อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ R2556C092

สำนักหอสมุด

รายงายวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ของสารสกัดจากผลและใบของกุหลาบพุกาม (*Pereskia bleo*)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ดร.รักสกุล แก่นเรณู
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 22 มิ.ค. 2558
เลขทะเบียน 1.669481 0 ล.2
เลขเรียกหนังสือ 2 QK
861
ด413ร
2557

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

รายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ของสารสกัดจากผลและใบของกุหลาบพุกาม (*Pereskia bleo*)

(ภาษาอังกฤษ) Larvicidal activity of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) fruit and leaf extracts against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) mosquito

ชื่อผู้รับทุนวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์

บทคัดย่อ

การใช้สารเคมีในการควบคุมแมลงพาหะก่อให้เกิดปัญหาในหลายด้าน สารฆ่าแมลงที่ได้มาจากธรรมชาติจึงได้ถูกนำมาทดแทนเพื่อแก้ปัญหาเหล่านั้น สารสกัดจากพืชหลากหลายชนิดจึงได้ถูกศึกษาจากนักวิจัยทั่วโลก ในการศึกษาครั้งนี้ เนื้อของผลและใบกุหลาบพุกาม (*Pereskia bleo*) ได้ถูกนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทานอล และน้ำ เพื่อเตรียมเป็นสารสกัดหยาบและส่วนสกัดละเอียดเพื่อศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ระยะที่ 3 ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากส่วนใบกุหลาบพุกามไม่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง ส่วนเนื้อของผลนั้น ทั้งสารสกัดหยาบและส่วนสกัดละเอียดของสารสกัดจากเอทานอลและน้ำมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง โดยพบค่า LC_{50} value ต่อลูกน้ำยุงลายบ้านที่แตกต่างกัน แต่สำหรับสารสกัดจากเฮกเซนนั้นไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากเตรียมสารสกัดจากตัวอย่างได้ในปริมาณที่น้อยมาก ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเนื้อของผลกุหลาบพุกามมีศักยภาพในการเตรียมเป็นสารสกัดเพื่อใช้ควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้านได้ อย่างไรก็ตาม ความปลอดภัยในการใช้งาน หรือฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงชนิดอื่นของสารสกัดจากพืชชนิดนี้ควรทำการศึกษาต่อไป

Abstract

Because the using of insecticide causes adverse effects to the vector control situation, a plant bio-insecticide becomes an advantaged substitute for solving the problems. Nowadays, a promising mosquito larvicidal activity from plant extracts have been reported worldwide, including Thailand. In this study, *Pereskia bleo* fruit endocarp and leaf were extracted with hexane, ethanol and distilled water. Crudes and fractionated groups of the extracts were evaluated for their larvicidal efficacy against the 3rd instar larvae of *Aedes aegypti*. It was found that, for the crude extracts, the leaf extracts did not show a larva killing activity, while the fruit endocarp extracts did. The different LC_{50} values of crude and fractionated group extracts of both ethanolic and aqueous extracts were found. For the hexane extract, ultra-low yield was gained, then the larvicidal activity was not be completed. The bioassay results indicated the capability of larvicidal property against the *Ae. aegypti* mosquito of the *P. bleo* plant extracts. A safety for non-target organisms or an action on other mosquito vectors of this plant, however, should be further investigated.

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

1. ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ของสารสกัดจากผลและใบของกุหลาบพุกาม (*Pereskia bleo*)

(ภาษาอังกฤษ) Larvicidal activity of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) fruit and leaf extracts against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) mosquito

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด หมายเลขโทรศัพท์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์
ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร โทรศัพท์ 055964676

3. สาขาที่ทำการวิจัย กีฏวิทยาทางการแพทย์ (การควบคุมพาหะนำโรคด้วยวิธีทางชีวภาพ)

4. งบประมาณทั้งโครงการ 180,000 บาท

5. ระยะเวลาดำเนินการ 12 เดือน

6. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

การใช้สารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงแทนการใช้เคมีฆ่าแมลงนั้น มีการศึกษาและพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อสัตว์ชนิดอื่นรวมทั้งมนุษย์มากกว่าการควบคุมด้วยการใช้สารเคมีฆ่าแมลง ในปัจจุบันสารเคมีที่นิยมใช้ควบคุมลูกน้ำยุงมากที่สุดคือทีมีฟอส ในรูปของสารเคลือบเม็ดทราย (ทรายอะเบท) ซึ่งแม้ว่ามีการรับรองความปลอดภัย แต่หากใช้ในปริมาณที่มากอย่างต่อเนื่อง อาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค และมีการตกค้างในสิ่งแวดล้อมจนก่อให้เกิดการต้านทานของลูกน้ำยุงอีกด้วย การใช้สารฆ่าแมลงชีวภาพจึงเป็นทางเลือกที่ใช้หลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสารสกัดจากพืชชนิดใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์สูงในการฆ่าลูกน้ำยุง และเป็นพืชที่หาหรือเพาะปลูกได้ง่าย จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งเพื่อที่จะผลิตและนำสารฆ่าแมลงชีวภาพมาใช้ในทางปฏิบัติ

ในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยมีความสนใจเกี่ยวกับกุหลาบพุกาม ซึ่งมีผลการวิจัยว่าสารสกัดจากใบของกุหลาบพุกามมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งเต้านม ฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่ยังไม่การศึกษาใดระบุถึงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในเบื้องต้น คณะผู้วิจัยพบว่าสารสกัดหยาบด้วยน้ำของผลกุหลาบพุกามมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจยิ่งที่จะศึกษาถึงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดจากกุหลาบพุกาม ทั้งจากผลซึ่งมีฤทธิ์ดังกล่าวจากการศึกษาเบื้องต้น และจากใบซึ่งมีฤทธิ์ด้านต่างๆ แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง หากค้นพบว่าสารสกัดจากผลหรือใบของกุหลาบพุกามมีประสิทธิภาพที่ดี ผลการศึกษาที่ได้จะก่อให้เกิดประโยชน์ทั้งในแง่ของการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับพืชชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง และพัฒนาต่อยอดนำสู่การผลิตสารฆ่าแมลงชีวภาพจากพืชชนิดนี้เพื่อใช้ในการควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้านอย่างปลอดภัยต่อไป

7. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

7.1 เพื่อเตรียมสารสกัดหยาบด้วยน้ำ เอทานอล และเฮกเซน จากส่วนผลและใบของกุหลาบพุกาม

7.2 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ ที่เตรียมได้ ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านระยะต่างๆ

7.3 เพื่อศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านสูงสุด

7.4 เพื่อทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของส่วนสกัดย่อยจากคอลัมน์โครมาโตกราฟี

8. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

8.1 สารสกัดกุหลาบพุกาม

ผลและใบกุหลาบพุกามถูกเก็บจากธรรมชาติในพื้นที่เขตจังหวัดพิษณุโลก หลังจากล้างให้สะอาดได้นำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างแห้งสนิท หลังจากนั้นบดให้ละเอียด ตัวอย่างที่บดเป็นผงได้ถูกสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) ที่อุณหภูมิห้อง กรองสารสกัดยกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator และ lyophilizer บรรจุสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดสีชาและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น

8.2 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

8.3 การศึกษาฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบจากผลและใบของกุหลาบพุกาม

