

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นด้วยเอทานอลและทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากยาเส้น
ที่มีต่อหนอนม้วนใบกล้วย โดยวิธีการทดสอบแบบจุ่มใบ

การทดลองสกัดสารสกัดหยาบจากยาเส้นด้วยตัวทำละลายเอทานอล ซึ่งยาเส้นที่ใช้ เป็น ยาสูบหรือยาเส้นแห้งที่บรรจุห่อจำหน่ายในท้องตลาด ตราไก่ มีน้ำหนักสุทธิ ห่อละ 1.8 กรัม



(ก)



(ข)

ภาพที่ 11 ยาสูบหรือยาเส้นแห้งที่บรรจุห่อจำหน่ายในท้องตลาด

(ก) ยาเส้นตราไก่

(ข) ลักษณะของยาเส้น

ทำการสกัดยาเส้นด้วยตัวทำละลายเอทานอล โดยแช่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
จะได้สารสกัดหยาบจากยาเส้นเมื่อต้มไล่ตัวทำละลาย



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 12 ลักษณะของสารสกัดหยาบจากยาเส้นที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล

(ก) สารสกัดหยาบจากยาเส้นในตัวทำละลายเอทานอลกรองผ่านกระดาษกรอง

(ข) สารสกัดหยาบจากยาเส้นในตัวทำละลายเอทานอล

(ค) สารสกัดหยาบจากยาเส้นที่ระเหยตัวทำละลายแล้ว มีสีน้ำตาลแดง
ลักษณะข้นเหนียว และมีกลิ่นฉุน

ในการทดลองเลือกใช้ใบสะเดาสดมาสกัดด้วยเอทานอลเพื่อนำสารสกัดหยาบไปทำการทดสอบฤทธิ์ต่อหนอนม้วนใบกล้วย แล้วเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัดจากยาเส้น



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 13 การสกัดสารจากใบสะเดาด้วยตัวทำละลายเอทานอล

(ก) และ (ข) ใบสะเดาสด

(ค) สารสกัดหยาบจากใบสะเดาสด มีสีน้ำตาล และเมื่อระเหยตัวทำละลายเอทานอลได้สารสกัดที่มีสีน้ำตาลแดง และข้นเหนียว

ผลการสกัดสารจากยาเส้น และใบสะเดาสดอย่างละ 200 กรัม ด้วยวิธีแช่ในตัวทำละลายเอทานอล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ายาเส้นมีปริมาณ สารสกัดหยาบ 42 กรัม คิดเป็น 21 % และ 20 กรัม คิดเป็น 10 % ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณของสารสกัดหยาบที่ได้จากยาเส้น และใบสะเดา

ส่วนที่สกัด	ตัวทำละลาย	ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้	
		น้ำหนัก (g)	เปอร์เซ็นต์ (%w/v)
ใบยาเส้นแห้ง	เอทานอล	42	21
ใบสะเดาสด	เอทานอล	20	10

การทดสอบเบื้องต้น

การสกัดสารจากยาเส้นด้วยตัวทำละลายเอทานอล

นำสารสกัดหยาบจากยาเส้นที่ได้ละลายในน้ำ 100 mL เพื่อเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น แล้วทำการทดสอบโดยวิธีแบบจุ่มใบ (leaf dipping method) ภาพที่ 14



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 14 การทดสอบเบื้องต้นฤทธิ์ของสารสกัดจากยาเส้นกับหนอนม้วนใบกล้วย

- (ก) สารละลายเข้มข้น
- (ข) การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากยาเส้นด้วยวิธีการทดสอบแบบจุ่มใบ (leaf dipping method)
- (ค) หนอนม้วนใบกล้วยก่อนการทดสอบ
- (ง) การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากยาเส้นจากสารละลายเข้มข้นด้วยวิธีการทดสอบแบบจุ่มใบกับหนอนม้วนใบกล้วย

ผลการทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดฤทธิ์ของสารสกัดจากยาเส้นจากสารละลายเข้มข้น และสารสกัดในความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การทดสอบเบื้องต้นของการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาดจากยาเส้นที่มีต่อ หนอนม้วนใบกล้วย

ความเข้มข้นของสาร (%v/v)	การตายของหนอน
1	ไม่ตาย
3	ไม่ตาย
5	ตาย
10	ตาย
สารละลายเข้มข้น	ตายทุกตัว

