

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีเตรียมวัสดุวิจัย

1.1. การเลี้ยงแมลงให้ได้ปริมาณมาก

แมลงที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ ยุงลาย *Aedes aegypti* L. เป็นสายพันธุ์ที่เลี้ยงในห้องเลี้ยงแมลงของกองกึ่งวิทยาทางแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ไม่เคยได้รับสารฆ่าแมลงมาเป็นเวลานานแล้ว ซึ่งจะมีความไวต่อการทดสอบกับสารป้องกันกำจัดแมลงได้ในระดับเดียวกัน

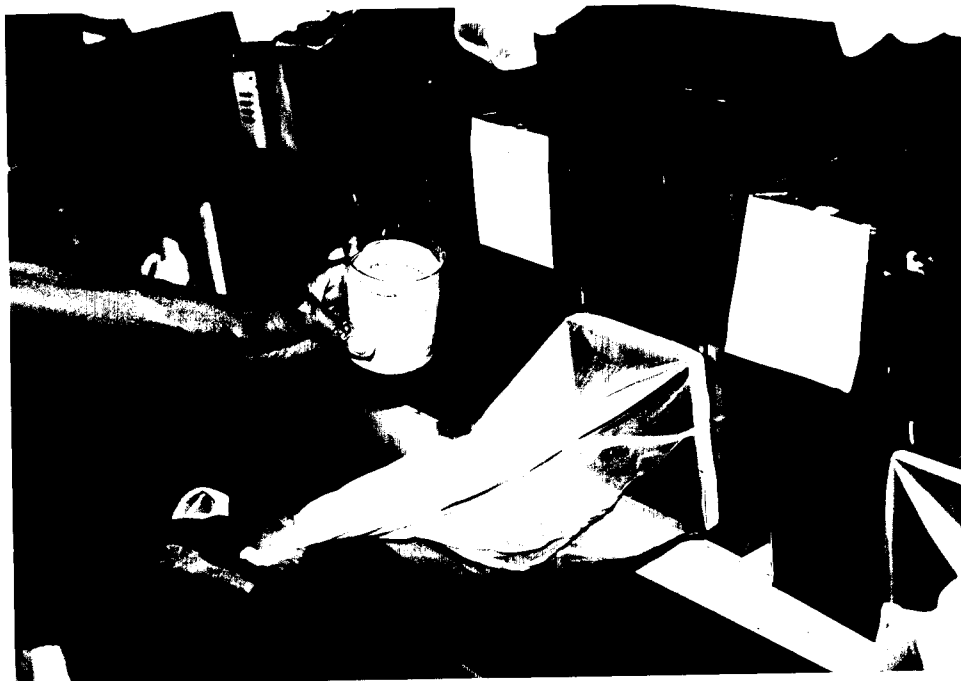
การเลี้ยงยุงลาย ให้ได้ปริมาณมากเพื่อใช้ในการทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยจากพืช เริ่มต้นจากระยะลูกน้ำซึ่งเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดสำหรับกระต่าย โดยนำอาหารเม็ดมาตำด้วยครกให้ละเอียดแล้วนำไปโรยในภาดเลี้ยงลูกน้ำขนาด 30 x 40 ตารางเซนติเมตร สูง 6 เซนติเมตร แต่ละภาดใส่ น้ำ 6,000 มิลลิลิตร เลี้ยงลูกน้ำได้ภาดละ 1,000-1,500 ตัว (รูปที่ 4) โดยให้อาหารวันละครั้งและเปลี่ยนน้ำ 2 วันต่อครั้ง น้ำที่เลี้ยงเป็นน้ำประปา ที่เก็บไว้นานถึงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้ เมื่อลูกน้ำเจริญเติบโตเป็นตัวมด ให้เก็บตัวมดโดยใช้ dropper ตูดใส่ในถ้วยพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8 เซนติเมตร จำนวนประมาณ 400 ตัว นำไปใส่ในกรงเลี้ยงยุงขนาด 30 x 30 x 30 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่มีแท่งสาหลิม น้ำหวาน 5-10 % วางไว้เพื่อเป็นอาหารของยุง ตั้งไว้ประมาณ 2 วัน ตัวมดก็จะฟักออกเป็นตัวยุงหมด เมื่อเลี้ยงยุงไปได้ 2 วัน ให้ยุงกินเลือดหนูขาวโดยนำหนูขาวหนีบด้วยตะแกรงตาข่ายไม่ให้หนูตื่นและยุงสามารถกินเลือดได้ (รูปที่ 1) โดยใส่หนู 4 ตัว เข้าไปในกรงยุง ตั้งไว้ให้ยุงกินเลือด 2 ชั่วโมง ในเวลาตอนกลางวัน เมื่อยุงกินเลือดแล้ว 3 ถึง 4 วัน เอากระดาดชกรอง เบอร์ 4 ใส่ไว้รอบในแก้วน้ำ หรือบีดเกอร์ที่มีน้ำประมาณครึ่งถ้วย แล้วนำไปวางไว้ในกรงเลี้ยงยุง (รูปที่ 2) เพื่อให้ยุงวางไข่ ตั้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงนำแก้วน้ำและกระดาดออกจากกรงยุง จะได้ไข่ยุงลายติดกระดาดชกรองเหนือระดับน้ำโดยรอบเป็นจำนวนมาก นำกระดาดชกรอง

