

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Article

การทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบเกี่ยวกับฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน ของน้ำมันหอมระเหยสกัดจากพืช

A systematic review of larvicidal effect of essential oils from plants against *Aedes aegypti* larvae

นที ชาวนา* วท.ม. (กีฏวิทยา)

Natee Chaona*, M.Sc. (Entomology)

ปราณ สุขุมลนันทน์* ส.บ.

Pran Sukumolanan*, B.P.H.

อัจฉริยา มหาวงค์* วท.บ. (สาธารณสุขศาสตร์)

Artchariya Mahawong*, B.Sc. (Public Health)

จิรปริยา บุญสงค์* ส.ม.

Jirapreeya Bunsong*, M.P.H.

สมรภพ บรรหารักษ์** ปร.ด. (พยาบาลศาสตร์)

Samoraphop Banharak**, Ph.D. (Nursing Science)

*สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 9

Office of Disease Prevention and Control Region 9,

จังหวัดนครราชสีมา

Nakhon Ratchasima

**คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Faculty of Nursing, Khon Kaen University

Received: September 19, 2018

Revised: March 20, 2019

Accepted: April 3, 2019

บทคัดย่อ

โรคไข้เลือดออกเป็นโรคประจำถิ่น (endemic area) ของไทยที่มีการแพร่ระบาดและมีอัตราการเสียชีวิตสูงขึ้น วิธีการป้องกันโรคไข้เลือดออกที่ดีที่สุดวิธีหนึ่งคือ การหลีกเลี่ยงไม่ให้ยุงกัดและการกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุงเพาะจากการศึกษาพบว่า สารสกัดจากพืชมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ แต่ยังไม่มีการรวบรวมว่ามีพืชชนิดใดบ้าง ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาชนิดของพืชที่สามารถนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยเพื่อฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน โดยใช้กระบวนการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบ เพื่อศึกษาชนิดของพืช ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย และฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการ โดยใช้คำสำคัญในการสืบค้นข้อมูลจาก 3 ฐาน คือ SCOPUS, PROQUEST และ SPRINGER จากงานวิจัยที่ตีพิมพ์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2551 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2560 พบงานวิจัยทั้งสิ้น 440 เรื่อง เมื่อคัดเลือกตามเกณฑ์ ได้งานวิจัยที่เกี่ยวข้องทั้งสิ้น 7 เรื่อง ผลการศึกษาพบว่า พืชที่สามารถนำมาสกัดเพื่อฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านเรียงตามการออกฤทธิ์สูงสุดไปต่ำสุด ได้แก่ (1) ส้มเกลี้ยงหรือส้มแขก *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (2) พืชสกุลพริกไทย *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (3) พืชสกุลขิง *Zingiber nimmonii* (J. Graham) Dalzell (4) พืชวงศ์ทานตะวัน *Blumea eriantha* (5) พืชสกุลขิง *Zingiber cernuum* (6) สนสามใบ *Pinus kesiya* (7) กานพลู *Syzygium aromaticum* (L.) Merr และ (8) พืชวงศ์ส้มและมะนาว *Clausena dentata* (Willd) M. Roam โดยสามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านระยะ 3 และระยะ 4 ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งพิจารณาจากค่า LC₅₀ ที่ความเข้มข้น 11.92, 30.52, 44.46, 44.82, 44.88, 57.00, 93.56 และ 140.20 ppm ตามลำดับ ผลการทบทวนวรรณกรรมครั้งนี้ช่วยให้สามารถนำความรู้เกี่ยวกับน้ำมันหอมระเหยจากพืชมาพัฒนาเป็นสารฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน รวมทั้งขึ้นนำการศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านในสถานการณ์จริง เพื่อควบคุมปริมาณยุงลายและลดอุบัติการณ์การเกิดโรคไข้เลือดออกต่อไป

Abstract

Dengue hemorrhagic fever (DHF) is endemic disease in Thailand and recently there have been an increase in the number of DHF cases and mortality. One of the best ways to prevent DHF is to avoid mosquito bite and to get rid of *Aedes* vectors habitats. Several studies found that essential oils extracted from plants can kill mosquito larvae. However, to date no systematic review on this kind of researches has been undertaken. This study aimed to review the essential oils from plants with potential larvicidal activity against in vitro *Aedes aegypti* larvae, which focused primarily on specific plant species, concentrations of essential oils, and their larvicidal effect. Keywords were used to search on three databases including SCOPUS, PROQUEST, and SPRINGER, and studies published between 2008 to 2017 were included. Seven from 440 studies met the criteria for final review. Eight species of plants were extracted to get the essential oils to kill stage 3–4 of in vitro larvae. Based on their effects from the highest to the lowest, the eight species of plants were: (1) *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, (2) *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (3) *Zingiber nimmonii* (J. Graham) Dalzell, (4) *Blumea eriantha* (5) *Zingiber cernuum* (6) *Pinus kesiya* (7) *Syzygium aromaticum* (L.) Merr, and (8) *Clausena dentata* (Willd) M. Roam. Concentrations of these eight essential oils were found to have an LC_{50} value of 11.92, 30.52, 44.46, 44.82, 44.88, 57.00, 93.56, and 140.20 ppm, respectively. More studies on the effects of applying these essential oils to kill mosquito larvae in real situations for controlling *Aedes* vector and reducing incidence rate of DHF are needed.

