ประสิทธิภาพฤทธิ์ไล่ของน้ำมันสะเดาช้าง (*Azadirachta excels* Jack), พริกไทยดำ และสาร DEET ต่อยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* (L.)

Potential of thiam oil (*Azadirachta excels* Jack), black pepper oil (*Piper nigrum* L.) and DEET substance on excito-repellency property against *Aedes aegypti* (L.)

ศักดา รติศุภกร[1], Lorn Sokchan[1], **วริน กล้าการขาย**[1] **และ กราญ์จนา ถาอินชุม**[1*]

Sakda Ratisupakorn[1], Lorn Sokchan1, Warin Klakankhai[1] and Krajana Tainchum[1*]

บทคัดย่อ: ฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชสมุนไพรประกอบด้วยฤทธิ์ในการฆ่าและฤทธิ์ในการไล่ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ไล่โดยการสัมผัส (Contact Irritancy) ของน้ำมันสะเดาช้าง (*Azadirachta excels* Jack.), น้ำมันพริกไทยดำ (*Piper nigrum* L.) และสาร DEET ต่อพฤติกรรมการหนีของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* (L.) ทดสอบฤทธิ์ไล่โดยประเมินจากอัตราการตอบสนองหนีและไม่หนีของยุงลายบ้าน หลังจากที่สัมผัสสารทดสอบ ทำการปล่อยยุงตัวเต็มวัยเพศเมียอายุ 3-5 วันเข้าไปในกล่องทดสอบ excite-repellency test (ER) ที่มีกระดาษชุบน้ำมันหอมระเหยอยู่ นับจำนวนยุงที่หนีออกจากกล่องทดสอบทุกนาทีเป็นเวลา 30 นาที ผลการทดสอบพบว่ายุงทดสอบมีการตอบสนองต่อน้ำมันและสาร DEET ในแต่ละความเข้มข้น พบยุงหงายท้อง 30 นาทีและตายหลังจากการทดสอบที่ 24 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้จะได้นำไปประเมินความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันที่จะสามารถไล่ยุงลายบ้านได้ผลดีที่สุดต่อไป

คำสำคัญ: ยุงลายบ้าน, น้ำมันสะเดาช้าง,น้ำมันพริกไทยดำ, DEET, กล่องทดสอบ

ABSTRACT: Two chemical actions of essential oils are toxic and the deterrent actions. The objective of present study was to evaluate the effect of thiam oil (*Azadirachta excels* Jack.), black pepper oil (*Piper nigrum* L.) and DEET substance on excito-repellency property against *Aedes aegypti* (L.). Adult female, 3-5 days old of *Ae. aegypti* was introduced to excito-repellency test system and collect number of escape mosquito in every min for 30 min. Number of KD and dead mosquito were noted and analyzed. The result showed that behavioral responses of *Ae. aegypti* to essential oils and DEET were seen. The number of mosquito knockdown at 30 min and mortality at 24 h after exposure were observed. The information from this study may assist to evaluate the most effective for mosquito repellent chemical and concentration in future study.

Keywords: *Aedes aegypti*, thiam oil, black pepper oil, DEET, excito-repellency test chamber

[1] ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110
Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand
[*] Corresponding author : krajana.t@psu.ac.th

บทนำ

ปัจจุบันการควบคุมยุงพาหะเป็นมาตรการหลักในการป้องกันโรคไข้เลือดออก แม้ว่าวัคซีนไข้เลือดออกเช่น “เด็งวาเซีย” Dengvaxia® ที่ถูกค้นค้นโดยทีมนักวิจัยชาวฝรั่งเศส จะเริ่มมีการนำมาใช้แต่ยังไม่เป็นที่แพร่หลายและยังไม่มียาที่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสเดงกีซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไข้เลือดออก ดังนั้น การป้องกันตัวเองจากการกัดของยุงพาหะนำโรคก็ยังถือเป็นการป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพ โดยพาหะนำโรคไข้เลือดออกที่สำคัญคือยุงลายบ้าน (Ae. aegypti) ส่วนในชนบทบางพื้นที่จะมียุงลายสวน (Aedes albopictus) เป็นพาหะนำโรคร่วม (WHO, 2018) การใช้สารเคมีสังเคราะห์เช่นสาร DEET นั้นอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเปลี่ยนพฤติกรรมของยุง ระคายเคืองต่อผู้ใช้ และเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Norbert et al.,2010) สารสกัดหรือน้ำมันหอมระเหยจากพืชที่มีองค์ประกอบพฤกษเคมีที่น่าสนใจมีหลายชนิดด้วยกัน ไม่ว่าจะเป็น น้ำมันสะเดาช้าง (A. excels Jack.) และ น้ำมันพริกไทยดำ (P. nigrum L.) เนื่องจากฤทธิ์ของสารประกอบทางชีวภาพในเมล็ดมีผลในการกำจัด การยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลงศัตรูได้ อีกทั้งพบว่ามีฤทธิ์ไล่และป้องกันการดูดเลือดของยุง

