BRT 540065

วิทยานิพนธ์

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากตะไคร้หอม (*CYMBOPOGON WINTERIANUS* JEWITTI) และสะเดา (*AZADIRACHTA INDICA VAR. SIAMENSIS* VALETON) กับการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ทำลายพิษในเห็บสุนัข (*RHIPICEPHALUS SANGUINEUS* LATREILLE)

EFFICIENCY OF LEMON GRASS (*CYMBOPOGON WINTERIANUS* JEWITTI) AND NEEM (*AZADIRACHTA INDICA VAR. SIAMENSIS* VALETON) EXTRACTS ON THE LEVEL OF DETOXIFICATION ENZYMES IN DOG TICK (*RHIPICEPHALUS SANGUINEUS* LATREILLE)

นางสาวเรวดี ชูช่วย

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
พ.ศ. ๒๕๔๑

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และเครือข่ายนโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
c/o [illegible]
[illegible]
73/1 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400

25 ส.ค. 2542

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา)

ปริญญา

สัตววิทยา	สัตววิทยา
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง ประสิทธิภาพของสารสกัดจากตะไคร้หอม (*Cymbopogon winterianus* Jewitti) และสะเดา (*Azadirachta indica* var. siamensis Valeton) กับการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ทำลายพิษในเห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille)

Efficiency of Lemon Grass (*Cymbopogon winterianus* Jewitti) and Neem (*Azadirachta indica* var. siamensis Valeton) Extracts on The Level of Detoxification Enzymes in Dog Tick (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille)

นามผู้วิจัย นางสาวเรวดี ชูช่วย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ.....
(อาจารย์สุรพล วิเศษสุวรรค์, Ph.D.)

กรรมการ.....
(อาจารย์มัณฑนา มิลน์, Ph.D.)

กรรมการ.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิณทิพย์ กรรณสูตร, วท.ม.)

หัวหน้าภาควิชา.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิณทิพย์ กรรณสูตร, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(ศาสตราจารย์ธรรมศักดิ์ สมมาตย์, Ph.D.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 21 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2541

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากตะไคร้หอม (*Cymbopogon winterianus* Jewitti) และสะเดา (*Azadirachta indica var. siamensis* Valeton) กับการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ทำลายพิษในเห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille)

Efficiency of Lemon Grass (*Cymbopogon winterianus* Jewitti) and Neem (*Azadirachta indica var. siamensis* Valeton) Extracts on The Level of Detoxification Enzymes in Dog Tick (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille)

โดย

นางสาวเรวดี ชูช่วย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา)

พ.ศ. ๒๕๔๑

BRT 5400655

เรวดี ชูช่วย 2541 : ประสิทธิภาพของสารสกัดจากตะไคร้หอม (*Cymbopogon winterianus* Jewitti) และสะเดา (*Azadirachta indica var. siamensis* Valeton) กับการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ทำลายพิษในเห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา) สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา ประธานกรรมการที่ปรึกษา : อาจารย์สุรพล วิเศษสรรค์ Ph.D. 124 หน้า

การศึกษานี้ต้องการทราบผลของสารสกัดจากตะไคร้หอม (*Cymbopogon winterianus* Jewitti) และสารสกัดจากสะเดา (*Azadirachta indica var. siamensis* Valeton) ต่อการตอบสนองของเห็บ (Rhipicephalus sanguineus Latreille) และการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ทำลายพิษ บางชนิดของเห็บ เพื่อให้รู้กลไกการทำลายพิษ หลังจากที่เห็บได้รับสารสกัดทั้งสอง ในการศึกษานี้ได้ศึกษาการไล่เห็บจากสารสกัดจากตะไคร้หอม และการตายของเห็บจากการใช้สารสกัดจากสะเดา เปรียบเทียบกับการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ esterase, cholinesterase และ GSH ในแต่ละการทดลอง การสกัดสารจากพืชทั้งสองชนิดใช้วิธีการของกรมวิชาการเกษตร และทำการวิเคราะห์คุณภาพสารสกัดโดยวิธีการ Thin layer chromatography ก่อนศึกษาประสิทธิภาพ

จากการทดลองสารสกัดจากตะไคร้หอม พบว่าที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์เหมาะสมที่จะทำให้เห็บหนีได้ดี โดยให้ค่าสมการเส้นตรงของการหนีเป็น Y = 0.030 + 0.064 X และเมื่อผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ TPP จะทำให้สมการการหนีของเห็บเปลี่ยนเป็น Y = 0.108 + 0.071 X ที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารสกัดดังกล่าวจะทำให้การหนีของเห็บเป็นระยะทาง 8.4 $\pm$ 1.2 และ 8.6 $\pm$ 2.1 เซนติเมตร ใน 120 วินาที และจากการวิเคราะห์ปฏิกิริยาของเอนไซม์ทำลายพิษ พบว่าเอนไซม์ esterases, cholinesterase ลดลง 30 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ GSH ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัดจากสะเดาที่ความเข้มข้นระหว่าง 1-10 กรัม จะให้การตายระหว่าง 10.10 $\pm$ 1.6 ถึง 52.6 $\pm$ 11.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผสมสาร 1 เปอร์เซ็นต์ TPP จะทำให้การตายเพิ่มเป็น 16.2 $\pm$ 1.7 และ 74.4 $\pm$ 11.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ปฏิกิริยาเอนไซม์ทำลายพิษ พบว่าเอนไซม์ esterase ลดลงประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อผสมสารเพิ่มประสิทธิภาพจะทำให้ปฏิกิริยาลดลงไปจากเดิมอีก 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วน GSH ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการวิเคราะห์สมการ regression ระหว่างการไล่เห็บกับสารสกัดจากตะไคร้หอมในความเข้มข้นต่างพบว่าได้สมการเป็น Y = 6.13 + 1.09 X และค่า effective dose (ED) เป็น 0.01 เปอร์เซ็นต์ และสมการ regression ของสารสกัดสะเดาต่อการตายของเห็บเป็น Y = -26.967 + 12.798 X ซึ่งจะได้ค่า LD_{50} เป็น 6.01 กรัมต่อลิตร และ correlation ระหว่างการไล่เห็บจากสารสกัดตะไคร้หอม และปฏิกิริยาเอนไซม์ esterase, cholinesterase จะเป็น -0.77 และ -0.65 ตามลำดับ ในขณะที่อัตราการตายของเห็บจากสารสกัดสะเดา และ esterase เป็น -0.88 ส่วน correlation ของการตอบสนองต่อสารสกัดทั้งสองไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ต่อปฏิกิริยาของ GSH อย่างเด่นชัดแต่อย่างไร (r = 0.09 และ 0.34 ตามลำดับ)

เรวดี ชูช่วย

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

16 / มี.ค. / 54

Rawadee Chouchouy 2541 : Efficiency of Lemon Grass (*Cymbopogon winterianus* Jewitti) and Neem (*Azadirachta indica var. siamensis* Valeton) Extracts on the Level of Detoxification Enzymes in Dog Tick *(Rhipicephalus sanguineus* Latreille). Master of Science (Zoology), Major Field Zoology, Department of Zoology. Thesis Advisor : Mr.Surapon Visetson, Ph.D. 124 pages.

The effects (repellent and mortality) of two plant extracts, Lemon grass (*Cymbopogon winteranus*) and Neem (*Azadirachta siamensis*) were measured against tick (Family Ixodidae). Also some detoxification enzymes activity namely esterase, cholinesterase and GSH activity were trailed against their concentrations used in the experiment. All extraction methods followed the department of agriculture's and all extracts used in the experiment had been qualitatively analyzed using Thin layer chromatography prier to the trials.

Lemon grass extracts showed linear respond with $Y = 0.030 + 0.064 X$ at concentration 0.1 % and $Y = 0.108 + 0.071 X$ with added 1 % TPP to the concentration extract 0.01 %. The tick escaped at the optimum distance of 8.4 ± 1.2 cm and 8.6 ± 2.1 cm in 120 second. Esterase and cholinesterase activity were reduced by 30 and 60 % but GSH stayed at the same to all levels of extract concentrations. Neem extracts showed 10.10 ± 1.5 to 52.6 ± 11.5 % mortality at 1-10 g/L and with addition of 1% TPP the mortality increased by 50%. Neem extract alone reduced esterase activity ca. 30 % and with addition of 1% TPP, esterase activity further reduced by ca. 10%. Both plant extracts could not produce changes in GSH activity significantly.

Regression equation of lemon grass concentration and response showed $Y = 6.13 + 1.09 X$ for lemon grass and $Y = -26.967 + 12.798 X$ for neem extracts indicating of ED 0.01 % for lemon grass and 6.01 g/L for neem extracts. Also correlation among lemon grass extract concentration against esterase and cholinesterase were -0.77 and -0.65 respectively and neem extract concentration against esterase was -0.88. Both extracts showed poor correlation to GSH with $r = 0.09$ and 0.34 respectively.

Rawadee chouchouy — Student's signature

Surapon Visetson — Thesis Advisor's signature

16, 03, 49

คำนิยม

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สุรพล วิเศษสรรค์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาสอนสั่ง ประสิทธิ์ประสาทวิทยาการต่าง ๆให้คำปรึกษาแนะนำดูแลเอาใจใส่ในระหว่างการปฏิบัติการตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จเป็นอย่างดียิ่ง ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. มัณฑนา มิลท์ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก (สัตววิทยา) กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสมบูรณ์เป็นอย่างดียิ่ง ขอขอบพระคุณ ผศ. พิณทิพย์ กรรณสูตร กรรมการที่ปรึกษาวิชาโท (ชีววิทยา) กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ จนสมบูรณ์เป็นอย่างดียิ่ง ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. กัญจนะ มากวิจิตร์ กรรมการผู้แทนบัณฑิต กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ จนสมบูรณ์เป็นอย่างดียิ่ง ขอขอบพระคุณ รศ. ดร.ไพบูลย์ ยุติศรี ที่กรุณาสอนสั่ง ประสิทธิ์ประสาทวิทยาการต่าง ๆ ให้ และ ขอขอบพระคุณ อาจารย์ จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ ที่กรุณาช่วยดูแลเอาใจใส่ในระหว่างทำงานปฏิบัติการ

ขอขอบพระคุณ คุณอมรา ไตรศิริ และ คุณสำรวย ปลูกงาม จากศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ ที่ได้ให้คำแนะนำ และต้นตะไคร้หอมมาทำการวิจัย และ ขอขอบคุณคุณปราสาททอง พรหมเกิด นักสัตววิทยากองกีฏและสัตววิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำการวิจัย

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่เคารพรัก และ น้องชายที่ให้คำปรึกษาแนะนำ ใน ทุก ๆ เรื่อง และ เป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้องในภาคสัตววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทยซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT 540065

ตุลาคม 2541

สารบาญ

	หน้า
สารบาญ	(1)
สารบาญตาราง	(2)
สารบาญภาพ	(5)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	43
ผลการทดลอง	62
วิจารณ์ผลการทดลอง	93
สรุป	102
เอกสารอ้างอิง	104
ภาคผนวก	121

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยในตะไคร้หอมพันธุ์ลังกา และพันธุ์ชวา	13
2	ผลการสกัดตะไคร้หอมโดยวิธีการต่าง ๆ ที่ความชื้น 62.5 เปอร์เซ็นต์	16
3	แสดงการจำแนกปฏิกิริยาในระยะที่ 1	34
4	แสดงปฏิกิริยา เอนไซม์และ functional group ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา conjugation ในระยะที่ 2	35
5	ระยะทางเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ (เซนติเมตร) ในการหนีของเห็บในเวลาต่าง ๆ จากบริเวณที่วางชุบสารสกัดจากตะไคร้หอมความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	63
6	ระยะทางเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ (เซนติเมตร) ในการหนีของเห็บในเวลาต่าง ๆ จากบริเวณที่วางสำลีชุบสารสกัดสกัดจากตะไคร้หอมความเข้มข้นต่างกันที่ผสมกับ 1เปอร์เซ็นต์ TPP	65

สารบาญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
7	อัตราการตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐาน (จากการทดลอง 3 ซ้ำ) ของเห็บจากการฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสะเดาในอัตราความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อผสมกับสารเสริมฤทธิ์ (1 เปอร์เซ็นต์TPP และ 1เปอร์เซ็นต์ DEM)	68
8	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐาน (จากการทดลอง 3 ซ้ำ) ของความเข้มข้นของโปรตีนในเห็บสุนัขที่รอดชีวิตหลังจากได้รับสารสกัดจากตะไคร้หอมที่อัตราต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	71
9	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐาน (จากการทดลอง 3 ซ้ำ) ของความเข้มข้นโปรตีนในเห็บสุนัขที่รอดชีวิตหลังจากได้รับการฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสะเดาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	73
10	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐานของระดับ esterase และ cholinesterase จากการทดลอง 3 ซ้ำ ในเห็บสุนัขหลังจากได้รับการฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากตะไคร้หอมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	77
11	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐานของระดับ esterase และ cholinesterase จากการทดลอง 3 ซ้ำในเห็บสุนัขหลังจากได้รับการฉีดพ่นด้วยสารสกัดตะไคร้หอมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมกับ 1เปอร์เซ็นต์ TPP เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	79

สารบาญตาราง(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐานของระดับ glutathione S- transferase จากการทดลอง 3 ซ้ำ ในเห็บสุนัขหลังจากได้รับการฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากตะไคร้หอมความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ DEM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	81
13	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐานของระดับ esterase จากการทดลอง 3 ซ้ำในเห็บสุนัข หลังจากได้รับการฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสะเดาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ TPP เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	84
14	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐานของระดับ glutathione S – transferase จากการทดลอง 3 ซ้ำ หลังจากได้รับการฉีดพ่นสารสกัดจากสะเดาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ DEM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	86
15	สมการ regression และ ค่าสหสัมพันธ์หลังจากการได้รับสารสกัดจากสะเดาหรือสารสกัดจากตะไคร้หอม	89
16	สมการ regression การหนี และ coefficient of determination (r^2)ของเห็บจากบริเวณที่ให้สารสกัดจากตะไคร้หอม	91
17	สมการ regression การหนี และ coefficient of determination (r^2)ของเห็บจากบริเวณที่ให้สารสกัดจากตะไคร้หอมผสมกับ 1เปอร์เซ็นต์ TPP	92

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงวงจรชีวิตของเห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille)	5
2	แสดงลักษณะของเห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille)	7
3	ลักษณะการเกาะของเห็บที่อาศัยอยู่บนตัวสุนัข	8
4	ลักษณะตัวเต็มวัยของเห็บสุนัข	9
5	สูตรโครงสร้างทางเคมีบางชนิดที่สำคัญของสารที่มีในสารสกัดตะไคร้หอม	14
6	รูปร่างลักษณะตะไคร้หอม (*Cymbopogon winterianus* Jewitti)	15
7	แสดงเครื่องกลั่นน้ำมันตะไคร้อย่างง่ายโดยดัดแปลงจากหม้อต้มก๋วยเตี๋ยว ออกแบบฝาที่ท่อไอน้ำออกมากลั่นตัวภายนอก	18
8	สูตรโครงสร้างของสารประกอบ limonoids ชนิดต่าง ๆ ที่พบในสะเดา	23
9	ลักษณะผลสะเดาและเมล็ดสะเดาบด	24
10	ลักษณะของต้นสะเดา (*Azadirachta indica*)	25
11	แสดงทิศทางขั้นตอนการแพร่กระจายของสารพิษในร่างกายโดยทาง intravenous, intramuscular, subcutaneus, oral, and topical	31

สารบาญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	ปฏิกิริยา hydrolysis ของ esterase	40
13	ปฏิกิริยา hydrolysis ของ acetylcholine ซึ่งเป็น Endrogenus substrate ของ Acetylcholinesterase	40
14	ปฏิกิริยา conjugation ของ glutathione S- transferase	42
15	แสดงการสกัดสะเดาโดยเครื่อง soxhlet apparatus	46
16	แสดงการสกัดตะไคร้หอมโดยเครื่องกลั่นไอน้ำ	47
17	ลักษณะของสารสกัดจากตะไคร้หอมที่ได้จากการสกัด	48
18	แสดงการแยกตัวทำละลายออกจากตัวถูกละลายโดยเครื่อง Flask evaporator	49
19	แสดงการทดลองหาอัตราการไล่ของเห็บสุนัขที่ได้รับสารสกัดตะไคร้หอม	50
20	ลักษณะของสารสกัดสะเดาที่ได้จากการสกัด	51
21	แสดงการทดลองหา LD_{50} ของเห็บสุนัขที่รับสารสกัดสะเดา	55
22	การเตรียม suspension สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ เอนไซม์ โดยเครื่อง centrifuge	56
23	แสดงการหาค่าการดูดซับแสงโดยเครื่อง spectrophotometer	57

สารบาญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
24	กราฟเส้นแสดงระยะทาง (เซนติเมตร) การหนีของเห็บของบริเวณที่ให้สารสกัดจากตะไคร้หอมที่ความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01 เปอร์เซ็นต์และชุดควบคุม	64
25	กราฟเส้นแสดงระยะทาง (เซนติเมตร) การหนีของเห็บจากบริเวณให้สารสกัดตะไคร้หอมที่ความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ 1เปอร์เซ็นต์ TPP	66
26	ฮีสโตแกรมแสดงอัตราการตายของเห็บจากการใช้สารสกัดสะเดาในอัตราความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการใช้ 1เปอร์เซ็นต์ TPP, 1เปอร์เซ็นต์ DEM และไม่ใช้สารเสริมฤทธิ์	69
27	ฮีสโตแกรมแสดงผลของการสกัดจากตะไคร้หอมต่อปริมาณของโปรตีนในเห็บสุนัข	72
28	ฮีสโตแกรมแสดงผลของสารสกัดจากสะเดาต่อความเข้มข้นของโปรตีนในเห็บสุนัข	74
29	ฮีสโตแกรมแสดงผลของสารสกัดตะไคร้หอมต่อระดับ esterase และ cholinesterase ในเห็บสุนัข	78
30	ฮีสโตแกรมแสดงผลของสารสกัดตะไคร้หอมและ 1เปอร์เซ็นต์ TPP ต่อระดับ esterase และ cholinesterase ในเห็บสุนัข	80
31	ฮีสโตแกรมแสดงผลของสารสกัดจากตะไคร้หอมและ 1เปอร์เซ็นต์ DEM ต่อระดับ glutathione S- transferase ในเห็บสุนัข	82
32	ฮีสโตแกรมแสดงผลของสารสกัดสะเดาและ 1เปอร์เซ็นต์ TPP ต่อระดับ esterase ในเห็บสุนัข	85

สารบาญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
33	ฮีสโตแกรมแสดงผลของสารสกัดสะเดาและ 1เปอร์เซ็นต์ DEM ต่อระดับ glutathione S – transferase ในเห็บสุนัข	87

ชื่อเต็มของคำศัพท์

ANOVA= analysis of variance

ATCL = acetyl thiochline Iodide

AZT = azeotropic mixture

CDNB = 3, 4 – dichloronitrobenzene

DCNB = 1- chloro – 2, 4 – dinitrobenzene

DDA = 2, 2 – bis (p- chlorophenyl) –1, 1, 1 – trichloroethylene

DDE = 2, 2 – bis (p – chlorophenyl) – 1, 1 – dichloroethylene

DEM = diethyl maleate

DMRT = Duncan's Multiple Range Test

ED = effective dose

EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid tetra sodium salt

GSH = reduced glutathione

g/ L = gram/ Litre

HPLC = high performance liquid chrolomatography

LD = lethal dose

MFO = mixed function oxidase

OP = organophosphorus

PNPA = para nitrophenyleacetate

PVPP = polyvinyl polypyrrolidine

SD = standard deviation

TPP = triphenyl phosphate

Tris = tris chydroxymethyl amino ethane

v/ v = volume/ volume

w/ w = weight/ weight

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากตะไคร้หอม (*Cymbopogon winterianus* Jewitti) และสะเดา (*Azadirachta indica var. siamensis* Valeton) กับการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ทำลายพิษในเห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille)

Efficiency of Lemon Grass (*Cymbopogon winterianus* Jewitti) and Neem (*Azadirachta indica var. siamensis* Valeton) Extracts on The Level of Detoxification Enzymes in Dog Tick (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille)

คำนำ

มนุษย์มีความใกล้ชิดและคลุกคลีกับสุนัขมาเป็นเวลานาน ผู้เลี้ยงสุนัขมักพบกับปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพของสุนัข โดยเฉพาะมีเห็บซึ่งทำให้เกิดแผลและความรำคาญกับสุนัข (สัมฤทธิ์, 2537) บางครั้งอาจเป็นพาหะนำโรค และอันตรายมาสู่ผู้เลี้ยงสุนัขได้ เช่น โรคเคนายไพโรพลาสโมซีส (Urquhart *et. al.*, 1987) ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการกำจัดเห็บเพื่อความปลอดภัยของผู้เลี้ยงและตัวสุนัข ส่วนมากผู้เลี้ยงจะใช้สารเคมีกำจัดเห็บสุนัข สารเคมีเหล่านี้อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อสุนัขและผู้เลี้ยงได้

ปัจจุบันมีการผลิตสารเคมีมากกว่า 300 ชนิด เพื่อใช้ในการเกษตร โดยมีวัตถุประสงค์หลักของการผลิตเพื่อประโยชน์ทางเศรษฐกิจและป้องกันกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ แต่ในปัจจุบันการใช้สารเคมีเหล่านั้นกลับปรากฏผลกระทบต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเกษตรกรและผู้ใช้ส่วนใหญ่ขาดความรู้และความเข้าใจในการใช้อย่างถูกวิธีและปลอดภัย จึงทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์และก่อให้เกิดมลพิษอีกด้วย ซึ่งปัญหาเกี่ยวกับมลพิษนี้นับวันจะยิ่งรุนแรงมากขึ้น และใช้ระยะเวลายาวนานกว่าจะแก้ไขให้สำเร็จได้ (อำพล, 2540)

การใช้สารเคมีเกินความจำเป็น ไม่เพียงแต่ก่อให้เกิดผลกระทบกระเทือนต่อผู้ใช้และผู้เกี่ยวข้องโดยตรง ยังมีผลกระทบในระยะยาวทำให้สมดุลธรรมชาติสูญเสียไป เกิดปัญหาต่าง ๆ ติดตามมา ปัญหาที่สำคัญที่สุดได้แก่ แมลงสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง (ประพิศ, 2539) ในปี พ.ศ. 2481 มีรายงานว่าแมลง 7 ชนิดเท่านั้น ที่สร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง ในปี พ.ศ. 2530 พบว่ามีแมลงศัตรูพืชและสัตว์เลี้ยงรวมทั้งพาหะนำโรคมากกว่า 500 ชนิด สร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงสังเคราะห์ (Visetson, 1991) สาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่แมลงมีการสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงสังเคราะห์ เนื่องจากแมลงมีกระบวนการในการทำลายพิษหรือขจัดพิษ (detoxification) โดยวิธีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีซึ่งมีเอนไซม์เป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาการขจัดพิษดังกล่าว (Dauterman และ Hodgson, 1978)

เมื่อสารเคมีสังเคราะห์ก่อให้เกิดปัญหาหลายประการดังที่กล่าวมาแล้ว ทางแก้ปัญหาประการหนึ่ง คือการให้ความรู้แก่ผู้ใช้และเกษตรกร การลดการนำเข้าสารเคมีร้ายแรง นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากพืชชนิดต่าง ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัด การใช้สารสกัดจากพืชนั้นมีมานานแล้ว ตั้งแต่ก่อนประวัติศาสตร์ แต่ไม่เป็นที่นิยมเพราะการเตรียมค่อนข้างยุ่งยากและใช้เวลานาน แต่ปัจจุบันมีเทคนิคการสกัดที่ช่วยทำให้การสกัดเป็นไปอย่างสะดวกและรวดเร็วมากขึ้น และนอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากพืชมีสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่มากมาย แมลงจะต้องใช้เวลานานมากในการสร้างความต้านทานต่อองค์ประกอบต่าง ๆ ในสารสกัดเหล่านั้น (Visetson, 1991)

สารสกัดจากพืชหลายชนิดที่ถูกนำมาศึกษาประสิทธิภาพในทางการเกษตร สารสกัดจากพืชที่นำมาใช้มากในปัจจุบัน เช่น พืชตะไคร้หอม และสะเดา ซึ่งมีรายงานว่าคุณสมบัติในการไล่หรือฆ่าแมลงหลายชนิด (Singh *et. al.*, 1989) นอกจากนี้ ณรงค์ (2540) รายงานว่ามะขามเปียกสามารถฆ่าเห็บโคได้ สารสกัดดังกล่าวนอกจากจะเป็นสารที่ไม่ทำให้เกิดพิษภัยข้างเคียงต่อสัตว์และสภาพแวดล้อมแล้ว ยังทำให้ผู้ใช้ปลอดภัยอีกด้วย (มารศรี, 2528) แต่อย่างไรก็ตามกลไกในการออกฤทธิ์ของสารสกัดดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งเรื่องของเอนไซม์ทำลายพิษ (detoxification

enzymes) ยังไม่มีผู้ใดทำการทดลองศึกษา การศึกษานี้เป็นตัวชี้บอกถึงแนวทางการสร้างความต้านทานต่อสารสกัดจากพืช และการเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดดังกล่าวได้อย่างดี

การวิจัยนี้เป็นการทดสอบผลของสารสกัดจากตะไคร้หอมและสารสกัดจากสะเดา รวมทั้งได้ทดลองผสมสารสกัดจากตะไคร้หอมและสารสกัดจากสะเดากับสารเสริมฤทธิ์ (synergists) เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากตะไคร้หอมและสะเดา ในการป้องกันกำจัดเห็บสุนัข และศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ทำลายพิษ ที่เกิดขึ้นของเห็บมากน้อยเพียงใด ผลการทดลองนี้จะเป็นแนวทางในการป้องกันและกำจัดแมลงบางชนิด เมื่อมีการสร้างความต้านทานต่อสารสกัดจากตะไคร้หอมและสารสกัดจากสะเดา ในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากตะไคร้หอมในการเป็นสารไล่และสารสกัดจากสะเดาต่อการตายของเห็บสุนัข
2. ศึกษาค่า LD_{50} ของสารสกัดจากสะเดา
3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับ cholinesterase, esterase และ glutathion S-transferase

ตรวจเอกสาร

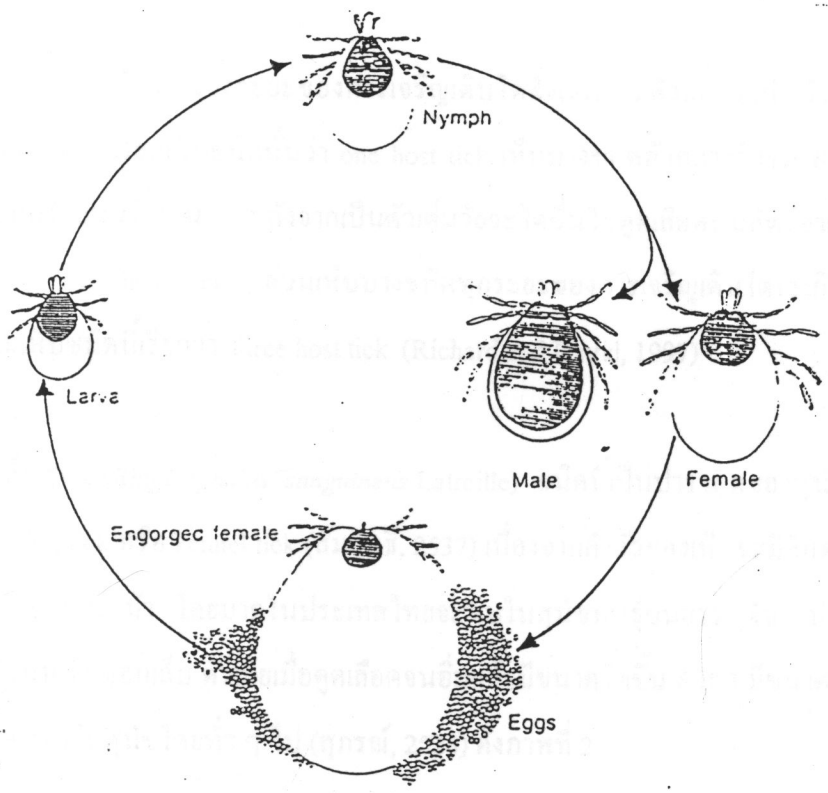
1. การจัดชั้นและรูปร่างลักษณะของเห็บ

Phylum	Arthropoda
Class	Arachnida
Order	Acarina (Georgi, 1969)
Family	Ixodidae
Genus	Rhipicephalus
Species	*Rhipicephalus sanguineus*

Family Ixodidae

Family Ixodidae ได้แก่เห็บที่มีขนาดใหญ่ ดูดเลือดกินเป็นอาหาร มี capitulim อยู่ที่ส่วนปลายด้านหน้าของตัวในทุกระยะของวงจรชีวิต เปลือกด้านหลัง (scutum) เป็นสิ่งบอกความแตกต่างของเพศ ซึ่งเห็บใน Family Ixodidae นี้มีชื่อเรียกทั่ว ๆ ไปว่าเห็บแข็ง (hardtick) เนื่องจากมีเปลือกด้านหลังของลำตัว ในตัวอ่อนและตัวกลางวัย ยังคงมีเปลือกด้านหลังปกคลุมอยู่ครึ่งตัว เห็บตัวผู้ส่วนมากเปลือกด้านหลัง จะปกคลุมส่วนหลังเกือบตลอดลำตัว (สัมฤทธิ์, 2537) แต่ในเห็บตัวเมียเปลือกด้านหลังจะปกคลุมอยู่เฉพาะส่วนหน้าของลำตัวเท่านั้น เป็นเหตุให้เห็บตัวเมียหลังจากดูดเลือดจนอิ่ม (engorge) แล้วจะมีขนาดโตกว่าเห็บตัวผู้หลายเท่า (สุภรณ์, 2526) ส่วนปากอยู่ทางด้านหน้าของลำตัว ตาถ้ามีจะมีอยู่ 1 คู่ และอยู่ทางด้านข้างของเปลือกด้านหลัง มีสไปราเคิลอยู่ 1 คู่ ที่เปลือกด้านหลังจะมีร่อง (groove) ร่องนี้สามารถนำมาแยกสกุลของเห็บได้ เห็บบางชนิดจะมีสีและลวดลายประดับ แต่บางชนิดไม่มีลวดลายประดับ เห็บตัวเมียที่มิได้ถูกผสมจะมีอายุยาวนานกว่าเห็บที่ถูกผสม เห็บตัวเมียจะมีการวางไข่นอกตัวสัตว์ที่มันอาศัยอยู่โดยเฉพาะตามพื้นดิน ตัวเมียจะวางไข่เป็นกระจุกหลังจากวางไข่แล้วตัวเมียจะตาย (อนันต์, 2540) ดังภาพที่ 1

วงจรชีวิต



ภาพที่ 1 แสดงวงจรชีวิตของเห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille) จาก Urquhart *et. Al.*, (1987)

ไข่ของเห็บจะมีขนาดค่อนข้างเล็กกลมสีเหลืองอ่อนจนถึงสีน้ำตาลแก่ อุณหภูมิจะมีอิทธิพลต่อการฟักตัวของไข่ โดยที่อากาศหนาวเย็นจะชะลอการฟักไข่และการเจริญในระยะต่าง ๆ

