บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ปัญหาแมลงศัตรูพืชในการผลิตผัก

พืชผักเป็นอาหารประจำวันสำหรับทุกคน ตามแหล่งปลูกผักต่าง ๆ จึงมักมีการปลูกกันอย่างต่อเนื่องตลอดทั้งปี ปัญหาเกี่ยวกับแมลงศัตรูผักจึงเป็นเรื่องที่ต่อเนื่องกันมาเช่นกัน

หนอนกระทู้ผัก

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Spodoptera litura* (Fabr.)

อันดับ : Lepidoptera

วงศ์ : Noctuidae

พืชอาศัย : คะน้า ผักกาด กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก มะเขือเทศ ถั่วพู มันเทศ องุ่น ส้ม ผักบุ้ง บัวหลวง ยาสูบ ชา กะเพรา บานชื่น บานไม่รู้โรย หงอนไก่ ผักโขม มันฝรั่ง ถั่วผี สตรอเบอรี่ กุหลาบ หงอนไก่ กล้วย ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ฝ้าย ละหุ่ง ฯลฯ (ณรรฐพล, 2526)

ลักษณะการทำลาย

อันตรายรุนแรง มักเกิดจากหนอนตัวโต กัดกินใบก้านหรือเข้าไปทำลายในหัวหรือดอก ทำความเสียหายยากแก่การกำจัด อย่างไรก็ตาม การทำลายมักเกิดเป็นหย่อม ๆ ตามจุดที่แม่ผีเสื้อวางไข่

ลักษณะ ชีวประวัติและพฤติกรรม

ไข่ ตัวเมียวางไข่เป็นกลุ่ม ๆ โดยมีขนสีน้ำตาลปกคลุมไข่ไว้ ไข่ใหม่ ๆ มีสีขาวนวล และค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและสีดำ เมื่อไข่ใกล้ฟักออกเป็นตัว ไข่มีอายุประมาณ 3-7 วัน

หนอน เมื่อออกจากไข่ใหม่ ๆ มีสีเขียวอ่อนหรือสีนวลอยู่รวมกันเป็นกลุ่มตรงที่ไข่ฟักออกนั้น หนอนส่วนมากออกหากินในเวลากลางคืน

ดักแด้ ปกติแล้วหนอนเข้าดักแด้ในดินตรงรอยแตกระแหงหรือตามกองขยะ ดักแด้สีน้ำตาลดำ ยาวประมาณ 1.5 - 1.8 ซม. อายุดักแด้ประมาณ 7-12 วัน

ตัวเต็มวัย เป็นผีเสื้อกลางคืน เมื่อกางปีกแล้ว วัดได้ประมาณ 3 ซม. ลำตัว 1.5 ซม. ปีกคู่หน้ามีจุดสีน้ำตาลเข้มมีลวดลายเต็มปีก ส่วนปีกคู่หลังสีขาวบาง ลำตัวมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุมอยู่ ตัวเมียตัวหนึ่งวางไข่ได้ 200-300 ฟอง

เพลี้ยอ่อน (*Lipaphis erysimi*) : ทำลายพืชได้ทั้งในระยะ**ตัวอ่อน**และตัวเต็มวัย โดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากพืชทั้งส่วนยอด ใบอ่อน ใบแก่และช่อดอก **ลักษณะอาการที่เห็นได้ชัด** คือ ยอดและใบจะหงิกงอ เมื่อเพลี้ยอ่อนเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ พืชแสดงอาการ**เหี่ยว ใบที่ถูกทำ**ลายค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลือง และร่วงหล่นลำต้นแคระแกร็น ถ้าทำลายช่อดอกทำให้**ดอกร่วงหล่น**หลุดไปจากต้น ผลผลิตลดลง

ด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta sinuata*) : เป็นศัตรูสำคัญของผักประเภทกระหล่ำและผักกาด พบการทำลายได้ตลอดทั้งปี โดยตัวเต็มวัยกัดกินใบจนเป็น**รูพรุน** ทำความเสียหายได้ในระยะที่ผักกำลังเจริญเติบโต สำหรับตัวอ่อนที่เป็นหนอนชอบกัดกินราก บางครั้งอาจเกิดการระบาดในแปลงเพาะกล้าได้เช่นกัน