นำสารสกัดหยาบผลและใบของกุหลาบพุกามจากตัวทำละลายแต่ละชนิดมาเตรียมเป็นstock solution ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 1% stock solution ได้ถูกเก็บรักษาใน screw-cap vial ปิดทับด้วย aluminium foil ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียมเป็นความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน โดยนำลูกน้ำยุงลายบ้านระยะที่ 3 ตอนปลาย หรือระยะที่ 4 ตอนต้น จำนวน 25 ตัว ถ่ายลงในสารละลายทดสอบ 200 มิลลิลิตร ในเบื้องต้นจะทดสอบด้วยสารละลายทดสอบที่มีช่วงความเข้มข้นต่างกันมาก เพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นของอัตราการตายของลูกน้ำเมื่อสัมผัสกับสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นเลือกความเข้มข้น 4 ถึง 5 ระดับ ที่ทำให้ลูกน้ำมีอัตราการตายที่ 10 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการหาค่า LC_{50} และ LC_{90} สำหรับกลุ่มควบคุมจะใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายทดสอบจากสารสกัดด้วยน้ำ และใช้ DMSO 2 มิลลิลิตร ในน้ำกรอง 200 มิลลิลิตร แทนสารละลายทดสอบจากสารสกัดด้วย เอทานอล และเฮกเซน อัตราการตาย (Percentage mortality: %M) จะถูกบันทึกที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นำค่าอัตราการตายไปคำนวณหาค่า LC_{50} และ LC_{90} โดยวิธี Probit analysis ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Ldp Line (*http://embakr.tripod.com/ldpline*)

8.4 การศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านสูงสุดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

สารสกัดหยาบของกุหลาบพุกามที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านสูงสุด ได้ถูกศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นโดยวิธี Quick Column Chromatography ส่วนสกัดย่อยที่ได้ จะทดสอบการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 8.3

9. ผลการวิจัย

ตัวอย่างผลกุหลาบพุกาม 3,684.07 กรัม เมื่ออบแห้งแล้วมีน้ำหนัก 232.95 กรัม และเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ได้สารสกัดหยาบจากเฮกเซน เอทานอล และน้ำ เท่ากับ 0.36, 30.06 และ 18.98 กรัม ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างใบกุหลาบพุกาม 1,355.80 กรัม เมื่ออบแห้งแล้วมีน้ำหนัก 86.11 กรัม และเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ได้สารสกัดหยาบจากเฮกเซน เอทานอล และน้ำ เท่ากับ 0.19, 5.60 และ 5.62 กรัม ตามลำดับ ฤทธิ์ของสารสกัดด้วยน้ำจากผลกุกลาบพุกามมีค่า LC_{50} ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง อยู่ที่ 240 และ ต่ำกว่า 100 ppm ตามลำดับ สำหรับสารสกัดด้วยเอทานอลนั้นมีฤทธิ์ต่ำกว่า คือมีค่า LC_{50} ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง อยู่ที่ 735 และ 160 ppm ตามลำดับ โดยสารสกัดจากเฮกเซนนั้นไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ได้อย่างสมบูรณ์เนื่องจากได้สารสกัดจำนวนน้อย และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ของใบกุหลาบพุกามนั้น นอกจากจะได้สารสกัดจำนวนน้อยมาก ไม่เพียงพอในการนำมาทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านแล้ว จากการทดสอบในบางความเข้มข้น ยังพบว่า สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดนั้นมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงน้อยมาก

หลังจากแยกองค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากน้ำและเอทานอลของของกุหลาบพุกาม พบว่าสารสกัดหยาบจากน้ำสามารถแยกสารสกัดส่วนย่อย (fraction) ออกมาได้ 50 ส่วน ซึ่งสามารถจัดได้เป็น 4 กลุ่มย่อย คือ A-Gr1, A-Gr2, A-Gr3 และ A-Gr4 สำหรับสารสกัดหยาบจากเอทานอล แยกสารสกัดส่วนย่อออกมาได้ 87 ส่วน สามารถจัดได้เป็น 5 กลุ่มย่อย คือ E-Gr1, E-Gr2, E-Gr3, E-Gr4 และ E-Gr5 โดยพบว่าสารสกัดกลุ่มย่อยทั้ง 9 กลุ่ม มีฤทธิ์แตกต่างกัน พบว่าส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์สูงสุดคือ E-Gr3 ซึ่งเป็นกลุ่มของส่วนสกัดหยาบที่แยกได้จากสารสกัดหยาบเอทานอล

10. สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบจากน้ำและเอทานอลของผลกุหลาบพุกาม โดยสารสกัดหยาบจากเฮกเซนนั้นไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ได้อย่างสมบูรณ์เนื่องจากได้สารสกัดจำนวนน้อย อย่างไรก็ตาม จากการทดสอบในบางความเข้มข้น แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ที่ต่ำกว่าทั้งสารสกัดจากน้ำและเอทานอล ในขณะที่สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ของใบกุหลาบพุกามนั้น นอกจากจะได้สารสกัดจำนวนน้อยมาก ไม่เพียงพอในการนำมาทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านแล้ว จากการทดสอบในบางความเข้มข้น ยังพบว่า สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดนั้น มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงน้อยมาก สำหรับส่วนสกัดย่อยนั้น ทั้งจากสารสกัดหยาบด้วยน้ำและเอทานอลมีฤทธิ์แตกต่างกัน พบว่าส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์สูงสุดคือ E-Gr3 ซึ่งเป็นกลุ่มของส่วนสกัดหยาบที่แยกได้จากสารสกัดหยาบเอทานอล

แม้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากผลกุหลาบพุกามที่มีผลต่อการตายของลูกน้ำยุงจะสูงกว่าสารสกัดจากพืชอื่นหลายชนิด แต่จากหลักฐานว่าพืชชนิดนี้มีฤทธิ์ด้านต่างๆ ที่มีประโยชน์ อีกทั้งมีรายงานถึงการนำส่วนของใบไปเป็นอาหาร จึงอาจเป็นข้อมูลที่จะกล่าวได้ว่าพืชชนิดนี้ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ การใช้สารสกัดจากพืชที่ไม่เป็นพิษแม้ว่าจะใช้ในความเข้มสูง ย่อมมีความปลอดภัยกว่าการใช้สารสกัดจากพืชที่มีความเป็น

พิษแม้ในความเข้มข้นต่ำกว่า ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงนั้นเพิ่มมากขึ้นเมื่อให้ลูกน้ำสัมผัสกับสารสกัดเป็นเวลานานขึ้น การที่พบว่าฤทธิ์ที่ดีขึ้นเมื่อเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับ 24 ชั่วโมงนั้น สอดคล้องกับหลายการศึกษาที่มีผลการทดลองในลักษณะดังกล่าว โดยสรุปแล้ว การศึกษานี้ได้ค้นพบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดจากผลกุหลาบพุกามทั้งส่วนสารสกัดหยาบและกลุ่มของส่วนสกัดย่อย อย่างไรก็ตาม การที่จะพัฒนาสารสกัดจากพืชชนิดนี้ไปใช้ในการควบคุมยุงพาหะ การประเมินด้านความปลอดภัย อีกทั้งศึกษาฤทธิ์ต่อยุงพาหนะชนิดอื่นจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

