สัญญาเลขที่ R2559C135

รายงายวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ ฤทธิ์ฆ่าตัวโม่ง และฤทธิ์ฆ่าไข่ยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยจากเอทานอลของยอดชะอม

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ผศ.ดร.ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์	มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. ดร.รักสกุล แก่นเรณู	มหาวิทยาลัยพะเยา
3. ผศ.ดร.รัชนาพร โชคชัยสิริ	มหาวิทยาลัยพะเยา

มหาวิทยาลัยนเรศวร
10 388/57
3 QL
536
ด๔๔๔๕
2559

สนับสนุนโดย
งบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีงบประมาณ 2559

รายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ ฤทธิ์ฆ่าตัวโม่ง และฤทธิ์ฆ่าไข่ยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยจาก เอทานอลของยอดชะอม

(ภาษาอังกฤษ) Larvicidal, pupacidal and ovicidal activities of *Acacia pennata* subsp. *insuavis* shoot tips crude and fractionated ethanol extracts against *Aedes aegypti* mosquito

ชื่อผู้รับทุนวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์

บทคัดย่อ

ชะอม (*Acacia pennata* subsp. *insuavis*) เป็นพืชอาหารพื้นบ้านและพืชสมุนไพรของคนไทยมาช้านาน มีการศึกษาที่รายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ของสารสกัดจากใบชะอม เช่น ฤทธิ์ด้าน antinociceptive anti-inflammatory antimicrobial และ anti-helminthic เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ได้รายงานฤทธิ์ด้านใหม่ของสารสกัดชะอม (สารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อย) คือ ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำและตัวโม่งของยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) โดยวิธีการทดสอบฤทธิ์ในการศึกษาครั้งนี้ได้อ้างอิงการวิธีการมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก (WHO) ซึ่งพบว่า สารสกัดจากยอดชะอมมีฤทธิ์ที่ดีในการฆ่าลูกน้ำและตัวโม่งของยุงลายบ้าน โดยส่วนสกัดย่อยมีฤทธิ์ที่ดีกว่าสารสกัดหยาบ การทดสอบกับยุงลายบ้านระยะที่ 3 ให้ค่า LC_{50} เท่ากับ 39.45-50.75 และ 244.50 ppm เมื่อทดสอบกับส่วนสกัดย่อยและสารสกัดหยาบตามลำดับ การทดสอบกับตัวโม่งยุงลายบ้านก็ให้ผลที่คล้ายคลึงกันคือ LC_{50} เท่ากับ 44.10-53.73 (ส่วนสกัดย่อย) และ 87.27 (สารสกัดหยาบ) ppm ฤทธิ์ต่อลูกน้ำและตัวโม่งยุงลายบ้านของสารสกัดยอดชะอมในการศึกษาครั้งนี้ ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาใช้สารสกัดจากชะอมในการเพื่อการควบคุมยุงพาหะนำโรคในธรรมชาติ

Abstract

Acacia pennata subsp. *insuavis*, Cha-om, is a common Thai vegetable dishes. Moreover, it has been used as a medicinal herb for a long time. From the literatures, antinociceptive, anti-inflammatory, antimicrobial and anti-helminthic activities were reported. In this study, we introduced the novel activities, larvicidal and pupicidal, of this plant. The shoot tips crude ethanolic and fractionated extracts of *A. pennata* were tested against aquatic stages of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. The 1^{st}-4^{th} instar larvae and pupae were subjected for the bioassays by following the standard protocol of WHO. The larval and pupal mortalities were observed after 24- and 48-hour exposure times, consequently. The bioassays demonstrated that the stronger efficacy was found from the fractions over than the crude extracts. The LC_{50} values against the 3^{rd} instar larvae were 39.45-50.75 ppm (fractions) and 244.50 ppm (crude). It was also found effects against the pupae testing with the LC_{50} values of 44.10-53.73 ppm and 87.27 ppm for the fractions and the crude, respectively. The bioassays demonstrated the effective mosquito larvicide and pupicide of *A. pennata* extracts. It could be alternative candidate for developing of phytotoxin for controlling the mosquito vectors.

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

1. ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ ฤทธิ์ฆ่าตัวโม่ง และฤทธิ์ฆ่าไข่ยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยจาก เอทานอลของยอดชะอม

(ภาษาอังกฤษ) Larvicidal, pupacidal and ovicidal activities of *Acacia pennata* subsp. *insuavis* shoot tips crude and fractionated ethanol extracts against *Aedes aegypti* mosquito

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด หมายเลขโทรศัพท์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์
ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร โทรศัพท์ 055964676

3. สาขาที่ทำการวิจัย กีฏวิทยาทางการแพทย์ (การควบคุมพาหะนำโรคด้วยวิธีทางชีวภาพ)

4. งบประมาณทั้งโครงการ 220,000 บาท

5. ระยะเวลาดำเนินการ 12 เดือน

6. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากยังไม่มีวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออก เมื่อเกิดการระบาดของโรค การลดจำนวนยุงพาหะ (ยุงลายบ้าน: *Aedes aegypti*) จึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงสุดเพื่อยับยั้งการแพร่ระบาด ในการกำจัดยุงลายบ้านนั้น ระยะลูกน้ำจะเป็นเป้าหมายที่สำคัญต่อการกำจัด เพราะลูกน้ำยุงลายบ้านอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่เราสามารถเข้าถึง ตรวจพบ และทำลายได้ง่าย จากอดีตจนถึงปัจจุบัน ทรายอะเบท (ทีมีฟอส) เป็นสารเคมีที่นิยมใช้ใส่ในแหล่งน้ำเพื่อกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน อย่างไรก็ตาม แม้ว่าทีมีฟอสจะมีความเป็นพิษต่อมนุษย์ต่ำ แต่หากได้รับในปริมาณมากอย่างต่อเนื่อง อาจก่อให้เกิดอันตราย อีกทั้งหากใช้ในความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมอาจก่อให้เกิดการพัฒนาความต้านทานขึ้นในลูกน้ำยุง ดังนั้น เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว สารสกัดจากธรรมชาติจึงถูกศึกษาพัฒนาเพื่อนำมาทดแทนสารเคมี และแม้ว่าจะพบสารสกัดจากพืชหลายชนิดที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน แต่การค้นหาและพัฒนาสารสกัดจากพืชชนิดใหม่ๆ ยังคงมีความสำคัญอยู่อย่างต่อเนื่อง เพื่อประโยชน์ในด้านการศึกษาวิจัย และการคัดเลือกสารสกัดที่มีประสิทธิภาพดี มีความปลอดภัยสูง และสามารถผลิตเพื่อการใช้งานได้จริง

ชะอมเป็นพืชพื้นบ้านที่เป็นอาหารของคนไทย จากการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัยพบว่ายอดชะอมมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ และมีฤทธิ์ค่อนข้างดีอีกด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงจะทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยจากเอทานอลของยอดชะอม เพื่อประเมินประสิทธิภาพฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ ฤทธิ์ฆ่าตัวโม่ง และฤทธิ์ฆ่าไข่ยุงลายบ้านของสารสกัดชะอมโดยละเอียด หากผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่ดี อาจนำสู่การพัฒนาใช้สารสกัดจากยอดชะอมเพื่อกำจัดลูกน้ำยุงลายในธรรมชาติ ทดแทนการใช้สารเคมี และจากการที่ยอดชะอมเป็นอาหารโดยปกติของคนไทยอยู่แล้ว สารสกัดจากชะอมจึงมีความปลอดภัยสูง อีกทั้ง

เป็นพืชที่สามารถปลูกได้ง่าย หากจะพัฒนาต่อยอดสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมอาจมีต้นทุนต่ำกว่าการซื้อสารเคมีมาก

7. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

7.1 เตรียมสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยจากเอทานอลของยอดชะอม

7.2 ศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ ฤทธิ์ฆ่าตัวโม่ง และฤทธิ์ฆ่าไข่ยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยดังกล่าว

8. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

8.1 สารสกัดยอดชะอม

นำยอดชะอมที่ซื้อจากตลาดสดในจังหวัดพิษณุโลกมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา นำไปอบให้แห้งด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บดละเอียดด้วยเครื่องปั่น จากนั้นสกัดสารสกัดหยาบจากผงยอดชะอม โดยวิธีการแช่หมักด้วยเอทานอล ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) ที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยเครื่อง reciprocal shaker ที่ความเร็ว 180 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองสารสกัดที่ได้ด้วยผ้าใยแก้ว กรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ในชุดกรองแก้ว บรรจุสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดสีชาและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น

8.2 การแยกส่วนสกัดย่อย (fractions) ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

แยกสารกสัดหยาบเอทานอลของยอดใบชะอมด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลชนิดหยาบ ใช้ตัวชะโดยเริ่มจากเฮกเซน เฮกเซน-เอทิลอะซีเตต ถึงเอทิลอะซีเตต และเอทิลอะซีเตต-เมทานอล โดยการเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วสูงกว่าไปเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบาง จากนั้นรวมกลุ่มส่วนที่ออกมาที่มีจุดของสารบน TLC คล้ายคลึงกัน นำส่วนสกัดย่อยแต่ละกลุ่มไปทดสอบฤทธิ์ต่างๆ เช่นเดียวกับที่ทดสอบกับสารสกัดหยาบ

8.3 ยุงที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) เป็นสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ เลี้ยงยุงตัวเต็มวัยด้วยสารละลายน้ำตาล 5% ผสมวิตามินรวม 5% เมื่อยุงมีอายุประมาณ 3-4 วัน ให้ยุงกินเลือดโดยวิธี Artificial membrane feeding จากนั้น 3 วัน ให้ยุงวางไข่บนกระดาษกรอง Whatman No.1 ซึ่งบุอยู่ขอบของภาชนะที่ใส่น้ำประปาและนำเข้าไปไว้ในกรงเลี้ยงยุง ไข่ที่ได้จะถูกเก็บในสภาวะแห้ง เมื่อต้องการเพาะเลี้ยงยุงรุ่นต่อไปนำกระดาษกรองซึ่งมีไข่ติดอยู่ไปแช่น้ำประปาที่บรรจุอยู่ในถาดพลาสติก ลูกน้ำระยะที่ 1 จะออกจากไข่ แล้วจึงให้อาหารสุนัขบดละเอียดเป็นอาหาร เมื่อยุงเจริญเป็นตัวเต็มวัย ถ่ายยุงใส่ในกรงเลี้ยงยุงมาตรฐานและเพาะเลี้ยงตามวิธีที่กล่าวข้างต้นต่อไป

8.4 การทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำและตัวโม่งยุงลายบ้าน

นำสารสกัดหยาบหรือส่วนสกัดย่อยของยอดชะอมมาเตรียมเป็น stock solution ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 1% จากนั้น stock solution จะถูกเตรียมเป็นความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำและตัวโม่งยุงลายบ้าน โดยแต่ละระยะ ลูกน้ำยุงจำนวน 25 ตัว จะถูกถ่ายลงในสารละลายทดสอบ 200 มิลลิลิตร โดยในเบื้องต้นจะทดสอบด้วยสารละลายทดสอบที่มีช่วงความเข้มข้นต่างกันมาก เพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นของอัตราการตายของลูกน้ำเมื่อสัมผัสกับสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นจะเลือกความเข้มข้น 4 ถึง 5 ระดับ ที่ทำให้ลูกน้ำมีอัตราการตายที่ 10 ถึง 90% ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการหาค่า LC_{50} และ LC_{90} สารละลายของสารสกัดหยาบหรือส่วนสกัดย่อยแต่ละความเข้มข้นจะถูก

ทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้นเป็นจำนวน 4 ซ้ำ เพื่อให้ได้จำนวนลูกน้ำยุงทดสอบ 100 ตัว ต่อสารสกัดแต่ละความเข้มข้น และทำการทดสอบเป็นจำนวน 2 ชุด ซึ่งจะได้จำนวนลูกน้ำยุงทดสอบ 200 ตัว ต่อสารสกัดหยาบแต่ละความเข้มข้น สำหรับกลุ่มควบคุมจะใช้ DMSO 2 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร แทนสารละลายทดสอบ ทำการทดสอบ 4 ซ้ำ เพื่อให้ได้จำนวนลูกน้ำยุงทดสอบในกลุ่มควบคุม 100 ตัว ทำการทดสอบในลักษณะดังกล่าวกับลูกน้ำยุงลายบ้านทั้ง 4 ระยะ และระยะตัวโม่ง โดยอัตราการตาย จะถูกบันทึกที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง หลังการทดสอบ นำค่าอัตราการตายไปคำนวณหาค่า LC_{50} และ LC_{90} โดยวิธี Probit analysis ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Ldp Line (*http://embakr.tripod.com/ldpline*)