คำสำคัญ

น้ำมันหอมระเหยสกัดจากพืช,ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน, การทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบ

Key words

essential oils from plants, larvicidal *Aedes aegypti*, systematic review

บทนำ

โรคไข้เลือดออก (dengue hemorrhagic fever: DHF) เป็นโรคประจำถิ่น (endemic area) เกิดการระบาดครั้งแรกในประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2501 ที่กรุงเทพมหานคร และมีรายงานสถานการณ์ผู้ป่วยต่อเนื่องทุกปี โดยพบว่า มีการแพร่ระบาดทั่วประเทศไทย ตามการเพิ่มของจำนวนประชากรและขยายไปตามชุมชนเมือง ในปี พ.ศ. 2560 มีรายงานผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก (DF, DHF, DSS) สะสมรวม 53,190 ราย และมีอัตราป่วย 80.80 ต่อประชากรแสนคน ถึงแม้จะมีการรายงานจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออก ณ ช่วงเวลาเดียวกันลดลงร้อยละ 15.98 (0.84 เท่า) เมื่อเทียบกับปี พ.ศ. 2559 แต่กลับพบว่า มีผู้ป่วยเสียชีวิต 63 ราย อัตราป่วยตายเท่ากับ ร้อยละ 0.12 ผู้ป่วยอัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ 1:0.93⁽¹⁾ จากรายงานผู้ป่วยย้อนหลัง

พ.ศ. 2547–2557 พบผู้ป่วยได้ทุกกลุ่มอายุ โดยกลุ่มอายุ 5–14 ปี พบมากที่สุด รองลงมาคือ กลุ่มอายุ 15–24 ปี ซึ่งเป็นกลุ่มนักเรียน⁽²⁾ ในแต่ละปีจะมีรายงานการระบาดของโรคไข้เลือดออกและจำนวนผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้น โดยพบผู้ป่วยมากที่สุดในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือนสิงหาคม นอกจากนี้ หากพื้นที่ดังกล่าวมีเชื้อไวรัสเดงกีชุกชุม จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดการระบาดของโรคได้รวดเร็วและรุนแรงยิ่งขึ้น ซึ่งรูปแบบการแพร่ระบาดมีการเปลี่ยนแปลงจากปีเว้นปี มาเป็นแบบสูง 2 ปี แล้วลดต่ำลง หรือลดต่ำลง 2 ปี แล้วเพิ่มสูงขึ้น^(2–3) เด็กมีโอกาสเสี่ยงมากกว่าผู้ใหญ่ โดยพบว่า ส่วนใหญ่เป็นเด็กที่เคยติดเชื้อมาแล้ว และมีปัญหาภาวะโภชนาการ⁽⁴⁾

โรคไข้เลือดออกติดต่อได้โดยยุงลาย 2 ชนิด เป็นแมลงพาหะนำโรค ได้แก่ ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) เป็นยุงพาหะหลัก และยุงลายสวน (*Aedes albopictus*)

เป็นยุงพาหะรอง⁽⁵⁾ ยุงลายมีระยะการเจริญเติบโต 4 ระยะ คือ ระยะไข่ ระยะลูกน้ำ ระยะดักแด้หรือตัวโม่ง และระยะ ตัวเต็มวัย ยุงลายตัวเต็มวัยจะวางไข่ติดแน่นที่ผิวของภาชนะ เหนือระดับน้ำเล็กน้อย เมื่อมีน้ำท่วมถึง ก็จะสามารถฟักเป็นลูกน้ำได้ในระยะเวลา 1-2 วัน⁽⁶⁾ ลูกน้ำยุงลายใช้ระยะเวลาเติบโตประมาณ 6-8 วัน จึงเข้าสู่ระยะดักแด้ และใช้ระยะเวลาเติบโต 1-2 วัน จึงจะสามารถลอกคราบเป็นยุงลายตัวเต็มวัย ยุงลายจะออกหากินเวลากลางวัน เฉพาะยุงลายเพศเมียเท่านั้นที่ต้องกินเลือดคนหรือสัตว์เลือดอุ่น เพื่อนำโปรตีนไปพัฒนาไข่ให้เจริญเติบโต⁽⁷⁾ เมื่อยุงลายดูดเลือดผู้ป่วยในระยะไข่สูง ซึ่งเป็นระยะที่มีไวรัสในกระแสเลือด เชื้อไวรัสจะเข้าสู่กระเพาะยุงและเพิ่มจำนวนมากขึ้น จากนั้นจึงจะเข้าสู่ต่อมน้ำลายยุง พร้อมทั้งจะเข้าสู่คนที่ถูกกัดต่อไป ดังนั้น การออกหากินของยุงลาย โดยเฉพาะยุงลายที่มีเชื้อไวรัส จะทำให้เกิดการแพร่เชื้ออย่างต่อเนื่องและเป็นลูกโซ่ในชุมชนที่มีคนอาศัยอยู่อย่างหนาแน่น⁽⁴⁾

การป้องกันและควบคุมยุงลายบ้านมีวัตถุประสงค์สำคัญเพื่อลดความชุกชุมของยุงพาหะนำโรค ลดการสัมผัสระหว่างคนและยุง เนื่องจากหากความชุกชุมของยุงพาหะต่ำลง จะช่วยลดโอกาสการแพร่เชื้อได้ การควบคุมยุงพาหะให้ได้ผลดีจะต้องดำเนินการในระยะตัวอ่อน เนื่องจากมีแหล่งอาศัยที่ชัดเจนและจัดการได้โดยง่าย⁽⁸⁾ แม้ว่าการควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้านด้วยการใช้สารเคมีจะได้ผลดีและรวดเร็ว แต่การใช้อย่างต่อเนื่องจะก่อให้เกิดการต้านทานต่อสารเคมี และยังเกิดปัญหาการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม หรือมีผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตในระบบห่วงโซ่อาหารในระยะยาวได้⁽⁹⁾ ดังนั้นการใช้สารที่ได้จากพืชจึงเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้านจากการสืบค้นข้อมูลพบว่า มีสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชบางชนิด สามารถออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการสรุปและสังเคราะห์ว่า มีพืชชนิดใดบ้างที่สามารถนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหย และมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ รวมทั้งผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการต่อการฆ่า