เนื้อหางานวิจัย

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การใช้สารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง (mosquito larvicidal activity) แทนการใช้สารเคมีฆ่าแมลง (insecticide) นั้น มีการศึกษาและพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อสัตว์ชนิดอื่นรวมทั้งมนุษย์มากกว่าการควบคุมด้วยการใช้สารเคมีฆ่าแมลง ในปัจจุบันสารเคมีที่นิยมใช้ควบคุมลูกน้ำยุงมากที่สุดคือทีมีฟอส ในรูปของสารเคลือบเม็ดทราย (ทรายอะเบท) ซึ่งแม้ว่ามีการรับรองความปลอดภัยของทรายอะเบทในการใช้ควบคุมลูกน้ำยุงในภาชนะกักเก็บน้ำต่างๆ รวมทั้งน้ำดื่มก็ตาม แต่หากใช้ในปริมาณที่มากอย่างต่อเนื่อง อาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค และมีการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมได้ อีกทั้งในปัจจุบัน มีรายงานการเพิ่มขึ้นของลูกน้ำยุงที่มีความต้านทานต่อทีมีฟอสอีกด้วย การใช้สารฆ่าแมลงชีวภาพ (bio-insecticide) จึงเป็นทางเลือกที่ใช้หลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว งานวิจัยจำนวนมากรายงานถึงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงของสารสกัดจากพืชหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่แล้วเป็นพืชสมุนไพร อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากพืชมักมีฤทธิ์น้อยกว่าสารเคมี อีกทั้งยังมีปัจจัยเกี่ยวกับการจัดหาพืชชนิดนั้นๆ เพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารสกัดอีกด้วย ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสารสกัดจากพืชชนิดใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์สูงในการฆ่าลูกน้ำยุง และเป็นพืชที่หาหรือเพาะปลูกได้ง่าย จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งเพื่อที่จะผลิตและนำสารฆ่าแมลงชีวภาพมาใช้ในทางปฏิบัติ

ในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยมีความสนใจเกี่ยวกับกุหลาบพุกาม ซึ่งเป็นพืชที่เพาะปลูกได้ง่าย มีการปลูกเป็นไม้ประดับโดยทั่วไป ผลการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากใบของกุหลาบพุกามมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งเต้านม ฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่ยังไม่การศึกษาใดระบุถึงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงจากสารสกัดพืชชนิดนี้ แต่จากการศึกษาในเบื้องต้น คณะผู้วิจัยพบว่าสารสกัดหยาบด้วยน้ำของผลกุหลาบพุกามมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจยิ่งที่จะศึกษาถึงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดจากกุหลาบพุกาม ทั้งจากผลซึ่งมีฤทธิ์ดังกล่าวจากการศึกษาเบื้องต้น และจากใบซึ่งมีฤทธิ์ด้านต่างๆ แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง เพื่อพิสูจน์และทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดจากพืชชนิดนี้ หากค้นพบว่าสารสกัดจากผลหรือใบของกุหลาบพุกามมีประสิทธิภาพที่ดี ผลการศึกษาที่ได้จะก่อให้เกิดประโยชน์ทั้งในแง่ของการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับพืชชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง และพัฒนาต่อยอดนำสู่การผลิตสารฆ่าแมลงชีวภาพจากพืชชนิดนี้เพื่อใช้ในการควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้านอย่างปลอดภัยต่อไป

การทบทวนวรรณกรรม

ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) เป็นพาหะสำคัญในการนำไวรัสเดงกี่ (dengue virus) มาสู่มนุษย์ ไวรัสชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคไข้เดงกี่ (dengue fever) และโรคไข้เลือดออกเดงกี่ (dengue hemorrhagic fever) ซึ่งเป็นโรคติดต่อที่ก่อปัญหาทางสาธารณสุขในหลายประเทศทั่วโลก (Halstead, 2007; Guzman and Isturiz, 2010; Wilder-Smith, 2012) สำหรับในประเทศไทย พบผู้ป่วยคนแรกในปี ค.ศ. 1949 และเกิดการระบาดของโรคเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1958 (Prasittisuk, et al., 1998) จากนั้นมาพบการระบาดของโรคไข้เลือดออกทั่วทั้งประเทศไทยจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากยังไม่มีวัคซีนสำหรับโรคไข้เลือดออก การป้องกันหรือลดการระบาดของโรคจะเน้นในด้านการควบคุมและกำจัดยุงพาหะ การควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้านนิยมใช้เม็ดทรายซึ่งเคลือบด้วยสารเคมีฆ่าแมลงที่เรียกกว่า ทรายอะเบท (Abate) (Chareonviriyaphap, et al., 1999) ใส่ลงในภาชนะกักเก็บน้ำหรือภาชนะที่มีน้ำขัง สารออกฤทธิ์ของทรายอะเบทคือทีมีฟอส (temephos) เป็นสารเคมีกลุ่ม Organophosphate ซึ่งแม้ว่าจะมีความเป็นพิษต่ำต่อมนุษย์ แต่การใช้ใน

ปริมาณมากหรือในผู้แพ้สารชนิดนี้อาจก่อให้เกิดอันตราย นอกจากนี้ยังสามารถเกิดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม ซึ่งหากลูกน้ำยุงลายบ้านสัมผัสกับทีมีฟอสที่ความเข้มข้นต่ำเป็นเวลานาน อาจก่อให้เกิดการพัฒนาความต้านทานต่อทีมีฟอส (Wirth and Georghiou, 1999; Paeporn, et al., 2003; 2004; Tikar, et al., 2009) หรือเกิดความต้านทานข้ามต่อสารเคมีฆ่าแมลงชนิดอื่น (Rodriguez, et al., 2002; Poupardin, et al., 2008; Thongwat and Bunchu, 2011) ในยุงรุ่นต่อๆ ไป ด้วยเหตุนี้ การศึกษาวิจัยถึงวิธีการควบคุมลูกน้ำยุงลายด้วยวิธีการอื่นๆ จึงมีความสำคัญและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง เช่นการควบคุมทางชีวภาพ (biological control) ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความปลอดภัยแก่ผู้ใช้และสิ่งแวดล้อมมากกว่าการใช้สารเคมี อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีการศึกษาถึงการใช้สิ่งมีชีวิตต่างๆ ในการควบคุมลูกน้ำยุง ได้แก่ แบคทีเรีย เช่น *Bacillus thuringiensis* และ *Bacillus sphaericus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้าง endotoxin ที่มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงเมื่อกินแบคทีเรียชนิดนี้เข้าไป (Poopathi and Abidha, 2010) เชื้อรา เช่น *Lagenidium giganteum*, *Coelomomyces* sp., *Culicinomyces* sp., *Pythium* sp., *Entomophthora* sp., *Beauveria* sp. และ *Fusarium* sp. ซึ่งเป็น pathogen ต่อลูกน้ำยุงหลายชนิด (Cuda, et al., 1997; Suh and Axtell, 1999; Su, et al., 2001; Scholte, et al., 2004) ไมโครสปอริเดีย เช่น *Brachiola algerae*, *Vavraia culicis*, *Edhazardia aedis*, *Amblyospora* sp. และ *Hyalinocysta chapmani* (Becnel, et al., 2005; Andreadis, 2007) หรือแม้กระทั่งพลานาเรียชนิด *Dugesia bengalensis* (Kar and Aditya, 2003) เป็นต้น