หนอนคืบกระหล่ำ (*Trichoplusia ni* Hubn.) : เป็นหนอน**ขนาดกลาง** กินจุ ทำลายโดยการกัดกินใบเป็นส่วนใหญ่ (การทำลายเป็นไปอย่างรวดเร็วเมื่อหนอนโต**ขึ้น**) หนอนคืบกัดกินเนื้อใบขาด และมักเหลือเส้นใยไว้ เมื่อเกิดระบาดขึ้นมักแพร่กระจายไปอย่างรวดเร็ว

หนอนใยผัก (*Plutella xylostella* L.) : หนอนใยผักกัดกินผิว**ด้าน**ล่างใบจนเหลือแต่ใยขาว รอยทำลายแตกต่างจากหนอนอื่นและมักเข้าไปกัดกินในยอดผักที่กำลังเจริญถึงทำให้ยอดลีบ หรือกัดกินใบที่หุ้มหัวผักพวกกะหล่ำให้เสียคุณภาพ นอกจากนี้ยังกัดกินผักอ่อนทำให้เกิดเป็นรูพรุน (สิริวัฒน์, 2526)

ภาพที่ 1 ดอกค้างคาวดำและต้นค้างคาวดำ

ค้างคาวดำ หรือ Bat flower, Black lily (*Tacca chantrieri* Andre.) เป็นพืชตระกูล Taccaceae (ดังภาพที่ 1)เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี (วุฒิ, 2540 และวงศ์สถิตน์และคณะ, 2539) ลักษณะทั่วไปของต้นค้างคาวดำมีความสูงประมาณ 30-50 เซนติเมตร มีเหง้าใต้ดินรูปทรงกระบอก ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับเวียนออกเป็นรัศมี ใบมีลักษณะเป็นรูปวงรี กว้าง 6-18 เซนติเมตร ยาว 25-60 เซนติเมตร ดอกเป็นดอกช่อ มีดอกย่อย 4-6 ดอก กลีบดอกเป็นสีม่วงแกมเขียวถึงสีม่วงดำ มีใบประดับ 2 คู่ เรียงตั้งฉากกัน ใบใหญ่ 2 ใบ ใบเล็ก 2 ใบ ส่วนผล มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกแกมสามเหลี่ยม มีสันเป็นคลื่นตามยาว เมล็ดเป็นรูปไต สีม่วงจนถึงม่วงอมน้ำตาล มักพบพืชชนิดนี้ขึ้นตามภูเขาสูง เจริญเติบโตได้ดีในที่ที่มีอากาศเย็นชื้น มีแสงแดดร่มรำไร โดยถ้าอยู่ในที่ร่มให้ดอกสีเข้มกว่าอยู่ในที่มีแสงแดดจัด(วงศ์สถิตน์และคณะ, 2539) เป็นพืชสมุนไพรบนที่สูงชนิดหนึ่งของไทย การศึกษาวิจัยระยะหลังพบว่า นอกจากฤทธิ์ทางยารักษาโรคแล้ว สารสกัดจากพืชชนิดนี้ยังสามารถยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผักได้

รัตติยา (2542) ศึกษาการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผักในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยวิธีการเลือกกิน (leaf disk bioassay) สามารถคัดเลือกพืชที่มีค่า Antifeedant Index (AFI) ต่ำกว่า 20 ได้จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ กิ่งประยงค์ เปลือกผลมะกรูด รากหนอนตายหยาก ผลดีปลี และลำต้นใต้ดินค้างคาวดำ มีค่าเท่ากับ 17.94±6.73 18.51±1.83 19.35±1.00 23.29±7.59 และ 25.32±6.04 ตามลำดับ ในกรณีของค้างคาวดำซึ่งมีค่า AFI มากกว่า 20 แต่ก็ได้รับคัดเลือกไว้ เนื่องจากมีผลทำให้การเจริญเติบโตของหนอนผิดปกติ เช่น ไม่สามารถเข้าดักแด้ ดักแด้ตาย และผีเสื้อมีลักษณะผิดปกติ คันธรส (2544) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบด้วยอะซิโตนจากลำต้นใต้ดินค้างคาวดำ ที่มีต่อหนอนกระทู้ผัก พบว่าสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 25, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงฤทธิ์ยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผักทุกระดับความเข้มข้น