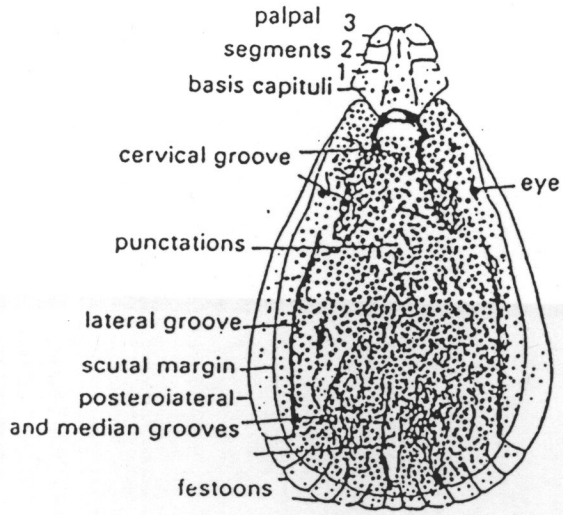
ตัวอ่อนที่ฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ เรียกว่า ซีดทิค (Seed tick) เกาะเป็นกระจุก (อนันต์, 2540) ต่อมาจะเกาะบนยอดหญ้ารอเวลาที่โฮสต์ผ่านมา โดยใช้อุ้งเท้าขาหน้าเกาะกับโฮสต์ การลอกคราบของเห็บจะเกิดบนตัวโฮสต์หรือนอกตัวโฮสต์ก็ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของเห็บ (สุภรณ์, 2526)

เห็บบางชนิดทุกช่วงระยะของการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะตัวอ่อนจนถึงตัวเต็มวัยเกิดบนสัตว์ที่อาศัยตัวเดียว เรียกเห็บชนิดนั้นว่า one host tick เห็บบางชนิดตัวกลางวัยจะตกจากสัตว์ที่อาศัยเดิมมาลอกคราบบนพื้นดิน หลังจากเป็นตัวเต็มวัยจะไต่ขึ้นไปดูดเลือดบนสัตว์อาศัยตัวใหม่ เรียกเห็บชนิดนี้ว่า two host tick ส่วนเห็บบางชนิดทุกระยะของการเจริญเติบโตจะเกิดการลอกคราบบนพื้นดินเห็บชนิดนี้เรียกว่า three host tick (Richard and David, 1997)

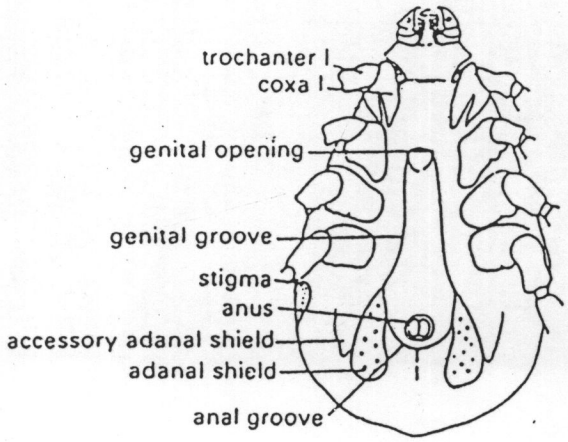
เห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille) ชนิดนี้เป็นปาราสิตของสุนัขเรียกชื่อทั่วไปว่า brown dog tick หรือ kennel tick (สัมฤทธิ์, 2537) เนื่องจากลำตัวของเห็บจะมีสีแดง แต่อาจพบในสัตว์อื่นด้วย เช่น ม้า โดยมากในประเทศไทยจะพบในสุนัขพันธุ์ขนยาว ตำแหน่งที่พบคือใบหูบริเวณที่มีขนหนา ซอกเล็บ ตัวเมียเมื่อดูดเลือดจนอิ่มแล้วมีขนาดโตขึ้น 6 เท่า มีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้เห็บชนิดนี้จะพบในสุนัขโดยทั่ว ๆ ไป (สุภรณ์, 2526) ดังภาพที่ 2

การสืบพันธุ์และความเป็นอยู่ ตัวเมียวางไข่เพียงครั้งเดียว ประมาณ 2,000 - 3,900 ฟอง ไข่มีลักษณะเช่นเดียวกับไข่ของเห็บในสกุลอื่น ๆ ที่อยู่ในแฟมมิลี่นี้ (สุภรณ์, 2526) ไข่ฟักเป็นตัวอ่อนภายในเวลา 20 - 30 วันตัวอ่อนขึ้นไปดูดเลือดบนสุนัขนาน 2 - 4 วัน ตัวอ่อนสามารถอดอาหารได้นานถึง 8 เดือนครึ่ง เห็บชนิดนี้เป็น three host tick (Richard and David, 1997) ดังนั้นเมื่อตัวอ่อนดูดเลือดจนอิ่มจะหล่นลงมาแล้วลอกคราบบนพื้นดิน ตัวอ่อนใช้เวลาพักก่อนการลอกคราบนาน 5 วัน ตัวกลางวัยขึ้นไปดูดเลือดบนโฮสต์นาน 4 - 9 วัน เมื่ออิ่มแล้ว จะหล่นลงมาลอกคราบบนพื้นดิน ตัวกลางวัยอดอาหารได้นานถึง 6 เดือน ตัวกลางวัยใช้เวลาพักก่อนการลอกคราบ

ประมาณ 11 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมียขึ้นไปดูดเลือดบนตัวโฮสต์ ใช้เวลาในการดูดเลือดนาน 6 - 21 วัน และสามารถอดอาหารได้นานถึง 19 เดือน (สุภรณ์, 2526)



A ภาพด้านบน



B ภาพด้านล่าง

ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของเห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille) A ภาพด้านบน B ภาพด้านล่างจาก สัมฤทธิ์, 2537, Richard and David, 1997

เห็บชนิดนี้ชอบดูดเลือดบริเวณใบหู ลำตัว โดยเฉพาะบริเวณต้นคอที่มีขนหนา ๆ ซอกเล็บ และพบได้ที่บริเวณอื่น ๆ ของสุนัข (สัมฤทธิ์, 2537) เห็บเป็นตัวนำโรคบิริอารี ฟีเวอร์ (biliary fever) หรือ เคนาย ไพโรพลาสโมซิส (canine piroplasmosis) ซึ่งเกิดจากเชื้อ บาบีเซียเคนิส (Babesia canis) (Urquhart *et. al.*, 1987)

ภาพที่ 3 ลักษณะตัวเต็มวัยของเห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille)

ภาพที่ 4 แสดงการเกาะของเห็บที่อาศัยอยู่บนตัวสุนัข

2. อันตรายที่เกิดจากเห็บ

เห็บทำอันตรายให้สุนัขโดยการกัดและการดูดเลือดของเห็บ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคโลหิตจางได้ ถ้ามีเป็นจำนวนมาก ๆ จะทำให้สัตว์ถึงตายได้ (สัมฤทธิ์, 2537) อันตรายที่เกิดจากการดูดเลือดของเห็บนี้จัดว่าเป็นอันตรายที่ค่อนข้างจะรุนแรงมาก เช่น เห็บตัวเมีย 1 ตัว สามารถดูดเลือดได้ถึงประมาณ 0.2 - 0.5 มิลลิลิตรต่อวัน และทำให้สัตว์เกิดอาการที่เรียกว่า "tick worry" อาการเหล่านี้จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับตำแหน่งหรือบริเวณที่เห็บกัด จำนวนเลือดที่สูญเสียไป ลักษณะของบาดแผลและที่สำคัญก็คือ บาดแผลนั้นอาจถูกแมลงวันต่าง ๆ มาวางไข่ สัตว์ที่ถูกเห็บรบกวนจะตรวจพบว่ามีน้ำหนักตัวลดลง ผลิตผลต่าง ๆ เช่น น้ำนมก็จะลดลงไปด้วย สัตว์บางตัวจะผอมมาก และทำให้หนังสัตว์เกิดการเสียหายขายไม่ได้ราคาเท่าที่ควร โรคอีกชนิดหนึ่งที่อาจเกิดขึ้นได้จากการดูดเลือดของเห็บ คือ โรคอัมพาต สาเหตุเนื่องจากเห็บได้ปล่อยสารพิษเข้าไปในโฮสต์ สารพิษนี้พบได้จากตัวเมียแต่บางครั้งก็อาจพบได้จากตัวกลางวัย โดยทั่วไปแล้วการเกิดอัมพาตในสัตว์จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระยะเวลาการดูดเลือดของตัวเห็บ และขึ้นอยู่กับจำนวนของเห็บ ถ้าดึงเอาเห็บออกทำให้สัตว์หายป่วยและจะกลับคืนสู่สภาพปกติได้ (สุภรณ์, 2526)

3. การควบคุมเห็บ

เนื่องจากเห็บส่วนมากวางไข่บนพื้นดิน เห็บบางชนิดเป็น three horst tick บางชนิดเป็น two host tick ดังนั้นการมุ่งแต่จะควบคุมเห็บที่อยู่บนสัตว์อย่างเดียวจะไม่ได้ผลในการรักษา สิ่งที่ต้องคำนึงถึง คือ ชนิดของเห็บว่าเป็นเห็บชนิดใด (one host tick, two host tick หรือ three host tick) ระยะเวลาของเห็บแต่ละชนิด เห็บจำพวก one host tick สามารถควบคุมได้ง่ายกว่าเห็บชนิดอื่น ๆ ส่วนเห็บ three host tick เป็นเห็บที่ควบคุมได้ยาก เพราะทุกระยะจะมีการลอกคราบบนพื้นดิน และยิ่งกว่านั้นตัวอ่อนและตัวกลางวัยสามารถขึ้นไปดูดเลือดบนสัตว์ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่สัตว์เลี้ยงได้ ทำให้ยากแก่การควบคุมเป็นอย่างยิ่ง สารเคมีที่ใช้ฆ่าเห็บ เช่น benzenehexachoride เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ หรือสารหนู มีประสิทธิภาพในการฆ่าได้สูง แต่สารเคมีนี้มีข้อเสียคือ ในความเข้มข้นมากเกินไปอาจจะระคายเคืองต่อผิวหนังของทำให้เกิดการอักเสบตามผิวหนัง เมื่อใช้สารเคมีนี้เป็น

เวลานานเห็บจะเกิดการดื้อยา วิธีป้องกันและกำจัดเห็บที่อยู่ตามพื้นดิน พื้นคอก อาจใช้การเผาทุ่งหญ้า การรมควัน และการพ่นยาฆ่าเห็บ (สุภรณ์, 2526)

การใช้สารเคมีสังเคราะห์และสารอนินทรีย์ดังกล่าว ทำให้เกิดผลเสียต่อสภาพแวดล้อม ตลอดจนผลที่ไม่พึงประสงค์อื่น ๆ เช่น การสร้างความต้านทานของแมลงต่อสารเคมีสังเคราะห์ หรือสารอนินทรีย์และเกิดสารตกค้าง ซึ่งจะทำให้เกิดพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม เมื่อเพิ่มปริมาณของสารสังเคราะห์มากขึ้นต่อมาจากการวิจัยพบว่า สารเคมีในกลุ่ม organophosphate ได้แก่ coumaphous, malathion, dimethoate จะทำให้แมลงสร้างความต้านทานในระยะเวลา 4 - 5 ปี (Metcalf, 1989) และ Ahmed *et. al.*, (1989) รายงานว่าการสร้างความต้านทานของแมลงหวี่ขาวต่อสารฆ่าแมลง carbofuran ก็มีสาเหตุในการลดความไวของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสด้วย และสารอนินทรีย์ ได้แก่ อาร์ซีนิคอล (arsenical) จะทำให้เกิดอาการเป็นพิษบริเวณที่สัมผัส (สุภาณี, 2537) และเป็นอันตรายจากการกินของสัตว์ (Visetson, 1991)

จากการวิจัยพบว่าการใช้สารสกัดจากพืช เช่น สะเดา นอกจากจะไม่ทำให้มีสารตกค้างในธรรมชาติ และไม่ส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมแล้ว ยังทำให้การสร้างความต้านทานเป็นไปได้ยากด้วย (Yu, 1985; Rose, 1986; Visetson, 1991) และนอกจากนี้ผู้ใช้สารสกัดยังสามารถเตรียมได้เอง ไม่จำเป็นต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกพืช 2 ชนิด ซึ่งปัจจุบันมีผู้สนใจในการนำสารสกัดมาใช้ในการป้องกันกำจัดแมลง โดยเฉพาะแมลงศัตรูใน บ้านเรือน เช่น ตะไคร้หอมและสะเดา

ตะไคร้หอม (Lemon grass)

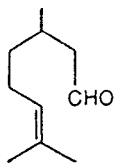
ตะไคร้หอมเป็นพืชที่ขึ้นง่าย และมีแพร่หลายในประเทศไทยเป็นพืชตระกูลหญ้าชนิดหนึ่งเช่นเดียวกับข้าว (สุรพล, 2528) อยู่ใน Family Graminae มี essential oil ที่มีชื่อสามัญว่า

Citronella (Java type) มีสารประกอบหลักคือ citroneliol, geraniol (Singh *et. al.*, 1989) มีน้ำมันหอมระเหยอยู่ที่ส่วนใบและลำต้น สามารถนำไปสกัดทำยาป้องกันกำจัดแมลง ตะไคร้หอมที่นิยมปลูกมี 2 ชนิดคือ พันธุ์ลังกา *Cymbopogon nardus* Rendie และพันธุ์ชวา *Cymbopogon winterianus* Jewitt หรือมีชื่อพื้นเมืองว่า Mahapengiri (วินัย, 2540) ปลูกมากในหมู่เกาะชวา แล้วแพร่เข้าไปในประเทศจีน พันธุ์ตะไคร้หอมที่ปลูกกันมากในประเทศไทยเป็นพันธุ์ชวา (อรนุช, 2530) ลักษณะของตะไคร้หอมจะขึ้นเป็นกอ (สุรพล, 2528) มีช่อดอกยาวโน้มลงลำต้นออกสีม่วง และแข็ง ใบกว้างกว่าและกลิ่นแรงกว่าตะไคร้แกง (ลีนา, 2522) เจริญเติบโตได้ดีที่สุดในช่วงฝนตกชุก ระหว่างเดือนกันยายน - ตุลาคม มีความสูงเฉลี่ย 126 เซนติเมตร ออกดอกช่วงเดือนธันวาคม - มกราคม หลังจากออกดอกแล้วต้นจะโทรม (อรนุช, 2530) ดังภาพที่ 6

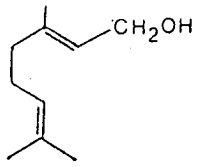
ตะไคร้หอมพันธุ์ลังกา และพันธุ์ชวา มีองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันตะไคร้หอม (ตารางที่ 1) จึงทำให้มีลักษณะกลิ่นเฉพาะพันธุ์ (วินัย, 2540)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยในตะไคร้หอมพันธุ์ลังกา และพันธุ์ชวา (วินัย, 2540)

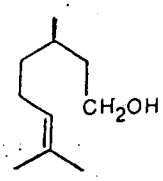
	ชนิดของสารเคมี	ปริมาณเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์)	
		พันธุ์ลังกา	พันธุ์ชวา
1	Limonene	9.7	1.3
2	Methyl neptanone	0.2	trace
3	Citronellal	5.2	32.7
4	Citronelyl acetate	1.9	3.0
5	Menthol	trace	-
6	1-borneol	6.6	trace
7	Citronellol, geranyl acetate	8.4	15.9
8	Geraniol	18.0	23.9
9	Metyl euginol	1.7	trace
10	Methyliso-euqunol; euginol	7.2	2.3
11	Geranyl formate	4.2	2.5
12	Trans-ocinene	1.8	-



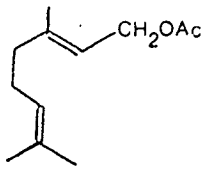
Citronellal, D-



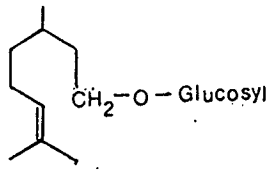
Geraniol



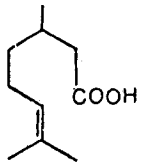
Citronellol (+)-B-



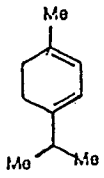
Geraniol acetate



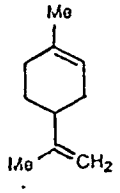
Citronellol glucoside



Citronellic acid



α-Terpinene



Limonnene

<u>ภาพที่ 5</u> สูตรโครงสร้างทางเคมีบางชนิดที่สำคัญของสารที่มีในสารสกัดจากตะไคร้หอม (Devon and Scott, 1972; Tong and Eisenbrand, 1992)

ภาพที่ 6 รูปร่างลักษณะตะไคร้หอม (*Cymbopogon winterianus* Jewitti)

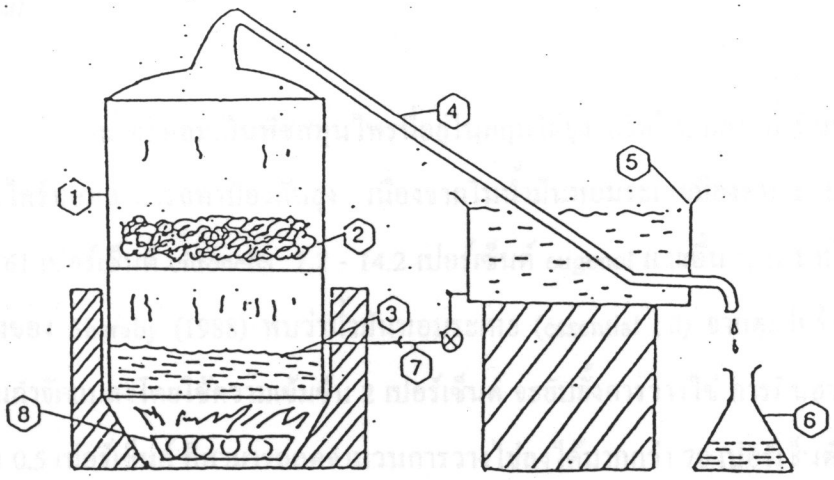
ความหลากหลายขององค์ประกอบทางเคมีของตะไคร้หอมทั้งสองพันธุ์ ทำให้เกิดความแตกต่างกันในการนำไปใช้ประโยชน์ เช่น พันธุ์ลังกา นำไปทำ น้ำหอม สบู่ น้ำยาดับกลิ่น น้ำยาพ่นหอม น้ำยาทำความสะอาด สำหรับน้ำมันจากพันธุ์ชวาซึ่งมีปริมาณของ citronellal มาก จึงสกัดเอา citronellal และอนุพันธ์ของ citronellal ตัวอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ เช่น citronellol, citronellol ester, hydroxy citronellal หรือเปลี่ยนเป็น menthol โดยการสังเคราะห์ขึ้นมาจาก citronellal ก็ได้ (วินัย, 2540) ปริมาณและคุณภาพของน้ำมันหอม ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น อุณหภูมิ ปริมาณน้ำฝน การเก็บเกี่ยว ตลอดจนเทคนิคและวิธีการสกัด (ช่อผกา, 2539)

พรรณีกา และคณะ (2538) ทดลองสกัดน้ำมันจากตะไคร้หอม 4 วิธี พบว่าวิธีการสกัดโดยใช้ไอน้ำและแช่น้ำร้อนมีปริมาณ geraniol ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 2) แต่เนื่องจากวิธีการต้ม สาร β-citronellol และ citronellal จะถูกความร้อนเชิงปฏิกิริยาเปลี่ยนรูปมาเป็น geraniol ทำให้พบส่วนสกัดมีปริมาณ geraniol สูง ส่วนของตะไคร้หอมที่นำมาสกัด ได้แก่ ส่วนที่เป็นสีเขียวพ้นจากลำต้น

ตารางที่ 2 ผลการสกัดตะไคร้หอมโดยวิธีการต่าง ๆ ที่ความชื้น 62.5 เปอร์เซ็นต์ (พรรณีกา และคณะ, 2538)

วิธีการ	Citronellal เปอร์เซ็นต์	Citronellol เปอร์เซ็นต์	Geraniol เปอร์เซ็นต์	Total เปอร์เซ็นต์
1. ใช้ไอน้ำ	10.35	5.16	17.26	32.8
2. กลั่นหมุนเวียน (ตัวทำละลาย)	0.07	0.06	0.20	0.33
3. แช่น้ำเย็น	-	0.59	1.22	1.81
4. แช่น้ำร้อน	0.75	1.57	28.81	31.1

นอกจากนี้ยังสามารถใช้กรรสกัดด้วยไขมันเย็น การสกัดด้วยไขมันร้อน การสกัดด้วยตัวทำละลายระเหยง่าย (solvent extraction) และการสกัดโดยการบีบหรืออัด (ช่อผกา, 2539) ตะไคร้หอมมีสารออกฤทธิ์อยู่ในส่วนที่เป็นน้ำมัน จึงได้ใช้วิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ (water steam distillation) (อมรา และสำรวย, 2539) จากการทดลองพบว่าการกลั่นน้ำมันตะไคร้หอมควรใช้ใบตะไคร้สดที่เก็บในตอนเช้านำมาตากให้แห้ง 1 แดด (6 ชั่วโมง) จะช่วยให้ใช้เวลาการสกัดลดลง (ขวัญชัย และคณะ, 2523) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยได้ศึกษาการสกัดสารจากตะไคร้หอมอย่างง่าย รวมทั้งได้ทำการผลิตเครื่องกลั่นน้ำมันจากตะไคร้หอม ดังภาพที่ 7



1. หม้อที่ดัดแปลงจากหม้อต้มน้ำสำหรับทำก๋วยเตี๋ยว ภายในมีชั้นตะแกรงเพื่อใส่ตัวอย่างที่จะกลั่นน้ำมัน
2. ชั้นสำหรับใส่ตัวอย่าง เป็นตะแกรงชนิดที่ตาค่อนข้างถี่
3. น้ำที่ใช้สำหรับต้มให้กลายเป็นไอ
4. ท่อนำไอน้ำและน้ำมัน
5. อ่างน้ำเย็นสำหรับให้ไอน้ำกลั่นตัว
6. ภาชนะสำหรับรองรับการกลั่น
7. ท่อที่นำน้ำเย็นมาใส่หม้อต้ม
8. เตาแกส

ภาพที่ 7 แสดงเครื่องกลั่นน้ำมันตะไคร้อย่างง่ายโดยดัดแปลงจากหม้อต้มก๋วยเตี๋ยว ออกแบบฝาให้มีท่อไอน้ำออกมากลั่นตัวภายนอก (ขวัญชัย และคณะ, 2523)

ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากตะไคร้หอม (efficiency of lemon grass extracts)

ตะไคร้หอมเป็นพืชสมุนไพรที่อยู่ในกลุ่มไล่ยุง หรือไล่แมลง น้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากตะไคร้หอมสามารถทาป้องกันยุง เนื่องจากในน้ำมันหอมระเหยมีองค์ประกอบของ geraniol 57.6 - 61 เปอร์เซ็นต์ citronella 7.7 - 14.2 เปอร์เซ็นต์ eugenol และอื่น ๆ (สุนทรี, 2536) จากการทดลองของ Sharaby (1988) พบว่าน้ำมันหอมระเหย (essential oil) จากตะไคร้หอม มีคุณสมบัติป้องกันกำจัดแมลงโดยใช้ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จะยับยั้งการวางไข่ การกินอาหาร หรือที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ก็สามารถลดจำนวนการวางไข่ลงได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และมีคุณสมบัติของสารฆ่าแมลงอยู่ด้วย ซึ่งมีการทดลองพบว่าสารสกัดจากตะไคร้หอมทำให้ปริมาณไข่และหนอนเจาะสมอฝ้ายลดลง (อมรา และสำรวย, 2539) จากการทดลองในสภาพไร่ ได้ปลูกตะไคร้หอมในแปลงฝ้าย พบว่าหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Heliothis ormigera*) มีปริมาณน้อยกว่าแปลงปลูกฝ้ายปกติ (ครรชิต และคณะ, 2534) และมีการนำมาใช้ประโยชน์ ทางการเกษตรโดยการใช้ใบตะไคร้หอมสดที่แก่จัดผสมข่าสด และใบสะเดาสดบดให้ละเอียดในอัตราส่วน 4:4:4 แช่น้ำ 2 ปี๊บ แล้วหมัก 1 คืน จากนั้นกรองเอาน้ำใช้เป็นหัวเชื้อฉีดกำจัดแมลงในพืชผักและข้าว (อรนุช, 2530 และ สุนทรี, 2536) ยังมีการนำน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมมาใช้ป้องกันกำจัดแมลงในโรงเก็บเมล็ดธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด เป็นต้น โดยนำเมล็ดธัญพืชเหล่านั้นมารมควันด้วยน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากตะไคร้หอม สามารถป้องกันมอดข้าวได้ และน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากตะไคร้หอมยังทำให้ประชากรของ *Sitopphilus oryzae* ลดลง 35.69 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Singh *et. al.*, 1989)

นอกจากนี้ Onawanmi (1989) รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราหลายชนิด เช่น *Aspergillus flavas, A. fumigatus, Microsporum gypseum* and

Trichophyton metnagraphysis Saweelan (1989) พบว่าสาร geraniol มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. flavas* and *A. fumigatus* และการงอกของสปอร์ (Reghavaiah and Jayaramaiah, 1987) และฤทธิ์ความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม ไม่มีพิษต่อยีนส์ (genotoxic) เมื่อทดสอบกับหนูขาวใหญ่ (Torre *et. al.*, 1989)

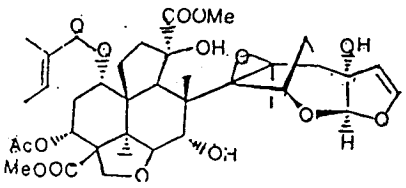
สะเดา (neem)

สะเดาเป็นพืชที่ขึ้นในเขตร้อน จัดอยู่ในวงศ์ Meliaceae มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในประเทศอินเดีย สะเดาที่พบในบ้านเราส่วนมากเป็นสะเดาไทย *Azadirachta indica var. siamensis* Valcton สะเดาอินเดีย *Azadirachta indica* A. Juss และสะเดาช้าง *Azadirachta excellsa* Jac. (งามผ่อง, 2537) สะเดาไทยมีลักษณะลำต้นสั้น เรือนยอดแผ่กว้างเป็นพุ่มหนากว่าสะเดาอินเดีย เปลือกไม้สีน้ำตาลแดง แตกเป็นร่องลึก ใบมีสีเขียวเข้มเป็นมัน ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อยทู่ โคนใบเบี้ยวแต่กว้าง ฐานใบเยื้องกันเล็กน้อย ดอกสีขาวมีกลิ่นเล็กน้อย จะออกดอกในเดือนธันวาคม - มกราคม ผลรูปกลมรี (ทิพย์พรรณ, 2536) เมล็ดสะเดาที่จะนำมาสกัดนั้นจะต้องเป็นเมล็ดจากผลสุกที่แยกเอาเนื้อออก (กองกีฏและสัตววิทยา, 2539) การใช้สารสกัดจากสะเดาในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชนั้นมีวิธีการสกัดหลายอย่าง ได้แก่ การใช้เทคนิคทางเคมีและเครื่องมือเฉพาะ เช่น ใช้เครื่องสกัดชนิด soxhlet extractor การปั่นหรือคนการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด (Feuerhake, 1983 and Pimsamarn *et. al.*, 1991) และนอกจากนี้ยังสกัดสารได้โดยนำเมล็ดสะเดาแห้งมาบดให้ละเอียด แล้วนำมาหมักแช่ใน น้ำอัตราส่วน 1:20 โดยน้ำหนัก แล้วกรองเอากากออก นำน้ำที่กรองได้ไปฉีดพ่นฆ่าแมลง (สุรพล, 2528) และมีการนำเอาเมล็ดสะเดาบดมาหมักแช่น้ำ รวมกับตะไคร้หอมบด และข่าสดบดละเอียด ในอัตรา 1:1:1 กิโลกรัม แช่ทิ้งไว้ 1 คืน กรองเอาน้ำไปฉีดพ่นฆ่าแมลง ซึ่งจะฉีดพ่นเวลาเย็น (เชาว์, 2537)

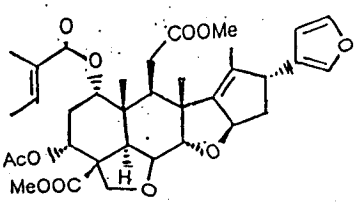
สารละลายที่ได้นี้ จะมีสารประกอบอยู่หลายชนิดที่ละลายน้ำออกมา สารประกอบเหล่านี้มีทั้งสารที่ออกฤทธิ์กำจัดแมลงและที่ไม่มีฤทธิ์กำจัดแมลง จึงต้องใช้สารสกัดเป็นปริมาณมากในการฉีดพ่น ประกอบกับสารที่สกัดได้ไม่สามารถเก็บไว้ได้นาน จึงไม่สะดวกต่อการนำไปใช้ ดังนั้นจึงมีการสกัดสารจากสะเดาให้ได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพ ในการป้องกันกำจัดแมลงสูงกว่าสารสกัดที่ได้จากสกัดด้วยน้ำ โดยการใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เช่น เอธานอล (ethanol) เฮกเซน (hexane) อะซิโตน (acetone) ปิโตรเลียม- อีเธอร์ (petroleum ether) เป็นต้น (ถาวร, 2534) สารสกัดจากเมล็ดสะเดาที่สกัดด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเธอร์ จะมีฤทธิ์ฆ่าแมลง (เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล, หนอนกระทู้หอม) ได้สูงกว่า สารละลายที่ได้จากการนำเมล็ดสะเดามาหมักแช่น้ำ (สุรพล, 2534) จากการทดลองของ Chavan (1983) พบว่าเมื่อนำใบสะเดาแห้งบดละเอียดแล้วสกัดด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเธอร์ อีเธอร์ เอธานอล และคลอโรฟอร์ม โดยสกัดด้วยเครื่อง soxhlet extractor แล้วนำสารที่สกัดได้มาใช้ฆ่ายุง และตัวอ่อนของยุง ได้ผลสอดคล้องกับวิธีการขององค์การอนามัยโลกที่ใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ ของสารสกัดจากใบสะเดาที่สกัดด้วยตัวทำลายปิโตรเลียมอีเธอร์ และอีเธอร์ มีฤทธิ์ฆ่าตัวอ่อนยุง 100 เปอร์เซ็นต์ ใน 24 ชั่งโมง และ 50 - 60 เปอร์เซ็นต์ หลังจาก 144 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังได้มีการทดลองผสมตัวทำละลาย (azeotropic mixture; AZT) เช่น methyl tertiary-butyl ether ผสมกับเมธานอล ทำให้ได้สารสกัดที่มีทั้งความบริสุทธิ์ และได้สารอะซาดิแรคตินมากที่สุด (Feuernake, 1983) เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารจากเมล็ดสะเดา เพื่อใช้คุมกำเนิดของแมลง ซึ่งใช้วิธีการสกัด 3 แบบ คือ สกัดด้วยวิธีกล (mechanic extraction) โดยใช้เครื่องบีบ การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) ด้วยการใช้เฮกเซน และการสกัดด้วย column fraction แล้วนำสารสกัดจากวิธีทั้ง 3 ไปทดสอบกับแมลง พบว่าสารสกัดจากเฮกเซน มีความเหมาะสมในการคุมกำเนิดที่สุด (Gorg *et. al.*, 1994) สารที่เป็นตัวทำละลายที่นำมาใช้สกัดสารนั้นมักเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีขั้วและไม่มีขั้ว เพื่อที่จะให้ได้สารออกฤทธิ์มากที่สุด แล้วนำสารที่สกัดได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยขบวนการ liquid-liquid extraction ก็จะทำให้ได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูง (อัญชลี, 2539) เมื่อนำสารสกัดมาวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์จากเมล็ดสะเดา ด้วยวิธี high performance liquid

chromatography (HPLC) สารที่ออกฤทธิ์ คือ อะซาดิแรคติน (Schneider and Ermel, 1987) และได้ใช้ thin-layer chromatography แบบ 2 ทิศทาง วิเคราะห์ แยกสารประกอบในสารสกัดจากใบสะเดา พบว่าประกอบด้วย violaxanthin, butein, β-carotene, zeaxanthin, antheroxanthin, cryptoxanthin and neoxanthin และยังพบสารประกอบ epoxy 7 ชนิด flavanol 6 ชนิด (Tirimanna, 1983)