ลูกน้ำยุงลายบ้านเป็นอย่างไร จากเหตุผลข้างต้น ทีมวิจัยจึงสนใจศึกษาการใช้สารสกัดจากพืช โดยเฉพาะสารสกัดในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยเพื่อฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน โดยการใช้การทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบ เพื่อรวบรวมและเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีการควบคุมกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านที่มีในปัจจุบันให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นต่อไป โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของน้ำมันหอมระเหยสกัดจากพืช โดยครอบคลุมถึงชนิดของพืชที่สามารถนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหย ความเข้มข้นที่เหมาะสม และฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการ

วัตถุประสงค์และวิธีการศึกษา

การทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบครั้งนี้ ทีมวิจัยได้ทำการสืบค้นข้อมูลอย่างเข้มงวดจากงานวิจัยที่ตีพิมพ์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2551 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2560 มีการดำเนินการวิจัย ดังนี้

1. การระบุประเด็นปัญหาและวัตถุประสงค์ของการวิจัย โดยใช้ PICO framework ซึ่งประกอบด้วย

P (population) คือ ลูกน้ำยุงลายบ้านระยะ 3 และระยะ 4 ในห้องปฏิบัติการ

I (intervention or issue of interest) คือ

- ขั้นตอนพืชที่สกัดด้วยวิธีการกลั่นน้ำมันหอมระเหย (hydro-distillation) ซึ่งเป็นวิธีการกลั่นแบบง่ายและประหยัด โดยการให้ความร้อนแก่น้ำและพืชโดยตรง ความร้อนจากไอน้ำจะแพร่เข้าไปในตัวอย่างพืชและน้ำมันหอมระเหยออกมา⁽¹⁰⁾

- การทดลองในห้องปฏิบัติการตามวิธีการของ WHO ปี ค.ศ. 2005 ซึ่งเป็นมาตรฐานการทดสอบความเป็นพิษของสารต่อลูกน้ำยุงในห้องปฏิบัติการ และอ่านผลหลังการทดลองที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่สารออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายแบบเฉียบพลัน⁽¹¹⁾

C (comparison intervention or issue of interest) คือ น้ำมันหอมระเหยสกัดจากพืชและเปรียบเทียบฤทธิ์การฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านหลังการใช้น้ำมัน

หอมระเหย ที่ความเข้มข้นในหน่วย ppm, µg/ml และ mg/l

O (outcome) คือ ค่า LC_{50} ของน้ำมันหอมระเหยที่ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านหลังการทดลองที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งค่า LC_{50} หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารพิษที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย ร้อยละ 50.00 ในระยะเวลาและสภาพการทดลองที่กำหนด^(9,11)

2. การสืบค้นเอกสารหรือวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง ได้ดำเนินการสืบค้นจากฐานข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ แหล่งสืบค้นข้อมูล จำนวน 3 ฐาน ได้แก่ SCOPUS, PROQUEST และ SPRINGER กำหนดคำสำคัญในการสืบค้น ได้แก่ “larvicidal*” AND “plant extract*” OR “essential oil*” OR “plants oil*” AND “Aedes larvicide” OR “larvae*” AND “Aedes aegypti” การเลือกใช้คำสำคัญอยู่ภายใต้การดูแลและให้ข้อเสนอแนะโดยผู้เชี่ยวชาญด้านการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบและบรรณารักษ์

3. คัดเลือกงานวิจัยที่มีคุณสมบัติตามเกณฑ์ที่กำหนด โดยเกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (inclusion criteria) ได้แก่

(1) เป็นงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2551-2560 หรืองานวิจัยที่ไม่ได้รับการตีพิมพ์หรืออยู่ระหว่างรอรับการตีพิมพ์ (grey literature) ทั้งนี้เพื่อลดอคติจากการคัดเลือกเฉพาะงานวิจัยที่ถูกตีพิมพ์ซึ่งมักเป็นงานวิจัยที่ให้ผลการวิจัยเฉพาะในทางที่เป็นบวก (publication bias)

(2) ศึกษาเกี่ยวกับผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยสกัดจากพืชต่อการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการ

(3) เป็นรายงานการศึกษาระดับสมบูรณ์

(4) ตีพิมพ์เป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ

4. เกณฑ์การคัดออกจากการศึกษา (exclusion criteria) ได้แก่

(1) ใช้การสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการอื่นที่ไม่ใช่วิธีการกลั่นน้ำมันหอมระเหย (hydro-distillation)

(2) ใช้กระบวนการทดลองอื่นที่ไม่เป็นไปตามวิธีการของ WHO ปี ค.ศ. 2005

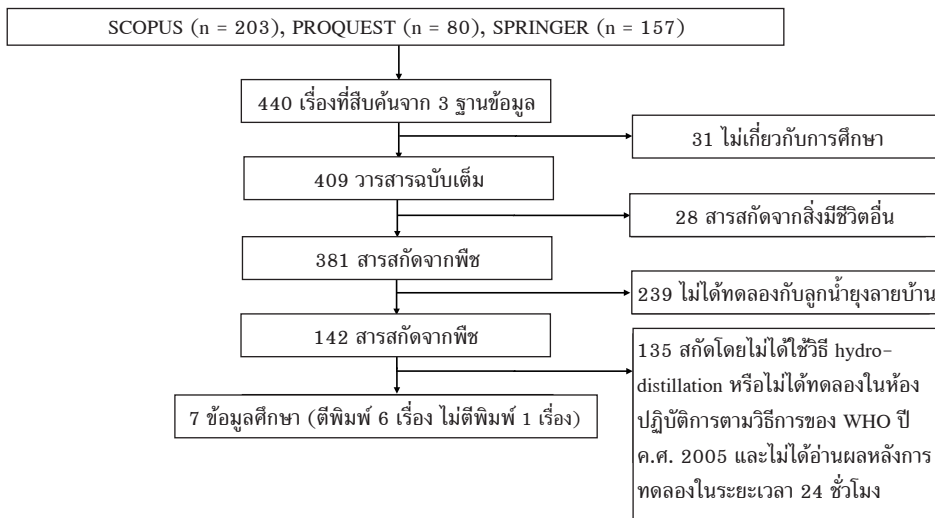
(3) การศึกษาที่ไม่ได้อ่านผลหลังการทดลองที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

