อภิบันทนเกรรา

สัญญาเลขที่ R2560B057

สำนักหอสมุด

รายงายวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) ยุงก้นปล่อง (*Anopheles minimus*) และยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) ของส่วนสกัดย่อยเนื้อผลจันทน์ผา (*Dracaena loureiri*)

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. รศ.ดร.ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์	มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. ดร.รักสกุล แก่นเรณู	มหาวิทยาลัยพะเยา
3. ผศ.ดร.รัชนาพร โชคชัยสิริ	มหาวิทยาลัยพะเยา
4. ผศ.ดร.นพวรรณ บุญชู	มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 1 ส.ค. 2562
เลขทะเบียน 1020002
เลขเรียกหนังสือ ว QK 661 ด๔๑๙ ๒๕๖๐

สนับสนุนโดย
งบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีงบประมาณ 2560

รายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) ยุงก้นปล่อง (*Anopheles minimus*) และยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) ของส่วนสกัดย่อยเนื้อผลจันทน์ผา (*Dracaena loureiri*)

(ภาษาอังกฤษ) Larvicidal activity of *Dracaena loureiri* fruit endocarp fractionated extracts against *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Anopheles minimus* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes

ชื่อผู้รับทุนวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์

บทคัดย่อ

สารสกัดจากพืชกำลังได้รับความสนใจเพื่อนำมาทดแทนการใช้สารเคมีในการกำจัดแมลงพาหะนำโรค เนื่องจากสารจากพืชนั้นมีความหลากหลายสูงและมีความปลอดภัยต่อมนุษย์ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) ยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) และยุงก้นปล่อง (*Anopheles minimus*) ของสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยของเนื้อผลจันทน์ผา (*Dracaena loureiri*) โดยใช้วิธีการทดสอบตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโรค (World Health Organization: WHO) โดยลูกน้ำระยะที่ 3 ของยุงแต่ละชนิดจะถูกทดสอบกับสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นอัตราการตายจะถูกบันทึกที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการทดสอบ และนำไปวิเคราะห์หาค่า LC_{50} ด้วยโปรแกรม probit analysis จากการศึกษาพบว่า ลูกน้ำยุงก้นปล่องมีอัตราการตายสูงกว่ายุงชนิดอื่นเมื่อทดสอบกับสารสกัดหยาบเนื้อผลจันทน์ผา โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 77.88 ppm ในขณะที่ยุงลายบ้าน ยุงลายสวน และยุงรำคาญ ให้ค่า LC_{50} เท่ากับ 224.73, 261.75 และ 282.86 ppm ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับผลของการศึกษาส่วนสกัดย่อยพบว่า ส่วนสกัดย่อยกลุ่ม RC-DT 012 และ RC-DT 013 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง โดยมีฤทธิ์สูงสุดต่อลูกน้ำยุงรำคาญ โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.66 และ 0.94 ppm เมื่อทดสอบกับ RC-DT 012 และ RC-DT 013 ตามลำดับ โดยสรุปแล้วพบว่า ส่วนสกัดย่อยของเนื้อผลจันทน์ผามีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงทุกชนิดได้ดีกว่าสารสกัดหยาบ อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ได้มาซึ่งสารออกฤทธิ์สูงสุดในการฆ่าลูกน้ำยุง การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคัดแยกสารออกฤทธิ์บริสุทธิ์ของส่วนสกัดย่อย RC-DT 012 และ RC-DT 013 นั้นมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไป เพื่อประโยชน์ในการนำมาใช้ควบคุมลูกน้ำยุงได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดได้ในอนาคต

Abstract

Bio-substance from plant has been focused to replacement of the insecticide usage. Because of their species abundance and human safety, plant extracts have been the challenging subject for the vector controlling situation. Then the aim of this study was to evaluate the larvicidal efficacies of the crude and fractionated extracts of the endocarp of *Dracaena loureiri* against the *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles minimus* mosquitos. The protocol of larvicidal activity testing were followed the

WHO standard protocol. Third-stage larvae of each mosquito species were exposed to various concentration of the *D. loureiri* crude and fractionated extracts. The mortality rates were observed after 24- and 48-h exposure times. After that, larval mortality data of the bioassays were analyzed using a computerized probit analysis for LC_{50} value determination. It was found that, highest susceptibility to the crude extract was found from *An. minimus* larvae with the LC_{50} value of 77.88 ppm, while the others, *Ae. aegypti* (224.73 ppm), *Ae. albopictus* (261.75 ppm) and *Cx. quinquefasciatus* (282.86 ppm) were significantly lower susceptible. The most effective fractionated groups were RC-DT 012 and RC-DT 013. The most susceptible mosquito to the fractionated groups was *Cx. quinquefasciatus* with the LC_{50} value of 0.66 and 0.94 ppm after 24 hours exposure, for the RC-DT 012 and RC-DT 013, respectively. In conclusions, the fractionated extracts provided more effective as larvicide than the crude extract against all tested mosquito species. For getting a most effective alternative larvicide, a chemical composition analysis and a purification for a pure substance of the fractions need to be done in further.

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

1. ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) ยุงก้นปล่อง (*Anopheles minimus*) และยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) ของส่วนสกัดย่อยเนื้อผลจันทน์ผา (*Dracaena loureiri*)

(ภาษาอังกฤษ) Larvicidal activity of *Dracaena loureiri* fruit endocarp fractionated extracts against *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Anopheles minimus* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด หมายเลขโทรศัพท์

รองศาสตราจารย์ ดร.ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์
ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร โทรศัพท์ 055964676

3. สาขาที่ทำการวิจัย กีฏวิทยาทางการแพทย์ (การควบคุมพาหะนำโรคด้วยวิธีทางชีวภาพ)

4. งบประมาณทั้งโครงการ 291,000 บาท

5. ระยะเวลาดำเนินการ 12 เดือน

6. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

การใช้สารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง แทนการใช้เคมีฆ่าแมลงนั้น มีการศึกษาและพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อสัตว์ชนิดอื่นรวมทั้งมนุษย์มากกว่าการควบคุมด้วยการใช้สารเคมีฆ่าแมลง ในปัจจุบันสารเคมีที่นิยมใช้ควบคุมลูกน้ำยุงมากที่สุดคือทีมีฟอส ในรูปของสารเคลือบเม็ดทราย (ทรายอะเบท) ซึ่งแม้ว่ามีการรับรองความปลอดภัยของทรายอะเบทในการใช้ควบคุมลูกน้ำยุงในภาชนะกักเก็บน้ำต่าง ๆ รวมทั้งน้ำดื่มก็ตาม แต่หากใช้ในปริมาณที่มากอย่างต่อเนื่อง อาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค และมีการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมได้ อีกทั้งในปัจจุบัน มีรายงานการเพิ่มขึ้นของลูกน้ำยุงที่มีความต้านทานต่อทีมีฟอสอีกด้วย การใช้สารฆ่าแมลงชีวภาพ (bio-insecticide) จึงเป็นทางเลือกที่ใช้หลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว งานวิจัยจำนวนมากรายงานถึงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงของสารสกัดจากพืชหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่แล้วเป็นพืชสมุนไพร อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากพืชมักมีฤทธิ์น้อยกว่าสารเคมี อีกทั้งยังมีปัจจัยเกี่ยวกับการจัดหาพืชชนิดนั้น ๆ เพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารสกัดอีกด้วย ดังนั้น การศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสารสกัดจากพืชชนิดใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์สูงในการฆ่าลูกน้ำยุง และเป็นพืชที่หาหรือเพาะปลูกได้ง่าย จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งเพื่อที่จะผลิตและนำสารฆ่าแมลงชีวภาพมาใช้ในทางปฏิบัติ ซึ่งจันทน์ผาเป็นพืชชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไป มีการปลูกไว้เพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ เช่น เพื่อความสวยงาม หรือเพื่อแสดงขอบเขตของพื้นที่ เป็นต้น ดังนั้น จันทน์ผาจึงเป็นพืชที่เพาะปลูกได้ง่ายชนิดหนึ่ง

จากการศึกษาที่ผ่านมาของผู้วิจัย โดยเงินงบประมาณแผ่นดินปี 2557 (รหัสโครงการ R2557B001) ซึ่งได้ทำการวิจัยสำเร็จลุล่วงและปิดโครงการไปแล้วนั้น พบว่า สารสกัดหยาบจากเอทานอลเนื้อผลจันทน์ผา มีฤทธิ์ที่ดีในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน ซึ่งผลการศึกษาอยู่ระหว่างการดำเนินการเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ดังนั้น การวิจัยต่อยอดโดยการแยกส่วนสกัดย่อยจากสารสกัดหยาบจากเนื้อผลจันทน์ผา เพื่อหวังให้ได้ส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่สูงขึ้น อันจะนำสู่การพัฒนาต่อยอดสู่การผลิตสารฆ่าลูกน้ำยุงจากพืชชนิดนี้ ทั้งนี้ งานวิจัยต่อยอดในครั้งนี้ จะขยายการทดสอบฤทธิ์ของส่วนสกัดย่อยไปสู่ลูกน้ำยุงชนิดอื่น นอกจากยุงลายบ้าน คือ ยุงลายสวน ยุงก้นปล่อง และยุงรำคาญ เพื่อประเมินว่า ส่วนสกัดย่อยของเนื้อผลจันทน์ผา จะมีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงชนิดใดได้สูงสุด ผลการวิจัยที่ได้จะในไปใช้เพื่อประเมินและวางแผนสู่การพัฒนาส่วนสกัดย่อยของเนื้อผลจันทน์ผาให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุงที่มีแนวทางที่ชัดเจน

7. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

7.1 เตรียมส่วนสกัดย่อยจากสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของเนื้อผลจันทน์ผา

7.2 ทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน ยุงลายสวน ยุงก้นปล่อง และยุงรำคาญ ของส่วนสกัดย่อยของเนื้อผลจันทน์ผา

8. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

8.1 สารสกัดเนื้อผลจันทน์ผา

เก็บผลจันทน์ผาจากพื้นที่ในเขตจังหวัดพิษณุโลกมาล้างให้สะอาด แยกส่วนที่เป็นเนื้อ (endocarp) และส่วนเมล็ด (seed) ของผลจันทน์ผาออกจากกัน นำเฉพาะส่วนเนื้อไปอบให้แห้งด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นบดตัวอย่างเนื้อผลจันทน์ผาให้ละเอียดด้วยเครื่องบด ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากตัวอย่างส่วนเนื้อผลจันทน์ผาที่บดเป็นผง โดยวิธีการแช่หมักด้วยเอทานอล ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) ที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยเครื่อง reciprocal shaker เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองสารสกัดที่ได้ด้วยผ้าใยแก้วเพื่อแยกกากพืชชิ้นใหญ่ออกจากสารสกัดหยาบ กรองสารสกัดหยาบอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ในชุดกรองแก้ว ทำการระเหยตัวทำละลายออก โดยใช้ rotary evaporator บรรจุสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดสีชาและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นและเตรียมส่วนสกัดย่อยด้วยวิธี Quick Column Chromatography โดยแยกด้วย gradient solvent system จากนั้น eluted substances ถูกวิเคราะห์ด้วย Thin layer Chromotography กลุ่มของส่วนสกัดย่อยที่ได้ ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนสกัดย่อยแต่ละกลุ่มไปทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงเช่นเดียวกับที่ทดสอบกับสารสกัดหยาบ

