ผลของสารอัลลีโลพาทีจากใบพลู (*Piper betle* L.) ต่อการงอกของเมล็ด การเจริญเติบโต และสรีรวิทยาของถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek)

Effect of Allelopathy from *Piper betle* L. Leaves on Seed Germination, Growth, and Physiology of Mung Bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek)

พรปวีณ์ ทนสูงเนิน และ ภาคภูมิ พระประเสริฐ*

Pornpawee Thonsoongnern and Phakpoom Phraprasert*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University

Received : 16 May 2019

Revised : 4 June 2019

Accepted : 6 June 2019

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของสารสกัดจากใบพลู (*Piper betle* L.) ต่อการงอกของเมล็ด การเจริญเติบโตและสรีรวิทยาของถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) โดยแช่เมล็ดถั่วเขียวในสารสกัดจากใบพลูที่อัตราส่วนใบพลูแห้งต่อน้ำ 20 40 60 และ 80 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 3 วัน พบว่า ถั่วเขียวมีเปอร์เซ็นต์การงอก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้นมีผลยับยั้งการงอกของเมล็ดมากขึ้น โดยความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการงอกของถั่วเขียวได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 12.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารสกัดที่ IC_{50} ไปทดสอบกับเมล็ดถั่วเขียว เพื่อหาปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ แป้ง โปรตีน และ กิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase โดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า เมล็ดถั่วเขียวที่แช่ในสารสกัดที่ IC_{50} เป็นเวลา 3 วัน มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีน และ กิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่พบว่าปริมาณแป้งมากกว่าชุดควบคุม และเมื่อนำสารสกัดจากใบพลูทดสอบกับเอนไซม์ α -amylase พบว่า สารสกัดจากใบพลูมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ลดลง ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าสารสกัดจากใบพลูมีผลยับยั้งกระบวนการสลายแป้งซึ่งเป็นอาหารสะสมสำคัญของเมล็ด รวมทั้งมีผลให้การสร้างโปรตีนของเมล็ดลดลง จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เมล็ดพืชทดสอบไม่งอกเมื่อได้รับสารสกัดจากใบพลู

คำสำคัญ : อัลลีโลพาที, พลู, สรีรวิทยาการงอก, ถั่วเขียว, α-amylase

*Corresponding author. E-mail : phakpoompp@yahoo.com

Abstract

The effect of aqueous leaf-extract from *Piper betle* L. on germination, growth and physiology of mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) were examined. Mung bean seeds were immersed in betel leaf extract at the ratio of dry leave and water of 20, 40, 60 and 80 g/L for 3 days. The results showed the reduction of germination percentage, fresh and dry weight when compared to the control. The higher of the concentration of the extracts resulted the more inhibiting seed germination. The inhibition concentration at 50% seed germination (IC_{50}) was 12.75 mg/mL of extractable from betel dry leaves. The extract at the IC_{50} was used to determine the sugar, starch, and protein content and also activity of α-amylase. Extract treated seeds showed the reduction of reducing sugar, protein and α-amylase activity when compared to the control. Starch determination in treated seed were higher than the control. The betel leaf extract was also tested to α-amylase and demonstrated that betel leaf extract inhibited α -amylase activity. This might be concluded that the betel leaf extract can inhibited the activity of α-amylase and effected to protein synthesis of tested seeds which might be the causes of seed ungemination.

Keywords : allelopathy, *Piper betle* L., germination physiology, *Vigna radiata*, α-amylase

