

การสกัดและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรหนอนตายหยาก Extraction and Biological Evaluation of *Stemona collinsae* Craib

สมหมาย ปะติตังโข^{1*} และกิงแก้ว ปะติตังโข²

Sommai Patitungkho^{1*} and Kingkaew Patitungkho²

¹สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ บุรีรัมย์ 31000

²สาขาวิชาบรรณารักษศาสตร์และสารนิเทศศาสตร์ คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ บุรีรัมย์ 31000

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Rajabhat Buriram University, Buriram, Thailand 31000

²Department of Library and Information, Faculty of Humanities and Social Sciences, Rajabhat Buriram University
Buriram, Thailand 31000

*Corresponding author: sommai.pt@bru.ac.th

Received: February 16, 2022

Revised: February 02, 2023

Accepted: March 24, 2023

Abstract

Stemona collinsae Craib is found throughout all regions of Thailand. This kind of herb possesses medical efficiency preserved with villagers' local wisdom. The purpose of this research was to extract the *Stemona collinsae* Craib herb. The total phenolics were determined with the Folin-Ciocalteu and antioxidant activities were assessed using the DPPH assays. Biological activities of crude extracts were investigated against citrus canker and to compare its effects with copper sulfate solution and *Bacillus cereus* bio-fermentation formula used for farmers. The results revealed that crude dichloromethane extract contains a maximum of total phenolics content 6.21 ± 0.83 mg/L. The DPPH radical scavenging activity of the crude dichloromethane extract showed the best efficiency at IC_{50} of 46.62 mg/L. The crude ethanol extract inhibited bacteria that caused canker disease with the best an average clear zone of $12.67.00 \pm 1.73$ mm which better than copper sulfate solution and *Bacillus cereus* bio-fermentation formula. Moreover, the crude ethanol extract also repels mealybugs, blue mealybugs and red riders of lime.

Keywords: biological evaluation, natural products extraction, *Stemona collinsae* Craib

บทคัดย่อ

หนอนตายหยาก (*Stemona collinsae* Craib) มีอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย มีประสิทธิภาพทางยาตามภูมิปัญญาท้องถิ่นมากมาย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์

ที่จะนำสมุนไพรหนอนตายหยากมาสกัด หาปริมาณฟีนอลิกรวม ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอส การต้านโรคแคงเกอร์ของมะนาว และเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดกับสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตและน้ำหมักชีวภาพสูตรผสม *Bacillus cereus* ที่เกษตรกรใช้

ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงสุด 6.21 ± 0.83 มก./ลิตร ส่วนฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH พบว่าสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดที่ IC_{50} เท่ากับ 46.62 มก./ลิตร สารสกัดหยาบเอทานอลออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสาเหตุของโรคแคงเกอร์ได้ดีที่สุดด้วยค่าเฉลี่ยของเคลียร์โซน $12.67.00 \pm 1.73$ มม. และออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตและน้ำหมักชีวภาพสูตรผสม *Bacillus cereus* นอกจากนี้สารสกัดหยาบเอทานอลยังสามารถออกฤทธิ์ต้านเพลี้ยแป้งเพลี้ยแป้งสีชมพูและด้านไรแดงที่เป็นศัตรูของมะนาวได้อีกด้วย

คำสำคัญ: การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลผลิตภัณฑ์
ธรรมชาติการสกัด หนอนตายหยาก

คำนำ

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติคือสิ่งที่ได้จากพืช สัตว์ จุลินทรีย์ และแร่ธาตุ ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นยา รักษาโรครวมถึงเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารบำรุงสุขภาพ เครื่องสำอาง ปัจจุบันการใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางการเกษตรได้รับความนิยมสูงขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากสามารถก่อให้เกิดผลดีต่อร่างกายในด้านต่าง ๆ และผู้บริโภคมีความเชื่อมั่นเนื่องจากไม่ใช้สารสังเคราะห์ จึงมีความปลอดภัยสูง สมุนไพรที่นำมาใช้จำนวนมากมีทั้งที่อยู่ในรูปของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ นอกจากนั้นยังมีการเตรียมตำรับสมุนไพรในรูปแบบหรือลักษณะต่าง ๆ เพื่อความสะดวกในการนำไปประยุกต์ใช้ เช่น ครีม แคปซูล เจล และเม็ด เป็นต้น ตลอดจนมีการวิจัยสมุนไพรหลายชนิดเกี่ยวกับการออกฤทธิ์รักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับยาแผนปัจจุบัน ฤทธิ์ส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง รักษาโรคเบาหวาน ชะลอความแก่ชรา เช่น ผลิตภัณฑ์แทกซอล (Taxol) สารสกัดจากสาหร่ายทะเลเพื่อใช้ต้านมะเร็งและผลิตภัณฑ์