ผึ้งงานท้องที่มีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 70-80 % (รูปที่ 3 A) เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้ตัวอ่อนนางไขเจริญเติบโต เมื่อต้องการฟักลูกน้ำ ให้นำแผ่นกระดาษกรองที่มีไขอยู่หลายอายุตั้งแต่ 3 วันขึ้นไปลอยในน้ำที่อยู่ในถาดเลี้ยงลูกน้ำ (รูปที่ 3 B) ประมาณ 15-20 นาที ก็จะเริ่มฟักออกเป็นตัวลูกน้ำ แผ่นกระดาษที่มีไขอยู่นี้สามารถเก็บไว้ได้หลายเดือนโดยที่ไขยังมีชีวิตอยู่

ลูกน้ำที่ใช้อัดสอบเป็นลูกน้ำระยะ 2 และระยะ 4 ลูกน้ำระยะ 2 เป็นลูกน้ำที่ฟักจากไข่แล้วเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนลูกน้ำวัย 4 เป็นลูกน้ำที่ฟักจากไข่แล้วเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ส่วนตัวเต็มวัยขุ่นหลายที่ใช้ในการทดสอบการพ่น knock down เป็นยุงตัวเมียที่มีอายุ 5-7 วัน โดยก่อนการทดสอบ 24 ชั่วโมง จะให้ยุงกินเลือดหนูขาวเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่วนยุงที่ใช้อัดสอบการป้องกันยุง เป็นยุงตัวเมียอายุ 3-5 วัน ที่ยังไม่ได้กินเลือดสัตว์



รูปที่ 1 หนูขาวอยู่ในตะแกรง เตรียมให้ยุ่งลายกินเลือด

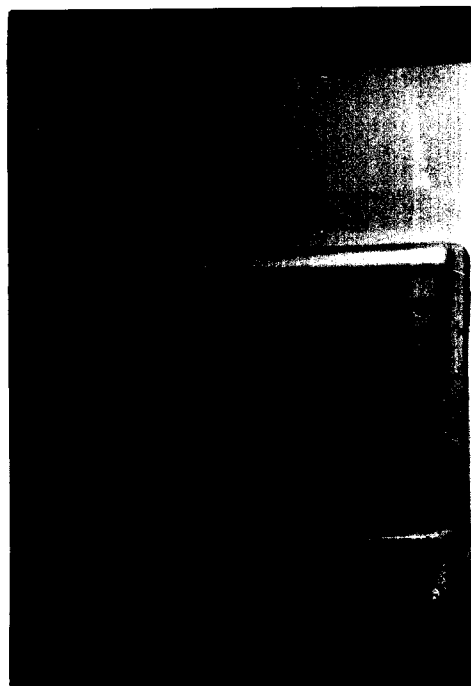


รูปที่ 2 บีดเกอร์ที่มีแผ่นกระดาษรองพื้นอยู่ภายใน และมีน้ำครึ่งบีดเกอร์เตรียมให้
ยุ่งลายวางไข่