8.2 ยุงที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

การเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการ

ลูกน้ำยุงลายบ้านสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการจะถูกเลี้ยงในถาดพลาสติกสีขาวด้วยน้ำประปา โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงลูกน้ำคืออาหารสุนัขบดละเอียด เมื่อลูกน้ำเจริญเป็นตัวโม่งจะถูกถ่ายไปสู่แก้วพลาสติกบรรจุน้ำซึ่งปิดทับปากแก้วด้วยผ้าตาข่าย เมื่อตัวโม่งเจริญเป็นตัวเต็มวัย จะถูกถ่ายสู่กรงเลี้ยงยุงมาตรฐานขนาดเลี้ยงยุงตัวเต็มวัยด้วยสารละลายน้ำตาล 5% ผสมวิตามินรวม 5% เมื่อยุงตัวเต็มวัยมีอายุประมาณ 3-4 วัน ให้ยุงเพศเมียกินเลือดด้วยวิธี artificial membrane feeding เมื่อยุงพร้อมจะวางไข่ ให้วางไข่โดยการนำถ้วยพลาสติกสีขาวบรรจุน้ำประปาประมาณครึ่งถ้วย บุขอบของถ้วยด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ใส่

เข้าไปในกรงเลี้ยงยุง ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืน ยุงเพศเมียจะวางไข่ที่กระดาษกรอง จากนั้นเทน้ำออกจากถ้วยพลาสติก ทิ้งถ้วยพลาสติกไว้ในกรงเลี้ยงยุงจนกระดาษกรองแห้งสนิท (ประมาณ 3วัน) นำกระดาษกรองซึ่งมีไข่ติดอยู่ไปแช่น้ำประปาซึ่งบรรจุอยู่ในถาดพลาสติก ลูกน้ำระยะที่ 1 จะออกจากไข่ แล้วจึงให้อาหารและเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น

การเพาะเลี้ยงยุงลายสวนในห้องปฏิบัติการ

ยุงลายสวนจะถูกจับจากภาคสนาม ซึ่งจะถูกวินิจฉัยว่าเป็นยุงลายสวนโดยอาศัยกุญแจยุงของประเทศไทย "Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand VI. Tribe Aedini" จากนั้นเพาะเลี้ยงโดยใช้วิธีการเดียวกับการเพาะเลี้ยงยุงลายบ้าน

การเพาะเลี้ยงยุงก้นปล่องและยุงรำคาญในห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากยุงก้นปล่องและยุงรำคาญเป็นยุงที่เพาะเลี้ยงได้ค่อนข้างยากในห้องปฏิบัติการ ดังนั้น การนำสารสกัดไปทดสอบกับยุงทั้ง 2 ชนิด ยังห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อม และมีการเพาะเลี้ยงยุงทั้ง 2 ชนิดนี้อยู่เป็นประจำ จะมีความสะดวกและประหยัดงบประมาณเพื่อจัดเตรียมอุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงยุงทั้ง 2 ชนิดนี้ มากกว่า ซึ่งได้แก่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

8.3 การศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำของสารสกัด

ส่วนสกัดย่อยทั้งหมดที่ได้จากการสกัดสารสกัดหยาบ จะถูกทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงตามวิธีการขององค์การอนามัยโลก โดยนำส่วนสกัดย่อยแต่ละ fraction มาเตรียมเป็นstock solution ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 1% จากนั้น stock solution ของส่วนสกัดย่อยแต่ละ fraction จะถูกเตรียมเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นถ่ายลูกน้ำยุงแต่ละชนิดในระยะที่ 3 ตอนปลาย หรือระยะที่ 4 ตอนต้น จำนวน 25 ตัว ลงในสารละลายทดสอบ 200 มิลลิลิตร ในเบื้องต้นจะทดสอบด้วยสารละลายทดสอบที่มีช่วงความเข้มข้นต่างกันมาก เพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นของอัตราการตายของลูกน้ำเมื่อสัมผัสกับสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นจะเลือกความเข้มข้น 4 ถึง 5 ระดับ ที่ทำให้ลูกน้ำมีอัตราการตายที่ 10 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการหาค่า LC_{50} สารละลายของส่วนสกัดย่อยแต่ละ fraction จะถูกทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น 4 ซ้ำ เพื่อให้ได้จำนวนลูกน้ำยุงทดสอบ 100 ตัว ต่อส่วนสกัดย่อยแต่ละความเข้มข้น โดยกลุ่มควบคุมจะใช้ DMSO 2 มิลลิลิตร ในน้ำกรอง 200 มิลลิลิตร แทนสารละลายทดสอบ ทำการทดสอบ 4 ซ้ำ เพื่อให้ได้จำนวนลูกน้ำยุงทดสอบในกลุ่มควบคุม 100 ตัว จากนั้น บันทึกอัตราการตายที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง หลังการทดสอบ หากในกลุ่มควบคุมลูกน้ำยุงลายมีอัตราการตายมากกว่า 20% การทดลองชุดนั้นจะถูกยกเลิกและต้องทำการทดลองใหม่ และถ้าลูกน้ำในกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายระหว่าง 5-20% จะต้องทำการปรับค่าอัตราการตายโดยใช้ Abbott's formula นำค่าอัตราการตายไปคำนวณหาค่า LC_{50} โดยวิธี Probit analysis ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Ldp Line

9. ผลการวิจัย

ตัวอย่างเนื้อผลจันทน์ผา 1,737.40 กรัม เมื่ออบแห้งแล้วมีน้ำหนัก 441.5 กรัม และเมื่อสกัดด้วยเอทานอล ได้สารสกัดหยาบทั้งสิ้น 19.80 กรัม หลังจากแยกองค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเนื้อผลจันทน์ผาโดยวิธี Quick Column Chromatography และ Thin Layer Chromatography พบว่าสารสกัดหยาบสามารถแยกสารสกัดส่วนย่อย (fraction) ออกมาได้ 188 ส่วน ซึ่งสามารถจัดได้เป็น 6 กลุ่ม คือ RC-DT 009 (1.23 กรัม), RC-DT 010 (0.60 กรัม), RC-DT 011 (0.76 กรัม), RC-DT 012 (0.70 กรัม), RC-DT 013 (3.08 กรัม) และ RC-DT 014 (1.31 กรัม)

จากการศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน ยุงลายสวน ยุงรำคาญ และยุงก้นปล่องของสารสกัดผลจันทน์ผาพบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง ลูกน้ำยุงก้นปล่อง *An. minimus* มีความไวต่อสารสกัดหยาบมากที่สุด มีค่า LC_{50} เท่ากับ 77.88 ppm โดยลูกน้ำยุงลายบ้าน *Ae. aegypti* (224.73 ppm) ยุงลายสวน *Ae. albopicutus* (261.75 ppm) และยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* (282.86 ppm) มีความต้านทานที่สูงกว่า สำหรับส่วนสกัดย่อย พบว่าเฉพาะ RC-DT 012 และ RC-DT 013 เท่านั้น ที่มีฤทธิ์ โดยสามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้มากกว่า 90% ที่ความเข้มข้น 110 ppm ส่วนสกัดย่อยทั้งสองจึงถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงชนิดอื่น โดยพบว่า ส่วนสกัดย่อยทั้งสองมีฤทธิ์ที่ดีมากต่อลูกน้ำยุงรำคาญ โดยมีค่า LC_{50} ของส่วนสกัดย่อย RC-DT 012 เท่ากับ 0.66 ppm และส่วนสกัดย่อย RC-DT 013 เท่ากับ 0.94 ppm ในขณะที่ลูกน้ำยุงชนิดอื่นมีอัตราการตายที่ต่ำกว่า อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบของเนื้อผลจันทน์ผา ส่วนสกัดย่อย RC-DT 012 และ RC-DT 013 มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่สูงกว่าในยุงทุกชนิดที่ทำการทดสอบ

10. สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ยุงก้นปล่องมีความไวต่อสารสกัดหยาบเนื้อผลจันทน์ผามากกว่ายุงชนิดอื่น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของงานวิจัยอื่น เช่น การศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยของ *Origanum scabrum* ต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง *An. stephensi* ยุงลายบ้าน *Ae. aegypti* ยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* และ *Cx. tritaeniorhynchus* ซึ่งพบว่า ยุงก้นปล่องมีความไวต่อน้ำมันหอมระเหยของพืชชนิดนี้มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า ยุงก้นปล่องชนิดนี้มีความไวสูงกว่ายุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากพืช *Terminalia chebula*

นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า ส่วนสกัดย่อยของเนื้อผลจันทน์ผามีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่สูงกว่าสารสกัดหยาบ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของพืชชนิด *Sphaeranthus indicus* ซึ่งพบว่าส่วนสกัดย่อยมีฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดหยาบ สำหรับผลการศึกษาที่พบว่า จากจำนวนส่วนสกัดย่อยของเนื้อผลจันทน์ผา 6 ส่วนนั้น มีเพียง 2 ส่วนสกัดย่อยคือ RC-DT 012 และ RC-DT 013 ที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง ซึ่งแสดงให้เห็นฤทธิ์ดังกล่าวไม่ได้เกิดจากการทำงานร่วมกัน (synergistic action) ของสารทั้งหมดที่อยู่ในสารสกัดของผลจันทน์ผา แต่เกิดจากฤทธิ์ของสารบางตัวเท่านั้น ซึ่งการค้นพบนี้สอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงของสารสกัดจากยอดชะอม (*Acacia pennata*) โดยพบว่าสารสกัดหยาบจากยอดชะอม สามารถแยกเป็นส่วนสกัดย่อยได้ 7 ส่วน (Fr-G1 ถึง Fr-G7) แต่กลับพบว่าส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงคือ Fr-G2 และ Fr-G3 เท่านั้น

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่ดีมากของส่วนสกัดย่อย RC-DT 012 และ RC-DT 013 ของเนื้อผลจันทน์ผา อย่างไรก็ตาม การศึกษาหาสารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่อยู่ในส่วนสกัดย่อย การทำให้สารออกฤทธิ์นั้นบริสุทธิ์ รวมถึงการประเมินฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงของสารออกฤทธิ์เหล่านั้น มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องดำเนินการ เพื่อประเมินความเป็นไปได้ที่จะนำสารออกฤทธิ์จากพืชชนิดนี้ไปใช้ในการควบคุมยุงพาหะนำโรคในธรรมชาติทดแทนการใช้สารเคมีซึ่งดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน

เนื้อหางานวิจัย

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การใช้สารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง แทนการใช้เคมีฆ่าแมลงนั้น มีการศึกษาและพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อสัตว์ชนิดอื่นรวมทั้งมนุษย์มากกว่าการควบคุมด้วยการใช้สารเคมีฆ่าแมลง ในปัจจุบันสารเคมีที่นิยมใช้ควบคุมลูกน้ำยุงมากที่สุดคือทีมีฟอส ในรูปของสารเคลือบเม็ดทราย (ทรายอะเบท) ซึ่งแม้ว่ามีการรับรองความปลอดภัยของทรายอะเบทในการใช้ควบคุมลูกน้ำยุงในภาชนะกักเก็บน้ำต่าง ๆ รวมทั้งน้ำดื่มก็ตาม แต่หากใช้ในปริมาณที่มากอย่างต่อเนื่อง อาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค และมีการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมได้ อีกทั้งในปัจจุบัน มีรายงานการเพิ่มขึ้นของลูกน้ำยุงที่มีความต้านทานต่อทีมีฟอสอีกด้วย การใช้สารฆ่าแมลงชีวภาพ (bio-insecticide) จึงเป็นทางเลือกที่ใช้หลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว งานวิจัยจำนวนมากรายงานถึงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงของสารสกัดจากพืชหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่แล้วเป็นพืชสมุนไพร อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากพืชมักมีฤทธิ์น้อยกว่าสารเคมี อีกทั้งยังมีปัจจัยเกี่ยวกับการจัดหาพืชชนิดนั้น ๆ เพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารสกัดอีกด้วย ดังนั้น การศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสารสกัดจากพืชชนิดใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์สูงในการฆ่าลูกน้ำยุง และเป็นพืชที่หาหรือเพาะปลูกได้ง่าย จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งเพื่อที่จะผลิตและนำสารฆ่าแมลงชีวภาพมาใช้ในทางปฏิบัติ ซึ่งจันทน์ผาเป็นพืชชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไป มีการปลูกไว้เพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ เช่น เพื่อความสวยงาม หรือเพื่อแสดงขอบเขตของพื้นที่ เป็นต้น ดังนั้น จันทน์ผาจึงเป็นพืชที่เพาะปลูกได้ง่ายชนิดหนึ่ง

จากการศึกษาที่ผ่านมาของผู้วิจัย โดยเงินงบประมาณแผ่นดินปี 2557 (รหัสโครงการ R2557B001) ซึ่งได้ทำการวิจัยสำเร็จลุล่วงและปิดโครงการไปแล้วนั้น พบว่า สารสกัดหยาบจากเอทานอลเนื้อผลจันทน์ผามีฤทธิ์ที่ดีในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน ซึ่งผลการศึกษาอยู่ระหว่างการดำเนินการเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ดังนั้น การวิจัยต่อยอดโดยการแยกส่วนสกัดย่อยจากสารสกัดหยาบจากเนื้อผลจันทน์ผา เพื่อหวังให้ได้ส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่สูงขึ้น อันจะนำสู่การพัฒนาต่อยอดสู่การผลิตสารฆ่าลูกน้ำยุงจากพืชชนิดนี้ ทั้งนี้ งานวิจัยต่อยอดในครั้งนี้ จะขยายการทดสอบฤทธิ์ของส่วนสกัดย่อยไปสู่ลูกน้ำยุงชนิดอื่น นอกจากยุงลายบ้าน คือ ยุงลายสวน ยุงก้นปล่อง และยุงรำคาญ เพื่อประเมินว่า ส่วนสกัดย่อยของเนื้อผลจันทน์ผา จะมีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงชนิดใดได้สูงสุด ผลการวิจัยที่ได้จะในไปใช้เพื่อประเมินและวางแผนสู่การพัฒนาส่วนสกัดย่อยของเนื้อผลจันทน์ผาให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุงที่มีแนวทางที่ชัดเจน

การทบทวนวรรณกรรม

โรคติดต่อนำโดยยุง เช่น ไข้เลือดออก (Dengue hemorrhagic fever) ไข้ชิคุนกุนยา หรือไข้ปวดข้อยุงลาย (Chikungunya) ไข้มาลาเรีย (Malaria) ไข้สมองอักเสบ (Japanese encephalitis) รวมถึงโรคเท้าช้าง (Elephantiasis) หรือฟิลาริเอสิส (Filariasis) ยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โรคต่าง ๆ เหล่านี้ นอกจากโรคไข้สมองอักเสบแล้ว ในปัจจุบัน ยังไม่มีวัคซีนที่สามารถใช้ป้องกันการติดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ การควบคุมการแพร่ระบาดของโรคจึงขึ้นอยู่กับการควบคุมยุงพาหะ คือยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) ซึ่งเป็นพาหะสำคัญของโรคไข้เลือดออกและไข้ชิคุนกุนยา ยุงก้นปล่อง (*Anopheles* sp.) ซึ่งเป็นพาหะของไข้มาลาเรีย และยุงรำคาญ (*Culex* sp.) ซึ่งเป็นพาหะของไข้สมองอักเสบ รวมถึงโรคเท้าช้าง ซึ่งยุงแต่ละชนิด มีแหล่งเพาะพันธุ์ที่แตกต่างกันออกไป

สำหรับแหล่งเพาะพันธุ์ที่เป็นน้ำนิ่งนั้น การกำจัดลูกน้ำยุงนิยมใส่ ทรายอะเบท (Abate) ลงไปในแหล่งน้ำ (Chareonviriyaphap *et al.*, 1999) สารออกฤทธิ์ของทรายอะเบท คือ ทีมีฟอส (temephos) ซึ่งมีความเป็นพิษต่ำต่อมนุษย์ แต่การใช้ในปริมาณที่สูงกว่ากำหนดหรือการได้รับสารต่อเนื่องเป็นเวลานานสามารถก่อให้เกิดอันตรายแก่มนุษย์ได้ อีกทั้งการตกค้างของสารเคมีสามารถทำให้ลูกน้ำยุงลายเกิดการพัฒนาความต้านทานต่อทีมีฟอส และสามารถพัฒนาสู่ความต้านทานข้ามต่อสารเคมีฆ่าแมลงชนิดอื่นได้ (Rodriguez *et al.*, 2002; ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์ และนพวรรณ บุญชู, 2554) อันจะทำให้ทรายอะเบทไม่สามารถใช้ควบคุมลูกน้ำยุงลายได้อีกต่อไปในพื้นที่ที่ลูกน้ำมีความต้านทานแล้ว ด้วยเหตุนี้ การศึกษาเพื่อสกัดสารชนิดใหม่ๆ จากพืชธรรมชาติ ที่ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง (larvicidal activity) มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสารเคมีแต่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ รวมถึงสัตว์ชนิดอื่นที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ จึงมีบทบาทสำคัญในปัจจุบัน

ในประเทศไทย การศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงนั้นมีเป็นจำนวนมาก ตัวอย่างเช่นการศึกษาของ Promsiri และคณะ (2006) ซึ่งทำการคัดเลือกสารสกัดพืชสมุนไพรจากภาคใต้ของประเทศไทย จำนวน 112 ชนิด พบว่าพืช 14 ชนิดมีฤทธิ์ที่ดีในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน โดยมีค่า 50% Lethal Concentration (LC_{50}) น้อยกว่า 100 ppm อีกทั้งยังพบว่าพืช 2 ชนิดคือ *Mammea siamensis* และ *Anacardium occidentale* มีฤทธิ์ที่ดีมาก โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 5.9 และ 9.1 ppm ตามลำดับ ถัดมาในปี 2010 มีการศึกษาพบว่าสารสกัดจากพืชที่รับประทานได้ 5 ชนิดคือ *Citrus hystrix*, *Citrus reticulate*, *Kaempferia galangal*, *Syzygium aromaticum* และ *Zingiber zerumbet* มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านที่ดี มีค่า LC_{50} เท่ากับ 30.07, 15.42, 53.64, 124.69 และ 48.88 ppm ตามลำดับ (Sutthanont *et al.*, 2010) จากการศึกษาของหลายกลุ่มผู้วิจัยที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่าพันธุ์พืชหลายชนิดในประเทศไทยมีศักยภาพในการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุง

จันทน์ผา เป็นไม้ป่าชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ มีชื่อพื้นเมืองว่า จันทน์แดง ลักกะจั่น หรือ ลักกะจันทน์ จัดอยู่ในวงศ์ Dracaenaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dracaena loureiri* Gagnep ซึ่งในธรรมชาติจันทน์ผาจะพบได้ตามภูเขาสูงหรือเกาะแก่งกลางทะเลที่ห่างไกลจากฝั่ง ปัจจุบันมีผู้นิยมปลูกจันทน์ผาเป็นไม้ประดับ ซึ่งเริ่มเป็นที่ต้องการของตลาด ทำให้เกิดความพยายามในการเพาะเลี้ยงจันทน์ผากันมากขึ้น สำหรับประโยชน์ของจันทน์ผานั้น มีการกล่าวอ้างว่าแก่นของจันทน์ผามีสรรพคุณบำรุงหัวใจ แก้เลือดออกตามไรฟัน ลดการอักเสบ ปวดบวม เป็นต้น สำหรับการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ต่าง ๆ ในจันทน์ผา พบว่า 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) แต่จากการศึกษาล่าสุดเกี่ยวกับจันทน์ผา ผู้วิจัยพบว่า สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของเนื้อผล (endocarp) มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านที่ดี โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 84 และ <50 ppm ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (Thongwat *et al.*, unpublished data) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงคาดว่า หากสามารถแยกส่วนสกัดย่อยจากสารสกัดหยาบของเนื้อผลจันทน์ผาได้ จะสามารถค้นพบส่วนสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงสูงขึ้น เนื่องจาก การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยของ กุหลาบพุกาม (*Pereskia bleo*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่ใบและแก่นมี

ฤทธิ์ต้านการอักเสบและลดไข้ แต่เนื้อของผล (endocarp) กลับมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน โดยสารสกัดหยาบจากเอทานอลมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำที่ LC_{50} เท่ากับ 1,094.84 ppm ในขณะที่ ส่วนสกัดย่อยที่ 1 มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำที่ LC_{50} เท่ากับ >2,000 ppm, ส่วนสกัดย่อยที่ 2 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 1,759.12 ppm, ส่วนสกัดย่อยที่ 3 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 707.94 ppm, ส่วนสกัดย่อยที่ 4 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 878.07 ppm และส่วนสกัดย่อยที่ 5 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 830.89 ppm (Thongwat *et al*., 2014)

จะเห็นได้ว่า เมื่อสกัดส่วนสกัดย่อยออกมาจากสารสกัดหยาบแล้ว จะมีโอกาสพบส่วนสกัดย่อยจำนวนหนึ่งที่มีฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดหยาบ ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้ จึงต้องการแยกส่วนสกัดย่อยออกมาจากสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของเนื้อผลจันทน์ผา เพื่อค้นหาส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่สูงขึ้น เพื่อนำสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุงต่อไป ทั้งนี้ การศึกษานี้จะทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำของส่วนสกัดย่อยเนื้อผลจันทน์ผา ให้ครอบคลุมจำนวนยุงหลายชนิดมากขึ้น ได้แก่ ยุงลายบ้าน ยุงลายสวน ยุงก้นปล่อง และยุงรำคาญ ซึ่งจะทำให้ผลของการศึกษามีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เตรียมส่วนสกัดย่อยจากสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของเนื้อผลจันทน์ผา
2. ทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน ยุงลายสวน ยุงก้นปล่อง และยุงรำคาญ ของส่วนสกัดย่อยของเนื้อผลจันทน์ผา