8.5 การทดสอบฤทธิ์ฆ่าระยะไข่ของยุงลายบ้าน

ให้ยุงที่กินเลือดแล้ววางไข่บนกระดาษกรองเปียกที่เตรียมไว้ในแก้วสำหรับบรรจุยุง โดยให้ยุงแต่ละตัววางไข่เดี่ยว ปล่อยให้ไข่มีการพัฒนาโดยสมบูรณ์ ทิ้งให้กระดาษกรองแห้ง จากนั้นเตรียมสารละลายสารสกัดหยาบหรือส่วนสกัดย่อยให้มีความเข้มข้นต่างๆ เช่นเดียวกับการเตรียมสำหรับทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำและตัวโม่ง ปริมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วแช่ไข่ที่ติดอยู่กับกระดาษกรองลงในสารละลายที่เตรียมไว้เป็นเวลา 5 ชั่วโมง โดยทำการทดสอบ 5 ซ้ำ ต่อสารละลาย 1 ความเข้มข้น ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วนำไข่ที่ทดสอบแต่ละความเข้มข้นไปแช่น้ำกลั่นในถ้วยสำหรับเลี้ยงลูกน้ำยุง จากนั้นตรวจนับจำนวนลูกน้ำที่เจริญออกมาจากไข่ทุกวัน จนกว่าจะไม่มีลูกน้ำเจริญออกมาอีก นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่า % hatchability

9. ผลการวิจัย

ตัวอย่างผลกุหลาบพุกาม 6,250 กรัม เมื่ออบแห้งแล้วมีน้ำหนัก 847.15 กรัม และเมื่อสกัดด้วยเอทานอล ได้สารสกัดหยาบทั้งสิ้น 45.56 กรัม จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับยุงลายบ้าน พบว่าสารสกัดหยาบยอดชะอมไม่มีฤทธิ์ต่อไข่ของยุง ไม่ทำให้อัตราการฟักตัวของไข่เปลี่ยนแปลง สำหรับฤทธิ์ต่อระยะลูกน้ำ พบว่าสารสกัดหยาบมีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำแต่ละระยะที่แตกต่างกัน โดยลูกน้ำระยะที่ 1 มีค่า LC_{50} ต่ำที่สุด (169.78 ppm) ในขณะที่ลูกน้ำระยะที่ 4 มีค่า LC_{50} สูงที่สุด (467.46 ppm) ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการทดสอบ ซึ่งค่า LC_{50} จะลดลงในลูกน้ำทุกระยะ เมื่อเวลาทดสอบ 48 ชั่วโมง สำหรับฤทธิ์ต่อระยะตัวโม่ง สารสกัดหยาบมีฤทธิ์ฆ่าระยะตัวโม่งได้ดีกว่าลูกน้ำ โดยมีค่า LC_{50} ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการทดสอบคือ 87.27 และ 56.41 ppm ตามลำดับ

หลังจากแยกองค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากน้ำและเอทานอลของของกุหลาบพุกามโดยวิธี Quick Column Chromatography และ Thin Layer Chromatography แล้ว พบว่าสารสสกัดหยาบจากน้ำสามารถแยกสารสกัดส่วนย่อย (fraction) ออกมาได้ 505 ส่วน ซึ่งสามารถจัดได้เป็น 7 กลุ่ม คือ Fr-G1, fractions 1-15 (4.20 g), Fr-G2, fractions 16-33 (1.04 g), Fr-G3, fractions 34-55 (0.65 g), Fr-G4, fractions 56-150 (0.11 g), Fr-G5, fractions 151-230 (0.21 g), Fr-G6, fractions 231-425 (0.51 g) และ Fr-G7, fractions 426-505 (5.00 g)

เมื่อทดสอบฤทธิ์ของส่วนสกัดย่อยพบว่า Fr-G2 และ Fr-G3 มีฤทธิ์ต่อลูกน้ำระยะที่ 3 ที่ค่า LC_{50} เท่ากับ 50.75 และ 39.45 ppm ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 45.28 และ 37.45 ppm ที่เวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์ต่อระยะตัวโม่งคือ Fr-G4 และ Fr-G5 โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 53.73 และ 44.10 ppm ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 49.15 และ 40.64 ppm ที่เวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

10. สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบยอดชะอมไม่มีฤทธิ์ต่อระยะไข่ของยุงลายบ้าน เพราะเมื่อทดสอบระยะไข่ของยุงลายบ้านด้วยสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นถึง 500 ppm แต่กลับไม่พบว่าสามารถทำให้อัตราการฟักตัวของไข่แตกต่างไปจากการทดสอบในกลุ่มควบคุมอย่างไรก็ตาม สารสกัดหยาบจากยอดชะอมมีฤทธิ์ที่ค่อนข้างดีและดีมากในการฆ่าระยะลูกน้ำและตัวโม่งของยุงลายบ้าน ตามลำดับ เมื่อแยกส่วนสกัดย่อย (7 กลุ่ม) ได้จากสารสกัดหยาบ และเปรียบเทียบฤทธิ์กับสารสกัดหยาบ พบว่าส่วนสกัดย่อย Fr-G2 และ Fr-G3 มีฤทธิ์ที่ดีขึ้นในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านระยะที่ สำหรับส่วนสกัดย่อย Fr-G4 และ Fr-G5 มีฤทธิ์ที่ดีขึ้นในการฆ่าระยะตัวโม่ง ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงข้อมูลที่น่าสนใจว่า สารที่ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำและตัวโม่งนั้นเป็นสารคนละกลุ่มกัน ซึ่งหากทำการศึกษาต่อยอดจนสามารถระบุชนิดของสารนั้นได้ จะเป็นประโยชน์ยิ่งในการนำสารดังกล่าวมาใช้งานในการควบคุมลูกน้ำหรือตัวโม่งของยุงในธรรมชาติ

เนื่องจากชะอมเป็นพืชที่เป็นอาหาร การศึกษาเกี่ยวกับชะอมในอดีตที่ผ่านมาจึงศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับคน เช่น ฤทธิ์ทาง antinociceptive anti-inflammatory หรือ antimicrobial เท่านั้น จนเมื่อปี 2013 มีการรายงานฤทธิ์หนอนพยาธิชนิด *Raillietina echinobothrida* และการศึกษาครั้งนี้ได้ค้นพบและรายงานฤทธิ์ที่แตกต่างออกไปของสารสกัดจากยอดชะอม โดยพบว่าสารสกัดหยาบและส่วนสกัดยอดของยอดชะอมนั้นมีฤทธิ์ที่ดีถึงดีมากในการฆ่าลูกน้ำและตัวโม่งของยุงลายบ้าน นอกจากนี้พบว่าหากให้ลูกน้ำหรือตัวโม่งสัมผัสกับสารสกัดเป็นเวลานานขึ้นถึง 48 ชั่วโมง อัตราการตายจะเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ ก่อนหน้านี้ เช่น ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดจากพืชชนิด *Coriandrum sativum Nigella sativa* และ *Syzygium aromaticum* พืชชนิด *Ricinus communis* และ *Cnidoscolus phyllacanthus* เป็นต้น

เมื่อพิจารณาถึงพืชชนิดอื่นที่อยู่ในตระกูลเดียวกับชะอม มีรายงานว่า *Acacia nilotica* มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านที่ LC_{50} 60-148 ppm และฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญที่ LC_{50} 59-126 ppm และล่าสุดมีรายงานว่าสารสกัดจาก *A. nilotica* มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles arabiensis* อีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดจาก *A. nilotica* กับชะอมในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าสารสกัดจากชะอมมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านที่ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบที่ใช้ลูกน้ำยุงระยะเดียวกัน สารสกัดจากชะอมจึงมีความน่าสนใจที่จะถูกทำการศึกษาต่อยอด โดยเฉพาะการหาชนิดของสารออกฤทธิ์ในส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์ที่ดีในการฆ่ายุงระยะลูกน้ำหรือตัวโม่ง นอกจากนี้ ความเป็นพิษต่อคน ต่อสัตว์ชนิดอื่น และความคุ้มค่าในต้นทุนการผลิต เป็นสิ่งที่ควรถูกประเมินต่อไป

เนื้อหางานวิจัย

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เนื่องจากยังไม่มีวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออก เมื่อเกิดการระบาดของโรค การลดจำนวนยุงพาหะ (ยุงลายบ้าน: *Aedes aegypti*) จึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงสุดเพื่อยับยั้งการแพร่ระบาด ในการกำจัดยุงลายบ้านนั้น ระยะลูกน้ำจะเป็นเป้าหมายที่สำคัญต่อการกำจัด เพราะลูกน้ำยุงลายบ้านอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่เราสามารถเข้าถึง ตรวจพบ และทำลายได้ง่าย จากอดีตจนถึงปัจจุบัน ทรายอะเบท (ทีมีฟอส) เป็นสารเคมีที่นิยมใช้ใส่ในแหล่งน้ำเพื่อกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน อย่างไรก็ตาม แม้ว่าทีมีฟอสจะมีความเป็นพิษต่อมนุษย์ต่ำ แต่หากได้รับในปริมาณมากอย่างต่อเนื่อง อาจก่อให้เกิดอันตราย อีกทั้งหากใช้ในความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมอาจก่อให้เกิดการพัฒนาความต้านทานขึ้นในลูกน้ำยุง ดังนั้น เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว สารสกัดจากธรรมชาติจึงถูกศึกษาพัฒนาเพื่อนำมาทดแทนสารเคมี และแม้ว่าจะพบสารสกัดจากพืชหลายชนิดที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน แต่การค้นหาและพัฒนาสารสกัดจากพืชชนิดใหม่ๆ ยังคงมีความสำคัญอยู่อย่างต่อเนื่องเพื่อประโยชน์ในด้านการศึกษาวิจัย และการคัดเลือกสารสกัดที่มีประสิทธิภาพดี มีความปลอดภัยสูง และสามารถผลิตเพื่อการใช้งานได้จริง

ชะอมเป็นพืชพื้นบ้านที่เป็นอาหารของคนไทย จากการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัยพบว่ายอดชะอมมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ และมีฤทธิ์ค่อนข้างดีอีกด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงจะทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยจากเอทานอลของยอดชะอม เพื่อประเมินประสิทธิภาพฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ ฤทธิ์ฆ่าตัวโม่ง และฤทธิ์ฆ่าไข่ยุงลายบ้านของสารสกัดชะอมโดยละเอียด หากผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่ดี อาจนำสู่การพัฒนาใช้สารสกัดจากยอดชะอมเพื่อกำจัดลูกน้ำยุงลายในธรรมชาติ ทดแทนการใช้สารเคมี และจากการที่ยอดชะอมเป็นอาหารโดยปกติของคนไทยอยู่แล้ว สารสกัดจากชะอมจึงมีความปลอดภัยสูง อีกทั้งเป็นพืชที่สามารถปลูกได้ง่าย หากจะพัฒนาต่อยอดสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมอาจมีต้นทุนต่ำกว่าการซื้อสารเคมีมาก

การทบทวนวรรณกรรม

โรคติดต่อนำโดยยุงยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะโรคไข้เลือดออกซึ่งในแต่ละปีจะมีผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกี่ (dengue virus) เป็นจำนวนมาก ก่อให้เกิดไข้เดงกี่ (dengue fever) และไข้เลือดออกเดงกี่ (dengue hemorrhagic fever) ซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนต่อโรคนี้ การควบคุมการแพร่ระบาดของโรคจึงขึ้นอยู่กับการควบคุมยุงพาหะ คือยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ซึ่งเป็นพาหะสำคัญของโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย ทรายอะเบท (Abate) คือสารเคมีที่นิยมใช้ใส่ในภาชนะน้ำขังเพื่อกำจัดลูกน้ำยุงลาย (Chareonviriyaphap *et al.*, 1999) สารออกฤทธิ์ของทรายอะเบทคือทีมีฟอส (temephos) ซึ่งมีความเป็นพิษต่ำต่อมนุษย์ แต่การใช้ในปริมาณที่สูงกว่ากำหนดหรือการได้รับสารต่อเนื่องเป็นเวลานาน สามารถก่อให้เกิดอันตรายแก่มนุษย์ได้ อีกทั้งการตกค้างของสารเคมีสามารถทำให้ลูกน้ำยุงลายเกิดการพัฒนาความต้านทานต่อทีมีฟอสและสามารถพัฒนาสู่ความต้านทานข้ามต่อสารเคมีฆ่าแมลงชนิดอื่นได้ (Rodriguez *et al.*, 2002; ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์ และนพวรรณ บุญชู, 2554) อันจะทำให้ทรายอะเบทไม่สามารถใช้ควบคุมลูกน้ำยุงลายได้อีกต่อไปในพื้นที่ที่ลูกน้ำมีความต้านทานแล้ว ด้วยเหตุนี้ การศึกษาเพื่อสกัดสารชนิดใหม่ๆ จากพืชธรรมชาติ ที่ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง (larvicidal activity) มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสารเคมีแต่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ รวมถึงสัตว์ชนิดอื่นที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจึงมีบทบาทสำคัญในปัจจุบัน

