

ฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชและสารองค์ประกอบหลัก ต่อการตายของ  
ลูกน้ำ ตัวโม่ง ตัวเต็มวัย การยับยั้งการวางไข่ การยับยั้งการฟักไข่ของลายบ้าน  
(*Aedes aegypti* (Linn.))

Larvicidal, pupicidal, adulticidal, oviposition deterrent and ovicidal  
activities of plant essential oils and their major composition  
against *Aedes aegypti* (Linn.)



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเกษตรศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2567

KMITL-2024-AG-M-065-424

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

LARVICIDAL, PUPICIDAL, ADULTICIDAL, OVIPOSITION DETERRENT  
AND OVICIDAL ACTIVITIES OF PLANT ESSENTIAL OILS AND THEIR  
MAJOR COMPOSITION AGAINST *AEDES AEGYPTI* (LINN.)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE  
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL  
SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
2024  
KMITL-2024-AG-M-065-424

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**COPYRIGHT 2024**

**SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชและสารองค์ประกอบหลัก ต่อการตายของลูกน้ำ ตัวโม่ง ตัวเต็มวัย การยับยั้งการวางไข่ การยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้าน ( <i>Aedes aegypti</i> (Linn.))
นักศึกษา	นางสาวชีพนก ภูวนารถ
รหัสประจำตัว	63604010
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เกษตรศาสตร์
พ.ศ.	2567
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ.ดร.มยุรา สุนัยวีระ

### บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ในอัตราส่วนต่าง ๆ ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.) 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ (*Cinnamomum verum* J. Presl.) 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geraniol 1% และ น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% ต่อการตายของลูกน้ำวัย 4 ตัวโม่ง ตัวเต็มวัย การยับยั้งการฟักไข่ และการยับยั้งการวางไข่ของยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti* Linn.)

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักต่อการตายของลูกน้ำวัย 4 ยุงลายบ้าน ด้วยวิธีการจุ่ม (dipping bioassay) ผลปรากฏว่าน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดลูกน้ำวัย 4 ของยุงลายบ้าน ทำให้ลูกน้ำวัย 4 ตาย 100% หลังการทดลอง 6 ชั่วโมง และมีค่า LT<sub>50</sub> เท่ากับ 1.4 ชั่วโมง โดยลูกน้ำวัย 4 ยุงลายบ้านตายแบบปกติไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยา (Normal larvae : NL) บริเวณระบบทางเดินอาหารของลูกน้ำมีลักษณะปกติ ไม่มีสีดำ และผนังลำตัวไม่มีรอยไหม้

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักต่อการตายของตัวโม่งยุงลายบ้าน ด้วยวิธีการจุ่ม (dipping bioassay) พบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดตัวโม่งของยุงลายบ้าน ทำให้ตัวโม่งตาย 100% หลังการทดลอง 24 ชั่วโมง และมีค่า LT<sub>50</sub> เท่ากับ 2.3 ชั่วโมง โดยตัวโม่งยุงลายบ้านตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และเก็บอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผิดปกติมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยา (Deformed pupa :DP) บริเวณส่วนหัวของตัวมดงูกลายเป็นขยายใหญ่คล้ายกับหัวช้าง ผนังลำตัวมีรอยไหม้สีดำและบวม

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักต่อการกำจัดตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน ด้วยวิธีการสัมผัส (contact method) โดยใช้อุปกรณ์ชุดทดสอบ WHO standard susceptibility test kit พบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีประสิทธิภาพดีที่สุดในกำจัดตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน มีผลทำให้ตัวเต็มวัยของยุงลายบ้านสลบและตาย 100% หลังการทดลอง 10 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยมีค่า  $KT_{50}$  และค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 1.6 นาที ดังนั้นเมื่อนำอัตราการตายไปเปรียบเทียบกับอัตราการเกิดพิษตามแนวองค์การอนามัยโลก พบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีความเป็นพิษต่อยุงลายบ้านในระดับสูง (S, Susceptible)

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักต่อการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้าน ด้วยวิธีการหยด (topical method) ผลปรากฏว่าน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1% มีประสิทธิภาพดีที่สุดในกำจัดไข่ของยุงลายบ้าน สามารถยับยั้งการฟักไข่ได้ 81.3% หลังการทดลอง 48 ชั่วโมง

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักต่อการยับยั้งการวางไข่ของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน ด้วยวิธีการ double-choice method พบว่าน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% ให้ผลดีที่สุด โดยมีประสิทธิภาพในการไล่ไม่ให้ตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านมาวางไข่ได้ 99% และมีค่าดัชนีชี้วัดการวางไข่ (OAI) เท่ากับ -1

จากผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำวัย 4 และยับยั้งการวางไข่ของยุงลายบ้านได้ดี ในขณะที่ น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1% มีฤทธิ์ในการยับยั้งการฟักไข่ได้ดี สำหรับน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีฤทธิ์ในการกำจัดตัวมดงูและตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านได้ดี ดังนั้นการผสมกันของน้ำมันหอมระเหยจากพืชกับสารองค์ประกอบหลักให้ผลดีในการกำจัดยุงลายบ้าน สามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดและควบคุมจำนวนประชากรของยุงลายบ้านได้ เพราะมีความปลอดภัยในการทำงานและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

<b>Thesis Title</b>	Larvicidal, pupicidal, adulticidal, oviposition deterrent and ovicidal activities of plant essential oils and their major composition against <i>Aedes aegypti</i> (Linn.)
<b>Student</b>	Ms. Cheepchanok Puwanard
<b>Student ID</b>	63604010
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Program</b>	Agriculture
<b>Year</b>	2024
<b>Thesis Advisor</b>	Prof.Dr. Mayura Soonwera

### Abstract

The larvicidal, pupicidal, adulticidal, ovicidal, and oviposition deterrent activities against *Aedes aegypti* (Linn.) of combinations of plant essential oils (EOs) and their main components were evaluated. Those combinations were the following: nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) EO 2% + alpha-pinene 1%, nutmeg EO 2% + geranial 1%, nutmeg EO 2% + *trans*- cinnamaldehyde 1%, lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) EO 2% + alpha-pinene 1%, lemongrass EO 2% + geranial 1%, lemongrass EO 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, cinnamon (*Cinnamomum verum* J. Presl.) EO 2% + alpha-pinene 1%, cinnamon EO 2% + geranial 1%, and cinnamon EO 2% + *trans*- cinnamaldehyde 1%.

The larvicidal activities of the combinations of plant essential oils and their main constituents against the fourth instars of *Ae. aegypti* larvae were determined by a dipping bioassay. Cinnamon EO 2% + *trans*- cinnamaldehyde 1% was found to provide the highest mortality rate at 100% after 6 hours, with an  $LT_{50}$  of 1.4 hours. It also caused some morphological aberrations of the fourth instar larvae at the time of death. Their abdominal membrane did not have black, burnt patches. However, aberrational morphological changes of *Ae. aegypti* larvae from larvae to adults were not observed. After treatment, they usually died suddenly as normal larvae (NL).

The pupicidal activities of the combinations of plant essential oils and their main constituents against *Ae. aegypti* pupae were determined by a dipping bioassay. Lemongrass EO 2% + alpha-pinene 1% was found to provide the highest mortality rate at 100% after 24 hours, with an  $LT_{50}$  of 2.3 hours. It also caused some morphological

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และห้ามอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

aberrations of the pupae at the time of death, such as black and pigmented cuticles in the cephalothorax and abdomen of the pupae, which could be the result of abnormal cuticular melanization. After treatment, they usually died suddenly as deformed pupa (DP).

The adulticidal activities of the combinations of plant essential oils and their main constituents against the female adults of *Ae. aegypti* were determined by a contact method with a WHO standard susceptibility test kit. The result showed that lemongrass EO 2% + alpha-pinene 1% provided the highest knockdown and mortality rate at 100% within 10 min and 24 hours, respectively, with a  $KT_{50}$  and an  $LT_{50}$  of 1.6 min. Therefore, *Ae. aegypti* was susceptible to lemongrass EO 2% + alpha-pinene 1% according to WHO guidelines.

The ovicidal activities of the combinations of plant essential oils and their main constituents against the eggs of *Ae. aegypti* were determined by a topical method. Cinnamon EO 2% + alpha-pinene 1% showed the highest hatching inhibition rate at 81.3% after 48 hours of exposure.

The oviposition-deterrent activities of the combinations of plant essential oils and their main constituents against female adults *Ae. aegypti* were determined by a double-choice method. The results revealed that cinnamon EO 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% had a strong oviposition deterrent activity, with 99.0% effective repellency and an oviposition activity index of -1.0.

To conclude, cinnamon EO 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% showed the most potent larvicidal and oviposition deterrent activities, while cinnamon EO 2% + alpha-pinene 1% had a good ovicidal activity. Lemongrass EO 2% + alpha-pinene 1% was able to effectively control pupae and female adults. These combinations can be developed into a product for preventing, eliminating, and controlling the population of *Ae. aegypti*. They are safe for users and environmentally friendly.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจาก ศาสตราจารย์ ดร. มยุรา สุนย์วีระ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ถ่ายทอดความรู้และคำชี้แนะในการค้นคว้าวิจัย ทักษะ การทำวิจัย เสียสละเวลาให้คำปรึกษา ช่วยแก้ไขข้อผิดพลาดจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ รวมทั้งให้ โอกาสทางการศึกษาพัฒนาตนเอง และประสบการณ์ต่าง ๆ ที่มีคุณค่าตลอดระยะเวลาการศึกษา อีกทั้งยังเป็นแบบอย่างของความเป็นอาจารย์และนักวิจัยที่ดีที่สุดของข้าพเจ้า ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็น อย่างยิ่งและขอกราบขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร ประธานสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์.ดร.จำรุญ เล้าสินวัฒนา รองศาสตราจารย์.ดร.มณฑินี อีระรักษ์ และ ดร.ททัยชนก พัศระ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่ามารับเป็นกรรมการ สอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ความรู้และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่อความถูกต้องและความสมบูรณ์ ของเนื้อหาทางวิชาการ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ปรารธนา กังสตาลย์ ที่คอยช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในการเขียน บทความวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ดร.จิรัฐดา สินธุศิริ ดร.ศิริวุฒิ สิทธิโชค นายธนภูมิ ม่วงทิพย์ มาลัย (นักศึกษาปริญญาเอก) และ นายสหรัฐ เกชาคุปต์ (นักศึกษาปริญญาโท) ผู้ให้ความอนุเคราะห์ แนะนำแนวทางระหว่างการดำเนินงาน การวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านสถิติ ตลอดจนตรวจแก้ไข วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น อีกทั้งยังคอยช่วยเหลือสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้ ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์

คุณความดีและประโยชน์อันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อธงชัย ภูวนารถ และคุณแม่จำปี ทับทิม นางสาวสุทธิภัทร นาคแหลม และนายธีรเดช รักดี ผู้ให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้าน และคอยเป็นกำลังใจในการศึกษาแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด คุณงามความดีของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอยกให้บิดา มารดา ครูบาอาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

นางสาวชีพชนก ภูวนารถ

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
<b>บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>5</b>
2.1 ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของยุงลายบ้าน.....	5
2.2 กลไกการกัดกินเลือดของยุง.....	10
2.3 พฤติกรรมการผสมพันธุ์ การวางไข่ และแหล่งเกาะพัก.....	10
2.4 ความสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุข.....	11
2.5 การควบคุมและการป้องกันกำจัดยุงลายบ้าน.....	13
2.6 พืชและสารองค์ประกอบหลักจากพืชที่นำมาใช้ในการทดลอง.....	15
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	22
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน.....</b>	<b>25</b>
3.1 การเตรียมอุปกรณ์ในการดำเนินงานวิจัย.....	25
3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการทดลอง.....	25
3.1.2 อุปกรณ์ในการให้เลือดยุงลายบ้านแบบเทียม (Membrane feeding technique).....	25
3.1.3 อุปกรณ์ในการวางไข่ยุงลายบ้าน.....	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และแจ้งอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.1.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมน้ำมันระเหยจากพืชและองค์สารประกอบหลัก ที่นำมาใช้ในการทดลอง.....	25
3.1.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืช ผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการป้องกันกำจัดลูกน้ำวัย 4 และตัวโม่งของยุงลายบ้าน และ ศึกษาความเป็นพิษต่อลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาของยุงลายบ้าน.....	26
3.1.6 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสม กับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการสลบและการตายของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน.....	26
3.1.7 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืช ผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้าน.....	26
3.1.8 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืช ผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการวางไข่ของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน.....	26
3.1.9 สารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้เป็นสารการทดลองเปรียบเทียบ (positive control).....	27
3.2 วิธีการดำเนินงาน.....	35
3.2.1 การเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง.....	35
3.2.2 ขั้นตอนการเตรียมถ้วยสำหรับวางไข่ของยุงลายบ้าน.....	36
3.2.3 การเตรียมน้ำมันระเหยจากพืชและสารองค์ประกอบหลักที่นำมาใช้ใน การทดลอง.....	36
3.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสาร องค์ประกอบหลัก ต่อการป้องกันกำจัดลูกน้ำวัย 4 และตัวโม่งของยุงลายบ้าน และศึกษา ความเป็นพิษต่อสัณฐานและสรีรวิทยาของยุงลายบ้าน.....	41
3.2.5 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสาร องค์ประกอบหลัก ต่อการสลบและการตายของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน.....	48
3.2.6 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสาร องค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้าน.....	52
3.2.7 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสาร องค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการวางไข่ของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน.....	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และขอย้ำอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่ 4 ผลการทดลอง.....</b>	57
4.1 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสาร องค์ประกอบหลัก ต่อการป้องกันกำจัดลูกน้ำวัย 4 และศึกษาความเป็นพิษต่อสัณฐาน และสรีรวิทยาของยุงลายบ้าน.....	57
4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสาร องค์ประกอบหลัก ต่อการป้องกันกำจัดตัวโม่ง และศึกษาความเป็นพิษต่อสัณฐานและ สรีรวิทยาของยุงลายบ้าน.....	65
4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสาร องค์ประกอบหลัก ต่อการสลบและตายของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน.....	72
4.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสาร องค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้าน.....	79
4.5 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสาร องค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการวางไข่ของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน.....	82
<b>บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....</b>	85
5.1 การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสาร องค์ประกอบหลัก ต่อการป้องกันกำจัดลูกน้ำวัย 4 และศึกษาความเป็นพิษต่อสัณฐาน และสรีรวิทยาของยุงลายบ้าน.....	85
5.2 การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสาร องค์ประกอบหลัก ต่อการป้องกันกำจัดตัวโม่ง และศึกษาความเป็นพิษต่อสัณฐานและ สรีรวิทยาของยุงลายบ้าน.....	87
5.3 การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสาร องค์ประกอบหลัก ต่อการสลบและการตายของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน.....	88
5.4 การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสาร องค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้าน.....	89
5.5 การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสาร องค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการวางไข่ของยุงลายบ้าน.....	90

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย.....	93
6.1 สรุปผลการทดลอง.....	93
6.2 ข้อเสนอแนะ.....	94
บรรณานุกรม.....	95
ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์.....	102
ประวัติผู้เขียน.....	189



# สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ ตะไคร้บ้าน และ อบเชยเทศ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS).....	21
4.1	ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการตายของลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้าน หลังการทดลอง 1, 5, 10, 15, 30 นาที 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง.....	60
4.2	ความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยของพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการตายและการพัฒนาที่ผิดปกติทางสัณฐานและสรีรวิทยาของลูกน้ำ ยุ้งลายบ้าน หลังการทดลอง 24 ชั่วโมง.....	63
4.3	ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการตายของตัวโม่งยุ้งลายบ้าน หลังการทดลอง 1, 5, 10, 15, 30 นาที 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง.....	69
4.4	ความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยของพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการตายและการพัฒนาที่ผิดปกติทางสัณฐานและสรีรวิทยาของตัวโม่ง ลายบ้าน หลังการทดลอง 48 ชั่วโมง.....	70
4.5	ผลของน้ำมันหอมระเหยของพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการสลบของตัวเต็มวัยเพศเมียยุ้งลายบ้าน หลังการทดลอง 1, 5, 10, 15, 30 และ 60 นาที.....	76
4.6	ผลของน้ำมันหอมระเหยของพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการตายของตัวเต็มวัยเพศเมียยุ้งลายบ้าน หลังการทดลอง 24 ชั่วโมง.....	77
4.7	ผลของน้ำมันหอมระเหยของพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการฟักไข่ของยุ้งลายบ้าน หลังการทดลอง 48 ชั่วโมง.....	80
4.8	ผลของน้ำมันหอมระเหยของพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการวางไข่ของตัวเต็มวัยเพศเมียยุ้งลายบ้าน หลังการทดลอง 3 วัน...	83

# สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	วงจรชีวิตของยุงลายบ้าน ( <i>Aedes aegypti</i> L.) ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบสมบูรณ์ (Complete metamorphosis) ประมาณ 9-14 วัน.....	5
2.2	ยุงลายบ้านมีการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบสมบูรณ์ (Complete metamorphosis) มี 4 ระยะ คือ ก) ระยะไข่ ข) ระยะลูกน้ำวัยที่ 1 ค) ระยะลูกน้ำวัยที่ 2 ง) ระยะลูกน้ำวัยที่ 3 จ) ระยะลูกน้ำวัยที่ 4 ฉ) ระยะตัวมดข) ตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมีย และ ช) ตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศผู้.....	7
2.3	ภาพที่ 2.3 ส่วนหัวของยุงลายบ้าน (ก) และ ส่วนประกอบของปากยุงลายบ้าน (ข).....	8
2.4	บริเวณอกปล้องกลางของยุงลายบ้านมีเส้นสีขาวยาวรูปเคียว (เส้นโค้ง) 2 เส้น.	9
2.5	การกัดกินเลือดของตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้าน.....	10
2.6	การผสมพันธุ์ของยุงลายบ้านเพศผู้และเพศเมีย.....	11
2.7	ผลิตภัณฑ์สารเคมีสังเคราะห์กำจัดยุงที่ขายในท้องตลาด ก) 1% (w/w) temephos (ทรายจีพีโอ-1 <sup>®</sup> ; temephos 1% w/w ข) 20 % (w/v) เฟอร์นิโทรไทออน (ซูมิไรออน 20 ซีเอส <sup>®</sup> ) ค) 1.6% (w/w) พราเลทริน (ไบกอน <sup>®</sup> ) และ ง) 0.3% ดี-อัลเลทริน (ไบกอน <sup>®</sup> ).....	15
2.8	จันทน์เทศ ( <i>Myristica fragrans</i> Houtt.): ก) เมล็ดจันทน์เทศ และ ข) สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารองค์ประกอบหลักที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยเมล็ดจันทน์เทศ คือ alpha-pinene.....	17
2.9	ตะไคร้บ้าน ( <i>Cymbopogon citratus</i> (D.C) Stapf): ก) ลำต้นสดตะไคร้บ้าน และ ข) สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารองค์ประกอบหลักที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยลำต้นตะไคร้บ้าน คือ geranial.....	19
2.10	อบเชยเทศ ( <i>Cinnamomum verum</i> J. Presl): ก) เปลือกลำต้นอบเชยเทศ และ ข) สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารองค์ประกอบหลักที่ได้จากเปลือกอบเชยเทศ คือ trans-cinnamaldehyde.....	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ ฝังอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
3.1	อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง: ก) ถังน้ำพลาสติก ขนาด 50 ลิตร ข) ก่องพลาสติก สำหรับเลี้ยงลูกน้ำและตัวโม่ง ขนาด 18×27×10 เซนติเมตร ค) อาหารสำหรับเลี้ยงลูกน้ำยุงลายบ้าน: อาหารปลาชนิดเม็ดโปรตีน 38% (OPTIMUM®) ง) ถ้วยพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร และสูง 3.5 เซนติเมตร จ) กรงเลี้ยงแมลง ขนาด 30×30×30 เซนติเมตร และ ฉ) อาหารสำหรับเลี้ยงตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน: น้ำหวานความเข้มข้น 5% + multivitamin ความเข้มข้น 2%.....	27
3.2	อุปกรณ์ในการให้เลือดยุงลายบ้านแบบเทียม (Membrane feeding technique): ก) ลำไส้หมู ข) เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำแบบวน (Circulating water bath) ค) กระจกเปาะแก้ว (Glass feeding) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร ง) สายยาง (Rubber tube) จ) เลือดมนุษย์ และ ฉ) หลอดดูดเลือด (Dropper) ขนาด 4.6 เซนติเมตร.....	28
3.3	อุปกรณ์ในการวางไข่ยุงลายบ้าน : ก) น้ำปราศจากคลอรีน ข) กระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1®) ขนาด 6×15 เซนติเมตร และ ค) ถ้วยพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร.....	29
3.4	อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมน้ำมันระเหยจากพืชและสารองค์ประกอบหลักที่นำมาใช้ในการทดลอง : ก) น้ำปราศจากคลอรีน ข) tween 60 (RHEODOL TW – S120V®) ค) เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer Genie® 2) ง) น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ จ) น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน ฉ) น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ ช) สาร alpha-pinene ซ) สาร geranial และ ฉ) สาร <i>trans-cinnamaldehyde</i> .....	30
3.5	อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการป้องกันกำจัดของลูกน้ำวัย 4 และตัวโม่งของยุงลายบ้าน และศึกษาความเป็นพิษต่อลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาของยุงลายบ้าน : ก) ถ้วยพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร ข) หลอดดูด (Dropper) ค) ผ้าตาข่าย 15×15 เซนติเมตร ง) นาฬิกาจับเวลา และ จ) น้ำปราศจากคลอรีน.....	31

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
3.6	อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการสลบและการตายของตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้าน : ก) เครื่องดูดแมลง (Aspirator) ข) กระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1 <sup>®</sup> ) ขนาด 11.5×15 เซนติเมตร และ ค) ชุดทดสอบ WHO Standard Susceptibility Test Kit.....	32
3.7	อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้าน : ก) ไข่ยุงลายบ้าน ข) เครื่องนับจำนวน ค) น้ำปราศจากคลอรีน ง) ถ้วยพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร และ จ) กล้องสเตอริโอ (NIKON <sup>®</sup> , Type 102).....	33
3.8	อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการวางไข่ของตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้าน : ก) กรงเลี้ยงแมลง ขนาด 30×30×30 เซนติเมตร ข) ถ้วยพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร ค) กระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1 <sup>®</sup> ) ขนาด 6×15 เซนติเมตร ง) ไมโครปิเปตต์ (FNMPIPETTE <sup>®</sup> F2) จ) ถ้วยพลาสติกสำหรับใส่น้ำหวาน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร สูง 2.5 เซนติเมตร ฉ) น้ำหวานความเข้มข้น 5% + multivitamin ความเข้มข้น 2% และ ช) น้ำปราศจากคลอรีน.....	34
3.9	สารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้เป็นสารการทดลองเปรียบเทียบ (positive control) : ก) 1% (w/w) temephos (ทรายจีพีโอ-1 <sup>®</sup> ) และ ข) 1% (w/v) alpha-cypermethrin (ดีทรอยด์ 10 <sup>®</sup> ).....	34
3.10	ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการ (ก-ง).....	38
3.11	ขั้นตอนการให้ยุงกินเลือดแบบเทียม (Membrane feeding method) (ก-ค)	39
3.12	ขั้นตอนการเตรียมถ้วยสำหรับวางไข่ยุงลายบ้าน (ก-ข).....	40
3.13	ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักของสารแต่ละชนิด ต่อการกำจัดลูกน้ำวัยที่ 4 และตัวไม่ยุงลายบ้าน ด้วยวิธีการจุ่ม (Dipping bioassay) (ก-ง).....	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ อนุญาตให้นำไปใช้

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
3.14	ลักษณะการตายแบบ Normal Larvae (NL) คือ ลักษณะการตายแบบปกติ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานและสรีรวิทยา (ก-ค).....	44
3.15	ลักษณะการตายแบบ Deformed Larvae (DL) คือ ลักษณะการตายของลูกน้ำแบบผิดปกติที่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นตัวโม่่งได้อย่างสมบูรณ์ (ก-ง).....	44
3.16	ลักษณะการตายแบบ Deformed Larval-Pupal Intermediate (LP) คือ ลักษณะการตายของลูกน้ำยุงลายบ้านแบบผิดปกติ โดยบริเวณส่วนหัวของลูกน้ำยุงลายบ้านผิดปกติ ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาของลูกน้ำยุงลายบ้านไปเป็นตัวโม่่งได้สมบูรณ์ (ก-ง).....	45
3.17	ลักษณะการตายแบบ White Pupa (WP) คือ ลักษณะการตายที่ผิดปกติของตัวโม่่ง โดยสีผิวบริเวณผนังลำตัวมีสีขาวเหือก ยกเว้นส่วนตาที่ปกติ (ก-ข).....	45
3.18	ลักษณะการตายแบบ Dead Normal Brown Pupa (BP) คือ ลักษณะการตายของตัวโม่่งแบบปกติ ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยา (ก-ข).....	45
3.19	ลักษณะการตายแบบ Deformed Pupa (DP) คือ ลักษณะผิดปกติของตัวโม่่งยุงลายบ้านที่ส่วนหัวขยายใหญ่ คล้ายส่วนหัวช้าง (Elephantoid) (ก-ง).....	46
3.20	ลักษณะการตายแบบ Adult Attached to the Pupal Stage (PA) คือ ลักษณะการตายแบบผิดปกติของของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านที่มีรูปร่างไม่สมบูรณ์ (ก-ฉ).....	46
3.21	ลักษณะการตายแบบ Deformed Adult (DA) คือ ลักษณะการตายที่ผิดปกติของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านแบบผิดปกติ โดยตัวโม่่งยุงลายบ้านสมบูรณ์ แต่ตัวเต็มวัยมีลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาไม่สมบูรณ์ ได้แก่ ลำตัว หนวดและปีกไม่สมบูรณ์ ปีกกุด และปีกบิดเบี้ยว (ก-ข).....	47
3.22	ลักษณะการตายแบบ Normal Adult (NA) คือ ลักษณะการตายของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านที่ปกติ โดยที่ลูกน้ำสามารถพัฒนาไปเป็นตัวโม่่ง และตัวเต็มวัยอย่างสมบูรณ์ (ก-ข).....	47

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
3.23	ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักแต่ละชนิด ต่อการสลบและการตายของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมีย ด้วยวิธีการสัมผัส (Contact method) (ก-ช).....	50
3.24	ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักแต่ละชนิดต่อการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้านด้วยวิธีการหยด (Topical application) (ก-ค).....	53
3.25	ขั้นตอนการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักแต่ละชนิด ต่อการยับยั้งการวางไข่ตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน ด้วยวิธีการ Double choice method (ก-ง).....	56
4.1	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตายกับระยะเวลาของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อลูกน้ำวัย 4 ยุงลายบ้าน.....	64
4.2	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตายกับระยะเวลาของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อตัวโม่งยุงลายบ้าน.....	71
4.3	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการสลบกับระยะเวลาของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้าน.....	78
4.4	เปอร์เซ็นต์อัตราการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้านของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก หลังการทดลอง 48 ชั่วโมง.....	81
4.5	คุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักต่อการดึงดูดและไล่ตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้านในการวางไข่.....	84

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงในโรงงานอุตสาหกรรม การเผาถ่านหิน การเลี้ยงปศุสัตว์ที่เพิ่มมากขึ้น รวมทั้งการตัดไม้ทำลายป่า เมื่อต้นไม้ถูกโค่นลงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไนตรัสออกไซด์ และก๊าซมีเทนที่สะสมอยู่เป็นจำนวนมากก็จะถูกปล่อยสู่ชั้นบรรยากาศก่อให้เกิดสภาวะเรือนกระจกหรือภาวะโลกร้อนที่รุนแรงเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะในกลุ่มประเทศเขตร้อนและอบอุ่น ซึ่งจากการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศมีแนวโน้มที่เป็นภัยคุกคามต่อความเป็นอยู่ของมนุษย์ สุขภาพ และสิ่งแวดล้อมทางธรรมชาติ (European Commission, 2023) เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะส่งผลทำให้คาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำสูงขึ้นส่งผลให้แมลงที่มีระยะการเจริญเติบโตในน้ำมีการขยายพันธุ์และแพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว (Filho *et al.*, 2019) และแมลงที่สำคัญต่อการแพร่กระจายของโรคทางการแพทย์ที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายคือ ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti* (Linn.)) ซึ่งมีระยะลูกน้ำที่มีการเจริญเติบโตในน้ำ โดยลูกน้ำจะฟักออกจากไข่ได้เร็วขึ้นจาก 7 วัน เป็น 5 วัน และอุณหภูมิที่สูงขึ้นเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการพัฒนาการเจริญเติบโตของยุงลายบ้านได้มากขึ้นถึง 4 เท่า โดยอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ตัวโม่งจะพัฒนาเป็นยุงตัวเต็มวัย 4 วัน แต่ในอุณหภูมิ 32-34 องศาเซลเซียส ตัวโม่งจะสามารถพัฒนาเป็นยุงตัวเต็มวัยเพียง 1 วัน (Apiwathnasorn, 2012) ยุงลายบ้านสามารถพบได้ทั่วไปบริเวณบ้านเรือน มีแหล่งเพาะพันธุ์ขยายพันธุ์ในภาชนะเก็บน้ำ ท่อระบายน้ำทิ้ง โถง ถ้วยรองขาตู้กับข้าว หรือน้ำในแจกันดอกไม้ เป็นต้น ส่งผลก่อให้เกิดการระบาดของโรคติดต่อที่มียุงลายบ้านเป็นพาหะนำโรคที่ร้ายแรงมาสู่มนุษย์และสัตว์ เช่น โรคไข้เลือดออกเด็งกี (dengue hemorrhagic fever, DHF) โรคชิคุนกุนยาหรือโรคไข้วัดข้อ ยุงลาย (Chikungunya) และโรคไวรัสซิกา (Zika virus) เป็นต้น (กรมควบคุมโรค, 2566ก) จากการรวบรวมข้อมูลรายงานของสำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ในปี 2565 พบว่า จำนวนผู้ป่วยและเสียชีวิตจากโรคไข้เลือดออกเด็งกี พบผู้ป่วยสะสม 45,145 ราย เสียชีวิต 31 ราย มีรายงานผู้ป่วยมากกว่าปีที่ผ่านมา 4.5 เท่า โดยจังหวัดที่มีอัตราป่วยสูงสุด 5 อันดับแรก คือ แม่ฮ่องสอน (2203.33) รองลงมาคือ ตาก (252.74) ชลบุรี (152.29) เชียงใหม่ (136.38) และกรุงเทพมหานคร (135.38) ต่อประชากรแสนคน ตามลำดับ (กรมควบคุมโรค, 2566ข) สำหรับโรคไข้ชิคุนกุนยา พบจำนวนผู้ป่วยสะสม 1,370 ราย โดยจังหวัดที่มีอัตราป่วยสูงสุด 5 อันดับแรก คือ กาฬสินธุ์ (13.93) รองลงมาคือ กรุงเทพมหานคร (13.93) ชัยภูมิ (8.10) หนองคาย (5.41) และจันทบุรี (5.13) ต่อประชากรแสนคน ตามลำดับ (กรมควบคุมโรค, 2565ค) และโรคไวรัสซิกาพบจำนวนผู้ป่วยสะสม 66 ราย เป็นผู้ป่วยทั่วไป 45 ราย หญิงตั้งครรภ์ 20 ราย และทารกศีรษะเล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 ราย โดยจังหวัดที่มีอัตราป่วยสูงสุด 5 อันดับแรก คือ อุตรดิตถ์ (8.05) รองลงมาคือ น่าน (1.26) เชียงราย (0.54) กรุงเทพมหานคร (0.13) และลำปาง (0.28) ต่อประชากรแสนคน สำหรับในปี 2566 คาดการณ์ว่ามีความเสี่ยงที่จะพบผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสซิกาจำนวนมากขึ้น เนื่องจากประเทศไทยมีการระบาดรุนแรงของโรคติดเชื้อไวรัสซิกาในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา ซึ่งกลุ่มเสี่ยงคือ หญิงตั้งครรภ์เพราะเมื่อทารกที่คลอดจากมารดาที่ติดเชื้อไวรัสซิกา อาจพบภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงคือ ความพิการทางสมองและระบบประสาท และความผิดปกติทางด้านพัฒนาการในภายหลัง (กรมควบคุมโรค, 2563ง)

ดังนั้นการป้องกันกำจัดยุงลายบ้านเพื่อลดการกัดของยุงและป้องกันการรบกวนจากยุง จึงมีวิธีในการป้องกันหลายวิธี เช่น การใช้กับดักไฟฟ้า ผลิตภัณฑ์จากสารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้ในการป้องกันกำจัดและไล่ตัวเต็มวัยยุงลายแบบสเปรย์ฉีดพ่น และชนิดทา เช่น DEET (N,N-diethyl-3-methylbenzamide), IR 3535 3-[N-Butyl-N-acetyl]-aminopropionic acid) รวมทั้งยากู้ดกันยุงแบบขดที่มีส่วนผสมของสารเคมีในกลุ่มไพริทรอยด์ที่สามารถพบได้ตามท้องตลาด นอกจากนี้ยังพบสารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่นิยมใช้ทั่วไปตามบ้านเรือนที่นำมาใช้ในการป้องกันกำจัดลูกน้ำ คือ ทิมิฟอส (temephos) เนื่องจากมีราคาถูก สะดวกและง่ายต่อการใช้งานสามารถหาซื้อได้ทั่วไปตามท้องตลาด แต่เมื่อมีการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในระยะเวลาสั้น และในปริมาณที่ไม่เหมาะสมแมลงจะมีกลไกในการต้านทานสารฆ่าแมลงมากขึ้น (สิริภักดิ์ สุระพร, 2562) อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อมนุษย์ สัตว์ สิ่งแวดล้อม และสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมายในการป้องกันกำจัด (ภาณุกิจ กันหาจันทร์ และคณะ, 2563) จากปัญหาดังกล่าวจึงมีการนำสารออกฤทธิ์จากพืชที่อยู่ในรูปน้ำมันหอมระเหยมาใช้ในการป้องกันกำจัดยุงลายบ้านเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ เพราะพืชเหล่านี้เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้เป็นอาหาร และยาพื้นบ้านมาเป็นเวลากว่า 1,000 ปี อาทิเช่น จันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt) ตะไคร้บ้าน (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) โป๊ยกั๊ก (*Illicium verum* Hook. f.) ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus globulus* Labill.) อบเชยเทศ (*Cinnamomum verum* J. Presl.) อบเชยญวน (*Cinnamomum loureirii* Nees.) และอบเชยจีน (*Cinnamomum aromaticum* Nees.) ซึ่งพืชเหล่านี้มีรายงานว่าฤทธิ์ในการกำจัดยุงลายบ้านได้ดี (เมตไทย, 2564; Aungtikun and Soonwera, 2021; Soonwera and Sittichok, 2020) หากผลการศึกษาในครั้งนี้ได้นำน้ำมันหอมระเหยชนิดใดชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการกำจัดยุงลายบ้าน ก็สามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์กำจัดยุงลายบ้านที่ปลอดภัยต่อมนุษย์และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากจันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.) ตะไคร้บ้าน (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) และอบเชยเทศ (*Cinnamomum verum* J. Presl.) ผสมกับสารออกฤทธิ์หลัก alpha-pinene, geranial และ *trans*-cinnamaldehyde ต่อการตายของลูกน้ำยุงลายบ้าน

1.2.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากจันทน์เทศ ตะไคร้บ้าน และอบเชยเทศ ผสมกับสารออกฤทธิ์หลัก alpha-pinene, geranial และ *trans*-cinnamaldehyde ต่อการตายของตัวไม่ยุงลายบ้าน

1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากจันทน์เทศ ตะไคร้บ้าน และอบเชยเทศ ผสมกับสารออกฤทธิ์หลัก alpha-pinene, geranial และ *trans*-cinnamaldehyde ต่อการตายของตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน

1.2.4 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากจันทน์เทศ ตะไคร้บ้าน และอบเชยเทศ ผสมกับสารออกฤทธิ์หลัก alpha-pinene, geranial และ *trans*-cinnamaldehyde ต่อการยับยั้งการฟักไข่ยุงลายบ้าน

1.2.5 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากจันทน์เทศ ตะไคร้บ้าน และอบเชยเทศ ผสมกับสารออกฤทธิ์หลัก alpha-pinene, geranial และ *trans*-cinnamaldehyde ต่อการยับยั้งการวางไข่ของยุงลายบ้าน

## 1.3 ขอบเขตของการศึกษา

การวิจัยครั้งนี้ศึกษาทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาชั้น 3 ห้อง D313 และ D313/1 อาคารเจ้าคุณทหาร ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยมีขอบเขตการศึกษา ดังนี้

1.3.1 ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักต่อการตายของลูกน้ำวัย 4 และตัวไม่ยุงลายบ้านและความผิดปกติทางสัณฐานและสรีรวิทยากับสารเคมีสังเคราะห์ คือ 1% (w/w) temephos (ทรายจีพีโอ-1<sup>®</sup>) ด้วยวิธีการจุ่ม (Dipping bioassay)

1.3.2 ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักต่อการตายของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านกับสารเคมีสังเคราะห์ คือ 1% (w/v) alpha-cypermethrin (ดีทรอยด์ 10<sup>®</sup>) ด้วยวิธีการสัมผัส (Contact method) โดยใช้อุปกรณ์ทดสอบ WHO standard susceptibility test kit และใช้เกณฑ์การประเมินตามมาตรฐานการสร้าง ความต้านทานขององค์การอนามัยโลก (WHO)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.3 ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักต่อการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้านกับสารเคมีสังเคราะห์ คือ 1% (w/w) temephos (ทรายจีพีโอ-1<sup>®</sup>) ด้วยวิธีการหยด (Topical application)

1.3.4 ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักต่อการยับยั้งการวางไข่ของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านกับสารเคมีสังเคราะห์ คือ 1% (w/w) temephos (ทรายจีพีโอ-1<sup>®</sup>) ด้วยวิธีการ Double-choice method

## 1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบชนิดของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารออกฤทธิ์หลักที่มีคุณสมบัติในการตายของลูกน้ำ และตัวไม่ยุงลายบ้าน

1.4.2 ทราบชนิดของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารออกฤทธิ์หลักที่มีคุณสมบัติในการตายของตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน

1.4.3 ทราบชนิดของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารออกฤทธิ์หลักที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้าน

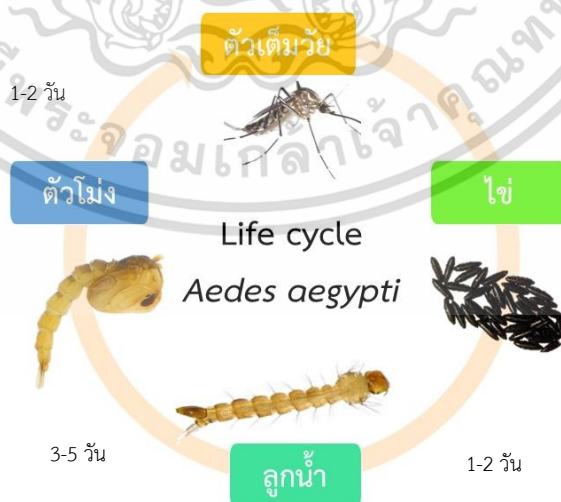
1.4.4 ทราบชนิดของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารออกฤทธิ์หลักที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการวางไข่ของตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน

1.4.5 เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดยุงลายบ้าน

## บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ชีวิตวิทยาและนิเวศวิทยาของยุงลายบ้าน

ยุงลายบ้านจัดอยู่ในอันดับ Diptera วงศ์ Culicidae ชื่อวิทยาศาสตร์ *Aedes aegypti* (Linn.) เป็นแมลงที่มีการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบสมบูรณ์ (Complete metamorphosis) ซึ่งสามารถแบ่งได้ 4 ระยะ คือ ระยะไข่ (egg) ระยะลูกน้ำ (larva) ระยะตัวโม่ง (pupa) และระยะตัวเต็มวัย (adult) (ภาพที่ 2.1) ซึ่งในแต่ละช่วงของการเจริญเติบโตของแต่ละระยะจะแตกต่างกันตามสภาพแวดล้อมและปัจจัยต่าง ๆ อาทิเช่น อุณหภูมิ อาหาร และความหนาแน่นของประชากร เป็นต้น ยุงลายบ้านเป็นแมลงขนาดเล็ก มีขนาดความยาวลำตัวประมาณ 4-6 มิลลิเมตร มีตา 2 ตา ไม่มีตาเดี่ยว ขอบและเส้นปีกปกคลุมด้วยเกล็ด ขาเป็นปล้องสีดำและสีขาวสลับเห็นได้ชัดเจน ด้านบนบริเวณส่วนอกจะมีแถบสีขาวเป็นรูปเคียว 2 เส้น ยุงลายบ้านจะใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตจากไข่จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัยประมาณ 9-14 วัน โดยยุงลายบ้านจะอาศัยตามบ้านเรือน น้ำหล่อชาตู้กับข้าว หรือโอ่ง ตัวเต็มวัยเพศเมียจะออกหากินในเวลากลางวันในช่วงเวลาสายและบ่าย บริเวณที่มีร่มเงา พื้นที่ออกหากิน เช่น ในอาคาร ใต้ร่มไม้ หรือสวนสาธารณะ เป็นต้น โดยการเจาะดูดกินเลือดมนุษย์และเหยื่ออื่น ๆ เป็นอาหาร และสามารถพบยุงลายบ้านได้มากในเขตร้อนและเขตอบอุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 28-35 องศาเซลเซียส (อุซาวดี ถาวร และ ชีรภาพ เจริญวิริยะภาพ, 2556; มยุรา สุณย์วีระ, 2560; ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์, 2560; อักษร จันทร์เทวี, 2563) ดังนั้นยุงลายบ้านจึงมีการขยายพันธุ์และแพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว โดยมีวงจรชีวิตของยุงลายบ้านดังนี้



ภาพที่ 2.1 วงจรชีวิตของยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti* L.) ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบสมบูรณ์ (Complete metamorphosis) ประมาณ 9-14 วัน

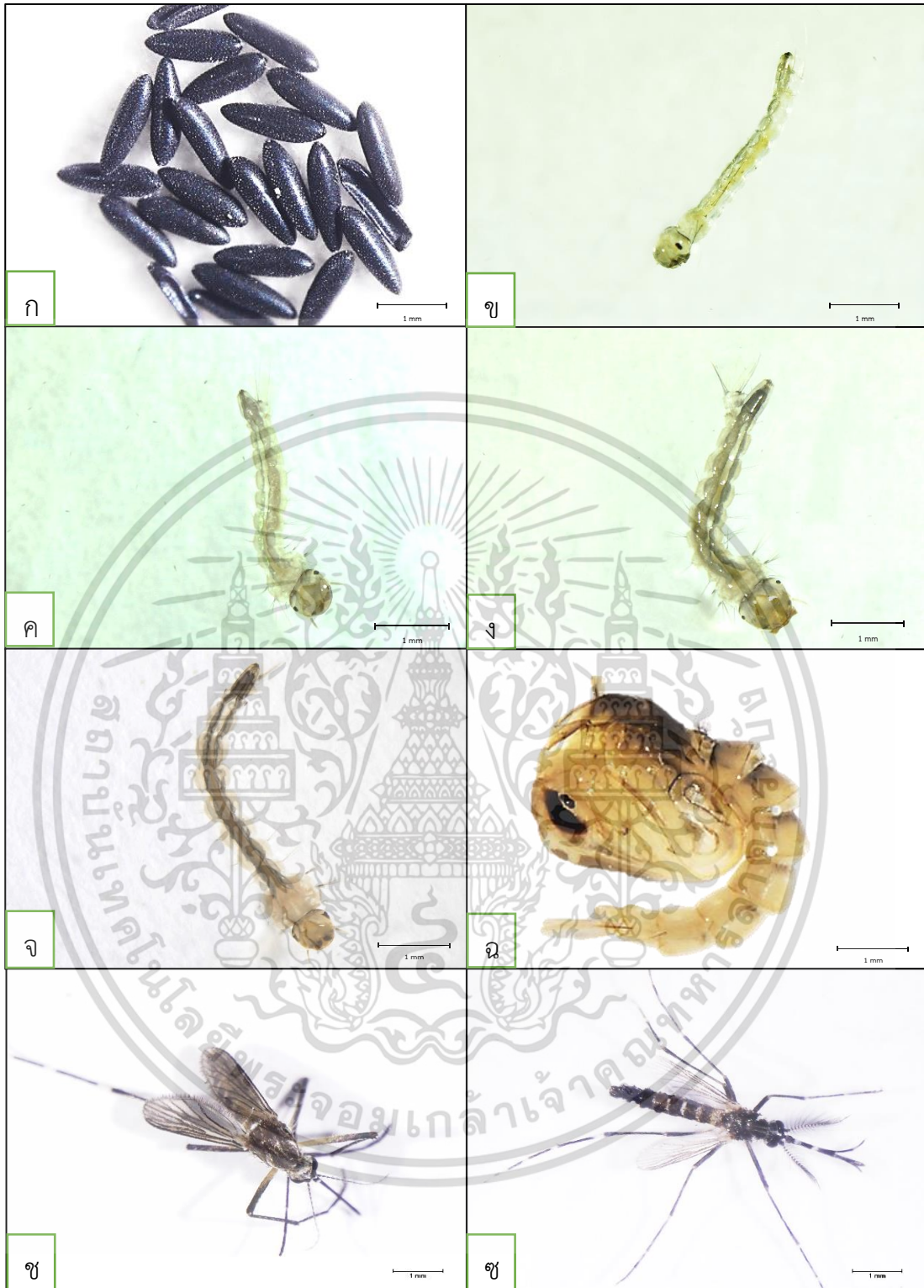
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ระยะไข่ (egg)** ไข่ของยุงลายบ้านจะมีลักษณะยาวรี ขนาด 1 มิลลิเมตร วางไข่เป็นฟองเดี่ยว ๆ เหนือบริเวณขอบน้ำ ในระยะแรกไข่มีสีขาว แล้วเปลี่ยนเป็นสีดำภายในเวลาประมาณ 12-24 ชั่วโมง เปลือกไข่มีลายคล้ายกระเบื้องโมเสค ไข่จะสามารถฟักออกมาเป็นลูกน้ำได้ภายใน 1-2 วัน และไข่สามารถอยู่ในสภาพที่แห้งได้เป็นเดือนหรือเป็นปีโดยที่ตัวอ่อนภายในไข่ยังสามารถมีชีวิตอยู่ แต่ถ้าอยู่ในสภาวะแห้งเป็นระยะเวลานานเกินไปตัวอ่อนภายในจะตายและไม่ฟักตัว แต่ถ้าไม่ได้ผ่านสภาวะแห้งเลยตัวอ่อนจะฟักตัวช้าหรือไม่ฟักเลยเช่นเดียวกัน ดังนั้นไข่ยุงลายบ้านต้องผ่านการฟักตัวอยู่ในสภาวะแห้งอย่างน้อยประมาณ 5-7 วัน เพื่อให้ตัวอ่อนพัฒนาเป็นลูกน้ำได้อย่างสมบูรณ์ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและสภาพอากาศ (ภาพที่ 2.2 ก)

**ระยะลูกน้ำ (larva)** ลูกน้ำจะประกอบไปด้วยส่วนหัว (head), อก (thorax) และท้อง (abdomen) ลูกน้ำของยุงมีทั้งหมด 4 ระยะ (1<sup>st</sup>-4<sup>th</sup> instar larva) ซึ่งมีการสังเคราะห์สาร chitin ที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโครงสร้างผนังลำตัวของแมลงเพื่อการพัฒนาเจริญเติบโต โดยลูกน้ำวัยที่ 1 มีขนาดของลำตัวสีขาวใสประมาณ 1 มิลลิเมตร เส้นขนบริเวณอกและท้องยังไม่สมบูรณ์ลักษณะหัวจะแคบและเป็นรูปสามเหลี่ยม (ภาพที่ 2.2 ข) ลูกน้ำวัยที่ 2 มีสีน้ำตาลใสขนาดลำตัวประมาณ 2-3 มิลลิเมตร หัวของลูกน้ำจะมีลักษณะเหมือนแคปซูลมีความหนูนมากขึ้น โดยศีรษะมีขนาดใหญ่และมีรูปร่างเป็นทรงกลม (ภาพที่ 2.2 ค) ลูกน้ำวัยที่ 3 มีลำตัวสีน้ำตาลขุ่น ขนาดลำตัวประมาณ 4-5 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2.2 ง) และลูกน้ำวัยที่ 4 มีขนาดลำตัวประมาณ 6-7 มิลลิเมตร เส้นขนบริเวณหัว อกและท้องมีการเจริญสมบูรณ์ ออกขยายอย่างเต็มที่ (ภาพที่ 2.2 จ) ลูกน้ำมีระบบหายใจแบบ Metapneustic respiratory system ซึ่งมีท่อหายใจอยู่บริเวณปลายท้องคู่สุดท้ายเรียกว่า siphon และมีขน subventral tuft หนึ่งคู่ ลูกน้ำยุงลายบ้านเมื่อเกาะพักที่ผิวน้ำ ลำตัวทำมุมเกือบตั้งฉากกับผิวน้ำ ลูกน้ำจาดำน้ำลงไปกินอาหารที่ก้นของภาชนะ ลักษณะการเคลื่อนที่คล้ายกับงูเลื้อยสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็ว สำหรับอาหารของลูกน้ำจะเป็นจุลินทรีย์เล็ก ๆ ที่อยู่ในน้ำ เช่น สาหร่าย และสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เมื่อได้รับอาหารที่เพียงพอจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และใช้ระยะเวลาประมาณ 5-7 วัน เพื่อพัฒนาเป็นตัวโม่่ง

**ระยะตัวโม่่ง (pupa)** ตัวโม่่งจะมีขนาดลำตัวยาวประมาณ 2-3 มิลลิเมตร เมื่อตัวโม่่งออกมาใหม่ ๆ จะมีสีน้ำตาล และเปลี่ยนเป็นสีดำ ส่วนหัวและอกจะเชื่อมติดกันคล้ายเป็นส่วนเดียวกันคล้ายกับเครื่องหมายจุลภาค ตัวโม่่งมีระบบการหายใจแบบ Propneustic respiratory system โดยบริเวณส่วนหัวพบท่อหายใจคู่หนึ่งลักษณะคล้ายแตรเรียกว่า trumpets และในปล้องสุดท้ายจะเปลี่ยนเป็นแผ่นที่มีรูปร่างคล้ายใบพาย (paddle) 1 คู่ ตัวโม่่งเป็นระยะที่ไม่มีการกินอาหารโดยจะหยุดพักเพื่อพัฒนาเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นตัวเต็มวัย มีนิสัยชอบลอยนึ่งอยู่บนผิวน้ำแต่จะเคลื่อนที่เร็วเมื่อถูกรบกวน ตัวโม่่งจะลอกคราบและใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยประมาณ 1-2 วัน โดยตัวเต็มวัยจะนำส่วนหัวออกมาก่อนเพื่อหายใจนำอากาศเข้าเพื่อไปขยายช่องท้องเพื่อลอกคราบออก (ภาพที่ 2.2 ฉ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

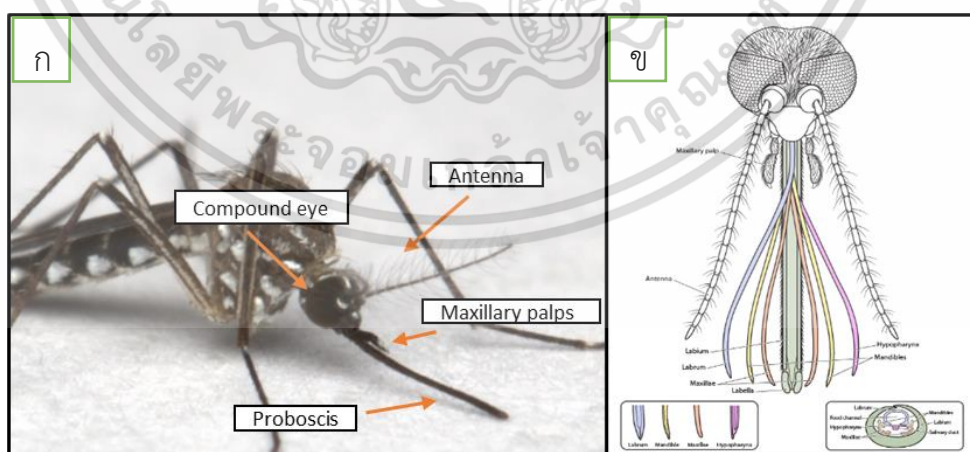


ภาพที่ 2.2 ยุงลายบ้านมีการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบสมบูรณ์ (Complete metamorphosis) มี 4 ระยะ คือ ก) ระยะไข่ ข) ระยะลูกน้ำวัยที่ 1 ค) ระยะลูกน้ำวัยที่ 2 ง) ระยะลูกน้ำวัยที่ 3 จ) ระยะลูกน้ำวัยที่ 4 ฉ) ระยะตัวมดง ช) ตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมีย และ ซ) ตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศผู้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ระยะตัวเต็มวัย (adult)** ตัวเต็มวัยของยุงลายบ้านมีลำตัวน้ำตาลเข้มถึงดำสนิท มีลวดลายสีเงินหรือ สีขาวตามลำตัว โดยเฉพาะข้อต่อของขาคู่หลัง ซึ่งลำตัวทั้งสองด้านซ้ายและขวาลักษณะเหมือนกัน และเท่ากัน (ภาพที่ 2.2 ช, ซ) สามารถแบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนหัว (head) ส่วนอก (thorax) และส่วนท้อง (abdomen) ดังนี้

- **ส่วนหัว (head)** ประกอบไปด้วยตา รวม 2 ตา (compound eye) ไม่มีตาเดี่ยว ที่มีรูปร่างคล้ายกับแมลงมีหน้าทีหลักในการมองเห็นและรับภาพ ปากแบบเจาะดูด (piercing-sucking mouthparts) ตรงกลางบริเวณด้านท้องของปาก (proboscis) มีอวัยวะยื่นยาวออกมาในลักษณะของท่อยาว โดยประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ที่มีลักษณะเหมือนริบบิ้นยาว 6 เส้น ได้แก่ mandible 2 เส้น maxilla 2 เส้น hypopharynx 1 เส้น labrum อย่างละ 1 เส้น ซึ่งจะประกอบกันเป็นท่อเพื่อใช้ในการดูดเลือด ในเวลาปกติส่วนประกอบทั้ง 6 นี้จะถูกเก็บไว้ใน labium เปรียบเสมือนถุงหุ้มปาก เมื่อยุงลายบ้านกัดกินเลือด labium จะงอโค้งอยู่บนผิวหนัง บริเวณด้านบนของปากจะมีรอยางค์ฟัน มีลักษณะเป็นปล้อง จำนวน 3 ปล้อง เรียกว่า maxillary palp ยุงลายบ้านมี palp 2 อัน มีลักษณะเป็นท่อสั้น ยุงลายบ้านเพศเมีย palp สั้นประมาณ  $\frac{1}{4}$  ของปาก ส่วน palp ของยุงลายบ้านเพศผู้ยาวและมีขนมากที่ปล้องสุดท้ายและงอขึ้น ซึ่ง palp ทำหน้าที่เป็นอวัยวะรับสัมผัสหรือรับสิ่งกระตุ้นทางเคมี เช่น สารเคมีที่ระเหยจากเหงื่อของเหยื่อ (ภาพที่ 2.3 ก,ข) หนวด (antenna) ของยุงลายบ้านสามารถใช้จำแนกยุงเพศผู้และเพศเมียได้ โดยหนวดของยุงเพศผู้จะมีขนเหมือนพู่ขนนก เรียกว่า plumose มีหน้าที่ในการรับคลื่นเสียงจากการกระพือปีกของยุงลายบ้านเพศเมียในการผสมพันธุ์ สำหรับหนวดของยุงลายบ้านเพศเมียมีลักษณะขนสั้น ๆ เรียกว่า pilose มีหน้าที่ในการรับความชื้นจากอากาศ รับกลิ่นและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากเหยื่อ (ภาพที่ 2.2 ช, ซ)



ภาพที่ 2.3 ส่วนหัวของยุงลายบ้าน (ก) และ ส่วนประกอบของปากยุงลายบ้าน (ข)

(ที่มา: <https://artpictures.club>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- **ส่วนอก (thorax)** แบ่งออกเป็น 3 ปล้อง ได้แก่ อกปล้องแรก (pronotum), อกปล้องกลาง (mesonotum) และอกปล้องหลัง (metanotum) อกปล้องกลางมีขนาดใหญ่เห็นเด่นชัดมากที่สุดโดยบริเวณส่วนบนของอกปล้องกลางจะมี scutum ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นแข็งมีเส้นสีขาวยูรูปเคียว (เส้นโค้ง) 2 เส้น อยู่ทางด้านข้างของอกแต่ละฝั่ง (ภาพที่ 2.4) และบริเวณด้านข้างของอกแต่ละส่วนจะมีขายื่นออกมา 1 คู่ ดังนั้นจึงมีขาทั้งหมด 3 คู่ มีลักษณะเป็นท่อยาวแบ่งเป็นปล้อง ๆ มีเกล็ดปกคลุมตลอดทั้งขาคล้ายสีขาและสีดำ สำหรับอกส่วนกลางจะมีปีก (wing) 1 คู่ ยื่นออกมามีลักษณะปีกเป็นแผ่นเยื่อบาง ๆ (membrane) และอกส่วนหลังของยุงลายบ้านยังมีปีกที่หดสั้นจนมีลักษณะเป็นตุ่มปีกเล็ก ๆ (halters) ที่ทำหน้าที่ควบคุมการทรงตัวในเวลาที่ยุงบิน

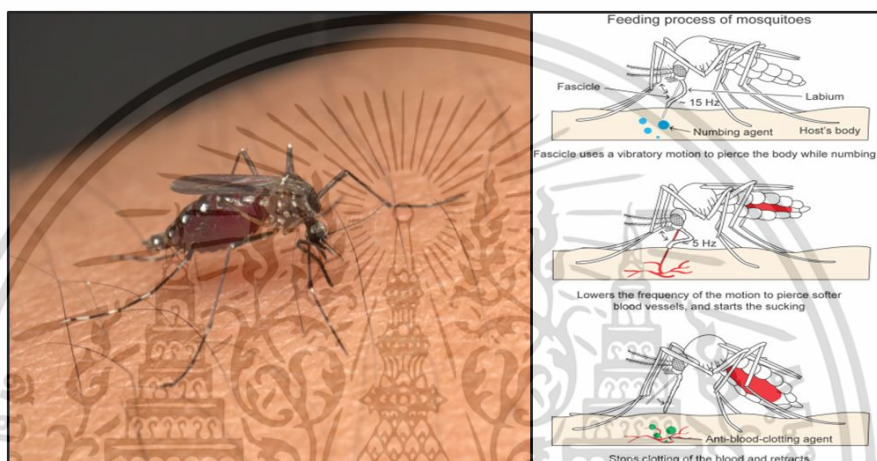


ภาพที่ 2.4 บริเวณอกปล้องกลางของยุงลายบ้านมีเส้นสีขาวยูรูปเคียว (เส้นโค้ง) 2 เส้น

- **ส่วนท้อง (abdomen)** แบ่งออกเป็น 10 ปล้อง แต่สามารถเห็นได้ชัดเพียง 8 ปล้อง ซึ่งจะมีเกล็ดสีขาวยูรูปเคียวปกคลุมตลอดทั้งบริเวณส่วนท้อง และบริเวณท้องปล้องสุดท้ายของเพศผู้มีอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอก (terminalia) ยื่นออกมาเป็นลักษณะขอเกี่ยว เรียกว่า claspers ในขณะที่เพศเมียจะมีลักษณะเป็นแท่งสั้น ๆ 1 คู่ เรียก cerci โดย claspers ของเพศผู้มีหน้าที่ยึดจับกับ cerci ของเพศเมียในระหว่างการผสมพันธุ์ เมื่อยุงเพศผู้เจริญออกจากตัวโม่งใหม่ ๆ claspers จะอยู่ในลักษณะหงายขึ้นไม่สามารถยึดจับ cerci ของเพศเมียได้ จนเมื่อเวลาผ่านไป 12-24 ชั่วโมง claspers จะหมุนคว้าง จนสามารถที่จะยึดจับกับ cerci ได้ ดังนั้นในธรรมชาติยุงเพศผู้จะมีการเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยก่อนยุงเพศเมียประมาณ 1 วัน เพื่อรอให้ claspers หมุนกลับจนอยู่ในลักษณะที่พร้อมผสมพันธุ์กับเพศเมียได้ทันทีเมื่อยุงเพศเมียเจริญตามออกมาภายหลัง จากเหตุผลดังกล่าวทำให้ยุงเพศเมียเกือบทั้งหมดในธรรมชาติจึงผ่านการผสมพันธุ์แล้ว

## 2.2 กลไกการกัดกินเลือดของยุง (ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์, 2560)

ตัวเต็มวัยยุงลายบ้านมีอวัยวะภายในที่สำคัญ คือ ต่อมน้ำลายอยู่ในอกส่วนหน้าทำหน้าที่ผลิตน้ำลาย ซึ่งจะถูกบีบให้ผ่านทางท่อ hypopharynx เพื่อส่งเข้าไปใต้ผิวหนังของเหยื่อในเวลาที่ถูกกัดกินเลือด น้ำลายจะทำหน้าที่ป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ทำให้ไม่เกิดการอุดตันของปากยุงระหว่างที่ถูกกัดกินเลือด เมื่อเชื้อโรคที่อาศัยยุงเป็นพาหะนำโรคลงใช้ช่องทางนี้ในการบุกรุกเข้าสู่ร่างกายของคนหรือสัตว์ (ภาพที่ 2.5)



ภาพที่ 2.5 การกัดกินเลือดของตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้าน  
(ที่มา: Gurera *et al.*, 2018)

## 2.3 พฤติกรรมการผสมพันธุ์ การวางไข่ และแหล่งเกาะพัก (อุษาวดี ถาวร และคณะ, 2553; ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์, 2560; อักษร จันทร์เทวี, 2563)

ยุงลายบ้านเพศผู้และเพศเมียจำเป็นต้องดูดกินน้ำหวานจากพืช เพื่อใช้เป็นพลังงานในการดำรงชีวิต ซึ่งการผสมพันธุ์ของยุงมักเกิดขึ้นกลางอากาศ ยุงจะผสมพันธุ์ในขณะที่ยุงตัวผู้จำนวนหนึ่งบินเป็นกลุ่ม (swarming) ในเวลาหัวค่ำและใกล้รุ่ง มักเกิดการบินวนเป็นกลุ่มเหนือพุ่มไม้ตามทุ่งโล่งหรือบริเวณใกล้กับเหยื่อ เช่น บนศีรษะของคน เป็นต้น (ภาพที่ 2.6) เมื่อยุงลายบ้านเพศเมียได้รับการผสมพันธุ์แล้วมีความจำเป็นต้องการโปรตีนจากเลือดมนุษย์เป็นอาหารเพื่อนำไปสร้างไข่ ซึ่งตัวเต็มวัยยุงลายบ้านชอบดูดกินเลือดมนุษย์มากกว่าเลือดสัตว์ (anthropophilic mosquitoes) โดยยุงลายบ้านออกหากินในช่วงเวลาเช้า (09.00-11.00 น.) และช่วงเวลาบ่าย (13.00-14.30 น.) ซึ่งมีพฤติกรรมออกหากินภายในบ้าน หลังจากกินเลือดแล้วยุงลายบ้านมักเกาะอยู่ภายในบ้าน และโดยปกติยุงลายบ้านจะกินเลือดจนอิ่มเฉลี่ยประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อตัว เมื่อยุงลายบ้านพร้อมวางไข่ยุงลายบ้านจะหาแหล่งภาชนะที่บรรจุน้ำสีเข้ม และมีพฤติกรรมวางไข่ก่อนพระอาทิตย์ตก ในน้ำที่ค่อนข้างใสทั้งเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายในและภายนอกบ้านเรือน จะสะอาดหรือไม่สะอาดก็ได้ หรือแม้กระทั่งบริเวณที่มีน้ำขัง อาทิเช่น น้ำในยางรถยนต์ เป็นต้น ซึ่งไข่ยุงลายบ้านสามารถอยู่ในสภาพแห้งได้เป็นเวลาหลายเดือน และตลอดอายุขัยของยุงลายบ้านเพศเมียสามารถวางไข่ได้ประมาณ 4-7 ครั้ง จำนวนไข่เฉลี่ยครั้งละ 100-150 ฟอง สำหรับบริเวณที่ยุงลายบ้านใช้ในการเกาะพักอาศัยมักจะพบตามเสื้อผ้าที่ห้อยแขวน มุ้ง เชือก สายไฟ เครื่องใช้ครัวเรือน และ ฝาบ้าน เป็นต้น



ภาพที่ 2.6 การผสมพันธุ์ของยุงลายบ้านเพศผู้และเพศเมีย

## 2.4 ความสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุข

ยุงลายบ้านมีแหล่งเพาะพันธุ์อยู่ทุกบริเวณบ้านเรือนทุกหลังคาเรือนของประเทศไทย และยุงลายบ้านเป็นแมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์และก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับระบบสาธารณสุขทั่วโลก โดยเฉพาะบริเวณที่มีภูมิอากาศเขตร้อน-กึ่งเขตร้อน เช่น ประเทศไทย โดยเป็นที่นำพาหะนำโรคที่รุนแรงมาสู่มนุษย์โดยมีรายละเอียดดังนี้

ก). โรคไข้เลือดออกเดงกี (dengue hemorrhagic fever, DHF) (ตำราพันธุ์ ทองวัฒน์, 2560; โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน, 2023; สถาบันป้องกันควบคุมโรคเขตเมือง, 2024)

โรคไข้เลือดออกเดงกีมียุงลายบ้านเป็นพาหะนำโรคโดยเฉพาะในเขตชุมชนเมือง (urban transmission) ซึ่งยุงลายบ้านมีการเพิ่มขึ้นสาเหตุมาจากการเพิ่มขึ้นของแหล่งเพาะพันธุ์ เนื่องจากภัยพิบัติน้ำท่วมหรืออุทกภัยที่สูงขึ้นที่เป็นการเร่งการเจริญเติบโต อีกทั้งจากการที่มีความหนาแน่นของประชากรในประเทศไทยที่เพิ่มขึ้น จากรายงานของกรมควบคุมโรคตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2566 -11 มกราคม 2567 พบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก จำนวน 158,705 ราย เสียชีวิตจำนวน 190 ราย ซึ่งสูงกว่าปีที่ผ่านมา 3.5 เท่า และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง 5 จังหวัดแรกที่มีจำนวนผู้ป่วยสูงสุด ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ระยอง เพชรบุรี สงขลา และสมุทรสาคร ตามลำดับ โดยผู้เสียชีวิตจะมีอายุระหว่าง

55-64 ปี และจากผลตรวจทางห้องปฏิบัติการในผู้เสียชีวิตพบไวรัสเดงกีทั้ง 4 สายพันธุ์โดยพบ DENV-2 มากที่สุด รองลงมา คือ DENV-1 DENV-3 และ DENV-4 ตามลำดับ

เชื้อสาเหตุ: ไวรัสเดงกี (dengue virus; DENV) สกุล Flavivirus ในวงศ์ Flaviviridae มีจีโนมเป็น single stranded RNA มี 4 ซีโรทัยป์ serotype คือ DENV-1, DENV-2, DENV-3 และ DENV-4

ลักษณะอาการของโรค: ผู้ที่ได้รับเชื้อจะมีอาการไข้สูงอย่างเฉียบพลัน ปวดศีรษะ ปวดกระบอกตา ปวดกล้ามเนื้อ ปวดกระดูกและปวดข้อ อาจมีจุดเลือดออกที่บริเวณผิวหนัง และยังมีพบลักษณะของตัวที่โตผิดปกติ โดยจะมีเกล็ดเลือดต่ำและมีการรั่วของเม็ดเลือดแดงออกมานอกหลอดเลือด ถ้าไม่ได้รับการรักษาผู้ป่วยจะมีผิวหนังที่เย็น ไม่สามารถจับชีพจรและวัดความดันได้ในระยะท้ายผู้ป่วยจะมีความรู้สึกละเลยสับสนไป และอาจเสียชีวิตภายใน 12-24 ชั่วโมง หลังจากมีภาวะช็อก

การรักษา: ปัจจุบันในประเทศไทยมีวัคซีนป้องกันไข้เลือดออก 2 ชนิด คือ วัคซีน CYD-TDV (Dengvaxia®) และวัคซีน TAK-003 (Qdenga®) สามารถฉีดได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ที่มีอายุระหว่าง 4-60 ปี ซึ่งมีประสิทธิภาพในการป้องกันไข้เลือดออกจากยุงลายได้ทุกสายพันธุ์ได้ 80.2% และมีประสิทธิภาพ ในการป้องกันการนอนโรงพยาบาลจากไข้เลือดออกประมาณ 66-90% ในช่วง 4-4.5 ปี นอกจากนี้ยังมีวิธีการป้องกันยุงลายที่สามารถทำได้คือ การกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ทั้งภาชนะกักเก็บน้ำ หรือน้ำขังตามบ้านเรือน ไม่ว่าจะเป็้นตุ่มน้ำ จานรองขาตู้กับข้าว ยางรถยนต์เก่า เป็นต้น โดยการเทน้ำออกและคว่ำภาชนะที่ไม่ได้ใช้ รวมทั้งการป้องกันตัวเองด้วยการสวมเสื้อผ้ามิดชิดเพื่อป้องกันยุงกัด

ข). โรคชิคุนคุนยาหรือโรคไข้วัดช้อยุงลาย (chikungunya) (กรมควบคุมโรค, 2566จ; ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์, 2560; โรงพยาบาลบางปะกอก 8, 2562)

โรคชิคุนคุนยาหรือโรคไข้วัดช้อยุงลายมีลักษณะอาการคล้ายกับไข้เลือดออกเด็งกี แต่จะไม่มี การรั่วของพลาสมาออกนอกเส้นเลือด ผู้ป่วยจึงมีอาการที่ไม่รุนแรงมาก แต่จะมีอาการปวดข้อที่มัก เป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถไปทำงานได้ จากรายงานของกรมควบคุมโรคตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม-12 กรกฎาคม 2566 พบผู้ป่วยโรคชิคุนคุนยา จำนวน 598 ราย และไม่มีรายงาน ผู้เสียชีวิต กลุ่มอายุที่พบผู้ป่วยสูงสุด คือ 10-14 ปี รองลงมาคือ 65 ปีขึ้นไป และ 5-9 ปี ตามลำดับ

เชื้อสาเหตุ: เชื้อไวรัสชิคุนคุนยา (Chikungunya virus: CHIKV) สกุล Alphavirus ในวงศ์ Togaviridae มีจีโนมเป็น single stranded positive virus เป็น RNA virus มียุงลายบ้านและยุงลายสวนเป็นพาหะนำโรค

ลักษณะอาการของโรค: โรคชิคุนคุนยาจะมีอาการค่อนข้างเฉียบพลัน โดยมีระยะฟักตัวของโรค 2-3 วัน (หลังจากโดนยุงกัด) มีอาการปวดศีรษะรุนแรง ไข้สูงเฉียบพลัน คลื่นไส้ อาเจียน อ่อนเพลีย และผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีอาการปวดข้อตามร่างกาย เช่น ข้อมือ ข้อเท้า ข้อนิ้วมือ ข้อนิ้วเท้า เป็นต้น โดยอาการปวดจะเปลี่ยนตำแหน่งไปเรื่อย ๆ และอาจจะมีการอักเสบวมแดงจนไม่สามารถขยับตัวได้ อาการปวดข้อมักจะหายไป ใน 1-2 สัปดาห์ สามารถพบอาการแทรกซ้อนเกี่ยวกับระบบประสาท หัวใจ และทางเดินอาหารได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การรักษา: การรักษาโรคซิกาคนุยาจะเป็นไปตามลักษณะอาการที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะอาการปวดข้อก็จะได้รับยาแก้ปวดและยาลดไข้ สำหรับวัคซีนป้องกันการติดเชื้อยังอยู่ในขั้นตอนของการพัฒนา

ค. โรคไข้ซิกา (Zika virus disease) (นพพร โตะมี, 2558; กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค, 2566)

โรคไข้ซิกามีการระบาดในทวีปอเมริกา แอฟริกา เอเชีย รวมถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยมีศูนย์กลางเป็นพาหะนำโรค สาเหตุเกิดจากการที่โดนยุงที่มีเชื้อไวรัสซิกากัดโดยตรงและการแพร่เชื้อผ่านการมีเพศสัมพันธ์ หรือการแพร่จากมารดาที่มีเชื้อไวรัสซิกาสู่ทารกในครรภ์

เชื้อสาเหตุ: ไวรัสซิกา (Zika virus) ซึ่งไวรัสซิกาเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA) อยู่ในตระกูลฟลาวิไวรัส (Flavivirus)

ลักษณะอาการของโรค: ระยะฟักตัวของโรคไข้ซิกาใช้เวลาเฉลี่ย 4-7 วันหลังโดนยุงกัดอาการของผู้ที่มีเชื้อไวรัสซิกา จะมีไข้ เยื่อบุตาอักเสบ ปวดกล้ามเนื้อ และมีผื่นแดง ปกติแล้วจะมีอาการเหล่านี้เพียงเล็กน้อย และเชื้อไวรัสซิกาสามารถถ่ายทอดจากแม่ไปสู่ลูก ทารกที่คลอดจากมารดาที่ติดเชื้อไวรัสซิกาจะพบการเกิด ภาวะศีรษะเล็ก (Microcephaly) ได้ ไม่ว่ามารดาจะติดเชื้อไวรัสซิกาในช่วงไตรมาสที่ 1, 2 หรือ 3 และเกิดความผิดปกติได้แม้มารดาไม่มีอาการผิดปกติ ซึ่งพบความผิดปกติแต่กำเนิดที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสซิกา เช่น การเกิดภาวะศีรษะเล็กแต่กำเนิด โดยอวัยวะได้รับผลกระทบทางด้านระบบประสาท ระบบการมองเห็น การได้ยิน และความพิการทางภายนอก

การรักษา: ในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนป้องกันโรคไข้ซิกาโดยเฉพาะ การรักษาทำได้ด้วยการพักผ่อนให้เพียงพอ ดื่มน้ำมาก ๆ และรักษาตามอาการ เช่น ไข้ยาแก้ปวดเพื่อลดไข้หรือบรรเทาอาการปวด

## 2.5 การควบคุมและการป้องกันกำจัดยุงลายบ้าน (อุษวดี ถาวร และคณะ, 2553; อักษร จันทร์เทวี, 2563)

### 2.5.1 การจัดการแหล่งเพาะพันธุ์ (Breeding place management)

ยุงลายบ้านชอบวางไข่บนพื้นผิวที่เปียกมากกว่าการวางไข่บนผิวน้ำ รวมทั้งชอบวางไข่ในภาชนะสีเข้มที่บรรจุน้ำสีเข้ม ๆ โดยสภาพน้ำจะเป็นน้ำที่ค่อนข้างใส อาจจะสะอาดหรือไม่สะอาดก็ได้ เช่น แจกันดอกไม้ น้ำในยางรถยนต์ โถงใสน้ำดื่ม และบ่อคอนกรีตขังน้ำในห้องน้ำ เป็นต้น ดังนั้นวิธีการป้องกันคือการนำตาข่าย หรือผ้ามาปิดภาชนะเมื่อใช้งานเสร็จ ทำความสะอาดภาชนะและมีระบายน้ำทิ้งเปลี่ยนน้ำทุก 4-5 วัน สำหรับภาชนะที่แตก หรือยางรถยนต์เก่าที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์สามารถนำไปใส่ดินปลูกต้นไม้ หรือนำไปทำแนวกันดินป้องกันการถูกคลื่นชะทำลาย เป็นต้น

### 2.5.2 การควบคุมโดยใช้สารเคมี (Chemical control) (ภาพที่ 2.7)

การใช้สารเคมีในการควบคุมต้องมีการวางแผนการใช้อย่างรัดกุม ผู้ใช้ต้องมีความรู้และความเชี่ยวชาญ เพราะสารเคมีก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อมนุษย์ และราคาของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบมีราคาแพง เนื่องจากสารเคมีที่ใช้อย่างปลอดภัยในทางสาธารณสุขมีจำนวนไม่มากนัก อีกทั้งการใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมีในระยะเวลายาวนานส่งผลต่อสุขภาพผู้ใช้แล้วยังตกค้างในสภาพแวดล้อม อีกทั้งยังส่งผลให้ยุงพาหะเกิดความต้านต่อสารเคมีอีกด้วย ดังนั้นการใช้สารเคมีควบคุมจำนวนประชากรของยุงพาหะจึงแบ่งแยกใช้แต่ละระยะการเจริญเติบโตของยุงลายบ้าน อาทิเช่น สำหรับการใส่สารเคมีที่มีการใช้ในการควบคุมยุงลายบ้านในปัจจุบันมีดังนี้ การควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้านมีสารเคมีกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphate) เช่น 1% (w/w) temephos ที่อยู่ในรูปทรายกำจัดลูกน้ำใช้ในอัตราส่วนทรายกำจัดลูกน้ำ 1 กรัม ต่อน้ำ 10 ลิตร (ความเข้มข้นของสาร เท่ากับ 1 ppm) โดยใช้สารโรยตามองน้ำ และภาชนะต่าง ๆ ที่เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุง การควบคุมตัวเต็มวัยยุงลายบ้านด้วยวิธีการพ่นที่มีฤทธิ์ตกค้างที่แหล่งเกาะพัก มีสารเคมีกลุ่มไพเรทรอยด์สังเคราะห์ (Pyrethrins) เช่น 0.075% (w/v) Alpha-cypermethrin, 0.05% (w/v) permethrin และ 0.05% (w/v) Deltamethrin ที่อยู่ในรูปสารละลาย ใช้ฉีดพ่นบริเวณต่าง ๆ ที่มียุงอาศัยอยู่ ซึ่งสารเคมีในกลุ่มนี้มีความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่ำ และให้ประสิทธิภาพดีในการกำจัดยุง และการควบคุมตัวเต็มวัยยุงลายบ้านด้วยวิธีการพ่นแบบฟุ้งกระจายที่มีฤทธิ์ครอบคลุมพื้นที่กว้าง ซึ่งสารเคมีที่กำจัดแมลงที่องค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้ในการฉีดพ่นได้แก่ สารเคมีกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ไพเรทรอยด์สังเคราะห์ เช่น malation ใช้ปริมาณ 112-600 กรัม/เฮกตาร์ หรือ permethrin ใช้ปริมาณ 5-10 กรัม/เฮกตาร์ (1 เฮกตาร์ เท่ากับ 10,000 ตารางเมตร หรือประมาณ 6.25 ไร่) โดยวิธีการพ่นแบบหมอกควัน (fogging) และวิธีแบบฟอยละออง (Ultra Low Volume: ULV)

### 2.5.3 การควบคุมโดยใช้วิธีทางชีววิทยา (Biological control)

การนำศัตรูของยุงตามธรรมชาติที่สามารถหาได้ในท้องถิ่นมาใช้ในการควบคุมประชากรของยุงลายบ้านทุกระยะการเจริญเติบโต โดยไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น ลูกน้ำยุงยักษ์ แบคทีเรีย เชื้อรา หรือปลากินลูกน้ำ เป็นต้น

ก. การใช้ปลากินลูกน้ำ (Larvivorous fish) มีปลาหลายสกุลที่นำมาควบคุมยุงลายซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นปลาใน suborder Cyprinodontidae ปลากินลูกน้ำที่นิยมใช้อยู่ใน Family Poeciliidae เช่น ปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) โดยอัตราการใส่ปลากินลูกน้ำที่ได้ผลคือ ใช้ลูกน้ำ 3-5 ตัวต่อพื้นที่ผิวน้ำหนึ่งตารางเมตร ซึ่งสามารถทำลายยุงลายในระยะวงจรชีวิตอยู่ในน้ำได้ ทั้งในระยะไข่ ระยะลูกน้ำหรือตัวไม่

ข. การใช้ตัวห้ำ (Invertebrate predators) ตัวห้ำเป็นศัตรูธรรมชาติที่สามารถควบคุมประชากรของยุงได้ เช่น แมลงเหนี่ยง, แมลงตับเต่าหรือลูกน้ำยุงยักษ์ (*Toxorhynchites*) ซึ่งตัวเต็มวัยของยุงยักษ์เพศเมียไม่กัดกินเลือด แต่ลูกน้ำของยุงยักษ์ชอบกินลูกน้ำของยุงกันปล่อง ยุงรำคาญหรือยุงลาย อย่างไรก็ตามไม่สามารถใช้ลูกน้ำยุงยักษ์ร่วมกับฮอร์โมนได้ เนื่องจากจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตจนกระทั่งลูกน้ำยุงยักษ์ตาย

ค. การใช้แบคทีเรีย (Bacteria) แบคทีเรียที่สามารถกำจัดลูกน้ำยุงลายได้ดีที่สุดคือ *Bacillus thuringiensis serotype* เรียกว่า Bti เมื่อลูกน้ำกินแบคทีเรียเข้าไปสารพิษจะเข้าไปทำปฏิกิริยาเกิดพิษในกระเพาะทำให้ลูกน้ำตายภายในเวลา 1-48 ชั่วโมงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ โดยลำตัวของลูกน้ำที่ตายจะมีสีดำ อีกทั้งผลึกของสารพิษนี้สามารถผลิตใช้ทางอุตสาหกรรมในรูปของผงละลายน้ำ เม็ดหรือของเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.7 ผลิตภัณฑ์สารเคมีสังเคราะห์กำจัดยุงที่ขายในท้องตลาด: ก) 1% (w/w) temephos (ทรายจีพี โอ-1<sup>®</sup>) ข) 20 % (w/v) เพอร์นิโทรโทออน (ซูมิไรออน 20 ซีเอส<sup>®</sup>) ค) 1.6% (w/w) พราเลทริน (ไบกอน<sup>®</sup>) และ ง) 0.3% ดี-อัลเลทริน (ไบกอน<sup>®</sup>)

(ที่มา: <https://expertpestsystem.com/>, <https://enrichfogger.co.th/>, <https://www.baygon.co.th/>)

## 2.6 พืชและสารองค์ประกอบหลักจากพืชที่นำมาใช้ในการทดลอง

พืชที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 3 ชนิด มีรายละเอียดดังนี้

2.6.1 จันทน์เทศ (ฐานข้อมูลเครื่องยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2567ก; Aungtikun *et al.*, 2021; Vespermann *et al.*, 2017)

ชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ : จันทน์บ้าน (ภาคเหนือ), ลูกจันทน์, ดอกจันทน์, หน่วยसान, จันทน์ปาน (ทั่วไป), ปาลา (มลายู, มาเลเซีย), โหยงโต้โต้, เหน็กเต่าไขว่ (จีน)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Myristica fragrans* Houtt.