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากผลจันทน์ผา

1.1. เก็บผลจันทน์ผาจากพื้นที่ในเขตจังหวัดพิษณุโลก

1.2. ล้างผลจันทน์ผาให้สะอาด แยกส่วนที่เป็นเนื้อ (endocarp) และส่วนเมล็ด (seed) ของผลจันทน์ผาออกจากกัน นำเฉพาะส่วนเนื้อไปอบให้แห้งด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งตัวอย่างทั้งสองส่วนแห้งสนิท จากนั้นบดตัวอย่างเนื้อผลจันทน์ผาให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (motorized stone grinder)

1.3. ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากตัวอย่างส่วนเนื้อผลจันทน์ผาที่บดเป็นผง โดยวิธีการแช่หมักด้วยเอทานอล ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) ที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยเครื่อง reciprocal shaker เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.4. กรองสารสกัดที่ได้ด้วยผ้าใยแก้วเพื่อแยกกากพืชชิ้นใหญ่ออกจากสารสกัดหยาบ กรองสารสกัดหยาบอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ในชุดกรองแก้ว จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator

1.5. บรรจุสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดสีชาและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2 การเตรียมส่วนสกัดย่อย

2.1. ศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นและเตรียมส่วนสกัดย่อยโดยวิธี Quick Column Chromatography (Merck silica gel 60 PF_{254}, 250g)

2.2. สารสกัดหยาบถูกแยกส่วนสกัดย่อยด้วย gradient solvent system (CH_2Cl_2, CH_2Cl_2-MeOH and MeOH)

2.3. eluted substances ถูกวิเคราะห์ด้วย Thin layer Chromotography

2.4. กลุ่มของส่วนสกัดย่อยที่ได้ ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5. นำส่วนสกัดย่อยแต่ละกลุ่มไปทดสอบฤทธิ์ต่างๆ เช่นเดียวกับที่ทดสอบกับสารสกัดหยาบ

3 การเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการ

3.1. ยุงลายบ้านสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ จะถูกทำการเพาะเลี้ยงที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

3.2. ลูกน้ำจะถูกเลี้ยงในถาดพลาสติกสีขาวด้วยน้ำประปา โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงลูกน้ำคืออาหารสุนัขบดละเอียด เมื่อลูกน้ำเจริญเป็นตัวโม่งจะถูกถ่ายไปสู่แก้วพลาสติกบรรจุน้ำซึ่งปิดทับปากแก้วด้วยผ้าตาข่าย

3.3. เมื่อตัวโม่งเจริญเป็นตัวเต็มวัย จะถูกถ่ายสู่กรงเลี้ยงยุงมาตรฐานขนาด 30x30x30 เซนติเมตร เลี้ยงยุงตัวเต็มวัยด้วยสารละลายน้ำตาล 5% ผสมวิตามินรวม 5% โดยเปลี่ยนสารละลายน้ำตาลวันเว้นวัน

3.4. 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 ยุงเพศเมียจะวางไข่ที่กระดาษกรอง จากนั้นเทน้ำออกจากถ้วยพลาสติก ทิ้งถ้วยพลาสติกไว้ในกรงเลี้ยงยุงจนกระดาษกรองแห้งสนิท (ประมาณ 3วัน) นำกระดาษกรองซึ่งมีไข่ติดอยู่ไปแช่น้ำประปาซึ่งบรรจุอยู่ในถาดพลาสติก ลูกน้ำระยะที่ 1 จะออกจากไข่ แล้วจึงให้อาหารและเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น

3.5 ทำการเพาะเลี้ยงตามที่ได้กล่าวข้างต้นจนได้ยุงลายบ้านรุ่นต่าง ๆ ต่อไป จนกว่าจะถูกนำมาใช้ในการทดลอง

4. การเพาะเลี้ยงยุงลายสวนในห้องปฏิบัติการ

4.1. ยุงลายสวน จะถูกจับจากภาคสนาม และนำมายังห้องปฏิบัติการ ของภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

4.2. วินิจฉัยว่าเป็นยุงลายสวน โดยอาศัยกุญแจยุงของประเทศไทย "Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand VI. Tribe Aedini" (Rattanarithikul et al., 2010)

4.3. เพาะเลี้ยงโดยใช้วิธีการเดียวกับการเพาะเลี้ยงยุงลายบ้าน

5 การเพาะเลี้ยงยุงก้นปล่องและยุงรำคาญในห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากยุงก้นปล่อง (*An. minimus*) และยุงรำคาญ (*Cx. quinquefasciatus*) เป็นยุงที่เพาะเลี้ยงได้ค่อนข้างยากในห้องปฏิบัติการ ดังนั้น การนำสารสกัดไปทดสอบกับยุงทั้ง 2 ชนิด ยังห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อม และมีการเพาะเลี้ยงยุงทั้ง 2 ชนิดนี้ อยู่เป็นประจำ จะมีความสะดวกและประหยัดงบประมาณเพื่อจัดเตรียมอุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงยุงทั้ง 2 ชนิดนี้ มากกว่า สำหรับห้องปฏิบัติการที่ได้ไปทำการศึกษาวิจัยในครั้งนี้คือ ห้องปฏิบัติการของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

6. การศึกษาฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงของส่วนสกัดย่อย

ส่วนสกัดย่อยทั้งหมดที่ได้จากการสกัดสารสกัดหยาบ จะถูกทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงตามวิธีการขององค์การอนามัยโลก (WHO, 2005) ดังนี้

จ QK
861
ด4915
2560
1020002

สำนักหอสมุด
- 1 ส.ค. 2562

6.1. นำส่วนสกัดย่อยแต่ละ fraction มาเตรียมเป็นstock solution ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 1% ซึ่งเตรียมได้จากละลายสารสกัดหยาบ 200 มิลลิกรัมใน DMSO 20 มิลลิลิตร stock solution จะถูกเก็บรักษาใน screw-cap vial ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.2. จากนั้น stock solution ของส่วนสกัดย่อยแต่ละ fraction จะถูกเตรียมเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ 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 ใน DMSO 18 มิลลิลิตร จากนั้น จึงเตรียมสารละลายทดสอบเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น จะได้สารละลายทดสอบความเข้มข้น 1-10 ppm เป็นต้น

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

6.4. สารละลายของส่วนสกัดย่อยแต่ละ fraction จะถูกทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น 4 ซ้ำ เพื่อให้ได้จำนวนลูกน้ำยุงทดสอบ 100 ตัว ต่อสารส่วนสกัดย่อยแต่ละความเข้มข้น

6.5. กลุ่มควบคุมจะใช้ DMSO 2 มิลลิลิตร ในน้ำกรอง 200 มิลลิลิตร แทนสารละลายทดสอบ ทำการทดสอบ 4 ซ้ำ เพื่อให้ได้จำนวนลูกน้ำยุงทดสอบในกลุ่มควบคุม 100 ตัว

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

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

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

ผลการศึกษาวิจัย

สารสกัดหยาบจากเนื้อผลจันทน์ผา

ตัวอย่างยอดชะอมเมื่อผ่านการอบแห้งแล้ว น้ำหนักของตัวอย่างเป็นดังนี้

ตัวอย่าง	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	Yield (%)
เนื้อผลจันทน์ผา	1,737.40	441.65	25.42

เมื่อนำตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งและบดละเอียดไปสกัดด้วยตัวเอทานอล แล้วระเหยตัวทำละลายออก ได้สารสกัดหยาบในปริมาณดังนี้

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดแห้ง (กรัม)	Yield (%)
ผงเนื้อผลจันทน์ผา	เอทานอล	441.65	19.80	4.48

เมื่อแยกส่วนสกัดย่อยแล้วได้สารสกัดออกมาดังนี้

ส่วนสกัดย่อยที่	รหัส	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	Yield (%)
1	RC-DT 009	1.2310	8.79
2	RC-DT 010	0.5987	4.28
3	RC-DT 011	0.7563	5.40
4	RC-DT 012	0.7049	5.04
5	RC-DT 013	3.0818	22.01
6	RC-DT 014	1.3144	9.39

ฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงลายบ้าน ยุงลายสวน ยุงรำคาญ และยุงก้นปล่องของสารสกัดหยาบเนื้อผลจันทน์ผา

Mosquito	Conc. (ppm)	24-hour exposure time		48-hour exposure time	
		Mortality (%) ± SD	LC_{50} (ppm) (LCL-UCL)	Mortality (%) ± SD	LC_{50} (ppm) (LCL-UCL)
Ae. aegypti	Control	0	224.73	0	93.37
	50	0	(204.19-267.17)	5.00 ± 3.83	(89.03-97.58)
	70	0		26.00 ± 7.66	
	90	0		45.00 ± 6.00	
	110	2.00 ± 2.31		64.00 ± 3.27	
	130	10.00 ± 4.00		83.00 ± 5.03	
	150	15.00 ± 3.83		90.00 ± 7.66	
	170	21.00 ± 2.83		89.00 ± 6.00	
	190	34.00 ± 6.93		97.00 ± 3.83	
Ae. albopictus	Control	0	261.75	0	134.40
	50	0	(220.28-369.95)	1.00 ± 2.00	(127.15-
	70	0		14.00 ± 5.16	142.73)
	90	5.00 ± 2.00		28.00 ± 8.64	
	110	13.00 ± 2.00		42.00 ± 6.93	
	130	15.00 ± 3.83		48.00 ± 8.64	
	150	24.00 ± 3.27		50.00 ± 8.33	
	170	28.00 ± 3.27		65.00 ± 3.83	
	190	30.00 ± 5.16		74.00 ± 2.31	
Cx. quinquefasciatus	Control	0	282.86	0	82.55
	70	7.00 ± 5.03	(228.79-426.04)	49.00 ± 10.00	(58.94-97.65)
	90	10.00 ± 5.16		41.00 ± 8.87	
	110	21.00 ± 5.03		63.00 ± 7.57	
	130	17.00 ± 5.03		70.00 ± 7.66	
	150	28.00 ± 7.30		63.00 ± 10.52	
	170	32.00 ± 5.66		67.00 ± 11.94	
	190	31.00 ± 6.00		71.00 ± 8.87	
An. minimus	Control	0	77.88	0	-*
	30	31.00 ± 2.00	(67.84-87.73)	93.00 ± 5.03	
	50	36.00 ± 3.27		95.00 ± 5.03	
	70	42.00 ± 5.16		92.00 ± 4.62	
	90	50.00 ± 8.33		95.00 ± 3.83	
	110	56.00 ± 3.27		94.00 ± 2.31	
	130	63.00 ± 6.00		96.00 ± 2.00	
	150	69.00 ± 6.83		98.00 ± 2.31	
	170	71.00 ± 8.25		96.00 ± 3.27	
	190	82.00 ± 8.35		97.00 ± 2.00	

* อัตราการตายสูงมากเกินกว่าที่จะคำนวณหาค่า LC ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้

ฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงลายบ้าน ยุงลายสวน ยุงรำคาญ และยุงก้นปล่องของสารส่วนสกัดย่อยเนื้อผลจันทน์ผา

ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของส่วนสกัดย่อย RC-DT 012

Mosquito	Conc. (ppm)	24-hour exposure time		48-hour exposure time	
		Mortality (%) ± SD	LC_{50} (ppm) (LCL-UCL)	Mortality (%) ± SD	LC_{50} (mg/L) (LCL-UCL)
Ae. aegypti	Control	0	26.45	0	18.43
	10	0	(21.39-30.58)	6.00 ± 2.31	(16.65-20.28)
	30	61.00 ± 10.52		91.00 ± 6.83	
	50	77.00 ± 10.00		98.00 ± 4.00	
	70	96.00 ± 3.27		100	
	90	97.00 ± 2.00		100	
	110	99.00 ± 2.00		100	
Ae. albopictus	Control	0	65.98	0	29.54
	10	5.00 ± 2.00	(56.55-82.81)	27.00 ± 5.03	(24.86-34.91)
	20	11.00 ± 3.83		41.00 ± 8.23	
	30	12.00 ± 3.27		42.00 ± 5.16	
	40	33.00 ± 6.83		58.00 ± 7.66	
	50	43.00 ± 10.52		65.00 ± 11.94	
	60	47.00 ± 8.87		70.00 ± 6.93	
Cx. quinquefasciatus	Control	1.00 ± 2.00	0.66	1.00 ± 2.00	-*
	2	81.82 ± 9.52	(0.09-1.19)	97.98 ± 2.31	
	4	90.91 ± 3.83		96.97 ± 2.00	
	6	96.97 ± 3.83		100	
	8	100		100	
	10	100		100	
An. minimus	Control	2.00 ± 2.31	24.57	6.00 ± 4.00	6.13
	5	10.20 ± 3.27	(21.41-29.48)	37.23 ± 8.87	(5.35-6.83)
	10	23.47 ± 2.00		77.66 ± 10.52	
	15	26.53 ± 5.66		96.81 ± 2.00	
	20	40.82 ± 7.66		96.81 ± 3.83	
	25	54.08 ± 8.87		98.94 ± 2.00	
	30	59.18 ± 9.80		100	

* **อัตราการตาย**สูงมากเกินกว่าที่จะคำนวณหาค่า LC ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้

ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของส่วนสกัดย่อย RC-DT 013

Mosquito	Conc. (ppm)	24-hour exposure time		48-hour exposure time	
		Mortality (%) ± SD	LC_{50} (ppm) (LCL-UCL)	Mortality (%) ± SD	LC_{50} (ppm) (LCL-UCL)
Ae. aegypti	Control	0	16.53	0	-*
	10	23.00 ± 3.83	(14.20-18.85)	89.00 ± 8.25	
	30	85.00 ± 6.83		99.00 ± 2.00	
	50	97.00 ± 3.83		100	
	70	98.00 ± 2.31		100	
	90	99.00 ± 2.00		100	
	110	99.00 ± 2.00		100	
Ae. albopictus	Control	0	34.62	0	14.52
	10	9.00 ± 3.83	(30.77-39.23)	26.00 ± 2.31	(12.73-16.16)
	20	35.00 ± 11.49		76.00 ± 11.78	
	30	48.00 ± 11.31		82.00 ± 6.93	
	40	64.00 ± 5.66		93.00 ± 6.00	
	50	55.00 ± 9.45		95.00 ± 6.00	
	60	66.00 ± 9.52		100	
Cx. quinquefasciatus	Control	1.00 ± 2.00	0.94	2.00 ± 2.31	-*
	2	81.82 ± 8.33	(0.37-1.36)	90.82 ± 3.83	
	4	94.95 ± 5.03		100	
	6	98.99 ± 5.03		100	
	8	100		100	
	10	100		100	
An. minimus	Control	1.00 ± 2.00	20.99	6.00 ± 4.00	7.73
	5	1.01 ± 2.31	(19.72-22.42)	18.09 ± 9.45	(7.03-8.39)
	10	10.10 ± 3.83		72.34 ± 8.33	
	15	21.21 ± 9.52		90.43 ± 5.03	
	20	38.38 ± 7.57		96.81 ± 6.00	
	25	65.66 ± 10.07		97.87 ± 2.31	
	30	80.81 ± 3.83		100	

* อัตราการตายสูงมากเกินกว่าที่จะคำนวณหาค่า LC ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้

สรุปและอภิปรายผลการศึกษาวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน ยุงลายสวน ยุงรำคาญ และยุงก้นปล่องของสารสกัดผลจันทน์ผาพบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง ลูกน้ำยุงก้นปล่อง *An. minimus* มีความไวต่อสารสกัดหยาบมากที่สุด มีค่า LC_{50} เท่ากับ 77.88 ppm โดยลูกน้ำยุงลายบ้าน *Ae. aegypti* (224.73 ppm) ยุงลายสวน *Ae. albopicutus* (261.75 ppm) และยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* (282.86 ppm) มีความต้านทานที่สูงกว่า

สำหรับส่วนสกัดย่อย การแยก fraction ด้วย column chromatography แยกส่วนสกัดย่อยออกจากสารสกัดหยาบผลจันทน์ผาได้ 188 eluted fractions โดยสามารถจัดเป็นกลุ่มได้ 6 กลุ่ม คือ RC-DT 009 ถึง RC-DT 014 และเมื่อทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงของส่วนสกัดหยาบทั้ง 6 กลุ่ม กับลูกน้ำยุงลาย พบว่าเฉพาะ RC-DT 012 และ RC-DT 013 เท่านั้น ที่มีฤทธิ์ โดยสามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้มากกว่า 90% ที่ความเข้มข้น 110 ppm ส่วนสกัดย่อยทั้งสองจึงถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงชนิดอื่นต่อไป โดยพบว่า

ส่วนสกัดย่อยทั้งสองมีฤทธิ์ที่ดีมากต่อลูกน้ำยุงรำคาญ โดยมีค่า LC_{50} ของส่วนสกัดย่อย RC-DT 012 เท่ากับ 0.66 ppm และส่วนสกัดย่อย RC-DT 013 เท่ากับ 0.94 ppm ในขณะที่ลูกน้ำยุงชนิดอื่นมีอัตราการตายที่ต่ำกว่า อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบของเนื้อผลจันทน์ผา ส่วนสกัดย่อย RC-DT 012 และ RC-DT 013 มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่สูงกว่าในยุงทุกชนิดที่ทำการทดสอบ

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ยุงก้นปล่องมีความไวต่อสารสกัดหยาบเนื้อผลจันทน์ผามากกว่ายุงชนิดอื่น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของงานวิจัยอื่น เช่น การศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยของ *Origanum scabrum* ต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง *An. stephensi* ยุงลายบ้าน *Ae. aegypti* ยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* และ *Cx. tritaeniorhynchus* ซึ่งพบว่า ยุงก้นปล่องมีความไวต่อน้ำมันหอมระเหยของพืชชนิดนี้มากที่สุด (Govindaragan *et al.*, 2016) นอกจากนี้ยังพบว่า ยุงก้นปล่องชนิดนี้มีความไวสูงกว่ายุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากพืช *Terminalia chebula* (Veni *et al.*, 2017)

นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า ส่วนสกัดย่อยของเนื้อผลจันทน์ผามีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่สูงกว่าสารสกัดหยาบ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของพืชชนิด *Sphaeranthus indicus* ซึ่งพบว่าส่วนสกัดย่อยซึ่งสกัดด้วย ethyl acetate นั้น มีฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดหยาบซึ่งสกัดด้วยไอน้ำ (Arivoli et al., 2016; Chellappandian *et al.*, 2017) สำหรับผลการศึกษาที่พบว่า จากจำนวนส่วนสกัดย่อยของเนื้อผลจันทน์ผา 6 ส่วน (fraction group) นั้น มีเพียง 2 ส่วนสกัดย่อยคือ RC-DT 012 และ RC-DT 013 ที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง ซึ่งแสดงให้เห็นฤทธิ์ดังกล่าวไม่ได้เกิดจากการทำงานร่วมกัน (synergistic action) ของสารทั้งหมดที่อยู่ในสารสกัดของผลจันทน์ผา แต่เกิดจากฤทธิ์ของสารบางตัวเท่านั้น ซึ่งการค้นพบนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Thongwat *et al.* 2017 ซึ่งพบผลการทดลองเช่นเดียวกันในการศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงของสารสกัดจากยอดชะอม (*Acacia pennata*) โดยพบว่าสารสกัดหยาบจากยอดชะอม สามารถแยกเป็นส่วนสกัดย่อยได้ 7 ส่วน (Fr-G1 ถึง Fr-G7) แต่กลับพบว่าส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงคือ Fr-G2 และ Fr-G3 เท่านั้น

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่ดีมากของส่วนสกัดย่อย RC-DT 012 และ RC-DT 013 ของเนื้อผลจันทน์ผา อย่างไรก็ตาม การศึกษาหาสารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่อยู่ในส่วนสกัดย่อย การทำให้สารออกฤทธิ์นั้นบริสุทธิ์ รวมถึงการประเมินฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงของสารออกฤทธิ์เหล่านั้น มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องดำเนินการ เพื่อประเมินความเป็นไปได้ที่จะนำสารออกฤทธิ์จากพืชชนิดนี้ไปใช้ในการควบคุมยุงพาหะนำโรคในธรรมชาติทดแทนการใช้สารเคมีซึ่งดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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.

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

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.

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.

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.

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 Pub Health* 2014; 45(6): 1292-300.

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.

ภาคผนวก

ผลงานวิจัยได้รับการเผยแพร่ตีพิมพ์ในวาสารวิชาการระดับนานาชาติ อยู่ในฐานข้อมูล SCOPUS = Q2 ของ SCImago Journal Rank (SJR) **ดังนี้คือ**

Damrongpan Thongwat, Ratchanaporn Chokchaisiri, Lucksagoon Ganranoo and Nophawan Bunchu (2018). Larvicidal efficacy of crude and fractionated extracts of *Dracaena loureirin* Gagnep against *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, and *Anopheles minimus* mosquito vectors. ***Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine***, 8(5), May, 273-8.

Reference and Information services, Naresuan University Library
Tel: 0-5596-2623 or 2623 e-mail ; reference@nu.ac.th

วันที่ 28 พฤษภาคม 2561

บริการ : Journal Impact Factor

เรียน รศ.ดร.ดำรงพันธุ์ ทองวัฒน์

ค่า Impact Factor และ Quartile จากฐานข้อมูล ISI Web of Science

Journal title	ISSN	Impact Factors (2016)	ISI Quartile (2016)	Note
Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine	(print): 2221-1691 (online): 2588-9222	-	มีในฐาน ISI แต่ไม่มีค่า Impact Factor	

ค่า Quartile บน SCImago Journal Rank (SJR) จากฐานข้อมูล SCOPUS

Journal title	ISSN	SJR Quartile (2016)	SCOPUS	Note
Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine	(print): 2221-1691 (online): 2588-9222	Q2	มี	