ในประเทศไทย การศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงนั้นมีเป็นจำนวนมาก ตัวอย่างเช่นการศึกษาของ Promsiri และคณะ (2006) ซึ่งทำการคัดเลือกสารสกัดพืชสมุนไพรจากภาคใต้ของประเทศไทย จำนวน 112 ชนิด พบว่าพืช 14 ชนิดมีฤทธิ์ที่ดีในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน โดยมีค่า 50% Lethal Concentration (LC_{50}) น้อยกว่า 100 ppm อีกทั้งยังพบว่าพืช 2 ชนิดคือ *Mammea siamensis* และ *Anacardium occidentale* มีฤทธิ์ที่ดีมาก โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 5.9 และ 9.1 ppm ตามลำดับ ถัดมาในปี 2010 มีการศึกษาพบว่าสารสกัดจากพืชที่รับประทานได้ 5 ชนิดคือ *Citrus hystrix*, *Citrus reticulate*, *Kaempferia galangal*, *Syzygium aromaticum* และ *Zingiber zerumbet* มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านที่ดี มีค่า LC_{50} เท่ากับ 30.07, 15.42, 53.64, 124.69 และ 48.88 ppm ตามลำดับ (Sutthanont *et al.*, 2010) การศึกษาล่าสุดในปี 2014 พบว่า ต้นจันทน์ผา (*Pereskia bleo*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่ใบและแก่นมีฤทธิ์ต้านการอักเสบและลดไข้ แต่เนื้อของผล (endocarp) กลับมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านโดยสารสกัดหยาบ (crude extract) และ ส่วนสกัดย่อย (fractionated extract) มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำที่ LC_{50} เท่ากับ 1,094.84 และ 707.94 ppm ตามลำดับ (Thongwat *et al.*, 2014) จากการศึกษาของหลายกลุ่มผู้วิจัยที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่าพันธุ์พืชหลายชนิดในประเทศไทยมีศักยภาพในการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุง การพัฒนาเพื่อทำให้สารสกัดจากพืชเหล่านี้สามารถนำมาใช้งานในการควบคุมลูกน้ำยุงได้จริงนั้นควรได้รับการศึกษาอย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตาม การค้นหาสารสกัดจากพืชชนิดใหม่ซึ่งยังมีอยู่อีกมากในประเทศไทยก็มีความสำคัญไม่น้อยไปกว่ากัน เพราะนอกจากจะเป็นการค้นพบองค์ความรู้ที่มีประโยชน์ในทางวิชาการแล้ว อาจทำให้ค้นพบสารสกัดจากพืชซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำที่ดีและมีความปลอดภัยสูง สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ทดแทนสารเคมีได้ในอนาคต และหากมุ่งเน้นในด้านความปลอดภัยต่อมนุษย์แล้ว สารสกัดจากพืชที่เป็นอาหารย่อมมีความน่าสนใจ โดยพืชในกลุ่มนี้ของประเทศไทยนั้นยังมีอยู่อีกเป็นจำนวนมากที่หลายผู้วิจัยมองข้าม เพราะไม่คาดคิดว่าจะมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้

ชะอม *Acacia pennata* (L.) Willd. subsp. *insuavis* (Lace) I.C. Nielsen จัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae (Mimosaceae) นิยมใช้รับประทานในทุกภาคของไทย ชะอมเป็นไม้เถาเนื้อแข็ง หรือไม้เถายืนต้น ลำต้นสีขาวมีหนามแหลมคม ใบประกอบขนาดเล็กเป็นฝอย มีก้านใบแยกเป็น 2 ทาง ลักษณะคล้ายใบกระถินหรือใบส้มป่อย ใบมีกลิ่นฉุนคล้ายกลิ่นลูกสะตอ ใบเรียงสลับ ใบย่อยออกตรงข้ามกัน ใบย่อยรูปรีมี 13-28 คู่ ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม ออกดอกตามซอกใบ สีขาวหรือขาวนวล ขนาดเล็ก เห็นชัดเฉพาะเกสรตัวผู้ที่เป็นฝอย ใบอ่อนของชะอมหรือส่วนยอดของใบสามารถนำมารับประทานได้ มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปแต่ละภาคเช่น โพซุยเด๊าะ (กะเหรี่ยงแม่ฮ่องสอน), ผักหละ (คนเมือง), มะจื้อกั๋ว (ม้ง), สร้ะ (ขมุ), บ่ะหละ (ลั้วะ), ด่อละฮ้ำ (ปะหล่อง), ยิ่มเจวย (เมี่ยน) โดยมากมักปลูกตามรั้วบ้านเนื่องจากมีหนามแล้วยังเป็นผักที่ทานได้ตลาดทั้งปี ชะอมมีสรรพคุณทางยาโดยรากมีฤทธิ์แก้ปวดท้อง ท้องอืด ท้องเฟ้อ ขับลมในลำไส้ได้ แม้ว่าชะอมจะเป็นพืชพื้นบ้านของประเทศไทย แต่กลับมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับชะอมไม่มากนัก การศึกษาแรกเกี่ยวกับชะอมเป็นงานวิจัยที่พยายามศึกษาฤทธิ์ anti-tumour จากพืชและผลไม้ที่ใช้เป็นวัตถุดิบทำอาหารของประเทศไทย ซึ่งมีชะอมรวมอยู่ในการศึกษาด้วย แต่กลับไม่พบฤทธิ์ดังกล่าวจากสารสกัดเมทานอลของชะอม (Murakami *et al.*, 1994) จากนั้นในปี 2005 มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของชะอม 2 การศึกษา การศึกษาแรกเป็นการคัดเลือกหาฤทธิ์ antioxidant จากพืชที่กินได้ของประเทศไทย จากสารสกัดด้วยเมทานอลของพืช 43 ชนิด ซึ่งรวมทั้งยอดชะอม พบว่าพืชแต่ละชนิดมีฤทธิ์ antioxidant แตกต่างกันออกไป สำหรับยอดชะอมนั้นมีฤทธิ์ antioxidant ที่ไม่ดีนัก มีค่า Antioxidant index เท่ากับ 1.46 ± 0.27 โดยพบว่ามี Vitamin C เท่ากับ 22.3 ± 0.08 mg%, Vitamin E เท่ากับ 0.0015 ± 0.0005 mg%, Total carotenes เท่ากับ 1.27 ± 0.05 mg%, Total xanthophylls เท่ากับ 1.59 ± 0.04 mg%, Tannins

เท่ากับ 11.1 ± 0.09 mg% และ Total phenolics เท่ากับ 121 ± 0.09 mg% (Chanwitheesuk *et al.*, 2005) การศึกษาที่สองเป็นการศึกษาของ Akanitapichat และคณะ (2005) ซึ่งศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสเริมทัยป์ 1 (Anti-herpes simplex virus type 1 activity) ของพืชพื้นบ้าน 80 ชนิด รวมทั้งยอดชะอม จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่าพืชแต่ละชนิดมีฤทธิ์ที่แตกต่างกัน สำหรับสารสกัดด้วยเมทานอลของยอดชะอมนั้น มีฤทธิ์ต้านไวรัสเริมทัยป์ 1 โดยมีค่า 50% inhibitory concentrations (IC_{50}) เท่ากับ 284 µg/ml โดยไม่พบว่ามีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) การศึกษาล่าสุดเกี่ยวกับฤทธิ์ของชะอมในปี 2010 พบว่า terpenoids and flavonoide glycoside จากสารสกัดเมทานอลของใบชะอมมีฤทธิ์เป็น Hh/GLI inhibitor ซึ่ง GLI1 (glioma-associated oncogene 1) สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งหากมีการ overexpression คาดว่าสารออกฤทธิ์ดังกล่าวของสารสกัดใบชะอมจะไปยับยั้งการเกิด transcription ของ Hh/GLI (Rifai *et al.*, 2010) จากการตรวจเอกสารที่เกี่ยวข้องย้อนหลัง พบการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดชะอมเพียงเท่านี้ แต่มีอีกหนึ่งการศึกษาในพืชตระกูลเดียวกับชะอมคือ *Acacia pennata* wild (Mimosaceae) พบว่ามีฤทธิ์ antinociceptive และ anti-inflammatory จากส่วนสกัดเมทานอล (Dongmo *et al.*, 2005) จะเห็นได้ว่า การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากชะอมนั้นมีอยู่น้อยมากทั้งที่เป็นพืชที่มีความใกล้ชิดกับมนุษย์มาก โดยเฉพาะในประเทศไทย นอกจากนี้ การศึกษาที่ผ่านมาเน้นการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางด้านการแพทย์ของสารสกัดชะอม แต่สำหรับผู้วิจัยแล้ว ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำหรือฤทธิ์ต่อยุงในระยะอื่นๆนั้น มีความน่าสนใจให้ทำการศึกษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากพืชนั้นเป็นพืชที่ใช้เป็นอาหารอยู่แล้ว หากพบว่ามีฤทธิ์ดังกล่าว จะสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้งานได้จริงในสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะมีความปลอดภัยอย่างสูงต่อมนุษย์

จากการทดสอบของผู้วิจัยในเบื้องต้น พบว่าสารสกัดจากเอทานอลของยอดชะอมที่ขายตามท้องตลาดมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านระยะที่ 3 ที่ดี โดยทำให้ลูกน้ำมีอัตราการตายถึง 50% ที่ความเข้มข้นของสารสกัดยอดชะอม 0.3 mg/ml ซึ่งทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจเป็นอย่างมากที่จะศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงของสารสกัดยอดชะอมโดยละเอียด ทั้งส่วนสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อย เพื่อค้นหาส่วนที่มีฤทธิ์สูงสุดในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของชะอม หากผลของการศึกษานี้พบว่าสารสกัดจากยอดชะอมมีประสิทธิภาพที่ดี นอกจากจะเป็นองค์ความรู้ในทางวิชาการแล้ว การพัฒนาต่อยอดเพื่อนำไปใช้ประโยชน์จริงอาจจะสำเร็จได้ในอนาคตอันใกล้ เพราะหากพิจารณาในด้านความปลอดภัยต่อมนุษย์แล้ว สารสกัดจากชะอมย่อมมีความปลอดภัยสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมี หรือแม้กระทั่งเปรียบเทียบกับสารสกัดจากพืชชนิดอื่นที่ไม่เป็นอาหารของมนุษย์ งานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลและส่วนสกัดย่อยจากยอดชะอมในการฆ่ายุงลายบ้านในระยะต่างๆ ซึ่งหากพบว่ามีประสิทธิภาพดี อาจนำสู่การศึกษาพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ควบคุมยุงลายบ้านทดแทนการใช้สารเคมีได้จริงในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เตรียมสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยจากเอทานอลของยอดชะอม
2. ศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ ฤทธิ์ฆ่าตัวโม่ง และฤทธิ์ฆ่าไข่ยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยดังกล่าว

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากยอดใบชะอม

1.1. ซื้อยอดชะอมจากตลาดสดในจังหวัดพิษณุโลก

1.2. ล้างยอดชะอมให้สะอาดด้วยน้ำประปา นำไปอบให้แห้งด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนกระทั่งยอดชะอมแห้งสนิท จากนั้นบดละเอียดด้วยเครื่องปั่น (electric blender: 22,000 ppm)

1.3. ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากผงยอดชะอม โดยวิธีการแช่หมักด้วยเอทานอล (absolute ethanol) โดยนำผงยอดชะอมไปแช่ในเอทานอลในอัตราส่วน 1:10 (w/v) ที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยเครื่อง reciprocal shaker ที่ความเร็ว 180 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.4. กรองสารสกัดที่ได้ด้วยผ้าใยแก้วเพื่อแยกกากพืชชิ้นใหญ่ออกจากสารสกัดหยาบ กรองสารสกัดหยาบอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ในชุดกรองแก้ว