ชื่อสามัญ : Nutmeg

วงศ์ : Myristicaceae

นิเวศวิทยา : เป็นไม้เขตร้อน พบเป็นไม้ถิ่นในหมู่เกาะบันดา ประเทศอินโดนีเซีย หรือทางตะวันตกของประเทศอินเดีย เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนชื้นโดยเฉพาะทางภาคตะวันออกและทางภาคใต้ของไทย สามารถขึ้นได้ในพื้นที่ที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 900 เมตร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : จันทน์เทศจะมีต้นตัวผู้ และต้นตัวเมีย โดยต้นตัวผู้จะให้ดอกเฉพาะตัวผู้ และต้นตัวเมียจะให้ดอกเฉพาะตัวเมียนั้น ใบดอกเป็นใบเดี่ยวโดยออกเรียงสลับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะของใบเป็นรูปรี หรือ รูปไข่กลมรี ปลายใบแหลม โคนใบสอบ ส่วนขอบใบเรียบ ใบมีขนาด กว้างประมาณ 4-5 เซนติเมตร และยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร เนื้อใบแข็ง หลังใบเรียบเป็นมัน และเป็นสีเขียวอมสีเหลืองอ่อน ส่วนท้องใบเรียบ และเป็นสีเขียวอ่อน ส่วนก้านใบยาวประมาณ 6-12 มิลลิเมตร ดอกออกเป็นช่อ ช่อละประมาณ 2-3 ดอก หรือ ออกเป็นดอกเดี่ยว โดยจะออกตามซอกใบ ดอกเป็นสีเหลืองอ่อนอมขาว กลีบดอกเชื่อมติดกัน ดอกเป็นรูปคนโทคว่ำ ปลายกลีบแยกออกเป็น 4 แฉกแหลมช่อดอกยาวประมาณ 2.5-5 เซนติเมตร ซึ่งดอกจะเป็นแบบแยกเพศกันอยู่คนละต้น

โดยดอกเพศผู้จะเกิดเป็นกลุ่ม ๆ ส่วนดอกเพศเมียจะเกิดเป็นดอกเดี่ยว และดอกเพศเมียจะมีขนาดใหญ่มากกว่าดอกเพศผู้ โดยต้นตัวเมียเท่านั้นที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ส่วนต้นเพศผู้จะปลูกไว้เพื่อผสมเกสรกับต้นตัวเมียเท่านั้น ผลเป็นผลสด ค่อนข้างฉ่ำน้ำ ลักษณะของผลเป็นรูปทรงค่อนข้างกลม รูปร่างคล้ายกับลูกสาลี ยาวประมาณ 3.5-5 เซนติเมตร และมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6-7 เซนติเมตร เปลือกผลเรียบเป็นสีเหลืองนวล สีเหลืองอ่อน เหลืองออกส้ม หรือ สีแดงอ่อน ส่วนเนื้อมีสีครีมมีรสเปรี้ยวฝาดเมื่อผลแก่แตกออออกเป็น 2 ซีก เมล็ดลักษณะกลม ยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 เซนติเมตร เมล็ดเป็นสีน้ำตาล เนื้อ และเปลือกแข็ง มีจำนวน 1 เมล็ดต่อผล ส่วนค้ำนอกเมล็ดมีรสสีแดงเป็นริ้วคลุมทั่ว

**สรรพคุณ :** จันทน์เทศมีประโยชน์อย่างมากมาย โดยรกรกหุ้มเมล็ดและเมล็ดของลูกจันทน์ มีคุณสมบัติในเรื่องของบำรุงธาตุในร่างกาย เป็นยาบำรุงกำลัง บำรุงหัวใจ ช่วยแก้ดีซ่าน ช่วยกระจายเลือดลม แก้อาการปวดศีรษะ แก้อาการหอบหืด ช่วยทำให้เจริญอาหาร แก้อาการเบื่ออาหาร ช่วยแก้ร้อนใน ช่วยทำให้ชุ่มคอ แก้อาการกระหายน้ำ ช่วยแก้เลือดกำเดาไหล ช่วยขับเสมหะ ช่วยแก้อาการคลื่นไส้อาเจียน ช่วยแก้ลมจุกเสียดแน่นท้อง ช่วยในการย่อยอาหาร ช่วยแก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ช่วยแก้อาการท้องร่วง ช่วยแก้อาการปวดมดลูก ช่วยบำรุงน้ำดี และช่วยแก้ผื่นคัน

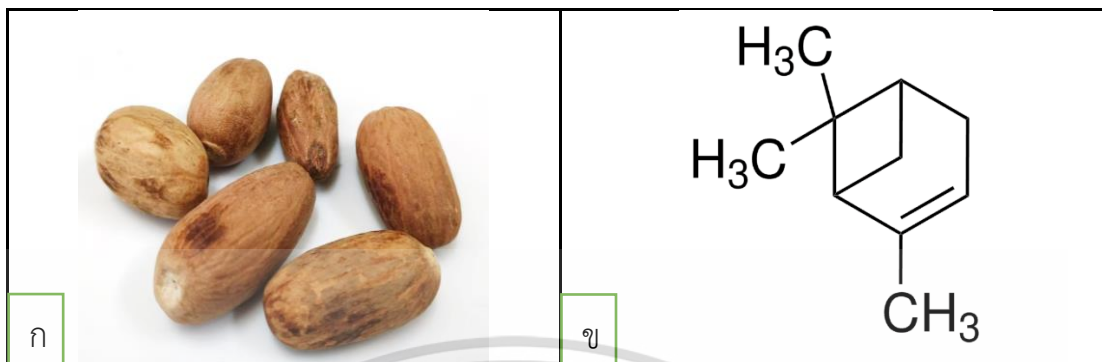
**ส่วนที่นำมาใช้ในการศึกษา :** เมล็ด (ภาพที่ 2.8 ก)

**องค์ประกอบทางเคมี :** น้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดจันทน์เทศมีสาร alpha-pinene (21.6%) เป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมาคือ สาร sabinene (19.4%), myristicin (14.4%), beta-pinene (14.1%), limonene (5.6%), terpinen-4-ol (4.1%), gamma-terpinene (3.9%) alpha-terpinene (2.8%), Safrole (2.2%), myrcene (1.9%), alpha-thujene (1.7%), 3-Carene (1.7%), terpinolene (1.7%), o-cymene (1.0%), cis-Isoeugenol (0.8%), alpha-terpineol (0.7%), alpha-Phellandrene (0.7%), camphene (0.4%), eugenol (0.3%), alpha-copaene (0.3%), elemicin (0.3%) และ trans-sabinene hydrate (0.2%) เป็นต้น (ตารางที่ 2.1)

**สารองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ:** มีสาร alpha-pinene ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสไม่มีสี เป็นสารประเภทโมโนเทอร์พีน (monoterpene) ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ มีสูตรทางเคมี คือ  $C_{10}H_{16}$  (ภาพที่ 2.8 ข) และใช้เป็นสารแต่งกลิ่นในน้ำมันและสารกระจาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลิ่น รวมทั้งสามารถใช้เป็นยาต้านมะเร็งในการแพทย์แผนจีน ด้านการอักเสบ ด้านจุลินทรีย์ ด้านมะเร็ง ด้านแผลในกระเพาะอาหาร กระตุ้นความจำ และคุณสมบัติป้องกันระบบทางเดินอาหาร



ภาพที่ 2.8 จันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.): ก) เมล็ดจันทน์เทศ และ ข) สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารองค์ประกอบหลักที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยเมล็ดจันทน์เทศ คือ alpha-pinene (ที่มา : <https://www.sigmaaldrich.com>)

2.6.2 ตะไคร้บ้าน (ฐานข้อมูลเครื่องยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2567ข; Aungtikun *et al.*, 2021)

**ชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ :** คาหอม (แม่ฮ่องสอน) จะไคร (เหนือ) เช็ดเกรย (เขมร สุรินทร์) ตะไคร้ (ภาคกลาง) ห่อวตะโป้ (กะเหรี่ยง แม่ฮ่องสอน) หัวสิงไค (เขมร ปราจีนบุรี) เหลอะเกรย (เขมร สุรินทร์) ไคร (คาบสมุทรม)

**ชื่อวิทยาศาสตร์ :** *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf

**ชื่อสามัญ :** Lemongrass

**วงศ์ :** Poaceae

**นิเวศวิทยา :** ตะไคร้บ้านเป็นพืชชนิดหนึ่งที่ผูกพันกับวิถีชีวิตของคนไทยเรามาตั้งแต่ออดีตแล้ว ทั้งนี้เพราะตะไคร้เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในแถบเขตร้อนของทวีปเอเชีย เช่น ไทย พม่า ลาว มาเลเซีย อินโดนีเซีย อินเดีย และศรีลังกา เป็นต้น และยังสามารถพบได้ในประเทศเขตร้อนบางประเทศในแถบอเมริกาใต้เช่นกัน ตะไคร้บ้านจัดเป็นพืชล้มลุกตระกูลหญ้า

**ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ :** ตะไคร้บ้านเป็นพืชล้มลุก มักมีอายุมากกว่า 1 ปี (ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสภาพแวดล้อม) ลำต้นตะไคร้บ้านมีเหง้าใต้ดิน ลำต้นมีลักษณะตั้งตรง รูปทรงกระบอก มีความสูงได้ถึง 1 เมตร (รวมทั้งใบ) ส่วนของลำต้นที่เรามองเห็นจะเป็นส่วนของกาบใบที่ออกเรียงซ้อนกันแน่น โคนต้นมีลักษณะกาบใบหุ้มหนา ผิวเรียบ และมีขนอ่อนปกคลุม ส่วนโคนมีรูปร่างอ้วน มีสีม่วงอ่อนเล็กน้อย และค่อย ๆ เรียวเล็กลงกลายเป็นส่วนของใบ แขนกลางเป็นปล้องแข็ง ส่วนนี้สูงประมาณ 20-30 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของดิน และพันธุ์ และเป็นส่วนที่นำมาใช้

สำหรับประกอบอาหาร ใบตะไคร้บ้านประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ก้านใบ หูใบ (ส่วนต่อระหว่างกาบใบ) และปล้องใบ (ส่วนที่ห่อหุ้มใบ) ใบตะไคร้บ้านมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว เนื่องจากมีน้ำมันหอมระเหยที่เรียกว่า ลิโมนีน (limonene) และซิโตรนัล (citronellal) ซึ่งมีส่วนช่วยในการขับลม แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ และช่วยในการย่อยอาหาร นอกจากนี้ ใบตะไคร้บ้านยังมีส่วนช่วยในการขับพิษ และช่วยในการรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจ และโรคไต เป็นต้น

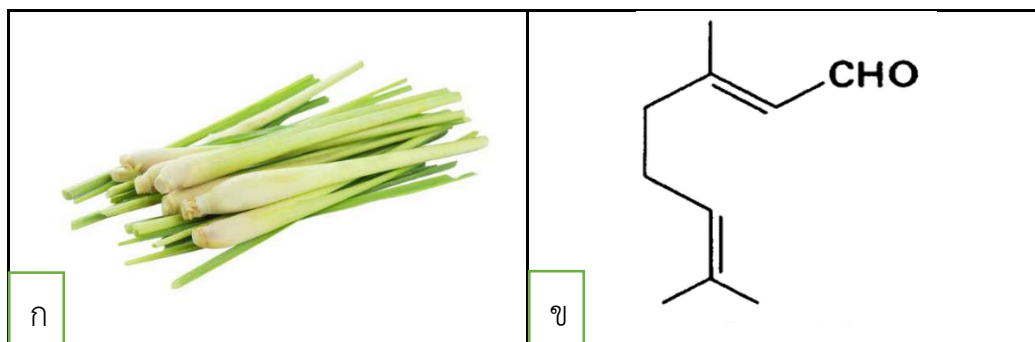
และใบ) และใบ ใบตะไคร้บ้าน เป็นใบเดี่ยว มีสีเขียว มีลักษณะเรียวยาว ปลายใบโค้งงูลงดิน โคนใบเชื่อมต่อกับหูใบ ใบมีรูปขอบขนาน ผิวใบสากมือ และมีขนปกคลุม ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ แต่คัมกลางใบมีเส้นกลางใบแข็ง สีขาวอมเทา มองเห็นต่างกับแผ่นใบชัดเจน ใบกว้างประมาณ 2 เซนติเมตร ยาว 60-80 เซนติเมตร ตะไคร้บ้านเป็นพืชที่ออกดอกยาก จึงไม่ค่อยพบเห็น ดอกตะไคร้บ้านดอกจะออกดอกเป็นช่อกระจาย มีก้านช่อดอกยาว และมีก้านช่อดอกย่อยเรียงเป็นคู่ ๆ ในแต่ละคู่จะมีใบประดับรองรับ มีกลิ่นหอม ดอกมีขนาดใหญ่คล้ายดอกอ้อ

**สรรพคุณ :** ตะไคร้บ้านมีสรรพคุณช่วยบำรุงไตให้แข็งแรง ช่วยให้ไตทำงานได้ดี อีกทั้งยังช่วยในการชำระล้างและกำจัดของเสียที่เป็นอันตรายออกจากร่างกาย บรรเทาอาการปวดและการอักเสบ การบรรเทาอาการปวดและการอักเสบจากโรคไขข้อ ช่วยลดอาการบวมอักเสบ ลดอาการปวดเมื่อย แก้เคล็ดขัดยอก แก้อาการนอนไม่หลับ ช่วยบำรุงเส้นประสาท ช่วยไล่แมลง ช่วยการลดไข้ บรรเทาอาการหวัด รักษาโรคเบาหวาน บำรุงระบบประสาทและสมอง บรรเทาความเครียด ช่วยคลายความวิตกกังวลและความเหนื่อยล้าที่เกิดจากความเครียด ช่วยป้องกันการสะสมของไขมันในเส้นเลือด ช่วยบรรเทาอาการเวียนศีรษะและคลื่นไส้

**ส่วนที่นำมาใช้ในการศึกษา :** ลำต้นสด (ภาพที่ 2.9 ก)

**องค์ประกอบทางเคมี :** น้ำมันหอมระเหยจากลำต้นตะไคร้บ้านมีสาร citral หรือ geranial (45%) เป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมาคือ สารneral (24.8%), 1,8-cineole (10.6%), geraniol (4.7%), geranyl acetate (4.3%), alpha-pinene (3.4%), caryophyllene oxide (2.4%), linalool (0.8%), alpha-terpinene (0.2%) และ gamma-terpinene (0.1%) เป็นต้น (ตารางที่ 2.1)

**สารองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน:** มีสาร geranial ที่มีลักษณะซึ่งเป็นของเหลวใสไม่มีสีหรือสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นแรงคล้ายมะนาวไวต่ออากาศและแสง เป็นสารเทอร์พีนแอลดีไฮด์ สามารถพบได้ในน้ำมันหอมระเหยของพืชหลายชนิด อาทิเช่น มะนาว (*Citrus aurantifolia* Swing) ส้ม (*Citrus Osback* (L.)) และตะไคร้บ้าน (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) มีสูตรทางเคมี คือ  $C_{10}H_{16}O$  (ภาพที่ 2.9 ข) และในปัจจุบันมีการนำมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ มากมายหลายด้าน อาทิเช่น ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง การทำน้ำหอม ครีมทาผิว ครีมบำรุงผิวหน้า เป็นต้น ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เครื่องใช้ในบ้านเรือน มีการนำมากฝรั่ง ขนมอบ ลูกอม เครื่องดื่ม และน้ำอัดลมต่าง ๆ ส่วนในอุตสาหกรรมยาได้มีการนำสารดังกล่าวมาใช้ในการผลิตวิตามิน A วิตามิน E และคลอโรฟิลล์ อีกด้วย นอกจากนี้ในการศึกษาวิจัยยังพบว่าสาร geranial ยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ แก้ท้องเสีย ป้องกันการเกิดสิว ป้องกันการเกิดอาการจุกเสียดแน่นท้อง เป็นต้น



**ภาพที่ 2.9** ตะไคร้บ้าน (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf): ก) ลำต้นสดตะไคร้บ้าน และ ข) สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารองค์ประกอบหลักที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยลำต้นตะไคร้บ้าน คือ geranial (ที่มา : Silva *et al.*, 2009)

**2.6.3 อบเชยเทศ** (ฐานข้อมูลเครื่องยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2567ค; Aungtikun and Soonwera, 2021; Chansang *et al.*, 2018)

**ชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ** : บอกคอก (ลำปาง), พญาปราบ (นครราชสีมา), สะวง (ปราจีนบุรี), กระดังงา (กาญจนบุรี), ฝักดาบ (พิษณุโลก), สุรามิต (สุโขทัย), กระแจกโมง โมงหอม (ชลบุรี), กระเจียด เจียดกระทั่งหัน (ยะลา), อบเชยต้น มหาปราบ (ภาคกลาง)

**ชื่อวิทยาศาสตร์** : *Cinnamomum verum* J. Presl

**ชื่อสามัญ** : Cinnamon

**วงศ์** : Lauraceae

**นิเวศวิทยา** : อบเชยเทศมีแหล่งกำเนิดในป่าของอินเดียตะวันตกเฉียงใต้ ศรีลังกา ตะวันตก และเชิงเขาเทแนสเซอร์ิม (ตะนาวศรี) ของพม่า มีการนำไปปลูกยังหลายประเทศ ชอบขึ้นในที่โล่งร่วมกับพืชป่าอื่น ๆ ที่มีลักษณะภูมิอากาศอบอุ่น และขึ้นมีฝนตกดี ไม่ชอบที่น้ำขังหรือแฉะ

**ลักษณะทางพฤกษศาสตร์** : ต้นกำเนิดอบเชยเทศมีถิ่นดั้งเดิมอยู่ในประเทศศรีลังกา เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลางที่ไม่ผลัดใบ เปลือกลำต้นเป็นสีเทาและหนา กิ่งขนานกับพื้นและตั้งชันขึ้น ใบเป็นใบเดี่ยวออกเรียงสลับกันตามลำต้น ลักษณะของใบเป็นรูปไข่หรือรูปหอก ปลายใบแหลม โคนใบแหลม ส่วนขอบใบเรียบ มีเส้นใบ 3 เส้น ใบค่อนข้างหนา ผิวใบเรียบเป็นมัน สีเขียวเข้ม ออกดอกเป็นช่อตามปลายกิ่ง ดอกมีขนาดเล็กเป็นสีเหลืองและมีกลิ่นหอม ผลเป็นสีดำมีลักษณะคล้ายรูปไข่ ผิวเปลือกเรียบบาง หนาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร อบเชยเป็นเครื่องยาหรือเครื่องเทศที่ได้มาจากการขูดเอาเปลือกชั้นนอกให้หมด แล้วลอกเปลือกชั้นในออกจากแก่นลำต้น โดยใช้มีดกรีดตามยาวของกิ่ง แล้วนำไปฝังในที่ร่มสลับกับตากแดดประมาณ 5 วัน และในขณะที่ตากให้ใช้มือม้วนเอาขอบทั้งสองข้างเข้าหากัน เมื่อเปลือกแห้งแล้วจึงมัดรวมกัน โดยเปลือกอบเชยที่ดีนั้นจะต้องเป็นสีน้ำตาลอ่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

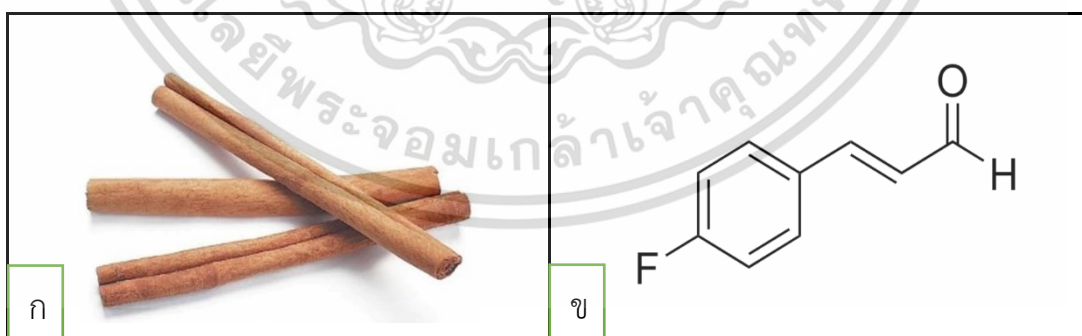
หรือสีสนิม มีความตรงและยาวอย่างสม่ำเสมอ โดยยาวประมาณ 1 เมตร มีรสขม เฝื่อน หวานเล็กน้อย และมีกลิ่นหอมแบบเฉพาะ

**สรรพคุณ :** เปลือกต้นและเนื้อไม้ของอบเชยเทศมีรสเฝื่อน หวานขม มีกลิ่นหอม เป็นยา ร้อนออกฤทธิ์ต่อไต ม้าม และกระเพาะปัสสาวะ ใช้เป็นยาบำรุงร่างกาย ทำให้ร่างกายอบอุ่น ช่วยกระจายความเย็นในร่างกาย ทำให้เลือดหมุนเวียนดี ช่วยย่อยสลายไขมัน ควบคุมระดับไขมันใน เลือด แก้เบื่ออาหาร ช่วยต้านมะเร็ง แก้ไข้หวัด ไซ้สนับิบาด แก้อาการหวัด แก้อาการไอ แก้อาการไอ หอบหืด แก้มวิงเวียน แก้อาการคลื่นไส้ อาเจียน แก้อาการจุกเสียดแน่นท้อง ช่วยขับผายลม อาหาร ไม่ย่อย แก้อาการท้องร่วง แก้อาการท้องเสีย แก้อาการท้องเสียในเด็ก แก้บิด และช่วยรักษาแผลในกระเพาะอาหาร

**ส่วนที่นำมาใช้ในการศึกษา :** เปลือกลำต้น (ภาพที่ 2.10 ก)

**องค์ประกอบทางเคมี :** น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกลำต้นอบเชยเทศมีสาร *trans*-cinnamaldehyde (73.21%) เป็นสารองค์ประกอบหลัก รองลงมาคือ สาร benzyl alcohol (12.83%), cinnamyl acetate (2.51%), copaene (1.83%), eugenol (1.29%), borneol (1.13%), alpha-pinene (0.84%), camphene (0.57%), 1,8-cineole (0.57%), limonene (0.54%), beta-myrcene (0.45%), cinnamic acid (0.45%), methyl cinnamate (0.28%) และ cadalene (0.21%) เป็นต้น (ตารางที่ 2.1)

**สารองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ:** มีสาร *trans*-cinnamaldehyde ที่มีลักษณะเป็นของเหลวชั้นหนืดสีเหลืองเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ มีสูตรทางเคมี คือ  $C_9H_8O$  (ภาพที่ 2.10 ข) ปัจจุบันมีการนำสาร *trans*-cinnamaldehyde ไปแต่งกลิ่นในหมาก ฝรั่ง ไอศกรีม ลูกอม และเครื่องดื่ม และใช้เป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ การทำน้ำหอม และนำไปใช้เป็นเครื่องปรุงในอาหารได้



**ภาพที่ 2.10** อบเชยเทศ (*Cinnamomum verum* J. Presl): ก) เปลือกลำต้นอบเชยเทศ และ ข) สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารองค์ประกอบหลักที่ได้จากเปลือกอบเชยเทศ คือ *trans*-cinnamaldehyde

(ที่มา : <https://www.sigmaaldrich.com>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ ตะไคร้บ้าน และอบเชยเทศ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS)

ลำดับ	ชื่อสาร	Linear retention index	Kovat retention index	เปอร์เซ็นต์ของสารองค์ประกอบทั้งหมด		
				จันทน์เทศ*	ตะไคร้บ้าน*	อบเชยเทศ**
1	Alpha-Pinene	935	936	21.6	3.4	0.84
2	Camphene	945	946	0.4	-	0.57
3	Sabinene	967	967	19.4	-	-
4	Beta-Pinene	971	970	14.1	-	-
5	Myrcene	987	988	1.9	-	-
6	Beta-Myrcene	991	991	-	-	0.45
7	Alpha-Phellandrene	1002	1002	0.7	-	0.41
8	3-Carene	1006	1005	1.7	-	-
9	Benzyl alcohol	1009	1009	-	-	12.83
10	Alpha-Terpinene	1012	1012	2.8	0.2	-
11	1,8-Cineole	1024	1024	-	10.6	0.57
12	Limonene	1025	1029	5.6	-	0.54
13	O-Cymene	1042	1041	1.0	-	-
14	lambda -Terpinene	1052	1050	3.9	0.1	-
15	Terpinolene	1081	1079	1.7	-	-
16	Linalool	1085	1086	-	0.8	-
17	trans-Sabinene hydrate	1090	1087	0.2	-	-
18	Terpinen-4-ol	1162	1162	4.1	-	-
19	Borneol	1170	1171	-	-	1.13
20	Alpha-Terpineol	1176	1175	0.7	-	-
21	Neral	1216	1217	-	24.8	-
22	Cinnamaldehyde	1221	1222	73.21	-	-
23	Geraniol	1235	1237	-	4.7	-
24	Geraniol	1246	1247	-	45.4	-
25	Safrole	1267	1269	2.2	-	-
26	Eugenol	1333	1335	0.3	-	1.29
27	Methyl cinnamate	1364	1364	-	-	0.28
28	Alpha-Copaene	1374	1375	0.3	-	-
29	Copaene	1381	1381	-	-	1.83
30	Geranyl acetate	1381	1380	-	4.3	-
31	cis-Isoeugenol	1410	1410	0.8	-	-
32	Cinnamyl acetate	1414	1414	-	-	2.51
33	Cinnamic acid	1462	1462	-	-	0.45
34	Myristicin	1494	1493	14.4	-	-
35	Elemicin	1523	1521	0.3	-	-
36	Caryophyllene oxide	1581	1580	-	2.4	-
37	Cadalene	1657	1658	-	-	0.21
Total identified (%)				99.8	96.7	98.24

\* ข้อมูลจาก Aungtikun *et al.* (2021)

\*\* ข้อมูลจาก Aungtikun and Soonwera (2021)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันผลกระทบของสภาวะโลกร้อน ส่งผลโดยตรงต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิตบนโลกนี้ โดยเฉพาะยุงลายบ้านที่มีการเพิ่มจำนวนประชากรและแพร่พันธุ์อย่างรวดเร็ว ดังนั้นการป้องกันกำจัดยุงลายบ้านด้วยผลิตภัณฑ์จากสารเคมีสังเคราะห์จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพราะสามารถลดจำนวนประชากรของยุงลายบ้านได้อย่างรวดเร็ว แต่มีข้อเสียคือต้องใช้ปริมาณสารเคมีที่มากเกินไปเกินกว่ากำหนด เนื่องจากปัจจุบันยุงลายบ้านเกิดความต้านทานต่อสารเคมีสังเคราะห์เหล่านี้ (Moungthipmalai *et al.*, 2023) จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้นักวิจัยคิดค้นเพื่อหาแนวทางหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีสังเคราะห์ที่มีผลต่อผู้ใช้งานโดยตรง จึงได้นำน้ำมันหอมระเหยจากพืชมาใช้ในการป้องกันกำจัดยุงลายบ้าน และแมลงทางการแพทย์และสัตว์แพทย์ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยกานพลู (*Syzygium aromaticum*) จันทน์เทศ (*Myristica fragrans*) ตะไคร้บ้าน (*Cymbopogon citratus*) โป๊ยกั๊ก (*Illicium verum*) มะแขว่น (*Zanthoxylum myriacanthum*) ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus globulus*) อบเชยเทศ (*Cinnamomum verum*) และอบเชยจีน (*Cinnamomum cassia*) ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพดีในการกำจัดไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัยของยุงลายบ้าน ยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) และแมลงวันบ้าน (*Musca domestica*) เป็นต้น (Farag *et al.*, 2024; Nakasen *et al.*, 2021; Soonwera *et al.*, 2022a; Soonwera and Phasomkusosil, 2016; Uniyal *et al.*, 2016) รวมทั้งมีการนำสารองค์ประกอบหลักที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยจากพืชในกลุ่ม monoterpene หลายชนิดมาใช้กำจัดไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัยของยุงลายบ้าน ยุงลายสวน ยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) และแมลงวันบ้าน อาทิเช่น สาร D-limonene จากน้ำมันหอมระเหยมะแขว่น, สาร geranial จากน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน, สาร alpha-pinene จากน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ, สาร trans-cinnamaldehyde จากน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ และสาร trans-anethole จากน้ำมันหอมระเหยโป๊ยกั๊ก เป็นต้น (Andrade-Ochoa *et al.*, 2018; Aungtikun *et al.*, 2021; Moungthipmalai *et al.*, 2023; Pavela, 2015; Soonwera *et al.*, 2022a) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยจากพืชมาผสมกันระหว่างน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก หรือสารองค์ประกอบหลักผสมกับสารองค์ประกอบหลัก พบว่าการผสมกันของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก หรือ สารองค์ประกอบหลักผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ให้ผลในการกำจัดยุงลายบ้านและแมลงชนิดอื่น ๆ ได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชหรือสารองค์ประกอบหลักชนิดเดียว ซึ่งแสดงค่าระยะเวลาที่ทำให้แมลงตายลงไปครึ่งหนึ่ง 50% (LT<sub>50</sub>) และค่าระยะเวลาที่ทำให้แมลงสลบลงไปครึ่งหนึ่ง 50% (KT<sub>50</sub>) สั้นกว่าค่าระยะเวลาที่ทำให้แมลงสลบหรือตายของน้ำมันหอมระเหยจากพืชหรือสารองค์ประกอบหลักชนิดเดียว (Aungtikun *et al.*, 2021; Soonwera *et al.*, 2022a) จากรายงานการศึกษาของ Moungthipmalai *et al.* (2023) รายงานว่าการผสมกันของน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ กับ geranial อัตราส่วน 2:1 (10,000 ppm) ในเอทิลแอลกอฮอล์ ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้านและยุงลายสวน โดยมีผลทำให้ไข่ตาย 100% หลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลอง 48 ชั่วโมง และมีค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 17.7 และ 16.2 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 30,000 ppm และ geranial 10,000 ppm สามารถยับยั้งการฟักไข่ได้ 86.4-91.0% และรายงานของ Yoassefi *et al.* (2019) พบว่า การผสมกันระหว่างของสาร thymol กับ carvacrol อัตราส่วน 1:4 ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการกำจัดไข่และลูกน้ำยุงรำคาญ (*Cx. pipiens*) โดยมีค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ 3.5:5.5 และ 12:8 mg/L ตามลำดับ รวมทั้งรายงานการศึกษาของ Soonwera *et al.* (2022b) รายงานว่า การผสมกันของน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 5% กับ น้ำมันหอมระเหยโป๊ยกั๊ก 5% ในน้ำมันถั่วเหลือง ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการกำจัดไข่แมลงสาบอเมริกัน (*Periplaneta americana*) ซึ่งสามารถยับยั้งการฟักไข่ได้ 99.3% หลังการทดลอง 30 วัน

อย่างไรก็ตามจากการศึกษา Benelli *et al.* (2017) รายงานการผสมกันของน้ำมันหอมเทียนเยวพาณี (*Trachyspermum ammi* L.) กับน้ำมันหอมระเหยเทียนสัตบุษย์ (*Pimpinella anisum* L.) อัตราส่วน 1:2 และน้ำมันหอมระเหยเทียนสัตบุษย์กับน้ำมันหอมระเหยผักชีฝรั่งป่า (*Smyrniolum olusatrum*) อัตราส่วน 1:1 พบว่าให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการกำจัดลูกน้ำวัย 3 ของยุงรำคาญ โดยมีค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ 15.2 และ 16.9  $\mu\text{L/L}^{-1}$  ตามลำดับ และรายงานของ Soonwera *et al.* (2022a) พบว่า การผสมกันระหว่างน้ำมันหอมระเหยโป๊ยกั๊ก 2.5% กับ *trans*-anethole 2.5% ให้ผลที่เสริมฤทธิ์กันในการกำจัดลูกน้ำและตัวโม่งของยุงลายบ้านและยุงลายสวน โดยมีผลทำให้ลูกน้ำและตัวโม่งของยุงทั้ง 2 ชนิด ตาย 100% ซึ่งมีค่า  $LT_{50}$  ต่ำที่สุดคือ 0.1-5.2 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่ *trans*-anethole 2.5% มีผลทำให้ลูกน้ำและตัวโม่งตาย 41.7-97.5% โดยมีค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 0.4-57.6 ชั่วโมง รวมทั้งการศึกษาของ Pandiyan *et al.* (2019) รายงานว่าการผสมกันของน้ำมันหอมระเหยโป๊ยกั๊กกับน้ำมันหอมระเหยเทียนเยวพาณี ให้ผลเสริมฤทธิ์กันที่ดีในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน โดยมีค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ 27.67  $\text{mg/L}^{-1}$  และการศึกษาของ Dhinakaran *et al.* (2019) รายงานว่าการผสมกันระหว่าง R-(+)-limonene กับ *trans*-anethole และ R-(+)-limonene กับ carvacrol ในอัตราส่วน 1:1 (wt/wt) ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน ซึ่งมีค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ 11.86 และ 10.42 ppm ตามลำดับ นอกจากนี้รายงานการศึกษาของ Pavela (2015) พบว่าการผสมกันระหว่างสาร p-cymene กับ R-(+)-limonene, สาร eugenol กับ R-(+)-limonene, สาร eugenol กับ cinnamaldehyde, สาร 1,8 cineole กับ cinnamaldehyde และสาร alpha-pinene กับ menthone ให้ผลเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic) ในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ ส่วนการผสมกันระหว่างสาร p-cymene กับ alpha-pinene, สาร gamma-terpinene กับ cinnamaldehyde และสาร 1,8 cineole กับ (-)-camphene ให้ผลไม่เสริมฤทธิ์กัน (Antagonistic) ในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ สำหรับการผสมกันระหว่างสาร *trans*-anethole กับ beta-pinene และสาร (-)-limonene กับ thymol ให้ผลไม่เสริมฤทธิ์และไม่ลดฤทธิ์กัน (no effect) ในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ (Andrade-Ochoa *et al.* 2018) และการศึกษาของ Jyoti *et al.* (2019) รายงานว่าการผสมกันของน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ (*C. zeylanicum*) กับน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน อัตราส่วน 1:1 และน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมกับน้ำมันหอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระเหยอบเซยเทศและน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน อัตราส่วน 1:1:1 ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการกำจัดตัวอ่อนของเห็บโค (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) โดยมีค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ 0.113 และ 0.106% ตามลำดับ

นอกจากนี้จากรายงานการศึกษาของ Soonwera and Sittichok (2020) พบว่าการผสมกันระหว่างน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 5% กับน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส 5% ให้ผลเสริมฤทธิ์กัน โดยมิผลทำให้ตัวเต็มวัยยุลงลายบ้าน ยุลงลายสวน และแมลงวันบ้านสลบและตาย 100% และมีค่า  $KT_{50}$  เท่ากับ 1.4-3.4 นาที ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 5% และน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส 5% มิผลทำให้ตัวเต็มวัยแมลงทั้ง 3 ชนิด สลบและตาย 59.5 - 87.3% ตามลำดับ และการศึกษาของ Aungtikun and Soonwera (2021) รายงานว่าการผสมกันระหว่างน้ำมันหอมระเหยอบเซยเทศ 2.5% กับน้ำมันหอมระเหยอบเซยจีน 2.5% (*C. cassia*) ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการกำจัดตัวเต็มวัยยุลงลายบ้านและยุลงลายสวน ทำให้ยุลงตัวเต็มวัยสลบและตาย 100% โดยมีค่า  $KT_{50}$  ระหว่าง 1.8 - 2.1 นาที ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยอบเซยเทศ 5% และน้ำมันหอมระเหยอบเซยจีน 5% มิผลทำให้ยุลงตัวเต็มวัยทั้ง 2 ชนิด สลบและตาย 90.4-92.6% ตามลำดับ รวมทั้งการศึกษาของ Aungtikun *et al.* (2021) รายงานว่าการผสมกันระหว่างน้ำมันหอมระเหยโป๊ยกั๊ก 0.5% กับ geranial 0.5% ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการกำจัดตัวเต็มวัยแมลงวันบ้าน มิผลทำให้แมลงวันบ้านสลบและตาย 100% โดยมีค่า  $KT_{50}$  เท่ากับ 4.0 นาที และมีค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 6.0 นาที ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยโป๊ยกั๊ก 1% มิประสิทธิภาพในการกำจัดตัวเต็มวัยแมลงวันบ้านได้เพียง 6% ส่วนการผสมกันของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 0.5% กับ alpha-pinene 0.5%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 0.5% กับ *trans*-anethole 0.5% และ *trans*-anethole 0.5% กับ alpha-pinene 0.5% ให้ผลไม่เสริมฤทธิ์กันในการกำจัดตัวเต็มวัยแมลงวันบ้าน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Balboné *et al.* (2022) รายงานว่าการรวมกันของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอม (*C. nardus*) กับน้ำมันหอมระเหยแมงลัก (*Ocimum americanum*) อัตราส่วน 90:10 ความเข้มข้น 1% มิผลเสริมฤทธิ์กันในการกำจัดตัวเต็มวัยยุลงลายบ้าน มิผลทำให้ตัวเต็มวัยยุลงลายบ้านตาย 83.3% หลังการทดลอง 24 ชั่วโมง ในขณะที่สาร carvone มิผลทำให้ตัวเต็มวัยยุลงลายบ้านตาย 57.5% รวมทั้งการศึกษาของ Nwanade *et al.* (2022) รายงานว่าการผสมกันของสาร benzyl benzoate กับ cinnamaldehyde ให้ผลเสริมฤทธิ์กันที่ดีในการกำจัดตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของเห็บ (*Haemaphysalis longicornis*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

# วิธีการดำเนินงาน

### 3.1 การเตรียมอุปกรณ์ในการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง

- 1) ถังน้ำพลาสติก ขนาด 50 ลิตร (ภาพที่ 3.1 ก)
- 2) กล่องพลาสติกสำหรับเลี้ยงลูกน้ำและตัวมดง ขนาด 18×27×10 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.1 ข)
- 3) อาหารสำหรับเลี้ยงลูกน้ำยุงลายบ้าน: อาหารปลาชนิดเม็ดโปรตีน 38% (OPTIMUM®) (ภาพที่ 3.1 ค)
- 4) ถ้วยพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.1 ง)
- 5) กรงเลี้ยงแมลง ขนาด 30×30×30 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.1 จ)
- 6) อาหารสำหรับเลี้ยงตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน: น้ำหวานความเข้มข้น 5% + multivitamin ความเข้มข้น 2% (ภาพที่ 3.1 ฉ)

#### 3.1.2 อุปกรณ์ในการให้เลือดยุงลายบ้านแบบเทียม (Membrane feeding technique)

- 1) ลำไส้หมู (ภาพที่ 3.2 ก)
- 2) เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำแบบวน (Circulating water bath)(ภาพที่ 3.2 ข)
- 3) กระเปาะแก้ว (Glass feeding) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.2 ค)
- 4) สายยาง (Rubber tube) (ภาพที่ 3.2 ง)
- 5) เลือดมนุษย์ (ภาพที่ 3.2 จ)
- 6) หลอดดูดเลือด (Dropper) ขนาด 4.6 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.2 ฉ)

#### 3.1.3 อุปกรณ์ในการวางไข่ยุงลายบ้าน

- 1) น้ำปราศจากคลอรีน (ภาพที่ 3.3 ก)
- 2) กระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1®) ขนาด 6×15 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.3 ข)
- 3) ถ้วยพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.3 ค)

#### 3.1.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมน้ำมันระเหยจากพืชและสารองค์ประกอบหลักที่นำมาใช้ในการทดลอง

- 1) น้ำปราศจากคลอรีน (ภาพที่ 3.4 ก)
- 2) tween 60 (RHEODOL TW – S120V®) (ภาพที่ 3.4 ข)
- 3) เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer Genie®2) (ภาพที่ 3.4 ค)
- 4) น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ (ภาพที่ 3.4 ง)
- 5) น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน (ภาพที่ 3.4 จ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 6) น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ (ภาพที่ 3.4 ฉ)
- 7) สาร alpha-pinene (ภาพที่ 3.4 ช)
- 8) สาร geranial (ภาพที่ 3.4 ซ)
- 9) สาร *trans*-cinnamaldehyde (ภาพที่ 3.4 ฉ)

**3.1.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการป้องกันกำจัดลูกน้ำวัย 4 และตัวโม่งของยุงลายบ้าน และศึกษาความเป็นพิษต่อลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาของยุงลายบ้าน**

- 1) ถ้วยพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.5 ก)
- 2) หลอดดูด (Dropper) (ภาพที่ 3.5 ข)
- 3) ผ้าตาข่าย ขนาด 15×15 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.5 ค)
- 4) นาฬิกาจับเวลา (ภาพที่ 3.5 ง)
- 5) น้ำปราศจากคลอรีน (ภาพที่ 3.5 จ)

**3.1.6 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการสลบและการตายของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน**

- 1) เครื่องดูดแมลง (Aspirator) (ภาพที่ 3.6 ก)
- 2) กระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1<sup>®</sup>) ขนาด 11.5×15 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.6 ข)
- 3) ชุดทดสอบ WHO Standard Susceptibility Test Kit (ภาพที่ 3.6 ค)

**3.1.7 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้าน**

- 1) ไข่ยุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) อายุ 5 วัน (ภาพที่ 3.8 ก)
- 2) เครื่องนับจำนวน (ภาพที่ 3.7 ข)
- 3) น้ำปราศจากคลอรีน (ภาพที่ 3.7 ค)
- 4) ถ้วยพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.7 ง)
- 5) กล้องสเตอริโอ (NIKON<sup>®</sup>, Type 102) (ภาพที่ 3.7 จ)

**3.1.8 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการวางไข่ของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน**

- 1) กรงเลี้ยงแมลง ขนาด 30×30×30 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.8 ก)
- 2) ถ้วยพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.8 ข)
- 3) กระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1<sup>®</sup>) ขนาด 6×15 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.8 ค)
- 4) ไมโครปิเปตต์ (FNNPIPETTE<sup>®</sup> F2) (ภาพที่ 3.8 ง)
- 5) ถ้วยพลาสติกสำหรับใส่น้ำหวาน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร สูง 2.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.8 จ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 6) น้ำหวานความเข้มข้น 5% + multivitamin ความเข้มข้น 2% (ภาพที่ 3.8 ฉ)
- 7) น้ำปราศจากคลอรีน (ภาพที่ 3.8 ช)

### 3.1.9 สารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้เป็นสารการทดลองเปรียบเทียบ (positive control)

1. 1% (w/w) temephos (ทรายจีพีโอ-1<sup>®</sup>) (ภาพที่ 3.9 ก)
2. 1% (w/v) alpha-cypermethrin (ดีทรอยด์ 10<sup>®</sup>) (ภาพที่ 3.9 ข)



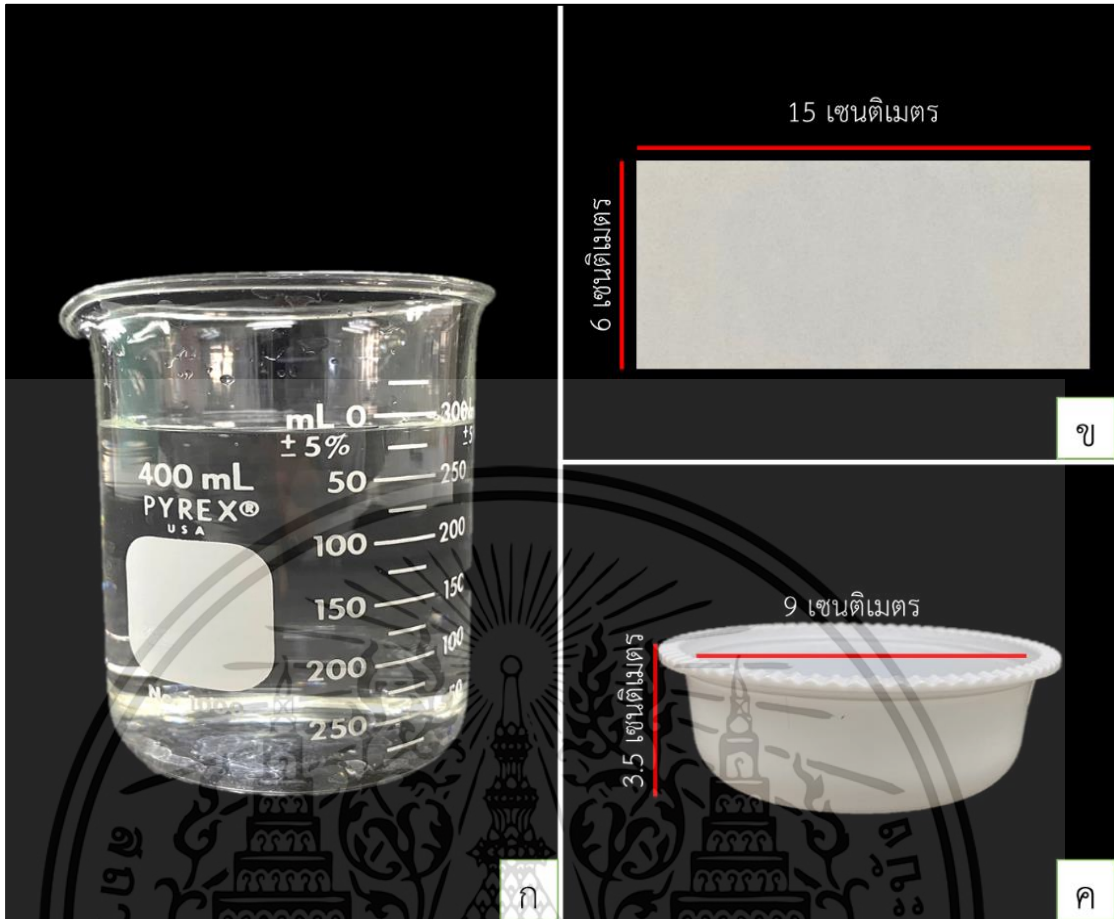
ภาพที่ 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง: ก) ถังน้ำพลาสติก ขนาด 50 ลิตร ข) ก่องพลาสติกสำหรับเลี้ยงลูกน้ำและตัวมดง ขนาด 18×27×10 เซนติเมตร ค) อาหารสำหรับเลี้ยงลูกน้ำยุงลายบ้าน: อาหารปลาชนิดเม็ดโปรตีน 38% (OPTIMUM<sup>®</sup>) ง) ถ้วยพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร และสูง 3.5 เซนติเมตร จ) กรงเลี้ยงแมลง ขนาด 30×30×30 เซนติเมตร และ ฉ) อาหารสำหรับเลี้ยงตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน: น้ำหวานความเข้มข้น 5% + multivitamin ความเข้มข้น 2%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.2 อุปกรณ์ในการให้เลือดยุงลายบ้านแบบเทียม (Membrane feeding technique): ก) ลำไส้หมู ข) เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำแบบวน (Circulating water bath) ค) กระจาเพาะแก้ว (Glass feeding) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร ง) สายยาง (Rubber tube) จ) เลือดมนุษย์ และ ฉ) หลอดดูดเลือด (Dropper) ขนาด 4.6 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.3 อุปกรณ์ในการวางไข่ง่ายบ้าน : ก) น้ำปราศจากคลอรีน ข) กระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1<sup>®</sup>) ขนาด 6×15 เซนติเมตร และ ค) ถ้วยพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



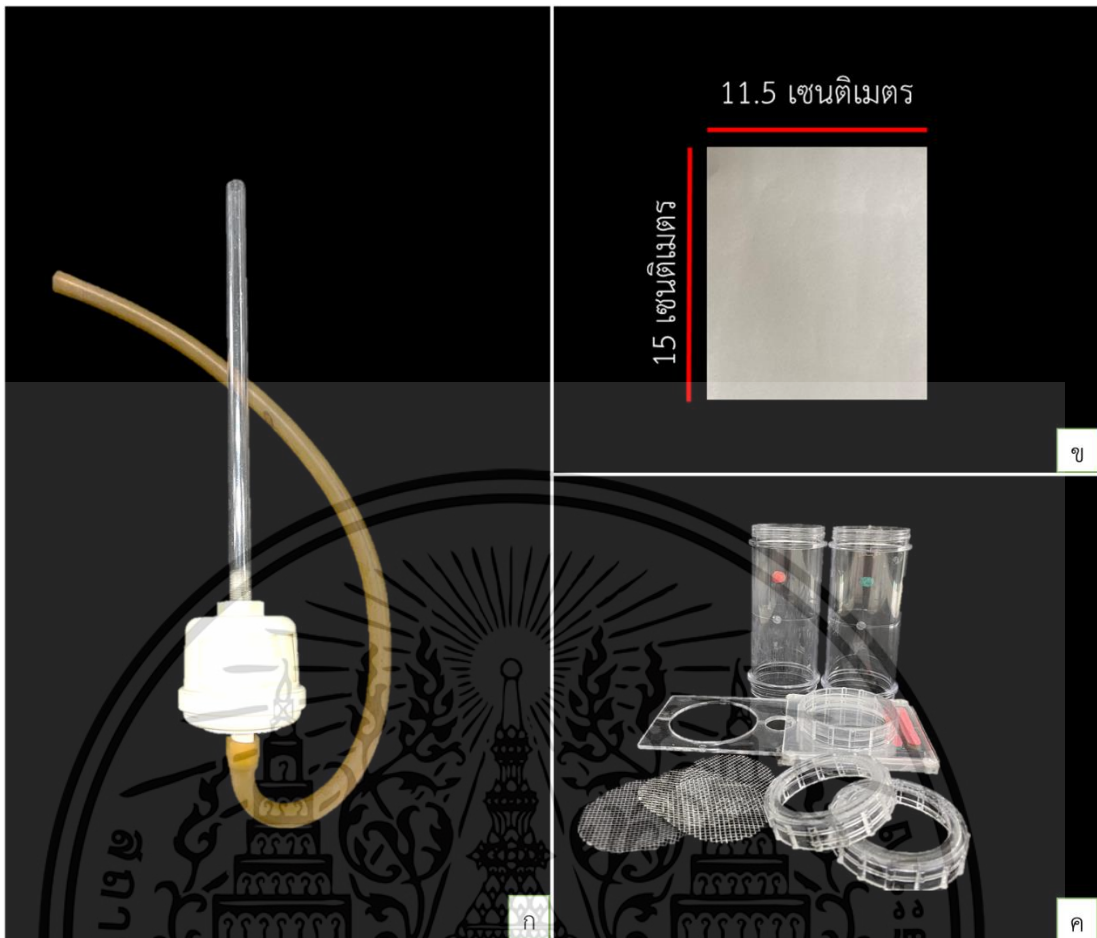
ภาพที่ 3.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมน้ำมันระเหยจากพืชและสารองค์ประกอบหลักที่นำมาใช้ในการทดลอง : ก) น้ำปราศจากคลอรีน ข) tween 60 (RHEODOL TW – S120V®) ค) เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer Genie® 2) ง) น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ จ) น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน ฉ) น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ ช) สาร alpha-pinene ซ) สาร geranial และ ณ) สาร *trans*-cinnamaldehyde

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



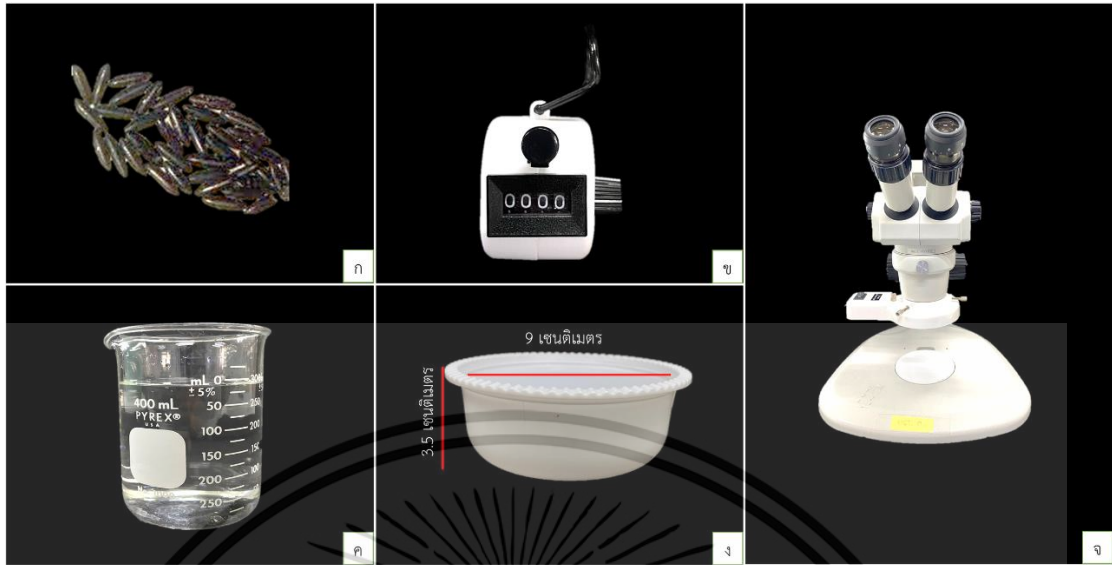
ภาพที่ 3.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการป้องกันกำจัดของลูกน้ำวัย 4 และตัวโม่งของยุงลายบ้าน และศึกษาความเป็นพิษต่อลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาของยุงลายบ้าน : ก) ถ้วยพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร ข) หลอดดูด (Dropper) ค) ผ้าตาข่าย 15×15 เซนติเมตร ง) นาฬิกาจับเวลา และ จ) น้ำปราศจากคลอรีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



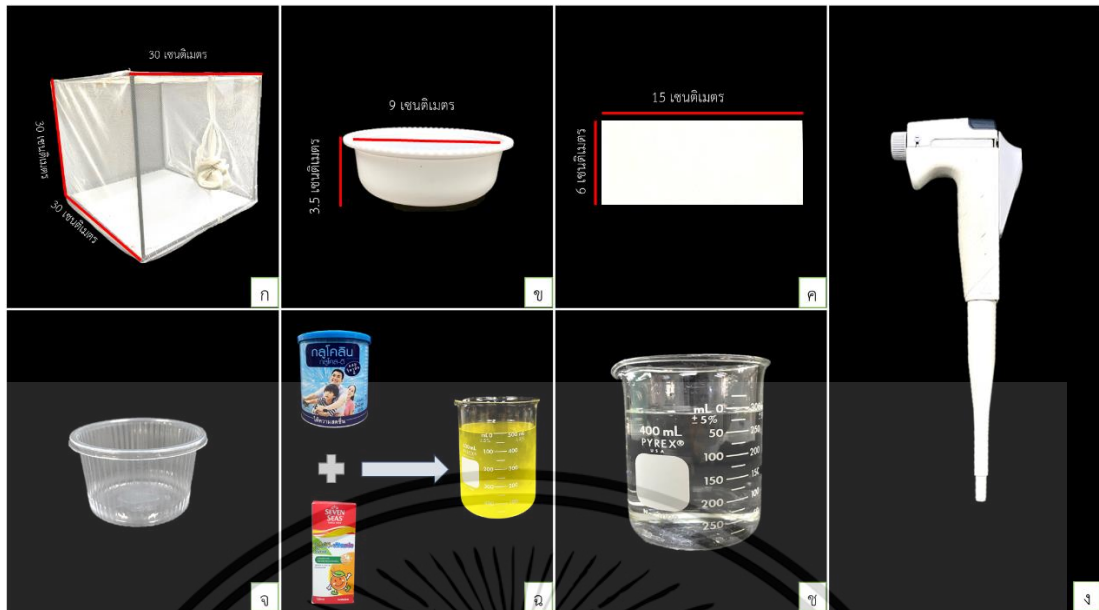
ภาพที่ 3.6 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการสลับและการตายของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน : ก) เครื่องดูดแมลง (Aspirator) ข) กระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1<sup>®</sup>) ขนาด 11.5×15 เซนติเมตร และ ค) ชุดทดสอบ WHO Standard Susceptibility Test Kit

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

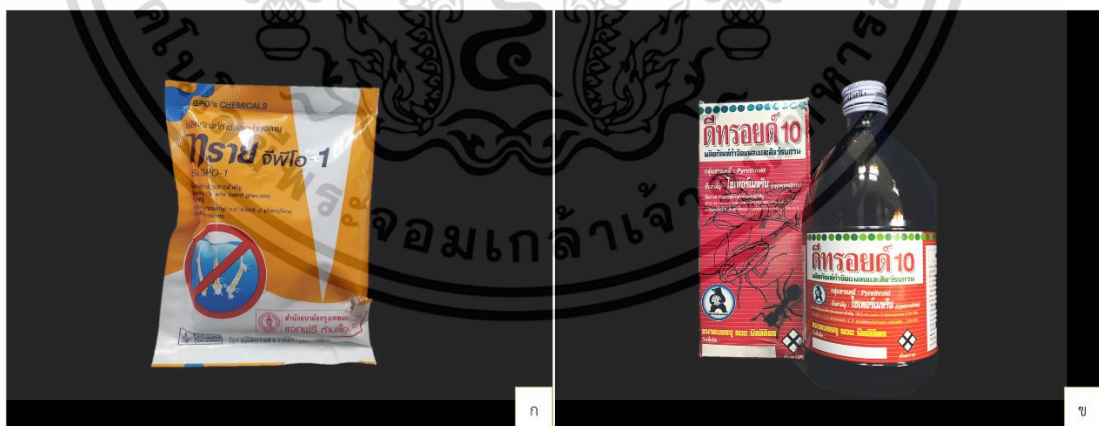


ภาพที่ 3.7 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้าน : ก) ไข่ยุงลายบ้าน ข) เครื่องนับจำนวน ค) น้ำปราศจากคลอรีน ง) ถ้วยพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร และ จ) กล้องสเตอริโอ (NIKON®, Type 102)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.8 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการวางไข่ของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน : ก) กรงเลี้ยงแมลง ขนาด 30×30×30 เซนติเมตร ข) ถ้วยพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร ค) กระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1®) ขนาด 6×15 เซนติเมตร ง) ไมโครปิเปตต์ (FNNPIPETTE® F2) จ) ถ้วยพลาสติกสำหรับใส่น้ำหวาน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร สูง 2.5 เซนติเมตร ฉ) น้ำหวานความเข้มข้น 5% + multivitamin ความเข้มข้น 2% และ ช) น้ำปราศจากคลอรีน



ภาพที่ 3.9 สารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้เป็นสารการทดลองเปรียบเทียบ (positive control) : ก) 1% (w/w) temephos (ทรายจีฟิโอ-1®) และ ข) 1% (w/v) alpha-cypermethrin (ดีทรอยด์ 10®)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.2 วิธีการดำเนินงาน

### 3.2.1. การเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง

เริ่มการเพาะเลี้ยงยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti* (Linn.)) ที่ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยา ห้อง D313/1 ชั้น 3 อาคารเจ้าคุณทหาร ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร ซึ่งภายในห้องปฏิบัติการมีอุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 70-80% โดยมีขั้นตอนการเลี้ยงยุงลายบ้าน (ภาพที่ 3.10) ดังนี้

ก) การพักน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงยุง โดยการเติมน้ำประปาลงไปจนถึงน้ำพลาสติก ขนาด 50 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2-3 วัน เพื่อให้คลอรีนระเหยออกมาให้หมด จากนั้นตวงน้ำปริมาณ 2 ลิตร ใส่กล่องพลาสติกสำหรับเลี้ยงลูกน้ำยุงลายบ้าน ขนาด 27×18.5×10 เซนติเมตร แล้วนำไข่ยุงลายบ้าน แชล่งไปในกล่องเลี้ยงยุง หลังจากแช่ไข่ยุงไปแล้วประมาณ 1-2 ชั่วโมง ยุงจะฟักออกจากไข่มาเป็นลูกน้ำ หลังจากนั้นประมาณ 2 วัน จึงทำการแยกลูกน้ำใส่กล่องเลี้ยงยุงประมาณ 250 ตัวต่อกล่อง

ข) ระยะเวลาเลี้ยงด้วยอาหารปลาชนิดเม็ด OPTIMUM<sup>®</sup> มีโปรตีน 38% ลูกน้ำวัยที่ 1 และลูกน้ำวัยที่ 2 จะให้อาหารในช่วงเช้าประมาณ 1 เม็ด สำหรับลูกน้ำวัยที่ 3 และลูกน้ำวัยที่ 4 จะให้อาหารในช่วงเช้า ประมาณ 2 เม็ด ลูกน้ำยุงลายบ้านจะใช้เวลาในการเจริญเติบโตเป็นตัวโม่งประมาณ 7-10 วัน

ค) ระยะเวลาตัวโม่ง เป็นระยะที่ไม่มีกรินอาหาร จะใช้หลอดดูด (dropper) ดูดตัวโม่งจำนวน 250 ตัว ใส่ในถ้วยพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร โดยเติมน้ำลงไปปริมาณ 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำถ้วยพลาสติกไปใส่ไว้ในกรงเลี้ยงยุงขนาด 30×30×30 เซนติเมตร โดยภายใน 1 กรงเลี้ยงยุงจะมีตัวโม่งประมาณ 2,500 ตัว จากนั้นใช้ผ้าขนหนูขนาด 50×150×0.5 เซนติเมตร ที่ชุ่มน้ำมาปกคลุมด้านบนของกรงเพื่อเป็นการให้ความชื้นแก่ยุงตัวเต็มวัย ซึ่งตัวโม่งจะใช้ระยะเวลาในการลอกคราบประมาณ 2 วัน จึงจะเจริญเติบโตไปเป็นตัวเต็มวัย

ง) ระยะเวลาตัวเต็มวัย ในระยะตัวเต็มวัยจะให้อาหารด้วยน้ำหวานความเข้มข้น 5% + multivitamin ความเข้มข้น 2 % โดยจะทำการเปลี่ยนน้ำหวานทุกวัน ในกรงเลี้ยงยุงจะมียุงตัวเต็มวัยเพศเมียประมาณ 1,000 ตัวต่อกรง เมื่อตัวเต็มวัยอายุประมาณ 5-7 วัน ยุงตัวเต็มวัยจะผสมพันธุ์สำหรับยุงเพศเมียจะต้องกินเลือดเพื่อนำโปรตีนจากเลือดมาใช้ในการผลิตไข่จึงจะทำการให้ยุงกินเลือดแบบเทียม (Membrane feeding method) ตามวิธีการของ อุบล ภูเก็ด (2559) โดยใช้เลือดมนุษย์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสภาอากาศไทย ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1) ตัดผนังลำไส้หนูขนาด 9×9 เซนติเมตร แล้วนำผนังลำไส้หนูที่ตัดแล้วไปแช่น้ำเพื่อล้างเกลือออกให้สะอาด หลังจากนั้นดึงแผ่นผนังลำไส้หนูให้ตึงแล้วครอบบนกระเปาะแก้ว (glass feeder) และรัดหนังยางให้แน่น จากนั้นตรวจสอบความีรอยรั่วเกิดขึ้นหรือไม่ หากพบว่ามียุงตัวเต็มวัยบินเข้าผนังลำไส้หนู ให้ทำการเปลี่ยนผนังลำไส้หนูชิ้นใหม่ก่อนนำไปใช้ในการให้เลือด (ภาพที่ 3.11 ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) เตรียมเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบน้ำวน (Circulating water bath) ที่มีน้ำบรรจุอยู่ภายในแล้วต่อสายยางเข้ากับกระเปาะแก้วที่เตรียมไว้ หลังจากนั้นเปิดเครื่องให้น้ำไหลเวียนภายในจนทั่ว โดยตั้งอุณหภูมิน้ำไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3.11 ข)

3) นำชุดกระเปาะแก้วที่เตรียมไว้เรียบร้อยแล้วมาวางไว้ด้านบนกรงยุงที่มียุงเพศเมียอยู่ภายใน ซึ่งยุงเพศเมียต้องทำการอดน้ำหวานอย่างน้อย 12 ชั่วโมง โดยให้สำลีสูดน้ำเปล่าปราศจากคลอรีนแทน

4) ใช้หลอดดูดเลือด (dropper) ดูดเลือดใส่ลงในกระเปาะแก้ว ประมาณ 2 มิลลิลิตร โดยใช้เวลาในการให้ยุงกินเลือดนานประมาณ 60 นาที เมื่อครบเวลาจึงถอดกระเปาะแก้วออกจากเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบน้ำวน แล้วนำกระเปาะแก้วไปแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อ (Clorox 10%) เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างให้สะอาด แล้วนำกระเปาะแก้วผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 3.11 ค)

### 3.2.2 ขั้นตอนการเตรียมถ้วยสำหรับวางไข่ของยุงลายบ้าน

ก) เตรียมถ้วยพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำปราศจากคลอรีน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำกระดาษกรอง Whatman No.1<sup>®</sup> ขนาด 6×15 เซนติเมตร จุ่มลงในน้ำและมีส่วนของกระดาษที่อยู่เหนือผิวน้ำไม่น้อยกว่า 2 เซนติเมตร เพื่อให้ง่ายต่อการวางไข่ของยุงลายบ้าน หลังจากนั้นนำถ้วยที่เตรียมไว้ในกรงเลี้ยงยุงขนาด 30×30×30 เซนติเมตร ที่มียุงลายบ้านเพศเมียที่ได้รับการผสมพันธุ์และกินเลือดเรียบร้อยแล้ว ซึ่งใช้ระยะเวลาให้ยุงลายบ้านวางไข่ประมาณ 5 วัน นับจากวันที่ให้ยุงกินเลือด (ภาพที่ 3.12 ก)

ข) การเก็บรักษาไข่ยุงลายบ้าน เมื่อยุงวางไข่ครบตามระยะเวลาที่กำหนดแล้ว จะนำกระดาษกรองที่ยุงวางไข่เรียบร้อยแล้วออกมาผึ่งลมให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 3-5 วัน เพราะไข่ของยุงลายบ้านไม่สามารถนำไปใช้ได้เลยทันที จำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการพัฒนาระยะตัวอ่อนให้เจริญเติบโตเต็มที่ก่อนที่จะฟักออกมาเป็นลูกน้ำยุงได้ จึงนำแผ่นกระดาษไข่ยุงลายบ้านเก็บใส่ในถุงพลาสติกที่ปิดผนึกแน่น และเก็บใส่กล่องพลาสติกปิดฝาให้สนิทเพื่อป้องกันการทำลายของแมลงชนิดอื่น อย่างไรก็ตามหากยุงมีปริมาณที่มากเพียงพอจึงนำไปใช้ทำการทดลองต่อไป (ภาพที่ 3.12 ข)

### 3.2.3 การเตรียมน้ำมันระเหยจากพืชและสารองค์ประกอบหลักที่นำมาใช้ในการทดลอง

พืชที่นำมาใช้ในการศึกษามี 3 ชนิด ได้แก่ จันทน์เทศ (*Myristica fragrant* Houtt.) ตะไคร้บ้าน (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) และอบเชยเทศ (*Cinnamomum verum* J.Presl) และสารองค์ประกอบหลัก ได้แก่ alpha-pinene, geranial และ *trans-cinnamaldehyde* ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกีฏวิทยา D313/1 ชั้น 3 อาคารเจ้าคุณทหาร ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร จากนั้นนำมาปรับความเข้มข้นโดยผสมกับน้ำเปล่า และ tween 60 (RHEODOL TW-S120V<sup>®</sup>) ในอัตราส่วนต่าง ๆ ดังนี้

- สิ่งทดลองที่ 1 ประกอบด้วย น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2 มิลลิลิตร + alpha-pinene 1 มิลลิลิตร ผสมกับ tween 60 3.5 มิลลิลิตร และน้ำเปล่า 93.5 มิลลิลิตร
- สิ่งทดลองที่ 2 ประกอบด้วย น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2 มิลลิลิตร + geranial 1 มิลลิลิตร ผสมกับ tween 60 3.5 มิลลิลิตร และ น้ำเปล่า 93.5 มิลลิลิตร
- สิ่งทดลองที่ 3 ประกอบด้วย น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2 มิลลิลิตร + *trans*-cinnamaldehyde 1 มิลลิลิตร ผสมกับ tween 60 3.5 มิลลิลิตร และน้ำเปล่า 93.5 มิลลิลิตร
- สิ่งทดลองที่ 4 ประกอบด้วย น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2 มิลลิลิตร + alpha-pinene 1 มิลลิลิตร ผสมกับ tween 60 3.5 มิลลิลิตร และ น้ำเปล่า 93.5 มิลลิลิตร
- สิ่งทดลองที่ 5 ประกอบด้วย น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2 มิลลิลิตร + geranial 1 มิลลิลิตร ผสมกับ tween 60 3.5 มิลลิลิตร และน้ำเปล่า 93.5 มิลลิลิตร
- สิ่งทดลองที่ 6 ประกอบด้วย น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2 มิลลิลิตร+ *trans*-cinnamaldehyde 1 มิลลิลิตร ผสมกับ tween 60 3.5 มิลลิลิตร และน้ำเปล่า 93.5 มิลลิลิตร
- สิ่งทดลองที่ 7 ประกอบด้วย น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2 มิลลิลิตร+ alpha-pinene 1 มิลลิลิตร ผสมกับ tween 60 3.5 มิลลิลิตร และน้ำเปล่า 93.5 มิลลิลิตร
- สิ่งทดลองที่ 8 ประกอบด้วย น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2 มิลลิลิตร + geranial 1 มิลลิลิตร ผสมกับ tween60 3.5 มิลลิลิตร และน้ำเปล่า 93.5 มิลลิลิตร
- สิ่งทดลองที่ 9 ประกอบด้วย น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2 มิลลิลิตร + *trans*-cinnamaldehyde 1 มิลลิลิตร ผสมกับ tween 60 3.5 มิลลิลิตร + น้ำเปล่า 93.5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก. เติมน้ำปราศจากคลอรีน 2 ลิตร ใส่ในกล่องเพาะเลี้ยงยุง ขนาด 27×18.5×10 เซนติเมตร แล้วนำไข่ยุงลายบ้านแช่ลงในกล่อง หลังจากนั้น 1 วัน ไข่ยุงลายบ้านจะฟักเป็นลูกน้ำวัยที่ 1



ข. แยกลูกน้ำวัย 2 ใส่ในกล่องเพาะเลี้ยงยุง จำนวน 250 ตัว/กล่อง แล้วให้อาหารปลา อาหารปลาชนิดเม็ด OPTIMUM® ทุกวัน หลังจากนั้น 7-10 วัน ลูกน้ำจึงจะพัฒนาเจริญเติบโตเป็นตัวโม่ง



ค. เมื่อเป็นตัวโม่งจะนำหลอดดูด (dropper) ตัวโม่ง จำนวน 250 ตัว/ถ้วย และนำไปใส่ไว้ในกรงเลี้ยงยุง ขนาด 30×30×30 เซนติเมตร พร้อมทั้งให้น้ำหวาน 5% + multivitamin ความเข้มข้น 2% เพื่อเป็นอาหารของตัวเต็มวัย



ง. นำถ้วยน้ำหวานออกจากกรงเลี้ยงยุง เพื่อให้ยุงลายบ้านอดน้ำหวานก่อนการให้เลือดยุงกินเลือดแบบเทียม (membrane feeding method) เพื่อเตรียมให้ยุงลายบ้านวางไข่

ภาพที่ 3.10 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการ (ก-ง)



ก. นำไส้หมูไปแช่น้ำสะอาดเพื่อล้างเกลือออกให้หมด จากนั้นตั้งแผ่นผนังไส้หมูให้ตั้ง แล้วนำไปครอบบนกระเปาะแก้ว (glass feeder) จากนั้นรัดหนังยางให้แน่น



ข. เตรียมเครื่องควบคุมน้ำแบบวน นำสายยางต่อเข้ากับกระเปาะแก้วทางช่องทางน้ำเข้า-ออก เพื่อให้ น้ำสามารถหล่อเลี้ยงกระเปาะแก้วขึ้นนอก จากนั้นเปิดเครื่องให้มีการไหลเวียนของน้ำภายในเครื่อง โดยอุณหภูมิของน้ำอยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส



ค. นำชุดกระเปาะแก้วที่เตรียมไว้มาวางบนกรงขุลงลายบ้านที่ทำการรดน้ำหวานแล้ว จากนั้นใช้หลอดดูดเลือด ดูดเลือดประมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในกระเปาะแก้ว โดยให้กินเลือดนาน 30-40 นาที

ภาพที่ 3.11 ขั้นตอนการให้ขุลงกินเลือดแบบเทียม (Membrane feeding method) (ก-ค)



ก. หลังจากยุงลายบ้านกินเลือดเสร็จแล้ว 1-2 วัน จะเตรียมถ้วยพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำปราศจากคลอรีน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำกระดาษกรอง Whatman No.1<sup>®</sup> ขนาด 6×28.5 เซนติเมตร จุ่มลงในน้ำและมีส่วนของกระดาษที่อยู่เหนือผิวน้ำไม่น้อยกว่า 2 เซนติเมตร ใส่ในกรงเลี้ยงยุงขนาด 30×30×30 เซนติเมตร เพื่อให้ยุงลายบ้านเพศเมียวางไข่



ข. นำกระดาษกรองที่ยุงวางไข่เรียบร้อยแล้วออกมาผึ่งลมให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 3-5 วัน จากนั้นนำแผ่นกระดาษไขยุงลายบ้านเก็บใส่ในถุงพลาสติกที่ปิดผนึกแน่น และเก็บใส่กล่องพลาสติกปิดฝาให้สนิท

ภาพที่ 3.12 ขั้นตอนการเตรียมถ้วยสำหรับวางไข่ยุงลายบ้าน (ก-ข)

### 3.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักต่อการป้องกันกำจัดลูกน้ำวัย 4 และตัวโม่งของยุงลายบ้าน และศึกษาความเป็นพิษต่อสัณฐานและสรีรวิทยาของยุงลายบ้าน

ดำเนินการทดลองด้วยวิธีการ Dipping bioassay ตามวิธีการของ Phukerd and Soonwera (2013) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) มี 11 สิ่งทดลอง ในแต่ละสิ่งทดลองทำ 5 ซ้ำ แต่ละหน่วยทดลองใช้ลูกน้ำวัย 4 หรือตัวโม่งยุงลายบ้าน จำนวน 25 ตัวต่อถ้วยทดลอง (ซ้ำ) โดยมีการทดลองเปรียบเทียบกับ 3.5% tween 60 เป็น negative control และ 1% (w/w) temephos (ทรายจีพีโอ-1®) เป็น positive control ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ (ภาพที่ 3.13)

ก) เตรียมถ้วยทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำที่ปราศจากคลอรีน ปริมาตร 99 มิลลิลิตรต่อถ้วย จากนั้นใช้หลอดดูด (dropper) ดูดลูกน้ำวัย 4 หรือตัวโม่งของยุงลายบ้าน จำนวน 25 ตัว ลงในแต่ละถ้วยทดลอง และใช้อ้อโต้เปิดตัดหยดน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละถ้วยทดลอง

ข) ทำการบันทึกผลหลังการทดลอง โดยนับจำนวนการตายของลูกน้ำวัย 4 ที่เวลา 1, 5, 10, 15, 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง และนับจำนวนการตายของตัวโม่ง ที่เวลา 1, 5, 10, 15, 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ซึ่งมีเกณฑ์การประเมินการตายของลูกน้ำวัย 4 และตัวโม่งของยุงลายบ้านคือ ไม่มีการเคลื่อนไหวหรือลอยขนานกับผิวน้ำของลูกน้ำวัยหรือตัวโม่ง รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักแต่ละชนิด ที่มีผลต่อสัณฐานและสรีรวิทยาของลูกน้ำวัย 4 และตัวโม่งของยุงลายบ้าน แล้วจำแนกการเกิดพิษ ตามวิธีการของ Soonwera *et al.* (2022a) ดังนี้

