

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 คุณสมบัติทางพฤกษเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มีชีวิตของสารสกัดของสะเดา น้อยหน่าและแมงลัก

5.1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และการกำจัดอนุมูลอิสระ (Total phenolic compounds and Free radical scavenging)

การศึกษาคุณสมบัติทางพฤกษเคมีของสารสกัดใบของสะเดา น้อยหน่าและแมงลัก และเมล็ดแมงลักโดยวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds – TPC) ด้วยวิธีของ Folin Ciocalteu's method พบว่าปริมาณของ TPC ไม่ขึ้นกับสารที่ใช้ ทำสกัดแต่ขึ้นกับชนิดและส่วนของพืช อาจเนื่องจากพืชแต่ละชนิดและแต่ละส่วนผลิตสารที่มี polarity มากน้อยต่างกัน ปริมาณ TPC ในสารสกัดเรียงจากมากไปน้อยต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ $NLE/e > CLE/w > NLE/w > CLE/e > MSE/w > MLE/w > MLE/e > MSE/e$ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 338 ± 41.83 ; 309 ± 44.45 ; 297 ± 31.67 ; 261 ± 30.74 ; 254 ± 30.51 ; 251 ± 31.55 ; 245 ± 26.48 และ 179 ± 13.38 mgGAE/L ตามลำดับ ส่วนคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) โดยวัดการกำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) โดยวิธี DPPH assay พิจารณาจากค่าความเข้มข้นที่สารสกัดสามารถกำจัดอนุมูล $DPPH^{\bullet}$ ได้ 50% หรือ IC_{50} พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดเรียงจากมากไปหาน้อย โดยค่า IC_{50} เรียงจากค่าน้อยไปมากดังนี้ $MSE/e > MSE/w > CLE/w > NLE/w > NLE/e > CLE/e > MLE/e > MLE/w$ ซึ่งมีค่า IC_{50} 155.48 ± 7.06 ; 156.44 ± 3.99 ; 163.55 ± 8.99 ; 172.99 ± 4.53 ; 211.53 ± 8.61 ; 218.62 ± 3.64 ; 226.39 ± 6.22 และ 288.92 ± 13.91 ppm สารสกัดเมล็ดแมงลัก MSE แสดง free radical scavenging activity สูงกว่าสารสกัดพืชอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) พบว่า ประสิทธิภาพ free radical scavenging ของสารสกัดใบและเมล็ดแมงลักด้วยน้ำดีกว่า (IC_{50} น้อยกว่า) สกัดด้วย ethanol และ IC_{50} ผกผันกับปริมาณของ TPC ดังจะเห็นได้จากสารสกัดเมล็ดแมงลัก MSE/e มี TPC น้อยที่สุด แต่มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด

5.1.2 Thin layer chromatographic (TLC) fingerprinting

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองเบื้องต้น ใช้ mobile phase systems จนได้ 3 ระบบที่สามารถแยกสารสกัดได้ คือ System A ประกอบด้วย ethyl acetate : methanol : water ในอัตราส่วน 81:11:8 (v/v/v) System B ประกอบด้วย n-butanol : glacial acetic acid : water ในอัตราส่วน 40:10:50 (v/v/v) และ System C ประกอบด้วย chloroform : methanol : glacial acetic acid ในอัตราส่วน 47.5:47.5:5 (v/v/v) จะเห็นได้ว่า mobile phase 3 systems นี้สามารถแยกสารเคมีในสารสกัดของใบสะเดา ใบน้อยหน่า ใบแมงลักคา และ เมล็ดแมงลักคาได้ต่างกัน และได้แถบเฉพาะหรือ TLC fingerprinting ของสารสกัดแต่ละพืชหรือส่วนของพืชคล้ายกัน TLC fingerprinting จึงใช้เป็นเครื่องมือในการบ่งชี้กลุ่มของพฤกษเคมีของสารสกัดได้ระดับหนึ่ง