1.5. นำกากที่ได้จากการกรองไปสกัดซ้ำอีกครั้งหนึ่งตามวิธีการเดียวกับกับที่กล่าวมาแล้ว

1.6. นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 ครั้ง มารวมกัน จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator

1.7. บรรจุสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดสีชาและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น จนกว่าจะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านต่างๆ

2 การแยกส่วนสกัดย่อย (fractions) ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

2.1. แยกสารกสัดหยาบเอทานอลของยอดใบชะอมด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (quick column chromatography)

2.2. ใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลชนิดหยาบ (Merck No. 1.07734) ใช้ตัวชะ (eluent) โดยเริ่มจากเฮกเซน เฮกเซน-เอทิลอะซีเตต ถึงเอทิลอะซีเตต และเอทิลอะซีเตต-เมทานอล โดยการเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วสูงกว่าไปเรื่อยๆ

2.3. ตรวจสอบส่วนที่ออกมาจากคอลัมน์ (eluates) ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบาง (thin-layer chromatography, TLC)

2.4. รวมกลุ่มส่วนที่ออกมาที่มีจุดของสาร (spot) บน TLC คล้ายคลึงกัน

2.5. นำส่วนสกัดย่อยแต่ละกลุ่มไปทดสอบฤทธิ์ต่างๆ เช่นเดียวกับที่ทดสอบกับสารสกัดหยาบ

3 การเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการ

3.1. ยุงลายบ้านที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งผ่านการจับมาจากพื้นที่ในจังหวัดพิษณุโลก และวินิจฉัยโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามกุญแจยุงของ Rattanarithikul และคณะ (2010) ผ่านการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนเป็นยุงรุ่นที่ 20 (F_{20}) ดังนั้นจึงมั่นใจได้ว่าปลอดจากเชื้อไวรัสหรือเชื้อโรคต่างๆ ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงที่ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยาทางการแพทย์ MD 321 ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร มาโดยตลอด และเพาะเลี้ยงอยู่ในกรงเลี้ยงยุงมาตรฐานขนาด 30x30x30 เซนติเมตร ที่ป้องกันการหลุดลอด อีกทั้งห้องปฏิบัติการที่ใช้เลี้ยงยุงจะเป็นห้องปฏิบัติการปิด ไม่เปิดหน้าต่างโดยเด็ดขาด และไม่มีการเปิดประตูทิ้งไว้หากไม่ใช่เพื่อการเข้าออก เพื่อป้องกันการหลุดลอดของยุงที่อาจหลุดจากกรงเลี้ยงยุงออกนอกห้องปฏิบัติการ

3.2. ลูกน้ำจะถูกเลี้ยงในถาดพลาสติกสีขาวด้วยน้ำประปา โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงลูกน้ำคืออาหารสุนัขบดละเอียด เมื่อลูกน้ำเจริญเป็นตัวโม่งจะถูกถ่ายไปสู่แก้วพลาสติกบรรจุน้ำซึ่งปิดทับปากแก้วด้วยผ้าตาข่าย

3.3. เมื่อตัวโม่งเจริญเป็นตัวเต็มวัย จะถูกถ่ายสู่กรงเลี้ยงยุงมาตรฐาน เลี้ยงยุงตัวเต็มวัยด้วยสารละลายน้ำตาล 5% ผสมวิตามินรวม 5% โดยเปลี่ยนสารละลายน้ำตาลวันเว้นวัน

3.4. เมื่อยุงตัวเต็มวัยมีอายุประมาณ 3-4 วัน ให้ยุงเพศเมียกินเลือดหมูที่ซื้อมาจากตลาดสด ด้วยวิธี artificial membrane feeding (Rutledge *et al.*, 1964) จากนั้นเลี้ยงยุงด้วยสารละลายน้ำตาลต่อไปอีกเป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบเวลา ให้ยุงวางไข่โดยการนำถ้วยพลาสติกสีขาวบรรจุน้ำประปาประมาณครึ่งถ้วย บุขอบของถ้วยด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ใส่เข้าไปในกรงเลี้ยงยุง ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืน ยุงเพศเมียจะวางไข่ที่กระดาษกรอง จากนั้นเทน้ำออกจากถ้วยพลาสติก ทิ้งถ้วยพลาสติกไว้ในกรงเลี้ยงยุงจนกระดาษกรองแห้งสนิท (ประมาณ 3วัน) นำกระดาษกรองซึ่งมีไข่ติดอยู่ไปแช่น้ำประปาซึ่งบรรจุอยู่ในถาดพลาสติก ลูกน้ำระยะที่ 1 จะออกจากไข่ แล้วจึงให้อาหารและเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น

3.5. ทำการเพาะเลี้ยงตามที่ได้กล่าวข้างต้นจนได้ยุงลายบ้านรุ่นต่างๆ ต่อไป

4 การทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำและตัวโม่งยุงลายบ้าน (larvicidal and pupacidal activities)

สารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยจากเอทานอลของยอดชะอมจะถูกทดสอบฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านระยะที่ 1-4 ตามวิธีการมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก (WHO, 2005) ดังนี้

4.1. นำสารสกัดหยาบหรือส่วนสกัดย่อยของยอดชะอมมาเตรียมเป็น stock solution ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 1% ซึ่งเตรียมได้จากละลายสารสกัด 200 มิลลิกรัมใน DMSO 20 มิลลิลิตร stock solution จะถูกเก็บรักษาใน screw-cap vial ปิดทับด้วย aluminium foil ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.2. จากนั้น stock solution จะถูกเตรียมเป็นความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน เช่น นำ stock solution ปริมาณ 0.2-2 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร จะได้สารละลายทดสอบความเข้มข้น 10-100 ppm และหากต้องการให้มีความเข้มข้นต่ำหรือสูงกว่านี้ สามารถทำได้โดยการเจือจางหรือทำให้เข้มข้นมากขึ้นของ stock solution เช่น ปรับเป็น 2% หรือ 4% เป็นต้น

4.3. ทำการทดสอบฤทธิ์กับลูกน้ำยุงลายบ้านทั้ง 4 ระยะ โดยแต่ละระยะ ลูกน้ำยุงจำนวน 25 ตัว จะถูกถ่ายลงในสารละลายทดสอบ 200 มิลลิลิตร โดยในเบื้องต้นจะทดสอบด้วยสารละลายทดสอบที่มีช่วงความเข้มข้นต่างกันมาก เพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นของอัตราการตายของลูกน้ำเมื่อสัมผัสกับสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นจะเลือกความเข้มข้น 4 ถึง 5 ระดับ ที่ทำให้ลูกน้ำมีอัตราการตายที่ 10 ถึง 90% ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการหาค่า LC_{50} (50% lethal concentration) และ LC_{90} (90% lethal concentration)

4.4. สารละลายของสารสกัดหยาบหรือส่วนสกัดย่อยแต่ละความเข้มข้นจะถูกทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้นเป็นจำนวน 4 ซ้ำ เพื่อให้ได้จำนวนลูกน้ำยุงทดสอบ 100 ตัว ต่อสารสกัดแต่ละความเข้มข้น และทำการทดสอบเป็นจำนวน 2 ชุด ซึ่งจะได้จำนวนลูกน้ำยุงทดสอบ 200 ตัว ต่อสารสกัดหยาบแต่ละความเข้มข้น

4.5. สำหรับกลุ่มควบคุมจะใช้ DMSO 2 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร แทนสารละลายทดสอบ ทำการทดสอบ 4 ซ้ำ เพื่อให้ได้จำนวนลูกน้ำยุงทดสอบในกลุ่มควบคุม 100 ตัว

4.6. ทำการทดสอบในลักษณะดังกล่าวกับลูกน้ำยุงลายบ้านทั้ง 4 ระยะ และระยะตัวโม่ง

4.7. อัตราการตาย (Percentage mortality) จะถูกบันทึกที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง หลังการทดสอบ หากในกลุ่มควบคุมลูกน้ำยุงลายมีอัตราการตายมากกว่า 20% การทดลองชุดนั้นจะถูกยกเลิกและต้องทำการทดลองใหม่ และถ้าลูกน้ำในกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายระหว่าง 5-20% จะต้องทำการปรับค่าอัตราการตายโดยใช้ Abbott's formula (Abbott, 1925) ซึ่งมีสูตรการคิดดังนี้

$$\%M = \frac{\%\text{ test mortality - \% control mortality}}{100 - \%\text{control mortality}} \times 100$$

4.8. จากนั้นนำค่าอัตราการตายไปคำนวณหาค่า LC_{50} และ LC_{90} โดยวิธี Probit analysis (Finney, 1971) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Ldp Line (*http://embakr.tripod.com/ldpline*)

5 การทดสอบฤทธิ์ฆ่าระยะไข่ของยุงลายบ้าน (ovicidal assay)

สารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยจากเอทานอลของยอดชะอมจะถูกทดสอบฤทธิ์การฆ่าระยะไข่ของยุงลายตามวิธีการของ Cheah และคณะ (2013) ดังนี้

5.1 ให้ยุงที่กินเลือดแล้ววางไข่บนกระดาษกรองเปียกที่เตรียมไว้ในแก้วสำหรับบรรจุยุง โดยให้ยุงแต่ละตัววางไข่เดี่ยว (แก้ว 1 ใบ ให้ยุงเพียง 1 ตัว วางไข่)

5.2 ปล่อยให้ไข่มีการพัฒนาโดยสมบูรณ์เป็นเวลาประมาณ 2 วัน จากนั้นทิ้งให้กระดาษกรองแห้ง

5.3 เตรียมสารละลายสารสกัดหยาบหรือส่วนสกัดย่อยให้มีความเข้มข้นต่างๆ เช่นเดียวกับการเตรียมสำหรับทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำและตัวโม่ง ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

5.4 แช่ไข่ที่ติดอยู่กับกระดาษกรองลงในสารละลายที่เตรียมไว้เป็นเวลา 5 ชั่วโมง โดยทำการทดสอบ 5 ซ้ำ ต่อสารละลาย 1 ความเข้มข้น

5.5 หลังจาก 5 ชั่วโมง นำไข่ที่ทดสอบแต่ละความเข้มข้นไปแช่น้ำกลั่นในถ้วยสำหรับเลี้ยงลูกน้ำยุง จากนั้นตรวจนับจำนวนลูกน้ำที่เจริญออกมาจากไข่ทุกวัน จนกว่าจะไม่มีลูกน้ำเจริญออกมาอีก

5.6 นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่า % hatchability จากสูตร

$$\%\text{ hatchability} = \frac{\text{Number of larvae hatched}}{\text{Total number of eggs in each replicate}} \times 100$$

จากนั้นนำข้อมูลไปเปรียบเทียบกันในสารละลายแต่ละความเข้มข้นด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ *t* test และ one-way analysis of variance (ANOVA) โดยโปรแกรม SPSS

ผลการศึกษาวิจัย

สารสกัดหยาบจากยอดชะอม

ตัวอย่างยอดชะอมเมื่อผ่านการอบแห้งแล้ว น้ำหนักของตัวอย่างเป็นดังนี้

ตัวอย่าง	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	Yield (%)
ยอดชะอม	6,250	847.15	13.55

เมื่อนำตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งและบดละเอียดไปสกัดด้วยตัวเอทานอล แล้วระเหยตัวทำละลายออก ได้สารสกัดหยาบในปริมาณดังนี้

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดแห้ง (กรัม)	Yield (%)
ผงยอดชะอม	เอทานอล	847.15	45.56	5.38

ฤทธิ์ต่อระยะไข่ ลูกน้ำ และตัวโม่งของยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบจากยอดชะอม

จากการทดสอบ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ hatchability rate ของไข่ยุงลายบ้าน เมื่อได้ทดสอบกับสารสกัดหยาบยอดชะอมที่ความเข้มข้นต่างๆ รายละเอียดดังตาราง

สารทดสอบ	ความเข้มข้น (ppm)	จำนวนลูกน้ำฟักตัว (7วัน) / จำนวนไข่ทั้งหมด	% hatchability
สารสกัดหยาบ	100	183/336	54.46
	200	247/423	58.39
	300	264/438	60.27
	400	202/378	53.44
	500	148/304	48.68
Control	0 (น้ำกลั่น)	41/103	39.81
	100	46/119	38.66
	300	134/229	58.51
	500	53/95	55.79

สำหรับฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงลายบ้าน พบว่าสารสกัดหยาบมีผลต่ออัตราการตายของลูกน้ำแต่ละระยะที่แตกต่างกัน โดยลูกน้ำระยะที่ 1 มีค่า LC_{50} ต่ำที่สุด (169.78 ppm) ในขณะที่ลูกน้ำระยะที่ 4 มีค่า LC_{50} สูงที่สุด (467.46 ppm) ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการทดสอบ ซึ่งค่า LC_{50} จะลดลงในลูกน้ำทุกระยะ เมื่อเวลาทดสอบ 48 ชั่วโมง รายละเอียดดังตาราง

ยุงลายบ้าน (ระยะ)	ความเข้มข้น (ppm)	อัตราการตาย (%)		LC_{50} (ppm)		LC_{90} (ppm)	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h
ลูกน้ำระยะที่ 1	50	0	0	169.78	162.36	368.96	342.41
	75	4	7				
	100	19	23				
	125	41	44				
	150	48	53				
	175	46	51				
	200	56	60				
	Control	0	3				

ยุงลายบ้าน (ระยะ)	ความเข้มข้น (ppm)	อัตราการตาย (%)		LC_{50} (ppm)		LC_{90} (ppm)	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h
ลูกน้ำระยะที่ 2	50	0	0	237.26	169.32	438.00	273.46
	75	2	3				
	100	4	6				
	125	4	15				
	150	15	37				
	175	23	60				
	200	49	72				
	250	53	83				
	300	66	92				
	Control	0	0				
ลูกน้ำระยะที่ 3	50	5	16	244.50	109.73	735.79	271.22
	100	16	46				
	150	24	62				
	200	33	72				
	250	53	89				
	300	66	99				
	Control	0	0				
ลูกน้ำระยะที่ 4	50	0	0	467.46	175.11	2,182.44	514.10
	100	9	22				
	150	23	50				
	200	23	54				
	250	28	66				
	300	27	72				
	350	37	79				
	400	55	85				
	Control	0	0				

สารสกัดหยาบยอดชะอมมีฤทธิ์ฆ่าระยะตัวโม่งได้ดีกว่าลูกน้ำ โดยมีค่า LC_{50} ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการทดสอบคือ 87.27 และ 56.41 ppm ตามลำดับ รายละเอียดดังตาราง

ยุงลายบ้าน (ระยะ)	ความเข้มข้น (ppm)	อัตราการตาย (%)		LC_{50} (ppm)		LC_{90} (ppm)	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h
ตัวโม่ง	10	0	4	87.27	56.41	175.31	155.17
	30	4	17				
	50	12	38				
	70	33	58				
	90	55	81				
	Control	0	0				

การแยกองค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

หลังจากแยกองค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากน้ำและเอทานอลของของกุหลาบพุกาม โดยวิธี Quick Column Chromatography และ Thin Layer Chromatography แล้ว พบว่าสารสสกัดหยาบจากน้ำสามารถแยกสารสกัดส่วนย่อย (fraction) ออกมาได้ 505 ส่วน ซึ่งสามารถจัดได้เป็น 7 กลุ่ม คือ Fr-G1, fractions 1-15 (4.20 g), Fr-G2, fractions 16-33 (1.04 g), Fr-G3, fractions 34-55 (0.65 g), Fr-G4, fractions 56-150 (0.11 g), Fr-G5, fractions 151-230 (0.21 g), Fr-G6, fractions 231-425 (0.51 g) และ Fr-G7, fractions 426-505 (5.00 g)

ฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำและตัวโม่งยุงลายบ้านของสารสกัดส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบยอดชะอม

ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดส่วนย่อยมีดังนี้

Fractions	24-hour			48-hour		
	LC_{50} with fiducial limit (ppm)	Parameter		LC_{50} with fiducial limit (ppm)	Parameter	
		χ^2	Slope (±SE)		χ^2	Slope (±SE)
Fr-G1	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-
Fr-G2	50.75 (48.25 - 53.14)	1.35	9.0023 ± 0.7633	45.28 (43.09 - 47.41)	1.66	10.4594 ± 0.9719
Fr-G3	39.45 (36.34 - 42.32)	3.94	5.3264 ± 0.4812	37.45 (34.99 - 39.77)	1.24	6.9271 ± 0.6188
Fr-G4	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-
Fr-G5	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-
Fr-G6	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-
Fr-G7	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-

[a] ไม่พบอัตราการตายในกลุ่มควบคุม

[b] อัตราการตายต่ำมากที่ความเข้มข้น 100 ppm ค่า LC_{50} value จึงมากกว่า 100 ppm และค่า parameters ไม่สามารถคำนวณได้

ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่าตัวโม่งยุงลายบ้านของสารสกัดส่วนย่อยมีดังนี้ 103817

Fractions	24-hour			48-hour		
	LC_{50} with fiducial limit (ppm)	Parameter		LC_{50} with fiducial limit (ppm)	Parameter	
		χ^2	Slope (±SE)		χ^2	Slope (±SE)
Fr-G1	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-
Fr-G2	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-
Fr-G3	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-
Fr-G4	53.73 (48.73 - 58.94)	0.55	3.2716 ± 0.3903	49.15 (44.47 - 53.70)	0.64	3.4403 ± 0.3923
Fr-G5	44.10 (38.70 - 48.93)	0.47	2.9848 ± 0.3822	40.64 (36.85 - 44.39)	1.03	3.5146 ± 0.2976
Fr-G6	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-
Fr-G7	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-

[a] ไม่พบอัตราการตายในกลุ่มควบคุม

[b] อัตราการตายต่ำมากที่ความเข้มข้น 100 ppm ค่า LC_{50} value จึงมากกว่า 100 ppm และค่า parameters ไม่สามารถคำนวณได้

สรุปและอภิปรายผลการศึกษาวิจัย

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำและตัวโม่งยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบจากยอดชะอม โดยพบว่าสารสกัดหยาบยอดชะอมไม่มีฤทธิ์ฆ่าระยะไข่ของยุงลายบ้าน เพราะเมื่อทดสอบระยะไข่ของยุงลายบ้านด้วยสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นถึง 500 ppm แต่กลับไม่พบว่าสามารถทำให้อัตราการฟักตัวของไข่แตกต่างไปจากการทดสอบในกลุ่มควบคุม

อย่างไรก็ตาม สารสกัดหยาบจากยอดชะอมมีฤทธิ์ที่ดีในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านระยะต่างๆ โดยพบว่ามีค่า LC_{50} ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ต่อยุงลายบ้านระยะที่ 1, 2, 3 และ 4 อยู่ที่ 169.78 ppm และ 162.36 ppm, 237.26 ppm และ 169.32 ppm, 244.50 ppm และ 109.73 ppm, 467.46 ppm และ 175.11 ppm ตามลำดับ ซึ่งค่า LC_{50} ต่อยุงลายบ้านระยะที่ 3 ที่เวลา 24 ชั่วโมง (244.50 ppm) ซึ่งเป็นระยะที่ใช้ทดสอบในงานวิจัยส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ของฆ่าลูกน้ำยุงของสารสกัดจากพืช แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากยอดชะอมมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่ค่อนข้างดี สำหรับฤทธิ์ฆ่าตัวโม่งนั้น พบสารสกัดหยาบจากยอดชะอมมีค่า LC_{50} ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง อยู่ที่ 87.27 ppm และ 56.41 ppm ตามลำดับ ซึ่งถือว่ามีฤทธิ์ดีมากในการฆ่าตัวโม่งของยุงลายบ้าน

เมื่อแยกส่วนสกัดย่อย (7 กลุ่ม) ได้จากสารสกัดหยาบ และเปรียบเทียบฤทธิ์กับสารสกัดหยาบ พบว่าส่วนสกัดย่อย Fr-G2 และ Fr-G3 มีฤทธิ์ที่ดีขึ้นในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านระยะที่ 3 โดยมีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เพียง 50.75 และ 39.45 ppm ตามลำดับ และ ส่วนสกัดย่อย Fr-G4 และ Fr-G5 มีฤทธิ์ที่ดีขึ้นในการฆ่าระยะตัวโม่ง โดยมีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เพียง 53.73 และ 44.10 ppm ตามลำดับ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงข้อมูลที่น่าสนใจว่า สารที่ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำและตัวโม่งนั้นเป็นสารคนละกลุ่มกัน ซึ่งหาก

ทำการศึกษาต่อยอดจนสามารถระบุชนิดของสารนั้นได้ จะเป็นประโยชน์ยิ่งในการนำสารดังกล่าวมาใช้งานในการควบคุมลูกน้ำหรือตัวโม่งของยุงในธรรมชาติ

เนื่องจากชะอมเป็นพืชที่เป็นอาหาร การศึกษาเกี่ยวกับชะอมในอดีตที่ผ่านมาจึงศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับคน เช่น ฤทธิ์ทาง antinociceptive anti-inflammatory หรือ antimicrobial เท่านั้น (Dongmo *et al.*, 2005; Nanasombat และ Teckchuen, 2009) จนเมื่อปี 2013 Lalchhandama (2013) ได้รายงานฤทธิ์ที่แตกต่างออกไปของชะอม คือฤทธิ์ฆ่าหนอนพยาธิชนิด *Raillietina echinobothrida* จนมาถึงการศึกษาของผู้วิจัย ซึ่งได้ค้นพบและรายงานฤทธิ์ที่แตกต่างออกไปของสารสกัดจากยอดชะอม โดยพบว่าสารสกัดหยาบและส่วนสกัดยอดของยอดชะอมนั้นมีฤทธิ์ที่ดีถึงดีมากในการฆ่าลูกน้ำและตัวโม่งของยุงลายบ้าน นอกจากนี้พบว่า หากให้ลูกน้ำหรือตัวโม่งสัมผัสกับสารสกัดเป็นเวลานานขึ้นถึง 48 ชั่วโมง อัตราการตายจะเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ ก่อนหน้านี้ เช่น ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดจากพืชชนิด *Coriandrum sativum Nigella sativa* และ *Syzygium aromaticum* (Bila *et al.*, 2012) พืชชนิด *Ricinus communis* และ *Cnidoscolus phyllacanthus* (Candido *et al.*, 2013)

เมื่อพิจารณาถึงพืชชนิดอื่นที่อยู่ในตระกูล (Genus) เดียวกับชะอม มีรายงานว่า *Acacia nilotica* มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านที่ LC_{50} 60-148 ppm และฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญที่ LC_{50} 59-126 ppm (Chaubal *et al.*, 2005) การศึกษาครั้งนั้นได้ศึกษาจนระบุชนิดของสารที่ออกฤทธิ์ได้คือ D-pinitol (=3-*O*-methyl-D-*chiro*-inositol; 1) และล่าสุด Edriss *et al.* (2012) ได้รายงานว่าสารสกัดจาก *A. nilotica* มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles arabiensis* อีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดจาก *A. nilotica* กับชะอมในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าสารสกัดจากชะอมมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านที่ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบที่ใช้ลูกน้ำยุงระยะเดียวกัน สารสกัดจากชะอมจึงมีความน่าสนใจที่จะถูกทำการศึกษาต่อยอด โดยเฉพาะการหาชนิดของสารออกฤทธิ์ในส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์ที่ดีในการฆ่ายุงระยะลูกน้ำหรือตัวโม่ง นอกจากนี้ ความเป็นพิษต่อคน ต่อสัตว์ชนิดอื่น และความคุ้มค่าในต้นทุนการผลิต เป็นสิ่งที่ควรถูกประเมินต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์ และนพวรรณ บุญชู. (2554). การต้านทานข้ามต่อเดลต้าเมทรินในยุงลายบ้านตัวเต็มวัยจากการเหนี่ยวนำให้มีความต้านทานต่อทีมีฟอสในระยะลูกน้ำ. *วารสารสาธารณสุขล้านนา, 7*(3), 240-250.

Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology, 18*, 265-267.

Akanitapichat, P., Wangmaneerat, A., and Teerawatanasuk, N. (2005). Anti-herpes simplex virus type 1 activity of local Northeastern plants. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences, 29(3-4)*, 137-145.

Bilal H, Akram W, Din S, Khan IA, Hassan SA, Arshad M. Larvicidal activity of selected plant extracts against *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Afr Entomol* 2012; 20: 8-12.

Candido LP, Cavalcanti MT, Beserra EB. Bioactivity of plant extracts on the larval and pupal stages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 2013; 46: 420-5.

Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., & Rakariyatham, N. (2005). Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chemistry, 92*, 491-497.

Chareonviriyaphap, T., Aum-aung, B., & Ratanatham, S. (1999). Current insecticide resistance patterns in mosquito vectors in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 30*(1), 184-194.