A

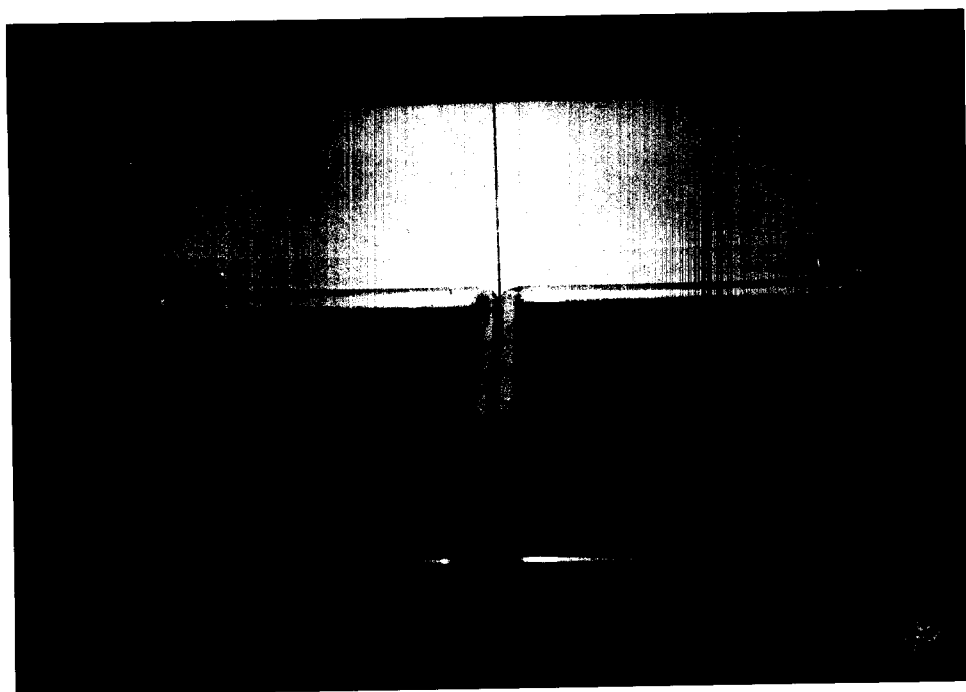


B



รูปที่ 3 A ไข่มุกสายที่ติดอยู่บนกระดาดกรอง

B การพักไข่มุกสายเป็นลูกน้ำ โดยการนำแผ่นไข่มุกไปลอยในภาดเลี้ยงลูกน้ำ



รูปที่ 4 ภาดเลี้ยงลูกน้ำไข่มุกสาย จนถึงระยะตัวมั่ง

1.2. พืชที่ใช้ในการทดสอบ

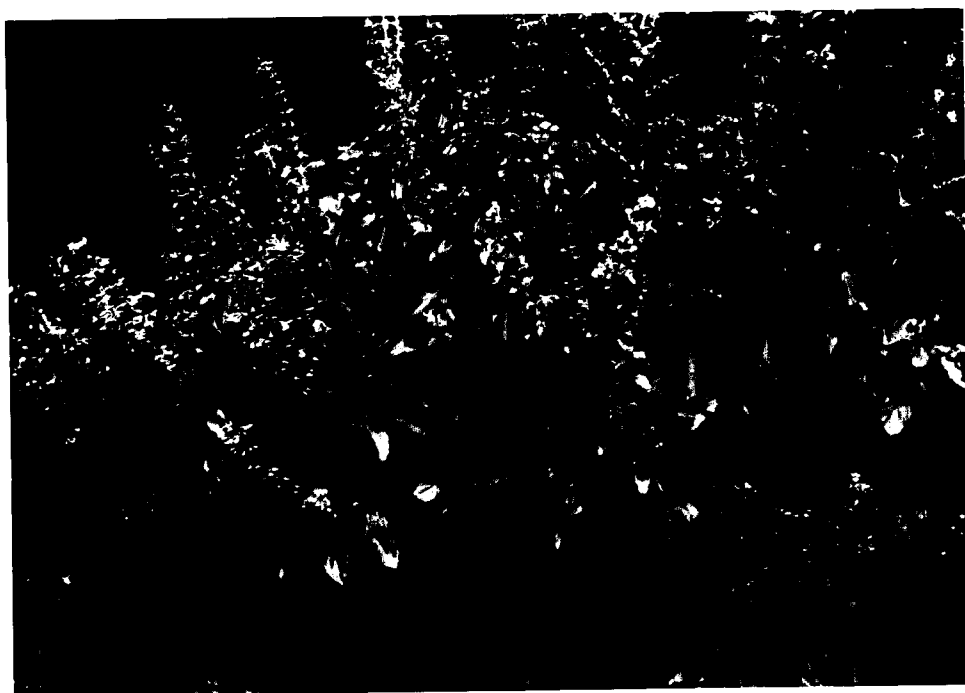
เป็นพืชในวงศ์ Labiatae 6 ชนิด ได้แก่ กะเพราขาว กะเพราแดง กะเพราผีแมงลัก สะระแหน่ โหระพา และพืชในตระกูล Gramineae หนึ่งชนิดได้แก่ ตะไคร้หอม พืชทดสอบเป็นพืชในระยะเจริญเติบโตเต็มที่ ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์และมีนาคม พืชทั้ง 7 ชนิด เป็นพืชที่ปลูกในแปลงเพาะปลูกของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ปลอดจากสารฆ่าแมลงรายละเอียดยของพืชที่ใช้สกัดสารแสดงไว้ในตารางที่ 1 และรูปที่ 5 - 11

ตารางที่ 1 พืชที่ใช้ทดสอบหาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย ในการป้องกัน และกำจัดยุงลาย

วงศ์	ชื่อพืช	ชื่อสามัญ		ชื่อวิทยาศาสตร์
		ภาษาไทย	ภาษาอังกฤษ	
Labiatae	กะเพรา	-	- holy basil - sacred basil	<i>Ocimum sanctum</i> L.