นอกจากการค้นหาสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ควบคุมลูกน้ำยุงทางชีวภาพแล้ว การค้นหาสารออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงซึ่งพบได้ในพืชชนิดต่างๆ เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีการศึกษาวิจัยกันอย่างแพร่หลาย ทำให้ค้นพบพืชชนิดต่างๆ ซึ่งส่วนใหญ่แล้วเป็นพืชสมุนไพรที่มีสารออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้ สำหรับในประเทศไทยพบพืชที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง ได้แก่ กระเพราแดง ขมิ้นชัน ขอบชะนาง ข่า ข่าเล็ก ขี้เหล็ก ประคำดีควาย พริกไทย แมงลักเลี่ยน ว่านน้ำ สะเดาอินเดีย สะระแหน่ หนอนตายอยาก หางไหล โหระพา ดีปลี สะค้าน ชะพลู และขิ้นฉ่าย เป็นต้น (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548; Choochote, et al., 2004; Chaithong, et al., 2006) ซึ่งสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพรเหล่านี้มีอยู่หลายชนิด เช่น อะซาไดแรคติน โรตินิน ปิปเปอรีน แทนนิน และ น้ำมันหอมระเหย เป็นต้น มีการศึกษาวิจัยจำนวนมากที่พบว่าสารสกัดที่ได้จากส่วนต่างๆ ของพืชมีฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน เช่น *Acalypha alnifolia*, *Acorus calamus* (ว่านน้ำ), *Anacardium occidentale* (มะม่วงหิมพานต์), *Anethum graveolens* (ผักชีลาว), *Carica papaya* (มะละกอ), *Cinnamomum porrectum* (ไม้เทพทาโร), *Citrus hystrix* (มะกรูด), *Citrus reticulate* (ส้มโชกุน), *Costus speciosus* (เอื้องไหมนา), *Delonix elata*, *Derris elliptica* (หางไหล), *Ervatamia coronaria* (พุดสวน), *Euphorbia tirucalli* (พญาไร้ใบ), *Homalomena aromatic*, *Jatropha curcas* (สบู่ดำ), *Kaempferia galangal* (เปราะหอม), *Leucas aspera* (หญ้านกเค้า), *Mammea siamensis* (สารภี), *Ocimum canum* (โหระพา), *Ocimum gratissimum* (ยี่หร่า), *Ocimum sanctum* (กะเพรา), *Phyllanthus pulcher* (ธรณีสาร), *Piper longum* (ดีปลี), *Piper nigrum* (พริกไทยดำ), *Prosopis juliflora* (กระถินหางกระรอก), *Rhinacanthus nasutus* (ทองพันชั่ง), *Stemona tuberose* (หนอนตายหยาก), *Syzygium aromaticum*, *Tephrosia purpurea* (คราม่ป่า), *Trigonostemon reidioides* และ *Zingiber zerumbet* (กระทือ) (Cavalcanti, et al., 2004; Komalamisra, et al., 2005; Promsiri, et al., 2006; Kamaraj, et al., 2008; Maheswaran, et al., 2008; Rahuman, et al., 2008; Kumar, et al., 2010; Sutthanont, et al., 2010; Govindarajan, et al., 2011; Bansal, et al., 2012; Kovendan, et al., 2012a; b; Marimuthu, et al., 2012) เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีการค้นพบสิ่งมีชีวิตหรือสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ ที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงเพิ่มมากขึ้น แต่ในปัจจุบันยังไม่มีสิ่งใดที่สามารถนำมาใช้ทดแทนการใช้สารเคมีในการกำจัดลูกน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพราะการใช้สิ่งมีชีวิตหรือสารสกัดจากพืชยังคงมีประสิทธิภาพน้อยกว่าสารเคมี ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อสกัดเอาสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ในพืชสมุนไพรที่เคยถูกศึกษา หรือแม้กระทั่งจากพืชชนิดใหม่ที่ไม่เคยถูกศึกษามาก่อน เพื่อนำไปใช้ควบคุมลูกน้ำยุงในภาคสนามยังคงมีการทำอยู่อย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะพบพืชที่มีสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพดีกว่าเดิม เพราะยังมีพืชอีกมากมายหลายชนิดที่ยังไม่เคยถูกทำการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงมาก่อน หากสามารถค้นพบพืชหรือสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมลูกน้ำยุงโดยเฉพาะยุงลายบ้าน จะเป็นประโยชน์อย่างมากในทางการแพทย์และการสาธารณสุขของประเทศ ในแง่ของการลดจำนวนประชากรยุงซึ่งจะสอดคล้องกับการลดจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออก หรือในด้านการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ในพืช ซึ่งจะทำให้พบความหลากหลายของพืชที่มีคุณสมบัติทางด้านนี้ รวมถึงการพัฒนาต่อยอดเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในทางปฏิบัติได้จริง นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากพืชชนิดใหม่ๆ ยังเป็นการป้องกันการเกิดความต้านทานต่อสารเคมีหรือต่อสารสกัดของลูกน้ำยุงเมื่อได้รับสารชนิดเดิมเป็นประจำอีกด้วย ดังนั้นจากผลการทดสอบเบื้องต้นของการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านโดยใช้สารสกัดจากผลกุหลาบพุกามดังที่จะกล่าวต่อไป ทำให้มีความเป็นไปได้ที่สารสกัดจากกุหลาบพุกามจะมีฤทธิ์ที่ดีในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน สามารถใช้ทดแทนสารเคมี และยังจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของกุหลาบพุกามอีกด้วย เพราะในปัจจุบันต้นกุหลาบพุกามถูกปลูกไว้เพื่อเป็นไม้ประดับเพียงอย่างเดียว หากพบกว่าผลหรือใบของกุหลาบพุกามสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านนี้ได้ จะเป็นการเพิ่มมูลค่าของพืชชนิดนี้ได้

กุหลาบพุกาม (*Pereskia bleo*) เป็นพืชที่จัดอยู่ในชั้น (class) Magnoliopsida ลำดับ (order) Caryophyllales วงศ์ (family) Cactaceae มีถิ่นกำเนิดมาจากอเมริกาใต้ แต่ได้ถูกนำไปปลูกในประเทศเขตร้อนต่างๆ มีชื่อที่เรียกในประเทศมาเลเซียว่า "jarum tujuh bilah" และประเทศจีนเรียกว่า "sing cam" ลักษณะทั่วไปของต้นกุหลาบพุกาม เป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่ ไม่ผลัดใบ เรือนยอดจะแผ่กว้างสูงประมาณ 2-8 เมตร ลำต้นสีเขียวเป็นมัน กิ่งก้านตั้งตรงและมีหนามสั้นๆ เป็นกระจุก ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ ใบรูปรีแคบหรือรูปใบหอก กว้าง 4-7 เซนติเมตร ยาว 6-20 เซนติเมตร ปลายใบเรียวแหลม ขอบใบเป็นคลื่น แผ่นใบค่อนข้างหนา ผิวใบด้านบนมีสีเขียวเป็นมัน ดอกมีสีส้มแดงหรือสีแดง ออกดอกเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม 2-3 ดอกที่ปลายกิ่ง ฐานดอกคล้ายกรวยห้าเหลี่ยม ขอบหยักเล็กน้อย กลีบดอกหนาผิวมันคล้ายเคลือบด้วยขี้ผึ้ง ปลายกลีบเว้าตื้นหรือมนและมีติ่งแหลม ดอกบานเต็มที่กว้าง 4-5 เซนติเมตร ผลสดจะเป็นรูปทรงกรวยห้าเหลี่ยม คล้ายฝักบัวเมื่อแก่จะมีสีเหลือง เมล็ดมีสีน้ำตาลดำ คนพื้นเมืองของประเทศมาเลเซียใช้ใบของพืชชนิดนี้ในการรักษาอาการปวดหัว ปวดท้อง การอักเสบและแผลตามร่างกาย และริดสีดวงทวาร เป็นต้น (Sim, et al., 2010)