5. ประเมินค่างานวิจัย (critical appraisal) ใช้แบบคัดกรองงานวิจัย Critical Appraisal Tool: CAT เพื่อตรวจสอบความสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ และข้อกำหนดกรอบในการสืบค้น (PICO framework)

ภายหลังจากการค้นคว้าและได้ข้อมูลสำหรับการทบทวนวรรณกรรม ทีมผู้วิจัยได้อ่านชื่อเรื่องและบทคัดย่อ ทำการประเมินและคัดเลือกผลงานวิจัยตามเกณฑ์การคัดเข้าและคัดออกอย่างเป็นอิสระต่อกันจนได้งานวิจัยที่ต้องการ เมื่อได้งานวิจัยทั้งหมดแล้ว ทีมผู้วิจัยดำเนินการค้นรายการงานวิจัยฉบับสมบูรณ์และทำการอ่านและประเมินงานวิจัยอีกครั้ง เพื่อคัดเลือกรายงานวิจัยที่จะนำมาสังเคราะห์ผลการศึกษาทั้งหมด หลังจากนั้นผู้วิจัย 3 ท่าน ทำการอ่านและสกัดเนื้อหาจากรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ มีการประชุมปรึกษาเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล ในกรณีที่ทีมผู้วิจัยอ่านผลงานวิจัยแล้วพบว่า มีการประเมินค่างานวิจัยหรือการสกัดเนื้อหาไม่สอดคล้องกัน ทีมผู้วิจัยจะร่วมกันพิจารณาเนื้อหาในรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์อีกครั้งเพื่อตัดสินใจร่วมกัน

ผลการศึกษา

จากการสืบค้นข้อมูลทั้ง 3 ฐาน ได้งานวิจัยทั้งสิ้น 440 เรื่อง เมื่อคัดเลือกตามเกณฑ์ได้งานวิจัยที่เกี่ยวข้องทั้งสิ้น 7 เรื่อง โดย 6 เรื่อง ได้รับการตีพิมพ์แล้ว⁽¹²⁻¹⁷⁾ และ 1 เรื่อง ที่เป็นงานวิจัยที่อยู่ระหว่างรอรับการตีพิมพ์ (grey literature) และสืบค้นเจอในฐานข้อมูล⁽¹⁸⁾ (แผนผังที่ 1) หลังจากนั้นทำการอ่านและสกัดเนื้อหาลงในตาราง โดยมีหัวข้อเรื่องประกอบด้วย ผู้แต่งปีที่พิมพ์ พืชที่นำมาศึกษา วงศ์ของพืช ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาใช้สกัดน้ำมันหอมระเหย สารสำคัญที่พบ ระดับความเข้มข้น ค่า LC_{50} (ppm) และสถานที่ศึกษา ดังตารางที่ 1



แผนผังที่ 1 แสดงผลการคัดเลือกรายงานวิจัยที่ทำการศึกษา

พืชและชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้สกัดน้ำมันหอมระเหย มี 4 รูปแบบ ดังนี้ (1) การใช้ใบสด ได้แก่ (1.1) ใบสดต้น *Clausena dentata* (Willd) M. Roam ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Rutaceae (1.2) พืชสกุลพริกไทย *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Piperaceae (1.3) ใบสนสามใบ (Fresh needles) *Pinus kesiya* ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Pinaceae (1.4) ใบสดต้น *Blumea eriantha* ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Asteraceae (2) การใช้เปลือกผลแห้ง ได้แก่ เปลือกผลแห้งของส้มเกลี้ยงหรือส้มเขียว *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Rutaceae (3) การใช้เหง้า/เหง้าสด ได้แก่ (3.1) เหง้าของพืชสกุลขิง *Zingiber nimmonii* (J. Graham) Dalzell และ (3.2) เหง้าสดของพืชสกุลขิง *Zingiber cernuum* ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Zingiberaceae (4) ไม่ระบุชิ้นส่วนพืช ได้แก่ *Syzygium aromaticum* (L.) Merr ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Myrtaceae

ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 8 ชนิด ที่นำมาศึกษามีความแตกต่างกัน โดยอยู่ระหว่าง 0.1–220 ppm เมื่อพิจารณาจากค่า LC_{50} พบฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ดีที่สุด และน้อยที่สุดเรียงตามลำดับ ดังนี้ (1) น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลแห้งของส้มเกลี้ยงหรือส้มเขียว *Citrus sinensis* (L.) Osbeck วงศ์