ภาพที่ 2 ต้นดีปลีและผลดีปลีแห้ง

ดีปลี หรือ Indian Long Pepper (*Piper retrofractum* Vahl.) เป็นพืชตระกูล Piperaceae (ดังภาพที่ 2) ลักษณะทั่วไป เป็นไม้เถาเลื้อย ผิวเรียบ มีรากงอกตามข้อ ลำต้นรูปทรงกระบอก ใบมีลักษณะรูปไข่ยาวรี ส่วนของโคนใบมนและค่อนข้างกลม สองด้านไม่เท่ากัน ปลายใบแหลม สีใบเขียวเป็นมัน ใบแก่สีเขียวเข้ม เส้นกลางใบมีเส้นแยกสองคู่ และมีเส้นที่ฐานใบ 3-5 เส้น ขนาดใบยาว 8.5-16 เซนติเมตร กว้าง 3.5-6.5 เซนติเมตร ก้านใบยาว 6-10 มิลลิเมตร เป็นใบเดี่ยว ออกสลับกัน ดอกออกตรงข้ามใบ เป็นช่อชนิดดอกย่อยไม่มีก้าน(spike) ช่อดอกตัวผู้และช่อดอกตัวเมียอยู่คนละต้นกัน ผลอัดกันแน่นเป็นช่อยาว 2.5- 5 เซนติเมตร วัดเส้นผ่านศูนย์กลางยาวประมาณ 1 เซนติเมตร โคนกว้างปลายมน เปลือกผลบาง ผลสดมีสีเขียวเมื่อแก่มีสีแดงสด มีรสเผ็ด ร้อน ขมกลิ่นฉุน (จันทร์ทิพย์, 2535; โสภา, 2537) ดีปลีเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์ป้องกันกำจัดแมลงได้หลายอย่าง เช่น ฆ่าลูกน้ำและตัวเต็มวัยยุงลาย (*Aedes aegypt*) (โสภา, 2537) จันทร์ทิพย์ (2535) ได้ศึกษาโครงสร้างของสารประกอบในผลดีปลีและฤทธิ์ฆ่าแมลง พบว่ามีสาร guineensine และสาร pipercide ซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าหนอนกระทู้ผักโดยการสัมผัส สาร guineensine มีค่า LD_{50} เท่ากับ 160.89 นาโนกรัมต่อตัว ที่ 1 ชั่วโมง และสาร pipercide มีค่า LD_{50} เท่ากับ 45.26 นาโนกรัมต่อตัว ที่ 1 ชั่วโมง สารทั้งสองตัวนี้มีฤทธิ์เสริมซึ่งกันและกัน เมื่อนำมารวมกันในอัตราส่วน 1:1 จะแสดงค่า LD_{50} เท่ากับ 18.48 นาโนกรัมต่อตัว ที่ 1 ชั่วโมง นับถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานยืนยันฤทธิ์ยับยั้งการกินของดีปลีแต่มีรายงานฤทธิ์ยับยั้งการกินจากพืชตระกูลเดียวกัน คือ *Piper futokazura* ซึ่งพบว่า สาร isosaron และสาร piperenone มีฤทธิ์ยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผักได้ (Kato *et al*., 1986)

การศึกษาฤทธิ์ควบคุมหนอนกระทู้ผักของด้างดาวดำและดีปลีดังกล่าวข้างต้น เป็นเพียงการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเท่านั้น การศึกษาเพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์ทางการค้า จำเป็นต้องศึกษาถึงระดับสารออกฤทธิ์ที่บริสุทธิ์หรือกึ่งบริสุทธิ์ด้วย ซึ่งอาจทำได้โดยนำสารสกัดหยาบเหล่านี้ไปผ่านกระบวนการทางเคมี เช่น ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) หรือ คอลัมน์โครมาโทกราฟี เป็นต้น ดังที่ได้เคยมีการศึกษาเป็นเบื้องต้นไว้แล้ว เช่น Escoubas *et al.* (1993) ได้ศึกษาสารสกัดหยาบจากต้น *Skimmia japonica* ด้วย เอธิลอะซิเตท พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผัก และตรวจสอบโดยวิธี insect feeding bioassay และนำแถบที่หนอนไม่กินมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) พบ สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการกินดีที่สุด 3 ชนิด คือ bergapten , xanthotoxin และ oxypeucedanin ตามลำดับ Natural Products Research Unit (NPRU) (1984) ได้สกัดสารสกัดจากเนื้อไม้แห้งของต้น *Bridelia tomentosa* Bl. ด้วย เมทานอล และนำมาสกัดอีกครั้งด้วยเฮกเซน และ คลอโรฟอร์ม แล้วแยกสารสกัดที่ได้โดยการใช้ column chromatography โดยมีเฮกเซน, คลอโรฟอร์ม และ เมทานอล ใช้เป็นตัวชะ แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค P-TLC , recolumn chromatography และ recrystallization ตามลำดับ ได้สารผสมของแข็ง 2 ชนิด เป็นสารสเตียรอยด์ คือ stigmaterol , β - stigmasterol

