

การพัฒนาผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ที่ต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงจากน้ำมันหอมระเหยในรูปแบบไมโครอิมัลชัน

ภาณุกิจ กันหาจันทร์¹ ศรีสุตา สมัยใหม่² จักรวาล ชมภูศรี¹ สรียา เรืองพัฒน์พงศ์³ พายุ ภักดีนวน¹ ษญาดา ขำสวัสดิ์¹ นาวี ศรีวรมย์¹ และเกรียงศักดิ์ ฤชุศาสตร์¹

¹กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

²มหาวิทยาลัยสวนดุสิต ดุสิต กรุงเทพมหานคร 10300

³สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย คลองหลวง ปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ ปัจจุบันมีการใช้สารเคมีกำจัดแมลงปริมาณมากเพื่อควบคุมยุงพาหะโรคไข้เลือดออก ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมและยุงต้านทานต่อสารเคมี จึงควรมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเพื่อลดผลกระทบดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 10 ชนิด (โหระพา กานพลู ยูคาลิปตัส อบเชยจีน ตะไคร้บ้าน ตะไคร้หอม มะกรูด ส้ม ส้มเขียวหวาน กระชาย) ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านสายพันธุ์จากห้องปฏิบัติการ (Lab strain) และสายพันธุ์ต้านทานต่อสารเคมี (Resistant strain) ผลการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยโหระพา กานพลู และยูคาลิปตัส มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain มีค่า LC_{50} เท่ากับ 62.8, 66.0 และ 77.4 ppm ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพต่อลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain มีค่า LC_{50} เท่ากับ 72.3, 83.1 และ 109.6 ppm ตามลำดับ จึงนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และศึกษาประสิทธิภาพต่อลูกน้ำยุงลายบ้านทั้ง Lab strain และ Resistant strain ในระดับกึ่งภาคสนามนาน 5 สัปดาห์ สำหรับลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain พบว่า มีอัตราการตายร้อยละ 100, 66.7, 57.7, 36.7 และ 0 ตามลำดับ ส่วนผลต่อลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain พบว่า มีอัตราการตายร้อยละ 100, 61.7, 46.7, 33.3 และ 0 ตามลำดับ สรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุงในรูปแบบไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมมีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงลายได้ดี สามารถนำไปใช้ในการควบคุมลูกน้ำยุงลายในธรรมชาติได้

คำสำคัญ: ฤทธิ์กำจัดลูกน้ำยุง, ไมโครอิมัลชัน, น้ำมันหอมระเหย, ลูกน้ำยุงต้านทานสารเคมี

Corresponding author E-mail: phanukit.k@dmsc.mail.go.th

Received: 15 October 2020

Revised: 30 November 2020

Accepted: 8 December 2020

บทนำ

ในประเทศไทยมีโรคติดต่อที่นำโดยแมลงอยู่หลายโรคด้วยกัน ยุงลายบ้านเป็นแมลงชนิดหนึ่งที่เป็นพาหะหลักนำโรคติดต่อที่กำลังเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศ ได้แก่ โรคไข้เลือดออก โรคชิคุนกุนยา และโรคติดเชื้อไวรัสซิกา ปัจจุบันมาตรการหลักในการป้องกันโรครยังคงให้ความสำคัญกับการกำจัดหรือการควบคุมยุงพาหะนำโรค ถึงแม้ว่าในปัจจุบันได้มีวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกที่ชื่อเต็งวาเซียร์แล้ว แต่สามารถป้องกันการเกิดโรคได้เพียงร้อยละ 65.6⁽¹⁾ ที่ผ่านมามีการนำสารเคมีกำจัดแมลงมาใช้ในการควบคุมยุงพาหะหลายชนิดในกลุ่ม Organophosphate เช่น มาลาไรออน (malathion) และเฟนิโตรไธออน (fenitrothion) กลุ่ม Carbamate เช่น โพรพ็อกเซอร์ (propoxur), เบนไดโอคาร์บ (bendiocarb) กลุ่ม Synthetic pyrethroids เช่น เดลตาเมธริน (deltamethrin), เพอร์เมธริน (permethrin) เป็นต้น แต่การใช้สารเคมีกำจัดแมลงนั้นทำให้เกิดสารตกค้างเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ นอกจากนี้ยังทำให้ยุงเกิดการต้านทานต่อสารเคมี ดังนั้นเพื่อเป็นการลดผลกระทบที่เกิดขึ้นดังกล่าว น้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาทดแทนการใช้สารเคมี เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรมีพิษต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยงต่ำ และมีรายงานว่า องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยของพืชหลายชนิด เช่น geraniol, methyl chavicol, eucalyptol, limonene, linalool, citronellal และ eugenol มีฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงและไล่ยุงได้⁽²⁾

Azhari, H.N. และคณะ ปี 2012 รายงานว่า จากการศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) ระยะที่ 3 ของน้ำมันหอมระเหยโหระพา (*Ocimum bacillicum*) โดย methyl chavicol (MCV) accession ให้ค่า LC_{50} และ LC_{90} เท่ากับ 160 และ 262 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ สำหรับ geraniol-geraniol (GGV) accession ให้ค่า LC_{50} และ LC_{90} เท่ากับ 174 และ 356 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ แสดงว่า MCV accession มีประสิทธิภาพดีกว่า GGV accession และเมื่อวิเคราะห์ methyl chavicol accession ด้วย GC-MS พบว่ามีองค์ประกอบดังนี้ คือ methyl chavicol (43%), linalool (17.55%), geraniol (13.73%), eucalyptol (5.00%), methyl cinnamate (5.00%), α -bergamotene (3.22%) และ eugenol (2.79%) รวมทั้ง β -pinene, β -myrcene, caryophyllene, germacrene และ β -ocimene (1.00-1.89%) สำหรับวิเคราะห์ GGV accession ด้วย GC-MS พบว่ามีองค์ประกอบ ดังนี้ geraniol (68.42%), geraniol (9.61%), linalool (8.12%) รวมทั้ง β -ocimene และ caryophyllene (1.05-2.90%)⁽²⁾

Dalia, I.H. และคณะ ปี 2013 รายงานว่า จากการศึกษาองค์ประกอบหลักทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม (*Citrus sinensis*) ทั้งเปลือกส้มดิบและเปลือกส้มสุก พบว่ามีสารลิโมนีน (limonene) ร้อยละ 80.14 และร้อยละ 80.93 ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากใบส้ม พบว่ามี terpinen-4-ol ร้อยละ 14.1 เป็นองค์ประกอบหลักสำหรับน้ำมันหอมระเหยจากดอกส้ม พบว่ามีสาร sabinene เป็นองค์ประกอบหลักและพบสารลิโมนีนเป็นองค์ประกอบรอง และจากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากส้มในการกำจัดลูกน้ำยุง ระยะที่ 4 ของยุงรำคาญ *Culex pipiens* พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มมีประสิทธิภาพดีที่สุด รองลงมา คือ น้ำมันหอมระเหยจากใบส้ม และจากดอกส้มด้วย LC_{50} อยู่ในช่วง (20-160 ppm)⁽³⁾

ผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดที่จะใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่มีองค์ประกอบทางเคมีของสารเหล่านี้ เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน ทั้งลูกน้ำยุงลายบ้านจากห้องปฏิบัติการและลูกน้ำยุงลายบ้านจากแม่งูที่มีความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงที่เก็บมาจากพื้นที่ศึกษา (จังหวัดจันทบุรี) โดยน้ำมันหอมระเหย

ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดจะถูกนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุงเพื่อตัดวงจรการเกิดโรคไข้เลือดออก โรคชคุณกุนยา และโรคติดเชื้อไวรัสซิกา นอกจากนี้ยังเป็นการส่งเสริมการใช้สมุนไพรในท้องถิ่นที่มีอยู่จำนวนมากให้เกิดประโยชน์สูงสุดและยังสามารถช่วยลดต้นทุนการนำเข้าสารเคมีสังเคราะห์ที่ส่งผลเสียต่อสุขภาพของประชาชนและสิ่งแวดล้อม วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการและกึ่งภาคสนาม และศึกษาขนาดอนุภาค การกระจายตัว และศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวของไมโครอิมัลชัน ที่พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านที่ต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลง

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย 10 ชนิด (โหระพา กานพลู ยูคาลิปตัส อบเชยจีน ตะไคร้บ้าน ตะไคร้หอม มะกรูด ส้ม ส้มเขียวหวาน และกระชาย) ซื้อมาจากบริษัท อุตสาหกรรมเครื่องหอมไทยจีน จำกัด เตรียมสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเจือจางด้วย 1% Tween 20 โดยใช้ 1% Tween 20 เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control)

สารสังเคราะห์ลิโมนีนของ Sigma Aldrich, USA เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) ในการทดสอบกึ่งภาคสนาม

ชนิดของลูกน้ำยุงที่ใช้ในการวิจัย

ลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ระยะ 3-4 จากห้องปฏิบัติการ เป็น Lab strain

ลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ระยะ 3-4 จากแม่ยุงที่มีความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลง ที่เก็บมาจาก (จังหวัดจันทบุรี) เป็น Resistant strain

การเตรียมลูกน้ำยุงลายบ้านสำหรับการทดสอบ

สัตว์ที่ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ ลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ไข่ยุง ที่นำมาเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดลอง ได้รับการสนับสนุนจากฝ่ายพิพิธภัณฑ์แมลงและอนุกรมวิธานและสนับสนุนงานกีฏวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ได้จากการนำไข่ยุงที่ติดบนกระดาษกรองลงฟักในถาดพลาสติก ใช้ระยะเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นไข่จะเริ่มฟักเป็นลูกน้ำยุงระยะที่ 1 เริ่มให้อาหารหนูบดละเอียด และเลี้ยงลูกน้ำยุงลายระยะเวลาประมาณ 4-5 วัน จะได้ลูกน้ำยุงระยะที่ 3 ถึงระยะที่ 4 ที่อุณหภูมิ 28-30 °C สามารถนำไปใช้ทดลองได้ โดยแบ่งเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองอย่างละ 20 ตัว ในแต่ละระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ

การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุง (Larvicidal activity)

การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุง ดัดแปลงมาจากวิธีของ Pedro M. Gutierrez, Jr. และคณะ (2014)⁽⁴⁾

1. เตรียมสารละลายของน้ำมันหอมระเหยที่แต่ละระดับความเข้มข้นจาก 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 และ 1,000 ppm ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 400 มิลลิลิตร (5 ซ้ำ)
2. ควบคุมสภาวะแวดล้อมของการทดลองที่อุณหภูมิ 27±2 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 75-85% RH
3. เติมลูกน้ำยุงระยะ 3 ตอนปลาย หรือ 4 ตอนต้น จำนวน 20 ตัว ใส่ลงในสารละลายของน้ำมันหอมระเหยที่แต่ละระดับความเข้มข้น ปริมาตร 200 มิลลิลิตร
4. ใช้ 1% Tween 20 ซึ่งเป็นตัวทำลายเป็นกลุ่มควบคุม

5. บันทึกผลจำนวนการตายของลูกน้ำหลังจาก 24 และ 48 ชั่วโมง ของการทดสอบ และประเมินผลทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การตายของลูกน้ำโดยใช้ Abbott's formula และคำนวณหาค่าอัตราการตายของลูกน้ำ (LC_{50}) โดยใช้ Probit analysis

สำหรับลูกน้ำยุงลายบ้านที่เก็บมาจากพื้นที่ศึกษาที่มีรายงานยุงลายต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลง deltamethrin และ cypermethrin จะนำมาทดสอบยืนยันความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลง deltamethrin และ cypermethrin ในห้องปฏิบัติการโดยวิธี WHO standard susceptibility test ถ้าพบว่ายุงลายบ้านจากจังหวัดจันทบุรีมีอัตราการตายน้อยกว่าร้อยละ 90 แสดงว่ายุงลายบ้านมีความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงที่ทดสอบตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก และนำไปทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงเช่นเดียวกันกับทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการ

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านจากห้องปฏิบัติการและลูกน้ำยุงลายบ้านจากแม่งที่มีมีความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงที่เก็บมาจากพื้นที่ศึกษา (น้ำมันหอมระเหยโหระพา กานพลู และยูคาลิปตัส) เพื่อหาเอกลักษณ์และปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค GC-MS โดยส่งตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

การพัฒนาตำรับและรูปแบบของสูตรผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุง และทดสอบประสิทธิภาพ

พัฒนาตำรับและรูปแบบของสูตรผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุง ผลิตภัณฑ์สมุนไพรเดี่ยวในรูปแบบไมโครอิมัลชัน การเตรียมไมโครอิมัลชันโดยวิธี low energy method⁽⁵⁾ ใช้ polysorbate 20 3.5 มิลลิลิตร กวนผสมกับ propylene glycol 3.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม essential oil ของน้ำมันโหระพา 2 มิลลิลิตร กวนส่วนผสมให้เข้ากันบน magnetic stirrer ด้วยความเร็ว 800 rpm เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมน้ำด้วยอัตราเร็ว 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที กวนส่วนผสมทั้งหมดด้วยอัตราเร็วเดิม เป็นเวลา 60 นาที แล้วส่งทำการวัดขนาดอนุภาค (Droplet size และ polydispersity ด้วย Photon correlation spectroscopy (Zetasizer ZS, Malvern, UK)) และศึกษาความคงตัวของตำรับอิมัลชันโหระพา ทำการทดสอบภายใต้ 40°C, 75% RH ณ เวลา 1, 7, 21, 30 และ 60 วัน หลังการเตรียม (ภาพที่ 1)