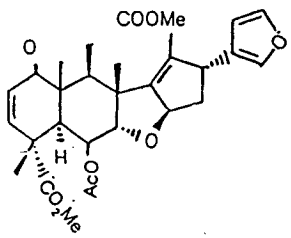
สารออกฤทธิ์ของสะเดานั้นเป็นสารเคมีธรรมชาติซึ่งเป็นสารประกอบที่มีพิษ มีหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ สารกลุ่มลิโมนอยด์ (tetra-and penta nortriterpenoids) ปนกันอยู่หลายชนิด เช่น สารอะซาดิแรคติน (Zanno *et. al.*, 1975; Uebel *et. al.*, 1979; Rembold *et. al.*, 1980) นิมบิดิน นิมบิน เป็นต้น (Schmutterer, 1990) มีอยู่ในทุกส่วนของต้นสะเดา (Rembold *et. Al.*, 1980) แต่จะมีมากในเมล็ด (เกรียงไกร, 2540) ในเมล็ดสะเดามีสารอินทรีย์อยู่มากที่สุด 35 ชนิด (งามผ่อง, 2537) จากการศึกษาชนิดและปริมาณอะซาดิแรคตินของ Rembold and Puhlmann, 1995 พบว่าในเมล็ดสะเดาอินเดียมีสารอะซาดิแรคตินถึง 13 ไอโซเมอร์ คือ อะซาดิแรคตินชนิด A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L and M ซึ่ง อะซาดิแรคติน A มีปริมาณมากที่สุดถึง 85 เปอร์เซ็นต์ สารอะซาดิแรคตินจะสลายอย่างรวดเร็วเมื่อถูกแสงอัลตร้าไวโอเล็ตแต่เมทาบอไลต์ที่ได้ยังคงมีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดแมลง (Barnby *et. al.*, 1989) ซึ่งสารประกอบ limonoids มีสูตร โครงสร้างดังนี้



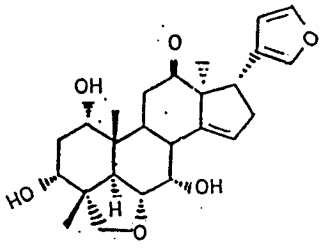
Azadirachtin



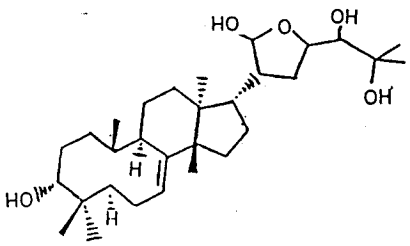
Salannin



Nimbin



Nimbidin



Metantriol

<u>ภาพที่ 8</u> สูตรโครงสร้างของสารประกอบ limonoids ชนิดต่าง ๆ ที่พบในสะเดา

(Rembold *et. al.*, 1980, Schmutterer, 1990)

ภาพที่ 9 ลักษณะผลสะเดา และเมล็ดสะเดาบด

ภาพที่ 10 ลักษณะต้นสะเดา (*Azadirachta indica var. siamensis* Valeton)

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากสะเดา (efficiency of neem extracts) ไม่ได้ออกฤทธิ์เร็วเหมือนสารฆ่าแมลง ต้องใช้ระยะเวลาพอสมควรจึงจะเห็นผล (ชัยพัฒน์, 2539) ที่สำคัญคือสะเดาไม่ได้ออกฤทธิ์โดยการสัมผัส แต่จะออกฤทธิ์เมื่อแมลงกินพืชอาหารที่มีสารออกฤทธิ์เข้าไป และจะค่อย ๆ แสดงอาการตามกลไกการออกฤทธิ์ ทำให้แมลงตายในที่สุด

ในเมล็ดสะเดามีน้ำมันอยู่ประมาณ 40-45 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันสะเดามีสีเหลืองอ่อน มีรสขมและมีกลิ่นเหม็น กากเมล็ดสะเดาที่คั้นเอาน้ำมันออกแล้วเมื่อใส่ในนาข้าวสามารถป้องกันกำจัดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* Stal) ได้ด้วย (Saxena and Rambold, 1983) การใช้เมล็ดหรือใบสะเดาป่นผสมหรือคลุกเคล้าเมล็ดพืชเพื่อป้องกันการทำลายของแมลงศัตรูภายหลังการเก็บเกี่ยว ใช้ได้ผลดีสามารถป้องกันการทำลายจากแมลงศัตรูของเมล็ดธัญพืชในโรงเก็บหลายชนิด (Jilani and Saxena, 1990) การใช้สารสกัดจากสะเดาที่มีประสิทธิภาพต่ำ ทำให้ต้องใช้สารสกัดสะเดาปริมาณมาก (เทวินทร์ และคณะ, 2539) อาจมีผลกระทบต่อพืชทำให้เกิด phytotoxic ได้ (ศรีสุดา, 2539)

Verkerk and Wright (1993) ศึกษาพบว่าสารออกฤทธิ์ในสะเดามีผลต่อแมลงในหลายลักษณะ ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของอะซาดิแรคตินเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดการแสดงผลออกมา เมื่อได้รับสาร เช่น ขับยั้งการกินอาหาร (Schmutterer, 1990) โดยอะซาดิแรคตินจะไปยับยั้งการทำงานของเซลล์ประสาทที่ส่งสัญญาณกระตุ้นให้กินอาหาร (Blaney, 1980, 198, Siminord and Blaney, 1983) อะซาดิแรคตินจะไปจับที่ receptor อย่างน้อย 1 receptor (Schoonhoven and Jermy, 1977) ซึ่งต้องใช้สารในความเข้มข้นที่สูง และการแสดงผลดังกล่าวเกิดจากการได้รับสารโดยการสัมผัส (Verkerk and Wright, 1993) Azadirachtin A, B, C และ D มีฤทธิ์คล้ายคลึงกันในด้านการควบคุมการเจริญเติบโต (Mesisner *et. al.*, 1981) จากการทดลองของ Schmutterer and Rembold, 1980, Rice, 1987 พบว่ามีผลขัดขวางการเจริญเติบโต และ Osman (1993) พบว่าการแสดงผลดัง

กล่าวการยังขึ้นอยู่กับระยะที่แมลงได้รับสาร เช่น การยับยั้งการลอกคราบ หรือทำให้การลอกคราบเกิดขึ้นช้ากว่าปกติ (Rembold *et. al.*, 1983) เนื่องจากไปรบกวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนในการลอกคราบ (Marco *et. al.*, 1990) หรือ อะซาดิแรคตินไปทำหน้าที่แทนฮอร์โมนในการลอกคราบ เนื่องจากมีโครงสร้างโมเลกุลที่คล้ายกัน (Rembold, 1989) และยับยั้งหรือรบกวนการพัฒนาของไข่ ในเพศเมียโตเต็มวัยที่ให้กินสารสกัดจากสะเดา หรือได้รับการฉีดสารสกัดจากสะเดา (Rembold and Sieber, 1981, Osman, 1993) และ สารสกัดสะเดายังมีผลต่อการเรียงตัวของไข่ และพฤติกรรมการวางไข่ ของ *Heliothis armigera* เพศเมีย (Joshi *et. al.*, 1978 ,Saxena and Remblod, 1983) และสารสกัดจากสะเดามีประสิทธิภาพในการเป็นสารฆ่า และสารไล่ (งามผ่อง, 2537) ใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 6.25 ppm ทำให้ตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ใน 7 วัน (เกรียงไกร และคณะ, 2540)

ปัญหาการใช้สารสกัดสะเดาที่มักพบคือ ความเข้มข้นที่เหมาะสม และจำนวนครั้งที่ใช้ที่มีผลในการป้องกันกำจัดแมลงแต่ละชนิด และความเป็นพิษของสารสกัดสะเดาที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชที่ปลูก (อารมณ์, 2537) ตลอดจนการคงสภาพของสารสกัด นอกจากนี้ ในต่างประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย เยอรมัน ญี่ปุ่น ประชาชนในประเทศเหล่านี้ ให้ความเชื่อมั่น ในสารสกัดจากสะเดาสูงมากโดยเชื่อว่า การใช้สารดังกล่าวไปเป็นระยะเวลาหนึ่ง สภาพนิเวศน์วิทยาดั้งเดิมในสภาพธรรมชาติ จะเกิดขึ้นมาอีกครั้งหนึ่ง (ecosystem regeneration) และระบบที่เกิดขึ้นใหม่จะคงทนถาวรกว่าระบบที่มีมาแต่เดิม ครั้งยังไม่ถูกทำลาย (สุรพล, 2536) สารสกัดจากพืชเป็นสาร allelochemicals (Visetson, 1991) ที่มีผลต่อการปรับตัวของแมลง เมื่อแมลงได้รับสารสกัดจากพืชเข้าไปในปริมาณที่เหมาะสม แมลงจะมีการเปลี่ยนแปลงการสร้างเอนไซม์ขจัดพิษ เช่น esterase, glutathion S-transferase เมื่อต่อต้านหรือทำลายสารแปลกปลอมดังกล่าวเพื่อการอยู่รอด (Yu, 1983, 1984) ทำให้คาดการณ์ได้ว่าแมลงอาจจะมีแนวโน้มในการสร้างความต้านทานต่อสารสกัดจากพืช

กลไกการปกป้องและทำลายพิษของแมลง

สิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับสารพิษจากสภาพแวดล้อม จะมีกลไกตอบสนองต่อสารพิษที่ได้รับ ส่วนโครงสร้างภายนอกของแมลง ที่เคลือบผิวของชั้น chitin เป็นบริเวณที่ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้สารฆ่าแมลงผ่านเข้าไปในตัวแมลง จะลดอัตราการผ่านเข้าของสาร (Yu and Nguyen, 1992) นอกจากนี้ชั้นซีเมนต์อาจจะทำหน้าที่ในการป้องกันการแทรกซึมสารฆ่าแมลง ซึ่งอยู่ในรูปของสารที่ละลายน้ำทำให้สามารถเคลื่อนที่ผ่านได้ แต่อัตราความแน่นอนในการเคลื่อนที่ของสาร ขึ้นอยู่กับตัวแปรหลายอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งความหนาของชั้นไคตินอัตราการแทรกซึมยังเปลี่ยนแปลงไปตามตำแหน่งการเข้าของสารฆ่าแมลง เช่น บริเวณระหว่างปล้อง หรือที่คลุมอยู่บนขนเกี่ยวกับการรับความรู้สึกจะต่อต้านการซึมผ่านของสารได้น้อยกว่า (อนันต์, 2540)

วิธีทางกายภาพที่ช่วยลดสภาพให้ซึมได้ของไคตินทำได้โดยการเพิ่มความหนาของเคลือบผิว การเพิ่มพื้นที่ผิวส่วนที่เป็นสีน้ำตาล หรือการดัดแปลงส่วนประกอบของเคลือบผิว นอกจากนี้การเปลี่ยนความเป็นกรดและด่างในท่ออาหารจะเป็นผลให้ ลดปริมาณตัวละลายและอัตราการดูดซึมของสารฆ่าแมลงอีกด้วย แมลงบางชนิดสามารถเพิ่มปริมาณการสะสมไขมัน เนื่องจากสารฆ่าแมลงส่วนใหญ่จะละลายได้ในไขมัน และมีการสะสมในเนื้อเยื่อที่เป็นไขมัน ซึ่งจะไม่มีผลต่อแมลง (อนันต์, 2540)

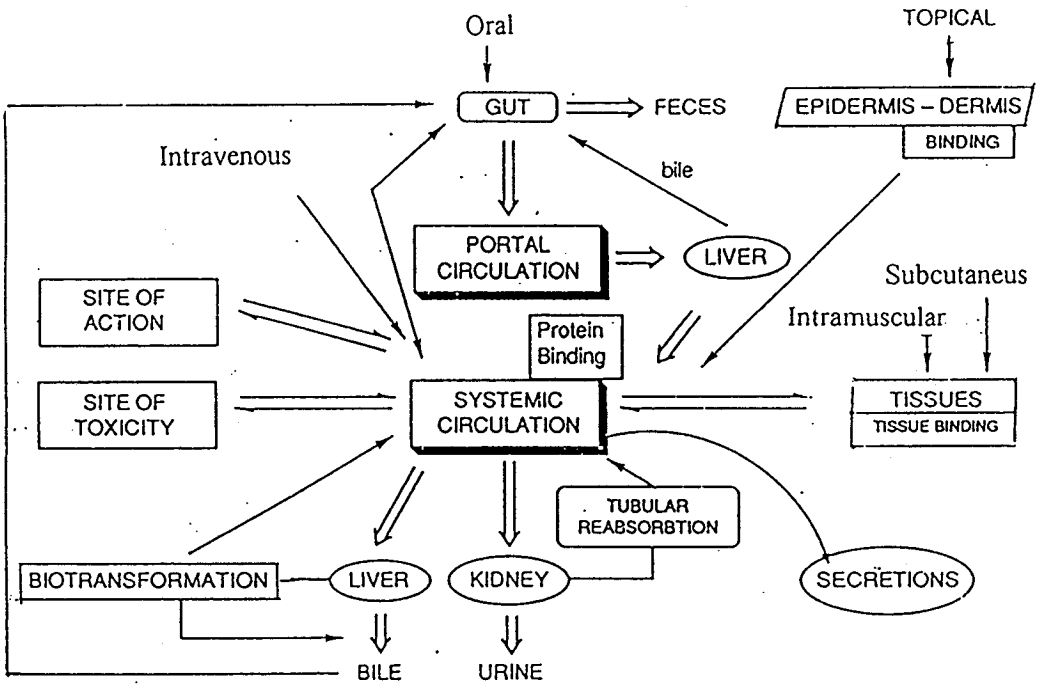
วิธีหนึ่งที่สำคัญที่สุด ที่แมลงใช้ในการทำลายและกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย ได้แก่ การเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ทำลายพิษ เพื่อกำจัดหรือลดความเป็นพิษ (อนันต์, 2540) สารพิษต่าง ๆ ที่อยู่ใน สภาพแวดล้อม รวมทั้งสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาใช้ในชีวิตประจำวัน ได้แก่ อาหาร ยา เครื่องสำอางค์ สารเหล่านี้ถ้าเข้าไปในร่างกายทางใดก็ตามจะกลายไปเป็นสารตั้งต้น (substrate)ของเอนไซม์ต่าง ๆ ในร่างกาย สารตั้งต้นบางชนิดเป็นสารยับยั้ง บางชนิดเป็นสารเหนี่ยวนำในการทำงานของเอนไซม์ (Ernest, 1994) ปฏิกิริยาต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิตมักต้องมีเอนไซม์

เป็นตัวเร่ง ทำให้สารตั้งต้นถูกเปลี่ยนแปลงรูปไป คุณสมบัติของเอนไซม์แต่ละชนิด รวมทั้งวิธีการทำงานมีปัจจัยต่าง ๆ ควบคุมอยู่ด้วย ตัวอย่างเช่น ความเป็นกรดและด่าง อุณหภูมิ และลักษณะอื่น ๆในสภาวะที่เฉพาะต่อการทำงานของเอนไซม์ (Visetson, 1991) อัตราการสังเคราะห์เอนไซม์ ถูกกำหนดโดยการถ่ายทอดจากยีนส์ (transcription) ซึ่งอาจเกิดจากการกระตุ้นของสารแปลกปลอมที่ร่างกายไม่ได้สร้างขึ้นจะทำให้ mRNA นั้นเกิดการแปรระหัส (translation) และการสังเคราะห์โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะมากขึ้น (Ernest and Patricia, 1994) เอนไซม์ที่ถูกสร้างใหม่นี้จะทำงานได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง เช่น เอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นใหม่นี้จะไปเร่งการดึงคลอรีน(dechlorinate) ออกจากสารประกอบดีดีที (DDT) และก่อเกิดเป็นอนุพันธ์ของไดคลอโรเอทิลีน (dichloro ethylene derivative) คือ ดีดีอี (DDE) ซึ่งจะมีพิษน้อยกว่าดีดีที แมลงบางชนิดเปลี่ยนดีดีที ไปเป็นสารอื่นที่มีพิษน้อยกว่า เช่น ดีดีเอ (DDA) เป็นอนุพันธ์ของกรดอะซีติก และดีดีดี (DDD) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ ไดคลอโรอีเทน (dichloroethane derivative) ส่งผลให้แมลงมีความต้านทานต่อดีดีที (อนันต์, 2540)

ระบบเอนไซม์ทำลายพิษ (detoxification enzyme system) มีลักษณะการทำงานเช่นเดียวกับเอนไซม์ทั่วไป เมื่อมีสารแปลกปลอมจากภายนอกเข้าไปในเซลล์ เอนไซม์เหล่านี้จะเข้าไปเป็นตัวเร่งให้สารเหล่านั้นมีความสามารถในการละลายน้ำเพิ่มขึ้น หรือทำให้สารดังกล่าวเป็นสารที่มีขั้ว (electrophillic) เพื่อที่จะสามารถกำจัดออกจากร่างกาย ผ่านระบบขับถ่ายต่าง ๆ ได้มากขึ้น ดังนั้นเอนไซม์ดังกล่าวจึงต้องมีความพร้อมที่จะทำงานอย่างสมบูรณ์ทุกเมื่อ ซึ่งควรจะมีคุณสมบัติ คือ จะอยู่ ภายในอวัยวะที่มักจะได้รับสารแปลกปลอมอยู่เสมอ เช่น ตับ ปอด ลำไส้ ของสัตว์มีกระดูกสันหลังในเซลล์ไขมัน และในลำไส้ของพวกแมลง นอกจากนี้เอนไซม์นี้สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารแปลกปลอม ซึ่งจะต้องทำให้สารดังกล่าวนั้นหมดความเป็นพิษ หรือเป็นพิษน้อยลงแล้วขับออกจากเซลล์ได้โดยง่าย และสามารถควบคุมระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ และถูกชักนำให้เกิดได้รวดเร็ว ในกรณีที่ร่างกายได้รับสารแปลกปลอม (Schoknechy and Otto, 1989)

กระบวนการทำลายพิษที่เกิดจากการใช้เอนไซม์นี้ มีทั้งสารเคมีสังเคราะห์ขึ้นมา และสารพิษจากธรรมชาติ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารพิษที่ได้จากพืช เช่น เทอร์ฟีน (terpene) อัลคาลอยด์ (alkaloid) และ methylenodioxyphenyl compound ซึ่งสารเหล่านี้จะเป็นสารกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ (Dauterman and Hodgson, 1978)

กระบวนการซึมผ่านของสาร และการเมตาโบลิซึม โดยระบบเอนไซม์ทำลายพิษ (penetration and metabolism of xenobiotic in organism) ของสารประกอบเคมี จากสภาพแวดล้อมเข้าสู่ร่างกาย ก่อนที่สารเคมีนั้นไปออกฤทธิ์ที่เนื้อเยื่อเป้าหมาย ในกรณีที่สารพิษผ่านช่องทางเดินอาหาร (gastro intestinal tract) จะผ่านจากช่องปาก หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ช่องภายในลำไส้เล็ก และเข้าสู่เซลล์บุผิวผนังลำไส้ เข้าสู่ภายในเซลล์บุผิว ผ่าน basement membrane และ lamina propria เข้าสู่เส้นเลือดฝอย และท่อน้ำเหลืองขนาดเล็กไปยังตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ ที่ตำแหน่งนั้นสารพิษจะซึมผ่านจากเส้นเลือดฝอยเข้าสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์ และผ่านมายังตำแหน่งออกฤทธิ์บนผนังเซลล์ต่าง ๆ ในที่สุด ซึ่งที่เยื่อหุ้มเซลล์สามารถผ่านเข้าเซลล์หรือจับกับ receptor ที่มีอยู่ในระบบชีวภาพ (Riviere, 1994) ลำดับขั้นตอนการเกิดพิษของสารฆ่าแมลงในร่างกาย แสดงดังภาพที่ 11 เริ่มจากการที่สารฆ่าแมลงทำปฏิกิริยากับชีวสารเป้าหมาย เช่น เอนไซม์ สารสื่อประสาท (neurotransmitter) โปรตีน หรือ ลิปิดบางพวก ซึ่งมีความสำคัญในการดำรงค์ชีวิต



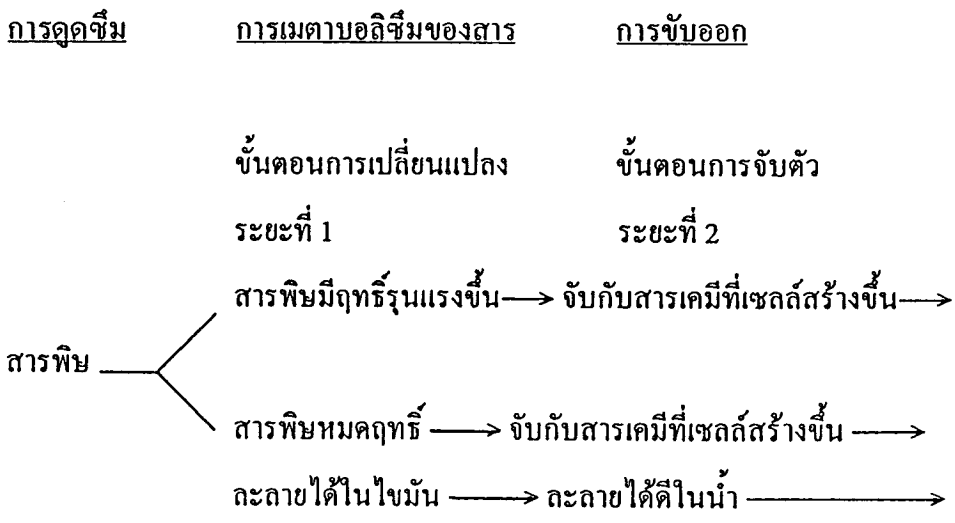
ภาพที่ 11 แสดงทิศทางขั้นตอนการแพร่กระจายของสารพิษในร่างกาย โดยทาง intravenous, intramuscular, subcutaneus, oral, and topical (J.E. Rivere, 1994)

สารแปลกปลอมต่างๆที่เข้าสู่ร่างกายได้ส่วนใหญ่เป็นสารที่ละลายในไขมัน (lipophilic) โดยจะละลายในชั้นลิปิด (lipid) ของผนังเซลล์ (membrane) ได้ดีเมื่อสารแปลกปลอมเข้าสู่ภายในร่างกาย แล้ว lipoprotein จะเป็นตัวนำสารแปลกปลอมผ่านไปตามของเหลวในร่างกาย แล้วจะทำปฏิกิริยากับ nonspecific enzyme ที่ร่างกายสร้างขึ้น การเข้าทำปฏิกิริยาแบ่งได้ 2 ระยะ คือ ปฏิกิริยาระยะที่ 1 และ ปฏิกิริยาระยะที่ 2 (Ernest and Patricia, 1994)

ปฏิกิริยา ระยะที่ 1 : เอนไซม์จะเกี่ยวข้องในปฏิกิริยา โดยทำให้โมเลกุลของสารพิษหรือสารฆ่าแมลงนั้น มีการแตกตัวเป็นสารที่มีขั้ว และละลายน้ำได้ ปฏิกิริยาที่สำคัญที่เกิดขึ้นในระยะที่ 1 นี้ ได้แก่ oxidation, reduction และ hydrolysis เอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาในระยะนี้ ได้แก่ monooxygenase และ esterase และที่สำคัญที่สุดคือ ทำให้สารแปลกปลอมเหล่านี้เป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาระยะที่ 2

ปฏิกิริยา ระยะที่ 2 : จะเกิดปฏิกิริยาที่เรียกว่า "ปฏิกิริยาการรวมตัว" (conjugation reaction) โดยกลุ่มที่ทำปฏิกิริยา (function group) กับผลผลิต (product) ที่ได้จากปฏิกิริยาในระยะที่ 1 จะต้องมีการรวมตัวกับสารที่ละลายน้ำได้สูง และมีขนาดโมเลกุลเล็ก เช่น glucose และ amino acids เพื่อให้ได้ผลผลิตสุดท้ายที่สามารถขับออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในระยะที่ 2 นี้คือ glutathion S-transferase

ปฏิกิริยาทั้ง 2 ระยะในระบบการทำลายพิษสามารถสรุปการทำงานได้ดังไดอะแกรมข้างล่างนี้



"ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารพิษในเซลล์ (ชัยวัฒน์ และคณะ, 2539)

เมตาบอลิซึม ของปฏิกิริยาระยะที่ 1

ปฏิกิริยาในระยะที่ 1 มีหลายชนิดด้วยกัน ดูได้จากตารางที่ 3 ตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยา oxidation นี้ กระทำโดยระบบ mixed-function oxidase ของ microsomal (cytochrome P450)

ตารางที่ 3 แสดงการจำแนกปฏิกิริยาในระยะที่ 1

Oxidation involving cytochrome P450
Oxidation – others
Reduction
Hydrolysis
Hydration
Isomerisation
Miscellaneous

ที่มา : Gibson and Skett, 1994

เมตาบอลิซึมของปฏิกิริยาระยะที่ 2

ปฏิกิริยา ในระยะที่ 2 หรือปฏิกิริยา conjugation พบว่าปฏิกิริยานี้เกี่ยวข้องกับกลุ่มที่เปลี่ยนแปลงไปของ enzyme นำไปสู่ผลผลิตที่ละลายน้ำได้ ซึ่งถูกกำจัดออกอยู่ในน้ำดีหรือปัสสาวะ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงปฏิกิริยาเอนไซม์และfunctional groupที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา conjugation ในระยะที่ 2

Reaction	Enzyme	Functional group
Glucuronidation	UDP-Glucuronyltransferase	-OH
		-COOH
		$-NH_2$
		-SH
Glycosidation	UDP-Glycosyltransferase	-OH
		-COOH
		-SH
Actylation	Acetyltransferase	$-NH_2$
		-OH
		$-SO_2NH_2$
Methylation	Methyltransferase	-OH
		$-NH_2$
		-SH
Sulfation	Sulfotransferase	$-NH_2$
		-OH

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Reaction	Enzyme	Function group
Amino acid conjugation	Acytransferase	-COOH
Glutation conjugation	Glutathion S-transferase	Epoxide
		Organic halide
Lipophilic conjugation		-OH
Condensation		-Various

ที่มา : Gibson and Skett (1994)

ปฏิกิริยาระยะที่ 2 ส่วนใหญ่จะเป็นคอนจูเกชั่นโปรดัก (conjucation products) ซึ่งในปฏิกิริยานี้จะแบ่งออกได้เป็นกลไกย่อย 3 กลไก

ชนิดที่ 1 Xenobiotic + actived conjugating agent ⟶ conjugated product

จะเป็นการเกิด conjugation กับ high-energy หรือ active intermediate

ชนิดที่ 2 Activated xenobiotic + amino acid ⟶ conjugated product

จะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความเป็นพิษ (activation) ของสารพิษซึ่งผลที่ได้จะเป็น active xenobiotic ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับ endogenous receptor ต่อไป

ชนิดที่ 3 Reactive xenobiotic + conjugating agent ——→ conjugated product

สาร xenobiotic ที่มีความ active จากการถูก metabolite จะเข้าทำปฏิกิริยากับกลุ่มของ endogenous conjugating agent โดยไม่มีการเกิด high-energyintermidiate (Dauterman, 1994)

สารเสริมฤทธิ์ในสารสกัดสะเดาและตะไคร้หอม

สารเสริมฤทธิ์เป็นสารซึ่งไม่มีฤทธิ์ในตัวของสารเอง แต่จะมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อผสมกับสารฆ่าแมลง (Wilkinson, 1976) สารเสริมฤทธิ์ จะยับยั้ง เอนไซม์ ทำให้ไม่ทำงานในขณะที่ทำปฏิกิริยากับสารฆ่าแมลง ในการทดลองนี้ใช้ สารเสริมฤทธิ์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น สารเสริมฤทธิ์ที่ใช้มี 2 ชนิดคือ

1. Diethyl malate ใช้ในการยับยั้ง เอนไซม์ glutathion S-transferase (Visetson, 1991)

2. Triphenyl phosphateใช้ในการยับยั้ง เอนไซม์ esterase (Prabhaker *et. al.*, 1988)

จำนวน สารเสริมฤทธิ์ ที่จะใช้ในการทดลอง ขึ้นอยู่กับวิธีการทดลองหรือชนิดของสารฆ่าแมลงและวิธีในการใช้สารฆ่าแมลง (Scott and Georghion, 1986, Prabhaker *et. al.*, 1988)

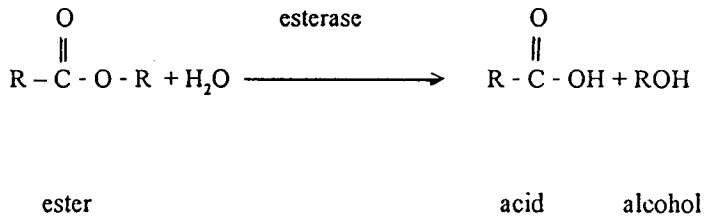
Eagleson (1940) ประสบความสำเร็จในการใช้ สารเสริมฤทธิ์ โดยใช้ pyrethrum ผสมกับ sesame oil ต่อมา Dove (1947) พบว่า pyrethrum มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น เมื่อผสมกับ piperonyl butoxide ซึ่งต่อมามีการใช้ pyrethrum synergist ผสมกับสารฆ่าแมลงที่ได้จากธรรมชาติ เหมือนกับ rotenone (Brannon, 1947) ryania dust (Reed and Filner, 1950) และ sabadilla (Blum and Kearns, 1957) และมีการใช้ สารเสริมฤทธิ์ ผสมกับสารสกัดจากสะเดา (Lange and Schmutterer, 1982)

Lange (1983) ได้ทดลองใช้ piperonyl butoxide ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น สารเสริมฤทธิ์ ผสมกับสารสกัดสะเดา โดยใช้ สารเสริมฤทธิ์ 5 เท่าของสารสกัดที่สกัดด้วย MTB/ H_2O , AZT และ MeOH และใช้ สารเสริมฤทธิ์ 2 เท่า ผสมกับสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ โดยทดสอบกับ larvae ระยะที่ 4 ของ *Plutella xylostella* ด้วยการใช้ใบพืชชุบสารสกัดเหล่านั้นให้กินอย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า Larvae ตายเพิ่มขึ้นจาก 50 เปอร์เซ็นต์ เป็น 90-98 เปอร์เซ็นต์ แล้วยังพบว่าแสง ultra-violet มีผล ลดฤทธิ์ของสารสกัดจาก MTB/ H_2O ที่ผสมกับ piperonyl butoxide และเมื่อทดสอบกับ larvae ระยะ ที่ 4 ของ *Epilachna varivestis* จะมีผลทำให้มีอัตราการตายลดลงจาก 89 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ ใน 24 ชั่วโมงแรก เมื่อใช้ 0.1 piperonyl butoxide ผสมกับ 0.67 เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดสะเดา พบว่าฆ่า larvae ระยะที่ 2 และ pupae ของ *Plutella xylostella* จาก 0.46 และ 46 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มเป็น 51.1 และ 93.3 เปอร์เซ็นต์ (Sombatsiri and Temboonkeat, 1987)

<u>ความสำคัญของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆในแมลงที่ทำการศึกษามีดังนี้</u>

