สัญญาเลขที่ R2557B001

อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงายวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ของสารสกัดหยาบผลจันทน์ผา (*Dracaena loureiri*)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 21 มี.ค. 2558
เลขทะเบียน 1652099 2
เลขเรียกหนังสือ

QK
861
ก493ร
2557

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพวรรณ บุญชู
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สบับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

รายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ของสารสกัดหยาบผลจันทน์ผา (*Dracaena loureiri*)

(ภาษาอังกฤษ) Larvicidal activity of *Dracaena loureiri* fruit crude extracts against *Aedes aegypti* mosquito

ชื่อผู้รับทุนวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์

บทคัดย่อ

การใช้สารเคมีในการควบคุมแมลงพาหะก่อให้เกิดปัญหาในหลายด้าน สารฆ่าแมลงที่ได้มาจากธรรมชาติ โดยเฉพาะสารสกัดจากพืช จึงได้ถูกนำมาทดแทนเพื่อแก้ปัญหาเหล่านั้น ในการศึกษาครั้งนี้เนื้อผลและเมล็ดผลจันทน์ผา (*Dracaena loureiri*) ได้ถูกนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทานอล และน้ำ เพื่อศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ระยะที่ 3 ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของเนื้อผล, สกัดหยาบด้วยเอทานอลของเมล็ด และสารสกัดหยาบด้วยน้ำของเนื้อผลจันทน์ผามีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 84.00 และ <50, 921.69 และ 307.40, และ 1,067.53 และ 834.37 ppm ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับสารสกัดหยาบด้วยเอกเซนทั้งจากเนื้อผลและเมล็ด และสารสกัดหยาบด้วยน้ำของเมล็ดผลจันทน์ผาไม่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเนื้อผลจันทน์ผามีศักยภาพในการเตรียมเป็นสารสกัดเพื่อใช้ควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้านได้ อย่างไรก็ตาม ความเป็นพิษต่อสัตว์ชนิดอื่นควรได้รับการศึกษาเพื่อประเมินถึงความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ควบคุมลูกน้ำยุงในธรรมชาติต่อไป

Abstract

Because the using of insecticide causes adverse effects to the vector control situation, a plant bio-insecticide becomes an advantaged substitute for solving the problems. In this study, *Dracaena loureiri* fruit endocarp and seed were extracted with hexane, ethanol and distilled water. The crude extracts were evaluated for their larvicidal efficacy against 3rd instar larvae of *Aedes aegypti*. It was found that, the LC_{50} values of the crude ethanolic extract of endocarp, seed and the crude aqueous extract of endocarp were 84.00 and <50, 921.69 and 307.40, and 1,067.53 and 834.37 ppm after 24- and 48-hour detection times, respectively. While, both crude hexane extracts of endocarp and seed and the crude aqueous extract of seed did show any larva killing activity. In this study, the bioassay results indicated the larvicidal capability against the *Ae. aegypti* mosquito of the *D. loureiri* endocarp extracts. However, a toxicity testing for non-target organisms should be further investigated before using this plant extract to control mosquito larva in natural as larvicide.

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

1. ชื่อโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ของสารสกัดหยาบผลจันทน์ผา (*Dracaena loureiri*)

(ภาษาอังกฤษ) Larvicidal activity of *Dracaena loureiri* fruit crude extracts against *Aedes aegypti* mosquito

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด หมายเลขโทรศัพท์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์
ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร โทรศัพท์ 055964676

3. สาขาที่ทำการวิจัย กีฏวิทยาทางการแพทย์ (การควบคุมพาหะนำโรคด้วยวิธีทางชีวภาพ)

4. งบประมาณทั้งโครงการ 283,100 บาท

5. ระยะเวลาดำเนินการ 12 เดือน

6. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบัน เนื่องจากยังไม่มีวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออก การควบคุมกำจัดยุงลายบ้านจึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงสุดเพื่อลดการระบาดของโรค ซึ่งการกำจัดยุงลายบ้านในระยะลูกน้ำสามารถทำได้ง่ายและมีประสิทธิภาพสูงกว่าการกำจัดตัวเต็มวัย เพราะลูกน้ำยุงลายบ้านอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่มีพื้นที่จำกัด ตรวจพบและทำลายได้ง่าย จากอดีตจนถึงปัจจุบัน ทรายอะเบท (ทีมีฟอส) เป็นสารเคมีที่นิยมใช้ใส่ในแหล่งน้ำเพื่อกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน แม้ว่าทีมีฟอสจะมีความเป็นพิษต่ำต่อมนุษย์ แต่หากได้รับในปริมาณมากอย่างต่อเนื่อง อาจก่อให้เกิดอันตราย อีกทั้งหากใช้อย่างไม่ถูกต้องยังก่อให้เกิดการสร้างความต้านทานขึ้นในลูกน้ำยุงได้ สารสกัดจากธรรมชาติจึงถูกให้ความสนใจและพัฒนาเพื่อนำมาทดแทนการใช้สารเคมี แม้ว่าจะพบสารสกัดจากพืชหลายชนิดที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน แต่การค้นหาและพัฒนาสารสกัดจากพืชชนิดใหม่ๆ ยังคงมีความสำคัญ เพื่อประโยชน์ในด้านการศึกษาวิจัย และการคัดเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์สูง มีความปลอดภัย และสามารถผลิตเพื่อการใช้งานได้จริง

จันทน์ผาเป็นพืชที่มีการปลูกเพื่อเป็นไม้ประดับกระจายอยู่ทั่วทั้งประเทศไทย และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าผลจันทน์ผามีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงจะทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากผลจันทน์ผา เพื่อประเมินประสิทธิภาพของฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านโดยละเอียด หาก**ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่ดี อาจนำสู่การพัฒนาใช้สารสกัดจากผลจันทน์ผาเพื่อกำจัดลูกน้ำยุงลายในธรรมชาติ ทดแทนการใช้สารเคมี และจากการที่มีการปลูกต้นจันทน์ผาอยู่ทั่วทั้งประเทศ การเตรียมสารสกัดจากผลจันทน์ผา อาจมีต้นทุนที่ต่ำกว่าการผลิตหรือซื้อสารเคมีเพื่อกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน ซึ่งจะเป็นการลดการใช้งบประมาณในด้านสาธารณสุขของประเทศต่อไป**

7. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

7.1 เพื่อเตรียมสารสกัดหยาบด้วยน้ำ ethanol และ hexane จากส่วนเนื้อและเมล็ดของผลจันทน์ผา

7.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบด้วยน้ำ ethanol และ hexane จากส่วนเนื้อและเมล็ดของผลจันทน์ผา

8. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

8.1 สารสกัดผลจันทน์ผา

เนื้อผลและเมล็ดผลจันทน์ผาถูกเก็บจากธรรมชาติในพื้นที่เขตจังหวัดพิษณุโลก หลังจากล้างให้สะอาดได้นำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างแห้งสนิท หลังจากนั้นบดให้ละเอียด ตัวอย่างที่บดเป็นผงได้ถูกสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) ที่อุณหภูมิห้อง กรองสารสกัดยกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator และ lyophilizer บรรจุสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดสีชาและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น

8.2 ยุงที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) เป็นสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ เลี้ยงยุงตัวเต็มวัยด้วยสารละลายน้ำตาล 5% ผสมวิตามินรวม 5% เมื่อยุงมีอายุประมาณ 3-4 วัน ให้ยุงกินเลือดโดยวิธี Artificial membrane feeding จากนั้น 3 วัน ให้ยุงวางไข่บนกระดาษกรอง Whatman No.1 ซึ่งบุอยู่ขอบของภาชนะที่ใส่น้ำประปาและนำเข้าไปไว้ในกรงเลี้ยงยุง ไข่ที่ได้จะถูกเก็บในสภาวะแห้ง เมื่อต้องการเพาะเลี้ยงยุงรุ่นต่อไปนำกระดาษกรองซึ่งมีไข่ติดอยู่ไปแช่น้ำประปาที่บรรจุอยู่ในถาดพลาสติก ลูกน้ำระยะที่ 1 จะออกจากไข่ แล้วจึงให้อาหารสุนัขบดละเอียดเป็นอาหาร เมื่อยุงเจริญเป็นตัวเต็มวัย ถ่ายยุงใส่ในกรงเลี้ยงยุงมาตรฐานและเพาะเลี้ยงตามวิธีที่กล่าวข้างต้นต่อไป

8.3 การศึกษาฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบจากผลและใบของกุหลาบพุกาม

นำสารสกัดหยาบเนื้อผลและเมล็ดผลจันทน์ผาจากตัวทำละลายแต่ละชนิดมาเตรียมเป็นstock solution ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 1% stock solution ได้ถูกเก็บรักษาใน screw-cap vial ปิดทับด้วย aluminium foil ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียมเป็นความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน โดยนำลูกน้ำยุงลายบ้านระยะที่ 3 ตอนปลาย หรือระยะที่ 4 ตอนต้น จำนวน 25 ตัว ถ่ายลงในสารละลายทดสอบ 200 มิลลิลิตร ในเบื้องต้นจะทดสอบด้วยสารละลายทดสอบที่มีช่วงความเข้มข้นต่างกันมาก เพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นของอัตราการตายของลูกน้ำเมื่อสัมผัสกับสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นเลือกความเข้มข้น 4 ถึง 5 ระดับ ที่ทำให้ลูกน้ำมีอัตราการตายที่ 10 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการหาค่า LC_{50} และ LC_{90} สำหรับกลุ่มควบคุมจะใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายทดสอบจากสารสกัดด้วยน้ำ และใช้ DMSO 2 มิลลิลิตร ในน้ำกรอง 200 มิลลิลิตร แทนสารละลายทดสอบจากสารสกัดด้วย เอทานอล และเฮกเซน อัตราการตาย (Percentage mortality: %M) จะถูกบันทึกที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นำค่าอัตราการตายไปคำนวณหาค่า LC_{50} และ LC_{90} โดยวิธี Probit analysis ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Ldp Line (*http://embakr.tripod.com/ldpline*)

9. ผลการวิจัย

ตัวอย่างเนื้อจันทน์ผา 359.70 กรัม เมื่ออบแห้งแล้วมีน้ำหนัก 79.40 กรัม และเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ได้สารสกัดหยาบจากเฮกเซน เอทานอล และน้ำ เท่ากับ 0.34, 3.76 และ 40.69 กรัม ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างเมล็ดผลจันทน์ผา 393.42 กรัม เมื่ออบแห้งแล้วมีน้ำหนัก 192.25 กรัม และเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ได้สารสกัดหยาบจากเฮกเซน เอทานอล และน้ำ เท่ากับ 10.68, 4.23 และ 11.21 กรัม ตามลำดับ สารสกัดหยาบด้วยเฮกเซนทั้งจากเนื้อผลและเมล็ดผลจันทน์ผา ไม่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน สำหรับฤทธิ์สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของเนื้อผลจันทน์ผา, สกัดหบาบด้วยเอทานอลของเมล็ด และสารสกัดหยาบด้วยน้ำของเนื้อผลมีค่า LC_{50} เท่ากับ 84.00 และ <50, 921.69 และ 307.40 และ 1,067.53 และ 834.37 ppm ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับสารสกัดหยาบน้ำของเมล็ดจันทน์ผานั้น ไม่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงแต่อย่างใด

10. สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านระยะที่ 3 ของสารสกัดหยาบเนื้อผลและเมล็ดผลจันทน์ผา พบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการทดสอบ สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของเนื้อผลจันทน์ผามีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงสูงสุด โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 84.00 ppm ในขณะที่สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของเมล็ด และสารสกัดหยาบด้วยน้ำของเนื้อผลมีค่า LC_{50} เท่ากับ 921.69 และ 1,067.53 ppm ตามลำดับ สำหรับที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการทดสอบ พบว่าสารสกัดทุกชนิดมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงสูงขึ้น โดยพบค่า LC_{50} เท่ากับ <50, 307.40 และ 834.37 ppm เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของเนื้อผล, สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของเมล็ด และสารสกัดหยาบด้วยน้ำของเนื้อผล ตามลำดับ สำหรับสารสกัดหยาบน้ำของเมล็ดจันทน์ผานั้นไม่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงแต่อย่างใด แม้ว่าจะทิ้งให้ลูกน้ำสัมผัสกับสารสกัดจนถึงเวลา 48 ชั่วโมงแล้วก็ตาม

แม้ว่าสารสกัดหยาบด้วยน้ำของผลจันทน์ผาจะให้ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่ไม่ดีนัก แต่สารสกัดหยาบด้วยเอทานอล โดยเฉพาะจากส่วนเนื้อผลจันทน์ผามีฤทธิ์ที่ดี สูงสุด โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 84.00 ppm ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารสกัดพืชหลายชนิดที่ทำการศึกษาจากหลายผู้วิจัย เช่น สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของ *Melia azedarach*, *Sapindus rarak*, *Curcuma zedoaria* และ *Cerbera odollum* มีค่า LC_{50} เท่ากับ 76.69, 88.08, 93.38 และ 96.16 ppm ตามลำดับ จากการตรวจเอกสารที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำของพืชในแฟมิลี่ Asparagaceae พบว่า มีเพียงการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลจากส่วนรากของ *Asparagus racemosus* ซึ่งพบว่า มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 97.71 ppm หลังจากทดสอบฤทธิ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การศึกษาศึกษาในครั้งนี้ ได้แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ที่ดีในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากเนื้อผลจันทน์ผา ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาเพื่อใช้เป็นสารชนิดใหม่ในการควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้านในอนาคต

เนื้อหางานวิจัย

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบัน เนื่องจากยังไม่มีวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออก การควบคุมกำจัดยุงลายบ้านจึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงสุดเพื่อลดการระบาดของโรค ซึ่งการกำจัดยุงลายบ้านในระยะลูกน้ำสามารถทำได้ง่ายและมีประสิทธิภาพสูงกว่าการกำจัดตัวเต็มวัย เพราะลูกน้ำยุงลายบ้านอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่มีพื้นที่จำกัด ตรวจพบและทำลายได้ง่าย จากอดีตจนถึงปัจจุบัน ทรายอะเบท (ทีมีฟอส) เป็นสารเคมีที่นิยมใช้ใส่ในแหล่งน้ำเพื่อกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน แม้ว่าทีมีฟอสจะมีความเป็นพิษต่ำต่อมนุษย์ แต่หากได้รับในปริมาณมากอย่างต่อเนื่อง อาจก่อให้เกิดอันตราย อีกทั้งหากใช้อย่างไม่ถูกต้องยังก่อให้เกิดการสร้างความต้านทานขึ้นในลูกน้ำยุงได้ สารสกัดจากธรรมชาติจึงถูกให้ความสนใจและพัฒนาเพื่อนำมาทดแทนการใช้สารเคมี แม้ว่าจะพบสารสกัดจากพืชหลายชนิดที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน แต่การค้นหาและพัฒนาสารสกัดจากพืชชนิดใหม่ๆ ยังคงมีความสำคัญ เพื่อประโยชน์ในด้านการศึกษาวิจัย และการคัดเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์สูง มีความปลอดภัยและสามารถผลิตเพื่อการใช้งานได้จริง

จันทน์ผาเป็นพืชที่มีการปลูกเพื่อเป็นไม้ประดับกระจายอยู่ทั่วทั้งประเทศไทย และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าผลจันทน์ผามีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงจะทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากผลจันทน์ผา เพื่อประเมินประสิทธิภาพของฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านโดยละเอียด หากผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่ดี อาจนำสู่การพัฒนาใช้สารสกัดจากผลจันทน์ผาเพื่อกำจัดลูกน้ำยุงลายในธรรมชาติ ทดแทนการใช้สารเคมี และจากการที่มีการปลูกต้นจันทน์ผาอยู่ทั่วทั้งประเทศ การเตรียมสารสกัดจากผลจันทน์ผา อาจมีต้นทุนที่ต่ำกว่าการผลิตหรือซื้อสารเคมีเพื่อกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน ซึ่งจะเป็นการลดการใช้งบประมาณในด้านสาธารณสุขของประเทศต่อไป

การทบทวนวรรณกรรม

ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) เป็นพาหะสำคัญของโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย ยุงชนิดนี้อาศัยอยู่ตามบ้านเรือนของมนุษย์ มีแหล่งเพาะพันธุ์ตามแหล่งน้ำขังต่างๆ ที่เกิดจากฝีมือมนุษย์เช่น โอ่ง แจกัน น้ำรองขาตู้ เป็นต้น ซึ่งลูกน้ำของยุงชนิดนี้จะอาศัยเจริญเติบโตอยู่ในน้ำขังตามภาชนะดังกล่าว การควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้านนิยมใช้สารเคมีคือทรายอะเบท (Abate) (Chareonviriyaphap *et al.*, 1999) ใส่ลงในภาชนะกักเก็บน้ำหรือภาชนะที่มีน้ำขัง สารออกฤทธิ์ของทรายอะเบทคือทีมีฟอส (temephos) เป็นสารเคมีกลุ่ม Organophosphate ซึ่งแม้ว่าจะมีความเป็นพิษต่ำต่อมนุษย์ อย่างไรก็ตามการใช้ในปริมาณมากหรือในผู้แพ้สารชนิดนี้สามารถทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้ อีกทั้งยังเกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้ ซึ่งหากลูกน้ำยุงลายบ้านสัมผัสกับทีมีฟอสที่ความเข้มข้นต่ำเป็นเวลานาน อาจก่อให้เกิดการพัฒนาความต้านทานต่อทีมีฟอส รวมถึงความต้านทานข้ามต่อสารเคมีฆ่าแมลงชนิดอื่นด้วย (Rodriguez et al., 2002; ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์ และนพวรรณ บุญชู, 2554) ด้วยเหตุนี้ การศึกษาวิจัยถึงวิธีการควบคุมลูกน้ำยุงลายด้วยวิธีการอื่นๆ จึงมีความสำคัญและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง เช่นการควบคุมทางชีวภาพ (biological control) ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความปลอดภัยแก่ผู้ใช้และสิ่งแวดล้อมมากกว่าการใช้สารเคมี อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีการศึกษาถึงการใช้สิ่งมีชีวิตต่างๆ ในการควบคุมลูกน้ำยุง ได้แก่ แบคทีเรีย คือ *Bacillus thuringiensis* และ *Bacillus sphaericus* (Poopathi and Abidha, 2010) เชื้อรา เช่น *Lagenidium giganteum*, *Coelomomyces* sp., *Culicinomyces* sp., *Pythium* sp., *Entomophthora* sp., *Beauveria* sp., *Fusarium* sp. เป็น pathogen ต่อลูกน้ำยุงหลายชนิด (Cuda *et al.*, 1997; Suh and Axtell, 1999; Su *et al.*, 2001; Scholte *et al.*, 2004) ไมโครสปอริเดีย เช่น *Brachiola algerae*, *Vavraia culicis*,

Edhazardia aedis, *Amblyospora* sp., *Hyalinocysta chapmani* (Andreadis, 2007; Becnel *et al.*, 2005) หรือแม้กระทั่ง พลานาเรียชนิด *Dugesia bengalensis* (Kar and Aditya, 2003)

นอกจากการค้นหาสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ควบคุมลูกน้ำยุงทางชีวภาพแล้ว การค้นหาสารออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงซึ่งพบได้ในพืชชนิดต่างๆ เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีการศึกษาวิจัยกันอย่างแพร่หลาย ทำให้ค้นพบพืชชนิดต่างๆ ซึ่งส่วนใหญ่แล้วเป็นพืชสมุนไพร ที่มีสารออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้ สำหรับในประเทศไทย พบพืชที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง ได้แก่ กระเพราแดง ขมิ้นชัน ขอบชะนาง ข่า ข่าเล็ก ขี้เหล็ก ประคำดีควาย พริกไทย แมงลัก เลี่ยน ว่านน้ำ สะเดาอินเดีย สะระแหน่ หนอนตายอยาก หางไหล โหระพา เป็นต้น (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548) ซึ่งสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพรเหล่านี้มีอยู่หลายชนิด เช่น อะซาไดแรคติน โรติโนน ปิปเปอรีน แทนนิน และ น้ำมันหอมระเหย เป็นต้น มีการศึกษาวิจัยจำนวนมากที่พบว่าสารสกัดที่ได้จากส่วนต่างๆ ของพืชมีฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน เช่น *Acorus calamus* (ว่านน้ำ), *Anacardium occidentale* (มะม่วงหิมพานต์), *Anethum graveolens* (ผักชีลาว), *Cinnamomum porrectum* (ไม้เทพทาโร), *Citrus hystrix* (มะกรูด), *Citrus reticulate* (ส้มโชกุน), *Costus speciosus* (เอื้องไหมนา), *Derris elliptica* (หางไหล), *Homalomena aromatic*, *Kaempferia galangal* (เปราะหอม), *Leucas aspera* (หญ้านกเค้า), *Mammea siamensis* (สารภี), *Ocimum gratissimum* (ยี่หร่า), *Phyllanthus pulcher* (ธรณีสาร), *Rhinacanthus nasutus* (ทองพันชั่ง), *Stemona tuberose* (หนอนตายหยาก), *Syzygium aromaticum*, *Trigonostemon reidioides*, *Zingiber zerumbet* (กระทือ) (Cavalcanti *et al.*, 2004; Komalamisra *et al.*, 2005; Promsiri *et al.*, 2006; Maheswaran *et al.*, 2008; Sutthanont *et al.*, 2010) เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีการค้นพบสิ่งมีชีวิตหรือสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ ที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงเพิ่มมากขึ้น แต่ในปัจจุบันยังไม่มีสิ่งใดที่สามารถนำมาใช้ทดแทนการใช้สารเคมีในการกำจัดลูกน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพราะการใช้สิ่งมีชีวิตหรือสารสกัดจากพืชยังคงมีประสิทธิภาพน้อยกว่าสารเคมี เช่น การใช้ *B. thuringiesis* ซึ่งแม้ว่าจะมีการผลิตเป็นการค้าวางจำหน่ายแล้วก็ตาม แต่ข้อเสียของแบคทีเรียชนิดนี้คือมีความสามารถในการเจริญเพิ่มจำนวนในสิ่งแวดล้อมได้น้อย ดังนั้นเมื่อปล่อยแบคทีเรียลงสู่สิ่งแวดล้อมแล้วเมื่อเวลาผ่านไปประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงจะลดลงตามจำนวนที่ลดลงของแบคทีเรีย ทำให้มีประสิทธิภาพฆ่าลูกน้ำยุงในเวลาที่สั้น (Poopathi and Abidha, 2010) สำหรับสารสกัดจากพืช แม้ว่ามีงานวิจัยจำนวนมากกล่าวถึงประสิทธิภาพของพืชหลายชนิดในการฆ่าลูกน้ำยุง อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีสารสกัดจากพืชชนิดใดถูกพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ฆ่าลูกน้ำยุงวางจำหน่ายในท้องตลาดเพื่อการใช้งานจริง อาจเป็นเพราะสารสกัดจากพืชเหล่านั้นยังไม่สามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ หรือผลิตภัณฑ์จากพืชเหล่านั้นอาจยังไม่มีประสิทธิภาพสูงเพียงพอที่จะนำไปใช้งานจริงในสิ่งแวดล้อม