การแยกส่วนผสมและทำสารให้บริสุทธิ์ (นันทวัน , 2534)

เนื่องจากในพืชแต่ละชนิดมีสารเคมีหลายชนิดประกอบอยู่ด้วยกัน ดังนั้นสารสกัดที่ได้เบื้องต้นจึงเป็นส่วนผสมของสารเคมีเหล่านั้น การให้ได้มาของสารสำคัญที่บริสุทธิ์จึงจำเป็นต้องอาศัยวิธีการแยกโดยใช้เทคนิคและอุปกรณ์การแยกต่าง ๆ ซึ่งการแยกทำได้โดย

1. Chemical Means วิธีนี้อาศัยคุณสมบัติและปฏิกิริยาทางเคมีของสารองค์ประกอบที่แตกต่างกัน สามารถแยกสารออกจากกันได้ เช่น
   - อาศัยความเป็นด่าง (basicity) ของสาร เช่น การแยกพวกเอมีน (amine) ออกจากสารอื่นด้วยกรด
   - สารพวกคาร์บอนิล (carbonyl) สามารถทำปฏิกิริยากับสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมไบซัลไฟต์ (sodium bisulfite) ได้เป็นไบซัลไฟต์ (bisulfite) ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตได้อัลดีไฮด์และคีโตนกลับมา สามารถแยกออกจากสารอื่น ๆที่ไม่ต้องการได้
   - ใช้วิธี fractional liberation คือการแยกสารออกจากกันโดยการเปลี่ยนแปลงคุณ-สมบัติของสาร เช่น การเปลี่ยนแปลงเกลือของแอคาลอยด์ให้เป็นแอลคาลอยด์ ซึ่งเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์สามารถละลายออกมาได้
2. Physical Means เป็นการแยกสารออกจากกันโดยอาศัยคุณสมบัติทางฟิสิกส์ เช่น การกลั่นด้วยไอน้ำ, การระเหิด (sublimation), คอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography), HPLC เป็นต้น และทำให้สารบริสุทธิ์ได้โดยการตกผลึก (precipitation), Preparative TLC เป็นต้น

การแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดพืชสมุนไพร (นันทวัน, 2534)

วิธีการแยกที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ โครมาโทกราฟี (chromatography) ซึ่งเป็นเทคนิคการแยกสาร โดยอาศัยหลักการกระจายของสารที่ต้องการในระหว่างตัวกลาง 2 ชนิดที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ ตัวกลางอยู่กับที่ (stationary phase) และตัวพาเคลื่อนที่ (mobile phase) สารเคลื่อนที่ไปบนตัวกลางอยู่กับที่โดยการพาของตัวกลางเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่ของสารในตัวกลางไม่เท่ากันขึ้นกับแรงอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างสารตัวถูกละลาย (solute) กับตัวกลางอยู่กับที่และระหว่างสารตัวถูกละลายกับตัวพาเคลื่อนที่ แรงอันตรกิริยาที่เกิดอาจเกิดโดยกระบวนการต่อไปนี้ คือ

1. การดูดซับ (adsorption) ที่ผิวอนุภาค (particles) ของตัวกลางอยู่กับที่

2. การดูดซึม (absorption) เข้าไปในช่องว่าง (pores) ของตัวกลางอยู่กับที่

3. การกระจายตัว (partition) เข้าไปในของเหลวที่เคลือบอยู่ที่ผิวอนุภาคของตัวกลางอยู่กับที่หรืออยู่ในช่องว่างของอนุภาคซึ่งขึ้นอยู่กับสมบัติในการละลายของสาร

4. การสร้าง heteropolar bonds กับไอออน (ion) ของตัวกลางอยู่กับที่

5. การระเหย (volatile)

โดยทั่วไปแล้วการแยกไม่ได้ผ่านกระบวนการข้างต้นเพียงอย่างเดียว แต่อาจผ่านกระบวนการดังกล่าวรวมกัน เช่นมีทั้งดูดซับและดูดซึมเป็นต้น