การวิจัยส่วนใหญ่เกี่ยวกับสารสกัดจากกุหลาบพุกามจะเป็นการศึกษาสารสกัดจากใบ โดยพบว่ามีฤทธิ์ต่างๆ หลายประการเช่น ฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็ง (anticancer activity) ของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด T47-D cell line ของสารสกัดเมทานอลจากใบกุหลาบพุกาม โดยชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิด apoptosis (Tan, et al., 2005) และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิด mouse mammary cell line (4T1) และ normal mouse fibroblast cell line (NIH/3T3) จากฤทธิ์ anti-poliferation ของสารสกัดด้วยน้ำ (Er, et al., 2007) สำหรับสารสกัดจากเอทิล อะซิเตท นั้นพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิด human nasopharyngeal epidermoid carcinoma cell line (KB) ได้ (Malex, et al., 2009) นอกจากฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็งแล้ว สารสกัดด้วยเฮกเซนและเมทานอลยังมีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial

activity) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิดคือ *Pseudomonas aerunginosa* และ *Salmonella choleraesuis* ได้จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ (Wahab, et al., 2009) และจากการศึกษาในปี 2010 ของ Sim และคณะ พบว่าสารสกัดเมทานอล เฮกเซน น้ำ และเอทิล อะซิเตท จากใบกุหลาบพุกามมีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยพบว่าสารสกัดจาก ethyl acetate มีฤทธิ์สูงที่สุด (Sim, et al., 2010)

จากการสืบค้นข้อมูลจะเห็นว่าการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากกุหลาบพุกามนั้นยังมีอยู่น้อย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการค้นพบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ต้านแบคทีเรีย และต้านสารอนุมูลอิสระ โดยทั้งหมดเป็นฤทธิ์ของสารสกัดจากส่วนใบ สำหรับส่วนผลนั้นยังไม่มีการนำมาเตรียมเป็นสารสกัดและศึกษาถึงฤทธิ์ต่างๆ ที่อาจมีอยู่ นอกจากนี้ ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง (mosquito larvicidal activity) ก็ยังไม่เคยถูกศึกษาหรือคำนึงถึงมาก่อน ไม่ว่าจะเป็นจากสารสกัดส่วนใดของกุหลาบพุกาม ซึ่งจากการทดสอบในเบื้องต้นของผู้วิจัยพบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากผลกุหลาบพุกามมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านระยะที่ 3 ได้มากกว่า 50% ที่ความเข้มข้น 1% w/v ซึ่งได้ทดสอบโดยนำผลกุหลาบพุกามแห้งบดละเอียด 1 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าให้อากาศสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 3 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำเฉพาะส่วนสารละลายที่กรองได้ไปทดสอบกับลูกน้ำยุง โดยผลจากการทดสอบเบื้องต้นนี้เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการที่จะศึกษาถึงประสิทธิภาพโดยละเอียดในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดจากกุหลาบพุกามดังกล่าว

หากผลของการศึกษานี้พบว่าสารสกัดจากกุหลาบพุกามมีประสิทธิภาพที่ดีในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน จะเป็นประโยชน์อย่างมากในทางการแพทย์และการวิจัย ในแง่ของการค้นพบและพัฒนาสารออกฤทธิ์จากพืชชนิดใหม่ อีกทั้งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากกุหลาบพุกามมีฤทธิ์ทางยา จึงอาจจะมีความปลอดภัยต่อมนุษย์มากกว่าการใช้สารเคมีเพื่อกำจัดลูกน้ำยุง งานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบด้วยน้ำ เอทานอล และเฮกเซน จากส่วนผลและใบของกุหลาบพุกามในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน ซึ่งหากพบว่ามีประสิทธิภาพดี อาจนำสู่การศึกษาพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ควบคุมยุงลายบ้านทดแทนการใช้สารเคมีต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อเตรียมสารสกัดหยาบด้วยน้ำ เอทานอล และเฮกเซน จากส่วนผลและใบของกุหลาบพุกาม
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบชนิดต่างๆ ที่เตรียมได้ ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านระยะต่างๆ
3. เพื่อศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านสูงสุด
4. เพื่อทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของส่วนสกัดย่อยจากคอลัมน์โครมาโตกราฟี

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากกุหลาบพุกาม

1.1. เก็บผลและใบกุหลาบพุกามจากธรรมชาติเพื่อนำมาทำการศึกษา โดยเก็บจากพื้นที่ในเขตจังหวัดพิษณุโลก

1.2. ล้างผลและใบกุหลาบพุกามให้สะอาดด้วยน้ำประปา นำไปอบให้แห้งด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งตัวอย่างทั้งสองส่วนแห้งสนิท จากนั้นบดตัวอย่างผลและใบของกุหลาบพุกามให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (motorized stone grinder)

1.3. ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากตัวอย่างส่วนผลและใบของกุหลาบพุกามที่บดเป็นผง โดยวิธีการแช่หมักด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ เอทานอล และเฮกเซน โดยนำผงตัวอย่างผลและใบของกุหลาบพุกามไปแช่ในตัวทำละลายแต่ละชนิด ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) ที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยเครื่อง reciprocal shaker เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.4. กรองสารสกัดที่ได้ด้วยผ้าใยแก้วเพื่อแยกกากพืชชิ้นใหญ่ออกจากสารสกัดหยาบ กรองสารสกัดหยาบอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ในชุดกรองแก้ว จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายออก

1.5. สำหรับสารสกัดหยาบจากการสกัดด้วยน้ำ ทำการระเหยตัวทำละลายออกโดยการใช้ rotary evaporator และ lyophilizer ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย เอทานอล และเฮกเซน ทำการระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator

1.6. บรรจุสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดสีชาและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น

1.7. นำสารสกัดหยาบในข้อ 1.6. ไปทดสอบฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลาย ตามวิธีในข้อ 2

2 การเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการ

2.1. ยุงลายบ้านที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2.2. ลูกน้ำจะถูกเลี้ยงในถาดพลาสติกสีขาวด้วยน้ำประปา โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงลูกน้ำคืออาหารสุนัขบดละเอียด เมื่อลูกน้ำเจริญเป็นตัวโม่งจะถูกถ่ายไปสู่แก้วพลาสติกบรรจุน้ำซึ่งปิดทับปากแก้วด้วยผ้าตาข่าย

2.3. เมื่อตัวโม่งเจริญเป็นตัวเต็มวัย จะถูกถ่ายสู่กรงเลี้ยงยุงมาตรฐานขนาด 30x30x30 เซนติเมตร เลี้ยงยุงตัวเต็มวัยด้วยสารละลายน้ำตาล 5% ผสมวิตามินรวม 5% โดยเปลี่ยนสารละลายน้ำตาลวันเว้นวัน

2.4. เมื่อยุงตัวเต็มวัยมีอายุประมาณ 3-4 วัน ให้ยุงเพศเมียกินเลือดด้วยวิธี 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

2.5. ทำการเพาะเลี้ยงตามที่ได้กล่าวข้างต้นจนได้ยุงลายบ้านรุ่นต่างๆ ต่อไป ซึ่งลูกน้ำยุงลายบ้านตั้งแต่รุ่นที่ 6 (F_6) ถือว่าเป็นสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ จะถูกนำมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้

3 การศึกษาฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบจากผลและใบของกุหลาบพุกาม

สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ของผลและใบกุหลาบพุกาม จะถูกทดสอบฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านด้วยวิธีการเดียวกัน ตามวิธีการขององค์การอนามัยโลก (WHO, 2005) ดังนี้