ในปัจจุบัน การศึกษาวิจัยเพื่อสกัดเอาสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ในพืชสมุนไพร หรือแม้กระทั่งการค้นหาพืชชนิดใหม่ เพื่อนำไปใช้ควบคุมลูกน้ำยุงในภาคสนามยังคงมีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง เพราะมีความเป็นไปได้ที่จะพบพืชที่มีสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพดีกว่าเดิม ซึ่งหากสามารถค้นพบพืชหรือสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมลูกน้ำยุงโดยเฉพาะยุงลายบ้าน จะเป็นประโยชน์อย่างมากในทางการแพทย์และการสาธารณสุขของประเทศ ในแง่ของการลดจำนวนประชากรยุงซึ่งจะสอดคล้องกับการลดจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออก หรือในด้านการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ในพืช ซึ่งจะทำให้พบความหลากหลายของพืชที่มีคุณสมบัติทางด้านนี้ รวมถึงการพัฒนาต่อยอดสารออกฤทธิ์ที่ค้นพบ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในทางปฏิบัติได้จริง นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากพืชยังเป็นการป้องกันการเกิดความต้านทานต่อสารเคมีของลูกน้ำยุงเมื่อได้รับสารเคมีชนิดเดิมเป็นประจำ และปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตอื่นอีกด้วย ดังนั้นจากผล

การทดสอบเบื้องต้นของการฆ่าลูกน้ำยุงลายโดยใช้ผลจันทน์ผาดังที่จะกล่าวต่อไป ทำให้มีความเป็นไปได้ที่สารสกัดจากผลจันทน์ผาจะมีฤทธิ์ที่ดีในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน สามารถใช้ทดแทนสารเคมี และยังจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของจันทน์ผาอีกด้วย เพราะในปัจจุบันต้นจันทน์ผามีการใช้ประโยชน์เป็นไม้ประดับเพียงอย่างเดียว ในส่วนของผลนั้นไม่ได้มีการใช้ประโยชน์ด้านอื่นแต่ประการใด ดังนั้นหากสามารถนำส่วนผลจันทน์ผามาใช้ประโยชน์ในด้านนี้ได้ จะเป็นการเพิ่มมูลค่าของจันทน์ผาเป็นอย่างมาก

จันทน์ผา เป็นไม้ป่าชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ มีชื่อพื้นเมืองว่า จันทน์แดง ลักกะจั่น หรือ ลักกะจันทน์ จัดอยู่ในวงศ์ Dracaenaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dracaena loureiri* Gagnep ซึ่งในธรรมชาติ จันทน์ผาจะพบได้ตามภูเขาสูงหรือเกาะแก่งกลางทะเลที่ห่างไกลจากฝั่ง ปัจจุบันมีผู้นิยมปลูกจันทน์ผาเป็นไม้ประดับ ซึ่งเริ่มเป็นที่ต้องการของตลาด ทำให้เกิดความพยายามในการเพาะเลี้ยงจันทน์ผากันมากขึ้น สำหรับประโยชน์ของจันทน์ผานั้น มีการกล่าวอ้างว่าแก่นของจันทน์ผามีสรรพคุณบำรุงหัวใจ แก้เลือดออกตามไรฟัน ลดการอักเสบ ปวดบวม เป็นต้น สำหรับการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ต่างๆ ในจันทน์ผาพบว่า สารสกัดจากส่วนลำต้นของจันทน์ผามีฤทธิ์ลดอาการปวดและอาการไข้ในสัตว์ทดลอง (Reanmongkol *et al*., 2003) และสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดที (Jurkat cell) ได้อีกด้วย (Chirathaworn *et al*., 2005) สำหรับสารสกัดจากส่วนแก่นของลำต้นมีสารยับยั้ง ไซโคลออกซิเจนเนส-2 (cyclooxygenase-2) ซึ่งใช้บรรเทาอาการปวดและอักเสบ (Sawasdee, 2001) และยังพบฤทธิ์ Ani-HIV1 integrase activity (Bunluepuech and Tewtrakul, 2009) จากสารสกัดส่วนนี้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม จนถึงปัจจุบันรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากจันทน์ผายังมีไม่มากนัก โดยเฉพาะฤทธิ์ในการฆ่าตัวอ่อนของแมลง (larvicidal activity) ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน อีกทั้งส่วนอื่นๆ ของพืชชนิดนี้ยังไม่ถูกนำมาศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดอีกด้วย งานวิจัยนี้สนใจการเตรียมสารสกัดจากส่วนของผล เนื่องจากการศึกษาเกี่ยวกับจันทน์ผาที่ผ่านมามุ่งเน้นไปยังฤทธิ์ของสารสกัดจากส่วนลำต้น ผู้วิจัยเห็นว่าหากต้องการพบฤทธิ์ด้านอื่นจากพืชชนิดนี้ ควรเลือกส่วนที่ยังไม่มีการศึกษามาก่อน อีกทั้งผลของจันทน์ผาจะออกตามฤดูกาล สามารถเก็บเกี่ยวมาใช้เป็นวัตถุดิบในการศึกษาได้อย่างต่อเนื่อง ต่างกับการศึกษาในส่วนลำต้นที่ต้องตัดต้นจันทน์ผาเพื่อนำส่วนลำต้นมาทำการวิจัยซึ่งเป็นการสูญเสียต้นจันทน์ผาไป ซึ่งจากการทดสอบในเบื้องต้นของผู้วิจัย พบว่า สารสกัดจากผลจันทน์ผาสามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านระยะที่ 3 ได้มากกว่า 90% ที่ความเข้มข้น 1% w/v ซึ่งได้ทดสอบโดยนำผลจันทน์ผาแห้งบดละเอียด (ทั้งเนื้อและเมล็ด) 1 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าให้อากาศสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 3 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำเฉพาะส่วนสารละลายที่กรองได้ไปทดสอบกับลูกน้ำยุง ซึ่งผลจากการทดสอบนี้เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการที่จะศึกษาถึงประสิทธิภาพโดยละเอียดในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดจากผลจันทน์ผาดังกล่าว

หากผลของการศึกษานี้พบว่าสารสกัดจากผลจันทน์ผามีประสิทธิภาพที่ดีในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน จะเป็นประโยชน์อย่างมากในทางการแพทย์และการวิจัย ในแง่ของการค้นพบและพัฒนาสารออกฤทธิ์จากพืชชนิดใหม่ อีกทั้งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากจันทน์ผามีฤทธิ์ทางยา จึงอาจจะมีความปลอดภัยต่อมนุษย์มากกว่าการใช้สารเคมีเพื่อกำจัดลูกน้ำยุง งานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบด้วยน้ำ ethanol และ hexane จากส่วนเนื้อและเมล็ดของผลจันทน์ผา ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน ซึ่งหากพบว่ามีประสิทธิภาพดี อาจนำสู่การศึกษาพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ควบคุมยุงลายบ้านทดแทนการใช้สารเคมีต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อเตรียมสารสกัดหยาบด้วยน้ำ ethanol และ hexane จากส่วนเนื้อและเมล็ดของผลจันทน์ผา
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบด้วยน้ำ ethanol และ hexane จากส่วนเนื้อและเมล็ดของผลจันทน์ผา

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. การจับและการเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านให้เป็นสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ

1.1. เก็บลูกน้ำยุงลายจากแหล่งน้ำขังจากภาคสนามในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลกด้วยไปเปตพลาสติก ถ่ายใส่ลงในขวดพลาสติกใส นำลูกน้ำยุงลายที่เก็บได้มายังห้องปฏิบัติการของภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

1.2. ลูกน้ำจะถูกเลี้ยงในถาดพลาสติกสีขาวด้วยน้ำประปา โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงลูกน้ำคืออาหารสุนัขบดละเอียด เมื่อลูกน้ำเจริญเป็นตัวโม่งจะถูกถ่ายไปสู่แก้วพลาสติกบรรจุน้ำซึ่งปิดทับปากแก้วด้วยผ้าตาข่าย เมื่อตัวโม่งเจริญเป็นตัวเต็มวัย ทำการคัดเลือกเฉพาะยุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) โดยพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตามกุญแจยุงของ Rattanarithikul *et al*. (2010) เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงต่อไป

1.3. ยุงลายบ้านที่ถูกคัดเลือกจะถูกเลี้ยงในกรงเลี้ยงยุงมาตรฐานขนาด 30x30x30 เซนติเมตร เลี้ยงยุงตัวเต็มวัยด้วยสารละลายน้ำตาล 5% ผสมวิตามินรวม 5% โดยเปลี่ยนสารละลายน้ำตาลวันเว้นวัน

