกับหินหรือพื้นแข็งเพื่อกินเป็นอาหาร กลุ่มแมลงก็สามารถล่ากิ้งกือได้เช่นเดียวกันเช่น มดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้สกุล *Probolomyrmex* เป็นมดที่มีความสามารถในการล่ากิ้งกืออันดับ Polyxenida มวนพิษฆาต (assassin bug) *Lepidocoris elegans* ในแอฟริกาได้ล่ากิ้งกือที่มีขนาดใหญ่กว่า ได้แก่กิ้งกือในวงศ์ Spirostreptidae นอกจากนี้กิ้งกือยังเป็นโฮสต์ของปรสิตชนิดต่าง ๆ โดยพบพวกหนอนตัวกลมมากที่สุด แมลงวันในวงศ์ Phaeomyiidae ดำรงชีวิตกึ่งปรสิต (parasitoids) เชื้อรา *Trichomyces* เป็น symbiotrophic fungi ในลำไส้กิ้งกือมักพบในทางเดินอาหารส่วนท้าย กิ้งกืออันดับ Julida บางสปีชีส์ได้รับผลกระทบจาก *Laboulbeniales* ซึ่งเป็นเชื้อราปรสิตภายนอกลำตัว นอกจากนี้กิ้งกือยังเป็นโฮสต์ตัวกลางของ *Macracanthorhynchus ingens* (Acanthocephala) ซึ่งพบในแรคคูนตัวเต็มวัย ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าแรคคูนอาจเป็นนักล่าตามธรรมชาติของกิ้งกือ (Alagesan, 2016; Sierwald & Bond, 2007)

2.8 หน้าที่ และความสำคัญของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือ

สีเตือนภัยเป็นสิ่งแรกในการป้องกันตัวของกิ้งกือเพื่อเตือนผู้ล่าเกี่ยวกับการมีอยู่ของสารคัดหลั่งที่ใช้ป้องกันตัว วิธีการป้องกันตัวในลำดับถัดมาคือ การม้วนตัวเพื่อช่วยปกป้องส่วนที่อ่อนนุ่มของลำตัวโดยเฉพาะบริเวณส่วนหัวและส่วนท้ายสุดของลำตัว และการหลั่งสารเคมีที่ก่อให้เกิดการระคายเคืองเมื่อการป้องกันตัวด้วยการม้วนไม่เป็นผล (Stanković *et al.*, 2016) กิ้งกือจะหลั่งสารคัดหลั่งจากต่อม repugnatorial (ภาพที่ 3) ผ่านช่อง ozopore (ภาพที่ 4) ที่อยู่ด้านข้างของลำตัว ยกเว้น

กิ้งกือใน 5 อันดับที่ไม่พบต่อมนี้ ได้แก่ Polyxenida, Sphaerotheriida, Glomeridesmida, Chordeumatida และ Siphoniulida สารคัดหลั่งนี้มีความเป็นพิษต่อแมลง และสัตว์เลื้อยคลานด้วย น้ำมัน ประกอบด้วยสารเคมีที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ ฟีนอล แอลคาลอยด์ เทอร์พีน เบนโซควิโนน ไฮโดรควิโนน สารประกอบไซยาโนเจน สารประกอบอะลิฟาติก (aliphatic compound) เอสเทอร์ ของกรดไขมัน (fatty acid ester) และสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกที่ประกอบด้วยอะตอมของ ไนโตรเจน (heterocyclic nitrogen-containing compounds) แต่ยังมีกิ้งกือบางกลุ่มที่ไม่มี อันตรายคือ กิ้งกือในอันดับ Polyxenida เพราะไม่มีต่อม repugnatorial แต่มีขนเดือยแข็งที่สามารถ ใช้ป้องกันผู้ล่าได้ นอกจากนี้มีการศึกษาที่ยืนยันว่ากลิ่นที่เกิดขึ้นจากสารประกอบเหล่านี้ใช้เพื่อป้องกัน และขับไล่ผู้ล่าที่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง มีความเป็นพิษต่อเชื้อรา แบคทีเรีย และพวกหนอนตัวกลม อย่างไรก็ตามสัตว์เลื้อยคลานด้วยน้ำมันบางสปีชีส์ เช่น ลิงคาปูชิน และสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ ใช้สาร คัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือเพื่อป้องกันยุงและเห็บ นอกจากนี้การขับถ่ายของกิ้งกือกลุ่ม juliform ที่มีควิโนนปนอยู่สามารถดึงดูดตัวและแมลงบางชนิดได้ (Shear, 2015; Sierwald & Bond, 2007)

นอกจากการมีสารคัดหลั่งเพื่อใช้ป้องกันและขับไล่ผู้ล่าแล้ว สารคัดหลั่งยังอาจมีหน้าที่อื่น ๆ โดย Shear, (2015) รายงานไว้ดังนี้

1. เป็นสารต้านจุลชีพ สารควิโนนและไฮโดรควิโนนมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ฟีนอลเป็นหนึ่งในสารกลุ่มแรกที่ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อและน้ำยาฆ่าเชื้อ เนื่องจากกิ้งกือส่วนใหญ่อาศัยอยู่ตามพื้นดินซึ่งมีแบคทีเรียและเชื้อราอยู่มาก ดังนั้นคุณสมบัติในการต้านจุลชีพของสารคัดหลั่งจึงมีความสำคัญต่อกิ้งกือ อย่างไรก็ตามสารคัดหลั่งป้องกันตัวจะหลั่งออกมาเพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่คุกคาม แต่ไม่ได้หลั่งออกมาอยู่ตลอดเวลา จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าสารคัดหลั่งป้องกันตัวมีไว้เพื่อใช้ในการต้านจุลชีพหรือไม่
2. ใช้ป้องกันปรสิต กิ้งกือเป็นโฮสต์ของไร และมีรายงานว่าสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือ *Narceus annularis* (Rafinesque, 1820) สามารถใช้ฆ่าไรที่เป็นปรสิตได้
3. เป็นฟีโรโมน (pheromone) มีข้อสังเกตว่าสารคัดหลั่งป้องกันตัวอาจใช้เป็นฟีโรโมน แต่เป็นการหลั่งสารคัดหลั่งจากกิ้งกือเพศเมียเพื่อส่งสัญญาณถึงความไม่พร้อมในการสืบพันธุ์ในกิ้งกือ *Niponia nodulosa* Verhoeff, 1931 ซึ่งเป็นกิ้งกือกลุ่ม polydesmidan ไม่มีสารไซยาโนเจน แต่จะหลั่งสาร geosmin และ 1-octen-3-ol ซึ่งพบว่าเป็นสารที่ไม่สามารถไล่แมดได้ และอาจทำหน้าที่เป็นฟีโรโมนเตือนภัยได้ (alarm pheromone)

2.9 ต่อม repugnatorial

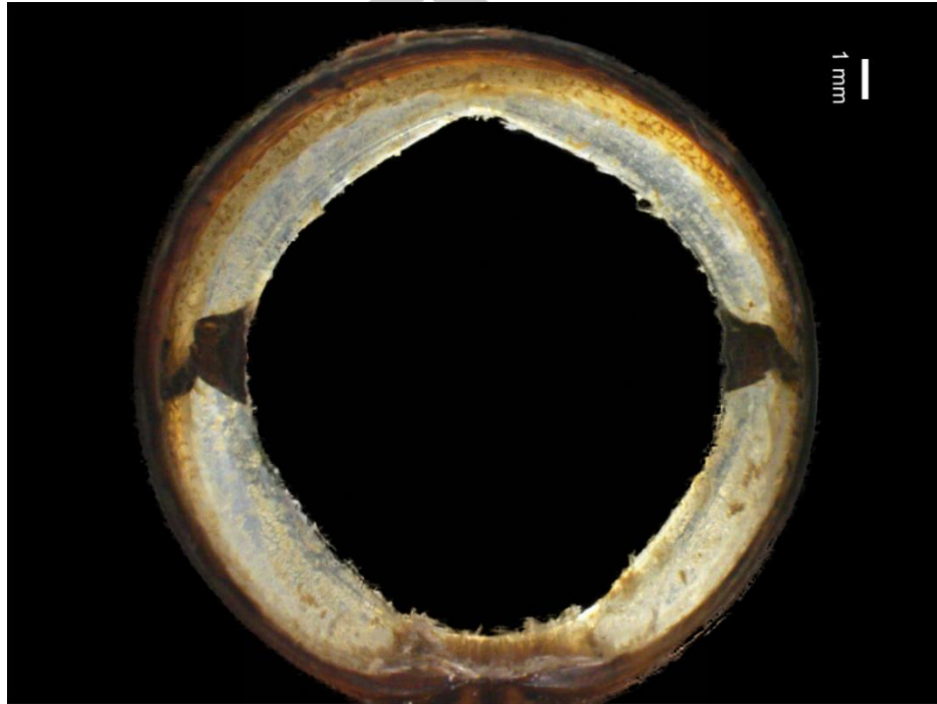
ต่อม repugnatorial ของกิ้งกือเป็นต่อมที่มีลักษณะคล้ายกับถุงที่เกิดจากการบุ่ม (invagination) ของผิวหนังลำตัว รวมทั้งเชื่อมต่อกับมีช่องเปิดออกทางผิวของลำตัว ภายในต่อมมีเซลล์ที่สามารถผลิตสารคัดหลั่งที่มีความหลากหลาย และสามารถหลั่งออกมาผ่าน ozopore เมื่อเจอกับผู้ล่า หรือภัยคุกคาม โดย Eisner *et al.*, (1978) ได้แบ่งต่อม repugnatorial ออกเป็น 3 ประเภทดังนี้

ประเภทที่ 1 พบเฉพาะกิ้งกือกระสุนในอันดับ Glomerida โดยมีต่อมอยู่ตามแนวขวางของปล้องลำตัว มีช่องเปิดอยู่บริเวณรอยต่อวงปล้อง ด้านกลางหลังลำตัวของปล้องที่ 4 - 11 เช่น ในกิ้งกือ *Glomeris marginata* (Villers, 1789) ต่อมประกอบด้วยแขนงยาวสองข้าง และมีจุดร่วมบริเวณช่องเปิดด้านกลางหลังลำตัว ต่อมแต่ละข้างจะถูกห่อหุ้มด้วยกล้ามเนื้อบาง ๆ ซึ่งคาดว่าสารคัดหลั่งป้องกันตัวจะถูกขับออกมาโดยการหดตัวของกล้ามเนื้อรอบ ๆ บริเวณต่อม

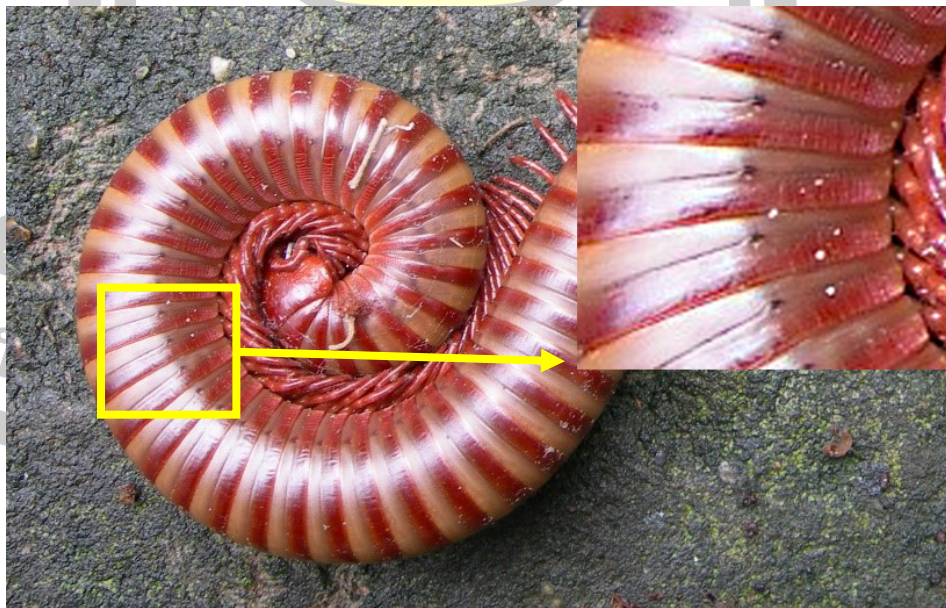
ประเภทที่ 2 พบในกิ้งกืออันดับ Spirostreptida, Spirobolida, Julida, Polyzoniida, Callipodida และ Platydesmida ต่อมจะอยู่เป็นคู่มิช่องเปิดออกทางด้านข้างของลำตัว และในบางอันดับจะมีช่องเปิดเริ่มตั้งแต่ช่วงปล้องที่ 5 หรือ 6 ต่อมประกอบด้วยชั้นบาง ๆ ของเยื่อบุคิวติเคิล (cuticle) ที่เรียงอยู่ด้านในของวงปล้อง ซึ่งบ่งบอกได้ว่าต่อมเกิดจากการบุ่มของผิวหนังลำตัว ต่อมส่วนใหญ่มีรูปร่างครึ่งวงกลม (ภาพที่ 3) แต่มีลักษณะยาวในกลุ่ม polyzoniid และจะแคบในกลุ่ม platydesmid ถัดจากต่อมจะมีท่อแคบ ๆ ที่เปิดออกสู่ ozopore โดยภายในท่อมมีลิ้นวาล์ว (pluglike valve) ซึ่งถูกควบคุมโดยกล้ามเนื้อที่ยึดติดกับชั้นคิวติเคิลของปล้องลำตัว ต่อมไม่ได้ถูกควบคุมจากกล้ามเนื้อโดยตรง แต่การหลั่งสารเกิดจากการซึมผ่านเมื่อลิ้นวาล์วเปิดออก หรือการเบ่งซึ่งเห็นได้ชัดจากการหดตัวของกล้ามเนื้อที่อยู่ระหว่างวงปล้อง

ประเภทที่ 3 พบเฉพาะกิ้งกือตะเข็บอันดับ Polydesmida ต่อมมีการกระจายตามวงปล้องแบบไม่ต่อเนื่อง พบมากที่สุดในช่วงปล้องที่ 5, 7, 9, 10, 12, 13 และ 15 ถึง 19 (ปกติลำตัวของกิ้งกือ polydesmidan มี 20 วงปล้องรวมถึงส่วนคอลลัม และส่วนท้ายลำตัวที่ไม่มีขา) ภายในต่อมประกอบด้วยถุงเยื่อขนาดใหญ่คล้ายกับประเภทที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยไซยาโนเฟอร์ (cyanophore) (โดยปกติจะเป็น mandelonitrile หรือ benzoyl cyanamide) มีท่อขนาดสั้นเชื่อมต่อกับต่อม หรือที่สะสมสาร (reservoir) ไปยังอีกถุงที่เรียกว่า vestibule ระหว่างที่สะสมสาร กับ vestibule จะมีลิ้นวาล์วกันอยู่คล้ายกับที่อยู่ใกล้ ozopore ในประเภทที่ 2 ดังนั้นการหลั่งสารคัดหลั่งป้องกันตัวจึงขึ้นอยู่กับลิ้นวาล์วบริเวณนี้โดย ozopore จะเปิดอยู่ตลอดเวลา ลิ้นวาล์วนี้จะช่วยให้สารตั้งต้นจากที่สะสมสารหลั่งเข้าสู่ vestibule จากนั้นเซลล์ที่อยู่บริเวณรอบ ๆ จะปล่อยเอนไซม์ที่กระตุ้นการแยกตัวของ mandelonitrile benzaldehyde และ hydrogen cyanide Eisner *et al.*, (1978) ได้

ตั้งสมมติฐานว่าเป็นการพัฒนาจากรูปแบบที่ 2 โดยเกิดจากการบวมของส่วน ozopore ทำให้ส่วน
ลิ้นวาล์วเข้าไปอยู่ด้านใน



ภาพที่ 3 ต่อม repugnatorial ของ *A. sculptus*



ภาพที่ 4 ช่อง ozopore ที่อยู่ด้านข้างของลำตัวของ *A. sculptus*

2.10 การหลั่งสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ่งกือ

Shear, (2015) ได้รายงานไว้ดังนี้

1. กิ่งกือกลุ่ม glomeridan (ต่อม repugnatorial ประเภทที่ 1) ส่วนใหญ่หลั่งสารกลุ่ม quinazolinone alkaloid ได้แก่ glomerin และ homoglomerin ผ่านออกมาทาง ozopore โดยการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ห่อหุ้มต่อม และไหลออกมาเป็นหยดอยู่ตามผิวลำตัวของกิ่งกือด้านหลัง ปริมาณของสารที่หลั่งออกมาเมื่อเทียบกับน้ำหนักตัวมีค่าประมาณ 0.15 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้กิ่งกือยังใช้เวลาในการผลิตสารคัดหลั่งนานประมาณถึง 4 เดือน แสดงให้เห็นว่ากิ่งกือมีความสามารถในการหลั่งสารคัดหลั่งป้องกันตัวได้น้อยมากในรอบปี

2. กิ่งกือกลุ่ม juliform (ต่อม repugnatorial ประเภทที่ 2) ส่วนใหญ่หลั่งสารกลุ่มฟีนอล เบนโซควิโนน ไฮโดรควิโนน กรดไขมันของเอสเทอร์ และสารประกอบอะลิฟาติกอื่น ๆ ผ่านทาง ozopore โดยการซึมผ่านและกระจายออกมาจนทั่วผิวลำตัวของกิ่งกือ หรือมีการพ่นออกอย่างรวดเร็วคล้ายสเปรย์ การหลั่งสารคัดหลั่งโดยการพ่นแบบสเปรย์พบเฉพาะในกิ่งกือที่มีขนาดใหญ่ 2 อันดับคือ Spirobolida และ Spirostreptida สารคัดหลั่งนี้มีการกระจายได้ถึง 50 เซนติเมตร ซึ่งคาดว่าเกิดจากความดันที่เพิ่มมากขึ้นของ haemolymph หรือความดันจากกล้ามเนื้อบริเวณใกล้เคียง เนื่องจากบริเวณรอบต่อม repugnatorial ของกิ่งกือเหล่านี้ไม่พบกล้ามเนื้อ โดยกิ่งกือขนาดใหญ่ทั้งสองอันดับนี้อาจมีสารเบนโซควิโนนได้มากถึง 200 - 300 มิลลิกรัม แต่กิ่งกือขนาดเล็กมีเพียง 1 มิลลิกรัมเท่านั้น