- Normal Larvae (NL) คือ ลักษณะการตายแบบปกติของลูกน้ำยุงลายบ้าน ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานและสรีรวิทยา (ภาพที่ 3.14)

- Deformed Larvae (DL) คือ ลักษณะการตายของลูกน้ำยุงลายบ้านแบบผิดปกติ ที่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นตัวโม่งได้อย่างสมบูรณ์ (ภาพที่ 3.15)

- Deformed Larval-Pupal Intermediate (LP) คือ ลักษณะการตายของลูกน้ำยุงลายบ้านแบบผิดปกติ โดยบริเวณส่วนหัวของลูกน้ำยุงลายบ้านผิดปกติ ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาของลูกน้ำยุงลายบ้านไปเป็นตัวโม่งได้สมบูรณ์ (ภาพที่ 3.16)

- White Pupa (WP) คือ ลักษณะการตายที่ผิดปกติของตัวโม่งยุงลายบ้าน โดยสีผิวบริเวณผนังลำตัวมีสีขาวเผือก ยกเว้นส่วนตาที่ปกติ (ภาพที่ 3.17)

- Dead Normal Brown Pupa (BP) คือ ลักษณะการตายของตัวโม่งยุงลายบ้านแบบปกติ ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยา (ภาพที่ 3.18)

- Deformed Pupa (DP) คือ ลักษณะผิดปกติของตัวหนอนยุงลายบ้านที่ส่วนหัวขยายใหญ่ คล้ายส่วนหัวช้าง (Elephantoid) (ภาพที่ 3.19)

- Adult Attached to the Pupal Stage (PA) คือ ลักษณะการตายแบบผิดปกติของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านที่มีรูปร่างไม่สมบูรณ์ (ภาพที่ 3.20)

- Deformed Adult (DA) คือ ลักษณะการตายที่ผิดปกติของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านแบบผิดปกติ โดยตัวหนอนยุงลายบ้านสมบูรณ์ แต่ตัวเต็มวัยมีลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาไม่สมบูรณ์ ได้แก่ ลำตัว หนวดและปีกไม่สมบูรณ์ ปีกกุด และปีกบิดเบี้ยว (ภาพที่ 3.21)

- Normal Adult (NA) คือ ลักษณะการตายของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านที่ปกติ โดยที่ลูกน้ำสามารถพัฒนาไปเป็นตัวหนอน และตัวเต็มวัยอย่างสมบูรณ์ (ภาพที่ 3.22)

#### การวิเคราะห์ข้อมูลสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจะใช้โปรแกรม SPSS (version 25) ซึ่งวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย ร้อยละการตายของลูกน้ำวัยที่ 4 และตัวหนอนยุงลายบ้าน ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการพัฒนาที่ผิดปกติของลูกน้ำวัยที่ 4 ตัวหนอน และตัวเต็มวัยยุงลายบ้านของแต่ละสารทดสอบ และทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

วิเคราะห์ค่า  $LT_{50}$  (50% Lethal Time) : เวลาหลังการทดลองที่ทำให้ลูกน้ำวัยที่ 4 และตัวหนอนยุงลายบ้านตายครึ่งหนึ่ง (50%) ด้วยวิธี Probit analysis



ก. เตรียมถ้วยทดสอบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำปราศจากคลอรีน ถ้วยละ 99 มิลลิลิตร

ข. ทำการหยดสารทดลองแต่ละชนิด ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ลงในถ้วยทดสอบ

ค. ใช้หลอดดูดพลาสติก (dropper) ดูดลูกน้ำวัย 4 หรือตัวโมงยุงลายบ้าน จำนวน 25 ตัว ใส่ในถ้วยทดสอบ

ง. ทำการบันทึกผลอัตราการของลูกน้ำวัย 4 ยุงลายบ้าน หลังการทดลอง 1, 5, 10, 15, 30 นาที 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง สำหรับตัวโมงยุงลายบ้านบันทึกผลหลังการทดลอง 1, 5, 10, 15, 30 นาที 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

จ. หลังการทดลอง 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการจำแนกการเกิดพิษของน้ำมันหอมระเหยจากพืชของแต่ละสารทดสอบที่มีผลต่อสัญญาณและสรีรวิทยาของลูกน้ำ ตัวโมง และตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน

**ภาพที่ 3.13** ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักของสารแต่ละชนิด ต่อการกำจัดลูกน้ำวัยที่ 4 และตัวโมงยุงลายบ้าน ด้วยวิธีการจุ่ม (Dipping bioassay) (ก-ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.14 ลักษณะการตายแบบ Normal Larvae (NL) คือ ลักษณะการตายแบบปกติ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานและสรีรวิทยา (ก-ค)

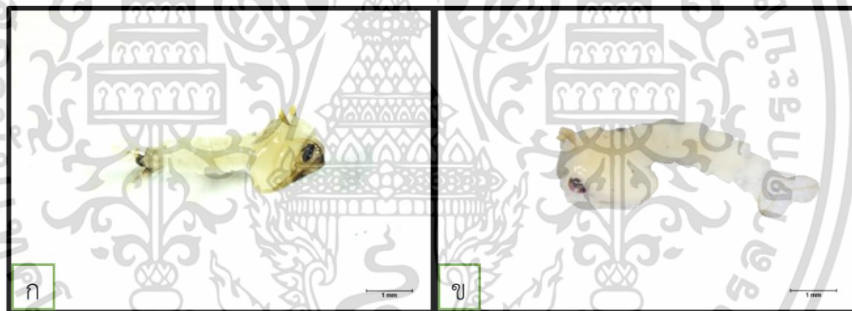


ภาพที่ 3.15 ลักษณะการตายแบบ Deformed Larvae (DL) คือ ลักษณะการตายของลูกน้ำแบบผิดปกติที่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นตัวโม่่งได้อย่างสมบูรณ์ (ก-ง)

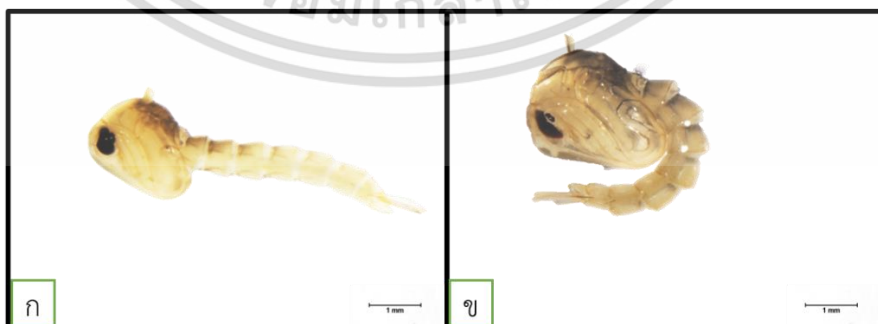
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.16 ลักษณะการตายแบบ Deformed Larval-Pupal Intermediate (LP) คือ ลักษณะการตายของลูกน้ำยุงลายบ้านแบบผิดปกติ โดยบริเวณส่วนหัวของลูกน้ำยุงลายบ้านผิดปกติ ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาของลูกน้ำยุงลายบ้านไปเป็นตัวโม่่งได้สมบูรณ์ (ก-ง)



ภาพที่ 3.17 ลักษณะการตายแบบ White Pupa (WP) คือ ลักษณะการตายที่ผิดปกติของตัวโม่่ง โดยสีผิวบริเวณผนังลำตัวมีสีขาวเผือก ยกเว้นส่วนตาที่ปกติ (ก-ข)



ภาพที่ 3.18 ลักษณะการตายแบบ Dead Normal Brown Pupa (BP) คือ ลักษณะการตายของตัวโม่่งแบบปกติ ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยา (ก-ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

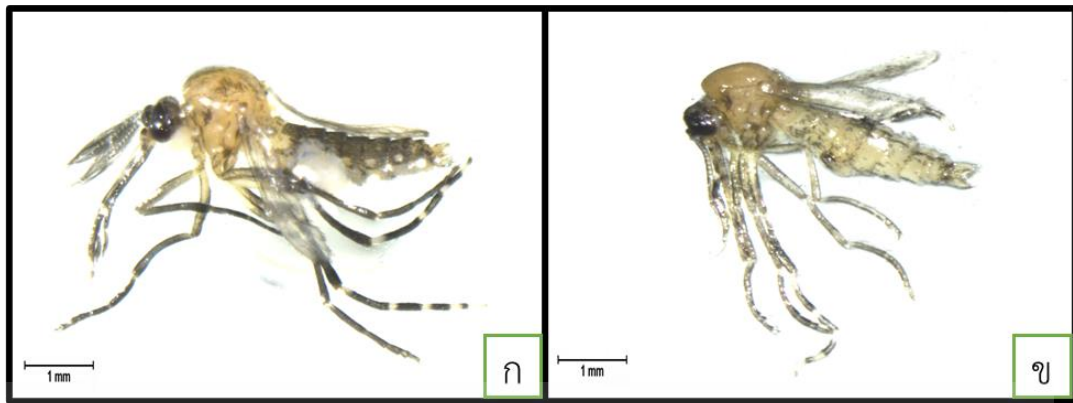


ภาพที่ 3.19 ลักษณะการตายแบบ Deformed Pupa (DP) คือ ลักษณะผิดปกติของตัวโม่่งยุลงลายบ้านที่ส่วนหัวขยายใหญ่ คล้ายส่วนหัวช้าง (Elephantoid) (ก-ง)



ภาพที่ 3.20 ลักษณะการตายแบบ Adult Attached to the Pupal Stage (PA) คือ ลักษณะการตายแบบผิดปกติของของตัวเต็มวัยยุลงลายบ้านที่มีรูปร่างไม่สมบูรณ์ (ก-ฉ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.21 ลักษณะการตายแบบ Deformed Adult (DA) คือ ลักษณะการตายที่ผิดปกติของตัวเต็มวัยยุ้งลายบ้านแบบผิดปกติ โดยตัวโม่่งยุ้งลายบ้านสมบูรณ์ แต่ตัวเต็มวัยมีลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาไม่สมบูรณ์ ได้แก่ ลำตัว หนวดและปีกไม่สมบูรณ์ ปีกกุด และปีกบิดเบี้ยว (ก-ข)



ภาพที่ 3.22 ลักษณะการตายแบบ Normal Adult (NA) คือ ลักษณะการตายของตัวเต็มวัยยุ้งลายบ้านที่ปกติ โดยที่ลูกน้ำสามารถพัฒนาไปเป็นตัวโม่่ง และตัวเต็มวัยอย่างสมบูรณ์ (ก-ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2.5 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการสลับและการตายของตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้าน

ดำเนินการทดลองด้วยวิธี Contact method ตามวิธีของ Cotchakaew and Soonwera (2019) และ World Health Organization (2018) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) มี 11 สิ่งทดลอง ในแต่ละสิ่งทดลองทำ 5 ซ้ำ แต่ละหน่วยการทดลองใช้ตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมียจำนวน 25 ตัวต่อกระบอก (ซ้ำ) โดยมีการทดลองเปรียบเทียบกับ 3.5% tween 60 เป็น negative control และ 1% (w/v) alpha- cypermethrin (ดีทรอยด์10®) เป็น positive control การทดลองนี้เป็นการทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมีย โดยใช้ชุดอุปกรณ์ WHO Standard Susceptibility Test Kit ที่ประกอบด้วยหลอดพลาสติกกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.4 เซนติเมตร สูง 12.1 เซนติเมตร ปลายหลอดทั้งสองด้าน เปิด-ปิด ได้ โดยมีลักษณะเป็นเกลียวหมุนจำนวน 2 กระบอก คือ กระบอกจุดสีแดง (exposure tube) ซึ่งจะใช้เป็นหลอดทดสอบเพื่อให้ตัวเต็มวัยยุงลายบ้านได้สัมผัสกับสารทดสอบ โดยมีจุดกลมสีแดงกำกับไว้ข้างกระบอก ส่วนกระบอกจุดสีเขียว (holding tube) ใช้เป็นกระบอกพักแมลงก่อนทำการทดสอบ โดยมีจุดกลมสีเขียวกำกับไว้ข้างกระบอก ซึ่งมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้ (ภาพที่ 3.23)

ก) ทำเตรียมกระดาษกรอง (Whatman No. 1®) ขนาด 11.5×15 เซนติเมตร จำนวน 2 แผ่น กระดาษกรองแผ่นที่ 1 บุติดด้านในของกระบอกที่มีจุดสีเขียว (holding tube) โดยติดให้แนบสนิทกับกระบอก ตรึงด้วยเทปกาวเพื่อให้กระดาษกรองแนบสนิทกับกระบอก

ข) นำตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมีย จำนวน 25 ตัว ที่ยังไม่ได้กินเลือดใสในกระบอกที่มีจุดสีเขียว (holding tube) แล้วทำการปิดกระบอกด้วยฝาเลื่อนเปิด-ปิด เพื่อพักแมลงก่อนทำการทดสอบ

ค) นำกระดาษกรองแผ่นที่ 2 มาทำการหยดน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักแต่ละชนิด ปริมาณ 2 มิลลิลิตร บนแผ่นกระดาษกรองให้ทั่วทั้งแผ่น แล้วทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 20 วินาที จึงนำกระดาษกรองบุติดด้านในของกระบอกที่มีจุดสีแดง (exposure tube) โดยติดให้แนบสนิทกับกระบอก ตรึงด้วยเทปกาวเพื่อให้กระดาษกรองแนบสนิทกับกระบอก

ง) นำกระบอกที่มีจุดสีแดง (exposure tube) ที่ติดกระดาษแล้วไปประกอบเข้าอีกด้านหนึ่งของกระบอกที่มีจุดสีเขียว (holding tube) แล้วหมุนเกลียวให้แน่น จากนั้นเลื่อนรูขนาดใหญ่อยู่ตรงกับกระบอก ทำการปล่อยให้ตัวเต็มวัยยุงลายบ้านมาอยู่ในกระบอกที่มีจุดสีแดง (exposure tube) ให้หมดแล้วจึงทำการปิดกระบอกด้วยฝาเลื่อน

จ) ปล่อยให้ตัวเต็มวัยยุงลายบ้านสัมผัสกับสารทดสอบนาน 1 ชั่วโมง ทำการบันทึกผลอัตราการสลับของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมีย ที่เวลา 1, 5, 10, 15, 30 และ 60 นาที หลังจากนั้นย้ายตัวเต็มวัยยุงลายบ้านมาอยู่ในกระบอกที่มีจุดสีเขียว (holding tube) และปิดฝาเลื่อนให้สนิทแล้ว

หลอดกระบอกที่มีจุดสีแดง (exposure tube) ออก แล้ววางสำลีชุบน้ำหวานความเข้มข้น 5% + multivitamin ความเข้มข้น 2% ไว้บนปากกระบอกเพื่อเป็นอาหารจนครบ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง 25-27 องศาเซลเซียส จึงทำการบันทึกผลการตายของยุงลายบ้านเพศเมีย สำหรับเกณฑ์ประเมินการตายของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านคือ แมลงนอนนิ่ง งอขาหรือขาแข็ง และไม่เคลื่อนไหว

#### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจะใช้โปรแกรม SPSS (version 25) ซึ่งวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย ร้อยละอัตราการสลับและการตายของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมียของแต่ละสารทดสอบ และทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

วิเคราะห์ค่า  $KT_{50}$  (50% Knockdown Time) : เวลาหลังการทดลองที่ทำให้ตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมียสลบครึ่งหนึ่ง (50%)

วิเคราะห์ค่า  $LT_{50}$  (50% Lethal Time) : เวลาหลังการทดลองที่ทำให้ตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมียตายลงครึ่งหนึ่ง (50%) ด้วยวิธี Probit analysis

#### สูตรคำนวณอัตราการสลับของยุงลายบ้าน

$$\text{อัตราการสลับของยุงลายบ้าน (Knockdown Rate)} = \left[ \frac{\text{จำนวนยุงลายบ้านที่สลบ}}{\text{จำนวนยุงลายบ้านที่ทดสอบ}} \right] \times 100$$

#### สูตรคำนวณอัตราการตายของยุงลายบ้าน

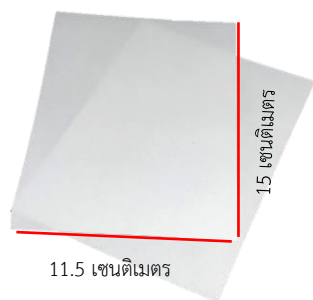
$$\text{อัตราการตายของยุงลายบ้าน (Mortality Rate)} = \left[ \frac{\text{จำนวนยุงลายบ้านที่ตาย}}{\text{จำนวนยุงลายบ้านที่ทดสอบ}} \right] \times 100$$

จากนั้นนำข้อมูลอัตราการตายมาแปลผลตามแนวทางองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, 2018) ดังนี้

อัตราการตายของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมียระหว่าง 98 – 100% หมายถึง สารมีความเป็นพิษต่อตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมียในระดับสูง (S; Susceptible)

อัตราการตายของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมียระหว่าง 80 – 97% หมายถึง สารมีความเป็นพิษต่อตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมียในระดับปานกลาง (PR; Possible Resistant)

อัตราการตายของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมียต่ำกว่า 80% หมายถึง สารมีความเป็นพิษต่อตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมียในระดับต่ำหรือต่อต้านสารเคมี (R; Resistant)



ก. เตรียมกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1<sup>®</sup>  
ขนาด 11.5×15 เซนติเมตร จำนวน 2 แผ่น



ข. นำกระดาษกรองแผ่นที่ 1 บุติด้านใน  
กระบอกพลาสติกจุดสีเขียว (holding tube)  
และนำตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมียอายุ 3-5  
วัน จำนวน 25 ตัว ใส่ในกระบอกพลาสติกจุดสี  
เขียวเป็นกระบอกพักแมลง

ค. สำหรับกระดาษกรองแผ่นที่ 2 นำมาหยด  
สารทดลองแต่ละชนิด ปริมาณ 2 มิลลิตร แล้ว  
นำไปบุติด้านในของกระบอกสีแดง (exposure  
tube)

ง. นำกระบอกที่มีจุดสีแดง (exposure tube)  
ที่ติดกระดาษแล้วไปประกอบเข้าอีกด้านหนึ่ง  
ของกระบอกที่มีจุดสีเขียว (holding tube) แล้ว  
หมุนเกลียวให้แน่น

WHO Standard Susceptibility Test Kit

**ภาพที่ 3.23** ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสาร  
องค์ประกอบหลักแต่ละชนิด ต่อการสลบและการตายของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมีย ด้วยวิธีการ  
สัมผัส (Contact method) (ก-ง)

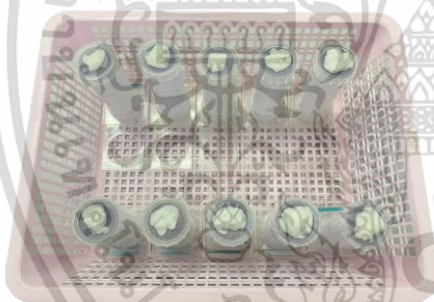
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



จ. เป่าหรือเคาะกระบอกเบาๆ เพื่อปล่อยให้ตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมียจากกระบอกสีเขียวไปยังกระบอกสีแดงให้หมด แล้วจึงทำการปิดกระบอกด้วยฝาเลื่อนโดยให้ตัวเต็มวัยยุงลายบ้านสัมผัสสารนาน 1 ชั่วโมง



ฉ. ทำการบันทึกจำนวนตัวเต็มวัยยุงลายบ้านที่สลบแต่ละกระบอกทดสอบที่เวลา 1, 5, 10, 15, 30 และ 60 นาที



ช. เมื่อครบ 60 นาที (1 ชั่วโมง) ทำการย้ายตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมียกลับมายังกระบอกจุดสีเขียว ปิดกระบอกด้วยฝาเลื่อน จากนั้นวางสำลีชุบน้ำหวานความเข้มข้น 5% ไว้ด้านบนกระบอกสีเขียว และทำการบันทึกการตายหลังการทดลอง 24 ชั่วโมง

ภาพที่ 3.23 (ต่อ) ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักแต่ละชนิด ต่อการสลบและการตายของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมีย ด้วยวิธีการสัมผัส (Contact method) (ก-ช)

### 3.2.6 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักต่อการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้าน

ดำเนินการทดลองด้วยวิธีการหยด (Topical method) ดัดแปลงตามวิธีการของ Cotchakaew and Soonwera (2019) โดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) มี 11 สิ่งทดลอง ในแต่ละสิ่งทดลองทำ 5 ซ้ำ แต่ละหน่วยทดลองใช้ไข่ของยุงลายบ้าน อายุ 5 วัน จำนวนไม่น้อยกว่า 25 ฟอง ต่อถ้วยทดลอง (ซ้ำ) โดยมีการทดลองเปรียบเทียบกับ 3.5% tween 60 เป็น negative control และ 1% (w/w) temephos (ทรายจีพีโอ-1<sup>®</sup>) เป็น positive control ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ (ภาพที่ 3.24)

ก) เตรียมถ้วยทดลอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำเปล่าปราศจากคลอรีน ปริมาณ 99 มิลลิลิตรต่อถ้วยทดลอง จากนั้นใช้อุปกรณ์หยดน้ำมันหอมระเหยพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักแต่ละชนิด ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละถ้วยทดลอง

ข) ทำการตรวจความสมบูรณ์ของไข่ยุงลายบ้านทุกฟองภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Nikon<sup>®</sup>, Type 102) จากนั้นนำไข่ยุงลายบ้านใส่ในถ้วยทดลอง

ค) ทำการบันทึกผลการฟักไข่ของยุงลายบ้าน หลังการทดลอง 1 และ 2 วัน ด้วยเครื่องนับจำนวน (counter) จากนั้นบันทึกและนำข้อมูลไปหาอัตราการยับยั้งการฟักไข่ (Inhibition Rate)

#### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจะใช้โปรแกรม SPSS (version 25) ซึ่งวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการฟักไข่ของแต่ละสารทดสอบ และทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

วิเคราะห์ค่า LT<sub>50</sub> (50% Lethal Time) : เวลาหลังการทดลองที่มีผลต่อการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้าน ด้วยวิธี Probit analysis

#### สูตรคำนวณอัตราการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้าน

$$\text{อัตราการยับยั้งการฟักไข่ (Inhibition Rate)} = \left[ \frac{\text{จำนวนไข่ที่ไม่ฟัก}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}} \right] \times 100$$



ก. เตรียมถ้วยทดลอง แล้วเติมน้ำเปล่าปราศจากคลอรีน ปริมาณ 99 มิลลิลิตรต่อถ้วยทดลอง จากนั้นหยดสารทดสอบแต่ละชนิด ปริมาณ 1 มิลลิลิตร



ข. ตรวจสอบสมบูรณ์ของไข่ยุงลายบ้านอายุ 5 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (NIKON®, Type 102) ที่มีความสมบูรณ์จำนวน 25 ฟอง แล้วนำไข่ยุงลายบ้านใส่ลงในถ้วยทดสอบ



ค. ตรวจสอบและบันทึกจำนวนไข่ที่ไม่ฟักของยุงลายบ้าน หลังการทดลอง 1 และ 2 วัน

ภาพที่ 3.24 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักแต่ละชนิด ต่อการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้าน ด้วยวิธีการหยด (Topical application) (ก-ค)

### 3.2.7 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักต่อการยับยั้งการวางไข่ของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน

ดำเนินการทดลองด้วยวิธีการ Double-choice method ตามวิธีการของ Chantawee and Soonwera (2018) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) มี 11 สิ่งทดลอง ในแต่ละสิ่งทดลองทำ 5 ซ้ำ แต่ละหน่วยทดลองใช้ตัวเต็มวัยเพศเมียจำนวน 15 ตัว ต่อกรงทดสอบ (ซ้ำ) และมีการทดลองเปรียบเทียบกับ 3.5% tween 60 เป็น negative control และ 1% (w/w) temephos (ทรายจีพีโอ-1®) เป็น positive control ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ (ภาพที่ 3.25)

ก) เมื่อยุงเพศเมียอายุ 5-7 วัน ได้รับการผสมพันธุ์แล้วจะนำยุงตัวเต็มวัยเพศเมียมาให้กินเลือดแบบเทียม หลังจากยุงกินเลือดเสร็จแล้ว 1 วัน ใช้หลอดดูดแมลง (aspirator) ดูดยุงตัวเต็มวัยเพศเมีย จำนวน 15 ตัว ใส่ในกรงทดสอบขนาด 30×30×30 เซนติเมตร พร้อมทั้งให้น้ำหวานความเข้มข้น 5% + multivitamin ความเข้มข้น 2% เพื่อใช้เป็นอาหารของยุงตัวเต็มวัย

ข) จากนั้นเตรียมถ้วยทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 3.5 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำปราศจากคลอรีนปริมาตร 99 มิลลิลิตรต่อถ้วยจำนวน 2 ถ้วย โดยถ้วยที่ 1 ใส่ออโต้ปิเปตต์หยดน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักที่แต่ละชนิด ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (ถ้วยมีสาร) ส่วนถ้วยที่ 2 หยดด้วยน้ำปราศจากคลอรีน ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (ถ้วยไม่มีสาร)

ค) ใส่กระดาษกรอง Whatman No.1® ขนาด 6×15 เซนติเมตร สำหรับให้ยุงวางไข่ ลงในถ้วยมีสาร และถ้วยไม่มีสาร โดยให้กระดาษกรองสำหรับวางไข่จุ่มลงไปใต้น้ำและมีส่วนของกระดาษที่อยู่เหนือผิวน้ำไม่น้อยกว่า 2 เซนติเมตร

ง) จากนั้นนำถ้วยที่เตรียมไว้ใส่ในกรงทดสอบ โดยวางถ้วยที่มุมของกรงทดสอบในทิศทางตรงกันข้าม ซึ่งในการทดลอง 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำจะวางถ้วยมีสารและถ้วยไม่มีสารในตำแหน่งที่ตรงกันข้ามและไม่ซ้ำกับตำแหน่งเดิม

จ) เมื่อครบ 3 วัน ทำการบันทึกผลการทดลอง โดยนำถ้วยมีสารและถ้วยไม่มีสารออกจากกรงทดสอบ แล้วนับจำนวนไข่ของยุงที่วางไว้ในแต่ละถ้วยแต่ละซ้ำ ด้วยเครื่องนับจำนวน (counter) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (NIKON®, Type 102) จากนั้นนำข้อมูลทั้งหมดของแต่ละสารทดสอบมาทดสอบความแตกต่างทางสถิติ

#### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจะใช้โปรแกรม SPSS (version 25) ซึ่งวิเคราะห์หาค่าผลการวางไข่ของแต่ละสารทดสอบ มาทดสอบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Paired-sample *t*-test

วิเคราะห์ค่าดัชนีชี้วัดการวางไข่ (OAI = Oviposition activity index) ตามวิธีการของ Chantawee and Soonwera (2018) ดังนี้

ดัชนีชี้วัดการวางไข่ (OAI)

$$\text{ดัชนีชี้วัดการวางไข่ (OAI)} = \frac{\text{จำนวนไข่ยุงในถ้วยมีสาร} - \text{จำนวนไข่ยุงในถ้วยไม่มีสาร}}{\text{จำนวนไข่ยุงในถ้วยมีสาร} + \text{จำนวนไข่ยุงในถ้วยไม่มีสาร}}$$

กรณีค่า OAI มีค่าอยู่ระหว่าง -1 ถึง 1 แปลผลดังนี้

ค่า OAI เป็นบวก (+) หมายถึง จำนวนไข่ในถ้วยมีสารมากกว่าถ้วยไม่มีสาร แสดงว่าสารนั้นมีผลในการดึงดูดตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านให้มาวางไข่ (Attractants)

ค่า OAI เป็นลบ (-) หมายถึง จำนวนไข่ในถ้วยมีสารน้อยกว่าถ้วยไม่มีสาร แสดงว่าสารนั้นมีผลในการขับไล่ตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านไม่ให้มาวางไข่ (Repellents)

ค่า OAI เป็นศูนย์ (0) หมายถึง จำนวนไข่ในถ้วยมีสารเท่ากับจำนวนไข่ในถ้วยไม่มีสาร แสดงว่าสารนั้นไม่มีผลในการดึงดูดและขับไล่ตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านให้มาวางไข่ (Fair)

ในกรณีค่า OAI เป็นบวก แสดงว่า น้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติในการดึงดูดให้ตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านมาวางไข่ จึงนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาค่าประสิทธิภาพการดึงดูด (Effective Attractancy, %EA) ตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงให้มาวางไข่

$$\% EA = \left[ \frac{\text{จำนวนไข่ยุงในถ้วยมีสาร} - \text{จำนวนไข่ยุงในถ้วยไม่มีสาร}}{\text{จำนวนไข่ยุงในถ้วยมีสาร}} \right] \times 100$$

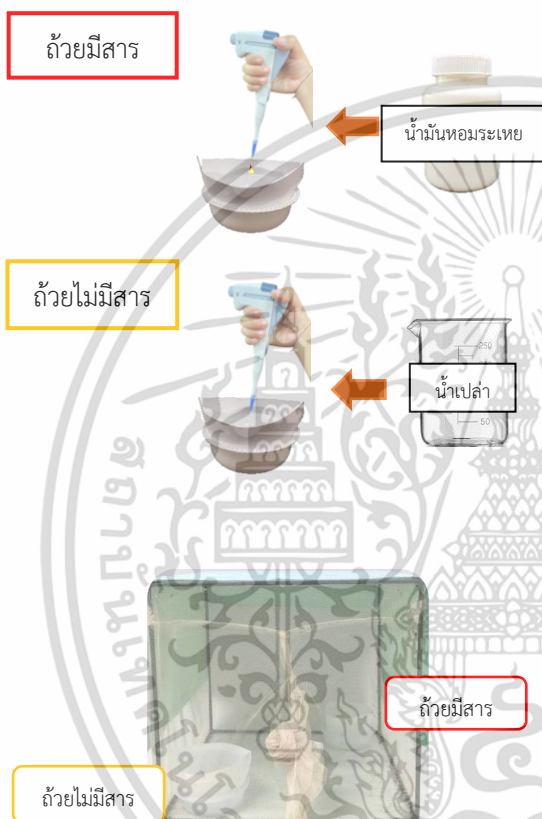
ในกรณีค่า OAI เป็นลบ แสดงว่า น้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติในการไล่ไม่ให้ตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านมาวางไข่ จึงนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาค่าประสิทธิภาพในการไล่ (Effective Repellency, %ER) ตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงไม่ให้มาวางไข่ ดังนี้

$$\% ER = \left[ \frac{\text{จำนวนไข่ยุงในถ้วยไม่มีสาร} - \text{จำนวนไข่ยุงในถ้วยมีสาร}}{\text{จำนวนไข่ยุงในถ้วยไม่มีสาร}} \right] \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก. เตรียมตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมียที่ให้อินเลียดแล้ว จำนวน 15 ตัว ใส่เข้าไปในกรงทดสอบขนาด 30×30×30 เซนติเมตร



ข. เตรียมถ้วยทดสอบจำนวน 2 ใบ แล้วเติมน้ำปราศจากคลอรีนปริมาณ 99 มิลลิลิตร โดยถ้วยที่ 1 หยดสารทดสอบแต่ละชนิด ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เป็นถ้วยมีสาร ส่วนถ้วยที่ 2 หยดด้วยน้ำเปล่า ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เป็นถ้วยไม่มีสาร หลังจากนั้นใส่กระดาษกรอง whatman ขนาด 6×15 เซนติเมตร

ค. นำถ้วยที่เตรียมไว้ใส่ในกรงทดสอบ โดยวางถ้วยที่มุมของกรงในทิศทางตรงกันข้ามกัน



ง. เมื่อครบ 3 วัน ทำการบันทึกผลการทดลอง โดยนับจำนวนไข่ของยุงที่วางไว้ในแต่ละถ้วยแต่ละซ้ำ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

ภาพที่ 3.25 ขั้นตอนการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักแต่ละชนิด ต่อการยับยั้งการวางไข่ตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน ด้วยวิธีการ Double choice method (ก-ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการป้องกันกำจัดลูกน้ำวัย 4 และศึกษาความเป็นพิษต่อสัณฐานและสรีรวิทยาของยุงลายบ้าน

ผลการทดลองในตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1 คือ ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการตายของลูกน้ำวัย 4 ยุงลายบ้าน ผลปรากฏว่า น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1% ให้ผลดีที่สุดในการทดลอง รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1% และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% ตามลำดับ ซึ่งผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักในการป้องกันกำจัดลูกน้ำวัย 4 ยุงลายบ้าน ที่ให้ผลดีที่สุดให้ผลแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กับผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักในการกำจัดลูกน้ำวัย 4 ยุงลายบ้านในระดับรองลงมา ซึ่งรายละเอียดในแต่ละช่วงเวลามีดังนี้

หลังการทดลอง 1 และ 5 นาที พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักทั้ง 9 สูตร ไม่มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุงลายบ้านตาย 0%

หลังการทดลอง 10 นาที พบว่า น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1% มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุงลายบ้านตายสูงที่สุด คือ 3.5% รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1% และน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1% ไม่มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุงลายบ้านตาย 0%

หลังการทดลอง 15 นาที พบว่า น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1% มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุงลายบ้านตายสูงที่สุด คือ 8.3% รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1% มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ตาย เท่ากับ 6.8, 6.3, 5.3 และ 5.0% ตามลำดับ สำหรับ น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans-*

cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% และ น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1% ไม่มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้านตาย 0%

หลังการทดลอง 30 นาที พบว่า น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้านตายสูงที่สุด คือ 28.3% รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% และน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1% มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ตาย เท่ากับ 20.3, 16.3, 13.5, 12.8, 7.8, 5.3 และ 2.8% ตามลำดับ สำหรับน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% ไม่มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้านตาย 0%

หลังการทดลอง 1 ชั่วโมง พบว่า น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้านตายสูงที่สุด คือ 55.3% รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% และน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ตาย เท่ากับ 48.0, 41.3, 32.5, 30, 16.5, 13.8, 10.8 และ 3.0% ตามลำดับ

หลังการทดลอง 2 ชั่วโมง พบว่า น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้านตายสูงที่สุด คือ 55.3% รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% และน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ตาย เท่ากับ 87.3, 85.8, 81.8, 59.9, 56.0, 34.3, 27.5, 23.5 และ 8.3% ตามลำดับ

หลังการทดลอง 6 ชั่วโมง พบว่า น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1% และ น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้านตายสูงที่สุด 100% รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, และ น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1% และน้ำมัน

หอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ตาย เท่ากับ 93.0, 59.5, 49.5, 46.0 และ 39.5% ตามลำดับ

หลังการทดลอง 24 ชั่วโมง พบว่า น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1% และน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุบตายบ้านตายสูงที่สุด 100% รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% และ น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ตาย เท่ากับ 99.8, 94.8, 88.0 และ 72.5% ตามลำดับ

สำหรับการทดลองเปรียบเทียบ 1% (w/w) temephos (positive control) พบว่า หลังการทดลอง 1-10 นาที ไม่มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุบตายบ้านตาย (0%) แต่หลังการทดลอง 15 นาที-24 ชั่วโมง 1% (w/w) temephos มีผลทำให้ลูกน้ำยุบตายบ้านตาย 2.4-93.8% ในขณะที่ tween 60 (negative control) ไม่มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุบตายบ้านตายตลอดระยะเวลาในการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบค่า  $LT_{50}$  (50% Lethal Time) คือ เวลาหลังการทดลองที่ทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุบตายบ้านตายลงครึ่งหนึ่ง (50%) ผลปรากฏว่า น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีค่า  $LT_{50}$  ต่ำที่สุด คือ 1.4 ชั่วโมง รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 1.7, 1.7, 2.4, 4.6, 5.0, 11.4, 12.8 และ 17.7 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่ผลการทดลองเปรียบเทียบ 1% (w/w) temephos (positive control) มีค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 9.8 ชั่วโมง สำหรับ tween 60 (negative control) ไม่สามารถวิเคราะห์ค่าสถิติได้

**ตารางที่ 4.1** ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการตายของลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้าน หลังการทดลอง 1, 5, 10, 15, 30 นาที 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง

ชนิดของน้ำมันหอมระเหย	อัตราการตายของลูกน้ำวัยลายบ้าน (%) ± SD/เวลาหลังการทดลอง									LT <sub>50</sub> <sup>2/</sup> (ชั่วโมง) (ต่ำสุด-สูงสุด)
	1 นาที	5 นาที	10 นาที	15 นาที	30 นาที	1 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + $\alpha$ -pinene 1%	0±0 <sup>1/</sup>	0±0	0±0 <sup>b</sup>	5.3±1.9 <sup>b</sup>	16.3±10.9 <sup>bc</sup>	30.0±13.1 <sup>d</sup>	56.0±23.3 <sup>b</sup>	93.0±13.0 <sup>a</sup>	99.8±1.0 <sup>a</sup>	4.6 (-)
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geraniol 1%	0±0	0±0	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>c</sup>	2.8±4.6 <sup>ef</sup>	16.5±8.0 <sup>c</sup>	34.3±26.7 <sup>c</sup>	46.0±31.4 <sup>bc</sup>	94.8±7.4 <sup>ab</sup>	11.4 (-)
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2%+ <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	0±0	0±0	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>c</sup>	0±0 <sup>f</sup>	3.0±1.1 <sup>fg</sup>	8.3±4.1 <sup>de</sup>	49.5±22.1 <sup>bc</sup>	88.0±11.6 <sup>b</sup>	12.8 (11.5-14.3)
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + $\alpha$ -pinene 1%	0±0	0±0	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>c</sup>	5.3±5.8 <sup>def</sup>	10.8±9.4 <sup>ef</sup>	23.5±14.3 <sup>cd</sup>	39.5±16.9 <sup>c</sup>	72.5±16.5 <sup>c</sup>	17.7 (16.0-20.2)
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geraniol 1%	0±0	0±0	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>c</sup>	7.8±6.9 <sup>cdef</sup>	13.8±7.6 <sup>e</sup>	27.5±9.7 <sup>c</sup>	59.5±10.2 <sup>b</sup>	100±0 <sup>a</sup>	5.0 (4.7-5.35)
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	0±0	0±0	0±0 <sup>b</sup>	5.0±1.8 <sup>b</sup>	13.5±6.2 <sup>bcd</sup>	48.0±8.9 <sup>ab</sup>	85.8±5.1 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	1.7 (1.6-17.8)
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2%+ $\alpha$ -pinene 1%	0±0	0±0	0±0 <sup>b</sup>	6.8±1.9 <sup>a</sup>	12.8±10.9 <sup>bcd</sup>	32.5±13.5 <sup>cd</sup>	59.5±13.1 <sup>b</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	2.4 (2.2-2.6)
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geraniol 1%	0±0	0±0	3.5±3.2 <sup>a</sup>	8.3±2.3 <sup>a</sup>	20.3±5.9 <sup>ab</sup>	41.3±9.5 <sup>bc</sup>	81.8±11.3 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	1.7 (1.6-1.8)
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2%+ <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	0±0	0±0	0±0 <sup>b</sup>	6.3±2.0 <sup>a</sup>	28.3±11.5 <sup>d</sup>	55.3±11.8 <sup>a</sup>	87.3±7.2 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	1.4 (1.3-1.6)
tween 60 (negative control)	0±0	0±0	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>c</sup>	0±0 <sup>f</sup>	0±0 <sup>g</sup>	0±0 <sup>e</sup>	0±0 <sup>d</sup>	0±0 <sup>d</sup>	NA <sup>3/</sup>
1% (w/w) temephos (positive control)	0±0	0±0	0±0 <sup>b</sup>	2.4±1.3 <sup>bc</sup>	11.3±6.9 <sup>bcde</sup>	35.3±16.2 <sup>cd</sup>	76.3±11.1 <sup>a</sup>	90.3±8.6 <sup>a</sup>	93.8±8.3 <sup>ab</sup>	9.8 (4.8-22.1)
df <sub>total</sub> , F-test	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	-
C.V. (%)	-	-	122.3	105.2	46.5	24.1	17.4	4.6	1.6	-

<sup>1/</sup> ตัวเลขค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธีการ DMRT

<sup>2/</sup> 50% Lethal Time (LT<sub>50</sub>) หมายถึง เวลาหลังการทดลองที่ทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้านตายลงไปครึ่งหนึ่ง (50%)

<sup>3/</sup> Not Available (NA) หมายถึง ไม่สามารถวิเคราะห์ค่าทางสถิติได้

\*\* แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ผลการทดลองในตารางที่ 4.2 คือ ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการตายและการพัฒนาที่ผิดปกติทางสัณฐานและสรีรวิทยาของลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้าน ผลปรากฏว่า น้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก มีผลต่ออัตราการตายและความผิดปกติทางด้านสัณฐานและสรีรวิทยาในการพัฒนาของลูกน้ำไปเป็นตัวโม่่ง และตัวเต็มวัย โดยน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้านมากที่สุด รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1% คือ น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *alpha-pinene* 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *alpha-pinene* 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *alpha-pinene* 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *geranial* 1% และน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *geranial* 1% ซึ่งผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อความเป็นพิษของลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้านที่ให้ผลดีที่สุดในการทดลองให้ผลแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กับผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักต่อความเป็นพิษของลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้านในระดับรองลงมาโดยมีรายละเอียดแต่ละชนิดของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมสารองค์ประกอบหลักดังนี้

น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1% และน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* มีความเป็นพิษสูงที่สุดซึ่งมีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้านพัฒนาผิดปกติมากที่สุด 1 แบบ ได้แก่ การตายแบบ NL (Normal Larvae) คือ ลูกน้ำยุ้งลายบ้านตายปกติที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยา 100% (ภาพที่ 3.1.4)

น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *alpha-pinene* 1% มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้านพัฒนาผิดปกติมากที่สุด 2 แบบ ได้แก่ การตายแบบ NL เท่ากับ 99.2% และการตายแบบ DL (Deformed Larvae) คือ ลูกน้ำยุ้งลายบ้านตายแบบผิดปกติ โดยที่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นตัวโม่่งได้อย่างสมบูรณ์ เท่ากับ 0.8% (ภาพที่ 3.1.5)

น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *geranial* 1% มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้านพัฒนาผิดปกติมากที่สุด 4 แบบ ได้แก่ การตายแบบ DL เท่ากับ 85.6%, การตายแบบ LP (Deformed Larval-Pupal Intermediate) คือ ลูกน้ำยุ้งลายบ้านตายแบบผิดปกติโดยบริเวณส่วนหัวของลูกน้ำยุ้งลายบ้านผิดปกติ จึงไม่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นตัวโม่่งได้สมบูรณ์ เท่ากับ 7.2% (ภาพที่ 3.16), DP (Deformed Pupa) คือ ตัวโม่่งยุ้งลายบ้านตายแบบผิดปกติโดยบริเวณส่วนหัวของตัวโม่่งขยายใหญ่เหมือนช้าง เท่ากับ 4.8% (ภาพที่ 3.19) และการตายแบบ BP (Dead Normal Brown Pupa) ตัวโม่่งยุ้งลายบ้านตายแบบผิดปกติ โดยที่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นตัวเต็มวัยได้อย่างสมบูรณ์ เท่ากับ 2.8% (ภาพที่ 3.18)

น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้านพัฒนาผิดปกติมากที่สุด 4 แบบ ได้แก่ การตายแบบ NL เท่ากับ 70.4%, การตายแบบ DL เท่ากับ 9.2%, การตายแบบ LP เท่ากับ 1.2% และการตายแบบ BP เท่ากับ 19.2%

น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1% มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้านพัฒนาผิดปกติมากที่สุด 2 แบบ ได้แก่ การตายแบบ NL เท่ากับ 83.2% และการตายแบบ DL เท่ากับ 16.8 %

น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1% มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้านพัฒนาผิดปกติมากที่สุด 3 แบบ ได้แก่ การตายแบบ NL เท่ากับ 44.8% การตายแบบ DL เท่ากับ 55.2% และการตายแบบ LP เท่ากับ 0.4%

สำหรับการทดลองเปรียบเทียบใน 1% (w/w) temephos (positive control) พบว่า มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้านมีการพัฒนาที่ผิดปกติมากที่สุด 2 แบบ ได้แก่ การตายแบบ NL เท่ากับ 72.8% และการตายแบบ DL เท่ากับ 22.0% สำหรับลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้าน 5.2% สามารถพัฒนาเป็นตัวโม่งและตัวเต็มวัยได้อย่างสมบูรณ์ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานและสรีรวิทยา (NA) ในขณะที่ tween 60 (negative control) พบว่า ลูกน้ำวัย 4 ยุ้งลายบ้าน สามารถพัฒนาไปเป็นตัวโม่งและตัวเต็มวัยได้ 100% (NA: Normal adult, ภาพที่ 3.22)

**ตารางที่ 4.2** ความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยของพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการตายและการพัฒนาที่ผิดปกติทางสัณฐานและสรีรวิทยาของลูกน้ำยุงลายบ้าน หลังการทดลอง 24 ชั่วโมง

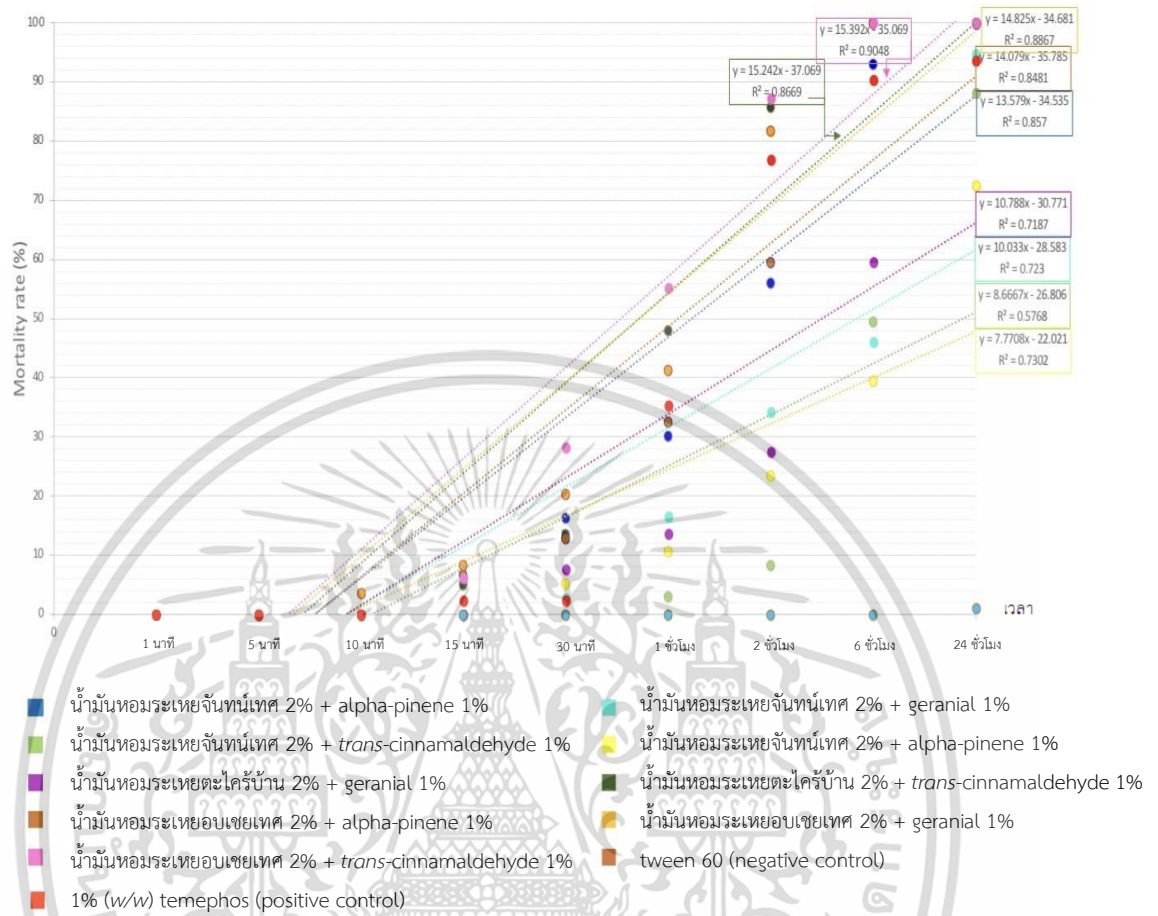
ชนิดของน้ำมันหอมระเหย	อัตราการตายและการพัฒนาที่ผิดปกติของลูกน้ำยุงลายบ้าน (%)							
	NL <sup>1/</sup>	DL <sup>1/</sup>	LP <sup>1/</sup>	DP <sup>1/</sup>	BP <sup>1/</sup>	DA <sup>1/</sup>	WP <sup>1/</sup>	NA <sup>1/</sup>
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%	99.2 <sup>a3/</sup>	0.8 <sup>e</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0	0	0 <sup>c</sup>
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%	0 <sup>d</sup>	85.6 <sup>a</sup>	7.2 <sup>a</sup>	4.8 <sup>a</sup>	2.8 <sup>b</sup>	0	0	0 <sup>c</sup>
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2%+ <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	100 <sup>a</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0	0	0 <sup>c</sup>
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1%	70.4 <sup>b</sup>	9.2 <sup>d</sup>	1.2 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	19.2 <sup>a</sup>	0	0	0 <sup>c</sup>
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%	44.8 <sup>c</sup>	55.2 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0	0	0 <sup>c</sup>
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	100 <sup>a</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0	0	0 <sup>c</sup>
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%	83.2 <sup>ab</sup>	16.8 <sup>cd</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0	0	0 <sup>c</sup>
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1%	44.8 <sup>c</sup>	55.2 <sup>b</sup>	0.4 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0	0	0 <sup>c</sup>
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2%+ <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	100 <sup>a</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0	0	0 <sup>c</sup>
tween 60 (negative control)	0 <sup>d</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0	0	100 <sup>a</sup>
1% (w/w) temephos (positive control)	72.8 <sup>b</sup>	22.0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0	0	5.2 <sup>b</sup>
<i>df</i> <sub>total</sub> , <i>F</i> -test	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>
C.V. (%)	17.1	42.9	277.9	501.2	214.3	NA <sup>3/</sup>	NA	26.6

<sup>1/</sup>NL= Normal Larvae, DL= Deformed Larvae, LP= Deformed Larval-Pupal Intermediate, DP= Deformed Pupa, BP= Dead Normal Brown pupa, DA= Deformed Adult, WP, White Pupa และNA= Normal Adult

<sup>2/</sup> ตัวเลขค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธีการ DMRT

<sup>3/</sup> Not Available (NA) หมายถึง ไม่สามารถวิเคราะห์ค่าทางสถิติได้

\*\* แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%



ภาพที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตายกับระยะเวลาของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อลูกน้ำวัย 4 ยุ่งลายบ้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการป้องกันกำจัดตัวมิ่ง และศึกษาความเป็นพิษต่อสัตว์และสรีรวิทยาของยุงลายบ้าน

ผลการทดลองในตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.2 คือ ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการตายของตัวมิ่งยุงลายบ้าน ผลปรากฏว่า น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% ให้ผลดีที่สุดในการทดลอง รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1% และ น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1% ตามลำดับ ซึ่งผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักในการเป็นสารกำจัดตัวมิ่งยุงลายบ้าน ที่ให้ผลดีที่สุดให้ผลแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กับผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักในการเป็นสารกำจัดตัวมิ่งยุงลายบ้านในระดับรองลงมา ซึ่งรายละเอียดแต่ละช่วงเวลามีดังนี้

หลังการทดลอง 1, 5, 10 และ 15 นาที พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ทั้ง 9 สูตร ไม่มีผลทำให้ตัวมิ่งยุงลายบ้านตาย 0%

หลังการทดลอง 30 นาที พบว่า น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1% มีผลทำให้ตัวมิ่งยุงลายบ้านตายสูงที่สุด คือ 9.0% รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีผลทำให้ตัวมิ่งตาย เท่ากับ 3.1% สำหรับน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1% และน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1% ไม่มีผลทำให้ตัวมิ่งยุงลายบ้านตาย 0%

หลังการทดลอง 1 ชั่วโมง พบว่า น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีผลทำให้ตัวมิ่งยุงลายบ้านตายสูงที่สุด คือ 30.0% รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1% และน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีผลทำให้ตัวมิ่งยุงลายบ้านตาย เท่ากับ 13.2, 11.0, 8.0, 5.2, 4.2, 3.2, 0 และ 0% ตามลำดับ

หลังการทดลอง 2 ชั่วโมง พบว่า น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีผลทำให้ตัวมิ่งยุงลายบ้านตายสูงที่สุด คือ 75.0% รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% +

geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% และน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีผลทำให้ตัวโม่งยุบลงตายบ้านตาย เท่ากับ 25.0, 19.5, 17.0, 11.0, 6.0, 5.2, 4.8 และ 4.2% ตามลำดับ

หลังการทดลอง 6 ชั่วโมง พบว่า น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีผลทำให้ตัวโม่งยุบลงตายบ้านตายสูงที่สุด คือ 98.0% รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1% และน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1% มีผลทำให้ตัวโม่งยุบลงตายบ้านตาย เท่ากับ 68.0, 49.0, 49.0, 17.1, 17.1, 14.0, 11.0 และ 10.1% ตามลำดับ

หลังการทดลอง 24 ชั่วโมง พบว่า น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1% และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีผลทำให้ตัวโม่งยุบลงตายบ้านตายสูงที่สุด 100% รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1% และน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1% มีผลทำให้ตัวโม่งยุบลงตายบ้านตาย เท่ากับ 98.0, 97.0, 41.0, 30.0, 25.0, 16.0 และ 14.0% ตามลำดับ

หลังการทดลอง 48 ชั่วโมง พบว่า น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1% มีผลทำให้ตัวโม่งยุบลงตายบ้านตายสูงที่สุด 100% รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1% และน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1% มีผลทำให้ตัวโม่งยุบลงตายบ้านตาย เท่ากับ 59.0, 43.0, 22.0 และ 20.0% ตามลำดับ

สำหรับการทดลองเปรียบเทียบ 1% (w/w) temephos (positive control) และ tween 60 (negative control) พบว่า ไม่มีผลทำให้ตัวโม่งยุบลงตายตลอดระยะเวลาในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบค่า  $LT_{50}$  (Lethal Time) คือ เวลาหลังการทดลองที่ทำให้ตัวมดงูยุงลายบ้านตายครึ่งหนึ่ง (50%) ผลปรากฏว่า น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีค่า  $LT_{50}$  ต่ำที่สุดคือ 1.4 ชั่วโมง รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geraniol 1% และน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1% ซึ่งมีค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 5.8, 7.0, 7.8, 25.2, 39.9, 47.1, 68.1 และ 71.2 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่การทดลองเปรียบเทียบ 1% (w/w) (positive control) และ tween 60 (negative control) ไม่สามารถวิเคราะห์ค่าสถิติได้

ผลการทดลองในตารางที่ 4.4 คือ ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักต่อการตายและการพัฒนาที่ผิดปกติทางสัณฐานและสรีรวิทยาของตัวมดงูยุงลายบ้าน ผลปรากฏว่า น้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก มีผลต่อการตายและความผิดปกติทางด้านสัณฐานและสรีรวิทยาในการพัฒนาของตัวมดงูไปเป็นตัวเต็มวัย โดยน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีความเป็นพิษต่อตัวมดงูยุงลายบ้านมากที่สุด รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% และ น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1% ซึ่งผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อความเป็นพิษของตัวมดงูยุงลายบ้านให้ผลดีที่สุดในการทดลองให้ผลแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กับผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักต่อความเป็นพิษของตัวมดงูยุงลายบ้านในระดับรองลงมา โดยมีรายละเอียดแต่ละชนิดของน้ำมันหอมระเหยมีดังนี้

น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geraniol 1% มีความเป็นพิษสูงที่สุดซึ่งมีผลทำให้ตัวมดงูยุงลายบ้านพัฒนาการผิดปกติมากที่สุด 1 แบบ ได้แก่ การตายแบบ Deformed pupa (DP) คือ ลักษณะผิดปกติของตัวมดงูยุงลายบ้านที่ส่วนหัวขยายใหญ่ คล้ายส่วนหัวช้าง (Elephantoid) เท่ากับ 100% (ภาพที่ 3.19)

น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีผลทำให้ตัวมดงูยุงลายบ้านพัฒนาการผิดปกติมากที่สุด 4 แบบ ได้แก่ การตายแบบ DP เท่ากับ 32%, การตายแบบ Adult attached to the pupal stage (PA) คือ ลักษณะการตายแบบผิดปกติของของตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มีรูปร่างไม่สมบูรณ์ เท่ากับ 11% (ภาพที่ 3.20) การตายแบบ Deformed Adult (DA) คือ ลักษณะการตายที่ผิดปกติของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านแบบผิดปกติ โดยตัวโม่่งยุงลายบ้านสมบูรณ์ แต่ตัวเต็มวัยมีลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาไม่สมบูรณ์ ได้แก่ ลำตัว หนวดและปีกไม่สมบูรณ์ ปีกกุด และปีกบิดเบี้ยว เท่ากับ 16% (ภาพที่ 3.21) และการตายแบบ Normal adult (NA) คือ ลักษณะการตายของตัวเต็มวัยยุงลายบ้านที่ปกติ โดยที่ลูกน้ำสามารถพัฒนาไปเป็นตัวโม่่ง และตัวเต็มวัยอย่างสมบูรณ์ เท่ากับ 41% (ภาพที่ 3.22)

น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1% มีผลทำให้ตัวโม่่งยุงลายบ้านพัฒนาการผิดปกติมากที่สุด 3 แบบ ได้แก่ การตายแบบ DP เท่ากับ 32%, การตายแบบ PA เท่ากับ 1% และการตายแบบ NA เท่ากับ 78%

น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีผลทำให้ตัวโม่่งยุงลายบ้านพัฒนาการผิดปกติมากที่สุด 5 แบบ ได้แก่ การตายแบบ DP เท่ากับ 18%, การตายแบบ Dead normal brown pupa (BP) คือ ลักษณะการตายของตัวโม่่งแบบปกติ ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยา เท่ากับ 10.7% (ภาพที่ 3.18), การตายแบบ PA เท่ากับ 6% การตายแบบ DA เท่ากับ 14.3% และการตายแบบ NA เท่ากับ 51%

น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1% มีผลทำให้ตัวโม่่งยุงลายบ้านพัฒนาการผิดปกติมากที่สุด 3 แบบ ได้แก่ การตายแบบ DP เท่ากับ 17%, การตายแบบ PA เท่ากับ 4% และการตายแบบ NA เท่ากับ 79%

สำหรับการทดลองเปรียบเทียบ 1% (w/w) temephos (positive control) และ tween 60 (negative control) พบว่า ตัวโม่่งยุงลายบ้านสามารถพัฒนาไปเป็นตัวเต็มวัยยุงลายบ้านได้ 100% (NA)

**ตารางที่ 4.3** ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการตายของตัวมดยุงลายบ้าน หลังการทดลอง 1, 5, 10, 15, 30 นาที 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

ชนิดของน้ำมันหอมระเหย	อัตราการตายของตัวมดยุงลายบ้าน (%) ± SD/เวลาหลังการทดลอง										LT <sub>50</sub> <sup>2/</sup> (ชั่วโมง) (ต่ำสุด-สูงสุด)
	1 นาที	5 นาที	10 นาที	15 นาที	30 นาที	1 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene1%	0±0 <sup>1/</sup>	0±0	0±0	0±0	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>d</sup>	19.5±5.7 <sup>bc</sup>	49.0±12.9 <sup>bc</sup>	98.0±4.2 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	7.8 (-)
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial1%	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0 <sup>b</sup>	13.2±4.7 <sup>b</sup>	17.0±10.6 <sup>bcd</sup>	49.0±12.9 <sup>bc</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	5.8 (5.3-6.4)
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2%+ trans-cinnamaldehyde 1%	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>d</sup>	4.2±2.0 <sup>d</sup>	17.1±5.0 <sup>c</sup>	41.0±11.9 <sup>bc</sup>	100±0 <sup>a</sup>	25.2 (23.2-27.48)
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene1%	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0 <sup>b</sup>	30.0±9.4 <sup>a</sup>	75.0±15.8 <sup>a</sup>	98.0±4.2 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	2.3 (1.94-2.92)
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%	0±0	0±0	0±0	0±0	9.0±5.17 <sup>a</sup>	11.0±5.7 <sup>b</sup>	25.0±13.5 <sup>b</sup>	68.0±13.2 <sup>ab</sup>	97.0±4.8 <sup>ab</sup>	100±0 <sup>a</sup>	7.0 (-)
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + trans-cinnamaldehyde 1%	0±0	0±0	0±0	0±0	3.2±1 <sup>ab</sup>	3.2±1.0 <sup>cd</sup>	4.8±2.1 <sup>df</sup>	17.1±5.0 <sup>c</sup>	25.0±13.5 <sup>cd</sup>	43.0±12.5 <sup>bc</sup>	47.1 (43.4-53.4)
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2%+ alpha-pinene1%	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0 <sup>b</sup>	5.2±2.4 <sup>bc</sup>	6.0±4.7 <sup>cd</sup>	10.1±6.7 <sup>def</sup>	16.0±5.2 <sup>cdf</sup>	20.0±6.7 <sup>cdf</sup>	71.2 (59.8-89.4)
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1%	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0 <sup>b</sup>	4.2±2.0 <sup>cd</sup>	5.2±2.4 <sup>cd</sup>	11.0±5.7 <sup>de</sup>	14.0±6.9 <sup>dfg</sup>	22.0±11.4 <sup>cd</sup>	68.1 (58.0-83.5)
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2%+ trans-cinnamaldehyde 1%	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0 <sup>b</sup>	8.0±4.2 <sup>bc</sup>	11.0±5.7 <sup>c</sup>	14.0±5.2 <sup>cd</sup>	30.0±9.4 <sup>c</sup>	59.0±17.3 <sup>b</sup>	39.9 (36.2-44.4)
tween 60 (negative control)	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>d</sup>	0±0 <sup>f</sup>	0±0 <sup>f</sup>	0±0 <sup>g</sup>	0±0 <sup>f</sup>	NA <sup>3/</sup>
1% (w/w) temephos (positive control)	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>d</sup>	0±0 <sup>f</sup>	0±0 <sup>f</sup>	0±0 <sup>g</sup>	0±0 <sup>f</sup>	NA
df <sub>total</sub> , F-test	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	-
C.V. (%)	-	-	-	-	225.1	106.7	56.9	34.8	15.3	13.5	

<sup>1/</sup> ตัวเลขค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธีการ DMRT

<sup>2/</sup> 50% Lethal Time (LT<sub>50</sub>) หมายถึง เวลาหลังการทดลองที่ทำให้ตัวมดยุงลายบ้านตายลงไปครึ่งหนึ่ง (50%)

<sup>3/</sup> Not Available (NA) หมายถึง ไม่สามารถวิเคราะห์ค่าทางสถิติได้

\*\* แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

**ตารางที่ 4.4** ความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยของพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการตายและการพัฒนาที่ผิดปกติทางสัณฐานและสรีรวิทยาของตัวมอดลายบ้าน หลังการทดลอง 48 ชั่วโมง

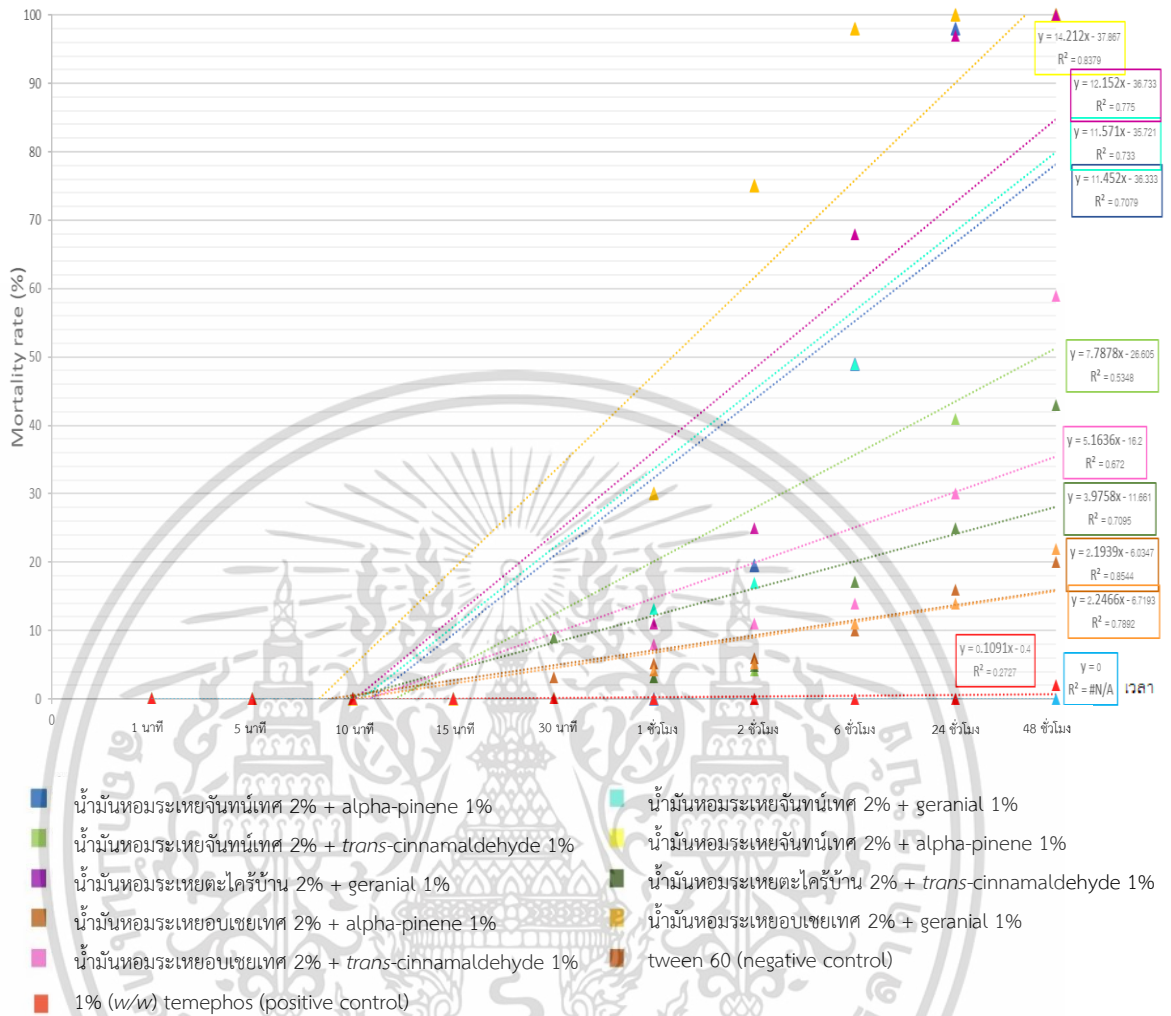
ชนิดของน้ำมันหอมระเหย <sup>2/</sup>	อัตราการตายและการพัฒนาที่ผิดปกติของตัวมอดลายบ้าน (%)					
	DP <sup>1/</sup>	BP <sup>1/</sup>	PA <sup>1/</sup>	DA <sup>1/</sup>	WP <sup>1/</sup>	NA <sup>1/</sup>
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%	100 <sup>a3/</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>	0	0 <sup>f</sup>
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geraniol 1%	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>	0	0 <sup>f</sup>
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>	0	0 <sup>f</sup>
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1%	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>	0	0 <sup>f</sup>
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geraniol 1%	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>	0	0 <sup>f</sup>
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	18.0 <sup>cd</sup>	10.7 <sup>a</sup>	6 <sup>c</sup>	14.3 <sup>ab</sup>	0	51.0 <sup>c</sup>
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%	17.0 <sup>cd</sup>	0 <sup>b</sup>	4 <sup>cd</sup>	0 <sup>c</sup>	0	79.0 <sup>b</sup>
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geraniol 1%	21.0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	1.0 <sup>cde</sup>	0 <sup>c</sup>	0	78.0 <sup>b</sup>
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	32.0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	11.0 <sup>b</sup>	16 <sup>a</sup>	0	41.0 <sup>d</sup>
tween 60 (negative control)	0 <sup>d</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>	0	100 <sup>a</sup>
1% (w/w) temephos (positive control)	0 <sup>d</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	0	100 <sup>a</sup>
<i>df</i> <sub>total</sub> , <i>F</i> -test	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>
C.V. (%)	14.6	746.2	251.8	214.8	NA <sup>3/</sup>	22.7

<sup>1/</sup>DP= Deformed Pupa, BP= Dead Normal Brown Pupa, PA= Adult Attached to the Pupal stage, DA= Deformed Adult, WP, White Pupa และNA= Normal Adult

<sup>2/</sup> ตัวเลขค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธีการ DMRT

<sup>3/</sup> Not Available (NA) หมายถึง ไม่สามารถวิเคราะห์ค่าทางสถิติได้

\*\* แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตายกับระยะเวลาของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อตัวมดงูยลายบ้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการสลบและตายของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน

ผลการทดลองในตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.3 คือ ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการสลบและตายของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน ผลปรากฏว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% ให้ผลดีที่สุดในการทดลอง รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1% และ น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% ตามลำดับ ซึ่งผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการสลบและการตายของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน ที่ให้ผลดีที่สุดให้ผลแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กับผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการสลบและการตายของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านในระดับรองลงมา ซึ่งรายละเอียดแต่ละช่วงเวลามีดังนี้

หลังการทดลอง 1 นาที พบว่า น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีผลทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านสลบสูงที่สุด คือ 52.4% รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% และ น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1% มีผลทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านสลบเท่ากับ 45.6, 43.4, 37.6, 31.8, 30.0, 23.6, 14.0 และ 6.4% ตามลำดับ

หลังการทดลอง 5 นาที พบว่า น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีผลทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านสลบสูงที่สุด คือ 97.2% รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1% และ น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีผลทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านสลบเท่ากับ 93.6, 93.0, 84.0, 58.8, 55.6, 55.4, 46.6 และ 44.6% ตามลำดับ

หลังการทดลอง 10 นาที พบว่า น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geraniol 1% และ

น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีผลทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมีย ยุงลายบ้านสลบสูงที่สุด 100% รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% และน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีผลทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมีย ยุงลายบ้านสลบเท่ากับ 97.6, 92.2, 89.2, 74.2 และ 66.6% ตามลำดับ

หลังการทดลอง 15 นาที พบว่า น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene1% และน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1% มีผลทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมีย ยุงลายบ้านสลบสูงที่สุด 100% รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene1% และน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีผลทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมีย ยุงลายบ้าน เท่ากับ 94.2 และ 77.2% ตามลำดับ

หลังการทดลอง 30 และ 60 นาที พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ทั้ง 9 ชนิด ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1% และน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีผลทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมีย ยุงลายบ้านสลบสูงที่สุด 100%

สำหรับการทดลองเปรียบเทียบ 1% (w/v) alpha-cypermethrin (positive control) พบว่า หลังการทดลอง 1, 5, 10, 15, 30 และ 60 นาที มีผลทำให้ตัวเต็มวัย ยุงลายบ้านเพศเมียสลบเท่ากับ 18.2, 54.8, 97.2, 100, 100 และ 100% ตามลำดับ ในขณะที่การทดลอง tween 60 (negative control) พบว่า ไม่มีผลทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมีย ยุงลายบ้านสลบตลอดระยะเวลาในการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบค่า  $KT_{50}$  (50% Knockdown Time) คือ เวลาหลังการทดลองที่ทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมีย ยุงลายบ้านสลบลงครึ่งหนึ่ง (50%) ผลปรากฏว่า น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene1% มีค่า  $KT_{50}$  ต่ำที่สุดคือ 1.6 นาที รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1% และน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1% โดยมีค่า  $KT_{50}$  เท่ากับ 2.0, 2.3, 3.3, 3.5, 4.0, 6.0, 6.3 และ 7.8 นาที ตามลำดับ ในขณะที่การทดลองเปรียบเทียบ 1% (w/v) alpha-cypermethrin (positive control) มีค่า  $KT_{50}$  เท่ากับ 4.5 นาที ส่วน tween 60 (negative control) ไม่สามารถวิเคราะห์ค่าสถิติได้

ผลการทดลองในตารางที่ 4.6 คือ ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักต่อการตายของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน หลังการทดลอง 24 ชั่วโมง ผลปรากฏว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักทั้ง 9 สูตร ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geraniol 1% และ น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1% มีผลทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านตาย 100%

สำหรับการทดลองเปรียบเทียบ 1% (w/v) alpha-cypermethrin (positive control) พบว่าหลังการทดลอง 24 ชั่วโมง มีผลทำให้ตัวเต็มวัยของยุงลายบ้านเพศเมียตาย 100% ในขณะที่การทดลอง tween 60 (negative control) พบว่า ไม่มีผลทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านตายตลอดระยะเวลาในการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบค่า  $LT_{50}$  (50% Lethal Time) คือ เวลาหลังการทดลองที่ทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านตายลงครึ่งหนึ่ง (50%) ผลปรากฏว่า น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีค่า  $LT_{50}$  ต่ำที่สุดคือ 1.6 นาที รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1% และน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1% โดยมีค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 2.0, 2.3, 3.3, 3.5, 4.0, 6.0, 6.3 และ 7.8 นาที ตามลำดับ ในขณะที่การทดลองเปรียบเทียบ 1% (w/v) alpha-cypermethrin (positive control) มีค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 4.5 นาที ส่วน tween 60 (negative control) ไม่สามารถวิเคราะห์ค่าสถิติได้

อย่างไรก็ตามเมื่อนำอัตราการตายมาเปรียบเทียบกับอัตราการเกิดพิษตามแนวทางองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, 2018) พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักทุกชนิดมีความเป็นพิษ ต่อตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านในระดับสูง (Susceptible, S) รวมถึงการทดลองเปรียบเทียบ 1% (w/v) alpha-cypermethrin (positive control) พบว่า มีความเป็นพิษต่อ

ยุ่งลายบ้านในระดับสูง (Susceptible, S) เช่นเดียวกัน ในขณะที่การทดลองเปรียบเทียบ tween 60 (negative control) ไม่สามารถเปรียบเทียบอัตราการตายได้ เนื่องจากไม่มีผลทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมีย ยุ่งลายบ้านตายตลอดระยะเวลาในการทดลอง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลของน้ำมันหอมระเหยของพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการสลบของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน หลังการทดลอง 1, 5, 10, 15, 30 และ 60 นาที

ชนิดของน้ำมันหอมระเหย	อัตราการสลบของยุงลายบ้าน (%) ± SD/ เวลาหลังการทดลอง (นาที)						KT <sub>50</sub> <sup>2/</sup> (นาที) (ต่ำสุด-สูงสุด)
	1	5	10	15	30	60	
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%	6.4±2.4 <sup>s1/</sup>	46.6±5.7 <sup>de</sup>	89.2±4.5 <sup>b</sup>	94.2±3.3 <sup>b</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	6.3 (6.0-6.7)
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%	31.8±6.7 <sup>a</sup>	93.0±5.0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	2.3 (2.2-2.5)
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	23.6±7.2 <sup>de</sup>	44.6±8.8 <sup>e</sup>	74.2±13.5 <sup>c</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	6.0 (5.7-6.4)
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1%	52.4±5.8 <sup>c</sup>	97.2±2.9 <sup>ab</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	1.6 (1.4-1.6)
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%	45.6±3.8 <sup>b</sup>	55.6±4.1 <sup>c</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	3.5 (3.2-3.8)
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	43.4±9.3 <sup>b</sup>	93.6±8.6 <sup>ab</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	2.0 (1.9-2.2)
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%	37.6±10.6 <sup>c</sup>	84.0±9.9 <sup>b</sup>	92.2±6.3 <sup>b</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	3.3 (2.8-3.8)
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1%	30.0±8.8 <sup>cd</sup>	58.8±15.3 <sup>c</sup>	97.6±4.2 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	4.0 (3.7-4.3)
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	14.0±3.6 <sup>f</sup>	55.4±9.3 <sup>cd</sup>	66.6±10.9 <sup>d</sup>	77.2±10.3 <sup>c</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	7.8 (7.3-8.4)
tween 60 (negative control)	0±0 <sup>s</sup>	0±0 <sup>f</sup>	0±0 <sup>e</sup>	0±0 <sup>d</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	NA <sup>3/</sup>
1% (w/v) alpha-cypermethrin (positive control)	18.2±12.6 <sup>ef</sup>	54.8±17.4 <sup>cde</sup>	97.2±7.8 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	4.5 (4.2-4.8)
df <sub>total</sub> , F-test	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	54 <sup>**</sup>	-
C.V. (%)	18.7	12.3	4.5	2.8	NA	NA	-

<sup>1/</sup> ตัวเลขค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธีการ DMRT

<sup>2/</sup> 50% Knocdown Time (KT<sub>50</sub>) หมายถึง เวลาหลังการทดลองที่ทำให้ตัวไม่มียุงลายบ้านตายลงไปครึ่งหนึ่ง

<sup>3/</sup> Not Available (NA) หมายถึง ไม่สามารถวิเคราะห์ค่าทางสถิติได้

\*\* แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 4.6 ผลของน้ำมันหอมระเหยของพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการตายของตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้าน หลังการทดลอง 24 ชั่วโมง