การทดสอบน้ำมันจากพืชสมุนไพรด้วยกล่องทดสอบ excito-repellency test (ER) เพื่อใช้ในการประเมินประสิทธิภาพในการใช้เป็นสารไล่ยุงมีการศึกษาค่อนข้างหลากหลายทั้งกับชนิดพืชและยุงพาหะ (Boonyuan et al., 2014) โดยรายงานล่าสุดของ Nararak et al., (2017) ได้ทำการศึกษาพฤติกรรมการตอบสนองของยุงลายบ้าน *Ae. aegypti* และยุงก้นปล่อง Anopheles minimus ด้วยน้ำมันส้ม Citrus hystrix DC พบว่าสามารถไล่ยุงทั้งสองชนิดได้ สำหรับน้ำมันพริกไทยดำและน้ำมันสะเดาช้างได้มีการศึกษาในการนำมาทดสอบกับแมลงศัตรูโรงเก็บและทดสอบประสิทธิภาพการไล่ยุงของภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ ม.สงขลานครินทร์ (เอกราช, 2552) แต่ยังไม่มีรายงานการทำทดสอบพฤติกรรมการตอบสนองของยุงลายบ้าน ด้วยกล่องทดสอบ excite-repellency test ดังนั้น การศึกษานี้มีจึงวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงลายบ้าน Ae. aegypti (L.) ของน้ำมันสะเดาช้าง (A. excels Jack.) และ น้ำมันพริกไทยดำ (P. nigrum L.) พืชสมุนไพรท้องถิ่นที่มีมากในประเทศไทยเปรียบเทียบกับสาร DEET อาจเป็นไปได้ว่าหากน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรนี้มีประสิทธิภาพในการฤทธิ์ไล่ยุงได้ดี อาจจะสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางเลือก เพื่อลดการนำเข้าสารเคมีสังเคราะห์ที่เป็นผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมและอาจช่วยชะลอการพัฒนาการสร้างความต้านทานของยุงพาหะนำโรคได้

วัสดุและวิธีการ

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณยุงลายบ้าน

ยุงลายบ้าน *Ae.aegypti* (L.) สายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ USDA ถูกนำมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ ณ อาคารปฏิบัติการกีฏวิทยา ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช ลูกน้ำยุงจะถูกเลี้ยงในถาดพลาสติกที่ใส่น้ำกรองประมาณ 150 มิลลิลิตร ให้อาหารปลา (ซากุระ บริษัท ไทยสุปริงเดย์ จำกัด กรุงเทพมหานคร) เป็นอาหารของลูกน้ำยุง จนถึงระยะดักแด้จึงเก็บนับจำนวนดักแด้ใส่กรงขนาด 30×30×30 cm3 โดยให้น้ำหวาน 10% เป็นอาหารของตัวเต็มวัย คัดเลือกตัวเต็มวัยเพศเมียอายุ 3-5 วันเพื่อการทดสอบ งดให้น้ำหวานก่อนนำยุงไปทดสอบโดยจะให้น้ำเปล่าชุบสำลีวางบนกระบอกเตรียมยุงทดแทนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กระบอกละ 15 ตัว ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ จากนั้นนำยุงที่มีการหนีและไม่มีการหนีพักไว้ในกระบอกพลาสติก

การเตรียมกระดาษชุบสารและการทดสอบด้วยกล่องทดสอบ excito repellency test

เตรียมสารน้ำมันสะเดาช้าง (ความเข้มข้น 2.5, 5, 10% v/v) น้ำมันพริกไทยดำ (ความเข้มข้น 2.5, 5, 10 v/v) และสารไล่ยุงที่มีสารออกฤทธิ์ DEET (N, N-diethyl-m-toluamide) (ความเข้มข้น