5.1.3 ความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัด

การตรวจหาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์มีชีวิตของสารสกัดด้วยวิธี brine shrimp lethality assay (BSLA) ซึ่งเป็นวิธีที่แสดงนัยของพิษต่อสิ่งมีชีวิตชั้นสูงเช่นสัตว์เลื้อยถูกด้วยน้ำนม ทั้งนี้แสดงพิษด้วยความเข้มข้นของสารที่มีพิษที่เป็นผลให้กุ้งฝอยตาย 50% ที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งในการวิเคราะห์พิษของสารสกัดใบสะเดา น้อยหน่าและแมงลักคา และเมล็ดแมงลักครั้งนี้ พิษของสารสกัดเรียงจากน้อยไปมาก หรือจากฤทธิ์สูงไปน้อย คือ $MLE/e < MLE/w < MSE/w < NLE/e < MSE/e < CLE/e < NLE/w < CLE/w$ ซึ่ง LC_{50} เท่ากับ 0.14 ± 0.02 , 0.86 ± 0.07 , 3.65 ± 0.41 , 6.33 ± 1.12 , 6.37 ± 0.60 , 27.78 ± 3.27 , 48.37 ± 5.13 และ 115.06 ± 8.97 ppm ตามลำดับ ในการผสมสารสกัดที่สกัดด้วยสารทำละลายชนิดเดียวกันในอัตราส่วน 1:1 พบว่าฤทธิ์ของสารสกัดผสมระหว่างสารสกัดใบด้วย ethanol แสดงความเป็นพิษได้มากกว่า (LC_{50} น้อยกว่า) การผสมระหว่างสารสกัดใบด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) MLE/e เสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้ CLE/e และ NLE/e การเสริมฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดผสม จะทำให้สามารถเลือกใช้สารสกัดในปริมาณน้อยลงแต่ได้ประสิทธิภาพสูงกว่าและประหยัดค่าใช้จ่ายได้ดีกว่า และสังเกตเห็นได้ว่า cytotoxicity สอดคล้องกับปริมาณ total phenolic compounds ของสารสกัด แต่พหุพันธ์กับ free radical scavenging ดังสรุปใน Table 5.1 การใช้ประโยชน์จากสารสกัดพืชจึงสามารถเลือกนำไปใช้ได้ให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของงาน

Table 5.1 Summary of total phenolic compound content, free radical scavenging activity and cytotoxicity activity of the leaf extracts of neem, custard apple, and mintweed and the seed extracts of mintweed.

Extract	Total phenolic cpd (mgGAE/L)	Inhibition of DPPH [•] (IC ₅₀) (ppm)	Cytotoxicity, BSLA LC ₅₀ (ppm), 24 h.
	Mean $\pm$ S.D., n = 5	Mean $\pm$ S.D., n = 5	Mean $\pm$ S.D., n = 6
NLE/w	297 $\pm$ 31.67*	172.99 $\pm$ 4.53*	48.37 $\pm$ 5.13**
NLE/e	338 $\pm$ 41.83*	211.53 $\pm$ 8.61*	6.33 $\pm$ 1.12**
CLE/w	309 $\pm$ 44.45*	163.55 $\pm$ 8.99*	115.06 $\pm$ 8.97**
CLE/e	261 $\pm$ 30.74*	218.62 $\pm$ 3.64*	27.78 $\pm$ 3.27**
MLE/w	251 $\pm$ 31.55	288.92 $\pm$ 13.91	0.86 $\pm$ 0.07**
MLE/e	245 $\pm$ 26.48	226.39 $\pm$ 6.22	0.14 $\pm$ 0.02**
MSE/w	254 $\pm$ 30.51*	156.44 $\pm$ 3.99	3.65 $\pm$ 0.41*
MSE/e	179 $\pm$ 13.28*	155.48 $\pm$ 7.06	6.37 $\pm$ 0.60*

N - neem, C - custard apple, M - mintweed, L - leaf, S - seed, w - water and e - ethanol

5.2 การควบคุมโดยชีววิธีของไข่ ตัวอ่อน และ ตัวเต็มวัยแมลงวันทอง

5.2.1 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการไล่ (Repellency) แมลงวันทองตัวเต็มวัย