1.4. เมื่อยุงตัวเต็มวัยมีอายุประมาณ 3-4 วัน ให้ยุงเพศเมียกินเลือดด้วยวิธี artificial membrane feeding (Rutledge *et al*., 1964) จากนั้นเลี้ยงยุงด้วยสารละลายน้ำตาลต่อไปอีกเป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบเวลา ให้ยุงวางไข่โดยการนำถ้วยพลาสติกสีขาวบรรจุน้ำประปาประมาณครึ่งถ้วย บุขอบของถ้วยด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ใส่เข้าไปในกรงเลี้ยงยุง ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืน ซึ่งไข่ที่ได้จะเป็นยุงรุ่นลูกรุ่นที่ 1 (F_1) จากนั้นเทน้ำออกจากถ้วยพลาสติก ทิ้งถ้วยพลาสติกไว้ในกรงเลี้ยงยุงจนกระดาษกรองแห้งสนิท (ประมาณ 3วัน) นำกระดาษกรองซึ่งมีไข่ติดอยู่ไปแช่น้ำประปาซึ่งบรรจุอยู่ในถาดพลาสติก ลูกน้ำระยะที่ 1 จะออกจากไข่ แล้วจึงให้อาหารและเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการเลี้ยงยุงลายที่เก็บจากภาคสนาม

1.5. ทำการเพาะเลี้ยงตามที่ได้กล่าวข้างต้นจนได้ยุงลายรุ่นต่างๆ ต่อไป ซึ่งลูกน้ำยุงลายตั้งแต่รุ่นที่ 6 (F_6) ถือว่าเป็นสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ จะถูกนำมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ต่อไป

2. การเตรียมสารสกัดหยาบจากผลจันทน์ผา

2.1. เก็บผลจันทน์ผาจากธรรมชาติเพื่อนำมาทำการศึกษา โดยเก็บจากพื้นที่ในเขตจังหวัดพิษณุโลก

2.2. ล้างผลจันทน์ผาให้สะอาด แยกส่วนที่เป็นเนื้อ (endocarp) และส่วนเมล็ด (seed) ของผลจันทน์ผาออกจากกัน นำไปอบให้แห้งด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนกระทั่งตัวอย่างทั้งสองส่วนแห้งสนิท บดตัวอย่างเนื้อและเมล็ดของผลจันทน์ผาให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (motorized stone grinder)

2.3. ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากตัวอย่างส่วนเนื้อและส่วนเมล็ดของผลจันทน์ผาที่บดเป็นผง โดยวิธีการแช่หมักด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ ethanol และ hexane โดยนำผงตัวอย่างเนื้อและเมล็ดของผลจันทน์ผาไปแช่ในตัวทำละลายแต่ละชนิด ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) ที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยเครื่อง reciprocal shaker เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4. กรองสารสกัดที่ได้ด้วยผ้าใยแก้วเพื่อแยกกากพืชชิ้นใหญ่ออกจากสารสกัดหยาบ กรองสารสกัดหยาบอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ในชุดกรองแก้ว จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายออกโดยสารสกัดหยาบจากการสกัดด้วยน้ำ ทำการระเหยตัวทำละลายออกโดยการใช้ rotary evaporator และ

lyophilizer ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย ethanol และ hexane ทำการระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator

2.6. บรรจุสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดสีชาและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น

2.7. นำสารสกัดหยาบในข้อ 6. ไปทดสอบฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลาย ตามวิธีในข้อ 13.3

3. ศึกษาฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบจากเนื้อและเมล็ดของผลจันทน์ผา

สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ของส่วนเนื้อและเมล็ดผลจันทน์ผา จะถูกทดสอบฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านด้วยวิธีการเดียวกัน ตามวิธีการขององค์การอนามัยโลก (WHO, 2005) ดังนี้

3.1. นำสารสกัดหยาบเนื้อและเมล็ดของผลจันทน์ผาจากตัวทำละลายแต่ละชนิดมาเตรียมเป็น stock solution ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 1% ซึ่งเตรียมได้จากละลายสารสกัดหยาบ 200 มิลลิกรัมในตัวทำละลาย 20 มิลลิลิตร (ตัวทำละลายคือน้ำกลั่นสำหรับสารสกัดหยาบด้วยน้ำ และ DMSO สำหรับสารสกัดหยาบด้วย ethanol และ hexane) stock solution จะถูกเก็บรักษาใน screw-cap vial ปิดทับด้วย aluminium foil ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2. จากนั้น stock solution ของสารสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด จะถูกเตรียมเป็นความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน เช่น นำ stock solution ปริมาณ 0.2-2 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกรอง 200 มิลลิลิตร จะได้สารละลายทดสอบความเข้มข้น 10-100 ppm และหากต้องการให้มีความเข้มข้นต่ำกว่านี้ สามารถทำได้โดยการเจือจาง stock solution โดยละลาย stock solution 2 มิลลิลิตร ในตัวทำละลายที่เหมาะสม (น้ำกลั่น หรือ DMSO) 18 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเตรียมสารละลายทดสอบเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น จะได้สารละลายทดสอบความเข้มข้น 1-10 ppm เป็นต้น

3.3. ลูกน้ำยุงลายบ้านระยะที่ 3 ตอนปลาย หรือระยะที่ 4 ตอนต้น จำนวน 25 ตัว จะถูกถ่ายลงในสารละลายทดสอบ 200 มิลลิลิตร ในเบื้องต้นจะทดสอบด้วยสารละลายทดสอบที่มีช่วงความเข้มข้นต่างกันมาก เพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นของอัตราการตายของลูกน้ำเมื่อสัมผัสกับสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นจะเลือกความเข้มข้น 4 ถึง 5 ระดับ ที่ทำให้ลูกน้ำมีอัตราการตายที่ 10 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการหาค่า LC_{50} และ LC_{90}

3.4. สารละลายของสารสกัดหยาบส่วนเนื้อและเมล็ดของผลจันทน์ผาจากตัวทำละลายแต่ละชนิด จะถูกทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้นเป็นจำนวน 4 ซ้ำ เพื่อให้ได้จำนวนลูกน้ำยุงทดสอบ 100 ตัว ต่อสารสกัดหยาบแต่ละชนิด และทำการทดสอบเป็นจำนวน 3 ชุด ซึ่งจะได้จำนวนลูกน้ำยุงทดสอบ 300 ตัว ต่อสารสกัดหยาบแต่ละชนิด

3.5. สำหรับกลุ่มควบคุมจะใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายทดสอบจากสารสกัดด้วยน้ำ และใช้ DMSO 2 มิลลิลิตร ในน้ำกรอง 200 มิลลิลิตร แทนสารละลายทดสอบจากสารสกัดด้วย ethanol และ hexane ทำการทดสอบ 4 ซ้ำ เพื่อให้ได้จำนวนลูกน้ำยุงทดสอบในกลุ่มควบคุม 100 ตัว ต่อสารสกัดหยาบแต่ละชนิด

3.6. อัตราการตาย (Percentage mortality: %M) จะถูกบันทึกที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง หลังการทดสอบ หากในกลุ่มควบคุมลูกน้ำยุงลายมีอัตราการตายมากกว่า 20% การทดลองชุดนั้นจะถูกยกเลิกและต้องทำการทดลองใหม่ และถ้าลูกน้ำในกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายระหว่าง 5-20% จะต้องทำการปรับค่าอัตราการตายโดยใช้ Abbott's formula (Abbott, 1925) ซึ่งมีสูตรการคิดดังนี้

$$\%M = \frac{\%\text{ test mortality} - \%\text{ control mortality}}{100 - \%\text{control mortality}} \times 100$$

3.7. จากนั้นนำค่าอัตราการตายไปคำนวณหาค่า LC_{50} และ LC_{90} โดยวิธี Probit analysis (Finney, 1971) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Ldp Line (*http://embakr.tripod.com/ldpline*)

ผลการศึกษาวิจัย

สารสกัดหยาบจากกุหลาบพุกาม

ตัวอย่างจันทน์ผาเมื่อผ่านการอบแห้งแล้ว น้ำหนักของตัวอย่างจันทน์ผาเป็นดังนี้

ตัวอย่างผลจันทน์ผา	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	Yield (%)
เนื้อของผล	359.70	79.40	22.07
เมล็ด	393.42	192.25	48.86

เมื่อตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งและบดละเอียดไปสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด แล้วระเหยตัวทำละลายออก ได้สารสกัดหยาบในปริมาณที่ต่างกันดังนี้

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดแห้ง (กรัม)	Yield (%)
เนื้อของผล	เฮกเซน	79.40	0.34	0.43
	เอทานอล		3.76	4.74
	น้ำ		40.69	51.25
เมล็ด	เฮกเซน	192.25	10.68	5.56
	เอทานอล		4.23	2.20
	น้ำ		11.21	5.83

ฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบจากผลจันทน์ผา

ในการทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบเนื้อผลและเมล็ดจันทน์ผา จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทานอล และน้ำ พบว่า สารสกัดของเนื้อผลโดยเฮกเซนมีปริมาณน้อยมาก ไม่สามารถนำมาทดสอบฤทธิ์ได้ นอกจากนี้ สารสกัดของเมล็ดโดยเฮกเซนแม้ว่าจะมีปริมาณมาก แต่กลับมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงต่ำ โดยมีอัตราการตายน้อยกว่า 50% ที่ความเข้มข้นสูงสุด (1,000 ppm) จึงไม่สามารถคำนวณหาค่า LC_{50} ของสารสกัดจากเฮกเซนได้ ดังนั้น ผลการศึกษาจึงมีเพียงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงของสารสกัดจากผลจันทน์ผาด้วยเอทานอลและน้ำเท่านั้น

ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดผลจันทน์ผาที่เวลา 24 ชั่วโมง มีดังนี้

Crude extract (ppm)	24-hour exposure time			
		Larvicidal activity		
	% Mortality (Mean ± SE)	LC_{50} with fiducial limits (ppm)	χ^2	Slope ±SE
Endocarp ethanol				
50	29.00 ± 2.52	84.00	8.70	2.28 ± 0.22
100	64.00 ± 4.32	(71.02 - 95.85)		
150	69.00 ± 1.91			
200	72.00 ± 4.32			
250	88.00 ± 3.65			
300	93.00 ± 1.00			
Control	0			
Endocarp aqueous				
100	0	1,067.53[a]	2.55	3.11 ± 0.35
200	0	(960.52 - 1,241.93)		
300	5.00 ± 3.79			
400	10.00 ± 2.58			
500	12.00 ± 3.65			
600	24.00 ± 6.32			
700	25.00 ± 5.26			
800	38.00 ± 7.75			
900	39.00 ± 3.42			
1000	48.00 ± 5.66			
Control	0			
Seed ethanol				
100	0	921.69	12.13	3.24 ± 0.33
200	0	(848.00 - 1,029.11)		
300	6.00 ± 1.15			
400	11.00 ± 1.91			
500	27.00 ± 2.52			
600	29.00 ± 3.79			
700	35.00 ± 3.42			
800	35.00 ± 4.43			
900	42.00 ± 4.16			
1000	65.00 ± 4.12			
Control	1.00 ± 1.00			
Seed aqueous				
100	0	-[b]	-[b]	-[b]
200	0			
300	0			
400	0			
500	0			
600	0			
700	0			
800	0			
900	0			
1000	0			
Control	0			

[a]The LC_{50} is estimated by the Probit analysis of *Ldp Line* software.