	- กะเพราขาว - กะเพราแดง	- -		- white variety - red variety
	กะเพราผี	- แมงลักคา - แมงลักป่า	- wild spikenard - bush-tea-bush	<i>Hyptis suaveolens</i> Poit.
	แมงลัก	- ก้อมก้อขาว - มังลัก	- hairy basil - hoary basil	<i>Ocimum americanum</i> L. หรือ <i>Ocimum canum</i> Sims
	สะระแหน่	- มักเงาะ - สะแน - สะระแหน่สวน - หอมด่วน	- kitchen mint - field mint - coen mint - wild pennyroyal	<i>Mentha arvensis</i> L.

ตาราง 1 พืชที่ใช้ทดสอบหาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย ในการป้องกัน และกำจัดยุงลาย (ต่อ)

วงศ์	ชื่อพืช	ชื่อสามัญ		ชื่อวิทยาศาสตร์
		ภาษาไทย	ภาษาอังกฤษ	
Labiatae	โหระพา	- ห่อขาวชวช - ห่อวช - อิ่มคิมขาว - หล่อเล็ก	- common basil - sweet basil	<i>Ocimum basilicum</i> L.
Gramineae	ตะไคร้หอม	- ตะไคร้แดง	- citronella grass	<i>Cymbopogon nardus</i> Rendle



รูปที่ 5 กระเพราขาว *Ocimum sanctum* L. (white variety)



รูปที่ 6 กระเพราแดง *Ocimum sanctum* L. (red variety)