พัฒนาตำรับและรูปแบบของผลิตภัณฑ์สมุนไพรรวมในรูปแบบไมโครอิมัลชัน การเตรียมไมโครอิมัลชันโดยวิธี low energy method ใช้ polysorbate 20 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ผสมกับ propylene glycol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กวนเป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม Cremophor RH 40 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กวนเป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม plantacare 1200 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กวนเป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม essential oil ของน้ำมันโหระพา กานพลู และยูคาลิปตัส ปริมาตร 5, 4, 4 มิลลิลิตร ตามลำดับ กวนส่วนผสมให้เข้ากันบน magnetic stirrer ด้วยความเร็ว 800 rpm เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมน้ำด้วยอัตราเร็ว 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที กวนส่วนผสมทั้งหมดด้วยอัตราเร็วเดิม เป็นเวลา 60 นาที แล้วส่งทำการวัดขนาดอนุภาค (Droplet size และ polydispersity ด้วย Photon correlation spectroscopy (Zetasizer ZS, Malvern, UK)) และศึกษาความคงตัวของตำรับอิมัลชันสมุนไพรรวม ทำการทดสอบภายใต้ 40°C, 75% RH ณ เวลา 1, 7, 21, 30 และ 60 วัน (ภาพที่ 2)

หลังการเตรียมแล้ว ทำการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้น ทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านจากห้องปฏิบัติการและลูกน้ำยุงลายบ้านจากแม่งที่มีมีความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงที่เก็บมาจากพื้นที่ศึกษา โดยทดสอบประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์เดี่ยวของน้ำมันหอมระเหยโหระพา และสูตรผลิตภัณฑ์สมุนไพรรวม ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้านทั้งสอง strain ทั้งในห้องปฏิบัติการและในกึ่งภาคสนาม



ภาพที่ 1 ไมโครอิมัลชันสมุนไพรเดี่ยวโหระพา



ภาพที่ 2 ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม

การศึกษาขนาด การกระจายตัวของอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวของอิมัลชันโหระพา และอิมัลชันสมุนไพรรวม

ขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค (size and polydispersity index; PDI): วัดด้วยเครื่อง Zeta Sizer (NanoZS, Mavernt, UK) ที่อุณหภูมิ 25°C โดยใช้เทคนิค Photon correlation spectroscopy (PCS) วัดซ้ำ 3 ครั้ง ($n=3$) โดยวิธีการทดสอบดัดแปลงจากวิธีของ Soradech และคณะ (2018)⁽⁶⁾

การวิเคราะห์ขนาดอนุภาคก่อนและหลังการใช้ผลิตภัณฑ์ในช่วงเวลาต่าง ๆ

ใช้สถิติ one way ANOVA

การศึกษาความคงตัวทางเคมีกายภาพของไมโครอิมัลชันน้ำมันหอมระเหย

การศึกษาความคงตัวของตำรับอิมัลชันโหระพา และอิมัลชันสมุนไพรรวม ทำการทดสอบภายใต้ 40°C, 75% RH เป็นเวลา 2 เดือน ซึ่งวิธีการทดสอบดัดแปลงจากวิธีของ Soradech และคณะ (2018)⁽⁶⁾ โดยคุณลักษณะทางเคมีกายภาพที่ทำการทดสอบ ได้แก่ ขนาด การกระจายอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว โดยใช้เครื่อง Zeta sizer NanoZS (Mavernt, ประเทศอังกฤษ) ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 เครื่องวัดขนาดการกระจายอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว Zeta sizer Nano ZS (Mavernt, ประเทศอังกฤษ)

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์เดี่ยวของน้ำมันหอมระเหยโหระพา และสูตรผลิตภัณฑ์สมุนไพรรวม ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน **Lab strain** ในระดับห้องปฏิบัติการ⁽⁴⁾

1. เตรียมสูตรไมโครอิมัลชันโหระพา (โหระพา + น้ำ + Tween 20 + propylene glycol) (2:1:3.5:3.5) และสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200+ น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1:1) ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 400 มิลลิลิตร (5 ขั้ว)
2. ควบคุมสภาวะแวดล้อมของการทดลองที่อุณหภูมิ $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ 75–85 %RH
3. เติมลูกน้ำยุงลายบ้านจากห้องปฏิบัติการระยะ 3 หรือ 4 จำนวน 20 ตัว ใส่ลงในสารละลายของน้ำมันหอมระเหย ที่แต่ละระดับความเข้มข้นปริมาตร 200 มิลลิลิตร
4. ใช้ (น้ำ + Tween 20 + propylene glycol) (1:3.5:3.5) ซึ่งเป็นตัวทำละลาย และน้ำประปาเป็นกลุ่มควบคุม
5. บันทึกผลจำนวนการตายของลูกน้ำหลังจาก 24 และ 48 ชั่วโมงของการทดสอบ และประเมินผลทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การตายของลูกน้ำโดยใช้ Abbott's formula และคำนวณหาค่าอัตราการตายของลูกน้ำ (LC₅₀) โดยใช้ Probit analysis

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์เดี่ยวของน้ำมันหอมระเหยโหระพา และสูตรผลิตภัณฑ์สมุนไพรรวม ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน **Resistant strain** ในระดับห้องปฏิบัติการ⁽⁴⁾

ดำเนินการแบบเดียวกันกับ Lab strain ยกเว้นข้อ 3 ใช้ลูกน้ำยุง Resistant strain

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน **Lab strain** ในระดับกึ่งภาคสนาม (โอ่งมังกร ขนาด 180 ลิตร, $n=3$) วิธีการทดสอบดัดแปลงตามวิธีของ Thanyalak และคณะ (2006)⁽⁷⁾ ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงวิธีการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ในระดับกึ่งภาคสนาม (โอ่งมังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$)

1. เตรียมสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1) และสูตรลิโมนีน (limonene + Tween 20 + น้ำ) (4:12:1) ใส่ลงในโถงมุ้งที่มีน้ำประปาปริมาณ 180 ลิตร (3 ชั่วโมง)
2. คนสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน เป็นเวลา 30 นาที
3. เติมลูกน้ำยุงลายบ้านจากห้องปฏิบัติการระยะ 3 หรือ 4 จำนวน 20 ตัว ใส่ลงในสารละลายของสูตรน้ำมันหอมระเหยที่แต่ละสูตรปริมาณ 180 ลิตร
4. ใช้ (Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (12:1:1:1:1) ซึ่งเป็นตัวทำละลาย และน้ำประปาเป็นกลุ่มควบคุม
5. บันทึกผลจำนวนการตายของลูกน้ำหลังจากวันแรก สัปดาห์ที่ 2 สัปดาห์ที่ 3 สัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่ 5 ของการทดสอบ
6. บันทึกอุณหภูมิตลอดการทดลอง และวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าความขุ่นของน้ำก่อนและหลังการทดสอบ