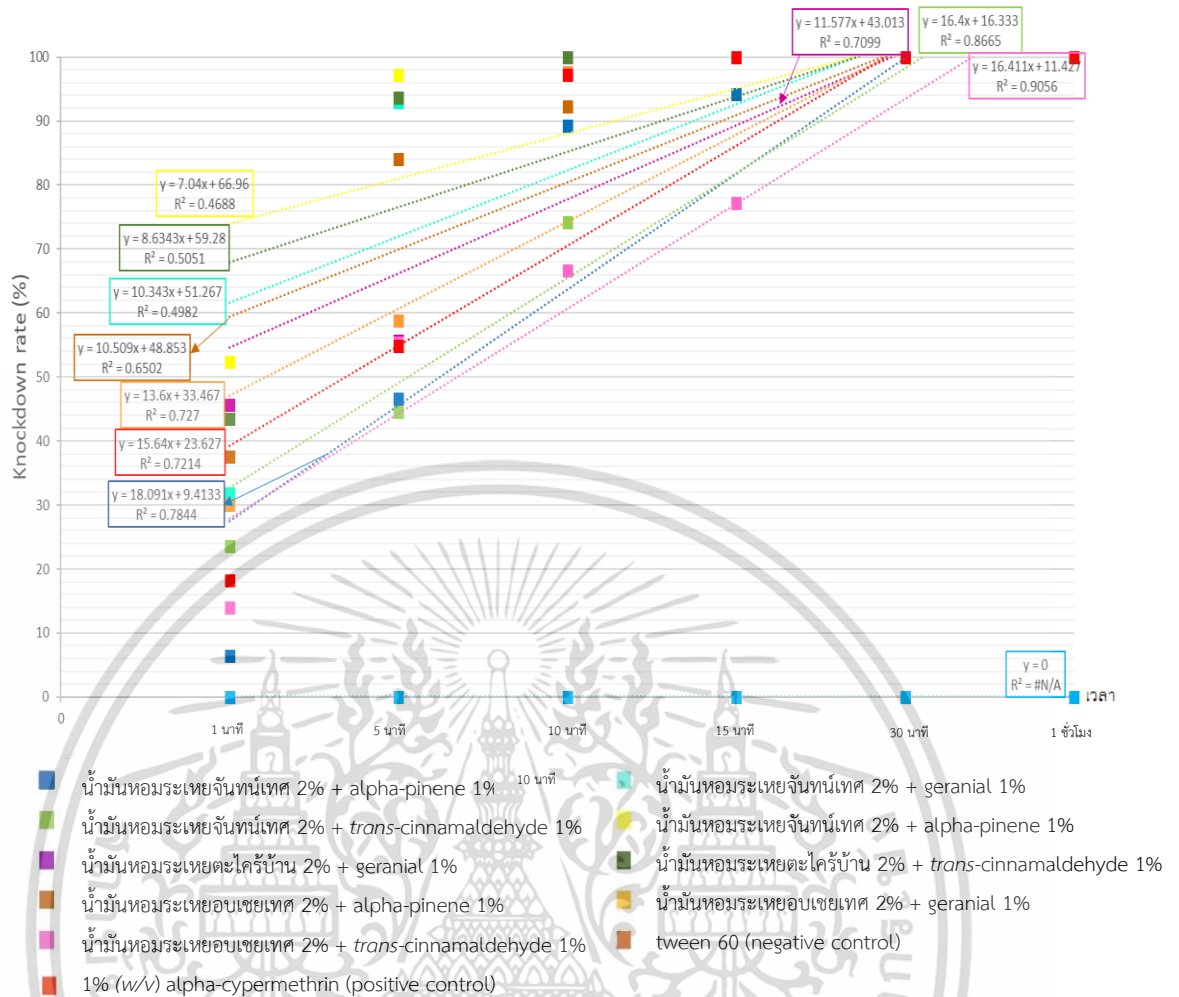
ชนิดของน้ำมันหอมระเหย	อัตราการตายเฉลี่ยของตัวเต็มวัย ยุงลายบ้าน (%) $\pm$ SD	LT <sub>50</sub> <sup>2/</sup> (นาที) (ต่ำสุด-สูงสุด)	ความเป็นพิษ <sup>3/</sup>
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%	100 $\pm$ 0 <sup>a1/</sup>	6.3 (6.0-6.7)	S
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geraniol 1%	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	2.3 (2.2-2.5)	S
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2%+ <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	6.0 (5.7-6.4)	S
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1%	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	1.6 (1.4-1.6)	S
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geraniol 1%	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	3.5 (3.2-3.8)	S
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	2.0 (1.9-2.2)	S
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2%+ alpha-pinene 1%	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	3.3 (2.8-3.8)	S
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geraniol 1%	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	4.0 (3.7-4.3)	S
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2%+ <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	7.8 (7.3-8.4)	S
tween 60 (negative control)	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	NA <sup>4/</sup>	R
1% (w/v) alpha-cypermethrin (positive control)	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	4.5 (4.2-4.8)	S

<sup>1/</sup>อัตราการตายเฉลี่ยของตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน

<sup>2/</sup> 50% Lethal Time (LT<sub>50</sub>) หมายถึง เวลาหลังการทดลองที่ทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้านตายลงไปครึ่งหนึ่ง (50%)

<sup>3/</sup>อัตราการตายระหว่าง 98-100% หมายถึง มีความเป็นพิษต่อสารเคมีในระดับสูง (S: Susceptible) อัตราการตายระหว่าง 80-97% หมายถึง มีความเป็นพิษต่อสารเคมีในระดับปานกลาง (PR: Possible Resistant) อัตราการตายต่ำกว่า 80% หมายถึง มีความเป็นพิษต่อสารเคมีในระดับต่ำหรือต่อต้านสารเคมี (R: Resistant)

<sup>4/</sup> Not Available (NA) หมายถึง ไม่สามารถวิเคราะห์ค่าทางสถิติได้



ภาพที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการสลบกับระยะเวลาของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อตัวเต็มวัยเพศเมียของลายบ้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการฟักไข่ของลายบ้าน

ผลการทดลองในตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.4 คือ ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการฟักไข่ของลายบ้าน ผลปรากฏว่าน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1% ให้ผลดีที่สุดในการทดลอง รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1% และน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1% ซึ่งผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการฟักไข่ในระดับรองลงมา หลังการทดลอง 48 ชั่วโมง พบว่า น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1% สามารถยับยั้งการฟักไข่ของลายบ้านได้ 81.3% รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1% และน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1% สามารถยับยั้งการฟักไข่ของลายบ้านได้ 79.0, 78.4, 73.4, 72.9, 67.5, 58.0, 56.7 และ 49% ตามลำดับ

สำหรับการทดลองเปรียบเทียบ 1% (w/w) temephos (positive control) สามารถยับยั้งการฟักไข่ได้ 20.9% ในขณะที่ tween 60 (negative control) ไม่สามารถยับยั้งการฟักไข่ได้ โดยไข่สามารถฟักไข่ได้ 100%

ตารางที่ 4.7 ผลของน้ำมันหอมระเหยของพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้าน หลังการทดลอง 48 ชั่วโมง

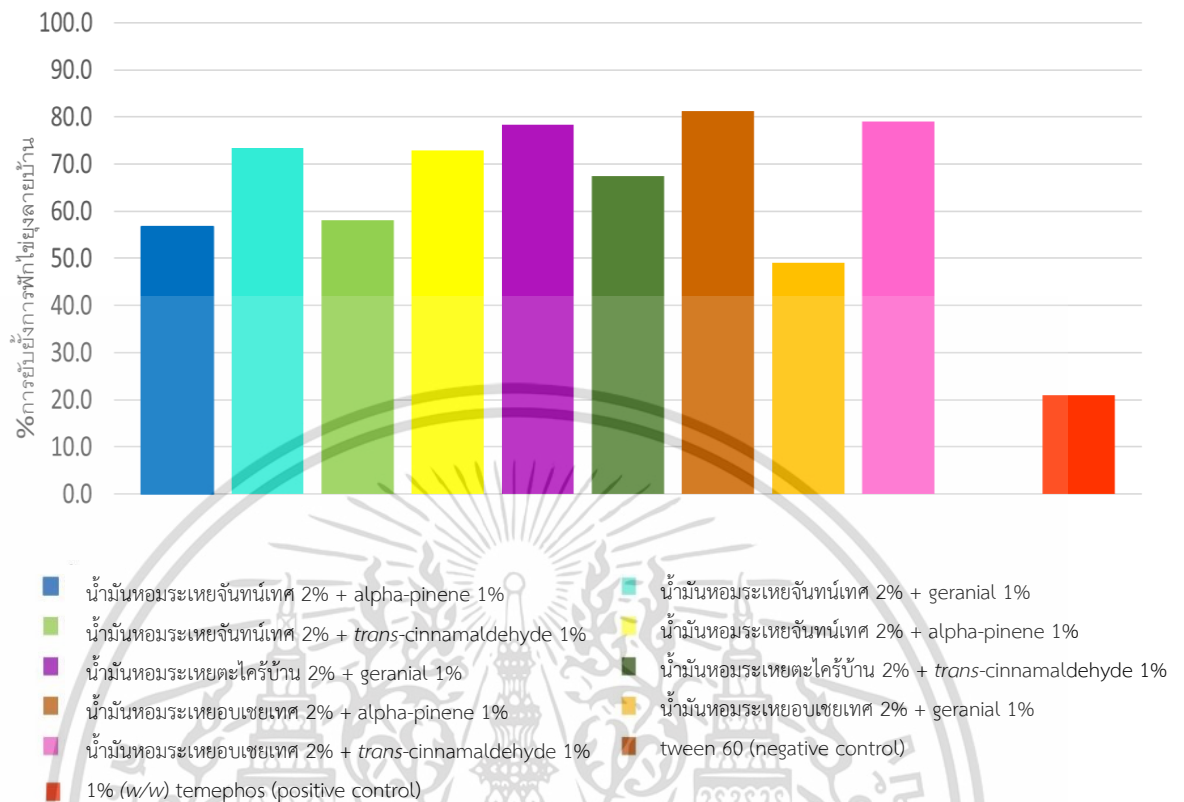
ชนิดของน้ำมันหอมระเหย	อัตราการยับยั้งการฟักไข่ (%) ± SD
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%	56.7±16.9 <sup>bc/</sup>
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%	73.4±16.3 <sup>a</sup>
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	58.0±15.8 <sup>bc</sup>
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1%	72.9±19.4 <sup>a</sup>
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%	78.4±23.4 <sup>a</sup>
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	67.5±14.2 <sup>ab</sup>
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2%+ alpha-pinene 1%	81.3±6.3 <sup>a</sup>
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1%	49.0±13.5 <sup>c</sup>
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	79.0±12.5 <sup>a</sup>
tween 60 (negative control)	0±0 <sup>e</sup>
1% (w/w) temephos (positive control)	20.9±13.6 <sup>d</sup>
df <sub>total</sub> , <i>F</i> -test	54 <sup>**</sup>
C.V. (%)	16.9 <sup>**</sup>

<sup>1/</sup> ตัวเลขค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธีการ DMRT

<sup>2/</sup> 50% Lethal Time (LT<sub>50</sub>) หมายถึง เวลาหลังการทดลองที่ทำให้ยุงลายบ้านไม่สามารถฟักได้

<sup>3/</sup> Not Available (NA) หมายถึง ไม่สามารถวิเคราะห์ค่าทางสถิติได้

\*\* แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 4.4 เเปอร์เซ็นต์อัตราการขับยุงการฟักไข่ของยุงลายบ้านของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก หลังการทดลอง 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการวางไข่ของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน

ผลการทดลองในตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.5 คือ ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการวางไข่ของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน หลังการทดลอง 3 วัน ผลปรากฏว่า น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% ให้ผลดีที่สุดในการทดลองสามารถไล่ไม่ให้ตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านมาวางไข่ได้ (% Effective Repellency: %ER) 99.0% และมีค่าจำนวนไข่เฉลี่ยต่อยุงลายบ้านเพศเมีย 1 ตัว ในถ้วยมีสาร เท่ากับ 1 ฟอง/ตัว รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1% และน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geraniol 1% โดยมีประสิทธิภาพในการไล่ไม่ให้ตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านมาวางไข่ เท่ากับ 98.5, 98.1, 98.0, 97.9, 96.8, 95.9, 93.9 และ 89.4% ตามลำดับ และมีค่าจำนวนไข่เฉลี่ยต่อยุงลายบ้านเพศเมีย 1 ตัว ในถ้วยมีสาร เท่ากับ 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.4, 2.0, 3.4 และ 3.4% ฟอง/ตัว ตามลำดับ รวมทั้งเมื่อเปรียบเทียบดัชนีชี้วัดการวางไข่ (Oviposition activity index: OAI) พบว่า น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geraniol 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geraniol 1% และ น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีค่าดัชนีชี้วัดการวางไข่ (OAI) เท่ากับ -1 รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% และ น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geraniol 1% มีค่า OAI เท่ากับ -0.9, -0.9, -0.9 และ -0.8 ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อนำผลการวางไข่ในถ้วยมีสารและถ้วยไม่มีสารมาทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีการ Paired sample *t*-test พบว่า จำนวนไข่ของยุงลายบ้านในถ้วยที่มีสารของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักทั้ง 9 สูตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กับถ้วยไม่มีสาร

สำหรับการทดลองเปรียบเทียบ 1% (w/w) temephos (positive control) พบว่า มีประสิทธิภาพในการดึงดูดตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมียให้มาวางไข่ (% Effective Attractavcy: %EA) เท่ากับ 33.4% และมีค่าจำนวนไข่เฉลี่ยต่อตัวเต็มวัยยุงลายบ้านเพศเมีย 1 ตัว ในถ้วยมีสาร เท่ากับ 89.5 ฟอง/ตัว รวมทั้งเมื่อเปรียบเทียบดัชนีชี้วัดการวางไข่ (OAI) เท่ากับ 0.2

ตารางที่ 4.8 ผลของน้ำมันหอมระเหยของพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการวางไข่ของตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้าน หลังการทดลอง 3 วัน

ชนิดของน้ำมันหอมระเหย	จำนวนไข่ $\pm$ SD (ฟอง/ถ้วย) <sup>1/</sup>		OAI <sup>2/</sup>	%ER <sup>3/</sup>	%EA <sup>4/</sup>	จำนวนไข่เฉลี่ยต่อ ยุงลายบ้านเพศ เมีย 1 ตัว ในถ้วย ที่มีสาร (ฟอง) <sup>5/</sup>	P-value
	ถ้วยมีสาร	ถ้วยไม่มีสาร					
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%	50.8 $\pm$ 2.8*	840.3 $\pm$ 140.1	-0.9	93.9	-	3.4	0.001
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geraniol 1%	67.0 $\pm$ 11.3*	632.8 $\pm$ 73.1	-0.8	89.4	-	4.5	0.000
น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	18.8 $\pm$ 4.6*	590.3 $\pm$ 159.1	-0.9	96.8	-	1.4	0.005
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1%	30.5 $\pm$ 5.3*	756.5 $\pm$ 126.4	-0.9	95.9	-	2.0	0.001
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geraniol 1%	19.0 $\pm$ 7.5*	1247.0 $\pm$ 204.8	-1.0	98.5	-	1.1	0.001
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	17.0 $\pm$ 6.3*	841.8 $\pm$ 117.8	-1.0	98.0	-	1.3	0.010
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%	21.5 $\pm$ 7.1*	1007.0 $\pm$ 72.2	-1.0	97.9	-	1.4	0.000
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geraniol 1%	18.0 $\pm$ 2.9*	943.5 $\pm$ 436.9	-1.0	98.1	-	1.2	0.000
น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + <i>trans</i> -cinnamaldehyde 1%	12.5 $\pm$ 2.4*	999.5 $\pm$ 436.9	-1.0	99.0	-	0.8	0.023
tween 60 (negative control)	451.8 $\pm$ 24.2	720.0 $\pm$ 229.5	-0.7	80.9	-	30.1	0.078
1% (w/w) temephos (positive control)	1343.0 $\pm$ 221.9	894.0 $\pm$ 211.1	0.2		33.4	89.5	0.019

<sup>1/</sup> ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

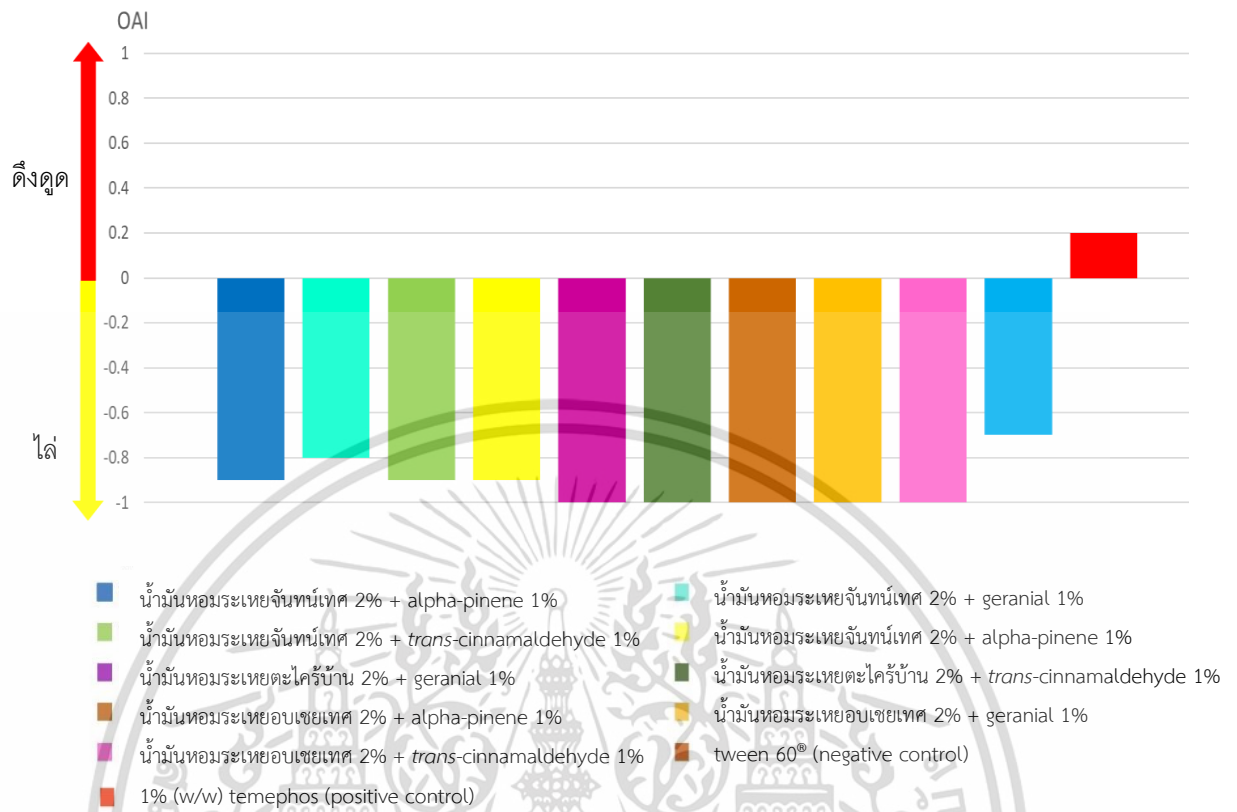
<sup>2/</sup> ดัชนีการวางไข่ (Oviposition Activity Index: OAI)

<sup>3/</sup> ประสิทธิภาพในการไล่ (Effective Repellent: ER%)

<sup>4/</sup> ประสิทธิภาพในการดึงดูด (Effective Attractancy: EA%)

<sup>5/</sup> จำนวนไข่เฉลี่ยต่อยุงลายบ้านเพศเมีย 1 ตัวในถ้วยสาร

\* ค่าเฉลี่ยระหว่างการทดลอง (ถ้วยมีสาร) และการทดลองเปรียบเทียบ (ถ้วยไม่มีสาร) ที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95% โดยวิธีการ paired t-Test ( $P < 0.05$ )



ภาพที่ 4.5 คุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการดึงดูดและไล่ตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงลายบ้านในการวางไข่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลักที่ได้จาก น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.) ตะไคร้บ้าน (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) อบเชยเทศ (*Cinnamomum verum* J. Presl.) และสารองค์ประกอบหลักได้แก่ alpha-pinene, geranial และ *trans*-cinnamaldehyde ในอัตราส่วนดังนี้ น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2%+ *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2%+ alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1% และ น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% ต่อการกำจัดลูกน้ำวัย 4 ตัวโม่ ตัวเต็มวัย การยับยั้งการฟักไข่ และการยับยั้งการวางไข่ของ ยุงลายบ้าน ทำให้ทราบว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชที่ผสมกับสารองค์ประกอบหลักในอัตราส่วนต่าง ๆ มีคุณสมบัติที่ดีต่อการป้องกันและกำจัดยุงลายบ้าน รวมทั้งให้ผลดีมากกว่าการใช้สารกำจัดยุงลายบ้าน จากสารเคมีสังเคราะห์ ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้แบ่งออกเป็นประเด็นต่าง ๆ ดังนี้

#### 5.1 การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการป้องกันกำจัดลูกน้ำวัย 4 และศึกษาความเป็นพิษต่อสัณฐานและสรีรวิทยาของยุงลายบ้าน

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการกำจัดลูกน้ำวัย 4 โดยมีผลต่อความผิดปกติด้านสัณฐานและสรีรวิทยาของลูกน้ำยุงลายบ้าน พบว่าการผสมกันระหว่างน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% มีประสิทธิภาพดีที่สุด ทำให้ลูกน้ำวัย 4 ตาย 100% หลังการทดลอง 24 ชั่วโมง และมีค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 1.4 ชั่วโมง ในขณะที่ 1% (w/w) temephos มีผลทำให้ลูกน้ำวัย 4 ยุงลายบ้านตาย 93.8% และมีค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 9.8 ชั่วโมง จากผลการศึกษาครั้งนี้ใกล้เคียงกับรายงานของ Jyoti *et al.* (2019) ที่รายงานว่าเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยอบเชยลังกา (*C. zeylanicum*) ผสมกับน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน อัตราส่วน 1:1 มีความเป็นพิษสูง ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการกำจัดตัวอ่อนของเห็บโค (*R. (B.) microplus*) โดยมีค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ 0.113% ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศชนิดเดียวให้ผลในการกำจัดลูกน้ำยุงกันปล่อง (*An. stephensi*) ได้ดีแต่มีค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ 37 ppm (Firoozian *et al.*, 2021) และการศึกษาของ Pavela (2015) รายงานว่าการผสมกันของสาร eugenol กับสาร cinnamaldehyde และสาร 1,8-cineol กับสาร cinnamaldehyde ให้ผลเสริมฤทธิ์กัน โดยทำให้ออกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูกน้ำยุงรำคาญ (*Cx. quinquefasciatus*) ตาย 20.0 และ 38.5% ตามลำดับ ในขณะที่สาร cinnamaldehyde และสาร 1,8-cineol มีผลทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย 6.5 และ 0.4% ตามลำดับ รวมทั้งรายงานการศึกษาของ Andrade-Ochoa *et al.* (2018) ที่พบว่าการผสมกันระหว่างสาร cinnamaldehyde กับสาร thymol, สาร cinnamaldehyde กับสาร limonene, และสาร cinnamaldehyde กับสาร *trans*-anethole อัตราส่วน 1:1 มีความเป็นพิษสูง ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการกำจัดลูกน้ำของยุงรำคาญ (*Cx. quinquefasciatus*) ทำให้ลูกน้ำตาย 42.7-60.2% ในขณะที่สาร cinnamaldehyde ชนิดเดียวมีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญได้ 8.3% และมีค่า LC<sub>50</sub> เท่ากับ 18.4 µg/mL ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาความผิดปกติด้านสัณฐานและสรีรวิทยาในการพัฒนาของลูกน้ำไปเป็นตัวเต็มวัยพบว่า น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% ส่งผลให้ลูกน้ำตายแบบ Normal Larvae (NL) ลูกน้ำยุงลายบ้านจะตายปกติ ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยา เท่ากับ 100% โดยทางเดินอาหารของลูกน้ำยุงลายบ้านมีลักษณะปกติ ไม่มีสีดำแต่บริเวณผนังลำตัวมีรอยไหม้สีดำ กล่าวคือเมื่อลูกน้ำยุงลายบ้านสัมผัสกับน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans*-cinnamaldehyde 1% ลูกน้ำยุงจะมีอาการดิ้นและเคลื่อนที่ลงสู่พื้นผิวด้านล่างของถ้วยทดสอบทันที โดยมีอาการเคลื่อนไหวบิดตัวไปมาและชักกระตุกอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเวลาผ่านไปครบ 6 ชั่วโมง การเคลื่อนไหวตัวของลูกน้ำจะช้าลงและตายในที่สุด ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้ใกล้เคียงกับรายงานการศึกษาของ Soonwera *et al.* (2022a) ที่รายงานว่า การผสมกันของน้ำมันหอมระเหยโป๊ยกั๊ก (*I. verum*) 2.5% กับสาร *trans*-anethole 2.5% มีความเป็นพิษสูงต่อลูกน้ำยุงลายบ้าน เมื่อลูกน้ำได้สัมผัสกับสารจะทำให้ตายทันทีแบบ NL โดยบริเวณผนังลำตัวมีลักษณะบวมและเกิดการเปลี่ยนแปลงของเมดสีบริเวณรอบ ๆ ลำตัวของลูกน้ำ และบริเวณท่อหายใจ (siphon) มีจุดสีน้ำตาลลักษณะเป็นรอยไหม้ ทำให้ไม่สามารถแลกเปลี่ยนก๊าซและออกซิเจนเหนือผิวน้ำได้ รวมทั้งบริเวณ papillae เกิดอาการบวม ส่งผลต่อขบวนการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจนของลูกน้ำเมื่ออยู่ใต้ผิวน้ำ ทำให้ลูกน้ำเสียชีวิตในการว่ายน้ำ และตายในที่สุด ซึ่งการศึกษาของ Pavela and Benelli (2016) และ Nakasen *et al.* (2021) พบว่าน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศจะซึมเข้าทางผนังเซลล์ เข้าไปรบกวนการไหลเวียนของของเหลวภายในลำตัวลูกน้ำยุง และมีความเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหารของแมลง ทำให้เกิดการอุดตัน ส่งผลให้บริเวณผนังลำตัว ออก และระบบทางเดินหายใจมีสีดำ เนื่องจากการเกิดความผิดปกติของเมดสีที่เกิดจากการยับยั้งการสังเคราะห์ไคติน โดยกลไกนี้จะส่งผลให้ลูกน้ำมีลักษณะที่ผิดปกติทางสัณฐานและสรีรวิทยาทำให้เกิดรอยเหี่ยวยุบ บวม และเกิดแผลบนผนังลำตัว รวมไปถึงส่งผลให้ชั้นไขมันและโปรตีนในชั้นผนังเซลล์เกิดภาวะเซลล์แตก จนเป็นสาเหตุทำให้ลูกน้ำตาย นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศมีฤทธิ์ทำลายระบบประสาทของแมลง โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholine esterase (AChE) และ butyrylcholinesterase (BChE)

ซึ่งเอนไซม์ AChE มีหน้าที่ในการย่อยสารสื่อประสาทของ Acetylcholine : ACh และ BChE ทำเอกลสารนี้เป็นเอกลสารที่สว่นไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกลสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้าที่ในการกำจัดสารพิษและกำจัด ACh เมื่อเอนไซม์ AChE และ BChE ทำงานไม่ได้จึงทำให้เกิดการสะสมของสารสื่อประสาท และเมื่อมีการสะสมของสารสื่อประสาทมาก ๆ จะทำให้เซลล์ประสาทของแมลงมีการสื่อสารตลอดเวลาไม่หยุดพัก จึงทำให้ระบบประสาทเสียหาย แมลงอ่อนล้า และตายในที่สุด (มยุรา สุนย์วีระ, 2560) ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ + *trans*-cinnamaldehyde มีแนวโน้มที่ดีในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านได้

## 5.2 การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการป้องกันกำจัดตัวมด และศึกษาความเป็นพิษต่อสัณฐานและสรีรวิทยาของยุงลายบ้าน

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการกำจัดตัวมด โดยมีผลต่อความผิดปกติด้านสัณฐานและสรีรวิทยาของตัวมดยุงลายบ้าน พบว่า น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีประสิทธิภาพดีที่สุด ทำให้ตัวมดตาย 100% หลังการทดลอง 48 ชั่วโมง และมีค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 2.3 ชั่วโมง ในขณะที่ 1% (w/w) temephos ไม่มีผลทำให้ตัวมดยุงลายบ้านตายตลอดระยะเวลาในการทดลอง จากผลการศึกษานี้ใกล้เคียงกับรายงานการศึกษาของ Pavela (2015) ที่รายงานว่า การผสมกันระหว่างสาร alpha-pinene กับสาร menthone อัตราส่วน 1:1 ให้ผลเสริมฤทธิ์กัน มีความเป็นพิษสูงทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญ (*Cx. quinquefasciatus*) ตาย 100% ในขณะที่สาร alpha-pinene มีผลทำให้ลูกน้ำตายเพียง 20.5% และรายงานของ Tak et al. (2017) พบว่าการผสมกันของสาร citral (geranial) ที่ได้จาก น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน กับสาร limonene (อัตราส่วน 50:50) ให้ผลเสริมฤทธิ์ในการกำจัด หนอนผีเสื้อหนอนกะหล่ำ (*Trichoplusia ni*) โดยมีค่า  $LD_{50}$  เท่ากับ 115.0  $\mu\text{g}$ /ตัว ขณะที่สาร citral และสาร limonene แต่ละชนิดมีค่า  $LD_{50}$  เท่ากับ 135.9 และ 233.8  $\mu\text{g}$ /ตัว ตามลำดับ สำหรับความผิดปกติด้านสัณฐานและสรีรวิทยาในการพัฒนาของตัวมดไปเป็นตัวเต็มวัย พบว่า น้ำมันหอมระเหย ตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% ส่งผลให้ตัวมดตายแบบ Deformed Pupa (DP) ตัวมดยุงลายบ้านจะตายแบบผิดปกติ ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาของตัวมด เท่ากับ 100% โดยบริเวณส่วนหัวของตัวมดมีลักษณะขยายใหญ่คล้ายหัวช้าง และบริเวณส่วนหัวและลำตัวมีรอยไหม้และบวม กล่าวคือเมื่อตัวมดยุงลายบ้านสัมผัสกับน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% ตัวมดจะมีอาการตื่นและเคลื่อนที่ตลอดเวลา โดยไม่ค่อยเกาะพักนั่งบริเวณเหนือผิวน้ำ เมื่อเวลาผ่านไปครบ 24 ชั่วโมง ตัวมดจะเคลื่อนไหวช้าลงและตายในที่สุด ผลการศึกษานี้ใกล้เคียงกับรายงานของ Soonwera et al. (2022a) ที่รายงานว่า การผสมกันของน้ำมันหอมระเหยเป็ยก็๊ก 2.5% กับ *trans*-anethole 2.5% มีความเป็นพิษสูงต่อตัวมดยุงลายบ้าน ส่งผลทำให้ตัวมดตายแบบ DP มากที่สุด โดยบริเวณส่วนหัว ลำตัว และท่อหายใจ (respiratory trumpets) ทั้ง 2 ข้าง เกิดรอยไหม้และบวม ทั้งนี้การตายของตัวมดยุงลายบ้านอาจเป็นเพราะน้ำมันหอมระเหยจากพืชและสารองค์ประกอบหลัก จะเข้าไปรบกวนกระบวนการทำงานของต่อมไร้ท่อที่ควบคุมระบบเมทาบอลิซึมของแมลง ส่งผลให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฮอร์โมนควบคุมการเจริญเติบโต (Juvenile hormone) ทำงานผิดปกติ ขัดขวางขบวนการลอกคราบ และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากตัวโม่งไปเป็นตัวเต็มวัยได้ตามปกติ (มยุรา สุณย์วีระ, 2560; อักษร จันทร์เทวี, 2563; Soonwera and Phasomkusosil, 2016) เพราะน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน และสารองค์ประกอบหลัก geranial มีความเป็นพิษต่อระบบทางเดินหายใจของแมลง ส่งผลทำให้ท่อหายใจ (respiratory trumpets) ทั้ง 2 ข้าง เกิดรอยไหม้และบวม รวมทั้งมีผลต่อระบบกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อผนังลำตัวของยุง (Soonwera and Sittichok, 2020) ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน + alpha-pinene มีแนวโน้มที่ดีในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์กำจัดตัวโม่งยุงลายบ้านได้

### 5.3 การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการสลบและการตายของตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้าน

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการสลบและการตายของตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้าน พบว่า น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีประสิทธิภาพดีที่สุดใน ทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้านสลบและตาย 100% โดยมีค่า  $KT_{50}$  และ  $LT_{50}$  เท่ากับ 1.6 นาที เมื่อนำอัตราการตายไปเปรียบเทียบกับอัตราการเกิดพิษตามแนวทางองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, 2018) พบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีความเป็นพิษต่อตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้านในระดับสูง (S, Susceptible) ในขณะที่ 1% (w/v) alpha-cypermethrin มีผลทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้านสลบและตาย 97.2 และ 100% แต่มีค่า  $KT_{50}$  และค่า  $LT_{50}$  มากกว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบคือ ค่า  $KT_{50}$  เท่ากับ 4.48 นาที และค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 4.5 นาที ตามลำดับ และมีความเป็นพิษต่อตัวเต็มวัยยุงลายบ้านในระดับสูง (S, Susceptible) เช่นเดียวกัน ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Soonwera and Sittichok (2020) ที่รายงานว่า การผสมกันระหว่างน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 5% กับน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส (*E. globulus*) 5% ให้ผลเสริมฤทธิ์กันมีพิษสูงต่อตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้านและยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) ทำให้ยุงทั้ง 2 ชนิดสลบและตาย 100% โดยมีค่า  $KT_{50}$  เท่ากับ 0.3 และ 0.5 นาที ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน มีผลทำให้ยุงทั้ง 2 ชนิดสลบและตาย 85.6-87.3% และมีค่า  $KT_{50}$  ระหว่าง 28.5-30.2% ตามลำดับ และการศึกษาของ Soonwera et al. (2024) รายงานว่าการผสมกันของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 1% + สาร trans-anethole 1% และสาร geranial 1% + สาร trans-anethole 1% ให้ผลเสริมฤทธิ์กันมีพิษสูงต่อตัวเต็มวัยแมลงวันบ้าน (*M. domestica*) ทำให้ตัวเต็มวัยสลบและตาย 100% โดยมีค่า  $KT_{50}$  เท่ากับ 3.2 นาที และมีค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 0.07 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2.5%, สาร trans-anethole 1% และสาร geranial 1% ชนิดเดียว มีความเป็นพิษต่อตัวเต็มวัยแมลงวันบ้านน้อยกว่าสารผสมกัน 2 ชนิด โดยมีค่า  $KT_{50}$  เท่ากับ 101.6, 59.2 และ 8.4 นาที ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า

ว่าการผสมกันของน้ำมันหอมระเหยไผ่ยักษ์ 0.5% + สาร geranial 0.5% และสาร alpha-pinene 0.5% เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

+ สาร geranial 0.5% ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการกำจัดตัวเต็มวัยแมลงวันบ้าน โดยมีค่า  $KT_{50}$  เท่ากับ 4.0 และ 6.1 นาที ตามลำดับ ส่วนสาร alpha-pinene ที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ ไม่มีผลทำให้ตัวเต็มวัยแมลงวันบ้านสลบตลอดระยะเวลาในการทดลอง สำหรับสาร geranial ที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน มีผลทำให้ตัวเต็มวัยสลบ ซึ่งมีค่า  $KT_{50}$  เท่ากับ 6.5 นาที (Aungtikun *et al.*, 2021) รวมทั้งรายงานของ Balboné *et al.* (2022) ที่พบว่าการผสมกันของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอม (*C. nardus*) กับน้ำมันหอมระเหยแมงลัก (*O. americanum*) อัตราส่วน 90:10 ให้ผลเสริมฤทธิ์กัน สามารถกำจัดตัวเต็มวัยยุงก้นปล่อง (*An. gambiae*) ได้ 100% โดยมีค่า  $KDT_{50}$  น้อยกว่า 1% รวมทั้งมีค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ 0.22% ส่วนน้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอม 1% มีผลทำให้ตัวเต็มวัยยุงก้นปล่องตายได้เพียง 35.29% และมีค่า  $KDT_{50}$  เท่ากับ 60.19 นาที ทั้งนี้ผลการสลบและตายของตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน อาจเนื่องจากตัวเต็มวัยยุงลายบ้านมีการสัมผัสโดยตรงกับน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากพืชและสารองค์ประกอบหลักมีฤทธิ์ในการขัดขวางการทำงานของระบบต่าง ๆ ภายในลำตัวของแมลง โดยน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน และสาร alpha-pinene ที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ มีความเป็นพิษต่อหมวดของตัวเต็มวัยแมลงวันบ้าน ทำลายระบบทางเดินหายใจ และระบบประสาทรับสัมผัส เช่น กลิ่น รวมทั้งมีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อผนังลำตัวของตัวเต็มวัยแมลงวันบ้าน ในขณะที่สารองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน คือ geranial มีความเป็นพิษต่อระบบประสาทของยุงลายบ้าน และแมลงวันบ้าน (Soonwera and Sittichok, 2020) โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BChE ที่ทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทของแมลง (Aungtikun *et al.*, 2021; Soonwera *et al.*, 2024; Manh *et al.*, 2020) ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน + alpha-pinene มีแนวโน้มที่ดีในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์กำจัดตัวเต็มวัยยุงลายบ้านได้

#### 5.4 การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้าน

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้าน พบว่าน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1% ให้ผลดีที่สุด สามารถยับยั้งการฟักไข่ได้ 81.3% หลังการทดลอง 48 ชั่วโมง ในขณะที่ 1% (w/w) temephos สามารถยับยั้งการฟักไข่ของยุงลายบ้านได้เพียง 20% จากผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Mounghthipmalai *et al.* (2023) ที่รายงานว่า การผสมกันของน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1% และสาร geranial 1.5% + *trans*-cinnamaldehyde 1.5% ความเข้มข้น 10,000 ppm ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการฟักไข่ได้ 100% หลังการทดลอง 48 ชั่วโมง และมีค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 17.7 และ 20.4 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ และสาร *trans*-cinnamaldehyde ความเข้มข้น 30,000 ppm สามารถยับยั้งการฟักไข่ได้ 91.0 และ 96.7% ตามลำดับ รวมทั้งรายงานการศึกษาของ Soonwera *et al.* (2022b) พบว่าเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผสมกันระหว่างน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 5% + น้ำมันหอมระเหยโป๊ยกั๊ก 5% ในน้ำมันถั่วเหลือง สามารถยับยั้งการฟักไข่ของแมลงสาบอเมริกัน (*Periplaneta americana*) ได้ 99.3% หลังการทดลอง 30 วัน สาเหตุการตายของไข่ยุงลายบ้านในครั้งนี้ เนื่องจากลักษณะทั่วไปของเปลือกไข่จะเป็นแบบไม่ชอบน้ำ (lipophilic) เมื่อไข่ยุงลายบ้านสัมผัสกับน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1% แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า บริเวณภายนอกของเปลือกไข่ถูกเคลือบด้วยสารทดสอบเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ ซึ่งปิดกั้นรูหายใจ (aeropyles) ที่อยู่บริเวณรอบ ๆ บนผิวเปลือกไข่ ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซและออกซิเจนของตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่ เมื่อตัวอ่อนไม่สามารถแลกเปลี่ยนก๊าซและออกซิเจนได้ ทำให้ตัวอ่อนตายอยู่ภายในไข่ (Nakasen *et al.*, 2021; Mounghthipmalai *et al.*, 2023) ซึ่งมีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ และสาร *trans-cinnamaldehyde* มีความเป็นพิษต่อระบบหายใจของแมลง โดยลดการทำงานของ ATPase ในเยื่อหุ้มเซลล์ของตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่ รวมทั้งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cytokines และทำให้ฮอร์โมนควบคุมการเจริญเติบโต (juvenile hormone) ทำงานผิดปกติ (Mounghthipmalai *et al.*, 2023) ในขณะที่สาร alpha-pinene มีความเป็นพิษต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ของยุง (Aungtikun *et al.*, 2021) ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ + alpha-pinene มีแนวโน้มที่ดีในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์กำจัดไข่ยุงลายบ้านได้

### 5.5 การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการวางไข่ยุงลายบ้าน

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ต่อการยับยั้งการวางไข่ของยุงลายบ้าน พบว่าน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1% ให้ผลดีที่สุด มีประสิทธิภาพในการไล่ไม่ให้ตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้านมาวางไข่ได้ 99% และมีค่าดัชนีชี้วัดการวางไข่ (OAI) เท่ากับ -1 ในขณะที่ 1% (w/w) temephos พบว่ามีประสิทธิภาพในการดึงดูดให้ตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้านมาวางไข่ 33.4% และมีค่า OAI เท่ากับ 0.2 จากผลการศึกษาในครั้งนี้ใกล้เคียงกับ Mounghthipmalai *et al.* (2023) ที่พบว่าการผสมกันระหว่างน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ กับสาร geranial (อัตราส่วน 2:1) ความเข้มข้น 10,000 ppm มีความเป็นพิษสูงต่อไข่ของยุงลายบ้าน โดยสามารถยับยั้งการฟักไข่ได้ 100% ซึ่งมีค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 16.9 ชั่วโมง และมีค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ 2,303.5 ppm รวมทั้งรายงานการศึกษาของ Farag *et al.* (2024) ที่รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ ความเข้มข้น 6% มีประสิทธิภาพดีในการไล่ไม่ให้ตัวเต็มวัยเพศเมียยุงรำคาญมาวางไข่ได้ดี มีค่า OAI เท่ากับ -0.92 หลังการทดลอง 5 วัน ทั้งนี้ผลในการไล่ไม่ให้ตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้านมาวางไข่ได้ เนื่องจากไอระเหยของน้ำมันหอมระเหยแพร่กระจายไปสัมผัสกับอวัยวะรับสัมผัส (palp) ทำให้เซลล์ประสาทของอวัยวะส่วนนี้ส่งความรู้สึกไปยังปลายประสาทของระบบประสาท ทำให้

ยุงลายบ้านมีพฤติกรรมเคลื่อนที่หนีกลิ่นของน้ำมันหอมระเหย เพราะเกิดความระคายเคืองทำให้อวัยวะรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัมผัสของยุงลายบ้านทำงานผิดปกติ จากรายงานของ Soonwera *et al.* (2022b) พบว่า ไอระเหยของน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ และสาร *trans-cinnamaldehyde* มีความเป็นพิษสูงต่อระบบทางเดินหายใจของแมลงสาบ ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ + *trans-cinnamaldehyde* มีแนวโน้มที่ดีในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยับยั้งการวางไข่ยุงลายบ้านได้

ปัจจุบันการป้องกันและกำจัดยุงลายบ้านนิยมใช้สารเคมีสังเคราะห์เพราะสามารถลดจำนวนประชากรของยุงลายบ้านลงได้อย่างรวดเร็ว แต่จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ให้ผลในการป้องกันและกำจัดยุงลายบ้านได้ดีกว่าสารเคมีสังเคราะห์ (temephos และ alpha-cypermethrin) ในทุกระยะของวงจรชีวิต บ่งชี้ว่ายุงลายบ้านมีความต้านทานต่อสารเคมีสังเคราะห์ เนื่องจากการใช้สารเคมีสังเคราะห์ป้องกันและกำจัดยุงลายบ้านในปริมาณที่มากเกินไปกว่ากำหนด ซึ่งการศึกษานี้ไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาของ Melo-Santosa *et al.* (2010) และ Naqqassh *et al.* (2016) ที่รายงานว่าปัจจุบันยุงลายบ้านมีความต้านทานต่อ temephos เพิ่มมากขึ้น โดยมีค่าอัตราการต้านทาน ( $RR_{50}$ ) มากกว่า 200 เท่า และรายงานการศึกษาของ Shafiq *et al.* (2023) พบว่ายุงลายบ้านมีความต้านทานต่อ alpha-cypermethrin เพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีค่า  $RR_{50}$  ระหว่าง 10 ถึง 100 เท่า นอกจากนี้สารเคมีสังเคราะห์เหล่านี้มีผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ใช้งาน และสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมาย ซึ่งสาร temephos มีความเป็นพิษต่อระบบประสาทของมนุษย์ก่อให้เกิดโรคสมาธิสั้น (Attention Deficit Hyperactivity Disorder: ADHD) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's Disease) และ โรคจิตเภท (Schizophrenia) (Bisset *et al.* 2020) รวมทั้งมีความเป็นพิษต่อดิน และสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำ โดยมีค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ 298.7-526.7 ppm ต่อปลาสด (*Poecilia latipinna*) และปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) (Soonwera *et al.*, 2022a; Mounghthipmalai *et al.*, 2023) สำหรับสาร alpha-cypermethrin มีความเป็นพิษสูงต่อระบบทางเดินหายใจ ระบบประสาท และระบบสืบพันธุ์ของมนุษย์ โดยเฉพาะระบบภูมิคุ้มกันในเด็ก ถ้ามีการสัมผัสกับสาร alpha-cypermethrin เป็นระยะเวลานานจะส่งผลทำให้ผิวหนังเกิดการระคายเคือง และแสบร้อนได้ รวมทั้งมีความเป็นพิษสูงต่อสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมายที่อาศัยอยู่ในดิน เช่น ไส้เดือน ซึ่งมีค่าความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงด้วยนม (50% Lethal Dose)  $LD_{50}$  เท่ากับ 247  $mg\ kg^{-1}$  ทางปากของหนูเพศผู้ และ 309  $mg\ kg^{-1}$  ทางปากของหนูเพศเมีย (Soonwera and Sittichok, 2020) ในทางตรงกันข้ามน้ำมันหอมระเหยจากพืชและสารองค์ประกอบหลักเป็นสารเคมีอินทรีย์ที่พืชผลิตขึ้นได้เองตามธรรมชาติ มีองค์ประกอบของสารเคมีที่สลับซับซ้อนและแตกต่างกันออกไป จึงให้ผลดีในการกำจัดยุงลายบ้านในแต่ละระยะของวงจรชีวิตที่ดีแตกต่างกัน และไม่มีรายงานว่าแมลงเกิดความต้านทานต่อน้ำมันหอมระเหยจากพืช (Pavela and Benelli, 2016) ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากพืชและสารองค์ประกอบหลัก ก่อให้เกิดพิษต่อแมลงจากการกิน สัมผัส หรือไอระเหย มีฤทธิ์ทำลายระบบทางเดินอาหาร กระบวนการหายใจ ยับยั้งกระบวนการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการ

เจริญเติบโต และขับไล่แมลง (Aungtikun *et al.*, 2021; Pavela and Benelli, 2016; Soonwera เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*et al.*, 2024) แต่ไม่มีพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมาย และมนุษย์ จึงปลอดภัยต่อผู้ใช้งาน โดยมีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้านไม่เป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยมีค่า LD<sub>50</sub> เท่ากับ 2,000-7,046 mg kg<sup>-1</sup> ทางปากของหนู (Soonwera and Sittichok, 2020) สารองค์ประกอบหลัก geraniol ที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน ไม่เป็นพิษต่อมวนพิฆาต (*Podisus nigrispinus*) โดยมีค่า LD<sub>50</sub> เท่ากับ 25.56 µg/ตัวแมลง (Brügger *et al.*, 2019) น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศมีความปลอดภัยกับมนุษย์ มีค่า LD<sub>50</sub> มากกว่า 5,000 mg/kg ของน้ำหนักตัวมนุษย์เมื่อรับประทานอบเชยเทศ (Muhammad *et al.*, 2017) และไม่เป็นพิษต่อผึ้งโพรง (*Apis mellifera*) (Hýbl *et al.*, 2021) สารองค์ประกอบหลัก *trans*-cinnamaldehyde ที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศไม่เป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีค่า LD<sub>50</sub> เท่ากับ 2.22 g/kg ทางปากของหนู (Voedingsmiddelen Dierenvoerders en Andere Consumptieproducten, 2020) และสารองค์ประกอบหลัก alpha-pinene ที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ มีค่า LD<sub>50</sub> เท่ากับ 4,716 mg/kg ทางปากของหนู (Agilent, 2019) นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยจากพืชและสารองค์ประกอบหลักมีกลิ่นหอม ซึ่งนิยมนำมาใช้เป็นส่วนประกอบหลักของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์ และอาหาร อีกทั้งยังมีสรรพคุณในการรักษาโรค และอาการต่าง ๆ เช่น ต้านเชื้อรา ต้านการอักเสบ และมีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง (Soonwera and Sittichok, 2020)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการนำน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้บ้าน และ อบเชยเทศ มาผสมกับสารองค์ประกอบหลักมีศักยภาพและประสิทธิภาพในการกำจัดยุงลายบ้าน จึงเหมาะสมที่จะมีการวิจัยและพัฒนาต่อยอดให้เป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการกำจัดไข่ ลูกน้ำ ตัวโม่ง และตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน ทั้งนี้เพื่อเป็นการพัฒนาและส่งเสริมการใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชในการป้องกันและกำจัดยุงลายบ้านเพราะมีความปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

## บทที่ 6

### สรุปผลการวิจัย

#### 6.1 สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผสมกับสารองค์ประกอบหลัก ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยจันทน์เทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + geranial 1%, น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1%, น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + geranial 1% และน้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1% ต่อการตายของลูกน้ำวัย 4 ตัวโม่ ตัวเต็มวัย การยับยั้งการฟักไข่ และการยับยั้งการวางไข่ของยุงลายบ้าน สามารถสรุปผลการศึกษาได้ดังนี้

6.1.1 น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + *trans-cinnamaldehyde* 1% มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดลูกน้ำวัย 4 ยุงลายบ้านได้ 100% หลังการทดลอง 6 ชั่วโมง ในขณะที่ 1% (w/w) temephos สามารถกำจัดลูกน้ำวัย 4 ยุงลายบ้านได้ 93.8% หลังการทดลอง 24 ชั่วโมง

6.1.2 น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดตัวโม่ยุงลายบ้านได้ 100% หลังการทดลอง 24 ชั่วโมง ในขณะที่ 1% (w/w) temephos ไม่สามารถกำจัดตัวโม่ยุงลายบ้านได้ (อัตราการตาย 0%)

6.1.3 น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน 2% + alpha-pinene 1% มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน ทำให้ตัวเต็มวัยสลบและตาย 100% หลังการทดลอง 10 นาที ในขณะที่ 1% (w/v) alpha-cypermethrin สามารถกำจัดตัวเต็มวัยยุงลายบ้านได้ 100% หลังการทดลอง 15 นาที

6.1.4 น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2% + alpha-pinene 1% มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการฟักไข่ยุงลายบ้าน สามารถยับยั้งการฟักไข่ได้ 81.3% หลังการทดลอง 48 ชั่วโมง ในขณะที่ 1% (w/w) temephos สามารถยับยั้งการฟักไข่ยุงลายบ้านได้ 20.9%

6.1.5. น้ำมันหอมระเหยอบเชยเทศ 2%+ *trans-cinnamaldehyde* 1% มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการวางไข่ของตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน โดยมีประสิทธิภาพการไล่ไม่ให้ยุงลายบ้านเพศเมียมาวางไข่ เท่ากับ 99.0% ER และมีค่า OAI เท่ากับ -1 ในขณะที่ 1% (w/w) temephos ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการวางไข่ แต่ดึงดูดให้ตัวเต็มวัยเพศเมียยุงลายบ้านมาวางไข่ โดยมีประสิทธิภาพการดึงดูดให้ยุงลายบ้านเพศเมียมาวางไข่ เท่ากับ 33.4% EA และมีค่า OAI เท่ากับ 0.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 6.2 ข้อเสนอแนะ

6.2.1 ควรนำน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้านมาผสมกับสาร alpha-pinene มาพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ใช้ในการป้องกันกำจัดยุงลายบ้าน เพื่อลดจำนวนประชากรของยุงลายบ้านและให้เป็นอีกหนึ่งทางเลือกกับผู้บริโภค

6.2.2 ควรหลีกเลี่ยงการใช้ผลิตภัณฑ์สารเคมีกำจัดแมลงในการป้องกันและกำจัดยุงลายบ้าน เพราะอาจก่อให้เกิดการแพ้และอันตรายต่อผู้ใช้โดยตรง อีกทั้งยังทำให้ยุงลายบ้านเกิดความต้านทานต่อสารเคมีในระยะยาว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บรรณานุกรม

- กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2566ก. กรมควบคุมโรค เผยปีนี้พบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกเพิ่มขึ้นทุกวัย และมีหญิงตั้งครรภ์ติดเชื้อไวรัสซิกาคลอดทารกศีรษะเล็กผิดปกติ ย้ำทุกคนร่วมมือกันกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลาย และป้องกันยุงกัดเพื่อลดการแพร่เชื้อ. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: [http:// www.ddc.moph.go.th](http://www.ddc.moph.go.th) (21 มกราคม 2567).
- กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2566ข. รายงานประเมินความเสี่ยงการระบาดของโรคติดต่อฯ โดยแมลง ปีพ.ศ. 2566. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <http:// www.ddc.moph.go.th> (12 มกราคม 2567).
- กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2565ค. รายงานประเมินความเสี่ยงการระบาดของโรคติดต่อฯ โดยแมลง ปีพ.ศ. 2566. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <http:// www.ddc.moph.go.th> (12 มกราคม 2567).
- กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2563ง. รายงานประเมินความเสี่ยงการระบาดของโรคติดต่อฯ โดยแมลง ปีพ.ศ. 2566. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <http:// www.ddc.moph.go.th> (12 มกราคม 2567).
- กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2566จ. สคร.9 เดือนภัย !! โรคไข้ปวดข้อยุงลาย หรือ ชิคุนกุนยา. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <http:// www.ddc.moph.go.th> (15 มีนาคม 2567).
- กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. 2566. โรคติดเชื้อไวรัสซิกา. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <https://ddc.moph.go.th> (21 ธันวาคม 2566).
- ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 2567ก. จันทน์เทศ. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <https://www.thaicrudedrug.com> (3 มกราคม 2567).
- ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 2567ข. ตะไคร้บ้าน. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <https://www.thaicrudedrug.com> (3 มกราคม 2567).
- ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 2567ค. อบเชยเทศ. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <https://www.thaicrudedrug.com> (3 มกราคม 2567).
- ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์. 2560. ยุงที่สำคัญทางการแพทย์ของประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร. พิษณุโลก. 220 น.
- นพพร โตะมี. 2558. “Zika virus ภัยร้ายที่ต้องระวัง”. *จดหมายข่าวสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ*. 15(1): 1-4.
- ภานุกิจ กันหาจันทร์ ศรีสุตา สมัยใหม่ จักรวาล ชมภูศรี ศรียา เรื่องพัฒนาพงศ์ พายุ ภัคดีนวน ชญาดา ขำสวัสดิ์ นาวิ ศรีวรรณย์ และ เกรียงศักดิ์ ฤชศาสดัต. 2563. “การพัฒนาผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ที่ต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงจากน้ำมันหอมระเหยในรูปแบบไมโครอิมัลชัน”. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*. 62(4): 352-371.
- มยุรา สนย์วีระ. 2560. *แมลง: การศึกษาเบื้องต้นของแมลง (Insect: An Introduction to the study of insects*. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท สไมล์เปเปอร์แอนด์ปรินต์ติ้ง จำกัด. กรุงเทพมหานคร. 577 น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เมตไทย. 2564. **จันทน์เทศสรรพคุณและประโยชน์ของต้นจันทน์เทศ ลูกจันทน์ 54 ข้อ** [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: [http:// www. Medthai.com](http://www.Medthai.com) (19 ธันวาคม 2566).
- โรงพยาบาลบางกอก 8. 2562. **โรคไข้วัดข้อขี้คุณกุนยา.** [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก:<https://www.bangpakok8.com>. (6 ธันวาคม 2566).
- โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน. 2023. **ไข้วัดออก และวัคซีนป้องกันไข้วัดออกในปัจจุบัน.** [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <https://www.tropmedhospital.com/knowledge>.
- สิริภักดิ์ สุระพร. 2562. “กลไกที่แมลงต้านทานต่อสารฆ่าแมลง”. **วารสารเกษตรพระวรุณ.** 16(1): 34-48.
- สถาบันป้องกันควบคุมโรคเขตเมือง. 2024. **สรุปรายงานเหตุการณ์ที่สำคัญทางระบาดวิทยา.** [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <https://ddc.moph.go.th/uploads/publish/1530320240205032701.pdf> (15 มีนาคม 2567).
- อักษร จันทร์เทวี. 2563. “ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรในการไล่ และการกำจัดแมลงวันบ้าน (*Musca domestica* L.) และยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti* Linn.)”. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- อุบล ภูเกิด. 2559. “ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรในการขับไล่ป้องกันการวางไข่ กำจัดตัวอ่อน ตัวโม่งและตัวเต็มวัยของยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti* Linn.) และยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus* Say)”. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- อุษาวดี ถาวร และ อธิวิทย์ เจริญวิริยะภาพ. 2556. **การควบคุมแมลงทางการแพทย์.** พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท หนังสือวันดี จำกัด. กรุงเทพมหานคร. 128 น.
- อุษาวดี ถาวร อภิวิทย์ อธิสิน จักรวาล ชมพูนุศรี พัชรารวรรณ ศิริโสภา และ พายุ ภัคดีนวน. 2553. **ชีววิทยา นิเวศวิทยา และการควบคุมยุงในประเทศไทย.** พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร. บริษัท หนังสือวันดี จำกัด. กรุงเทพมหานคร. 126 น.
- Agilent. 2019. **Safety data sheet acc. to osha hcs.** [Online] Available: [https://www.agilent.com/cs/library/msds/TRP-160-1\\_NAEnglish.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/msds/TRP-160-1_NAEnglish.pdf). (28 Mar 2024).
- Andrade-Ochoa, S., Sánchez-Aldana, D., Chacón-Vargas, K. F., Rivera-Chavira, B. E., Sánchez-Torres, L. E., Camacho, A. D., Noguera-Torres, B. and Nevárez-Moorillón, G. V. 2018. “Oviposition deterrent and larvicidal and pupaecidal activity of seven essential oils and their major components against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae): synergism-antagonism effects”. **Insects.** 9: 25.
- Apiwathnasorn, C. 2012. “Climate change and mosquito vectors”. **Journal of Tropical Medicine and Parasitology.** 35(2): 78-85.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Aungtikun, J. and Soonwera, M. 2021. “Improved adulticidal activity against *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) from synergy between *Cinnamomum* spp. essential oils”. **Scientific Reports**. 11: 4685.
- Aungtikun, J., Soonwera, M. and Sittichok, S. 2021. “Insecticidal synergy of essential oils from *Cymbopogon citratus* (Stapf.), *Myristica fragrans* (Houtt.), and *Illicium verum* Hook. f. and their major active constituents”. **Industrial Crops and Products**. 164: 113386.
- Baker, O. S., Norris, E. J. and IV., E. R. B. 2023. “Insecticidal and synergistic potential of three monoterpenoids against the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), and the house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae)”. **Molecules**. 28: 3250.
- Balboné, M., Sawadogo, I., Soma, D. D., Drabo, S. F., Namountougou, M., Bayili, K., Romba, R., Meda, G. B., Nebié, H. C. R., Dabire, R. K., Bassolé, I. H. N. and Gnankine, O. 2022. “Essential oils of plants and their combinations as an alternative adulticides against *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) populations”. **Scientific Reports**. 12: 19077.
- Benelli, G., Pavela, R., Iannarelli, R., Petrelli, R., Cappellacci, L., Cianfaglione, K., Afshar, F. H., Nicoletti, M., Canale, A. and Maggi, F. 2017. “Synergized mixtures of Apiaceae essential oils and related plant-borne compounds: larvicidal effectiveness on the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* Say”. **Industrial Crops and Products**. 96: 186-195.
- Bisset, J. A., Rodríguez, M. M., Piedra, L. A., Cruz, M., Gutiérrez, G. and Ruiz, A. 2020. “Reversal of resistance to the larvicide temephos in an *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) laboratory strain from Cuba”. **Journal of Medical Entomology**. 57(3): 801–806.
- Brügger, B. P., Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., de Castro e Castro, B. M., Soares, M. A., Wilcken, C. F., Carvalho, A. G., Serrão, J. E. and Zanuncio, J. C. 2019. “Bioactivity of the *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil and its terpenoid constituents on the predatory bug, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae)”. **Scientific Reports**. 9: 8358.
- Chantawee, A. and Soonwera, M. 2018. “Efficacies of four plant essential oils as larvicide, pupicide and oviposition deterrent agents against dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae)”. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 8(4): 217-225.

- Chansang, A., Champakaew, D., Junkum A., Jitpakdi, A., Amornlerdpison, D., Aldred, K. A., Riyong, D., Wannasan, A., Intirach, J., Muangmoon, R. and Pitasawat, B. 2018. “Synergy in the adulticidal efficacy of essential oils for the improvement of permethrin toxicity against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)”. **Parasites & Vectors**. 11: 417.
- Cotchakaew, N. and Soonwera, M. 2019. “Toxicity of several botanical essential oils and their combinations against females of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Anopheles minimus* (Theobald): oviposition deterrent, ovicidal and adulticidal Efficacies”. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 9(1): 29-39.
- Dhinakaran, S. R., Mathew, N. and Munusamy, S. 2019. “Synergistic terpene combinations as larvicides against the dengue vector *Aedes aegypti* Linn”. **Drug Development Research**. 80(6):791-799.
- European Commission. 2023. **Consequences of climate change**. [Online] Available: [https://climate.ec.europa.eu/climate-change/consequences-climate-change\\_en](https://climate.ec.europa.eu/climate-change/consequences-climate-change_en) (28 Feb 2024).
- Farag, S. M., Moustafa, M. A. M., Fónagy, A., Kamel, O. M. H. M. and Abdel-Haleem, D. R. 2024. “Chemical composition of four essential oils and their adulticidal, repellence, and field oviposition deterrence activities against *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae)”. **Parasitology Research**. 123: 110.
- Filho, W.L., Scheday, S., Boenecke, J., Gogoi, A., Maharaj, A. and Korovou, S. 2019. “Climate change, health and mosquito-borne diseases: trends and implications to the pacific region.” **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 16(24): 5114.
- Firoozian, S., Amani, A., Osanloo, M., Hasan, S., Kazemi, M., Basseri, H.R., Hajipirloo, H.M., Sadaghianifar, A. and Sedaghat, M.M. 2021. “Preparation of nanoemulsion of *Cinnamomum zeylanicum* oil and evaluation of its larvicidal activity against a main malaria vector *Anopheles stephensi*”. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**. 19(1): 1025–1034.
- Hýbl, M., Bohatá, A., Rádsetoulalová, I., Kopecký, M., Hoštičková, I., Vaničková, A. and Mráz, P. 2021. “Evaluating the efficacy of 30 different essential oils against *Varroa destructor* and honey bee workers (*Apis mellifera*)”. **Insects**. 12(11): 1045.
- Jyoti., Singh, N. K., Singh, H., Mehta, N. and Rath S. S. 2019. “In vitro assessment of synergistic combinations of essential oils against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)”. **Experimental Parasitology**. 201: 42-48.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Manh, H.D., Hue, D.T., Hieu, N.T.T., Tuyen, D.T.T. and Tuyet, O.T. 2020. “The mosquito larvicidal activity of essential oils from *Cymbopogon* and *Eucalyptus* species in Vietnam”. **Insects**. 11(2): 128.
- Melo-Santosa, M.A.V., Varjal-Melo, J.J.M., Araújo, A.P., Gomes, T.C.S., Paiva, M.H.S., Regisa, L.N., Furtado, A.F., Magalhaes, T., Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T.M. and Ayres C.F.J. 2010. “Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil”. **Acta Tropica** 113: 180–189.
- Moungthipmalai, T., Puwanard, C., Aungtikun, J., Sittichok, S. and Soonwera, M. 2023. “Ovicidal toxicity of plant essential oils and their major constituents against two mosquito vectors and their non-target aquatic predators”. **Scientific Reports**. 13: 2119.
- Muhammad, I. U., Jazuli, F. U., Faruq, F. W., Imam, A. A., Alhassan, A. J. and Yaradua, A. I. 2017. “Phytochemical screening, acute (LD50) and sub-chronic toxicity studies of aqueous stem bark extract of *Cinnamomum Verum*”. **Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences**. 3: 1253-1258.
- Nakasen, K., Wongsrila, A., Prathumtet, J., Sriraj, P., Boonmars, T., Promsrisuk, T., Laikaew, N. and Aukkanimart, R. 2021. “Bio efficacy of Cinnamaldehyde from *Cinnamomum verum* essential oil against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)”. **Journal of Entomological and Acarological Research**. 53: 9400.
- Naqqash, M. N., Gökçe, Ayhan., Bakhsh, A. and Salim, M. 2016. “Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests”. **Parasitology Research**. 115: 1363–1373.
- Nwanade, C. F., Wang, M., Li, Hongxia., Masoudi, A., Yu, Z. and Liu, J. 2022. “Individual and synergistic toxicity of cinnamon essential oil constituents against *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) and their potential effects on non-target organisms”. **Industrial Crops and Products**. 178: 114614.
- Pandiyan, G. N., Mathew, N. and Munusamy, S. 2019. “Larvicidal activity of selected essential oil in synergized combinations against *Aedes aegypti*”. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 174: 549-556.
- Pavela, R. 2015. “Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say larvae”. **Parasitology Research**. 114: 3835–3853.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Pavela, R. and Benelli, G. 2016. "Essential oils as ecofriendly biopesticides? challenges and constraints". **Trends in Plant Science**. 21(12): 1000-1007.
- Phukerd, U. and Soonwera, M. 2013. "Larvicidal and pupicidal activities of essential oils from Zingiberaceae plants against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* say mosquitoes". **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. 44(5):761-71.
- Shafiq, M., Abubakar, M., Riaz, M. and Shad, S. A. 2023. "Development of alpha-cypermethrin resistance and its effect on biological parameters of yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae)". **Parasitology Research**. 123:14.
- Soonwera, M. and Phasomkusosil, S. 2016. "Effect of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and *Syzygium aromaticum* (clove) oils on the morphology and mortality of *Aedes aegypti* and *Anopheles dirus* larvae". **Parasitology Research**. 115: 1691-1703.
- Soonwera, M. and Sittichok, S. 2020. "Adulticidal activities of *Cymbopogon citratus* (Stapf.) and *Eucalyptus globulus* (Labill.) essential oils and of their synergistic combinations against *Aedes aegypti* (L.), *Aedes albopictus* (Skuse), and *Musca domestica* (L.)". **Environmental Science and Pollution Research**. 27(16): 20201-20214.
- Soonwera, M., Mounghthipmalai, T., Aungtikun, J., Sittichok, S. 2022a. "Combinations of plant essential oils and their major compositions inducing mortality and morphological abnormality of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*". **Heliyon**. 8(5): e09346.
- Soonwera, M., Mounghthipmalai, T., Takawirapat, W and Sittichok, S. 2022b. "Ovicidal and repellent activities of several plant essential oils against *Periplaneta americana* L. and enhanced activities from their combined formulation". **Scientific Reports**. 12: 12070.
- Soonwera, M., Sinthusiri, J., Passara, H., Mounghthipmalai, T., Puwanard C., Sittichok, S. and Murata, K. 2024. "Combinations of lemongrass and star anise essential oils and their main constituent: synergistic housefly repellency and safety against non-target organisms". **Insects**. 15(3): 210.
- Tak, J.-H., Jovel, E. and Isman, M. B. 2017. "Synergistic interactions among the major constituents of lemongrass essential oil against larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*". **Journal of Pest Science**. 90: 735-744.

- Uniyal, A., Tikar, S. N., Agrawal, O. P., Sukumaran, D. and Veer, V. 2016. "Larvicidal and oviposition deterrent activity of twenty three essential oils against *Aedes aegypti*". **International Journal of Mosquito Research**. 3(1): 14-21.
- Vespermann, K. A. C., Paulino, B. N., Mayara, C. S. B., Marina, G. P., Glauca, M. P. and Gustavo, M. 2017. "Biotransformation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene into flavor Compounds". **Applied Microbiology and Biotechnology**. 101: 1805–1817.
- Voedingsmiddelen, dierenvoeders en andere consumptieproducten. 2020. **Review of essential oils in capsules *Cinnamomum verum* J. Presl**. [Online] Available: [https://www.health.belgium.be/sites/default/files/uploads/fields/fps\\_health\\_theme\\_file/monografie\\_cinnamomum\\_verum\\_bark\\_en.pdf](https://www.health.belgium.be/sites/default/files/uploads/fields/fps_health_theme_file/monografie_cinnamomum_verum_bark_en.pdf). (28 Mar 2024).
- World Health Organization. 2018. **Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes – 2<sup>nd</sup> ed**. Geneva: World Health Organization. [Online] Available Source: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250677/9789241511575eng.pdf>, (6 November 2023).
- Youssefi, M. R., Tabari, M. A., Esfandiari, A., Kazemi, S., Moghadamnia, A. A., Sut, S., Dall'Acqua, S., Benelli, G. and Maggi, F. 2019. "Efficacy of two monoterpenoids, carvacrol and thymol, and their combinations against eggs and larvae of the west nile vector *Culex pipiens*". **Molecules**. 24(10): 1867.

## ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

### ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติ

- Puwanard, C. and Soonwera, M. 2022. “Ovicidal and adulticidal activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf and *Illicium verum* Hook. f. against *Aedes aegypti* (Linn.).” **International Journal of Agricultural Technology**. 18(1): 319-328.
- Puwanard, C., Mounghipmalai, T. and Soonwera, M. 2022. “Toxicity of *Litsea petiolata* Hook.f. essential oil against *Aedes aegypti* (Linn.), *Aedes albopictus* (Skuse), *Anopheles minimus* (Theobald) and *Culex quinquefasciatus* (Say).” **International Journal of Agricultural Technology**. 18(5): 2209-2228.
- Mounghipmalai, T., Puwanard, C., Aungtikun, J., Sittichok, S. and Soonwera, M. 2023. “Ovicidal toxicity of plant essential oils and their major constituents against two mosquito vectors and their non-target aquatic predators.” **Scientific Reports**. 13: 2119.
- Soonwera, M., Mounghipmalai, T., Puwanard, C., Sittichok, S., Sinthusiri, J. and Passara, H. 2024. “Adulticidal synergy of two plant essential oils and their major constituents against the housefly *Musca domestica* and bioassay on non-target species.” **Heliyon**. 10: e26910.
- Soonwera, M., Sinthusiri, J., Passara, H., Mounghipmalai, T., Puwanard, C., Sittichok, S. and Murata, K. 2024. Combinations of lemongrass and star anise essential oils and their main constituent: synergistic housefly repellency and safety against non-target organisms. **Insects**. 15: 210.

### การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ แบบ Oral presentation

- Puwanard, C. and Soonwera, M. 2022. “Ovicidal and adulticidal activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf and *Illicium verum* Hook. f. against *Aedes aegypti* (Linn.).” p.24. In **The ninth International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development (9<sup>th</sup> ICIST 2021)**. King Mongkut’s Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand. 19 November 2021.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Puwanard, C., Mounghipmalai, T. and Soonwera, M. 2022. “Toxicity of *Litsea petiolata* Hook.f. essential oil against *Aedes aegypti* (Linn.), *Aedes albopictus* (Skuse), *Anopheles minimus* (Theobald) and *Culex quinquefasciatus* (Say).” p.28. In **The tenth International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development (10<sup>th</sup> ICIST 2021)**. King Mongkut’s Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand. 19 November 2021.

**การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ แบบ Poster presentation**

Puwanard, C., Sinthusiri, J., Passara, H., Bunpetch, V., Sittichok, S. and Soonwera, M. 2023. “Adulticidal efficacies against *Aedes aegypti* Linn. of formulations of *Cymbopogon citratus* essential oil and its major constituents.” p.15. In **The 19<sup>th</sup> Asian Agricultural Symposium**. Kumamoto, Japan. 2 December 2023.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Ovicidal and adulticidal activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf and *Illicium verum* Hook. f. against *Aedes aegypti* (Linn.)

Puwanard, C. and Soonwera, M.\*

Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Chalong Krung Road, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

Puwanard, C. and Soonwera, M. (2022). Ovicidal and adulticidal activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf and *Illicium verum* Hook. f. against *Aedes aegypti* (Linn.). International Journal of Agricultural Technology 18(1):319-328.

**Abstract** The hatching inhibition and knockdown rates against *Aedes aegypti* of two essential oils (EOs): *Cymbopogon citratus* DC. Stapf and *Illicium verum* Hook F was evaluated. The efficacy of each of these EOs, at 1, 5, 10% emulsion in water, stabilized by tween 60<sup>®</sup>, was compared to that of 1% w/v temephos and 1% w/w cypermethrin (common, harmful synthetic insecticides). Topical and contact assays showed that 10% *C. citratus* and 10% *I. verum* emulsions were the most effective in inhibiting the hatching of mosquito eggs (100%) after 48 hours of exposure. Moreover, they were also the most toxic against mosquito adults (100% mortality) after 24 hours of exposure. This study also established that tween 60<sup>®</sup> had no effect on hatching inhibition or mortality rate of treated *Aedes aegypti* mosquitoes. All EO emulsions were more potent than temephos and cypermethrin against these mosquito species. Coupling this higher efficacy with no or benign known side effects of natural EOs, it can be concluded that 10% *C. citratus* and 10% *I. verum* emulsions are better alternatives than temephos and cypermethrin for a mosquito control program at the present time.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, *Cymbopogon citratus* (Stapf.), *Illicium verum* Hook. F.

### Introduction

*Aedes aegypti* (Linn.) is considered a destructive insect in medicine and public health. Even though it is found mostly in tropical regions, it can live anywhere in the world. Their habitats are such as waterlogging area, hollow, and water tank. Mosquito eggs are hardy, i.e., they can stay viable through a drought (Silvério *et al.*, 2020; Reinhold *et al.*, 2018). Most importantly, it is a vector of many serious human diseases, such as dengue, yellow fever, chikungunya, and Zika virus. Dengue infects humans easily, inflicting 50-100 million people annually (Tantawichien and Thisyakorn, 2017; WHO, 2020a; Wilder-Smith *et al.*, 2019). An estimate of 2.5 billion people being at risk around the world annually, and the infection rate has been increasing rapidly.

\* **Corresponding Author:** Soonwera, M.; **Email:** mayura.so@kmitl.ac.th, mayura.soon@gmail.com

Dengue is believed to penetrate into capillaries, causing thrombocytopenia and possibly eventual death (WHO, 2020a). Chikungunya is another destructive virus that causes pain in the joints and muscles in the early stage of infection, whereas Zika virus affects the nervous system, causing Guillain-Barré Syndrome and meningoencephalitis. Pregnant women infected with Zika may give birth to microcephalic child, baby having an abnormally small head (Chansang *et al.*, 2018; WHO, 2020a; WHO, 2020b).

The most popular prevention method against these diseases has been to destroy the vector population with effective synthetic chemicals. Widely used ones are organophosphates, carbamates, and pyrethroids (Nicolopoulo *et al.*, 2016; Kandel *et al.*, 2019; WHO, 2020c). However, after these chemicals have been used extensively and effectively to control insect vectors in a region, the insects developed resistance to them (Demok *et al.*, 2019; Collins *et al.*, 2019; Hamid *et al.*, 2018). Nowadays, insect vectors all around the world are resistant to these insecticides. Not only being ineffective at the present days, these previously effective synthetic chemicals also cause serious damages to human's nervous and respiratory systems (Demok *et al.*, 2019; Nicolopoulo *et al.*, 2016). Moreover, they persisted in the environment for a long time, not biologically degraded quickly like natural compounds (Aungtikun and Soonwera, 2021; Isman, 2017).

Therefore, safe and sustainable alternatives have been explored. Good candidates have been essential oils (EOs) extracted from medicinal herbs because they are not toxic to humans and animals and do not leave persistent residue in the environment. In addition, the following EOs have already been reported to repel or destroy some mosquito vectors (Chansang *et al.*, 2018; Nicolopoulo *et al.*, 2016; Sarma *et al.*, 2020; Pavela and Benelli, 2016): *Murraya koenigii*, *Ficus benghalensis*, *Hottuynia cordata*, *Callistemon linearis*, *Psidium guajava*, *Eupatorium odoratum*, *Ageratum conyzoids*, *Zingiber officinale*, *Polyalthia longifolia*, *Spondias pinata*, *Lantana camara*, *Hamalomena aromatica*, *Ocimum sanctum*, *Eucalyptus maculatus*, *Lippia alba*, *Mentha piperita*, *Azadirachta indica*, *Allium sativum*, *Plumeria rubra*, *Cyperus rotundus*, *Alpinia galanga*, and *Cinnamomum alangum*. However, the ovicidal and adulticidal activities of *Cymbopogon citratus* and *Illicium verum* against *Aedes aegypti* have not been reported in the literature yet. Therefore, this study attempted to evaluate the efficacy of these EOs against all life stages of *Ae. aegypti*.

## Materials and methods

### *Mosquito rearing*

320

Colonies of a mosquito species, *Ae. aegypti* were provided by the Entomological Laboratory, Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Thailand. The colonies were kept under the following conditions:  $27.0 \pm 3.3$  °C,  $72.5 \pm 1.5\%$  RH, and 12-h light and 12-h dark lighting period. The eggs hatched out into around 200 larvae in a plastic box ( $28 \times 35 \times 4$  cm<sup>3</sup>) filled with 2000 ml of drinking water. They fed on fish food (OPTIMUM<sup>®</sup>, 32% protein). Fourteen-day-old larvae developed into pupae, then 150 pupae were collected and put in a 250 ml plastic cup containing 200 ml of drinking water. The cup was transferred into a mosquito cage ( $30 \times 30 \times 30$  cm<sup>3</sup>). No food was fed to the pupae in the cage. Two-day-old pupae developed into adult mosquitoes. The adults fed on 5% glucose solution mix 1% multivitamin syrup solution in drinking water in soaked cotton pads. When they were 5 days old, female mosquitoes were given blood as food for 60 min by an artificial membrane method (Aungtikun and Soonwera, 2021; Cotchakaew and Soonwera, 2018). Three days afterwards, the gravid mosquitoes laid eggs. An ovicidal bioassay was performed on most of the eggs, but some of the eggs were hatched into adults, and two-day-old female adults were subjected to an adulticidal activity assay.

### **Essential oils**

Plant materials used in this study were fresh stems of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf gathered from local plants in Samutphakan province, Thailand. Dry fruits of *Illicium verum* Hook. F. were purchased from Vejpong Pharmacy (hock ann tung) Co. Ltd, Thailand. Specimens of the two plants were positively identified by a plant taxonomist from the Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Thailand. The fresh stems and dry fruits were cleaned, cut into small pieces, and extracted for 5 h for their EOs by a water distillation method. After the distillation was completed, EOs were collected from the separating funnel, stored in airtight bottles, and kept at 4 °C for later experiments. All EO formulations (solutions with different concentration of an EO) were prepared by diluting the stock extracted EO solution with drinking water containing 3.5% tween 60<sup>®</sup> to the desired concentration.

### **Positive and negative controls**

- A positive control was cypermethrin (Cyperguard 10 EC<sup>®</sup>, 10% w/v cypermethrin), manufactured by Expert pest system Co. Ltd, Bangkok, Thailand.

- Another positive control was temephos (SaiGPO-1<sup>®</sup>, 1.0% w/w temephos), manufactured by Thailand's Government Pharmaceutical Organization, Thailand. Of note is that temephos was a solid product, hence to use it as a control, 0.01g of it was dissolved in 100 ml of drinking water in a 250 ml plastic cup.

- Tween 60<sup>®</sup> was the negative control, manufactured by Kao corporation, Japan.

### ***Ovicidal bioassay***

The ovicidal bioassay was the dipping method used by Cotchakaew and Soonwera (2018). This experiment was of a completely randomized design. Five replicates of each treatment were run, and the average results were compared to that produced by 1% w/w temephos. LC<sub>50</sub> (Lethal Concentration for 50% mortality) were calculated by probit analysis. A Duncan's Multiple Range Test was conducted on the mortality data, with SPSS statistical software for Windows (version 16.0).

Twenty five eggs of each species of mosquitoes were placed in a 250-ml plastic cup containing 99 ml of drinking water. One milliliter of each formulation of *C. citratus* and *I. verum* EOs was added to the cup. After 48 hours, the hatched larvae were counted. Five replicates of the treatment were run, and the results were compared to those produced by temephos and drinking water. The percentage egg inhibition rate was calculated by the following formula:

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left[ \frac{\text{NT}}{\text{NC}} \right] \times 100,$$

where NT is the total number of dead eggs (not hatched within 48 hours) and NC is the total number of treated eggs.

### ***World Health Organization (WHO) susceptibility test***

Knockdown rate, mortality rate, and susceptibility classification of adulticidal agents were determined by the standard World Health Organization (WHO, 2018) contact method, with a completely randomized design. Five replicates of each treatment were run, and the average results were compared to that produced by 10% w/w cypermethrin, the positive control. Twenty-five-day-old female mosquitoes (2 days after emergence) unfed with any blood meal were exposed to *C. citratus* and *I. verum* EOs. Two milliliters of either 1 or 5 or 10% concentration of the EO were dropped onto a filter paper (the size of

12×15 cm, Whatman No.1<sup>®</sup>) which was then placed in the treatment tube (44 mm in diameter and 125 mm in length). After 1 h of exposure, the mosquitoes were transferred to the non-treatment tube containing a plain filter paper to ensure that the filter papers, by themselves, did not affect the assay outcomes. The knockdown rates were recorded at 1, 5, 10, 15, 30, and 60 min, and the mortality rates were recorded 24 h after the start of the exposure. Knockdown and mortality were evident by no movement of any body parts (head, antenna, thorax, wings, legs, abdomen, and other appendages) when the treated mosquito was prodded with a soft brush.