ทดลองอิทธิพลของสารต่อการไล่แมลงวันทองโดยทดสอบใน Olfactometer ซึ่งเป็นอุปกรณ์ระบบปิด ใช้สารสกัดผง 1 กรัม เปรียบเทียบกับสารดึงดูดแมลง methyl eugenol ในน้ำตาลเป็นสารควบคุม สารสกัดด้วย ethanol ไไล่แมลงได้ใกล้เคียงกันและสูงกว่า 65% และ ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ฤทธิ์การไล่แมลงวันทองของสารสกัดทั้งเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ MSE/e > MLE/e > CLE/e > NLE/e > CLE/w > MSE/w > NLE/w > MLE/w สารสกัดด้วย ethanol ของใบเมล็ดแมงลักกา (MLE/e) และ เมล็ดแมงลักกา (MSE/e) มีฤทธิ์ไล่แมลงวันทองได้มากที่สุด 74% สารสกัดใบน้อยหน้า ethanol (CLE/e) สามารถไล่แมลงได้ 70.00 $\pm$ 1.42% สารสกัดใบสะเดาด้วย ethanol (NLE/e) สามารถไล่ 69.23 $\pm$ 1.96% การทดลองผสมระหว่างสารสกัดที่สกัดด้วยสารทำละลายชนิดเดียวกันในอัตราส่วน 1:1 ของสารความเข้มข้นเท่ากัน พบว่า MLE/w และ MSE/w ช่วยเสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ต่อการไล่ของ NLE/w

{NLE/w + CLE/w ($78.00 \pm 2.60\%$); NLE/w + MSE/w ($76.67 \pm 2.46\%$) และ NLE/w + MLE/w ($73.33 \pm 2.25\%$)} แต่ลดฤทธิ์ต่อการไล่ของ CLE/w ลงเล็กน้อย และ NLE/e ลดฤทธิ์การไล่ของ MLE/e และ MSE/e ดังนั้น MLE/w และ MSE/w น่าจะเป็นสารเสริมฤทธิ์ที่ในการใช้ผสมกับสารสกัดใบด้วยน้ำในการไล่แมลงวันทอง

5.2.2 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการฟักไข่แมลงวันทอง (Egg hatching)

นำไข่ของแมลงวันทองวางบริเวณกลางกระดาษที่หยดสารสกัดใบสะเดาน้อยหน้าและแมงลักคา และสารสกัดเมล็ดสะเดาที่ความเข้มข้นต่างๆ (2,500-10,000 ppm) ที่ 24 ชั่วโมง ฤทธิ์ยับยั้งการฟักไข่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด (concentration dependent) สารสกัดเมล็ดแมงลักคาด้วย ethanol (MSE) มีฤทธิ์ยับยั้งการฟักไข่ได้มากที่สุด มีค่า LC_{50} 591.12 ± 30.26 ppm ประสิทธิภาพของสารสกัดเดียวในการยับยั้งการฟักไข่แมลงวันทองเรียงจากมากไปน้อยดังนี้ $MSE/e > MSE/w > CLE/w > MLE/e > MLE/w > NLE/w > NLE/e > CLE/e$ ส่วนฤทธิ์ของสารสกัดผสมต่อการฟักไข่ พบว่าสารผสมระหว่างสารสกัดด้วย ethanol มีประสิทธิภาพดีกว่าฤทธิ์การผสมระหว่างสารสกัดด้วยน้ำ $CLE/e + MLE/e$ มีประสิทธิภาพมากที่สุด ค่า LC_{50} 475.19 ± 31.90 ppm และ $NLE/e + MLE/e$ มีค่า LC_{50} เท่ากับ 666.76 ± 62.27 ppm นั่นคือ MLE/e เสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้ NLE/e และ CLE/e และพบว่า CLE/e เพิ่มฤทธิ์แบบ additive effect ให้ NLE/e จึงสรุปได้ว่าการควบคุมการฟักไข่แมลงวันทองควรจะใช้สารสกัดเมล็ดแมงลัก