ที่พบผลิตขายทางการค้า 12, 25 , 95% v/v) โดยใช้เอททานอล (99.97%) เป็นตัวทำละลายและตัวแปรควบคุม การเตรียมการะดาษชุบสารและการเตรียมสารตามวิธีการของ Tainchum et al. (2014) ผสมลงบนกระดาษกรอง whatman® no.1 ขนาด 14.7×17.5 cm2 ปริมาตรแผ่นละ 2.75 มิลลิลิตร (พื้นที่กระดาษ 257.25 ตารางเซนติเมตร) และผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นห่อเก็บด้วยอะลูมินัมฟรอยด์ ก่อนจะนำไปประกอบเข้ากับกล่องทดสอบ

ทดสอบโดยการปล่อยยุงเข้าไปในกล่องทดสอบ excito-repellency test chamber อุปกรณ์นี้มีการนำมาทดสอบในหลายการศึกษาก่อนหน้านี้ (Chreonviriyaphap et al., 2002; Tainchum et al., 2014) ซึ่งกล่องนี้ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ exposure chamber และ escaping chamber การศึกษาครั้งนี้ประยุกต์วิธีการศึกษาโดยสนใจทำการศึกษาเฉพาะฤทธิ์ไล่โดยการสัมผัส (Contact Irritancy) แล้วหนีเท่านั้น ยุงทดสอบจะได้สัมผัสสารจากกล่องแรก ยุงจะหนีสารจากกล่อง exposure chamber ไปยังกล่อง escaping chamber ซึ่งด้านบนปิดด้วยพลาสติกใสทำให้มองเห็นตัวยุงได้ ดูดยุงที่หนีออกจาก exposure chamber ด้วย mouth aspirator ใส่ไว้ในกระบอกพลาสติก escaped และนับจำนวนยุงที่หนี ทุกๆ 1 นาทีจนครบ 30 นาที ดูดยุงที่ยังคงอยู่ (remained) ในกล่อง exposure chamber และนับจำนวนยุงทดสอบที่หนี (escaped) และไม่หนี (remained) ทำการจดบันทึกยุงที่หงายท้อง (knockdown) ที่เวลา 30 นาที และนับจำนวนยุงทดสอบตายที่ 24 ชั่วโมง นำมาคำนวณร้อยละการตายและวิเคราะห์จำนวนยุงที่หนีออกจากกล่องด้วย Kaplan–Meier survival analysis และ เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ log rank test ระหว่างจำนวนยุงที่หนีจากสารทดสอบที่ความเข้มข้นแต่ละคู่ด้วย Log rank test ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ด้วยโปรแกรม SAS (Chareonviriyaphap et al. 2002)

ผลการศึกษา

การตอบสนองของยุงลายบ้าน *Ae. aegypti*

จากการทดสอบการตอบสนองของยุงลายบ้าน Ae. aegypti ต่อน้ำมันสะเดาช้างและน้ำมันพริกไทยดำที่ความเข้มข้น 3 ความเข้มข้นคือ 2.5, 5 และ 10% ด้วยกล่องทดสอบ excito-repellency test system ผลปรากฏ ดังในตาราง (Table 1) ยุงทดสอบมีการตอบสนองต่อน้ำมันสะเดาช้างทั้งสามความเข้มข้น อัตราการตอบสนองโดยการหนีอยู่ในช่วง 13.33-31.66% โดยความเข้มข้น 2.5% พบอัตรายุงหนีสูงสุดที่ 31.66% ในขณะที่ผลของน้ำมันพริกไทยดำพบว่ายุงมีการตอบสนองโดยการหนีอยู่ในช่วง 35.59-65.00% และความเข้มข้น 5% พบเปอร์เซ็นต์ยุงตอบสนองสูงสุดที่ 65.00% โดยตลอดการทดสอบน้ำมันสะเดาช้างและน้ำมันพริกไทยดำไม่พบยุงที่หงายท้องหลังจากทดสอบ 30 นาทีหรือยุงที่ตายหลังจากทดสอบ 24 ชั่วโมง ในของส่วนการทดสอบการตอบสนองของยุงลายบ้าน Ae. aegypti ต่อสาร DEET ที่ความเข้มข้น 3 ความเข้มข้นคือ 12, 25 และ 95% พบว่าอัตราการตอบสนองโดยการหนีสูงสุด 30.98% ที่ความเข้มข้น 25% การทดสอบการตอบสนองโดยการหนีที่ระดับความเข้มข้น 12% และ 25% พบยุงที่หงายท้องหลังจากทดสอบ 30 นาทีคิดเป็น 1.7% และ 10% ตามลำดับ และไม่พบการตายหลังจากการทดสอบ 24 ชั่วโมง แต่ที่ระดับความเข้มข้น 95% พบยุงตายมีการตายหลังจากทดสอบ 24 ชั่วโมง คิดเป็น 26.67%

การเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ log rank test

ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างจำนวนยุงที่หนีจากสารทดสอบที่ความเข้มข้นแต่ละคู่ (Table 2) ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) สำหรับการทดสอบด้วยน้ำมันสะเดาช้าง น้ำมันพริกไทยดำและสาร DEET ในทุกคู่ความเข้มข้น ยกเว้นน้ำมันพริกไทยดำที่ความเข้มข้น 2.5และ10% ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.6025)

Table 1. Escape response and mortality rate of *Aedes aegypti* from exposure chambers in contact irritancy assay.

Test	Concentration	N	Escape (%)	Remain (%)	KD (30 min)	Mortality (24 hr)
Control		60	6 (10)	54 (90)	0	0
Thiam	2.5%	60	19 (31.66)	41 (68.33)	0	0
	5%	60	11(18.33)	49 (81.67)	0	0
	10%	60	8 (13.33)	52 (86.67)	0	0
Control		60	4 (6.67)	56 (93.33)	0	0
Black pepper	2.50%	59	21 (35.59)	38 (64.41)	0	0
	5%	60	39 (65.00)	21 (35.00)	0	0
	10%	59	23 (38.98)	36 (61.02)	0	0
Control		58	4 (6.67)	54 (93.10)	1.70	3.30
DEET	12%	55	14 (25.45)	41 (74.55)	1.70	0
	25%	71	22 (30.98)	49 (69.01)	10	0
	95%	56	4 (7.14)	52 (92.85)	0	26.67

Table 2. The log rank test (*P*-value) comparing the escape mosquito from ER contact irritancy assay.

Concentration	2.5% Thiam	5% Thiam
5% Thiam	0.0062	-
10% Thiam	0.0182	<0.0001
	2.5% Black pepper	5% Black pepper
5% Black pepper	0.0022	-
10% Black pepper	0.6025	0.0131
	12%DEET	25%DEET
25%DEET	0.0002	-
95%DEET	0.0007	<0.0001

วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ไล่ยุงจากสารสกัดหรือน้ำมันจากพืชมีหลากหลายงานวิจัย โดยส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นเพื่อหาสารสำคัญที่สามารถไล่ยุงได้จากพืชชนิดใหม่ๆ พืชที่เป็นที่นิยมและเป็นที่รู้จักในการมีฤทธิ์ไล่ยุง เช่น ตะไคร้หอม ตะไคร้บ้าน ส้ม เป็นต้น จากการศึกษาพฤติกรรมการตอบสนองด้วยการหนีของยุงลายบ้าน Aedes aegypti (L.) ด้วยน้ำมันส้ม Citrus hystrix DC 4 เปอร์เซ็นการหนีของยุงที่ความเข้มข้น 2.5% คือ 56.1% (Nararak et al., 2017) ซึ่งใกล้เคียงกับการทดสอบครั้งนี้ในน้ำมันสะเดาช้างที่ความเข้มข้น 2.5% จะมีฤทธิ์ในการไล่ที่ดีที่สุด ผลิตภัณฑ์ไล่ยุง (Insect repellents) ที่ใช้ตามท้องตลาดในปัจจุบันมีสารเคมีออกฤทธิ์คือ DEET, IR3535 และสาร picaridin โดยอัตราแนะนำที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ IR3535ที่ความเข้มข้น 7.5-20.07% และสาร picaridin ใช้ที่ความเข้มข้น 5–20% แต่ทั้ง 2 สารไม่ได้รับความนิยมมากนักซึ่งแตกต่างจากสาร DEET ที่มีอัตราการใช้ในผลิตภัณฑ์ไล่แมลงระหว่าง 4–100% (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2543) โดย Tainchum และ คณะ (2014) ได้ทำการทดลองการตอบสนองของยุงลายบ้าน Ae. aegypti ประชากรห้องปฏิบัติการและภาคสนาม 5% ด้วยกล่องทดสอบ excito-repellency test พบว่าเปอร์เซ็นต์การหนีของยุงทดสอบประชากรห้องปฏิบัติการเท่ากับ 33% ประชากรภาคสนาม เท่ากับ 33% ซึ่งใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์การหนีสูงสุดในการศึกษาครั้งนี้ 30.98% ที่ทดสอบด้วย 12%DEET นอกเหนือจากประสิทธิภาพของสารทดสอบแล้ว วิธีการทดสอบประสิทธิภาพการไล่ยุงในกล่องทดสอบ excito-repellency test นั้นมีข้อดีคือการลดความเสี่ยงจากการถูกยุงกัดของอาสาสมัครและอาจทดแทนการใช้วิธีทดสอบแบบ arm in cage แต่ก็มีข้อด้อยในเรื่องของการซุบสารบนกระดาษกรอง ซึ่งไม่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับผิวหนังมนุษย์ ผลจากการทดสอบด้วยกล่องทดสอบ excito-repellency test จึงเป็นวิธีการเบื้องต้น ในการจำแนกประสิทธิภาพของน้ำมันสกัดจากพืชก่อนนำไปศึกษาการป้องกันการกัดและสารออกฤทธิ์ของน้ำมันสกัดจากพืชต่อไป