เอนไซม์ esterase เป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในปฏิกิริยาเมตาบอลิซึมระยะที่ 1 ช่วยในการควบคุมปริมาณสารที่ผลิตขึ้นในร่างกาย (endogenous substate) ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม และทำลายพิษสารแปลกปลอม (xenobiotic) ที่เป็นสาร ester เอนไซม์ esterase ในแมลงพบได้มากใน cytosol, microsomes, mitochondria และ nuclei ของเซลล์ ลำไส้ และกล้ามเนื้อส่วนหลัง ซึ่งปริมาณของเอนไซม์ ขึ้นอยู่กับอายุ ชนิด และสายพันธุ์ของแมลง

เอนไซม์เอสเตอเรส ทำปฏิกิริยาสลายพันธะ ester ได้กรดและแอลกอฮอล์ ดังสมการ

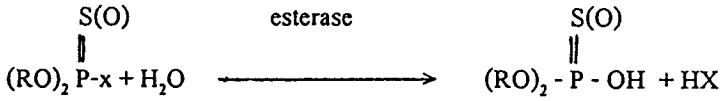


esterase กล่าวโดยทั่วไปแล้วแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

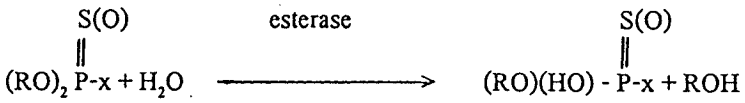
esterase ชนิด A เป็นพวกที่ไม่มีการยับยั้งโดย organophosphate (OP)

esterase ชนิด B เป็นพวกที่ถูกยับยั้งโดย OP

esterase ชนิด A ทำลายสารประกอบ OP จำนวนมาก โดยวิธี Hydrolysis ดังนี้



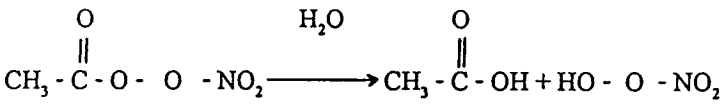
และ



ดังนั้นเอนไซม์ที่ถูกพิจารณาเป็น paraoxonase, arylesterase phosphatase, phosphorylphosphatase ฯลฯ esterase เข้าไปทำปฏิกิริยา hydrolysis กับสารประกอบ O P ไม่ชัดเจนเสมอไป เพราะว่า glutathione S-transferase และ mixed function oxidases ก็มีส่วนเข้าไปสลายสารประกอบ O P เหล่านี้ด้วย

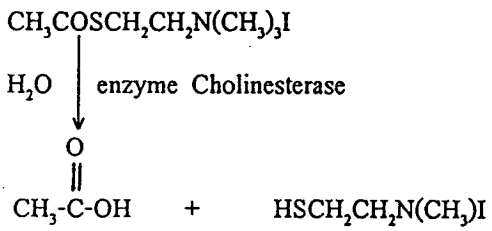
esterase ชนิด B รวมทั้งจำนวนกลุ่ม enzyme ต่าง ๆ มีกลุ่มหลัก กลุ่มหนึ่งคือ carboxyl esterases และ aliesterases ซึ่งเป็น hydrolyze ester ของ N-free alcohol และ phenol; lipase

hydrolyze fat and oil และ cholinesterase hydrolyze choline esterase กลุ่มหลังนี้ถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือกลุ่มที่เฉพาะกับ cholinesterase ซึ่งจับกับ acetylcholin อย่างพิเศษ และพวกที่ไม่เฉพาะเจาะจงกับ cholinesterase ซึ่งจับกับ choline ester ได้บ้าง



paranitropheyl acetate acetic acid paranitrophenol

ภาพที่ 12 ปฏิกิริยา hydrolysis ของ esterases



acetic acid (reacts with DTNB gives yellow color)

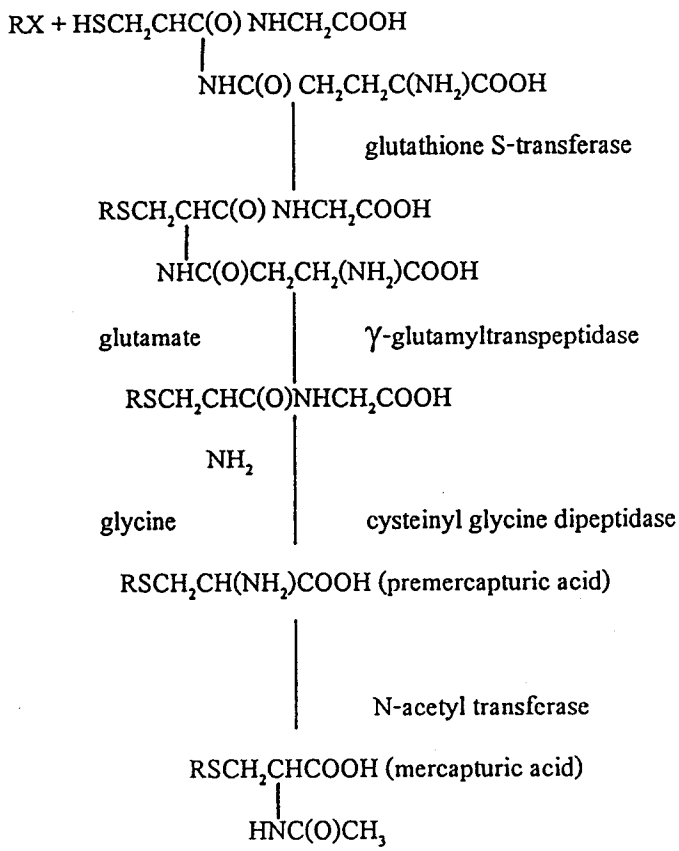
ภาพที่ 13 ปฏิกิริยา hydrolysis ของ acetylcholine ซึ่งเป็น Endogenous substrate ของ Acetylcholinesterase (Gibson and Skett, 1994)

เอนไซม์ **glutathione S-transferase** จัดเป็น non-specific enzyme ในปฏิกิริยาในระยะที่2 คือจะเร่งการรวมตัวระหว่าง glutathion S-transferase กับ substrate การเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวกันนี้จะทำให้สารแปลกปลอมที่เข้าสู่เซลล์นั้นหมดความเป็นพิษและเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง

ทำให้สามารถขจัดออกจากเซลล์ได้ง่าย ๆ เอนไซม์ชนิดนี้มีความสำคัญในการขจัดทำลายสารแปลกปลอมออกจากร่างกายคน และสัตว์ทุกชนิด และเกี่ยวข้องกับการสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง

แมลงวันสายพันธุ์ที่มีความต้านทานจะมี activity ในการรวมตัวกับสาร organophosphate ได้มากกว่าแมลงวันสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทาน ในแมลงทุกชนิดจะพบว่ามีการทำงานของเอนไซม์ glutathione S-transferase แต่บางสายพันธุ์มีความว่องไวในการทำลาย substrate สูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ ในสายพันธุ์ที่สร้างความต้านทานทั้งหมดมีระดับของ alkyl-transferase และ aryl S-transferase สูงกว่าสายพันธุ์ที่ไม่สร้างความต้านทาน ในแมลงสายพันธุ์ที่สร้างความต้านทาน จะมีระดับของเอนไซม์ monooxygenase สูงเช่นเดียวกับเอนไซม์ glutathion S-transferase ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดถูกควบคุมโดย gene บนโครโมโซมเดียวกัน (Clark and Dauterman, 1982)

สาเหตุอย่างหนึ่งที่แมลงวันบ้านบางสายพันธุ์มีการสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง เนื่องจาก แมลงวันสายพันธุ์นั้นมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ glutathion S-transferase ได้เป็นหลาย ๆ รูปแบบ ทำให้สามารถเข้าจับกับสารฆ่าแมลงที่มีโครงสร้างแตกต่างกันได้หลายชนิด (James *et. al.*, 1984)



ภาพที่ 14 ปฏิกิริยา conjugation ของ glutathione S-transferase (Dauterman, 1994)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. กล่องพลาสติก
2. เห็บสุนัข *(Rhipicephalus sanguineus* Latreille)
3. เครื่องชั่งละเอียด
4. ตะไคร้หอม (*C. winterianus* Jewitti)
5. เมล็ดสะเดา (*A. indica var. siamensis* Valeton)
6. โกร่งบด
7. บีกเกอร์ขนาด 50, 100 มิลลิลิตร
8. ตู้เย็นปรับอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
9. กระบอกตวงขนาด 25, 100, 250 มิลลิลิตร
10. pasture pipette
11. magnetic stirrer
12. pipette tip ขนาด 1, 100, 1000 ไมโครลิตร
13. microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
14. pH meter
15. centrifuge (Universal 16 r)
16. spectrophotometer (Spectronic Genesys 5)
17. microsyringe
18. potassium phosphate buffer
19. dichloronitrobenzene
20. paranitrophenyl acetate

21. ethanol

22. acetythiocholine iodide

23. homogenising buffer

วิธีการทดลอง

การทดลองได้แบ่งเป็นสองการทดลองจากพืชสองชนิด พืชแต่ละชนิดได้ถูกแบ่งออกเป็นการทดลองย่อยต่อไปนี้

ก. ศึกษาผลของสารสกัดตะไคร้หอมในการไล่เห็บสุนัข และการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ทำลายพิษบางชนิด ซึ่งได้ทำการศึกษาการขับไล่เห็บจากสารสกัดเดี่ยว ๆ กับการใช้สารสกัดจากตะไคร้หอม ร่วมกับสารเสริมฤทธิ์ เช่น triphenyl phosphate และ กับการใช้ diethyl maleate ที่มีผลต่อระดับเอนไซม์ esterases, cholinesterase และนอกจากนี้ยังศึกษาผลของการใช้สารสกัดจากตะไคร้หอมที่มีต่อระดับ glutathione S-transferase

ข. ศึกษาการตายของเห็บ จากการใช้สารสกัดจากสะเดา และการใช้ร่วมกับ triphenyl phosphate และ dimethyl maleate ที่มีผลต่อระดับเอนไซม์ esterases และ glutathione S-transferase

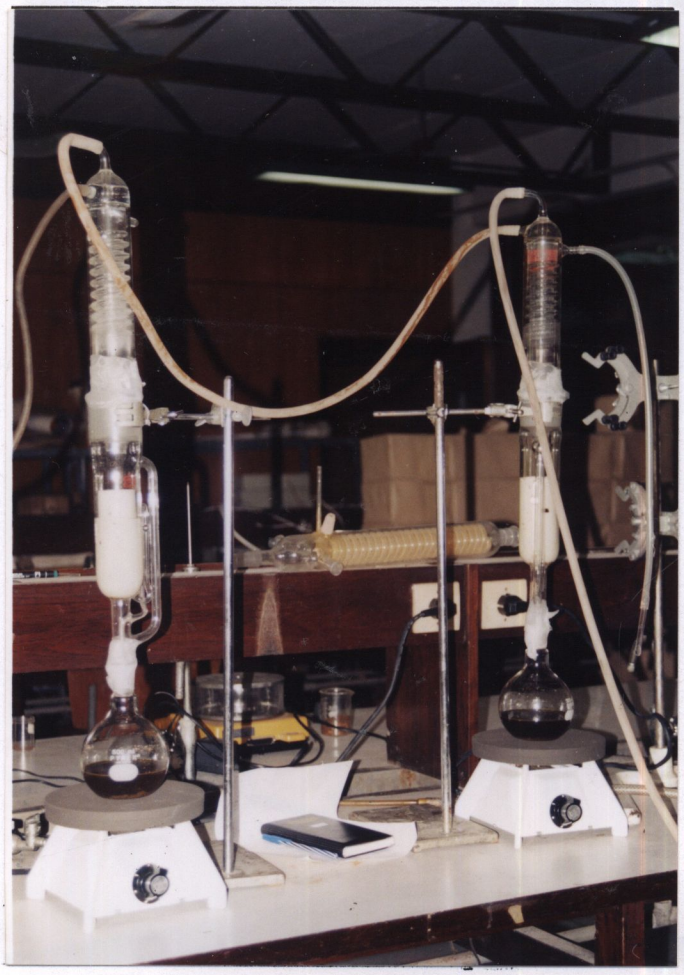
ค. จากผลการทดลองทั้งสองหาสมการ regression เพื่อคาดคะเนอัตราการตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของสารสกัดจากสะเดา และหาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตอบสนองในการหนีจากการใช้สารสกัดจากตะไคร้หอมและการปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ esterases, cholinesterases และ glutathione S-transferases เพื่อวิเคราะห์และขืนยันกลไกการตอบสนองจากการใช้สารสกัดจากพืชทั้งสองชนิด

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างเห็บและการเลี้ยงเห็บสำหรับการทดลอง

1.1 เก็บรวบรวมเห็บสุนัขจากสุนัขจรจัดที่ทุ่งสีกัน โดยเลือกเก็บจากบริเวณคอ หู และซอกนิ้ว หรือตามบริเวณที่สุนัขอาศัยอยู่ เช่น พื้นบ้าน ฝาบ้าน ขอบหน้าต่าง โดยการใช้ forcept หนีบจับตัวเห็บอย่างเบา ๆ อย่าให้ขาขาด แล้วนำใส่ขวดปิดด้วยฝาด้วยผ้าตาข่าย

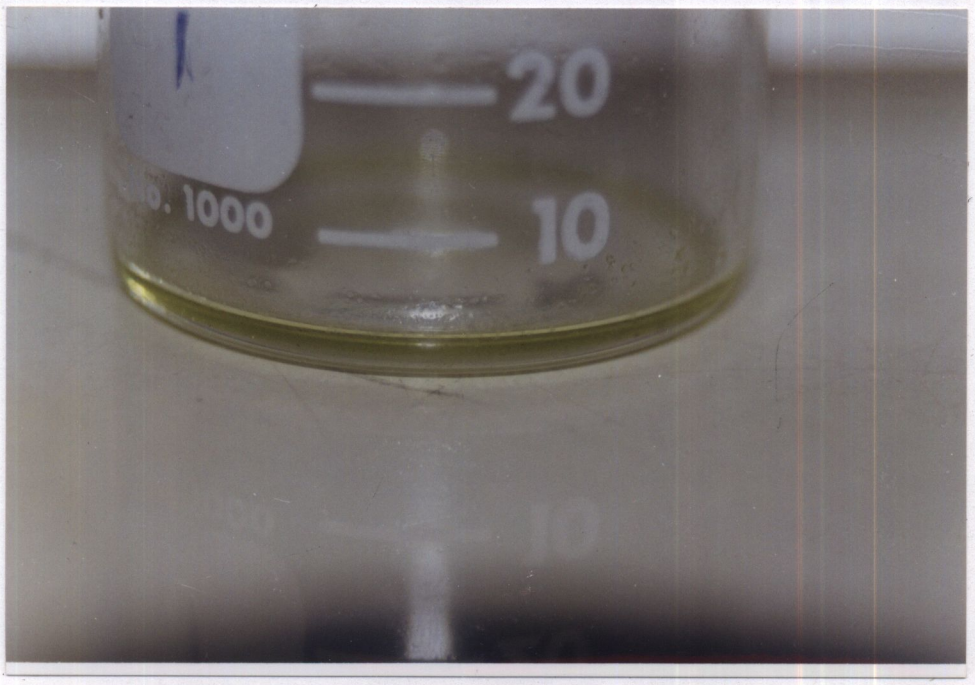
1.2 หลังจากตรวจวิเคราะห์ใต้กล้องเพื่อให้แน่ใจว่าเป็นเห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille) คัดขนาดของเห็บโดยเลือกเอาเฉพาะตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งตัวเต็มวัยเพศเมียจะมี เปลือกด้านหลังปกคลุมเฉพาะครึ่งหน้าของส่วนหลังของลำตัว ทำให้ตัวเมียสามารถขยายขนาดได้มาก และมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ ซึ่งมีเปลือกด้าน คลุมส่วนหลังทั้งหมด (อังสุมาลย์, 2535) นำเห็บเพศผู้และเพศเมียประมาณ 40 ตัวใส่กล่องที่มีขนาด 5 x 5 ตารางนิ้วแล้วใส่ต้นหญ้าขนลงไป 1-2 ต้น เพื่อเป็นที่อยู่ของเห็บ แล้วใช้ผ้าตาข่ายปิดปากกล่องไว้เป็นเวลา 2 วันก่อนทำการทดลอง เพื่อให้เห็บได้ปรับตัวและแข็งแรงขึ้น

2. การสกัดตะไคร้หอม ใช้วิธีการสกัดตามวิธีการ (สุรพล, 2528, อมราและสำรวย, 2539) โดยนำใบตะไคร้หอมสดมาตัดให้มีขนาดยาวไม่เกิน 1 เซนติเมตร จำนวน 200 กรัม ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 1500 มิลลิลิตร ทำการสกัดแบบ stream distillation เป็นเวลา 2 ชั่วโมงครึ่ง เริ่มตั้งแต่น้ำเดือด จากนั้นนำสารที่ได้ไปสกัดแบบ liquid-liquid extraction โดยใช้ petroleum ether ซึ่งจะได้สารที่เป็น essential oil หลังจากผ่านเครื่อง evaporator ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้สาร 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วนำไปทดสอบหาปริมาณสารที่สกัดได้โดยใช้ Thin layer chromatography โดยใช้ ethyl alcohol เป็น mobile phase เปรียบเทียบสารมาตรฐาน citronellal (Tirimanna, 1983)

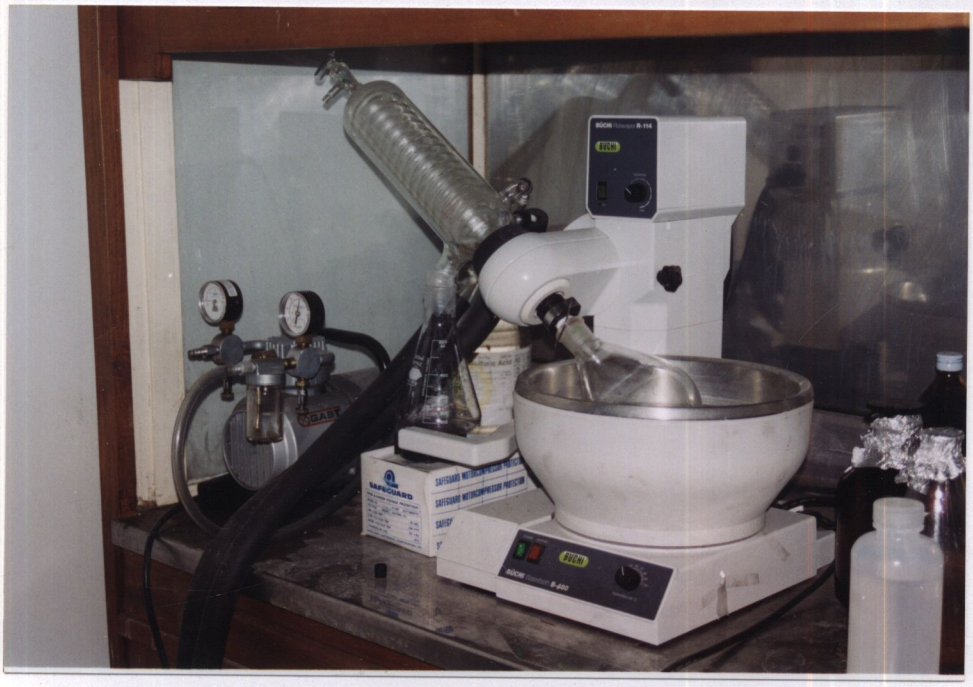


<u>ภาพที่ 15</u> แสดงการสกัดสะเดาโดยเครื่อง soxhlet apapratus

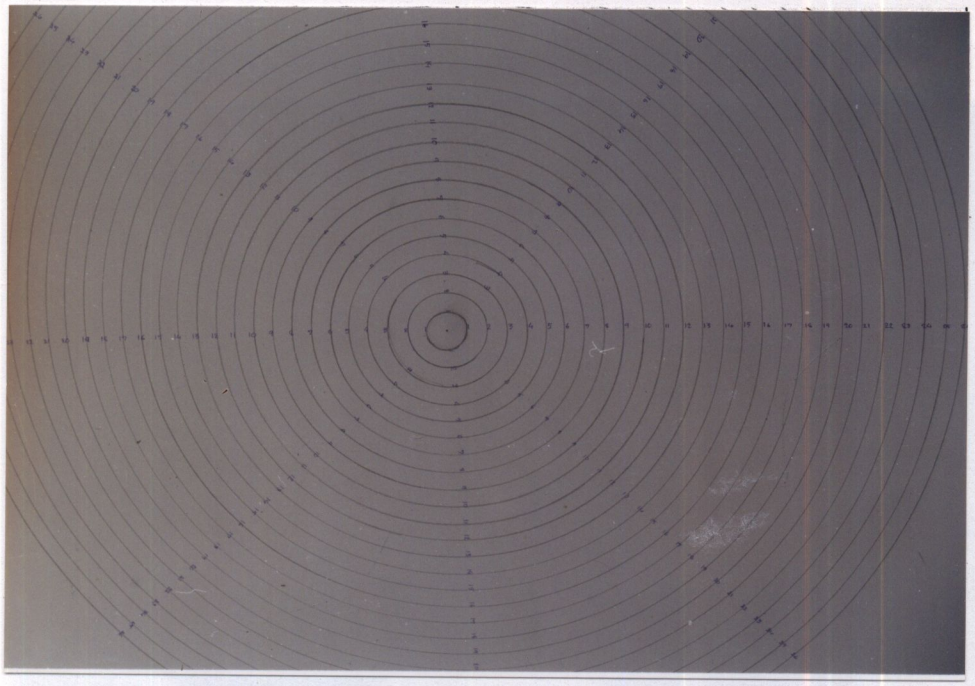
ภาพที่ 16 แสดงการสกัดตะไคร้หอมโดยเครื่องกลั่นไอน้ำ



<u>ภาพที่ 17</u> ลักษณะของสารสกัดจากตะไคร้หอมที่ได้จากการสกัด



ภาพที่ 18 แสดงการแยกตัวทำละลายออกจากตัวถูกละลายโดยเครื่อง Flask evaporator



ภาพที่ 19 แสดงการทดลองหาอัตราการไล่ของเห็บสุนัขที่ได้รับสารสกัดตะไคร้หอม

ภาพที่ 20 ลักษณะของสารสกัดสะเดาที่ได้จากการสกัด

3. การสกัดสารจากสะเดา ใช้วิธีการสกัดจาก (สุรพล, 2528) โดยชั่งเมล็ดสะเดาบด 140 กรัม สกัดโดยวิธี soxhlet extraction โดยใช้ 95 เปอร์เซ็นต์ ethylalcohol 700 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้แต่ละครั้งจะนำมารวมกันก่อนเข้าเครื่อง evaporator ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสได้สาร 35 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อได้สารสกัดมาแล้วนำไปตรวจสอบคุณภาพของสารสกัดโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอะซาดิแรคตินด้วยวิธี Thin layer chromatography โดยใช้ ethylalcohol เป็น mobile phase (Tirimanna, 1983)

4. การทดลองการหนีของเห็บจากสารสกัดจากตะไคร้หอม วางแผนการทดลองแบบ completely randomized designs 5 กลุ่มการทดลองรวมชุดควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้เครื่องมือที่ประดิษฐ์ขึ้นเอง ทำด้วยโลหะสี่เหลี่ยม เส้นผ่าศูนย์กลาง 48 เซนติเมตร ตรงกลางทำเป็นบริเวณที่ตั้งของสารสกัดที่เจือจางด้วยน้ำอุ่นแล้ว ที่พื้นทำมาตราส่วนในแนววงกลมเพื่อบอกระยะทางจากจุดศูนย์กลางในการทดลองได้แบ่งกลุ่มการทดลองดังนี้

T_1 กลุ่มควบคุม ไม่มีการให้สารสกัดแต่เป็นการให้น้ำผสม 1 เปอร์เซ็นต์ petroleum ether ชุบสำลีวางไว้ที่กลางเครื่องมือทดลอง

T_2 เห็บสุนัขได้รับสารสกัดชุบสำลี 0.010 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวน1 มิลลิลิตร

T_3 เห็บสุนัขได้รับสารสกัดชุบสำลี 0.10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวน1 มิลลิลิตร

T_4 เห็บสุนัขได้รับสารสกัดชุบสำลี 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวน1 มิลลิลิตร

T_5 เห็บสุนัขได้รับสารสกัดชุบสำลี 10.0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวน1 มิลลิลิตร

จากนั้นวางสำลีชุบสารสกัดตะไคร้หอมที่บริเวณกึ่งกลางเครื่องมือนี้ แล้วนำเห็บที่เลี้ยงไว้ปล่อยลงไปบนเครื่องมือที่ตรงบริเวณกึ่งกลาง โดยระวังมิให้เห็บถูกสารสกัดโดยตรง ทำการวัดระยะการเดินของเห็บจากบริเวณปล่อยในวินาทีที่ 0, 10, 60, 90 และ 120 ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการทดลองโดยผสมสารสกัดตะไคร้หอมด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ triphenyl phosphate ทุกกลุ่มทดลอง และทำการทดลองเหมือนเดิมแต่ใช้เห็บคนละชุด ทำการจดบันทึกผลการทดลอง เช่นเดียวกับการทดลองแรกเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารเสริมฤทธิ์ดังกล่าว และเป็นการยืนยันกลไกการทำลายพิษสารสกัดจากตะไคร้หอมของเห็บ

5. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ทำลายพิษบางชนิด หลังจากเห็บได้รับสารสกัดจากตะไคร้หอม ทำการผสมสารสกัดจากตะไคร้หอมในอัตราเดิมของการทดลองที่ 4 โดยแบ่งเป็นสารสกัดเดี่ยว ๆ และสารสกัดที่ผสม 1 เปอร์เซ็นต์ triphenyl phosphate และ 1 เปอร์เซ็นต์ diethyl maleate จำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นฉีดพ่นสารสกัดเจือจางด้วย microsyring ลงในกล่องกลมที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เซนติเมตรที่ใส่เห็บ 15 ตัวปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจวัดเอนไซม์ cholinesterase, esterase และ glutathione S-transferases โดยวิธีการของ Kao *et. al.*, (1984); Mackness *et. al.*,(1983); Booth *et. al.*, (1961) ตามลำดับ และนอกจากนี้ทำการตรวจสอบปริมาณโปรตีนของเห็บหลังจากได้รับสารสกัดจากตะไคร้หอมทุกความเข้มข้นโดยใช้วิธีการ Lowry's protein determination (Lowry, 1951)

6. การศึกษาการตายของเห็บจากการใช้สารสกัดจากสะเดา เนื่องจากมีรายงานว่าสารสกัดจากสะเดามีฤทธิ์ในการกินและถูกตัวตาย (Varkerk and Wright, 1993) จึงทำการศึกษาอัตราการตายจากการสัมผัสสารสกัดจากสะเดา ในความเข้มข้นที่ได้จากการทำให้สารสกัดเจือจางโดยใช้ น้ำ ในอัตราต่าง ๆ กัน โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design 3 ซ้ำ จำนวน 4 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

T_1 กลุ่มควบคุม เห็บสุนัขได้รับน้ำผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ ethanol

T_2 เห็บสุนัขได้รับสารสกัดสะเดา 1 กรัมต่อลิตร

T_3 เห็บสุนัขได้รับสารสกัดสะเดา 5 กรัมต่อลิตร

T_4 เห็บสุนัขได้รับสารสกัดสะเดา 10 กรัมต่อลิตร

หลังจากทำการเจือจางสารสกัดสะเดาในอัตราความเข้มข้นดังกล่าว แล้วจึงฉีดพ่นสารสกัดเจือจางด้วย microsyring บนเห็บในกล่องกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยฉีดพ่น 1 มิลลิลิตรต่อ 1 กลุ่มการทดลอง กลุ่มทดลองละ 10 ตัว จากนั้นนำเห็บไปเลี้ยงแล้วตรวจนับการตาย การทดลองนี้ได้แยกเป็นการทดลองย่อยโดยทดลองผสม 1 เปอร์เซ็นต์ triphenyl phosphate และ 1 เปอร์เซ็นต์ diethyl maleate ลงในสารสกัดสะเดาที่เจือจางแล้ว เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารเสริมการออกฤทธิ์ดังกล่าว และเป็นการยืนยันกลไกการทำลายพิษสารสกัดจากสะเดาของเห็บ

7. การศึกษาผลของสารสกัดจากสะเดา ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ทำลายพิษบางชนิดของเห็บเช่น esterase ทำการเตรียมสารสกัดเจือจางในปริมาณเหมือนกับข้อ 5 จำนวน 3 ชุด ๆ ละ 3ซ้ำ และทำการผสม 1 เปอร์เซ็นต์ triphenyl phosphate และ 1 เปอร์เซ็นต์ diethyl maleate ลงในสารสกัดเจือจาง 2 ชุด ชุดที่เหลือเป็นชุดควบคุม จากนั้นนำสารสกัดเจือจางเดี่ยว ๆ และที่ผสมสารเคมีดังกล่าวแต่ละความเข้มข้น ฉีดพ่นเห็บชุดละจำนวน 20 ตัว แล้วนำเห็บไปเลี้ยงไว้ 24 ชั่วโมง ก่อนทำการสกัดเอนไซม์ เพื่อดูปฏิกิริยาของเอนไซม์บางชนิด คือ esterase และ glutathion S-transferase โดยวิธีการของ Mackness *et al.*,(1983), Boote *et al.*, (1961) ตามลำดับ และนอกจากนี้ได้ทำการตรวจสอบปริมาณโปรตีนที่มีในเห็บซึ่งจะทำให้ทราบปริมาณโปรตีนรวมเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับระดับเอนไซม์ที่วัดได้จากการทดลอง หลังจากที่เห็บได้รับสารสกัดจากสะเดาทุกความเข้มข้น โดยใช้วิธีการ Lowry's protein determination (Lowry, 1951)

8. วิเคราะห์สมการ regression เพื่อหาค่า LD_{50} ของสารสกัดจากสะเดาและการตอบสนองในการหนีสารสกัดจากตะไคร้หอมตามลำดับ นอกจากนี้หาค่า สหสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนอง เช่น การหนีจากสารสกัดตะไคร้หอม ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ cholinesterse, esterases และ glutathione S-transferases และการตายของเห็บจากสะเดาต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ esterase และ glutathione S-transferases เพื่อเป็นการยืนยันกลไกบางอย่างของการตอบสนองต่อสารสกัดทั้งสองดังกล่าว

ภาพที่ 21 แสดงการทดลองหา LD_{50} ของเห็บสุนัขที่รับสารสกัดจากสะเดา

ภาพที่ 22 การเตรียม suspension สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์โดยเครื่อง centrifuge

<u>ภาพที่ 23</u> แสดงการหาค่าการดูดซับแสง โดยเครื่อง spectrophotometer

9. การตรวจสอบระดับการทำงานของเอนไซม์ แบ่งออกเป็น 2 ตอนดังนี้

- การสกัดเอนไซม์จากเห็บสุนัข
- การตรวจวัดระดับเอนไซม์ของเห็บสุนัข

9.1 การสกัดเอนไซม์จากเห็บสุนัข โดยอาศัยหลักการของ detoxification enzymes assay โดย ได้ประยุกต์ใช้จากวิธีการของ Deuterman, (1983); Rose, (1986); Visetson, (1991)

9.1.1. นำเห็บสุนัขที่ได้รับสารสกัดสะเดา และสารสกัดสะเดาผสม synergists มาบดรวมกับ Polyvinylpolypyrrolidine (PVPP) 0.1 กรัม ในโกร่งบดซึ่งแช่เย็น ระหว่างการบดเติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ทีละน้อย

9.1.2. เมื่อบดเห็บจนละเอียดแล้ว ใช้ผ้าขาวบางกรองเอาแต่ส่วนน้ำใส่ในหลอดทดลองไว้

9.1.3. นำส่วนที่เป็นน้ำในข้อ 2. ไปปั่นโดยใช้เครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 18,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนที่เป็นสารละลายไว้ ส่วนที่เป็นตะกอนนำไปทิ้ง นำส่วนที่เป็นสารละลายมาตรวจวัดเอนไซม์ esterase พร้อมกับหาค่า protein concentration ด้วย