Rutaceae จากประเทศบราซิล มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ดีที่สุด โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 11.92 ppm (2) น้ำมันหอมระเหยจากใบสดของพืชสกุลพริกไทย *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC วงศ์ Piperaceae จากประเทศบราซิล มีค่า LC_{50} เท่ากับ 30.52 ppm (3) น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าของพืชสกุลขิง *Zingiber nimmonii* (J. Graham) Dalzell วงศ์ Zingiberaceae จากประเทศอินเดีย มีค่า LC_{50} เท่ากับ 44.46 ppm (4) น้ำมันหอมระเหยจากใบสดต้น *Blumea eriantha* ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Asteraceae จากประเทศอินเดีย มีค่า LC_{50} เท่ากับ 44.82 ppm (5) น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าสดของพืชสกุลขิง *Zingiber cernuum* วงศ์ Zingiberaceae จากประเทศอินเดีย มีค่า LC_{50} เท่ากับ 44.88 ppm (6) น้ำมันหอมระเหยจากใบสนสามใบ (Fresh needles) *Pinus kesiya* วงศ์ Pinaceae จากประเทศอินเดีย มีค่า LC_{50} เท่ากับ 57.00 ppm (7) น้ำมันหอมระเหยจากกานพลู *Syzygium aromaticum* (L.) Merr มีค่า LC_{50} เท่ากับ 93.56 ppm และ (8) น้ำมันหอมระเหยจากใบสดต้น *Clausena dentata* (Willd) M. Roam วงศ์ Rutaceae จากประเทศอินเดีย มีค่า LC_{50} เท่ากับ 140.20 ppm ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ผลการสังเคราะห์งานวิจัยน้ำมันหอมระเหยสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน

ผู้แต่ง/ ปีที่พิมพ์	พืชที่นำมา ศึกษา	วงศ์	ชิ้นส่วน ของพืช	สารสำคัญที่พบ	ระดับความ เข้มข้น ppm, µg/ml, mg/l	ค่า LC ₅₀ ppm = µg/ml = mg/l, (n)	สถานที่ ศึกษา
de Oliveira Araujo AF, et al. 2016 ⁽¹²⁾	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Rutaceae	เปลือก ผลแห้ง	1. Limonene 2. Linalool 3. Mircene	0.1–220 ppm	11.92 ppm (1)	บราซิล
da Silva MF, et al. 2016 ⁽¹³⁾	<i>Piper</i> <i>corcovadensis</i> (Miq.) C. DC	Piperaceae	ใบสด	1. 1-butyl-3,4-methy- lenedioxybenzene 2. Terpinolene 3. trans-Caryophyllene	20–50 ppm	30.52 ppm (2)	บราซิล
Govindarajan M, et al. 2016 ⁽¹⁴⁾	<i>Zingiber</i> <i>nimmonii</i> (J. Graham) Dalzell	Zingiberaceae	เหง้า	1. β-Caryophyllene 2. α-Humulene 3. α-Cadinol	20, 40, 60, 80, 100 µg/ ml	44.46 ppm (µg/ml) (3)	อินเดีย
Benelli G, et al. 2017 ⁽¹⁵⁾	<i>Blumea</i> <i>eriantha</i>	Asteraceae	ใบสด	1. (4E,6Z)-Allo- ocimene 2. Carvotanacetone 3. Dodecyl acetate	20, 40, 60, 80, 100 µg/ ml	44.82 ppm (µg/ml) (4)	อินเดีย
Rajeswary M, et al. 2017 ⁽¹⁸⁾	<i>Zingiber</i> <i>cernuum</i>	Zingiberaceae	เหง้าสด	1. trans-Caryophyllene 2. δ-3-Carene 3. α-Humulene	20, 40, 60, 80, 100 µg/ ml	44.88 ppm (µg/ml) (5)	อินเดีย
Govindarajan M, et al. 2016 ⁽¹⁶⁾	<i>Pinus kesiya</i>	Pinaceae	ใบสด	1. β-Pinene 2. α-Pinene 3. Myrcene	25, 50, 75, 100, 125 µg/ ml	57.00 ppm (µg/ml) (6)	อินเดีย
de Oliveira Araujo AF, et al. 2016 ⁽¹²⁾	<i>Syzygium</i> <i>aromaticum</i> (L.) Merr	Myrtaceae	ไม้มะรุ	1. Eugenol 2. b-Caryophyllene 3. Eugenol acetate	0.1–220 ppm	93.56 ppm (7)	บราซิล
Rajkumar S, Jebanesan A, 2010 ⁽¹⁷⁾	<i>Clausena</i> <i>dentata</i> (Willd) M.	Rutaceae	ใบสด	1. Sabinene 2. Biofloratriene 3. Borneol	100, 200, 300, 400 mg/l	140.20 ppm (mg/l)	อินเดีย

หมายเหตุ : n = ลำดับที่ของการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านจากดีที่สุดไปน้อยที่สุด

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้เป็นการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบ เกี่ยวกับฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของน้ำมันหอมระเหยจากพืช โดยรายงานการวิจัยที่นำเข้ามาศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนทั้งสิ้น 7 เรื่อง ซึ่งรวมงานวิจัยที่ยังไม่ได้รับการตีพิมพ์ด้วย 1 เรื่อง จากการทบทวนวรรณกรรม พบชิ้นส่วนของพืชที่นำมาใช้สกัดน้ำมันหอมระเหย ฤทธิ์เพื่อฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านมี 4 ส่วน ได้แก่ (1) การใช้ใบสด^(13,15,16-17) (2) การใช้เปลือกผลแห้ง⁽¹²⁾ (3) การใช้เหง้า/เหง้าสด^(14,18) และ (4) ไม่ระบุชิ้นส่วนพืช⁽¹²⁾ เนื่องจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชจะสร้างน้ำมันระเหยที่เป็นสารประกอบทุติยภูมิและเก็บไว้ตามส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ดอก ใบ ผล ลำต้นและเมล็ด⁽¹⁹⁾ โดยคุณภาพและปริมาณสารประกอบในพืชสามารถเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาสกัด⁽²⁰⁻²¹⁾ สภาพภูมิศาสตร์ของพื้นที่ปลูก⁽²²⁻²³⁾ แร่ธาตุอาหารในดิน⁽²⁴⁾ อายุเก็บเกี่ยว⁽²⁵⁻²⁶⁾ ระยะเวลาการสกัด⁽²⁷⁾ และวิธีการสกัด⁽²⁸⁾