[b]Nil mortality rates observed from all concentrations, and then the parameters could not be calculated.

ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดผลจันทน์ผาที่เวลา 48 ชั่วโมง มีดังนี้

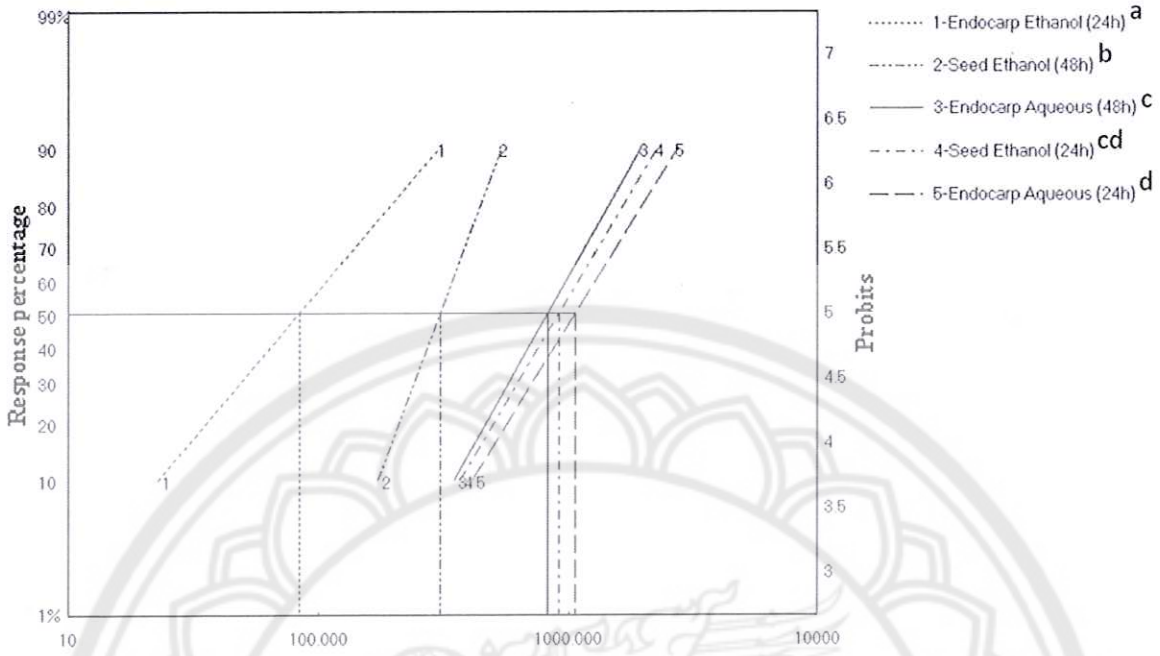
Crude extract (ppm)	48-hour exposure time			
		Larvicidal activity		
	% Mortality (Mean ± SE)	LC_{50} with fiducial limits (ppm)	χ^2	Slope ±SE
Endocarp ethanol				
50	93.00 ± 1.00	<50[a]	-[b]	-[b]
100	94.00 ± 1.15			
150	96.00 ± 1.63			
200	99.00 ± 1.00			
250	100			
300	100			
Control	0			
Endocarp aqueous				
100	0	834.37	8.46	3.42 ± 0.29
200	1.00 ± 1.00	(777.62 - 908.25)		
300	5.00 ± 3.79			
400	19.00 ± 4.12			
500	17.00 ± 5.97			
600	36.00 ± 6.93			
700	36.00 ± 8.49			
800	54.00 ± 4.76			
900	52.00 ± 7.12			
1000	58.00 ± 9.59			
Control	0			
Seed ethanol				
100	3.00 ± 1.00	307.40	9.04	5.19 ± 0.38
200	21.00 ± 4.43	(289.07 - 325.40)		
300	47.00 ± 6.61			
400	63.00 ± 5.51			
500	90.00 ± 4.76			
600	97.00 ± 1.91			
700	100			
800	100			
900	100			
1000	100			
Control	2.00 ± 1.15			
Seed aqueous				
100	0	-[c]	-[c]	-[c]
200	0			
300	0			
400	0			
500	0			
600	0			
700	0			
800	3.00 ± 1.91			
900	17.00 ± 1.91			
1000	27.00 ± 3.00			
Control	0			

[a]The mortality rates were very high, then the accurate LC_{50} could not be calculated.

[b]The mortality rates were very high, and then the parameters could not be calculated.

[c]The mortality rates were very low, and then the parameters could not be calculated.

ผลของการนำค่า LC_{50} จากสารสกัดทั้งหมดมาเปรียบเทียบกัน มีดังนี้



*Endocarp ethanol (48h) and seed aqueous (both 24h and 48h) are excluded, because of the very high and very low observed mortality rates, respectively.

**Statistically significant differences are indicated by different letters on the crude extract categories (upper right)

สรุปและอภิปรายผลการศึกษาวิจัย

ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านระยะที่ 3 ของสารสกัดหยาบเนื้อผลและเมล็ดผลจันทน์ผา พบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการทดสอบ สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของเนื้อผลจันทน์ผามีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงสูงสุด โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 84.00 ppm ในขณะที่สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของเมล็ด และสารสกัดหยาบด้วยน้ำของเนื้อผลมีค่า LC_{50} เท่ากับ 921.69 และ 1,067.53 ppm ตามลำดับ สำหรับที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการทดสอบ พบว่าสารสกัดทุกชนิดมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงสูงขึ้น โดยพบค่า LC_{50} เท่ากับ <50, 307.40 และ 834.37 ppm เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของเนื้อผล, สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของเมล็ด และสารสกัดหยาบด้วยน้ำของเนื้อผล ตามลำดับ สำหรับสารสกัดหยาบด้วยน้ำของเมล็ดจันทน์ผานั้น ไม่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงแต่อย่างใด แม้ว่าจะทิ้งให้ลูกน้ำสัมผัสกับสารสกัดจนถึงเวลา 48 ชั่วโมงแล้วก็ตาม

แม้ว่าสารสกัดหยาบด้วยน้ำของผลจันทน์ผาจะให้ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่ไม่ดีนัก แต่สารสกัดหยาบด้วยเอทานอล โดยเฉพาะจากส่วนเนื้อผลจันทน์ผามีฤทธิ์ที่ดี โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 84.00 ppm ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารสกัดพืชหลายชนิดที่ทำการศึกษาจากหลายผู้วิจัย เช่น สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากพืช *Melia azedarach*, *Sapindus rarak*, *Curcuma zedoaria* และ *Cerbera odollum* ซึ่งมีค่า LC_{50} เท่ากับ 76.69, 88.08, 93.38 และ 96.16 ppm ตามลำดับ (Promsiri *et al.*, 2006) นอกจากนี้ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่ใกล้เคียงกันยังพบในสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายชนิดอื่นเช่น สารสกัดหยาบด้วยอซีโตนของ *Pinus caribaea* และสารสกัดหยาบด้วยอีเทอร์ของ *Phyllanthus amarus* มีค่า LC_{50} เท่ากับ 92.00 และ

90.92 ppm ตามลำดับ (Rahuman *et al.*, 2008; Kanis *et al.*, 2009) จากการตรวจเอกสารที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำของพืชในแฟมิลี่ Asparagaceae พบว่า มีเพียงการศึกษาของ Govindarajan และ Sivakuma (2014) ซึ่งได้รายงานฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลจากส่วนรากของ *Asparagus racemosus* ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 97.71 ppm หลังจากทดสอบฤทธิ์ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาครั้งนี้ สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของเนื้อผลจันทน์ผามีค่า LC_{50} เท่ากับ 84.00 ppm ซึ่งจะเห็นว่าเนื้อผลจันทน์ผามีฤทธิ์ดีกว่าเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงของสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของเนื้อผลจันทน์ผามีฤทธิ์ที่สูงขึ้นเมื่อให้ลูกน้ำยุงสัมผัสกับสารสกัดนานขึ้นเป็นเวลาถึง 48 ชั่วโมง โดยมีค่า LC_{50} น้อยกว่า 50 ppm

การศึกษาในครั้งนี้ ได้แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ที่ดีในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากเนื้อผลจันทน์ผา ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาเพื่อใช้เป็นสารชนิดใหม่ในการควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้านในอนาคต อย่างไรก็ตาม การพิสูจน์ถึงสาเหตุในการตายของลูกน้ำเมื่อสัมผัสกับสารสกัดจากเนื้อผลจันทน์ผา รวมถึงการพิสูจน์ถึงความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นโดยเฉพาะมนุษย์ มีความสำคัญที่ควรทำการศึกษาโดยเร่งด่วน เพื่อใช้พิจารณาถึงความเป็นไปได้และความปลอดภัยที่จะนำสารสกัดจากจันทน์ผาไปใช้ควบคุมลูกน้ำยุงในธรรมชาติได้จริงต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์ และนพวรรณ บุญชู. การต้านทานข้ามต่อเดลต้าเมทรินในยุงลายบ้านตัวเต็มวัยจากการเหนี่ยวนำให้มีความต้านทานต่อทีมีฟอสในระยะลูกน้ำ. *วารสารสาธารณสุขล้านนา* 2554; 7(3): 240-250.

สถาบันวิจัยสมุนไพร. *สมุนไพรป้องกันกำจัดแมลงทางการแพทย์* 2548. สถาบันวิจัยวิทยาศาตร์สาธารณสุข, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข.

Abbott, WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 1925; 18: 265-267.

Andreadis TG. Microsporidian parasites of mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 2007; 7: 3-29.

Becnel JJ, White SE, Shapiro AM. Review of microsporidia-mosquito relationships: from the simple to the complex. *Folia Parasitologica* 2005; 52: 41-50.

Bunluepuech K, Tewtrakul S. Anti – HIV-1 integrase activity of Thai Medicinal plants. Songklanakarin *J Sci Technol* 2009; 31(3): 289-92.

Cavalcanti ESB, de Morais SM, Lima MAA, Santana EWP. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L.. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2004; 99(5): 541-4.

Chareonviriyaphap T, Aum-aung B, Ratanatham S. Current insecticide resistance patterns in mosquito vectors in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999; 30(1): 184-94.

Chirathaworn C, Kongcharoensuntorn W, Charadram P, Pongpanich A, Poovorawan Y. Effects of *Dracaena loureiri* Gagnep and *Myristica fragrans* Houtt extracts on proliferation of a leukemia cell line. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18-20 October 2005.

Cuda JP, Hornby JA, Cotterill B, Cattell M. Evaluation of *Lagenidium giganterm* for biocontrol of *Mansonia* mosquitoes in Florida (Diptera: Culicidae). *Bio Control* 1997; 8: 124-30.