9.1.4. ถ้าเป็นส่วนที่ต้องการวัดเอนไซม์ glutathione S-transferase ให้ทำเช่นเดียวกับการตรวจวัดเอนไซม์ esterase แต่ในขั้นตอนการบดให้เพิ่มสาร glutathione และ tris ลงไปในขณะบด

9.2 การตรวจวัดระดับเอนไซม์

ทำการตรวจวัดระดับเอนไซม์3 ชนิด ได้แก่ cholinesterase esterase และ glutathione S-transferase ที่มีผลทำให้เห็บเกิดการต้านทานต่อสารสกัดจากพืช

9.2.1 การตรวจวัดระดับเอนไซม์ cholinesterase

ใช้วิธี acetyl thiocholine iodide assay ของ Kao *et al.*, (1984) โดยอาศัยหลักการคือ เอนไซม์ cholinesterase ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น คือ acetylthiocholine iodide (ATCL) และทำการวัดปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (thiocholine iodide) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร (ดูภาพที่ 13)

9.2.2 การตรวจวัดระดับเอนไซม์ esterase

ใช้วิธี PNPA assay ของ Mackness *et. al.*, (1983) โดยอาศัยหลักการ คือ เอนไซม์ esterase เร่งการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของสารตั้งต้น คือ paranitrophenyl acetate (PNPA) ไปเป็น Paranitrophenol ซึ่งจะเกิดเป็นสารละลายสีเหลือง (ดูภาพที่ 12) การตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของ Paranitrophenol ที่เกิดขึ้น โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ระดับความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร

9.2.3 การตรวจวัดระดับเอนไซม์ glutathion S-transferase

ใช้วิธี DCNB assays ของ Booth *et. al.*, (1961) โดยอาศัยหลักการคือ dicholoronitrobenzene (DCNB) ผสมกับ glutathion (GSH) โดยมี glutathion S-transferase เป็นตัวเร่ง (ภาพที่ 14) และทำการวัดปริมาณสารผลิตภัณฑ์ ที่เกิดขึ้นโดยนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ระดับความยาวคลื่น 344 นาโนเมตร

9.3 วิเคราะห์ข้อมูล

1. การเก็บตัวเลข เช่น ค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของค่า enzyme activity เทียบกับกลุ่มควบคุม

2. สถิติวิเคราะห์ ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (one way analysis of variance หรือ one way ANOVA) ใช้ทดสอบความแตกต่างของระดับเอนไซม์ของแต่ละกลุ่มในการทดลอง เมื่อพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะทำการทดสอบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ซึ่งจะทดสอบให้ทราบว่ากลุ่มใดที่แตกต่างกัน และหาสมการ regression ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดตะไคร้หอมและสะเดา ต่ออัตราการไล่ จากการใช้สารสกัดทั้งสองและต่ออัตราการตาย จากการใช้สารสกัดสะเดา เพื่อหาค่า LD_{50} นอกจากนี้ยังหาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ cholinesterase และ glutathion S-transferase เพื่อศึกษากลไกในการตอบสนองของเห็บต่อสารสกัดทั้ง 2 ชนิด

ผลการทดลอง

1. ผลของสารสกัดตะไคร้หอมต่อการไล่เห็บสุนัข

เมื่อใช้สารสกัดจากตะไคร้หอมที่มีความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1, 10 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 120 วินาที เห็บเดินหนีจากบริเวณที่มีสารสกัด 1.0 ± 0.1, 8.4 ± 1.2, 9.1 ± 1.4, 11.7 ± 1.2 และ 16.5 ± 1.6 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 5) และทุกความเข้มข้นของสารสกัดจากตะไคร้หอมที่ใช้ จะมีระยะทางหนีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับชุดควบคุม ($p < 0.05$ DMRT)

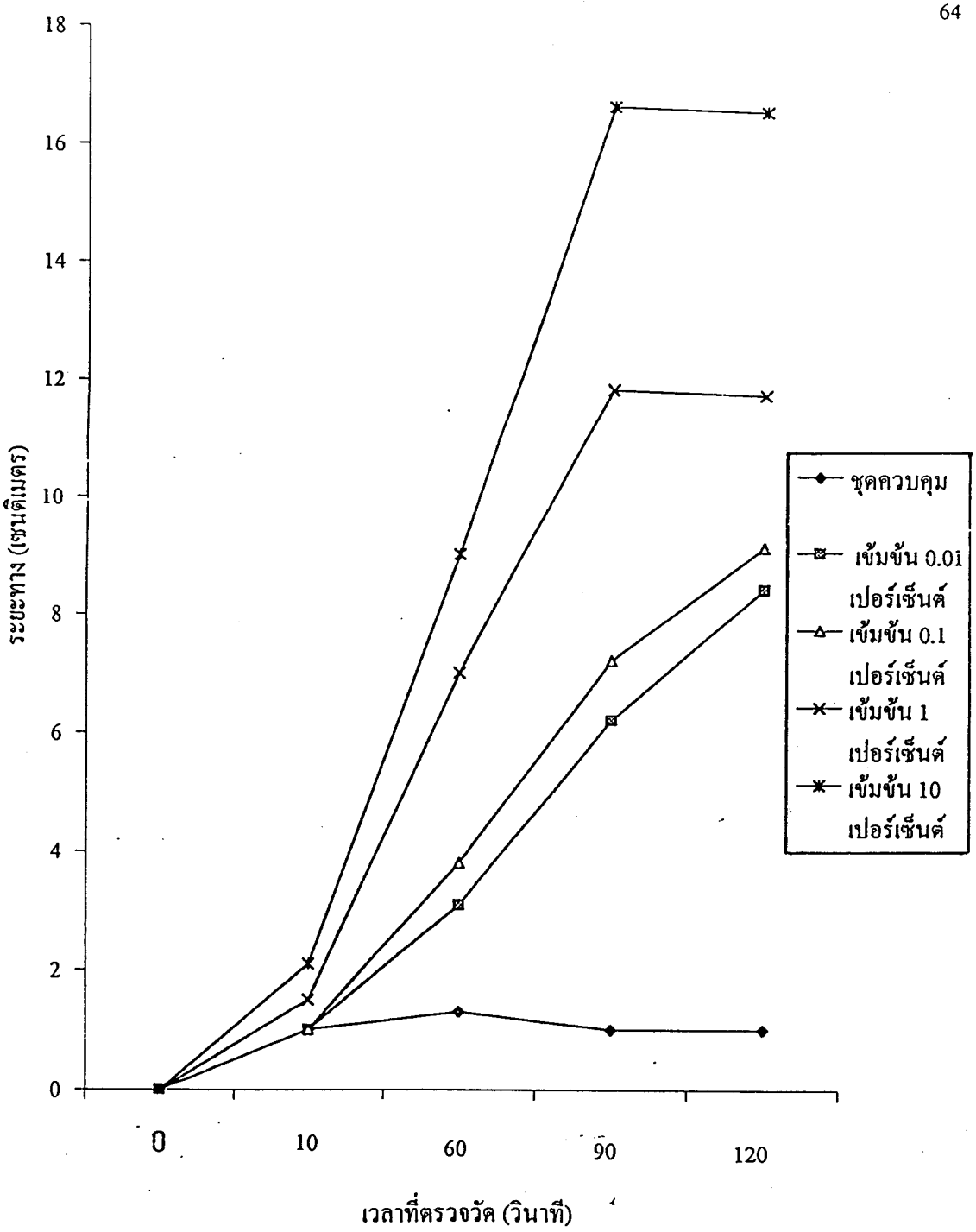
เมื่อใส่สาร triphenyl phosphate (TPP) ในอัตรา 1.0 เปอร์เซ็นต์ กับทุกความเข้มข้นของสารสกัดจากตะไคร้หอม ในเวลา 120 วินาที เห็บเดินหนีจากแหล่งให้สารสกัด 8.6 ± 2.1, 9.4 ± 1.1, 11.6 ± 1.6 และ 18.2 ± 2.2 เซ็นติเมตร ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากตะไคร้หอม 0.01, 0.1, 1 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมเห็บเดินออกไปจากแหล่งให้สารTPP เพียง 1.2 ± 1.6 เซนติเมตร (ตารางที่ 6) และมีระยะทางหนีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กับชุดควบคุม ($p < 0.05$ DMRT) แสดงว่าเมื่อใส่สารเสริมฤทธิ์ TPP เห็บจะมีการตอบสนองโดยการหนีมากขึ้น

ตารางที่ 5 ระยะทางเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ (เซนติเมตร) ในการหนีของเห็บในเวลาต่าง ๆ จากบริเวณที่วางสำลีชุบสารสกัดจากตะไคร้หอมความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์) [1]	ระยะทางการหนี(เซ็นติเมตร) ที่เวลา(วินาที)[2]				
สารสกัดตะไคร้หอม	0	10	60	90	120
10	0	2.1 ± 0.2 ก	9.0 ± 0.1 ก	16.6 ± 1.6 ก	16.5 ± 1.6 ก
1.0	0	1.5 ± 0.5 ข	7.0 ± 0.7 ก	11.8 ± 1.2 ข	11.7 ± 1.2 ข
0.1	0	1.0 ± 0.1ข	3.8 ± 0.2 ข	7.2 ± 1.7 ค	9.1 ± 1.4 ข
0.01	0	1.0 ± 0.1ข	3.1 ± 0.5 ข	6.2 ± 1.1 ค	8.4 ± 1.2 ข
0	0	1.0 ± 0.3ข	1.3 ± 0.2 ค	1.0 ± 0.2 ง	1.0 ± 0.1 ค

[1] ความเข้มข้นคำนวณจากสารสกัดทั้งหมดที่ได้ก่อนการทดลอง

[2] ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ภายในแนวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ $P > 0.05$, DMRT



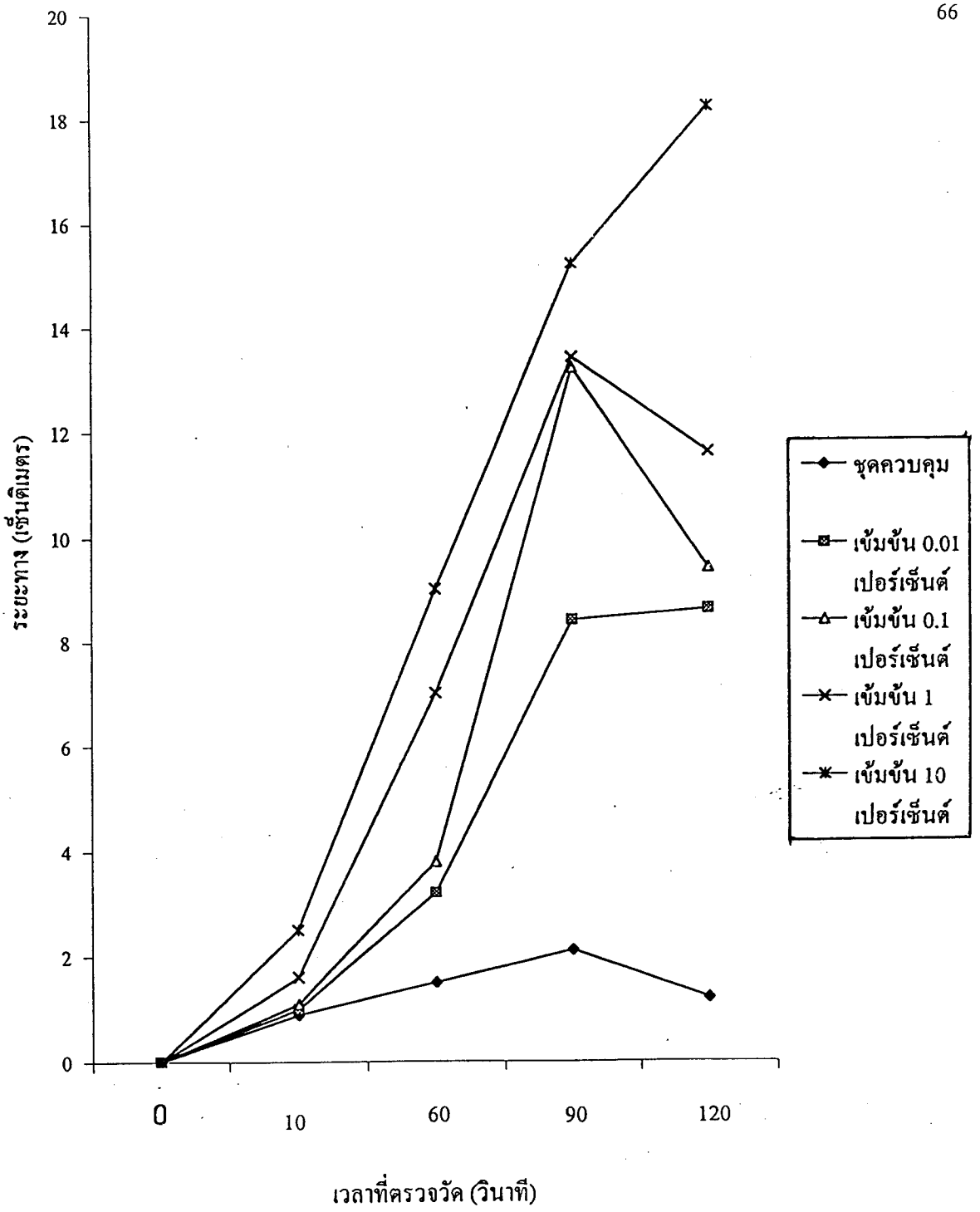
ภาพที่ 24 กราฟเส้นแสดงระยะทาง (เซนติเมตร) การหนีของเห็บของบริเวณที่ให้สารสกัดจากตะไคร้หอมที่ความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01 เปอร์เซ็นต์และชุดควบคุม

ตารางที่ 6 ระยะทางเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ (เซนติเมตร) ในการหนีของเห็บในเวลาต่าง ๆ จากบริเวณที่วางสำลีชุบสารสกัดจากตะไคร้หอมความเข้มข้นต่างกันที่ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ TPP

ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์) [1]	ระยะทางที่หนี(เซ็นติเมตร) ที่เวลา(วินาที) [2]				
สารสกัดจากตะไคร้หอม	0	10	60	90	120
10	0	2.5 ± 0.5 ก	9.0 ± 0.3 กข	15.2 ± 1.1 ก	18.2 ± 2.2 ก
1.0	0	1.6 ± 0.5 ข	7.0 ± 0.6 ข	13.4 ± 1.1ข	11.6 ± 1.6 ข
0.1	0	1.1 ± 0.2 ข	3.8 ± 0.5 ค	13.2 ± 1.4 ข	9.4 ± 1.1ข
0.01	0	1.0 ± 0.3 ข	3.2 ± 0.1 ค	8.4 ± 1.2 ข	8.6 ± 2.1ข
0	0	0.9 ± 0.3 ข	1.5 ± 0.2 ง	2.1 ± 1.5 ค	1.2 ± 1.6 ค

[1] ความเข้มข้นคำนวณจากสารสกัดทั้งหมดที่ได้ก่อนการทดลอง

[2] ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ภายในแนวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างทางค่าสถิติอย่างมีนัยสำคัญ $P > 0.05$, DMRT



ภาพที่ 25 กราฟเส้นแสดงระยะทาง (เซนติเมตร) การหนีของเห็บจากบริเวณให้สารสกัดตะไคร้หอมที่ความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ 1เปอร์เซ็นต์ TPP

2. ผลของสารสกัดสะเดาต่อการตายของเห็บสุนัข

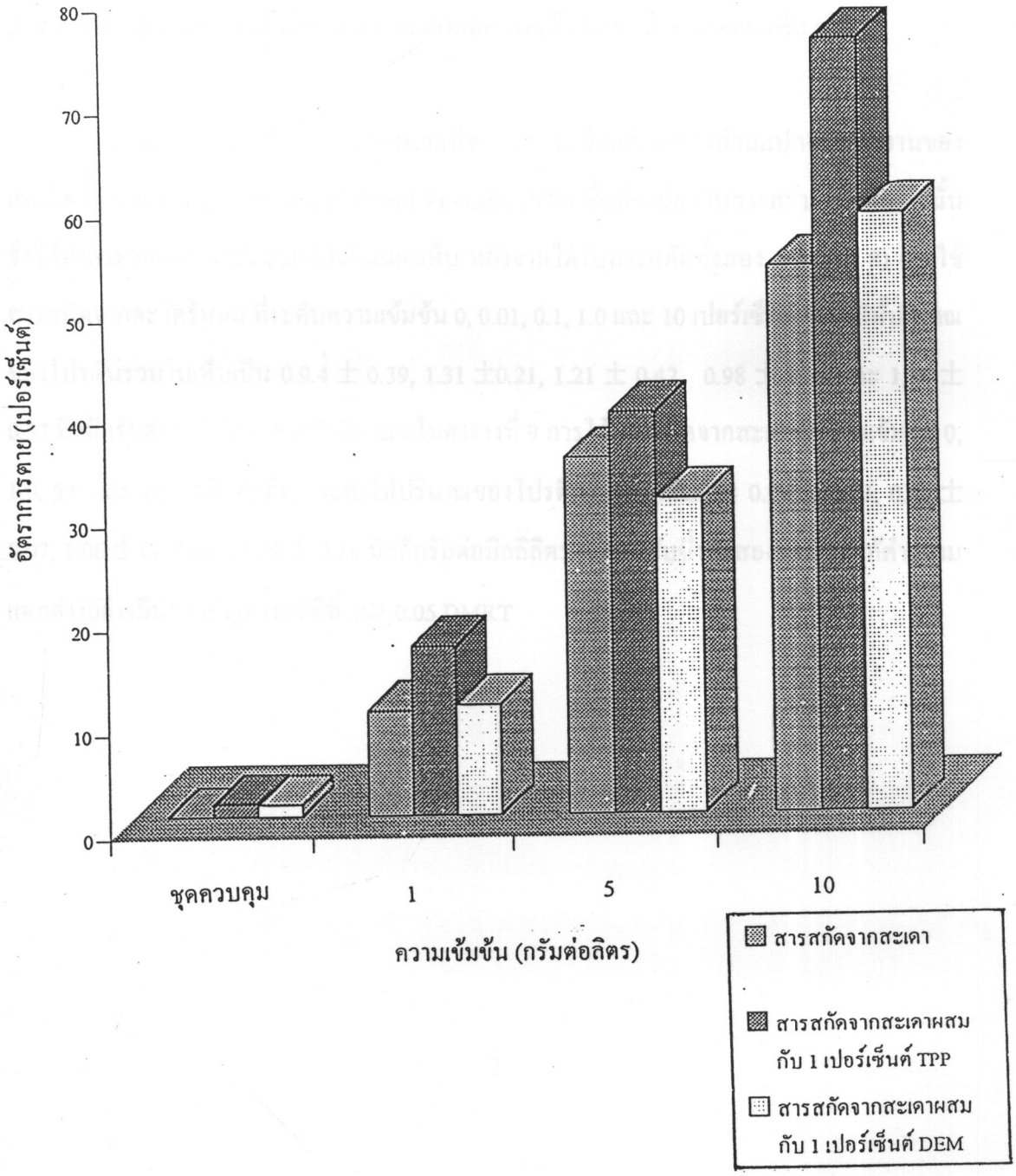
สารสกัดจากสะเดาที่ความเข้มข้น 1.0, 5.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตรฉีดพ่นเห็บ พบว่าอัตราการตายเป็น 10.1 $\pm$ 1.6, 34.2 $\pm$ 16.1 และ 52.6 $\pm$ 11.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และหลังจากการผสม 1 เปอร์เซ็นต์ TPP อัตราการตายเพิ่มเป็น 16.2 $\pm$ 1.7, 38.6 $\pm$ 6.2 และ 74.4 $\pm$ 11.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อเปลี่ยนมาผสม 1 เปอร์เซ็นต์ DEM มีอัตราการตาย 10.6 $\pm$ 2.5, 30.2 $\pm$ 7.4 และ 57.6 $\pm$ 12.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมใช้ TPP และ DEM พบว่ามีอัตราการตาย 1.2 $\pm$ 0.1 และ 1.1 $\pm$ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 7) แสดงว่าเมื่อใส่สารเสริมฤทธิ์เห็บจะมีการตายเพิ่มมากขึ้น และการไม่ใช้สารเสริมฤทธิ์ TPP จะทำให้เห็บมีเปอร์เซ็นต์การตายมากกว่าการใช้สารเสริมฤทธิ์ DEM

ตารางที่ 7 อัตราการตายเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ ของเห็บจากการฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสะเดา ในอัตราความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อผสมกับสารเสริมฤทธิ์ (1 เปอร์เซ็นต์ TPP และ 1 เปอร์เซ็นต์ DEM)

ความเข้มข้น(กรัมต่อลิตร) สารสกัดสะเดา	อัตราการตาย [1] (เปอร์เซ็นต์)		
	สารสกัดสะเดา	สารสกัดสะเดาผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ TPP [2]	สารสกัดสะเดาผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ DEM [2]
10	52.6 ± 11.5 ข	74.4 ± 11.4 ก	57.6 ± 12.4 ข
5	34.2 ± 16.1 กข	38.6 ± 6.2 ก	30.2 ± 7.4 ข
1	10.1 ± 1.6 ข	16.2 ± 1.7 ก	10.6 ± 2.5 ข
0	0 ก	1.2 ± 0.1ก	1.1 ± 0.2 ก

[1] อัตราการตายคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ 24 ชั่วโมง

[2] ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ภายในแนวนอนเดียวกันจะไม่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$, DMRT)



ภาพที่ 26 ฮีสโตแกรมแสดงอัตราการตายของเห็บจากการใช้สารสกัดสะเดาในอัตราความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการใช้ 1เปอร์เซ็นต์ TPP, 1เปอร์เซ็นต์ DEM และไม่ใช้สารเสริมฤทธิ์

3. ผลของสารสกัดจากตะไคร้หอม และสะเดาต่อความเข้มข้นของโปรตีนของเห็บสุนัข

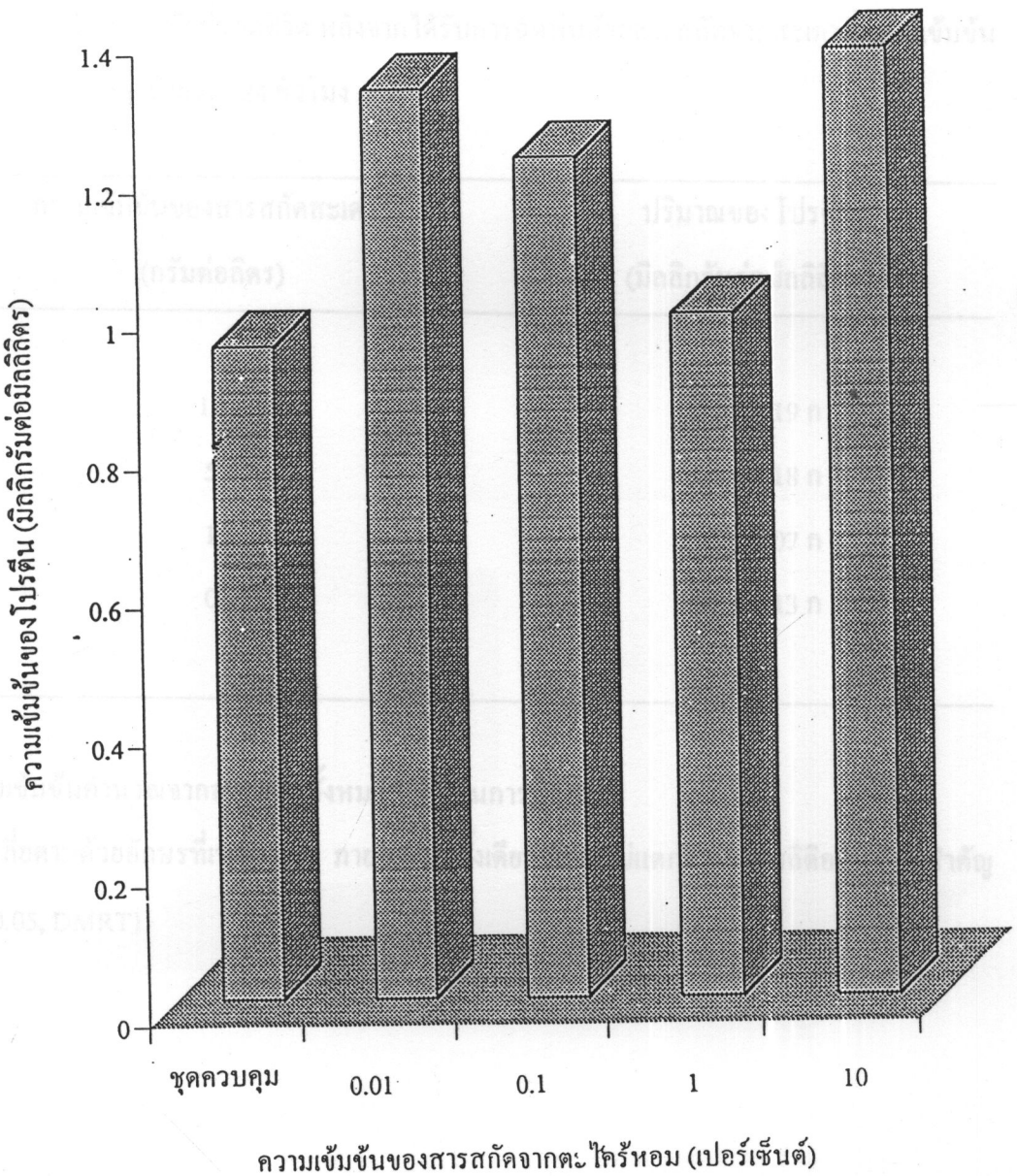
เนื่องจากการได้รับสารสกัดจากพืช จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ทำลายพิษ (Deuterman, 1985 and Visetson, 1991) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบหาปริมาณโปรตีนของเห็บ หลังจากได้รับสารสกัดทั้งสอง (ตารางที่ 8) การใช้สารสกัดจากตะไคร้หอม ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1, 1.0 และ 10 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ปริมาณของโปรตีนรวมในเห็บเป็น 0.9.4 $\pm$ 0.39, 1.31 $\pm$0.21, 1.21 $\pm$ 0.42, 0.98 $\pm$ 0.39 และ 1.36 $\pm$ 0.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และในตารางที่ 9 การใช้สารสกัดจากสะเดาที่ความเข้มข้น 0, 1.0, 5.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร จะทำให้ปริมาณของโปรตีนรวมในเห็บเป็น 0.98 $\pm$ 0.13, 0.98 $\pm$ 0.07, 1.06 $\pm$ 0.18 และ 1.09 $\pm$ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับซึ่งทั้งสองกรณีไม่ให้ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P > 0.05$ DMRT

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ ของความเข้มข้นของโปรตีนในเห็บสุนัขที่รอดชีวิตหลังจากได้รับสารสกัดจากตะไคร้หอมที่อัตราต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดตะไคร้หอม [1] (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณของโปรตีน [2] (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
10.0	1.36 ± 0.32 ก
1.0	0.98 ± 0.39 ก
0.1	1.21 ± 0.42 ก
0.01	1.31 ± 0.21 ก
0	0.94 ± 0.39 ก

[1] ความเข้มข้นคำนวณจากสารสกัดทั้งหมดที่ได้ก่อนการทดลอง

[2] ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ภายในแนวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$, DMRT)



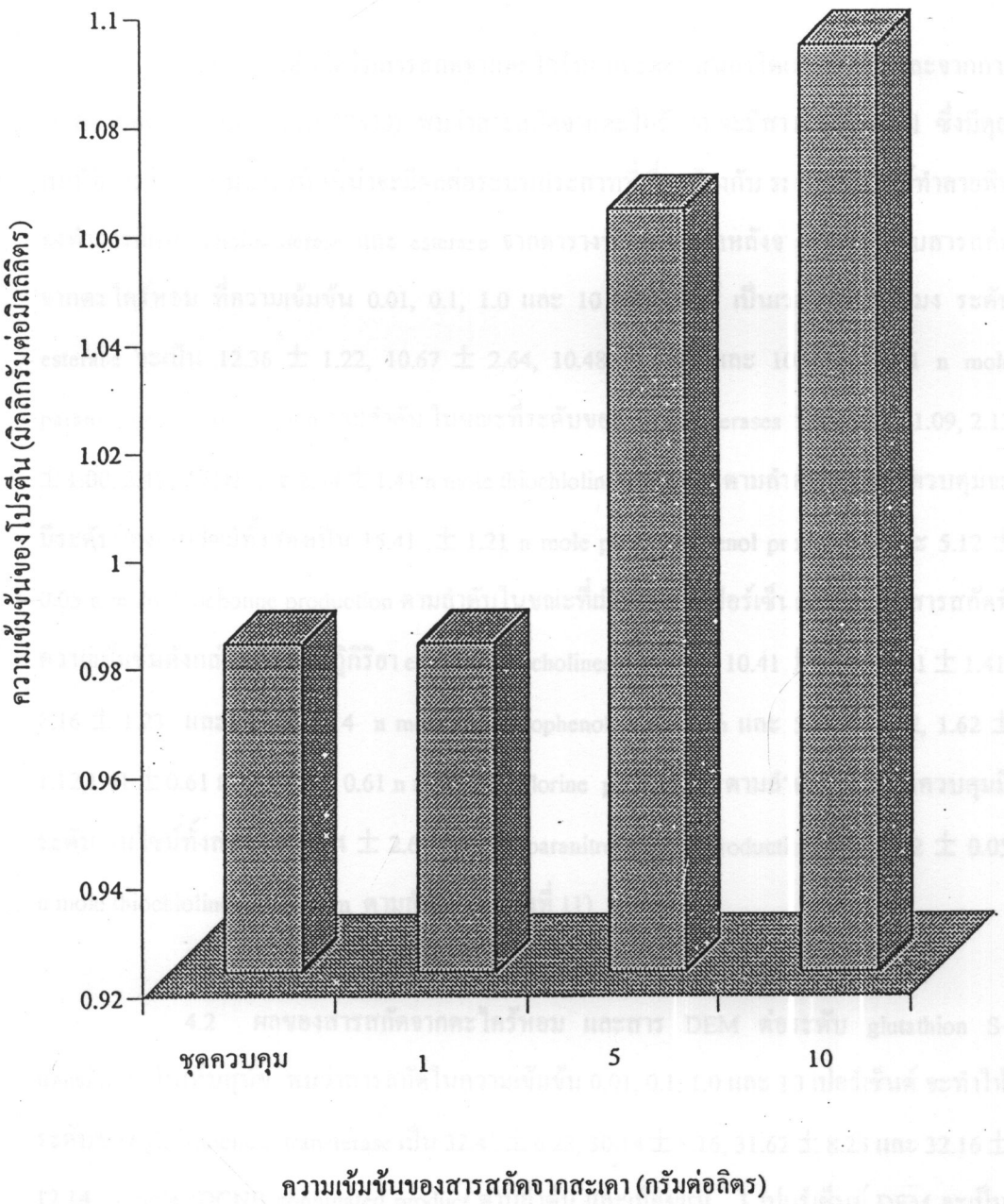
ภาพที่ 27 ฮีสโตแกรมแสดงผลของการสกัดจากตะไคร้หอมต่อความเข้มข้นของโปรตีนในเห็บสุนัข

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ ของความเข้มข้นของโปรตีนในเห็บสุนัขที่รอดชีวิต หลังจากได้รับการฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสะเดาที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดสะเดา [1] (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
10	1.09 ± 0.19 ก
5	1.06 ± 0.18 ก
1	0.98 ± 0.07 ก
0	0.98 ± 0.13 ก

[1] ความเข้มข้นคำนวณจากสารสกัดทั้งหมดที่ได้ก่อนการทดลอง

[2] ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ภายในแนวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$, DMRT)