Knockdown rate and mortality rate were calculated by the following formula:

$$\text{Knockdown rate (\%)} = [\text{NT/NC}] \times 100,$$

where NT is the total number of knocked-down mosquitoes, and NC is the total number of treated mosquitoes.

KT<sub>50</sub> (50% knockdown time) and LC<sub>50</sub> (50% lethal concentration) were calculated by probit analysis. Mortality data were analyzed by Duncan's Multiple Range Test with SPSS for Windows software (version 16.0). Adulticidal agent's susceptibility criteria as classified by WHO (2018) are as follows: 98.0-100% mortality signifies susceptibility (S); 80.0-97.0% mortality signifies possibly resistant that needs confirmation (PR); and less than 80.0% signifies resistant (R).

## Results

### *Ovicidal bioassay*

The percentage hatching-inhibition rates against *Ae. aegypti* eggs of *C. citratus* and *I. verum* EOs at 1, 5, and 10% and temephos are listed in Table 1. *C. citratus* and *I. verum* EOs at 10% exhibited a 100 %inhibition rate against *Ae. aegypti* eggs. In addition, at a half of the maximum concentration tested, 5% *C. citratus* and *I. verum* EOs exhibited 80.6 and 91.1% inhibition rates, respectively, and at only a tenth of the maximum concentration, the 1% EOs provided a 47.0 and 63.4% hatching-inhibition rates, respectively. In contrast, temephos showed a much lower toxicity to the eggs of those mosquito species tested, with an inhibition rate of only 34.6%, while tween 60<sup>®</sup> (the negative control) showed no toxicity at all against mosquito eggs.

**Table 1.** Ovicidal activities against *Ae. aegypti* eggs of 1%, 5% and 10% *C. citratus* and *I. verum* EOs and 1% w/v temephos

Treatment	Conc (%)	Inhibition rate±SD		LC <sub>50</sub> <sup>1/</sup> (%)
		24 h	48 h	
<i>C. citratus</i>	1	64.5±1.5 <sup>d3/</sup>	47.0±4.2 <sup>c</sup>	1.38
<i>C. citratus</i>	5	87.5±8.0 <sup>c</sup>	80.6±4.82 <sup>c</sup>	
<i>C. citratus</i>	10	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	
<i>I. verum</i>	1	82.6±0.6 <sup>c</sup>	63.4±3.8 <sup>d</sup>	<1
<i>I. verum</i>	5	93.1±5.3 <sup>b</sup>	91.1±2.5 <sup>b</sup>	
<i>I. verum</i>	10	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	
Temephos	1 w/v	59.2±31.1 <sup>e</sup>	34.6±19.6 <sup>f</sup>	ns <sup>2/</sup>
Tween 60 <sup>®</sup>		0 <sup>f</sup>	0 <sup>e</sup>	ns
df <sub>total</sub> , F-test		39	39	
C.V. (%)		60.8	58.8	

<sup>1/</sup>LC<sub>50</sub>, 50% lethal concentration.

<sup>2/</sup>ns: Could not be determined by Probit analysis

<sup>3/</sup>Mean % mortality rates followed by the same letter in the same column are not significantly different at p < 0.05 (one-way ANOVA and Duncan's multiple range test).

#### **World Health Organization (WHO) susceptibility test**

Knockdown rate and knockdown time, KT<sub>50</sub>, against females of *Ae. aegypti* of *C. citratus* and *I. verum* EOs are tabulated in Table 2, while their LC<sub>50</sub> and WHO susceptibility status are listed in Table 3. Both EOs at all 1, 5, and 10% concentrations provided a 100% mortality rate after 1 hr of exposure. However, the more concentrated 5 and 10% *C. citratus* provided a shorter mortality time (after 10 min of exposure) than the less concentrated 1% formulation (after at least 15 min of exposure). Interestingly, *I. verum* provided a 100% mortality rate at all 1, 5, and 10% concentrations after only 15 min of exposure. Based on the KT<sub>50</sub> of *C. citratus*, 10% concentration provided the shortest mortality time, followed by 5% (2.1 min) and 1% (2.9 min). Regarding LC<sub>50</sub>, its LC<sub>50</sub> was calculated to be 11.92%. Following the same trend, the KT<sub>50</sub> of 10% *I. verum* was the shortest at 2.1 min, followed by 5% (2.6 min) and 1% (3.1 min), with an LC<sub>50</sub> of 13.2%. In contrast, the KT<sub>50</sub> of cypermethrin was 4.3 min, which means that it takes at least two times longer to destroy *Ae. aegypti* females than both EOs at 1%, the lowest concentration tested. As expected, the tween 60<sup>®</sup> control did not destroy or affect any mosquitoes throughout the experiment.

**Table 2.** Knockdown rate and  $KT_{50}$  against *Ae. aegypti* of 1, 5, and 10% *C. citratus* and *I. verum* EOs and 1% w/w cypermethrin

Treatment	Conc (%)	Knockdown rate (%) $\pm$ SD			$KT_{50}$ <sup>1/</sup>
		5 min	10 min	15 min	
<i>C. citratus</i>	1	60.0 $\pm$ 4.0 <sup>d3/</sup>	99.2 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	2.9 (2.5-3.4)
<i>C. citratus</i>	5	96.8 $\pm$ 3.3 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	2.1 (1.7-2.6)
<i>C. citratus</i>	10	99.2 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	1.9 (1.3-2.4)
<i>I. verum</i>	1	59.2 $\pm$ 5.2 <sup>d</sup>	85.6 $\pm$ 9.2 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>	3.2 (2.8-3.7)
<i>I. verum</i>	5	72.8 $\pm$ 7.69 <sup>c</sup>	95.2 $\pm$ 4.3 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	2.6 (2.2-3.0)
<i>I. verum</i>	10	85.6 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	99.2 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	2.2 (1.8-2.6)
Cypermethrin	1 w/w	21.3 $\pm$ 6.1 <sup>e</sup>	50.6 $\pm$ 6.1 <sup>d</sup>	100 <sup>a</sup>	4.4 (3.9-5.0)
Tween 60 <sup>®</sup>		0 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>b</sup>	ns <sup>2/</sup>
$df_{total}$ , $F$ -test		39	39	39	
C.V. (%)		37.06	27.88	27.22	

<sup>1/</sup> $KT_{50}$ , 50% knockdown time<sup>2/</sup>ns: Could not be determined by Probit analysis<sup>3/</sup>Mean % mortality rates followed by the same letter in the same column are not significantly different at  $p < 0.05$  (one-way ANOVA and Duncan's multiple range test).**Table 3.** Mortality rate and  $LC_{50}$  against *Ae. aegypti* as well as WHO susceptibility status of *C. citratus*, *I. verum* EOs, and 1% w/w cypermethrin

Treatment	Conc (%)	Mortality rate (%) $\pm$ SD		Susceptibility status <sup>2/</sup>
		60 min	$LC_{50}$ (%) <sup>1/</sup>	
<i>C. citratus</i>	1	100		S
<i>C. citratus</i>	5	100	11.9	S
<i>C. citratus</i>	10	100		S
<i>I. verum</i>	1	100		S
<i>I. verum</i>	5	100	13.2	S
<i>I. verum</i>	10	100		S
Cypermethrin	1 w/w	100	ns <sup>3/</sup>	S
Tween 60 <sup>®</sup>		0	ns	R

<sup>1/</sup> $LC_{50}$ , 50% lethal concentration.<sup>2/</sup>S, Susceptibility is defined as 98-100% mortality; RS, Resistance suspected is defined as 80-97% mortality; and R, Resistant, is defined as <80% mortality.<sup>3/</sup>ns = Could not be determined by Probit analysis.

## Discussion

The first point of discussion is that 10% *I. verum* EO was more effective than temephos at hatching inhibition of *Ae. aegypti* mosquito eggs, most likely because temephos was ingested by the larvae but not the eggs (Ling *et al.*, 2013). This conclusion is supported by a finding by Cotchakaew and Soonwera (2018) that 10% *I. verum* EO was able to inhibit, at 100% rate, the hatching of

the eggs of *Ae. albopictus* (Skuse) and *Anopheles minimus* (Theobald). Moreover, it was also able to inhibit the hatching of housefly eggs at 97.3% rate (Sinthusiri and Soonwera, 2014).

The second point is that our finding that 10% *C. citratus* EO was more effective than cypermethrin in knocking down *Ae. aegypti* mosquitoes is consistent with a finding by Soonwera and Sittichok, (2020) that *C. citratus* EO and geranial provided a high mortality rate against the mosquitoes. Not only providing a higher knockdown rate than cypermethrin, 10% *C. citratus* EO also provided a higher mortality rate.

The final point of discussion is that *C. citratus* and *I. verum* essential oils are better natural alternatives to cypermethrin because they not only were more effective at the time of this study but also safer to non-targeted organisms since they were natural substances that have been consumed since ancient times as folk medicine (Silvério *et al.*, 2020). In modern time, it has been used in perfume industry because it smelled good and was safe for users (Irshad *et al.*, 2020). However, a gold standard safety evaluation of these EOs should be conducted before they are released as an alternative commercial product to cypermethrin.

### Acknowledgements

The financial support for this study was from King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Bangkok, Thailand. We would also like to thank Mr. Pratana Kangsadal, a KMITL Proofreader, for revising the English of this manuscript.

### References

- Aungtikun, J. and Soonwera, M. (2021). Improved adulticidal activity against *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) from synergy. *Scientific Reports*, 11:4685.
- Chansang, A., Champakaew, D., Junkum, A., Jitpakdi, A., Amornlerdpison, D., Aldred, A. K. and Pitasawat, B. (2018). Synergy in the adulticidal efficacy of essential oils for the improvement of permethrin toxicity against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasites and Vectors*, 11:417.
- Collins, E., Natasha, M. V., Moussa, S., Abdoul, H. B., James, O., Gena, L., Ryan, E. W., Seth, R. I., Thomas, W. and Louisa, A. M. (2019). The relationship between insecticide resistance, mosquito age and malaria prevalence in *Anopheles gambiae* s.l. from Guinea. *Scientific Reports*, 9: 8846.
- Cotchakaew, N. and Soonwera, M. (2018). "Efficacise of essential oils from Illiciaceae and Zingiberaceae plant as oviposition deterrent, ovicidal, and adulticidal agents agains females *Aedes albopictus* (Skuse) and *Anopheles minimus* (Theobald)". *International Journal of Agricultural Technology*, 14:631-652.

- Demok, S., Endersby-Harshman, N., Vinit, R., Timinao, L., Robinson, L. J., Susapu, M., Makita, L., Laman, M., Hoffmann, A. and Karl, S. (2019). Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes in Papua New Guinea. *Parasites and Vectors*, 12:333.
- Hamid., P. H., Ninditya, V. I., Prastowo, J., Haryanto, A., Taubert, A. and Hermosilla, C. (2018). Current status of *Aedes aegypti* insecticide resistance development from Banjarmasin, Kalimantan, Indonesia. *BioMed Research International*. ID 1735358.
- Irshad, M., Subhani, M. A., Ali, S. and Hussain, A. (2020). Biological importance of essential oils. *Biological Importance of Essential Oils*. Retrieved from doi:10.5772/intechopen.87198.
- Isman, M. N. (2017). Bridging the gap: Moving botanical insecticides from the laboratory to the farm. *Industrial Crops and Products*. 110:10-14.
- Ling, L. S., Sulaiman, S. and Othman, H. (2013). Laboratory evaluation of temephos, grass infusion, and *Piper aduncum* extracts against the ovipository responses of *Aedes aegypti*. *The Journal of Tropical Medicine and Parasitology*, 36:15-22.
- Kandel, Y., Julia, V., Stacy, D. R., Emily, M., Hae-Na, C., Soumi, M., Joel, J. Cordova., Kalli, J.L. M., Alex, S. M., Aditi, K., Paul, E., Sandra, M., Jiannong, Xu., Michaela, B., Kathryn, A. H. and Immo, A. H. (2019). Widespread insecticide resistance in *Aedes aegypti* L. from New Mexico, U.S.A. *PLoS One*. 14:e0212693.
- Nicolopoulo, S. P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P. and Hens, L. (2016). Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Front. Public Health*, 4:1-8.
- Pavela, R. and Benelli, G. (2016). Ethnobotanical knowledge on botanical repellents employed in the African region against mosquito vectors - a review. *Parasitol*. 167:103-108.
- Reinhold, J. M., Lazzari, C. R. and Lahondère, C. (2018). Effects of the environmental temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes: a review. *Insects*, 9:158.
- Sarma, R., Adhikari, K., Mahanta, S. and Khanikor, B. (2020). Twenty essential oils as ovicidal agent against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *National Academy Science Letters*. Retrieved from doi:10.1007/s40009-020-00923-1.
- Silvério, M. R. S., Espindola, L. S., Lopes, N. P. and Vieira, P. C. (2020). Plant natural products for the control of *Aedes aegypti*: the main vector of important arboviruses. *Molecules*, 25:3484.
- Sinthusiri, J. and Soonwera, M. (2014). Oviposition deterrent and ovicidal activities of seven herbal essential oils against female adults of housefly, *Musca domestica* L. *Parasitology Research*, 113:3015-3022.
- Soonwera, M. and Sittichok, S. (2020). Adulticidal activities of *Cymbopogon citratus* (Stapf.) and *Eucalyptus globulus* (Labill.) essential oils and of their synergistic combinations against *Aedes aegypti* (L.), *Aedes albopictus* (Skuse), and *Musca domestica* (L.). *Environmental Science and Pollution Research*, 27:20201-20214.
- World Health Organization (WHO) (2018). Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes – 2nd ed. Geneva: World Health Organization. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250677/9789241511575eng.pdf>.

- World Health Organization (WHO) (2020a). Dengue situation update2020. Retrieved from <http://iris.wpro.who.int/handle/10665.1/14184>.
- World Health Organization (WHO) (2020b). What is dengue fever?. Retrieved from <http://breakdengue.org/dengue-fever>.
- World Health Organization (WHO) (2020c). Insecticide resistance. Retrieved from [www.who.int/malaria/areas/vectors-control/insecticide-resistance/en](http://www.who.int/malaria/areas/vectors-control/insecticide-resistance/en).

(Received: 19 August 2021, accepted: 28 December 2021)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Toxicity of *Litsea petiolata* Hook.f. essential oil against *Aedes aegypti* (Linn.), *Aedes albopictus* (Skuse), *Anopheles minimus* (Theobald) and *Culex quinquefasciatus* (Say)

Puwanard, C., Mounthipmalai, T. and Soonwera, M.\*

Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Chalong Krung Road, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

Puwanard, C., Mounthipmalai, T. and Soonwera, M. (2022). Toxicity of *Litsea petiolata* Hook.f. essential oil against *Aedes aegypti* (Linn.), *Aedes albopictus* (Skuse), *Anopheles minimus* (Theobald) and *Culex quinquefasciatus* (Say). International Journal of Agricultural Technology 18(5):2209-2228.

**Abstract** This study evaluated the oviposition deterrent, ovicidal, larvicidal, pupicidal, and adulticidal activities of essential oil (EO) from *Litsea petiolata* leaves against *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Anopheles minimus* and *Culex quinquefasciatus* with double-choice, dipping, and contact assays. *Litsea petiolata* EO was tested at 1, 5, and 10% concentrations in ethanol and their efficiencies were compared with those of 1% w/w temephos and 10 % w/v cypermethrin. Oviposition deterrent was evaluated on gravid females. Larvicidal and pupicidal activities were tested on the fourth larvae and 2-day-old pupae. The adulticidal activity was tested against two-day-old adult females. Ten percent of *L. petiolata* EO exhibited the highest oviposition deterrent activity against gravid females and 100% repellency against *Ae. albopictus* and *An. minimus*, 97.0% against *Ae. aegypti* and 94.6% against *Cx. quinquefasciatus*. The oviposition activity index (OAI) against females of those four mosquito species ranged from -0.9 to -1.0. Ten percent of *L. petiolata* EO also exhibited the highest ovicidal activity against the eggs of the four mosquito species, with an inhibition rate ranging from 87.2 to 100%. Moreover, it also showed the highest larvicidal and pupicidal activities against the larvae and pupae of the four mosquito species, with a 100% mortality rate at 10 and 60 min, respectively. The adulticidal activity was recorded at 1 and 24h. Ten percent of *L. petiolata* EO exhibited the highest toxicity to female adults of the four mosquito species, with 100% knockdown (1h) and mortality (24h) rates. On the other hand, 1%w/w temephos did not deter gravid females, and it was only slightly toxic to the eggs and larvae and non-toxic to the pupae. In the same manner, 10%w/v cypermethrin was less effective against the female adults of the four mosquito species than 10% *L. petiolata* EO. *L. petiolata* EO is a highly effective and eco-friendly alternative to synthetic insecticides.

**Keywords:** *Litsea petiolata*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Anopheles minimus*, *Culex quinquefasciatus*, Essential oil

### Introduction

Mosquitoes are serious vectors and a considerable threat to people's livelihood worldwide. They are a major cause of death for 700,000 hundred

\*Corresponding Author: Soonwera, M.; Email: [mayura.so@kmitl.ac.th](mailto:mayura.so@kmitl.ac.th), [mayura.soon@gmail.com](mailto:mayura.soon@gmail.com)

thousand people per year (WHO, 2020). Serious diseases vectored by mosquitoes include dengue, malaria, Japanese encephalitis, filariasis, yellow fever, and Zika virus. *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) and *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*) mosquitoes, in particular are vectors of dengue widely distributed globally especially in tropical and subtropical areas (Paixao *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2022). Areas infested with dengue vectors are habitats of about two-thirds of the world's population. Three-point nine billion people in more than 128 countries are at risk of contracting dengue. In 2019 an estimated 229 million cases and 56 million cases of dengue had been reported worldwide (Mustafa, 2015; Pompon *et al.*, 2017; Demirak and Emel, 2022). *Culex quinquefasciatus* (*Cx. quinquefasciatus*) is a globally distributed cosmopolitan mosquito, especially in tropical and subtropical areas (Chaiphongpachara *et al.*, 2018). *Cx. quinquefasciatus* is a vector of lymphatic filariasis, West Nile fever, and Japanese encephalitis. Also, about 859 million people are vulnerable to lymphatic filariasis, and over 3 billion people are threatened by Japanese encephalitis worldwide (WHO, 2020). It causes annoyance, pain, and dermatitis (Muthukumaran *et al.*, 2015), and it is reported to cause lymphatic filariasis, a widely distributed tropical disease estimated to infect around 600 million people in the Southeast region of Asia in 2019 (Rai *et al.*, 2019). On the other hand, *Anopheles minimus* (*An. minimus*) is a vector of malaria. Malaria is a severe disease and public health problem that causes many deaths of children and adults annually. A report stated that, in 2019, there were 214 million infected cases worldwide (Moxon *et al.*, 2019). Most of the deaths were under 5-year-old children (Sonkong *et al.*, 2015; WHO, 2016).

In recent years, many synthetic insecticides have not been used comprehensively in mosquito control programs: their harmful effects on human and non-target populations, their difficult-to-biodegrade nature, and the ever-increasing mosquito resistance to them (Forstinus *et al.*, 2017). Thus, new, safer insecticides for controlling the mosquito population are urgently needed. (Demirak and Emel, 2022). Recently, plant extracts or phytochemicals as potential sources of mosquito control agents have attracted much attention from researchers (Singh *et al.*, 2006; Arokiyaraj *et al.*, 2015). Natural products are more desirable because they are safer for non-target organisms and biodegrade quickly. Essential oils are suitable potential controllers of mosquito vectors of diseases. Plant essential oils (EOs), the first generation of herbal pesticides, are known as green pesticides. They show anti-insect activities, including insecticidal, antifeedant, repellent, oviposition deterrent, growth regulatory, and (Tahghighi *et al.*, 2019). Many researchers have observed that some EOs from herbal plant sources had larvicidal and pupicidal activity (Chantawee and Soonwera, 2018), repellent activity (Wu *et al.*, 2019), insecticidal activity (Dua *et al.*, 2010), and ovicidal and oviposition-deterrent activity (Cotchakaew and Soonwera, 2018)

2210

against mosquito vectors. This study focused on *Litsea petiolata* Hook.f. (*L. petiolata*), Lauraceae family. It is a native tree in the South and Northeast of Thailand. *L. petiolata* leaves and twigs odor like an edible insect called Mangdana (*Lethocerus indicus*: Hemiptera; Belostomatidae), which is used as a common flavoring agent in Thai food.

The objective of this study was to evaluate the efficacy of *Litsea petiolata* EO against *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Anopheles minimus* and *Culex quinquefasciatus* in terms of oviposition deterrent, ovicidal, larvicidal, pupicidal, and adulticidal activities.

## Materials and methods

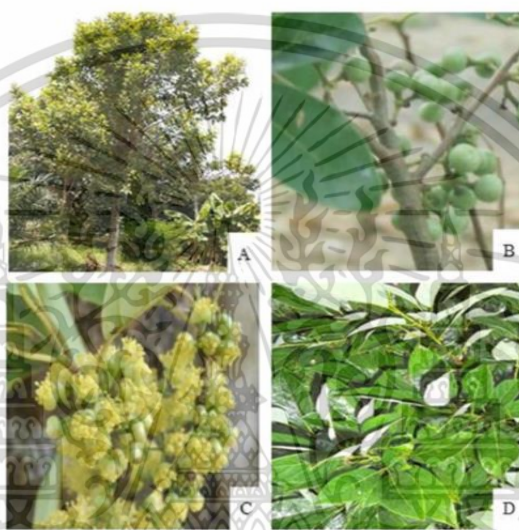
### *Mosquito rearing*

Colonies of four mosquito species—*Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*), *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*), *Anopheles minimus* (*An. minimus*) and *Culex quinquefasciatus* (*Cx. quinquefasciatus*) were provided by the Entomological Laboratory, Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Bangkok. The laboratory colonies were kept under the following conditions:  $27.0 \pm 3.3$  °C,  $72.5 \pm 1.5\%$  RH, and 12-h light and 12-h dark lighting periods. The eggs were hatched in a tray ( $28 \times 35 \times 4$  cm<sup>3</sup>) and filled with 2000 ml of drinking water. The tray held about 200 larvae. They fed on fish food (OPTIMUM<sup>®</sup>, 32% protein). Fourteen-day-old larvae developed into pupae, then 150 pupae were collected in a 250 ml plastic cup containing 200 ml of drinking water. The cup was transferred into a mosquito cage ( $30 \times 30 \times 30$  cm<sup>3</sup>). No food was fed to the pupae. Two-day-old pupae developed into adult mosquitoes. The adults fed on 5% sugar solution in drinking water soaked in cotton pads. When they were 5 days old, female mosquitoes were given blood as food for 60 min by an artificial membrane method (Chantawee and Soonwera, 2018). Three days afterward, the gravid mosquitoes laid eggs. An oviposition deterrent bioassay was performed on 2-day-old female adults that had been fed with the blood meal, while the eggs were used in an ovicidal bioassay. Larvae of the four mosquito species were collected. Fourth instar larvae were used in a larvicidal bioassay, and pupae were used in a pupicidal bioassay. Two-day-old adult female mosquitoes that had not been fed with blood were used in an adulticidal activity assay.

### *Plant materials*

Fresh leaves of *Litsea petiolata* (*L. petiolata*) from 3-year-old trees were collected from Bankhai district, Rayong province ( $12^{\circ} 40' 48''$  N and  $101^{\circ} 16' 48''$  E)

in the Eastern part of Thailand (Figure 1). The specimens were identified by a botanical taxonomist from King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang. Fresh leaves were rinsed with drinking water and cut into small pieces. One kilogram of leaves was placed in a flask (5L.), then added with 2,000 ml of drinking water and extracted for their EO by a water distillation method. The extraction process took about 5 hours. The EO obtained was diluted into 1, 5 and 10% solutions in ethyl alcohol. All EO solutions were stored at room temperature ( $27.5\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ ;  $75.5\pm 1.5\% \text{RH}$ ) before being used in a test. Gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry were used to analyze the composition of the *L. petiolata* EO.



**Figure 1.** *Litsea petiolata* Hook.f. (F. Lauraceae) (A) tree, (B) fruits, (C) flowers and (D) leaves

#### ***GC-MS determination of oil components of L. petiolata***

The composition of *L. petiolata* EO was analyzed by GC-MS are presented in Table 1. The analysis was carried out at the Scientific Instrument Center, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand. The GC-MS system was an agilent system. It was composed of a model 6890-N gas chromatographer, a model 5973-N mass spectrometer with 70 EV electron energy, a 7683 Auto-sampler, and a Chemstation data system. The GC column was an HP-5 ms fused silica capillary with 5% phenyl methylpolysiloxane coating and 0.25- $\mu\text{m}$  film thickness—length of 30 m and an internal diameter of 0.25-mm. The initial

2212

oven temperature was kept at 50 °C for 2 min, and then it was heated up to 200°C at a rate of 10°C/min<sup>-1</sup> and held there for 20 min. The injector temperature was maintained at 270°C. Each EO sample was diluted at 1:100 in ethyl alcohol, and 0.2 µl of the diluted sample was injected into the GC-MS system at a slit ratio of 1:100. The mobile gas was 99.9% helium. The flow rate was 1.0 ml per min. Spectra were scanned in a range of 30 to 500 m z<sup>-1</sup>. Chemical components of EOs were analyzed and identified with Agilent software (version G1701DA D.00.00), NIST mass spectral search program for Wiley 7n.1, and NIST tandem mass spectral library v7.1.

**Table 1.** Chemical composition of *Litsea petiolata* EO as identified by GC-MS

No.	Constituent	Percent of total	R.T. (min)
1	Benzene	0.17	7.27
2	1,8-Cineole	2.74	7.39
3	8-Nonen-2-one	0.15	8.23
4	2-Nonanone	54.69	8.48
5	2-Decanone	31.30	11.31
6	Undec-10-en-2-one	1.41	11.40
7	2-Undecanone	0.47	11.46
8	2-Dodecanol	0.04	11.72
9	2-methyl	0.03	12.58
10	1-Hepten-6-one	0.02	12.77
11	$\alpha$ -Cubebene	0.04	13.10
12	Butanal	6.81	13.18
13	1,3-Oxazin-2-one	2.09	14.00
Total		99.96	

#### **Positive and negative controls**

- Cypermethrin (Cyperguard10 EC<sup>®</sup>, 10% w/v) manufactured by Expert pest system Co. Ltd, 4/151 Borommaratchachonnani Road, Chimplee, Bangkok 10170, Thailand, functioned as a positive control.

- Temephos (SaiGPO-1<sup>®</sup>, 1.0% w/w) manufactured by 138 Government Pharmaceutical Organization, Rangsit -NakhonNayok Road, Pathumthani province, Thailand, functioned as another positive control.

- Drinking water (Crystal<sup>®</sup>) manufactured by Sermsook Co. Ltd., 72 Phaholyothin Rd, Nakhon Sawan province, Thailand, functioned as a negative control.

#### **Assays for determination of various activities of *L. petiolata* EO**

##### **Oviposition deterrence bioassay**

The oviposition deterrence bioassay was a double-choice method. Each treatment was performed in five replicates. The outcomes were statistically analyzed by a paired t-test ( $P < 0.05$ ). It was performed on 15 gravid females in a mosquito cage (30x30x30cm) mentioned in the section "Mosquito rearing

method." Two 250-ml plastic cups were brought into the cage and filled with 99 ml of drinking water, then placed at opposite corners of the cage. The cups were switched their positions in each replicate of the experiment. The treatment cup was added with 1 ml of either 1 or 5 or 10% *L. petiolata* EO or 1 ml of drinking water with 0.01g of dissolved temephos. The non-treatment cup was added with 1 ml of drinking water. After 72 hours and under a stereomicroscope, the number of eggs laid in the treatment and non-treatment cups was counted and recorded. The results from the two types of cups were statistically analyzed and compared. The oviposition activity index (OIA), percentage effective repellency (ER%), and percentage effective attractant (EA%) were determined. The OAI was calculated by the following formula (Govindarajan *et al.*, 2018; Shaalan and Canyon, 2018; Soonwera and Phasomkusolsil, 2017):

$$OAI = \frac{TC - UC}{TC + UC},$$

where TC is the total number of mosquito eggs in the treatment cup, and UC is the total number of mosquito eggs laid in the non-treatment cup. The values of OAI ranged from -1.0 to +1.0, where an OAI=0 signified a neutral response (N); an OAI from 0 to +1.0 signified an attractant (A), i.e., more mosquito eggs were laid in the treatment cup than in the non-treatment cup; and an OAI from 0 to -1.0 signified a repellent (R), i.e., more mosquito eggs were laid in the non-treatment cup than in the treatment cup. A highly negative index value was what we were looking for, which would show that the test solution deterred the female mosquitoes from spawning their eggs.

ER% was calculated for the case of positively repellent and deterrent by the following formula:  $ER\% = \frac{UC - TC}{UC} \times 100$ ,

On the other hand, EA% was calculated for the case of positive attractant by the following formula:  $EA\% = \frac{TC - UC}{TC} \times 100$ .

#### Ovicidal bioassay

The ovicidal bioassay was the same dipping method used by Cotchakaew and Soonwera (2019). This experiment was of a completely randomized design. Five replicates of each treatment were run, and the average results were compared to that produced by 1%w/w temephos.  $LT_{50}$  values (Lethal Time for 50% mortality) and  $LC_{50}$  (Lethal Concentration for 50% mortality) were calculated by probit analysis. A Duncan's Multiple Range Test was conducted on the mortality data with SPSS statistical software for Windows (version 16.0). Twenty-five eggs of each species of mosquitoes were placed in a 250-ml plastic cup containing 99 ml of drinking water and added with 1 ml of 1 or 5 or 10% of *L. petiolata* EO solution. In the case of temephos, 0.01g of temephos was dissolved in 100 ml of drinking water in a 250 ml plastic cup and used as a positive control, while 100 ml of drinking water in a 250 ml plastic cup was used as a negative control. After 48 hours, the hatched

2214

larvae were counted. Five treatment replicates were run, and the results were compared to those produced by temephos and drinking water. The percentage egg inhibition rate was calculated by the following formula:

$$\text{Inhibition rate (\%)} = [\text{NT/NC}] \times 100,$$

where NT is the total number of dead eggs (not hatched within 48 hours) and NC is the total number of treated eggs.

#### **Larvicidal and pupicidal bioassay**

The larvicidal and pupicidal bioassays followed the method of Soonwera and Phasomkusolsil (2017) and were of a completely randomized design. Five replicates of each treatment were run, and the average results were compared to that produced by temephos. The  $LT_{50}$  values (Lethal Time for 50% mortality) and  $LC_{50}$  (Lethal Concentration for 50% mortality) were calculated by probit analysis. A Duncan's Multiple Range Test was conducted on the mortality data with SPSS statistical software for Windows (version 16.0). In a 250-ml plastic cup, one milliliter of *L. petiolata* EO was added to 99 ml of drinking water at each concentration. Ten specimens of fourth instar larvae and 10 specimens of pupae were placed in such plastic cups. Larval mortality was recorded at 1, 5, 10, 15, 30, 60 min, and 24 h and pupae mortality at 15, 30 min, 1, 3, 6, 12, 24 and 48 h. Larvae were considered dead if they could not rise to the water surface or did not manifest a diving reaction. The mortality rates were recorded and calculated by the following formula:

$$\text{Mortality rate (\%)} = [\text{NT/NC}] \times 100,$$

where NT is the total number of dead larvae/pupae and NC is the total number of treated larvae/pupae.

#### **World Health Organization (WHO) susceptibility test**

The knockdown rate, mortality rate and susceptibility testing of mosquito females were carried out following the standard World Health Organization (WHO) protocol (WHO, 2018) contact method, with a completely randomized design. Five replicates of each treatment were run, and the average results were compared to that produced by 10% w/v cypermethrin, the positive control. Twenty-five female mosquitoes (2 days after emergence) unfed with blood meal were exposed to *L. petiolata* EO at 1 or 5 or 10% concentration in a treatment tube. Two ml of an EO solution were dropped and absorbed on a filter paper (the size of 12×15 cm, Whatman No1<sup>®</sup>) and put in the treatment tube (the size of 44 mm in diameter and 125 mm in length). After 1 h of exposure, the mosquitoes were transferred to the non-treatment tube (containing a filter paper but without *L. petiolata* EO). The knockdown rates were recorded at 1, 5, 10, 15, 30, and 60 min, and the mortality rates were recorded 24 h after

the exposure. The criterion for both knockdown and mortality was that no mosquito body parts (head, antenna, thorax, wings, legs, abdomen, and other appendages) moved.

Knockdown rate and mortality rate were calculated by the following formula:  $\text{Knockdown rate (\%)} = [\text{NT/NC}] \times 100$ ,

Where NT is the total number of knocked down mosquitoes, and NC is the total number of treated adult mosquitoes.

KT<sub>50</sub> (50% knockdown time) and LC<sub>50</sub> (50% lethal concentration) were calculated by using probit analysis. The mortality data were analyzed by Duncan's Multiple Range Test with SPSS for Windows software (version 16.0). An agent's susceptibility criteria as classified by WHO are as follows: 98.00-100% mortality signifies susceptibility (S); 80.00-97.00% mortality signifies possibly resistant that needs confirmation (PR); and less than 80.00% signifies resistant (R).

## Results

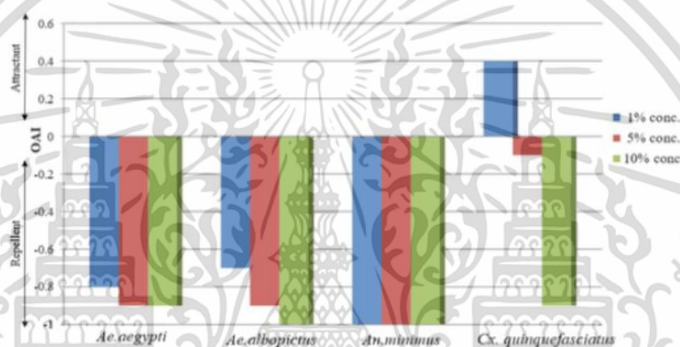
### *Oviposition deterrent bioassay*

The results of the oviposition deterrent assay are presented in Table 2. The oviposition activity index (OAI) values of *L. petiolata* EO at 1, 5 and 10% conc. Against *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *An. minimus* and *Cx. quinquefasciatus* are presented in Figure 2. It can be observed that 10% of *L. petiolata* EO had a high ER% (percentage effective repellency) and a higher oviposition deterrent activity against all species of mosquitoes than 5 and 1% concentrations had. *L. petiolata* EO at all tested concentrations (1, 5 and 10%) exhibited effective oviposition deterrent activity against *An. minimus* females with the highest deterrent activity of 100% ER and -1.0 OAI. In addition, *L. petiolata* EO at all tested concentrations successfully prevented oviposition. When compared with temephos, *L. petiolata* EO showed a higher oviposition deterrent activity (24.9% EA (effective attractancy) and 0.1 OAI) against *An. minimus* females.

Against *Ae. albopictus* females, *L. petiolata* EO at all tested concentrations showed a high oviposition deterrent activity, not as high as it was against *An. minimus* but higher against all of the other tested species.

In addition, the EO at all tested concentrations also showed a high oviposition deterrent activity against *Ae. albopictus* females with %ER ranging from 75.0 to 100% and OAI ranging from -0.6 to -1.0, whereas temephos did not show an effective oviposition deterrent activity against *Ae. albopictus* (0.4%ER and -0.1OAI). *Ae. aegypti* females ranked third out of the four mosquito species tested in sensitivity to *L. petiolata* EO (in terms of oviposition deterrent activity), with ER ranging from 89.7 to 97.0% and OAI ranging from

-0.8 to -0.9. Temephos did not show an effective oviposition deterrent activity against *Ae. albopictus* females (0.03% ER and -0.01 OAI). *Cx. quinquefasciatus* females ranked the last out of all tested species in terms of their oviposition activity deterred by *L. petiolata* EO. *L. petiolata* EO at 5 and 10% showed % ER of 18.5 and 94.6% and OAI of -0.1 and -0.9, respectively, but 1% *L. petiolata* EO showed %EA of 52.3%. Similar to the EO at a low concentration, temephos did not show an effective oviposition deterrent activity against *Cx. quinquefasciatus* females (8.6% ER and -0.1OAI). To stress, *L. petiolata* EO at 5 and 10% deterred the ovipositioning of all four tested mosquito species, i.e., the number of eggs laid in the treatment cups was significantly lower than laid in the non-treatment cups, whereas temephos was not shown.



**Figure 2.** Oviposition activity index (OAI) values of *L. petiolata* EO at three concentrations (1, 5 and 10%) against *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *An. minimus*, and *Cx. quinquefasciatus*

#### Ovicidal bioassay

The percentage hatching-inhibition rates of *L. petiolata* EO at 1, 5, and 10% against *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *An. minimus*, and *Cx. quinquefasciatus* eggs are presented in Table 3. *L. petiolata* EO at all tested concentrations exhibited a 100 % inhibition rate against *Cx. quinquefasciatus* eggs. In addition, 5 and 10% *L. petiolata* EO were highly toxic to *Ae. albopictus* and *An. minimus* eggs with a 100% inhibition rate, while the EO at 1% was toxic against *Ae. albopictus* and *An. minimus* eggs at 4.5 and 69.7% hatching-inhibition rate, respectively. However, *L. petiolata* EO at 1, 5 and 10% showed moderate toxicity against *Ae. aegypti* eggs with inhibition rates of 74.4, 79.2 and 87.2%, respectively. In contrast to the EO, temephos showed low toxicity to the eggs of all mosquito species tested, with inhibition rates ranging from 6.2 to 9.5%. Not surprisingly, the drinking water (negative control) showed no toxicity against mosquito eggs.

**Table 2.** Oviposition deterrent activities (OAI) values of *L. petiolata* EO at 1%, 5% and 10% concentrations and 1w/w temephos against *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *An. minimus* and *Cx. quinquefasciatus*

Mosquitoes species	Treatment	Conc. (%)	Number of eggs $\pm$ SD		OAI**	ER%	EA%	No. of eggs laid per female (in treatment cup)
			Treatment cup	Non-treatment cup				
<i>Ae. aegypti</i>	<i>L. petiolata</i> EO	1	75.0 $\pm$ 20.9*	731.0 $\pm$ 105.5	-0.8	89.7	-	5.0
		5	49.2 $\pm$ 17.5*	819.6 $\pm$ 65.7	-0.9	94.0	-	3.3
		10	31.6 $\pm$ 6.9*	1060.4 $\pm$ 150	-0.9	97.0	-	2.1
	temephos	1w/w	249.3 $\pm$ 32.1	256.1 $\pm$ 46.6	-0.01	0.03	-	17.3
<i>Ae. albopictus</i>	<i>L. petiolata</i> EO	1	148.6 $\pm$ 128.6*	595.8 $\pm$ 122.0	-0.6	75.0	-	9.9
		5	9.8 $\pm$ 6.7*	553.8 $\pm$ 160.2	-0.9	98.2	-	0.6
		10	0.0 $\pm$ 0.0*	599.4 $\pm$ 107.05	-1.0	100	-	0.0
	temephos	1w/w	308.3 $\pm$ 83.58	455.4 $\pm$ 171.98	-0.1	0.4	-	33.2
<i>An. minimus</i>	<i>L. petiolata</i> EO	1	0.0 $\pm$ 0.0*	533.6 $\pm$ 95.7	-1.0	100	-	0.0
		5	0.0 $\pm$ 0.0*	737.2 $\pm$ 175.8	-1.0	100	-	0.0
		10	0.0 $\pm$ 0.0*	610.2 $\pm$ 124.2	-1.0	100	-	0.0
	temephos	1w/w	395.3 $\pm$ 172.3	297.1 $\pm$ 129.31	0.1	-	24.9	26.3
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	<i>L. petiolata</i> EO	1	974.0 $\pm$ 72.4*	464.2 $\pm$ 97.9	0.4	-	52.3	64.9
		5	646.8 $\pm$ 72.3*	793.6 $\pm$ 64.4	-0.1	18.5	-	43.1
		10	62.2 $\pm$ 14.2*	1161.4 $\pm$ 192.0	-0.9	94.6	-	4.2
	temephos	1w/w	243.1 $\pm$ 31.1	266.0 $\pm$ 31.0	-0.1	8.6	-	16.2

\* Significant difference between treatment and non-treatment cups by paired t-test ( $P < 0.05$ )

\*\* The OAI ranges from -1 to +1; positive index value (+) indicates that the test solution was an attractant; negative index value (-) indicates that the test solution was a deterrent; and 0 indicates a neutral response, OAI = Oviposition Active Index; ER = Effective Repellency; EA = Effective Attractancy

**Table 3.** Ovicidal activities of *L. petiolata* EO at 1%, 5% and 10% concentrations and 1w/w temephos against *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *An. minimus* and *Cx. quinquefasciatus* eggs

Mosquito Species	Inhibition rate (%)				
	1% conc	5% conc.	10% conc.	1w/w Temephos	drinking water
<i>Ae. aegypti</i>	74.4±5.3 <sup>d1</sup>	79.2±8.4 <sup>c</sup>	87.2±8.9 <sup>b</sup>	9.5±4.4 <sup>a</sup>	0.0
<i>Ae. albopictus</i>	4.5±2.2 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	9.4±10.4 <sup>b</sup>	0.0
<i>An. minimus</i>	69.7±13.1 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	6.2±4.6 <sup>c</sup>	0.0
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	6.3±1.4 <sup>b</sup>	0.0

<sup>1</sup>Means in each row followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ , by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test)

### Larvicidal and pupicidal bioassay

The larvicidal activities of *L. petiolata* EO at 1, 5 and 10% concentration against fourth instar larvae of *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *An. minimus* and *Cx. quinquefasciatus* are presented in Table 4. *L. petiolata* EO at 1, 5 and 10% concentrations showed higher toxicity against fourth instar larvae at 10 min of exposure than at 5 min. At 10 min, *L. petiolata* EO at all tested concentrations was highly toxic to *An. minimus* larvae with 100% mortality, LC<sub>50</sub> value of 0.5%, and LT<sub>50</sub> values ranging from 2.4 to 9.1 min; the LC<sub>50</sub> against the larvae of *Cx. quinquefasciatus* was 0.7%, with a mortality rate ranging from 93.6 to 100%, and the LT<sub>50</sub> values ranging from 4.2 to 5.4 min; the LC<sub>50</sub> against the larvae of *Ae. aegypti* was 1.8%, with mortality ranging from 30.4 to 100%; the LT<sub>50</sub> values ranged from 3.6 to 15.4 min; lastly, the LC<sub>50</sub> against the larvae of *Ae. albopictus* was 2.8% with a mortality rate ranging from 0 to 100%; the LT<sub>50</sub> values ranged from 2.4 to 27.1 min. Temephos showed slight toxicity against the larvae of *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *An. minimus* and *Cx. quinquefasciatus* within 10 min of exposure. *L. petiolata* EO at all tested concentrations were able to control the larvae of all tested mosquito species, while temephos was not controlled.

The results of the pupicidal activity assay of *L. petiolata* EO against pupae of *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *An. minimus* and *Cx. quinquefasciatus* are presented in Table 5. *L. petiolata* EO at all tested concentrations (1, 5, and 10%) were more toxic to the pupae when they were exposed to each of them for 60 min than for 30 min. At 60 min, *L. petiolata* EO at all tested concentrations was highly toxic to *Cx. quinquefasciatus* pupae with a mortality rate ranging from 4.0 to 100%, LC<sub>50</sub> of 2.1%, and an LT<sub>50</sub> value ranging from 18.1 to 180.3 min; the LC<sub>50</sub> against the pupae of *An. minimus* and *Ae. albopictus* was 2.8%, with a mortality rate ranging from 0 to 100% and an LT<sub>50</sub> ranging from 0 to 6.3 min; the LC<sub>50</sub> against the pupae of *Ae. aegypti* was 3.2%, with a mortality rate ranging from 7.2 to 100% and an LT<sub>50</sub> ranging from 18.1 to 138.2 min. In contrast, temephos was not an effective larvicide against the pupae of *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *An. minimus*, and *Cx. quinquefasciatus*.

**Table 4.** LT<sub>50</sub>, LC<sub>50</sub>, and Mortality rate of *L. petiolata* EO at 1%, 5% and 10% concentrations against larvae of *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *An. minimus* and *Cx. quinquefasciatus* at 5 and 10 min

Mosquito species	Treatment	Conc. (%)	Mortality (%)±SD		LT <sub>50</sub> (min)	Confidence limit 95%		LC <sub>50</sub> (%) at 10 min	χ <sup>2</sup>
			5 min	10 min		LCL	UCL		
<i>Ae. aegypti</i>	<i>L. petiolata</i> EO	1	1.6±3.6 <sup>c</sup>	30.4±5.4 <sup>c</sup>	15.4	0.2	0.2		65.4
		5	87.2±7.2 <sup>b</sup>	99.2±1.8 <sup>b</sup>	4.8	0.06	0.1	1.8	153.4
		10	98.4±2.2 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	3.6	0.04	0.09		150.5
	temephos	1w/w	0.0±0.0	0.0±0.0	ns	-	-	-	-
<i>Ae. albopictus</i>	<i>L. petiolata</i> EO	1	0±0.0 <sup>b</sup>	0±0.0 <sup>b</sup>	27.1	0.4	0.5		51
		5	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	2.4	-0.1	0.1	2.8	178.9
		10	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	2.4	-0.1	0.1		178.9
	temephos	1w/w	0.0±0.0	0.0±0.0	ns	-	-	-	-
<i>An. minimus</i>	<i>L. petiolata</i> EO	1	0±0.0 <sup>b</sup>	100	9.1	-0.07	0.2		159.4
		5	100 <sup>b</sup>	100	2.4	-0.1	0.1	0.5	178.9
		10	100 <sup>b</sup>	100	2.4	-0.1	0.1		178.9
	temephos	1w/w	0.0±0.0	0.0±0.0	ns <sup>1/</sup>	-	-	-	-
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	<i>L. petiolata</i> EO	1	89.6±5.4 <sup>c</sup>	93.6±5.4 <sup>b</sup>	5.4	0.06	0.1		182.4
		5	95.2±4.4 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	4.8	0.05	0.1	0.7	190.2
		10	99.2±1.8 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	4.2	0.04	0.1		196.3
	temephos	1w/w	0.0±0.0	0.0±0.0	ns <sup>1/</sup>	-	-	-	-

All values were based on five replications; UCL= upper confidence limit; LCL = lower confidence limit; χ<sup>2</sup> = chi square; LC<sub>50</sub> = 50% lethal concentration.

<sup>1/</sup>ns = not computed by Probit analysis

**Table 5.** LT<sub>50</sub>, LC<sub>50</sub>, and Mortality rate of *L. petiolata* EO at 1%, 5% and 10% concentrations against pupae of *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *An. minimus* and *Cx. quinquefasciatus* at 30 min and 60 min

Mosquito species	Treatment	Conc. (%)	Mortality (%)±SD		LT <sub>50</sub> (min)	Confidence limit 95%		LC <sub>50</sub> (%) at 60 min	χ <sup>2</sup>
			30 min	60 min		LCL	UCL		
<i>Ae. aegypti</i>	<i>L. petiolata</i> EO	1	4.0±0.0	7.2±3.3	138.2	96.1	336.3	3.2	3.5
		5	52.0±5.7	89.6±9.2	30.3	24.0	36.5	3.2	25.6
		10	100	100	18.1	6.3	24.4	3.2	0.03
	temephos	1w/w	0	0	ns <sup>1/</sup>	-	-	ns	-
<i>Ae. albopictus</i>	<i>L. petiolata</i> EO	1	0	0	ns	-	-	2.8	-
		5	100	100	18.1	6.3	24.4	2.8	0.1
		10	100	100	18.1	6.3	24.4	2.8	0.1
	temephos	1w/w	0	0	ns	-	-	ns	-
<i>An. minimus</i>	<i>L. petiolata</i> EO	1	0	0	ns	-	-	2.8	-
		5	100	100	18.1	6.3	24.4	2.8	0.1
		10	100	100	18.1	6.3	24.4	2.8	0.1
	temephos	1w/w	0	0	ns	-	-	ns	-
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	<i>L. petiolata</i> EO	1	3.2±5.2	4.0±4.9	180.3	121.3	376.1	2.1	22.6
		5	89.6±6.1	100	24.2	6.2	24.4	2.1	3.9
		10	100	100	18.1	6.3	24.4	2.1	0.03
	temephos	1w/w	0	0	ns	-	-	ns	-

All values were based on five replications; UCL= upper confidence limit; LCL = lower confidence limit; χ<sup>2</sup> = chi square; LC<sub>50</sub> = 50% lethal concentration.  
<sup>1/</sup>ns = not computed by Probit analysis.

### **World Health Organization (WHO) susceptibility test**

The knockdown rate (KT<sub>50</sub>), mortality rate, susceptibility status, and lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of *L. petiolata* EO against females of *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *An. minimus* and *Cx. quinquefasciatus* are presented in Table 6. The mortality rate increased with increased EO concentration. Ten percent of *L. petiolata* EO was more toxic to females of the four mosquito species, with a 100% mortality rate than 5 % was (see Table 6). Against *An. minimus* females, 10 and 5 percent *L. petiolata* EO exhibited a mortality rate of 100% and a respective KT<sub>50</sub> of 0.7 and 17.3 min after 1 h of exposure. Their LC<sub>50</sub> was 2.9%, and the WHO susceptibility status of *An. minimus* against the 10% *L. petiolata* EO was susceptible. These results (KT<sub>50</sub> of 0.7 min) were better than 10% w/v cypermethrin (KT<sub>50</sub> of 3.7 min). Against *An. minimus* females, 1% *L. petiolata* EO and 1%w/v cypermethrin did not show an effective knockdown rate or mortality rate. Against *Ae. aegypti* females, *L. petiolata* EO at 1 and 5% were not fully effective, with a KT<sub>50</sub> at 1h ranging from 7.9 to 46.5 and a mortality rate at 24 h ranging from 10.4 to 61.2%. In contrast, 10% of *L. petiolata* EO showed the highest mortality rate, at 100%, against *Ae. aegypti* females with a KT<sub>50</sub> of 1.8 min and an LC<sub>50</sub> of 4.1 %. Its WHO susceptibility status was 'susceptible.' Against *Cx. quinquefasciatus* females, 10% *L. petiolata* EO provided the highest mortality rate of 100% at 24 h, a KT<sub>50</sub> of 2.9 min at 1 h, and an LC<sub>50</sub> of 5.8 % at 24 h. The susceptibility status of *Cx. quinquefasciatus* against 10% *L. petiolata* EO was "susceptible." In addition, 1 and 5% *L. petiolata* EO provided a mortality rate of 2.4 and 28.0% at 1 h and KT<sub>50</sub> values of 110.1 and 8.7 min, respectively. On the other hand, 10%w/v cypermethrin (KT<sub>50</sub> of 1.3 min) was better than 10% *L. petiolata* EO (KT<sub>50</sub> of 2.9 min) against *Cx. quinquefasciatus* females. On the other hand, against *Ae. albopictus* females, 10% of *L. petiolata* EO exhibited the highest mortality rate of 100% at 24 h, KT<sub>50</sub> of 0.7 min at 1 h, and LC<sub>50</sub> of 6.1 % at 24 h. The susceptibility status of *Ae. albopictus* against 10% *L. petiolata* EO was "susceptible." However, 5% conc of *L. petiolata* EO did not show a very high mortality rate at 1 h (44%), and 1% of *L. petiolata* EO was not effective against *Ae. albopictus* females. Ten percent (w/v) Cypermethrin (KT<sub>50</sub> of 5.3 min) was less effective than 10%*L. petiolata* EO (KT<sub>50</sub> of 0.7 min) against *Cx. quinquefasciatus* females.

**Table 6.**  $KT_{50}$ ,  $LC_{50}$  value, mortality rate and susceptibility status of *L. petiolata* EO concentrations and cypermethrin against *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *An. minimus* and *Cx. quinquefasciatus*

Treatment	Conc (%)	<i>Ae. aegypti</i>				<i>Ae. albopictus</i>				<i>An. minimus</i>				<i>Cx. quinquefasciatus</i>			
		$KT_{50}$ (min)	% Mortality at 24 h	Susceptibility status	$LC_{50}$ (%) at 24 h	$KT_{50}$ (min)	% Mortality at 24 h	Susceptibility status	$LC_{50}$ (%) at 24 h	$KT_{50}$ (min)	% Mortality at 24 h	Susceptibility status	$LC_{50}$ (%) at 24 h	$KT_{50}$ (min)	% Mortality at 24 h	Susceptibility status	$LC_{50}$ (%) at 24 h
<i>L. petiolata</i> EO	1	46.5	10.4±2.2 <sup>c</sup>	R	ns	0 <sup>c</sup>	R	ns	0 <sup>b</sup>	R	110.1	2.4±5.2 <sup>c</sup>	R				
	5	7.9	61.6±7.8 <sup>b</sup>	R	4.1	5.1	R	6.1	17.3	100 <sup>a</sup>	S	2.9	8.7	28.0±12.5 <sup>b</sup>	R	5.8	
	10	1.8	100 <sup>a</sup>	S	0.7	100 <sup>a</sup>	S	0.7	100 <sup>a</sup>	S	2.9	100 <sup>a</sup>	S				
cypermethrin	1	4.2	90.0±5.3 <sup>a</sup>	RS	ns	0 <sup>c</sup>	RS	ns	0 <sup>b</sup>	RS	4.1	92.0±4.0 <sup>a</sup>	RS				
	5	3	100 <sup>a</sup>	S	0.6	17.2	S	2.6	10.2	100 <sup>a</sup>	S	2.9	2.4	100 <sup>a</sup>	S	0.6	
	10	2.9	100 <sup>a</sup>	S	5.3	100 <sup>a</sup>	S	3.7	100 <sup>a</sup>	S	1.3	100 <sup>a</sup>	S				

$KT_{50}$ , 50% knockdown time;  $LC_{50}$ , 50% lethal concentration. Mean % mortality followed by the same letter in the same column is not significantly different (one-way ANOVA and Duncan's multiple range test). S, Susceptibility is defined as 98-100% mortality; RS, Resistance suspected is defined as 80-97% mortality, R, Resistance is defined as <80% mortality. <sup>1</sup>ns = not computed by Probit analysis.

## Discussion

The experimental results demonstrated that *L. petiolata* EO at 10% concentration is an effective oviposition deterrent, ovicidal, larvicidal, pupicidal, and adulticidal agent against *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *An. minimus* and *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes. Ten percent of *L. petiolata* EO exhibited a high effective repellency against gravid females of all tested mosquito species and a high inhibition rate against the eggs. These results are supported by the finding from Phukerd and Soonwera (2014) that 10% of *L. petiolata* EO exhibited a high repellent activity against females of *Cx. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti*. Muangmoon *et al.* (2019) also reported that *L. petiolata* EO showed a repellency activity against *Ae. aegypti* females. Along with the same trend, Uniyal *et al.* (2016) reported that 100 mg/L of *L. cubeta* EO showed a high oviposition deterrent activity against *Ae. aegypti* females with 87.17% effective repellency. Regarding ovicidal activity, our results agree well with those from Phasomkusolil and Soonwera (2012) and Cotchakaew and Soonwera (2019). They reported that essential oils from the *Cananga odorata* flower, *Curcuma zedoaria* rhizome, and *Ocimum basilicum* leaves were highly toxic to the eggs of *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *An. dirus*, *An. minimus*, and *Cx. quinquefasciatus*, with  $EC_{50} < 1.0$  %. Wang *et al.* (2016) reported that *L. cubeta* EO was highly toxic to the eggs of *Callosobruchus chinensis* (Bruchidae: Coleoptera), with an  $LC_{50}$  of 3.78  $\mu$ l/L. In addition, 10% *L. petiolata* EO was highly toxic to the larvae, pupae, and adults of all tested mosquito species. This results are supported by findings from Muangmoon *et al.* (2018) that *L. petiolata* EO exhibited high toxicity to the larvae ( $LD_{50}$  of 27.7 mg/L) and adult ( $LD_{50}$  of 2.4  $\mu$ g/mg) of *Ae. aegypti*. Along the same line, Sinthusiri and Soonwera (2013) reported that 5 and 10% of *L. petiolata* EO exhibited high toxicity against *Musca domestica* adults ( $KT_{50}$  ranking of 16.7 to 22.8 min). While Dai *et al.* (2020) also reported that 100  $\mu$ g/mL of *L. umbellata* and *L. iteodaphne* EOs was highly toxic to the larvae mortality of *Cx. quinquefasciatus* 100% ( $LC_{50}$  of 54.17 and 23.78  $\mu$ g/mL) In addition, several *Litsea* EOs have shown good efficacy in repelling various types of mosquitoes compared to synthetic insecticides.

Identified by GC-MS, thirteen monoterpenes were found in *L. petiolata* EO, mainly 2-Nonanone (54.69%), 2-Decanone (31.30%), Butanal (6.81%), 1,8-Cineole (2.74%), and 1,3-Oxazin-2-one (2.09%). The percentage of 2-Nonanone) in the chemical profile that we obtained was different from that reported by Thongthip *et al.* (2017) and Muangmoon *et al.* (2018). The major composition differences may be affected by several factors such as harvesting time, soil structure and fertilizer, and other environmental factors. Monoterpenes from *L. petiolata* EO are volatile and lipophilic with low molecular weight, so they can penetrate through insect cuticles and enter their

2224

tracheae system, causing mortality (El-Wakeil, 2013). Moreover, monoterpenoids from plant EOs are much less toxic to mammals and show only short persistence in the environment (Ebadollahi, 2011; El-Wakeil., 2013) than synthetic insecticides like temephos, an organophosphate or cypermethrin, a pyrethroid. These synthetic insecticides have been extensively used as mosquito control agents (Naqqash *et al.*, 2016). Unfortunately, extended and repeated applications of synthetic insecticide have led to serious problems for humans, animals and the environment. For example, they are highly toxic to fish and other aquatic animals; they cause pruritus, numbness and difficulty breathing in humans; and they are possible human carcinogens (Sisay *et al.*, 2019). To make matters worse, the usage of chemicals is liable to the development of insect resistance (Mouhamadou *et al.*, 2019). Newer generations of insects will be harder to control. To remedy these issues, we suggest using a natural product like *L. petiolata* EO for controlling mosquitoes. It is a preferable and safer alternative to using chemical insecticides.

Essential oil from *L. petiolata* was effective at controlling four mosquito species at all four stages of their life cycle, showing a full potential for development into a highly effective and eco-friendly mosquito-controlling agent. Moreover, it was tested to be more effective than cypermethrin and temephos, widely used synthetic chemicals, in terms of effectiveness against mosquitoes at all stages of their life cycle (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *An. minimus* and *Cx. quinquefasciatus*).

### Acknowledgments

The financial support for this study was from King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Bangkok, Thailand, in a grant for KMITL Doctoral Scholarship (Grant No. KDS 2018/001 and KDS 2021/002). We would also like to thank Mr. Pratana Kangsadal, a KMITL Proofreader, for revising the English of this manuscript.

### References

- Arokiyaraj, S., Kumar, V. D., Elakya, V., Kamala, T., Park, S., Ragam, M., Saravanan, M., Bououdina, M., Arasu, V., Kovendan, K. and Vincent, S. (2015). Biosynthesized silver nanoparticles using floral extract of *Chrysanthemum indicum* L. potential for malaria vector control. *Environmental Science and Pollution Research*, 22:9759-9765.
- Chaiphongpachara, T., Bunyuen, P. and Chansukh, K. K. (2018). Development of a more effective mosquito trapping box for vector control. *The Scientific World Journal*, 28:1-8.
- Chantawee, A. and Soonwera, M. (2018). Efficacies of four plant essential oils as larvicide, pupicide and oviposition deterrent agents against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* Linn., (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8:217-225.

- Cotchakaew, N. and Soonwera, M. (2018). Efficacise of Essential oils from Illiciaceae and Zingiberaceae plant as oviposition deterrent, ovicidal, and adulticidal agents against females *Aedes albopictus* (Skuse) and *Anopheles minimus* (Theobald). *International Journal of Agricultural Technology*, 5:631-652.
- Cotchakaew, N. and Soonwera, M. (2019). Toxicity of several botanical essential oils and their combinations against females of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Anopheles minimus* (Theobald): Oviposition deterrent, ovicidal and adulticidal efficacies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 9:29-39.
- Dai, D. N., Nguyen, D. H., Nguyen, T. C., Le, T. H., Nguyen, H. H. and Isiaka, A. O. (2020). Chemical constituents of the essential oils from the leaves of *Litsea umbellate* and *Litsea iteodaphne* and their mosquito larvicidal activity. *Journal of essential oil Bearing Plants*, 23:1334-1344.
- Demirak, M. S. and Emal, C. (2022). Plant-based bioinsecticides for mosquito control: impact on insecticide resistance and disease transmission. *Insects*, 13:162.
- Dua, V. K., Pandey, A. C. and Dash, A. P. (2010). Adulticidal activity of essential oil of *Lantana camara* leaves against mosquitoes. *Indian Journal of Medical Research*, 3:434-439.
- Ebadollahi, A. (2011). Iranian plant essential oils as sources of natural insecticide agents. *International Journal of Biological Chemistry*, 5:266-290.
- El-Wakeil, N. (2013). Botanical pesticides and their mode of action. *Gesunde Pflanzen*, 65: 125-149.
- Forstinus, N. O., Ikechukwn, E. N., Emenike, P. M. and Osita, O. (2017). Synthetic insecticides, phytochemicals and mosquito resistance. *Academia Journal of Biotechnology*, 5:118-125.
- Govindarajan, M., Vaseeharan, B., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., Al-anbr, M. N., Alyahya, S. A., Maggi, F. and Benelli, G. (2018). High efficacy of (Z)- $\gamma$ -bisabolene from the essential oil of *Galinsoga parviflora* (Asteraceae) as larvicide and ovipositiondeterrent against six mosquito vectors. *Environmental Science and Pollution Research*, 25:10555-10566.
- Mouhamadou, C. S., Souza, S. S., Fodjo, B. K., Zoh, M. G., Bil, N. K. and Koudou, B. G. (2019). Evidence of insecticide resistance selection in wild *Anopheles coluzzii* mosquitoes due to agricultural pesticide use. *Infectious Diseases of Poverty*, 8:1-8.
- Moxon, C. A., Gibbins, M. P., McGuinness, D., Milner, D. A. and Marti, M. (2019). New insights into malaria pathogenesis. *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease*, 15:315-343.
- Muangmoon, R., Junkum, A., Chaithong, U., Jitpakdi, A., Riyong, D., Wannasan, A., Somboon, P. and Pitasawat, B. (2018). Natural larvicides of botanical origin against dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 49:227-239.
- Muangmoon, R., Champakaew, D., Junkum, A., Chaithong, U., Jitpakdi, A., Riyong, D., Wannasan, A., Intirach, J., Chansang, A., Somboon, P. and Pitasawat, B. (2019). Mosquitocidal potential and chemical composition of essential oil and ethanolic extract of *litsea petiolata* hook. f. (lauraceae) from northern Thailand against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 50: 486-499.
- Muthukumaran, U., Govindarajan, M. and Rajeswary, M. (2015). Mosquito larvicidal potentialof silver nanoparticles synthesized using *Chomelia asiatica* (Rubiaceae) against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 114:989-999.

2226

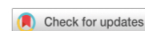
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Mustafa, M. S., Rasotgi, V., Jain, S., and Gupta, V. I. (2015). Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*, 71:67-70.
- Naqqash, M. N., Gökçe, A., Bakhsh, A. and Salim, M., (2016). Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. *Parasitology Research*, 115:1363-1373.
- Paixao, E. S., Teixeira, M. G. and Rodrigues, L. C. (2018). Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and reemerging arboviral diseases. *Bmj Global Health*, 3:1-6.
- Phasomkusolil, S. and Soonwera, M. (2012). The effects of herbal essential oils on the oviposition deterrent and ovicidal activities of *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Herrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Thopical Biomedicine*, 29:138-150.
- Phukerd, U. and Soonwera, M. (2013). Insecticidal effect of essential oils from *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and *Curcuma zedoaria* rose against dengue vector mosquito, *Aedes aegypti* L. *Journal of Agricultural Technology*, 9:1573-1583.
- Pompon, J., Manuel, M., Ng, G. K., Wong, B., Shan, C., Manokaran, G., Soto-Acosta, R., Bradrick, S. S., Ooi, E. E., Missé, D., Shi, P. Y. and Garcia-Blanco, M. A. (2017). Dengue subgenomic flaviviral RNA disrupts immunity in mosquito salivary glands to increase virus transmission. *PLOS Pathogens*, 13:1-27.
- Rai, P., Bharati, M., Subba, A. and Saha, D. (2019). Insecticide resistance mapping in the vector of lymphatic filariasis, *Culex quinquefasciatus* Say from northern region of West Bengal, India. *Plos one*, 14:1-17.
- Shaan, E. A. and Canyon, D. V. (2018). Mosquito oviposition deterrents. *Environmental Science and Pollution Research*, 25:10207-10217.
- Sharma, S., Neha, L., Shweta, G. and Lalit, M. (2022). Evaluation of larval toxicity, mode of action and chemical composition of citrus essential oils against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 39:102284.
- Singh, R. K., Dhiman, R. C. and Mittal, P. K. (2006). Mosquito larvicidal properties of *Momordica charantia* Linn (Family: Cucurbitaceae). *Journal of Vector Borne Diseases*, 43:88-91.
- Sinthusiri, J. and Soonwera, M. (2013). Efficacy of herbal essential oils as insecticides against the housefly, *Musca domestica* L. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 44:188-196.
- Sisay, B., Tefera, T., Wakgari, M., Ayalew, G. and Mendesil, E. (2019). The efficacy of selected synthetic insecticides and botanicals against fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in Maize. *Insects*, 10:1-14.
- Sonkong, K., Chaiklieng, S., Neave, P. and Suggaravetsiri, P. (2015). Factors affecting delay in seeking treatment among malaria patients along Thailand-Myanmar border in Tak Province, Thailand. *Malaria Journal*, 14:1-8.
- Soonwera, M. and Phasomkusolsi, S. (2017). Adulticidal, larvicidal, pupicidal and oviposition deterrent activities of essential oil from *Zanthoxylum limonella* Alston (Rutaceae) against *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7:967-978.
- Tahghighi, A., Naseh, M. R., Navid, D. D., Hamzeh, A., Raziye, A., Fateh, K. and Saeed, Y. (2019). GC-MS analysis and anti-mosquito activities of *Juniperus virginiana* essential oil against *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 9:168-175.

- Thongthip, P., Atiphasaworon, P., Monggoot, S. and Pripdeevech, P. (2017). In vitro antibacterial activity and essential oil composition of *Litsea petiolata* Hook. f. leaves. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7:94-98.
- Uniyal, A., Tikar, S. N., Agrawal, O. P., Sukumaran, D. and Veer, V. (2016). Larvicidal and oviposition activity of twenty three essential oil against *Aedes aegypti*. *International Journal of Mosquito Research*, 3:14-21.
- Wang, Z. Y., Lu, Y. J. and Zhoa, Y. R. (2016). Fumigation action of four plant oils against eggs of *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Essential Oil Bearing Plant*, 19:1394-1403.
- World Health Organization (WHO). (2016). Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. 25 June 2018. Available Source: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250677/9789241511575eng.pdf?sequence=1>.
- World Health Organization (WHO) (2018). Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes – 2nd ed. Geneva: World Health Organization. Available Source: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle>
- World Health Organization (WHO) (2020). Vector-borne diseases, 27 April 2020. Available Source: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>.
- Wu, H., Zhangand, M. and Yang, Z. (2019). Repellent activity screening of 12 essential oils against *Aedes albopictus* Skuse: Repellent liquid preparation of *Mentha arvensis* and *Litsea cubeba* oils and bioassay on hand skin. *Industrial Crops and Products*, 128:46.

(Received: 2 August 2022, accepted: 3 September 2022)

# scientific reports



## OPEN Ovicidal toxicity of plant essential oils and their major constituents against two mosquito vectors and their non-target aquatic predators

Tanapoom MOUNGTHIPMALAI, Cheepchanok PUWANARD, Jirapon AUNGTIKUN, Sirawut SITTICHOK & Mayura SOONWERA

Plant essential oil (EO) is a natural alternative to synthetic chemical insecticides for mosquito control. EOs from *Citrus aurantium* L., *Cymbopogon citratus* (Stapf.), and *Cinnamomum verum* (J. Presl.) were selected for topical assay of their ovicidal activity against *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (Skuse). Their efficacy was compared to that of 1% (w/w) temephos. In addition, their non-toxicity against aquatic mosquito predators, *Poecilia latipinna* and *Poecilia reticulata*, was tested. Found by GC–MS analysis, the major constituent of *C. verum* EO was *trans*-cinnamaldehyde, of *C. aurantium* EO was *D*-limonene, and of *C. citratus* EO was geraniol. Both *C. verum* EO and *trans*-cinnamaldehyde at a high concentration (30,000 ppm) exhibited high ovicidal activity against *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* eggs after 48 h of incubation with an inhibition rate of 91.0–93.0% for *C. verum* EO and 96.7–95.2% for *trans*-cinnamaldehyde. The combination of *C. verum* EO + geraniol exhibited the strongest synergistic inhibition activity (100%) against the two mosquito vectors and was five times more effective than temephos. Moreover, they were not toxic to the non-target fishes. As a safe ovicidal agent for mosquito egg control, the combination of *C. verum* EO + geraniol has excellent potential.

### Abbreviations

EO	Essential oil
EOs	Essential oils
BI	Biosafety index
EII	Effective inhibition rate index
SI	Synergistic index

*Aedes aegypti* L. and *Aedes albopictus* (Skuse) mosquitoes that have bitten viral-infected humans transmit the disease to other humans. These mosquitoes are major vectors of arboviruses such as Zika, yellow fever, dengue, and chikungunya<sup>1–3</sup>. Dengue is one of the most dangerous arboviruses, causing high morbidity and mortality rates in several countries around the world including many parts of Thailand<sup>2,4</sup>. According to a report by the Thai Ministry of Public Health, there were 9084 and 19,380 total dengue cases in Thailand, in 2021 and 2022, respectively, with 9 and 17 fatalities, calculated into a morbidity rate of 0.06% and 0.09%, respectively<sup>5</sup>. Since vaccines and other drugs have limited effectiveness in controlling dengue, controlling the population of mosquitoes with pesticides is the most effective measure to avoid this contagious disease<sup>6</sup>.

Controlling the mosquitoes at their embryonic and larval stages is the key strategy in controlling mosquito populations<sup>6–8</sup>. Generally, temephos, a common synthetic organophosphate insecticide, is used extensively around the world, especially in Thailand, for killing mosquito larvae. Unfortunately, its efficacy has been reduced drastically because populations of mosquitoes have developed resistance to it<sup>1</sup>. Moreover, temephos incurs serious

Department of Plant Production Technology, School of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand. ✉email: mayura.so@kmitl.ac.th; mayura.soon@gmail.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

negative side effects. It causes irreversible damage to non-target aquatic predators and humans, thus limiting its use<sup>9,10</sup>. In this glum context, many researchers have urgently developed alternative strategies that are safer for humans and the environment<sup>7</sup>.

Because plant essential oils (EOs) are natural substances, they and their phytochemical constituents are good, green alternatives to temephos. They are not harmful or only slightly harmful to mammals and non-target aquatic predators of mosquitoes at a practical pesticidal level, plus they degrade rapidly in the environment<sup>3,11</sup>. The EOs of *Cinnamomum verum* (J. Presl.), *Citrus aurantium* L., and *Cymbopogon citratus* (Stapf.) were investigated in this study. They have been reported safe for humans and mammals as well as having low toxicity on non-target predators because they have been long used as feed in food industry as well as antibiotic and antioxidant in folk medicine for thousands of years<sup>12–14</sup>.

Regarding plant EOs insecticidal efficacy, they are strongly insecticidal against many insect pests, such as *Ae. aegypti* (Order Diptera)<sup>15</sup>, *Musca domestica* (Order Diptera)<sup>16</sup>, *Haemaphysalis longicornis* (Order Ixodidae)<sup>17</sup>, *Pediculus humanus capitis* (Order Phthiraptera)<sup>18</sup>, *Spodoptera littoralis* (Order Lepidoptera)<sup>19</sup>, and *Periplaneta americana* (Order Blattodea)<sup>20</sup>. Specifically, EOs from *C. verum*, *Coccinia indica*, *C. citratus*, *Illicium verum* (Hook.f.), and *Moringa oleifera* (Lam.) and their major constituents (geranial and D-limonene) exhibited strong ovicidal activity against many mosquitoes species like *Anopheles indica*<sup>7</sup>, *Ae. aegypti*<sup>21–23</sup>, and *Culex quinquefasciatus*<sup>24</sup> and housefly (*M. domestica*)<sup>16</sup> with an LC<sub>50</sub> ranging from 3.31 to 303,200 ppm. Furthermore, combined formulations of EOs and EO constituents showed even higher efficacy than their individual EOs<sup>25,26</sup>. For example, Soonwera et al.<sup>27</sup> reported that a combined *trans*-anethol + *I. verum* EO formulation provided complete mortality against *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* larvae. Another group of researchers, Andrade-Ochoa et al.<sup>28</sup>, showed that a combined *trans*-cinnamaldehyde + *trans*-anethol formulation and a combined *trans*-cinnamaldehyde + (-)-limonene formulation were highly insecticidal against *Cx. quinquefasciatus* larvae and pupae, synergistically high. Youssefi et al.<sup>29</sup> stated that a combination of thymol + carvacrol provided strong ovicidal and larvicidal activities against *Cx. pipiens*.

To conclude, D-limonene, geranial, and *trans*-cinnamaldehyde show several dominant activities for mosquito and other insect pest control. Single and combined formulations of D-limonene showed a strong larvicidal activity against *Ae. aegypti*<sup>29</sup> and also shown a strong pupicidal activity against *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*<sup>27</sup>. Geranial showed a strong adulticidal activity against *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, and *M. domestica*<sup>30,31</sup>. Single and combined formulations of *trans*-cinnamaldehyde also showed a strong adulticidal activity against *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*<sup>4,15</sup>.

From these pieces of studies, our group was inspired to investigate the egg mortality against *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* incurred by EOs from *C. aurantium*, *C. citratus*, and *C. verum*, their major constituents, and several of their combinations. In addition, the biosafety of the EO treatment was evaluated against two common, non-target predators of mosquitoes, *Poecilia latipinna* and *Poecilia reticulata* fishes.

## Results

**Essential oils and GC/MS analysis.** GC-MS analysis of EOs was necessary because different parts of the three plant species—*C. aurantium*, *C. citratus*, and *C. verum* EOs—gave different EO chemical profiles, and hence can make an accurate efficacy comparison between studies meaningless.

All EOs were pale yellow. Table 1 is a list of the components of essential oils discovered by GC-MS. The highest percentage of extraction yield, at 1.30% v/w, was recovered from *C. aurantium* EO, followed by from *C. citratus* EO (1.14% v/w), and from *C. verum* EO (1.01% v/w). *C. aurantium* EO, 21 chemical constituents were found to compose 96.67% of its chemical composition, D-limonene (78.15%) was the major constituent. Some other main constituents were linalool (4.80%), δ-3-carene (2.40%), and β-myrcene (2.00%). For *C. citratus* EO, 9 chemical constituents were found to compose 96.54% of its chemical profile. The major constituent was geranial (45.41%). A few other main constituents were neral (24.80%), 1,8-cineole (10.59%), and geraniol (4.70%). For *C. verum* EO contained 14 constituents as 97.26% of its chemical profile. *Trans*-cinnamaldehyde (73.21%) was the major constituent. Some other main constituents were benzyl alcohol (12.87%), cinnamyl acetate (2.50%), and eugenol (2.35%).