3. กิ่งกือกลุ่ม polydesmidan (ต่อม repugnatorial ประเภทที่ 3) ส่วนใหญ่หลั่งสารกลุ่มไซยาโนเจน ฟีนอล และสารประกอบอะลิฟาติกอื่น ๆ ผ่านทาง ozopore หลังจากผ่านการกระตุ้นโดยเอนไซม์บริเวณ vestibule ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น การผสมระหว่าง mandelonitrile หรือ benzoyl cyanamide กับเอนไซม์จะทำให้เกิดไฮโดรเจนไซยาไนด์ กับเบนซาลดีไฮด์ (benzaldehyde) หรือกรดเบนโซอิก (benzoic acid) ได้นานถึง 30 นาที แต่ก็มีรายงานว่ากิ่งกือ polydesmidan จากประเทศญี่ปุ่นบางสปีชีส์ไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ในการผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ จาก benzoyl cyanamide

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.11.1 การศึกษาเกี่ยวกับสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ่งกือยักษ์ในอันดับ Spirostreptida

Attygalle *et al.*, (1993) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวในกิ่งกือ *Floridobolus penneri* Causey, 1957 พบว่ามีองค์ประกอบหลัก 2 ชนิดคือ 2-methyl-1,4-benzoquinone และ 2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone คิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ และ

สารประกอบอีก 4 ชนิดคือ 2,3-dimethoxy-1,4-benzoquinone, 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone, 2,5-dimethyl-3-methoxy-1,4-benzoquinone และ 2-hydroxy-3-methyl-1,4-benzoquinone

Williams *et al.*, (1997) ได้รายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือ *Orthoporus antillanus* (Pocock, 1894) จากประเทศจาเมกา พบสารเบนโซควิโนนทั้งหมด 6 ชนิด มีสาร 2 ชนิดที่พบมาก ได้แก่ 2-methyl-1,4-benzoquinones และ 2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone คิดเป็น 96 เปอร์เซ็นต์ และเบนโซควิโนนที่พบอีก 4 ชนิด ได้แก่ 2,5-dimethyl-3-methoxy-1,4-benzoquinone, 2-hydroxy-3-methyl-1,4-benzoquinone, 2-3-dimethoxy-1,4-benzoquinone และ 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในคนพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Fonsecaea pedrosoi* ได้มากที่สุด รองลงมาได้แก่ยีสต์ *Candida albicans* และ *Microsporium gypseum* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 6.0, 30.0 และ 78.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืช *Fusarium oxysporum* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช *Xanthomonas campestris* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 15.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อหนอนตัวกลม *Strongyloides stercoralis* และ *Rotylenchus reniformis* โดยมีค่า LD₅₀ เท่ากับ 20.0 และ 28.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Deml & Huth, (2000) ได้รายงานถึงสารเบนโซควิโนน และไฮโดรควิโนนซึ่งเป็นสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือเขตร้อนในอันดับ Spirostreptida สองสปีชีส์คือ *Telodeinopus aoutii* (Demange, 1971) วงศ์ Spirostreptidae จากแอฟริกา และอีกหนึ่งสปีชีส์ในวงศ์ Harpagophoridae จากประเทศไทย พบสารที่สำคัญในสองสปีชีส์คือ 2-methoxy-3-methylbenzoquinone toluquinone และ toluhydroquinone เนื่องจากทั้งสองสปีชีส์อาศัยอยู่ในทวีปและระบบนิเวศที่แตกต่างกัน จึงแสดงให้เห็นว่าทั้งสองสปีชีส์อาจมีการเผชิญกับผู้ล่าที่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังที่คล้ายคลึงกันเพราะมีขนาดตัวที่ใหญ่

Valderrama *et al.*, (2000) ได้รายงานถึงลิงคาปูชิน (capuchin monkey) ที่ใช้สารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือ *Orthoporus dorsovittatus* (Verhoeff, 1938) ทาตัวเพื่อป้องกันแมลง ซึ่งการวิเคราะห์ทางเคมีพบสารเบนโซควิโนน 2 ชนิด ได้แก่ 2-methyl-1,4-benzoquinone และ 2-methyl-3-methoxy-1,4 benzoquinone

Rodriguez *et al.*, (2018) ได้รายงานเกี่ยวกับวิวัฒนาการของโครงสร้างของสารคัดหลั่งป้องกันตัวในกิ้งกือ พบว่าสารคัดหลั่งชนิดแรกที่กิ้งกือสร้างขึ้นในช่วงยุคไซลูเรียน (Silurian) อาจเป็นสารกลุ่มฟีนอล ซึ่งพบร่วมกันใน 6 อันดับได้แก่ Callipodida, Spirobolida, Spirostreptida, Julida, Stemmiulida และ Polydesmida และการสร้างสารกลุ่มเบนโซควิโนนอาจเกิดขึ้นในภายหลัง โดยกิ้งกือกลุ่ม Juliform สามารถสร้างสารคัดหลั่งเบนโซควิโนนที่มีโครงสร้างซับซ้อนมากที่สุด และยังสร้างสารที่ไม่ใช่ควิโนน เช่น เอสเทอร์ของกรดไขมัน และสารประกอบอะลิฟาติก นอกจากนี้ยังรายงานว่าพบสารเอทิลเบนโซควิโนน (ethyl-benzoquinone) ในวงศ์ Julidae, Rhinocricidae และ Spirostreptidae ซึ่งเป็นวงศ์ที่มีโครงสร้างของสารคัดหลั่งป้องกันตัวซับซ้อนมากที่สุด

2.11.2 การศึกษาเกี่ยวกับสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกืออันดับอื่น ๆ

Wood *et al.*, (2000) ได้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารแอลคาลอยด์กลุ่มใหม่จากสารคัดหลั่งป้องกันตัว ของกิ้งกือ *Buzonium crassipes* Cook & Loomis, 1928 โดยการวิเคราะห์ GC-MS พบว่ามีสารประกอบ 3 ชนิดได้แก่ β -pinene (35 เปอร์เซ็นต์) limonene (6 เปอร์เซ็นต์) และแอลคาลอยด์ชนิดใหม่คือ buzonamine (59 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันผู้ล่ากับมด *Formica obscuripes* Forel, 1886 ที่ทำรัง และอาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกับกิ้งกือ โดยการใส่สารคัดหลั่งป้องกันตัวเหล่านี้ลงไปบนหนอน *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 พบว่ามดจะใช้เวลาเพิ่มขึ้นในการโจมตี และลากหนอนเข้าไปภายในรัง นอกจากนี้ยังรายงานว่ากิ้งกือที่มีน้ำหนัก 150 มิลลิกรัม สามารถสร้างสารคัดหลั่งป้องกันตัวได้ประมาณ 4 มิลลิกรัม

Vujisic *et al.*, (2014) ได้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือในวงศ์ Blaniulidae พบว่าสารคัดหลั่งป้องกันตัว ของ *Nopoiulus kochii* (Gervais, 1847) และ *Cibiniulus phlepsii* (Verhoeff, 1897) เป็นสารผสมของเบนโซควิโนน ไฮโดรควิโนน และกรดโอเลอิกซึ่งพบครั้งแรกในสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือ สารประกอบสำคัญที่พบได้ทั้งสองสปีชีส์คือ 2-methyl-1,4-benzoquinone (toluquinone) สารประกอบที่พบรองลงมาของ *N. kochii* คือ 2-methyl-3,4-(methylenedioxy)phenol และสารประกอบที่พบรองลงมาของ *C. phlepsii* คือ 2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone

Stanković *et al.*, (2016) ได้ศึกษาองค์ประกอบ และฤทธิ์ในการต้านจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจาก *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881) ซึ่งเป็นกิ้งกือที่มีขนาดใหญ่ อยู่ในวงศ์ Julidae และอันดับ Julida พบสารประกอบ 44 ชนิด ทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มของควิโนน และเอสเทอร์ของกรดไขมัน โดยมีสัดส่วนของสารควิโนนต่อสารที่ไม่ใช่ควิโนนคือ 94.7 ต่อ 5.3 เปอร์เซ็นต์ ในเพศผู้

และ 87.3 ต่อ 12.7 เปอร์เซ็นต์ ในเพศเมีย และพบควิโนนสองชนิดที่โดดเด่นคือ 2-methyl-1,4-benzoquinone และ 2-methoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญ และทำลายเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ *Listeria monocytogenes* 1/2a ได้มากที่สุดโดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.20 และ 0.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญ และทำลายเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้มากที่สุดโดยมีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 0.10 และ 0.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ และทำลายเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคได้มากกว่ายาปฏิชีวนะ fluconazole

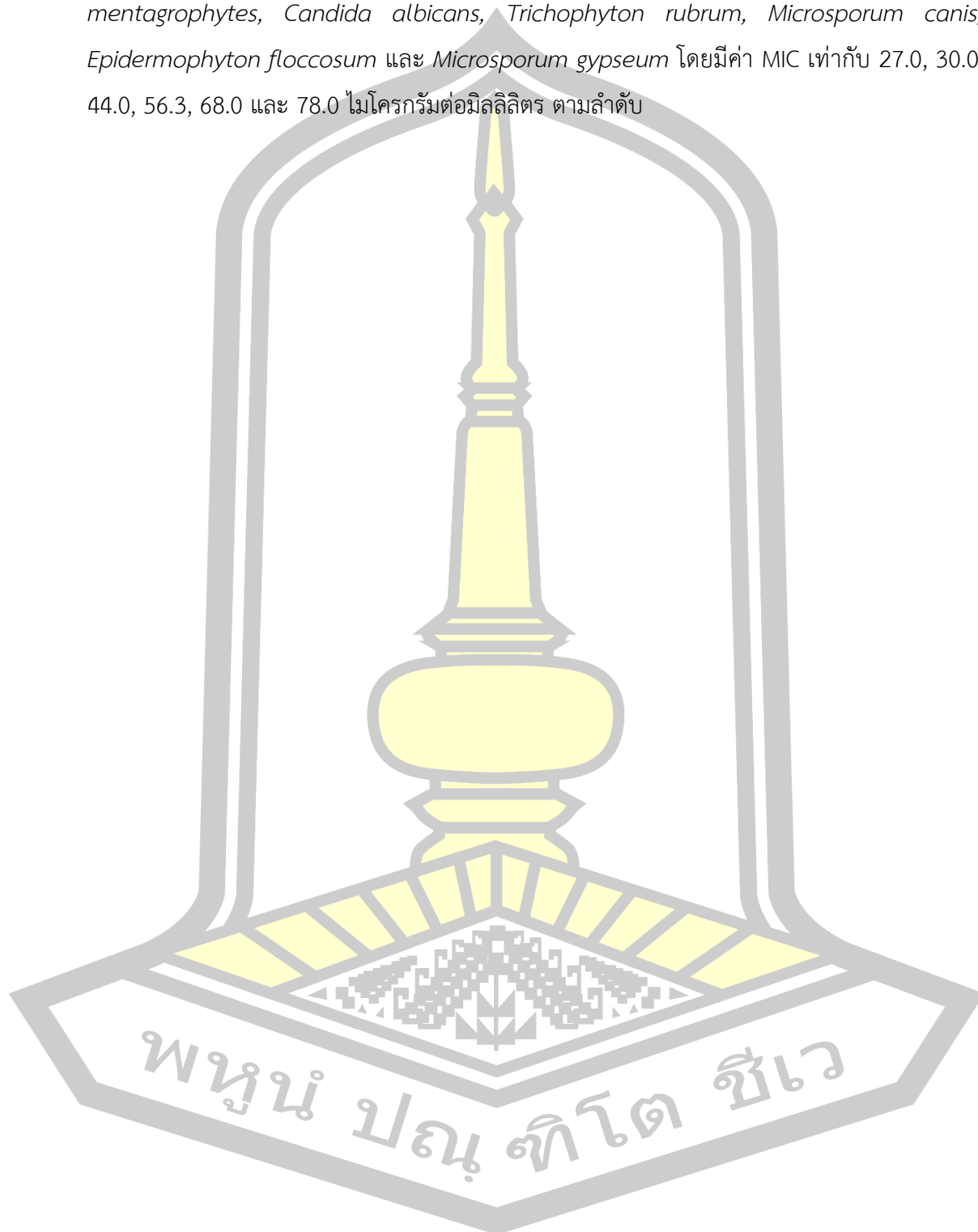
Jones *et al.*, (2018) ได้รายงานเกี่ยวกับสารเคมีของกิ่งกือ Dalodesmidean จากแทสมเนีย พบกิ่งกือ 6 สปีชีส์ในสกุล *Gasterogramma* ที่สามารถผลิต (rel-3R,5S,7S)-3,5,7-trimethyl-2,8-decanedione เป็นอะไซคลิกคีโตน (acyclic ketone) คือ คีโตนชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated ketone) ซึ่งเป็นการพบครั้งแรกในสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ่งกือ

Kuwahara *et al.*, (2017) ได้รายงานเกี่ยวกับการพบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide : H₂O₂) ครั้งแรกในสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ่งกือกลุ่ม polydesmid พร้อมกับสารไฮโดรเจนไซยาไนด์ซึ่งเป็นส่วนประกอบของสารเบนโซอิลไฮยาไนด์

Ilić *et al.*, (2019) ได้รายงานเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ่งกือประจำถิ่นของบอลข่าน *Apfelbeckia insulpta* (L. Koch, 1867) ต่อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ ยีสต์ 4 สายพันธุ์ และราสาย (filamentous fungi) 9 สายพันธุ์ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญ และทำลายเชื้อแบคทีเรีย ได้สูงโดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.01 - 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า MBC อยู่ในช่วง 0.0125 - 0.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญและทำลายยีสต์ได้สูง โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.006 - 0.075 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า MFC อยู่ในช่วง 0.0125 - 0.075 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งการเจริญและทำลายราสายได้โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.10 - 0.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า MFC อยู่ในช่วง 0.20 - >1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Morales & Pedroso, (2019) ได้รายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ่งกือ *Rhinocricus* sp. ซึ่งเป็นสปีชีส์เฉพาะถิ่น (Endemic species) ของประเทศคิวบา โดยได้ศึกษาจาก 6 กลุ่มประชากร พบสารประกอบควิโนนหลายชนิด สารประกอบส่วนใหญ่ที่พบร่วมกัน ได้แก่ 3, 4-dimethoxyphenol และยังพบส่วนประกอบที่สำคัญคือหมู่แทนที่ ส่วนใหญ่เป็นไฮโดรควิโนน (hydroquinone) 1,4-benzoquinone และแอลดีไฮด์ (aldehyde) และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลชีพพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Fonsecaea pedrosoi* มาก

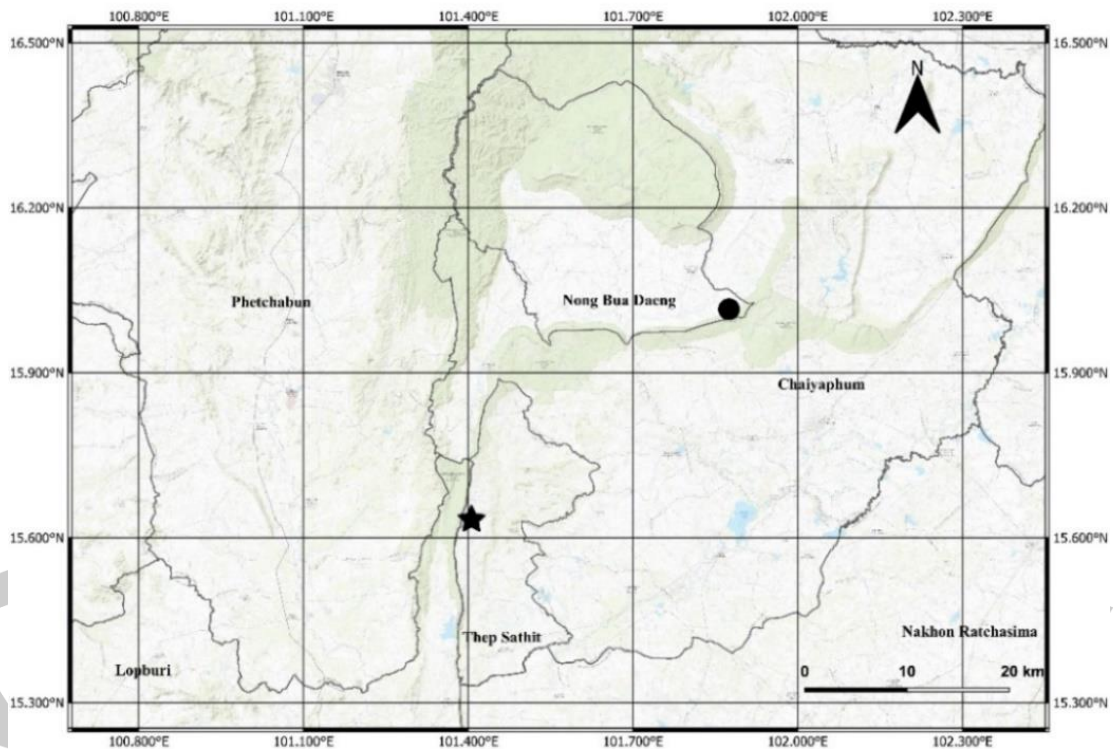
ที่สุดโดยมีค่า MIC เท่ากับ 6.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่ *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* และ *Microsporum gypseum* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 27.0, 30.0, 44.0, 56.3, 68.0 และ 78.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างกิ่งกือ

เก็บตัวอย่างกิ่งกือยักษ์ *A. sculptus* ในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนกันยายน 2564 ในพื้นที่อำเภอเทพสถิต จังหวัดชัยภูมิ พิกัดทางภูมิศาสตร์ $15^{\circ} 38' 28''$ N $101^{\circ} 23' 20''$ E ที่ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 1.29 กิโลเมตร และอำเภอนองบัวแดง จังหวัดชัยภูมิ พิกัดทางภูมิศาสตร์ $16^{\circ} 00' 01''$ N $101^{\circ} 52' 36''$ E ที่ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 1.13 กิโลเมตร (ภาพที่ 5) โดยเก็บตัวอย่างกิ่งกือไว้ในกล่องพลาสติก (ขนาดกว้าง 20 เซนติเมตร ยาว 30 เซนติเมตร และสูง 10 เซนติเมตร) ที่บรรจุเศษซากใบไม้ ซากพืช และฉีดย้ำน้ำให้มีความชุ่มชื้นอยู่ตลอดเวลา จากนั้นนำตัวอย่างกิ่งกือเก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ที่ห้องปฏิบัติการ SC2-304/2 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม



★ อำเภอเทพสถิต ● อำเภอนองบัวแดง

ภาพที่ 5 พื้นที่เก็บตัวอย่าง

3.2 การเก็บตัวอย่างสารคัดหลังป้องกันตัวจากกิ้งกือ

เก็บตัวอย่างสารคัดหลังจากกิ้งกือ โดยการผ่าและดึงต่อม repugnatorial ออกจากวงปล้อง ลำตัวของกิ้งกือโดยตรง นำมาตากให้แห้ง และชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง จากนั้นนำไปแช่ในตัวทำละลายเพื่อทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันตามความมีขี้ว ได้แก่ 1) เฮกเซน (hexane) 2) เอทิลแอซีเตต (ethyl acetate) 3) เมทานอล (methanol) และ 4) สารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงที่ไม่ผ่านการสกัด โดยสารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้ทั้ง 4 นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ

3.3 การสกัดสารคัดหลังป้องกันตัว

นำต่อม repugnatorial ที่ได้จากข้อ 3.2 แช่ในตัวทำละลายที่เตรียมไว้ โดยแช่เรียงลำดับจาก ความมีขี้วน้อยไปหาความมีขี้วมาก ได้แก่ เฮกเซน เอทิลแอซีเตต และเมทานอล โดยมีวิธีการดังนี้

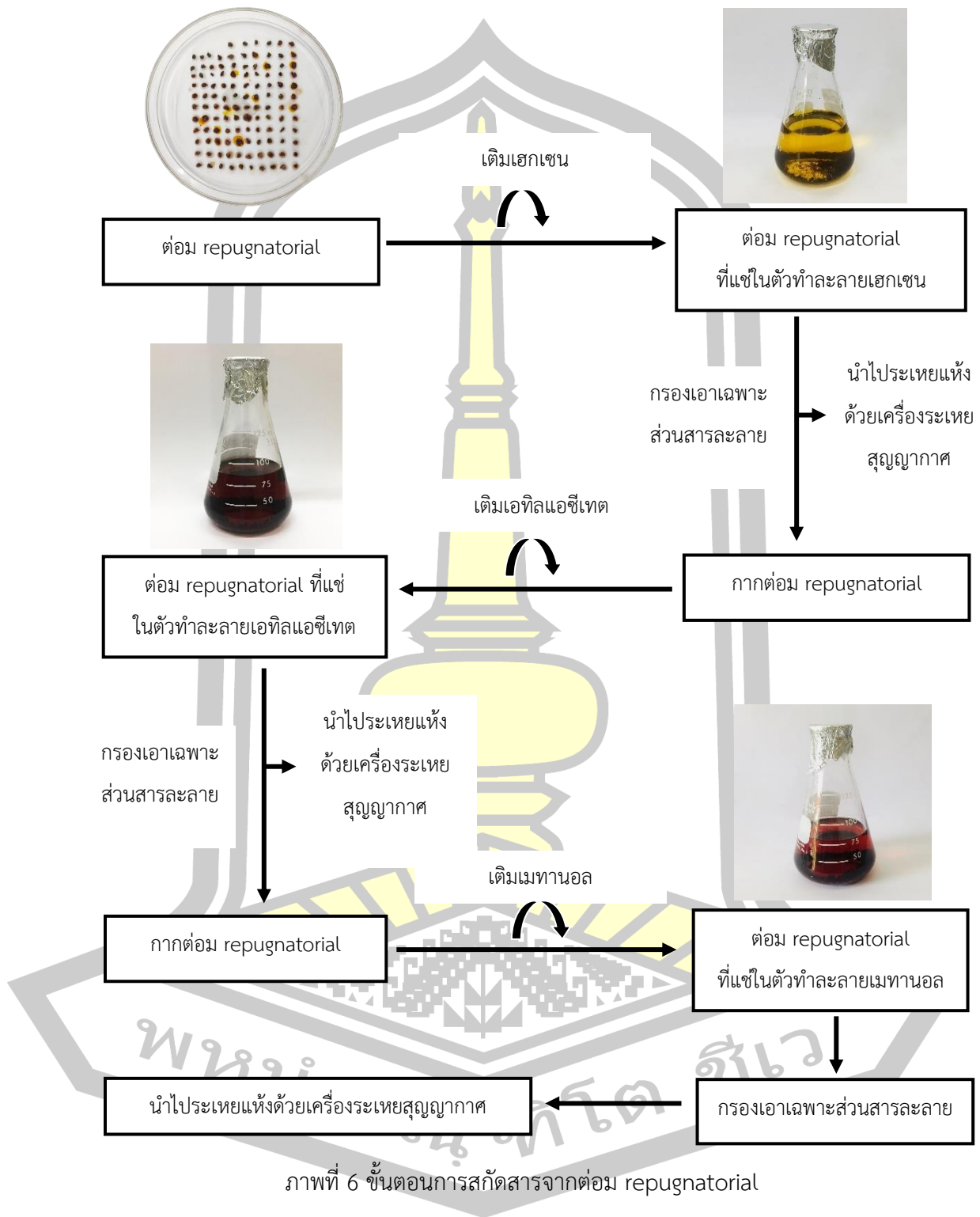
3.3.1 เทสารละลายเฮกเซนลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุต่อม repugnatorial ให้ท่วม ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลาย นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) จนกระทั่งได้สารสกัดหยาบที่แห้งสนิท ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.2 เทสารละลายเอทิลแอซีเตตลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุต่อม repugnatorial ที่ผ่านชั้นเฮกเซน ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลาย นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จนกระทั่งได้สารสกัดหยาบที่แห้งสนิท ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลแอซีเตตเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.3 เทสารละลายเมทานอลลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุต่อม repugnatorial ที่ผ่านชั้นเอทิลแอซีเตต ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลาย นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จนกระทั่งได้สารสกัดหยาบที่แห้งสนิท ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 6)

3.3.4 นำสารสกัดหยาบในแต่ละชั้นมาวิเคราะห์องค์ประกอบของสารคัดหลังป้องกันตัวด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี (gas chromatography-mass spectrometry: GC-MS) และทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพ

ขั้นตอนการสกัดสารจากต่อม repugnatorial



ภาพที่ 6 ขั้นตอนการสกัดสารจากต่อม repugnatorial

3.4 การเตรียมสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง

ใช้วิธีการเก็บเช่นเดียวกับข้อ 3.2 แต่ไม่นำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย ซึ่งสารคัดหลั่งที่ได้จากต่อมโดยตรงนี้นำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ และสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงจะถูกนำไปละลายด้วยเมทานอล (Stanković *et al.*, 2016) เพื่อนำไปวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมี

3.5 การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัว

3.5.1 วิเคราะห์ห้องค์ประกอบของสารคัดหลั่งป้องกันตัวด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี

นำสารสกัดแต่ละชั้นตัวทำละลาย และสารคัดหลั่งที่ได้จากต่อมโดยตรงวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง GC-MS รุ่น QP 2010 Shimadzu ที่ศูนย์เครื่องมือกลางมหาวิทยาลัยมหาสารคาม โดยมีสถานะของเครื่อง GC-MS ดังนี้ (ดัดแปลงจาก Arab *et al.*, 2016)

- Injection volume : 1 μ L
- Column : Rtx®-5MS (Restek, 30 m \times 0.25 mm ID, 0.25 μ m)
- Carrier gas : Helium, 1 mL/min
- Injector temperature : 250 $^{\circ}$ C
- Programmed temperature : 70 $^{\circ}$ C, hold for 2 min, ramped to 250 $^{\circ}$ C at a rate of 5 $^{\circ}$ C/min then to at 280 $^{\circ}$ C at a rate of 5 $^{\circ}$ C and finally hold for 16 min
- Ion source temperature : 200 $^{\circ}$ C
- Interface temperature : 250 $^{\circ}$ C
- MS mode : Scan
- m/z range : 40-500 amu

จากนั้นตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของสารโดยการเปรียบเทียบสเปกตรัมกับ National Institute of Standards and Technology (NIST 14)

3.6 การเตรียมสารคัดหลั่งป้องกันตัวเพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพ

นำสารสกัดหยาบในแต่ละชั้นไปละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide: DMSO) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (Ansel *et al.*, 1969; Wadhvani *et al.*, 2009) ให้ได้ความเข้มข้น 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง โดยดึงต่อม repugnatorial เพื่อเตรียมไว้ใช้ในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี paper disc diffusion และใช้ในการทดสอบหาค่า MIC, MBC และ MFC ต่อไป

3.7 เชื้อจุลชีพที่ใช้ทดสอบ และการเตรียมเชื้อ

นำสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ้งกือยักษ์ *A. sculptus* มาทดสอบสมบัติการต้านจุลชีพกับ เชื้อก่อโรคในมนุษย์ โดยทดสอบกับยีสต์ (yeast) 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. albicans* และ *C. albicans* ATCC10231 แบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive) 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. aureus* DMST20654 และแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative) 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ATCC25922 และ *Salmonella* Typhi ATCC16122 โดยได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ขั้นตอนการเตรียมเชื้อมีดังนี้

3.7.1 ซีดเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.7.2 ซีดยีสต์ *C. albicans* และ *C. albicans* ATCC10231 ลงบนอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อโคโลนีของเชื้อเจริญบนจานอาหาร นำมาเตรียมเชื้อโดยชุดโคโลนีของแบคทีเรีย และยีสต์ ลงในสารละลาย normal saline solution นำมาปรับความเข้มข้นให้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน 0.5 McFarland standard (1.5×10^8 CFU/ml) โดยการนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.08 - 0.1

3.8 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพ

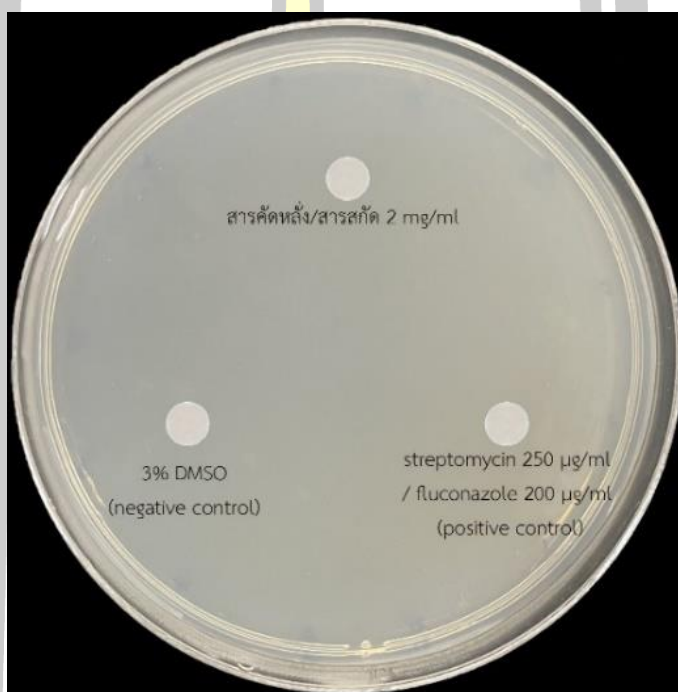
3.8.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของ *A. sculptus*

เบื้องต้น

ทดสอบโดยใช้วิธี paper disc diffusion ซึ่งเป็นวิธีทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพในเบื้องต้น โดยใช้ cotton swab จุ่มในสารละลายเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวอาหาร MHA และ SDA ทั้งให้ผิวอาหารแห้ง จากนั้นหยดสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และสารสกัดแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงบนกลางแผ่น paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวางบนผิวอาหาร MHA และ SDA โดยใช้ DMSO ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวควบคุมทางลบ (negative control) ยาปฏิชีวนะ streptomycin 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Sutthisa & Chaiyacham, 2022) เป็นตัวควบคุมทางบวก (positive control) สำหรับแบคทีเรีย

และยาปฏิชีวนะ fluconazole 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Suwanchatree *et al.*, 2011) เป็นตัวควบคุมทางบวกสำหรับยีสต์ (ภาพที่ 7) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการวัดขนาดของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำไปหาค่าเฉลี่ย

ทดสอบค่าความแตกต่างทางสถิติด้วย nonparametric test โดยทดสอบด้วยวิธี Jonckheere-Terpstra test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 7 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารคัดหลั่งป้องกันตัวด้วยวิธี paper disc diffusion

3.8.2 การหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration: MIC)

เตรียมอาหาร Mueller Hinton broth (MHB) สำหรับแบคทีเรีย และอาหาร Sabouraud dextrose agar broth (SDB) สำหรับยีสต์ สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงความเข้มข้น 4.0 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่เจือจางด้วย MHB หรือ SDB และสารสกัดทั้ง 3 ชนิดความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาทดสอบโดยใช้การเจือจางแบบ two fold dilutions ทำให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 2.0 - 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงที่มีความเข้มข้น 2.0 - 0.001 เปอร์เซ็นต์ (v/v) โดยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB และ SDB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลุมที่ 1-12 ของ 96 well plate เติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือสารคัดหลั่งป้องกันตัว 4.0 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1

จากนั้นดูดสารละลายในหลุมที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 2 และทำเช่นเดียวกันจนถึงหลุมที่ 12 จากนั้นดูดสารผสมทิ้งไป 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลายเชื้อทดสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1-12 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดความขุ่นด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อ่านผลโดยพิจารณาจากความเข้มข้นของสารสกัดความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ หรือไม่มี ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยค่าความเข้มข้นของสารในหลอดทดลองนั้นจะถูกกำหนดให้เป็นค่า MIC โดยมีชุดควบคุมทางลบเป็นอาหาร MHB หรือ SDB และเชื้อทดสอบแต่ละชนิด อย่างละ 100 ไมโครลิตร ชุดควบคุมทางบวกสำหรับแบคทีเรีย คือ ยาปฏิชีวนะ streptomycin ความเข้มข้น 250 - 0.122 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดควบคุมทางบวกสำหรับยีสต์ คือ ยาปฏิชีวนะ fluconazole ความเข้มข้น 200 - 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.7.3 ค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration: MBC) และเชื้อรา (minimum fungicidal concentration: MFC)

การหาค่า MBC และ MFC ทำต่อเนื่องจากการหาค่า MIC โดยนำ 96 well plate ที่ได้จากการหาค่า MIC ที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ นำมาขีดลงบนอาหาร MHA สำหรับแบคทีเรีย และอาหาร SDA สำหรับยีสต์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยพิจารณาจากความเข้มข้นของสารสกัดความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อได้ โดยจะไม่ปรากฏการเจริญของแบคทีเรีย หรือยีสต์ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่านั้นจะถูกกำหนดให้เป็นค่า MBC ในแบคทีเรีย และค่า MFC ในยีสต์ที่นำมาทดสอบ

บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัย

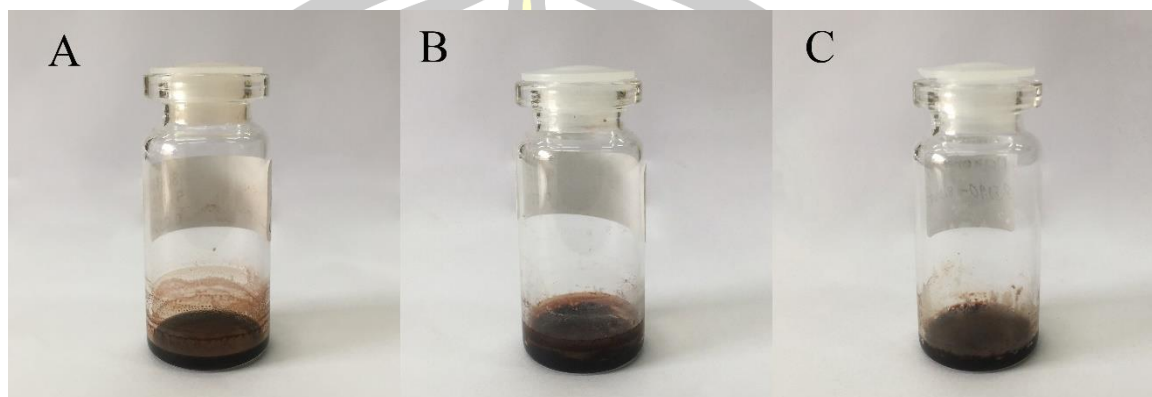
4.1 ผลการสกัดสารสกัดหลังป้องกันตัว

ต่อม repugnatorial น้ำหนักแห้ง 1.1299 กรัม ดึงมาจากกิ่งก้อยักษ์ *A. sculptus* จำนวน 7 ตัว ซึ่งสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่ต่างกันตามลำดับความมีขี้ผึ้ง จากความมีขี้ผึ้งน้อยไปหาความมีขี้ผึ้งมาก ได้แก่ เฮกเซน เอทิลแอสีเทต และเมทานอล จากนั้นนำมาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ โดยสารสกัดในชั้นเฮกเซนมีปริมาณมากที่สุด คือ 9.52 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือสารสกัดในชั้นเมทานอล 8.07 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดในชั้นเอทิลแอสีเทตคิดเป็น 6.30 เปอร์เซ็นต์ รวมสารสกัดที่สกัดได้จากต่อมแห้ง 23.89 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 2 นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะทางกายภาพของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด เหมือนกันคือ มีลักษณะชั้นหนืดสีน้ำตาลแดงเข้ม (ภาพที่ 8) แตกต่างจากสารสกัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงที่เป็นของเหลวสีน้ำตาลเหลือง (ภาพที่ 9) ตารางที่ 2 ปริมาณของสารที่สกัดได้ (yield) จากต่อม repugnatorial ในตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลแอสีเทต และเมทานอล

ชนิดตัวทำละลาย	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)	ร้อยละสารสกัดหยาบ (% yield)
เฮกเซน	0.1076	9.52
เอทิลแอสีเทต	0.0712	6.30
เมทานอล	0.0912	8.07
รวม	0.27	23.89

*ค่าร้อยละของสารสกัดหยาบคิดจากน้ำหนักแห้งของต่อม repugnatorial 1.1299 กรัม

พหุ ประถมศึกษา



ภาพที่ 8 สารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

A. เฮกเซน B. เอทิลแอสีเทต และ C. เมทานอล



ภาพที่ 9 สารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง

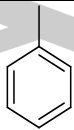
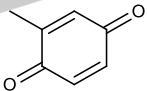
4.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ้งกือ *A. sculptus* ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากสารที่ได้จากต่อมโดยตรง สารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลแอสีเทต และเมทานอล ได้ผลดังนี้ (ตารางที่ 3 - 7)