5.2.3 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการควบคุมตัวอ่อนโดยการกิน (Larval feeding)

การทดลองการกินสารสกัด (2,500-10,000 ppm) ของตัวอ่อนระยะที่ 2 (second instar larvae) ของแมลงวันทอง สารสกัดใบแมงลักคาด้วย ethanol กำหนดหนอนแมลงมากกว่าสกัดด้วยน้ำและมีประสิทธิภาพมากที่สุด MSE/e มีประสิทธิภาพมากที่สุด ค่า LC_{50} 982.18 ± 45.60 ppm ส่วนสารสกัดอื่นๆ สารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ทำให้ตัวหนอนแมลงวันตายได้มากกว่าสารสกัดด้วย ethanol และมีประสิทธิภาพไม่มาก และพบว่าสารสกัดผสมในอัตราส่วน 1:1 ส่วนมากฤทธิ์จะหักล้างกัน $NLE/e \pm MSE/e$ มีประสิทธิภาพมากที่สุด ค่า LC_{50} $1,194.63 \pm 46.64$ ppm และ MLE/e ช่วยเสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้แก่ NLE/e และเพิ่มฤทธิ์แบบ additive effect ให้แก่ CLE/e การกำหนดหนอนแมลงวันทองโดยการให้กินสารสกัดจึงควรใช้สารสกัดเดี่ยวของใบน้อยหน่าด้วยน้ำ (CLE/w) และใช้การผสมระหว่าง NLE/e + MSE/e

5.2.4 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการสัมผัสตัวอ่อนโดยการจุ่มในสารละลาย (Larval dipping)

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อตัวอ่อนระยะที่ 2 (second instar larvae) ของแมลงวันทอง โดยการจุ่มตัวหนอนในสารละลายสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (2,500-10,000 ppm) เป็นเวลา 3 วินาที สารสกัดเดี่ยวด้วยน้ำแสดงพิษดีกว่าสารสกัดด้วย ethanol สารสกัดใบน้อยหน่าด้วยน้ำ CLE/w แสดงฤทธิ์ทำให้หนอนแมลงวันทองตายมากที่สุดทุกระดับความเข้มข้นของสาร แต่เมื่อประสิทธิภาพพิจารณาจากค่า LC_{50} ของสารสกัดทุกสารมีค่า LC_{50} ก่อนข้างสูงกว่าการควบคุมด้วยวิธีการให้ตัวอ่อนกินสารสกัด MSE/w มีค่า LC_{50} น้อยที่สุดซึ่งเท่ากับ $2,220.36 \pm 83.79$ ppm ส่วนฤทธิ์สารผสมระหว่างสารสกัดด้วย ethanol ก่อนข้างดี NLE /e+ MLE/e และ CLE/e + MLE/e มีค่า LC_{50} น้อยที่สุดและใกล้เคียงกัน คือ 652.80 ± 13.15 ppm และ 683.25 ± 38.08 ppm ตามลำดับ และพบว่า สารสกัดใบแมงลัก MLE/e สามารถใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้แก่สารสกัดใบพืชอื่นได้ดีมาก ในขณะที่ CLE/e น่าจะเป็นสารเพิ่มฤทธิ์แบบ additive effect ให้แก่ NLE/e การควบคุมหนอนตัวอ่อนแมลงวันทองจึงควรใช้สารสกัดผสมที่มี MLE/e ผิดพันให้ตัวหนอนเปียก

5.2.5 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการควบคุมแมลงตัวเต็มวัยโดยการกิน (Adult feeding)