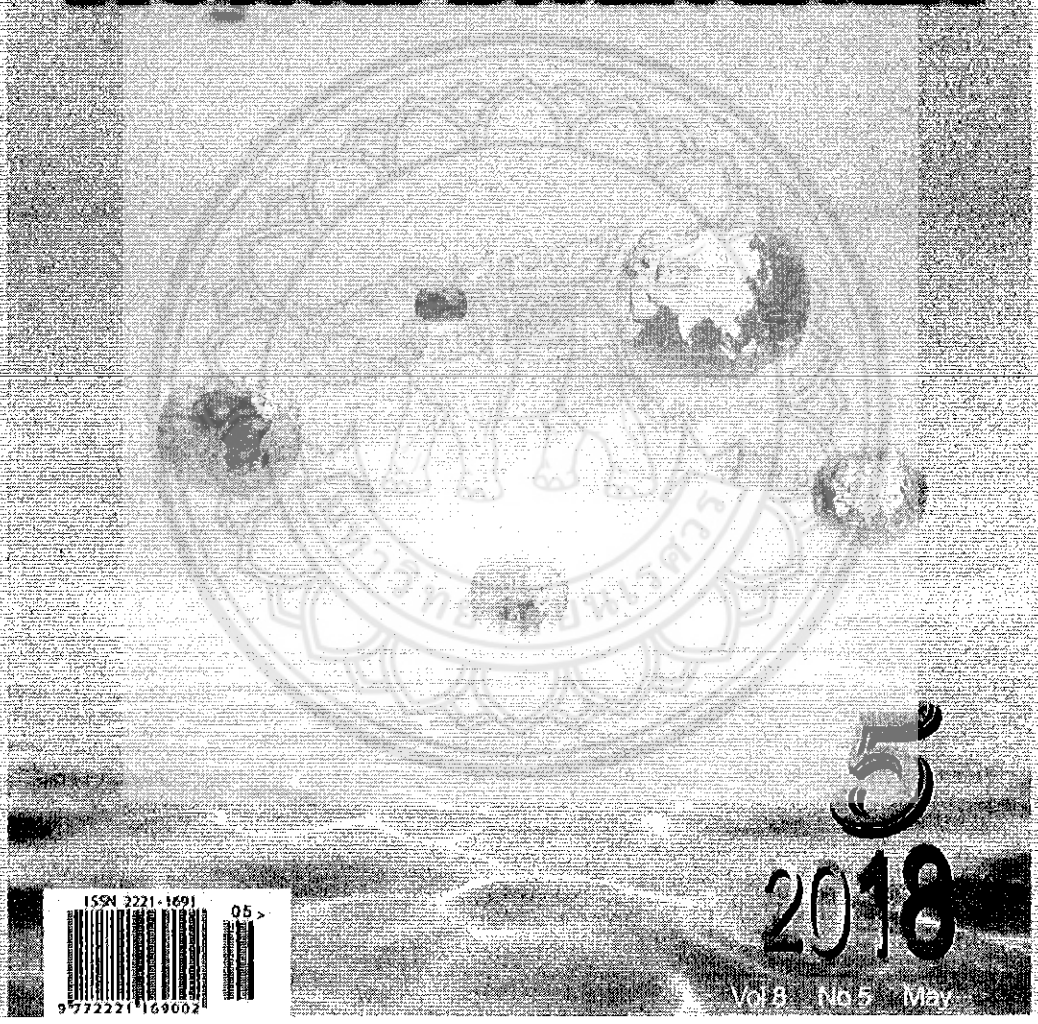
หมายเหตุ

** การขอรับรางวัลตีพิมพ์บทความ อ้างอิงจากค่า Quartile ในฐาน SJR /SCOPUS และ ISI Web of Science แต่การขอรับทุนอุดหนุนการวิจัย จะอ้างอิงจากค่า Journal Impact Factor ของวารสารระดับชาติ/นานาชาติ (ตามประกาศมหาวิทยาลัย ว่าด้วยเรื่องการรับทุนสนับสนุนการวิจัยและเงินอุดหนุนการวิจัย ปี 2561)*

Wolters Kluwer Medknow

ISSN 2221-1691(Print)
ISSN 2588-9222(Online)
CODEN APJTC7

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine



ISSN 2221-1691 05

2018

Vol 8 No 5 May

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine

Journal homepage: www.apjtb.org

doi: 10.4103/2221-1691.233009

©2018 by the Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.

Larvicidal efficacy of crude and fractionated extracts of *Dracaena loureiri* Gagnep against *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, and *Anopheles minimus* mosquito vectors

Damrongpan Thongwat[1,2*], Ratchanaporn Chokchaisiri[3], Lucksagoon Gaiwanou[3], Nophawan Bunchu[1,2]

[1]*Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand*

[2]*Centre of Excellence in Medical Biotechnology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand*

[3]*Department of Chemistry, School of Science, University of Phayao, Phayao, Thailand*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 January 2018
Revision 20 February 2018
Accepted 30 March 2018
Available online 23 May 2018

Keywords:
Dracaena loureiri
Aedes aegypti
Aedes albopictus
Culex quinquefasciatus
Anopheles minimus
Fractionated extract
Crude extract
Larvicidal
Mosquito larva

ABSTRACT

Objective: To evaluate the larvicidal efficacy of crude and fractionated extracts of *Dracaena loureiri* endocarp against *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, and *Anopheles minimus* mosquitos. **Methods:** Larvicidal activity was tested according to World Health Organization standard protocol. The third-stage larvae of each mosquito species were exposed to various concentrations of *Dracaena loureiri* crude extract and six groups of *Dracaena loureiri* fractionated extracts (RC-DT 009-014). Larval mortality rates were observed after 24 h and 48 h of exposure. Then, a computerized probit analysis of the mortality data was performed to determine lethal concentration 50 (LC_{50}) and lethal concentration 90 values. **Results:** *Anopheles minimus* larvae (24-h LC_{50} 77.88 mg/L) had the highest susceptibility to crude extract, whereas others (*Aedes aegypti*, 24-h LC_{50} 224.73 mg/L; *Aedes albopictus*, 24-h LC_{50} 261.75 mg/L; and *Culex quinquefasciatus*, 24-h LC_{50} 282.86 mg/L) were significantly less susceptible. The most effective groups of fractionated extracts were RC-DT 012 and RC-DT 013. The mosquito species most susceptible to fractionated extracts was *Culex quinquefasciatus*, with 24-h LC_{50} values of 0.66 and 0.94 mg/L for RC-DT 012 and RC-DT 013, respectively. **Conclusions:** The larvicidal activity of fractionated extracts is more effective than that of crude extract against all tested mosquito species. For the most effective alternative larvicide, purification and a phytochemical constituent analysis must be performed.

1. Introduction

Mosquito-borne diseases remain the biggest health problem for humans worldwide. In Thailand, *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) and *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*) are the primary vectors for transmitting dengue and dengue hemorrhagic fever[1], *Anopheles minimus* (*An. minimus*) is one of the primary vector for the seasonal outbreaks of malaria[2], and *Culex quinquefasciatus* (*Cx. quinquefasciatus*) transmits Japanese encephalitis[3]. In 2017, the Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control Ministry of Public Health in Thailand reported that more than 30 000 Thai

* First and corresponding author: Damrongpan Thongwat, Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand.
Tel: +66-55-963676
Fax: +66-55-963770
E-mail: damrongpanth@nu.ac.th

Foundation project: This work was supported by the Naresuan University Research Fund [Grant No. R2560I033].

This is an open-access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-Share Alike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

For reprints contact: reprints@medknow.com

©2018 Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine Produced by Wolters Kluwer-Medknow

How to cite this article: Thongwat D, Chokchaisiri R, Gaiwanou L, Bunchu N. Larvicidal efficacy of crude and fractionated extracts of *Dracaena loureiri* Gagnep against *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, and *Anopheles minimus* mosquito vectors. Asian Pac J Trop Biomed 2018; 8(5): 273-278.

were infected by those mosquitoes-borne diseases.

Insecticides have traditionally been the first option for controlling outbreaks of vector-borne diseases, owing to their outstanding efficacy[4]. Temephos, the most well-known larvicide, is widely used for controlling the mosquito larvae population[5]. However, continuous use of temephos has led to negative effects on humans. Moreover, reports of temephos-resistant mosquitoes are continuously being published[6-8]. Therefore, plant biosubstances have been the focus of replacement insecticides.

Plant extracts have been a challenging subject with regard to vector control because of the abundance of plant species and human safety issues. One potentially safer alternative is *Dracaena loureiri* Gagnep (*D. loureiri*), commonly known as "*Chan Phu*", "*Chan Daeng*", and "*Lukka Chan*". *D. loureiri* is a folkloric medical plant with antipyretic and analgesic properties that is used in Thailand for the treatment of colds, fever, cough, inflammation, and gastrointestinal disturbances[9,10]. We previously reported on the larvicidal efficacy of crude extract from the endocarp of *D. loureiri* against third-stage larvae of *Ae. aegypti*, in which the 24-h and 48-h lethal concentration 50 (LC_{50}) values were 84.00 mg/L and < 50.00 mg/L, respectively[11]. Thus, we aimed to assess the larvicidal efficacy of crude and fractionated extracts of *D. loureiri* against *Ae. aegypti* and other mosquito species (i.e., *Ae. albopictus*, *Cx. quinquefasciatus*, and *An. minimus*).

2. Materials and methods

2.1. Crude extracts

Crude extracts of *D. loureiri* (voucher number: DTNU008) endocarp were prepared according to the method outlined in the previous study[11]. Briefly, the fruits were collected from naturally growing trees and cleaned with tap water. Their endocarps (2.36 kg) were completely dried in a hot air oven at 45 ℃. The dried endocarps (586.33 g) were ground with an electric blender at 22 000 r/min, and the resulting dried powder was macerated with absolute ethanol at a ratio of 1:10 (powder:solvent, w/v) with 24 h of continuous shaking (180 r/min) on a rotary shaker. The suspension was then filtered through a Whatman™ No.1 filter paper (GE Healthcare UK Limited, UK) via a Büchner funnel. Afterward, the extracts were evaporated to dryness under reduced pressure to yield crude extract (26.29 g), which was stored in a desiccator.

2.2. Column chromatographic fractionation

The crude extract was fractionated by column chromatography (Merck silica gel 60 PF_{254}, 250 g) using a gradient solvent system of CH_2Cl_2, CH_2Cl_2–MeOH, and MeOH, with increasing amounts of the more polar solvent (mobile phase: 10% MeOH in dichloromethane). After heating at 90–110 ℃ for 4 min, the developing reagent (anisaldehyde reagent, consisting of 3 mL *p*-methoxybenzaldehyde, 2 mL concentrated sulfuric acid, 2 mL water, and 90 mL absolute ethanol) caused organic compounds to emit specific colors, which were examined by thin-layer chromatography. From there, six groups of fractionated extracts were obtained: RC-DT 009 (1.23 g), RC-DT 010 (0.59 g), RC-DT 011 (0.75 g), RC-DT 012 (0.70 g), RC-DT 013 (3.80 g) and RC-DT 014 (1.31 g).

2.3. Mosquito colonization

Ae. aegypti and *Ae. albopictus* colonies were obtained from laboratory strains from the Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Thailand. *Cx. quinquefasciatus* and *An. minimus* were obtained from laboratory colonies from the Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. The larvae were reared in tap water under laboratory conditions; (25±2) ℃, 70%–80% relative humidity, and 10:14 (light:dark) photoperiod. Larval food consisted of powdery dog biscuits (for *Aedes* and *Culex*) and fish food (for *Anopheles*). After pupation, the larvae were transferred into plastic cups filled with tap water that were placed in mosquito cages (30 cm × 30 cm × 30 cm). After emergence, the adults were provided solutions of 5% sugar mixed with 5% multivitamin syrup. After 5 d, the females were provided blood meal through an artificial membrane feeding method. After blood-feeding, female *Aedes* and *Culex* were reared until gravid and permitted to lay eggs. Meanwhile, blood-fed female *Anopheles* were mated though an artificial mating method[12], after which they were permitted to lay eggs. After the eggs hatched, the larvae were reared according to the above conditions until they were required for bioassays.