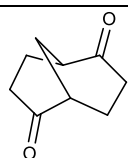
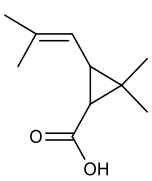
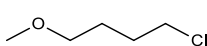
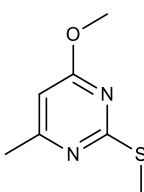
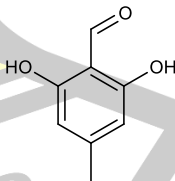
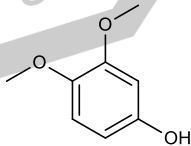
4.2.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง พบสารคัดหลั่งป้องกันตัวประกอบด้วยสารประกอบ 11 ชนิด โดยสารประกอบที่พบมากที่สุด ได้แก่ bicyclo(3.3.1)nonane-2,6-dione 58.58 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 2-methyl-*p*-benzoquinone 15.71 เปอร์เซ็นต์ 1-chloro-4-methoxybutane 8.22 เปอร์เซ็นต์ และ 4-methoxymethoxy-4-methyl-hex-2-ynal 6.07 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารประกอบทั้ง 4 ชนิดนี้คิดเป็น 88.78 เปอร์เซ็นต์ และสารประกอบอื่น ๆ อีก 7 ชนิด ได้แก่ toluene, 3,4-dimethoxyphenol, (*Z*)-9-octadecenamide, 4-methoxy-6-methyl-2-(methylthio)pyrimidine, chrysanthemic acid, *S*-(2-((1*R*,4*R*)-4-Methyl-2-oxocyclohexyl)propan-2-yl) ethanethioate และ 2,6-dihydroxy-4-methylbenzaldehyde โดยพบ 3.14, 3.08, 2.08, 1.84, 0.48, 0.36 และ 0.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

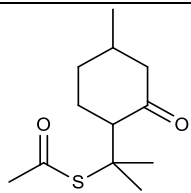
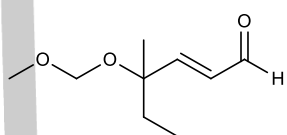
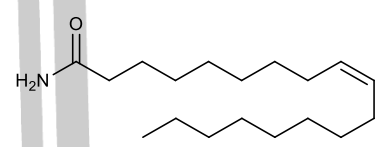
ตารางที่ 3 องค์ประกอบของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากต่อมโดยตรงที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

ลำดับ	เวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (R _t)	ชนิดสารประกอบ	พื้นที่ (%)	โครงสร้าง
1	2.327	toluene	3.14	
2	6.143	2-methyl- <i>p</i> -benzoquinone	15.71	

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากต่อมโดยตรงที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS (ต่อ)

ลำดับ	เวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (R _t)	ชนิดสารประกอบ	พื้นที่ (%)	โครงสร้าง
3	10.405	bicyclo(3.3.1)nonane-2,6-dione	58.58	
4	14.365	chrysanthemic acid	0.48	
5	14.939	1-chloro-4-methoxybutane	8.22	
6	15.881	4-methoxy-6-methyl-2-(methylthio)pyrimidine	1.84	
7	16.332	2,6-dihydroxy-4-methylbenzaldehyde	0.24	
8	17.144	3,4-dimethoxyphenol	3.08	

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากต่อมโดยตรงที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS (ต่อ)

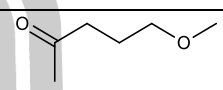
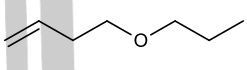
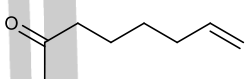
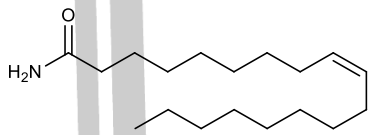
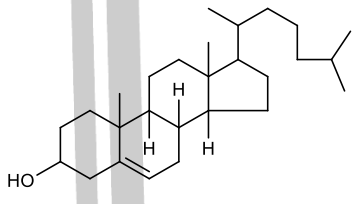
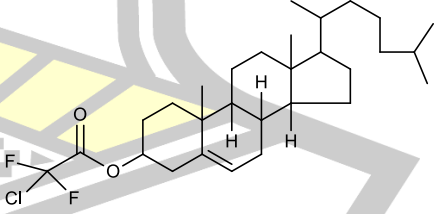
ลำดับ	เวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (R _t)	ชนิดสารประกอบ	พื้นที่ (%)	โครงสร้าง
9	19.375	<i>S</i> -(2-((1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-4-methyl-2-oxocyclohexyl)propan-2-yl) ethanethioate	0.36	
10	21.509	4-methoxymethoxy-4-methyl-hex-2-ynal	6.27	
11	36.391	(<i>Z</i>)-9-octadecenamide	2.08	

4.2.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชั้นเฮกเซน

สารสกัดชั้นเฮกเซน พบสารประกอบ 6 ชนิด โดยพบสาร (*Z*)-9-octadecenamide มากที่สุด คิดเป็น 80.02 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ cholesterol, 7-octen-2-one, 5-methoxy-2-pentanone, 3-butenyl propyl ether และ cholesterol, chlorodifluoroacetate โดยพบ 7.04, 6.05, 2.69, 2.37 และ 1.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

พญ. ปณ. ทิโต ชีเว

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่สกัดในตัวทำละลายเฮกเซนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

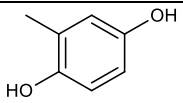
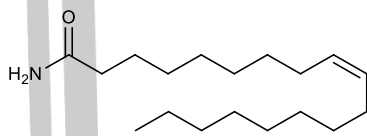
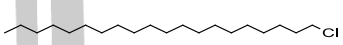
ลำดับ	เวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (R _t)	ชนิดสารประกอบ	พื้นที่ (%)	โครงสร้าง
1	3.950	5-methoxy-2-pentanone	2.69	
2	4.248	3-butenyl propyl ether	2.37	
3	5.130	7-octen-2-one	6.05	
4	36.143	(Z)-9-octadecenamide	80.02	
5	47.302	cholesterol	7.04	
6	48.505	cholesterol, chlorodifluoroacetate	1.83	

พหุ ประถมศึกษา

4.2.3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชั้นเอทิลเอซีเทต

สารสกัดชั้นเอทิลเอซีเทตพบสารประกอบ 3 ชนิด โดยมีสาร (Z)-9-octadecenamide มากที่สุด คิดเป็น 54.87เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ 2-methyl-*p*-hydroquinone 40.23 เปอร์เซ็นต์ และ 1-chloroeicosane 4.90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของสารสกัดหลังป้องกันตัวที่สกัดในตัวทำละลายเอทิลเอซีเทตที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

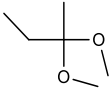
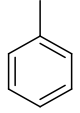
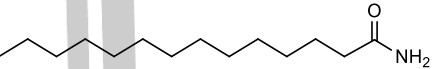
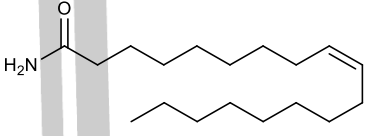
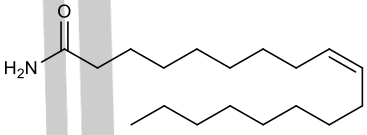
ลำดับ	เวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (R _t)	ชนิดสารประกอบ	พื้นที่ (%)	โครงสร้าง
1	18.092	2-methyl- <i>p</i> -hydroquinone	40.23	
2	36.187	(Z)-9-octadecenamide	54.87	
3	39.832	1-chloroeicosane	4.90	

4.2.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชั้นเมทานอล

สารสกัดชั้นเมทานอล พบสารประกอบ 4 ชนิด โดยพบสาร (Z)-9-octadecenamide มากที่สุด คิดเป็น 87.06 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ tetradecanamide 6.05 เปอร์เซ็นต์ 2,2-dimethoxybutane 2.69 เปอร์เซ็นต์ และ toluene 2.37 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6)

พหุ ประถมศึกษา

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่สกัดในตัวทำละลายเมทานอลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

ลำดับ	เวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (R _t)	ชนิดสารประกอบ	พื้นที่ (%)	โครงสร้าง
1	2.224	2,2-dimethoxybutane	0.35	
2	2.331	toluene	40.33	
3	33.249	tetradecanamide	1.00	
4	36.101	(Z)-9-octadecenamide	54.85	
5	39.200	(Z)-9-octadecenamide	3.48	

พหุ ประถมศึกษา

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบชนิดของสารประกอบที่พบในสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง สารคัดหลั่งในเฮกเซน สารคัดหลั่งในเอทิลเอซีเทต และ สารคัดหลั่งในเมทานอล

สารประกอบ	สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่			สารคัดหลั่ง เอทิลเอซีเทต	สารคัดหลั่ง เมทานอล
	ได้จากต่อมโดยตรง	เฮกเซน	เอทิลเอซีเทต		
toluene	พบ (3.14%)	-	-	-	พบ (40.33%)
2-methyl- <i>p</i> -benzoquinone	พบ (15.17%)	-	-	-	-
bicyclo(3.3.1)nonane-2,6-dione	พบ (58.58%)	-	-	-	-
chrysanthemic acid	พบ (0.48%)	-	-	-	-
1-chloro-4-methoxybutane	พบ (8.22%)	-	-	-	-
4-methoxy-6-methyl-2-(methylthio)pyrimidine	พบ (1.84%)	-	-	-	-
2,6-dihydroxy-4-methylbenzaldehyde	พบ (0.24%)	-	-	-	-
3,4-dimethoxyphenol	พบ (3.08%)	-	-	-	-
S-(2-((1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-4-Methyl-2-oxocyclohexyl)propan-2-yl) ethanethioate	พบ (6.27%)	-	-	-	-
4-methoxymethoxy-4-methyl-hex-2-ynal	พบ (2.08%)	พบ (80.02%)	พบ (54.87%)	พบ (58.33%)	-
(<i>Z</i>)-9-octadecenamide	-	พบ (2.69%)	-	-	-
5-methoxy-2-pentanone	-	-	-	-	-

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบชนิดของสารประกอบที่พบในสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง สารคัดหลั่งเฮกเซน สารคัดหลั่งเอทิลแอลกอฮอล์ และ สารคัดหลั่งเมทานอล

สารประกอบ	สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ ได้จากต่อมโดยตรง	สารคัดหลั่ง เฮกเซน	สารคัดหลั่ง เอทิลแอลกอฮอล์	สารคัดหลั่ง เมทานอล
3-butenyl propyl ether	-	พบ (2.37%)	-	-
7-octen-2-one	-	พบ (6.05%)	-	-
cholesterol	-	พบ (7.04%)	-	-
cholesterol, chlorodifluoroacetate	-	พบ (1.83%)	-	-
2-methyl-p-hydroquinone	-	-	พบ (40.23%)	-
1-chloroeicosane	-	-	พบ (4.90%)	-
2,2-dimethoxybutane	-	-	-	พบ (0.35%)
tetradecanamide	-	-	-	พบ (1.00%)

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่พบสารประกอบชนิดนั้น ๆ

4.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพ

4.3.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวของ *A. sculptus* เบื้องต้น

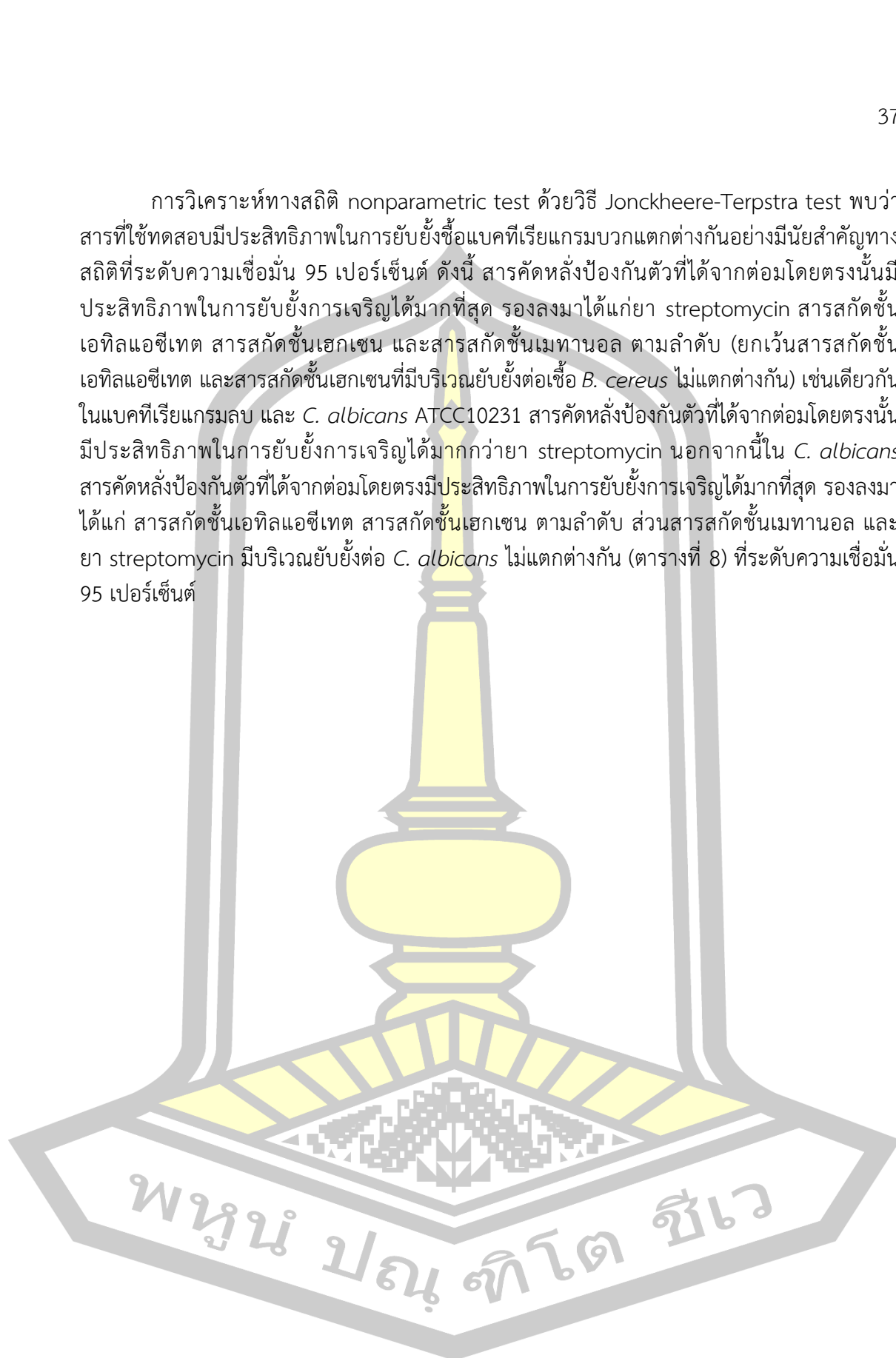
ทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพด้วยสารสกัดในแต่ละชั้นที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง ด้วยวิธี paper disc diffusion โดยทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive) 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. aureus* DMST20654 แบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative) 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ATCC25922 และ *Salmonella* Typhi ATCC16122 และยีสต์ (yeast) 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. albicans* และ *C. albicans* ATCC10231 ในการทดสอบใช้ DMSO ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวควบคุมทางลบ (negative control) และตัวควบคุมทางบวก (positive control) ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ streptomycin 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับแบคทีเรีย และยาปฏิชีวนะ fluconazole 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับยีสต์ มีผลการทดสอบดังนี้

สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. aureus* DMST20654 โดยสารสกัดชั้นเฮกเซนมีบริเวณยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 3 สายพันธุ์เท่ากับ 9.40, 12.30 และ 11.60 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 9.60, 14.00 และ 13.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดชั้นเมทานอลมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 6.70, 7.00 และ 6.30 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 76.60, 85.00 และ 85.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ และยาปฏิชีวนะ streptomycin มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 13.20, 16.20 และ 1.96 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 10, 11 และ 12)

ในส่วนของแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ และสารสกัดชั้นเมทานอลไม่เกิดบริเวณยับยั้ง แต่สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีบริเวณยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *E. coli* ATCC25922, *P. aeruginosa* และ *Salmonella* Typhi ATCC16122 เท่ากับ 71.80, 69.30, 63.70, และ 69.30 มิลลิเมตรตามลำดับ ซึ่งมากกว่ายาปฏิชีวนะ streptomycin ที่มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 14.80, 12.10, 10.10 และ 6.20 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 13, 14, 15 และ 16)

ฤทธิ์ในการยับยั้งยีสต์ *C. albicans* พบว่าสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง สารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ และสารสกัดชั้นเมทานอลมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 85.00, 10.80, 9.10 และ 7.00 มิลลิเมตร ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งได้มากกว่ายา fluconazole ที่มีค่าบริเวณยับยั้งเท่ากับ 6.80 มิลลิเมตร ในกรณีของ *C. albicans* ATCC10231 สารสกัดทั้ง 3 ชนิด และยาปฏิชีวนะ fluconazole ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง แต่พบสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 85.00 มิลลิเมตร (ภาพที่ 17 และ 18) นอกจากนี้ยังพบบริเวณยับยั้ง 85.00 มิลลิเมตร ต่อเชื้อ *S. aureus*, *S. aureus* DMST20654, *C. albicans* และ *C. albicans* ATCC10231 ซึ่งเท่ากับขนาดของจานเพาะเชื้อ (Petri dish) หมายถึงการที่สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อภายในจานเพาะเชื้อได้ทั้งหมด เนื่องจากไม่พบการเจริญของเชื้อในจานเพาะเชื้อ

การวิเคราะห์ทางสถิติ nonparametric test ด้วยวิธี Jonckheere-Terpstra test พบว่า สารที่ใช้ทดสอบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนี้ สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้มากที่สุด รองลงมาได้แก่ยา streptomycin สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต สารสกัดชั้นเฮกเซน และสารสกัดชั้นเมทานอล ตามลำดับ (ยกเว้นสารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต และสารสกัดชั้นเฮกเซนที่มีบริเวณยับยั้งต่อเชื้อ *B. cereus* ไม่แตกต่างกัน) เช่นเดียวกันในแบคทีเรียแกรมลบ และ *C. albicans* ATCC10231 สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้มากกว่ายา streptomycin นอกจากนี้ใน *C. albicans* สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้มากที่สุด รองลงมาได้แก่ สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต สารสกัดชั้นเฮกเซน ตามลำดับ ส่วนสารสกัดชั้นเมทานอล และยา streptomycin มีบริเวณยับยั้งต่อ *C. albicans* ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 8) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์





ตารางที่ 8 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดขึ้นเฮกเซน สารสกัดขึ้นเอทิลแอสซิเทต สารสกัดขึ้นเมทานอล และสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงด้วยวิธี paper disc diffusion