โครมาโทกราฟี แบ่งได้ 2 ประเภทตามเทคนิคการแยก คือ

1. คอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) เป็นโครมากราฟีซึ่งมีตัวกลางอยู่กับที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ขนาดต่าง ๆ กัน เมื่อใส่สารที่ต้องแยกลงไปเหนือคอลัมน์แล้วจึงผ่านตัวพาเคลื่อนที่ลงไป ตัวพาเคลื่อนที่พาสารเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์

2. โอเพนเบดโครมาโทกราฟี (open-bed chromatography) เป็นโครมาโทกราฟีซึ่งเป็นแผ่นบาง ตัวกลางเคลื่อนที่โดยอาศัยคุณสมบัติ capillary wetting ใช้กับตัวกลางเคลื่อนที่ที่เป็นของเหลวได้แก่ เปเปอร์โครมาโทกราฟี (paper chromatography) และ ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin - layer chromatography, TLC)

Thin - Layer Chromatography เป็นเทคนิคการแยกสาร โดยการใช้ตัวกลางอยู่กับที่ที่แผ่เป็นแผ่นเคลือบอยู่บนตัวรองรับ (support) ซึ่งอาจเป็นแก้ว อะลูมิเนียม (aluminium) หรือ โพลีเอ-ทธิลีน (polyethylene) การแยกทำโดยการหยดสารบนตัวกลางอยู่กับที่ แล้วนำแผ่น TLC ที่ได้ไปใส่ในภาชนะที่มีตัวพาเคลื่อนที่ที่เหมาะสมบรรจุอยู่ สารละลายเคลื่อนที่ผ่านไปบนตัวกลางอยู่กับที่เรียกว่า development ขณะเกิดการ development สารแยกออกจากกัน โดยกระบวนการแยกมีทั้งการดูดซับ และการกระจายตัวของสารเกิดขึ้นพร้อม ๆ กันไป สารแต่ละชนิด มีความสามารถในการดูดซับและการกระจายตัวต่างกันไป เมื่อเวลาผ่านไปเกิดการแยกออกจากกันในที่สุด

Liquid - liquid Extractor เป็นการสกัดสารจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรก แบ่งเป็น 2 ชนิด

1. Extractant lighter คือ ตัวทำละลายที่ใช้สกัดเบากว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

2. Raffinate lighter คือ ตัวทำละลายที่ใช้สกัดหนักกว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร (นันทวัน, 2534)

หลักเกณฑ์การเลือกใช้ตัวทำละลาย (นันทวัน, 2534)

1. สารละลายและตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกัน
2. ละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุด ในขณะที่ละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด (selectivity)
3. แรง (force) ซึ่งเกี่ยวข้องในการละลายที่สำคัญ คือ
   3.1 Dispersion force เป็นแรงที่เกิดจาก transient charger induced ในโมเลกุล พวกตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ประกอบด้วยโมเลกุล ซึ่งเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ทำให้พวกสารไม่มีขั้ว เข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างโมเลกุลได้ง่าย
   3.2 Dipole - dipole force เป็นแรงที่พบในตัวทำละลายที่มีขั้ว เกิดจากการเหนี่ยวนำในโมเลกุลเกิดเป็นขั้วบวก หรือขั้วลบพวกนี้ ทำให้โมเลกุลของตัวทำละลายที่มีขั้วจับกับแน่น พวกสารซึ่งไม่มีขั้วแทรกตัวเข้าไปได้ยาก
   3.3 Hydrogen - bonding สารที่สามารถสร้าง H - bonding กับตัวทำละลายได้ดี สามารถละลายได้ดี

   ตัวทำละลายอาจจัดเรียงตามลำดับความมีขั้วจากน้อยไปหามากได้ดังนี้

cyclohexane
carbon tetrachloride
ethylene trichloride
toluene
benzene
dichloromethane
chloroform
ethyl ether
ethyl acetate
acetone
ethanol
methanol
water

การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการการกินของสารสกัดจากพืช

การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการกินในแมลง โดยวิธี leaf disk bioassay คือ การใช้ใบพืชอาหารทาหรือจุ่มในสารทดลองแล้วปล่อยแมลงหรือตัวอ่อนแมลงเข้าไปกัดกิน (Alkafahi *et al.*, 1989) แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ no - choice leaf disk bioassay ซึ่งใช้ใบพืชอาหารที่ทาหรือจุ่มในสารทดลองอย่างเดียว ตรวจเช็คผลด้วยวิธีวัดพื้นที่ใบ หรือตรวจเช็คด้วยการให้คะแนนความเสียหาย โดยโสภา(2537) เรียกวิธีนี้ว่า leaf dipping ส่วนอีกแบบหนึ่งคือ two - choice leaf disk bioassay ซึ่งประกอบด้วยใบพืชอาหารที่ทาด้วยสารทดลอง และ ใบพืชอาหารที่ไม่ทาสารทดลอง (ควบคุม) อยู่ในการทดลองเดียวกัน ทำการวัดพื้นที่ใบที่ถูกแมลงกัดกิน โดยค่า indexเท่ากับ [%T/(%T+%C)] X 100 เมื่อ % T คือ ร้อยละของพื้นที่ใบทดลองที่ถูกแมลงกัดกิน และ %C คือ ร้อยละของพื้นที่ใบควบคุมที่ถูกแมลงกัดกิน เรียกค่า index นี้ว่า antifeedant index (AFI) (Escoubas *et al.*, 1993) โดยกำหนดการตัดสินพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งการกินที่ AFI น้อยกว่า 20 ค่า AFI เท่ากับ 0 คือใบพืชทดลองไม่ถูกกัดกิน แสดงว่ามีศักยภาพยับยั้งการกินสูงที่สุด ส่วนค่า AFI เท่ากับ 50 คือ หนอนกินใบพืชทดลองและใบพืชควบคุมเท่า ๆ กัน แสดงว่าไม่มีศักยภาพยับยั้งการกิน และค่า AFI ที่ ใกล้เคียง 80 แสดงถึง ฤทธิ์กระตุ้นการกินของหนอน

การตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์โดยวิธี Insect feeding bioassay

การตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งการกินของแมลง โดยวิธี insect feeding bioassay (Escoubas *et al.*, 1992)คือ การนำแผ่น TLC ที่ทำการแยกสารออกฤทธิ์ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมเสร็จแล้ว มาฉาบด้วยอาหารเทียม (รายละเอียดวิธีการแสดงในภาคผนวก) แล้วปล่อยหนอนกระทู้ผักวัย 3 จำนวน 15 ตัว ลงในกล่องที่มีแผ่น TLC ทิ้งไว้ที่มืด 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกหนอนออก บันทึกค่า *Rf* ของแถบที่ยับยั้งการกินของหนอน จากบริเวณที่หนอนไม่กิน

การประเมินความเป็นพิษของสาร (สุภาณี , 2540)

การประเมินความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute test) เป็นการให้สัตว์ทดลองได้รับสารพิษเพียงครั้งเดียวหรือได้รับหลายครั้งในระยะเวลาที่สั้น โดยทั่วไปสัตว์ทดลองแสดงอาการให้เห็นภายใน 24 ชั่วโมง และเพิ่มความรุนแรงมากขึ้นภายใน 1 – 3 วัน ในการบอกระดับความเป็นพิษเฉียบพลันนิยมใช้คำ ลีทัลโดส (lethal dose, LD) หรือ ลีทัลคอนเซนเทรชัน(lethal concentration, LC) เป็นดรรชนีแสดง

ลีทัลโดส (lethal dose, LD) หมายถึง ปริมาณ (dose) ของสารพิษที่ทำให้สัตว์ทดลองตายภายในระยะเวลาที่กำหนด โดยทั่วไปใช้เปอร์เซ็นต์การตายของสัตว์ประกอบในการกำหนดค่า ลีทัลโดส เช่น ปริมาณสารพิษที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 10 % (LD_{10}) ปริมาณสารพิษที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 % (LD_{50}) และปริมาณสารพิษที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 90 % (LD_{90}) เป็นต้น แต่ที่นิยมที่สุดคือ การใช้ LD_{50} หรือ มีเดียนลีทัลโดส (median lethal dose) เป็นเกณฑ์การบอกระดับความเป็นพิษ อาจให้คำจำกัดความได้ว่า หมายถึง ปริมาณของสารพิษที่สัตว์ทดลองแต่ละตัวได้รับ และมีผลทำให้สัตว์ทดลองตายลงครึ่งหนึ่ง (หรือ 50 เปอร์เซ็นต์) ภายในระยะเวลาที่กำหนด ใช้หน่วยเป็นปริมาณของสารพิษต่อตัว หรือต่อหน่วยน้ำหนักของสัตว์ทดลอง เช่น ไมโครกรัมต่อตัว, มิลลิกรัมต่อตัว หรือ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นต้น