3.1. นำสารสกัดหยาบผลและใบของกุหลาบพุกามจากตัวทำละลายแต่ละชนิดมาเตรียมเป็นstock solution ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 1% ซึ่งเตรียมได้จากละลายสารสกัดหยาบ 200 มิลลิกรัมในตัวทำละลาย 20 มิลลิลิตร (ตัวทำละลายคือน้ำกลั่นสำหรับสารสกัดหยาบด้วยน้ำ และ DMSO สำหรับสารสกัดหยาบด้วย เอทานอล และเฮกเซน) stock solution จะถูกเก็บรักษาใน screw-cap vial ปิดทับด้วย aluminium foil ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2. จากนั้น stock solution ของสารสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด จะถูกเตรียมเป็นความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน เช่น นำ stock solution ปริมาณ 0.2-2 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกรอง 200 มิลลิลิตร จะได้สารละลายทดสอบความเข้มข้น 10-100 ppm และหากต้องการให้มี

ความเข้มข้นต่ำกว่านี้ สามารถทำได้โดยการเจือจาง stock solution โดยละลาย stock solution 2 มิลลิลิตร ในตัวทำละลายที่เหมาะสม (น้ำกลั่น หรือ DMSO) 18 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเตรียมสารละลายทดสอบเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น จะได้สารละลายทดสอบความเข้มข้น 1-10 ppm เป็นต้น

3.3. ลูกน้ำยุงลายบ้านระยะที่ 3 ตอนปลาย หรือระยะที่ 4 ตอนต้น จำนวน 25 ตัว จะถูกถ่ายลงในสารละลายทดสอบ 200 มิลลิลิตร ในเบื้องต้นจะทดสอบด้วยสารละลายทดสอบที่มีช่วงความเข้มข้นต่างกันมาก เพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นของอัตราการตายของลูกน้ำเมื่อสัมผัสกับสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นจะเลือกความเข้มข้น 4 ถึง 5 ระดับ ที่ทำให้ลูกน้ำมีอัตราการตายที่ 10 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการหาค่า LC_{50} และ LC_{90}

3.4. สารละลายของสารสกัดหยาบส่วนผลและใบกุหลาบพุกามจากตัวทำละลายแต่ละชนิด จะถูกทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้นเป็นจำนวน 4 ซ้ำ เพื่อให้ได้จำนวนลูกน้ำยุงทดสอบ 100 ตัว ต่อสารสกัดหยาบแต่ละชนิด แต่ละความเข้มข้น และทำการทดสอบเป็นจำนวน 3 ชุด ซึ่งจะได้จำนวนลูกน้ำยุงทดสอบ 300 ตัว ต่อสารสกัดหยาบแต่ละชนิด แต่ละความเข้มข้น

3.5. สำหรับกลุ่มควบคุมจะใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายทดสอบจากสารสกัดด้วยน้ำ และใช้ DMSO 2 มิลลิลิตร ในน้ำกรอง 200 มิลลิลิตร แทนสารละลายทดสอบจากสารสกัดด้วย เอทานอล และเฮกเซน ทำการทดสอบ 4 ซ้ำ เพื่อให้ได้จำนวนลูกน้ำยุงทดสอบในกลุ่มควบคุม 100 ตัว ต่อสารสกัดหยาบแต่ละชนิด

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

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

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

4 ศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านสูงสุดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

สารสกัดหยาบของกุหลาบพุกามที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านสูงสุด ได้ถูกศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นโดยวิธี Quick Column Chromatography

4.1. สารสกัดหยาบด้วยน้ำ ได้ถูกแยกส่วนสกัดย่อย (fraction) ด้วย gradient solvent system (CH_2Cl_2, CH_2Cl_2-MeOH and MeOH-H_2O) จากนั้น eluted substances ได้ถูกวิเคราะห์ด้วย Thin layer Chromotography

4.2. สารสกัดหยาบด้วยเอทานอล ได้ถูกแยกส่วนสกัดย่อยด้วย gradient solvent system (CH_2Cl_2, CH_2Cl_2-MeOH and MeOH) จากนั้น eluted substances ได้ถูกวิเคราะห์ด้วย Thin layer Chromotography

4.3. กลุ่มของส่วนสกัดย่อยที่ได้ จะทดสอบการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3

ผลการศึกษาวิจัย

สารสกัดหยาบจากกุหลาบพุกาม

ตัวอย่างกุหลาบพุกามเมื่อผ่านการอบแห้งแล้ว น้ำหนักของตัวอย่างกุหลาบพุกามเป็นดังนี้

ตัวอย่างกุหลาบพุกาม	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	Yield (%)
ผล	3,684.07	232.95	6.32
ใบ	1,355.80	86.11	6.35

เมื่อตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งและบดละเอียดไปสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด แล้วระเหยตัวทำละลายออก ได้สารสกัดหยาบในปริมาณที่ต่างกันดังนี้

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดแห้ง (กรัม)	Yield (%)
ผล	เฮกเซน	232.95	0.36	0.15
	เอทานอล		30.06	12.90
	น้ำ		18.98	8.15
ใบ	เฮกเซน	86.11	0.19	0.22
	เอทานอล		5.60	6.50
	น้ำ		5.62	6.53

ฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบจากผลและใบของกุหลาบพุกาม

ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดผลและใบกุหลาบพุกามมีดังนี้

กุหลาบพุกาม	ตัวทำละลาย	ความเข้มข้น (ppm)	อัตราการตาย (%)		LC_{50} (ppm)		LC_{90} (ppm)	
			24h	48h	24h	48h	24h	48h
ผล	เฮกเซน[a]	500	4	72	-	-	-	-
		1000	56	100				
	เอทานอล	100	2	25	735	160	-[b]	560
		200	6	68				
		300	19	77				
		400	26	80				
		500	33	85				
		600	41	93				
		700	43	100				
		800	63	98				
		900	71	100				
		1000	79	99				
	น้ำ	100	41	84	240	<100	-[b]	185
		200	44	91				
		300	57	96				
		400	62	97				
		500	63	99				
		600	81	99				
		700	81	99				
		800	79	100				
		900	78	98				
		1000	88	100				

[a] สารสกัดจากเฮกเซนมีปริมาณน้อย จึงสามารถเตรียมได้เพียงความเข้มข้น 500 และ 1000 ppm เท่านั้น

[b] อัตราการตายต่ำเกินกว่าจะหาค่า LC_{50} หรือ LC_{90} ได้

กุหลาบพุกาม	ตัวทำละลาย	ความเข้มข้น (ppm)	อัตราการตาย (%)		LC_{50} (ppm)		LC_{90} (ppm)	
			24h	48h	24h	48h	24h	48h
ใบ	เอทานอล	100	0	0	-	-	-	-
		200	0	0				
		300	0	0				
		400	0	2				
		500	0	0				
		600	0	0				
		700	0	1				
		800	0	0				
		900	0	0				
		1000	0	0				
	น้ำ	100	0	0	-	-	-	-
		200	0	0				
		300	0	0				
		400	0	0				
		500	0	1				
		600	1	3				
		700	1	5				
		800	1	2				
		900	12	34				
		1000	25	44				

หมายเหตุ: สารสกัดจากเฮกเซนมีปริมาณน้อยมาก ไม่สามารถนำมาเตรียมเป็นความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทดสอบฤทธิ์ได้ และอัตราการตายของลูกน้ำจากการทดสอบด้วยสารสกัดจากใบกุหลาบพุกามต่ำเกินกว่าจะหาค่า LC_{50} หรือ LC_{90} ได้