Chaubal R, Pawar PV, Hebbalkar GD, *et al.* Larvicidal activity of *Acacia nilotica* extracts and isolation of D-pinitol--a bioactive carbohydrate. *Chem Biodivers* 2005; 2: 684-8.

Cheah, S.X., Tay, J.W., Chan, L.K., & Jaal, Z. (2013). Larvicidal, oviposition, and ovicidal effects of *Artemisia annua* (Asterales: Asteraceae) against *Aedes aegypti, Anopheles sinensis,* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research, 112*, 3275-3282.

Dongmo, A.B., Nguelefack, T. & Lacaille-Dubois, M.A. (2005). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Acacia pennata* wild (Mimosaceae). *Journal of Ethopharmacology, 98*, 201-206.

Edriss AE, Satti AA, Alabjar ZA. Preliminary studies on phytochemicals and larvicidal effects of *Acacia nilotica* L. extracts against *Anopheles arabiensis* Patton. *Sci Res Essays* 2012; 7: 4253-8.

Finney, D.J. 1971. *Probit analysis*, 3rd ed. Cambridge University Press, London, pp. 68-78.

Lalchhandama K. Efficacy and structural effects of *Acacia pennata* root bark upon the avian parasitic helminth, *Raillietina echinobothrida. Phcog J* 2013; 5: 17-21.

Murakami, A., Ohigashi, H. & Koshimizu, K. (1994). Possible anti-tumour promoting properties of traditional Thai food items and some of their active constituents. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 3*, 185-191.

Promsiri, S., Naksathit, A., Kruatrachue, M., & Thavara, U. (2006). Evaluations of larvicidal activity of medicinal plant extracts to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and other effects on a non target fish. *Insect Science, 13*, 179-88.

Rattanarithikul, R., Harbach, R.E., Harrison, B.A., Panthusiri, P., Coleman, R.E., & Richardson, J.H. (2010).

Nanasombat S, Teckchuen N. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *J Med Plants Res* 2009; 3: 443-9.

Vl. Tribe Aedini. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 41* Suppl 1: 1-225.

Rifai, Y., Arai, M.A., Koyano, T., Kowithayakorn, T., & Ishibashi, M. (2010). Terpenoids and flavonoid glycoside from *Acacia pennata* leaves as Hedgehog/GLI-mediated transcriptional inhibitors. *Journal of Natural Products, 73*, 995-997.

Rodriguez, M.M., Bisset, J., Ruiz, M., & Soca, A. (2002). Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *Journal of Medical Entomology*, *39*(6), 882-888.

Rutledge, L.C., Ward, R.A., & Gould, D.J. (1964). Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosquito News*, *24*, 407-419.

Sutthanont, N., Choochote, W., Tuetun, B., Junkum, A., Jitpakdi, A., & Chaithong, U., et al. (2010). Chemical composition and larvicidal activity of edible plant-derived essential oils against the pyrethroid-susceptible and –resistant strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecology*, *35*(1), 106-115.

Thongwat, D., Ganranoo, L., Chokchaisiri, A. (2014). Larvicidal activity of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) fruit endocarp crude and fractionated extracts against *Aedes aegypti* (L.) (Diptier: Culicidae). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, *45*(6), 1292-1300.

World Health Organization (WHO). (2005). *Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides*. World health Organization, Communicable Disease Control, Prevention and Eradication, WHO Pesticide Evaluation Scheme, Geneva, Switzerland.

ภาคผนวก

ผลงานวิจัยได้รับการเผยแพร่ตีพิมพ์ในวาสารวิชาการระดับนานาชาติ มีค่า Impact Factor จาก Thomson Reuters' Journal Citation Reports = 0.773 และ SCImago Journal Rank (SJR) จากฐานข้อมูล SCOPUS = Q3 ดังนี้คือ

Damrongpan Thongwat, Lucksagoon Ganranoo and Ratchanaporn Chokchaisiri (2017). Larvicidal and pupicidal activities of crude and fractionated extracts of *Acacia pennata* (L.) Willd. Subsp *insuavis* shoot tips against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). ***The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health***, 48(1), January, 27-36.

Reference and Information services, Naresuan University Library
Tel: 0-5596-2623 or 2623 e-mail ; reference@nu.ac.th

วันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2560
บริการ : Journal Impact Factor
เรียน อาจารย์ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์

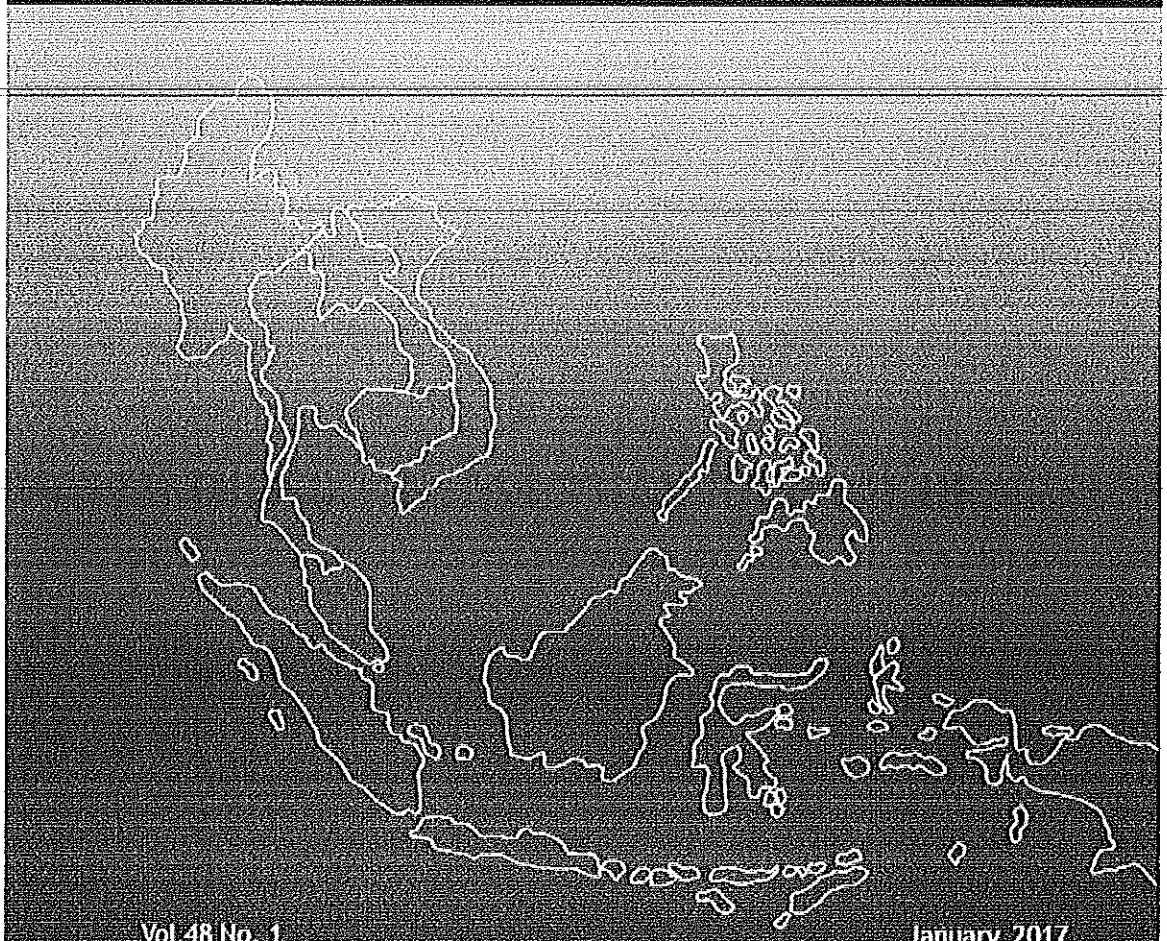
Impact Factor วารสารที่ต้องการจาก Thomson Reuters' Journal Citation Reports

Journal title	JCR abbreviated title	ISSN	Impact Factors (2015)	Note
Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health		01251562	0.773	

SCImago Journal Rank (SJR) จากฐานข้อมูล SCOPUS

Journal title	JCR abbreviated title	ISSN	SJR Quartile (2015)	Note
Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health		01251562	Q3	

THE SOUTHEAST ASIAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND PUBLIC HEALTH



Vol 48 No. 1 January 2017

50th

Official Publication of the SEAMEO Regional Tropical Medicine and Public Health Network (TROPMED)

LARVICIDAL AND PUPICIDAL ACTIVITIES OF CRUDE AND FRACTIONATED EXTRACTS OF *ACACIA PENNATA* (L.) WILLD. SUBSP *INSUAVIS* SHOOT TIPS AGAINST *AEDES AEGYPTI* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE)

Damrongpan Thongwat[1,2], Lucksagoon Ganranoo[3] and Ratchanaporn Chokchaisiri[3]

[1]Department of Microbiology and Parasitology, [2]Centre of Excellence in Medical Biotechnology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok; [3]Department of Chemistry, School of Science, University of Phayao, Thailand

Abstract. *Acacia pennata* subsp *insuavis*, or *Cha-om* in Thai, is a common vegetable found in Thailand. It has been used as a medicinal herb for a long time. From the literature, antinociceptive, anti-inflammatory, antimicrobial, and anti-helminthic activities were reported. In this study, we investigated two new actions of this plant: larvicide and pupicide. The crude ethanolic and fractionated extracts of *A. pennata* shoot tips were tested against aquatic stages of the dengue virus vector, *Aedes aegypti* mosquito. The 1st-4th instar larvae and pupae of *Ae. aegypti* were subjected for bioassays by following the standard protocol of WHO. The larval and pupal mortalities were observed after 24- and 48-hour exposure times. The bioassays demonstrated that stronger efficacy was found from the fractionated extracts than the crude extracts. The LC_{50} values against the 3rd instar larvae were 39.45-50.75 mg/l (fractionated extracts) and 244.50 mg/l (crude extracts). It also effects the pupae with the LC_{50} values of 44.10-53.73 mg/l and 87.27 mg/l for the fractionated and the crude extracts, respectively. The bioassays demonstrated the effective mosquito larvicide and pupicide of *A. pennata* extracts. It could be an alternative candidate for the development of phytotoxin for controlling mosquito vectors.

Keywords: *Aedes aegypti*, *Acacia pennata*, crude extract, larvicide, pupicide

INTRODUCTION

For vector control strategy, insecticides are the most effective substance. However, it causes some adverse effects, *eg*, environmental pollution and toxic endangerment to non-target organisms (Colin *et al*, 2004; Diepens *et al*, 2014; Ogbeide *et al*, 2015). One of leading chemical larvicides, temephos, not only causes the above-mentioned effects, but also leads to insecticide resistance after indiscriminate use (Chareonviriyaphap, 1999; Sornpeng *et al*, 2009; Tikar *et al*, 2009). In order to reduce those problems, a bio-insecticide has been intensively researched and developed for substitution of insecticides.

Currently, plant extracts, some of the bio-substances, have been considered for controlling the population of insect vectors, including mosquitoes. A number of

Correspondence: Damrongpan Thongwat, Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, 99 Moo 9, Tambon Tha Pho, Mueang, Phitsanulok 65000, Thailand.
Tel: +66 (0) 55 964676; Fax: +66 (0) 55 964770
E-mail: damrongpanth@nu.ac.th

plant species: *Callistemon rigidus* (Pierre *et al*, 2014), *Chloroxylon swietenia* (Jayaraman *et al*, 2015), and *Leucas aspera* (Elumalai *et al*, 2016) were found to have larvicidal activity against *Aedes aegypti* mosquito, the most important vector of the dengue virus (WHO, 2011). A great quantity of such plant species in Thailand has led to a continuing search to find a novel larvicide-contained plant.

Acacia pennata (L.) Willd. subsp *insuavis* (Lace) I.C. Nielsen, Thorny tree (common name) or *Cha-om* (Thai name), is one of thirteen *Acacia* species native to Thailand. The young leaf (shoot tip) of *A. pennata* is a common and an important food source for Thai people. For the traditional medicine aspect, *A. pennata* is used for the treatment of indigestion in infants, urine scald, and the treatment of bleeding gums. It was also used for treatment of cholera, digestive complaints, headache, body pain, snake bites, and fish poisoning (Bhumibhamon, 2002). The literature suggests that the leaves extracts of *A. pennata* have antinociceptive and anti-inflammatory activities (Dongmo *et al*, 2005), antimicrobial activity (*Bacillus cereus* and *Lactobacillus plantarum*) (Nanasombat and Teckchuen, 2009), and anticancer (Rifai *et al*, 2010) activities. Recently, the root bark extract of the plant showed killing efficacy against *Raillietina echinobothrida*, the avian parasitic helminth, with profound structural damages of the worm (Lalchhandama, 2013).