เชื้อทดสอบ	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ± SD					
	3% DMSO	Hexane extract (2 mg/ml)	Ethyl acetate extract (2 mg/ml)	Methanol extract (2 mg/ml)	secretion	Streptomycin (250 µg/ml)
<i>B. cereus</i>	0	9.30 ± 0.05 ^b	9.70 ± 0.05 ^b	6.70 ± 0.05 ^a	76.60 ± 0.05 ^d	13.20 ± 0.04 ^c
<i>S. aureus</i>	0	12.30 ± 0.05 ^b	14.00 ± 0.05 ^c	7.00 ± 0.08 ^a	85.00 ± 0.00 ^{*e}	19.60 ± 0.38 ^d
<i>S. aureus</i> DMST20654	0	11.60 ± 0.05 ^b	13.00 ± 0.09 ^c	6.30 ± 0.05 ^a	85.00 ± 0.00 ^{*e}	16.20 ± 0.06 ^d
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	71.80 ± 0.10 ^b	14.80 ± 0.34 ^a
<i>E. coli</i> ATCC25922	0	0	0	0	69.30 ± 0.07 ^b	12.10 ± 0.03 ^a
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	63.70 ± 0.20 ^b	10.10 ± 0.03 ^a
<i>Salmonella</i> Typhi ATCC16122	0	0	0	0	69.30 ± 0.09 ^b	6.20 ± 0.04 ^a

ค่าเฉลี่ยและค่า SD

ค่าเฉลี่ยและค่า SD

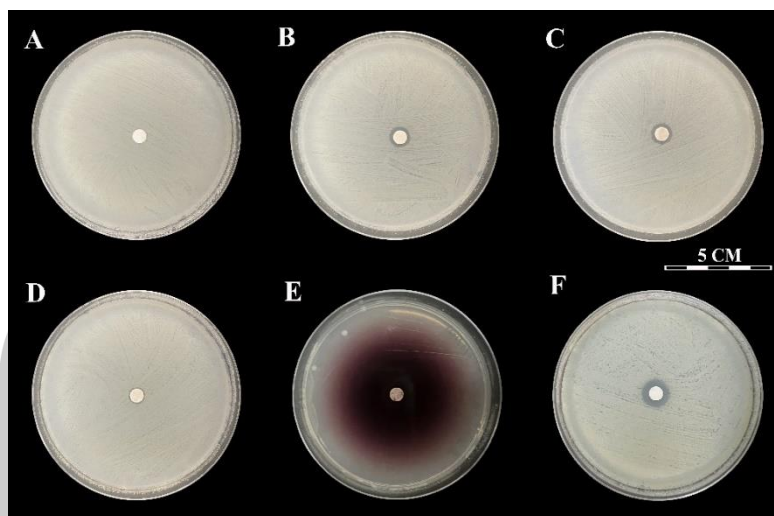
ตารางที่ 8 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดชันเฮกเซน สารสกัดชันเอทิลแอสเทท สารสกัดชันเมทานอล และสารสกัดหาลัง
ป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโตโดยตรงด้วยวิธี paper disc diffusion (ต่อ)

เชื้อทดสอบ	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) + SD				
	3% Hexane extract (2 mg/ml)	Ethyl acetate extract (2 mg/ml)	Methanol extract (2 mg/ml)	secretion	Fluconazole (200 µg/ml)
<i>C. albicans</i>	0	10.80 ± 0.13 ^b	9.10 ± 0.09 ^b	7.00 ± 0.05 ^a	85.00 ± 0.00 ^{*c}
<i>C. albicans</i> ATCC10231	0	0	0	0	85.00 ± 0.00 [*]

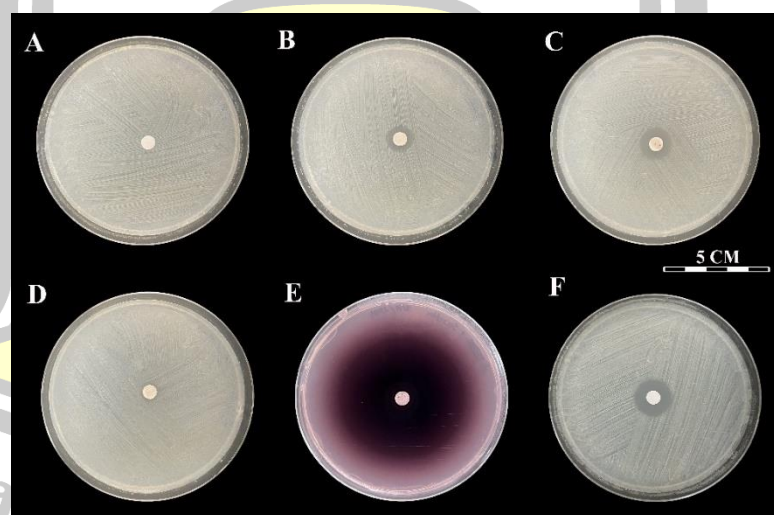
หมายเหตุ : 0 หมายถึง ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

* หมายถึง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อภายในจานเพาะเชื้อได้ทั้งหมด (85.00 มิลลิเมตร)

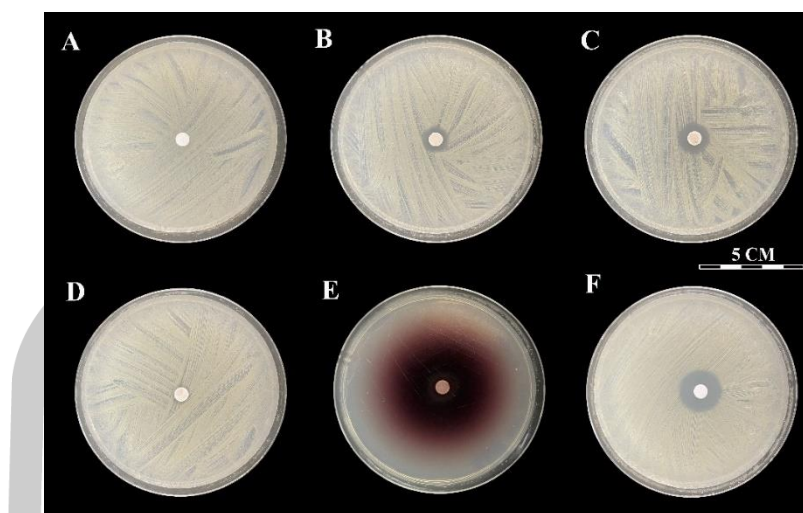
a, b, c, d และ e ที่แตกต่างกันในแนวนอนหมายถึงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Jonckheere-Terpstra test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์



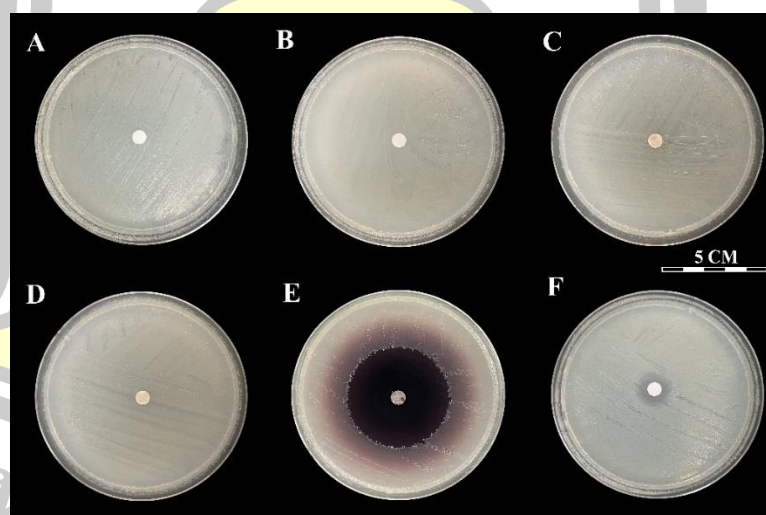
ภาพที่ 10 ผลการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* จาก A. 3% DMSO B. สารสกัดชั้นเฮกเซน (2.0 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) C. สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) D. สารสกัดชั้นเมทานอล (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) E. สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และ F. ยา streptomycin (250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



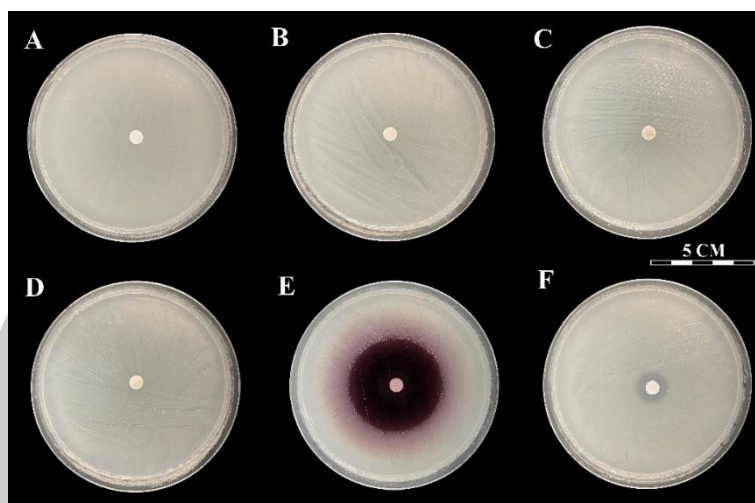
ภาพที่ 11 ผลการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* จาก A. 3% DMSO B. สารสกัดชั้นเฮกเซน (2.0 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร) C. สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) D. สารสกัดชั้นเมทานอล (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) E. สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และ F. ยา streptomycin (250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



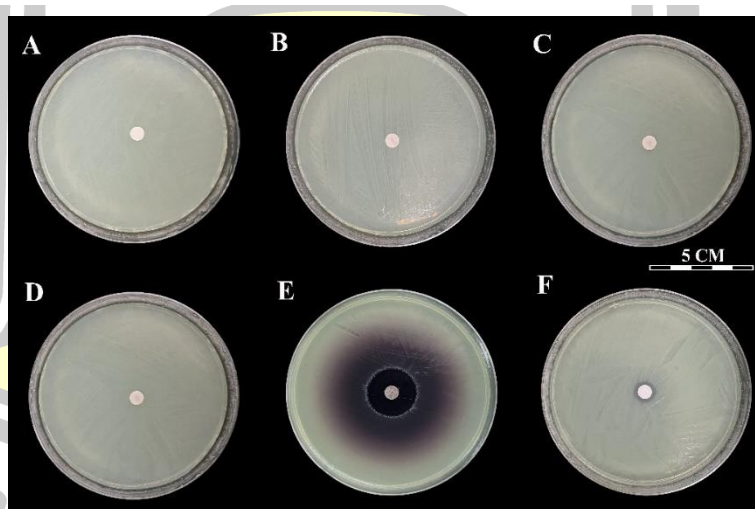
ภาพที่ 12 ผลการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* DMST20654 จาก A. 3% DMSO B. สารสกัดชั้นเฮกเซน (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) C. สารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) D. สารสกัดชั้นเมทานอล (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) E. สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และ F. ยา streptomycin (250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



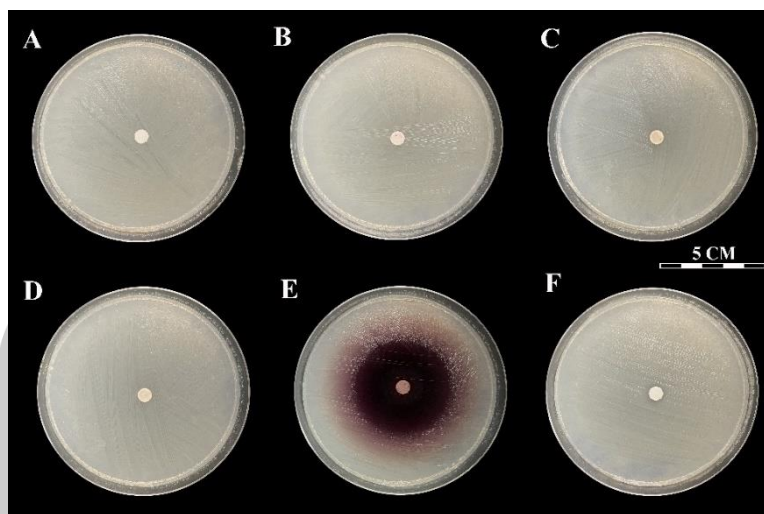
ภาพที่ 13 ผลการยับยั้งเชื้อ *E. coli* จาก A. 3% DMSO B. สารสกัดชั้นเฮกเซน (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) C. สารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) D. สารสกัดชั้นเมทานอล (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) E. สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และ F. ยา streptomycin (250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



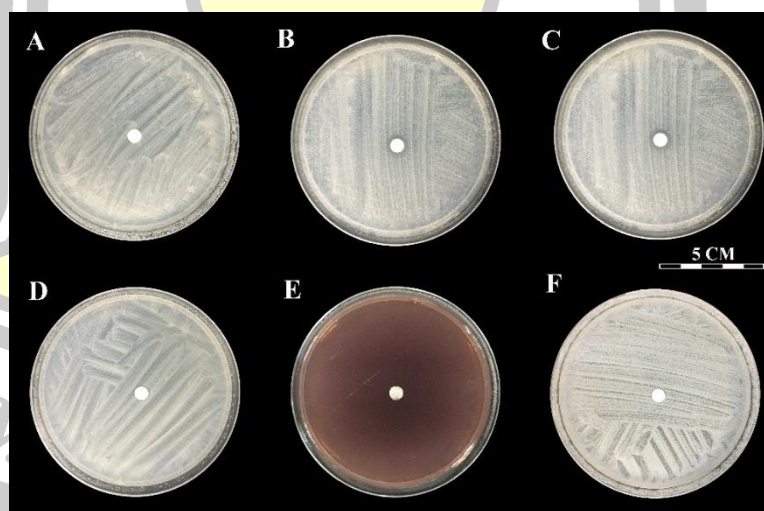
ภาพที่ 14 ผลการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC25922 จาก A. 3% DMSO B. สารสกัดชั้นเฮกเซน (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) C. สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) D. สารสกัดชั้นเมทานอล (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) E. สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และ F. ยา streptomycin (250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



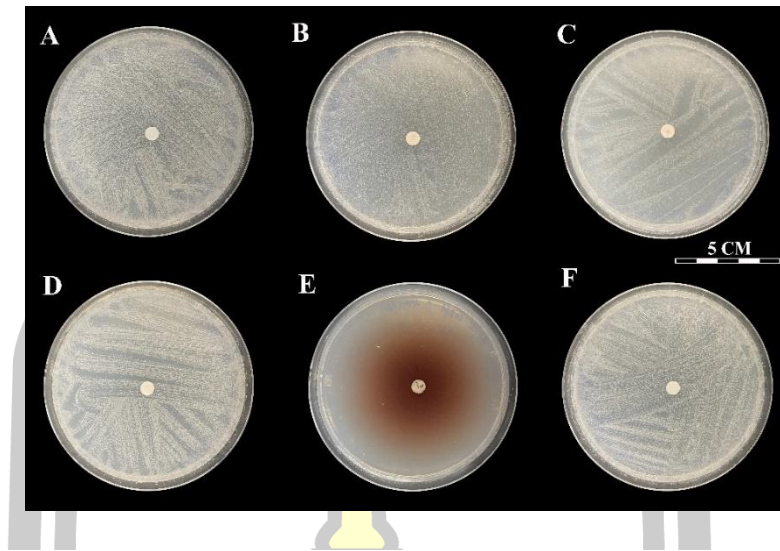
ภาพที่ 15 ผลการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* จาก A. 3% DMSO B. สารสกัดชั้นเฮกเซน (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) C. สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) D. สารสกัดชั้นเมทานอล (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) E. สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และ F. ยา streptomycin (250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 16 ผลการยับยั้งเชื้อ *Salmonella Typhi* ATCC16122 จาก A. 3% DMSO B. สารสกัดชั้นเฮกเซน (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) C. สารสกัดชั้นเอทิลแอซีเทต (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) D. สารสกัดชั้นเมนทานอล (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) E. สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และ F. ยา streptomycin (250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 17 ผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* จาก A. 3% DMSO B. สารสกัดชั้นเฮกเซน (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) C. สารสกัดชั้นเอทิลแอซีเทต (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) D. สารสกัดชั้นเมนทานอล (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) E. สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และ F. ยา fluconazole (200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 18 ผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ATCC10231 จาก A. 3% DMSO B. สารสกัดชั้นเฮกเซน (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) C. สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) D. สารสกัดชั้นเมทานอล (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) E. สารสกัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และ F. ยา fluconazole (200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



4.3.2 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ (minimum inhibitory concentration: MIC)

จากการทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. aureus* DMST20654 และยีสต์ *C. albicans* และสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทุกชนิด จึงนำมาทดสอบเพื่อหาค่า MIC พบว่าสารสกัดชั้นเฮกเซน มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus*, *S. aureus*, *S. aureus* DMST20654 และ *C. albicans* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.50, 0.50, 0.50 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับสารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ และสารสกัดชั้นเมทานอล ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยสารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ มีค่า MIC เท่ากับ 0.50, 0.25, 0.50 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า MIC เท่ากับ 1.00, 1.00, 1.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งน้อยกว่ายาปฏิชีวนะ streptomycin และ fluconazole ที่มีค่า MIC อยู่ในช่วง 31.25 - 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ผลการทดสอบสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้ง *C. albicans* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.00195 เปอร์เซ็นต์ (v/v) รองลงมาได้แก่ *C. albicans* ATCC10231, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. aureus* DMST20654, *E. coli*, *E. coli* ATCC25922, *Salmonella* Typhi ATCC16122 และ *P. aeruginosa* มีค่า MIC เท่ากับ 0.0039, 0.0078, 0.0156, 0.0156, 0.0625, 0.0625, 0.0625 และ 0.250 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ streptomycin สารคัดหลั่งป้องกันตัวมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้น้อยกว่าเนื่องจากมีค่า MIC ที่สูงกว่า แต่ในกรณีของยีสต์ *C. albicans* และ *C. albicans* ATCC10231 สารคัดหลั่งป้องกันตัวมีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ fluconazole เนื่องจากมีค่า MIC น้อยกว่า (ตารางที่ 9)



ตารางที่ 9 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) ของสารสกัดขึ้นเฮกเซน สารสกัดขึ้นเอทิลแอซีเทต สารสกัดขึ้นเมทานอล และสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง

	เชื้อทดสอบ				
	Hexane extract (mg/ml)	Ethyl acetate extract (mg/ml)	Methanol extract (mg/ml)	Secretion (% v/v)	Streptomycin (µg/ml)
<i>B. cereus</i>	0.50	0.50	1.00	0.0156	62.5
<i>S. aureus</i>	0.50	0.25	1.00	0.0078	31.25
<i>S. aureus</i> DMST20654	0.50	0.50	1.00	0.0156	62.5
<i>E. coli</i>	-	-	-	0.0625	62.5
<i>E. coli</i> ATCC25922	-	-	-	0.0625	62.5
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	0.250	125
<i>Salmonella</i> Typhi ATCC16122	-	-	-	0.0625	125

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) ของสารสกัดชันเฮกเซน สารสกัดชันเอทิลแอสซิเทต สารสกัดชันเมทานอล และสารสกัดหึ่งป้องกันตัวที่เตจจากต่อมโดยตรง (ต่อ)

	ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC)				
	Hexane extract (mg/ml)	Ethyl acetate extract (mg/ml)	Methanol extract (mg/ml)	Secretion (% v/v)	Fluconazole (µg/ml)
<i>C. albicans</i>	2.00	2.00	2.00	0.0019	200
<i>C. albicans</i> ATCC10231	-	-	-	0.0039	200

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่มีการทดสอบ

4.3.3 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration: MBC) และเชื้อรา (minimum fungicidal concentration: MFC)

จากการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. aureus* DMST20654 และยีสต์ *C. albicans* และสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทุกชนิด จึงได้นำมาทดสอบเพื่อหาค่า MBC หรือ MFC พบว่าสารสกัดชั้นเฮกเซน มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus*, *S. aureus*, และ *S. aureus* DMST20654 โดยมีค่า MBC อยู่ที่ 2.00, 2.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับสารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ที่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด โดยมีค่า MBC อยู่ที่ 2.00, 2.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียน้อยกว่าเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ streptomycin ที่มีค่า MBC อยู่ในช่วง 125 - 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนอกจากนี้สารสกัดชั้นเฮกเซน และเอทิลแอลกอฮอล์ ไม่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อ *C. albicans* ในการทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุด 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับสารสกัดชั้นเมทานอล ที่ความเข้มข้นสูงสุด 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อ *B. cereus*, *S. aureus*, *S. aureus* DMST20654 และ *C. albicans* (ตารางที่ 10)

ผลการทดสอบของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงพบว่า มีฤทธิ์ในการทำลาย *C. albicans* ได้ดีที่สุดในค่า MFC เท่ากับ 0.0039 เปอร์เซ็นต์ (v/v) รองลงมาได้แก่ *C. albicans* ATCC10231, *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* DMST20654, *E. coli* ATCC25922, *Salmonella* Typhi ATCC16122 และ *P. aeruginosa* มีค่า MBC/MFC เท่ากับ 0.0078, 0.125, 0.125, 0.250, 0.250, 0.250, 0.250 และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ streptomycin สารคัดหลั่งป้องกันตัวมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้น้อยกว่าเนื่องจากมีค่า MBC ที่สูงกว่า แต่ในกรณีของยีสต์ *C. albicans* และ *C. albicans* ATCC10231 (ภาพที่ 19) สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อราได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ fluconazole เนื่องจากมีค่า MFC น้อยกว่า (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (MBC) และเชื้อรา (MFC) ของสารสกัดขึ้นเหกเซน สารสกัดขึ้นเอทิลเอซีเทต สารสกัดขึ้นเมทานอล และสารสกัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง

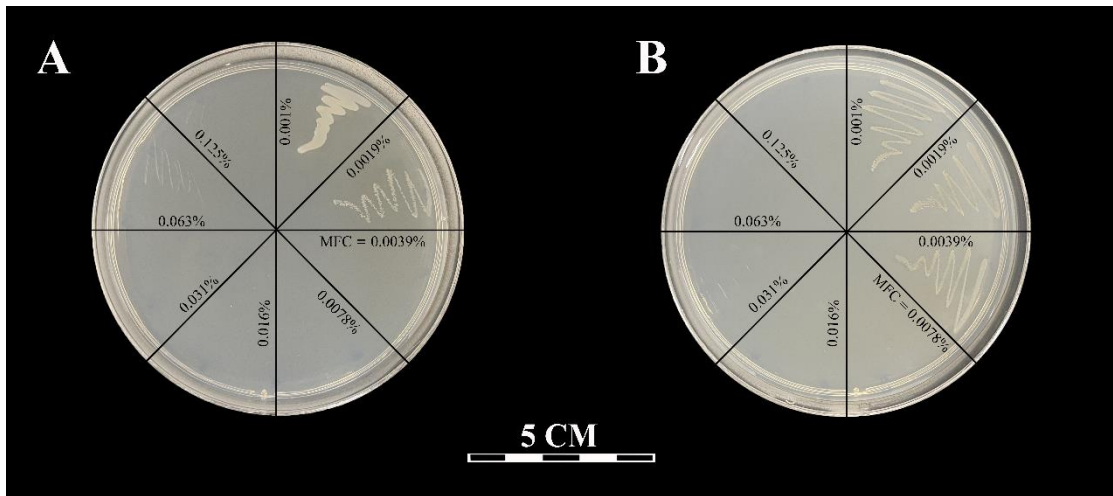
ชื่อทดสอบ	ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (MBC) หรือเชื้อรา (MFC)					
	Hexane extract (mg/ml)	Ethyl acetate extract (mg/ml)	Methanol extract (mg/ml)	Secretion (% v/v)	Streptomycin (µg/ml)	
<i>B. cereus</i>	2.00	2.00	>2.00	0.125	250	
<i>S. aureus</i>	2.00	2.00	>2.00	0.0625	125	
<i>S. aureus</i> DMST20654	2.00	2.00	>2.00	0.125	250	
<i>E. coli</i>	-	-	-	0.250	125	
<i>E. coli</i> ATCC25922	-	-	-	0.250	250	
<i>Ps. aeruginosa</i>	-	-	-	0.500	250	
<i>Salmonella</i> Typhi ATCC16122	-	-	-	0.250	250	

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (MBC) และเชื้อรา (MFC) ของสารสกัดขึ้นเฮกเซน สารสกัดขึ้นเอทิลแอซีเตต สารสกัดขึ้นเมทานอล และสารสกัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง (ต่อ)

เชื้อทดสอบ	ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (MBC) หรือเชื้อรา (MFC)				
	Hexane extract (mg/ml)	Ethyl acetate extract (mg/ml)	Methanol extract (mg/ml)	Secretion (% v/v)	Fluconazole (µg/ml)
<i>C. albicans</i>	>2.00	>2.00	>2.00	0.0039	>200
<i>C. albicans</i> ATCC10231	-	-	-	0.0078	>200

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่มีการทดสอบ

> หมายถึง ความเข้มข้นมากกว่าจำนวนนั้น ๆ อาจสามารถทำลายเชื้อได้



ภาพที่ 19 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงที่สามารถทำลายยีสต์ได้ โดยมีค่า MIC ต่อ A. *C. albicans* เท่ากับ 0.0039 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และ B. *C. albicans* ATCC10231 เท่ากับ 0.0078 เปอร์เซ็นต์ (v/v) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



บทที่ 5

สรุป และอภิปรายผลการดำเนินการวิจัย

5.1 การสกัดสารคัดหลังป้องกันตัว

ต่อม repugnatorial จากกิ้งกือยักษ์ *A. sculptus* 7 ตัว มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 1.1299 กรัม สามารถนำมาสกัดสารได้ทั้งหมด 0.27 กรัม คิดเป็น 23.89 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสกัดในชั้นเฮกเซนมีปริมาณมากที่สุด คือ 9.52 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือสารสกัดในชั้นเมทานอล 8.07 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดในชั้นเอทิลแอสีเทตคิดเป็น 6.30 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีลักษณะทางกายภาพเหมือนกันคือ หนืดข้นมีสีน้ำตาลแดงเข้ม ซึ่งแตกต่างจากสารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงที่เป็นของเหลวสีน้ำตาลเหลือง ซึ่งคาดว่าเป็นสีของเบนโซควิโนน (Shear, 2015)

5.2 องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลังป้องกันตัวของกิ้งกือ *A. sculptus*

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง พบว่ามีสารประกอบ 11 ชนิด โดยมีสารประกอบ 2 ชนิดที่เป็นองค์ประกอบหลัก 74.29 เปอร์เซ็นต์ได้แก่ bicyclo(3.3.1)nonane-2,6-dione และ 2-methyl-*p*-benzoquinone โดยมีรายละเอียดดังนี้

สารประกอบ bicyclo(3.3.1)nonane-2,6-dione การศึกษาครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่พบสารชนิดนี้ในกิ้งกือ และเป็นสารที่พบมากที่สุดในสารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงของ *A. sculptus* คิดเป็น 58.58 เปอร์เซ็นต์ มีรายงานน้อยมากที่พบสารประเภทคีโตนที่มีหมู่คาร์บอนิลในวงแหวน (cyclic ketone) หรือสารประเภทอื่นที่เป็นองค์ประกอบหลักนอกเหนือจากไฮโดรควิโนน (hydroquinone) และเบนโซควิโนน โดยสารประกอบ bicyclo(3.3.1)nonane-2,6-dione เป็นสารอนุพันธ์ (derivative) ของ bicyclo(3.3.1)nonane ซึ่งเป็นเป็นโครงสร้างหลักของสารประกอบในธรรมชาติหลายชนิด (Shen et al., 2020) การศึกษาของ Arab et al., (2003) ได้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายขององค์ประกอบของสารคัดหลังป้องกันตัวในกิ้งกือ juliform โดยได้รายงานถึงการพบสารแอลคาลอยด์ครั้งแรกในกิ้งกือกลุ่มนี้ และยังเป็นองค์ประกอบหลักในสารคัดหลังป้องกันตัวร่วมกับสารควิโนน จากกิ้งกือ *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Spirobolida: Rhinocricidae) ที่อยู่ในเขตร้อนของทวีปอเมริกา (neotropical) เช่นเดียวกันกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบสารแอลคาลอยด์ 4-methoxy-6-methyl-2-(methylthio)pyrimidine แต่พบในสัดส่วนที่น้อย (1.84 เปอร์เซ็นต์) โดยปกติจะไม่พบในกิ้งกือ juliform เนื่องจากแอลคาลอยด์ เป็นสารองค์ประกอบหลักที่พบในสารคัดหลังป้องกันตัวของกิ้งกืออันดับ Glomerida หรือกิ้งกือกระสุนเล็ก และกิ้งกือวงศ์ Polyzoniidae (Wood et al., 2000; Shear, 2015) ทั้งนี้ความแตกต่างขององค์ประกอบในสารคัด

หลังป้องกันตัวอาจเนื่องมาจากความแตกต่างของเชื้อก่อโรค ผู้ล่า และการตอบสนองในการปรับตัว ต่อสภาพแวดล้อมเฉพาะถิ่น ซึ่งเป็นแรงขับที่ทำให้เกิดวิวัฒนาการผ่านการใช้สารคัดหลังป้องกันตัว (Shear *et al.*, 2007)

สารประกอบ 2-Methyl-*p*-benzoquinone เป็นสารประเภทเบนโซควิโนนที่ทราบกันดีว่าเป็นองค์ประกอบหลัก และพบได้มากในสารคัดหลังป้องกันตัวของกิ้งกือกระบอกกลุ่ม juliform (อันดับ Julida, Spirobolida และ Spirostreptida) (Shear, 2015) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Deml & Huth, (2000) พบว่าองค์ประกอบสารคัดหลังป้องกันตัวของกิ้งกือที่อยู่ในเขตร้อน 2 สปีชีส์คือ *Telodeinopus aoutii* (Demange, 1971) จากแอฟริกา และอีกหนึ่งสปีชีส์ในวงศ์ Harpagophoridae จากประเทศไทย พบสารชนิดเดียวกันนี้ (toluquinone) ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันคือ 21.50 เปอร์เซ็นต์ ในกิ้งกือ *T. aoutii* และ 19.38 เปอร์เซ็นต์ ในกิ้งกือวงศ์ Harpagophoridae นอกจากนี้ ยังพบ 2-methoxy-3-methylbenzoquinone และ toluhydroquinone เช่นเดียวกับ Vujisic *et al.*, (2014) ที่ศึกษาองค์ประกอบสารคัดหลังป้องกันตัวจากกิ้งกือ *Nopoiulus kochii* (Gervais, 1847) และ *Cibiniulus phlepsii* (Verhoeff, 1897) ที่พบสารประกอบ toluquinone ในสารคัดหลังป้องกันตัวของกิ้งกือทั้งสองสปีชีส์ และเช่นเดียวกับงานวิจัยอีกมาก (Eisner *et al.*, 1965; De Bernardi *et al.*, 1982; Huth, 1999; Valderrama *et al.*, 2000; Shimizu *et al.*, 2012) ที่พบ 2-methyl-*p*-benzoquinone เป็นองค์ประกอบหลักในกิ้งกือ juliform

สารประกอบอื่น ๆ ที่พบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอะลิฟาติก (aliphatic compound) สารประกอบอะลิไซคลิก (alicyclic compound) โทลูอิน (toluene) สารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) ฟีนอล (phenol) และเบนซาลดีไฮด์ (benzaldehyde) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้อาจเป็นสารออกฤทธิ์ร่วมกัน หรือทำงานร่วมกับสารประกอบควิโนนเพื่อเพิ่มศักยภาพในการสื่อสาร และใช้เป็นเครื่องหมายทางเคมี (chemotaxonomical marker) (Vujisic *et al.*, 2014)

สารสกัดชั้นเฮกเซนพบสารประกอบ 6 ชนิด สารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทตพบสารประกอบ 3 ชนิด และสารสกัดชั้นเมทานอลพบสารประกอบ 5 ชนิด แต่ไม่พบสารประกอบหลัก 2 ชนิดที่พบในสารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง ซึ่งความแตกต่างของสารประกอบจากสารสกัดทั้ง 3 ชนิด กับองค์ประกอบของสารคัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง อาจเป็นผลจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) และการสลายตัวของสารประกอบ (Stanković *et al.*, 2016) เนื่องจากการนำต่อม repugnatorial ตากในอากาศเป็นเวลานาน (3 วัน) และการระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศที่ต้องใช้ความร้อนอาจส่งผลต่อสารบางชนิด แต่อย่างไรก็ตามยังมีสารประกอบที่พบ

เช่นเดียวกับที่พบในสารสกัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และพบมากในสารสกัดทั้ง 3 ชนิด คือ (Z)-9-octadecenamide (ในสารสกัดชั้นเฮกเซนพบ 80.02 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดชั้นเอทิลเอซีเทตพบ 54.87 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดชั้นเมทานอลพบ 58.33 เปอร์เซ็นต์) เนื่องจากสารอินทรีย์ประเภท เอไมด์ (amide) มีจุดเดือดจุดหลอมเหลวสูง จึงอาจไม่สลายตัวในอุณหภูมิที่ใช้ในการระเหยตัวทำละลายในขั้นตอนการระเหยแห้ง โดย (Z)-9-octadecenamide เป็นองค์ประกอบที่พบเช่นเดียวกับรายงานของ Rukhsana *et al.*, (2015) ที่พบสารชนิดเดียวกันนี้ในสารสกัดหลังป้องกันตัวของกิ้งกือ *Anoplodesmus saussurii* (Humbert, 1865) (Polydesmida) ซึ่งมีเขตการกระจายอยู่แถบอินเดียใต้ ศรีลังกา มอริเชียส และสิงคโปร์ และสามารถพบได้ในพืช เช่น น้ำนมราชสีห์ (*Euphorbia hirta* L.) และผักขมหินตั้ง (*Boerhavia erecta* L.) (Olaoluwa *et al.*, 2018) นอกจากนี้ยังมีสารอีกชนิดที่พบมากในชั้นเอทิลเอซีเทต (40.23 เปอร์เซ็นต์) คือ 2-methyl-*p*-hydroquinone ซึ่งเป็นสารไฮโดรควิโนนที่สามารถละลายได้ดีในเอทิลเอซีเทต (World Health Organization, 1996) จึงอาจทำให้พบสารนี้ในสารสกัดชั้นเอทิลเอซีเทตในสัดส่วนที่มาก และพบโทลูอีนในสารสกัดชั้นเมทานอล 40.33 เปอร์เซ็นต์

5.3 ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง และสารสกัด

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารสกัดหลังป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยับยั้งได้มากกว่ายาปฏิชีวนะ streptomycin ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ยาปฏิชีวนะ fluconazole ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และสารสกัดจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *S. aureus* DMST20654, *C. albicans* และ *C. albicans* ATCC10231 ได้ทั้งหมด เนื่องจากไม่พบการเจริญของเชื้อภายในจานเพาะเชื้อ

สารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลเอซีเทต และสารสกัดชั้นเมทานอลมีฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. aureus* DMST 20654 และสามารถยับยั้ง *C. albicans* ได้ โดยสารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลเอซีเทต และสารสกัดชั้นเมทานอลมีบริเวณยับยั้งต่อ *C. albicans* เท่ากับ 1.08, 0.91 และ 0.70 เซนติเมตร ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งได้มากกว่ายาปฏิชีวนะ fluconazole ที่มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 0.68 เซนติเมตร แต่สารสกัดทั้ง 3 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ อาจเนื่องมาจากสารประกอบที่ได้จากสารสกัดทั้ง 3 ชนิด ไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากความแตกต่างของผนังเซลล์ เพราะแบคทีเรียแกรมลบมีส่วน ห่อหุ้มที่ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ผนังเซลล์ (peptidoglycan cell wall) และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก

เป็นส่วนที่ควบคุมการไหล และดูดซึมสาร เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมีโครงสร้างแบบไม่สมมาตร (asymmetric bilayer) ด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกประกอบด้วยฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ส่วนด้านนอกประกอบด้วยลิพโพลีแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ซึ่งจะมีช่องที่เรียกว่าพอริน (porin) ฝังอยู่ และ bilayer ที่มีลิพโพลีแซ็กคาไรด์จะมีความแข็งมากกว่าปกติ จะทำให้สารที่ชอบน้ำ (hydrophobic compound) ไหลช้าลง และสารที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophilic compound) จะถูกจำกัดด้วยช่องที่มีขนาดเล็ก (Rojas *et al.*, 2018 & Zgurskaya *et al.*, 2015) และนอกจากนี้ ในชั้น periplasmic space มีเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) หรือที่เรียกว่า murein ที่เป็นชั้นที่แข็ง และยังมีเอนไซม์ (enzyme) ที่สามารถทำลายโมเลกุลแปลกปลอมจากภายนอกได้ จึงนับว่ามีความสำคัญในการปกป้องเซลล์ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก แต่มีเพปทิโดไกลแคนหลายชั้น และกรด teichoic ล้อมรอบเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีความจุของน้ำมาก และสามารถเก็บโปรตีนได้มาก เนื่องจากโครงสร้างที่มีรูพรุนหนาและชอบน้ำ ทำให้สารสามารถซึมผ่านได้ดีกว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (Ren *et al.*, 2014)