ลีทัลคอนเซนเทรชัน (lethal concentration, LC) หมายถึง ค่าความเข้มข้น (concentration) ของสารพิษ ซึ่งทำให้สัตว์ทดลองตายภายในเวลาที่กำหนด ใช้หน่วยเป็น สตล. (part per million, ppm), เปอร์เซ็นต์, มิลลิกรัมต่อลิตร, มิลลิกรัมต่อกรัม หรือแม้กระทั่งใช้เป็นอัตราส่วนการเจือจางจากสารละลายมาตรฐาน เช่น 1:1,000 และ 1:10,000 เป็นต้น การประเมินค่า LC นี้ไม่สามารถบอกได้ว่าสัตว์ทดลองแต่ละตัวได้รับสารพิษในปริมาณเท่าใด แต่รู้ว่าสัตว์ทดลองได้รับสารพิษที่มีความเข้มข้นเท่าใด

ยังมีค่าที่ใช้บอกระดับความเป็นพิษแบบอื่น ๆ ที่มีการใช้บ้างเฉพาะบางกรณี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการศึกษาความเป็นพิษของสารฆ่าแมลงต่อแมลง เช่น ลีทัลไทม์ (lethal time, LT) เป็นการบอกระดับความเป็นพิษโดยใช้เวลาในการทำให้สัตว์ทดลองตาย เมื่อได้รับสารพิษในปริมาณเดียวกันเป็นตัววัด มีหน่วยเป็นวินาที, นาทีหรือชั่วโมง เป็นต้น

มีสารพิษหลายชนิดที่ไม่ได้ใช้ฆ่าแมลงโดยตรง แต่ทำให้เกิดผลเสียในลักษณะอื่น ๆ ต่อแมลงเช่น สารไล่, สารดึงดูด, สารยับยั้งการกิน และฟีโรโมน เป็นต้น ในการประเมินประสิทธิภาพมักใช้ ค่าเอฟเฟกทีฟโดส (effective dose, ED) หรือ เอฟเฟกทีฟคอนเซนเทรชัน (effective concentration, EC) เป็นตัวบอกระดับปริมาณหรือความเข้มข้นของสาร ซึ่งสัตว์ทดลองแสดงการตอบสนอง

จากการตรวจเอกสารข้างต้นแสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบจากค้างคาวดำและดีปลีมีฤทธิ์ยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผัก ซึ่งหนอนชนิดนี้เป็นศัตรูพืชที่ทำความเสียหายต่อพืชได้มากกว่า 100 ชนิด ทำให้หนอนสามารถแพร่กระจายได้ตลอดทั้งปี และสร้างความเสียหายแก่พืชเศรษฐกิจอย่างมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาวิธีการพัฒนาสารสกัดจากค้างคาวดำและดีปลีเป็นผลิตภัณฑ์สารสกัดสำเร็จรูปจากธรรมชาติมาใช้ทดแทนสารสังเคราะห์ที่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดย ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดในการควบคุมแมลงในแปลงผัก และผลกระทบที่มีต่อการเจริญเติบโตของพืชปลูก

ทำการทดสอบยืนยันฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากค้างคาวดำและดีปลีโดยวิธี leaf disk bioassay แบบ two-choice leaf disk bioassay และ หาค่า AFI จากการวัดพื้นที่ใบ แล้วนำไปคำนวณได้จากสูตร [%T/(%T+%C)] x 100 (Escoubas *et al.*, 1993) จากนั้นทำการแยกสารสกัดค้างคาวดำและดีปลี และทำให้สารบริสุทธิ์ โดยในสารสกัดหยาบจากค้างคาวดำใช้วิธี solvent / solvent precipitation และในดีปลีใช้วิธี thin layer chromatography จากนั้นนำสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่ได้ไปตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์โดยวิธี insect feeding bioassay (Escoubas *et al.*, 1992) และทดสอบยืนยันฤทธิ์ ยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผัก โดยวิธี leaf disk bioassay แล้วนำไปทดสอบ ประสิทธิภาพและผลกระทบของสารสกัดในสภาพแปลงปลูกคะน้า