For our study, the potential larvicidal and pupicidal activities of *A. pennata* shoot tips extract, against aquatic stages of the *Ae. aegypti* mosquito were studied.

MATERIALS AND METHODS

Acacia pennata crude extract preparation

Fresh shoot tips of *A. pennata* were purchased from a food market in Mueang District, Phitsanulok Province, Thailand. The shoot tips were cleaned with tap water and air dried. After weighing, the *A. pennata* shoot tips (5 kg) were completely dried in a hot air oven at 45°C. They were then ground to powder using an electric blender at 22,000 rpm. The dried powder (677.72 g) was extracted with absolute ethanol in a ratio of 1:10 (powder:solvent).

Twenty-five grams of the plant powder were suspended in 250 ml of the solvent (absolute ethanol) in a 500-ml Erlenmeyer flask, which was continuously shaken at 180 rpm on a rotary shaker for 24 hours at room temperature. The suspension was then suction filtered through a Whatman No. 1 filter paper via a Buchner funnel. The filtrates were evaporated to dryness by using a rotary evaporator (Buchi Rotavapor® R-205 with a Buchi Vac® V-500; BUCHI, Flawil, Switzerland).

Yields for the *A. pennata* shoot tips crude extract were 36.45 g. The crude extract was retained in a desiccator until required for a further fractionated extraction and bioassays. A voucher specimen of the *A. pennata* shoot tips (DTNU009) was deposited at the Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Thailand.

Column chromatography fractionated extraction

The *A. pennata* shoot tips ethanolic crude extract (15.00 g) was fractionated by a column chromatography (Silica gel 60, less than 0.063 mm, 200 g, P/N 1.07729.5000; Merck, Frankfurt, Germany), using a gradient solvent system of *n*-hexane, *n*-hexane-EtOAc, EtOAc, EtOAc-MeOH, and MeOH with increasing amounts of the more polar solvent.

The eluates were examined using a Thin Layer Chromatography (TLC Silica gel 60 F_{254}, P/N 1.05554.0001; Merck,

Frankfurt, Germany). They were then fractionated into seven groups of eluting fractions: Gr1, fractions 1-15 (4.20 g); Gr2, fractions 16-33 (1.05 g); Gr3, fractions 34-55 (0.64 g); Gr4, fractions 56-150 (0.10 g); Gr5, fractions 151-230 (0.20 g); Gr6, fractions 231-425 (0.51 g) and Gr7, fractions 426-505 (5.00 g).

Mosquito colonization

The laboratory strain of *Ae. aegypti* mosquito, originally collected from Mueang District, Phitsanulok Province, Thailand was colonized as previously described (Thongwat *et al*, 2014). In brief, larvae were reared in tap water under laboratory condition [25±2°C, 70-80% relative humidity, and 10:14 (L:D) photoperiod]. Powdery dog biscuits (Adult Complete Nutrition, Pedigree®, Mars Petcare, Franklin, TN) were fed to the larvae. After pupation, they were transferred into a mosquito cage until they became adults. The adults were provided with a 5% sugar solution containing 5% multivitamin syrup (Seven Seas®, Feltham, Feltham, UK).

After 5-7 days, the females were allowed to feed on a blood meal by using an artificial membrane feeding method (Rutledge *et al*, 1964). After a further 2-4 days, the gravid females were permitted to lay eggs on a wet filter paper (Whatman No. 1). The eggs were air-dried (3 days at room temperature) and maintained in a humidity-controlling glass jar until required.

Larvicidal and pupicidal bioassays

The bioassays of *A. pennata* extracts were conducted on *Ae. aegypti* larvae and pupae by following the protocol of WHO (2005). Briefly, a stock solution of the extracts (1% w/v) was prepared by adding 200 mg of the extract into 20 ml of dimethylsulphoxide (DMSO). The stock solutions were kept at 4°C. A series of concentrations were prepared for the bioassay testing. Two hundred ml of various concentrations was then put into plastic bowls. Twenty-five of the 1st, 2nd, 3rd, and 4th instar larvae or pupae were transferred into the plant extract solutions. The concentrations of 50-400 mg/l were prepared for crude extract testing, while lower concentration series were prepared for the fractionated one. After 24 and 48 hours, mortality rates were assessed. The larvae were considered dead when they were unable to normally move after gentle touching with a needle. The experiments were performed in four replicates. The control group, containing 2 ml of DMSO in 198 ml distilled water was also included.

Data analysis

The larvicidal and pupicidal data were analyzed using a computerized probit analysis for the 50% lethal concentration (LC_{50}) determination (Finney, 1971). The chi-square values (χ^2) and 95% confidence intervals (CI) of upper and lower fiducial limits (UCL and LCL) were also calculated [LdP Line® (Plant Protection Research Institute), Cairo, Egypt].

RESULTS

The 24- and 48-hour bioassay results of the crude ethanolic extract of *A. pennata* shoot tips against aquatic stages, including the 1st to 4th instars larva and the pupa, of *Ae. aegypti* mosquito are presented in Table 1, Fig 1, and Fig 2. Among all five stages, the pupa displayed the highest susceptibility to the extract with LC_{50} values of 82.27 and 56.41 mg/l for the 24- and 48-hour exposure times, respectively. For all larval stages, the 4th instar showed the highest tolerance with 467.46 mg/l LC_{50} value from the 24-hour exposure time, while the lowest response (175.11 mg/l) was found from the 48-hour bioassay.

Table 1
24- and 48-hour larvicidal and pupicidal activities of *A. peltata* crude extract against aquatic stages of *Ae. aegypti*.

Mosquito stage[a]	24-hour			48-hour		
	LC_{50} with fiducial limit (mg/l)	Parameter		LC_{50} with fiducial limit (mg/l)	Parameter	
		χ^2	Slope (± SE)		χ^2	Slope (± SE)
1st instar larva	169.78 (149.13 - 225.62)	11.85	3.8020 ± 0.4209	162.36 (142.03 - 266.92)	11.78	3.9547 ± 0.4190
2nd instar larva	237.26 (216.85 - 269.71)	13.47	4.8137 ± 0.3724	169.382 (162.79 - 176.14)	7.44	6.1560 ± 0.3667
3rd instar larva	294.50 (250.25 - 378.36)	6.54	2.6785 ± 0.2794	109.73 (83.20 - 132.96)	12.69	3.2611 ± 0.2484
4th instar larva	467.66 (382.47 - 628.99)	10.66	1.9154 ± 0.2829	175.11 (157.65 - 191.29)	3.29	2.7400 ± 0.2638
Pupa	87.27 (79.60 - 94.29)	2.18	4.2304 ± 0.5977	56.45 (39.22 - 87.85)	11.26	2.5154 ± 0.2992

[a]Zero mortality rates were observed from all control groups.

For the fractionated extracts, seven fractions (Fr-G1 to Fr-G7) were obtained from the crude. It was found that only Fr-G2 and Fr-G3 demonstrated larvicidal activity against the 3rd stage larvae with superior efficacies than the crude extract. After statistical analysis, the Fr-G3 showed significantly greater activity than the Fr-G2, with LC_{50} values of 39.45 mg/l (24h), 37.45 mg/l (48h); and 50.75 mg/l (24h), 45.28 mg/l (48h), for the Fr-G3 and Fr-G2, respectively (Table 2, Fig 3).

Unexpectedly, fractions (Fr-G2 and Fr-G3), which contained larvicide bioactive compound, did not show the pupicidal activity (with nil pupal mortality after 100 mg/l testing for 48 hours). It was then found from Fr-G4 and Fr-G5 fraction groups with lower LC_{50} values. Fr-G4 showed LC_{50} values of 53.73 mg/l (24 hrs) and 49.15 mg/l (48 hrs). Fr-G5 showed a slightly higher activity with 44.10 mg/l (24 hrs) and 40.64 mg/l (48 hrs) LC_{50} values (Table 3). Compared to the crude extract, both the Fr-G4 and Fr-G5 fractions showed significant pupicidal activity greater than the crude extracts (Fig 4).

In this study, improvement of both larvicidal and pupicidal, with lower LC_{50} values were found after extending the exposure bioassay time to 48 hours.

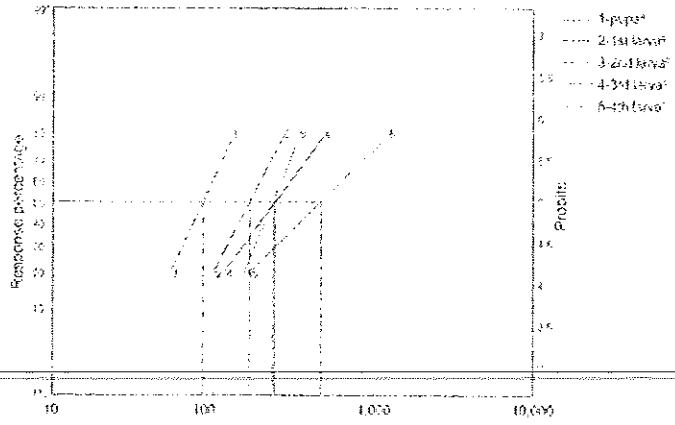


Fig. 1–The comparison of 24-hour LC_{50} values of the *A. pennata* crude extracts on the aquatic stages of *Ae. aegypti*. Statistically significant differences are indicated by different letter on the mosquito stage categories (upper right).

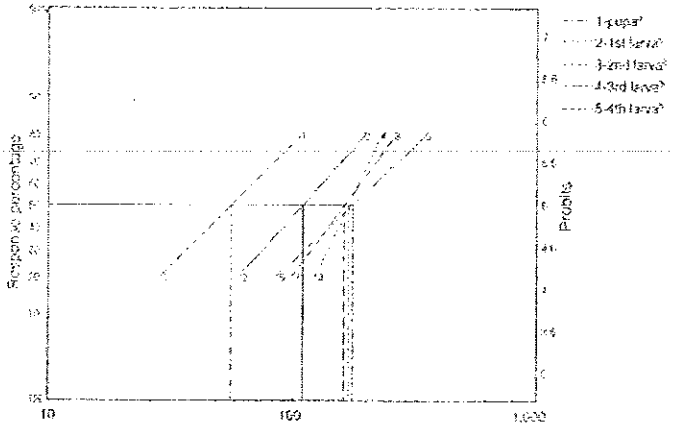


Fig. 2–The comparison of 48-hour LC_{50} values of the *A. pennata* crude extracts on the aquatic stages of *Ae. aegypti*. Statistically significant differences are indicated by different letter on the mosquito stage categories (upper right).

DISCUSSION

Although *A. pennata* is one of the most common ingredients for traditional Thai foods, it has never been reported for other activities, such as the medical aspect, for example, anti-nociceptive, anti-inflammatory, or antimicrobial activities (Dongmo *et al*, 2005; Nanasombat and Teckchuen, 2009). In 2013, the killing efficacy against the avian parasitic helminth, *R. echinobothrida*, was reported (Lalchhandama, 2013). In our study, we discovered and reported some novel properties—larvicidal and pupicidal activities—of the *A. pennata* shoot tips against the dengue vector mosquito. Both ethanolic crude and fractionated extracts contained a promising insecticide against the 1st-3th instars larvae (39.45-244.50 mg/l) and pupae (44.10-87.27 mg/l) of *Ae. aegypti*.

Table 2
24- and 48-hour larvicidal activities of *A. pennata* fractionated extracts against the 3rd instar larvae of *Ae. aegypti*.

Fractionated group[a]	24-hour			48-hour		
	LC_{50} with fiducial limit (mg/l)	Parameter		LC_{50} with fiducial limit (mg/l)	Parameter	
		χ^2	Slope (± SE)		χ^2	Slope (± SE)
Fr-G1	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-
Fr-G2	50.75 (48.25 - 53.14)	1.35	9.0023 ± 0.7632	45.28 (43.09 - 47.41)	1.66	10.4594 ± 0.9719
Fr-G3	39.45 (36.34 - 42.32)	3.94	5.3264 ± 0.4812	37.45 (34.99 - 39.77)	1.24	6.9271 ± 0.6188
Fr-G4	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-
Fr-G5	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-
Fr-G6	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-
Fr-G7	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-

[a]Zero mortality rates were observed from all control groups; [b]The mortality rates were very low at 100 mg/l, so the LC_{50} value is estimated to over 100 mg/l and the parameters could not be calculated.