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพของสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลแอสีเทต และเมทานอล พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. aureus* DMST20654 และสามารถยับยั้ง *C. albicans* ได้ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.25 - 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ในส่วนของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง ผลการทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ได้ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.0019 - 0.250 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ streptomycin สารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ น้อยกว่าเนื่องจากมีค่า MIC ที่สูงกว่า แต่ในกรณีของ *C. albicans* และ *C. albicans* ATCC10231 พบว่าสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงสามารถยับยั้งได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า โดยมีค่า MIC อยู่ที่ 0.0019 และ 0.0039 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ตามลำดับ ในขณะที่ยาปฏิชีวนะ fluconazole มีค่า MIC อยู่ที่ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ต่อเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งมากกว่าสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรง 5 - 10 เท่า

การทดสอบค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดในการทำละลายเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา พบว่า สารสกัดชั้นเฮกเซน และเอทิลแอสีเทต มีฤทธิ์ในการทำละลายเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus*, *S. aureus*, และ *S. aureus* DMST20654 โดยมีค่า MBC อยู่ที่ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ต่อเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ แต่ไม่มีฤทธิ์ในการทำละลาย *C. albicans* ที่ความเข้มข้นสูงสุด 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร การทดสอบสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงพบว่ามีฤทธิ์ในการทำละลายแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ได้ โดยมีค่า MBC/MFC อยู่ในช่วง 0.0039 - 0.50 เปอร์เซ็นต์ (v/v) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบว่าสามารถทำลายเชื้อ *C. albicans* และ *C. albicans* ATCC10231 ได้อย่างมี

ประสิทธิภาพมากกว่ายาปฏิชีวนะ fluconazole โดยมีค่า MFC อยู่ที่ 0.0039 และ 0.0078 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของผนังเซลล์ โดยผนังเซลล์ของยีสต์ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) เช่น ไคติน (chitin) กลูแคน (glucan) และแมนแนน (mannan) เป็นหลัก (Lipke & Ovalle, 1998) แต่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยเพปทิโดไกลแคน โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบที่เยื่อหุ้มชั้นนอกประกอบด้วยลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ ทำให้ผนังเซลล์มีความซับซ้อน และมีโครงสร้างหลายชั้น ส่งผลให้สารต่าง ๆ เข้าสู่ชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ยากมากขึ้น และเป็นอุปสรรคต่อสารสกัดจากพืช ยาปฏิชีวนะสังเคราะห์ และสารปฏิชีวนะจากธรรมชาติ (Stanković *et al.*, 2016)

โดยทั่วไปสารคัดหลั่งป้องกันตัวของกิ่งกือ Spirostreptida มีสารประกอบหลักที่เป็นกลุ่มควิโนน ดังที่กล่าวมาแล้ว แต่สารคัดหลั่งป้องกันตัวของ *A. sculptus* มีสารประกอบ bicyclo(3.3.1)nonane-2,6-dione ที่เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งยังไม่มีข้อมูลการรายงานที่เกี่ยวข้องหน้าที่หรือการออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยตรง จึงไม่สามารถสรุปได้ว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้หรือไม่ แต่สาร bicyclo(3.3.1)nonane เป็นสารอนุพันธ์ที่เป็นโครงสร้างในสารประกอบหลายชนิด เช่น berkeleydione ที่ต้านการอักเสบ polyketide rugulosone ต้านเชื้อมาลาเรีย และ mexicanolide ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Shen *et al.*, 2020) ดังนั้นอาจอนุมานได้ว่า bicyclo(3.3.1)nonane-2,6-dione มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ใกล้เคียงกับสารอนุพันธ์ดังกล่าว เนื่องจากสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากต่อมโดยตรงสามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพที่ทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพในทุกสายพันธุ์

สารประกอบหลักอีก 1 ชนิดคือ 2-methyl-*p*-benzoquinone คาดว่าเป็นองค์ประกอบหลักที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง และทำลายเชื้อจุลชีพทดสอบในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากควิโนนเป็นกลุ่มสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (natural product) ที่มีความสำคัญ และทราบกันดีว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น สามารถยับยั้งเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส เป็นสารต้านมะเร็ง และมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าฟีนอล (Beheshti *et al.*, 2012; Campos-Xolalpa *et al.*, 2021; Ilic *et al.*, 2019) ควิโนนสามารถสร้างสารเชิงซ้อนต่อกรดอะมิโนในโปรตีนที่ทำให้โปรตีนไม่สามารถคืนสภาพได้ ดังนั้นผนังเซลล์ของเชื้อจุลชีพ สารที่เกาะอยู่กับผนังเซลล์ พอลิเพปไทด์ (polypeptide) และเอนไซม์จึงไม่สามารถทำงานได้ (Alibi *et al.*, 2021) เช่น การศึกษาของ Morales & Pedroso, (2019) ได้รายงานฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพของสารคัดหลั่งป้องกันตัวจากกิ่งกือ *Rhinocricus* sp. ซึ่งเป็นสปีชีส์เฉพาะถิ่น (Endemic species) ของคิวบา เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลชีพพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Fonsecaea pedrosoi* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 6.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ *C. albicans* มีค่า MIC เท่ากับ 30.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเช่นเดียวกับงานวิจัยอื่น ๆ

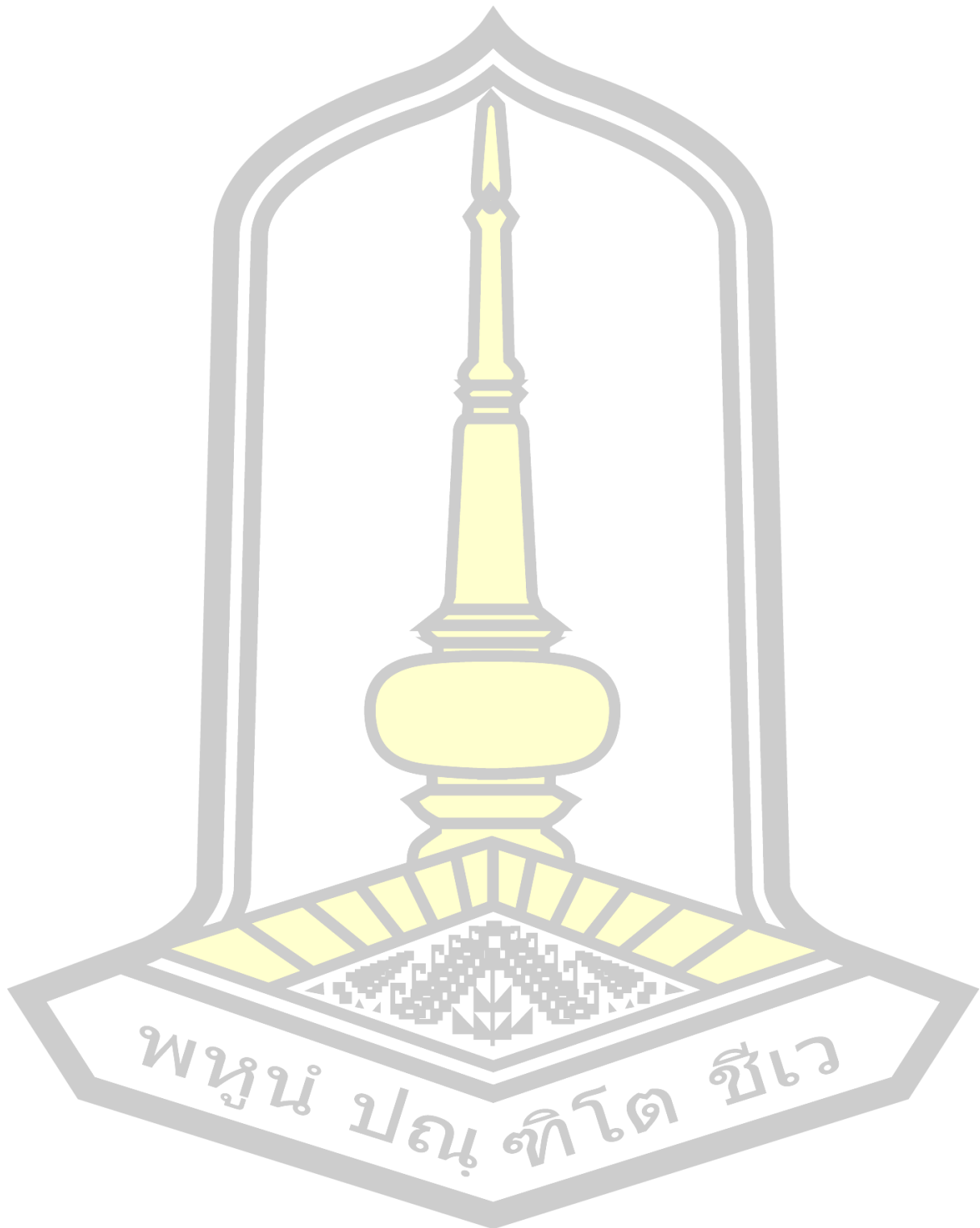
(Roncadori *et al.* 1985; Williams *et al.*, 1997; Ilić *et al.*, 2018; ; Ilić *et al.*, 2019) นอกจากนี้ควิโนนยังทำให้เกิดการระคายเคืองอย่างรุนแรงต่อผิวหนัง และเยื่อของสัตว์มีกระดูกสันหลัง รวมถึงมนุษย์ (Shear, 2015) โดยเมื่อสัมผัสสารคัดหลังบริเวณผิวหนังที่บอบบางอาจมีอาการแสบร้อน พุพอง และลอกได้ และสีของสารคัดหลังจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล นอกจากนี้ควิโนนแล้วยังมี 4-methoxy-6-methyl-2-(methylthio)pyrimidine ที่เป็นสารแอลคาลอยด์ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต (Arab *et al.*, 2003) ฟีนอล (3,4-dimethoxyphenol) เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นที่รู้จักมานานกว่า 100 ปี (Davidson & Branden 1981) และเป็นสารกลุ่มแรกของสารคัดหลังป้องกันตัวของกิ้งกือจากยุคไซลูเรียน (Silurian) (Rodriguez *et al.*, 2018) นอกจากนี้สาร (Z)-9-octadecenamide ที่พบในสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีรายงานถึงการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Devi & Muthu, 2014; Farha & Hatha, 2019) และสารอื่น ๆ คาดว่ามีฤทธิ์ที่ช่วยส่งเสริม อาจทำหน้าที่ในการเป็นตัวทำลาย และเป็นสารตัวพาที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของควิโนน (Vujisic' *et al.*, 2014) จึงทำให้สารคัดหลังป้องกันตัวสามารถยับยั้ง และทำลายเชื้อจุลชีพได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5.4 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ของสารประกอบ bicyclo(3.3.1)nonane-2,6-dione เพิ่มเติม ศึกษาวิธีการสกัดสารคัดหลังป้องกันตัวเพื่อป้องกันไม่ให้องค์ประกอบของสารไม่สลายตัวหรือเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และศึกษาองค์ประกอบของสารคัดหลังป้องกันตัวในสปีชีส์อื่น ๆ ทั้งในอันดับเดียวกันและอันดับอื่น ๆ รวมทั้งกิ้งกือจากต่างพื้นที่เพื่อเปรียบเทียบความหลากหลายขององค์ประกอบสารคัดหลังป้องกันตัว นอกจากนี้ควรมีการศึกษาการสกัดและนำสารคัดหลังป้องกันตัวจากกิ้งกือไปใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อจุลชีพ และในเชิงพาณิชย์



บรรณานุกรม



สมศักดิ์ ปัญหา. 2549. *วิจัยกิ้งกือ เรื่องไม่ยาก (Millipede made easy)*. จัดทำโดยโครงการ BRT.58 น.

สมศักดิ์ ปัญหา, ปิยะธิดา พิมพ์วิชัย และ Henrik Enghoff. 2552. *กิ้งกือกระบอกในประเทศไทย*. จัดพิมพ์โดยโครงการ BRT. กรุงเทพฯ. 80 น.

Alagesan, P. (2016). Millipedes: Diversity, Distribution and Ecology. In: Chakravarthy A and Sridhara S. (eds.) *Arthropod Diversity and Conservation in the Tropics and Sub-tropics*. Springer, Singapore, 119-137.

Alibi, S., Crespo, D., & Navas, J. (2021). Plant-derivatives small molecules with antibacterial activity. *Antibiotics*, 10(3), 231.

Ansel, H. C., Norred, W. P., & Roth, I. L. (1969). Antimicrobial activity of dimethyl sulfoxide against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus megaterium*. *Journal of pharmaceutical sciences*, 58(7), 836-839.

Arab, A., Zacarin, G. G., Fontanetti, C. S., Camargo-Mathias, M. I., Dos Santos, M. G., & Cabrera, A. C. (2003). Composition of the defensive secretion of the Neotropical millipede *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). *Entomotropica*, 18(2), 79-82.

Attygalle, A. B., Xu, S. C., Meinwald, J., & Eisner, T. (1993). Defensive secretion of the millipede *Floridobolus penneri*. *Journal of Natural Products*, 56(10), 1700-1706.

Beheshti, A., Norouzi, P., & Ganjali, M. R. (2012). A simple and robust model for predicting the reduction potential of quinones family; electrophilicity index effect. *International Journal of Electrochemical Science*, 7, 4811-4821.

Burden, B. (2004). Symphylans (Class Symphyla). In: *Encyclopedia of Entomology*. Springer, Dordrecht.

Campos-Xolalpa, N., Pérez-Ramos, J., Esquivel-Campos, A., Pérez-González, C., Sánchez-Pérez, L., & Pérez-Gutiérrez, S. (2021). Cytotoxic and Antimicrobial

Activities of Quinones Isolated from Different Organism. *Cytotoxicity-New Insights into Toxic Assessment*, 27.

Davidson, P. M., & Branden, A. L. (1981). Antimicrobial activity of non-halogenated phenolic compounds. *Journal of Food Protection*, 44(8), 623-632.

De Bernardi, M., Mellerio, G., Vidari, G., Vita-Finzi, P., Demange, J. M., & Pavan, M. (1982). Quinones in the defensive secretions of African millipedes. *Naturwissenschaften*, 69(12), 601-602.

Deml, R., & Huth, A. (2000). Benzoquinones and hydroquinones in defensive secretions of tropical millipedes. *Naturwissenschaften*, 87(2), 80-82.

Devi, J., A., I., & Muthu, A., K. (2014). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of bioactive constituents in the ethanolic extract of *Saccharum spontaneum* Linn. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6, 755-759.

Eisner, T., Hurst, J. J., Keeton, W. T., & Meinwald, Y. (1965). Defense mechanisms of arthropods. XVI. Para-benzoquinones in the secretion of spirostreptoid millipedes. *Annals of the Entomological Society of America*, 58(2), 247-248.

Eisner, T., Alsop, D., Hicks, K., & Meinwald, J. (1978). Defensive secretions of millipedes. In: Bettini, Sergio (Ed.), *Arthropod Venoms, Handbook of Experimental Pharmacology*, 1823, 41-72.

Enghoff, H. (2005). The millipedes of Thailand (Diplopoda). *Steenstrupia*, 29 (1), 87-103.

Farha, A., K., & Hatha, A., M. (2019). Bioprospecting potential and secondary metabolite profile of a novel sediment-derived fungus *Penicillium* sp. ArCSPF from continental slope of Eastern Arabian Sea. *Mycology*, 10(2), 109-117.

Golovatch, S. I., & Kime, R. D. (2009). Millipede (Diplopoda) distributions: A review. *Soil organisms*, 81(3), 565-597.

Hopkin, S. P., & Read, H. J. (1992). *The Biology of Millipedes*. Oxford. Oxford University Press.

Huth, A. (2000). Defensive secretions of millipedes: more than just a product of melting point decrease?. *Fragmenta faunistica*, 43(Suppl.), 191-200.

Ilić, B., Dimkić, I., Unković, N., Grbić, M. L., Vukojević, J., Vujisić, L., Tešević, V., Stanković, S., Makarov, S., & Lučić, L. (2018). Millipedes vs. pathogens: Defensive secretions of some julids (Diplopoda: Julida) as potential antimicrobial agents. *Journal of Applied Entomology*, 142(8), 775-791.

Ilić, B., Unković, N., Ćirić, A., Glamočlija, J., Ljaljević Grbić, M., Raspotnig, G., Bodner, M., Vukojević, J., & Makarov, S. (2019). Phenol-based millipede defence: antimicrobial activity of secretions from the Balkan endemic millipede *Apfelbeckia insculpta* (L. Koch, 1867)(Diplopoda: Callipodida). *The Science of Nature*, 106(7), 1-9.

Jones, T. H., Guthrie, D. M., Hogan, C. T., Robinson, D. J., Mesibov, R., Shear, W. A., Spande, T. F., & Saporito, R. A. (2018). The chemistry of some Dalodesmidean millipedes from Tasmania (Diplopoda, Polydesmida). *Journal of natural products*, 81(1), 171-177.

Kime, R. D., & Golovatch, S. I. (2000). Trends in the ecological strategies and evolution of millipedes (Diplopoda). *Biological Journal of the Linnean Society*, 69(3), 333-349.

Klem, M. L. (2017). Effectiveness of chemical defense in a tropical millipede species on a potential predator, the tarantula *Megaphobema mesomelas*. *Occam's Razor*, 7(1), 4.

Kuwahara, Y., Yamaguchi, T., Ichiki, Y., Tanabe, T., & Asano, Y. (2017). Hydrogen peroxide as a new defensive compound in “benzoyl cyanide” producing polydesmid millipedes. *The Science of Nature*, 104(3), 1-8.

- Likhitrakarn, N., Golovatch, S. I., Jeratthitikul, E., Srisonchai, R., Sutcharit, C., & Panha, S. (2020). A remarkable new species of the millipede genus *Trachyjulus* Peters, 1864 (Diplopoda, Spirostreptida, Cambalopsidae) from Thailand, based both on morphological and molecular evidence. *ZooKeys*, *925*, 55.
- Lipke, P. N., & Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of bacteriology*, *180*(15), 3735–3740.
- Marek, P. E., Shear, W. A., & Bond, J. E. (2012). A redescription of the leggiest animal, the millipede *Illacme plenipes*, with notes on its natural history and biogeography (Diplopoda, Siphonophorida, Siphonorhinidae). *ZooKeys*, *241*, 77.
- Morales, J. E. T., & Pedroso, M. T. C. (2019). Diplodomica I. Chemical Composition of Repugnatorial Secretions of Cuban Endemic Millipede gen. *Rhinocricus* sp. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, *41*(1), 1-8.
- Olaoluwa, O., Moronkola, D., Taiwo, O., & Iganboh, P. (2018). Volatile oil composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Boerhavia erecta* L. and *Euphorbia hirta* L. *Trends in Phytochemical Research*, *2*(3), 171-178.
- Pimvichai, P., Enghoff, H., & Panha, S. (2009a). A revision of the *Thyropygus allevatus* group. Part 1: the *T. opinatus* subgroup (Diplopoda: Spirostreptida: Harpagophoridae). *Zootaxa*, *2016*(1), 17-50.
- Pimvichai, P., Enghoff, H., & Panha, S. (2009b). A revision of the *Thyropygus allevatus* group. Part 2: the *T. bifurcus* subgroup (Diplopoda, Spirostreptida, Harpagophoridae). *Zootaxa*, *2165*(1), 1-15.
- Pimvichai, P., Enghoff, H., & Panha, S. (2010). The Rhynchoproctinae, a south-east Asiatic subfamily of giant millipedes: cladistic analysis, classification, four new genera and a deviating new species from north-west Thailand (Diplopoda: Spirostreptida: Harpagophoridae). *Invertebrate Systematics*, *24*(1), 51-80.