การแยกองค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

หลังจากแยกองค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากน้ำและเอทานอลของของกุหลาบพุกาม โดยวิธี Quick Column Chromatography และ Thin layer Chromotography แล้ว พบว่าสารสสกัดหยาบจากน้ำสามารถแยกสารสกัดส่วนย่อย (fraction) ออกมาได้ 50 ส่วน ซึ่งสามารถจัดได้เป็น 4 กลุ่มย่อย คือ A-Gr1, fractions 1-20 (10.42 g), A-Gr2, fractions 21-34 (4.71 g), A-Gr3, fractions 35-43 (3.75 g) และ A-Gr4, fractions 44-50 (23.22 g) สำหรับสารสกัดหยาบจากเอทานอล แยกสารสกัดส่วนย่อยออกมาได้ 87 ส่วน สามารถจัดได้เป็น 5 กลุ่มย่อย คือ E-Gr1, fractions 1-4 (2.23 g), E-Gr2, fractions 5-19 (10.96 g), E-Gr3, fractions 20-32 (1.73 g), E-Gr4, fractions 33-40 (16.20 g) และ E-Gr5, fractions 41-87 (11.22 g)

ฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบจากน้ำและเอทานอลของผลกุหลาบพุกาม

ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดส่วนย่อยมีดังนี้

P. bleo extracts	24-hour			48-hour		
	LC_{50} with fiducial limits (ppm)	Parameters		LC_{50} with fiducial limits (ppm)	Parameters	
		χ^2	Slope (±SE)		χ^2	Slope (±SE)
Aqueous extract[a]						
A-Gr1	1,453.47[c] (1,111.66 - 2,470.98)	9.85	1.9427 ± 0.3602	704.03 (606.16 - 850.56)	13.09	1.8668 ± 0.2364
A-Gr2	1,150.15[c] (929.44 - 1,622.50)	12.99	1.8444 ± 0.2726	561.67 (433.71 - 762.96)	19.03	1.9155 ± 0.2271
A-Gr3	1,122.53[c] (940.84 – 1,505.32)	6.48	2.4147 ± 0.3710	656.02 (593.56 - 734.11)	13.16	2.8546 ± 0.2982
A-Gr4	>2,000[b]	-	-	>2,000[b]	-	-
Ethanolic extract[a]						
E-Gr1	>2,000[b]	-	-	905.00 (849.45 - 985.72)	5.15	6.2675 ± 0.7913
E-Gr2	1,759.12[c] (1,286.40 – 6,449.59)	0.69	4.0386 ± 1.2859	1,0042.99[c] (921.64 - 1,260.64)	3.79	3.4973 ± 0.4786
E-Gr3	707.94 (593.56 - 893.48)	5.07	1.5625 ± 0.2206	223.12 (178.64 - 263.87)	9.97	2.0312 ± 0.2285
E-Gr4	878.07 (777.85 – 1,297.90)	36.08	4.9724 ± 0.5827	449.81 (311.43 - 613.71)	35.70	2.3141 ± 0.2345
E-Gr5	830.89 (772.02 - 911.72)	5.38	4.6803 ± 0.5440	343.59 (294.13 - 392.06)	9.65	2.1403 ± 0.2191

[a] ไม่พบอัตราการตายในกลุ่มควบคุม

[b] ค่า LC_{50} value มากกว่า 2,000 ppm และค่า parameters ไม่สามารถคำนวณได้

[c] ค่า LC_{50} value ได้ถูกประมาณโดยการคำนวณจาก Probit analysis ด้วย *Ldp Line* software

สรุปและอภิปรายผลการศึกษาวิจัย

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบจากผลของกุหลาบพุกาม โดยพบว่าสารสกัดด้วยน้ำของผลกุกลาบพุกามมีค่า LC_{50} ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง อยู่ที่ 240 และ ต่ำกว่า 100 ppm ตามลำดับ สำหรับสารสกัดด้วยเอทานอลนั้นมีฤทธิ์ต่ำกว่า คือมีค่า LC_{50} ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง อยู่ที่ 735 และ 160 ppm ตามลำดับ โดยสารสกัดจากเฮกเซนนั้นไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ได้อย่างสมบูรณ์เนื่องจากได้สารสกัดจำนวนน้อย อย่างไรก็ตาม จากการทดสอบในบางความเข้มข้น แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ที่ต่ำกว่าทั้งสารสกัดจากน้ำและเอทานอล ในขณะที่สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ของใบกุหลาบพุกามนั้น นอกจากจะได้สารสกัดจำนวนน้อยมาก ไม่เพียงพอในการนำมาทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านแล้ว จากการทดสอบในบางความเข้มข้น ยังพบว่า สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดนั้นมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงน้อยมาก หรือกล่าวได้ว่า สารสกัดหยาบจากใบกุหลาบพุกามไม่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน สำหรับส่วนสกัดย่อยนั้น ทั้งจากสารสกัดหยาบด้วยน้ำและเอทานอลมีฤทธิ์แตกต่างกัน พบว่าส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์สูงสุดคือ E-Gr3 ซึ่งเป็นกลุ่มของส่วนสกัดหยาบที่แยกได้จากสารสกัดหยาบเอทานอล

แม้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากผลกุหลาบพุกามที่มีผลต่อการตายของลูกน้ำยุงจะสูงกว่าสารสกัดจากพืชอื่นหลายชนิด แต่จากหลักฐานว่าพืชชนิดนี้มีฤทธิ์ด้านต่างๆ ที่มีประโยชน์ อีกทั้งมีรายงานถึงการนำส่วนของใบไปเป็นอาหารของคนพื้นเมืองของประเทศมาเลเซีย (Tan et al., 2005; Malek et al., 2009) จึงอาจเป็นข้อมูลที่จะกล่าวได้ว่าพืชชนิดนี้ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ การใช้สารสกัดจากพืชที่ไม่เป็นพิษแม้ว่าจะใช้ในความเข้มสูง ย่อมมีความปลอดภัยกว่าการใช้สารสกัดจากพืชที่มีความเป็นพิษแม้ในความเข้มข้นต่ำกว่า ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงนั้นเพิ่มมากขึ้นเมื่อให้ลูกน้ำสัมผัสกับสารสกัดเป็นเวลานาน

ว. 694810 ค.2

สำนักหอสมุด

ขึ้น การที่พบกว่าฤทธิ์ที่ดีขึ้นเมื่อเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับ 24 ชั่วโมงนั้น สอดคล้องกับหลายการศึกษาที่มีผลการทดลองในลักษณะดังกล่าว เช่น การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพืชสมุนไพร *Pueraria mirifica*, *Butea superba* และ *Thevetia peruviana* ต่อยุลายบ้าน มีค่า LC_{50} ลดลงจาก 889.33, 1,156.68 และ 346.42 ppm เป็น 317.63, 496.23 และ 31.98 ppm เมื่อเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ (Lapcharoen et al., 2005)

๒๒ มี.ค. ๒๕๕๘

โดยสรุปแล้ว การศึกษานี้ได้ค้นพบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดจากผลกุหลาบพุกามทั้งส่วนสารสกัดหยาบและกลุ่มของส่วนสกัดย่อย แม้ว่าฤทธิ์ที่ 24 ชั่วโมง จะค่อนข้างต่ำ แต่ที่ 48 ชั่วโมง สารสกัดทุกส่วนที่ทดสอบมีฤทธิ์สูงขึ้น อย่างไรก็ตาม การที่จะพัฒนาสารสกัดจากพืชชนิดนี้ไปใช้ในการควบคุมยุงพาหะ การประเมินด้านความปลอดภัย อีกทั้งศึกษาฤทธิ์ต่อยุงพาหนะชนิดอื่นเช่น ยุงก้นปล่อง และยุงรำคาญ จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265-7.

Andreadis, T.G. (2007). Microsporidian parasites of mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7, 3-29.

Bansal, S.K., Singh, K.V., Sharma, S., & Sherwani, M.R. (2012). Laboratory observations on the larvicidal efficacy of three plant species against mosquito vectors of malaria, dengue/dengue hemorrhagic fever (DF/DHF) and lymphatic filariasis in the semi-arid desert. *Journal of Environmental Biology*, *33*(3), 617-621.