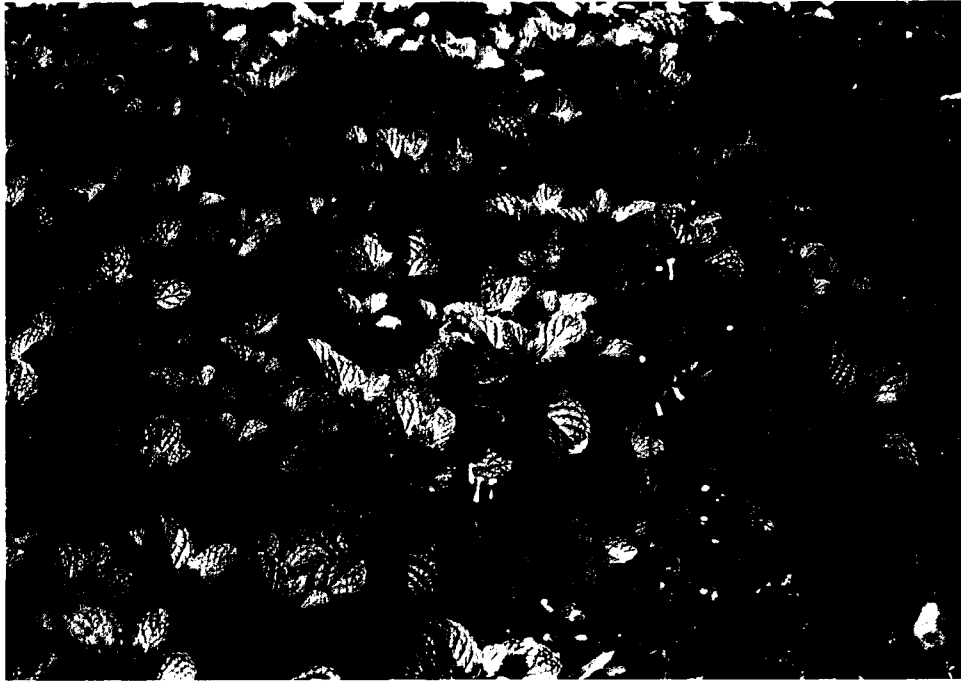
รูปที่ 7 กะเพราผี *Hyptis suaveolens* Poit.



รูปที่ 8 แมงลัก *Ocimum americanum* L.



ก. ๕๓๒๖๑



รูปที่ 9 สะระแหน่ *Mentha arvensis* L.



รูปที่ 10 โหระพา *Ocimum basilicum* L.



รูปที่ 11 ตะไคร้หอม *Cymbopogon nardus* Rendle

1.3. การสกัดน้ำมันหอมระเหย

โดยการนำพืชสดทั้งส่วนใบและกิ่งก้านที่อยู่บนดิน ของพืชในวงศ์ Labiatae และส่วน ลำต้นและกาบใบของตะไคร้หอม ทำความสะอาดแล้วนำมาหั่นซอยเป็นชิ้นขนาดกว้างประมาณ 0.5 เซนติเมตร เมื่อซังน้ำหนักแล้วนำไปสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี Steam distillation เครื่องที่ใช้สกัด เป็นขนาดที่สกัดพืชสดได้ครั้งละประมาณ 300 - 500 กรัม เมื่อใส่พืชสดแล้วให้ เติมน้ำสะอาดลงไปจนพืชให้ท่วมพืชพอดี เปิดเครื่องให้ hot plate ทำงาน ใช้เวลาสกัด ประมาณ 10 ชั่วโมง จะได้น้ำมันหอมระเหยลอยอยู่บนกะเปาะของชุดต้มกลั่น ใช้ปิเปตดูดส่วนที่เป็นน้ำมันออกมา นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดไปเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกน้ำที่ติดมาให้ออกจากน้ำมันหอมระเหย เสร็จแล้ว ดูดเอาส่วนน้ำมันหอมระเหยซึ่งอยู่ด้านบนออกมาวัดปริมาตร และซังน้ำหนักน้ำมันหอมระเหยที่ได้ จากน้ำหนักพืชสดที่ใช้สกัดแต่ละครั้ง นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้ใส่ขวดที่ปิดฝาสนิทและนำไปเก็บ ในช่อง freezer ของตู้เย็น