Pimvichai, P., Enghoff, H., & Panha, S. (2011a). A revision of the *Thyropygus allevatus* group. Part 3: the *T. induratus* subgroup (Diplopoda: Spirostreptida: Harpagophoridae). *Zootaxa*, 2941(1), 47-68.

Pimvichai, P., Enghoff, H., & Panha, S. (2011b). A revision of the *Thyropygus allevatus* group. Part 4: the *T. cuisinieri* subgroup (Diplopoda: Spirostreptida: Harpagophoridae). *Zootaxa*, 2980(1), 37-48.

Pimvichai, P., Enghoff, H., & Panha, S. (2014). Molecular phylogeny of the *Thyropygus allevatus* group of giant millipedes and some closely related groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 71, 170-183.

Pimvichai, P., Enghoff, H., & Panha, S. (2016). A revision of the *Thyropygus allevatus* group. Part 5: the *T. allevatus* subgroup (Diplopoda: Spirostreptida: Harpagophoridae). *European Journal of Taxonomy*, 199, 1–37.

Ren, L., Hemar, Y., Perera, C. O., Lewis, G., Krissansen, G. W., & Buchanan, P. K. (2014). Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. *Bioactive carbohydrates and dietary fibre*, 3(2), 41-51.

Rodriguez, J., Jones, T. H., Sierwald, P., Marek, P. E., Shear, W. A., Brewer, M. S., Kocot, K. M., & Bond, J. E. (2018). Step-wise evolution of complex chemical defenses in millipedes: a phylogenomic approach. *Scientific Reports*, 8(1), 1-10.

Rojas, E. R., Billings, G., Odermatt, P. D., Auer, G. K., Zhu, L., Miguel, A., Chang, F., Weibel, D. B., Theriot J. A., & Huang, K. C. (2018). The outer membrane is an essential load-bearing element in Gram-negative bacteria. *Nature*, 559(7715), 617-621.

Roncadori, R. W., Duffey, S. S., & Blum, M. S. (1985). Antifungal activity of defensive secretions of certain millipedes. *Mycologia*, 77(2), 185-191.

Rukhsana, K., Varghese, V., Akhilesh, V. P., Krishnan, J., Bhaskaran, P., Bindu, P. U., & Sebastian, C. D. (2015). GC-MS determination of chemical components in the

bioactive secretion of *Anoplodesmus saussurii* (Humbert, 1865). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6, 650-653.

Scheller, U., Berg, M. P., & Jansen, M. G. (2004). Pauropoda (Myriapoda), a class new to the Dutch fauna, with the description of a new species. *Entomologische Berichten*, 64(1), 3-9.

Shen, X., Ting, C. P., Xu, G., & Maimone, T. J. (2020). Programmable meroterpene synthesis. *Nature communications*, 11(1), 1-8.

Shear, W. A. (2015). The chemical defenses of millipedes (Diplopoda): biochemistry, physiology and ecology. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61, 78-117.

Shear, W. A., Jones T. H., & Miras H. M. (2007) A possible phylogenetic signal in millipede chemical defenses: the polydesmidan millipede *Leonardesmus injucundus* Shelley & Shear secretes p-cresol and lacks a cyanogenic defense (Diplopoda, Polydesmida, Nearctodesmidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(12), 838-842.

Shimizu, N., Kuwahara, Y., Yakumar, R., & Tanabe, T. (2012). n-Hexyl laurate and fourteen related fatty acid esters: new secretory compounds from the julid millipede, *Anaulaciulus* sp. *Journal of chemical ecology*, 38(1), 23-28.

Sierwald, P., & Bond, J. E. (2007). Current status of the myriapod class Diplopoda (millipedes): taxonomic diversity and phylogeny. *Annual Review of Entomology*, 52, 401-420.

Srisonchai, R., Enghoff, H., Likhitrakarn, N., & Panha, S. (2018). A revision of dragon millipedes I: genus *Desmoxytes* Chamberlin, 1923, with the description of eight new species (Diplopoda, Polydesmida, Paradoxosomatidae). *ZooKeys*, 761, 1-177.

Stanković, S., Dimkić, I., Vujisić, L., Pavković-Lučić, S., Jovanović, Z., Stević, T., Sofrenić, I., Mitić, B., & Tomić, V. (2016). Chemical defence in a millipede: Evaluation and characterization of antimicrobial activity of the defensive

secretion from *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881)(Diplopoda, Julida, Julidae). *PLoS One*, 11(12).

Stoev, P., Zapparoli, M., Golovatch, G., Enghoff, H., Akkari, N., & Barber, M. (2010). Myriapods (Myriapoda). Chapter 7.2. In: Roques A et al. (Eds) Alien terrestrial arthropods of Europe. *BioRisk* 4(1): 97–130.

Sutthisa, W., & Chaiyacham, P. (2022). Antibacterial Activity of Ethanolic Extracts of *Lenfinus squarrosulus* Mont. against Human Pathogenic Bacteria. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 16(1), 441-448.

Suwanchatree, J., Khamtorn, N., Noodang, W., & Lertcanawanichakul, M. (2011). Anti-*Candida albicans* activity of active substances derived from *Morinda citrifolia* fruit. *Journal of Medical Technology and Physical Therapy*, 23(1), 7-18.

Valderrama, X., Robinson, J. G., Attygalle, A. B., & Eisner, T. (2000). Seasonal anointment with millipedes in a wild primate: a chemical defense against insects?. *Journal of Chemical Ecology*, 26(12), 2781-2790.

Vujišić, L. V., Antić, D. Ž., Vučković, I. M., Sekulić, T. L., Tomić, V. T., Mandić, B. M., Tesević, V. V., Božidar, P. M. C., Vajsc, V. E., & Makarov, S. E. (2014). Chemical defense in millipedes (Myriapoda, Diplopoda): do representatives of the family Blaniulidae belong to the 'quinone' clade?. *Chemistry & Biodiversity*, 11(3), 483-490.

Wadhvani, T., Desai, K., Patel, D., Lawani, D., Bahaley, P., Joshi, P., & Kothari, V. (2009). Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials. *Internet Journal of Microbiology*, 7(1), 1-8.

Weldon, P. J., Cranmore, C. F., & Chatfield, J. A. (2006). Prey-rolling behavior of coatis (*Nasua* spp.) is elicited by benzoquinones from millipedes. *Naturwissenschaften*, 93(1), 14-16.

World Health Organization. (1996). Hydroquinone: health and safety guide.

Wood, W. F., Hanke, F. J., Kubo, I., Carroll, J. A., & Crews, P. (2000). Buzonamine, a new alkaloid from the defensive secretion of the millipede, *Buzonium crassipes*. *Biochemical systematics and ecology*, 28(4), 305-312.

Williams, L. A., Singh, P., & Caleb Williams, L. S. (1997). Biology and biological action of the defensive secretion from a Jamaican millipede. *Naturwissenschaften*, 84(4), 143-4.

Zgurskaya, H. I., López, C. A., & Gnanakaran, S. (2015). Permeability barrier of Gram-negative cell envelopes and approaches to bypass it. *ACS infectious diseases*, 1(11), 512-522.

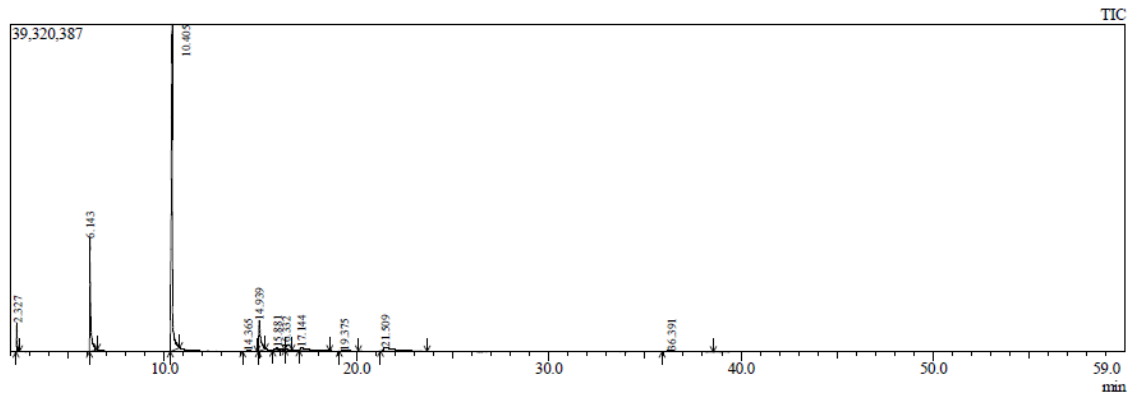


ภาคผนวก

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบสารคัดหลั่งป้องกันตัวด้วยเทคนิค

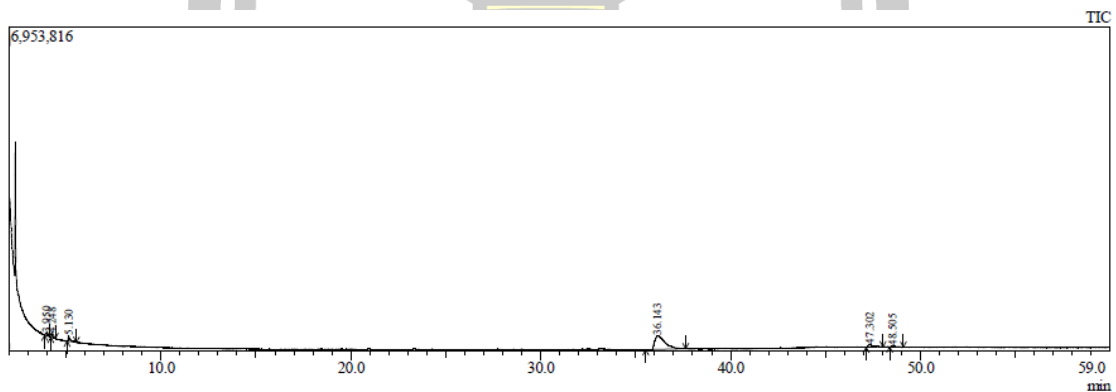
แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี





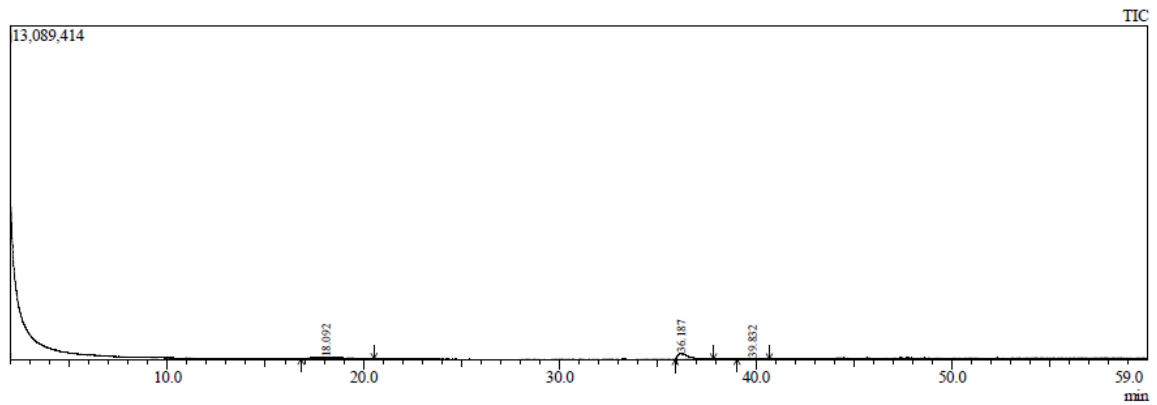
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	2.327	2.292	2.467	9101198	3.14	3459494	5.64	2.63		Toluene
2	6.143	6.117	6.525	45599725	15.71	13609910	22.17	3.35		p-Benzoquinone, 2-methyl-
3	10.405	10.308	10.800	169977801	58.58	39176758	63.82	4.34		Bicyclo(3.3.1)nonane-2,6-dione
4	14.365	14.075	14.825	1398034	0.48	87578	0.14	15.96	MI	Chrysanthemic acid
5	14.939	14.892	15.267	23848833	8.22	3662420	5.97	6.51		Butane, 1-chloro-4-methoxy-
6	15.881	15.642	16.258	5353497	1.84	313303	0.51	17.09	MI	6-Methyl-2-thiouacil, O,S-dimethyl-
7	16.332	16.283	16.642	696796	0.24	104495	0.17	6.67	MI	Benzaldehyde, 2,6-dihydroxy-4-methyl-
8	17.144	17.017	18.608	8943428	3.08	365389	0.60	24.48	MI	Phenol, 3,4-dimethoxy-
9	19.375	19.100	20.100	1042147	0.36	43556	0.07	23.93	MI	S-(2-((1R,4R)-4-Methyl-2-oxocyclohexyl)pro
10	21.509	21.242	23.675	18191776	6.27	431502	0.70	42.16	MI	4-Methoxymethoxy-4-methyl-hex-2-ynal
11	36.391	35.892	38.558	6021581	2.08	131311	0.21	45.86	MI	9-Octadecenamide, (Z)-
				290174816	100.00	61385716	100.00			

ภาพที่ 20 โครมาโทแกรมของสารคัดหลั่งป้องกันตัวที่ได้จากเครื่อง GC-MS



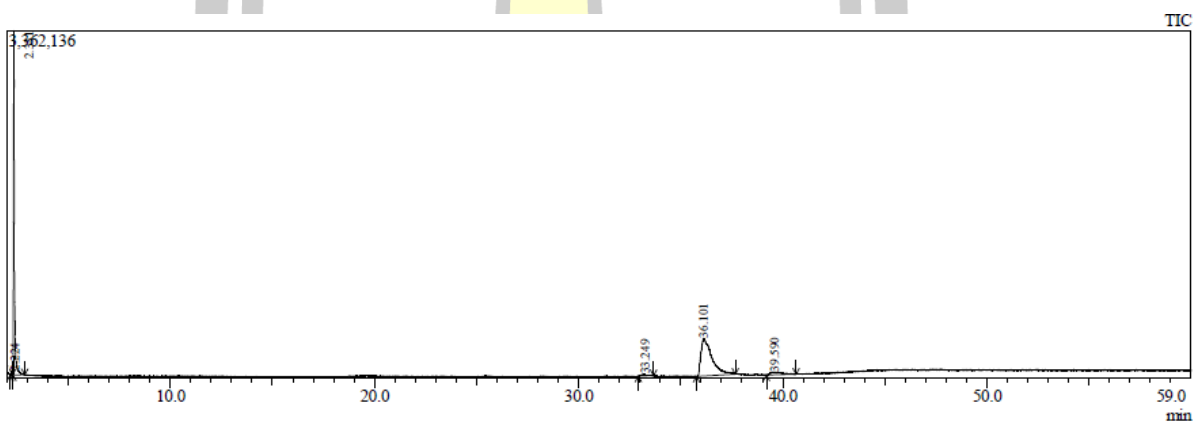
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.950	3.875	4.142	362390	2.69	59598	9.12	6.08	MI	2-Pentanone, 5-methoxy-
2	4.248	4.200	4.433	319455	2.37	82650	12.65	3.87	MI	Ether, 3-butenyl propyl
3	5.130	5.058	5.550	815088	6.05	119257	18.26	6.83	MI	7-Octen-2-one
4	36.143	35.533	37.625	10780545	80.02	297698	45.58	36.21	MI	9-Octadecenamide, (Z)-
5	47.302	47.142	48.025	948208	7.04	64207	9.83	14.77	MI	Cholesterol
6	48.505	48.383	49.100	246494	1.83	29770	4.56	8.28	MI	Cholesterol, chlorodifluoroacetate
				13472180	100.00	653180	100.00			

ภาพที่ 21 โครมาโทแกรมของสารสกัดชั้นเฮกเซนที่ได้จากเครื่อง GC-MS



Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	18.092	16.808	20.542	6776254	40.23	56275	17.34	120.41	MI	1,4-Benzenediol, 2-methyl-
2	36.187	35.892	37.842	9241209	54.87	243111	74.90	38.01	MI	9-Octadecenamide, (Z)-
3	39.832	39.042	40.692	825270	4.90	25211	7.77	32.73	MI	1-Chloroeicosane
				16842733	100.00	324597	100.00			

ภาพที่ 22 โครมาโทแกรมของสารสกัดชั้นเอทิลเอซีเทตที่ได้จากเครื่อง GC-MS



Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	2.224	2.167	2.275	84369	0.35	35894	0.95	2.35	MI	2,2-Dimethoxybutane
2	2.331	2.292	2.867	9823555	40.33	3326928	88.33	2.95	MI	Toluene
3	33.249	32.925	33.667	243374	1.00	13488	0.36	18.04	MI	Tetradecanamide
4	36.101	35.767	37.675	13359083	54.85	364928	9.69	36.61	MI	9-Octadecenamide, (Z)-
5	39.590	39.200	40.650	846956	3.48	25411	0.67	33.33	MI	9-Octadecenamide, (Z)-
				24357337	100.00	3766649	100.00			

ภาพที่ 23 โครมาโทแกรมของสารสกัดชั้นเมทานอลที่ได้จากเครื่อง GC-MS

พหุบัณฑิต ชีวะ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	อนุวัฒน์ ทุมมานาม
วันเกิด	5 พฤษภาคม 2540
สถานที่เกิด	258 หมู่ 7 ตำบลโพนงาม อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม 34230
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	258 หมู่ 7 ตำบลโพนงาม อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม 34230
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	นิสิตระดับปริญญาโท
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150 Email : tummanam.a@gmail.com
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2554 มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนบ้านหนองแสงเจริญพัฒนา จังหวัดนครปฐม พ.ศ. 2557 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนบุณชริกวิทยา จังหวัดนครปฐม พ.ศ. 2562 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาชีววิทยา (เกียรตินิยมอันดับ 1) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2565 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ทุนวิจัย	ทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา (ปริญญาโท) งบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2564 คณะวิทยาศาสตร์ (สัญญาเลขที่ 6404003/2564)

พูน ปณ ทิโต ชีเว