จากการศึกษาพบว่า มีน้ำมันหอมระเหยที่สามารถสกัดได้จากพืชถึง 122 ชนิด จาก 26 วงศ์ มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านและลูกน้ำยุงชนิดอื่นได้ โดยร้อยละ 68.80 คือพืช 5 วงศ์ ดังต่อไปนี้ Lamiaceae (วงศ์กะเพรา) ร้อยละ 19.70, Cupressaceae (วงศ์สนฉะ) ร้อยละ 14.7, Rutaceae (วงศ์ส้ม) ร้อยละ 12.3, Apiaceae (วงศ์ผักชี) ร้อยละ 11.5 และ Myrtaceae (วงศ์ชมพู) ร้อยละ 10.6⁽²⁹⁾ แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยที่ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงสามารถสกัดได้จากพืชหลากหลายชนิด ครอบคลุมถึงพืชที่พบในการทบทวนวรรณกรรมครั้งนี้ ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากพืชสามารถออกฤทธิ์ฆ่าแมลงโดยมีผลต่อพฤติกรรมและสรีรวิทยาของแมลง^(17,29-30) หรือมีผลเป็นพิษต่อระบบประสาทและกลไกต่างๆ ได้แก่ Gamma aminobutyric acid (GABA) receptors, Octopamine synapses รวมทั้งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส⁽³¹⁾ ขณะที่ da Silva MF, et al⁽¹³⁾ รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยจาก *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์

ในการย่อยอาหารในกระเพาะลูกน้ำยุงลายบ้านระยะที่ 4 ทำให้ไม่สามารถดูดซึมแร่ธาตุและกรดอะมิโนที่จำเป็น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า น้ำมันหอมระเหยจะปิดท่อหายใจของลูกน้ำยุงลาย ทำให้ไม่สามารถดึงออกซิเจนจากอากาศเหนือน้ำมาใช้หายใจได้⁽³²⁾ และสารออกฤทธิ์จากพืชมีผลไปรบกวนการเคลื่อนย้ายของโปรตอนในไมโทคอนเดรีย ซึ่งจะส่งผลให้ลูกน้ำยุงลายตายในที่สุด^(12,33-34)

การทบทวนวรรณกรรมครั้งนี้มีข้อจำกัดบางประการ เนื่องจากทำการสืบค้นงานวิจัยจากฐานข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ จำนวน 3 ฐาน รวมทั้งไม่พบงานวิจัยที่ทำการศึกษาในประเทศไทยที่สอดคล้องตามเกณฑ์คัดเข้าและคัดออกในฐานข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ดังกล่าว อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาที่ไม่ได้สืบค้นเจอในฐานข้อมูลทั้ง 3 ฐาน คือ รายงานการศึกษาของ Kunhachan P, et al⁽³⁵⁾ ได้ศึกษาฤทธิ์การกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการของน้ำมันหอมระเหย 12 ชนิด ทดสอบในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง น้ำมันหอมระเหยโหระพา มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านดีที่สุด มีค่า LC_{50} เท่ากับ 68.2 ppm รองลงมาได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยจีน ตะไคร้บ้าน ตะไคร้ต้น ตะไคร้หอม ใบฝรั่ง มะกรูด เปปเปอร์มินต์ สน ส้ม ส้มเขียวหวานและกระชาย มีค่า LC_{50} เท่ากับ 78.20, 125.50, 175.70, 188.20, 240.80, 255.70, 260.40, 280.80, 290.60, 312.50 และ 321.20 ppm ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการศึกษานี้กับการทบทวนวรรณกรรมทั้ง 7 เรื่อง พบว่า การศึกษานี้ใช้วิธีการศึกษาที่แตกต่างจากบุคคลอื่น ซึ่งมีได้ดำเนินการตามวิธีการของ WHO ปี ค.ศ. 2005 และมีได้ระบุชิ้นส่วนของพืชที่นำมาสกัด ทั้งนี้การศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน สัตว์ทดลองจะแสดงอาการให้เห็นภายใน 24 ชั่วโมง หากออกฤทธิ์ช้า ต้องใช้ระยะเวลาเพิ่มเป็น 48 ชั่วโมง⁽¹¹⁾ หรืออาจใช้ระยะเวลานานถึง 72 ชั่วโมง ขึ้นกับชนิดของสารปริมาณ ความเข้มข้น และวิธีการที่สัตว์ทดลองได้รับ⁽⁹⁾ ดังนั้นวิธีการศึกษาที่ต่างกัน และประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์จากแต่ละชิ้นส่วนของพืชจะส่งผลต่อการ

ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายแบบเฉียบพลันได้ต่างกัน แม้การศึกษาที่คัดเข้ามาทำการวิเคราะห์ทั้ง 7 เรื่อง จะไม่ได้ทำการศึกษาในประเทศไทย แต่มีพืช 3 ชนิด ที่เป็นพืชที่มีในประเทศไทย ได้แก่ ส้มเกลี้ยงหรือส้มแซ่ สนสามใบ และกานพลู จึงสามารถนำแนวคิดการใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชที่มีในประเทศไทยไปศึกษาต่อยอดเพื่อนำไปใช้ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านต่อไปได้