สมุนไพรหลายชนิดใช้เป็นยาบำรุงกำลัง เสริมสร้างความแข็งแรง ได้แก่ กวาวเครือ แปะก๊วย ลูกยอ และอื่น ๆ ผลิตภัณฑ์ที่ใช้เป็นเครื่องสำอางประทิ่นผิว ได้แก่ พลูและขมิ้นชัน นอกจากนี้ยังมีสมุนไพรที่ใช้เป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัสหรือกำจัดแมลงศัตรูพืช และฆ่าปรสิต (Deewatthanawong *et al.*, 2019) เช่น ดาวเรือง ขมิ้นชัน กระเทียม น้อยหน่า และทุเรียนเทศ เป็นต้น โดยสมุนไพรที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นสมุนไพรที่มีการใช้กันมาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลายาวนาน ดังที่ปรากฏในตำรายาพื้นบ้าน รวมทั้งเป็นสมุนไพรที่มีการรายงานในบทความวิจัยต่าง ๆ ขณะนี้มีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาและค้นหาผลิตภัณฑ์ที่สำคัญจากสมุนไพรเพิ่มมากขึ้นเพื่อนำมาใช้รักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ซึ่งนักวิจัยสามารถนำสมุนไพรไทยพัฒนาตำรับยา แคปซูลเคอราเพื่อการดูแลตนเองของผู้เข้าข่ายติดเชื้อ (Butcha *et al.*, 2022) เพื่อลดการนำเข้าของยาหรือสารเคมีจากต่างประเทศที่มีราคาแพงและให้ผลในการรักษาที่ไม่น่าพอใจ เพราะเกิดการดื้อต่อยา (Multidrug-Resistant; MDR) ในเวลาต่อมาอีกด้วย

หนอนตายหยาก เป็นพืชสมุนไพรสกุล *Stemona* วงศ์ Stemonaceae ที่ภูมิปัญญาพื้นบ้านของไทยนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น ป้องกันการเกิดหนอนปลาร้า ทาแผลป้องกันการเกิดหนอน กำจัดเห็บ (Kontun, 2014) กำจัดทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของแมลงสาบอเมริกา (Charoensuk, 2017) ยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Charoensuk, 2017) ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพริกต้น เชื้อรา *Pythium delicense* ที่ก่อโรคในผัก เชื้อรา *Pythium parasitica* ที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าในไม้ผลโดยเฉพาะในทุเรียน และเชื้อรา *Pythium oxysporum* ที่เป็นสาเหตุหลักของโรคเหี่ยวในไม้ดอกไม้ประดับ (Montri *et al.*, 2014) พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สเปรย์กำจัดเห็บสุนัข (*Rhipicephalus sanguineus*) ซึ่งเป็นแมลงที่พบเกาะติดแน่นอยู่ใต้ขนสุนัขทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ในสุนัข เช่น สภาวะโลหิตจาง

เกิดบาดแผลบนผิวส่งผลให้เกิดแผลติดเชื้อและโรคติดเชื้อพยาธิในเม็ดเลือดต่าง ๆ อีกหลายโรค (Kontun, 2014) สามารถออกฤทธิ์ฆ่าตัวอ่อนพยาธิตัวกลมของแพะได้ดีเท่ากับยาไอเวอร์เมคติน® (Boonkusoli *et al.*, 2022) ขับไล่และลดการวางไข่ของผีเสื้อหนอนใยผัก เนื่องจากหนอนตายหายากสร้างสารทุติยภูมิสติลบินอยด์ (Stilbenoids) ซึ่งเป็นสารกลุ่มพอลิฟีนอล (Polyphenols) ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีและมีขอบเขตในการออกฤทธิ์กว้าง (Montri *et al.*, 2014)

มะนาวเป็นพืชผักสวนครัวที่อยู่คู่คนไทยมานาน มะนาวจึงจัดเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย เป็นพืชวงศ์ Rutaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle คนไทยเรานิยมใช้มะนาวสำหรับปรุงอาหาร ส่วนชาวต่างชาตินอกจากจะใช้ปรุงอาหารแล้วยังใช้คั้นน้ำเป็นเครื่องดื่มที่นิยมกันมาก การบริโภคมะนาวยังทำให้ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันมะเร็ง เบาหวาน ชะลอความแก่ และป้องกันโรคอื่น ๆ ในทางอุตสาหกรรมยังใช้สารสกัดน้ำมันจากผิวมะนาวเพื่อเป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางและผสมยารักษาโรคบางชนิด มะนาวสามารถปลูกได้ทุกภาคทั่วประเทศทำรายได้ให้กับเกษตรกรไม่น้อย แต่การปลูกมะนาวกำลังประสบปัญหาการระบาดของเชื้อแบคทีเรีย (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) สาเหตุของโรคแคงเกอร์ และแมลงศัตรูพืชส่งผลให้พื้นที่ปลูกมะนาวลดลงมาก (Sapapporn and Thanikkun, 2013) อย่างไรก็ตามประเทศไทยยังมีข้อได้เปรียบด้านความอุดมสมบูรณ์ของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและความหลากหลายทางชีวภาพซึ่งเป็นที่ประจักษ์ ดังนั้นคณะผู้วิจัยต้องการที่จะหาวิธีการแก้ปัญหาโรคแคงเกอร์มะนาว รวมทั้งพืชตระกูลส้มชนิดอื่น ๆ โดยการนำสมุนไพรที่มีมากในท้องถิ่นมาทำการสกัดเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activities) และการค้นหาสารต้นแบบ (Lead compound) จากสมุนไพรหนอนตายหยาก (*Stemona collinsae* Craib) เพื่อนำไปใช้ในแก้ปัญหาให้กับกลุ่มเกษตรกรที่ปลูกมะนาวและพืชตระกูลส้มที่ระบาดอย่างรุนแรงอยู่ในขณะนี้

รวมทั้งศึกษาหาแนวทางการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้สารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านโรคแคงเกอร์ของมะนาวให้กับชุมชน และเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดกับสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตและน้ำหมักชีวภาพที่ผสมแบคทีเรีย *Bacillus cereus*