ภาพที่ 28 ฮีสโตแกรมแสดงผลของสารสกัดจากสะเดาต่อความเข้มข้นของโปรตีนในเห็บสุนัข

4. ผลของสารสกัดตะไคร้หอม ต่อระดับเอนไซม์บางชนิดในเห็บสุนัข

4.1 เมื่อเห็บได้รับสารสกัดจากตะไคร้หอมจะตอบสนองโดยการหนี และจากการทดลองของอมราและสำรวย (2539) พบว่าสารสกัดจากตะไคร้หอมจะมีสาร citronellal ซึ่งมีคุณสมบัติการไล่ ดังนั้นสารชนิดนี้น่าจะมีผลต่อระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับ ระบบเอนไซม์ทำลายพิษ จึงทำการศึกษา cholinesterase และ esterase จากตารางที่ 10 พบว่าหลังจากที่เห็บได้รับสารสกัดจากตะไคร้หอม ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1.0 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระดับ esterase จะเป็น 12.36 $\pm$ 1.22, 10.67 $\pm$ 2.64, 10.48 $\pm$ 2.21 และ 10.97 $\pm$ 2.41 n mole paranitrophenol production ตามลำดับ ในขณะที่ระดับของ cholinesterases เป็น 5.15 $\pm$ 1.09, 2.13 $\pm$ 1.00, 2.46 $\pm$ 2.41 และ 2.34 $\pm$ 1.41 n mole thiochloline produced ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมจะมีระดับของเอนไซม์ทั้งสองเป็น 15.41 $\pm$ 1.21 n mole paranitrophenol production และ 5.12 $\pm$ 0.05 n mole thiocholine production ตามลำดับในขณะที่เมื่อผสม 1 เปอร์เซ็นต์ TPP กับสารสกัดที่ความเข้มข้นดังกล่าวค่าของปฏิกิริยา esterase และcholinesterase เป็น 10.41 $\pm$ 1.23, 10.21 $\pm$ 1.41, 8.16 $\pm$ 1.23 และ8.12 $\pm$ 1.14 n mole paranitrophenol production และ 5.11 $\pm$ 1.12, 1.62 $\pm$ 1.12,1.61 $\pm$ 0.61 และ 1.62 $\pm$ 0.61 n mole thiochlorine production ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมมีระดับเอนไซม์ทั้งสองเป็น 15.4 $\pm$ 2.67 n mole paranitrophenol production และ 5.02 $\pm$ 0.05 n mole thiochloline production ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

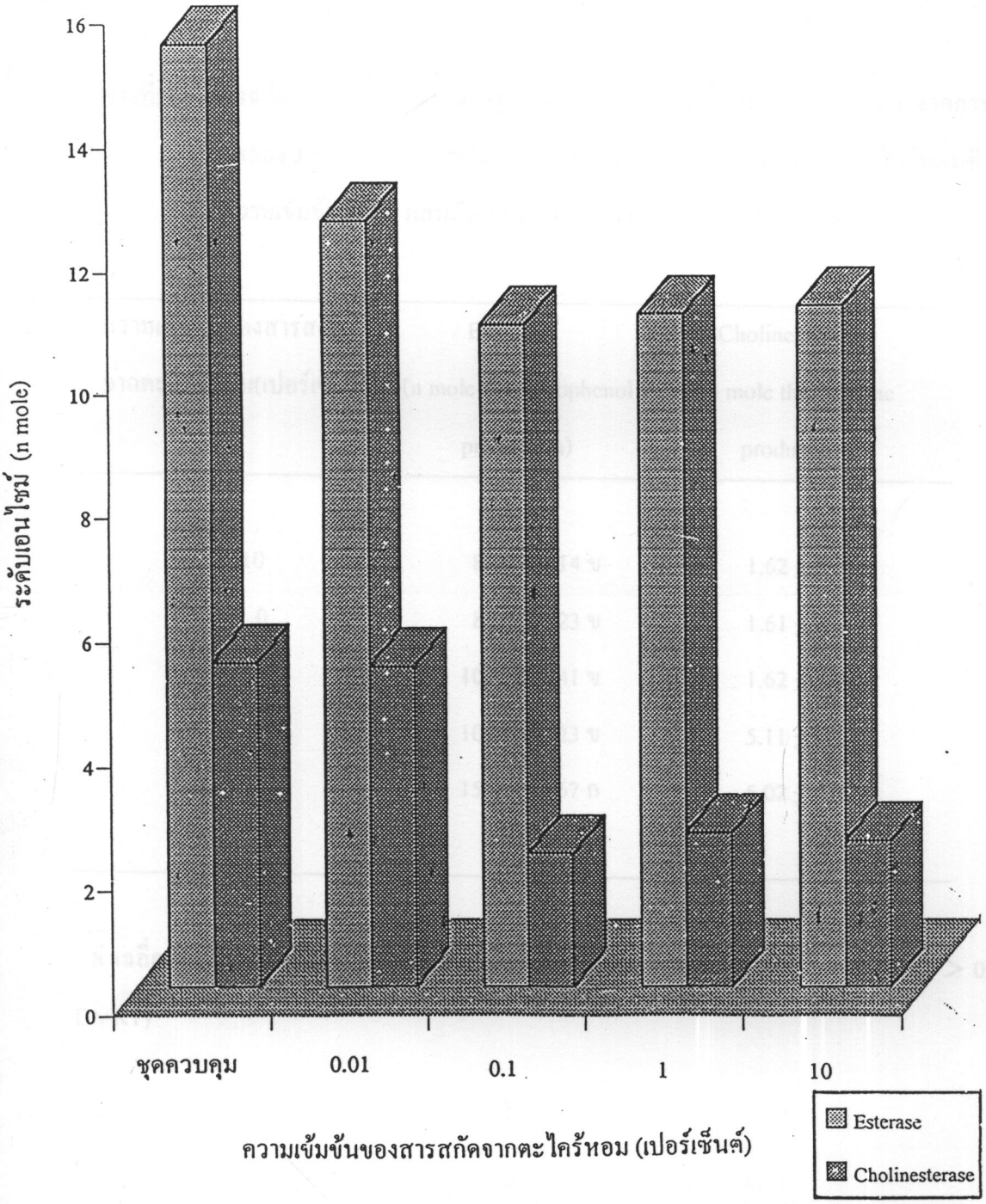
4.2 ผลของสารสกัดจากตะไคร้หอม และสาร DEM ต่อระดับ glutathion S-transferase ในเห็บสุนัข พบว่าสารสกัดในความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1.0 และ 10 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ระดับของ glutathione S-transferase เป็น 32.42 $\pm$ 6.23, 30.14 $\pm$ 8.16, 31.62 $\pm$ 8.25 และ 32.16 $\pm$ 12.14 n mole DCNB conjugated product ตามลำดับ และเมื่อผสม 1 เปอร์เซ็นต์ DEM จะเป็น 28.23 $\pm$ 8.42, 26.14 $\pm$ 2.12, 25.42 $\pm$ 6.16 และ 30.12 $\pm$ 6.42 n mole DCNB conjugated product ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (36.41 $\pm$ 8.12และ 30.16 $\pm$ 11.23 n mole DCNB conjugated

product ตามลำดับ)จะไม่พบความแตกต่างทางสถิติทั้ง 2 การทดลอง (ตารางที่ 12) แสดงว่าสารสกัดจากเตะไคร้หอมถูกทำลายโดยเอนไซม์ในปฏิกิริยาระยะที่ 1 เมื่อวัดระดับเอนไซม์ในปฏิกิริยาระยะที่ 2 พบว่าปริมาณของเอนไซม์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐานของระดับ esterase และcholinesterase จากการทดลอง 3 ซ้ำในเห็บสุนัขหลังจากได้รับการฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากตะไคร้หอมที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจากตะไคร้หอม(เปอร์เซ็นต์)	Esterase [1] (n mole paranitrophenol production)	Cholinesterase [1] (n mole thiochlorine production)
10	10.97 ± 2.41 ข	2.34 ± 1.41 ข
1.0	10.48 ± 2.21 ข	2.46 ± 2.41 ข
0.1	10.67 ± 2.64 ข	2.13 ± 1.00 ข
0.01	12.36 ± 1.22 กข	5.15 ± 1.02 ก
0	15.21 ± 1.21ก	5.12 ± 0.05 ก

[1] ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$, DMRT)

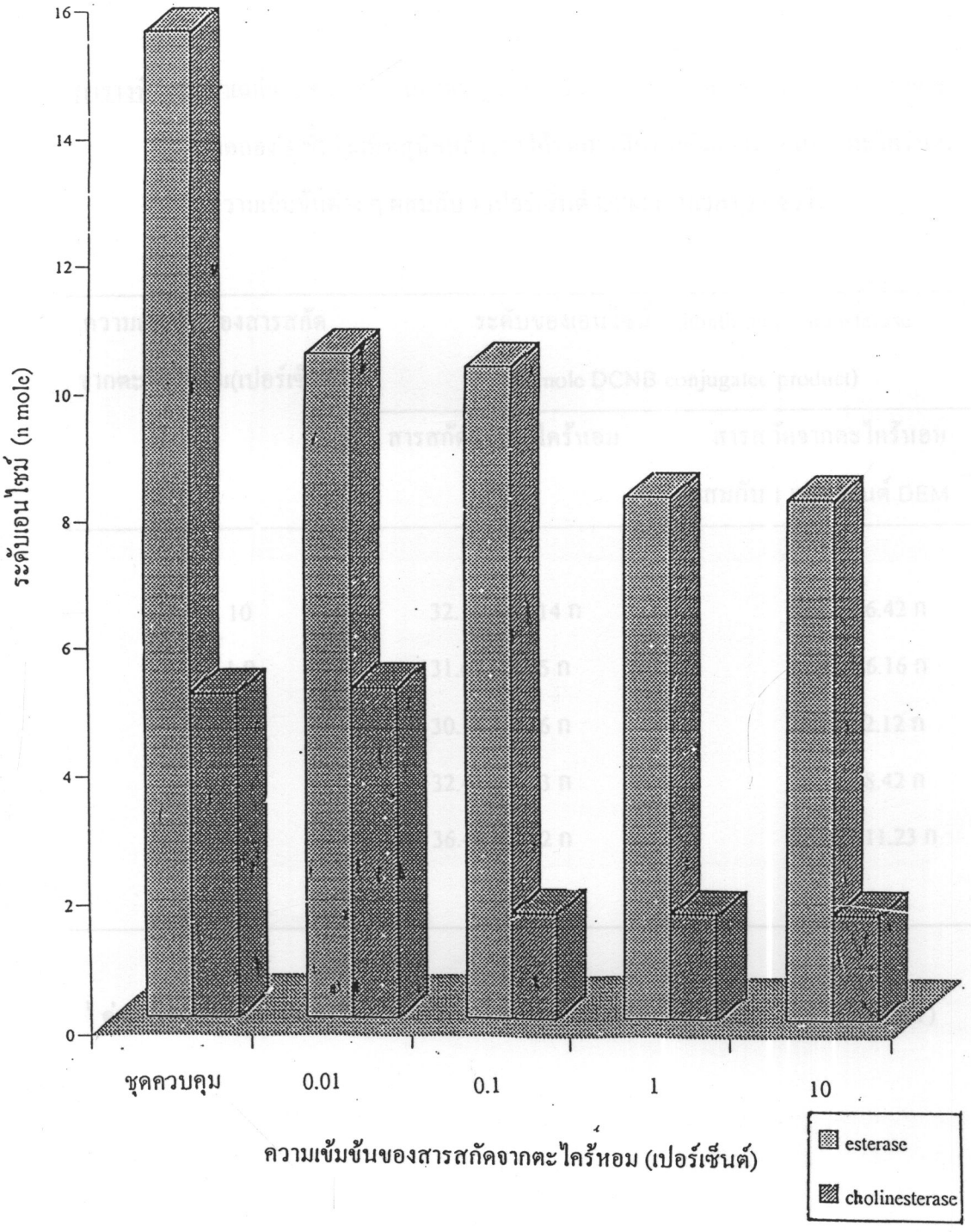


ภาพที่ 29 ฮีสโตแกรมแสดงผลของสารสกัดตะไคร้หอมต่อระดับ esterase และ cholinesterase ในเห็บสุนัข

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของระดับ esterase และ cholinesterase จากการทดลอง 3 ซ้ำในเห็บสุนัขหลังจากได้รับการฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากตะไคร้หอมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ TPP เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจากตะไคร้หอม(เปอร์เซ็นต์)	Esterase [1] (n mole paranitrophenol production)	Cholinesterase [1] (n mole thiocholine production)
10	8.12 ± 1.14 ข	1.62 ± 0.61 ข
1.0	8.16 ± 1.23 ข	1.61 ± 0.61 ข
0.1	10.21 ± 1.41 ข	1.62 ± 1.12 ข
0.01	10.41 ± 1.23 ข	5.11 ± 1.12 ก
0	15.41 ± 2.67 ก	5.02 ± 0.05 ก

[1] ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$, DMRT)

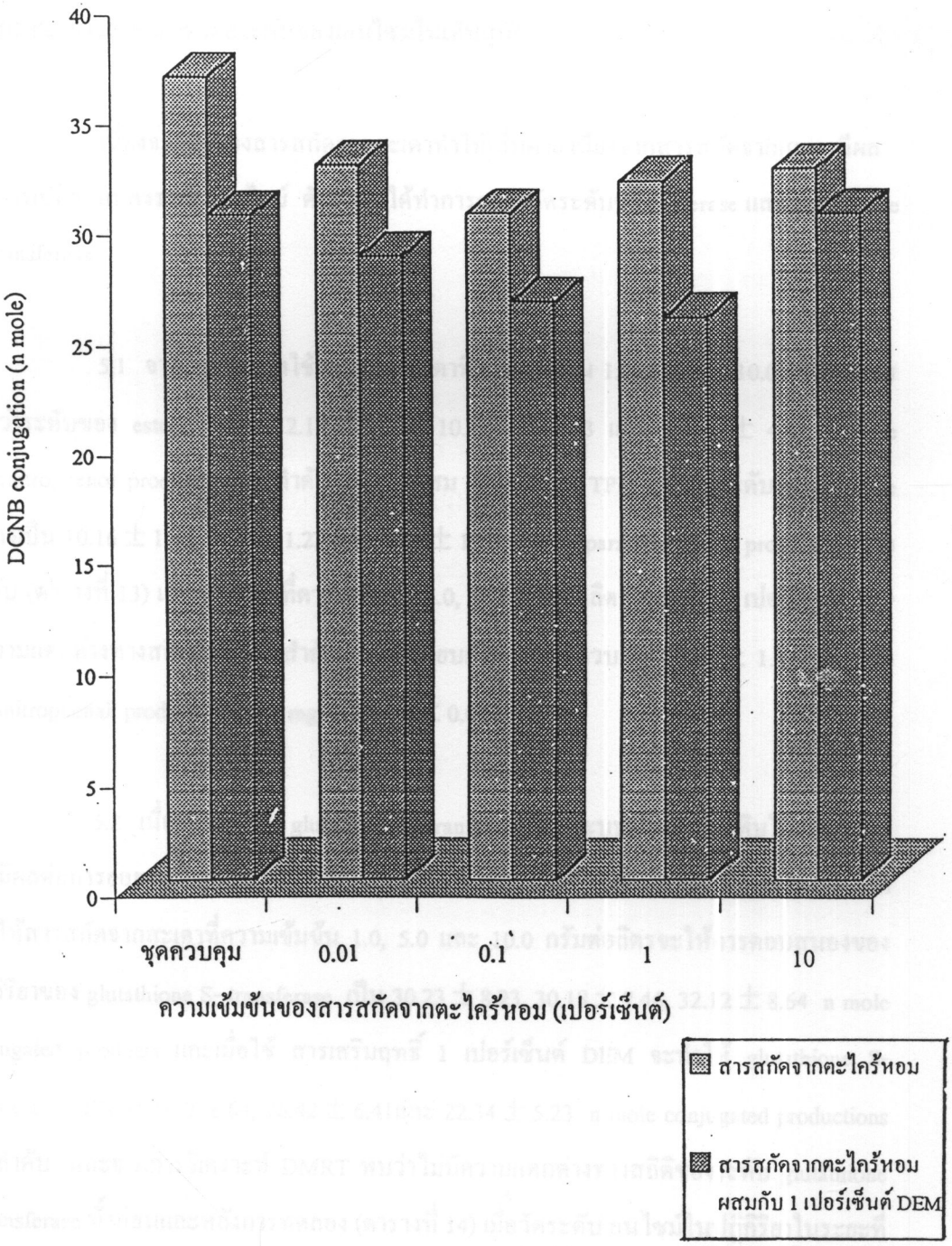


ภาพที่ 30 ฮีสโตแกรมแสดงผลของสารสกัดจากตะไคร้หอมและ 1 เปอร์เซ็นต์ TPP ต่อระดับ esterase และ cholinesterase ในเห็บสุนัข

ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของระดับ glutathione S-transferase จากการทดลอง 3 ซ้ำ ในเห็บสุนัขหลังจากได้รับการฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากตะไคร้หอมความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ DEM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจากตะไคร้หอม(เปอร์เซ็นต์)	ระดับของเอนไซม์ glutathione S-transferase (n mole DCNB conjugated product)	
	สารสกัดจากตะไคร้หอม	สารสกัดจากตะไคร้หอมผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ DEM
10	32.16 ± 12.14 ก	30.12 ± 6.42 ก
1.0	31.62 ± 8.25 ก	25.42 ± 6.16 ก
0.1	30.14 ± 8.16 ก	26.14 ± 2.12 ก
0.01	32.42 ± 6.23 ก	28.23 ± 8.42 ก
0	36.41 ± 8.12 ก	30.16 ± 11.23 ก

[1] ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันจะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$, DMRT)



ภาพที่ 31 ฮีสโตแกรมแสดงผลของสารสกัดจากตะไคร้หอม และ 1 เปอร์เซ็นต์ DEM ต่อระดับ glutathione S- transferase ในเห็บสุนัข

5. ผลของสารสกัดสะเดาต่อระดับของเอนไซม์ในเห็บสุนัข

เนื่องจากผลของสารสกัดจากสะเดาทำให้เห็บตาย เนื่องจากสารสกัดจากสะเดามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ ดังนั้นจึงได้ทำการตรวจวัดระดับของ esterase และ glutathione S-transferase

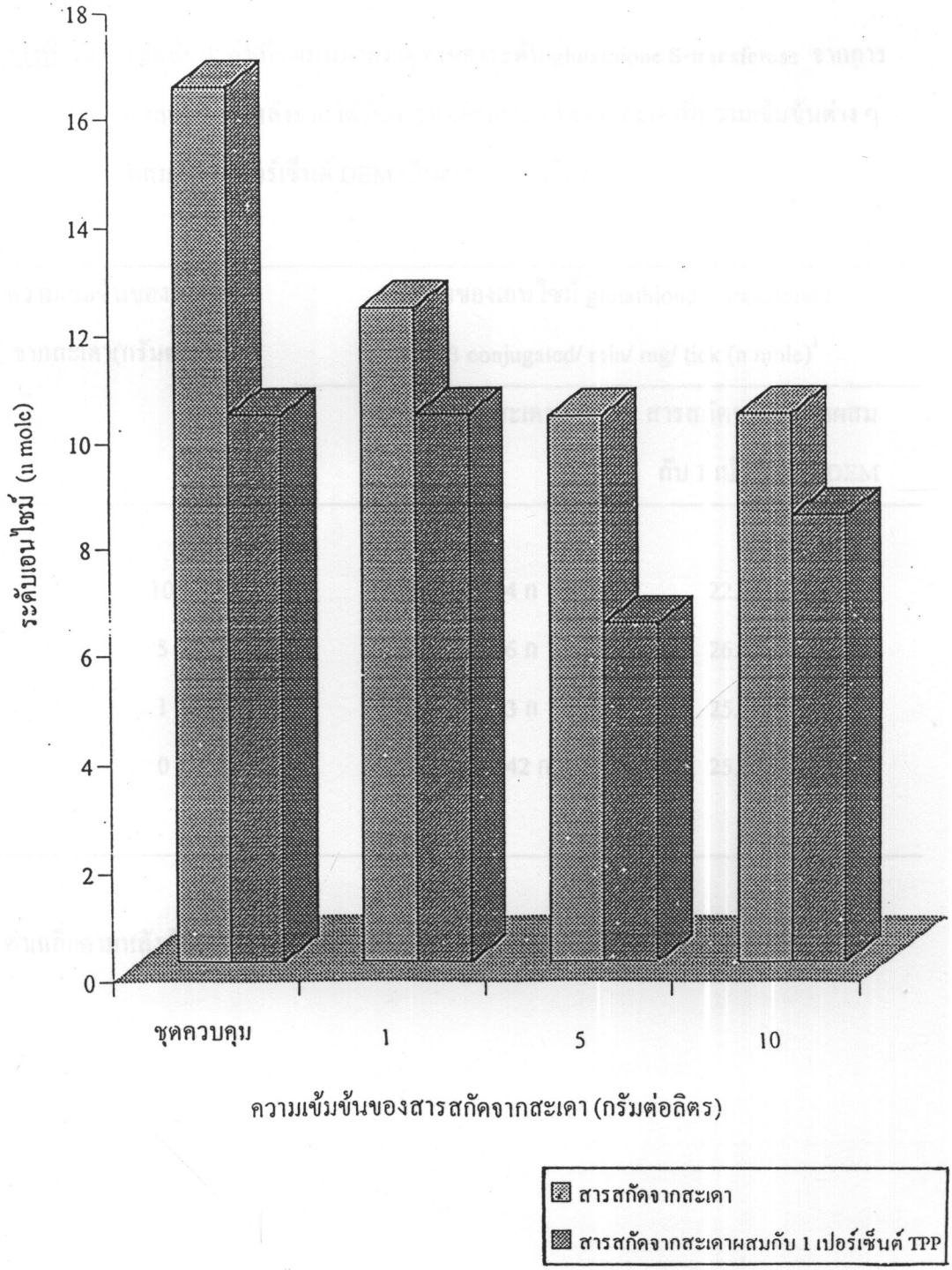
5.1 จากการทดลองใช้สารสกัดสะเดาที่ความเข้มข้น 1.0, 5.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร พบว่าระดับของ esterase เป็น 12.14 $\pm$ 1.64, 10.12 $\pm$ 2.23 และ 10.14 $\pm$ 4.12 n mole paranitrophenol production ตามลำดับ และเมื่อผสม 1 เปอร์เซ็นต์ TPP จะทำให้ระดับของ esterase ลดลงเป็น 10.16 $\pm$ 1.41, 6.23 $\pm$ 1.23 และ 8.24 $\pm$ 1.20 n mole paranitrophenol production ตามลำดับ (ตารางที่ 13) และสารสกัดที่ความเข้มข้น 5.0, 10.0 กรัมต่อลิตร ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ TPP มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (10.6 $\pm$ 1.23 n mole paranitrophenal production/ min/ mg tick) ที่ $P < 0.05$

5.2 เนื่องจากระบบ glutathione S-tranferase เป็นระบบที่จะทำลายพิษใน ระยะที่ 2 อาจมีผลต่อการย่อยสลายสารสกัดดังกล่าว จึงได้มีการวัดระดับของ glutathion S-transferase จากการให้สารสกัดจากสะเดาที่ความเข้มข้น 1.0, 5.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตรจะให้การตอบสนองของปฏิกิริยาของ glutathione S- transferase เป็น 30.23 $\pm$ 8.23, 30.18 $\pm$ 7.46, 32.12 $\pm$ 8.64 n mole conjugated products และเมื่อใช้ สารเสริมฤทธิ์ 1 เปอร์เซ็นต์ DEM จะทำให้ glutathione S-transferase เป็น 25.16 $\pm$ 8.64, 26.42 $\pm$ 6.41และ 22.34 $\pm$ 5.23 n mole conjugated productions ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ DMRT พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติของระดับ glutathione S-transferase ทั้งก่อนและหลังการทดลอง (ตารางที่ 14) เมื่อวัดระดับเอนไซม์ในปฏิกิริยาในระยะที่ 2 พบว่าปริมาณเอนไซม์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงว่าสารสกัดจากสะเดาถูกทำลายโดยเอนไซม์ในปฏิกิริยาระยะที่ 1

ตารางที่ 13 ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนตราฐานของระดับ esterase จากการทดลอง 3 ซ้ำในเห็บสุนัข หลังจากได้รับการฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสะเดาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ DEM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจากสะเดา(กรัมต่อลิตร)	ระดับของเอนไซม์ esterase [1] paranitrophenol production / min/ mg tick (n mole)	
	สารสกัดจากสะเดา	สารสกัดจากสะเดาผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ DEM
10	10.14 ± 4.12 ข	8.24 ± 1.20 ข
5	10.12 ± 2.23 ข	6.23 ± 1.23 ข
1	12.14 ± 1.64 กข	10.16 ± 1.41 ก
0	16.23 ± 3.62 ก	10.16 ± 1.23 ก

[1] ค่าเฉลี่ยตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันจะไม่แตกต่างในแนวตั้งเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$, DMRT)

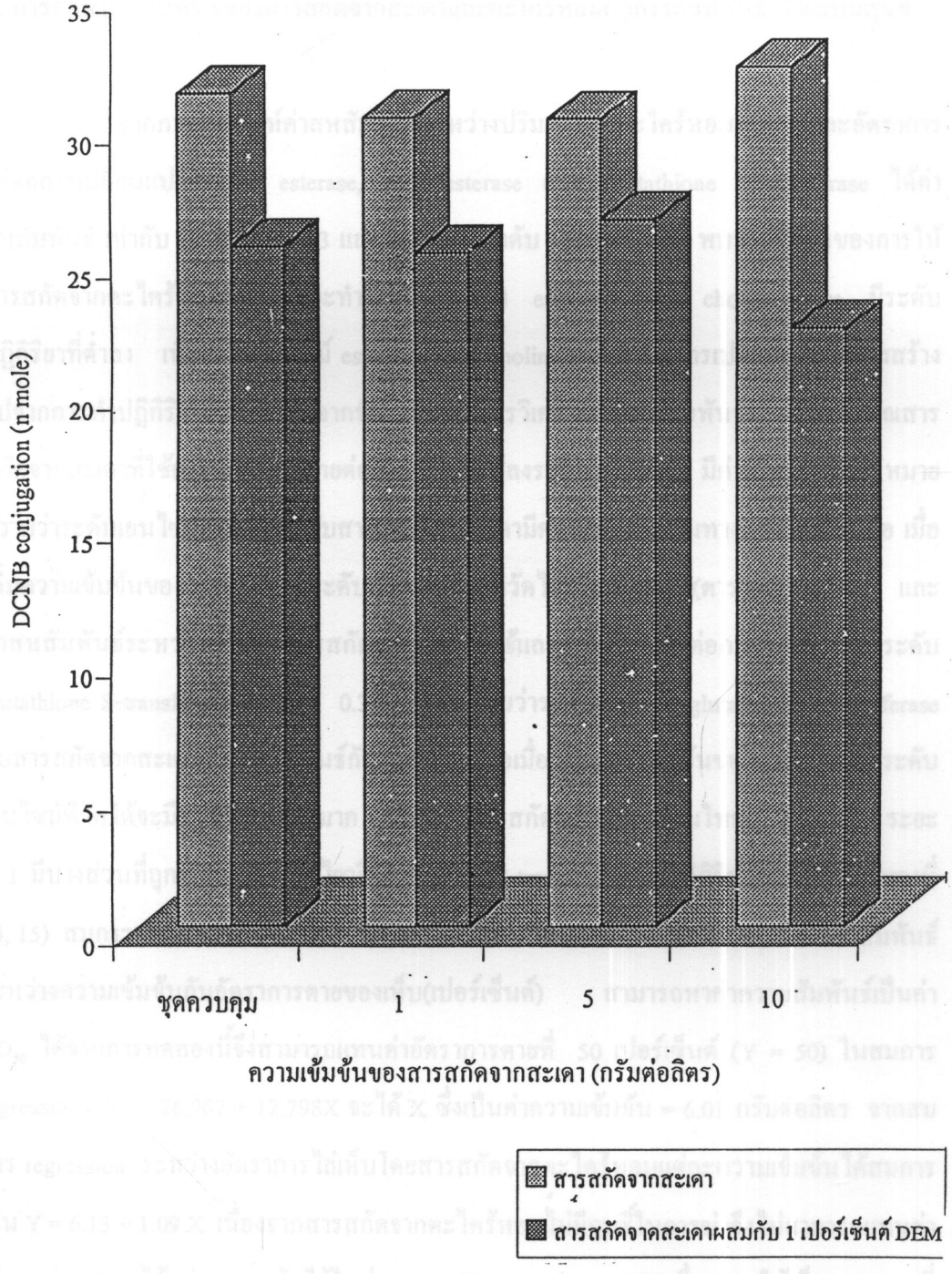


ภาพที่ 32 ฮีสโตแกรมแสดงผลของสารสกัดจากสะเดา และ 1 เปอร์เซ็นต์ TPP ต่อระดับ esterase ในเห็บสุนัข

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของระดับ glutathione S-transferase จากการทดลอง 3 ซ้ำ หลังจากได้รับการฉีดพ่นสารสกัดจากสะเดาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ DEM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจากสะเดา(กรัมต่อลิตร)	ระดับของเอนไซม์ glutathione S-transferase DCNB conjugated/ min/ mg/ tick (n mole)[1]	
	สารสกัดจากสะเดา	สารสกัดจากสะเดาผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ DEM
10	32.12 ± 8.64 ก	22.34 ± 5.23 ก
5	30.18 ± 7.46 ก	26.42 ± 6.41 ก
1	30.23 ± 8.23 ก	25.16 ± 8.64 ก
0	31.16 ± 10.42 ก	25.42 ± 7.41 ก

[1] ค่าเฉลี่ยตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน จะไม่แตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญ $P > 0.05$, DMRT



ภาพที่ 33 ฮีสโตแกรมแสดงผลของสารสกัดจากสะเดา และ 1 เปอร์เซ็นต์ DEM ต่อระดับ glutathione S- transferase ในเห็บสุนัข

6. การศึกษาสหสัมพันธ์ของสารสกัดจากสะเดาและตะไคร้หอมต่อการตอบสนองของเห็บสุนัข

จากการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของตะไคร้หอมที่ใช้ และอัตราการไล่ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ esterase, cholinesterase และ glutathione S-transferase ได้ค่าสหสัมพันธ์ เท่ากับ -0.770, -0.653 และ 0.09 ตามลำดับ (ตารางที่ 14) พบว่าปริมาณของการให้สารสกัดจากตะไคร้หอมที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณของ esterase และ cholinesterase มีระดับปฏิกิริยาที่ต่ำลง เนื่องจากเอนไซม์ esterase และ cholinesterase เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปจากการทำปฏิกิริยากับสารสกัดจากพืช และจากการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสกัดจากสะเดาที่ใช้และอัตราการตายต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ esterase มีค่าเป็น - 0.88 หมายความว่าระดับเอนไซม์ esterase กับสารสกัดจากสะเดามีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้าม คือ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดมากระดับของเอนไซม์ที่วัดได้ก็ยิ่งน้อยลง (ตารางที่ 13, 15) และค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสกัดจากสะเดาที่ใช้และอัตราการตายต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ glutathione S-transferase มีค่าเป็น 0.343 หมายความว่าระดับเอนไซม์ glutathione S-transferase กับสารสกัดจากสะเดามีความสัมพันธ์กันน้อยมาก คือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดมากระดับเอนไซม์ที่วัดได้จะมีค่าเพิ่มขึ้นน้อยมาก เนื่องจากสารสกัดจากสะเดาส่วนใหญ่ในปฏิกิริยา ระยะที่ 1 มีบางส่วนที่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ glutathione S-transferase ในปฏิกิริยาระยะที่ 2 (ตารางที่ 14, 15) สมการ regression ของเห็บที่ได้รับสารสกัดจากสะเดาเป็นสมการที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับอัตราการตายของเห็บ(เปอร์เซ็นต์) สามารถหาค่าความสัมพันธ์เป็นค่า LD_{50} ได้จากการทดลองนี้จึงสามารถแทนค่าอัตราการตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (Y = 50) ในสมการ regression Y = -26.967 + 12.798X จะได้ X ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้น = 6.01 กรัมต่อลิตร จากสมการ regression ระหว่างอัตราการไล่เห็บโดยสารสกัดจากตะไคร้หอมแต่ละความเข้มข้นได้สมการเป็น Y = 6.13 + 1.09 X เนื่องจากสารสกัดจากตะไคร้หอมไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าจึงไม่สามารถแทนค่าเพื่อหาค่า LD_{50} ได้แต่สามารถวัดได้ในค่าของ effective dose (ED) ซึ่งแสดงให้เห็นระยะทางที่เห็บตอบสนองโดยการหนีจากบริเวณที่ให้สารสกัดในอัตราความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 15 สมการ regression และค่าสหสัมพันธ์ หลังจากการได้รับสารสกัดจากสะเดา หรือสารสกัดจากตะไคร้หอม