**Toxicity against target mosquito.** The following ovicidal activity indexes for each formulation against the two mosquito species: inhibition rate, 50% Lethal time (LT<sub>50</sub>), 50% Lethal concentration (LC<sub>50</sub>), effective inhibition rate index (EII) versus temephos are tabulated in Tables 2 and 3. The table also includes the determined synergistic index (SI) of each formulation. For example, from Table 2, *C. aurantium* EO at 30,000 ppm alone provided an egg inhibition rate of 78.1%, an LT<sub>50</sub> of 55.3 h, and an LC<sub>50</sub> of 15,071.7 h, with EII = 2.56 against *Ae. aegypti*. From Table 3, *C. aurantium* EO at 30,000 ppm alone provided an egg inhibition rate of 76.3%, an LT<sub>50</sub> of 51.7 h, and an LC<sub>50</sub> of 16,592.2 h, with EII = 2.59 against *Ae. albopictus*. Regarding the synergistic index (SI) column, since this formulation is of single *C. aurantium* EO, the synergistic index of combined formulation is not applicable. Several individual EOs and EO constituents at 30,000 ppm showed a significantly higher efficacy than at a lower concentration. The highest egg inhibition rate of individual EOs was at 91.0% against *Ae. aegypti* and 93.0% against *Ae. albopictus*, achieved by *C. verum* EO. At 30,000 ppm. It provided an LT<sub>50</sub> of 29.7 h against *Ae. aegypti* and 31.1 h against *Ae. albopictus*. In contrast, at 10,000 ppm, *C. aurantium* EO provided the lowest egg inhibition rate, at 59.7%, against *Ae. aegypti* and 53.2% against *Ae. albopictus*, with an LT<sub>50</sub> of 83.6 h and 85.8 h, respectively. The highest egg inhibition rate of EO constituents was 96.7% against *Ae. aegypti* and 95.2% against *Ae. albopictus*, achieved by *trans*-cinnamaldehyde, the major constituent of *C. verum* EO. At 30,000 ppm, *trans*-cinnamaldehyde provided an LT<sub>50</sub> of 24.3 h against *Ae. aegypti* and 24.7 h against *Ae. albopictus*. In contrast, at 10,000 ppm, D-limonene, the major constituent of *C. aurantium* EO, provided the lowest egg inhibition rate against *Ae. aegypti* at 76.4% and against *Ae. albopictus* at 72.1%, with an LT<sub>50</sub> of 39.5 h

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

No	Constituent <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	KI <sup>c</sup>	Percentage of total composition			ID <sup>d</sup>
				<i>C. aurantium</i>	<i>C. citratus</i>	<i>C. verum</i>	
1	α-Pinene	949	949	1.17 ± 0.29	3.43 ± 0.06	0.80 ± 0.04	RI,MS,Std
2	Camphene	952	952	–	–	0.61 ± 0.04	RI,MS,Std
3	Sabinene	967	969	0.20 ± 0.01	–	–	RI,MS,Std
4	β-pinene	979	979	0.91 ± 0.03	–	–	RI,MS,Std
5	β-Myrcene	991	991	2.00 ± 0.05	–	0.52 ± 0.11	RI,MS,Std
6	α-Phellandrene	1003	1003	0.30 ± 0.07	–	0.42 ± 0.11	RI,MS,Std
7	δ-3-Carene	1006	1006	2.40 ± 0.85	–	–	RI,MS,Std
8	Benzyl alcohol	1009	1009	–	–	12.87 ± 0.69	RI,MS,Std
9	α-Terpinene	1012	1012	–	–	0.21 ± 0.09	RI,MS,Std
10	Limonene	1032	1032	78.15 ± 5.19	–	0.64 ± 0.09	RI,MS,Std
11	1,8-Cineole	1033	1033	–	10.59 ± 0.03	0.61 ± 0.06	RI,MS,Std
12	(E)-β-Ocimene	1050	1050	1.13 ± 0.16	–	–	RI,MS,Std
13	γ-Terpinene	1052	1052	–	0.10 ± 0.01	–	RI,MS,Std
14	Terpinolene	1089	1088	0.60 ± 0.05	–	–	RI,MS,Std
15	Linalool	1101	1101	4.80 ± 0.80	0.81 ± 0.01	–	RI,MS,Std
16	Terpinen-4-ol	1179	1179	0.17 ± 0.02	–	–	RI,MS,Std
17	α-Terpineol	1190	1191	0.92 ± 0.04	–	–	RI,MS,Std
18	Neral	1216	1216	0.75 ± 0.03	24.80 ± 4.62	–	RI,MS
19	trans-Cinnamaldehyde	1221	1221	–	–	73.21 ± 2.73	RI,MS,Std
20	Nerol	1233	1232	0.10 ± 0.01	–	–	RI,MS,Std
21	Geraniol	1235	1235	0.22 ± 0.08	4.70 ± 0.00	–	RI,MS,Std
22	Geranial	1246	1246	0.43 ± 0.07	45.41 ± 2.26	–	RI,MS,Std
23	Linalyl acetate	1262	1261	1.65 ± 0.32	–	–	RI,MS,Std
24	Eugenol	1355	1355	–	–	2.35 ± 0.86	RI,MS,Std
25	Neryl acetate	1368	1368	0.05 ± 0.01	–	–	RI,MS,Std
26	α-Copaene	1378	1378	–	–	1.81 ± 0.41	RI,MS
27	Geranyl acetate	1381	1381	0.19 ± 0.02	4.30 ± 0.02	–	RI,MS,Std
28	Cinnamyl acetate	1414	1414	–	–	2.50 ± 0.53	RI,MS,Std
29	Cinnamic acid	1462	1462	–	–	0.51 ± 0.19	RI,MS,Std
30	trans-Nerolidol	1566	1565	0.40 ± 0.01	–	–	RI,MS,Std
31	Caryophyllene oxide	1581	1581	0.13 ± 0.02	2.40 ± 0.02	–	RI,MS,Std
32	Cadalene	1657	1658	–	–	0.20 ± 0.05	RI,MS
	Total identified (%)			96.67	96.54	97.26	
	Color			Pale yellow	Pale yellow	Pale yellow	
	Yield (% v/w)			1.30	1.14	1.05	

**Table 1.** Chemical composition of the essential oils *Cinnamomum verum*, *Citrus aurantium*, and *Cymbopogon citratus*. <sup>a</sup>Constituents listed in order of elution in the HP-5MS column. <sup>b</sup>RI Retention index calculated through the retention time in relation to the series of C<sub>7</sub>–C<sub>30</sub> n-alkanes. <sup>c</sup>KI Kovats retention index is taken from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. <sup>d</sup>ID identification method: std: substance matching was done with a readily available analytical standard (Sigma-Aldrich), RI RI value matching with those reported in NIST 17<sup>54</sup>, MS a mass spectrum matching with chemicals in the computer mass library of Adams<sup>53</sup>.

and 36.3 h, respectively. To conclude, *C. verum* EO exhibited a stronger ovicidal activity (lower LC<sub>50</sub>) against *Ae. aegypti*, but *trans*-cinnamaldehyde was stronger against *Ae. albopictus*.

Moreover, the ovicidal efficacy of all combined formulations against the eggs of the two mosquito vectors was greater than the efficacy of individual EOs and EO constituents, with a synergistic index (SI) in the range of 0.26–0.49. The highest egg inhibition rate was at 100% against both *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*, achieved by the combination of *C. verum* EO + geranial (2:1) 10,000 ppm. It provided an LT<sub>50</sub> of 17.7 h against *Ae. aegypti* and an LT<sub>50</sub> of 16.9 h against *Ae. albopictus*. In contrast, the combination of *C. aurantium* EO + geranial (2:1) 10,000 ppm provided the lowest egg inhibition rate, at 81.0% against *Ae. aegypti* and 80.0% against *Ae. albopictus*, with an LT<sub>50</sub> of 35.8 h and 34.3 h, respectively. To conclude, *C. verum* EO + geranial (2:1) 10,000 ppm exhibited a stronger ovicidal activity against both *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*, in terms of low LC<sub>50</sub>.

Regarding the effective inhibition rate index (EII), every combination of separate EOs and EO components as well as all combined formulations showed higher than 1.0 EII—they were more toxic to the eggs of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* than 1 ppm temephos was.

Treatment	Inhibition rate (%) ± SD	LT <sub>50</sub> (h) (LL-UL)	R <sup>2</sup>	LC <sub>50</sub> (ppm) (LL-UL)	R <sup>2</sup>	EII	SI	Status
<i>C. aurantium</i> EO 10,000 ppm	59.7 ± 4.5f	83.6 (60.6–155.8)	0.275	15,071.7 (11,735.3–18,639.5)	0.527	1.96	–	–
<i>C. aurantium</i> EO 30,000 ppm	78.1 ± 3.8d	55.3 (40.2–73.6)	0.338					
D-Limonene 5000 ppm	36.4 ± 5.8h	41.5 (36.9–47.6)	0.581					
D-Limonene 10,000 ppm	76.4 ± 2.3d	39.5 (35.4–44.8)	0.429	14,604.8 (12,221.9–17,408.3)	0.711	1.19	–	–
D-Limonene 30,000 ppm	84.0 ± 1.9cd	33.8 (24.7–40.5)	0.431					
<i>C. citratus</i> EO 10,000 ppm	72.9 ± 2.0c	76.2 (67.6–89.4)	0.494	11,170.2 (7659.4–14,747.1)	0.339	2.39	–	–
<i>C. citratus</i> EO 30,000 ppm	88.0 ± 2.5c	32.1 (25.3–42.4)	0.432					
Geranial 5000 ppm	40.0 ± 5.9g	36.3 (29.9–45.9)	0.443					
Geranial 10,000 ppm	86.4 ± 3.6c	33.4 (26.5–41.1)	0.421	9907.8 (7260.1–12,843.8)	0.552	1.31	–	–
Geranial 30,000 ppm	90.6 ± 1.6bc	30.2 (24.7–38.5)	0.698					
<i>C. verum</i> EO 10,000 ppm	85.1 ± 2.0cd	34.1 (27.9–43.3)	0.412	9069.4 (5126.7–12,857.9)	0.508	2.79	–	–
<i>C. verum</i> EO 30,000 ppm	91.0 ± 2.5bc	29.7 (25.1–33.0)	0.719					
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde 5000 ppm	49.4 ± 1.8fg	35.8 (30.0–44.6)	0.431	7205.9 (5190.2–10,276.4)	0.148	1.62	–	–
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde 10,000 ppm	89.2 ± 5.3c	31.4 (27.2–42.1)	0.482					
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde 30,000 ppm	96.7 ± 3.9b	24.3 (20.1–29.9)	0.726					
<i>C. verum</i> EO + geranial (2:1) 10,000 ppm	100a	17.7 (12.4–26.6)	0.881	2308.2 (982.1–3001.3)	0.319	3.28	0.29	Synergy
<i>C. citratus</i> EO + D-limonene (2:1) 10,000 ppm	94.5 ± 1.6b	28.6 (22.9–36.5)	0.414	4212.3 (2256.1–6101.2)	0.422	3.10	0.43	Synergy
<i>C. aurantium</i> EO + geranial (2:1) 10,000 ppm	81.0 ± 5.3cd	35.8 (29.8–44.6)	0.431	4306.4 (2581.1–6233.1)	0.321	2.90	0.49	Synergy
D-Limonene + geranial (1.5:1.5) 10,000 ppm	95.5 ± 5.9c	28.6 (22.9–36.5)	0.414	4200.1 (2011.0–3972.6)	0.409	3.13	0.49	Synergy
Geranial + <i>trans</i> -cinnamaldehyde (1.5:1.5) 10,000 ppm	100a	20.4 (14.1–31.7)	0.459	2901.4 (1583.4–4030.2)	0.320	3.28	0.37	Synergy
D-Limonene + <i>trans</i> -cinnamaldehyde (1.5:1.5) 10,000 ppm	100a	22.9 (17.7–30.9)	0.408	2916.0 (1905.4–4022.4)	0.331	2.66	0.26	Synergy
Temephos (positive control) 1 ppm	30.5 ± 4.6i	60.2 (51.3–77.4)	0.351			–	–	–
Ethyl alcohol (negative control)	0h	n/a	n/a			–	–	–
Water (neutral control)	0h	n/a	n/a			–	–	–
ANOVA $Df_{total}$ , $P$ value, $F_{0.05}$	239, <0.05, n.s							

**Table 2.** Ovicidal effects of EO formulations from *Cinnamomum verum*, *Citrus aurantium*, and *Cymbopogon citratus* EOs and their major constituents and combined formulations on the hatching rate of *Aedes aegypti* eggs after 48 h of incubation. Means percentage ovicidal activities in each column followed by same letters are not significantly different by ANOVA at  $P < 0.05$ .  $LT_{50}$  Lethal time that kills 50% of the exposed eggs,  $LC_{50}$  Lethal concentration that kills 50% of the exposed organisms,  $LL$ , 95% lower confidence limit and  $UL$ , 95% upper confidence limit,  $R^2$  regression coefficient,  $EII$  effective inhibition rate index,  $n.s.$  not significantly different at  $P < 0.05$ ,  $SI$  Synergistic index,  $n/a$  not available.

**Toxicity against non-target aquatic predators.** The estimated  $LC_{50}$  values against *P. latipinna* and *P. reticulata*, two fish species, of all formulations are summarized in Table 4. The two species were less susceptible to individual EOs and *trans*-cinnamaldehyde, D-limonene, and geranial EO constituents than every combined formulation, in terms of  $LC_{50}$ . The range of  $LC_{50}$  values against the two fish species of those EOs and EO constituents was from 8165.5 to 57,232.5 ppm, while for the combined formulations, the range was 4091.6–5921.3 ppm. On the other hand, the range for 1 ppm temephos was high toxic to both species with  $LC_{50}$  from 298.7 to 526.7 ppm.

On the biosafety index (BI) are shown in Table 5. All formulations provided a high BI from 1.03 to 9.77, these BIs were higher than 1. Therefore, all formulations were not toxic to both fish species.

### Discussion

Regarding extraction yield, the extraction yields of all tested plants were the same or only slightly different from the corresponding yields reported by previous studies<sup>20,32</sup>. The extraction yield of *C. verum* EO was 1.05% v/w compared to 1.1% v/w found by Aungtikun and Soonweera<sup>4</sup> and Soonweera et al.<sup>20</sup>; the extraction yield of *C. aurantium* EO was 1.30% v/w compared to 1.4% v/w found by Bnina et al.<sup>33</sup>; and the extraction yield of *C. citratus* EO was 1.14% v/w, compared to 1.2% v/w found by Soonweera et al.<sup>20</sup>. The slight differences can be attributed to many factors, e.g., the harvesting season, the integrity of the plant species, the adequate plant management, and the degree of fertility of the soil (soil chemicals and relative humidity)<sup>20,32</sup>.

On GC-MS analysis results, the chemical profiles of all tested EOs agreed well with those found in previous studies<sup>13,20</sup>. The major chemical constituent and key component (the active component<sup>12,20</sup>) of *C. verum* EO was *trans*-cinnamaldehyde (73.21% of the profile), very close to 72.2% reported by Soonweera et al.<sup>20</sup>; the major chemical constituent and key component<sup>13</sup> of *C. aurantium* EO was D-limonene (78.15%), agreeing well with 73.6% supported by Bnina et al.<sup>33</sup>; and the major chemical constituent and key component<sup>14</sup> of *C. citratus* EO was geranial (45.41%), agreeing well with 49.4% found by Chanthai et al.<sup>34</sup>. Nevertheless, some papers report larger differences. For *C. verum* EO, Chansang et al.<sup>15</sup> reported a higher percentage of *trans*-cinnamaldehyde (90.2% compared to 73.21%); for *C. aurantium* EO, Zarrad et al.<sup>32</sup> reported a higher percentage of D-limonene (87.5% compared to 78.15%); and for *C. citratus* EO, Brügger et al.<sup>35</sup> reported a lower percentage of geranial

Treatment	Inhibition rate (%) ±SD	LT <sub>50</sub> (h) (LL-UL)	R <sup>2</sup>	LC <sub>50</sub> (ppm) (LL-UL)	R <sup>2</sup>	EII	SI	Status
<i>C. aurantium</i> EO 10,000 ppm	53.2 ± 1.8g	85.8 (65.4–135.6)	0.154	16,592.2 (13,357.4–20,170.4)	0.541	1.80	–	–
<i>C. aurantium</i> EO 30,000 ppm	76.3 ± 5.3de	51.7 (39.5–71.3)	0.429					
D-Limonene 5000 ppm	62.4 ± 4.4f	80.5 (70.4–95.7)	0.453	7708.9 (5590.4–9991.2)	0.835	2.11	–	–
D-Limonene 10,000 ppm	72.1 ± 1.9e	36.3 (29.9–45.9)	0.437					
D-Limonene 30,000 ppm	90.8 ± 1.4bc	32.4 (27.9–43.3)	0.592					
<i>C. citratus</i> EO 10,000 ppm	71.4 ± 3.6e	55.3 (52.0–64.9)	0.386	12,170.5 (8466.3–15,870.6)	0.314	2.42	–	–
<i>C. citratus</i> EO 30,000 ppm	85.1 ± 2.0c	34.6 (29.9–45.9)	0.489					
Geranial 5000 ppm	81.2 ± 2.0d	73.0 (61.8–92.3)	0.374	4979.9 (3615.9–9279.7)	0.396	2.75	–	–
Geranial 10,000 ppm	81.6 ± 2.0d	34.1 (30.1–44.7)	0.421					
Geranial 30,000 ppm	92.4 ± 2.0b	29.7 (28.3–39.5)	0.701					
<i>C. verum</i> EO 10,000 ppm	88.6 ± 1.6c	41.5 (36.0–47.6)	0.475	8196.2 (4269.1–12,020.8)	0.353	3.00	–	–
<i>C. verum</i> EO 30,000 ppm	93.0 ± 2.5b	31.1 (28.1–40.2)	0.709					
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde 5000 ppm	83.6 ± 1.9cd	52.7 (46.4–61.8)	0.462	4530.9 (3497.5–8731.9)	0.322	2.83	–	–
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde 10,000 ppm	86.0 ± 2.7c	30.3 (27.1–34.0)	0.592					
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde 30,000 ppm	95.2 ± 1.6b	24.7 (20.0–31.0)	0.712					
<i>C. verum</i> EO + geranial (2:1) 10,000 ppm	100a	16.9 (13.8–25.4)	0.879	2303.5 (982.1–3001.3)	0.318	3.39	0.27	Synergy
<i>C. citratus</i> EO + D-limonene (2:1) 10,000 ppm	93.8 ± 3.4b	27.3 (21.5–35.2)	0.490	4255.0 (3344.5–5901.2)	0.421	3.18	0.44	Synergy
<i>C. aurantium</i> EO + geranial (2:1) 10,000 ppm	80.0 ± 4.7d	34.3 (29.1–43.2)	0.433	4101.5 (3650.1–6511.2)	0.398	2.71	0.26	Synergy
D-Limonene + geranial (1.5:1.5) 10,000 ppm	91.7 ± 3.8c	29.8 (23.5–34.2)	0.425	4270.4 (3451.0–3966.1)	0.409	3.11	0.48	Synergy
Geranial + <i>trans</i> -cinnamaldehyde (1.5:1.5) 10,000 ppm	100a	19.7 (13.2–29.2)	0.419	2980.3 (1478.2–2042.2)	0.325	3.39	0.36	Synergy
D-Limonene + <i>trans</i> -cinnamaldehyde (1.5:1.5) 10,000 ppm	100a	21.3 (17.4–31.6)	0.458	2901.2 (1815.5–3901.2)	0.339	3.39	0.47	Synergy
Temephos (positive control) 1 ppm	29.5 ± 2.4h	61.3 (51.4–78.5)	0.351			–	–	–
Ethyl alcohol (negative control)	0i	n/a	n/a			–	–	–
Water (neutral control)	0i	n/a	n/a			–	–	–
ANOVA <i>Df</i> <sub>total</sub> , <i>P</i> value, <i>F</i> <sub>0.05</sub>		239, < 0.05, n.s						

**Table 3.** Ovicidal effects of EO formulations from *Cinnamomum verum*, *Citrus aurantium*, and *Cymbopogon citratus* EOs and their major constituents and combined formulations on the hatching rate of *Aedes albopictus* eggs after 48 h of incubation. Means percentage ovicidal activities in each column followed by same letters are not significantly different by ANOVA at  $P < 0.05$ . *LT*<sub>50</sub> Lethal time that kills 50% of the exposed eggs, *LC*<sub>50</sub> lethal concentration that kills 50% of the exposed organisms, *LL* 95% lower confidence limit and *UL*, 95% upper confidence limit, *R*<sup>2</sup> regression coefficient, *EII* effective inhibition rate index, *n.s.* not significantly different at  $P < 0.05$ ; *SI* synergistic index, *n/a* not available.

(31.5% compared to 45.41%). This variation can be attributed to seasonal fluctuations, differences in temperature at the farms where these plants were cultivated, geographic location, ontogenetic variables, the growth stage of the plant at the time of harvest (pest management), and extraction method<sup>27,32</sup>, and all key components were robustly identified and quantified.

Regarding ovicidal efficacy results, based on *LT*<sub>50</sub>, the ranking of inhibition against *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* eggs was as follows: (1) *C. verum* EO + geranial (2:1), (2) geranial + *trans*-cinnamaldehyde (1.5:1.5), (3) D-limonene + *trans*-cinnamaldehyde (1.5:1.5), (4) *C. citratus* EO + D-limonene (2:1), (5) D-limonene + geranial (1.5:1.5), and (6) *C. aurantium* EO + geranial (2:1). All tested formulations were more effective than temephos, and one formulation was outstanding. The outstanding combination of *C. verum* EO + geranial (2:1), at the final concentration of 10,000 ppm each, showed the shortest lethal time (*LT*<sub>50</sub> ranging from 16.9 to 17.7 h) and the smallest lethal concentration (2303.5 ppm for 100% mortality). In contrast, temephos showed a lethal time in the range of 60.2–61.3 h, which is longer than that (ranging from 34.3 to 35.8 h) of the least effective EO formulation, *C. aurantium* EO + geranial (2:1) 10,000 ppm. Previous works<sup>4,27</sup> have already established the potent toxicity of several combined EOs and EO constituents against mosquitoes at most stages in their life cycle, except at the egg stage. The effectiveness of the formulations that combined EO and EO constituents and targeted mosquitoes at the egg stage of their life cycles was first reported in this study. Regarding the most effective combined formulation, it was not surprising that it was so effective since its individual components, *C. verum* EO and geranial, have already been shown to be effective against several pest insects, as presented in the following papers. Nakasen et al.<sup>24</sup> supported that *C. verum* EO at 12.5 ppm showed high ovicidal activity against *Cx. quinquefasciatus* with a 100% inhibition rate and an *LC*<sub>50</sub> of 3.31 ppm. Soonwera et al.<sup>20</sup> reported that *C. verum* EO had strong ovicidal activity against *Periplaneta americana*. Dias et al.<sup>36</sup> indicated that *trans*-cinnamaldehyde exhibited a strong insecticidal effect against *Mahanarva spectabilis* eggs. *trans*-cinnamaldehyde showed a toxic effect against the eggs of *P. humanus capitis*<sup>37</sup>, and *Spodoptera littoralis*<sup>19</sup>. Finally, Castillo-Morales et al.<sup>38</sup> reported that geranial provided strong ovicidal activity against *Ae. aegypti*. Regarding the low efficacy of temephos, it can be inferred that it was low because it was not designed specifically to kill mosquitoes at the egg stage but at the larval stage. The mosquito subjects were a laboratory-selected strain, not field-collected, and hence the larvae have not

Treatment	Non-target predators	LC <sub>50</sub> (ppm) (LL-UL)	Regression equation	R <sup>2</sup>	X <sup>2</sup> (df.)
<i>C. aurantium</i> EO 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	18,813.3 (-)	$y = -0.399 + 0.001x$	0.948	0.002 (9) n.s
	<i>Poecilia reticulata</i>	18,246.2 (-)	$y = -0.521 + 0.001x$	0.967	0.004 (9) n.s
D-Limonene 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	40,062.4 (-)	$y = -0.153 + 0.000x$	0.785	0.001 (9) n.s
	<i>Poecilia reticulata</i>	46,772.4 (28,163.8–64,304.2)	$y = -0.491 + 0.001x$	0.932	0.422 (9) n.s
<i>C. citratus</i> EO 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	57,232.5 (-)	$y = -0.153 + 0.000x$	0.785	0.001 (9) n.s
	<i>Poecilia reticulata</i>	51,508.8 (-)	$y = -0.153 + 0.000x$	0.785	0.001 (9) n.s
Geranial 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	48,631.8 (33,621.4–978,426.0)	$y = -0.031 + 0.000x$	0.882	3.030 (9) n.s
	<i>Poecilia reticulata</i>	36,825.6 (28,030.1–68,274.5)	$y = -0.184 + 0.000x$	0.966	1.681 (9) n.s
<i>C. verum</i> EO 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	25,798.5 (13,573.1–54,386.7)	$y = -0.767 + 0.001x$	0.785	0.080 (9) n.s
	<i>Poecilia reticulata</i>	25,798.5 (13,573.1–54,386.7)	$y = -0.767 + 0.001x$	0.785	0.080 (9) n.s
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	8165.5 (-)	$y = 0.135 + 0.001x$	0.800	0.011 (9) n.s
	<i>Poecilia reticulata</i>	8753.5 (7541.3–10,000.9)	$y = 1.344 + 0.001x$	0.627	0.056 (9) n.s
<i>C. verum</i> EO + geranial (2:1) 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	5921.3 (3850.0–6953.8)	$y = 1.000 + 0.001x$	0.608	0.226 (9) n.s
	<i>Poecilia reticulata</i>	4832.3 (-)	$y = 1.632 + 0.001x$	0.499	0.038 (9) n.s
<i>C. citratus</i> EO + D-limonene (2:1) 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	4470.7 (-)	$y = -0.153 + 0.001x$	0.778	0.014 (9) n.s
	<i>Poecilia reticulata</i>	4485.3 (-)	$y = -0.153 + 0.001x$	0.778	0.014 (9) n.s
<i>C. aurantium</i> EO + geranial (2:1) 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	4680.2 (3550.0–6993.4)	$y = -1.000 + 0.001x$	0.608	0.226 (9) n.s
	<i>Poecilia reticulata</i>	4415.4 (3921.1–7020.1)	$y = 0.479 + 0.001x$	0.801	2.314 (9) n.s
D-Limonene + geranial (1.5:1.5) 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	4554.1 (4109.5–6314.3)	$y = 0.712 + 0.001x$	0.844	0.147 (9) n.s
	<i>Poecilia reticulata</i>	4525.4 (3918.5–6605.6)	$y = -0.233 + 0.001x$	0.983	2.550 (9) n.s
Geranial + <i>trans</i> -cinnamaldehyde (1.5:1.5) 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	4343.5 (-)	$y = 1.632 + 0.001x$	0.499	0.038 (9) n.s
	<i>Poecilia reticulata</i>	4091.6 (-)	$y = 2.663 + 0.001x$	0.346	0.034 (9)
D-Limonene + <i>trans</i> -cinnamaldehyde (1.5:1.5) 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	4343.5 (-)	$y = 1.632 + 0.001x$	0.499	0.038 (9) n.s
	<i>Poecilia reticulata</i>	4343.5 (-)	$y = 1.632 + 0.001x$	0.499	0.038 (9) n.s
Temephos 1 ppm (positive control)	<i>Poecilia latipinna</i>	526.7 (381.3–762.3)	$y = 0.104 + 0.000x$	0.870	3.079 (9) n.s
	<i>Poecilia reticulata</i>	298.7 (-)	$y = -0.077 + 0.001x$	0.349	1.121 (9)

**Table 4.** Effect of *Cinnamomum verum*, *Citrus aurantium*, and *Cymbopogon citratus* EOs and their major constituents and combined formulations against *Poecilia latipinna* and *Poecilia reticulata* fishes sharing the same ecological niche of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. No mortality was observed in the control. LC<sub>50</sub> Lethal concentration that kills 50% of the exposed organisms, LL 95% lower confidence limit, UL 95% upper confidence limit, R<sup>2</sup> regression coefficient, df. degrees of freedom, n.s. not significantly different at  $P < 0.05$ , n/a not available.

developed resistance to temephos. Their morbidity was confirmed. The low egg-inhibition activity of temephos is supported by previous works of Puwanard and Soonwera<sup>23</sup> and Cotchakaew and Soonwera<sup>39</sup>, indicating that 1% (w/w) temephos showed an inhibition rate ranging from 9.3 to 34.6% against the eggs of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*, while the EOs showed a 47.0–100% inhibition rate.

On egg morphology, its SEM images in Figs. 1 and 2 show damages to the exochorionic meshwork and tubercles of the outer cells on exochorion cuticle (external chitin layer) with cell borders, papillae, and aeropyles<sup>40,41</sup>. Moreover, the cell borders and papillae as well as aeropyles were covered with a layer that was assumed to be an oil layer, which would explain the ovicidal mechanism of the EO, discussed in the paragraph below.

Regarding the mechanisms of ovicidal action, as stated in the paragraph above, the aeropyles seemed to be blocked by an oil layer, making respiration difficult or impossible. This respiration inhibition mechanism has been reported by Khedr et al.<sup>19</sup> *C. verum* EO induced mortality of embryo and egg by forming a thin film of oil over the outer egg surface and blocking the egg respiration by sealing the aeropyles. Nakasen et al.<sup>24</sup> concluded that *C. verum* EO destroyed chitin wall by the oil penetrating the eggshell pore leading to embryo death. Another possible mechanism of action is the mechanism that *trans*-cinnamaldehyde, the major constituent of *C. verum* EO, acts on the egg. *Trans*-cinnamaldehyde reduces the ATPase activity in the cell membrane of the respiratory system and inhibits the enzymes involved in cytokinesis as well as retards juvenile hormone production and cell growth in the immune system of mosquito<sup>4,42</sup>. In short, *C. verum* and *trans*-cinnamaldehyde act mainly on the respiratory system of mosquito eggs. Contrarily, geranial affects the egg's neurological system. Geranial inhibits the acetylcholinesterase (AChE) enzymes of neural cells and neuroreceptors<sup>30</sup>. Castillo-Morales et al.<sup>38</sup> concluded that geranial penetrates through the serosal cuticle of an embryo and disturbs the embryogenesis process. Hence, the synergistic effect of the combination may stem from the fact that both substances acted along two different pathways, reinforcing one another.

On the biosafety of non-target aquatic predators of mosquito eggs, the combined EO formulation was deemed safe for *P. latipinna* and *P. reticulata*, two species of predator fish, because its BI was more than 1 and its high lethal concentration (LC<sub>50</sub>). EOs are also generally considered safe for other arthropods and fishes<sup>43</sup>. Other authors have supported the conclusion that EOs are safe for non-target organisms. Alsalthi et al.<sup>43</sup> supported

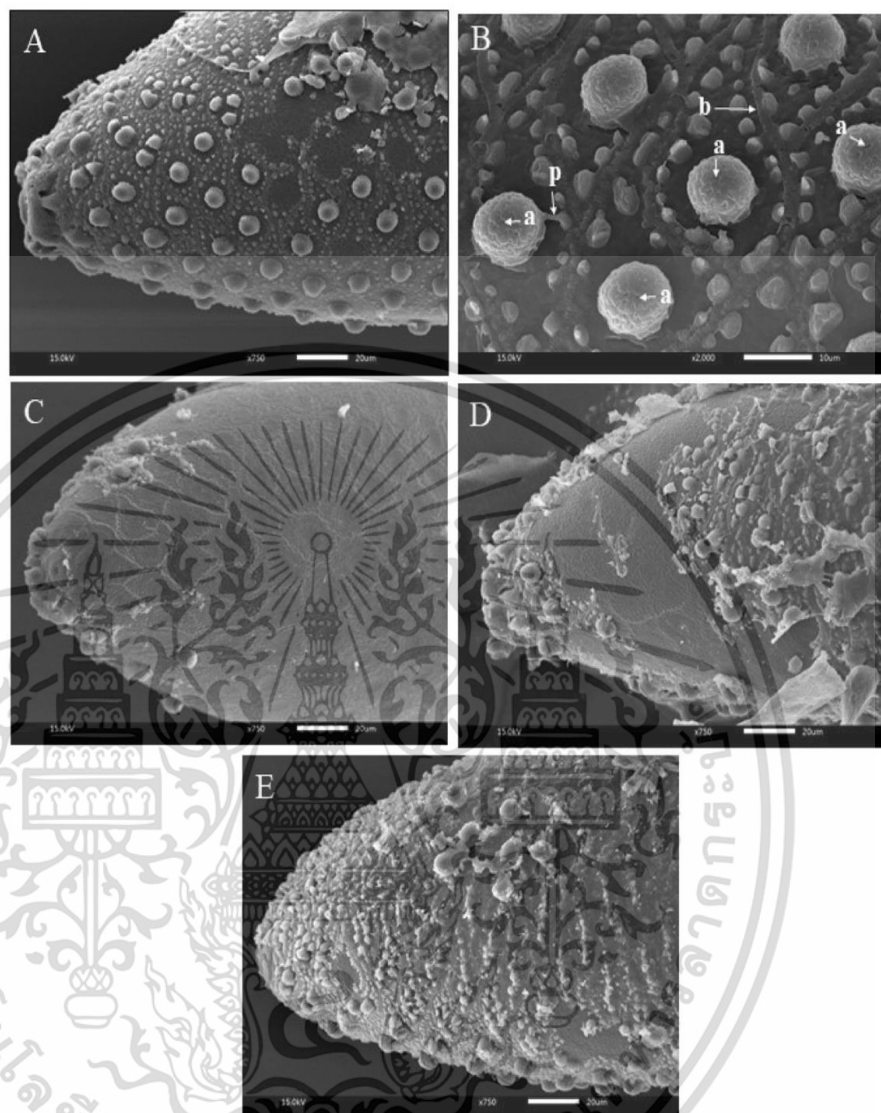
Treatment	Non-target organism	Biosafety index (BI)	
		<i>Ae. aegypti</i>	<i>Ae. albopictus</i>
<i>C. aurantium</i> EO 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	1.25	1.13
	<i>Poecilia reticulata</i>	1.21	1.10
D-Limonene 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	2.74	5.20
	<i>Poecilia reticulata</i>	3.20	6.07
<i>C. citratus</i> EO 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	5.12	4.70
	<i>Poecilia reticulata</i>	4.61	4.23
Geranial 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	4.91	9.77
	<i>Poecilia reticulata</i>	3.72	7.39
<i>C. verum</i> EO 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	2.84	3.15
	<i>Poecilia reticulata</i>	2.84	3.15
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	1.13	1.80
	<i>Poecilia reticulata</i>	1.21	1.93
<i>C. verum</i> EO + geranial (2:1) 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	2.57	2.57
	<i>Poecilia reticulata</i>	2.09	2.09
<i>C. citratus</i> EO + D-limonene (2:1) 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	1.06	1.05
	<i>Poecilia reticulata</i>	1.06	1.05
<i>C. aurantium</i> EO + geranial (2:1) 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	1.09	1.14
	<i>Poecilia reticulata</i>	1.03	1.08
D-Limonene + geranial (1.5:1.5) 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	1.08	1.07
	<i>Poecilia reticulata</i>	1.08	1.06
Geranial + <i>trans</i> -cinnamaldehyde (1.5:1.5) 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	1.50	1.46
	<i>Poecilia reticulata</i>	1.41	1.37
D-Limonene + <i>trans</i> -cinnamaldehyde (1.5:1.5) 10,000 ppm	<i>Poecilia latipinna</i>	1.49	1.49
	<i>Poecilia reticulata</i>	1.49	1.49

**Table 5.** Biosafety index (BI) against *Poecilia latipinna* and *Poecilia reticulata* sharing the same ecological niche of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, exposed to *Cinnamomum verum*, *Citrus aurantium*, and *Cymbopogon citratus* EOs and their major constituents and combined formulations.

that *trans*-cinnamaldehyde showed very low toxicity on *Gambusia affinis* ( $LC_{50} = 3960.6$  ppm). Nwanade et al.<sup>17</sup> reported that *trans*-cinnamaldehyde provided a less toxic effect on *Tenebrio molitor* ( $LC_{50} = 28.4$   $\mu$ L/mL). In addition, Hýbl et al.<sup>44</sup> indicated that *C. zeylanicum* EO did not show toxicity against honey bee, *Apis mellifera* ( $LC_{50} = 4.542$   $\mu$ L). Sabahi et al.<sup>45</sup> reported that *C. citratus* EO was not toxic to *A. mellifera* ( $LD_{50} = 53,304.0$   $\mu$ g/mL). It has also been shown that geranial, the major constituent of *C. citratus* EO, had a low negative effect on a predatory bug, *Podisus nigrispinus* ( $LD_{50} = 25,56$   $\mu$ g/insect<sup>-1</sup>)<sup>35</sup>. In contrast, temephos is highly toxic to several non-target organisms e.g., *Acilius sulcatus*, *Anisops bouvieri*, and *G. affinis* with  $LC_{50}$  ranging from 0.957 to 4.817 ppm<sup>43</sup>. Chellappandian et al.<sup>11</sup> reported that temephos showed a highly toxic effect against aquatic mosquito larvae predator, *Toxorhynchites splendens*. Along the same line, USA EPA<sup>46</sup> concluded that temephos showed highly acute toxicity to risk quotients for freshwater fish: the  $LC_{50}$  against rainbow trout was 3490 ppb. Similarly, in this study, 1% (w/w) temephos showed a high level of toxicity to two fish species, *P. latipinna* and *P. reticulata* with  $LC_{50}$  ranging from 298.7 to 526.7 ppm. Furthermore, temephos resists degradation and accumulates in the environment at a high level, thus harming non-target organisms<sup>46</sup>. On the contrary, EOs and their constituents are natural substances that degrade quickly in the environment and do not accumulate in the environment, hence much safer for the environment. More than one BI for all formulations verified that those formulations were absolutely safe for these non-target aquatic predators. The mortality rate after the treatment of the eggs was much higher than the mortality rate against the fishes (Fig. 3). Most importantly, both EOs from *C. verum* and *C. citratus* as well as their major constituents do not exhibit cytotoxicity activity on human fibroblast cells<sup>47,48</sup> and show high  $LD_{50}$  value on mammals<sup>49,50</sup>. They have long been used as a food ingredient, cosmetics, and folk medicine<sup>12,14,51</sup>. They quickly degraded in the environment<sup>50,51</sup>. On the other hand, temephos is toxic to the nervous systems of humans. It can cause Alzheimer's disease as reported by Martins Laurentino et al.<sup>52</sup>. Because of its efficacy and safety, the combined formulation of *C. verum* EO + geranial should be developed as a natural insecticide for controlling the eggs of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* to replace commercial synthetic insecticides. However, to develop the combined formulation into a commercial product (a spray or drops of solution into the water), it is still necessary to investigate other factors that affect to mortality of mosquito vectors and their eggs, e.g., a field study and a study of the post-application temperature effect.

## Materials and methods

**Plant collection.** All plants were obtained under national and international guidelines. The plants were collected under the supervision and permission of the School of Agricultural Technology, KMITL. All of the authors complied with all local and national guidelines.

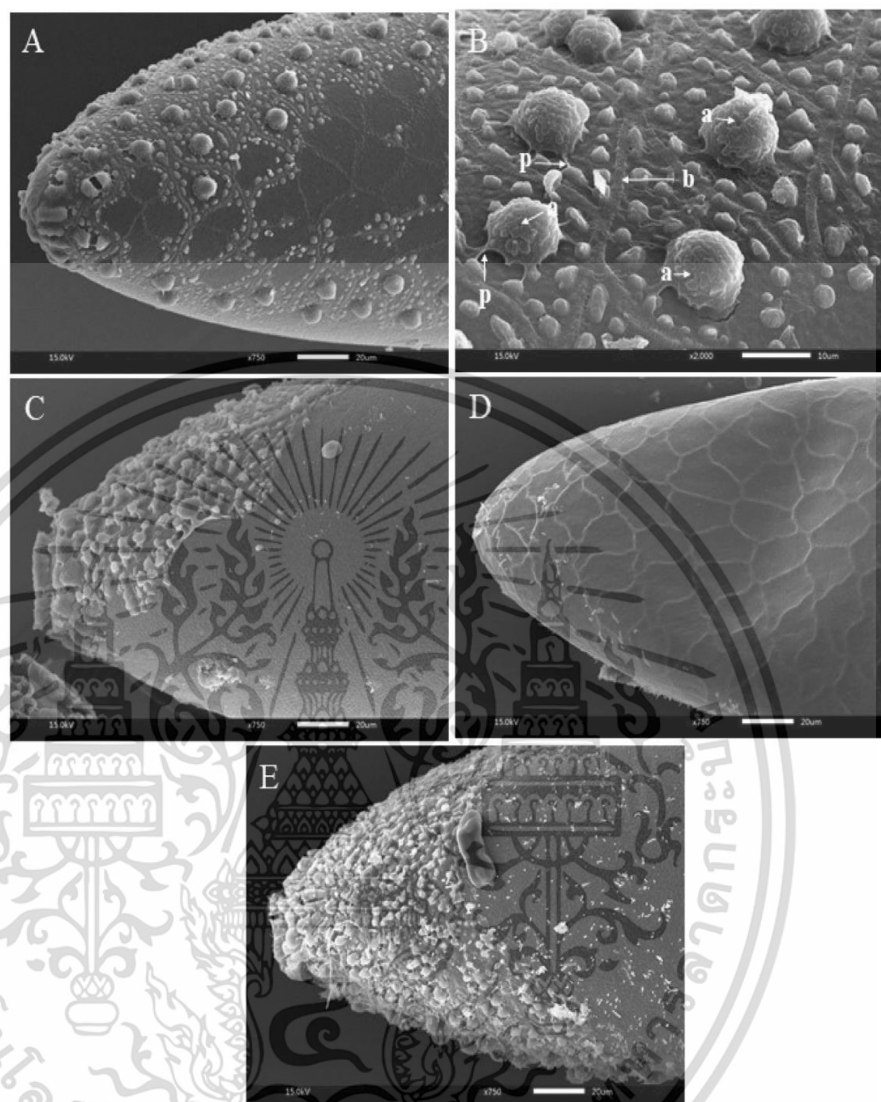


**Figure 1.** Scanning electron micrographs of *Aedes aegypti* eggs: (A,B) non-treated egg, intact exochorionic cuticle with cell borders (b), papillae (p), and aeropyles (a), morphological damage to exochorionic cuticle after treated with d-limonene (C), geranial (D), and *trans*-cinnamaldehyde (E).

Dried barks of *C. verum* were purchased from a local Chinese pharmacy in Thailand (Chao Krom Poe Dispensary, Bangkok, Thailand). Peels of *C. aurantium* fruit were obtained from a farm in Nakhon Ratchasima province, Thailand (14° 58' 47.6400" N/102° 5' 51.9756" E). Fresh stems of *C. citratus* were obtained from a farm in Chanthaburi province, Thailand (12° 36' 34" N/102° 06' 16" E) in July–October 2021. All plant species were identified by Mr. Tanapoom Mounthipmalai, a herbal specialist at the KMITL herbal museum, and some of the specimens were kept at the KMITL herbal museum, School of Agricultural Technology, KMITL.

**Essential oil extraction.** Plant part (1000 g) was washed and extracted by hydro-distillation in 2000 mL of distilled water at 100 °C for 5 h. The rate of distillation was two drops of EO per second. The EO was then filtered and stored in a tea color bottle at 4 °C.

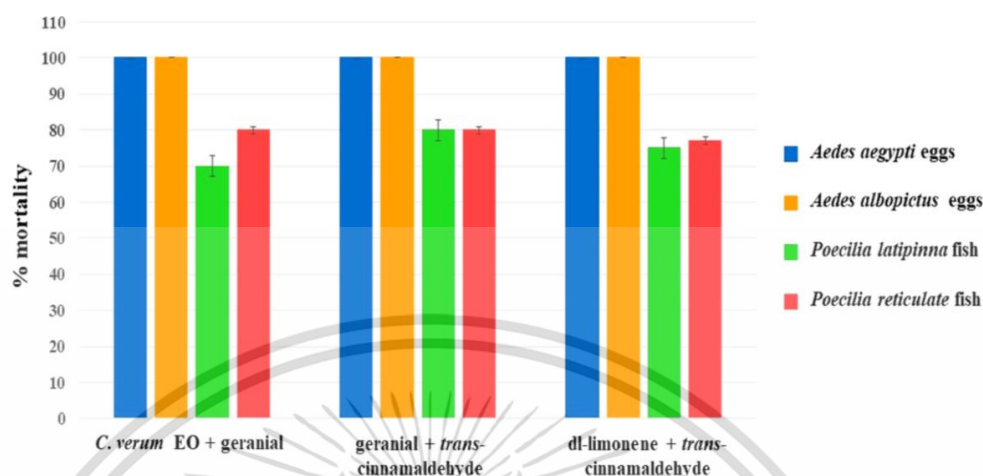
**Identification of essential oil constituents through GC/MS.** Samples of *C. aurantium*, *C. citratus*, and *C. verum* EOs were analyzed by an Agilent 6890 N gas chromatograph GC–MS at the central Laboratory, KMITL, following our previous protocol<sup>27</sup>. Serving as the mobile phase is 1 mL per min flow of helium (99.99%). To start, 0.2 µL of extract in ethyl alcohol solution (split ratio = 1:100) of each EO was injected into the column. A 5973-N mass spectrometer (using an HP-5 MS fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm ID with 0.25 µm film



**Figure 2.** Scanning electron micrographs of *Aedes albopictus* eggs: (A,B) non-treated egg, intact exochorionic cuticle with cell borders (b), papillae (p), and aeropyles (a), morphological damage to exochorionic cuticle after treated with d-limonene (C), geranial (D), and *trans*-cinnamaldehyde (E).

thickness of 5% phenyl-methylpolysiloxane coating), an electron ionization system with 70 eV electron energy ( $30\text{--}500\text{ m z}^{-1}$ ), and an Agilent 6890-N gas chromatograph (USA) made up the GC-MS system. The column temperature was programmed to increase gradually from room temperature to 50 °C and stay there for 2 min. The column temperature was then increased to 200 °C and maintained there for 3 min at a rate of 10 °C  $\text{min}^{-1}$ . In the final stage, the column temperature was raised to 260 °C at a rate of 15 °C  $\text{min}^{-1}$  and held there for 20 min. The injector and detector temperature were held at 270 °C. The total running time was 40 min. A mass spectra search program with Wiley 7 N library was used for identifying all components of EOs. The mass spectra of peaks were compared with those stored in Adams<sup>53</sup> and NIST 17<sup>54</sup> libraries. Temperature-programmed retention indices (RI) were determined using *n*-alkanes ( $C_7\text{--}C_{30}$ ). The experiment was performed in three replicates.

**Source and purity of reagents.** Cinnamaldehyde (98% pure), a major constituent of *C. verum* EO, d-limonene (96% pure), a major constituent of *C. aurantium* EO, and geranial (96% pure), a major constituent of *C. citratus* EO together with standard *n*-alkanes ( $C_7\text{--}C_{30}$ ) were supplied by Sigma-Aldrich company (USA). Temephos (1 ppm), the positive control, was obtained from Thailand's Government Pharmaceutical Organization (GPO) (Pathum Thani, Thailand). Ethyl alcohol (95% v/v) was supplied by Thailand's Liquor Distillery Organization (Chachoengsao, Thailand). All chemicals used in this study were reagent-grade.



**Figure 3.** Mortality rates of the combined formulations against the eggs of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, compared to those against non-target predators of mosquitoes, *Poecilia latipinna* and *Poecilia reticulata* fishes.

**Insect maintenance.** The mosquito eggs used in this experiment were freshly laid eggs of mosquitoes of two species, *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*, reared in the Entomology laboratory at the School of Agricultural Technology, KMUTT. They were reared under the conditions of  $26.5 \pm 2$  °C temperature,  $75.0 \pm 2\%$  RH, and an  $11 \pm 13$  h photoperiod. Female adult mosquitoes were fed with 2.5% glucose solution + 2.5% multivitamin syrup solution and periodically blood-fed via membrane by an artificial membrane method<sup>4</sup>. The first generation of eggs was used in various experiments.

**Toxicity against target mosquito.** Ovicidal activity bioassay was performed on the eggs following the method of Puwanard and Soonwera<sup>23</sup>. The eggs used for this bioassay were stored at  $26.5 \pm 2$  °C for 7 days after female mosquitoes had laid their eggs on a Whatman No.1 filter paper. Eggs were selected under a stereomicroscope (Nikon Type 102): abnormal eggs were discarded, and normal eggs were collected for the bioassay. For each mosquito species, 25 eggs were suspended in 99 mL of distilled water in a 150 mL plastic cup. A treatment was added to the cup: 1 mL of each EO formulation. This assay was done in ten replicates for each treatment, with positive, negative, and neutral controls: 1 ppm temephos (based on the recommendation of Thailand's Government Pharmaceutical Organization (GPO) for destroying mosquito larvae), 70% (v/v) ethyl alcohol, and pure water, respectively. The numbers of hatched larvae at 30 min, 1, 6, 24, and 48 h post-treatment were observed and recorded because it was easier and more practical to count live larvae than to count dead eggs under a stereomicroscope. The percentage inhibition rate after 48 h was determined by the formulas<sup>23</sup> below.

$$\text{Hatching rate(\%)} = \left[ \left( \frac{\text{NE}}{\text{NT}} \right) \times 100 \right], \quad (1)$$

$$\text{Inhibition rate(\%)} = 100 - \text{hatching rate(\%)}, \quad (2)$$

where NE is the total number of hatched eggs and NT is the total number of eggs.

The effective inhibition rate index (EII) as a comparative efficacy index between an EO and temephos, was determined by the formula<sup>4</sup> below,

$$\text{EII} = [\% \text{inhibition rate of each EO formulation} / \% \text{inhibition rate of temephos}]. \quad (3)$$

EII < 1 indicates that the EO formulation was not as effective as temephos; EII = 1 indicates that the EO formulation was as effective as temephos; and IRI > 1 indicates that the EO formulation was more effective than temephos.

Synergistic index (SI) is an efficacy comparison index between a combined formulation and the corresponding individual EO or individual EO constituent. It was calculated by the following formula<sup>31</sup>,

$$\text{SI} = [\text{LT}_{50} \text{ of combined formulation} / (\text{LT}_{50} \text{ of individual EO} + \text{LT}_{50} \text{ of individual EO constituent})]. \quad (4)$$

SI < 1 indicates synergistic; SI > 1 indicates antagonistic; and SI = 0 indicates not either one.

**Toxicity against non-target aquatic predators.** The experimental methods and procedures were performed in accordance with the guidelines and regulations of the National Research Council of Thailand guide for the care and use of laboratory animals and approved by the King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

of animal care and use committee. This study was carried out in compliance with the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines.

The effect of individual EOs, EO constituents, and combined formulations against non-target aquatic predators, *P. latipinna* and *P. reticulata*, was analyzed with a modified technique reported by Rajeswary et al.<sup>55</sup>. The test used four concentrations (i.e., 500, 1000, 2500, and 5000 ppm) of treatment that corresponded to the estimated LC<sub>50</sub> against the two mosquito species. Both fish species were purchased from a farm in Nakhon Pathom province, Thailand. They were separately kept in a glass container containing 10.5 L of water at 35 ± 2 °C and 77 ± 5% RH. With the registration number KDS2021/002 (August 2nd, 2021), the King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang's Ethics committee had approved each bioassay used in this study. One adult *P. latipinna* or *P. reticulata* was put in a glass jar containing 99 mL of water and contaminated with a treatment at a specified concentration. Four replicates were done for each treatment with positive control. Data on mortality and swimming sluggishness were recorded for 5 days post-treatment.

The biosafety index (BI) was determined by the formula<sup>55</sup> below,

$$BI = [LC_{50} \text{ of non-target aquatic predators} / LC_{50} \text{ of target vector species}]. \quad (5)$$

BI > 1 indicates that the EO formulation was safe for the non-target organisms, and BI < 1 indicates that the EO formulation was not safe for non-target organisms.

**Egg morphology and observation.** After 48 h of treatment, the morphology of the external surface of the eggs of each mosquito species that underwent a treatment or control was observed under scanning electron microscopy (SEM) at the Scientific and Technological Research Equipment Centre, Chulalongkorn University, Thailand. Samples were placed in a fixative, 2.5% glutaraldehyde for 30 min in 0.1 M phosphate buffer. Thoroughly washed with the same buffer, the eggs were dehydrated by soaking in a series of alcohol solutions in water (30, 50, 70, and 95%). Each 1-h soaking process with an alcohol solution was replicated three times with an automatic tissue processor. Then, the eggs were dried with a CO<sub>2</sub> critical point drier. Each dehydrated sample was mounted on a stub coated with gold-palladium and examined with a JSM-5800 LV (Tokyo, Japan) SEM. Photographs of the egg surface morphology were taken.

**Statistical analysis.** The design of the experiments was completely randomized. Analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range test at  $P < 0.05$  were applied to the mortality data of mosquito eggs. The treatment time to produce 50% egg mortality (LT<sub>50</sub>) was determined by probit analysis. The eggs were observed at 30 min, 1, 6, 24, and 48 h after the treatment. The concentration of a treatment that provided 50% mortality (LC<sub>50</sub>) against mosquito eggs was determined. The tested concentrations were 10,000 and 30,000 ppm for individual EOs and 5000, 10,000, and 30,000 ppm for individual EO constituents. The LC<sub>50</sub> values against the two species of fish were determined at 500, 1000, 2500, and 5000 ppm. SPSS Statistical Software Package version 22 was the statistical software package used.

#### Data availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Received: 21 November 2022; Accepted: 3 February 2023

Published online: 06 February 2023

#### References

- Chantawee, A. & Soonwera, M. Efficacies of four plant essential oils as larvicide, pupicide and oviposition deterrent agents against dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **8**, 217–225. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.231284> (2018).
- Kraemer, M. U. G. et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat. Microbiol.* **4**, 854–863. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0376-y> (2019).
- Silva Sá, G. C. et al. Arbovirus vectors insects: Are botanical insecticides an alternative for its management?. *J. Pest Sci.* **11**, 1–20. <https://doi.org/10.1007/s10340-022-01507-2> (2022).
- Aungtikun, J. & Soonwera, M. Improved adulticidal activity against *Aedes aegypti* (L.), and *Aedes albopictus* (Skuse), from synergy between *Cinnamomum* spp. essential oils. *Sci. Rep.* **11**, 4685. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84159-z> (2021).
- Ministry of Public Health of Thailand. The status of dengue fever cases. IOP Publishing Physics Web. <http://ddc.moph.go.th/aibd> (2022).
- Rajkumar, S., Jebanesan, A. & Nagarajan, R. Effect of leaf essential oil of *Coccinia indica* on egg hatchability and different larval instars of malarial mosquito *Anopheles stephensi*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **4**, 948–951. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60224-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60224-1) (2011).
- Chellappandian, M. et al. Botanical essential oils and uses as mosquitocides and repellents against dengue. *Environ. Int.* **113**, 214–230. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.038> (2018).
- Reegan, A. D. et al. Larvicidal and ovidical activities of phenyl acetic acid isolated from *Streptomyces collinus* against *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Exp. Parasitol.* **226–227**, 108120. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2021.108120> (2021).
- Benitez-Trinidad, A. B. et al. Cytostatic and genotoxic effect of temephos in human lymphocytes and HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro.* **29**, 779–786. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.02.008> (2015).
- Abe, F. R. et al. Toxicity of diflubenzuron and temephos on freshwater fishes: Ecotoxicological assays with *Oreochromis niloticus* and *Hyphessobrycon eques*. *Water Air Soil Pollut.* **230**, 230–277. <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4128-7> (2019).
- Chellappandian, M. et al. Target and non-target botanical pesticides effect of *Trichodesma indicum* (Linn.) R. Br. and their chemical derivatives against the dengue vector, *Aedes aegypti* L. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **26**, 16303–16315. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04870-3> (2019).

12. Hamidpour, R. *et al.* Cinnamon from the selection of traditional applications to its novel effects on the inhibition of angiogenesis in cancer cells and prevention of Alzheimer's disease, and a series of functions such as antioxidant, anticholesterol, antidiabetes, antibacterial, antifungal, nematocidal, acaricidal, and repellent activities. *J. Tradit. Complement. Med.* **5**, 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.11.008> (2015).
13. Maksoud, S. *et al.* *Citrus aurantium* L. active constituents, biological effects and extraction methods an updated review. *Molecules* **26**, 5832. <https://doi.org/10.3390/molecules26195832> (2021).
14. Ćimović, M., Kiprovska, B. & Gvozdenac, S. Application of *Cymbopogon citratus* in agro-food industry. *J. Agron. Technol. Eng. Manag.* **3**, 423–436 (2020).
15. Chansang, A. *et al.* Potential of natural essential oils and cinnamaldehyde as insecticides against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **49**, 6–22 (2018).
16. Sinthusiri, J. & Soonwera, M. Oviposition deterrent and ovicidal activities of seven herbal essential oils against female adults of housefly, *Musca domestica* L. *Parasitol. Res.* **113**, 3015–3022. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3964-z> (2014).
17. Nwanane, C. F. *et al.* Individual and synergistic toxicity of cinnamon essential oil constituents against *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) and their potential effects on non-target organisms. *Ind. Crops Prod.* **178**, 114614. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114614> (2022).
18. Soonwera, M., Wongnet, O. & Sittichok, S. Ovicidal effect of essential oils from Zingiberaceae plants and *Eucalyptus globulus* on eggs of head lice, *Pediculus humanus capitis* De Geer. *Phytomedicine* **47**, 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.050> (2018).
19. Khedr, M., Sabry, H. & El-Gendy, E. The potential of cinnamon, *Cinnamomum zeylanicum* essential oil as a natural ovicide against cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Thai J. Agric. Sci.* **53**, 120–133 (2020).
20. Soonwera, M. *et al.* Ovicidal and repellent activities of several plant essential oils against *Periplaneta americana* L. and enhanced activities from their combined formulation. *Sci. Rep.* **12**, 12070. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16386-x> (2022).
21. Saxena, K. N. & Sharma, R. N. Embryonic inhibition and oviposition induction in *Aedes aegypti* by certain terpenoids. *J. Econ. Entomol.* **65**, 1588–1591. <https://doi.org/10.1093/jee/65.6.1588> (1972).
22. Silva, L. S. *et al.* Effects of a solid formulation containing lectin-rich fraction of *Moringa oleifera* seeds on egg hatching and development of *Aedes aegypti* larvae. *Acta Trop.* **214**, 105789. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105789> (2021).
23. Puwanard, C. & Soonwera, M. Ovicidal and adulticidal activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf and *Illicium verum* Hook. F. against *Aedes aegypti* (Linn.). *Int. J. Agric. Technol.* **18**, 319–328 (2022).
24. Nakasen, K. *et al.* Bio efficacy of cinnamaldehyde from *Cinnamomum verum* essential oil against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Entomol. Acarol. Res.* **53**, 9400. <https://doi.org/10.4081/jea.2021.9400> (2021).
25. Dhinakaran, S. R., Mathew, N. & Munusamy, S. Synergistic terpene combinations as larvicides against the dengue vector *Aedes aegypti* Linn. *Drug. Dev. Res.* **80**, 791–799. <https://doi.org/10.1002/ddr.21560> (2019).
26. Al-Mekhlafi, E. A. *et al.* Target and non-target effects of *Foeniculum vulgare* and *Matricaria chamomilla* combined extract on *Culex pipiens* mosquitoes. *Saudi J. Biol. Sci.* **28**, 5773–5780. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.06.024> (2021).
27. Soonwera, M. *et al.* Combinations of plant essential oils and their major compositions inducing mortality and morphological abnormality of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Heliyon* **8**, e09346. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09346> (2022).
28. Andrade-Ochoa, S. *et al.* Oviposition deterrent and larvicidal and pupacidal activity of seven essential oils and their major components against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae): Synergism-antagonism effects. *Insects* **9**, 25. <https://doi.org/10.3390/insects9010025> (2018).
29. Youssefi, M. R. *et al.* Efficacy of two monoterpenoids, carvacrol and thymol, and their combinations against eggs and larvae of the west Nile vector *Culex pipiens*. *Molecules* **24**, 1867. <https://doi.org/10.3390/molecules24101867> (2019).
30. Soonwera, M. & Sittichok, S. Adulticidal activities of *Cymbopogon citratus* (Stapf.) and *Eucalyptus globulus* (Labill.) essential oils and of their synergistic combinations against *Aedes aegypti* (L.), *Aedes albopictus* (Skuse), and *Musca domestica* (L.). *Environ. Sci. Pollut. Res.* **27**, 20201–20214. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08529-2> (2020).
31. Aungtikun, J., Soonwera, M. & Sittichok, S. Insecticidal synergy of essential oils from *Cymbopogon citratus* (Stapf.), *Myristica fragrans* (Houtt.), and *Illicium verum* Hook. F. and their major active constituents. *Ind. Crops Prod.* **164**, 113386. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113386> (2021).
32. Zarrad, K. *et al.* Chemical composition, fumigant and anti-acetylcholinesterase activity of the Tunisian *Citrus aurantium* L. essential oils. *Ind. Crops Prod.* **76**, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.039> (2015).
33. Bnina, E. B. *et al.* Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the Tunisian *Citrus aurantium* essential oils. *Czech J. Food Sci.* **37**, 81–92. <https://doi.org/10.17221/202/2017-CJFS> (2019).
34. Chanthai, S., Prachakoll, S. & Ruangviriyachai, C. Influence of extraction methodologies on the analysis of five major volatile aromatic compounds of citronella grass (*Cymbopogon nardus*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) grown in Thailand. *J. AOAC Int.* **95**, 763–772. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-335> (2012).
35. Brügger, B. P. *et al.* Bioactivity of the *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil and its terpenoid constituents on the predatory bug, *Podisus nigripennis* (Heteroptera: Pentatomidae). *Sci. Rep.* **9**, 8358. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44709-y> (2019).
36. Dias, M. L. *et al.* Insecticidal activity of compounds of plant origin on *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae). *Insects* **10**, 360. <https://doi.org/10.3390/insects10100360> (2019).
37. Yang, Y. C. *et al.* Ovicidal and adulticidal activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil compounds and related compounds against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Int. J. Parasitol.* **35**, 1595–1600. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.08.005> (2005).
38. Castillo-Morales, R. M. *et al.* Impact of *Cymbopogon flexuosus* (Poaceae) essential oil and primary components on the eclosion and larval development of *Aedes aegypti*. *Sci. Rep.* **11**, 24291. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03819-2> (2021).
39. Cotchakaew, N. & Soonwera, M. Efficacies of essential oils from Illiciaceae and Zingiberaceae plants as oviposition deterrent, ovicidal, and adulticidal agents against females *Aedes albopictus* (Skuse) and *Anopheles minimus* (Theobald). *Int. J. Agric. Technol.* **14**, 631–652 (2018).
40. Campbell, B. E., Pereira, R. M. & Koehler, P. G. Complications with controlling insect eggs (Chapter 5) in *Insecticides Resistance* (ed. Trdan, S.) 83–96. <https://doi.org/10.5772/61848> (Croatia, 2016).
41. Mundim-Pombo, A. P. M. *et al.* *Aedes aegypti*: Egg morphology and embryonic development. *Parasit. Vectors* **14**, 531. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05024-6> (2021).
42. Benelli, G. *et al.* Acute and sub-lethal toxicity of eight essential oils of commercial interest against the filariasis mosquito *Culex quinquefasciatus* and the housefly *Musca domestica*. *Ind. Crops Prod.* **112**, 668–680. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.062> (2018).
43. AlSalhi, M. S. *et al.* The aromatic ginger *Kaempferia galanga* L. (Zingiberaceae) essential oil and its main compounds are effective larvicidal agents against *Aedes vittatus* and *Anopheles maculatus* without toxicity on the non-target aquatic fauna. *Ind. Crops Prod.* **158**, 113012. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113012> (2020).
44. Hýbl, M. *et al.* Evaluating the efficacy of 30 different essential oils against *Varroa destructor* and honey bee workers (*Apis mellifera*). *Insects* **12**, 1045. <https://doi.org/10.3390/insects12111045> (2021).
45. Sabahi, Q. *et al.* Toxicity of anethole and the essential oils of lemongrass and sweet marigold to the parasitic mite *Varroa destructor* and their selectivity for honey bee (*Apis mellifera*) workers and larvae. *Psyche A J. Entomol.* **2018**, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/6196289> (2018).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

46. The United States Environmental Protection Agency (USA EPA). Reregistration eligibility decision for temephos. IOP Publishing Physics Web. [https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/html/temephos\\_red.html](https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/html/temephos_red.html) (2022).
47. Ortega-Cuadros, M. *et al.* Antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (Poaceae) on *Streptococcus mutans* biofilm and its cytotoxic effects. *Rev. Biol. Trop.* **66**, 1519–1529. <https://doi.org/10.15517/rbt.v66i4.33140> (2018).
48. Banglao, W. *et al.* Determination of antioxidant, anti-aging and cytotoxicity activity of the essential oils from *Cinnamomum zeylanicum*. *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.* **10**, 436–440. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.10.3.436-440> (2020).
49. Baker, B. P. & Grant, J. A. Cinnamon and cinnamon oil profile. IOP Publishing Physics Web. <https://hdl.handle.net/1813/56117> (2018).
50. Lulekal, E. *et al.* Phytochemical analysis and evaluation of skin irritation, acute and sub-acute toxicity of *Cymbopogon citratus* essential oil in mice and rabbits. *Toxicol. Rep.* **6**, 1289–1294. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.11.002> (2019).
51. Muhoza, B. *et al.* Encapsulation of cinnamaldehyde: An insight on delivery systems and food applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **13**, 1–23. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1977236> (2021).
52. Martins Laurentino, A. O. *et al.* Effects of prenatal exposure to temephos on behavior and social interaction. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **15**, 669–673. <https://doi.org/10.2147/NDT.S193896> (2019).
53. Adams, R. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry* 4th edn. (Allured Publishing Crop, 2007) (ISBN-13:979-1932633214).
54. NIST 17. *The NIST 17 Mass Spectral Library (NIST2017/EPA/NIH)* (National Standards and Technology, 2017).
55. Rajeswary, M. *et al.* *Zingiber cernuum* (Zingiberaceae) essential oil as effective larvicide and oviposition deterrent on six mosquito vectors, with little non-target toxicity on four aquatic mosquito predators. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **25**, 10307–10316. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9093-3> (2018).

### Acknowledgements

This work was supported by King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Bangkok 10520, Thailand, in a Grant for KMITL Doctoral Scholarships (Grant No. KDS 2018/001 and KDS 2021/002). We are grateful to Mr. Pratana Kangsadal, for reviewing the English of the manuscript.

### Author contributions

This study was a collaboration of five researchers, each of whose contributions are described as: T.M.: set up the experiment. C.P.: conducted the experiment. J.A.: statistically analyzed the outcomes. S.S.: wrote the original draft. M.S.: conceptualizing and supervising the study, writing review, and editing.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.


### Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29421-2>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to M.S.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023



Contents lists available at ScienceDirect

Heliyon

journal homepage: [www.cell.com/heliyon](http://www.cell.com/heliyon)

Research article



## Adulticidal synergy of two plant essential oils and their major constituents against the housefly *Musca domestica* and bioassay on non-target species

Mayura Soonwera<sup>a,\*</sup>, Tanapoom Mounghthipmalai<sup>a</sup>, Cheepchanok Puwanard<sup>a</sup>, Sirawut Sittichok<sup>a</sup>, Jirisuda Sinthusiri<sup>b</sup>, Hataichanok Passara<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Department of Plant Production Technology, School of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

<sup>b</sup> Community Public Health Program, Faculty of Public and Environmental Health, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan 10540, Thailand

<sup>c</sup> Office of Administrative Interdisciplinary Program on Agricultural Technology (OAIPAT), School of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Adulticidal activity  
Housefly  
Lemongrass EO  
*trans*-anethole  
*Tetragonula pegdeni*  
*Poecilia reticulata*  
Adulticidal synergy  
Antennal and mouthpart aberrations  
Non-target species  
Natural housefly adulticidal agent

## ABSTRACT

Single and mixture formulations of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) and star anise (*Illicium verum* (J. Presl.)) essential oils (EOs) and their major constituents were assayed for their adulticidal activities against housefly, *Musca domestica* L., and two non-target species, stingless bee (*Tetragonula pegdeni* Schwarz) and guppy (*Poecilia reticulata* Peters). The efficacies of the mixture formulations were compared against those of the single formulations and 1.0%  $\alpha$ -cypermethrin, a common synthetic insecticide. GC-MS analysis found that the major constituent of lemongrass EO was geraniol (45.23%), and that of star anise EO was *trans*-anethole (93.23%). Almost all mixture formulations were more effective in adulticidal activity against housefly adults than single formulations and 1.0%  $\alpha$ -cypermethrin. A mixture of 1.0% lemongrass EO + 1.0% *trans*-anethole exhibited the strongest synergistic insecticidal activity with a 100% mortality rate (KT<sub>50</sub> of 3.2 min and LT<sub>50</sub> of 0.07 h). The relative percentage increase in mortality rate over single formulations was between 1.6 and 91.9%. In addition, it was three times more effective than 1.0%  $\alpha$ -cypermethrin. To find the mechanism of adulticidal action, scanning electron microscopy (SEM) was done to find morphological aberrations, such as antennal and mouthpart aberrations, after the houseflies were treated with 1.0% lemongrass EO + 1.0% *trans*-anethole. The aberrations included deformed and abnormal shape of arista and flagellum, change in labellum pigmentation, and damage to pseudotracheae. Regarding toxicity against non-target species, all single and mixture formulations were not toxic to the two non-target species, while 1.0%  $\alpha$ -cypermethrin was highly toxic. To conclude, a mixture of 1.0% lemongrass EO + 1.0% *trans*-anethole can be an excellent, natural, sustainable housefly adulticidal agent.

\* Corresponding author.

E-mail address: [mayura.so@kmitl.ac.th](mailto:mayura.so@kmitl.ac.th), [mayura.soon@gmail.com](mailto:mayura.soon@gmail.com) (M. Soonwera).

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26910>

Received 26 September 2023; Received in revised form 25 January 2024; Accepted 21 February 2024

Available online 27 February 2024

2405-8440/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1. Introduction

One serious global insect vector of numerous diseases is the housefly, *Musca domestica* L. This annoyance-causing insect is a source of more than 150 mammalian infections including viruses, bacteria, protozoa, and helminths [1,2]. Housefly adults are a major nuisance that interferes with dairy cow and chicken feeding, which is why they are a critical issue for dairy and poultry farms [2]. Currently, controlling houseflies is difficult due to the target its resistance to common synthetic insecticides (chlorpyrifos, cypermethrin, deltamethrin, and permethrin) [3,4]. For example, the resistance ratios at median lethal doses (LD<sub>50</sub>) ranged from 30 to 153.7 folds for cypermethrin and from 5 to 16 folds for permethrin [3–5]. In many countries, including Thailand, housefly resistance is increasing [6]. To make matters worse, non-target animals, pollinator insects, beneficial insects, and the ecosystem are adversely affected by synthetic insecticides [7].

Although synthetic insecticides, especially  $\alpha$ -cypermethrin, have several side effects, it is still commonly used to control insect pests in public health and agricultural sectors in Thailand [8]. Therefore, it is a proper positive control in the framework of Thailand's pest insect control for the development of brand-new, powerful natural substances that are safe for humans and the environment [8,9]. Many research teams are currently interested in using natural essential oils from plants (EOs) as insecticidal agents [9–11].

EOs and their primary ingredients from *Myristica fragrans*, *Pimpinella anisum*, *Ocimum gratissimum*, *Laurus nobilis*, *Illicium verum*, *Eucalyptus globulus*, *Cuminum cyminum*, *Cymbopogon citratus*, *Cinnamomum osmophleum*, *Cinnamomum verum*, *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum loureiroi*, *Citrus aurantium*,  $\alpha$ -limonene, and *trans*-cinnamaldehyde are natural insecticidal substances; all of which induce low resistance in insect pests and are biodegradable [9–16]. Furthermore, EOs from *C. verum*, *C. aurantium*, *C. citratus*, *C. cyminum*, *E. globulus*, *O. gratissimum*, *P. anisum*,  $\alpha$ -limonene, and *trans*-cinnamaldehyde are also safe for non-target species such as honeybee (*Apis mellifera*), moonfish (*Poecilia latipinna*), guppy (*Poecilia reticulata*), manure worm (*Eisenia foetida*), predatory stinkbug (*Podisus nigripinus*), and Asian lady beetle (*Harmonia axyridis*) [17–19]. EOs have been employed both singly and in combination to manage insect infestation [20,21]. Insect vector control can benefit from the synergy of mixture EO combinations and mixture combinations of EO and their main active ingredient [22–24]. Mixture EO combinations of *E. globulus* + *C. citratus*, *C. loureiroi* + *C. cassia*, *C. verum* + *C. cassia*, and *C. verum* + *C. loureiroi* showed synergistic adulticidal effects against female houseflies and two mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* [21–23]. Their mixture combinations have synergistic effects against Dipteran insect vectors [23–25]. The main active ingredients from plant EOs that had an adulticidal effect on houseflies, *Ae. aegypti*, and *Ae. albopictus* mosquitoes were monoterpenes such as *trans*-cinnamaldehyde, citronellal, eugenol, limonene, 1,8-cineole,  $\alpha$ -pinene, and *trans*-anethole [22–24]. Mixtures of monoterpene combinations were synergistically effective against housefly and *Ae. aegypti* mosquitoes, such as combinations of *trans*-anethole +  $\alpha$ -pinene,  $\alpha$ -pinene + geranial, carvone + limonene, 1,8-cineole + eudesmol, and 1,8-cineole + citronellal [21–27]. In addition, several mixture combinations of EO and EO constituents exhibited a higher degree of toxicity against housefly and mosquitoes. Their advantages are shorter knockdown time (KT<sub>50</sub>), especially a 0.5%:0.5% (w/w) combination of *I. verum* EO + geranial and *M. fragrans* EO + geranial exhibited a highly synergistic insecticidal effect against *M. domestica* [22] and a 2%:1% (w/w) *C. citratus* EO + *trans*-cinnamaldehyde, *C. citratus* EO + geranial, and *C. citratus* EO +  $\alpha$ -pinene exhibit strong adulticidal activity against *Ae. aegypti* [28]. A substantial adulticidal action on houseflies was also demonstrated by combined formulations of *E. globulus* + geranial and *C. citratus* + 1,8-cineole [29].

Most investigations have found that several formulations combining EO and EO's main active component had a high potential for controlling houseflies in a way that was both environmentally friendly and non-toxic to non-target species [13,24–27]. Therefore, our group was motivated to investigate adult housefly mortality incurred by single formulations and mixture formulations of EOs—lemongrass and star anise—and their active components. At the chosen concentrations, these EO formulations have already been shown to be effective against *M. domestica* and *Ae. aegypti* [20–23]. The chemical components of lemongrass and star anise EOs, the synergistic effect of mixture formulations, and the biosafety of the EO treatments were evaluated against a non-target species, stingless bee (*Tetragonula pegdeni* Schwarz) and guppy (*Poecilia reticulata* Peters), two common non-target organisms, predator, and pollinator, in Thailand and Southeast Asia [13,30]. Once their synergistic adulticidal activity and safety to non-target species have been established, some EO formulations would be a natural, secure, sustainable, and efficient alternative to  $\alpha$ -cypermethrin. The most urgently needed application is for reducing the housefly populations and hence house fly-borne diseases in urban, suburban, and livestock areas.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Collection of plants

All plant material collections and all authors adhered to local, regional, and global regulations. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) issued an approval, oversight, and authorized the collection of plant materials under permit KDS2021/002.

The two EOs used in this investigation were obtained from fresh stems of lemongrass (*C. citratus*: KMITL-01-08) and dried fruits of star anise (*I. verum*: KMITL-01-09). From August to September 2022, fresh stems of lemongrass were harvested at a natural habitat in Wat Nam Daeng Village (13° 35' 58" latitude N/100° 35' 48" longitude E) located in the town of Samut Prakan Province, in the central region of Thailand. Dried fruits of star anise were purchased from a Chinese herb vendor in Samut Prakan Province, Thailand. Hataichanok Passara a plant expert at the KMITL herbarium, identified the two plant species at the School of Agricultural Technology (KMITL), Bangkok, Thailand. All voucher specimens (KMITL-01-08 and KMITL-01-09) were deposited at the KMITL Herbarium, School of Agricultural Technology, KMITL for future reference.

## 2.2. Extraction of two essential oils and their GC-MS analysis

Cleaned and crushed 800 g (in 1600 ml of distilled water) of each plant were hydro-distilled in a Clevenger-type apparatus to extract its EO. The extraction process followed the protocol described by Soonwera and Sittichok [21]. Each EO was then filtered into a 100 ml container with a brown hue. It was then kept at 4 °C until it was used in GC-MS analysis as well as insecticidal experiments.

Each EO was subjected to a mass-spectrometric examination using an Agilent 6890 N gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) at the Scientific Center, KMITL. The used column, the temperature of the column, the temperature of the injector, carrier gas, acquisition mass range, and essential oil constituents' quantification were similar to those described in Aungtikun et al. [22]. Identification of the constituents of essential oils was done by computing retention indices (RI) using a homologous hydrocarbons series (C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub> n-alkanes) and peak area percentage in the chromatogram. The constituent's identification was completed by comparing the RI and mass spectra with one of three standard literature databases: NIST-MS (National Institute of Standards and Technology) [31], ADAMS [32], or the National Library of Medicine [33]. Every EO was checked three times, and the final observations were presented as mean ± standard deviation.

## 2.3. Source and purity of reagents

This investigation only employed reagent-grade compounds. Standard homologous hydrocarbons series (C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub> n-alkanes), geranial, the main ingredient of lemongrass EO (*C. citratus*), which was 96% pure, and *trans*-anethole, the main ingredient of star anise EO (*I. verum*), which was 98% pure, were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Alpha-cypermethrin (10% w/v) was used as a positive control and ethyl alcohol (95% v/v) was used as a negative control. They were supplied by SM Chemical Supplies Company (Bangkok, Thailand).

## 2.4. Raising housefly (*Musca domestica*)

Housefly were reared in the laboratory of the Entomological division, School of Agricultural Technology, KMITL, in an air-conditioned room under the conditions of 27.5 ± 3.5 °C, 75.0 ± 2.5 RH, and 12 h photoperiod. A day after their initial feeding, adult females laid eggs on pieces of mackerel fish on sterile coconut husks in a plastic container (17 × 25 × 6 cm<sup>3</sup>). The eggs then turned into larvae and pupae. The housefly-rearing protocol has been described by Soonwera and Sittichok [21]. The insecticidal assay was conducted on fresh, 3-day-old adult houseflies.

## 2.5. Adulticidal assay on housefly

The standard susceptibility test of the World Health Organization (WHO) [34] was used to evaluate the adulticidal efficacy against housefly adults. In a treatment tube that measured 125 mm in length and 44 mm in diameter, ten 3-day-old housefly adults of both sexes were exposed to 2 mL of either single or mixture formulations for an hour. Two milliliters of each formulation, one at a time, were put onto a sheet of Whatman No 1 filter paper with a surface area of 12 cm by 15 cm<sup>2</sup>. Housefly adults were subsequently moved to the non-treatment tube and monitored there for 24 h. Each treatment was repeated five times, with 1% (w/v) α-cypermethrin serving as the concurrent positive control. To decide whether the adult houseflies had been knocked down or killed, the authors observed the movement of their antennae, head, thorax, wings, legs, and belly. No movement indicated a knockdown or mortality [22]. At 1, 5, 10, 30, and 60 min after exposure, we observed and reported the knockdown rate for each formulation. At 24 h after exposure, we observed and recorded the mortality rate. The knockdown (%K) and mortality (%M) rates of adult houseflies were determined using the following formulae [22; Eqs. (1) and (2)],

$$\text{Knockdown rate (\%K)} = \text{KD}/\text{TN} \times 100, \quad (1)$$

$$\text{Mortality rate (\%M)} = \text{MT}/\text{TN} \times 100, \quad (2)$$

where KD is the total number of adult houseflies knocked down; MT is the total number of adult houseflies dead; and TN is the total number of adult houseflies treated.

The knockdown index (KI) was determined using the following formula [22; Eq. (3)],

$$\text{KI} = \text{KT}_{50} \text{ of treatment} / \text{KT}_{50} \text{ of } \alpha\text{-cypermethrin}. \quad (3)$$

KI < 1 signifies that the formulation, either single or mixture, was more toxic than α-cypermethrin; and KI > 1 signifies that the formulation was less toxic than α-cypermethrin.

Mortality index (MI) was determined using the following formula [22; Eq. (4)],

$$\text{MI} = \text{LT}_{50} \text{ of treatment} / \text{LT}_{50} \text{ of } \alpha\text{-cypermethrin}. \quad (4)$$

MI < 1 signifies that the formulation, either single or mixture, was more toxic than α-cypermethrin; and MI > 1 signifies that the formulation was less toxic than α-cypermethrin.

Synergistic mortality index (SMI) was determined using the following formula [23; Eq. (5)],

$$\text{SMI} = \text{LT}_{50} \text{ of the mixture formulation} / \text{LT}_{50} \text{ of the single formulation}. \quad (5)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SMI < 1 suggests that there is a synergistic effect, and SMI > 1 suggests that there is an antagonistic effect. Increased mortality value (IMV) was determined using the following formula [23; Eq. (6)],

$$\text{IMV} = [\% \text{Mof mixture formulations} - \% \text{Mof single formulations} / \% \text{Mof mixture formulations}] \times 100. \quad (6)$$

## 2.6. Safety assays on non-target organisms, stingless bee (*Tetragonula pegdeni*) and guppy (*Poecilia reticulata*)

The toxicity of every formulation was evaluated against a non-target pollinator, stingless bee (*T. pegdeni*) using the method of Dorneles et al. [35] and Matos et al. [36]. One hundred adult workers from three natural colonies of stingless bees were gathered from the KMITL organic farm into an insect box (17 × 24 × 5 cm) and transported to our laboratory in 1 h, Jirisuda Sinthusiri an entomologist, completed the stingless bee scientific identification. The stingless bee workers were fed with 40% (w/v) glucose and maintained at 28.5 ± 2.0 °C and 79.3 ± 3.0% RH for 2 days before the topical application test. Before the topical application, the stingless bees were anesthetized at -8 °C for 1 min. Then, they were applied 1 µL of each test formulation (at 10,000 ppm concentration) to their mesonotum part. After application, ten stingless bees were transferred into an insect box (7.5 × 10 × 4.5 cm) and fed with 40% (w/v) glucose. Five repeats of each treatment were done, along with 1% (w/v) α-cypermethrin as a positive control. After 5, 10, 30 min, 1, 12, and 24 h of exposure, mortality and aberrant behaviors, such as reduced feeding and activity, were observed.