2. วิธีทดสอบ และวิเคราะห์ข้อมูล

2.1. ทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย โดยละลายน้ำมันหอมระเหย ปริมาตร 0.3-0.5 มิลลิลิตร กับสารช่วยการกระจายตัว triton x-100 0.15 มิลลิลิตร ในน้ำให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตรเพื่อเป็น stock solution และจาก stock solution นำมาผสมน้ำประปา ที่ผ่านเครื่องกรองแล้ว ให้มีปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ทำการทดสอบกับลูกน้ำยุงลายระยะ 2 และระยะ 4 โดยทดสอบจำนวนลูกน้ำ 25 ตัว ต่อ น้ำ 250 มิลลิลิตร ที่ผสมด้วยน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และในแต่ละความเข้มข้นจะทำการ ทดสอบ 4 ซ้ำ การประเมินผลโดยตรวจดูจำนวนตายที่ 24 ชั่วโมง คำนวณปรับค่าอัตราตายด้วย Abbott's formula (Abbott, 1925) หลังจากการทดสอบแล้วคำนวณหาค่า LC₅₀ และ LC₉₅ โดยวิธี probit analysis (Finney, 1971; Heinrichs et al., 1981; Zhung-Ming and Finney, 1984; Skovmand, 1988)

2.2. ทดสอบประสิทธิภาพในการ knock down โดยดูดยุงตัวเมียด้วย aspirator จากกรงเลี้ยงยุงจำนวน 25 ตัว ใส่ในกรงทดสอบซึ่งทำด้วยตะแกรง สแตนเลส ทรงกระบอก ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 ซม. สูง 14 ซม. ส่วนปลายจะเป็นทางเปิดออกและมีเกลียวที่สามารถสวมเข้ากับชุดทดสอบมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก (WHO, 1981) ซึ่งเป็นพลาสติกที่มีขนาดเดียวกัน โดยจะมีส่วนของประตูที่สามารถเลื่อนปิดและเปิดได้

นำกรงทดสอบที่มียุงทดสอบ 25 ตัว ไปวางในตู้ทดสอบพ่นเคมี ซึ่งเป็นตู้กระจกทุกด้าน (glass chamber method) ที่มีขนาด 70 x 70 x 70 ลูกบาศก์เซนติเมตร (รูปที่ 12) โดยมีด้านหนึ่งเป็นประตูตรงส่วนกลางประตูด้านล่างจะเป็นบานเลื่อนเปิดปิดได้ ใช้เปิดขณะพ่นเคมี (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2529) น้ำมันหอมระเหยจากพืชแต่ละชนิดผสมด้วย acetone ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 10 ของน้ำมันหอมระเหย ผูดด้วยปิเปต จำนวน 0.7 มิลลิลิตร ใส่ในถ้วยของ spray gun (Iwata RG-2) ที่ต่อ เข้ากับปั๊มลมไฟฟ้าโดยเปิดเครื่อง ให้มีความดัน 2 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ใช้ spray gun ที่มีน้ำมันหอมระเหยใน acetone พ่นผ่านประตูบานเลื่อนสำหรับพ่นเคมี เป็นละอองฝอยให้กระจายพ่นทั่วตู้ทดสอบ (รูปที่ 13) ปิดประตูบานเลื่อนและทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที นำกรงยุงทดสอบมาตรวจนับจำนวนยุงที่ถูก knock down และถ่ายยุงใส่ในภาชนะสะอาดที่มีสาลีชุบน้ำหวาน 5-10 % อยู่ด้วยแล้ว

นำใบเลี้ยงวุ้นในห้องที่มีอุณหภูมิ 28-30 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 70-80 % เมื่อเลี้ยงไว้ครบ 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนยุงที่ตาย

สำหรับน้ำมันหอมระเหยที่ไม่มีผลในการ knock down ยุง จะทำการทดสอบซ้ำที่ความเข้มข้น 20% ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่มีผลในการ knock down และฆ่ายุง จะทำการทดสอบต่อที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำให้ยุงลาย knock down ที่ 30 นาที เพื่อหาค่า KC₅₀ และ KC₉₅

การทดสอบที่แต่ละความเข้มข้นและชุดเปรียบเทียบ ซึ่งเป็น acetone อย่างเดียว จะทำการทดสอบ 4 ซ้ำ ปรับค่าจำนวนยุง knock down และจำนวนยุงตายด้วย Abbott's formula (Abbott, 1925) และคำนวณปรับค่าประสิทธิภาพโดยใช้ probit analysis



รูปที่ 12 กรงใส่ยุงลายทดสอบประสิทธิภาพการ knock down ของน้ำมัน
หอมระเหยในตู้ทดสอบ