อุปกรณ์และสารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยทั้งหมดเป็นเกรดการวิเคราะห์ (AR grade): ดีพีพีเอช (DPPH; 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ของ FlukaChemie (Germany) ฟูลิน-ซีโอคัลเซอรีเอเจนต์ (Folin-Ciocalteu reagent) กรดแกลลิก (Gallic acid) ของ Sigma-Aldrich (USA) โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ของ Ajax Finechem (New Zealand) ไมโครปิเปต (Mechanical Pipettors BIOHIT) ของ Merck (Germany) เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary vacuum evaporator) และเครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV spectrophotometer, USA)

วิธีดำเนินการวิจัย

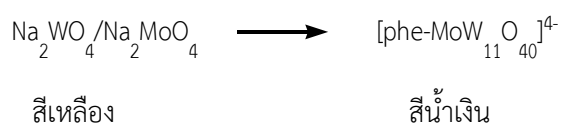
การสกัดสารสำคัญสมุนไพรหนอนตายหยาก

เก็บสมุนไพรหนอนตายหยากจากป่าชุมชนปะคำ ตำบลปะคำ อำเภอปะคำ จังหวัดบุรีรัมย์ ในครั้งนี้ใช้วิธีสำรวจแบบเป็นระบบ (Systematic sampling) โดยการวางแผนสำรวจสี่เหลี่ยม (Quadrats) ขนาดกว้าง 4 เมตร ยาว 4 เมตร ระยะห่างระหว่างแปลง 16 เมตร (Thapayai *et al.*, 2017) โดยวางแผนในพื้นที่ศึกษา 12 แปลง การสำรวจเริ่มทำในฤดูฝนในเดือนกันยายน และเก็บตัวอย่างหนอนตายหยากมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นบาง ๆ ผึ่งลมจนแห้งสนิท แล้วชั่งสมุนไพรแห้งจำนวน 500 กรัม ใส่ลงในถุงผ้ามัดปากถุงให้แน่นใส่ลงในโถแก้ว สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่างกัน ปริมาตร 3,000 มล. ได้แก่ เฮกเซนไดคลอโรมีเทน

เอทิลแอลกอฮอล์เอทานอล และเมทานอล ตามลำดับ นำสาร
สกัดสมุนไพรที่กรองแล้วมาระเหยตัวทำลายด้วยเครื่อง
ระเหยสุญญากาศแบบหมุน และเก็บที่อุณหภูมิ 4°C.

การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic compounds)

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธีฟูลิน-ซีโอสต์ (Folin-Ciocalteu method) (Rutnakornpituk, 2017; Thumpala and Seanthaweewasuk, 2018) โดยมีขั้นตอนที่สำคัญ ดังนี้ การเตรียมสารละลายฟูลิน-ซีโอสต์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยปิเปตสารละลายฟูลิน-ซีโอสต์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 10 มล. ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 75 กรัม/ลิตร โดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 100 มก./ลิตร โดยชั่ง 0.0100 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 10-100 มก./ลิตร เตรียมสารสกัดหนอนตายหยากเข้มข้น 50 มก./ลิตร โดยชั่งสารสกัด 0.0025 มก. ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 25 มล. ปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัด 0.5 มล. เติมสารละลายฟูลิน-ซีโอสต์เข้มข้น 2.5 มล. เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2.0 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วปล่อยไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร



ทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีดีพีพีเอช (DPPH method)

วิธีตีฟิฟิเชเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ความถูกต้อง
ความแม่นยำสูง ง่าย สะดวก และรวดเร็ว

(Rutnakornpituk, 2017) ขั้นตอนการวิเคราะห์เริ่มจากการเตรียมสารละลายดีพีพีเอชความเข้มข้น 100 มก./ลิตร ในสารละลายเมทานอลแล้วเตรียมสารตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน BHT ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 25, 50 และ 100 มก./ลิตร ตามลำดับ โดยใช้ขวดสีชา 45 ขวด เพราะในแต่ละความเข้มข้นจะต้องใช้ขวดสีชาจำนวน 3 ขวด และอีก 1 ขวดเป็นขวดควบคุม รวมเป็น 46 ขวด ปิเปต 1 มล. ของสารละลายตัวอย่างและสารมาตรฐาน ในแต่ละความเข้มข้นใส่ในขวดสีชา 3 ใบ เพื่อทำการทดสอบสารตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นปิเปตสารละลายดีพีพีเอช 2 มล. ใส่ขวดสีชาในแต่ละความเข้มข้นเขย่าให้สารเข้ากัน นำขวดทั้ง 46 ขวดไปเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (%Radical scavenging) จากสมการ

$$\% \text{Radical scavenging} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

เมื่อ A_{control} เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มควบคุม
 A_{sample} เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดรากหนอน
ตายหยากต่อโรคแคงเกอร์

นำเชื้อแบคทีเรีย 1.5×10^8 CFU/มล. เกลี่ยบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยง PCA โดยใช้ห้วงเชี่ยเชื้อจากสต็อกลงบนจานเพาะเชื้อ เตรียมสารตัวอย่างความเข้มข้น 6.0, 8.0 และ 10.0 มก./ลิตร ปรับปริมาตรด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide; DMSO) นำแผ่นกระดาษกรอง (Paper disc) ขนาด 6 มม. วางบนแผ่นกระดาษสีเหลืองแล้วปิเปตสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นกระดาษกรองในแต่ละความเข้มข้น จากนั้นนำแผ่นกระดาษกรองไปเก็บไว้ในที่ไม่มีแสงสว่างเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาวางบนเชื้อที่เตรียมไว้ ส่วนตัวควบคุม

เชิงลบ (Negative control) ใช้ไคเมทิลซัลฟอกไซด์ 20 ไมโครลิตร นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดเคลียร์โซน (Laend-on *et al.*, 2019)