ดังนั้น จึงเลือกใช้ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากยาเส้นต่ำสุดที่ 5 เปอร์เซ็นต์ (%v/v) และในความเข้มข้นสารละลายเข้มข้นของสารสกัดจากยาเส้น ทำให้ใบกล้วยมีลักษณะไหม้ เทียนเร็วและมีสารสกัดเคลือบบนใบไม่สม่ำเสมอ ทำให้หนอนได้รับสารจากการสัมผัสมากกว่าที่จะได้รับสารจากการกิน ภาพที่ 15



(ก)



(ข)

ภาพที่ 15 การทดสอบเบื้องต้นการจุ่มใบกล้วยในสารสกัดยาเส้น

(ก) ใบกล้วยจุ่มในสารละลายเข้มข้นของสกัดหยาดจากยาเส้น

(ข) ลักษณะของใบกล้วยที่จุ่มในสารสกัดเข้มข้นจะเหี่ยว และแห้งกรอบ

การทดลองการศึกษาการกินใบกล้วย น้ำว้า และใบกล้วยตานีของหนอนม้วนใบกล้วย

ใบกล้วยตานีและใบกล้วยน้ำว้าเป็นใบกล้วยที่เกษตรกรปลูกเพื่อขายใบ จึงเลือกมาใช้ในการทดสอบ ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 8 พฤติกรรมการกินใบกล้วยของหนอนม้วนใบกล้วย

การทดลองที่	แหล่งที่มาของหนอน	ชนิดของใบกล้วย ที่ใช้เป็นแหล่งอาหาร	พฤติกรรม การกินใบกล้วย
1	จากต้นกล้วยตานี	ใบกล้วยตานี	หนอนมีการกัดกินใบกล้วยตามปกติ
	จากต้นกล้วยน้ำว้า	ใบกล้วยน้ำว้า	หนอนมีการกัดกินใบกล้วยตามปกติ
2	จากต้นกล้วยตานี	ใบกล้วยน้ำว้า	หนอนมีการกัดกินใบกล้วยตามปกติ
	จากต้นกล้วยน้ำว้า	ใบกล้วยตานี	หนอนมีการกัดกินใบกล้วยตามปกติ

ดังนั้น หนอนม้วนใบกล้วยมีพฤติกรรมการกินต่อใบกล้วยทั้งสองชนิดเหมือนกัน จึงสามารถสุ่มหนอนม้วนใบกล้วยจากต้นกล้วยทั้งสองชนิดมาทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากยาเส้นได้ การทดลองครั้งนี้เลือกใช้ใบกล้วยตานี เนื่องจากเกษตรกรปลูกเพื่อจำหน่ายใบในแถบจังหวัดพังงา



(ก)



(ข)

ภาพที่ 16 ลักษณะหนอนม้วนใบกล้วยจากแหล่งต้นกล้วยชนิดต่าง ๆ

(ก) หนอนม้วนใบกล้วยจากต้นกล้วยน้ำว้า

(ข) หนอนม้วนใบกล้วยจากต้นกล้วยตานี

ในการทดลองจะใช้วิธีการสุ่มหนอนจากทั้งสองแหล่ง คือจากต้นกล้วยน้ำว้า และต้นกล้วยตานี มาทดสอบแต่ละชุดการทดลอง จำนวน 10 ตัว โดยวิธีคละกัน ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากยาเส้นที่มีผลต่อหนอนม้วนใบกล้วย โดยวิธีการทดสอบแบบจุ่มใบ



(ก)



(ข)



(ง)

ภาพที่ 17 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากยาเส้น

- (ก) สารสกัดหยาบจากยาเส้นในสารละลายเข้มข้น และสารสกัดหยาบจากยาเส้นเจือจาง
- (ข) สารสกัดหยาบจากยาเส้นเจือจาง
- (ค) การจุ่มใบกล้วยในสารละลายจากยาเส้นเจือจาง

การตอบสนองของหนอนม้วนใบกล้วยหลังจากกินใบกล้วยที่จุ่มสารสกัดหยาบจากยาเส้น
ในความเข้มข้นต่าง ๆ

1. สารสกัดหยาบความเข้มข้น 5%



ภาพที่ 18 การตอบสนองของหนอนม้วนใบกล้วยในสารสกัดหยาบเข้มข้น 5%

จากภาพที่ 18 แสดงให้เห็นถึงการตอบสนองของหนอนม้วนใบกล้วยกินใบกล้วยจุ่ม
สารสกัดหยาบจากยาเส้นตามปกติ มีการจับถ่าย สามารถชักใบม้วนใบกล้วยได้ตามปกติมีการ
เคลื่อนไหวได้ดี ไม่พบการตายของหนอนม้วนใบกล้วยจนกระทั่งชั่วโมงที่ 72 มีการตายสะสมเฉลี่ย
0.67 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การตายสะสม 6.67 %