บทนำ

วัชพืชเป็นปัญหาสำคัญในเกษตรกรรม ทำให้ผลผลิตทางการเกษตรลดลง (Bhullar *et al*., 2015; Doğan *et al*., 2014) การควบคุมวัชพืชมีหลายวิธี เช่น ใช้เครื่องมือกล ถอน ขุด ไถ พรวน ปลูกพืชคลุมดิน ปรับปรุงพันธุ์พืช และใช้สารกำจัดวัชพืช เป็นต้น ซึ่งการใช้สารกำจัดวัชพืช เป็นวิธีการที่ง่าย เห็นผลเร็ว (Korres *et al*., 2019) แต่ก่อทำให้เกิดผลเสียอย่างมากต่อสิ่งแวดล้อม สุขภาพของมนุษย์ และนำไปสู่การดื้อสารกำจัดวัชพืชและการระบาดของวัชพืชดื้อสารกำจัดวัชพืช (Lawrancea *et al*., 2019) ดังนั้นการใช้สารที่ผลิตจากธรรมชาติ เพื่อยับยั้งวัชพืชอาจเป็นแนวทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ และการใช้สารอัลลีโลพาที (allelochemicals) ที่มาจากธรรมชาติสามารถใช้ควบคุมวัชพืชได้เช่นกัน (Korres *et al*., 2019)

สารอัลลีโลพาที เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่พืชสร้างและปลดปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม มีผลทั้งกระตุ้นและยับยั้งพืชชนิดอื่น เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า อัลลีโลพาที (allelopathy) (Rice, 1984) โดยมีผลยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชได้ เช่น ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*) (Poonpaiboonpipat *et al*., 2013) แตงกวา (*Cucumis sativus* L.) (Kato-Noguchi *et al*., 2011) สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของหญ้าข้าวนก (*Echinochloa cruss-galli* L. Beauv) ได้

พลู (*Piper betle* L.) เป็นพืชในวงศ์ Piperaceae กระจายอยู่ในเขตร้อนชื้นของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ลักษณะใบรูปหัวใจ หน้าใบมัน มีกลิ่นหอมเฉพาะ เป็นพืชสมุนไพรที่นิยมมากในประเทศแถบเอเชีย (Pradhan *et al*., 2013) สารสกัดจากใบพลู มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ (Charoenwattana, 2007) ต้านการอักเสบ (Alam *et al*., 2013) สมานแผล (Nilugal *et al*., 2014) ต้านอนุมูลอิสระ (Ali *et al*., 2018) นอกจากนี้ สารสกัดจากใบพลูยังมีผลทางอัลลีโลพาที เช่น สารสกัดใบพลูด้วยน้ำที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10% และสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทที่ระดับความเข้มข้น 2,500 ppm สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของหญ้าข้าวนก (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.) และถั่วผี

(*Phaseolus lathyroides* L.) ได้ดี (Netsawang *et al*., 2013) และสารสกัดจากใบพลู (*P. betle* L.) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกันมีผลทางอัลลีโลพาทีแตกต่างกัน มีผลยับยั้งการงอกได้เล็กน้อยในพืชปลูก ได้แก่ ข้าว (*Oryza sativa* L.) ผักกาดหอม (*Lactuca sativa* L.) และคะน้า (*Brassica alboglabra* L.H. Bailey) ส่วนในวัชพืชได้แก่ กะเม็ง (*Eclipta prostrata* L.) และหญ้ารังนก (*Chloris barbata* Sw.) สามารถยับยั้งการงอกได้อย่างสมบูรณ์ (Woranoot *et al*., 2015)