ประเทศไทยมีข้อมูลโดยกรมควบคุมโรคกระทรวงสาธารณสุข⁽³²⁾ มีรายงานเกี่ยวกับการใช้น้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกับส้มเกลี้ยงหรือส้มแซ่ ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายและมีการให้คำแนะนำให้ใช้เพื่อฆ่าลูกน้ำยุงลาย โดยให้น้ำผลไม้มาคลึงไปมา 2-3 ครั้ง แล้วนำมาใส่ในภาชนะน้ำแข็ง อย่างไรก็ตาม การใช้น้ำมันจากผิวมะกรูดยังมีข้อจำกัดคือไม่สามารถทิ้งผลไม้สดไว้ในน้ำได้นาน เนื่องจากผลจะเน่าเปื่อยและทำให้น้ำสกปรก ดังนั้น การนำมะกรูดหรือพืชชนิดอื่น ที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ดีมาสกัดให้เป็นน้ำมันหอมระเหยพร้อมใช้ จึงยังคงเป็นทางเลือกที่ดี แต่การนำมาใช้ในสภาพธรรมชาติยังต้องมีการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีรูปแบบเหมาะสม มีบรรจุภัณฑ์ที่สะดวกต่อการใช้งานสามารถคงความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยได้ดี โดยไม่สูญเสียไปโดยเร็ว เนื่องจากอุณหภูมิหรือสภาพแวดล้อมของการเก็บรักษา ดังนั้นองค์ความรู้และผลการสังเคราะห์ที่ได้จากการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบครั้งนี้ จึงสามารถสะท้อนภาพการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านด้วยน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืช และเป็นแนวทางในการนำไปใช้กำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านในสถานการณ์จริง รวมทั้งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อยอดในประเด็นอื่นที่เกี่ยวข้องต่อไปในอนาคต

สรุป

จากการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบเกี่ยวกับฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืช พบพืช 8 ชนิด สามารถนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยเพื่อฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน ได้แก่ เปลือกผลแห้งของส้มเกลี้ยงหรือส้มแซ่ *Citrus sinensis* (L.) Osbeck,

ใบสดของพืชสกุลพริกไทย *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC, เหง้าของพืชสกุลขิง *Zingiber nimmonii* (J. Graham) Dalzell, ใบสดต้น *Blumea eriantha*, เหง้าสดของพืชสกุลขิง *Zingiber cernuum*, ใบสดของสนสามใบ (Fresh needles) *Pinus kesiya*, กานพลู *Syzygium aromaticum* (L.) Merr และใบสดต้น *Clausena dentata* (Willd) M. Roam โดยรายงานว่ น้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 8 ชนิด ที่สกัดด้วยวิธี hydro-distillation สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านระยะที่ 3 หรือระยะ 4 สายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ โดยค่า LC₅₀ ของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ 11.92, 30.52, 44.46, 44.82, 44.88, 57.00, 94.56 และ 140.20 ppm ตามลำดับข้อเสนอแนะ

1. นำองค์ความรู้เกี่ยวกับน้ำมันหอมระเหยสกัดจากพืชครั้งนี้ไปพัฒนาเป็นสาร หรือผลิตภัณฑ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน
2. ควรทำการศึกษาฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านในสถานการณ์จริง เพื่อประเมินประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยสกัดจากพืช ในการควบคุมปริมาณยุงลายบ้าน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดีด้วยความกรุณาอย่างสูงจากผู้อำนวยการสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 9 จังหวัดนครราชสีมา ที่ให้การสนับสนุนเวลา การจัดอบรมการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบ และงบประมาณ ช่วยให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Bureau of Vector-Borne Diseases. Dengue situation updates, week 53, 2017 (latest data as of January 9, 2018) [Internet]. 2018 [cited 2018 May 20]. Available from: <https://drive.google.com/uc?id=1fLbZTIpeh7HceOraR-WD6LL0VU0Ck6eWj&export=download> (in Thai)

2. Kaewkungwal J, Ketkaew J, Korphayakkhin T. Epidemiology. In: Pounsombat S, Korphayakkhin T, Amaruji W, Chanphakhon S, editors. Medical and public health guidelines on dengue fever and dengue hemorrhagic fever. 2nd ed. Nonthaburi: Bureau of Vector-Borne Diseases; 2016. p. 1-10. (in Thai)
3. Saengtharathrip S. Dengue epidemiology. In: Saengtharathrip S, editors. The miscellaneous chapter of dengue disease. 2nd ed. Nonthaburi: Bureau of Vector-Borne Diseases; 2002. p. 1-6. (in Thai)
4. Kalayanaroj S, Kaewkungwal J, Pounsombat S. Dengue causes, transmission, and risk factors. In: Pounsombat S, Korphayakkhin T, Amaruji W, Chanphakhon S, editors. Medical and public health guidelines on dengue fever and dengue hemorrhagic fever. 2nd ed. Nonthaburi: Bureau of Vector-Borne Diseases; 2016. p. 11-5. (in Thai)
5. World Health Organization. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. Geneva: World Health Organization; 2012.
6. Thavara U. Dengue hemorrhagic fever and chikungunya fever vectors. In: Thavara U, editors. Biological, ecological and mosquito control in Thailand. 3rd ed. Nonthaburi: National Institute of Health of Thailand; 2005. p. 1-41. (in Thai)
7. Chareonviriyaphap T, Apiwathnasorn C, Thanispong K. *Aedes aegypti* a primary vector of dengue fever. In: Pounsombat S, Korphayakkhin T, Amaruji W, Chanphakhon S, editors. Medical and public health guidelines on dengue fever and dengue hemorrhagic fever. 2nd ed. Nonthaburi: Bureau of Vector-Borne Diseases; 2016. p. 52-6. (in Thai)
8. Aumaung B, Pankeaw K. Integrated Vector Management (IVM) for Local Administration Organizations. Nonthaburi: Bureau of Vector-Borne Diseases; 2012. (in Thai)
9. Pimsamarn S. Insecticide. 2nd ed. Khon Kaen: Faculty of Agriculture, Khon Kaen University; 1997. (in Thai)
10. Sangsawat J. Essential oils [Internet]. [cited 2018 May 11]. Available from: <http://thongphaphum.kanchanaburi.doae.go.th/files/km.samupai.plai.pdf> (in Thai)
11. World Health Organization. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Geneva: World Health Organization; 2005.
12. de Oliveira Araujo AF, Ribeiro-Paes JT, de Deus JT, de Holanda Cavalcanti SC, de Souza Nunes R, Alves PB, et al. Larvicidal activity of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their antagonistic effects with temephos in resistant populations of *Aedes aegypti*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2016; 111:443-9.
13. da Silva MF, Bezerra-Silva PC, de Lira CS, de Lima Albuquerque BN, Agra Neto AC, Pontual EV, et al. Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae). Exp Parasitol 2016;165: 64-70.
14. Govindarajan M, Rajeswary M, Arivoli S, Tennyson S, Benelli G. Larvicidal and repellent potential of *Zingiber nimmonii* (J. Graham) Dalzell (Zingiberaceae) essential oil: an eco-friendly tool against malaria, dengue, and lymphatic filariasis mosquito vectors?. Parasitol Res 2016;115:1807-16.