2.4. Larvicidal bioassay

The protocol for testing larvicidal activity followed that of our previous study[11]. Briefly, a stock solution of crude and fractionated extracts (1%, w/v) were prepared with dimethyl sulfoxide as the diluent. From the stock solutions, a series of crude and fractionated extract concentrations were prepared (30–190 mg/L and 2–110 mg/L, respectively). Afterward, 200 mL of each concentration of extract was placed into plastic bowls. Twenty-five of the late third-stage larvae were transferred into the extract solutions. Mortality rates were determined after 24 h and 48 h of exposure. Larvae confirmed dead when they were pricked by a needle and not moved. This experiment was performed in quadruplicate (total of 100 larvae for each concentration). Dimethyl sulfoxide in distilled water was used as the control.

2.5. Data analysis

Larval mortality data from the larvicidal bioassays were analyzed using a computerized probit analysis for determination of LC_{50} and lethal concentration 90 (LC_{90})[13]. The *chi*-square values and 95% fiducial confidence intervals [lower confidence limit (LCL) and upper confidence limit (UCL)] were calculated. A commercial LdP Line® software (Plant Protection Research Institute, Egypt) was used.

3. Results

The larvicidal activities of *D. loureiri* crude endocarp extract against *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Cx. quinquefasciatus*, and *An. minimus*

mosquitoes were presented in Table 1. At 24 h, *An. minimus* larvae had the highest susceptibility to crude extract (LC_{50} 77.88 mg/L). Its 24-h LC_{90} was significantly lower than that of *Ae. aegypti* (224.73 mg/L), *Ae. albopictus* (261.75 mg/L), and *Cx. quinquefasciatus* (282.86 mg/L). At 48 h, *An. minimus* was so highly susceptible to crude extract (> 90% mortality rate at 30 mg/L) that we did not calculate the 48-h LC_{50} value, although it was estimated to be < 30 mg/L.

Fractionated extraction by column chromatography produced 188 eluted fractions from the crude extract. The fractions were classified into six groups: RC-DT 009 to RC-DT 014 (Figure 1). All groups were preliminarily screened for larvicidal ability. One concentration (110 mg/L) from each group was tested against the third-stage *Ae. aegypti* larvae. After 24 h of exposure, the RC-DT 012 and RC-DT 013 fractions produced > 90% mortality rates, while the remaining fractions produced 0%–3% mortality rates. For that reason, RC-DT 012 and RC-DT 013 were selected for the bioassays.

The results of larvicidal activity experiments on RC-DT 012 and RC-DT 013 were presented in Tables 2 and 3, respectively. In contrast to results from crude extract, *Cx. quinquefasciatus* (as opposed to *An. minimus*) was extremely susceptible to both fractions. For RC-DT 012, the 24-h LC_{50} and LC_{90} values were 0.66 and 3.29 mg/L, respectively. For RC-DT 013, those values were 0.94 and 2.77 mg/L, respectively. *An. minimus*, *Ae. aegypti*, and *Ae. albopictus* larvae had minor susceptibility to the fractions. However, the mortality rates of all mosquito species were significantly higher for those exposed to fractionated extracts than for those exposed to crude extract.

The LC_{50} and LC_{90} values of the crude and fractionated extracts for each mosquito species were compared and statistically analyzed. Results showed that the larvicidal activities of fractionated extracts were statistically greater than that of the crude extract for all mosquito species. In fact, the only values that were not statistically significant were the 48-h LC_{90} values for *Ae. albopictus* (crude

Table 1
Larvicidal activities of crude ethanolic *D. longan* extracts against the third-stage larvae of 4 mosquito vectors.

Mosquito	Concentration (mg/L)	24-hour exposure time				48-hour exposure time			
		Mortality rate (%)	LC_{50} (mg/L) (LCL–UCL)	LC_{90} (mg/L) (LCL–UCL)	χ^2	Mortality rate (%)	LC_{50} (mg/L) (LCL–UCL)	LC_{90} (mg/L) (LCL–UCL)	χ^2
Ae. aegypti	Control	0	224.73	367.97	1.532	0	93.37	156.52	4.770
	50	0	(204.19–267.17)	(299.11–545.42)		5.00±3.83	(89.03–97.58)	(147.59–167.88)	
	70	0				26.00±7.66			
	90	0				45.00±6.00			
	110	2.00±2.31				64.00±3.27			
	130	10.00±4.00				83.00±5.03			
	150	15.00±3.83				90.00±7.66			
	170	21.00±2.83				89.00±6.00			
	190	34.00±6.93				97.00±3.83			
Ae. albopictus	Control	0	261.75	648.75	1.582	0	134.40	279.89	7.404
	50	0	(220.28–369.93)	(434.17–1 502.71)		1.00±2.00	(137.15–142.73)	(247.85–328.88)	
	70	0				14.00±5.16			
	90	5.00±2.00				28.00±8.64			
	110	13.00±2.00				42.00±6.93			
	130	15.00±3.83				48.00±8.64			
	150	24.00±3.27				50.00±8.33			
	170	28.00±3.27				65.00±3.83			
	190	30.00±5.16				74.00±2.31			
Cx. quinquefasciatus	Control	0	282.86	974.88	3.600	0	82.55	541.33	9.929
	70	7.00±5.03	(228.79–426.04)	(583.32–2 741.42)		49.00±10.00	(58.94–97.65)	(342.47–1 633.50)	
	90	10.00±5.16				41.00±8.87			
	110	21.00±5.03				63.00±7.57			
	130	17.00±5.03				70.00±7.66			
	150	28.00±7.30				63.00±10.32			
	170	32.00±5.66				67.00±11.94			
	190	31.00±6.00				71.00±8.87			
An. minimus	Control	0	77.88	462.98	8.050	0	-	-	-
	30	31.00±3.00	(67.81–87.73)	(344.63–720.30)		93.00±5.03			
	50	36.00±3.27				95.00±5.03			
	70	42.00±5.16				92.00±4.62			
	90	50.00±8.33				95.00±3.83			
	110	56.00±3.27				94.00±2.31			
	130	63.00±6.00				96.00±2.00			
	150	69.00±6.83				98.00±2.31			
	170	71.00±8.25				96.00±3.27			
	190	82.00±8.35				97.00±2.00			

Values of mortality rate were expressed as mean±SD. χ^2: *chi*-square test, $P<0.05$ represented significant difference.
[a] The mortality rates were very high, so the parameters could not be calculated.

Table 2
Larvicidal activities of RC-DT 012 fractionated *D. loureiri* extract against the third-stage larvae of 4 mosquito species.

Mosquito	Concentration (mg/L)	24-hour exposure time				48-hour exposure time			
		Mortality rate (%)	LC_{50} (mg/L) (LCL–UCL)	LC_{90} (mg/L) (LCL–UCL)	χ^2	Mortality rate(%)	LC_{50} (mg/L) (LCL–UCL)	LC_{90} (mg/L) (LCL–UCL)	χ^2
Ae. aegypti	Control	0	26.43	60.87	1.999	0	18.43	31.17	3.702
	10	0	(21.39–30.58)	(54.78–69.45)		6.00 ± 2.31	(16.65–20.28)	(27.96–35.57)	
	30	61.00±10.52				91.00 ± 6.83			
	50	77.00±10.00				98.00 ± 4.00			
	70	96.00±3.27				100			
	90	97.00±2.00				100			
	110	99.00±2.00				100			
Ae. albopictus	Control	0	65.98	234.53	7.862	0	29.54	224.29	3.634
	10	5.00±2.00	(56.55–82.84)	(160.97–431.73)		27.00±3.03	(24.86–34.91)	(141.96–495.02)	
	20	11.00±3.83				41.00±5.23			
	30	12.00±3.27				42.00±3.16			
	40	33.00±6.83				58.00±7.66			
	50	43.00±10.52				65.00±11.04			
	60	47.00±8.87				70.00±6.93			
Cx. quinquefasciatus	Control	1.00±2.00	0.66	3.29	0.606	1.00±2.00	-	-	-
	2	81.82±9.52	(0.09–1.19)	(2.50–4.62)		97.98±2.31			
	4	90.91±3.83				96.97±2.00			
	6	96.97±3.83				100			
	8	100				100			
	10	100				100			
An. minimus	Control	2.00±2.31	24.57	103.72	3.609	6.00±4.00	6.13	13.49	0.454
	5	10.20±3.27	(21.41–29.48)	(75.38–199.29)		37.23±8.87	(5.35–6.83)	(12.08–13.51)	
	10	23.47±2.00				77.66±10.52			
	15	26.53±5.66				96.81±2.00			
	20	40.82±7.66				96.81±3.83			
	25	54.08±8.87				98.94±2.00			
	30	59.18±9.80				100			

Values of mortality rate were expressed as mean±SD. χ^2 chi-square test. $P<0.05$ represented significant difference.
[a] The mortality rates were very high, so the parameters could not be calculated.

extract: 279.89 mg/L; and RC-DT 012: 224.29 mg/L). According to the results in this study, fractionated extracts were more effective than crude extract against all tested mosquito species.

Figure 1. Thin-layer chromatography spots of organic compounds from isolated fractions (RC-DT 009-014) of *D. loureiri*.

4. Discussion

Surprisingly, the crude ethanol endocarp extract of *D. loureiri* had lower activity against *Ae. aegypti* at 24 h (LC_{50} 224.73 mg/L) and 48 h (LC_{50} 93.37 mg/L) than in the previous study (24-h LC_{50} 84.00 mg/L and 48-h LC_{50} < 50 mg/L)[11]. Both studies utilized the same protocol for producing crude extract, so the differences in larvicidal efficacy could be attributed to climate and seasonal difference. That is, the previous study used plants harvested in October 2013[11]; this study used the same plants, but the plants were harvested in September 2016.

Of all mosquito species tested, *An. minimus* showed the greatest susceptibility to *D. loureiri* crude extract. Other species (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, and *Cx. quinquefasciatus*) demonstrated a significant, threefold greater tolerance than that of *An. minimus*. Similarly, other studies have found that *Anopheles* larvae are more susceptible to plant extracts than other mosquitoes. For example, Govindarajan *et al.* discovered that *Anopheles stephensi* is more susceptible (LC_{50} 61.65 μg/mL) to *Origanum vulgare* essential oil than *Ae. aegypti* (LC_{50} 67.13 μg/mL), *Cx. quinquefasciatus* (LC_{50} 72.45 μg/mL), and *Culex tritaeniorhynchus* (LC_{50} 78.87 μg/mL)[14]. In addition, *Anopheles stephensi* is more susceptible to *Terminalia chebula* extract than *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*, with LC_{50} values of 87.13, 93.24, and 111.98 ppm, respectively[15].

Table 3
Larvicidal activities of RC-DT 013 fractionated *D. loureiri* extract against the third-stage larvae of 4 mosquito vectors.