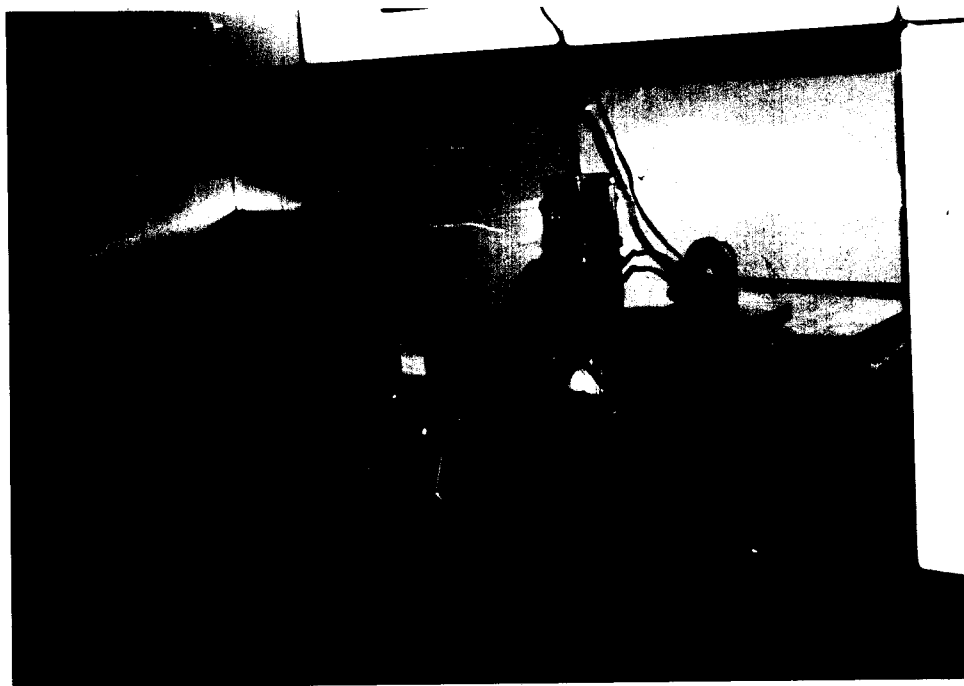
รูปที่ 13 หัวพ่น (spray gun) สำหรับพ่นน้ำมันหอมระเหยเข้าในตู้ทดสอบการ
knock down ยุงลาย

2.3. การทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันยุง

ทดสอบโดยใช้เครื่อง olfactometer (รูปที่ 14) ที่มีหนูขาวเป็นเหยื่อล่อและทดสอบกับ ยุงลายตัวเมีย (Busvine, 1971) โดยละลายน้ำมันหอมระเหยด้วย acetone ที่ความเข้มข้น ต่าง ๆ แล้วใช้ ปิเปต ดูดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปหยดบนแผ่นกระดาษกรองเบอร์ 4 ขนาด 7 x 10 ตารางเซนติเมตร ให้ทั่วพอดี แล้วนำไปวางในเครื่องทดสอบการป้องกันยุง ที่สร้าง ดัดแปลงมาจาก olfactometer รูปทรง ตัว "Y" ซึ่งมีการไหลเวียนอากาศ ควบคุมอุณหภูมิ และความชื้น (Granett and Starnes, 1960) ประกอบด้วยกรงยุงอยู่สองด้าน ในกรงมี หนูขาวสองตัว (รูปที่ 15) อยู่ในกรงทั้งสองด้านเพื่อล่อกลิ่นล่อยุง ตรงกลางระหว่างกรงยุงเป็น ห้องสำหรับปล่อยยุงเข้าไป มีขนาดกว้าง 10 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร และยาว 20 เซนติเมตร ระหว่างห้องยุง และกรงยุงทั้ง 2 ข้าง ต่อด้วยอุโมงค์ที่มีขนาดเท่าห้องยุง โดย ตรงกลางอุโมงค์วางไว้ด้วยแผ่นเอียง 45 องศา ข้างละแผ่นสำหรับวางกระดาษกรองที่หยด น้ำมันหอมระเหยข้างหนึ่งและเป็น acetone ซึ่งเป็นชุดเปรียบเทียบกับอีกข้างหนึ่ง บนอุโมงค์ทั้งสอง ข้างมีพัดลมดูดอากาศข้างละตัวเพื่อให้เกิดการหมุนเวียนอากาศ (กลิน, 2535)