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดรากหนอนตายหายากต่อโรคแคงเกอร์ในแปลงทดลอง

จากผลการทดลองตามหัวข้อข้างต้น ได้คัดเลือกสารสกัดหายากของสมุนไพรรากหนอนตายหายากที่ออกฤทธิ์อย่างจำเพาะต่อเชื้อโรคที่ดีที่สุด มาทำการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคแคงเกอร์ในแปลงทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomize Design; CRD) มีทั้งหมด 3 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น เตรียมสารสกัดที่คัดเลือกแล้วจากการทดลองให้มีความเข้มข้นที่มีปริมาณเนื้อสารสกัดเป็น 10.0 มก. ผสมสารจับใบอัตรา 2 หยดต่อน้ำ 20 มล. นำไปฉีดพ่นบนต้นมะนาวที่มีอายุ 1 ปี แต่ละต้นตามกรรมวิธีต่าง ๆ ที่กำหนดไว้ในช่วงเย็นในเดือนกุมภาพันธ์ ถึง มีนาคม ส่วนแปลงควบคุมใช้น้ำกลั่น (Vudhivanich, 2016)

ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

นำสารสกัดรากหนอนตายหายากที่ออกฤทธิ์อย่างจำเพาะต่อเชื้อโรคที่ดีที่สุดมาทำการทดสอบฤทธิ์การต้าน

เชื้อแบคทีเรียในแปลงทดลอง (Deewatthanawong *et al.*, 2019) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomize Design; CRD) มีทั้งหมด 3 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น เตรียมสารสกัดหายากแต่ละชนิดที่คัดเลือกแล้วจากการทดลองให้มีความเข้มข้นที่มีปริมาณเนื้อสารสกัดเป็น 10.0 มก. นำไปฉีดพ่นในแปลงทดลองในช่วงเย็น ส่วนในแปลงควบคุมใช้น้ำกลั่นสำหรับกรณีของเชื้อราและเชื้อราแดงได้ดำเนินการทำนองเดียวกันและแยกแปลงทดลอง

ผลการวิจัย

ผลการเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรรากหนอนตายหายาก

จากการพิจารณาลักษณะของหนอนตายหายากทางพฤกษศาสตร์ ลักษณะลำต้น ลักษณะดอก การเรียงตัวของใบ ลักษณะหัว รวมทั้งพื้นที่ที่พบ ระบุได้ว่าเป็นชนิด *Stemona collinsae* Craib เนื่องจากเกิดตามป่าดงดิบเขา มีลักษณะลำต้นเป็นเถา ใบรูปหัวใจปลายเรียว โใบโตและยาว เส้นใบวิ่งตามยาว ประมาณ 15 เส้น มีสีเขียวอ่อน รากเป็นหัวเก็บอาหารมีลักษณะกลมยาวเฉลี่ย 50 ซม. และเป็นพวง ดอกมีเฉพาะกลีบดอกสีเขียวอ่อน มีเกสรสีชมพู ขนาดของดอกใหญ่กว่าหนอนตายหายากขนาดเล็ก (Figure 1)



Figure 1 The general characteristics of *Stemona collinsae* Craib

ผลการหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมจากสารสกัดหยาบของสมุนไพรหนอนตายหายาก โดยวิธีฟูลิน-ซิโอสต์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาการถ่ายโอนอิเล็กตรอนระหว่างสารประกอบฟีนอลิกและสารละลายฟูลิน-ซิโอสต์ที่ประกอบด้วยโมลิบดีนัมและทังสเตน ที่อยู่ในรูปของไอออน Mo^{6+} และ W^{6+} ที่ทำให้สารละลายมีสีเหลือง เมื่อไอออนรับอิเล็กตรอนจากสารฟีนอลิกจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ

สารเชิงซ้อนฟอสโฟโมลิบเดต/ฟอสโฟทังสเตต ($[phe-MoW_{11}O_{40}]^{4+}$) ที่โลหะทั้งสองมีประจุเป็น Mo^{5+} และ W^{5+} ซึ่งมีสีน้ำเงิน (Srimoon and Niymwan, 2021) ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร พบว่าสารสกัดหยาบไคโคลโรมีเทนมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงสุด 6.21 ± 0.83 มก./ลิตร รองลงมาคือ สารสกัดหยาบด้วยเอทานอล 3.07 ± 0.10 มก./ลิตร (Table 1)

Table 1 Total phenolic contents of *Stemona collinsae* Craib extracts

Samples	Concentration (mg/L)	Absorbance (765 nm)			Polyphenolic content (mg/L)			$\bar{X} \pm SD$
		No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3	
Crude hexane extract	25	0.023	0.025	0.024	0.183	0.314	0.258	0.25 ± 0.06
	50	0.024	0.024	0.031	0.258	0.258	0.651	0.39 ± 0.22
	100	0.034	0.029	0.034	0.820	0.539	0.820	0.73 ± 0.16
Crude dichloromethane extract	25	0.053	0.063	0.053	1.887	2.449	1.887	2.07 ± 0.32
	50	0.079	0.079	0.077	3.348	3.348	3.235	3.10 ± 0.06
	100	0.139	0.138	0.113	6.719	6.662	5.258	6.21 ± 0.82
Crude ethylacetate extract	25	0.026	0.023	0.021	0.370	0.202	0.089	0.22 ± 0.14
	50	0.028	0.028	0.020	0.483	0.483	0.033	0.33 ± 0.26
	100	0.027	0.033	0.028	0.426	0.764	0.483	0.56 ± 0.18
Crude methanol extract	25	0.021	0.022	0.021	0.089	0.146	0.089	0.11 ± 0.03
	50	0.021	0.022	0.022	0.089	0.146	0.146	0.13 ± 0.03
	100	0.022	0.023	0.022	0.146	0.202	0.202	0.18 ± 0.03
Crude ethanol extract	25	0.062	0.061	0.063	2.393	2.337	2.449	2.39 ± 0.05
	50	0.078	0.070	0.069	3.292	2.842	2.786	2.97 ± 0.27
	100	0.073	0.076	0.073	3.011	3.179	3.011	3.07 ± 0.09

ผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบของรากหนอนตายหยาก จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด ดังกล่าวไว้ในวิธีวิจัย เมื่อทราบค่าการดูดกลืนแสงแล้วคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ จะทำให้ทราบค่า IC_{50} พบว่าสารสกัด

หยาบไดคลอโรมีเทนออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดด้วยค่า IC_{50} ต่ำที่สุดเท่ากับ 46.62 มก./ลิตร รองลงมาคือสารสกัดหยาบเฮกเซนมีค่า IC_{50} เท่ากับ 49.09 มก./ลิตร (Figure 2) โดยใช้สารโทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบเชิงบวก (Positive control)

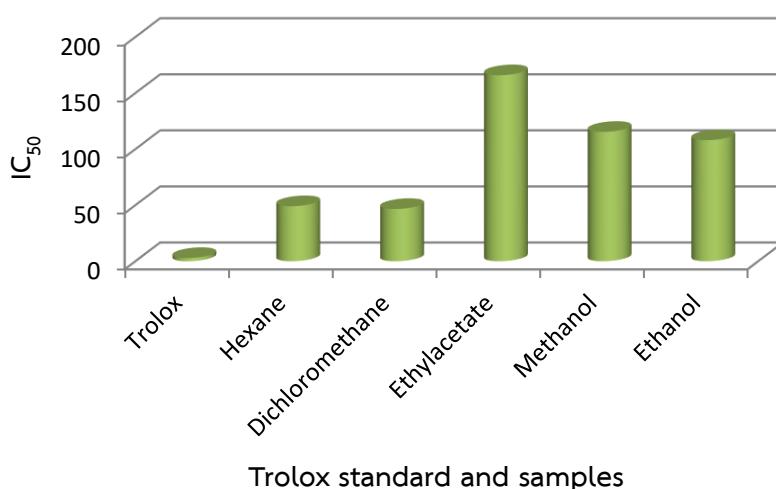


Figure 2 Comparative IC_{50} values of 5 crude extracts with Trolox standard

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดรากหนอนตายหยากในห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคแคงเกอร์ในมะนาว โดยนำสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน

ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอลกอฮอล์ เมทานอล และเอทานอล โดยนำสารสกัดเตรียมความเข้มข้นที่มีปริมาณเนื้อสารสกัดเป็น 6.0, 8.0 และ 10.0 มก. ตามลำดับ ซึ่งแสดงตาม Table 2

Table 2 Antibacterial activities to Citrus Canker

Samples	Concentration (mg/L)	Clear zone (mm)			$\bar{x} \pm SD$
		No.1	No.2	No.3	
Bio-fermented	6.0	7.0	7.0	8.0	7.33±0.19
water mix with	8.0	7.0	9.0	9.0	8.33±1.15
<i>Bacillus cereus</i>	10.0	10.0	9.0	10.0	9.66±0.57
Crude hexane	6.0	7.0	7.0	9.0	8.33±1.02
extract	8.0	7.0	7.0	9.0	8.33±1.02
	10.0	9.0	9.0	10.0	9.33±0.57
Crude	6.0	7.0	8.0	8.0	7.66±0.55
dichloromethane	8.0	7.0	9.0	8.0	8.00±1.00
extract	10.0	7.0	13.0	9.0	9.66±3.05
Crude	6.0	7.0	7.0	9.0	8.33±1.02
ethylacetate	8.0	7.0	7.0	9.0	8.33±1.02
extract	10.0	9.0	9.0	10.0	9.33±0.57
Crude methanol	6.0	7.0	7.0	8.0	7.33±0.19
extract	8.0	7.0	9.0	9.0	8.33±1.15
	10.0	10.0	9.0	10.0	9.67±0.57
Crude ethanol	6.0	7.0	9.0	8.0	8.00±1.00
extract	8.0	7.0	9.0	9.0	8.33±1.15
	10.0	13.0	10.0	10.0	12.67±1.73

จาก Table 2 พบว่าผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคแคงเกอร์ในมะนาว โดยนำสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเทต เมทานอล และเอทานอล เตรียมความเข้มข้นให้มีปริมาณเนื้อสารสกัดอยู่ระหว่าง 6.0, 8.0 และ 10.0 มก. ตามลำดับ เปรียบเทียบกับสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต และน้ำหมักชีวภาพสูตรผสม *Bacillus cereus* พบว่าสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด มีค่าเฉลี่ยของวงเคลียร์โซนที่ $12.67.00 \pm 1.73$ มม. ซึ่งมี

ค่าเฉลี่ยของวงเคลียร์โซนมากกว่าสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต และน้ำหมักชีวภาพสูตรผสม *Bacillus cereus*

ผลการทดสอบฤทธิ์ที่แปลงทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรหนอนตายหยากต่อโรคแคงเกอร์ เปรียบเทียบสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตและน้ำหมักชีวภาพสูตรผสม *Bacillus cereus* โดยเตรียมความเข้มข้นที่มีปริมาณเนื้อสารสกัดเป็น 10.0 มก. แล้วนำไปฉีดพ่นต้นมะนาวที่เกิดโรคแคงเกอร์ทุก ๆ 1 วัน จนครบ 2 สัปดาห์ (Table 3)