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ต่ออัตราการตาย (% Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน (Resistant strain) ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมุ้ง ขนาด 180 ลิตร, $n=3$) ดำเนินการแบบเดียวกับ Lab strain กึ่งภาคสนาม ยกเว้นข้อ 3 ใช้ลูกน้ำยุง Resistant strain

การวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิ, pH และค่าความขุ่นของน้ำ (O.D.) ก่อนและหลังการใช้ผลิตภัณฑ์ในทางสถิติ ในการวิเคราะห์ข้อมูลสภาพน้ำในโถงก่อนและหลังการทดลองใช้สถิติ t-test

ผล

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 10 ชนิด ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านจากห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุง (Larvicidal activity) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Pedro M.Gutierrez, Jr. และคณะ (2014) พบว่าน้ำมันหอมระเหยโหระพามีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน (Lab strain) รองลงมา คือ น้ำมันหอมระเหยกานพลูและน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 62.8, 66.0 และ 77.4 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 10 ชนิด ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain

สารทดสอบ	ความเข้มข้นในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain LC_{50} (ppm)
น้ำมันหอมระเหยโหระพา	62.8
น้ำมันหอมระเหยกานพลู	66.0
น้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส	77.4
น้ำมันหอมระเหยอบเชยจีน	78.2
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน	125.5
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอม	188.2
น้ำมันหอมระเหยมะกรูด	255.7
น้ำมันหอมระเหยส้ม	290.6
น้ำมันหอมระเหยส้มเขียวหวาน	312.5
น้ำมันหอมระเหยกระชาย	321.2

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 10 ชนิด ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน **Resistant strain**

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุง (Larvicidal activity) ตัดแปลงมาจากวิธีของ Pedro M. Gutierrez, Jr. และคณะ (2014) พบว่า น้ำมันหอมระเหยโหระพามีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน **Resistant strain** รองลงมา คือ น้ำมันหอมระเหยกานพลูและน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 72.3, 83.1 และ 109.6 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 10 ชนิด ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน **Resistant strain**

สารทดสอบ	ความเข้มข้นในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain LC_{50} (ppm)
น้ำมันหอมระเหยโหระพา	72.3
น้ำมันหอมระเหยกานพลู	83.1
น้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส	109.6
น้ำมันหอมระเหยอบเชยจีน	122.6
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน	184.3
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอม	289.6
น้ำมันหอมระเหยมะกรูด	344.3
น้ำมันหอมระเหยส้ม	397.5
น้ำมันหอมระเหยส้มเขียวหวาน	429.7
น้ำมันหอมระเหยกระชาย	512.0

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโหระพา น้ำมันหอมระเหยกานพลู และน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain และ Resistant strain (น้ำมันหอมระเหยโหระพา กานพลู และยูคาลิปตัส) เพื่อหาสารเอกลักษณ์และปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค GC-MS โดยส่งตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) พบว่าน้ำมันหอมระเหยโหระพา ส่วนใหญ่มีสาร methyl chavicol เป็นองค์ประกอบทางเคมีร้อยละ 84.45 นอกจากนี้ยังพบว่ามีสาร δ -3-carene, α -bergamotene และ 1,8-cineole ร้อยละ 6.62, 1.40 และ 0.69 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) น้ำมันหอมระเหยกานพลู ส่วนใหญ่มีสาร eugenol เป็นองค์ประกอบทางเคมีร้อยละ 91.61 นอกจากนี้ยังพบว่ามีสาร trans-caryophyllene และ α -humulene ร้อยละ 6.56 และ 1.83 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) น้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัสส่วนใหญ่มีสาร eucalyptol เป็นองค์ประกอบทางเคมีร้อยละ 82.15 นอกจากนี้ยังพบว่ามีสาร limonene, β -myrcene, α -pinene และ α -terpinene ร้อยละ 7.18, 4.43, 2.31 และ 2.23 ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโหระพา

Retention time	องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละ
6.70	1,8-cineole	0.69
16.32	δ -3-carene	6.62
17.22	α -bergamotene	1.40
19.82	Methyl chavicol	84.45

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยกานพลู

Retention time	องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละ
20.42	eugenol	91.61
22.07	Trans-caryophyllene	6.56
23.12	α -humulene	1.83

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส

Retention time	องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละ
6.33	α -pinene	2.31
9.00	β -myrecene	4.43
9.12	Limonene	7.18
9.50	Eucalyptol	82.15
10.07	α -terpinene	2.23

ผลการศึกษาขนาดอนุภาค การกระจายตัวของอนุภาค (PDI) และศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวของไมโครอิมัลชันโหระพา และไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม

จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างไมโครอิมัลชันโหระพา และไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) เพื่อวัดขนาดและการกระจายอนุภาค (size and polydispersity index; PDI): ซึ่งทำการวัดด้วยเครื่อง Zeta Sizer (NanoZS, Mavert, UK) ที่อุณหภูมิ 25°C โดยใช้เทคนิค photon correlation spectroscopy (PCS) ณ เวลา 1, 7, 21, 30 และ 60 วัน หลังการเตรียม วัดซ้ำ 3 ครั้ง ($n=3$) ดังภาพที่ 1 โดยวิธีการทดสอบตัดแปลงจากวิธีของ Soradech และคณะ (2018) พบว่าไมโครอิมัลชันโหระพาเริ่มต้นมีขนาดอนุภาคเท่ากับ 106.13 ± 1.26 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.29 ± 0.00 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -17.73 ± 2.10 ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 1 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 97.73 ± 1.20 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.47 ± 0.01 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -17.57 ± 1.22 ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 7 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 95.19 ± 0.67 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.43 ± 0.01 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -27.53 ± 1.19 ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 21 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 86.17 ± 0.41 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.51 ± 0.00 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -19.47 ± 1.72 ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 30 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 100.21 ± 1.90 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.42 ± 0.02 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -17.97 ± 1.22 ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 60 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 63.32 ± 0.50 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.53 ± 0.01 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -55.47 ± 4.78 (ตารางที่ 6)

ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมเริ่มต้น มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 82.59 ± 0.66 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.47 ± 0.00 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -27.23 ± 0.81 ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมวันที่ 1 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 95.44 ± 6.95 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.60 ± 0.04 มีค่าศักย์ไฟฟ้า

ที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -15.30 ± 1.57 ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมวันที่ 7 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 227.63 ± 45.87 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.33 ± 0.05 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -27.50 ± 0.36 ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมวันที่ 21 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 388.40 ± 3.77 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.51 ± 0.10 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -40.93 ± 4.40 ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมวันที่ 30 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 163.93 ± 46.19 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.31 ± 0.04 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -24.50 ± 2.43 ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม วันที่ 60 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 323.32 ± 0.50 nm มีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) เท่ากับ 0.53 ± 0.01 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV) เท่ากับ -55.47 ± 4.78 (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ขนาดอนุภาค การกระจายตัว (PDI) และศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวของไมโครอิมัลชันโหระพา และไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม

ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาค (nm)	การกระจายตัวของอนุภาค (PDI)	ศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (mV)
1. ไมโครอิมัลชันโหระพาเริ่มต้น	106.13 ± 1.26	0.29 ± 0.00	-17.73 ± 2.10
2. ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 1	97.73 ± 1.20	0.47 ± 0.01	-17.57 ± 1.22
3. ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 7	95.19 ± 0.67	0.43 ± 0.01	-27.53 ± 1.19
4. ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 21	86.17 ± 0.41	0.51 ± 0.00	-19.47 ± 1.72
5. ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 30	100.21 ± 1.90	0.42 ± 0.02	-17.97 ± 1.22
6. ไมโครอิมัลชันโหระพาวันที่ 60	63.32 ± 0.50	0.52 ± 0.01	-19.13 ± 0.81
7. ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมเริ่มต้น	82.59 ± 0.66	0.47 ± 0.00	-27.23 ± 0.81
8. ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมวันที่ 1	95.44 ± 6.95	0.60 ± 0.04	-15.30 ± 1.57
9. ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมวันที่ 7	227.63 ± 45.87	0.33 ± 0.05	-27.50 ± 0.36
10. ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมวันที่ 21	388.40 ± 3.77	0.51 ± 0.10	-40.93 ± 4.40
11. ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมวันที่ 30	163.93 ± 46.19	0.31 ± 0.04	-24.50 ± 2.43
12. ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมวันที่ 60	323.32 ± 0.50	0.53 ± 0.01	-55.47 ± 4.78

- จากการศึกษาขนาดอนุภาคของไมโครอิมัลชันโหระพาเริ่มต้น เท่ากับ 106.13 nm เมื่อเก็บภายใต้สภาวะ 40°ซ 75% RH เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ขนาดอนุภาคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จาก 106.13 nm เป็น 63.32 nm และค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดยลดลงจาก -17.73 mV เป็น -19.13 mV

- จากการศึกษาขนาดอนุภาคของไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมเริ่มต้น เท่ากับ 82.59 nm เมื่อเก็บภายใต้สภาวะ 40°ซ 75% RH เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จาก 82.59 nm เป็น 323.32 nm และค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยลดลงจาก -27.23 mV เป็น -55.47 mV

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันโหระพา และสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันโหระพา และสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน จากห้องปฏิบัติการ ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ร้อยละ 80.0±3.5 และ 84.0±4.2 ตามลำดับที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ร้อยละ 100.0±0.0 และ 100.0±0.0 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุม (น้ำประปา) และกลุ่มควบคุม (น้ำ + Tween 20+propylene glycol) (1:3.5:3.5) ไม่มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุง (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันโหระพา และสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับห้องปฏิบัติการ

กลุ่มทดสอบ	ระยะเวลาในการทดสอบ/อัตราการตาย (% Mortality)	
	24 hrs.	48 hrs.
กลุ่มควบคุม (น้ำประปา)	0.0±0.0	0.0±0.0
กลุ่มควบคุม (น้ำ + Tween 20 + propylene glycol) (1:3.5:3.5)	0.0±0.0	0.0±0.0
สูตรไมโครอิมัลชันโหระพา (โหระพา + น้ำ + Tween 20 + propylene glycol) (2:1:3.5:3.5)	80.0±3.5	100.0±0.0
สูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1:1)	84.0±4.2	100.0±0.0

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันโหระพา และสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันโหระพา และสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ร้อยละ 75.0±3.5 และ 81.0±2.2 ตามลำดับที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ร้อยละ 91.0±4.2 และ 92.0±2.7 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุม (น้ำประปา) และกลุ่มควบคุม (น้ำ + Tween 20 + propylene glycol) (1:3.5:3.5) ไม่มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุง (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันโหระพาและสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับห้องปฏิบัติการ

กลุ่มทดสอบ	ระยะเวลาในการทดสอบ/อัตราการตาย (%Mortality)	
	24 hrs.	48 hrs.
กลุ่มควบคุม (น้ำประปา)	0.0±0.0	0.0±0.0
กลุ่มควบคุม (น้ำ + Tween 20 + propylene glycol) (1:3.5:3.5)	0.0±0.0	0.0±0.0
สูตรไมโครอิมัลชันโหระพา (โหระพา + น้ำ + Tween 20 + propylene glycol) (2:1:3.5:3.5)	75.0±3.5	91.0±4.2
สูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200+ น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1:1)	81.0±2.2	92.0±2.7

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ต่ออัตราการตาย (% Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมังกร ขนาด 180 ลิตร, $n=3$)

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1:1) ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$) พบว่า มีประสิทธิภาพลดลงตามระยะเวลาทดสอบเพิ่มขึ้น คือ วันแรกของการทดลอง (Day 0) และที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ร้อยละ 100.0±0.0 และ 100.0±0.0 ตามลำดับ ส่วนสัปดาห์ที่ 2, 3, 4 และ 5 ร้อยละ 66.7±2.9, 57.7±2.9, 36.7±2.9 และ 0.0±0.0 ตามลำดับ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรลิโมนีน (limonene + Tween 20 + น้ำ) (4:12:1) ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$) พบว่า มีประสิทธิภาพลดลงตามระยะเวลาทดสอบเพิ่มขึ้น คือ วันแรกของการทดลอง (Day 0) และที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ร้อยละ 100.0±0.0 และ 100.0±0.0 ตามลำดับ ส่วนสัปดาห์ที่ 2, 3, 4 และ 5 ร้อยละ 70.0±5.0, 66.7±2.9, 50.0±0.0 และ 0.0±0.0 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุม (น้ำประปา) และกลุ่มควบคุม (Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (12:1:1:1:1) ไม่มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงตลอดระยะเวลาการทดสอบ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีนต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$)

กลุ่มทดสอบ	ระยะเวลาในการทดสอบ/อัตราการตาย (%Mortality)					
	Day 0	1 st week	2 nd weeks	3 rd weeks	4 th weeks	5 th weeks
กลุ่มควบคุม (น้ำประปา)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
กลุ่มควบคุม (Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (12:1:1:1:1)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
สูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1:1)	100.0±0.0	100.0±0.0	66.7±2.9	57.7±2.9	36.7±2.9	0.0±0.0
สูตรลิโมนีน (limonene + Tween 20 + น้ำ) (4:12:1)	100.0±0.0	100.0±0.0	70.0±5.0	66.7±2.9	50.0±0.0	0.0±0.0

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีนต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$)