Finney DJ. 1971. *Probit analysis*, 3rd ed. Cambridge University Press, London, pp. 68-78.

Govindarajan M, Sivakumar R. Ovicidal, larvicidal and adulticidal properties of *Asparagus racemosus* (Willd.) (Family: Asparagaceae) root extracts against filariasis (*Culex quinquefasciatus*), dengue (*Aedes aegypti*) and malaria (*Anopheles stephensi*) vector mosquitoes (Diptera: Culicidae). Parasitol Res 2014; 113: 1435-1449.

Kanis LA, Antonio RD, Antunes EP, Prophiro JS, da Silva OS. Larvicidal effect of dried leaf extracts from *Pinus caribaea* against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Rev Soc Bras Med Trop 2009; 42: 373-376.

Kar S, Aditya AK. Biological control of mosquitoes by aquatic planaria. *Tiscia* 2003; 34: 15-8.

Komalamisra N, Trongtokit Y, Rongsriyam Y, Apiwathnasorn C. Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36(6): 1412-22.

Maheswaran R, Sathish S, Ignacimuthu S. Larvicidal activity of *Leucas aspera* (Willd.) against the larvae of *Culex quinquefasciatus* Say. and *Aedes aegypti* L.. *I J Integrative Bio* 2008; 2(3): 2214-7.

Poopathi S, Abidha S. Mosquitocidal bacterial toxins (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*): Mode of action, cytopathological effects and mechanism of resistance. *J Physiol Pathophysiol* 2010; 1(3): 22-38.

Promsiri S, Naksathit A, Kruatrachue M, Thavara U. Evaluations of larvicidal activity of medicinal plant extracts to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and other effects on a non target fish. *Insect Science* 2006; 13: 179-88.

Rahuman A, Gopalakrishnan G, Venkatesan P, Geetha K. Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res 2008; 102: 867-873.

Rattanarithikul R, Harbach RE, Harrison BA, Panthusiri P, Coleman RE, Richardson JH. Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand. VI. Tribe Aedini. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2010; 41 Suppl 1: 1-225.

Reanmongkol W, Subhadhirasakul S, Bouking P. Antinociceptive and antipyretic activities of extracts and fractions from *Dracaena loureiri* in experimental animals. *Songklanakarin J Sci Technol* 2003; 25(4): 467-76.

Rodriguez MM, Bisset J, Ruiz M, Soca A. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J Med Entomol* 2002; 39(6): 882-8.

Rutledge LC, Ward RA, Gould DJ. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosq News* 1964; 24: 407-419.

Sawasdee K. Inhibitors of cyclooxygenase-2 from *Dracaena loureiri* stem. Master of Science in Pharmacy, Chulalongkorn University, 2001.

Scholte EJ, Knols BGJ, Samson RA, Takken W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *J Insect Science* 2004; 4: 1-24.

Su X, Zou F, Guo Q, Huang J, Chen T. A report on a mosquito-killing fungus, *Pythium carolinianum*. *Fungal Diversity* 2001; 7: 129-33.

Suh CP, Axtell RC. *Lagenidium giganteum* zoospores: effects of concentration, movement, light, and temperature on infection of mosquito larvae. *Bio control* 1999; 15: 33-8.

Sutthanont N, Choochote W, Tuetun B, Junkum A, Jitpakdi A, Chaithong U, et al. Chemical composition and larvicidal activity of edible plant-derived essential oils against the pyrethroid-susceptible and –resistant strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecology* 2010; 35(1): 106-15.

World Health Organization (WHO). 2005. *Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides*. World health Organization, Communicable Disease Control, Prevention and Eradication, WHO Pesticide Evaluation Scheme, Geneva, Switzerland.

งานวิจัยนี้ได้ถูกจัดเตรียมเป็น Manuscript และส่งไปตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Impact factor = 0.91, SCImago Journal Rank = Q3) ในชื่อเรื่อง "Larvicidal activity of endocarp and seed crude extracts of *Dracaena loureiri* Gagnep against *Aedes aegypti* (L.) mosquito" เมื่อวันที่ 15 มกราคม พ.ศ. 2558

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Preview

From: dalmo@rsbmt.uftm.edu.br

To: damrongpanth@nu.ac.th

CC: damrongpanth@nu.ac.th, supapornl@nu.ac.th, uratpi@nu.ac.th, nophawanb@nu.ac.th

Subject: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine - Manuscript ID RSBMT-2015-0016

Body: 15-Jan-2015

Dear Dr. Thongwat:

Your manuscript entitled "Larvicidal activity of endocarp and seed crude extracts of *Dracaena loureiri* Gagnep against *Aedes aegypti* (L.) mosquito" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.

Your manuscript ID is RSBMT-2015-0016.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at https://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to https://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo.

Thank you for submitting your manuscript to the Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.

Sincerely,
Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine Editorial Office

Date Sent: 15-Jan-2015

Close Window

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2014. All Rights Reserved.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical
Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine

Larvicidal activity of endocarp and seed crude extracts of *Dracaena loureiri* Gagnep against *Aedes aegypti* (L.) mosquito

Journal:	*Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*
Manuscript ID:	RSBMT-2015-0016
Manuscript Type:	Major Article
Keyword:	Aedes aegypti, Dracaena loureiri, larvicide, plant extract, crude extract

SCHOLARONE™
Manuscripts

Title: Larvicidal activity of endocarp and seed crude extracts of *Dracaena loureiri* Gagnep against *Aedes aegypti* (L.) mosquito

Running title: Larvicide from *D. loureiri* against *Ae. aegypti*

Structured Abstract:

Introduction: For the first time we introduced the larvicidal activity of ethanolic and aqueous extracts of a Thai folk medicine, *Dracaena loureiri*, endocarp and seed against the dengue mosquito vector, *Aedes aegypi*. **Methods:** Bioassays were performed by exposing late third- to early fourth-stage larvae of *Ae. aegypti* to various concentration of plant extracts. The larval mortality were observed after 24- and 48-hour exposure times, consequently. **Results:** The Probit analysis revealed that ethanolic endocarp extract showed the highest larvicidal property with the LC_{50} values of 84.00 and <50 ppm for 24- and 48-hour exposure time, respectively. While the others, including seed ethanolic extract and both endocarp and seed aqueous extracts, revealed the greatly lower activities. **Conclusions:** Ethanolic endocarp extract of *D. loureiri* contained a promising larvicidal potential. It could be considered as a possibly alternative source for developing a novel larvicide for a vector controlling strategy.

Aedes aegypti, *Dracaena loureiri*, larvicide, plant extract, crude extract

Introduction:

Insecticide has been used for controlling insect vectors for a long time, especially when the vector-borne disease outbreak is occurred. To control the outbreak of dengue and/or dengue hemorrhagic fevers outbreak, several insecticides are used for reducing the

number of *Aedes aegypti*, the biological vector of dengue virus. Temephos is the leading chemical insecticide applied into household water containers to control the larval stage of *Ae. aegypti*[1]. Although the highly killing efficacy against the mosquito larvae and the low toxicity to human of temephos has been reported[2], continuous uptake may be a cause of disorder in human. Moreover, inappropriate using of this insecticide can be a cause of insecticide resistance in the vector[3]. Currently, plant bio-insecticide is intensively studied worldwide, especially from the tropical countries where the high diversity of plants is found. There are many previous reports demonstrated larvicidal activity of plant extracts against *Ae. aegypti* larva.

Dracaena loureiri Gagnep, a Thai folkloric medicine called "Chan Pha", "Chan Daeng" or "Lukka Chan", belongs to the Asparagaceae botanical family. It has long been used for treatment of cough, fever and inflammation as antipyretic and analgesic activities[4]. The previous studies indicated that crude extracts of *D. loureiri* stem wood contained antinociceptive and anti-pyretic activities[5], anti-HIV-1 integrase activity[6], anti-allergic activity[7], estrogenic activity[8], anti-HIV-1 reverse transcriptase activities[9], and antimalarial (*Plasmodium falciparum*) activity[10]. Although some biological activities of *D. loureiri* were reported, the larvicidal activity against any mosquito vector has not been reported. Moreover, a fruit (endocarp and seed) of this plant has not been extracted and studied. Then, the purpose of this study was to evaluate the larvicidal activity against *Ae. aegypti* mosquito of ethanolic and aqueous extracts of *D. loureiri* endocarp and seed.

Methods:

***Dracaena loureiri* fruit extracts**

Fresh fruits of *D. loureiri* were collected from naturally growing trees in Phitsanulok Province, Thailand. The fruits were cleaned with a tap water. Then, endocarps and seeds were separated and weighed. The endocarps (359.70 g) and seeds (393.42 g) were dried in a hot air oven at 45°C until they became completely dry. After that, they were grounded to be powder by using an electric blender at 22,000 rpm. The dried powder of the endocarps (79.40 g) and seeds (192.25 g) were sequentially extracted with absolute ethanol and distilled water in a ratio of 1:10 (powder:solvent). Twenty-five grams of the powder were suspended into 250 mL of the solvent in a 500-mL Erlenmeyer flask. The flasks were continuously shaken at 180 rpm on a rotary shaker for 24 hours at room temperature. After that, the suspension was suction filtered through a Whatman No.1 filter paper via a buchner funnel. The filtrates of ethanolic extract were concentrated by using a rotary evaporator (BÜCHI Rotavapor® R-205 with BÜCHI Vac® V-500, BÜCHI, Switzerland), while the aqueous extracts were concentrated by using the same evaporation, and then dried by using a lyophilizer (Lyotrap LF/LYO/01/1, LTE SCIENTIFIC, UK). Yields for the ethanolic crude extract of the endocarps and seeds were 3.76 and 4.23 g, respectively. While, the aqueous extracts provided yields 40.69 and 11.21 g for the endocarps and seeds, respectively. All crude extracts were kept in a desiccator until requiring for a further bioassay. Some of fruits of *D. loureiri* were kept as voucher specimens and deposited at the Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Thailand.

***Aedes aegypti* mosquito colonization**

Aedes larvae were obtained from several breeding containers in Muang District, Phitsanulok Province, Thailand. The collected larvae were carefully transported to the same laboratory as mentioned above. They were reared in tap water under a laboratory condition of 25± 2°C, 70-80% relative humidity, and 10:14 (L:D) photoperiod. The larvae were fed with powdery dog biscuits. After they pupated, they were transferred into plastic cups filled with tap water and covered with a net until they turned to be adults. After that, 2 to 3-day-old adults were individually identified upon their morphology following the illustrated keys of the mosquitoes in Thailand[11]. The identified *Ae. aegypti* mosquitoes were transferred into a mosquito cage (30x30x30 cm). They were provided with 5% sugar mixed with 5% multivitamin syrup solution. After 5 day, the females were allowed to feed on a blood meal by using an artificial membrane feeding method[12]. After 3-4 days, the gravid female mosquitoes were permitted to lay eggs on a wet filter paper (Whatman No.1). Eggs were air-dried and maintained in a humidity-controlling glass jar until being required. A colony of *Ae. aegypti* was established for mass producing of larval materials for the larvicidal bioassay.