Table 3 Antibacterial activities to citrus canker in experimental plot

Samples	Concentration (mg/L)	Number of the day for spraying samples											
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Crude ethanol extract	10.0	-	-	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++
Copper sulphate	10.0	+	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
Bio-fermented water mix with <i>Bacillus cereus</i>	10.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- = inactive to citrus canker; + = starting active to citrus canker; ++ = antibacterial activity with 50; # = leaves and branches of citrus drying

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่สามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนในวันที่ 5 ของการฉีดพ่นและออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 11 ของการฉีดพ่นสำหรับสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ในวันที่ 3 ของการฉีดพ่น แต่วันที่ 4 เป็นต้นไปทั้งกิ่งและใบของมะนาวจะแห้งตาย ส่วนน้ำหมักชีวภาพสูตรผสม *Bacillus cereus* ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* ที่เป็นสาเหตุของโรคแคงเกอร์

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการต้านเพลี้ยแป้ง

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรหนอนตายหยาบต่อเพลี้ยแป้ง โดยเตรียมความเข้มข้นให้มีปริมาณเนื้อสารสกัดเป็น 10.0 มก. แล้วนำไปฉีดพ่นต้นมะนาวที่เกิดโรคเพลี้ยแป้ง โดยทำการทดสอบฤทธิ์ 3 ซ้ำ พบว่าเมื่อฉีดพ่นสารสกัดครั้งที่ 1 เวลาผ่านไป 1 วัน พบว่ายังมีเพลี้ยแป้งติดอยู่ตามกิ่งมะนาว แต่เมื่อฉีดพ่นสารสกัดครั้งที่ 2 พบว่าแป้งที่ติดอยู่กับเพลี้ยแป้งหลุดออก ลักษณะของเพลี้ยแป้งเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเขียวและตายไปในที่สุด

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการต้านเพลี้ยแป้งสีชมพู

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหนอนตายหยาบต่อเพลี้ยแป้งสีชมพู โดยเตรียมความเข้มข้นที่มีปริมาณเนื้อสารสกัดเป็น 10.0 มก. แล้วนำไปฉีดพ่นเพลี้ยแป้งสีชมพูที่เกิดกับต้นมะนาวจำนวน 3 ซ้ำ จากการทดลองพบว่าเมื่อฉีดพ่นสารสกัดครั้งที่ 1 สังเกตผลเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน ปริมาณของเพลี้ยลดลง 60 เปอร์เซ็นต์ ตัวเพลี้ยจะฝ่อตายและหลุดจากต้นมะนาว เมื่อฉีดพ่นสารสกัดครั้งที่ 2 เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน ปริมาณของเพลี้ยลดลง 80 เปอร์เซ็นต์ พบเพลี้ยที่ติดตามกิ่งมะนาวน้อยมากและเมื่อฉีดพ่นสารสกัดครั้งที่ 3 สังเกตผลเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน พบว่าไม่มีเพลี้ยเหลืออยู่

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการต้านไรแดง

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหนอนตายหยาบต่อไรแดง โดยใช้ความเข้มข้นที่มีปริมาณเนื้อสารสกัดเป็น 10.0 มก. ฉีดพ่นไรแดงที่เจริญเติบโตตามกิ่งมะนาวจำนวน 3 ซ้ำ พบว่าเมื่อฉีดพ่นสารสกัดครั้งที่ 1 สังเกตผลเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน ปริมาณของไรแดงลดลง 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อฉีดพ่นสารสกัดครั้งที่ 2 ปริมาณของไรแดงลดลง 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อฉีดพ่นสารสกัดครั้งที่ 3 ไม่มีไรแดงเหลืออยู่ แสดงว่าสารสกัดสมุนไพรหนอนตายหยาบมีฤทธิ์ในการกำจัดไรแดงได้

วิจารณ์ผลการวิจัย

การสกัดรากหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลายที่มีลำดับขั้วต่างกัน โดยเรียงลำดับจากตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วไปหาตัวทำละลายที่มีขั้วสูง ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลเอซิเทต เมทานอล และเอทานอล ได้ปริมาณสารสกัดหยากเฉลี่ย 0.02, 0.26, 0.08, 16.38 และ 0.45 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ จะเห็นว่าสารสกัดหยากด้วยเมทานอลให้ปริมาณสารสกัดหยากมากที่สุด แสดงว่าสารที่เป็นองค์ประกอบในหนอนตายหยาก

ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มสารที่มีขั้ว (Nuntawong, 2015) และเป็นสารสตีลบินอยด์จัดอยู่ในกลุ่มพอลิฟีนอล (Mattioli *et al.*, 2020) มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และสภาวะเครียดชีวสังเคราะห์ของสตีลบินอยด์เกิดผ่านวิถีฟีนิลโพรพานอยด์ และมีโครงสร้างหลักเป็นสตีลบินที่วงเบนซีนทั้งสองข้างมีหมู่แทนที่แตกต่างกัน สตีลบินอยด์ทำหน้าที่เป็นโครงแบบชนิดใหม่ (New scaffold) ในการพัฒนาของสารในกลุ่มนี้โดยมีสูตรโครงสร้างหลักเป็น C6-C2-C6 ซึ่งเป็นสารสตีลบิน และเมื่อสตีลบินถูกเติมหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) จะได้สารสตีลบินอยด์ (Figure 3)