Becnel, J.J., White, S.E., & Shapiro, A.M. (2005). Review of microsporidia-mosquito relationships: from the simple to the complex. *Folia Parasitologica*, 52, 41-50.

Cavalcanti, E.S.B., de Morais, S.M., Lima, M.A.A., & Santana, E.W.P. (2004). Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L.. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, *99*(5), 541-544.

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.

Chaithong, U., Choochote, W., Kamsuk, K., Jitpakdi, A., Tippawangkosol, P., & Chaiyasit, D., et al. (2006). Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology*, *31*(1), 138-144.

Choochote, W., Tuetun, B., Kanjanapothi, D., Rattanachanpichai, E., Chaithong, U., & Chaiwong, P., et al. (2004). Potential of crude seed extract of celery, *Apium graveolens* L., against the mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology*, 29(2), 340-346.

Cuda, J.P., Hornby, J.A., Cotterill, B., & Cattell, M. (1997). Evaluation of *Lagenidium giganterm* for biocontrol of *Mansonia* mosquitoes in Florida (Diptera: Culicidae). *Biological Control*, *8*, 124-130.

Er, H.M., Cheng, E.H., & Radhakrishnan, A.K. (2007). Anti-proliferative and mutagenic activities of aqueous and methanol extracts of leaves from *Pereskia bleo* (Kunth) DC (Cactaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, *113*, 448-456.

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

Govindarajan, M., Mathivanan, T., Elumalai, K., Krishnappa, K., & Anandan, A. (2011). Mosquito larvicidal, ovicidal, and repellent properties of botanical extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, *109*(2), 353-367.

Guzman, A., & Isturiz, R.E. (2010). Update on the global spread of dengue. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(Suppl 1), S40-S42.

Halstead, S.B. (2007). Dengue. *Lancet*, *370*, 1644-1652.

Kamaraj, C., Rahuman, A.A., & Bagavan, A. (2008). Antifeedant and larvicidal effects of plant extracts against *Spodoptera litura* (F.), *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. *Parasitology Research*, *103*, 325-331.

Kar, S., & Aditya, A.K. (2003). Biological control of mosquitoes by aquatic planaria. *Tiscia*, *34*, 15-18.

Komalamisra, N., Trongtokit, Y., Rongsriyam, Y., & Apiwathnasorn, C. (2005). Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, *36*(6), 1412-1422.

Kovendan, K., Murugan, K., Naresh, K.A., Vincent, S., & Hwang, J.S. (2012a). Bioefficacy of larvicidal and pupicidal properties of *Carica papaya* (Caricaceae) leaf extract and bacterial insecticide, spinosad, against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, *110*(2), 669-678.

Kovendan, K., Murugan, K., & Vincent, S. (2012b). Evaluation of larvicidal activity of *Acalypha alnifolia* Klein ex Willd. (Euphorbiaceae) leaf extract against the malarial vector, *Anopheles stephensi*, dengue vector, *Aedes aegypti* and Bancroftian filariasis vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, *110*(2), 571-581.

Kumar, S., Warikoo, R., & Wahab, N. (2010). Larvicidal potential of ethanolic extracts of dried fruits of three species of peppercorns against different instars of an indian strain of dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, *107*, 901-907.

Lapcharoen P, Apiwathnasorn C, Komalamisra N, Dekumyoy P, Palakul K, Rongsriyam Y. Three indigenous Thai medicinal plants for control of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36: 167-75.

Maheswaran, R., Sathish, S., & Ignacimuthu, S. (2008). Larvicidal activity of *Leucas aspera* (Willd.) against the larvae of *Culex quinquefasciatus* Say. and *Aedes aegypti* L.. *International Journal of Integrative Biology*, *2*(3), 2214-2217.

Malek, S.N.A., Shin, S.K., Wahab, N.A. & Yaacob, H. (2009). Cytotoxic components of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) leaves. *Molecules*, *14*, 1713-1724.

Marimuthu, G., Rajamohan, S., Mohan, R., & Krishnamoorthy, Y. (2012). Larvicidal and ovicidal properties of leaf and seed extracts of delonix elata (L.) Gamble (Family: Fabaceae) against malaria (*Anopheles stephensi* Liston) and dengue (*Aedes aegypti* Linn.) (Diptera: Culicidae) vector mosquitoes. *Parasitology Research*, *111*, 65-77.

Paeporn, P., Komalamisra, N., Deesin, V., Rongsriyam, Y., Eshita, Y., & Thongrungkiat, S. (2003). Temephos resistance in two forms of *Aedes aegypti* and its significance for the resistance mechanism. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, *34*(4), 786-792.

Paeporn, P., Ya-umphan, P., Supaphathom, K., Savanpanyalert, P., Wattanachai, P., & Patimaprakorn, R. (2010). Insecticide susceptibility and selection for resistance in a population of *Aedes aegypti* from Ratchaburi Province, Thailand. *Tropical Biomedicine*, *21*(2), 1-8.

Poopathi, S., & Abidha, S. (2010). Mosquitocidal bacterial toxins (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*): Mode of action, cytopathological effects and mechanism of resistance. *Journal of Physiology and Pathophysiology*, *1*(3), 22-38

Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., Vontas, J., & David, J.P. (2008). Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*; impact on larval tolerance to chemical insecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *38*(5), 540-551.

Prasittisuk, C., Andjaparidze, A.G., & Kumar, V. (1998). Current status of dengue/dengue haemorrhagic fever in WHO South-East Asia region. *Dengue Bulletin*, *22*, 1-15.

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*, 179-188.

Rahuman, A.A., Gopalakrishnan, G., Venkatesan, P., & Geetha, K. (2008). Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, *102*, 867-873.

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.

Sim, K.S., Sri Nurestri, A.M., & Norhanom, A.W. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of crude and fractionated extracts of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 4*(5), 193-201.

Scholte, E.J., Knols, B.G.J., Samson, R.A., & Takken, W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal of Insect Science*, *4*, 1-24.

Su, X., Zou, F., Guo, Q., Huang, J., & Chen, T. (2001). A report on a mosquito-killing fungus, *Pythium carolinianum*. *Fungal Diversity*, *7*, 129-133.

Suh, C.P., & Axtell, R.C. (1999). *Lagenidium giganteum* zoospores: effects of concentration, movement, light, and temperature on infection of mosquito larvae. *Biological control*, *15*: 33-38.

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). *Journal of Vector Ecology*, *35*(1), 106-115.

Tan, M.L., Sulaiman, S.F., Najimuddin, N., Samian, M.R., & Muhammad, T.S. (2005). Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line. *Journal of Ethnopharmacology*, *96*(1-2), 287-294.

Thongwat, D., & Bunchu, N. (2011). Cross-resistance to deltamethrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) adult induced by selection with temephos in larvae. *Lanna Public Health Journal*, *7*, 240-250.

Tikar, S.N., Kumar, A., Prasad, G.B., & Prakash, S. (2009). Temephos-induced resistance in *Aedes aegypti* and its cross-resistance studies to certain insecticides from India. *Parasitology Research*, *105*, 57-63.

Wahab, S.I.A., Abdul, A.B., Mohan, S.M., Al-Zubairi, A.S., Elhassan, M.M., & Ibrahim, M.Y. (2009). Biological activities of *Pereskia bleo* extracts. *International Journal of Pharmacology*, *5*(1), 71-75.

Wilder-Smith, A. (2012). Dengue infections in travellers. *Paediatrics and International Child Health*, *32*(S1): 28–32.

Wirth, M.C., & Georghiou, G.P. (1999). Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *15*(3), 315-320.

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.