การควบคุมตัวเต็มวัยของแมลงวันทองโดยการผสมสารสกัดความเข้มข้นหลายระดับ (2,500-10,000 ppm) ในอาหารเทียมเลี้ยงแมลง สารสกัดด้วยน้ำ CLE/w มีประสิทธิภาพสูงกว่าทุกสารสกัด มีค่า LC_{50} $1,710.91 \pm 67.07$ ppm ประสิทธิภาพควบคุมโดยสารสกัดเดี่ยวเรียงตามลำดับดังนี้ CIE/w > MSE/w > CLE/e > MLE/w > MLE/w > NLE/w > NLE/e > MSE/e ประสิทธิภาพของพิษสารสกัดผสมกำจัดแมลงวันทองตัวเต็มวัยด้วยการกินได้ปานกลาง NLE/e + CLE/e กำจัดแมลงได้สูงสุด มีค่า LC_{50} $1,605.87 \pm 67.93$ ppm และ NLE/w + MLE/w มีค่า LC_{50} $1,785.91 \pm 81.37$ ppm และ CLE/e เสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้กับ NLE/e MLE/w เสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้กับ NLE/w และ CLE/e เสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้กับ MSE/e ดังนั้นจึงควรใช้สารสกัดใบน้อยหน่า CLE/w NLE/e + CLE/e และ NLE/w + MLE/w ควบคุม/กำจัดแมลงวันทองตัวเต็มวัย

การศึกษาการควบคุมโดยชีววิธีแมลงวันทองด้วยสารสกัดของพืชโดยเทคนิคการไล่ การยับยั้ง การฟักไข่ การให้หนอนตัวอ่อนระยะที่ 2 กินและจุ่มในสารละลายของสารสกัด และการให้ตัวเต็มวัยกิน ครั้งนี้ สรุปเปรียบเทียบการประสิทธิภาพการควบคุม/กำจัดแมลงได้ดัง Table 5.2

Table 5.2 Summary of the insecticidal activities of the leaf extracts of neem, custard apple and mintweed and the seed extracts of mintweed on adult repellence, egg hatching, larval feeding, larval dipping, and adult feeding. The data are expressed as % repellence and the LC_{50} values of the rest effects.

Plants Extracts	% Repellence,		LC_{50} (ppm), 24 h			
	24 h		Mean $\pm$ S.E.			
	Mean $\pm$ S.E.	Egg Hatching	Larval Feeding	Larval Dipping	Adult Feeding	
Individual						
NLE/w	46.41 $\pm$ 2.59	3,353.35 $\pm$ 156.97	3,371.00 $\pm$ 108.27	3,256.96 $\pm$ 190.82	4,239.07 $\pm$ 190.82	
NLE/e	69.20 $\pm$ 1.96	3,625.14 $\pm$ 162.38	5,621.70 $\pm$ 101.43	4,300.95 $\pm$ 259.78	4,810.68 $\pm$ 259.78	
CLE/w	61.23 $\pm$ 2.10	1,551.40 $\pm$ 67.23	1,568.34 $\pm$ 47.50	2,977.18 $\pm$ 67.07	1,710.91 $\pm$ 67.07	
CLE/e	70.00 $\pm$ 1.42	5,815.26 $\pm$ 172.20	4,088.79 $\pm$ 125.29	5,429.48 $\pm$ 110.37	2,217.21 $\pm$ 110.37	
MLE/w	33.33 $\pm$ 2.54	2,920.27 $\pm$ 55.92	2,707.80 $\pm$ 120.38	3,222.85 $\pm$ 152.44	2,347.77 $\pm$ 152.44	
MLE/e	73.33 $\pm$ 1.45	1,798.12 $\pm$ 87.59	2,658.39 $\pm$ 132.40	2,650.98 $\pm$ 143.79	3,295.75 $\pm$ 143.79	
MSE/w	50.00 $\pm$ 2.43	1,098.66 $\pm$ 30.40	2,128.22 $\pm$ 57.14	2,220.36 $\pm$ 83.79	2,021.28 $\pm$ 83.79	
MSE/e	74.00 $\pm$ 5.04	591.12 $\pm$ 30.26	982.18 $\pm$ 45.60	5,945.54 $\pm$ 40.00	6,970.40 $\pm$ 40.00	

All data were analyzed by t-test of variance for paired samples. NLE - neem, leaf extract, CLE - custard apple extract, MLE - mintweed leaf extract, MSE- mintweed seed extract, w - water and e - ethanol.