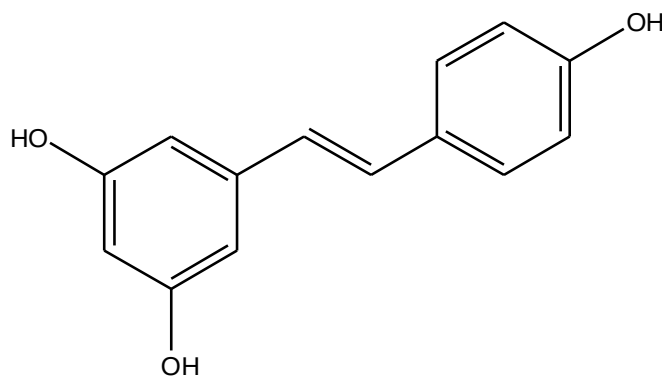


Figure 3 Basic structure of stilbenoid

ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม พบว่าสารสกัดหยากไดคลอโรมีเทนมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด 6.21 ± 0.82 มก./ลิตร รองลงมาคือ สารสกัดหยากด้วยเอทานอล 3.07 ± 0.09 มก./ลิตร แสดงว่าองค์ประกอบของสารสกัดมีสารสตีลบินอยด์ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ที่ดี ซึ่งสามารถเปลี่ยนไอออน Mo^{6+} และ W^{6+} จากสีเหลืองไปเป็น Mo^{5+} และ W^{5+} ที่มีน้ำเงิน (Srimoon and Niymawan, 2021) และผลการต้านอนุมูลอิสระเทคนิค DPPH พบว่าสารสกัดหยากไดคลอโรมีเทนมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุดด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 46.62 มก./ลิตร รองลงมาคือ สารสกัดหยากเฮกเซนมีค่า IC_{50} เท่ากับ 49.09 มก./ลิตร เนื่องจากสารสกัดหยากเหล่านี้มีองค์ประกอบของสารสตีลบินอยด์

มีหมู่ไฮดรอกซิลทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของอนุมูลอิสระ (Free radical quenching) จึงมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Zujko and Witkowska, 2011) ส่วนฤทธิ์การต้านแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคแคงเกอร์ พบว่าสารสกัดหยากด้วยเอทานอลสามารถต้านแบคทีเรียได้ดีที่สุดมีค่าเฉลี่ยของเคลียร์โซน $12.67.00 \pm 1.73$ มม. โดยมีค่าเฉลี่ยมากกว่าสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตและน้ำหมักชีวภาพสูตรผสม *Bacillus cereus* ที่เกษตรกรส่วนใหญ่ใช้กันอยู่ สำหรับกลไกการต้านแบคทีเรียของสารสตีลบินอยด์นั้นเกิดจากสารเข้าไปรบกวนการทำงานของเซลล์เมมเบรน (Membrane-disruption effects) ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm formation) (Li *et al.*, 2021)

นอกจากนี้สารดังกล่าวยังสามารถชักนำทำให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ทำให้สาย DNA แตก (DNA cleavage) ตลอดจนมีผลต่อสมบัติทางกายภาพอื่น ๆ ของแบคทีเรียส่งผลให้แบคทีเรียเสียหายและตายไปในที่สุด (Singh *et al.*, 2019) ส่วนสารคอปเปอร์ซัลเฟตใช้ควบคุมแบคทีเรียได้แต่ควรใช้ในปริมาณที่ต่ำ เนื่องจากสารนี้มีผลต่อใบและกิ่งของมะนาว โดยกลไกการออกฤทธิ์เกิดจากสารเข้าไปจับกับโปรตีนของแบคทีเรียทำให้เซลล์เสียหาย (Vincent *et al.*, 2017) สำหรับการใช้อนุพันธ์จากแบคทีเรีย *Bacillus cereus* เพื่อให้มีประสิทธิภาพต่อแบคทีเรียก่อโรคแคแคงเกอร์ได้ดีจะต้องใช้ในรูปแบบที่เป็นผง (Siwakorn and Brurane, 2016) ส่วนฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลที่มีปริมาณเนื้อสารสกัดเป็น 10.0 mg ต่อเปลือกแห้ง พบว่าสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลสามารถกำจัดเพลี้ยแป้งได้ภายใน 2 วัน และออกฤทธิ์กำจัดเพลี้ยแป้งสีชมพูในเวลา 3 วัน สำหรับฤทธิ์ของสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลต่อไรแดง พบว่าเมื่อฉีด 3 ครั้ง ทุก ๆ 3 วัน ไม่มีไรแดงหลงเหลืออยู่ที่กิ่งมะนาว ทั้งนี้เนื่องจากสารฟีนอลิกมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและทำให้เกิดการตายไปในที่สุด (Golan *et al.*, 2017)

ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่ากลไกการกำจัดศัตรูพืช (ทั้งแบคทีเรีย เพลี้ยแป้ง และไรแดง) ของสารสกัดหยาบหนอนตายหายาก นอกจากจะเกิดผ่านกระบวนการต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังเกิดผ่านกลไกอื่น ๆ อีกด้วย จากผลการวิจัยนี้ทำให้ได้แนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติตัวใหม่ให้กับเกษตรกรที่ปลูกมะนาวและพืชตระกูลส้มอื่น ๆ ต่อไป

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดหยาบของหนอนตายหายากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี โดยเฉพาะสารสกัดหยาบเอทานอลสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas*

campestris pv. *citri* ที่เป็นสาเหตุของโรคแคแคงเกอร์ได้ดีที่สุด ด้วยค่าเฉลี่ยของเคลียร์โซนมากกว่ากรณีของสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตและน้ำหมักชีวภาพสูตรผสม *Bacillus cereus* สำหรับการใช้อนุพันธ์จากแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ที่อยู่ในรูปของสารละลายไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแคแคงเกอร์ ส่วนฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเอทานอลที่แปลงทดลองพบว่าออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 11 และออกฤทธิ์ต้านเพลี้ยแป้งและไรแดงตั้งแต่วันที่ 2 ขึ้นไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.วิชัย บุญแสง ผู้อำนวยการสำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยแห่งชาติ ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัย (HERP สกอ)