ชนิดของสารสกัด	สมการ regression ของอัตราการตาย หรือไล่ต่อระดับความเข้มข้น[1,4]	ค่า correlation coefficiency การเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์[2,3]
สารสกัดตะไคร้หอม	$Y' = 6.13 + 1.09 X'$	Esterase = (-0.77) Cholinesterase = (-0.653) Glutathione S-transferase = (0.09)
สารสกัดสะเดา	$Y = -26.967 + 12.798 X$	Esterase = (-0.88) Glutathione S-transferase = (0.343)

[1] อัตราการตายของเห็บต่อความเข้มข้นสารสกัดสะเดา และอัตราการไล่ของเห็บต่อความเข้มข้นสารสกัดตะไคร้หอม

[2] การเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ esterase และ glutathion S-transferase ของระดับความเข้มข้นของสารสกัดสะเดาที่อัตราการตาย 24 ชั่วโมง

[3] การเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ esterase, cholinesterase และ glutathione S-transferase ของระดับความเข้มข้นของสารสกัดตะไคร้หอมที่อัตราการไล่ที่ 90 วินาที

X เป็นความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร) ; Y เป็นเปอร์เซ็นต์การตาย

$\acute{X}$ เป็นความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์) ; $\acute{Y}$ เป็นอัตราการไล่

[4] สมการ regression ได้จากการคำนวนผลการทดลองจากตารางที่ 5, 7

ตารางที่ 16 สมการ regression การหนีและค่า coefficient of determination (r^2)ของเห็บจากบริเวณที่ให้สารสกัดจากตะไคร้หอม

ความเข้มข้น	สมการ regression	r^2
10	Y = 0.854 + 0.1377X	0.9294
1.0	Y = 0.720 + 0.0980X	0.9271
0.1	Y = 0.102 + 0.0710X	0.9862
0.01	Y = 0.030 + 0.0640X	0.9804
0	Y = 0.628 + 0.0040X	0.2919

Y เป็นระยะทาง (เซนติเมตร)

X เป็นเวลา (วินาที)

ตารางที่ 17 สมการ regression การหนีและค่า coefficient of dermination (r^2) ของเห็บจากบริเวณที่ให้สารสกัดจากตะไคร้หอม ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ TPP

ความเข้มข้น(เปอร์เซ็นต์	สมการ regression	r^2
10	Y = 0.680 + 0.143X	0.9814
1.0	Y = 0.856 + 0.101X	0.8682
0.1	Y = 0.355 + 0.088X	0.6684
0.01	Y = 0.108 + 0.071X	0.9152
0	Y = 0.587 + 0.009X	0.4487

Y เป็นระยะทาง (เซนติเมตร)

X เป็นเวลา (วินาที)

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ทำลายพิษบางชนิดของเห็บสุนัขนี้ เพื่อหากลไกการทำลายพิษบางอย่าง ที่มีผลต่อการไล่และการตาย จากการใช้สารสกัดจากตะไคร้หอมและสารสกัดจากสะเดา แต่อย่างไรก็ตามกลไกเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์จากการได้รับสารสกัดจากตะไคร้หอมและสารสกัดจากสะเดาต่อเห็บสุนัข ยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษามาก่อน

การศึกษากลไกในเห็บสุนัขยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษามาก่อน และปัจจุบันการใช้สารเคมีสังเคราะห์ เป็นวิธีการที่ประชาชนเลือกใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูของสิ่งที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างมาก จากการใช้ที่ไม่ถูกวิธี อาจจะนำมาซึ่งผลเสียต่อสภาพแวดล้อมของผู้ใช้เอง และเป็นทางทำให้สัตว์ศัตรูเหล่านั้นสร้างความต้านทาน โดยกลไกการทำงานของเอนไซม์ทำลายพิษที่สิ่งที่มีชีวิตเหล่านั้นสร้างขึ้น (สุรพล, 2536) เมื่อเทียบกับปี พ.ศ. 2500 ไม่พบว่ามีการสร้างความต้านทานของแมลงศัตรูพืชเลยซึ่งในขณะนั้นมีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชเพียง 20 ชนิด (อำพล, 2540) ซึ่งปัจจุบันพบว่ามีแมลงศัตรูพืชประมาณ 500 ชนิด ได้สร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงเพิ่มขึ้น ในขณะที่มีมากกว่า 300 ชนิดของสารฆ่าแมลงศัตรูพืชที่กำลังใช้ในประเทศไทย การใช้สารสกัดจากพืชเป็นทางเลือกให้กับเกษตรกรอีกวิธีการหนึ่งที่ช่วยลดปัญหาดังกล่าว

ปัจจุบันการใช้สารสกัดจากพืชเริ่มมีความสำคัญและมีผู้นำกลับมาใช้เพื่อป้องกันและกำจัดศัตรูพืชอีกครั้งหนึ่ง จากการศึกษาของนักวิจัย พบว่าสารสกัดจากตะไคร้หอม และสารสกัดจากสะเดามีฤทธิ์ในการไล่และกำจัดแมลงศัตรูพืช นอกจากช่วยลดประชากรของศัตรูพืชแล้วการใช้สารสกัดจากพืช ยังช่วยลดปัญหาสารพิษตกค้างและลดกลไกการสร้างความต้านทานที่จะเกิดจากศัตรูพืชเหล่านั้นอีกด้วย (Yu, 1983 and Visetson, 1995) ความรู้เกี่ยวกับกลไกการทำลายพิษและกลไกที่ทำให้เกิดการตอบสนองของสิ่งที่มีชีวิตต่อสารพิษ จะเป็นแนวทางในการศึกษาแนวโน้มการสร้างความต้านทานและการใช้สารเพิ่มประสิทธิภาพสารเสริมฤทธิ์ต่อไป

การสกัดสารจากตะไคร้หอมและสารสกัดจากสะเดาที่ศึกษานี้ ใช้วิธี water distillation ของ (พรรณีกา และคณะ, 2538; ขวัญชัย และคณะ, 2523 และ ช่อผกา, 2539) และ soxhlet extraction (Chavan, 1983, Africa and Mabesa, 1984) หลังจากสกัดสารได้ตามที่ต้องการแล้ว จึงนำสารสกัดที่ได้มาตรวจหาสารสำคัญ คือ citronellal ,citronellol และ azadirachtin A โดยวิธีการ Thin layer chromatography ก่อนทำการทดลองต่อไป แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการทดลองพบว่าการตอบสนองของสิ่งที่มีชีวิตต่อสารสกัดจะไม่ขึ้นอยู่กับสารสำคัญเพียงอย่างเดียว แต่จะพบปัจจัยที่เกี่ยวกับการทำงานร่วมกันของสารประกอบในสารสกัด (crude extracts) อยู่หลายชนิดด้วยกัน เช่น ในสะเดาประกอบด้วยสาร azadirachtin, nimbin, salannin (Schmutterer, 1990) ซึ่งออกฤทธิ์ในการควบคุมการเจริญเติบโต จากการทดลองของ Rembold et. al., (1983) พบว่า azadirachtin มี 4 ชนิด จะออกฤทธิ์คล้ายคลึงกันและได้ทดสอบใน *Locusta migratoria* เพศเมียที่เจริญเต็มวัยพบว่า juvinile homone ลดลงและยับยั้งการพัฒนาของไข่แต่เมื่อทดสอบกับตัวอ่อน ระยะสุดท้ายจะป้องกันหรือ ชลอการลอกคราบ นอกจากนี้สารสกัดจากตะไคร้หอมประกอบด้วยสารซึ่งมีฤทธิ์ในการชลอการสืบพันธุ์ (Singh et. al., 1989) และยับยั้งการวางไข่และการกินอาหาร (Sharaby, 1988) ทำให้สิ่งที่มีชีวิตแสดงผลตอบสนองออกมา ซึ่ง Schmutterer (1990) พบว่าปริมาณสาร azadirachtin มิได้เป็นตัวบ่งความเป็นพิษจากสารสกัดจากสะเดาเพียงสารเดียว แต่การแสดงความเป็นพิษของสิ่งที่มีชีวิตจะเกิดจากสภาวะการเสริมฤทธิ์กันภายในสารสกัดที่สกัดได้

1. การศึกษาการหนีของเห็บจากบริเวณที่ให้สารสกัดจากตะไคร้หอม พบว่าอัตราการหนีจะแปรผันตามเวลาที่ผ่านไป โดยการตอบสนองจะเป็นเส้นตรง เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น จากตารางที่ 16, 17 พบว่าค่า coefficient of determination ของการตอบสนองระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดในระดับต่าง ๆ ต่อการหนีของเห็บในช่วงเวลา 120 วินาที และการผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ TPP มีค่าสูงดังสมการเส้นตรงที่เกิดขึ้นจากการให้สารสกัดที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ มีค่า coefficient of determination = 0.9804 และสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ TPP มีค่า coefficient of determination = 0.9152 ซึ่งสามารถแทนด้วยสมการ

$Y = 0.030 + 0.064\ X$ และ $Y = 0.108 + 0.071\ X$ ตามลำดับจะเป็นสมการที่ใช้ทำนายการตอบสนองที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากค่าการไล่มีการตอบสนองอยู่ในเส้นตรงเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบเวลากับชุดควบคุม ซึ่งมีค่า coefficient of determination = 0.2919 และ 0.4487 ตามลำดับ จากตารางที่ 16 สมการเส้นตรงในระดับที่ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ของสารสกัดจะให้ค่า coefficient of determinationของการตอบสนองสูง (0.9804) โดยให้การหนีเหมาะสมที่สุดเป็น 8.4 ± 1.2 เซนติเมตร (ตารางที่5) ภายใน 120 วินาที และเมื่อใช้สาร 1 เปอร์เซ็นต์ TPP ผสมในสารสกัดจะให้ค่า coefficient of determination เป็น 0.9152 และพบว่าทุกความเข้มข้นของสารสกัดจะให้การหนีของเห็บแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติที่ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และการผสมสาร 1 เปอร์เซ็นต์ TPP จะทำให้การตอบสนองรวดเร็วกว่าการไม่ใช้สารเสริมฤทธิ์ (ตารางที่ 5, 6) ผลของสารสกัดจากตะไคร้หอมในการไล่เห็บซึ่งเป็น ectoparasites นี้สอดคล้องกับการทดลองของ เชิดชัยและคณะ (2539) ได้สกัดสารจากตะไคร้หอมโดยวิธีแช่ในแอลกอฮอล์ และเจือจางด้วยน้ำ พบว่าสามารถไล่เหาไก่ และไรไก่ ได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้สารระเหยที่ได้จากพืชบางชนิดนอกจากตะไคร้หอมเช่น ข่า (galanga) ซึ่งมีสารในกลุ่ม geraniol ก็สามารถไล่แมลงวันที่ทำให้เกิดหนอนในมูลสุกร จากการรายงานของ อัศวิน (2535) พบว่าสารสกัดจากข่าที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถควบคุมหนอนแมลงวันได้ดีถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ ธารี (2539) ซึ่งได้ศึกษาผลของสารสกัดจากข่าต่อการตายของหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) สามารถทำให้หนอนตายถึง 30 เปอร์เซ็นต์

1.1 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากตะไคร้หอมความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ของอัตราส่วนผสม จะทำให้การตอบสนองของปฏิกิริยาเอนไซม์ทั้ง esterase และ cholinesterase ต่อสารสกัดเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเทียบกับปฏิกิริยาของเอนไซม์ ในตารางที่ 10 จะพบว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์ esterase อยู่ในระดับ 10.67 ± 2.64 n mole paranitrophenol production และ cholinesterase อยู่ในระดับ 2.13 ± 1.00 n mole thiocholine production ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่มีการตอบสนองต่ำสุด จากการวิเคราะห์ระดับของเอนไซม์ทั้งสอง พบว่าสารสกัดจากตะไคร้หอมจะทำให้เอนไซม์ esterase และ cholinesterase มีปฏิกิริยาลดลงจากชุดควบคุม ประมาณ 30 - 60 เปอร์เซ็นต์

ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 0.1 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้น่าจะเป็นกลไกหนึ่งของการหลีกหนีของเห็บ เนื่องจากเห็บมีความอ่อนแอลง อาจเนื่องจากสารสกัดจากตะไคร้หอมไปมีผลในการหยุดการทำงานของเอนไซม์ทั้งสอง สอดคล้องกับการทดลองของ Yu (1989) พบว่าสารสกัดจากพืชหลายชนิดจะไปยั้บยั้ง การทำงานของเอนไซม์โดยจะไปจับกับตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยา ของเอนไซม์ในลักษณะของ nonspecific noncompettitive inhibition ซึ่งจะทำให้สิ่งที่มีชีวิตแสดงค่าของปฏิกิริยาเอนไซม์ทำลายพิษที่ต่ำกว่าปกติ

1.2 จากการใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ TPP ผสมในสารสกัด พบว่าอัตราการหนีของเห็บจะเร็วขึ้น 5 เปอร์เซ็นต์นั้น (ตารางที่ 5, 6) ชี้ให้เห็นอีกทางหนึ่งว่า เมื่อเห็บได้รับความเป็นพิษจากสารสกัดจากตะไคร้หอมมากขึ้นอาจเนื่องจาก TPP จะไปลดการทำงานของเอนไซม์ (esterase และ cholinesterase) ทำให้เห็บจำเป็นต้องหนีจากสารสกัดจากตะไคร้หอมให้เร็วขึ้นเมื่อนำเห็บที่ได้รับสารสกัดจากตะไคร้หอมที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ไปวัดระดับของเอนไซม์ esterase และ สารสกัดจากตะไคร้หอมที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไปวัดระดับของเอนไซม์ cholinesterase พบว่าเอนไซม์ทั้งสองจะมีปริมาณลดลงไปจากเดิมที่มิได้ผสมสารดังกล่าว อีกประมาณ 30 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (และตารางที่ 11) ซึ่งเป็นการชี้ให้เห็นชัดว่าการใช้สารสกัดจากตะไคร้หอมนี้จะมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิด ซึ่งพบว่าที่ปริมาณของสารสกัด 0.01 เปอร์เซ็นต์ โดยผสมสาร 1 เปอร์เซ็นต์ TPP จะให้ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ esterase เป็น 10.41 ± 1.23 n mole paranitrophenol production/ min/ mg tick และที่ความเข้มข้นของสาร 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยผสม 1 เปอร์เซ็นต์ TPP จะให้ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ cholinesterase เป็น 1.62 ± 1.12 n mole thiocholine production/ min/ mg tick (ตารางที่ 11) ซึ่งปฏิกิริยาจากเอนไซม์ทั้งสองเป็นปฏิกิริยาในระยะที่ 1 ชนิด hydrolysis และจากการวิจัยพบว่าน่าจะมีปฏิกิริยาใน ระยะที่ 2 ซึ่งเป็นการ conjugation ของสาร alleochemical ที่ได้จากสารสกัดดังกล่าวกับ endogenous compounds ที่เซลล์สร้างขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม glutathione S-transferase จึงนำ

เห็บที่ได้รับสารสกัดจากตะไคร้หอมดังกล่าวไปหาปฏิกิริยาของเอนไซม์ในระยะที่ 2 โดยวิธี Kotze (1989)

1.3 จากการศึกษาปฏิกิริยาของ glutathione S-transferase พบว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังกล่าวไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยแสดงความแตกต่างระหว่างชุดควบคุมและการให้สารสกัด 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็น 36.41 $\pm$ 8.12 และ 30.14 $\pm$ 8.16 n mole DCNB conjugated/ min/ mg tick ตามลำดับ (ตารางที่ 12) และการใช้สาร 1 เปอร์เซ็นต์ DEM ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ glutathione S-transferase พบว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็น 30.16 $\pm$ 11.23 และ 26.14 $\pm$ 2.12 n mole DCNB conjugated/ min/ mg tick ในชุดควบคุม และที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นน่าจะเป็นไปได้ว่าเอนไซม์นี้ไม่มีผลต่อการทำลายความเป็นพิษของสารสกัดจากตะไคร้หอม ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นไปในทางเดียวกับ การทดลองของ ประพิศ (2539) ซึ่งได้ทำการทดลองสารสกัดจากสะเดาที่มีผลต่อระดับเอนไซม์ขจัดพิษของด้วงถั่ว ในระดับความเข้มข้น 10, 30 และ 50 ppm. ผลปรากฏว่าระดับเอนไซม์ esterase เปลี่ยนแปลงในทางลดลง 20-50 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 30 ppm. ขึ้นไป ระดับเอนไซม์ glutathione S-transferase มีการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจนและการทดลองของ มนัญญา (2540) ซึ่งได้ทำการทดลองสารสกัดจากใบสาบเสือ ต่อการตายของหนอนใยผัก (Pleutella xylostella) ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ขจัดพิษ esterase และ glutathione S-transferase พบว่า เอนไซม์ทั้งสองของหนอนใยผักรุ่นที่ 1 รุ่นที่ 2 และรุ่นที่ 3 ที่เลี้ยงด้วยคะน้าชุบสารสกัดจากใบสาบเสือ ที่ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์, 0.25 เปอร์เซ็นต์ และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ glutathione S-transferase มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นประมาณ 5 และ 20 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองของ มนัญญา และ ประพิศ แสดงให้เห็นว่าระบบการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยาระยะที่ 2 ระหว่างด้วงถั่ว หนอนใยผัก และเห็บ น่าจะใกล้เคียงกันในการลดความเป็นพิษจากสารพิษที่ได้รับ

1.4 การหาปริมาณของโปรตีนรวมในเห็บหลังจากให้สารสกัดจากตะไคร้หอม เพื่อดูค่าปริมาณโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไป พบว่าปริมาณโปรตีนไม่เปลี่ยนแปลงในทุกความเข้มข้นของสารสกัดจากตะไคร้หอมที่ทำการทดลอง (ตารางที่ 8) แสดงว่าการใช้ค่าปริมาณของโปรตีนรวมไม่สามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลง และความแตกต่างภายในสิ่งที่มีชีวิตชนิดนี้ หลังจากที่ได้รับสารจากภายนอกเข้าไปในระยะเวลาสั้น ๆ ได้ ซึ่ง Visetson, 1991 ได้ให้ความเห็นว่าเนื่องจากโปรตีนทุกชนิดที่เกิดขึ้นไม่ได้มีหน้าที่ในการรับผิดชอบการเมตาบอลิซึม ของสารแปลกปลอม ที่เป็น allelochemical ในสิ่งที่มีชีวิตดังนั้นต้องแยกชนิดของโปรตีนที่เฉพาะเจาะจงในการทำงานที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ทำลายพิษเท่านั้น และนอกจากนี้ในส่วนของ detoxification enzymes เองก็จะมีรูปแบบ (form) ที่มีผลต่อการทำลายพิษที่แตกต่างกันด้วย จึงจำเป็นต้องใช้ specific substrate เพื่อเลือกเฉพาะเอนไซม์ที่เหมาะสมเท่านั้นมาทำการศึกษา และการศึกษากลไกทางชีวเคมีเกี่ยวกับการยับยั้งการทำงานที่ดีจำเป็นต้องใช้สารในกลุ่มเดียวกันสองชนิด เพื่อดูความแตกต่างที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งในที่นี้ได้สกัดสารจากสะเดาซึ่งเป็นสารสกัดจากพืชที่ดีอีกชนิดหนึ่ง (Yu, 1984) จึงมีการศึกษาผลของสารสกัดจากสะเดาเพื่อดูผลของสารสกัดสะเดากับการตอบสนองในเห็บต่อไป

2. จากการศึกษาอัตราการตายจากสารสกัดจากสะเดา (ตารางที่ 7) พบว่าอัตราการตายของเห็บจะอยู่ระหว่าง 10.1 $\pm$ 1.6 ถึง 52.6 $\pm$ 11.5 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 1-10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งการป้องกันกำจัดแมลงโดยสารสกัดจากสะเดาเป็นที่ยอมรับกันในหมู่ของนักกีฏและสัตววิทยา โดยมีการยืนยันจาก สุรพล (2536) ว่าสารสกัดจากสะเดาสามารถให้ผลในการป้องกันกำจัดตัวอ่อนแมลงใน Order Lepidoptera เช่น หนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) หนอนเจาะสมออเมริกัน (*Heliothis armigera*) ด้วงงวงข้าว (*Sitophilus oryzae*) และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilapavata lugens*) การใช้สารสกัดจากสะเดายังสามารถใช้กำจัดแมลงศัตรูภายนอกชนิดอื่น ๆ ได้อีกด้วย เช่น ไรไก่ เหาไก่ (เชิดชัย และคณะ 2539 และ พรรณีกา 2538) นอกจากนี้ Schmuttrer (1991) รายงานว่าสารสกัดจากสะเดาน่าจะเป็นสารสกัดจากพืชที่สามารถนำมาใช้เป็นทางเลือกในการลดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากการใช้สารฆ่าแมลงในประเทศที่กำลังพัฒนาที่มีปัจจัยทางการ

เกษตรเป็นปัจจัยพื้นฐานได้ และนอกจากนี้การใช้สารเสริมฤทธิ์ ยังสามารถที่จะทำให้สารทดลองดังกล่าวมีฤทธิ์สูงขึ้น (สุรพล, 2528) ดังนั้นจึงใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ TPP และ 1 เปอร์เซ็นต์ DEM เพื่อศึกษาการเพิ่มฤทธิ์ดังกล่าว

2.1 ในการเติม 1 เปอร์เซ็นต์ TPP ในสารสกัดสะเดาจากการทดลองนี้ พบว่าอัตราการตายจะเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 35 เปอร์เซ็นต์ ทุกความเข้มข้น (ตารางที่ 7) ส่วนการผสม 1 เปอร์เซ็นต์ DEM จะทำให้เห็บตายในปริมาณที่ใกล้เคียงกับการใช้สารสกัดจากสะเดาและการผสม 1 เปอร์เซ็นต์ TPP ในสารสกัดจากสะเดา และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการไม่ใช้สารสารเสริมฤทธิ์ ซึ่งเป็นการยืนยันการทดลองของ สุรพล (2528)

2.2 จากการวัดระดับของเอนไซม์พบว่าสารสกัดจากสะเดาทุกความเข้มข้นจะให้ทำปริมาณของ esterase ลดลงประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์เทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 13) โดยระดับของ esterase จะอยู่ระหว่าง 16.23 $\pm$ 3.62 และ 10.14 $\pm$ 4.12 n mole paranitrophenol production/ min/ mg tick ที่ความเข้มข้นสารสกัดจากสะเดาเป็น 0.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และการใส่ 1 เปอร์เซ็นต์ TPP ผสมกับสารสกัดจากสะเดา จะทำให้ปฏิกิริยาของ esterase ลดลงประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ โดยมีระดับของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 10.16 $\pm$ 1.23 ถึง 8.24 $\pm$ 1.2 n mole paranitrophenol production/ min/ mg tick ตามลำดับ (ตารางที่ 13) ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากสะเดามีผลต่อระดับของ esterase จริง ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกับ ประพิศ (2539) ซึ่งได้พบว่าสารสกัดจากสะเดาสามารถลดปฏิกิริยา esteraseในด้วงถั่วได้ถึง 20 เปอร์เซ็นต์

2.3 ถึงแม้ว่าการใช้สารสกัดจากสะเดาจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาของ glutathione S-transferase (ตารางที่ 13) ซึ่งมีระดับของเอนไซม์ดังกล่าวอยู่ระหว่าง 31.16 $\pm$ 10.42 และ 32.12 $\pm$ 8.64 n mole DCNB conjugated/ min/ mg tick ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็ตามแต่การผสม 1 เปอร์เซ็นต์ DEM ก็จะช่วยลดปฏิกิริยาของ glutathione S-transferase ลงประมาณ 20 เปอร์เซนต์ เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 14) ซึ่งให้ค่าปฏิกิริยาอยู่ระหว่าง 25.42 $\pm$ 7.41 และ 22.34 $\pm$ 5.23 n mole DCNB conjugated/ min/ mg tick ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากสะเดา 0

และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ถึงแม้ว่าปฏิกิริยาไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ก็เป็นการยืนยันความเป็นพิษต่อเห็บที่แสดงการตอบสนองของการตายที่เพิ่มขึ้นในตารางที่ 7 การที่สารสกัดจากสะเดาไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับปฏิกิริยาของ glutathione S-transferase มากเท่ากับการตอบสนองในแง่ของอัตราการตายนั้น อาจเนื่องมาจากสารสกัดจากสะเดาอาจจะถูกปฏิกิริยาใน ระยะที่ 1 ทำปฏิกิริยาไปจนหมดก่อนที่จะมาถึงปฏิกิริยาใน ระยะที่ 2 ซึ่งเป็นการ conjugation จากกลุ่มของเอนไซม์นี้ ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นไปในทางเดียวกับ ประพิศ (2539) ซึ่งทำการศึกษาสารสกัดนี้กับด้วงถั่ว แต่แตกต่างจาก ธารี (2539) ซึ่งได้ทดลองสารสกัดจากข่าในหนอนใยผัก พบว่าสารสกัดจากข่าจะไปเพิ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ glutathione S-transferase ซึ่งอาจจะสรุปได้ว่าสิ่งที่มีชีวิตต่างชนิดกันมีการตอบสนองต่อสารต่างชนิดกันทำให้เอนไซม์ชนิดเดียวกันมีประสิทธิภาพไม่เท่ากัน แต่อย่างไรก็ตามการที่ให้สาร 1 เปอร์เซ็นต์ DEM ทำให้อัตราการตายสูงขึ้นในการทดลองนี้ อาจเป็นผลเนื่องมาจาก DEM ไม่ใช่สาร specific inhibitor ซึ่งมีผู้รายงานว่าสามารถที่จะไปหยุดการทำงานของ monooxygenase ได้ในแมลงบางชนิด และเมื่อเป็นเช่นนี้สารสกัดจากสะเดาก็น่าที่จะมีผลต่อ monooxygenase ด้วย ซึ่งน่าจะทำการศึกษาต่อไปในแง่ลึก ซึ่งเกี่ยวกับการ purification ของ isozyme ใน monooxygenase แต่เนื่องจากการขาดแคลนเครื่องมือ งบประมาณ และระยะเวลาการศึกษามีจำกัด จึงน่าที่จะเป็นแนวทางที่ควรทำการศึกษาต่อไปเมื่อมีโอกาส

2.4 ได้มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณของโปรตีน หลังจากที่เห็บได้รับสารสกัดจากสะเดาพบว่าปริมาณของโปรตีนไม่มีการเปลี่ยนแปลงทุกระดับของสารสกัดจากสะเดา (ตารางที่ 9) ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าปริมาณของโปรตีนไม่มีผลต่อการศึกษากลไกของการเปลี่ยนแปลงจากการสัมผัสกับสารสกัดจากสะเดา

3. จากการศึกษาสมการ regression (ตารางที่ 15) ระหว่างอัตราการเดินหนีของเห็บโดยสารสกัดจากตะไคร้หอมและสารสกัดจากสะเดาแต่ละความเข้มข้น ได้สมการ regression เป็น 2 สมการ คือสมการของสารสกัดจากตะไคร้หอมเป็น $Y = 6.13 + 1.09\ X$ (X เป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากตะไคร้หอม หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์, Y เป็นค่าการหนีหน่วยเป็นเซนติเมตร) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เห็บในตัวสุนัขอาจมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสารสกัดแตกต่างจากเห็บที่ใช้ทดลองนี้ ความ

เข้มข้น (effective dose) ที่จะทำให้เห็บหนีให้พ้นตัวสุนัข จะต้องใช้สารสกัดในอัตราความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

เนื่องจากให้ค่า correlation of determination (r^2) เป็น 0.9862 ในขณะที่ได้ค่าสมการ regression จากความเข้มข้นของสารสกัดจากสะเดาต่ออัตราการตายเป็น Y = - 26.967 + 12.798 X (X เป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร, Y เป็นอัตราการตายหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์) ซึ่งสามารถหาอัตราการตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของเห็บได้เป็น 6.01 กรัมต่อลิตร

จากการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (ตารางที่ 15) พบว่าอัตราการเดินหนีของเห็บจากสารสกัดจากตะไคร้หอมเป็น negative correlation กับเอนไซม์ esterase (r = -0.77) และ cholinesterase (r = -0.65) แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับปฏิกิริยาของ glutathione S-transferase (r = 0.090) ในขณะเดียวกันอัตราการตายของเห็บจากสารสกัดจากสะเดาก็จะเกิดจาก negative correlation กับเอนไซม์ esterase (r = -0.88) และมี แนวโน้มทำให้ปฏิกิริยาของ glutathione S-transferase (r = 0.34) เพิ่มขึ้นซึ่งสามารถสรุปว่า สารสกัดจากตะไคร้หอมและสารสกัดจากสะเดาในเห็บมีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ esterases และ cholinesterase และเนื่องจากปฏิกิริยาที่ได้จากเอนไซม์ทั้งสองนี้อยู่ใน ระยะที่ 1 ดังนั้นสารสกัดที่จะผ่านไปยัง ระยะที่2 ซึ่งเป็นปฏิกิริยาของการ conjugation โดย glutathione S-transferase จึงเห็นไม่ชัดเจน

อย่างไรก็ตามเนื่องจากเอนไซม์ที่ทำการทดลองเป็นเอนไซม์ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ ปฏิกิริยาอาจจะมีผลของตัวยับยั้งซึ่งอาจจะมีเจือปนอยู่แม้จะใส่สาร PVPP ในขณะสกัดเอนไซม์จากเห็บแล้วก็ตาม ดังนั้นถ้ามีการศึกษาต่อไปน่าทำการศึกษาโดยนำเอนไซม์เหล่านี้ผ่านขบวนการ enzyme purification โดยใช้วิธีการ ion exchange chromatography และมีการตรวจวิเคราะห์ product จากการ metabolism โดย high performace liquid chromatography ต่อไป ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่จะรู้ปฏิกิริยาทางชีวเคมีและสารประกอบในเชิงคุณภาพที่ควรทำในการศึกษาทางพิษวิทยาขั้นสูงของสารพิษจากพืชดังกล่าว