2. สารสกัดยับยั้งความเข้มข้น 10%



ภาพที่ 19 การตอบสนองของหนอนไหมในใบกล้วยในสารสกัดยับยั้งความเข้มข้น 10%

หนอนไหมในใบกล้วยกินใบกล้วยในช่วงแรกและกินได้น้อยลง มีการจับถ่ายปกติ สามารถเคลื่อนไหวได้ดีในช่วงแรกๆ ไม่พบการตายของหนอนจนกระทั่งชั่วโมงที่ 48 มีหนอนตายสะสมเฉลี่ย 0.33 มีเปอร์เซ็นต์การตายสะสม 3.33% และเมื่อครบ 72 ชั่วโมงมีการตายสะสมเฉลี่ยเท่ากับ 2 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การตายสะสม 20%

3. สารสกัดหยาบความเข้มข้น 15%



ภาพที่ 20 การตอบสนองของหนอนไหมในสารสกัดหยาบเข้มข้น 15%

ในช่วงแรก ๆ หนอนไหมกินใบกล้วยเมื่อครบ 24 ชั่วโมง หนอนบางตัวมีอาการผิดปกติ และกินน้อยลง มีการขับถ่ายน้อยลง นาน ๆ ครั้ง มีการเคลื่อนไหวน้อยลง หนอนไหมเริ่มตายชั่วโมงที่ 48 มีการตายสะสมเฉลี่ยเท่ากับ 0.67 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การตายสะสม 6.67 และเพิ่มเป็นการตายสะสมเฉลี่ยเท่ากับ 4.67 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การตายสะสม 46.67% เมื่อครบ 72 ชั่วโมง

4. สารสกัดยับยั้งความเข้มข้น 20%



ภาพที่ 21 การตอบสนองของหนอนม้วนใบกล้วยในสารสกัดยับยั้งเข้มข้น 20%

หนอนม้วนใบกล้วยมีอาการผิดปกติเพิ่มขึ้น ไม่กินใบกล้วย ไม่ขับถ่าย หยดน้ำไม่เคลื่อนไหว ไม่มีการชักโย้จึงม้วนใบกล้วยไม่ได้ ไม่ขีดเกาะใบกล้วย ตลอด 72 ชั่วโมง และตายในที่สุด หนอนม้วนใบกล้วยเริ่มตาย เมื่อครบ 48 ชั่วโมง มีการตายสะสมเฉลี่ยเท่ากับ 0.33 คิดเป็น 3.33% และเพิ่มขึ้นเมื่อครบ 72 ชั่วโมง มีการตายสะสมเฉลี่ย 6.33 คิดเป็น 63.33%

5. สารสกัดยับยั้งจากใบสะเดา



ภาพที่ 22 การตอบสนองของหนอนม้วนใบกล้วยในสารสกัดยับยั้งจากใบสะเดา

ในทุกการทดลองพบว่าหนอนม้วนใบกล้วยมีอาการผิดปกติ ไม่กินใบกล้วยที่จุ่มสารสกัดหยาบจากใบสะเดา และหยุดการเคลื่อนไหวในหนอนบางตัว ไม่มีการชักใย ขับถ่ายตามปกติ ไม่พบการตายของหนอนม้วนใบกล้วย

5. การตอบสนองในใบกล้วยที่จุ่มน้ำ



ภาพที่ 23 การตอบสนองของหนอนม้วนใบกล้วยในใบกล้วยจุ่มน้ำ

จากผลการทดลองพบว่าหนอนม้วนใบกล้วยสามารถดำรงชีวิตได้ตามปกติบนใบกล้วยที่จุ่มน้ำ



ภาพที่ 24 ลักษณะการชักใยม้วนใบกล้วยในใบกล้วยจุ่มน้ำ

ภาคผนวก ข

การคำนวณค่าทางสถิติ และการวิเคราะห์หาค่า LC_{50} ในการทดสอบฤทธิ์ของ
สารสกัดหยาดจากยาเส้นที่มีต่อหนอนม้วนใบกล้วย โดยวิธีการทดสอบแบบจุ่มใบ