ในการงอกของเมล็ดพืชชนิดต่าง ๆ กระบวนการที่สำคัญกระบวนการหนึ่งคือ การย่อยสลายอาหารที่สะสมภายในเมล็ดเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของต้นกล้าในระยะแรกที่ต้นกล้ายังไม่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ ซึ่งเมล็ดอาจสะสมสารอาหารประเภทต่าง ๆ เช่น แป้ง (starch) โปรตีน (proteins) และไขมัน (fat) โดยเมล็ดพืชส่วนใหญ่มักมีแป้งเป็นอาหารสะสมหลัก และการย่อยสลายเพื่อนำแป้งมาใช้ในกระบวนการงอกต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ α-amylase ในการย่อยแป้งเพื่อให้ได้น้ำตาลแล้วนำไปใช้ในกระบวนการหายใจเพื่อสร้างพลังงานและสารอินทรีย์ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้า (Kato-Noguchi & Macias, 2005) ดังนั้นจึงมีความสนใจศึกษาผลของสารสกัดจากใบพลูต่อสรีรวิทยาการงอกของเมล็ดบางประการ ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลที่ละลายน้ำได้ แป้ง โปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase โดยใช้เมล็ดถั่วเขียวเป็นเมล็ดทดสอบแทนเมล็ดวัชพืช เพราะเมล็ดวัชพืชมักมีระยะการพักตัวและต้องกระตุ้นเพื่อให้พ้นระยะพักตัว (Poonpaiboonpipat *et al*., 2013) รวมทั้งเมล็ดถั่วเขียว มีขนาดเมล็ดใหญ่ สามารถคัดเลือกเมล็ดที่มีความสมบูรณ์มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง เหมาะสำหรับใช้เพื่อการศึกษาผลของสารสกัดต่อกระบวนการทางสรีรวิทยา ซึ่งข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบถึงผลของสารสกัดจากใบพลูต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืชและอาจเป็นความรู้ที่สามารถเป็นพื้นฐานเพื่อใช้ในการปรับปรุงและประยุกต์ใช้ในการกำจัดวัชพืชจากธรรมชาติให้ได้ผลดีต่อไป รวมทั้งอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อลดการใช้สารกำจัดวัชพืชสังเคราะห์ที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม

วิธีดำเนินการวิจัย

พืชที่ใช้ทดลอง

ใบพลู (*Piper betle* L.) จากตลาดหนองมน ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี และถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) ตราข้าวทอง

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) โดยแต่ละทรีทเมนต์ทำการทดลอง 4 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยวิธี One-Way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การเตรียมสารสกัดใบพลู

ล้างใบพลูให้สะอาด อบให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น ได้ผงใบพลู ชั่งให้ได้ 20 40 60 และ 80 กรัม ตามลำดับ เติมน้ำ 1 ลิตร แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 8 ชั่วโมง กรองผงใบพลูด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman No.4) ได้สารสกัดอัตราส่วนความเข้มข้น 20 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพื่อใช้การในทดสอบการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ดต่อไป

ทดสอบการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ด

การทดสอบการงอกของเมล็ด โดยนำกระดาษเพาะเมล็ดวางลงในจานเพาะเชื้อปิดฝา นึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง นำสารสกัดแต่ละอัตราส่วนใส่ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อัตราส่วนละ 4 ซ้ำ ใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม นำเมล็ดพืชทดสอบ คือ ถั่วเขียว ล้างฆ่าเชื้อด้วย NaOCl (Sodium hypochlorite as available Chlorine 6% w/w) 5 %(v/v) ล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ใส่ลงในจานเพาะ จานละ 25 เมล็ด ปิดฝาจานเพาะ วางไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน บันทึกผล คือ จำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน ชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง คำนวณเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด เปรียบเทียบกับชุดควบคุม และคำนวณอัตราส่วนความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ด 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})

วิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบพลูที่สามารถยับยั้งการงอกของถั่วเขียวได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ด้วยการวิเคราะห์แบบโพรบิท (probit analysis) ตามวิธีของ Finney (1971) เพื่อนำสารสกัดจากใบพลูความเข้มข้นที่ IC_{50} ไปใช้ศึกษาผลของสารสกัดต่อสรีรวิทยาการงอกบางประการของเมล็ดต่อไป

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำเมล็ดถั่วเขียวที่แช่ในน้ำกลั่นและแช่ในสารสกัดใบพลูที่ IC_{50} เป็นเวลา 3 วัน จานละ 3 เมล็ด ชั่งน้ำหนักสด จากนั้นใส่ลงโกร่งบดที่วางบนน้ำแข็ง เติมเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร บดจนละเอียด ดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอดทดลอง นำไปต้มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดทดลองปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร ด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้ส่วนใสและตะกอน (ตะกอนนำไปใช้หาปริมาณแป้ง) จากนั้นดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมน้ำ 1,300 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย DNS (Dinitrosalicylic acid 40 mM Sodium hydroxide 400 mM และ Potassium sodium tartrate 1 M) 500 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยมีเมล็ดที่เพาะในน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม (Rose *et al*., 1991)