Larvicidal bioassay

Ae. aegypti larvae were tested for the larvicidal activity of the *D. loureiri* extracts by following the protocol of WHO (2005)[13]. Briefly, a stock solution of aqueous extracts (1% w/v) was prepared by weighing 200 mg of the extract and adding 20 mL of distilled water. For preparation of a stock solution of ethanolic extracts, dimethylsulphoxide (DMSO) was used as a diluent. The stock solutions were kept in a refrigerator at 4 °C. Series of concentration were prepared for the larvicidal activity testing. After that, 200 mL of various concentrations of each extract was put into a plastic bowl, and then twenty-five of the 3rd

instar larvae were transferred into the crude extract solutions. For both seed and endocarp aqueous extracts and seed ethanolic extract, the concentrations of 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, and 1,000 ppm were prepared. While, the concentrations of 50, 100, 150, 200, 250, and 300 ppm were prepared for the endocarp ethanolic extract. After 24 and 48 hours, mortality rates were determined by using a needle. The larvae were considered dead when they were unable to normally move after gentle touching. The experiments were performed in four replicates, with 100 larvae for each concentration of each crude extract. The control group was set up simultaneously with only 200 mL of distilled water for the aqueous extract testing, and 2 mL of DMSO in 198 mL distilled water for the ethanolic one.

Data analysis

The mortality data from larval bioassay was subjected to analyze using a computerized Probit analysis for the 50% lethal concentration (LC_{50}) value determination[14]. The computerized program is a commercial LdP Line® software (Cairo, EGY: Plant Protection Research Institute). The 95% Confidence Intervals (CI) of upper and lower fiducial limits (UCL and LCL) were also calculated.

Results:

The larvicidal activities with mortality rates, LC_{50} values and statistical data of ethanolic and aqueous crude extracts of *D. loureiri* fruits against the 3rd stage larvae of *Ae. aegypti* are presented in Table 1 and 2 for 24- and 48-hour exposure times, respectively. For 24-hour exposure time, the ethanolic extract of endocarp showed the highest toxicity with 84.00 ppm of LC_{50} values, while the seed ethanol and endocarp aqueous extracts showed 921.69 and 1,067.53 ppm, respectively. For 48-hour exposure time, the larval

mortality rate of the ethanolic endocarp extracts were very high with >90 % after tested with the lowest concentration (50 ppm). Then, the LC_{50} value of the ethanolic endocarp extracts could not be calculated with the *Ldp Line* software. However, it could be estimated that the LC_{50} values must be <50 ppm for this extract. Therefore, the same result was found from the 48-hour detection time with <50, 307.40 and 834.37 ppm for the endocarp ethanolic, seed ethanolic and endocarp aqueous extracts, respectively. For the seed aqueous extract, nil (24 hours) and very low (48 hours) larval mortality rates were found. Then, seed aqueous extract did not provide the *Ae. aegypti* larvicidal activity.

The LC_{50} values of the larvicide contained crude extracts (except the 48h ethanolic endocarp extract) were compared and statistically analyzed (Figure 1). It showed that, the ethanolic endocarp extract provided the highest larvicidal toxicity among the other extracts with 84.00 ppm LC_{50} value, following with the ethanolic seed extract (307.40 ppm). While, the aqueous encocarp (24 and 48 hours) and the seed ethanol (24 hours) extracts were revealed significantly lower activities. In this study, a generally finding that the improved activity with lower LC_{50} value of crude extracts was found after 48-hour detection time.

Discussion:

This study indicated the larvicidal activity of *D. loureiri* against *Ae. aegypti* mosquito. It is a new promising property of this plant. Only the medically important activities including estrogenic, antinociceptive, anti-pyretic, anti-allergic, anti-HIV 1 enzymes, and antimalarial activities[5-10] were found from the previous reports.

Although the aqueous extracts of *D. loureiri* did not show good activity, the ethanol extracts, especially for the endocarp, revealed a strong efficacy with 84.00 ppm of the LC_{50} value after 24-hour exposure time. The comparable efficacy against the same mosquito larva, *Ae. aegypti*, was also found from other studies. Ethanolic extracts of *Melia azedarach*, *Sapindus rarak*, *Curcuma zedoaria* and *Cerbera odollum* showed the larvicidal efficacy with the LC_{50} values of 76.69, 88.08, 93.38 and 96.16 ppm, respectively[15]. For the other solvents, acetone extract of *Pinus caribaea* and petroleum ether extract of *Phyllanthus amarus* showed the LC_{50} values against the *Ae. aegypti* larvae with 92.00 and 90.92 ppm, respectively[16-17].

For the literature of Asparagaceae extracts, insecticidal activity from this plant family has just recently been reported form the study of Govindarajan and Sivakuma (2014)[18]. The ovicidal, larvicidal and adulticidal properties against *Ae. aegypti*, *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles stephensi* were reported from root extracts of *Asparagus racemosus* (Willd.). The methanol extract of *A. racemosus* root revealed an effective larvicidal activity against *Ae. aegypti* with the LC_{50} value of 97.71 ppm after 24-hour exposure time. Compare to the ethanolic extract of *D. loureiri* endocarp, the stronger efficiency with 84.00 ppm LC_{50} value was found at the same exposure time. Moreover, the higher activity was found (<50 ppm) after leaving the mosquito larvae with the extract solution for 48 hours. The similar finding for the better larvicidal activity of 48-hour exposure time was generally reported. The 48-hour larvicidal activity of *Pueraria mirifica*, *Butea superba* and *Thevetia peruviana* extract was higher than the 24-hour with the LC_{50} values of 317.63, 496.23 and 31.98 ppm (48 hours) to 889.33, 1,156.68 and 346.42 ppm

(24 hours), respectively[19]. Crude extract of *Cnidoscolus phyllacanthus* provided 0.246 µg/mL of LC_{50} value for the 48-hour exposing time, compared to the 24-hour with 1.103 µg/mL[20]. Recently, the similar finding with 1,094.84 ppm (48 hours) and 416.50 ppm (24 hours) of the LC_{50} values was also reported from *Pereskia bleo* fruit endocarp crude extract[21].

Because of the limit literatures of *D. loureiri* activity against any arthropods, the action causing larval death could not be acknowledged estimated. However, a sodium chloride extract of *D. loureiri* was tested for a colchicine-like property to *Ae. aegypti* adult mosquito[22]. Although *D. loureiri* did not reveal the promising result when compare to *Gloriosa superba* extract that showed the best colchicine-like activity, 3.5 and 11.44 average number chromosomes per positive mosquito were found for female and male mosquitoes, respectively. Colchicine, a secondary metabolite of *Colchicum autumnale*, has widely been used for metaphase karyotype preparation in the study of cellular genetics. Colchicine effectively inhibits the cell division via disruptive action on the microtubule polymerization causing the mitosis discontinue[23]. For mosquito, colchicine cause the same effect against both adult and larval stages, then colchicine-like substance might cause the larval death from the previous action. Recently, acetone extract of *Gl. superba* was found to kill *Ae. aegypti* larvae with the LC_{50} values of 34.62 and 40.47 ppm against 3rd and 4th instar, respectively[24]. Then, we expected that the larvicide activity of *D. loureiri* might come from the action, the colchicine-like property, as the *Gl. superba* did. However, the factual action of *D. loureiri* extract against the mosquito larva should be further investigated.

21 ส.ค. 2558
1 6820992 ธ QK 861 ด4935 2558
9
สำนักหอสมุด

We have documented the promising larvicidal potential of ethanolic crude extract from *D. loureiri* fruit endocarp. It could be considered as a potentially alternative source for developing a novel larvicide to be used in the mosquito vector controlling strategy. Furthermore, Govindarajan and Sivakumar (2014)[18] indicated the larvicidal along with an ovicial and adulticidal form the member of Asparagaceae family, *A. racemosus*. Then, the same activities that found from *A. racemosus* might be discovered from the *D. loureiri* extracts of this study, then the ovicidal and adulticidal activities should be evaluated further.

Acknowledgement: We are grateful to the Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University for the supporting to progress this study.

Conflict of Interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Financial Support: Naresuan University Research Fund (Reference Number: R2557B001)

References:

1. Chareonviriyaphap T, Aum-aung B, Ratanatham S. Current insecticide resistance patterns in mosquito vectors in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1999; 30: 184-94.
2. Rozendaal JA. Vector control: Methods for use by individuals and communities. Geneva: World Health Organization; 1997: 132-3.
3. Sornpeng W, Pimsamarn S, Akksilp S. Resistance to temephos of *Aedes aegypti* Linnaeus larvae (Diptera: Culicidae). J Health Sci 2009; 18: 650-4.

4. Meksuriyen D, Cordell GA, Ruangrungsi N, Tantivatana P. Traditional medicinal plants of Thailand, IX. 10-hydroxy-11-methoxydracaenone and 7,10-dihydroxy-11-methoxydracaenone from *Dracaena loureiri*. J Nat Prod 1987; 50: 1118-1125.
5. Reanmongkol W, Subhadhirasakul S, Bouking P. Antinociceptive and antipyretic activities of extracts and fractions from *Dracaena loureiri* in experimental animals. Songklanakarin J Sci Technol 2003; 25: 467-476.
6. Bunluepuech K, Tewtrakul S. Anti-HIV-1 integrase activity of Thai medicinal plants. Songklanakarin J Sci Technol 2009; 31: 289-292.
7. Makchuchit S, Itharat A, Tewtrakul S. Anti-allergic activity of Thai medicinal plants. Planta Med 2009; 75: PD48. *DOI: 10.1055/s-0029-1234527*
8. El-Halawany AM, El Dine RS, Chung MH, Nishihara T, Hattori M. Screening for estrogenic and antiestrogenic activities of plants growing in Egypt and Thailand. Pharmacognosy Res 2011; 3: 107-113.
9. Silprasit K, Seetaha S, Pongsanarakul P, Hannongbua S, Choowongkomon K. Anti-HIV-1 reverse transcriptase activities of hexane extracts from some Asian medicinal plants. J Med Plant Res 2011; 5: 4899-4906.
10. Thiengsusuk A, Chaijaroenkul W, Na-Bangchang K. Antimalarial activities of medicinal plants and herbal formulations used in Thai traditional medicine. Parasitol Res 2013; 112: 1475-1481.
11. Rattanarithikul R, Harbach RE, Harrison BA, Panthusiri P, Coleman RE, Richardson JH. Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand. VI. Tribe Aedini. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2010; 41: 1-225.

12. Rutledge LC, Ward RA, Gould DJ. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. Mosq News 1964; 24: 407-419.

13. World Health Organization (WHO). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Geneva: *WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13*, 2005.