การวิเคราะห์ค่า LC_{50} โดยใช้ความสัมพันธ์เชิงเส้น

ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากยาเส้นกับหนอนม้วนใบกล้วย โดยวิธีการทดสอบแบบจุ่มใบ สังเกตผลทุก ๆ 6 ชั่วโมง นับจำนวนการตายของหนอนม้วนใบกล้วยเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และสังเกตพฤติกรรมของหนอนม้วนใบกล้วย เมื่อได้รับสารสกัด

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากยาเส้นต่อหนอนม้วนใบกล้วย โดยวิธีการทดสอบแบบจุ่มใบ ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 5%

ความเข้มข้น (%v/v)	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนหนอนที่ตาย (ตัว)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
ใบกล้วยจุ่มสารสกัด 5%	6	-	-	-
	12	-	-	-
	18	-	-	-
	24	-	-	-
	30	-	-	-
	36	-	-	-
	42	-	-	-
	48	-	-	-
	54	-	-	-
	66	-	-	-
	72	-	2	-
สารสกัดจากสะเดา	72	-	-	-
น้ำ	72	-	-	-
รวม		0	2	0

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากยาเส้นต่อหนอนม้วนใบกล้วย
โดยวิธีการทดสอบแบบจุ่มใบ ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 10%

ความเข้มข้น (%v/v)	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนหนอนที่ตาย (ตัว)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
ใบกล้วยจุ่มสารสกัด 10%	6	-	-	-
	12	-	-	-
	18	-	-	-
	24	-	-	-
	30	-	-	-
	36	-	-	-
	42	-	-	-
	48	1	-	-
	54	1	-	1
	66	-	2	1
	72	-	-	1
สารสกัดจากสะเดา	72	-	-	-
น้ำ	72	-	-	-
รวม		2	2	3

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากยาเส้นต่อหนอนม้วนใบกล้วย
โดยวิธีการทดสอบแบบจุ่มใบ ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 15%

ความเข้มข้น (%v/v)	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนหนอนที่ตาย (ตัว)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
ใบกล้วยจุ่มสารสกัด 15%	6	-	-	-
	12	-	-	-
	18	-	-	-
	24	-	-	-
	30	-	-	-
	36	-	-	-
	42	-	-	-
	48	2	-	-
	54	-	1	-
	66	-	2	2
	72	4	3	2
สารสกัดจากสะเดา	72	-	-	-
น้ำ	72	-	-	-
รวม		6	6	4

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากยาเส้นต่อหนอนม้วนใบกล้วย
โดยวิธีการทดสอบแบบจุ่มใบ ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 20%

ความเข้มข้น (%v/v)	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนหนอนที่ตาย (ตัว)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
ใบกล้วยจุ่มสารสกัด 20%	6	-	-	-
	12	-	-	-
	18	-	-	-
	24	-	-	-
	30	-	-	-
	36	-	-	-
	42	-	-	-
	48	-	1	-
	54	-	1	2
	66	4	2	1
	72	2	4	3
สารสกัดจากสะเดา	72	-	-	-
น้ำ	72	-	-	-
รวม		6	8	6

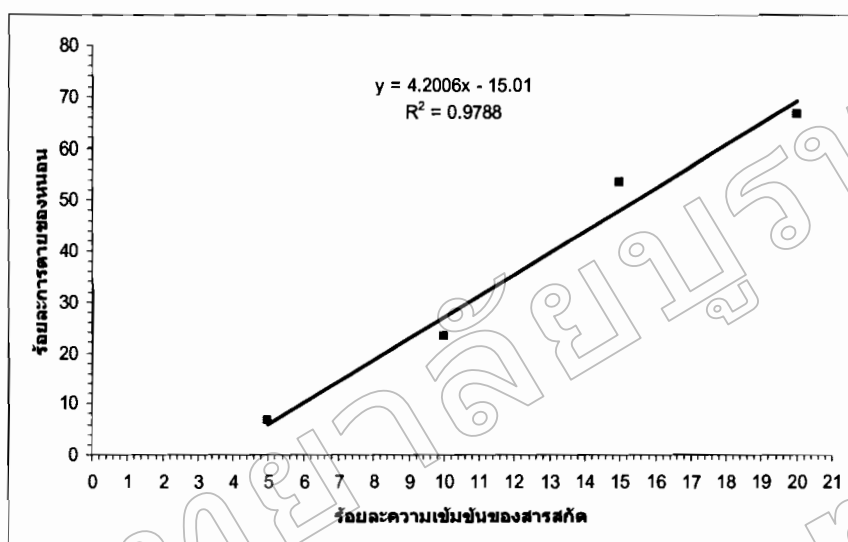
ตารางที่ 13 ความสัมพันธ์ของการตายสะสมของหนอนม้วนใบกล้วยที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 % v/v