Mosquito	Concentration (mg/L)	24-hour exposure time				48-hour exposure time			
		Mortality rate (%)	LC_{50} (mg/L) (LCL–UCL)	LC_{90} (mg/L) (LCL–UCL)	χ^2	Mortality rate (%)	LC_{50} (mg/L) (LCL–UCL)	LC_{90} (mg/L) (LCL–UCL)	χ^2
Ae. aegypti	Control	0	16.53	43.62	6.735	0	-	-	-
	10	23.00±3.83	(14.20–18.85)	(37.83–51.88)		89.00±8.25			
	30	85.00±6.83				99.00±2.00			
	50	97.00±3.83				100			
	70	98.00±2.31				100			
	90	99.00±2.00				100			
	110	99.00±2.00				100			
Ae. albopictus	Control	0	34.62	143.85	8.940	0	14.52	35.56	4.940
	10	9.00±3.83	(30.77–39.23)	(108.29–220.16)		26.00±2.31	(12.71–16.16)	(31.64–41.21)	
	20	35.00±11.49				76.00±11.78			
	30	48.00±11.31				82.00±6.93			
	40	64.00±5.66				93.00±6.00			
	50	55.00±2.83				95.00±6.00			
	60	66.00±9.52				100			
Cx. quinquefasciatus	Control	1.00±2.00	0.94	2.77	0.235	2.00±2.31	-	-	-
	2	81.82±8.33	(0.37–1.36)	(2.25–3.43)		90.82±3.83			
	4	94.95±5.03				100			
	6	98.99±5.03				100			
	8	100				100			
	10	100				100			
An. minimus	Control	1.00±2.00	20.99	40.74	8.274	6.00±4.00	7.73	14.95	1.593
	5	1.01±2.31	(19.73–22.42)	(36.10–48.20)		18.69±9.45	(7.03–8.39)	(13.63–16.71)	
	10	10.10±3.83				72.34±8.33			
	15	21.21±9.52				90.43±5.03			
	20	38.38±7.57				96.81±6.00			
	25	65.66±10.07				97.87±2.31			
	30	80.81±3.83				100			

Values of mortality rate were expressed as mean±SD. χ^2: chi-square test, $P<0.05$ represented significant difference.
[a]The mortality rates were very high, so the parameters could not be calculated.

While *An. minimus* was the species most susceptible to crude extract, this did not hold true for fractionated extracts. On the contrary, the mosquitoes most susceptible to RC-DT 012 (LC_{50} 0.66 mg/L) and RC-DT 013 (LC_{50} 0.94 mg/L) were *Cx. quinquefasciatus*, which had the lowest LC_{50} values. Furthermore, *Cx. quinquefasciatus* had the highest tolerance (LC_{90} 282.86 mg/L) to crude extract compared to other species: *Ae. aegypti* (LC_{90} 224.73 mg/L), *Ae. albopictus* (LC_{90} 261.75 mg/L), and *An. minimus* (LC_{90} 77.88 mg/L). This outcome could not be explained because of the data limitations of this study. However, we hypothesize that both fractions (RC-DT 012 and RC-DT 013) must contain compounds that are highly toxic only to *Culex* larvae.

The fractionated extracts of *D. loureiri* provided much better larvicidal efficacy against mosquito vectors than crude extract, which concurs with studies on *Sphaeranthus indicus* Linn. (Asteraceae) extracts. In those studies, steam-distilled crude extract of leaves were compared with the most effective fractionated ethyl acetate extract of the whole plant[16,17], revealing that fractionated extract is more effective than crude extract against *Ae. aegypti* (24-h LC_{50} 36.76 ppm *vs* 140 ppm, respectively) and *Cx. quinquefasciatus* (24-h LC_{50} 32.60 ppm *vs* 130 ppm, respectively).

Our findings suggest that the larvicidal activity of crude extract was not a synergistic action of all compounds in the extract, echoing another recent study that reported the same[18]. In that study, only two of seven groups of fractionated extracts of *Acacia pennata* (L.) Willd. subsp. *insuavis* shoot tips contained compounds active against *Ae. aegypti* larvae. The LC_{50} values of the Fr-G2 and Fr-G3 fractions were 50.75 and 39.45 mg/L, respectively, while the LC_{90} values of the other fractions (Fr-G1 and Fr-G4–Fr-G7) were > 100 mg/L. Similarly, our study found that the active substances in *D. loureiri* extract were contained only in RC-DT 012 and RC-DT 013, which had the lowest LC_{50} and LC_{90} values for all tested mosquito species.

Phytochemical studies have revealed several flavonoids isolated from stems of *D. loureiri*, including homoisoflavans[9], dihydrochalcone[19], and stilbenoid[20]. Of those, (2S)-pinocembrin, (3S)-7,4'-dihydroxy-3-(4-hydroxybenzyl)-chromane, and loureirin D have antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*; and 7,4'-dihydroxyflavan is fungitoxic against *Botrytis cinerea* and *Cladosporium herbarum*[9]. Studies by Meksuriyen and Cordell and Ichikawa *et al.* have reported that retrodihydrochalcones and homoisoflavones isolated from stem wood are estrogen agonists[19,21]. In addition, stilbenoids, isolated from stem wood are potent inhibitors of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 enzymes[20]. Although some phytochemical constituents and their activities have been studied, the phytochemical compounds in the fruit endocarp of *D. loureiri* have never been investigated. Moreover, until our previous study of crude extract[11], the larvicidal activity of *D. loureiri* has never been elucidated. Thus, the results of this study could not be compared to

the results of other studies. Further studies on the larvicidal activity of *D. loureiri* extract, phytochemical constituent analysis (*e.g.*, gas chromatography-mass spectroscopy)[22], purification, and mosquito larvicide evaluation of substances purified from the RC-DT 012 and RC-DT 013 groups must be performed.

Conflict of interest statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Naresuan University Research Fund (Reference Number: R2560B052) for the financial support and Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University for the laboratory facilities. We would like to thank Asst. Prof. Dr. Anuluck Junkum, the staff of Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand, and Dr. Danita Champakaew for their laboratory assistance.

References

[1]Sallam MF, Fizer C, Pilant AN, Whung PY. Systematic review: Land cover, meteorological, and socioeconomic determinants of *Aedes* mosquito habitat for risk mapping. *Int J Environ Res Public Health* 2017; 14(10): e1230.

[2]Taai chum K, Kongmee M, Mangkit S, Bangs MJ, Chareonviriyaphap T. *Anopheles* species diversity and distribution of the malaria vectors of Thailand. *Trends Parasitol* 2015; 31(3): 109-119.

[3]Huang YS, Heitzebach SM, Park SL, Diggs S, Barrett AD, Hui WW, et al. Differential infectivities among different Japanese encephalitis virus genotypes in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *PLOS Negl Trop Dis* 2016; 10(10): e0005038.

[4]Chareonviriyaphap T, Bangs MJ, Suwonkerd W, Kongmee M, Corbel V, Ngoen-Klan R. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. *Parasit Vectors* 2013; 6(01): e280.

[5]George L, Lenhart A, Toledo J, Lazzari A, Hao WW, Velayudhan R, et al. Community-effectiveness of temephos for dengue vector control: A systematic literature review. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9(9): e0004006.

[6]Grisales N, Poupardin R, Gomez S, Fonseca-Gonzalez I, Ranson H, Lenhart A. Temephos resistance in *Aedes aegypti* in Colombia compromises dengue vector control. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7(9): e2438.

[7]Cheab AM, Pimenta FG, Coelho GE, Braga IA, Lima JBP, Cavalcante KRLJ, et al. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio De Janeiro* 2016; 111(5): 311-321.

[8]Bellinato DF, Viana-Medeiros P, Araujo SC, Martins AJ, Lima JBP, Valle D. Resistance status to the insecticides temephos, deltamethrin, and diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* population. *BioMed Res Int* 2016; 2016(4): 1-12.

[9]Meksuriyen D, Cordell GA. Traditional medicinal plants of Thailand, IX. 10-hydroxy-11-methoxydracaenones and 7,10-dihydroxy-11-methoxydracaenone from *Dracaena loureiri*. *J Nat Prod* 1987; 50(6): 1118-1125.

[10]Makchuchit S, Itharat A, Tewtrakul S. Anti-allergic activity of Thai medicinal plants. *Planta Med* 2009; 75(09). Doi: 10.1055/s-0029-1234527.

[11]Thongwai D, Lamlertkon S, Punsuk U, Buncha N. Larvicidal activity of endocarp and seed crude extracts of *Dracaena loureiri* Gagnep against *Aedes aegypti* (L.) mosquito. *Asian Pac J Trop Biomed* 2017; 7: 222-226.

[12]Ow Yang CK, Sta Maria FL, Wharton RH. Maintenance of a laboratory colony of *Anopheles maculatus* Theobald by artificial mating. *Mosq News* 1963; 23: 34-35.

[13]Finney DJ. *Probit analysis*. 3rd edition. Cambridge: Cambridge University Press; 1971, p. 1-333.

[14]Govindarajan M, Kadalkumaru S, Alharbi NA, Benelli G. Acute toxicity and repellent activity of the *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae) essential oil against four mosquito vectors of public health importance and its biosafety on non-target aquatic organisms. *Environ Sci Pollut Res Int* 2016; 23(22): 23228-23238.

[15]Veal T, Pushpanathan T, Mohanraj J. Larvicidal and ovicidal activity of *Terminalia chebula* Retz. (Family: Combretaceae) medicinal plant extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *J Parasit Dis* 2017; 41(3): 693-702.

[16]Chellappandian M, Thanigaivel A, Vasantha-Srinivasan P, Edwin ES, Ponsankar A, Selin-Rani S, et al. Toxicological effects of *Sphaeranthus indicus* Linn. (Asteraceae) leaf essential oil against human disease vectors, *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* Linn., and impacts on a beneficial mosquito predator. *Environ Sci Pollut Res* 2017. Doi: 10.1007/s11356-017-8952-1.

[17]Arivoli S, Tennyson S, Raveen R, Jayakumar M, Senthilkumar B, Govindarajan M, et al. Larvicidal activity of fractions of *Sphaeranthus indicus* Linnaeus (Asteraceae) ethyl acetate whole plant extract against *Aedes aegypti* Linnaeus 1762, *Anopheles stephensi* Listen 1901 and *Culex quinquefasciatus* Say 1823 (Diptera: Culicidae). *Int J Mosq Res* 2016; 3: 18-30.

[18]Thongwai D, Gamrnoo L, Chotchaisin R. Larvicidal and pupicidal activities of crude and fractionated extracts of *Acacia pennata* (L.) Willd. Subsp *insuavis* shoot tips against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2017; 48: 27-36.

[19]Ichikawa K, Kitaoka M, Taki M, Takashi S, Yasutera I, Boriboon M, et al. Retrodihydrochalcones and Homoisoflavones Isolated from Thai medicinal plant *Dracaena loureiri* and their estrogen agonist activity. *Planta Med* 1997; 63(06): 540-543.

[20]Ichiwitayawuid K, Sawasdee K, Kuntikarn K. Flavonoids and stilbenoids with COX-1 and COX-2 inhibitory activity from *Dracaena loureiri*. *Planta Med* 2002; 68(09): 841-843.

[21]Meksuriyen D, Cordell GA. Retrodihydrochalcones from *Dracaena loureiri*. *J Nat Prod* 1988; 51(6): 1129-1135.

[22]Fayemiwo KA, Adeleke MA, Okaiyo DP, Awujide SH, Awaniyi IO. Larvicidal efficacies and chemical composition of essential oils of *Baeckea xylocarpa* and *Syzygium aromaticum* against mosquitoes. *Asian Pac J Trop Biomed* 2014; 4: 30-34.