14. Finney DJ. Probit analysis, 3rd ed. Cambridge, GBR: Cambridge University Press; 1971. 333 p.

15. Promsiri S, Naksathit A, Kruatrachue M, Thavara U. Evaluations of larvicidal activity of medicinal plant extracts to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and other effects on a non target fish. Insect Sci 2006; 13: 179-88.

16. Kanis LA, Antonio RD, Antunes EP, Prophiro JS, da Silva OS. Larvicidal effect of dried leaf extracts from *Pinus caribaea* against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Rev Soc Bras Med Trop 2009; 42: 373-376.

17. Rahuman A, Gopalakrishnan G, Venkatesan P, Geetha K. Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res 2008; 102: 867-873.

18. Govindarajan M, Sivakumar R. Ovicidal, larvicidal and adulticidal properties of *Asparagus racemosus* (Willd.) (Family: Asparagaceae) root extracts against filariasis (*Culex quinquefasciatus*), dengue (*Aedes aegypti*) and malaria (*Anopheles stephensi*) vector mosquitoes (Diptera: Culicidae). Parasitol Res 2014; 113: 1435-1449.

19. Lapcharoen P, Apiwathnasorn C, Komalamisra N, Dekumyoy P, Palakul K, Rongsriyam Y. Three indigenous Thai medicinal plants for control of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2005; 36: 167-75.

20. Candido LP, Cavalcanti MT, Beserra EB. Bioactivity of plant extracts on the larval and pupal stages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidea). Rev Soc Bras Med Trop 2013; 46: 420-425.

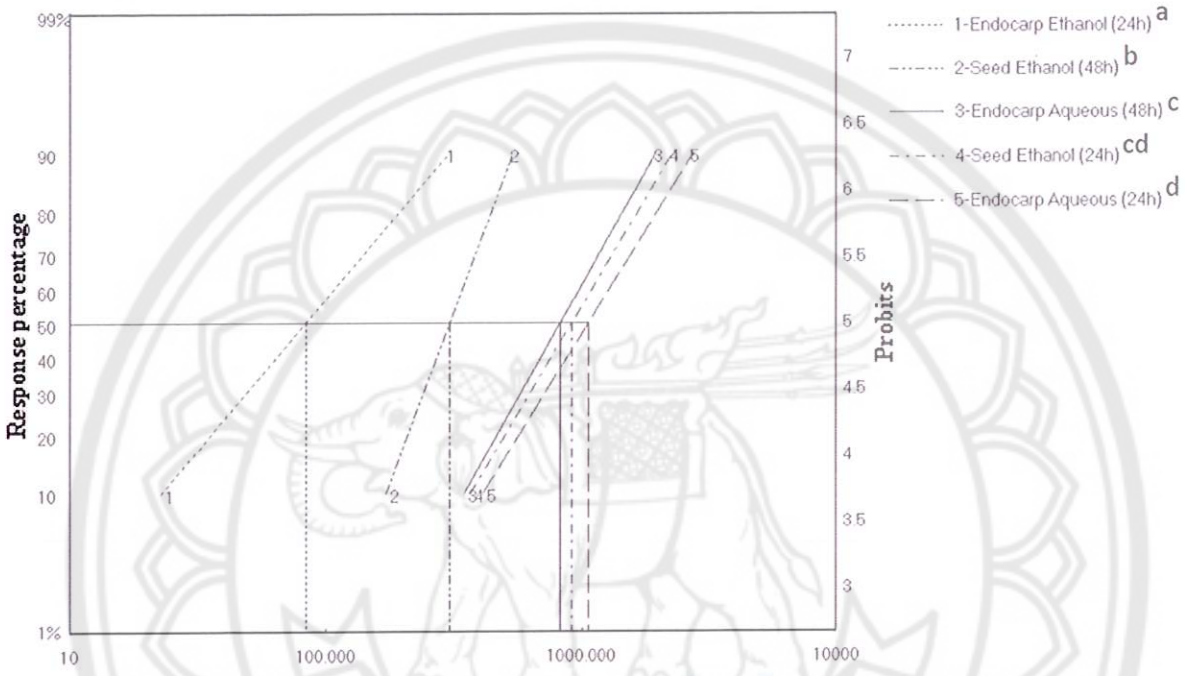
21. Thongwat D, Ganranoo L, Chokchaisiri R. Larvicidal activity of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) fruit endocarp crude and fractionated extracts against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Southeast Asian J Trop Med Public Health 2014; 45: 1292-1300.

22. Jitpakdi A, Choochote W, Insun D, Tippawakgkosol P, Keha P, Pitasawat B. Screening of ten plant species for metaphase chromosome preparation in adult mosquitoes (Diptera: Culicidae) using and inoculation technique. J Med Entomol 36; 892-895.

23. Haraguchi T, Kaneda T, Hiroaka Y. Dynamics of chromosomes and microtubules visualized by multiple-wavelength fluorescence imaging in living mammalian cells: effects of mitotic inhibitors on cell cycle progression. Genes Cells 1997; 2: 369-380.

24. Hima CR, Manimegalai M. Studies on larvicidal activity of *Gloriosa superba* on the developmental stages of the chickungunya mosquito, *Aedes aegypti*. Int J Curr Res 2014; 6: 6687-6690.

FIGURE 1 - Graph showing the LC_{50} values of crude ethanolic and aqueous *D. loureiri* extracts against the 3rd stage *Ae. aegypti* larvae at 24- and 48-hour exposure times.



*Endocarp ethanol (48h) and seed aqueous (both 24h and 48h) are excluded, because of the very high and very low observed mortality rates, respectively.

**Statistically significant differences are indicated by different letters on the crude extract categories (upper right)

Table 1. Larvicidal activities of crude ethanolic and aqueous *D. loureiri* extracts against the 3rd stage *Ae. aegypti* larvae at 24-hour exposure time.

Crude extract (ppm)	24-hour exposure time			
		Larvicidal activity		
	% Mortality (Mean ± SE)	LC_{50} with fiducial limits (ppm)	χ^2	Slope ±SE
Endocarp ethanol				
50	29.00 ± 2.52	84.00	8.70	2.28 ± 0.22
100	64.00 ± 4.32	(71.02 - 95.85)		
150	69.00 ± 1.91			
200	72.00 ± 4.32			
250	88.00 ± 3.65			
300	93.00 ± 1.00			
Control	0			
Endocarp aqueous				
100	0	1,067.53[a]	2.55	3.11 ± 0.35
200	0	(960.52 - 1,241.93)		
300	5.00 ± 3.79			
400	10.00 ± 2.58			
500	12.00 ± 3.65			
600	24.00 ± 6.32			
700	25.00 ± 5.26			
800	38.00 ± 7.75			
900	39.00 ± 3.42			
1000	48.00 ± 5.66			
Control	0			
Seed ethanol				
100	0	921.69	12.13	3.24 ± 0.33
200	0	(848.00 - 1,029.11)		
300	6.00 ± 1.15			
400	11.00 ± 1.91			
500	27.00 ± 2.52			
600	29.00 ± 3.79			
700	35.00 ± 3.42			
800	35.00 ± 4.43			
900	42.00 ± 4.16			
1000	65.00 ± 4.12			
Control	1.00 ± 1.00			
Seed aqueous				
100	0	-[b]	-[b]	-[b]
200	0			
300	0			
400	0			
500	0			
600	0			
700	0			
800	0			
900	0			
1000	0			

Control	0					

LC_{50}: lethal concentration that causes 50% of mortality, SE: standard error, χ^2: chi-square, ppm: parts per million

[a]The LC_{50} is estimated by the Probit analysis of *Ldp Line* software.

[b]Nil mortality rates observed from all concentrations, and then the parameters could not be calculated.

302

303

304 Table 2. Larvicidal activities of crude ethanolic and aqueous *D. loureiri* extracts against the

305 3rd stage *Ae. aegypti* larvae at 48-hour exposure time.

Crude extract (ppm)	48-hour exposure time			
		Larvicidal activity		
	% Mortality (Mean ± SE)	LC_{50} with fiducial limits (ppm)	χ^2	Slope ±SE
Endocarp ethanol				
50	93.00 ± 1.00	<50[a]	-[b]	-[b]
100	94.00 ± 1.15			
150	96.00 ± 1.63			
200	99.00 ± 1.00			
250	100			
300	100			
Control	0			
Endocarp aqueous				
100	0	834.37	8.46	3.42 ± 0.29
200	1.00 ± 1.00	(777.62 - 908.25)		
300	5.00 ± 3.79			
400	19.00 ± 4.12			
500	17.00 ± 5.97			
600	36.00 ± 6.93			
700	36.00 ± 8.49			
800	54.00 ± 4.76			
900	52.00 ± 7.12			
1000	58.00 ± 9.59			
Control	0			
Seed ethanol				
100	3.00 ± 1.00	307.40	9.04	5.19 ± 0.38
200	21.00 ± 4.43	(289.07 - 325.40)		
300	47.00 ± 6.61			
400	63.00 ± 5.51			
500	90.00 ± 4.76			
600	97.00 ± 1.91			
700	100			
800	100			
900	100			
1000	100			
Control	2.00 ± 1.15			
Seed aqueous				
100	0	-[c]	-[c]	-[c]
200	0			
300	0			
400	0			
500	0			
600	0			
700	0			
800	3.00 ± 1.91			
900	17.00 ± 1.91			

1000	27.00 ± 3.00
Control	0

LC_{50}: lethal concentration that causes 50% of mortality, SE: standard error, χ^2: chi-square, ppm: parts per million

[a]The mortality rates were very high, then the accurate LC_{50} could not be calculated.

[b]The mortality rates were very high, and then the parameters could not be calculated.

[c]The mortality rates were very low, and then the parameters could not be calculated.

เลขทะเบียน 25

หนังสือยินยอมการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการบนเว็บไซต์ ฐานข้อมูล NU Digital Repository (http://obj.lib.nu.ac.th/media/) สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตามที่ข้าพเจ้า ผศ.ดร.ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์ (ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์) ได้ส่งผลงานทางวิชาการการรายงานการวิจัย (เรื่อง) รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน (Aedes aegypti) ของสารสกัดหยาบผลจันทน์ผา (Dracaena loureiri)

ปีที่พิมพ์ 2558

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานทางวิชาการเป็นลิขสิทธิ์ของข้าพเจ้า ผศ.ดร.ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์ (ผู้วิจัยร่วม) ผศ.ดร.นพวรรณ บุญชู เป็นเจ้าของลิขสิทธิ์ร่วม และเพื่อให้ผลงานทางวิชาการของข้าพเจ้าเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและสาธารณชน จึงอนุญาตให้เผยแพร่ผลงาน ดังนี้

- [x] อนุญาตให้เผยแพร่
- [ ] ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ เนื่องจาก.....

.....

.....

ลงชื่อ .....

(ผศ.ดร.ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์)

วันที่ 12 พ.ย. 58

หมายเหตุ ลิขสิทธิ์ใดๆ ที่ปรากฏอยู่ในผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของเจ้าของผลงาน ไม่ใช่ของสำนักหอสมุด