การทดลอง	ความเข้มข้น (% v/v)	เวลา (ชั่วโมง)					
		24		48		72	
		การตายสะสมเฉลี่ย	ร้อยละการตายสะสม	การตายสะสมเฉลี่ย	ร้อยละการตายสะสม	การตายสะสมเฉลี่ย	ร้อยละการตายสะสม
1	5	0	0	0	0	0.67±1.15	6.67
2	10	0	0	0.33±0.58	3.33	2.00±1.00	20.00
3	15	0	0	0.67±1.15	6.67	4.67±1.15	46.67
4	20	0	0	0.33±0.58	3.33	6.33±0.58	63.33

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากยาเส้น กับหนอนม้วนใบกล้วย ที่เวลา 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (%v/v)	ความเข้มข้น (g/L)	จำนวนหนอนที่ตาย (ตัว)			เฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์การตาย
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
ใบกล้วยจุ่มสารสกัด 5%	21	0	2	0	0.66	6.67
ใบกล้วยจุ่มสารสกัด 10%	42	2	2	3	2.33	23.33
ใบกล้วยจุ่มสารสกัด 15%	63	6	6	4	5.33	53.33
ใบกล้วยจุ่มสารสกัด 20%	84	6	8	6	6.66	66.67
ใบกล้วยจุ่มสารสกัดจากใบสะเดา	200	0	0	0	0	0
ใบกล้วยจุ่มน้ำ	0	0	0	0	0	0

นำข้อมูลที่ได้หาความเข้มข้นของสารสกัดจากยาเส้นที่ออกฤทธิ์ในหนอนมันใบกล้วยตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) ในเวลา 72 ชั่วโมง โดยใช้ความสัมพันธ์เชิงเส้น



ภาพที่ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความเข้มข้นของสารสกัดจากยาเส้นต่อร้อยละการตายของหนอนมันใบกล้วย

จากกราฟให้ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากยาเส้น (X) ไปหาความสัมพันธ์กับร้อยละการตายของหนอนมันใบกล้วย (Y) พบว่ามีความสัมพันธ์กันในรูปของสมการเส้นตรง

คือ $y = 4.2006x - 15.01$ แทนค่าสมการได้ค่า LC_{50} ดังแสดง

$$y = 4.2006x - 15.01$$

$$50 = 4.2006x - 15.01$$

$$65.01 = 4.2006x$$

$$X = 15.48$$

ดังนั้น ความเข้มข้นที่ค่า y เป็น 50 คือ 15.48 นั่นคือ ค่า LC_{50} มีค่า 15.48 %v/v

คำนวณหาค่าสหสัมพันธ์ (r) ของร้อยละการตายของหนอนม้วนใบกล้วยกับระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากยาเส้น ดังแสดง

$$r_{xy} = \frac{\sum xy - n \bar{x} \bar{y}}{\sqrt{(\sum x^2 - n \bar{x}^2)(\sum y^2 - n \bar{y}^2)}}$$

เมื่อ x คือ ตัวแปรที่ 1 (ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากยาเส้น)

y คือ ตัวแปรที่ 2 (ร้อยละการตายของหนอนม้วนใบกล้วยในการทดสอบ)

n คือ จำนวนของข้อมูลของตัวแปรใดตัวแปรหนึ่ง ในการทดสอบนี้ n คือ 4

ตารางที่ 15 การคำนวณหาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการตายกับความเข้มข้น

x	y	x^2	y^2	xy	$\bar{x} \bar{y}$
5	6.66	25	44.3556	33.30	468.71875
10	23.33	100	544.2889	233.30	
15	53.33	225	2844.0889	799.95	
20	66.67	400	4444.8889	1333.40	
$\bar{x} = 12.5$	$\bar{y} = 37.49$	$\sum x = 750$	$\sum y = 7877.6223$	$\sum xy = 2399.95$	
$\bar{x}^2 = 156.25$	$\bar{y}^2 = 1406.06$				

$$r_{xy} = \frac{2399.95 - 4(468.71875)}{\sqrt{[750 - 4(156.25)][7877.6223 - 4(1406.0625)]}} = 0.9893$$