The toxicity assay against a non-target aquatic predator guppy (*P. reticulata*) was identical to the method used by Mounghipmalai et al. [13]. The guppy fish species were purchased from an organic farm in Kanchanaburi Province, Thailand. Tanapoom Mounghipmalai, an animal taxonomist, completed the guppy scientific identification. They were individually kept in a plastic bucket (40 × 58 × 30 cm) containing 80 L of water at 36.5 ± 2.0 °C and 60.5 ± 5.0% RH. For testing each formulation, ten adult guppies were put in a plastic bucket (38 × 26 × 20 cm) containing 5 L of water. A treatment was added to it, 10,000 ppm of each formulation. Five repeats of each treatment were done, along with 1% (w/v) α-cypermethrin as a positive control. Data on mortality and swimming inefficiency were recorded at 1, 3, 6 h, 1, 2, 3, 4, and 5 days after the exposure.

The mortality rate of non-target species was determined using the following formula [13,36; Eq. (7)],

$$\text{Mortality rate (\%N)} = \text{NT/TT} \times 100. \quad (7)$$

where NT is the total number of dead adults of the non-target species, and TT is the total number of treated adults of the non-target species.

Safety index (SI) was determined using the following formula [13; Eq. (8)],

$$\text{SI} = \text{LT}_{50} \text{ of non-target species} / \text{LT}_{50} \text{ of target species}. \quad (8)$$

**Table 1**  
Chemical compositions of the two essential oils (EOs) assayed for adulticidal activity in this study.

No.	Component <sup>a</sup>	RD <sup>b</sup>	KR <sup>c</sup>	Peak area (%) ± SD <sup>d</sup>		Identification <sup>e</sup>
				lemongrass EO	star anise EO	
1.	α-Thujene	932	930	-	0.25 ± 0.02	A,B,C
2.	α-Pinene	981	982	3.23 ± 0.11	-	A,B,C
3.	α-Terpinene	1010	1010	0.16 ± 0.02	-	A,B,C
4.	1,8-Cineole	1025	1025	10.83 ± 0.94	0.71 ± 0.04	A,B,C
5.	Limonene	1031	1032	-	1.83 ± 0.08	A,B,C
6.	γ-Terpinene	1051	1052	0.17 ± 0.04	-	A,B,C
7.	Linalool	1097	1098	0.82 ± 0.04	-	A,B,C
8.	α-Terpineol	1179	1178	-	0.43 ± 0.01	A,B,C
9.	Neral	1216	1217	24.62 ± 1.23	-	A,B,C
10.	p-Anisaldehyde	1247	1247	-	1.51 ± 0.08	A,B,C
11.	Geraniol	1240	1240	6.12 ± 0.98	-	A,B,C
12.	Geranial	1246	1246	45.22 ± 1.12	-	A,B,C
13.	trans-Anethole	1283	1283	-	93.24 ± 2.04	A,B,C
14.	Eugenol	1355	1356	-	0.62 ± 0.02	A,B,C
15.	Geranyl acetate	1380	1380	4.11 ± 0.92	-	A,B,C
16.	Caryophyllene oxide	1581	1580	2.12 ± 0.89	-	A,B,C
	Total (%)			97.40 ± 0.52	98.59 ± 0.95	
	Yield (%)			1.19 ± 0.10	3.13 ± 0.08	
	Density (g/ml)			0.96 ± 0.08	0.97 ± 0.09	
	Color			pale yellow	pale yellow	

<sup>a</sup> Major and minor compounds of EOs are listed in order of elution in the HP-5 MS column.

<sup>b</sup> RD, Retention index calculated using the retention time in relation to the homologous series of C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub> n-alkanes.

<sup>c</sup> KR, Kovats index is taken from NIST-MS [31] or ADAMS [32] or National Library of Medicine [33].

<sup>d</sup> Average of three runs.

<sup>e</sup> Identification: A, substance matching was done with a readily available analytical standard (Sigma Aldrich); B, mass spectrum matching with those reported in ADAMS [32] or NIST-MS [31] or National Library of Medicine [33]; and C, retention index overlapping with those reported in NIST-MS [31] and National Library of Medicine [33].

SI > 1 signifies that the formulation, either single or mixture, was benign to the non-target species; and SI < 1 signifies that the formulation was toxic to the non-target species.

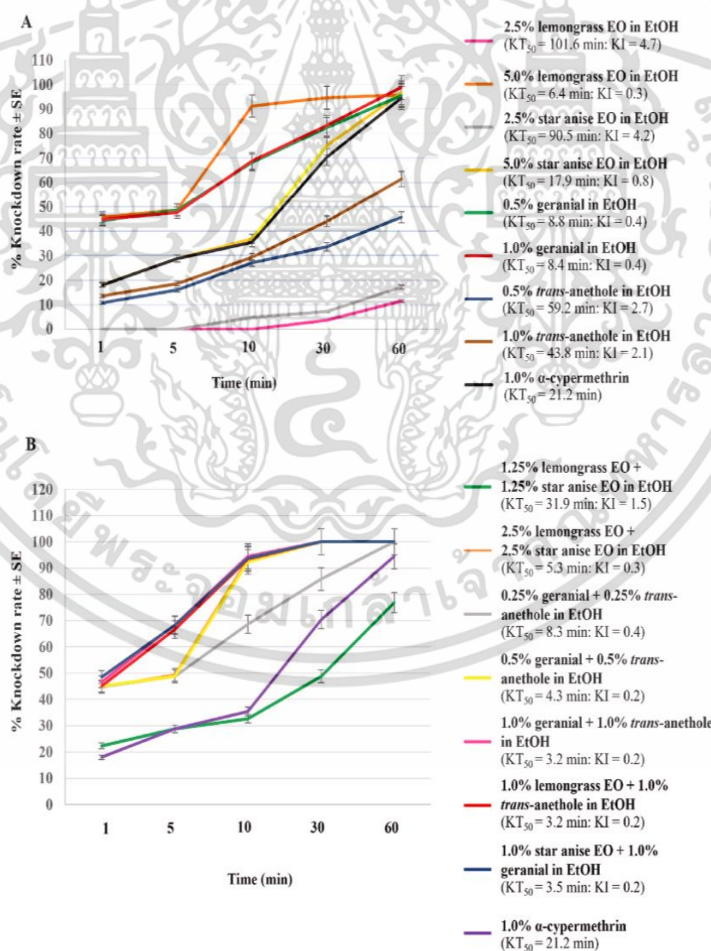
The Ethics Committee of King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (number KDS2021/002) had given its approval to each bioassay used in this research.

2.7. Preparation of adult samples for scanning electron microscopy

After 24 h of treatment, the morphology of the head, antennae, and mouthpart of the adult houseflies that underwent a treatment or control was observed under scanning electron microscopy (SEM). Heads of all samples were cut off and placed in 70% ethanol at room temperature. After being washed in 70% ethanol, the samples, the heads, were postfixed in 95% ethanol for 90 min. Then, they were dehydrated in absolute alcohol (100%) three times at 90 min each time. Samples were dried with a CO<sub>2</sub> critical point drier. The dried head samples were then mounted on aluminium stubs with double-sided adhesive tape, coated with gold, and observed with a JSM-6610LV scanning electron microscopy (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) at the Scientific and Technological Research Equipment Centre, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

2.8. Data analysis

All experiments were of completely randomized design (CRD), and the results were expressed as the mean ± SD. The average knockdown data were subjected to a probit regression analysis to calculate the knockdown time KT<sub>50</sub>. In the case of mortality data, LT<sub>50</sub> values were calculated [37]. Using a one-way analysis of variance (ANOVA), the treatment's impact was assessed. If the analysis



**Fig. 1.** Knockdown time ±SE against housefly of single EO or EO constituent formulations (A) and mixture formulations (B). Note: KT<sub>50</sub> = 50% Knockdown Time; Knockdown index (KI) = [KT<sub>50</sub> of treatment/KT<sub>50</sub> of α-cypermethrin] [22]; KI < 1 signifies that the formulation, either single or mixture, was more toxic than α-cypermethrin, and KI > 1 signifies that the formulation was less toxic than α-cypermethrin.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

of variance indicated significant differences between the groups ( $P < 0.05$ ), a Tukey's post hoc test ( $P < 0.05$ ) was carried out to ascertain the significant difference between the control and multiple treatment groups. All statistics were calculated with SPSS Statistical Software Package version 25.0.

### 3. Results

#### 3.1. Yields and chemical profiles of the two EOs

Yields of EOs from the hydro-distillation procedure were identified, and GC-MS analysis of their chemical makeups was conducted. Also identified were some of the EOs' physical characteristics. Table 1 lists each constituent's percentage fraction, as well as its retention index (RI) and Kovats retention index (KR). Pale yellow EOs were produced by lemongrass stems and star anise fruits. Their yields were 1.19 and 3.13%, respectively. Lemongrass EO had a density of 0.96 g/ml, and star anise EO had a density of 0.97 g/ml. The primary components of the lemongrass EO were geranial (45.22%) and neral (24.62%). A total of 10 chemical components were found, accounting for 97.40% of the total composition. The minor constituents were 1,8-cineole (10.83%), geraniol (6.12%), geranyl acetate (4.11%),  $\alpha$ -pinene (3.23%), caryophyllene oxide (2.12%), linalool (0.82%),  $\gamma$ -terpinene (0.17%), and  $\alpha$ -terpinene (0.16%). *Trans*-anethole (93.24%) was the primary constituent of the star anise EO. A total of 7 chemical components were found, accounting for 98.59% of the total composition. The minor constituents were limonene (1.83%), *p*-anisaldehyde (1.51%), 1,8-cineole (0.71%), eugenol (0.62%),  $\alpha$ -terpinene (0.43%), and  $\alpha$ -thujene (0.25%).

#### 3.2. Effects on housefly of single and mixture formulations

Figs. 1 and 2 showed the evaluation of the knockdown and mortality rates, 50% knockdown time ( $KT_{50}$ ), 50% lethal time ( $LT_{50}$ ), knockdown index (KI), and mortality index (MI) of single and mixture formulations against housefly. Housefly was more sensitive to all mixture formulations ( $KT_{50}$  value from 3.2 to 31.9 min) (Fig. 1B) than single formulations ( $KT_{50}$  value from 6.4 to 101.6 min) (Fig. 1A) at 1 h following exposure. Most single and mixture formulations had a knockdown rate greater than 1.0% (*w/v*)  $\alpha$ -cypermethrin; the KI was 0.2. With the lowest  $KT_{50}$  of 3.2 min and a KI of 0.2, 1.0% geranial + 1.0% *trans*-anethole and 1.0% lemongrass EO + 1.0% *trans*-anethole had the highest knockdown activity (Fig. 1).

Additionally, housefly was more vulnerable to all mixture formulations 24 h after treatment than it was to single formulations, with mortality rates ranging from 78.5 to 100% and an  $LT_{50}$  of 0.09–8.4 h. It was less susceptible to single formulations that offered mortality rates of 21.4–98.4% and an  $LT_{50}$  of 0.1–60.9 h. When compared to 1.0% (*w/v*)  $\alpha$ -cypermethrin, the adulticidal activity of the mixture formulations was 0.003–0.939 times higher. The strongest adulticidal effect was produced by 1.0% geranial + 1.0% *trans*-anethole and 1.0% lemongrass EO + 1.0% *trans*-anethole, which provided a 100% mortality rate, the lowest  $LT_{50}$  of 0.07 h, and an MI of 0.003 (Fig. 2).

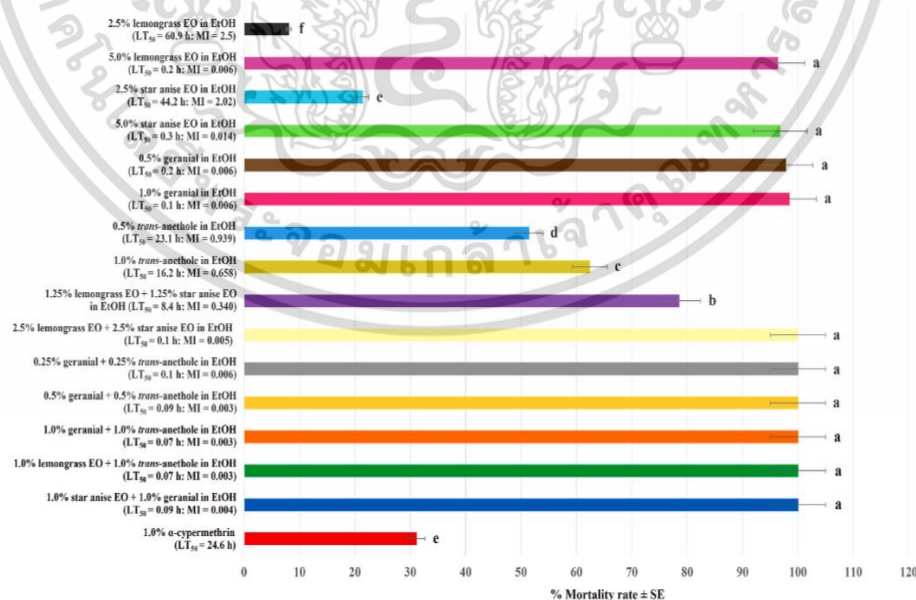


Fig. 2. Mortality rate  $\pm$ SE against housefly of single EO or EO constituent and mixture formulations.

Note: Mean mortality rates  $\pm$ SE within a column followed by the same letter do not differ significantly (Tukey's post hoc test  $P < 0.05$ ),  $LT_{50}$  = 50% Lethal Time, and Mortality Index (MI) = [ $LT_{50}$  of treatment/ $LT_{50}$  of  $\alpha$ -cypermethrin] [22]; MI < 1 signifies that the formulation, either single or mixture, was more toxic than  $\alpha$ -cypermethrin, and MI > 1 signifies that the formulation was less toxic than  $\alpha$ -cypermethrin.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

All mixture formulations demonstrated a synergistic effect, displaying greater toxicity than that of single formulations, with an SMI of 0.001–0.9. Their synergistic effect increased mortality, with IMV increasing from 1.6 to 91.9%. The formulation with the strongest synergistic effect, with an SMI ranging from 0.001 to 0.004, was 1.0% lemongrass EO + 1.0% *trans*-anethole. Its IMV of 37.6–91.9% was the formulation's maximum synergistic impact (Fig. 3).

### 3.3. Effects on two non-target species, stingless bee and guppy of single and mixture formulations

In this study, the safety index (SI) value of a formulation was defined as  $LT_{50}$  of non-target species divided by  $LT_{50}$  of houseflies. A value higher than one was considered safe, while a value lower than one was considered toxic. The computed SI of all formulations made from lemongrass and star anise EOs and their major constituent against two non-target species, stingless bee, and guppy, are presented in Fig. 4. All formulations showed low toxicity to two non-target species, with stingless bee (Fig. 4A) and guppy adults (Fig. 4B) having an  $LT_{50}$  range of 21.3–353.7 h. All formulations provided an SI of higher than 1 (1.1–4901.4). On the other hand, 1.0% (w/v)  $\alpha$ -cypermethrin was highly toxic to the adult stingless bee and guppy, with a mortality rate of 100% at 1 h ( $LT_{50}$  of 0.08) and 5 days (1.2 h). Its safety index (SI), which ranged from 0.003 to 0.05, was extremely low, signifying that all EO formulations were extremely safe.

## 4. Discussion

The current study shows that lemongrass and star anise essential oils, gathered from central Thailand, were viable sources of phytochemicals. According to the EO yield data, the extraction of lemongrass and star anise were 1.19 and 3.13% v/w, respectively, slightly different from the yields previously reported [21,22]. Several studies reported that the hydro-distillation process produced EO yields of lemongrass (*C. citratus*) that ranged from 0.79 to 1.10% v/w [21,22,38], whereas star anise (*I. verum*) reported EO yields ranged from 4.0 to 6.7% v/w [22,39]. The GC-MS part of the study revealed that their chemical compositions matched those previously mentioned in the literature [38,39]. Geranial was discovered to be the primary component of lemongrass EO (*C. citratus*), accounting for 45.22% of the total chemical composition, within the previously reported range of 40.7–45.4% [22,38]. *Trans*-anethole was discovered to be the primary component of star anise EO (*I. verum*), accounting for 93.24% of the total chemical composition, within the previously reported range of 88.5–94.0% [22,39,40]. Many important variables, including the quality of the raw plant materials, the management practice of plant cultivations [22], and the extraction procedures [41,42], can be explained by slight variations in the EO yield and the chemical profile of both EOs from the previously published values.

In this study, all mixture formulations showed a pronounced synergistic effect against housefly adults with a high SMI. The formulations 1.0% geranial + 1.0% *trans*-anethole and 1.0% lemongrass EO + 1.0% *trans*-anethole showed the highest level of synergy, improving the mortality rate to more than 90.0%. This result was consistent with the result of another study. That study found that *C. citratus* EO +  $\alpha$ -pinene (2%:1% (w/w)) exhibits strong adulticidal activity against *Ae. aegypti* [28]. Aungtikun et al. [22] concluded that the mortality rate against *M. domestica* rose to more than 50% when EOs from *I. verum* EO + geranial, *M. fragrans* EO + geranial,

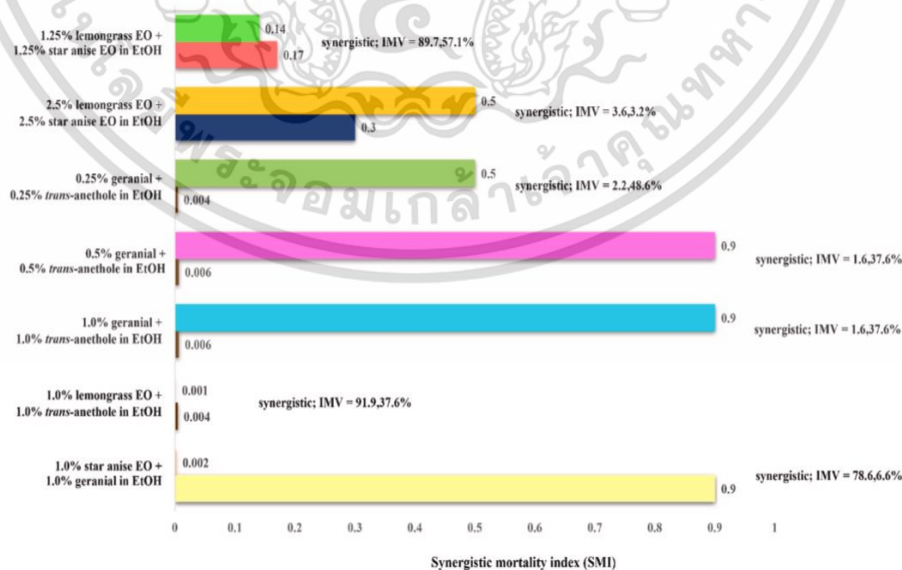


Fig. 3. Synergistic mortality index of mixture formulations against housefly.

Note: Synergistic mortality index (SMI) =  $[LT_{50}$  of mixture formulation/ $LT_{50}$  of single formulation] [23]; SMI < 1 suggests that there is a synergistic effect, and SMI > 1 suggests that there is an antagonistic effect and Increased mortality value (IMV) =  $[\%M$  of mixture formulations –  $\%M$  of single formulations/ $\%M$  of mixture formulations]  $\times$  100 [23].

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

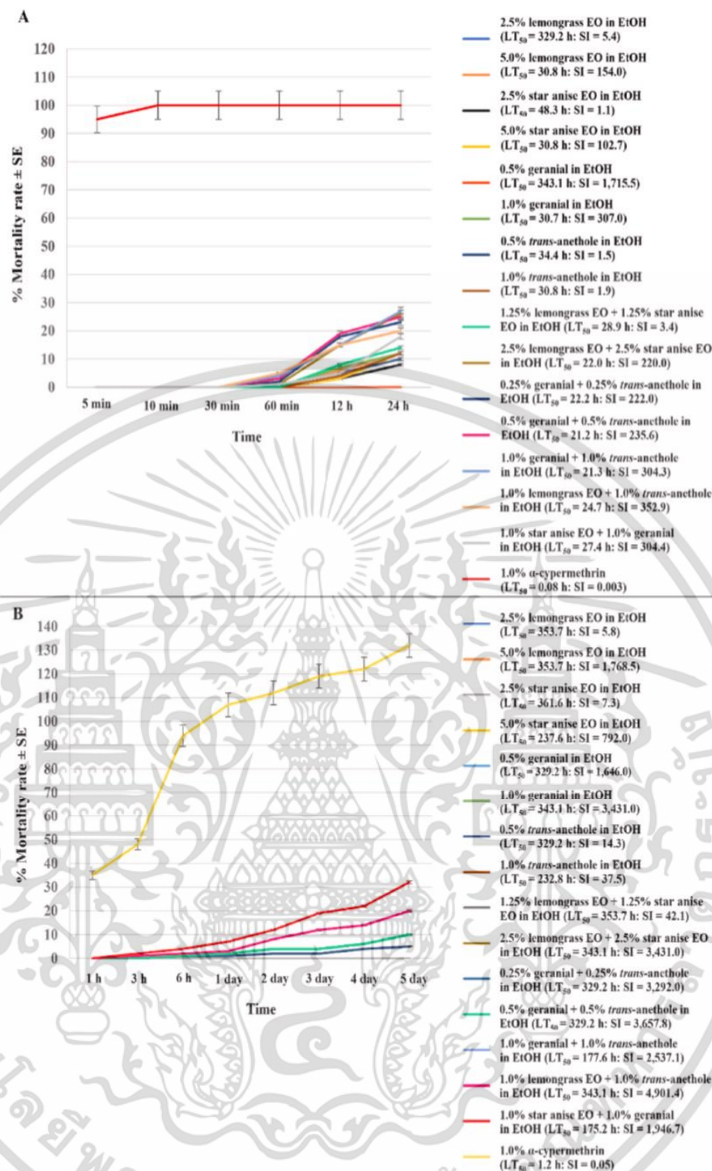
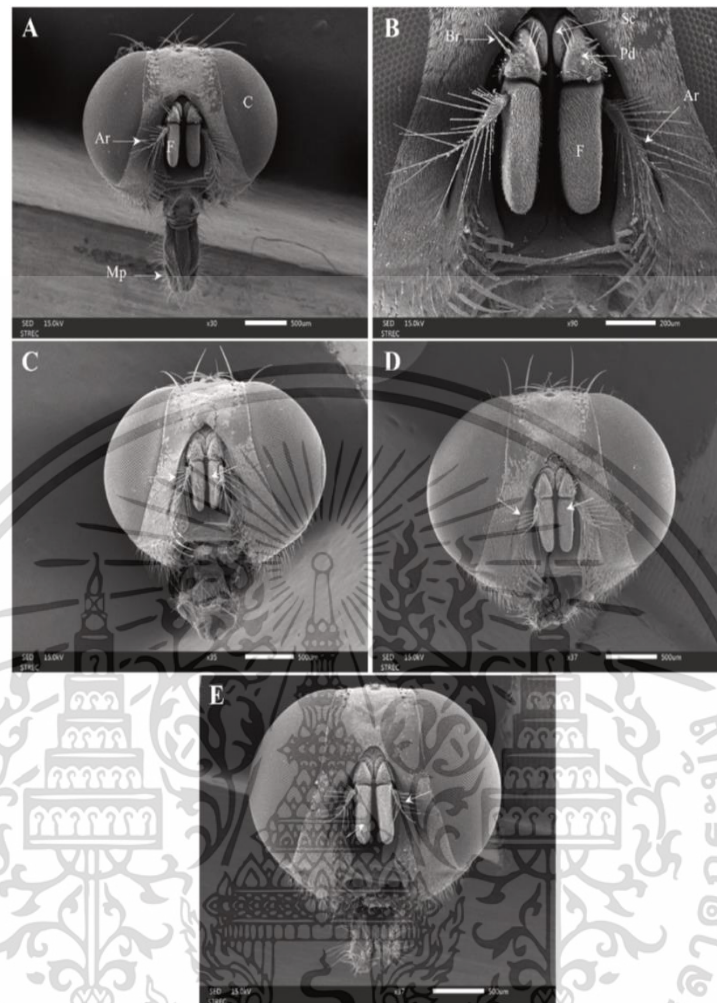


Fig. 4. Mortality rate ±SE of single EO and EO constituent formulations and mixture formulations against two non-target species: stingless bee (A) and guppy (B).

Note: LT<sub>50</sub> = 50% Lethal Time, Safety index (SI) = [LT<sub>50</sub> of non-target species/LT<sub>50</sub> of target species] [13]; SI > 1 signifies that the formulation, either single or mixture, was benign to the non-target species; and SI < 1 signifies that the formulation was toxic to the non-target species.

and α-pinene + geranial at 0.5%:0.5% was combined into a mixture. The EO combination of *C. citratus* EO + *E. globulus* EO (1:1 ratio) had a powerful synergistic impact (100% knockdown and mortality rates) against *M. domestica* females, with an increased mortality rate of more than 90.0% [21]. The monoterpene mixture of 1,8-cineole + geranial (2.5%:2.5%) exhibited synergistic insecticidal effects against *M. domestica* females [21]. In addition, mixtures of monoterpenoid essential oil compounds from *p*-cymene + 1, 8-cineole, *p*-cymene + γ-terpinene, and γ-terpinene + 1,8-cineole displayed synergistic toxicity to *M. domestica* adults [43]; citral + limonene, and 1,8-cineole + camphor showed synergistic toxicity against *Tichoplusia ni* [44,45]; and trans-anethole + estragole and trans-anethole + estragole + linalool showed strong synergistic effects against *Cryptolestes ferrugineus* [46]. Similarly, a mixture of *Rosmarinus officinalis* EO + *E. globulus* EO (10%:10%) showed strong synergistic toxicity against *Cx. pipiens*, *Blattella germanica*, and *M. domestica* [47].

Regarding SEM images, they showed clearly the morphological alterations induced by EO treatments when compared with non-treated adult head (Fig. 5A), non-treated adult antennae (Fig. 5B), and non-treated adult mouthparts (Fig. 6A, B). Fig. 5C, D, E showed morphological damages of external structure in the shape of flagellum and antennae balance as well as deformed maxillary



**Fig. 5.** Scanning electron micrographs of the head of housefly: (A) non-treated adult head, showing full external structure with compound eye (c), arista (Ar), elongated flagellum (F), and maxillary palp (Mp); (B) non-treated adult antennae, showing full external structure with bristle (Br), scape (Sc), and pedicel (Pd); morphological damage to antennae and elongated flagellum after treated with lemongrass EO (C), geraniol (D), and a mixture of lemongrass EO + *trans*-anethole (E).

palps, covered with a layer (Fig. 6C, D) that was thought to be an oil layer, that would account for the EOs' insecticidal mechanism.

Regarding the potential for houseflies to develop resistance to these natural agents, it is very unlikely because the mixtures of EOs exert their actions through multiple mechanisms [48]. All the mixture EO formulations examined in this study appeared to have a synergistic mechanism of action that was closely related to the modes of action of their primary ingredients [45,46]. EOs and their major constituents with different mechanisms of action can be more efficient in reducing or preventing resistance rates against insect pests, including housefly [16,45,48]. A mixture formulation, 1.0% lemongrass EO + 1.0% *trans*-anethole, damaged the olfactory sense in the antennae and maxillary palps as well as the neural systems of housefly and other insects [45,47,49]. Lemongrass EO acted toxically on the olfactory sense in the antennae and the integument branes of housefly by inhibiting enzymes acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) [22,49]. It was toxic to *M. domestica* larvae causing cell shrinkage, spinous cells to proliferate, pupae to emerge partially, and adults to develop abnormally [50]. *M. domestica*'s nervous system synapses were damaged by star anise EO, geraniol, and *trans*-anethole. All caused cell membrane damage, slowed down cellular metabolism, inhibited AChE activity in a neurotoxic manner, and caused acetylcholine to accumulate [49,51]. These effects resulted in hyperactivity, immobility, knockdown, morbidity, and mortality [16,45,50,52,53]. Furthermore, a mixture of monoterpenoids is a more effective AChE inhibitor than a single monoterpenoid. They work together harmoniously [25].

According to the safety data, all EO formulations were safe for the adults of the two non-target species, stingless bee and guppy. Their SI was larger than 1 and their  $LT_{50}$  values were high (see Fig. 4A and B). A mixture formulation—1.0% lemongrass EO + 1.0% *trans*-anethole—was outstandingly benign to stingless bee and guppy adults, with a 0.001% mortality rate. In contrast, 1.0% (w/v)  $\alpha$ -cypermethrin was highly toxic to the two non-target species, with a low SI, and  $LT_{50}$ .

EOs and their components are frequently regarded as safe for natural insect adversaries, pollinators, and other invertebrate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

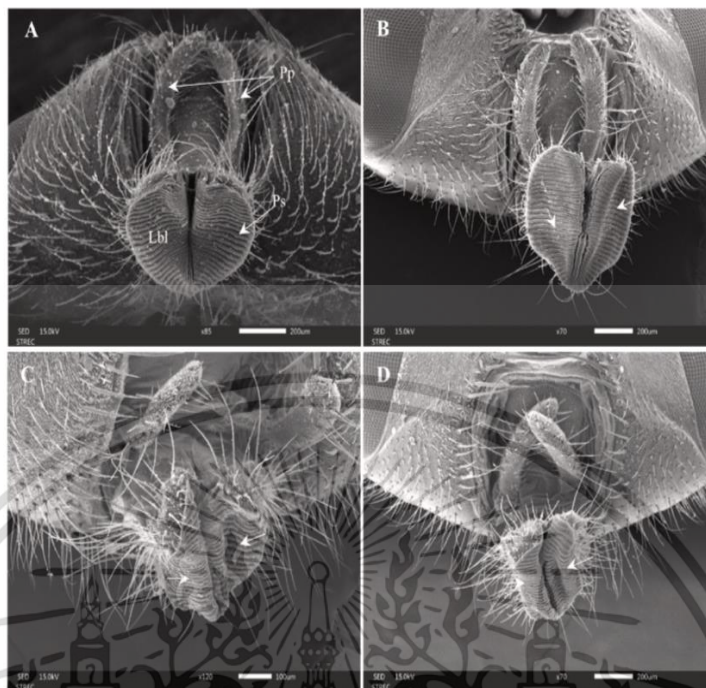


Fig. 6. Scanning electron micrographs of the mouthparts of housefly: (A,B) non-treated, showing full external structure with tips of palpus (Pp), labellum (Lbl), and labellum with pseudotracheae (Ps); morphological damage to mouthparts after treated with lemongrass EO (B), geranial (C), and a mixture of lemongrass EO + *trans*-anethole (D).

organisms [13,14,54,55]. Two studies reported that *C. citratus* EO and geranial were safe to a predator fish, guppy (*P. reticulata*) [13], and a predator bug, *P. nigrispinus* (Heteroptera) [19]. *Trans*-anethole and lemongrass EO did not show any toxic effect against honeybee, *A. mellifera* workers [14,54]. EOs from rosemary pepper and its major compounds, (*E*)-caryophyllene and *p*-cymene were not toxic to stingless bees, *Nannotrigona* aff. *testaceicornis* [56]. In addition, Mounghthipmalai et al. [13] supported that a combination of *C. verum* EO + geranial (2:1 ratio) did not show toxicity against two species of predator fish, *P. latipinna* and *P. reticulata*. A combination of EOs from *Cedrus atlantica* + *Corymbia citriodora* + *C. citratus* (1:1:1 ratio) was safe to parasitoid of *Ceratitis capitata* (Diptera) and *Psytalia concolor* (Hymenoptera) [57]. On the other hand, commonly, synthetic insecticides are regarded as poisonous to pollinators and other naturally occurring insect pest enemies [58]. Cypermethrin is highly toxic to stingless bees, *Meliponula bocandei*, with a low  $LC_{50}$  of 0.66–0.76  $\mu\text{g/ml}$  [59]. To make matters worse, cypermethrin contributes significantly to environmental pollution since it can build up in the soil, water, and air. Due to its high accumulation in the environment, it becomes very toxic to fish, pollinator species, and other non-target species [56,59]. In addition, cypermethrin is hazardous to mammals and humans [60]. It is poisonous to the human central nervous system, causing hyperexcitation of neurons, nausea, headaches, incontinence, shortness of breath, convulsion, and even death [60]. In contrast, EOs and their constituents do not accumulate in the environment, making them far safer for non-target species and natural insect pest enemies [11,14]. In this study, all EO formulations had an SI greater than 1, indicating that they were all entirely safe for these non-target species. Furthermore, the primary components of EOs from lemongrass and star anise neither damaged nor altered the histopathology of human cells [61,62]. They have long been used as traditional Asian medicine and food ingredients [38–41].

## 5. Conclusion

Due to their efficacy and safety, the outstanding mixture formulation—1.0% lemongrass EO + 1.0% *trans*-anethole—should be developed further into a natural adulticidal agent for managing housefly populations in urban and suburban areas and organic farms. Most importantly, the chosen EO and EO constituent—lemongrass EO and *trans*-anethole—are readily available and reasonably priced, which makes them excellent choices for inclusion in an insecticidal formulation. Several tests must be conducted along the way before the formulation can be developed into a commercial product, tests such as post-application humidity and temperature tests. Furthermore, semi-field and field studies on factors impacting the death of target and non-target species (biological stability of temperatures and humidities) as well as non-target effects, and toxicity on human cells should be investigated.

## Ethics approval

This study was reviewed and approved by the Ethics Committee of King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, with the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 10  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

approval number: KDS2021/002.

### Funding statement

This work was supported by King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Bangkok 10520, Thailand, in a grant for KMITL Doctoral Scholarship (Grant No. KDS2021/002).

### Data availability statement

Data will be made available on request.

### CRedit authorship contribution statement

**Mayura Soonwera:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Conceptualization. **Tanapoom Mounghipmalai:** Funding acquisition, Formal analysis, Data curation. **Cheepchanok Puwanard:** Methodology, Formal analysis, Data curation. **Sirawut Sittichok:** Writing – original draft, Investigation, Formal analysis. **Jirisuda Sinthusiri:** Writing – original draft, Investigation, Formal analysis. **Hataichanok Passara:** Writing – original draft, Investigation, Formal analysis.

### Declaration of competing interest

Tanapoom Mounghipmalai reports financial support was provided by King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang. If there are other authors, they declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Acknowledgments

The authors wish to thank the herbal specialist at the KMITL Herbarium for their help in identifying the species of plants. The authors thank Mr. Pratana Kangsadal for reviewing the English of the manuscript.

### Abbreviations

EOs	Essential Oils
EO	Essential Oil
KI	Knockdown Index
MI	Mortality Index
SMI	Synergistic Mortality Index
IMV	Increased Mortality Value
SI	Safety Index; EtOH, Ethyl alcohol

### References

- [1] C.J. Geden, D. Nayduch, J.G. Scott, E.R. Burgess IV, A.C. Gerry, et al., House fly (Diptera: Muscidae): biology, pest status, current management prospects, and research needs, *J. Integr. Pest Manag.* 12 (1) (2021) 1–38, <https://doi.org/10.1093/jipm/pmaa021>, 39.
- [2] A. Voulgari-Kokota, L.W. Beukeboom, B. Wertheim, J.F. Salles, Houseflies harbor less diverse microbiota under laboratory conditions but maintain a consistent set of host-associated bacteria, *Sci. Rep.* 12 (2022) 11132, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15186-7>.
- [3] Q. Li, J. Huang, J. Yuan, Status and preliminary mechanism of resistance to insecticides in a field strain of housefly (*Musca domestica*, L), *Rev. Bras. Entomol.* 62 (4) (2018) 311–314, <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2018.09.003>.
- [4] H.A.A. Khan, W. Akram, S.A. Shad, Resistance to conventional insecticides in Pakistani populations of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae): a potential ectoparasite of dairy animals, *Ecotoxicology* 22 (2013) 522–527, <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1044-2>.
- [5] H.A.A. Khan, W. Akram, A. Fatima, Resistance to pyrethroid insecticides in house flies, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) collected from urban areas in Punjab, Pakistan, *Parasitol. Res.* 116 (2017) 3381–3385, <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5659-8>.
- [6] S. Upakut, K.L. Sukontason, N. Bunchu, R.M. Pereira, K. Sukontason, Behavioral response of house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) to natural products, *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health* 48 (3) (2017) 561–569.
- [7] K. Ranian, M.K. Zahoor, M.A. Zahoor, H. Rizvi, A. Rasul, et al., Evaluation of resistance to some pyrethroid and organophosphate insecticides and their underlying impact on the action of esterases and phosphatases in house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), *Pol. J. Environ. Stud.* 30 (1) (2020) 327–336, <https://doi.org/10.15244/pjoes/96240>.
- [8] S. Lorn, W. Klakankhai, P. Nusen, A. Sumarnrote, K. Tainchum, Pyrethroid susceptibility in *Stomoxys calcitrans* and *Stomoxys indicus* (Diptera: Muscidae) collected from cattle farms in Southern Thailand, *Insects* 13 (2022) 711, <https://doi.org/10.3390/insects13080711>.
- [9] M.R.S. Silverio, L.S. Espindola, N.P. Lopes, P.C. Vieira, Plant natural products for the control of *Aedes aegypti*: the main vector of important arboviruses, *Molecules* 25 (15) (2020) 3484, <https://doi.org/10.3390/molecules25153484>.
- [10] E. Spinozzi, F. Maggi, G. Bonacucina, R. Pavela, M.C. Boukouvala, et al., Apiaceae essential oils and their constituents as insecticides against mosquito—a review, *Ind. Crops Prod.* 171 (2020) 113892, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113892>.
- [11] J.M. Chintalchere, M.A. Dar, R.S. Pandit, Biocontrol efficacy of bay essential oil against housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), *J. Basic Appl. Zool.* 81 (2020) 6, <https://doi.org/10.1186/s41936-020-0138-7>.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [12] M.B. Isman, Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides, *Phytochem. Rev.* 19 (2020) 235–241, <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09653-9>.
- [13] T. Mounghthipmalai, C. Puwanard, J. Aungtikun, S. Sittichok, M. Soonwera, Ovicidal toxicity of plant essential oils and their major constituents against two mosquito vectors and their non-target aquatic predators, *Sci. Rep.* 13 (2023) 2119, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29421-2>.
- [14] R. Bava, F. Castagna, E. Palma, M. Marrelli, F. Conforti, et al., Essential oils for a sustainable control of honeybee varroosis, *Vet. Sci.* 10 (5) (2023) 308, <https://doi.org/10.3390/vetsci10050308>.
- [15] H.F. Khater, C.J. Geden, Efficacy and repellency of some essential oils and their blends against larval and adult house flies, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), *J. Vector Ecol.* 44 (2) (2019) 256–263, <https://doi.org/10.1111/jvec.12357>.
- [16] G.C. da Silva Sá, P.V.V. Bezerra, M.F.A. da Silva, L.B. da Silva, P.B. Barra, et al., Arbovirus vectors insects: are botanical insecticides an alternative for its management? *J. Pest. Sci.* 96 (2022) 1–20, <https://doi.org/10.1007/s10340-022-01507-2>.
- [17] G. Benelli, R. Pavela, R. Petrelli, L. Cappellacci, A. Canale, et al., Not just popular species essential oils from *Cuminum cyminum* and *Pimpinella anisum* are toxic to insect pest and vectors without affecting non-target invertebrates, *Ind. Crops Prod.* 124 (2018) 236–243, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.048>.
- [18] G. Benelli, R. Pavela, F. Maggi, J.G.N. Wandjou, N.G.B.Y. Fofie, et al., Insecticidal activity of the essential oil and polar extracts from *Ocimum gratissimum* grown in ivory coast: efficacy on insect pests and vectors and impact on non-target species, *Ind. Crops Prod.* 132 (2019) 377–385, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.0487>.
- [19] B.P. Bruegger, L.C. Martínez, A. Plata-Rueda, B.M. de Castro e Castro, M.A. Soares, et al., Bioactive of the *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil and its terpenoids constituents on the predatory bug, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae), *Sci. Rep.* 9 (2019) 8358, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44709-y>.
- [20] M. Soonwera, T. Mounghthipmalai, J. Aungtikun, S. Sittichok, Combination of plant essential oils and their major compositions inducing mortality and morphological abnormality of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, *Heliyon* 8 (5) (2022) e09346, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09346>.
- [21] M. Soonwera, S. Sittichok, Adulticidal activities *Cymbopogon citratus* (Stapf.) and *Eucalyptus globulus* (Labill.) essential oils and of their synergistic combinations against *Aedes aegypti* (L.), *Aedes albopictus* (Skuse), and *Musca domestica* (L.), *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27 (16) (2020) 20201–20214, <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08529-2>.
- [22] J. Aungtikun, M. Soonwera, S. Sittichok, Insecticidal synergy of essential oils from *Cymbopogon citratus* (Stapf.), *Myristica fragrans* (Houtt.), and *Illicium verum* Hook.f. and their major active constituents, *Ind. Crops Prod.* 164 (2021) 113386, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113386>.
- [23] J. Aungtikun, M. Soonwera, Improved adulticidal activity against *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) from synergy between *Cinnamomum* spp. essential oils, *Sci. Rep.* 11 (2021) 4685, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84159-z>.
- [24] R. Sarma, K. Adhikari, S. Mahanta, B. Khanikar, Combinations of plant essential oil based terpene compounds as larvicidal agent against *Aedes aegypti* (Diptera: Clitidae), *Sci. Rep.* 9 (2019) 9471, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45908-3>.
- [25] M.R.S. Silveira, L.S. Espindola, N.P. Lopes, P.C. Vieira, Plant natural products for the control of *Aedes aegypti*: the main vector of important arboviruses, *Molecules* 25 (15) (2020) 3484, <https://doi.org/10.3390/molecules25153484>.
- [26] E. Scalerandi, G.A. Flores, M. Palacio, M.T. Defago, M.C. Carpinella, et al., Understanding synergistic toxicity of terpenes as insecticides: contribution of metabolic detoxification in *Musca domestica*, *Front. Plant Sci.* 9 (2018) 1579, <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01579>.
- [27] M.S.S. Demirak, E. Capolat, Plant-based bioinsecticides for mosquito control: impact on insecticide resistance and disease transmission, *Insects* 13 (2) (2022) 162, <https://doi.org/10.3390/insects13020162>.
- [28] C. Puwanard, J. Sintusiri, H. Passara, V. Bunpetch, S. Sittichok, et al., Adulticidal efficacies against *Aedes aegypti* Linn. of formulations of *Cymbopogon citratus* essential oil and its major constituents, in: *The 19th Asian Agricultural Symposium Future Prospects of Agricultural Science -Global, Local and the Future?*, Tokai University, Kumamoto, Japan, 2023, p. 15.
- [29] T. Mounghthipmalai, M. Soonwera, Adulticidal activity against houseflies (*Musca domestica* L.; Muscidae: Diptera) of combinations of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus globulus* essential oils and their major constituents, *Int. J. Agric. Technol.* 19 (3) (2023) 1127–1134.
- [30] A. Sawatthum, Role of stingless bee, *Tetragonula pegleri* and European honey bee, *Apis mellifera* in the pollination of confectionery sunflower, *Thai J. Sci. Technol.* 9 (3) (2020) 368–377, <https://doi.org/10.14456/tst.2020.26>.
- [31] NIST-MS, The NIST 17 Mass Spectral Library (NIST2017/EPA/NIH), National Standards and Technology, Gaithersburg, 2017. <https://chemdata.nist.gov/>.
- [32] R. Adams, *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/mass Spectrometry*, ISBN-13:979-1932633214, fourth ed., Allured Publishing Crop. Carol Stream, USA, 2007.
- [33] National Library of Medicine, Pubchem: Explore Chemistry. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, 2023.
- [34] Who, *Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vector Mosquitoes*, second ed., 2018. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/250677>.
- [35] A.L. Dorneles, R.A. de Souza, B. Betina, Toxicity of organophosphorus pesticides to the stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* and *Tetragonisca fiebrigii*, *Apidologie* 48 (2017) 612–620, <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0502-x>.
- [36] W.B. Matos, A.C.C. Santos, A.P.S. Lima, E.D.R. Santana, J.E. Silva, et al., Potential source of ecofriendly insecticides: essential oil induces avoidance and cause lower impairment on the activity of a stingless bee than organosynthetic insecticides, in laboratory, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 209 (2021) 111764, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111764>.
- [37] D.J. Finnew, *Probit analysis* Cambridge university press, *J. Pharm. Sci.* 60 (9) (1971) 1432, <https://doi.org/10.1002/jps.2600600940>.
- [38] E. Lulekal, S. Tesfaye, S. Gebrechristos, K. Dires, T. Zenebe, et al., Phytochemical analysis and evaluation of skin irritation, acute and sub acute toxicity of *Cymbopogon citratus* essential oil in mice and rabbits, *Toxicol Rep.* 6 (2019) 1289–1294, <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.11.002>.
- [39] Y. Li, Y. Wang, W. Kong, S. Yang, J. Luo, et al., *Illicium verum* essential oil, a potential natural fumigant in preservation of lotus seeds from fungal contamination, *Food Chem. Toxicol.* 141 (2020) 111347, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111347>.
- [40] L.F. Matos, D.R. e Silva Barbosa, E. da Cruz Lima, K. de Andrade Dutra, D.M. do Amaral Ferraz Navarro, et al., Chemical composition and insecticidal effect of essential oil from *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllus* on *Callosobruchus maculatus* in cowpea, *Ind. Crops Prod.* 145 (2020) 112088, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112088>.
- [41] M. Sharafan, K. Jafernik, H. Ekiert, P. Kubica, R. Kocjan, et al., *Illicium verum* (star anise) and *trans*-anethole as valuable raw materials for medicinal and cosmetic applications, *Molecules* 27 (3) (2022) 650, <https://doi.org/10.3390/molecules27030650>.
- [42] B.A. Sabry, A. Farouk, A.N. Badr, Bioactivity evaluation for volatiles and water extract of commercialized star anise, *Heliyon* 7 (8) (2021) e07721, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07721>.
- [43] R. Pavela, Acute and synergistic effects of some monoterpenoid essential oil compounds on the house fly (*Musca domestica* L.), *J. Essent. Oil-Bear Plants* 11 (5) (2008) 451–459, <https://doi.org/10.1080/0972060X.2008.10643653>.
- [44] J.H. Tak, M.B. Isman, Penetration-enhancement underlies synergy of plant essential oil terpenoids as insecticides in cabbage looper, *Trichoplusia ni*, *Sci. Rep.* 7 (2017) 42432, <https://doi.org/10.1038/srep42432>.
- [45] J.H. Tak, M.B. Isman, Metabolism of citral, the major constituent of lemongrass oil, in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and effects of enzyme inhibitors on toxicity and metabolism, *Pestic. Biochem. Physiol.* 133 (2016) 20–25, <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.03.009>.
- [46] I. Zibace, P. Khorram, Synergistic effect of some essential oils on toxicity and knockdown effects, against mosquitoes, cockroaches and house fly, *Arthropods* 4 (4) (2015) 107–123.
- [47] Z. Wang, Y. Xie, M. Sabier, T. Zhang, J. Deng, et al., *Trans*-anethole is a potent toxic fumigant that partially inhibits rusty grain beetle (*Cryptolestes ferrugineus*) acetylcholinesterase activity, *Ind. Crops Prod.* 161 (2021) 113207, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113207>.
- [48] R. Pavela, G. Benelli, Essential oils as ecofriendly biopesticides? challenges and constraints, *Trends Plant Sci.* (2016) 1000–1007, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005>.
- [49] P. Kumar, S. Mishra, A. Malik, S. Satya, Housefly (*Musca domestica* L.) control potential of *Cymbopogon citratus* Stapf. (Poales:Poaceae) essential oil and monoterpenes (citral and 1,8-cineole), *Parasitol. Res.* 112 (2013) 69–76, <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3105-5>.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [50] S. Mishra, P. Kumar, A. Malik, Microscopic investigation to determine the effect of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. treatment on different life stages of *Musca domestica* (L.), J. Parasit. Dis. 42 (2) (2017) 543–550, <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0848-4>.
- [51] M. Shahrari, A. Zibaee, N. Sahebzadeh, L. Shamaki, Effects of  $\alpha$ -pinene, trans-anethole, and thymol as the essential oil constituents on antioxidant system and acetylcholine esterase of *Ephesia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), Pestic. Biochem. Physiol. 150 (2018) 40–47, <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.06.015>.
- [52] M.D. Lopez, M.J. Pascual-Villalobos, Are monoterpenoids and phenylpropanoids efficient inhibitors of acetylcholinesterase from stored product insect strains? Flavour Fragrance J. 30 (1) (2015) 108–112, <https://doi.org/10.1002/ffj.3220>.
- [53] Z. Lui, Q.X. Li, B. Song, Pesticidal activity and mode of action of monoterpenes, J. Agric. Food Chem. 17 (15) (2022) 4556–4571, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00635>.
- [54] Q. Sabahi, M. Md Hamiduzzaman, J.S. Barajas-Pérez, J.M. Tapia-Gonzalez, E. Guzman- Novoa, Toxicity of anethole and the essential oils of lemongrass and sweet marigold to the parasitic mite *Varroa destructor* and their selectivity for honey bee (*Apis mellifera*) workers and larvae, Psyche 2018 (2018), <https://doi.org/10.1155/2018/6196289>. ID 6196289.
- [55] M. Hybl, A. Bohatá, I. Rádsetoulová, M. Kopecký, I. Hořticková, et al., Evaluating the efficacy of 30 different essential oils against varroa destructor and honey bee workers (*Apis mellifera*), Insects 12 (11) (2021) 1045, <https://doi.org/10.3390/insects12111045>.
- [56] W.B. Matos, A.C.C. Santos, A.P.S. Lima, E.D.R. Santana, J.E. Silva, et al., Potential source of ecofriendly insecticides: essential oil induces avoidance and cause lower impairment on the activity of a stingless bee than organosynthetic insecticides, in laboratory, Ecotoxicol. Environ. Saf. 209 (2021) 111764, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111764>.
- [57] T.J.S. Alves, A. Murcia-Meseguer, C. Azpiazu, A. Wanumen, V. Wanderley-Teixeira, et al., Side effects of a mixture of essential oils on *Psytalia concolor*, Ecotoxicology 29 (9) (2020) 1358–1367, <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02258-5>.
- [58] V.V. Pashte, C.S. Patil, Toxicity and poisoning symptoms of selected insecticides to honey bees (*Apis mellifera mellifera* L.), Arch. Biol. Sci. 70 (1) (2018) 5–12, <https://doi.org/10.2298/ABS170131020P>.
- [59] G.U. Chibee, O.M. Ojelabi, H.O. Fajana, B.A. Akinpelu, T.O. Kehinde, et al., Effects of cypermethrin as a model chemical on life cycle and biochemical responses of the tropical stingless bee *Meliponula bocandei* Spinola, 1853, Environ. Advces. 5 (2021) 100074, <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100074>.
- [60] D. Zeljezic, M. Mladinić, S. Žunec, A.L. Vrdoljak, V. Kasuba, et al., Cytotoxic, genotoxic and biochemical markers of insecticide toxicity evaluated in human peripheral blood lymphocyte and an HepG2 cell line, Food Chem. Toxicol. 96 (2016) 90–106, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.036>.
- [61] S. Shnha, M. Jothiramajayam, M. Ghosh, A. Mukherjee, et al., Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes, Food Chem. Toxicol. 68 (2014) 71–77, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.02.036>.
- [62] M. Asif, A.H.S. Yehya, M.A. Al-Mansoub, V. Revadigar, M.O. Ezzat, et al., Anticancer attributes of *Illicium verum* essential oils against colon cancer, South Afr. J. Bot. 103 (2016) 156–161, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.08.017>.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Article

# Combinations of Lemongrass and Star Anise Essential Oils and Their Main Constituent: Synergistic Housefly Repellency and Safety against Non-Target Organisms

Mayura Soonwera <sup>1,\*</sup>, Jirisuda Sinthusiri <sup>2</sup>, Hataichanok Passara <sup>1,3</sup>, Tanapoom Mounghthipmalai <sup>1</sup>, Cheepchanok Puwanard <sup>1</sup>, Sirawut Sittichok <sup>1</sup> and Kouhei Murata <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Production Technology, School of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand; hataichanok.pa@kmitl.ac.th (H.P.); 64604012@kmitl.ac.th (T.M.); 63604010@kmitl.ac.th (C.P.); best\_pest2@hotmail.com (S.S.)

<sup>2</sup> Community Public Health Program, Faculty of Public and Environmental Health, Huachiew Chalermprakiet University, Bang Phli, Bang Chalong 10540, Thailand; jiri\_ja@yahoo.com

<sup>3</sup> Office of Administrative Interdisciplinary Program on Agricultural Technology, School of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

<sup>4</sup> School of Agriculture, Tokai University, Kumamoto 862-8652, Japan; kmurata@agri.u-tokai.ac.jp

\* Correspondence: mayura.so@kmitl.ac.th or mayura.soon@gmail.com

**Simple Summary:** The housefly (*Musca domestica*) is a global vector of several pathogens and a nuisance to humans and animals. Repellents reduce the risk of housefly vector diseases. Green repellents from plant essential oils (EOs) and their active compounds were, at the time, a promising option against houseflies. This study evaluated the housefly-repellent activities of every tested EO, their main constituents, and several combinations of them. The combinations were lemongrass (*Cymbopogon citratus*) EO + *trans*-anethole, lemongrass EO + star anise (*Illicium verum*) EO, geranial + *trans*-anethole, and star anise EO + geranial. The efficacies of every formulation were compared against each other and DEET (a synthetic repellent). All combinations were more effective in repellency than all single-component formulations and DEET. More significantly, all of them were safe for four non-target species: guppy (*Poecilia reticulata*), molly (*Poecilia latipinna*), dwarf honeybee (*Apis florea*), and stingless bee (*Tetragonula pagdeni*). These combinations could be developed into valuable green repellents for housefly vector disease management.

**Abstract:** The present study evaluated the housefly repellency of single-component formulations and combinations of lemongrass and star anise essential oils (EOs) and their main constituents. The efficacies of the combinations were compared against those of single-component formulations and DEET. Safety bioassays of all formulations and DEET on non-target species—guppy, molly, dwarf honeybee, and stingless bee—were conducted. GC–MS analysis showed that the main constituent of lemongrass EO was geranial (46.83%) and that of star anise EO was *trans*-anethole (92.88%). All combinations were highly synergistic compared to single-component formulations, with an increased repellent value (IR) of 34.6 to 51.2%. The greatest synergistic effect was achieved by 1.0% lemongrass EO + 1.0% *trans*-anethole combination, with an IR of 51.2%. The strongest, 100% repellent rate at 6 h was achieved by 1.0% geranial + 1.0% *trans*-anethole. They were twice as effective as DEET and caused obvious damage to housefly antennae under microscopic observation. All single-component formulations and combinations were benign to the four tested non-target species. In contrast, DEET was highly toxic to them. The synergistic repellency and biosafety of these two combinations are compellingly strong support for developing them into an effective green repellent.

**Keywords:** housefly; essential oil combination; synergistic repellent; lemongrass essential oil; star anise essential oil; geranial; *trans*-anethole; non-target species



**Citation:** Soonwera, M.; Sinthusiri, J.; Passara, H.; Mounghthipmalai, T.; Puwanard, C.; Sittichok, S.; Murata, K. Combinations of Lemongrass and Star Anise Essential Oils and Their Main Constituent: Synergistic Housefly Repellency and Safety against Non-Target Organisms. *Insects* **2024**, *15*, 210. <https://doi.org/10.3390/insects15030210>

Academic Editor: Carlos Eduardo Almeida

Received: 2 February 2024

Revised: 19 March 2024

Accepted: 19 March 2024

Published: 20 March 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The housefly, *Musca domestica* L. (Muscidae), is a global nuisance and vector pest of humans, domestic animals, poultry, and livestock [1,2]. This pest has become a worldwide problem and acts as a mechanical vector of several severe pathogens that cause serious diseases, such as food-borne illnesses, leprosy, and typhoid in humans and avian flu, fowl cholera, anthrax, and porcine reproductive and respiratory syndrome diseases in livestock [2,3]. The economic loss per year due to housefly problems was estimated at more than USD 1 billion in 2021 in the United States [1,4,5]. The effective management of housefly populations is very complicated and difficult, especially in areas with abundant houseflies that are difficult to access [5,6]. Hence, synthetic insecticide control became the first and most popular option for housefly management [5,6]. The most popular synthetic repellent for insect vector control was *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) [6,7]. Unfortunately, DEET, acting directly as an insect repellent, was found to be highly toxic to the human nervous system and non-target species [8,9].

At this time, a renewed interest in green insecticides and repellents as alternative insect management tools was spurred by the global problem of housefly resistance to synthetic insecticides and synthetic repellents, their negative effects on non-target organisms, and the ecological pollution and imbalance that they have caused [8,9]. Green repellents from plant essential oils (EOs) and their major constituents have the potential to be safe alternative agents for preventing houseflies that have not been killed by synthetic agents in sensitive areas such as hospitals, nurseries, and nursing homes [6,10]. To summarize, plant EO-based repellents are highly effective, highly species-specific, biodegradable, and safe for humankind, making them a promising option for good housefly management [7,10,11].

Currently, there are many reports presenting EOs showing repellency against housefly adults: lemongrass (*Cymbopogon citratus*), peppermint (*Mentha piperita*), bergamot mint (*Mentha citrata*), blue gum (*Eucalyptus globulus*), khus grass (*Vetiver zizanioides*), and turmeric (*Curcuma longa*) by filter paper application [12]; tea tree (*Melaleuca alternifolia*), Indian tree basil (*Ocimum gratissimum*), breckland thyme (*Thymus serpyllum*), star anise (*Illicium verum*), nutmeg (*Myristica fragrans*), mango ginger (*Curcuma amada*), and sweet flag (*Acorus calamus*) by spray application [7,13]; and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) by cotton pad application [14].

Moreover, an EO combined with its major ingredient or with another EO showed synergistic repellency against housefly adults. Those combinations include peppermint EO + lemongrass EO, peppermint EO + sweet orange (*Citrus sinensis*) EO, and peppermint EO + blue gum EO [6,15]. Combining EOs with their major constituents increased their insecticidal and repellent activities over those of single EOs. Combinations of nutmeg EO + geraniol,  $\alpha$ -pinene + geraniol, and geraniol + *trans*-anethole exhibited strong insecticidal synergy against housefly adults in spray form [16]; a combination of star anise EO + cinnamon (*Cinnamomum verum*) EO exhibited highly repellent and ovicidal effects in spray form against the American cockroach, *Periplaneta americana* [17]. A combination of ylang-ylang (*Cananga odorata*) EO + lemongrass EO showed repellent activity in spray form against mosquito females of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* [18]. Furthermore, several combinations of EOs and their main constituents showed high toxicity against target species (*Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* eggs) but were non-toxic to the tested non-target predators (*Poecilia latipinna* and *Poecilia reticulata*) [19].

Several combinations of EOs and their major constituents had high potential for use as green repellents against houseflies in that they were, at the time, more effective than DEET, a popular synthetic repellent, and they were safer repellents for humans, environmentally friendly, and non-toxic to non-target predators [19,20]. Consequently, this study was motivated to investigate the adult housefly and the repellency incurred by single-component and combinations of lemongrass and star anise EOs and their main active constituents. These two EOs were selected because they have been widely reported to possess medicinal, antibacterial, and insecticidal properties, as well as to be safe for humans and the environment [16,19]. The synergistic housefly repellency of the combinations and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

their biosafety against non-target species were evaluated. The non-target species were two pollinators, *Apis florea* F. (dwarf honeybee) and *Tetragonula pegdeni* Schwarz (stingless bee) (both in the Apidae family) and two aquatic predators, *Poecilia latipinna* Lesueur (molly) and *Poecilia reticulata* Peters (guppy) (both in the Poeciliidae family). These four non-target species are common pollinators and aquatic predators in Asia, including Thailand [19,20]. Once their synergistic repellent activity and safety for the four non-target species have been demonstrated, some of these EO formulations may be deemed effective and sustainable green repellent alternatives to DEET.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant Materials and Extraction of Two Plant Essential Oils

The parts of plants from which EOs in this study were extracted were fresh stems of lemongrass (*Cymbopogon citratus*, KMITL-01-11) and dried fruits of star anise (*Illicium verum*, KMITL-01-18). The collection of plant materials was conducted in compliance with national, regional, and international laws. Under the permit KD2021/002 of King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), the authors were granted consent, sample monitoring rights, and authorization for the collection of plant materials. Fresh stems of lemongrass were collected from an organic farm in Bang Nam Prio, Chachoengsao Province, Thailand (latitude 13°53'44.44" N and longitude 101°1'33.344" E) from March–April 2023. Dried fruits of star anise were purchased from a Chinese herb supplier in Chachoengsao Province, Thailand. The two plant species were identified by Hataichanok Passara, a botanist from the KMITL herbarium at the School of Agricultural Technology of the same institute. This herbarium housed two plant specimens (KMITL-01-11 and KMITL-01-18) for future use.

EO extraction was performed by hydro-distilling 800 g of fresh stems of lemongrass and 800 g of dried fruits of star anise in 2000 mL of distilled water. After 3 h, each EO was filtered into a 100 mL brown bottle and stored at 4 °C until they were later used in repellent assays and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Bangkok, Thailand analysis.

The GC–MS system analyzed the composition in three replicates. The systems were an electron ionization system with 70 eV electron energy (30–500 m z<sup>-1</sup>) and an Agilent 6890-N gas chromatograph coupled to a 5973-N mass spectrometer with an HP-5 MS fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm ID with 0.25 μm film thickness of 5% phenyl-methylpolysiloxane coating). Each EO sample was diluted at a split ratio of 1:100 in ethyl alcohol, and 0.2 μL of the diluted sample was injected into the column. The oven temperature was set at 50 °C for 2 min, then raised at a rate of 10 °C min<sup>-1</sup> to 200 °C and kept there for 3 min. The final step was to raise the temperature at a rate of 15 °C min<sup>-1</sup> to 260 °C and keep it there for 20 min. The injector and detector temperatures were set at 260 °C. The retention times of all chemical constituents of each EO were analyzed and compared to those of the standard *n*-alkanes. Their retention index was compared with the reference values from Adams [21] or the National Institute of Standards and Technology (NIST) [22] or other sources in the published literature [23,24].

### 2.2. Chemicals

Technical grade 96% geraniol (CAS 5392-40-5, the major compound of lemongrass EO) and 98.5% *trans*-anethole (CAS 4180-23-8, the major compound of star anise EO) were purchased from Sigma-Aldrich Company Limited, Saint Louis, MO, USA. The two compounds were used to prepare 70% *v/v* stock solutions in ethyl alcohol (purchased from T.S. Interlab Company Limited, Bangkok, Thailand). The 12% *w/w* DEET (Sofffell®) used as the positive control was purchased from CP Consumer Products Company, Minburi, Bangkok, Thailand.

### 2.3. The Tested Formulations

The suitable strength or concentration of EOs to be tested was based on our previous studies [16,25]. At these assigned concentrations, these EO formulations were al-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ไปยังเว็บไซต์อื่นการคัดลอกหรือการนำข้อมูลไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ready shown to be effective against houseflies in terms of their ovicidal and insecticidal effects [17,19]. Therefore, the strength was chosen in anticipation of effective repellency while not chosen to be so strong as to be toxic to the non-target species. The solvent for diluting the EO extract was 70% *v/v* ethyl alcohol. The eight tested strengths of single-component formulations were lemongrass EO at 2.5% and 5.0%, star anise EO at 2.5% and 5.0%, geranial at 0.5% and 1.0%, and *trans*-anethole at 0.5% and 1.0%. The tested strengths for combinations were 1.25% lemongrass EO + 1.25% star anise EO, 2.5% lemongrass EO + 2.5% star anise EO, 0.25% geranial + 0.25% *trans*-anethole, 0.5% geranial + 0.5% *trans*-anethole, 1.0% geranial + 1.0% *trans*-anethole, 1.0% lemongrass EO + 1.0% *trans*-anethole, and 1.0% star anise EO + 1.0% geranial.

#### 2.4. Housefly Rearing

Larvae of housefly *M. domestica* were obtained from a housefly colony raised in the entomological laboratory of the School of Agricultural Technology, KMITL, under the conditions of  $25.3 \pm 1.5$  °C,  $70.5 \pm 2.5$  % RH, and 13.0 h light and 11.0 h dark periods. They were reared with steamed mackerel mixed with milk powder at a ratio of 1:0.25 [25]. After 7–10 days, the larvae developed into pupae and adults. The adults were fed with 10% honey solution + milk powder + mineral water at a ratio of 5:5:90. Then, 3-to-4-day-old adults were collected to serve as test subjects for the repellent bioassay [25].

#### 2.5. Repellent Activity Bioassay

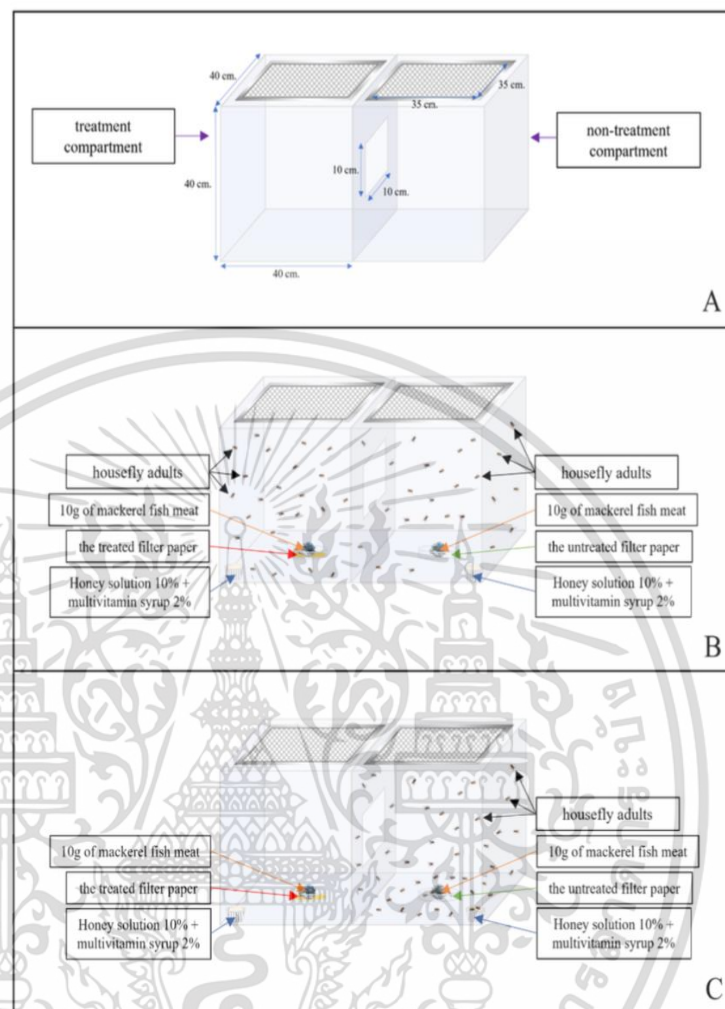
Repellency against housefly adults was evaluated by putting them into two test cages (size 40 × 40 × 40 cm): the first cage contained a tested formulation, but the second cage did not contain a tested formulation. The test cage was designed especially for repellency bioassay. It was made of five plastic sheets (40 × 40 cm) and one screen sheet (35 × 35 cm) at the top of the cage, as can be seen in Figure 1. The two cages were connected by a rectangular hole (10 × 10 cm). When the repellency bioassay was conducted, the cage with a tested formulation was opened to the cage with no tested formulation through the interconnecting passage. Two milliliters of tested formulations were dropped onto a filter paper (Whatman No.1<sup>®</sup>, Cytiva Global Life Sciences Solutions Operations UK Ltd., Buckinghamshire, UK, 8.5 cm in diameter) which was then put on a petri dish in the cage containing the treatment, while two milliliters of ethyl alcohol were dropped onto a filter paper which was then put on a petri dish in the cage containing no tested formulation. Ten grams of steamed mackerel fish meat were placed on top of both filter papers, as food, to attract the houseflies. A wet filter paper was placed in the petri dish in each cage and had a little ball of cotton wool placed adjacent to it that was soaked with honey solution 10% + multivitamin syrup 2.0% to provide the subjects with food and water. Twenty-five three-day-old housefly adults were released into each cage. The positive control, 12% (*w/w*) DEET, was tested concurrently with the tested formulations. Each treatment was performed in 5 replicates at the same time. The whole test is summarized in Figure 1 below.

The repellent rates against housefly adults were observed and recorded at 1.0, 3.0, and 6.0 h. It was observed whether the houseflies landed on the filter papers on the petri dish in the cage with the tested formulation or in the cage with no tested formulation. The number of landings for at most 5 min after the end of each period were counted, starting from the start time to the end of 1.0, 3.0, or 6.0 h, following the protocol made by the Thai Industrial Standards Institute, Ministry of Industry [26]. The houseflies might land and then leave or stay on the filter paper until the end of each time period. The following formula was used to determine the adult repellent rate (RR) [26]:

$$\%RR = [A - B/A + B] \times 100 \quad (1)$$

where A is the total number of housefly adults landing on the untreated filter paper, and B is the total number of housefly adults landing on the treated filter paper.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**Figure 1.** Repellent activity bioassay: The test cage was made of five plastic sheets (40 × 40 cm) and one screen sheet (35 × 35 cm) at the top of the cage, and the two compartments were connected by a rectangular hole (10 × 10 cm) in the middle of the cage (A). The first compartment on the left side contained a tested formulation, and the second compartment on the right contained the solvent (B). At the end, repellency could be observed and quantified (C).

The repellent index (RI) was determined by the formula [19] below,

$$RI = \%RR_{\text{tf}} / \%RR_{\text{DEET}}, \quad (2)$$

where  $\%RR_{\text{tf}}$  is the  $\%RR$  of the tested formulations, and  $\%RR_{\text{DEET}}$  is the  $\%RR$  of DEET.

$RI < 1$  means that the tested formulation was less potent than DEET, and  $RI > 1$  means that the tested formulation was more potent than DEET.

The synergistic repellent index (SRI) was calculated by the following formula [19]

$$SRI = \%RR_{\text{comb}} / \text{sum}(\%RR_{\text{sing}}), \quad (3)$$

where  $\%RR_{\text{comb}}$  is the  $\%RR$  of the combination, and  $\%RR_{\text{sing}}$  is the ( $\%RR$  of the single-component formulation).

$SRI < 1$  means that the combination was synergistic;  $SRI = 1$  means that the combination was neither synergistic nor antagonistic; and  $SRI > 1$  means that the combination was antagonistic.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The increased repellent value (%IR) was calculated by the following formula [16,25],

$$\%IR = [\%RR_{\text{comb}} - \text{sum } \%RR_{\text{sing}}/\%RR_{\text{comb}}] \times 100, \quad (4)$$

where  $\%RR_{\text{comb}}$  is the %RR of the combination, and  $\%RR_{\text{sing}}$  is the (%RR of the single-component formulation.

## 2.6. Safety Bioassay of Four Non-Target Species

### 2.6.1. Bioassay of Dwarf Honeybee and Stingless Bee

The toxicity of the tested formulations was evaluated against two non-target pollinators (dwarf honeybee and stingless bee), following the methods of Pashte and Patil [27] and Chibee et al. [28]. One hundred adult dwarf honeybee and stingless bee workers were collected from the organic farm at the School of Agricultural Technology, KMITL.

The two non-target pollinators were identified by Jirisuda Sinthusiri, a qualified taxonomist, at Huachiew Chalermprakiet University, Thailand. One hundred workers of each species of pollinator were transferred into an insect cage (30 × 30 × 30 cm) and transported to the entomological laboratory within 1 h of the collection. All pollinator workers were fed with sugar solution 18.0% + multivitamin syrup 2.0% and maintained under the conditions of 25.5 ± 1.5 °C, 70.5 ± 2.5% RH, and 13.0 h light and 11.0 h dark periods for 2–3 days before the topical application test. The topical test consisted of applying 1 µL of each tested formulation to the mesonotum part (the dorsal of the second thorax) of each tested pollinator. After that, ten pollinators were transferred into a plastic box (10 × 10 × 5 cm) and fed with sugar solution 18.0% + multivitamin syrup 2.0%. Each treatment was performed five times, together with 12% (w/w) DEET positive control. The bee mortality was recorded at 1, 6, 12, 24, 48, and 72 h after exposure. The formulas below were used to determine the mortality rate (MR) of the bees:

$$\%MR = C/D \times 100, \quad (5)$$

where C is the number of dead bees, and D is the number of treated bees.

The safety index (SI) was determined using the formula below [16,19],

$$SI = LT_{\text{test}}/LT_{\text{DEET}}, \quad (6)$$

where  $LT_{\text{test}}$  is the  $LT_{50}$  (50% Lethal Time value) of the tested formulation, and  $LT_{\text{DEET}}$  is the  $LT_{50}$  of DEET.

$SI > 1$  means that the tested formulation was safe for the bees, and  $SI < 1$  means that the tested formulation was unsafe for the bees.

### 2.6.2. Bioassay of Guppy and Molly

The toxicity of the tested formulations was tested against two non-target aquatic predators (guppy and molly), following the method of Mounghthipmalai et al. [19]. Both fish predators were purchased from an organic farm in Minburi, Bangkok, Thailand. One hundred fish of each species were kept in a plastic container (40 × 60 × 30 cm) containing 50.0 L of clean water under the conditions of 25.6 ± 1.3 °C, 70.5 ± 2.5% RH, and 13.0 h light and 11.0 h dark periods. The concentration of each treatment was 10,000 ppm following [19]. Ten guppy or molly adults were put in a plastic container (35 cm in diameter and 18 cm in height) containing 5.0 L of clean water. Each tested formulation was applied at 10,000 ppm. Each treatment was tested five times, simultaneously with DEET. The mortality rate and abnormal behavior were recorded for 1, 3, 5, 7, and 10 days post-treatment. The safety index (SI) was determined by the formula [19] below,

$$SI = LT_{\text{f}}/LT_{\text{DEET}}, \quad (7)$$

where  $LT_{\text{f}}$  is the  $LT_{50}$  of the tested formulation, and  $LT_{\text{DEET}}$  is the  $LT_{50}$  of DEET.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SI > 1 means that the tested formulation was safer than DEET for the non-target aquatic predator, and SI < 1 means that the tested formulation was less safe than DEET for the non-target aquatic predator.

### 2.7. Ethics and Guidelines for Bioassays

All bioassays in this study were approved by the Ethics committee of King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang with the registration number KDS2021/002. They were performed per the ethical principles and guidelines for the use of animals [29,30].

### 2.8. Morphological Alteration

After the repellent bioassay, the morphological alterations to housefly antennae caused by the combination formulations were observed under a stereomicroscope (Nikon® Model C-PS, Hollywood International Ltd., Bangkok, Thailand) and photographed with a digital camera (Nikon® DS-F12, Hollywood International Ltd., Bangkok, Thailand).

### 2.9. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using IBM's SPSS Statistical Software Package version 28 (Armonk, NY, USA). All bioassays were of completely randomized design (CRD). The choices, the landing on the treated or untreated filter paper, that the housefly had were analyzed using generalized linear models (GLM) with a binomial distribution. The tested EO was the explanatory variable, and the null hypothesis was that a housefly would choose either side of the test with equal probability [31]. Non-responding insects were not included in the analysis. The time that a substance took to produce 50% mortality (LT<sub>50</sub>) against non-target species with 95% confidence limits was determined by probit analysis on mortality (number of two non-target pollinators that had died at 72 h after exposure and number of two non-target aquatic predators that had died at 10 days post-treatment). Mortality data ( $\pm$ standard error) for the four non-target species and repellent rate were analyzed by one-way ANOVA, and Tukey's test ( $p < 0.05$ ) was used to investigate the differences across multiple treatment groups [32]. Repellent efficacy was analyzed by simple linear regression analysis. The main assumption of the simple regression analysis was checked. The assumption of linearity was true, with an R<sup>2</sup> approaching one for all treatments (0.5323–0.9988).