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1:1) ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$) พบว่ามีประสิทธิภาพลดลงตามระยะเวลาทดสอบเพิ่มขึ้น คือ วันแรกของการทดลอง (Day 0) และที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ร้อยละ 100.0±0.0 และ 100.0±0.0 ตามลำดับ ส่วนสัปดาห์ที่ 2, 3, 4 และ 5 มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ร้อยละ 61.7±2.9, 46.7±2.9, 33.3±2.9 และ 0.0±0.0 ตามลำดับ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรลิโมนีน (limonene + Tween 20 + น้ำ) (4:12:1) ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$) พบว่ามีประสิทธิภาพลดลงตามระยะเวลาทดสอบเพิ่มขึ้น คือ วันแรกของการทดลอง (Day 0) และที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ร้อยละ 100.0±0.0 และ 100.0±0.0 ตามลำดับ ส่วนสัปดาห์ที่ 2, 3, 4 และ 5 มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ร้อยละ 65.0±0.0, 60.0±0.0, 41.7±2.9 และ 0.0±0.0 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุม (น้ำประปา) และกลุ่มควบคุม (Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (12:1:1:1:1) ไม่มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงตลอดระยะเวลาการทดสอบ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับกิ่งภาคสนาม (โถงมุ้งขนาด 180 ลิตร, $n=3$)

กลุ่มทดสอบ	ระยะเวลาในการทดสอบ/อัตราการตาย (%Mortality)					
	Day 0	1 st week	2 nd weeks	3 rd weeks	4 th weeks	5 th weeks
กลุ่มควบคุม (น้ำประปา)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
กลุ่มควบคุม (Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (12:1:1:1:1)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
สูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1:1)	100.0±0.0	100.0±0.0	61.7±2.9	46.7±2.9	33.3±2.9	0.0±0.0
สูตรลิโมนีน (limonene + Tween 20 + น้ำ) (4:12:1)	100.0±0.0	100.0±0.0	65.0±0.0	60.0±0.0	41.7±2.9	0.0±0.0

ผลการศึกษาค่าพารามิเตอร์ (Temp, pH, O.D.) ของน้ำที่ใช้ก่อนและหลังการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ต่ออัตราการตาย (%Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับกิ่งภาคสนาม (โถงมุ้งขนาด 180 ลิตร, $n=3$)

จากการศึกษาค่าพารามิเตอร์ (Temp., pH, O.D.) ของน้ำที่ใช้ก่อนและหลังการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ต่ออัตราการตาย (% Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับกิ่งภาคสนาม (โถงมุ้งขนาด 180 ลิตร, $n=3$) พบว่าอุณหภูมิของน้ำก่อนและหลังการทดสอบไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง กลุ่มทดสอบสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมและกลุ่มสูตรลิโมนีนมีค่าลดลงเล็กน้อย แต่ค่า pH ก่อนและหลังการทดสอบไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ส่วนค่าความขุ่นของน้ำ พบว่ากลุ่มทดสอบสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมและกลุ่มสูตรลิโมนีนมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ค่า O.D. ก่อนและหลังการทดสอบไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 แสดงค่าพารามิเตอร์ (Temp, pH, O.D.) ของน้ำที่ใช้ก่อนและหลังการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ต่ออัตราการตาย (% Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถ่มังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$)

กลุ่มทดสอบ	ก่อนทดสอบ			หลังทดสอบ		
	Temp.	pH	O.D.	Temp.	pH	O.D.
กลุ่มควบคุม (น้ำประปา)	31.7±0.6	7.83±0.01	0.0446±0.0035	31.0±0.6	7.81±0.02	0.0504±0.0014
กลุ่มควบคุม (Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (12:1:1:1:1)	33.0±0.0	7.81±0.02	0.0459±0.0020	32.0±0.0	7.52±0.01	0.0557±0.0028
สูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200+ น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1:1)	32.0±0.0	7.80±0.02	0.0457±0.0016	31.7±0.6	7.26±0.02	0.1152±0.0127
สูตรลิโมนีน (limonene + Tween 20 + น้ำ) (4:12:1)	31.0±0.6	7.83±0.01	0.0465±0.0011	33.0±0.0	7.34±0.03	0.0757±0.0041

จากการศึกษาค่าพารามิเตอร์ (Temp, pH, O.D.) ของน้ำที่ใช้ก่อนและหลังการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ต่ออัตราการตาย (% Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถ่มังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$) พบว่า อุณหภูมิของน้ำก่อนหลังการทดสอบไม่แตกต่างกัน ($p>0.5$) ในทุกกลุ่มทดสอบ ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง กลุ่มทดสอบสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมและกลุ่มสูตรลิโมนีนมีค่าลดลงเล็กน้อย แต่ค่า pH ก่อนและหลังการทดสอบไม่แตกต่างกัน ($p>0.5$) ส่วนค่าความขุ่นของน้ำ พบว่ากลุ่มทดสอบสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม และกลุ่มสูตรลิโมนีนมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ค่า O.D. ก่อนและหลังการทดสอบไม่แตกต่างกัน ($p>0.5$) (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 แสดงค่าพารามิเตอร์ (Temp, pH, O.D.) ของน้ำที่ใช้ก่อนและหลังการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) และสูตรลิโมนีน ต่ออัตราการตาย (% Mortality) ของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับกึ่งภาคสนาม (โถงมังกรขนาด 180 ลิตร, $n=3$)

กลุ่มทดสอบ	ก่อนทดสอบ			หลังทดสอบ		
	Temp.	pH	O.D.	Temp.	pH	O.D.
กลุ่มควบคุม (น้ำประปา)	32.5±0.5	7.81±0.01	0.0443±0.0035	32.0±0.9	7.80±0.02	0.0469±0.0042
กลุ่มควบคุม (Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200 + น้ำ) (12:1:1:1:1)	32.3±0.3	7.83±0.01	0.0452±0.0032	32.0±0.0	7.60±0.02	0.0548±0.0032
สูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส + Tween 20 + propylene glycol + Cremophor RH 40 + plantacare 1200+ น้ำ) (5:4:4:12:1:1:1:1)	32.0±0.9	7.81±0.02	0.0462±0.0039	33.0±0.0	7.24±0.03	0.1146±0.0124
สูตรลิโมนีน (limonene + Tween 20 + น้ำ) (4:12:1)	31.7±0.8	7.80±0.02	0.0457±0.0034	31.0±0.6	7.32±0.03	0.0756±0.0031

วิจารณ์

น้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain และลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain คือ น้ำมันหอมระเหยโหระพา กานพลู และยูคาลิปตัส

จากการศึกษาฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงลาย พบว่าน้ำมันหอมระเหยโหระพามีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ สมเกียรติ บุญญะบัญชา ที่ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชบางชนิดต่อยุงลาย ได้แก่ กะเพราขาว กะเพราแดง กะเพราผี แมงลัก โหระพา และตะไคร้หอม โดยทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 และ 4 พบว่าน้ำมันหอมระเหยโหระพามีประสิทธิภาพดีที่สุดเช่นเดียวกัน⁽⁸⁾ นอกจากนี้ค่า LC_{50} ของน้ำมันหอมระเหยโหระพาต่อลูกน้ำยุงลาย ($LC_{50} = 62.8$ ppm) พบว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงลายมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Manimaran, A. และคณะ⁽⁹⁾ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ได้นำน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงมาพัฒนาต่อยอดจากงานวิจัยของ สมเกียรติ บุญญะบัญชา และงานวิจัยของ Manimaran, A. และคณะ ปี 2012 ให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงมากยิ่งขึ้น โดยใช้ความเข้มข้นที่ 250 ppm ในรูปแบบของไมโครอิมัลชันสมุนไพรเดี่ยวและสมุนไพรรวม พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง อัตราการตายของลูกน้ำยุงเท่ากับร้อยละ 80 และ 84 ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง อัตราการตายของลูกน้ำยุงเท่ากับร้อยละ 100 และ 100 ตามลำดับ