สรุปผล

การทดสอบครั้งนี้สรุปได้ว่าน้ำมันสะเดาช้าง น้ำมันพริกไทยดำและสาร DEET ที่ความเข้มข้นต่างกันมีฤทธิ์ไล่โดยการสัมผัส (contact irritancy) ที่แตกต่างกัน การศึกษาในอนาคตควรมีการเพิ่มความเข้มข้นหรือการใช้สารผสมเพื่อให้ได้เปอร์เซ็นต์การหนีของยุงเพิ่มมากขึ้น นอกจากนั้นควรทำการศึกษากับยุงในประชากรภาคสนาม เพื่อให้ทราบประสิทธิภาพเมื่อต้องนำไปใช้ในสภาพแวดล้อมจริง ทั้งนี้แม้ว่า ณ ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการไล่ยุงแล้วนั้นต้องคำนึงถึงความปลอดภัยให้มีความเหมาะสมต่อการใช้งาน

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับความกรุณาจากภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ ม.สงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา -ขอขอบคุณ ดร.สุนัยนา สท้านไตรภพ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข สำหรับความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ผลการทลองด้วยวิธีทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2543. ไข้เลือดออกและการควบคุมยุงพาหะนำโรค. กลุ่มงานกีฏวิทยา สถาบันวิจัย วิทยาศาสตร์สาธารณสุขและฝ่ายประชาสัมพันธ์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กระทรวงสาธารณสุข.เข้าถึงได้จาก: http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=123#intro (เข้าถึงเมื่อ 7 เมษายน 2562).

เอกราช แก้วนางโอ. 2552. การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำมันและสารสกัดหยาบเนื้อในเมล็ดสะเดาช้าง (Azadirachta excelsa Jack.) เพื่อควบคุมยุงลายบ้าน Aedes aegypti (L.). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Boonyuan, W., J. P. Grieco, M. J. Bangs, A. Prabaripai, S. Tantakom, and T. Chareonviriyaphap. 2014. Excito-repellency of essential oils against an Aedes aegypti (L.) field population in Thailand. J. Vector Ecol. 39: 112-122.

Chareonviriyaphap, T., A. Prabaripai, and S. Sungvornyothrin. 2002. An improved excito-repellency test chamber for mosquito behavioral tests. J. Vector Ecol. 27: 250-252.

Nararak, J., S. Sathantriphop, M. Kongmee, M. J. Bangs, and T. Chareonviriyaphap. 2017. Excito- repellency of Citrus hystrix DC Leaf and peel essential oils against Aedes aegypti and Anopheles minimus (Diptera: Culicidae), vectors of human pathogens. J. Med. Entomol. 54: 178-186.

Norbert, B., P. Dusan, Z. Marija, C. Clive, M. Minoo, D. Christen and A. Kaiser. 2010. Mosquitoes and their control. Springer, New York.

Tainchum, K., W. Ritthison, S. Sathantriphop, S. Tanasilchayakul, S. Manguin, M. J. Bangs, and T. Chareonviriyaphap. 2014. Influence of time of assay on behavioral responses of laboratory and field populations Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) to DEET. J. Med. Entomol. 51: 1227-1236.

World Health Organization (WHO). 2018. Dengue and severe dengue. Available source: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/, 7 April, 2019.