ยุงลายทดสอบเป็นยุงตัวเมียอายุ 3-5 วัน ที่ยังไม่เคยกินเลือด จำนวนยุงทดสอบครั้งละ 25 ตัว เมื่อวางกระดาษกรองที่มีน้ำมันหอมระเหยข้างหนึ่ง และเป็น acetone อีกด้านหนึ่งแล้ว จึงปล่อยยุงเข้าห้องยุงตรงกลาง ทิ้งไว้หนึ่งนาทีแล้วเปิดประตูกั้นให้ยุงบินเข้าอุโมงค์ทั้งสองข้าง โดยอิสระ นับจำนวนยุงที่บินผ่านกระดาษกรองไปหาหนูในกรงยุงทั้ง 2 ข้าง เป็นเวลา 10 นาที โดยนับจำนวนยุงที่บินผ่านทุกนาที ทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ให้ผลในการป้องกันยุงและ านแต่ละความเข้มข้น ทดสอบ 4 ซ้ำ โดยสลับข้างที่มีน้ำมันหอมระเหย และชุดเปรียบเทียบกับข้างละ 2 ซ้ำ

การคำนวณการป้องกันยุง โดยหาค่าจำนวนยุงที่น่าจะบินไปข้างซ้ายและขวา = $(T+C)/2$ (T เป็นจำนวนยุงที่บินไปข้าง treatment ส่วน C เป็นจำนวนยุงที่บินไปข้าง control) เพราะ ฉะนั้นจำนวนยุง T+C ป้องกันยุงได้ = $[(T+C)/2]-T$ นำค่าที่ได้คำนวณหาค่า EC_{50} และ EC_{95} โดย Probit analysis



รูปที่ 14 เครื่องทดสอบการป้องกันยุ้งลาย



รูปที่ 15 หนูขาวที่ใส่ไว้ในกรงเพื่อล่าให้ยุ้งบินมากินเลือด

2.4. การทดสอบประสิทธิภาพการทาสารป้องกันยุงกัดและความเป็นพิษต่อผิวหนัง

โดยการนำเอาน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพในการทดสอบการป้องกันยุงมาละลายด้วย acetone ให้มีความเข้มข้น 1% แล้วใช้ ปิเปต คูดสารทดสอบปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทาบน ผิวแขนด้านใน พื้นที่ขนาด 3×10 ตารางเซนติเมตร ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วสวมถุงมือยางเปิด เฉพาะบริเวณทาสาร ยื่นเข้าไปในกรงยุง ซึ่งมียุงลายตัวเมียอายุ 3-5 วัน ที่ยังไม่กินเลือด จำนวน 250 ตัว (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2529ก) บันทึกจำนวนยุงลายที่ลง เกาะกัดเป็นเวลา 3 นาที ในขณะที่เดียวกันบันทึกความผิดปกติบนผิวเนื่องจากการทาสารด้วย

ผู้ทดสอบจำนวน 6 คน จะทดสอบทั้ง 2 แขน ซึ่งทาสารไม่เหมือนกัน รวมทั้งสาร เปรียบเทียบที่เป็น acetone เพียงอย่างเดียว การเลือกแขนใดทาสารใดโดยวิธีจับสลาก สาร แต่ละชนิดจะต้องทาแขนซ้าย 2 ข้าง และแขนขวา 2 ข้าง รวมเป็น 4 ข้าง

กรงยุงทดสอบครั้งละ 2 กรง ให้ยื่นแขนซ้ายและแขนขวาเข้าข้างละกรง และทดสอบ พร้อมกัน คำนวณประสิทธิภาพการป้องกันยุงกัดโดยเปรียบเทียบกับสารเปรียบเทียบ โดยถือว่า สารเปรียบเทียบป้องกันได้เท่ากับ 0 ผลการทดสอบวิเคราะห์ทางสถิติโดย Analysis of variance และ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับ ความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 (Gomez and Gomez, 1984)