นอกจากนี้งานวิจัยของ สมเกียรติ บุญยะปัญญา และงานวิจัยของ Manimaran, A. และคณะ ทำการศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรในรูปแบบของสารสกัดเท่านั้น ไม่ได้ทำเป็นรูปแบบไมโครอิมัลชันในการทดสอบฤทธิ์กำจัดลูกน้ำยุง และระยะเวลาในการทดสอบ Larvicidal activity ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เท่านั้น แต่จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ได้ทำการศึกษา longevity ของไมโครอิมัลชันที่ระยะเวลาสัปดาห์ที่ 2 สัปดาห์ที่ 3 สัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่ 5 ทำให้ไมโครอิมัลชันเป็นรูปแบบที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ในการกำจัดลูกน้ำยุงได้จริง

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาน้ำมันหอมระเหยให้อยู่ในรูปแบบของไมโครอิมัลชัน โดยใช้ความเข้มข้น 250 ppm ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่าความเข้มข้นของงานวิจัยของ Manimaran, A. และคณะ ที่ใช้ความเข้มข้นสูงถึง 1,000 ppm ดังนั้นแสดงว่าการพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบของไมโครอิมัลชันจะช่วยให้ประหยัดปริมาณการใช้ น้ำมันหอมระเหยลง และช่วยให้ประหยัดต้นทุนในการผลิตได้

นอกจากนั้น ยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลูและยูคาลิปตัสมีประสิทธิผลรองลงมาจากน้ำมันหอมระเหยโหระพาในการกำจัดลูกน้ำ Lab strain และลูกน้ำยุงที่ต้านทานต่อสารเคมี Resistant strain

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโหระพา พบ methyl chavicol เป็นองค์ประกอบหลัก ร้อยละ 84.45 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยกานพลู พบ eugenol เป็นองค์ประกอบหลัก ร้อยละ 91.61 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส พบ eucalyptol เป็นองค์ประกอบหลัก ร้อยละ 82.15

จากการศึกษาขนาดอนุภาคของไมโครอิมัลชันโหระพาเริ่มต้น เท่ากับ 106.13 nm เมื่อเก็บภายใต้สภาวะ 40°C 75% RH เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าขนาดอนุภาคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จาก 106.13 nm เป็น 63.32 nm และค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดยลดลงจาก -17.73 mV เป็น -19.13 mV

จากการศึกษาขนาดอนุภาคของไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมเริ่มต้น เท่ากับ 82.59 nm เมื่อเก็บภายใต้สภาวะ 40°C 75% RH เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จาก 82.59 nm เป็น 323.32 nm และค่าศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยลดลงจาก -27.23 mV เป็น -55.47 mV

การเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคของไมโครอิมัลชันไม่มีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน เพราะอัตราการตายของลูกน้ำยุงขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นของสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยที่ออกฤทธิ์เสริมฤทธิ์กัน ดังนั้นควรพัฒนาสมุนไพรรวมในรูปแบบไมโครอิมัลชันมากกว่าสมุนไพรเดี่ยว เนื่องจากไมโครอิมัลชันในรูปแบบของสมุนไพรรวมมีสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติในการกำจัดลูกน้ำยุงที่เสริมฤทธิ์กัน เช่น methyl chavicol, eugenol และ eucalyptol เป็นต้น ซึ่งเป็นองค์ประกอบทางเคมีหลักของน้ำมันหอมระเหยโหระพา กานพลู และยูคาลิปตัส ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมกับสูตรลิโมนีนสังเคราะห์ พบว่าสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมมีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain และ Resistant strain ในระดับกึ่งกลางภาคสนามได้ใกล้เคียงกับสูตรลิโมนีนสังเคราะห์

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ พบว่าประสิทธิผลของไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมในการกำจัดลูกน้ำยุงลดลงทุกสัปดาห์ อาจจะเนื่องมาจากสารออกฤทธิ์สำคัญในน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดมีการระเหยไป เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมแบบกึ่งภาคสนาม อย่างไรก็ตามไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรเหมาะสมกับการนำไปใช้ในแหล่งเพาะพันธุ์ที่มีพืชน้ำ เช่น อ่างบัว บ่อเลี้ยงปลาкарพ์ รวมทั้งภาชนะที่ใช้ใส่น้ำให้สัตว์เลี้ยงดื่ม เพราะน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรมีความปลอดภัยสูงและมีความเป็นพิษต่อพืชและสัตว์ต่ำ

ข้อเสนอแนะ ควรมีการทดสอบองค์ประกอบทางเคมีหลักของน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิผลต่อการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านเพิ่มเติม และควรหาวิธีเพิ่มประสิทธิผลให้สามารถกำจัดลูกน้ำยุงได้ร้อยละ 100 เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยทำการสังเคราะห์สารสำคัญ (active component) ที่ออกฤทธิ์กำจัดลูกน้ำยุงเลียนแบบสารธรรมชาติ ดังนั้น

จึงจำเป็นต้องอย่างยิ่งที่จะต้องทำการศึกษาต่อไปในการพัฒนาวิธีการและรูปแบบในการใช้ประโยชน์ให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด เพื่อทดแทนและลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย เช่น อาจจะพัฒนาในรูปแบบ MMF (Monomolecular Film) เป็นแผ่นฟิล์มโมเลกุลเดี่ยว ออกฤทธิ์ทางกายภาพ ทำให้เกิดฟิล์มบางๆ ขึ้นมาระหว่างผิวน้ำกับอากาศ ทำให้ลูกน้ำตัวมือง ยุง ไม่สามารถใช้ออกซิเจนได้ ทำให้ตายลง⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ควรทำการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากในหนูขาว และการทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่ายของผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุง เพื่อประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ต่อไป

สรุป

ประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันโหระพา และสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า อัตราตายอยู่ในช่วงร้อยละ 80-100

ประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันโหระพา และสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) ที่ความเข้มข้น 250 ppm ต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าอัตราตายอยู่ในช่วงร้อยละ 75-92

ไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมมีประสิทธิภาพดีกว่าไมโครอิมัลชันสมุนไพรเดี่ยว เนื่องจากไมโครอิมัลชันในรูปแบบของสมุนไพรรวมมีสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติในการกำจัดลูกน้ำยุงที่เสริมฤทธิ์กันมากกว่าไมโครอิมัลชันในรูปแบบสมุนไพรเดี่ยว

ประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) (5:4:4:12:1:1:1:1) ต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Lab strain ในระดับกึ่งภาคสนาม พบว่า ประสิทธิภาพลดลงทุกสัปดาห์ ภายในระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ 5 สัปดาห์ อัตราตายร้อยละ 100, 66.7, 57.7, 36.7 และ 0 ตามลำดับ

ประสิทธิภาพของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวม (โหระพา + กานพลู + ยูคาลิปตัส) (5:4:4:12:1:1:1:1) ต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน Resistant strain ในระดับกึ่งภาคสนาม พบว่าประสิทธิภาพลดลงทุกสัปดาห์ ภายในระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ 5 สัปดาห์ อัตราตายร้อยละ 100, 61.7, 46.7, 33.3 และ 0 ตามลำดับ

การวัดค่าความเป็นกรดต่างและค่าความขุ่นของสูตรไมโครอิมัลชันสมุนไพรรวมในน้ำที่ใช้ในการทดสอบ พบว่าค่า pH ลดลงหลังการทดสอบ แต่ค่ายังอยู่ในช่วงสภาวะความเป็นกลาง ส่วนค่าความขุ่น พบว่า O.D. มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังการทดสอบ แต่น้ำที่มองเห็นยังคงใสเป็นปกติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพดี สามารถนำไปใช้ควบคุมลูกน้ำยุงลายในธรรมชาติได้โดยไม่ทำให้สภาพน้ำเปลี่ยนไป

กิตติกรรมประกาศ

ทางคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ดร. จิตติ จันทร์แสง หัวหน้าฝ่ายพิพิธภัณฑสถานและอนุกรมวิธานและสนับสนุนงานกีฏวิทยา นางสาวเบญญาภา รูปพุดชา และนายภูติษ พันไทย เจ้าหน้าที่ฝ่ายฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์ลูกน้ำยุงลายบ้านจากห้องปฏิบัติการ และขอขอบคุณ นางสาวประภาณิช วันโสภา พนักงานห้องปฏิบัติการ ฝ่ายชีววิทยาและนิเวศวิทยา ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้ลูกน้ำยุงลายที่ดักหนาท่อสารเคมีกำจัดแมลงที่เก็บจากพื้นที่ศึกษา (จังหวัดจันทบุรี)

เอกสารอ้างอิง

1. Hadinegoro SR, Arredondo-Garcia JL, Capeding MR, Deseda C, Chotpitayasunondh T, Dietze R, et al. Efficacy and long-term safety of a dengue vaccine in regions of endemic disease. *N Engl J Med* 2015; 373(13): 1195-206.
2. Nour AH, Nour A, Yusoff M, Sandanasamy J. Bioactive compounds from Basil (*Ocimum basilicum*) essential oils with larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. 3rd International Conference on Biology, Environment and Chemistry (IPCBEE) 2012; 46: 21-4.
3. Hamdan DI, Mohamed ME, Abdulla RH, Mohamed SM, El-Shazly AM. Anti-inflammatory, insecticidal and antimicrobial activities and chemical composition of the essential oils of different plant organs from navel orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Malesy) grown in Egypt. *J Med Plants Res* 2013; 7(18): 1204-15.
4. Gutierrez PM, Antepuesto AN, Eugenio BAL, Santos MFL. Larvicidal activity of selected plant extracts against the dengue vector *Aedes aegypti* mosquito. *Int Res J Biological Sci* 2014; 3(4): 23-32.
5. Duarte JL, Amado JRR, Oliveira AEMFM, Cruz RAS, Ferreira AM, Souto RNP, et al. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Rev Bras Farmacogn* 2015; 25: 189-92.
6. Soradech S, Kusolkumbot P, Thubthimthed S. Development and characterization of microemulsions containing *Tiliacora triandra* Diels as an active ingredient for antioxidant and melanogenesis stimulating activities. *J App Pharm Sci* 2018; 8(3): 46-54.
7. Fansiri T, Thavara U, Tawatsin A, Krasaesub S, Sithiprasasna R. Laboratory and semi-field evaluation of Mosquito Dunks[®] against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006; 37(1): 62-6.
8. สมเกียรติ บุญญะบัญชา. ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชบางชนิดต่อยุงลาย (*Aedes aegypti* L.). [วิทยานิพนธ์]. ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร, คณะเกษตรศาสตร์. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2536.
9. Manimaran A, Cruz MMJJ, Muthu C, Vincent S, Ignacimuthu S. Larvicidal and knockdown effects of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say, *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles stephensi* (Liston). *Adv Biosci Biotechnol* 2012; 3: 855-62.
10. Sukkanon C, Yaicharoen R, Ngrenngarmert W. Comparative effectiveness of monomolecular surface film on *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles minimus* (Theobald) (Diptera: Culicidae). *Agric Nat Resour* 2016; 50: 465-9.

Development of Essential Oils-based Microemulsion Larvicide Product for Control of Insecticide-resistant Strain of *Aedes aegypti* Mosquito Larvae

Phanukit Kunhachan¹ Srisuda Samaimai² Jakkrawarn Chompoonsri¹

Sareeya Reungpatthanaphong³ Payu Bhakdeenuan¹ Chayada Khumsawad¹

Navy Srivarom¹ and Kriangsak Ruchusatsawat

¹Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000

²Suan Dusit University, Dusit, Bangkok, 10300

³Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand

ABSTRACT Chemical insecticides have been used on a large scale to control vectors of dengue fever until now, resulting in chemical toxic to environment and causing chemical resistance in mosquitoes. Natural product should be developed as alternative larvicides to reduce the adverse effects of chemical use. The aim of this study is to determine the larvicidal efficacy of 10 herbal essential oils (Sweet basil, Clove, Eucalyptus, Chinese cassia, Lemon grass, Citronella, Kiffir lime, Orange, Tangerine and Lesser galangal) against laboratory strain (LS) and chemical resistant strain (RS) of *Aedes aegypti* larvae. The results showed that Sweet basil, Clove and Eucalyptus were the most effective herbal essential oils against the LS larvae with the LC_{50} of 62.8, 66.0 and 77.4 ppm, respectively. While, these three essential oils showed efficacy against the RS larvae with the LC_{50} of 72.3, 83.1 and 109.6 ppm, respectively. The microemulsion formulation of the mixture of three oils (Sweet basil, Clove and Eucalyptus) was formulated as a product and tested against LS and RS larvae under semi-field conditions for 5 weeks. During the test period against LS larvae, the product provided mortality rate of 100, 66.7, 57.7, 36.7 and 0.0 percent, respectively. In the same period, it showed mortality rate against RS larvae of 100, 61.7, 46.1, 33.3 and 0.0 percent, respectively. In conclusion, the herbal microemulsion product derived from mixture of the three essential oils demonstrated good efficacy against *Ae. aegypti* larvae and it could be used to control the mosquito larvae in natural breeding sites.

Keywords: Larvicidal activity, microemulsion, essential oils, insecticide-resistant mosquito larvae