เอกสารอ้างอิง

- Boonkusoli, D., N. Munkham and M. Warakdee. 2022. Effects of ethanolic medicinal plant extracts on mortality of goat nematode larva. **Journal of Science and Technology Phetchabun Rajabhat University** 2(1): 50-56. [in Thai]
- Butcha, R., P. Srathong, A. Sarakshetrin, C. Sowat, P. Thepaksorn and K. Chiddee. 2022. Use of Thai herbal recipe “KERRA capsules” self-care of people infected with Corona virus 2019 (COVID-19) disease. **Thai Journal of Public Health and Health Science** 1: 220-235. [in Thai]

- Charoensuk, S. 2017. **Antimicrobial activity of Crude Extract from *Stemona tuberosa* Lour.** [Online]. Available <https://repository.Rmutr.ac.th> (December 15, 2022). [in Thai]
- Deewatthanawong, R., P. Kongchinda, P. Deewattanawong, J. Pumnuan and A. Insung. 2019. GC-MS analysis and biopesticide properties of different crude extracts of *Annona squamosa* and *Annona muricata*. **International Journal of Agricultural Technology** 15(6): 859-868.
- Golan, K., C. Sempruch, E. Górski-Drabik, P. Czerniewicz, B. Łagowska, I. Kot K. Kmiec, K. Magierowicz and B. Leszczyński. 2017. Accumulation of amino acids and phenolic compounds in biochemical plant responses to feeding of two different herbivorous arthropod pests. **Arthropod-Plant Interactions** 11: 675-682.
- Kontun, J.S. 2014. Development of dog tick spray from herbal extracts. **Agricultural Science Journal** 45(2)(Suppl.): 581-584.
- Laend-on, K., S. Patitungkho and K. Patitungkho. 2019. Physico-chemical property and biological activity of dimethyl glyoxime metal nanoparticles level. **KKU. Science Journal** 47(2): 233-242. [in Thai]
- Li, Y., X. Lin, J. Hu, J. Shuai, Y. Wei and D. He. 2021. Synthesis and biological evaluation of stilbene-based peptoid mimics against the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas citri* pv. *citri*. **Pest Management Science** 77(1): 343-353.
- Mattio, L.M., G. Catinella, S. Dallavalle and A. Pinto. 2020. Stilbenoids: a natural arsenal against bacterial pathogens. **Antibiotics** 9: 336. [Online]. Available [doi:10.3390/antibiotics9060336](https://doi.org/10.3390/antibiotics9060336) (December 15, 2022).
- Montri, N., K. Chonnikarn and K. Pornprapa. 2014. Effect of *Stemona curtisii* Hook. f. crude extract on growth inhibition of some pathogenic fungi. **Khon Kaen Agriculture Journal** 42(suppl.3): 649-653. [in Thai]
- Nuntawong, N. 2015. **Natural Product**. Chiang Mai: Chiang Mai University. 79 p.
- Rutnakornpituk, B. 2017. **Study of Total Phenolic Compounds, Antioxidant Activity and Active compounds in Crude Extracts from *Stemona tuberosa* Lour.** Phitsanulok: Faculty of Science, Naressuan University. 47 p. [in Thai]
- Sapapporn, N. and N. Thanikkun. 2013. Bioactive compound production from isolated *Pseudomonas* sp. inhibits the citrus canker bacteria. **The Golden Teak: Science and Technology** 4(1): 77-79. [in Thai]

- Singh, D., R. Mendonsa, M. Koli, M. Subramanian and S.K. Nayak. 2019. Antibacterial activity of resveratrol structure analogues: a mechanistic evaluation of the structure-activity relationship. **Toxicology and Applied Pharmacology Journal** 367: 23-32.
- Siwakorn, N. and P. Bruranee. 2016. **Controlling in Canker disease of pummelo by medicinal plants.** [Online]. Available <https://www.doa.go.th> (December 25, 2022). [in Thai]
- Srimoon, R and S. Niymwan. 2021. Development and validation of the Folin-Ciocalteu semi-micro method for total phenolic compounds determination in Rangdaeng (*Ventilago denticulate* Willd.) extract. **Burapha Science Journal** 26(1): 378-398. [in Thai]
- Thapyai, C., K. Reuankon and T. Boonma. 2017. Species diversity of undergrowth plants in Ban Lai Pho agroforest, Bang Rakam districk, Phitsanulok. **Nakhon Phanom University Journal** 2(1): 22-34.
- Thumpala, W. and N. Seanthaweek. 2018. Total phenolic and total flavonoid content, antioxidant an extract of seed-under-leaf (*Phyllanthus amarus* (Schumacher)). **Khon Kaen Agriculture Journal** 46(Suppl.1): 1331-1335.
- Vincent, M., R.E. Duval, P. Hartemann and M. Engels-Deutsch. 2017. Contact killing and antimicrobial properties of copper. **Journal Applied Microbiology** 124: 1032-1046.
- Vudhivanich, S. 2016. Potential of *Chebulic myrobalan* fruit crude extract on decreasing lime canker disease virulence. **Journal of Science and Technology** 5(1): 16-28.
- Zujko, M.E. and A.M. Witkowska. 2011. Antioxidant potential and polyphenol content of selected food. **International Journal of Food Properties** 14(2): 300-308.