Only the 4th instar larva slightly tolerated the crude extract, with a LC_{50} value of 467.46 mg/l. However, stronger efficacy was found (175.11 mg/l) after extending the exposure time to 48 hours. It indicated that the extension of the exposure period would result in improvements. Similar findings have been found from the *Aedes* larvicide studies of the other plant extracts, for example, the ether extract of *Coriandrum sativum, Nigella sativa,* and *Syzygium aromaticum* (Bilal *et al*, 2012), the ethanolic extract of *Ricinus communis, Coutarea hexandra* and *Cnidoscolus phyllacanthus* (Candido *et al*, 2013), and, recently, the ethanolic extract of *Pereskia bleo* (Thongwat *et al*, 2014).

From our fractionated extracts study, the larvicide was found only from fractions Fr-G2 and Fr-G3, while the pupicide was from Fr-G4 and Fr-G5. This can be concluded that the larvicide and pupicide activities are contained in different substances. Therefore, it is interesting to investigate which active substances contain the larvicidal or pupicidal activities.

To pursue that study, the isolation and identification of the active substances have to undergo further investigation. For example, from the literature, n-hexadecanoic isolated from *Feronia limonia* leaves can kill the larvae of *Ae. aegypti, Culex quinquefasciatus,* and *Anopheles stephensi* (Rahuman *et al*, 2000). *Hyptis martiusii* leaf oil, 1,8-cineole,

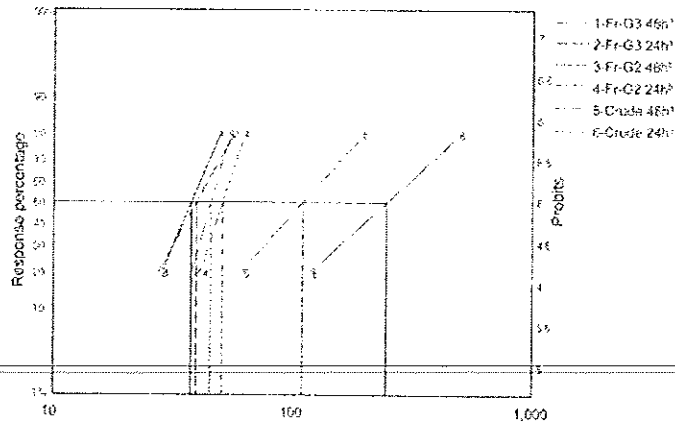


Fig 3–The comparison of 24- and 48-hour LC_{50} values of the *A. pennata* crude and fractionated extracts on the 3rd instar larvae of *Ae. aegypti*. Statistically significant differences are indicated by different letter on the crude or fractionated group categories (upper right).

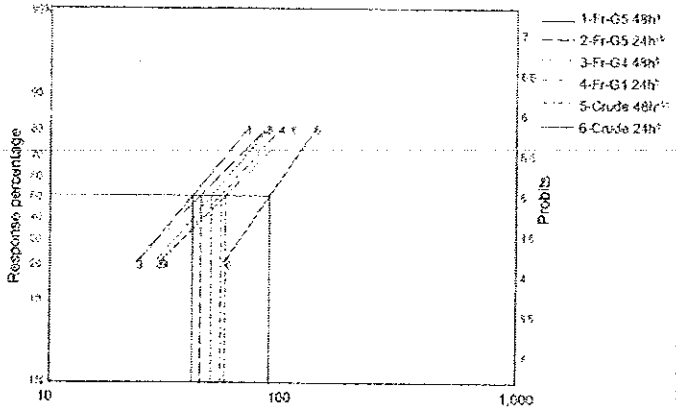


Fig 4–The comparison of 24- and 48-hour LC_{50} values of the *A. pennata* crude and fractionated extracts on the pupae of *Ae. aegypti*. Statistically significant differences are indicated by different letter on the crude or fractionated group categories (upper right).

have shown larvicidal activity against *Ae. aegypti* (Araujo *et al*, 2003).

In addition, D-pinitol from the aerial parts of *Acacia nilotica* was also found effective against *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* larvae (Chaubal *et al*, 2005). However, although the finding of known active compound that contained the mosquito larvicidal activity was extensively reported, the pupicidal activity has never been mentioned. This could be further investigated.

For the other *Acacia* plants, very few references have been cited for their mosquito larvicidal activity. Only *Acacia nilotica* extracts were reported by Chaubal *et al* (2005) who extracted the aerial parts of *A. nilotica* into 6 fractions with the LC_{50} values of 60-148 mg/l against *Ae. aegypti* larvae, and of 59-126 mg/l against *Cx. quinquefasciatus*. In that

Table 3
24- and 48-hour pupicidal activities of *A. pennata* fractionated extracts against the pupae of *Ae. aegypti*.

Fractionated group[a]	24-hour			48-hour		
	LC_{50} with fiducial limit (mg/l)	Parameter		LC_{50} with fiducial limit (mg/l)	Parameter	
		χ^2	Slope (± SE)		χ^2	Slope (± SE)
Fr-G1	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-
Fr-G2	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-
Fr-G3	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-
Fr-G4	53.72 (48.73 - 58.94)	0.35	3.2716 ± 0.3903	49.15 (44.47 - 53.70)	0.64	3.4403 ± 0.3923
Fr-G5	44.10 (38.70 - 48.63)	0.47	2.9848 ± 0.2822	40.64 (36.85 - 44.39)	1.05	3.5146 ± 0.2976
Fr-G6	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-
Fr-G7	>100[b]	-	-	>100[b]	-	-

[a]Zero mortality rates were observed from all control groups; [b]The mortality rates were very low at 100 mg/L so the LC_{50} value is estimated to over 100 mg/l and the parameters could not be calculated.

study, D-pinitol (=3-O-methyl-D-*chiro*-inositol; 1) was isolated and found that it was comparatively less active than the fractions were. They concluded that the larvicidal activity of the *A. nolitica* is not due to the D-pinitol alone but due to the presence of another compound along with the D-pinitol.

A similar study of Sakthivadivel and Daniel (2008) reported the LC_{50} values of the *A. nolitica* leave extract with 70.42, 58.16 and 55.72 mg/l against *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus*, and *An. stephensi*, respectively. In 2012, various solvent extracts (water, ethanol, and petroleum ether) of *A. nolitica* leaves were found to display 41.1-65.8% mortality rates of the *Anopheles arabiensis* larvae (Edriss *et al.* 2012).

When *A. nolitica* extracts were compared with those studies, *A. pennata* crude extract had lower efficiency with 244.50 mg/l LC_{50} value against the *Ae. aegypti* mosquito at the same larval stage (3rd) and exposure time (24-hour). However, the stronger activities, LC_{50} values of 39.45 and 50.75 mg/l, were found from the fractionated extracts. For the insecticidal activity of the other *Acacia* species, there was only a report of *Acacia auriculiformis* bark extracts that displayed some biological effects on *Bactrocera cucurbitae*, a melon fruit fly. The biological effects include the prolongation of larval and total developmental period, the abnormality of pupation and emergence percentage, and the decreasing oviposition

and egg hatching, on the fly were found (Kaur *et al*, 2010).

In conclusion, the bioassay results of this work introduced new and promising properties—larvicidal and pupicidal activities—against the *Ae. aegypti* mosquito of the *A. pennata* shoot tips extracts, especially the fractionated extracts. The isolation of the active substances is proposed to be further studied. Toxicology, cost effectiveness, and impact on non-target organisms of this edible plant extract also need to be studied.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University for supporting the progress of this study. Mr Siraphop Puniputikul, a bachelor's degree student of the Department of Microbiology and Parasitology, is recognized for excellent laboratory assistance. The Naresuan University Research Fund (Ref No. R2559C135) is also acknowledged for financial support.

REFERENCES

Araujo EC, Silveira ER, Lima MA, *et al*. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 3760-2.

Bhumibhamon S. Thais grow native *Acacia* for food [Newsletter]. *Nitrogen Fixing Trees News* 2002; 8: 1-2.

Bilal H, Akram W, Din S, Khan IA, Hassan SA, Arshad M. Larvicidal activity of selected plant extracts against *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Afr Entomol* 2012; 20: 8-12.

Candido LP, Cavalcanti MT, Beserra EB. Bioactivity of plant extracts on the larval and pupal stages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 2013; 46: 420-5.

Chareonviriyaphap T, Aum-aung B, Ratanatham S. Current insecticide resistance patterns in mosquito vectors in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999; 30: 184-94.

Chaubal R, Pawar PV, Hebbalkar GD, *et al*. Larvicidal activity of *Acacia nilotica* extracts and isolation of D-pinitol--a bioactive carbohydrate. *Chem Biodivers* 2005; 2: 684-8.

Colin ME, Bonmatin JM, Moineau I, Gaimon C, Brun S, Vermandere JP. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Arch Environ Contam Toxicol* 2004; 47: 387-95.

Diepens NJ, Pfennig S, Van den Brink PJ, Gunnarsson JS, Ruepert C, Castillo LE. Effect of pesticides used in banana and pineapple plantations on aquatic ecosystems in Costa Rica. *J Environ Biol* 2014; 35:73-84.

Dongmo AB, Nguelefack T, Lacaille-Dubois MA. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Acacia pennata* wild (Mimosaceae). *J Ethnopharmacol* 2005; 98: 201-6.

Edriss AE, Satti AA, Alabjar ZA. Preliminary studies on phytochemicals and larvicidal effects of *Acacia nilotica* L. extracts against *Anopheles arabiensis* Patton. *Sci Res Essays* 2012; 7: 4253-8.

Elumalai D, Hemavathi M, Hemalatha P, Deepaa CV, Kaleena PK. Larvicidal activity of catechin isolated from *Tenaus aspera* against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 2016; 115: 1203-12.

Finney DJ. Probit analysis. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.

Jayaraman M, Senthilkumar A, Venkatesalu V. Evaluation of some aromatic plant extracts for mosquito larvicidal potential against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, and *Anopheles stephensi*. *Parasitol Res* 2015; 114: 1511-8.

Kaur A, Sehal SK, Singh R, Arora S. Develop-

ment inhibitory effect of *Acacia auriculiformis* extracts on *Bactrocera cucumbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae). *J Biopest* 2010; 3: 499-504.

Lalchhandama K. Efficacy and structural effects of *Acacia pennata* root bark upon the avian parasitic helminth, *Raillietina echinobothrida*. *Pharmaceng J* 2013; 5: 17-21.

Nanasombat S, Teckchuen N. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *J Med Plants Res* 2009; 3: 443-9.

Ogbeide O, Tongo I, Ezemonye L. Risk assessment of agricultural pesticides in water, sediment, and fish from Owan river, Edo state, Nigeria. *Environ Monit Assess* 2015; 187: 654.

Pierre DY, Okechukwu EC, Nchiwan NE. Larvicidal and phytochemical properties of *Callistemon rigidus* R. Br. (Myrtaceae) leaf solvent extracts against three vector mosquitoes. *J Vector Borne Dis* 2014; 51: 216-23.

Rahuman AA, Gopalakrishnan G, Ghouse BS, Arumugam S, Himalayan B. Effect of *Feronia limonia* on mosquito larvae. *Fitoterapia* 2000; 71: 553-5.

Rifai Y, Arai MA, Koyano T, Kowithayakorn T, Ishibashi M. Terpenoids and a flavonoid glycoside from *Acacia pennata* leaves as Hedgehog/GLI-mediated transcriptional inhibitors. *J Nat Prod* 2010; 73: 995-7.

Rutledge LC, Ward RA, Gould DJ. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosq News* 1964; 24: 407-19.

Sakthivadivel M, Daniel T. Evaluation of certain insecticidal plants for the control of vector mosquito viz. *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Appl Entomol Zool* 2008; 43: 57-63.

Sompeng W, Pimsamarn S, Akksilp S. Resistance to temephos of *Aedes aegypti* Linnaeus larvae (Diptera: Culicidae). *J Health Sci* 2009; 18: 650-4.

Thongwat D, Ganranoo L, Chokchaisiri R. Larvicidal activity of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) fruit endocarp crude and fractionated extracts against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2014; 45: 1292-300.

Tikar SN, Kumar A, Prasad GB, Prakash S. Temephos-induced resistance in *Aedes aegypti* and its cross-resistance studies to certain insecticides from India. *Parasitol Res* 2009; 105: 57-63.

World Health Organization (WHO). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Geneva: WHO, 2005. [Cited 2016 Jul 28]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf

World Health Organization (WHO). Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever: revised and expanded edition. Geneva: WHO, 2011. [Cited 2016 Jul 28]. Available from: http://apps.searo.who.int/pds_docs/B4751.pdf