## 3. Results

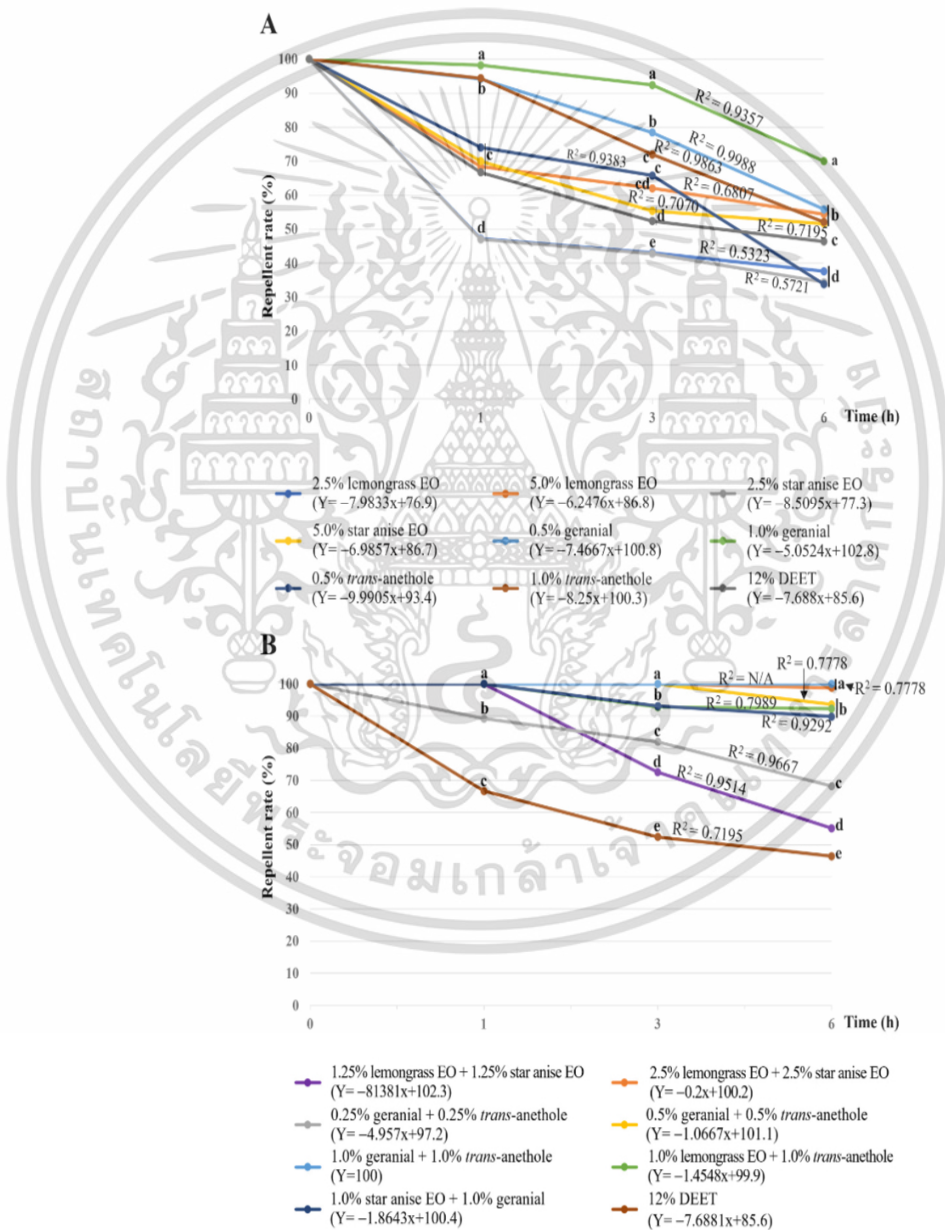
### 3.1. GC–MS Analysis of Two Plant Essential Oils

The qualitative and quantitative phytochemicals of lemongrass and star anise EOs were analyzed (Figures S1 and S2). The color of the two EOs was pale yellow. The lemongrass EO density was  $0.97 \pm 0.08$  g per mL, and the star anise EO density was  $0.98 \pm 0.09$  g per mL. The percentage of the extraction yield of star anise EO ( $4.01 \pm 0.08\%$  v/w) was much higher than that of lemongrass EO ( $1.21 \pm 0.23\%$  v/w). GC–MS analysis found that lemongrass EO was comprised of ten chemical constituents, accounting for  $98.59 \pm 0.87\%$  of the total composition. Geranial ( $46.83 \pm 1.02\%$ ) was the main constituent, followed by minor constituents such as neral, 1,8-cineole, geraniol, geranyl acetate,  $\alpha$ -pinene, caryophyllene oxide, linalool,  $\gamma$ -terpinene, and  $\alpha$ -terpinene. Respectively, the constituents' peak areas were  $23.85 \pm 1.13\%$ ,  $11.10 \pm 0.95\%$ ,  $6.10 \pm 0.87\%$ ,  $4.21 \pm 0.93\%$ ,  $3.25 \pm 0.10\%$ ,  $2.02 \pm 0.52\%$ ,  $0.88 \pm 0.03\%$ ,  $0.21 \pm 0.02\%$ , and  $0.14 \pm 0.02\%$ . Star anise EO was comprised of seven constituents, accounting for  $98.38 \pm 0.98\%$  of the total composition. The main constituent was *trans*-anethole ( $93.88 \pm 1.05\%$ ), followed by minor constituents: limonene, *p*-anisaldehyde, 1,8-cineole, eugenol,  $\alpha$ -terpineol, and  $\alpha$ -thujene. Respectively, the peak areas were  $1.84 \pm 0.05\%$ ,  $1.49 \pm 0.05\%$ ,  $0.81 \pm 0.02\%$ ,  $0.68 \pm 0.03\%$ ,  $0.43 \pm 0.02\%$ , and  $0.25 \pm 0.05\%$ .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2. Repellent Activity

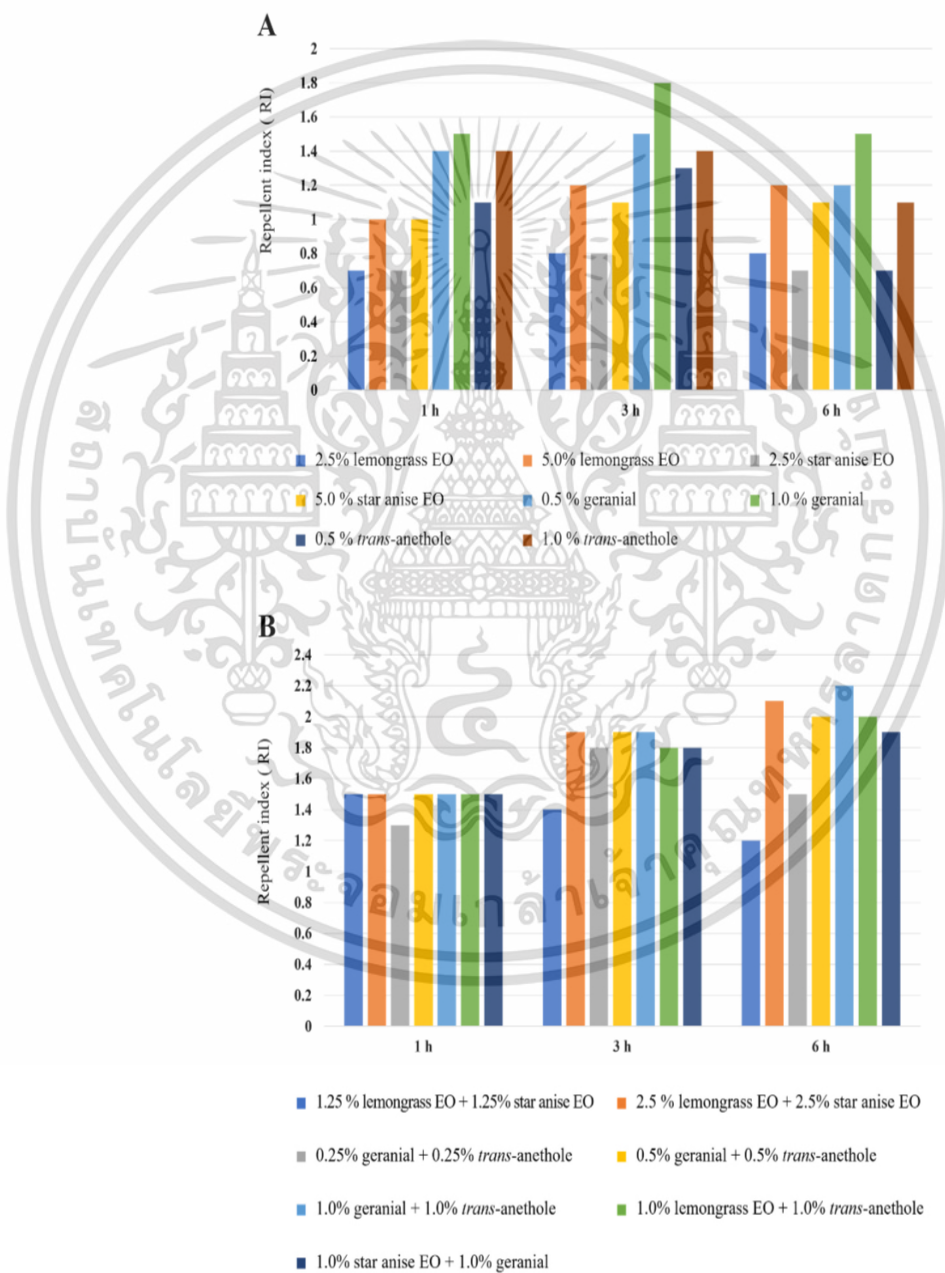
Figure 2 shows that all tested formulations provided a high repellent rate at 1–6 h after exposure, and the rate decreased with time after exposure. All single-component formulations were less effective (with a repellent rate between 33.8 to 94.4%) than all combinations (with a repellent rate between 55.1 to 100%). The highest repellent rate at 6 h after exposure among the eight single-component formulations was 70.0%, achieved by 1.0% geranial. The highest repellent rate among the seven combinations was 100% at 1–6 h of exposure, achieved by 1.0% geranial + 1.0% *trans*-anethole. In contrast, 12% *w/w* DEET gave a repellent rate of 66.7%, 52.4%, and 46.4% at 1, 3, and 6 h of exposure.



**Figure 2.** Repellent rate versus exposure time of formulations of lemongrass and star anise EOs and their main constituents: single-component formulations (A) and combinations (B). Note: Mean repellent rates within a row followed by the same letter do not differ significantly (Tukey’s post hoc test  $p < 0.05$ ). N/A = not available.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The effective repellent indexes (RI) of the tested formulations and 12% *w/w* DEET are shown in Figure 3. All combinations showed an RI in the range of 1.2 to 2.2. All of them were over two times more effective than all single-component formulations (RI ranging from 0.7 to 1.8). Among the eight single-component formulations, the strongest activity with the highest RI (1.5 to 1.8) was 1% geranial. It was 1.5 to 1.8 times more repellent than 12% *w/w* DEET. The lowest repellent activity was provided by 2.5% lemongrass EO and 2.5% star anise EO, with an SI of 0.7 to 0.8, about the same as that which 12% *w/w* DEET provided.

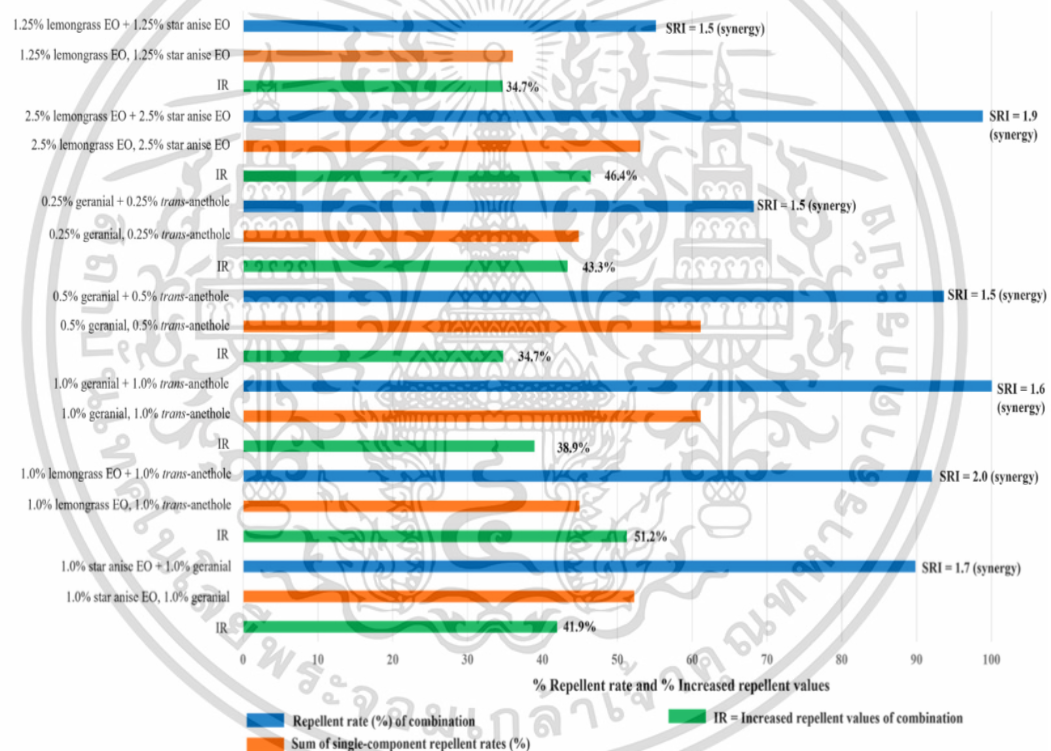


**Figure 3.** Repellent indexes (RI) of single-component formulations (A) and combinations (B). Note: RI is the ratio of the repellent rate of a single-component formulation or combination to the repellent rate of 12% DEET. A formulation with an RI < 1 means that the tested formulation was less toxic than DEET; a formulation with an RI > 1 means that the tested formulation was more toxic than DEET.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

All combinations were 1.2 to 2.2 times (RI of 1.2–2.2) more highly repellent than 12% *w/w* DEET. Among the seven combinations, four formulations—2.5% lemongrass EO + 2.5% star anise EO, 0.5% geranial + 0.5% *trans*-anethole, 1.0% geranial + 1.0% *trans*-anethole, and 1.0% lemongrass EO + 1.0% *trans*-anethole—exhibited the strongest repellency, with 92.3 to 100% repellent rates at 6 h exposure. These four formulations were 2.0 to 2.2 times (RI of 2.0–2.2) more repellent than 12% *w/w* DEET. In particular, the combination of 1.0% geranial + 1.0% *trans*-anethole exhibited the greatest repellency, with a 100% repellent rate at 6 h of exposure time, which was 2.2 times (RI of 2.2) higher repellency than 12% *w/w* DEET.

The synergistic repellent index (SRI) and increased repellent value (IR) of the seven combinations (when compared with the single-component formulations) are shown in Figure 4. All combinations showed a highly synergistic effect with an SRI of 1.5 to 2.0. The greatest synergistic effect was achieved by the combination of 1.0% lemongrass EO + 1.0% *trans*-anethole, with an SRI of 2.0 and an IR of 51.2.



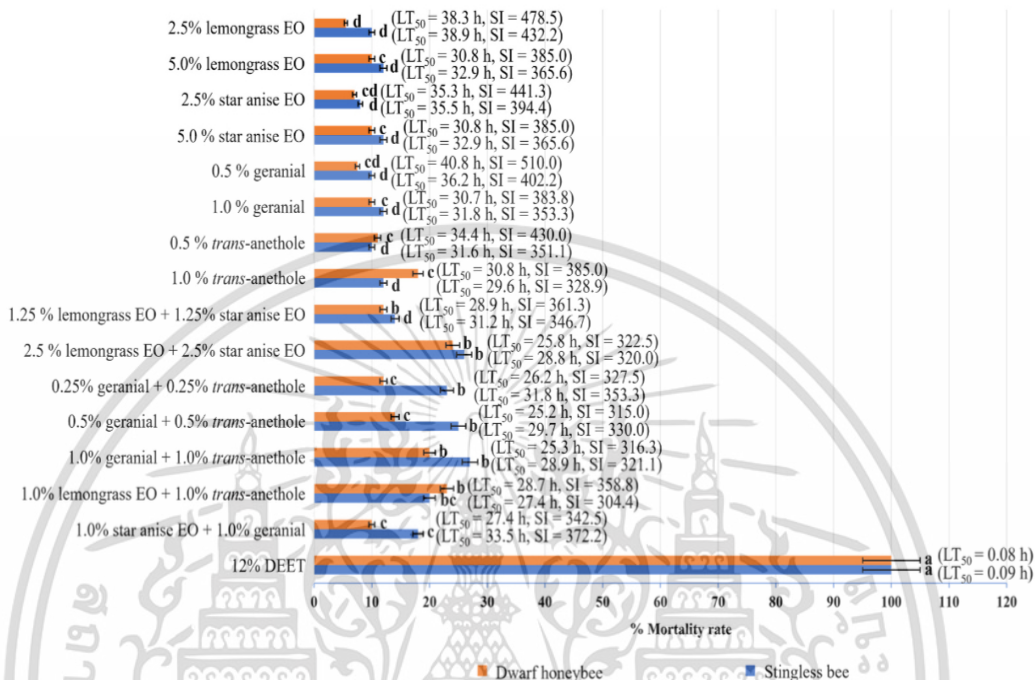
**Figure 4.** Synergistic repellent indexes (SRI) and increased repellent values (IR) of the combinations against housefly adults, when compared to the corresponding single-component formulations. Note: an SRI is calculated by dividing the repellent rate of the combination by the repellent rate of the single-component formulation. For combinations, an SRI < 1 means that the combination is synergistic; an SRI = 1 means that the combination was neither synergistic nor antagonistic; and an SRI > 1 means that the combination was antagonistic.

### 3.3. Toxicity to Non-Target Species

Toxicity against the two pollinators, dwarf honeybees and stingless bees, was evaluated. The 50% Lethal Times (h) against dwarf honeybees and stingless bees of all tested formulations are shown in Figure 5. All the tested single-component formulations and combinations were non-toxic to both pollinators, with an SI value ranging from 304.4 to 510.0. All the single-component formulations provided an SI value of 365.6 to 510.0 for stingless bees and 328.9 to 432.2 for dwarf honeybees. All the combinations provided an SI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

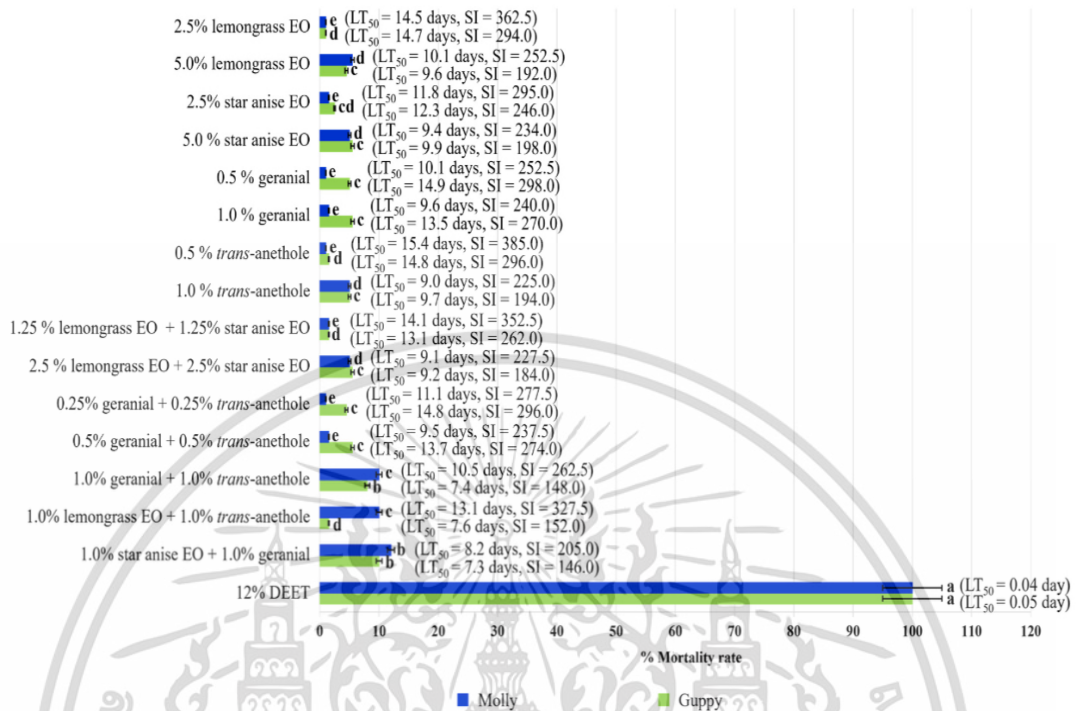
value of 315.0 to 361.3 for stingless bees and 304.4 to 372.2 for dwarf honeybees. In contrast, DEET exhibited high toxicity to both pollinators, with a low  $LT_{50}$  value of 0.08 to 0.09 h.



**Figure 5.** Mortality rates  $\pm$ SE of single-component formulations and combinations against dwarf honeybees and stingless bees at 72 h after exposure. Note: Mean mortality rates  $\pm$  SE within a row followed by the same letter do not differ significantly (Tukey’s post hoc test  $p < 0.05$ );  $LT_{50}$  = 50% Lethal Time; Safety index (SI):  $SI > 1$  signifies that the formulation was safer than DEET for the non-target species, and  $SI < 1$  signifies that the formulation was less safe than DEET for the non-target species.

The 50% Lethal Times (days) against guppy and molly of all the tested formulations are shown in Figure 6. All the tested single-component formulations and combinations were safe to both aquatic predators, with an SI value ranging from 146.0 to 362.5. All the single-component formulations provided an SI value of 225 to 362.5 for molly and 194 to 298 for guppy. All the combinations provided a still-high SI value ranging from 205 to 325 for molly and 146 to 296 for guppy. In contrast, DEET was highly unsafe for both aquatic predators, with a low  $LT_{50}$  value of 0.04 to 0.05 days.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**Figure 6.** Mortality rates ±SE of single-component formulations and combinations against molly and guppy at 10 days post-treatment. Note: Mean mortality rates ±SE within a row followed by the same letter do not differ significantly (Tukey’s post hoc test  $p < 0.05$ ); LT<sub>50</sub> = 50% Lethal Time; Safety index (SI): SI > 1 signifies that the formulation was safer than DEET for the non-target species, and SI < 1 signifies that the formulation was less safe than DEET for the non-target species.

### 3.4. Morphological Alterations after Repellent Bioassay

After 6 h of exposure to each tested formulation, morphological changes of the antennae were observed. The shape of the antennae was abnormal, with sunken and twisted flagellum and aristae, as can be seen in Figure 7. This effect was especially pronounced with two combination formulations: 1.0% lemongrass EO + 1.0% trans-anethole and 1.0% geranial + 1.0% trans-anethole.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**Figure 7.** Light micrographs of housefly antenna: non-treated antenna, with normal shape of flagellum and aristae of female (A), male (B); abnormal shape and morphological damage of antenna, sunken and twisted flagellum and aristae after treatment with the combination of 1% lemongrass EO + 1% *trans*-anethole ((C)—female, (D)—male) and the combination of 1% geraniol + 1% *trans*-anethole ((E)—female, (F)—male). Note: An antenna comprises a basal scape (Sc) and pedicel (Pd) with longitudinal antennal seam (as) and elongated flagellum (F), arista (Ar). Compound eye (C), bristle (Br).

#### 4. Discussion

Plant-based repellents are a safe option for preventing houseflies and other vector-borne diseases in epidemic areas [6,16,33]. Still, more studies are needed to improve green repellents in terms of efficacy, safety, and environmental friendliness [33,34]. Among plant products, plant EOs and their major constituents showed high potential as repellent agents against insect vectors [16,34]. The present study showed that lemongrass and star anise

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในเท่านั้น ไม่สามารถเผยแพร่ไปนอกระบบได้  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EOs and their active compounds were viable sources of phytochemicals that were highly repellent against houseflies. The EO yield and chemical composition of a plant EO strongly influenced its repellent property [16,19,34].

This study analyzed the EO yield and chemical composition of two plant EOs. The percentage of lemongrass EO yield in this study was  $1.21 \pm 0.23\%$  *v/w*. This finding is in excellent agreement with some previous reports; lemongrass percentage EO yield was  $1.1\%$  *v/w* [16],  $1.14\%$  *v/w* [19],  $0.5\text{--}1.13\%$  *v/w* [35], and  $1.01\text{--}1.46\%$  *v/w* [36]. However, some other previous studies reported slightly different results:  $0.21\text{--}0.29\%$  *v/w* [37],  $0.15\text{--}0.46\%$  *w/w* [38], and  $1.7\%$  *w/w* [39]. As for star anise EO, its yield was  $4.01 \pm 0.08\%$  *v/w*. This percentage yield was similar to those reported in many studies, such as  $4.0\%$  *v/w* [16],  $4.0\text{--}4.5\%$  *v/w* [40], and  $4.13\%$  *v/w* [41], but it differed considerably from the EO yield result reported by Soonwera et al. [42] at  $9.6\%$  *v/w*. The EO chemical analysis from the GC-MS of lemongrass and star anise revealed that their chemical compositions matched those previously reported [16,19,42,43]. Geranial was revealed to be the main constituent of lemongrass EO, accounting for  $46.83 \pm 1.02\%$  of the total chemical composition. This percentage value was similar to those reported in several studies: the main compounds of lemongrass EO were geranial at  $40.72\%$  *v/w* [44],  $42.42\%$  *v/w* [45],  $44.3\%$  *v/w* [39],  $45.40\text{--}45.41\%$  *v/w* [16,19], and, slightly different from some other studies, geranial at  $35.91\%$  [46] and  $51.14\text{--}53.21\%$  *v/w* [47]. *Trans*-anethole ( $93.88 \pm 1.05\%$ ) was the most abundant constituent of star anise EO. This finding is in good agreement with previous results [16,42] indicating that the *trans*-anethole percentage in the chemical composition was  $93.58\text{--}94.0\%$ . The findings from some other studies were slightly different:  $80.0\%$  [48],  $81.04\%$  [40], and  $83.46\%$  [41]. The difference in the EO yield and the chemical composition of lemongrass and star anise EOs were affected by many factors, such as plant genotype, plant age, maturity stage, harvesting stage, primary developmental period, quality of raw plant materials, and good management practice of cultivation [49–51]. The cropping time, stage of the plant, geographic distribution, environmental factors, and extraction and distillation methods all affected the quality and quantity of plant EOs [48,52]. Furthermore, lemongrass and star anise EOs and their major constituents have been demonstrated to possess some pharmacological activities (antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, and antifungal). They have been used as food additives, preservatives, flavoring agents, perfumes, deodorants, and shampoos [48,53].

Regarding the efficacy improvement of plant EO-derived repellents, several studies suggested that combinations of EOs and their main constituents are synergistic [16,54]. They were more highly repellent than single-component formulations of the same strength [16,33]. The desired outcomes of a synergistic combination were to reduce the dose or concentration of the EOs in the formulation and to reduce or delay the risk of resistance development in insect vectors [34,42,55]. All combinations in this study exhibited increased repellent efficacy against houseflies, with a high repellent rate, an effective repellent index (RI), a high synergistic repellent index (SRI), and a high increased repellent value (IR). In particular, the combination of  $1.0\%$  lemongrass EO +  $1.0\%$  *trans*-anethole produced the strongest repellency with a high level of synergy, improving the repellent rate to more than  $50\%$ . Another outstanding formulation was the combination of  $1.0\%$  geranial +  $1.0\%$  *trans*-anethole, which gave the strongest repellent rate of  $100\%$  at all tested exposure times. Many studies reported that combinations of EOs and their main constituents were synergistically repellent. Geranium, lemongrass, and peppermint mixed with sunflower oil were highly repellent against horn fly (*Haematobia irritans*: Diptera; Muscidae), with a repellent rate of more than  $75\%$  for 6–8 h [56]. A combination of lemongrass EO + peppermint EO (30:70) showed a synergistically strong repellency against houseflies, with an  $RC_{50}$  of  $0.009 \mu/m^3$  [15]. A combination of lemongrass EO + turmeric EO gave a synergistically high repellent activity against females of two mosquito species, *Anopheles minimus* and *Cx. quinquefasciatus*, with a protection time ranging from 120 to 125 min [57]. Combinations of lemongrass EO + olive oil and lemongrass EO + coconut oil showed high repellent activity against two species of mosquito females, *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*, with

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

a protection time of 60–85 min and 115–170 min, respectively [18,58]. Moreover, some combinations of EOs or EO active compounds have been demonstrated to synergistically cause mortality against houseflies, such as a combination of 2.5% lemongrass EO + 2.5% eucalyptus EO [55]. A combination of 0.5% star anise EO + 0.5% geranial showed the strongest synergistic effect against houseflies, with 100% knockdown and mortality rates and an  $LT_{50}$  of 6.0 min [16]. Combinations of p-cymene +  $\gamma$ -terpinene, p-cymene + 1,8-cineole, and  $\gamma$ -terpinene + 1,8-cineole showed an acute synergistic adulticidal effect against houseflies [59].

On the mechanism of action, EOs and EO active compounds were not only neurotoxic, but their vapor damaged the antennae of mosquitoes and houseflies [11,60]. The vapor prevented an insect from landing on and biting humans and animals [60,61]. After the houseflies were treated with the combinations of 1.0% lemongrass EO + 1.0% *trans*-anethole and 1.0% geranial + 1.0% *trans*-anethole, their images were taken under a stereomicroscope and a digital camera. Morphological aberrations of the antennae were found, including abnormal antenna shape and sunken, twisted flagellum and arista. Two combinations badly damaged the antennae of houseflies, hence interfering with and disrupting their smelling sense (Figure 7), so these combinations exhibited a high repellent rate for all tested exposure periods. This conclusion is similar to the finding in a study by Bakdachino et al. [62]. They reported that lemongrass EO showed a repellent property against stable flies (*Stomoxys calcitrans*: Diptera; Muscidae). The mode of action was that the EO interfered with the antennal olfactory receptor cells. For mosquitoes (Diptera: Culicidae), their antennae, palpi, and tarsal sensilla are also rich in chemo-sensory receptors that are vulnerable to the vapor of an EO [61,62].

Plant EOs and their major constituents are mostly regarded as safe and eco-friendly. They are also generally considered safe for non-target organisms, such as pollinators, aquatic predators, and fishes [34,60,63–65]. In the present study, all the single-component formulations and combinations were safe to two pollinator species (dwarf honeybees and stingless bees) and two aquatic predators (guppy and molly), with a high SI and a high  $LT_{50}$  when compared to DEET. Two combinations, 1.0% lemongrass EO + 1.0% *trans*-anethole and 1.0% geranial + 1.0% *trans*-anethole, were outstandingly benign to both pollinators and aquatic predators, with an SI of 304.4 to 372.2 and 146.0 to 327.5, respectively. This finding is similar to the findings by Mounghthipmalai et al. [19]. They reported that several combinations of cinnamon EO + geranial (2:1), lemongrass EO + D-limonene (2:1), citrus EO + geranial (2:1), D-limonene + geranial (1.5:1.5), geranial + *trans*-cinnamaldehyde (1.5:1.5), and D-limonene + *trans*-cinnamaldehyde (1.5:1.5) at 10,000 ppm were safe to non-target molly (*P. latipinna*) and guppy (*P. reticulata*), with a biosafety index (BI) of 1.06 to 2.57. Some EO compounds, such as thymol and 1,8-cineole, were moderately toxic to guppy, with an  $LC_{50}$  value of 10.99 to 12.51 mg/L and 1701.93 to 3997.07 mg/L, respectively [66]. Moreover, these biosafety results against pollinators were similar to the findings by Sahahi et al. [67]. They reported that lemongrass EO and *trans*-anethole did not show any toxicity to honeybees (*A. mellifera*), with an  $LD_{50}$  value of 53,304.0 and 35,942.0  $\mu$ g/mL, respectively. Geranial, the main constituent of lemongrass EO also showed low toxicity to a predatory bug, *Podisus nigrispinus* [Heteroptera: Pentatomidae], with an  $LD_{50}$  value of 25.56  $\mu$ g/insect [68]. On the other hand, DEET was highly toxic to the four non-target species, with a high mortality rate and a low  $LT_{50}$ . Some studies reported that DEET showed high toxicity against fathead minnows (*Pimephales promelas*), resulting in a reduced number of androgen receptors in females [69]. It also affected non-target organisms in surface water systems and was highly toxic to some algae [70]. Although DEET has been classified by the United States Environmental Protection Agency (US.EPA.) as “Group D-not classifiable as a human carcinogenicity”, the safety of DEET for humans, the environment, and non-target organisms are of critical concern in many reports [71–73]. In contrast, EOs and their chemical compounds are eco-friendly, do not accumulate in the environment, and are safer for non-target organisms [19,60,61]. In this study, all the single-component formulations and combinations had high SIs, meaning that they were

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในเท่านั้น การเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

thoroughly safe for all tested non-target species. Moreover, lemongrass and star anise EOs and their main compounds have been used as food ingredients and folk medicine in many Asian countries since ancient times, and they did not alter the histopathology of rabbits, mice, and humans [47,48,74–76].

## 5. Conclusions

Two outstanding combinations, 1.0% lemongrass EO + 1.0% *trans*-anethole and 1.0% geranial + 1.0% *trans*-anethole, exhibited a highly synergistic repellency and a highly increased repellent value against houseflies at low concentrations and were safe for four non-target species. They should be developed further into a green repellent agent for managing housefly populations in houses, farms, and sensitive areas (nurseries, nursing homes, and hospitals). They are readily available, sustainable, and safe, which makes them an excellent option for inclusion into a repellent formulation that is safer and more effective than DEET, the existing popular housefly repellent. Further studies would include bioefficacy experiments on these two combinations, the development of stable formulations, and toxicity studies at the human cell level under laboratory and field conditions.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/insects15030210/s1>, Figure S1: Chemical compositions of lemongrass EO (*Cymbopogon citratus*); Figure S2: Chemical compositions of star anise EO (*Illicium verum*).

**Author Contributions:** Conceptualization, M.S. and K.M.; methodology, T.M. and C.P.; data analysis, J.S., C.P. and S.S.; investigation, M.S., S.S. and H.P.; writing—original draft preparation, M.S. and J.S.; writing—review and editing, M.S., S.S. and K.M.; funding acquisition, T.M. and H.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was financially supported by King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMIL), Bangkok 10520, Thailand (KMIL Doctoral Scholarship, grant No KDS 2021/002).

**Data Availability Statement:** All relevant data are included in the article.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMIL) for their financial support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## Abbreviations

EOs, essential oils; EO, essential oil; RI, repellent index; SRI, synergistic repellency index; IR, increased repellent value; SI, safety index.

## References

- Geden, C.J.; Nayduch, D.; Scott, J.G.; Burgess, E.R., IV; Gerry, A.C.; Kaufman, P.E.; Thomson, J.; Pickens, V.; Machtinger, E.T. House fly (Diptera: Muscidae): Biology, pest status, current management prospects, and research needs. *J. Integr. Manag.* **2021**, *12*, 39. [CrossRef]
- Cortinhas, L.B.; Mendonca, P.M.; Braga, M.V.; Queiroz, M.M.C. Ultrastructure of the immature stages of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae: Muscinae). *J. Med. Entomol.* **2020**, *57*, 1712–1721. [CrossRef] [PubMed]
- Issa, R. *Musca domestica* acts as transport vector hosts. *Bull. Natl. Res. Cent.* **2019**, *43*, 73. [CrossRef]
- Khamesipour, F.; Lankarani, K.B.; Hohanvar, B.; Kenti, T.E. A systemic review of human pathogens carried by the housefly (*Musca domestica* L.). *BMC Public Health* **2018**, *18*, 1049. [CrossRef] [PubMed]
- Park, R.; Dzialo, M.C.; Spaepen, S.; Nsabimana, D.; Gielens, K.; Devriese, H.; Crauwels, S.; Tito, R.Y.; Raes, J.; Lievens, B.; et al. Microbial communities of the house fly *Musca domestica* vary with geographical location and habitat. *Microbiome* **2019**, *7*, 147. [CrossRef] [PubMed]
- Haselton, A.T.; Acevedo, A.; Kuruvilla, J.; Werner, E.; Kiernan, J.; Dhar, P. Repellency of  $\alpha$ -pinene against the house fly, *Musca domestica*. *Phytochemistry* **2015**, *117*, 469–475. [CrossRef]
- Chintalchere, J.M.; Dar, M.A.; Raut, K.D.; Pandit, R.S. Bioefficacy of Lemongrass and tea tree essential oils against house fly, *Musca domestica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *91*, 307–318. [CrossRef]
- Weeks, J.A.; Guiney, P.D.; Nikiforov, A.I. Assessment of the environmental fate and ecotoxicity of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). *Integr. Environ. Assess. Manag.* **2012**, *8*, 120–134. [CrossRef]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. Shrestha, B.; Lee, Y. Cellular and molecular mechanisms of DEET toxicity and disease-carrying insect vectors: A review. *Genes Genom.* **2020**, *42*, 1131–1144. [CrossRef]
10. Isman, M.B. Botanical insecticides in the twenty-first century—fulfilling their promise? *Annu. Rev. Entomol.* **2020**, *65*, 233–249. [CrossRef]
11. El Zayyat, E.A.; Soliman, M.I.; Elleboudy, N.A.; Ofaa, S.E. *Musca domestica* laboratory susceptibility to three ethnobotanical culinary plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 15844–15852. [CrossRef] [PubMed]
12. Kumar, P.; Mishra, S.; Malik, A.; Satya, S. Repellent, larvicidal and pupicidal properties of essential oils and their formulations against the housefly, *Musca domestica*. *Med. Vet. Entomol.* **2011**, *25*, 302–310. [CrossRef] [PubMed]
13. Singh, D.; Singh, A.K. Repellent and insecticidal properties of essential oils against housefly, *Musca domestica* L. *Int. J. Trop. Insect Sci.* **1991**, *12*, 487–491. [CrossRef]
14. Nteziyaremye, P.; Cherutoi, J.; Makatiani, J.; Muhizi, T. Insecticidal potential of essential oils from *Cupressus lusitanica* growing in ecological zones of Rwanda against adult housefly, *Musca domestica* L. *Int. J. Trop. Sci.* **2023**, *43*, 895–907. [CrossRef]
15. Chauhan, N.; Malik, A.; Sharma, S. Repellency potential of essential oils against housefly, *Musca domestica* L. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 4707–4714. [CrossRef]
16. Aungtikun, J.; Soonwera, M.; Sittichok, S. Insecticidal synergy of essential oils from *Cymbopogon citratus* (Stapf.), *Myristica fragrans* (Houtt.), and *Illicium verum* Hook.f. and their major active constituents. *Ind. Crops Prod.* **2021**, *164*, 113386. [CrossRef]
17. Soonwera, M.; Mounghthipmalai, T.; Takawirapat, W.; Sittichok, S. Ovicidal and repellent activities of several plant essential oils against *Periplaneta americana* L. and enhanced activities from their combined formulation. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 12070. [CrossRef]
18. Soonwera, M.; Phasomkusolsil, S. Efficacy of Thai herbal essential oils as green repellent against mosquito vectors. *Acta Trop.* **2015**, *142*, 127–130. [CrossRef]
19. Mounghthipmalai, T.; Puwanard, C.; Aungtikun, J.; Sittichok, S.; Soonwera, M. Ovicidal toxicity of plant essential oils and their major constituents against two mosquito vectors and their non-target aquatic predators. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 2119. [CrossRef] [PubMed]
20. Sawatthum, A. Role of stingless bee, *Tetragonula pegdeni* and European honey bee, *Apis mellifera* in the pollination of confectionery sunflower. *Thai J. Sci. Technol.* **2020**, *9*, 368–377. [CrossRef]
21. Adams, R. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed.; Allured Publishing Crop.: Carol Stream, IL, USA, 2007; ISBN 979-1932633214.
22. NIST 17. The NIST 17 Mass spectral library (NIST2017/EPA/NIH). In *National Standards and Technology*; National Institute of Standards and Technology Standard Reference Data Program: Gaithersburg, MD, USA, 2017.
23. Lucero, M.; Estell, R.; Tellez, M.; Fredrickson, E. A retention index calculator simplifies identification of plant volatile organic compounds. *Phytochem. Anal.* **2009**, *20*, 378–384. [CrossRef]
24. Zellner, B.A.; Bicchì, C.; Dugo, P.; Rubiolo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. Linear retention indices in gas chromatographic analysis: A review. *Flavour Fragr. J.* **2008**, *23*, 297–314. [CrossRef]
25. Mounghthipmalai, T.; Soonwera, M. Adulticidal activity against housefly (*Musca domestica* L.; Muscidae: Diptera) of combinations of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus globulus* essential oils and their major constituents. *Int. J. Agric. Technol.* **2023**, *19*, 1127–1134.
26. Thai Industrial Standards Institute Ministry of Industry. Herbal Repellent Products or Liquid Insect Protection (TISI841/2553). 2023. Available online: <http://www.agriman.doae.go.th/home/Research/Herb57/5.pdf> (accessed on 8 January 2024).
27. Pashte, V.V.; Patil, C.S. Toxicity and poisoning symptoms of selected insecticides to honey bees (*Apis mellifera mellifera* L.). *Arch. Biol. Sci.* **2018**, *70*, 5–12. [CrossRef]
28. Chibee, G.U.; Ojelabi, O.; Fajana, H.; Akinpelu, B.; Kehinde, T.; Awodriran, M.U.; Obuotor, E.M.; Owojori, O.J. Effects of cypermethrin as a model chemical on life cycle and biochemical responses of the tropical stingless bee *Meliponula bocandei* Spinola, 1853. *Environ. Adv.* **2018**, *5*, 100074. [CrossRef]
29. The National Research Council of Thailand. Ethical Principles and Guidelines for the Use of Animals. 2023. Available online: <https://labanimals.nrct.go.th/ACT/> (accessed on 5 January 2024).
30. ARRIVE. The Animal Research: Reporting of In Vivo Experiment Guidelines. 2023. Available online: <https://arriveguidelines.org/arrive-guidelines> (accessed on 5 January 2024).
31. Rutledge, L.C.; Wirtz, R.A.; Buescher, M.D.; Mehr, Z.A. Mathematical models of the effectiveness and persistence of mosquito repellents. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **1985**, *1*, 56–62. [PubMed]
32. Wheeler, M.W.; Park, R.M.; Bailer, A.J. Comparing median lethal concentration values using confidence interval overlap or ratio tests. *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, *25*, 1441–1444. [CrossRef]
33. Atkovska, K.; Kuvendziev, S.; Mustafa, E.; Marinkovski, M.; Ghaffari, P.; Lisichkov, K. Essential oils as green repellents against mosquito vectors. *Qual. Life* **2021**, *12*, 51–60. [CrossRef]
34. Nararak, J.; Sanguanpong, U.; Sukkanon, C.; Manguin, S.; Chareonviriyaphap, T. Synergistic repellent and irritant effects of a mixture of  $\beta$ -caryophyllene oxide and vetiver oil against mosquito vectors. *Insects* **2023**, *14*, 773. [CrossRef]
35. Verma, B.K.; Verma, R.S.; Chuahan, A.; Bisht, A. Evaluation of essential oil yield and chemical composition of eight lemongrass (*Cymbopogon* spp.) cultivars under Himalayan region. *J. Essent. Oil Res.* **2015**, *27*, 197–203. [CrossRef]
36. Ranitha, M.; Abdurahman, H.N.; Ziad, A.S.; Azhari, H.N.; Thana, R.S. A comparative study of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil extracted by microwave-assisted hydro distillation (MAHD) and conventional hydrodistillation (HD) method. *Int. J. Chem. Eng. Appl.* **2014**, *5*, 104–108. [CrossRef]

เอกสารนี้เป็นเอกสารเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

37. Thanh, N.D.B.; Duc, T.H.; Dung, N.T. Kinetics and modeling of oil extraction from Vietnam lemongrass by steam distillation. *Vietnam J. Sci. Technol.* **2017**, *55*, 58–65. [\[CrossRef\]](#)
38. Madi, Y.F.; Choucry, M.A.; Meselhy, M.R.; El-Kashoury, E.S.A. Essential oil of *Cymbopogon citratus* cultivation in Egypt: Seasonal variation in chemical composition and anticholinesterase activity. *Nat. Prod. Res.* **2021**, *35*, 4063–4067. [\[CrossRef\]](#)
39. Bossou, A.D.; Mangelinckx, S.; Yedomonhan, H.; Boko, P.M.; Akogbeton, M.C.; Kimpe, N.D.; Avlessi, F.; Sohounhoulou, D.C.K. Chemical composition and insecticidal activity of plant essential oil from Benin against *Anopheles gambiae* (Giles). *Parasites Vectors* **2013**, *6*, 337. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Gholivand, M.B.; Rahimi-Nasrabadi, M.; Chalabi, H. Determination of essential oil components of star anise (*Illicium verum*) using simultaneous hydro distillation-static headspace liquid-phase micro extraction-gas chromatography mass spectrometry. *Anal. Lett.* **2009**, *42*, 1382–1397. [\[CrossRef\]](#)
41. Outemsaa, B.; Oubih, A.; Jaber, H.; Kenfaeoui, I.; Ihamdan, R.; Azhari, H.E.; Ouhssine, M. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Illicium verum*. *Int. Congr. Health Vigil.* **2021**, *319*, 01052. [\[CrossRef\]](#)
42. Soonwera, M.; Mounthipmalai, T.; Aungtikun, J.; Sittichok, S. Combinations of plant essential oils and their major compositions inducing mortality and morphological abnormality of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Heliyon* **2022**, *8*, e09346. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Koba, K.; Sanda, K.; Guyon, C.; Raynaud, C.; Chaumont, J.P.; Nicod, L. In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. *Bangladesh J. Pharmacol.* **2009**, *4*, 29–34. [\[CrossRef\]](#)
44. Mohamed Hanaa, A.R.; Sallam, Y.I.; El-Leithy, A.S.; Aly, S.E. Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as affected by drying methods. *Ann. Agric. Sci.* **2012**, *57*, 113–116. [\[CrossRef\]](#)
45. Boukhatem, M.N.; Ferhat, M.A.; Kameli, A.; Saidi, F.; Kebir, H.T. Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potential anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan J. Med.* **2014**, *9*, 25431. [\[CrossRef\]](#)
46. Moustafa, M.A.M.; Awad, M.; Amer, A.; Hassan, N.N.; Ibarhin, E.S.; Ali, H.M.; Akrami, M.; Salem, M.Z.M. Insecticidal activity of lemongrass essential oil as an eco-friendly agent against the black cutworm *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insects* **2021**, *12*, 737. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Pinto, Z.T.; Sanchez, F.F.; Santos, A.R.d.; Amara, A.C.F.; Ferreira, J.L.P.; Escalona-Arranz, J.C.; Queiroz, M.M.d.C. Chemical composition and insecticidal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil from Cuba and Brazil against housefly. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **2015**, *24*, 36–44. [\[CrossRef\]](#)
48. Zou, Q.; Huang, Y.; Zhang, W.; Lu, C.; Yuan, J. A comprehensive review of the pharmacology, chemistry, traditional uses and quality control of star anise (*Illicium verum* Hook. F.): An aromatic medicinal plant. *Molecules* **2023**, *28*, 7378. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Tajidin, N.E.; Ahmad, S.H.; Rosenani, A.B.; Azimah, H.; Munirah, M. Chemical composition and citral content in lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil at three maturity stage. *Afr. J. Biotechnol.* **2012**, *11*, 2685–2693. [\[CrossRef\]](#)
50. Rocha, R.P.; de Melo, E.C.; Barbosa, L.C.A.; dos Santos, R.H.S.; Cecon, P.R.; Dallacort, R.; Sati, A. Influence of plant age on the content and composition of essential oil of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Staff. *J. Med. Plant Res.* **2014**, *8*, 1121–1126. [\[CrossRef\]](#)
51. Saby, B.A.; Farouk, A.; Badr, A.N. Bioactivity evaluation for volatiles and water extract of commercialized star anise. *Heliyon* **2021**, *7*, e07721. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Kumar, A.; Jnanasha, A.C.; Lal, R.K. Coppicing impact on the essential oil yield and its chemical composition of lemongrass cultivars of the genus *Cymbopogon* under arid region of South India. *Acta Ecol. Sinica* **2023**, *43*, 20–26. [\[CrossRef\]](#)
53. Enriquez-Estrella, M.A.; Poveda-Diaz, S.E.; Alvarado-Huatatoca, G.I. Bioactives of lemongrass used in the industry. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* **2023**, *14*, 1–11. [\[CrossRef\]](#)
54. Das, N.G.; Dhiman, S.; Talukdar, P.K.; Rabha, B.; Goswami, D.; Veer, V. Synergistic mosquito-repellent activity of *Curcuma longa*, *Pogostemon heyneanus* and *Zanthoxylum limonella* essential oils. *J. Infect. Public Health* **2015**, *8*, 323–328. [\[CrossRef\]](#)
55. Soonwera, M.; Sittichok, S. Adulticidal activities of *Cymbopogon citratus* (Stapf.) and *Eucalyptus globulus* (Labill.) essential oils and their synergistic combination against *Aedes aegypti* (L.), *Aedes albopictus* (Skuse), and *Musca domestica* (L.). *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27*, 20201–20214. [\[CrossRef\]](#)
56. Lachance, S.; Grange, G. Repellent effectiveness of seven plant essential oils, sunflower oil and natural insecticides against horn flies on pastured dairy cows and heifers. *Med. Vet. Entomol.* **2014**, *28*, 193–200. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Phasomkusolsil, S.; Soonwera, M. Insect repellent activity of medicinal plant oils against *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles minimus* (Theobald) and *Culex quinquefasciatus* Say base on protection time and biting rate. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **2010**, *41*, 831–840. [\[PubMed\]](#)
58. Sritabuttra, D.; Soonwera, M. Repellent activity of herbal essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **2013**, *3*, 271–276. [\[CrossRef\]](#)
59. Pavela, R. Acute and synergistic effects of some monoterpenoid essential oil compound on the housefly (*Musca domestica*). *J. Essent. Oil-Bear. Plants* **2008**, *11*, 451–459. [\[CrossRef\]](#)
60. Bava, R.; Castagna, F.; Palma, E.; Marrelli, M.; Conforti, F.; Musolino, V.; Carresi, C.; Lupia, C.; Ceniti, C.; Tilocca, B.; et al. Essential oils for a sustainable control of honeybee varroosis. *Vet. Sci.* **2023**, *10*, 308. [\[CrossRef\]](#)
61. Pavela, R.; Benelli, G. Ethnobotanical knowledge on botanical repellents employed in the African region against mosquito vectors-A review. *Exp. Parasitol.* **2016**, *167*, 103–108. [\[CrossRef\]](#)
62. Baldacchino, F.; Tramut, C.; Salem, A.; Lienard, E.; Deletre, E.; Franc, M.; Martin, T.; Duvallet, G.; Jay-Robert, P. The repellency of lemongrass oil against stable flies, tested using video tracking. *Parasite* **2013**, *20*, 21. [\[CrossRef\]](#)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี เพื่อประโยชน์ในการศึกษาวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี ไม่สามารถนำออกจำหน่ายหรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

63. AlSalhi, M.S.; Elumalai, K.; Devanesan, S.; Govindarajan, M.; Krishnappa, K.; Maggi, F. The aromatic ginger *Kaempferia galangal* L. (Zingiberaceae) essential oil and its main composition are effective larvicidal agents against *Aedes vittatus* and *Anopheles maculatus* without toxicity on the non-target aquatic fauna. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *158*, 113012. [\[CrossRef\]](#)
64. Govindarajan, M.; Rajeswary, M.; Senthilmurugan, S.; Vijayan, P.; Alharbi, N.S.; Kadaikunnan, S.; Khaled, J.M.; Benelli, G. Larvicidal activity of the essential oil from *Anomum subulatum* Roxb. (Zingiberaceae) against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae), and non-target impact on four mosquito natural enemies. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2018**, *101*, 219–224. [\[CrossRef\]](#)
65. Rajeswary, M.; Govindarajan, M.; Alharbi, N.S.; Kadaikunnan, S.; Khaled, J.M.; Benelli, G. *Zingiber cernuum* (Zingiberaceae) essential oil as effective larvicide and oviposition deterrent on six mosquito vectors, with little non-target toxicity on four aquatic mosquito predators. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 10307–10316. [\[CrossRef\]](#)
66. Bullangpoti, V.; Mujchariyakul, W.; Laksanavilat, N.; Junhirun, P. Acute toxicity of essential oil compound (thymol and 1,8-cineole) to insectivorous guppy, *Poecilia reticulata* Peters, 1859. *Agric. Nat. Resour.* **2018**, *52*, 190–194. [\[CrossRef\]](#)
67. Sabahi, Q.; Hamiduzzaman, M.M.; Barajas-Perez, J.S.; Tapia-Gonzalez, J.M.; Guzman-Novoa, E. Toxicity of anethole and the essential oils of lemongrass and sweet marigold to parasitic mite *Varroa destructor* and their selective for honey bee (*Apis mellifera*) workers and larvae. *Psyche* **2018**, *2018*, 6196289. [\[CrossRef\]](#)
68. Burgger, B.P.; Martinez, L.C.; Plata-Rueda, A.; de Castro e Castro, B.M.; Soares, M.A.; Wilcken, C.F.; Carvalho, A.G.; Serrao, J.E.; Zanoncio, J.C. Bioactive of the *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil and its terpenoids constituents on the predatory bug, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8358. [\[CrossRef\]](#)
69. Zenobio, J.E.; Sanchez, B.C.; Archuleta, L.C.; Sepulveda, M.S. Effects of triclocarban, *N,N*-diethyl-meta-toluamide, and a mixture of pharmaceuticals and personal care products of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* **2014**, *33*, 910–919. [\[CrossRef\]](#)
70. Gao, X.; Wang, X.; Li, J.; Ai, S.; Fu, X.; Fan, B.; Li, W.; Liu, Z. Aquatic life criteria derivation and ecological risk assessment of DEET in China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *188*, 109881. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Briassoulis, G.; Narioglou, M.; Hatzis, T. Toxic encephalopathy associated with use of DEET insect repellents: A case analysis of its toxicity in children. *Hum. Exp. Toxicol.* **2001**, *20*, 8–14. [\[CrossRef\]](#)
72. Swale, D.R.; Bloomquist, J.R. Is DEET a dangerous neurotoxicant? *Pest. Manag. Sci.* **2019**, *75*, 2068–2070. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Chen-Hussey, V.; Behrens, R.; Logan, L.G. Assessment of methods used to determine the safety of the topical insect repellent *N,N*-diethyl-m-toluamide (DEET). *Parasites Vectors* **2014**, *7*, 173. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Lulekal, E.; Tesfaye, S.; Gebrechristos, S.; Dires, K.; Zenebe, T.; Zegeye, N.; Feleke, G.; Kassahun, A.; Shiferaw, Y.; Monkonnen, A. Phytochemical analysis and evaluation of skin irritation, acute and sub acute toxicity of *Cymbopogon citratus* essential oil in mice and rabbits. *Toxicol. Rep.* **2019**, *6*, 1289–1294. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Shnha, S.; Jothiramajayam, M.; Ghosh, M.; Mukherjee, A. Evaluation of toxicity of essential oils palmarasa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *68*, 71–77. [\[CrossRef\]](#)
76. Asif, M.; Yehya, A.H.S.; Al-Mansoub, M.A.; Revadigar, V.; Ezzat, M.O.; Ahamed, M.B.K.; Oon, C.E.; Murugaiyah, V.; Majid, A.S.A.; Majid, A.M.S.A. Anticancer attributes of *Illicium verum* essential oil against colon cancer. *S. Afr. J. Bot.* **2016**, *103*, 156–161. [\[CrossRef\]](#)

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**PROCEEDING OF THE 9<sup>th</sup> INTERNATIONAL  
CONFERENCE ON INTEGRATION OF SCIENCE  
AND TECHNOLOGY FOR SUSTAINABLE  
DEVELOPMENT 2021 (9<sup>th</sup> ICIST)**

**“Soil, water and environmental conservation, biological diversity, safety  
food and sustainable agriculture”**

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.  
November 19, 2021 (WEBINAR-ZOOM)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The 9th International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development 2021 (9th ICIST 2021) through Webinar-zoom  
in November 19, 2021 at Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMUTT), Bangkok, Thailand

provided as high a mortality and knockdown rate as that of 10% cypermethrin. Therefore, it has a good potential as a safer and equivalently effective, natural product alternative to cypermethrin.

**Keywords:** eucalyptol, insecticidal activity, limonene, *Musca domestica*

### Ovicidal and adulticidal activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf and *Illicium verum* Hook. f. against *Aedes aegypti* (Linn.)

Puwanard, C. and Soonwera, M.\*

Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Chalong Krung Road, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

\*Corresponding author: Soonwera, M.; Email: mayura.so@kmitl.ac.th, mayura.soon@gmail.com.

**Abstract** This study was an evaluation of hatching inhibition and knockdown rates against *Aedes aegypti* of two essential oils (EOs): *Cymbopogon citratus* DC. Stapf and *Illicium verum* Hook F. The efficacy of each of these EOs, at 1, 5, 10% emulsion in water, stabilized by tween60®, was compared to that of 1% w/w temephos and 1% w/v cypermethrin (common, harmful synthetic insecticides). Topical and contact assays showed that 10% C. citratus and 10% I. verum emulsions were the most effective in inhibiting the hatching of mosquito eggs (100%) after 48 hours of exposure. Moreover, they were also the most toxic against mosquito adults (100% mortality) after 24 hours of exposure. This study also established that tween60® had no effect on hatching inhibition or mortality rate of treated *Aedes aegypti* mosquitoes. All EO emulsions were more potent than temephos and cypermethrin against these mosquito species. Coupling this higher efficacy with no or benign known side effects of natural EOs, it can be concluded that 10% C. citratus and 10% I. verum emulsions are better alternatives than temephos and cypermethrin for a mosquito control program at the present time.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, *Cymbopogon citratus* (Stapf.), *Illicium verum* Hook. F.

### Repellency of six plant essential oils against *Periplaneta americana* L. and *Blattella germanica* L.

Takawirapat, W., Sittichok, S. and Soonwera, M.\*

Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

\*Corresponding author: Soonwera, M.; Email: mayura.so@kmitl.ac.th, mayura.soon@gmail.com.

**Abstract** Six essential oils (EOs) from *Cinnamomum cassia*, *Citrus sinensis*, *Mentha piperita*, *Syzygium aromaticum*, *Zingiber cussumunar*, and *Zingiber officinale* at 10% in soybean oil were evaluated for their repellent activities against *Periplaneta americana* L. and *Blattella germanica* L. adults and compared to that of naphthalene (1 g of sublimating ground powder), a common insect repellent. All six EOs exhibited a significantly higher effective repellency against *B. germanica* than against *P. americana*. Among all EOs tested, *C. cassia* EO exhibited the highest repellent activity against adult *B.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**Toxicity of *Litsea petiolata* Hook.f. essential oil against *Aedes aegypti* (Linn.), *Aedes albopictus* (Skuse), *Anopheles minimus* (Theobald) and *Culex quinquefasciatus* (Say)****Puwanard, C., Mounghthipmalai, T. and Soonwera, M.**

Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Chalong Krung Road, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.  
Corresponding Author: Soonwera, M.; Email: mayura.so@kmitl.ac.th, mayura.soon@gmail.com

This study evaluated the oviposition deterrent, ovicidal, larvicidal, pupicidal, and adulticidal activities of essential oil (EO) from *Litsea petiolata* leaves against *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Anopheles minimus* and *Culex quinquefasciatus* with double-choice, dipping, and contact assays. *Litsea petiolata* EO was tested at 1, 5, and 10% concentrations in ethanol and their efficiencies were compared with those of 1% w/w temephos and 10 % w/v cypermethrin. Oviposition deterrence was evaluated on gravid females. Larvicidal and pupicidal activities were tested on the fourth instar larvae and 2-day-old pupae. The adulticidal activity was tested against two-day-old adult females. Ten percent of *L. petiolata* EO exhibited the highest oviposition deterrent activity against gravid females and 100% repellency against *Ae. albopictus* and *An. minimus*, 97.0% against *Ae. aegypti*, and 94.6% against *Cx. quinquefasciatus*. The oviposition activity index (OAI) against females of those four mosquito species ranged from -0.9 to -1.0. Ten percent of *L. petiolata* EO also exhibited the highest ovicidal activity against the eggs of the four mosquito species, with an inhibition rate ranging from 87.2 to 100%. Moreover, it also showed the highest larvicidal and pupicidal activities against the larvae and pupae of the four mosquito species, with a 100% mortality rate at 10 and 60 min, respectively. The adulticidal activity was recorded at 1 and 24h. Ten percent of *L. petiolata* EO exhibited the highest toxicity to female adults of the four mosquito species, with 100% knockdown (1h) and mortality (24h) rates. On the other hand, 1%w/w temephos did not deter oviposition by gravid females, and it was only slightly toxic to the eggs and larvae and non-toxic to the pupae. In the same manner, 10%w/v cypermethrin was less effective against the female adults of the four mosquito species than 10% *L.petiolata* EO. *L.petiolata* EO is a highly effective and eco-friendly alternative to synthetic insecticides.

**Keywords:** *Litsea petiolata*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Anopheles minimus*, *Culex quinquefasciatus*, Essential oil

**Insecticidal activity of *Citrus aurantium* and *Eucalyptus globulus* essential oils and their major constituents against nymphs and adults of *Pediculus humanus capitis* De Geer****Soonwera, M. and Sittichok, S.**

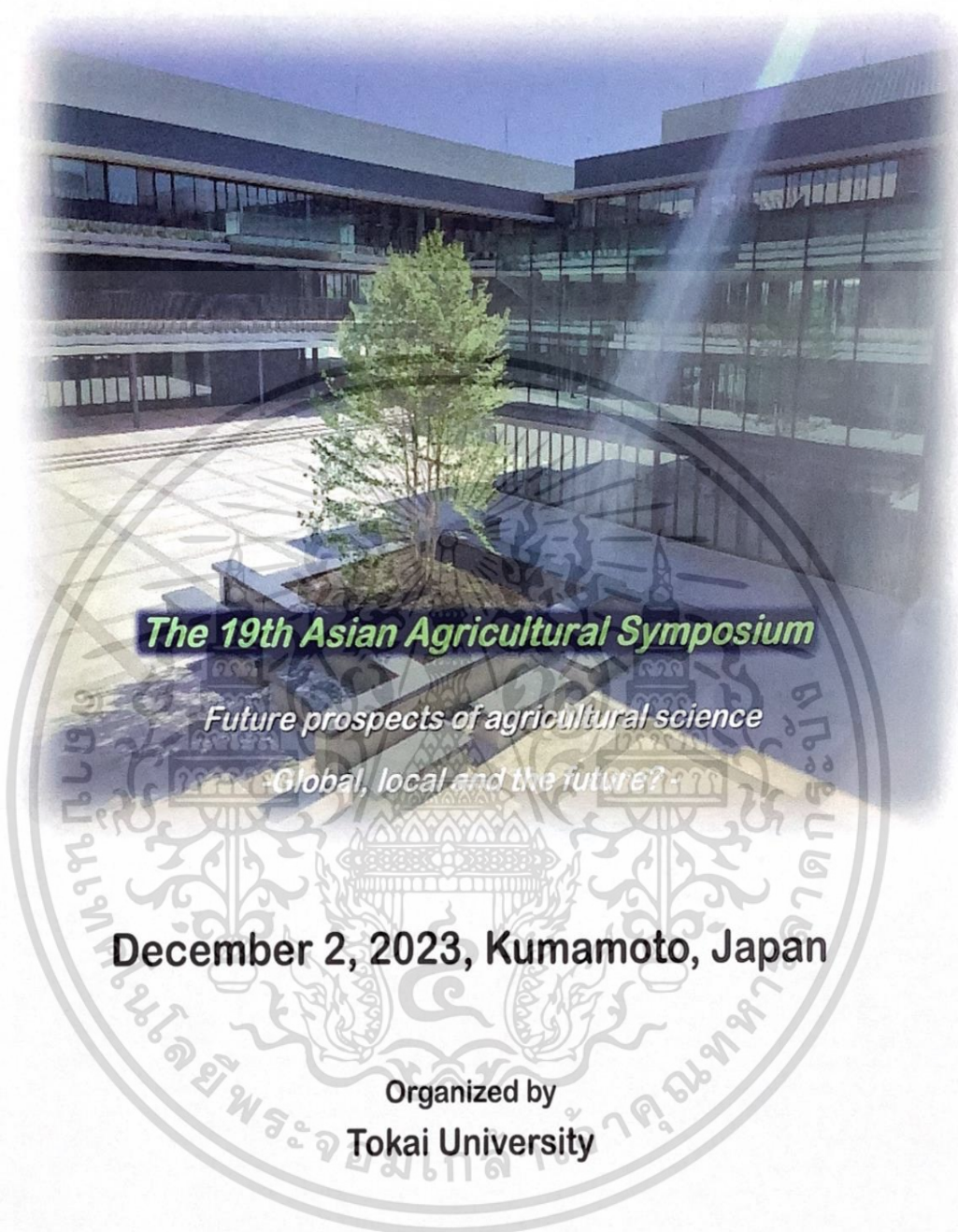
Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.  
Corresponding Author: Soonwera, M.; Email: mayura.so@kmitl.ac.th, mayura.soon@gmail.com

Insects have developed resistance to synthetic chemical pediculicides worldwide. It also has serious side effects to humans. Use of plant-derived essential oils has been recommended as an alternative method for head lice control. This study investigated the insecticidal activity of essential oils (EOs) from *Citrus aurantium* and *Eucalyptus globulus* and their major constituents against *Pediculus humanus capitis* De Geer nymphs and adults. A comparison was made between their efficacy and that of 25% (w/v) benzyl benzoate, a synthetic pediculicide. Each EO and its constituents at 1% and 5% (v/v) concentration in ethyl alcohol was assayed in an immersion test. Head lice nymphs and adults were immersed for 1 min in the treatments. Mortality rate was observed and recorded under stereomicroscope at 1, 10, 30, and 60 min after exposure. Every tested EO and its constituents exhibited a higher pediculocidal activity against nymphs and adults of *P. humanus capitis* than 25% (w/v) benzyl benzoate did. In particular, 5% 1,8-cineole exhibited the highest insecticidal effects against *P. humanus capitis* nymphs and adults with 100% mortality rate at 1 min with an LT<sub>50</sub> of 0.2 min and an LC<sub>50</sub> of 0.7%. The other EO formulations provided a mortality rate ranging from 0-96.0% and an LT<sub>50</sub> ranging 0.3-315.9 min against nymphs. Against the adults, the mortality rate ranged from 12.0-96.0% with an LT<sub>50</sub> ranging from 1.2-314.5 min. Our data showed that 1,8-cineole has a great potential to control head lice populations and should be further developed into a safe and effective pediculicide.

**Keywords:** *Pediculus humanus capitis*, *Citrus aurantium* EO, *Eucalyptus globulus* EO, d-limonene, 1,8-cineole, Pediculicides



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Sponsored by  
**Kumamoto Prefecture**  
**Kumamoto City**

 **TOKAI UNIVERSITY**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Adulticidal efficacies against *Aedes aegypti* Linn. of formulations of *Cymbopogon citratus* essential oil and its major constituents

Cheepchanok Puwanard<sup>1</sup>, Jirisuda Sinthusiri<sup>2</sup>, Hataichanok Passara<sup>3</sup>,  
Varitsara Bunpetch<sup>4</sup>, Sirawut Sittichok<sup>1</sup> and Mayura Soonwera<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department Plant Production Technology, School of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, <sup>2</sup>Community Public Health Program, Faculty of Public and Environmental Health, Huachiew Chalermprakiet University, <sup>3</sup>Office of Administrative Interdisciplinary Program on Agricultural Technology (OAIPT), School of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang,

<sup>4</sup>School of Dentistry, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

\*Corresponding Author: Mayura Soonwera: mayura.so@kmitl.ac.th

Formulations of combined herbal essential oil derived from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and its major constituents were evaluated for adulticidal activities against *Aedes aegypti*: NO.1 (2% *C. citratus* EO + 1% alpha-pinene); No.2 (2% *C. citratus* + 1% geraniol); and NO.3 (2% *C. citratus* + 1% trans-cinnamaldehyde). They were compared with two positive control (1% w/w alpha-cypermethrin) and 0.00125% metofluthrin and a negative control (drinking water) by WHO standard susceptibility test. The knockdown was recorded at 1, 5, 10, 15, 30 and 60 min, and the mortality at 24 hours. The results showed that NO.1 (2% *C. citratus* EO + 1% alpha-pinene) was the most effective with 100% knockdown at 10 min and  $KT_{50}$  and  $LT_{50}$  of 1.57 min, while 1% w/w alpha-cypermethrin showed a 100% knockdown at 15 min and a  $KT_{50}$  and  $LT_{50}$  of 4.48 min and 0.00125% metofluthrin showed a 100% knockdown at 5 min and a  $KT_{50}$  of 0.69 min and  $LT_{50}$  of 0.89 min, respectively. In contrast, drinking water did not show any knockdown and mortality. To conclude, it has been demonstrated that an essential oil mixed with its major constituents was effective in killing insects.


### เลมอนกราสのエッセンシャルオイルとその主要成分による ネッタイシマカに対する殺虫効果

Cheepchanok Puwanard<sup>1</sup> · Jirisuda Sinthusiri<sup>2</sup> · Hataichanok Passara<sup>3</sup> · Varitsara  
Bunpetch<sup>4</sup> · Sirawut Sittichok<sup>1</sup> · Mayura Soonwera<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 農業技術学部植物生産技術学科モンクット王工科大学ラカバン校 · <sup>2</sup> ファチアウ · チャラムプラキエット  
大学公衆環境衛生学部地域公衆衛生プログラム · <sup>3</sup> モンクット王工科大学ラカバン校農業技術大学院農業技術  
管理学際行政プログラム事務局 (OAIPT) · <sup>4</sup> モンクット王工科大学歯学部)

\*責任著者: Mayura Soonwera : mayura.so@kmitl.ac.th

レモンกราส *Cymbopogon citratus* の主要成分を組み合わせたエッセンシャル オイル製剤について、ネッタイシマカに対する殺成虫活性を評価した。NO.1 (2% レモンกราส EO + 1%  $\alpha$ -ピネン)。No.2 (2% レモンกราส + 1% ゲラニール); NO.3 (2% レモンกราส + 1% trans-シンナムアルデヒド)。これらを WHO の標準感受性試験により、2 つのポジティブコントロール (1% w/w アルファシベルメトリン) および 0.00125% メトフルトリン、およびネガティブコントロール (飲料水) と比較した。ノックダウン効果は、1, 5, 10, 15, 30 および 60 分で記録し、死亡率は 24 時間で記録した。結果は、NO.1 (2% レモンกราส EO + 1%  $\alpha$ -ピネン) が最も効果的で、10 分で 100% ノックダウン、 $KT_{50}$  および  $LT_{50}$  が 1.57 分であったのに対し、1% w/w  $\alpha$ -シベルメトリンは 15 分で 100% ノックダウン、 $KT_{50}$  および  $LT_{50}$  は 4.48 分、0.00125% メトフルトリンは 5 分で 100% ノックダウン、 $KT_{50}$  は 0.69 分、 $LT_{50}$  は 0.89 分であった。対照的に飲料水ではノックダウンや死亡率は示されなかった。結論として、主要成分と混合したエッセンシャルオイルが本種に対して殺虫効果があることが実証された。



## Adukticidal efficacies against *Aedes aegypti* Linn. of formulations of *Cymbopogon citratus* essential oil and its major constituents

Cheepchanok Puwanard<sup>1</sup>, Jirisuda Sinthusiri<sup>2</sup>, Hataichanok Passara<sup>3</sup>, Varitsara Bunpetch<sup>4</sup>, Sirawut Sittichok<sup>1</sup> and Mayura Soonwera<sup>1\*</sup>

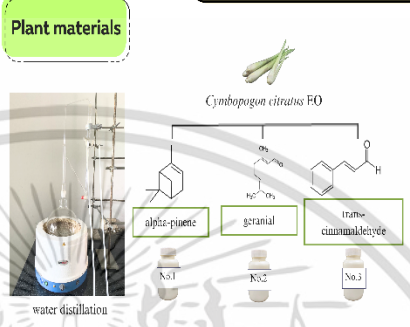
<sup>1</sup>Department Plant Production Technology, School of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand. \*mayura.so@kmitl.ac.th  
<sup>2</sup>Community Public Health Program, Faculty of Public and Environmental Health, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan 10540, Thailand.  
<sup>3</sup>Office of Administrative Interdisciplinary Program on Agricultural Technology (OAIPT), School of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.  
<sup>4</sup>School of Dentistry, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

### Abstract

Formulations of combined herbal essential oil derived from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and its major constituents were evaluated for adukticidal activities against *Aedes aegypti*: NO.1 (2% *C.citratus* EO + 1% alpha-pinene); No.2 (2% *C.citratus* + 1% geranial); and NO .3 (2% *C.citratus* + 1% trans-cinnamaldehyde). They were compared with two positive control (1% w/w alpha-cypermethrin) and 0.00125% metofluthrin and a negative control (drinking water) by WHO standard susceptibility test. The knockdown was recorded at 1, 5, 10, 15, 30 and 60 min, and the mortality at 24 hours. The results showed that NO.1 (2% *C.citratus* EO + 1% alpha-pinene) was the most effective with 100% knockdown at 10 min and  $KT_{50}$  and  $LT_{50}$  of 1.57 min, while 1% w/w alpha-cypermethrin showed a 100% knockdown at 15 min and a  $KT_{50}$  and  $LT_{50}$  of 4.48 min and 0.00125% metofluthrin showed a 100% knockdown at 5 min and a  $KT_{50}$  of 0.69 min and  $LT_{50}$  of 0.89 min, respectively. In contrast, drinking water did not show any knockdown and mortality. To conclude, it has been demonstrated that an essential oil mixed with its major constituents was effective in killing insects.

### Materials and Method


#### Plant materials



*Cymbopogon citratus* EO

water distillation

#### Mosquitoes rearing



### Method

- 1 25 female adults in green spot tube
- 2 impregnated with 2 ml of each essential oils on red spot tube
- 3 Mosquitoes were blown from green spot tube to red spot tube

WHO criteria (WHO,1198)

Mortality rate

98-100% = Susceptible

80-97% = Possible Resistant

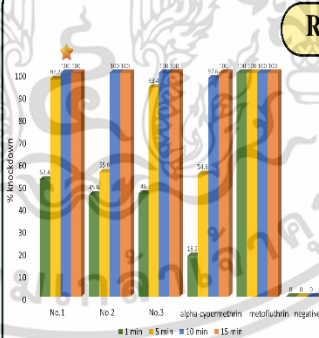
< 80% = Resistant

### Introduction

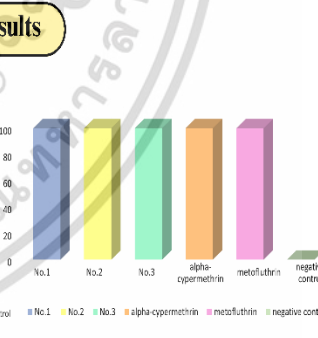
Dengue hemorrhagic fever (DHF) is vectored by mosquitoes to humans. They can be found in hot and humid environments in urban and semi-urban areas in Thailand and other countries. In Southeast Asia, this disease has become a public health problem. Every year about 390 million people in more than 128 countries are at risk of contracting dengue (Pompon et al., 2017). In recent years, many effective synthetic insecticides have not been used comprehensively in mosquito control programs because of their harmful effects on human and non-target populations, their difficult-to-biodegrade nature, and the ever-increasing mosquito resistance to them (Forstinus et al., 2017).

Therefore, there have been several studies of natural compounds from plants that are biodegradable and have low toxicity to mammals at the same time.

### Results



Formulation	1 min	5 min	10 min	15 min
No.1	53.4	79.7	100	100
No.2	46.2	75.0	100	100
No.3	41	78.5	100	100
alpha-cypermethrin	15.1	54.1	100	100
metofluthrin	2.2	100	100	100
negative control	0	0	0	0



Formulation	Mortality rate (%)
No.1	100
No.2	100
No.3	100
alpha-cypermethrin	100
metofluthrin	100
negative control	0

Fig 1. The knockdown rate at 1, 5, 10 and 15 min against adult mosquitoes *Aedes aegypti* of three formulations

Fig 2. The mortality rate at 24 h caused three formulations

### Conclusion

Our data showed that NO.1 (2% *C.citratus* EO + 1% alpha-pinene) was the most effective, providing 100% knockdown at 10 min,  $KT_{50}$  and  $LT_{50}$  value of 1.57 min, and mortality at 24 hours of 100%.

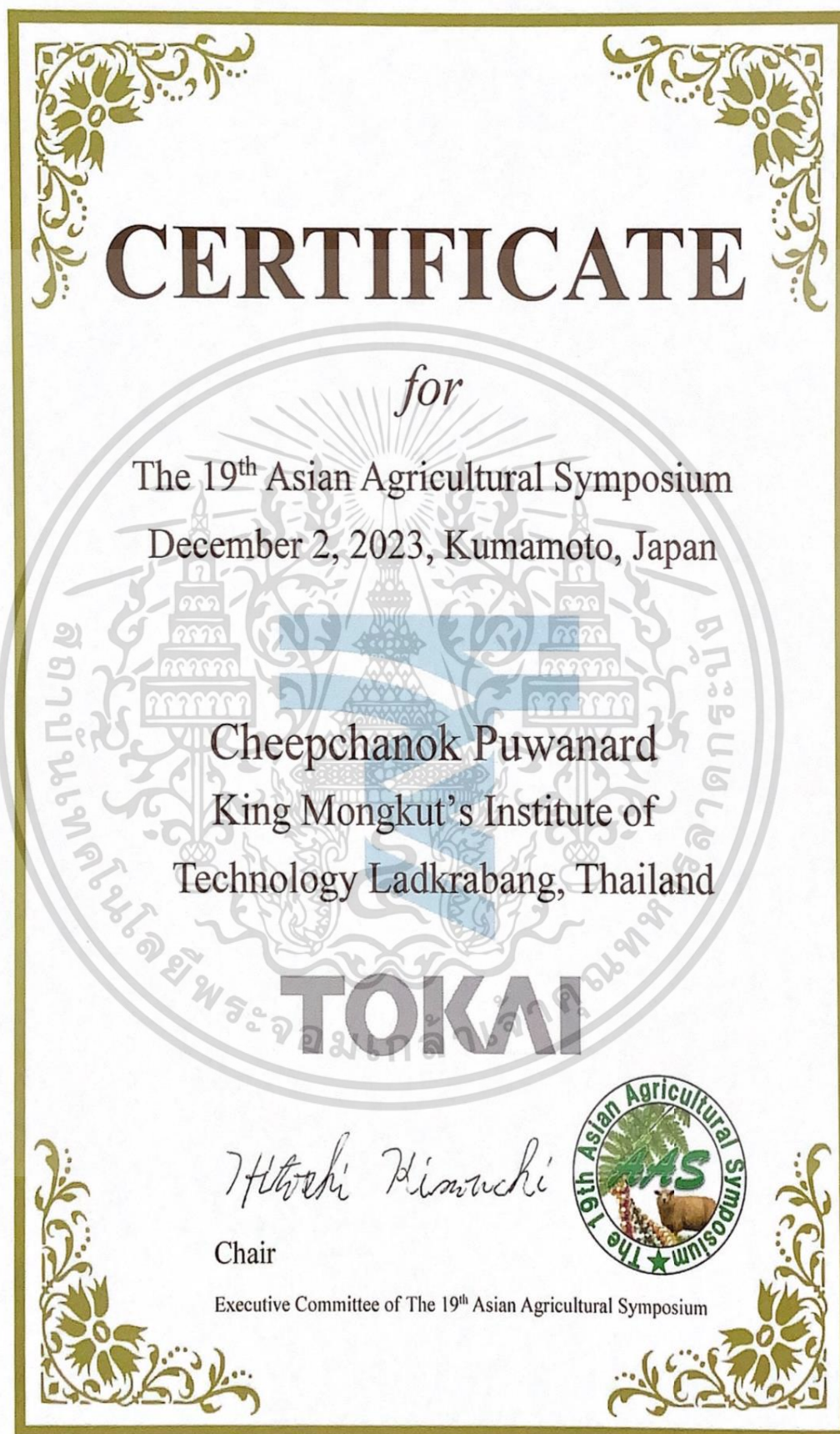
### References

Pompon, J., Manuel, M., Ng, G.K., Wong, B., Shan, C., Manolarin, G., Soto-Acosta, R., Brodrick, S.S., Ooi, E.E., Missé, D., Shi, P.Y. and Garcia-Blanco, M.A. (2017). Dengue subgenomic flaviviral RNA disrupts immunity in mosquito salivary glands to increase virus transmission. *PLoS Pathogens*, 13: 1-27.

World Health Organization. (2018). Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes – 2nd ed. Geneva: World Health Organization. Available Source: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/271100>.

Forstinus, N.O., Ikechulwa, E.N., Emenike, P.M. and Osita, O. (2017). Synthetic insecticides, phytochemicals and mosquito resistance. *Academia Journal of Biotechnology*, 5: 118-125.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นางสาวซีพชนก ภูวนารถ  
วัน เดือน ปีเกิด วันที่ 6 มกราคม 2541 จังหวัดสมุทรปราการ  
ที่อยู่ 86/4 หมู่ 2 ตำบล เทพารักษ์ อำเภอ เมืองสมุทรปราการ  
จังหวัด สมุทรปราการ รหัสไปรษณีย์ 10270

## ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2553 สำเร็จการศึกษาโรงเรียนวัดหนามแดง (เขี้ยวอุทิศ)  
พ.ศ. 2559 สำเร็จการศึกษาโรงเรียนบางพลีราษฎร์บำรุง  
พ.ศ. 2562 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)  
ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## โครงการแลกเปลี่ยนนักศึกษา

พ.ศ. 2567 ได้รับทุนโครงการ “Academic Exchange Program” จาก  
Tokai University (Kyushu Campuses) ไปแลกเปลี่ยน  
เรียนรู้ที่เมืองคุมาโมโตะ ประเทศญี่ปุ่น ระหว่างวันที่ 22  
เมษายน-22 พฤษภาคม พ.ศ. 2567

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# CERTIFICATE

*This is to certify that*

*Ms. Cheepchanok Puwanard*

*Pursued research in the Field of Natural  
Enemies and Environmental Entomology  
at Tokai University*

*Period of Research:*

*Between April 22, 2024 and May 22, 2024*

*Theme of Research:*

*Adulticidal activity of plant essential oils and their major  
compositions against Stable fly, *Stomoxys calcitrans*  
(Diptera: Muscidae) and bioassay on non-target species*

岡本 智伸

*Chinobu Okamoto  
Dean of Graduate School of  
Agriculture  
Tokai University*

木之内 均

*Hitoshi Kinouchi  
Provost of Kumamoto Campus  
Tokai University*

*May 22, 2024*

*Date*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้