สรุป

การศึกษานี้ทำให้ทราบผลของสารสกัดจากตะไคร้หอมและสะเดาต่อการตอบสนองของเห็บและการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ทำลายพิษบางชนิดของเห็บ เพื่อเป็นแนวทางทำให้รู้กลไกการทำลายพิษ หลังจากที่เห็บได้รับสารสกัดทั้งสอง ในการศึกษานี้ได้ศึกษาการไล่เห็บโดยใช้สารสกัดจากตะไคร้หอม และการตายของเห็บจากการใช้สารสกัดจากสะเดา เปรียบเทียบกับการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ทำลายพิษบางอย่าง เช่น esterase, cholinesterase และ glutathione S-transferase ในแต่ละการทดลอง การสกัดสารจากพืชทั้งสองชนิดใช้วิธีการของ (สุรพล, 2536 และ พรรณิกา และคณะ, 2538) และทำการวิเคราะห์คุณภาพสารสกัดโดยวิธีการ Thin layer chromatography ก่อนศึกษาประสิทธิภาพ

จากการทดลองโดยใช้สารสกัดจากตะไคร้หอม พบว่าที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการหนีของเห็บ โดยให้ค่าสมการเส้นตรงของการหนีเป็น $Y = 0.030 + 0.064 X$ และเมื่อผสมสารเพิ่มประสิทธิภาพ 1 เปอร์เซ็นต์ TPP จะทำให้สมการการหนีของเห็บเปลี่ยนเป็น $Y = 0.108 + 0.071 X$ ที่0.01 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารสกัดดังกล่าวจะทำให้การหนีของเห็บเป็นระยะทาง 8.4 $\pm$ 1.2 เซนติเมตร และ 8.6 $\pm$ 2.1 เซนติเมตร ใน 120 วินาที จากการวิเคราะห์ระดับของเอนไซม์ทำลายพิษ พบว่าเอนไซม์ esterases, cholinesterase ลดลง 30-60 เปอร์เซ็นต์ จากปฏิกิริยาเริ่มต้น ในขณะที่ glutathione S-transferase ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ส่วนสารสกัดจากสะเดาที่ความเข้มข้นระหว่าง 1-10 กรัมต่อลิตร จะทำให้เห็บตายระหว่าง 10.10 $\pm$ 1.6 ถึง 52.6 + 11.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผสมสารเพิ่มประสิทธิภาพ 1 เปอร์เซ็นต์ TPP จะทำให้การตายเพิ่มเป็น 16.2 $\pm$ 1.7 และ 74.4 $\pm$ 11.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ทำลายพิษ พบว่าเอนไซม์ esterase ลดลงประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาณเริ่มต้นและ

เมื่อผสมสารเพิ่มประสิทธิภาพจะทำให้ระดับเอนไซม์ลดลงไปจากเดิมอีกประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วน glutathione S-transferase ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สมการ regression ระหว่างระยะทางที่เห็บเดินหนีกับความเข้มข้นของสารสกัดจากตะไคร้หอมและสารสกัดจากสะเดาต่างพบว่าได้สมการเป็น $Y = 6.13 + 1.09 X$ และค่า effective dose เป็น 0.01เปอร์เซ็นต์ และสมการ regression ของสารสกัดสะเดาต่อการตายของเห็บเป็น $Y = -26.967 + 12.798 X$ ซึ่งจะได้ค่า LD_{50} เป็น 6.01 กรัมต่อลิตร ระหว่างการไล่เห็บจากสารสกัดตะไคร้หอม และปฏิกิริยาเอนไซม์ esterase, cholinesterase จะเป็น -0.77 และ -0.65 ตามลำดับ ในขณะที่อัตราการตายของเห็บจากสารสกัดสะเดา และ esterase เป็น -0.88 ส่วน ของการตอบสนองต่อสารสกัดทั้งสองไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ต่อปฏิกิริยาของ glutathione S-transferase อย่างเด่นชัด ($r = 0.09$ และ 0.34 ตามลำดับ)

ดังนั้น ผลที่ได้จากการทดลองนี้จึงเป็นแนวทางที่จะนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคตโดย

1 สามารถนำวิธีการวิเคราะห์เอนไซม์ทำลายพิษมาศึกษาการสร้างความต้านทานต่อสารสกัดของแมลงในรุ่นลูกเนื่องจากมีการตอบสนองของเอนไซม์ในปฏิกิริยาระยะที่ 2 ในสารสกัดจากสะเดา ซึ่งเป็นทางหนึ่งที่ชี้ให้เห็นว่าแมลงอาจมีการสร้างความต้านทานต่อสารสกัดจากพืชบางชนิดได้

2 สารสกัดจากตะไคร้หอมและสะเดามีผลต่อการยับยั้งการพัฒนาของไข่ (Rembold and Sieber, 1981 and Sharaby, 1988) จึงควรจะศึกษาวิจัยต่อไปว่า เมื่อเห็บหรือแมลงได้รับสารสกัดจากพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ในระดับที่ไม่ตาย แล้วจะมีผลต่อระบบสืบพันธ์เพศผู้หรือเพศเมียอย่างไร ซึ่งจะเป็นแนวทางในการควบคุมประชากรแมลงได้อีกด้วย

3 สามารถนำสารสกัดจากตะไคร้หอมหรือสารสกัดจากสะเดามาทำเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดเห็บสุนัขในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กีฏ และสัตววิทยา, กอง. 2539. คำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลงและศัตรูพืช. กรมวิชาการเกษตร เอกสารวิชาการ. วารสารกีฏและสัตววิทยา 17(3) : 197-198.

เกรียงไกร จำเริญมา เตือนจิตต์ สัตยาวิรุฑธ์ และ วรัญญา ตันติยุทธ. 2540. ประสิทธิภาพของสารสกัดสะเดากับหนอนกระทู้หอม. วารสารกีฏและสัตววิทยา 19(2) : 78-88.

ขวัญชัย สุวรรณสัมฤทธิ์ ไพบูลย์ ธรรมรัตนวาสิก พิพัฒน์ ภูริปัญญาคุณ กรรณิการ์ สถาปิตานนท์ และ อัจฉรา พันธุ์รักวงศ์. 2523. การกลั่นน้ำมันตะไคร้หอมด้วยไอน้ำ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ. 61 น.

ครรชิต พุทธโกษา อมรา ไตรศิริ และ สำรวย ปลูกงาม. 2534. การศึกษาปริมาณหนอนเจาะสมอฝ้ายในสภาพไร่ที่ปลูกตะไคร้หอมในแปลงฝ้าย. รายงานผลงานวิจัยประจำปี ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ นครสวรรค์. 64 น.

งามผ่อง คงคาทิพย์. 2537. เคมีของสะเดาและวิธีการกำจัดสารจากสะเดา. เอกสารประกอบการบรรยายการฝึกอบรมเชิงวิชาการ การใช้สารสกัดสะเดาในการป้องกันและกำจัดแมลง ครั้งที่ 3. 78 น.

ช่อผกา ชัยวิเศษวิทยา. 2539. น้ำมันหอมจากพืชธรรมชาติของไทย วิชาการปริทัศน์ 4(9) : 26-29.

ชัยพัฒน์ จิระธรรมจารี. 2539. ทำอย่างไรจึงจะใช้สารสกัดสะเดาให้ได้ผล. วารสารกีฏและสัตววิทยา 18(1) : 55-60.

ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแล้ว ธีรยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และ ปัญญา เต็มเจริญ. 2539. หลักการทางพิษวิทยา ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. 211 น.

เชาวร์ เสาวลักษณ์. 2537. ประสบการณ์การส่งเสริมการใช้สารสกัดจากพืชในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชเอกสารประกอบคำบรรยาย การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ การใช้สารสกัดสะเดาในการป้องกันและกำจัดแมลง ครั้งที่ 3. 78 น.

เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล ประเสริฐ วงค์น่าค สิทธิโชค เอกผักนาก และ สุรพัฒน์ เลาหวนิช. 2539. ผลของสารสกัดพืชสมุนไพรบางชนิดในการฆ่าไรและเหาของไก่พื้นเมือง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34. 311 น.

ณรงค์ จึงสมานญาติ และ วิระพล จันทร์สวรรค์. 2540. ผลของมะขามเปียกต่อเห็บโค. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ครั้งที่ 35. 138 น.

ถาวร ท้วมเจริญ. 2534. การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากสะเดาต่อแมลง. ข่าวสารวัตถุมีพิษ 18 : 2.

ทิพย์พรรณ สดากร. 2536. รวบรวมและศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชที่มีสารกำจัดศัตรูพืช. ข่าวพฤกษศาสตร์และวัชพืช 6(3) : 4.

เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ วัฒนา จารณศรี และ มานิตา คงชื่นสิน. 2539. ประสิทธิภาพของสารฆ่าไร และสารสกัดจากสะเดาต่อไรสนิมส้ม และผลกระทบต่อศัตรูธรรมชาติ. วารสารกีฏและสัตววิทยา 18(2) : 85-95.

ธารี วัฒนสมบัติ. 2539. ประสิทธิภาพของสารสกัดข่าที่มีต่ออัตราการตายและระดับเอนไซม์ของหนอนใยผัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

ประเทืองศรี สินชัยศรี. 2539. น้ำมันหอมระเหย. กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 12 น.

ประพิศ วองเทียม. 2539. ผลของสารสกัดจากสะเดาต่อระดับเอนไซม์ขจัดพิษของด้วงถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

พรรณีกา อัตตนนท์ วินัย ปีติยนต์ และ ถาวร ท้วมเจริญ. 2538. การสกัดตะไคร้หอมโดยวิธีการต่าง ๆ. ข่าวสารวัตถุมีพิษ 24(2) : 83.

มนัญญา เพียรเจริญ. 2541. การศึกษาผลของสารสกัดจากใบสาบเสือที่มีต่อการตายของหนอนใยผักและต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ขจัดพิษ esterase glutathione S- transferase และ monooxygenase ของหนอนใยผัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

มารศรี อุดมโชค. 2528. พิษจากพืชสมุนไพร. ข่าวสารวัตถุมีพิษ 12(2) : 68 - 70

ลีนา ผู้พัฒนพงศ์. 2522. สมุนไพรไทยตอนที่ 2 งานพฤกษศาสตร์ป่าไม้ กองบำรุง กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ. 180 น.

วินัย ปีติยนต์. 2540. ตะไคร้หอม (citronella grass). ข่าวสารวัตถุมีพิษ 24(2) : 78-84.

ศรีสุดา โท้ทอง. 2539. ผลของสารสกัดสะเดาในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูไม้ดอก. การประชุมสัมมนาทางวิชาการ แมลงและสัตว์ศัตรูพืช ครั้งที่ 10. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 120 น.

สุภรณ์ โพธิ์เงิน. 2526. อาร์โทรปอดวิทยาสาขาสัตวแพทยศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 254 น.

สุภาณี พิมพ์สมาน. 2537. สารฆ่าแมลง. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น. 175 น.

สุนทรี สิงหบุศรา. 2536. สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด. ไอ.เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์ พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. 181 น.

สุรพล วิเศษสรรค์. 2528. แนวโน้มการนำสารพิษที่สกัดได้จากพืชตามธรรมชาติมาทดแทนสารเคมี. ข่าวสารวัตถุมีพิษ 12(2) : 58-67.

สุรพล วิเศษสวรรค์. 2534. การใช้สารสกัดสะเดาให้ได้ผลในการควบคุมแมลง. วารสารกีฏและสัตววิทยา 13(4) : 210-215.

สุรพล วิเศษสรรค์. 2536. ผลการใช้สารสกัดจากสะเดาต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ของแมลง. รายงานการสัมนาการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อป้องกันกำจัดศัตรูทางการเกษตร คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 60 น.

สัมฤทธิ์ สิงห์อาษา. 2537. กีฏวิทยา – อะคาโรวิทยา การแพทย์และสัตวแพทย์. ภาควิชาชีววิทยา คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 528 น.

อารมณ์ แสงวานิช. 2537. ใช้สะเดาป้องกันกำจัดแมลง. กสิกร 67(6) : 534-541.

อังศุมาลย์ จันทราปัตย์. 2535. วิทยาเห็บไร. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 216 น.

อำพล เสนารณรงค์. 2540. เอกสารประกอบการบรรยายเรื่องการใช้สารเคมีการเกษตรให้ปลอดภัยมากยิ่งขึ้น. การประชุมใหญ่ประจำปี 2540. สมาคมกีฏและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 8 น.

อนันต์ สกุลกิม. 2540. การกินอาหารและการใช้ประโยชน์ชีววิทยาของแมลง. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา, กรุงเทพฯ. 261 น.

อมรา ไตรศิริ และ สำรวย ปลูกงาม. 2539. การใช้สารสกัดจากตะไคร้หอมในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูฝ้าย. รายงานผลงานวิจัยประจำปี ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์. นครสวรรค์. 64 น.

อัญชลี สงวนพงษ์. 2539. การผลิตสารสกัดจากสะเดาเพื่อการค้า (ตอน 2). วารสารกีฏและสัตววิทยา 18(4) : 254-256.

อัศวิน กิ่งแก้ว. 2535. ผลการใช้สารสกัดข่าต่อการควบคุมตัวอ่อนของแมลงวันในมูลสุกร. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 30. 408-411 น.

อรนุช เกษประเสริฐ. 2530. การปลูกตะไคร้หอม. กลุ่มงานพฤกษชีพการวิทยา. กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 2 น.

Ahmed M., R.T. Gladweell and A.R. McCaffery. 1989. Decreased neve sensitivity is a mechanism of resistance in a pyrethroid resistant strain of *Heliothis armigera* from Thailand. Pestic. Biochem. Physiol. 35 : 165-171

Africa, E.A. and L.B. Mabesa. 1984. Quality of flavoring extracts from lemon grass (*Cymbopogon citratus* D.C. Stapf) using different solvents. Philippine – Agriculturist (Phillippines). 64 (1) : 49-54.

Barn, M.A., R.B. Yamasaki, and J.A. Kloske. 1989. Biological activity of azadirachtin, their derivatives, and their ultraviolet radiation degradation products against tobacco budworm (Lepidoptera : Noctuidae) larvae. J. Econ. Entomol. 82 : 58-63.

Blaney, W.M. 1980. Chemoreception and food selection by locusts. Olfaction and Taste. 7 : 127-130.

_____. 1981. Chemoreception and food selection in locusts. Trend. Neu. 2 : 35-38.

Blum, L.W. and C.W. Kearns. 1957. The effect of pyrethrum activators on the toxicity of Sabadilla to house flies. J. Econ. Ext. 49 : 283.

Booth, J., E. Booyland and P. sims. 1961. An enzymes from rat liver catalyzing conjugation with glutatione. J. Biochem. 79 : 516-524.

Brannon, L.W. 1947. Piperonyl cyclonene and piperonyl butoxide as synergists with rotenone. J. Econ. Ent. 40 : 933-934.

Brattsten, L.B. 1989. Insecticide resistance : Research and Manage. Pestic. Sci. 26 : 329-332.

Chavan, S.R. 1983. Chemistry of alkanes separated from leaves of *Azadirachta indica* and their larvicidal/insecticidal activity againt mosquitoes. Proc. Int. Neem Conf. 2 : 59-66.

Clark, A.G. and W.C. Dauterman. 1982. The characterization by affinity chromatography of glutathione-s-transferase from different strains of house fly. Pestic. Biochem. physiol. 17 : 307-314.

Dauterman, W.C. 1983. Role of hydrolase and glutathione S-transferase in insecticide resistance pp. 229-247. In G.P. Georghion and T. Saito (eds.). Pest Resistance to Pesticides. Plenum Press, New York and London.

Dauterman, W.c. 1985. In Comprehensive Insect physiology, Biochemistry and pharmacology vol. 12, pp.713-730. In G.A. Kerkut and L.I. Gilbert (eds.). Insect Metabolism : Extramicrosomal. Oxford Pergamon Press London.

_____. 1994. Metabolism of toxicants : Phase II reactions, pp. 113-132. *In* H. Ernest and E.L. Patricia (eds.). Introduction to Biochemical Toxicology. 2d ed., Appleton & Lange. Norwalk, Connecticut.

Dauterman, W.C. and E. Hodgson. 1978. Detoxification mechanism in insect, pp. 541-577. *In* M. Rocktien (ed.). Biochem. of Insec. Academic, New York.

Devon, T.K. and A.I. Scott. 1972. Handbook of Naturally Occurring Compounds V. II. Terpenes., Academic Press. New York and London. 576 p.

Dove, W.E. 1947. piperonyl cyclonene and piperonyl butoxide as synergists with rotenone. J. Econ. Ent. 40 : 933-934.

Eagleson, C. 1940. Die Insecticide Chemis, Wirkungsweise and Toxizitat. Heidelberg. 145 p.

Ernest, H. 1994. Chemical and environmental factors affecting metabolism of xenobiotics, pp. 153-175. *In* H. Ernest and E.L. Patricia (eds.). Introduction to Biochemical Toxicology 2d ed., Appleton & Lange Norwalk, Connecticut.

Ernest, H. and E.L. Patricia. 1994. Metabolism of toxicants ; Phase I Reactions, pp. 75-111. *In* H. Ernest and E.L. Patricia (eds.). Introduction to Biochemical Toxicology 2d. ed., Appleton & Lange Norwalk, Connecticut.

Feuerhake, K.J. 1983. Effectiveness and selectivity of technical solvents for the extraction of neem seed components with insecticidal activity proc. 2d ed., Int. Neem Conf. 2 : 103-114.

Georgi, J.R. 1969. Parasitology for Verterinarians. W.B. Saunders Company Philadelphia. 237 p.

Gibson, G.G. and P. Skett. 1994. Introduction to Drug Metabolism 2d. ed., Blackie Academic & Professional. London. 266 p.

Gorg, S. , G.P. Talwar and S.W. Upadhyay. 1994. Comparison of extraction procedures on the immunocontraceptive activety of neem seed extracts. J. Ethnopharmacal Ireland. 44 (2) 87 – 92.

James, A.O. and W.P. Frederick. 1984. Glutathione S transferase in the house fly:Biochemical and genetic changes associated with induction and insecticide resistance. Pestic. Biochem. Physiol. 22 : 203-208.

Jilani, G. and R.C. Saxen. 1990. Repellent and feeding deterrent effects of turmeric oil, sweetflag oil, and a neem – based insecticide against lesser grain borer (Coleoptera : Bostrychidae) J. Econ. Entomol. 83 : 629-634.

Joshi, B.G., G. Rampaprashad, and S. Sitaramalah. 1978. Neem kernal as an ovipositional repellent for *Spodoptera litura* months. Phytoparasitica. 7 : 199-202.

Kao, L.R., N. Montoyama and W.C. Dauterman. 1984. Studies on hydrolysis invarious house fly strains and their role in malathion resistance. pestic. Biochem. Physiol. 22 : 86-92.

Kotze, A.C. and H.A. Rose. Purification and properties of glutathione S – transferase from the larvae of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Wiedemann). Insect Biochem. 19 : 703 - 713

Lange, W. 1983. Piperonyl butoxide : Synergistic effects on different neem seed extracts and influence on degradation of an enriched extract by ultra-violet light. Proc. Int. Neem Conf. 2 : 129-140.

Lange, W. and H. Schmutter. 1982. Versuche mit synergisten zur steigerung der metamorphosesis wirkung eines methanolischen rohextraktes aus semen des niembaumes (*Azadirachta indica*). Z. Pflkrankh. Pflschutz. 89 : 258-265.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough ; A.L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement With the folin phenol regent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

Mackness, M.L., C.H. Walker, D.G. Lowland and N.R. Price. 1983. Esterase activity in homogenates of three stains of the rust red flour beete *Tribolium castaneum* (Herbst) Comp. Biochem. Physiol. 74 : 65-68.

Marco, Maria – Pilar, N. Pascual, X. Belles, F. Camps, and A. Messeguer. 1990. Ecdysteroid depletion by azadirachtin in *Tenebrio molitor* pupal. Pestic. Biochem. Physiol. 38 : 60-65.

Meisner, J., K.R.S. Ascher, R. Aly and J.D. Warthen. 1981. Response of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Earias insulana* (Boisd.) larvae to azadirachtin and solanin. Phytoparasitica. 9 : 27-32.

Metcalf, R.L. 1989. Insect resistance to insecticides. Pestic. Sci. 26 : 333-358

Onawunmi, G.O. 1989. Evaluation of the Antifungal activity of lemon grass oil. Int. J. Crude-Drug-Res. 27(2) : 121-126.

Osman, M.Z. 1993. Effects of neem seed extract on growth and development of larvae of *Pieris brassicae* L. (Lep., Pieridae). J. Appl. Ent. 115 : 254-258

Pimsamarn, S., N. Siri T. JamJanya, and Y. Sutapakdi. 1991. Neem products for protecing cruciferous crop from diamondback month (Lepidoptera : Plutelldae) damage, pp. 159-167. In Proceedings, First Asia – Pacific conference of Entamology, Entomology and Zoology Association of Thailand, Funny Pblishing, Bangkok.

Prabhaker, N., D.L. Coudriet and N.C. Toscano. 1988. Effect of synergists on organophosphate and permethrin resistance in sweetpotato whitefly (Homoptera ; Aleyrodidae). J. Econ. Ent. 81 : 34-39.

Raghavaiah G. and M. Jayaramaiah. 1987. Antifungal activity of some essential oils against the White Muscardine fungus, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Indian – Perfumer. 31(4) : 328 – 331.

Reed, R.P. and R.S. Filmer. 1950. Activation of ryania, dust by piperonyl cyclonene and N-propyl isome. J. Econ. Ent. 43 : 161-164.

Rembold, H. 1989. Azadirachtins : Their structure and mode of action, pp. 150 – 163. In J.T. Arnasor, B.J.R. Philogene, and P. Morand(eds.), Insecticides of Plant Origin. American Chemical Society, Washington.

Rembold, H. and I. Puhlmann. 1995. Azadirachtins : Structure and Activity Relations in Case of *Epilachna varivestis* , pp. 222 – 231, In H. Schmutterer (ed). The Neem Tree. VCH, Weinheim

Rembold, H. and K.P. Sieber. 1981. Inhibition of oogenesis and ovarion ecdysteroid synthesis by azadirachtin in *locusta migratoria* migratorioides. Nature. 360 : 466-469.

Rembold, H., C.H. Forster, P.J. Czoppelt and K.P. Sieber. 1983. The azadirachtin, A group of insect growth regulators from the neem tree. Proc. Int. Neem Conf. 2 : 153-162.

Rembold, H., G.K. Sharma, T.C. Czoppelty and H. Schmutterer. 1980. Evidence of growth disruption in insects without feeding inhibition by neem seed fractions Plant Diseases and protection. 87 : 290-297.

Rice, M.J. 1987. Neem research in Australia. Philippine J. Sci. 5-9.

Richard, W. and S. David. 1997. Veterinary Entomology. T.J. International Ltd, Padstow, Comwall. 439 P.

Riviere, J.E. 1994. Absorption and distribution, pp. 11-48. *In* H. Ernest and E.L. Patricia 9 (eds.). Introduction to Biochemical Toxicology 2d. ed., Appleton & Lange Norwalk, Connecticut.

Rose, H.A. 1985. The relationship between feeding specialization and host to aldrin epoxidase activities of midjut homogenates in larval Lepidoptera. Ecol. Ent. 10 : 455-467.

Rose, H.A. and B.E. Wallbank. 1986. Mixed-function oxidase and Glutathione-s-transferase activity in a susceptible and a fenitrothion-resistant strian of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera : Cucujidae). J. Econ. Ent. 79 : 869-899.

Saxena, K.N. and H. Rembold. 1983. Orientation and ovipositional responses of *heliothis armigera* to certain neem constituents. Proc. Int. Neem Conf. 2 : 199-210.

Schmutterer, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides form the neem tree, *Azadirachta indica*. Annu. Rev. Ent. 35 : 271-297.

Schmutterer, H. and H. Rembold. 1980. Zur Wirkung einiger reinfraktionen aus samen von *Azadirachta indica* auf fravaktivitat and metamorphose von *Epilachna varivestis*. J. Agri. Ent. 2 : 179-188.

Schneider, B.H. and K. Ermel. 1987. Quantitative determination of azadirachtin from neem seeds using high performance liquid chromatography. Proc. Int. Neem Conf. 3 : 161-170.

Schokechy, U. and Otto, D. 1989. Enzymes involved in the metabolism of organophosphorus carbamate and pyrethroid insecticide. Chemistry of Plant Protection 2, Sprinder – Verlag Heidelberg. 118 – 142.

Schoonhoven, L.M. and T. Jermy. 1977. A. behavioral and eletrophysiological analysis of insect feeding deterrents, pp. 133-146. *In* N.R. Mcfarlane (ed.). Crop Protection Agents-Their Biological Evaluation. Academic Press, New York.

Scott, J.G. and G.P. Georghion. 1986. Mechanisms responsible for high levels of permethrin resistance in the house fly. Pestic. Sci. 17 : 195-206.

Sharaby, A. 1988. Anti-insectproperties of the essential oil of lemon grass, *Cymbopogon citratus* against the lesser cotton leafworm *Spodoptera exigua* (Hbn). Insect. Sci. Appl. 9(1) : 77-80.

Sieber, K.P. and H. Rembold. 1983. The effects of azadirachtin on the endocrine control of molting in *Loeusta migratoria*. J. Insect Physiol. 29 : 523-427.

Simmonds, M.S.J. and W.M. Blaney. 1983. Some neurophysiological effects of azadirachtin on Lepidopterous larvae and their feeding respone. Proc. Int. Neem Conf. 2 : 163-180.

Singh, D., M.D. Siddiqui and S. Sharma. 1989. Reproduction retardant and fumigant properties in essential oil against rice weevil (Coleoptera : Curculionidae) in stored wheat. J. Econ. Ent. 82(3) : 727-733.

Sombatsiri, K. and K. Temboonkeat. 1987. Efficacy of an improved neem kernel extract in the control of *Spodoptera litura* and of *Plutella xylostella* under laboratory conditions and in field trials. Proc. Int. neem Conf. 3 : 10-15.

Sweelan, M.E. 1989. The potential use of some ornamental plants for nematode control in Egypt. Bulletin – of – Faculty – of – Agriculture, University – of – cairo. 40(2) : 391 – 393.

Tirimanna, A.S.L. 1983. Surveying the chemical constituents of the neem leaf by two-dimensional thin-layer chromatography. Proc. Int. Neem Conf. 2 : 67-74.

Tong, W. and G. Eisenbrand. 1992. Chinese Drungs of Plant Origin Chemistry Phamacology and Use in Traditional and Modern Medicine. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. 1056 p.

Torre, M., T.N. Capiro and I. Fernandez. 1989. Studies on toxic and genotoxic activity of a decoction from lemon grass (*Cymbopogon citratus*). Rev. Biol. Habana. 3(2) : 131-138.

Uebel. E.C., J.D. Warthen and M. Jacobson. 1979. Preparative reversed phase liquid chromatographic isolation of azadirachtin from neem kernels. J. liq. chromat. 2 : 875-882.

Urquhart, G.M., J. Armour, J.L. Duncan, A.M. Dunn and F.W. Jennings. 1987. Verterinary Parasitology. Longman Scientific and Technical, London. 286 P.

Verkerk, R.H.J. and D.J. Wright. 1993. Biological activity of neem seed kernal extracts and synthetic azadirachtin against larvae of *Plutella xylostella* L. Pestic. Sci. 37 : 83 – 91.

Visetson, S. 1991. Insecticide resistance mechanisms in the rust red flour beelle, *Tribolium castaneum* (Herbst) Ph.D. thesis. The University of Sydney, Australia.

Wilkinson, C.F. 1976. Insecticide synergism, pp. 195-218. *In* R.L. Metcalf and I.J. Mckelvey (eds.). The Future for Insecticides : Needs and Prospects. Wiley, New York.

Yu, S.J. 1983. Induction of detoxifying enzymes by allelochemicals and host plant in the fall armyworm. Pestic. Biochem. Physiol. 12 : 330-336.

_____. 1984. Interaction of allelochemical with detoxification enzymes of insecticides susceptable and resistense fall armyworm. Pestic. Biochem. Physiol. 14 : 275-281.

Yu, S.J. and E.L. Hsu. 1985. Induction of hydrolases by allelochemicals and host plant in fall armyworm (Lepidoptera : Noctudiae) larvae. Environ. Ent. 14 : 512-515.

Yu. S.J. and N. Nguyen. 1992. Detection and Biochemical characterization of insecticide resistance in the diamond back moth Pestic. Biochem. Physiol. 44 : 74 – 81.

Zanno, P.R., I. Miura, I. Nakanishi and D.L. Elder. 1975. Structure of the insect phagorepellent azadirachtin. Application of PRFT/CWD carbon^{13} nuclear magnetic resonance. J. Am. Chem. Soc. 97 : 1975-1977.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

การวิเคราะห์ cholinesterase

สูตร Acetylthioline iodide assay

= OD/min x 73.529 x total volume of assay (ml.) - 1n moles thiocholin produced/min

แทนค่า OD/min ที่วัดได้จากเครื่อง spectrophotometer ด้วย X

ปริมาตรรวมที่ใช้วิเคราะห์เอนไซม์ใน 1 cuvette = 3.0 ml.

∴ปริมาณเอนไซม์ที่วัดได้ = X x 73.529 x 3.0n mole

การวิเคราะห์ general esterase

สูตร Paranitrophenyl acetate assay

= OD/min x 74.019245 x total volum of assay (ml)...-

แทนค่า OD/min ที่วัดได้จากเครื่อง spectrophotometer ด้วย X ปริมาตรรวมที่ใช้วิเคราะห์เอนไซม์ใน 1 cuvette = 3.9 ml

∴ ปริมาณเอนไซม์ที่วัดได้ = X x 74.01924 x 3.9

= X x 288.6751 n mole

การวิเคราะห์ glutathion S-transferase

$$\text{สูตร Dicholoronitrobenzene assay} = \frac{\text{OD/min x 1,31}}{\text{10 x 1000}} \text{ n mole}$$

แทนค่า OD/min ที่วัดได้จากเครื่อง spectrophotometer ด้วย X

$$\therefore \text{ปริมาณเอนไซม์ที่วัดได้} = \frac{\text{X x 1,31}}{\text{10,000}} \text{ n mole}$$

การวิเคราะห์โปรตีนรวม

$$\text{สูตร Protein assay} = \frac{\text{0.01 x OD/min x 1,000}}{\text{2.38}} \text{ mg/ml}$$

แทนค่า OD/min ที่วัดได้จากเครื่อง spectrophotometer ด้วย X

$$\therefore \text{ปริมาณเอนไซม์ที่วัดได้} = \frac{\text{0.01 x X x 1,000}}{\text{2.38}} \text{ mg/ml}$$

การหาค่า correlation ของการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ esterase และ glutathione S-transferase ต่อระดับความเข้มข้นของสารสกัดสะเดา

โดยการหาค่า r จากสมการข้างล่าง

ให้ x แทนความเข้มข้นของสารสกัดสะเดา

ให้ y แทนอัตราการตายที่ 24 ชั่วโมง

$$\sum x^2 = \sum x^2 - (\sum x)^2/n$$

$$\sum y^2 = \sum y^2 - (\sum y)^2/n$$

$$\sum xy = \sum xy - (\sum x)(\sum y)/n$$

$$r = \frac{\sum xy}{\sqrt{\sum x^2 \sum y^2}}$$

หาค่า r ที่ .05 และ .01 d.f. ที่ 2

การหาค่า correlation ของการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ esterase cholinesteras และ glutathione S-transferase ต่อระดับความเข้มข้นของสารสกัดตะไคร้หอม

โดยการหาค่า r จากสมการข้างล่าง

ให้ x แทนความเข้มข้นของสารสกัดตะไคร้หอม

ให้ y แทนอัตราการไล่ที่ 90 วินาที

$$\sum x^2 = \sum x^2 - (\sum x)^2/n$$

$$\sum y^2 = \sum y^2 - (\sum y)^2/n$$

$$\sum xy = \sum xy - (\sum x)(\sum y)/n$$

$$r = \frac{\sum xy}{\sqrt{\sum x^2 \sum y^2}}$$

หาค่า r ที่ .05 และ .01 d.f. ที่ 3