15. Benelli G, Govindarajan M, Rajeswary M, Senthilmurugan S, Vijayan P, Alharbi NS, et al. Larvicidal activity of *Blumea eriantha* essential oil and its components against six mosquito species, including Zika virus vectors: the promising potential of (4E,6Z)-allo-ocimene, carvotanacetone and dodecyl acetate. *Parasitol Res* 2017; 116:1175–88.
16. Govindarajan M, Rajeswary M, Benelli G. Chemical composition, toxicity and non-target effects of *Pinus kesiya* essential oil: an eco-friendly and novel larvicide against malaria, dengue and lymphatic filariasis mosquito vectors. *Ecotoxicol Environ Saf* 2016;129:85–90.
17. Rajkumar S, Jebanesan A. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam. (Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). *J Asia Pac Entomol* 2010;13:107–9.
18. Rajeswary M, Govindarajan M, Alharbi NS, Kadaikunnan S, Khaled JM, Benelli G. *Zingiber cernuum* (Zingiberaceae) essential oil as effective larvicide and oviposition deterrent on six mosquito vectors, with little non-target toxicity on four aquatic mosquito predators. *Environ Sci Pollut Res Int* 2018;25:10307–16.
19. Phokhawathana C, Asavaprapha P, Suwachittanon W. Herbal plants and spices manual (3rd edition) -- essential oils. 2nd ed. Bangkok: Department of Agricultural Extension; 2002. (in Thai)
20. Najna A, Gantner M. Chemical composition of essential oils from the buds and leaves of cultivated hazelnut. *Acta Sci Pol-Hortoru* 2012; 11:91–100.
21. Kamal GM, Anwar F, Hussain AI, Sarri N, Ashraf MY. Yield and chemical composition of *Citrus* essential oils as affected by drying pretreatment of peels. *Int Food Res J* 2011; 18:1275–82.
22. Rizvi SAH, Lin T, Zeng X. Chemical composition of essential oil obtained from (*Artemisia absinthium* L.) grown under the climatic condition of Skardu Baltistan of Pakistan. *Pak J Bot* 2018;50:599–604.
23. Nadim MM, Malik AA, Ahmad J, Bakshi SK. The essential oil composition of *Achillea millefolium* L. cultivated under tropical condition in India. *WJAS* 2011;7:561–5.
24. Janmohammadi M, Sufi-Mahmoudi Z, Ahadnezhad A, Yousefzadeh S, Sabaghnia N. Influence of chemical and organic fertilizer on growth, yield and essential oil of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) plant. *Acta Agric Slov* 2014;103:73–81.
25. Sriboonthai C, Rithichai P, Jirakaittikul Y, Itharut A. Effect of harvesting times on yield and secondary metabolites in leaves of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Songklanakarin J Pl Sci* 2016;3:13–20. (In Thai)
26. Taokaenchan N, Areesrisom P, Thonnalak T, Suthon W, Areesrisom K. Effects of harvest maturity and light intensity on phenolic compound content and antioxidation activity of *Pandanus amaryllifolius* Roxb. leaves. *Khon Kaen Agr J* 2017;45:433–8. (In Thai)
27. Zheljaskov VD, Cantrell CL, Astatkie T, Jeliazkova E. Distillation time effect on lavender essential oil yield and composition. *J Oleo Sci* 2013;62:195–9.

28. Bimakr M, Rahman RA, Taip FS, Ganjloo A, Salleh LM, Selamat J, et al. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. Food Bioprod Proces 2011;89:67-72.
29. Pevela R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. Ind Crop Prod 2015;76:174-87.
30. Jain N, Srivastava S, Aggarwal KK, Ramesh S, Kumar S. Essential oil composition of *Zanthoxylum alatum* seed from northern India. Flavour Frag J 2001;16:408-10.
31. Pavela R, Benelli G. Essential oils as ecofriendly biopesticides? challenges and constraints. Trends Plant Sci 2016;21:1000-7.
32. Department of Disease Control, Ministry of Public Health. Innovations related to prevention and control of dengue fever. Nonthaburi: Department of Disease Control; 2002. (In Thai)
33. Corbet SA, Danahar GW, King V, Chalmers CL, Tiley CF. Surfactant-enhanced essential oils as mosquito larvicides. Entomol Exp Appl 1995;75:229-36.
34. Usta J, Kreydiyyeh S, Bajakian K, Nakkash-Chammaisse H. In vitro effect of eugenol and cinnamaldehyde on membrane potential and respiratory chain complexes in isolated rat liver mitochondria. Food Chem Toxicol 2002;40:935-40.
35. Kunhachan P, Bhakdeenuan P, Khumsawads C, Sirisopa P, Phusup Y, Chompoonsri J, et al. Larvicidal effect of 12 herbal essential oils against *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles dirus* [Internet]. [cited 2018 May 20]. Available from: <http://nih.dmsc.moph.go.th/KM/59/research2559/poster/phanukit.pdf> (in Thai)