การหาปริมาณแป้ง

นำส่วนตะกอนที่เหลือจากการหาปริมาณน้ำตาลมาล้างด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้ง โดยดูดเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในหลอดทดลองปรับปริมาตรให้เป็น 2 มิลลิลิตร ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.6 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปล่อยไว้ให้เย็น แล้วเติมเอนไซม์ α-amylase 10 ไมโครลิตร (α-amylase 25 มิลลิกรัมต่อสารละลายอะซิเตท บัฟเฟอร์ 250 ไมโครลิตร) และเติมเอนไซม์ amyloglucosidase 10 ไมโครลิตร (amyloglucosidase 55 มิลลิกรัมต่อสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 250 ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร ด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนใสใสในหลอดทดลองปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมน้ำ 1,300 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย DNS 500 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิลดลงเท่ากับ

อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานแป้ง โดยมีเมล็ดที่เพาะในน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม (Rose *et al*., 1991)

การหากิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase

นำเมล็ดตัวอย่างที่แช่ในน้ำกลั่นและแช่ในสารสกัดใบพลู จากจานเพาะเชื้อ จานละ 3 เมล็ด ชั่งน้ำหนักสด ใส่ลงโกร่งบดสาร หลังจากนั้นเติม Tris-HCl buffer pH 7.5 (Tris 100 mM, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 5 mM, DTT 5 mM, $NaHSO_3$ 10 mM, BSA 5 mg/ mL) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร บดด้วยโกร่งที่วางอยู่บนน้ำแข็ง บดจนละเอียด ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอดทดลอง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นดูดส่วนใส ใส่ในหลอดทดลองเติมแคลเซียมคลอไรด์ 500 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสใส่ในหลอดทดลอง 2 หลอด ปริมาตรหลอดละ 300 ไมโครลิตร หลอดที่ 1 และหลอดที่ 2 เติม Na-acetate 500 ไมโครลิตร เติม Starch soluble 2% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เหมือนกัน หลอดที่ 1 ไปหาปริมาณน้ำตาลทันที และหลอดที่ 2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปหาปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้ง โดยวิธีเดียวกับการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ วิเคราะห์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยมีเมล็ดที่เพาะในน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม (Kato-Noguchi & Macias, 2005)

การหาปริมาณโปรตีน

นำเมล็ดตัวอย่างที่แช่ในน้ำกลั่นและแช่ในสารสกัดใบพลู จากจานเพาะเชื้อ จานละ 3 เมล็ด ชั่งน้ำหนักสด ใส่ลงโกร่งบดสาร ที่วางอยู่บนน้ำแข็ง เติม Tris-HCl buffer pH 7.5 (Tris 100 mM, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 5 mM, DTT 5 mM, $NaHSO_3$ 10 mM) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บดเมล็ดพืชด้วยโกร่งจนละเอียด ดูดสารละลายทั้งหมด นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสใส่หลอดทดลอง 50 ไมโครลิตร เติมสารละลายทดสอบโปรตีน (Bradford reagent) ปริมาตร 1,450 ไมโครลิตร นำไปบ่มในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน โดยมีเมล็ดที่เพาะในน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม

ผลของสารสกัดจากใบพลูต่อกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase

เตรียมสารสกัดใบพลู โดยชั่งผงใบพลู 121.6 กรัม เติมน้ำ 1 ลิตร แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 8 ชั่วโมง กรองผงใบพลูด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman No.4) ใส่สารสกัดจากใบพลูปริมาตร 250 ไมโครลิตร ที่มีสารสกัด 0 0.64 1.28 1.92 2.56 3.20 และ 3.84 มิลลิกรัม ตามลำดับ นำไปหากิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase โดยเติมเอนไซม์ α-amylase (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) 300 ไมโครลิตร เติม Na-acetate pH 6 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติม Starch soluble 4% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าสารให้เข้ากัน แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปหาปริมาณน้ำตาลทันที ส่วนที่ 2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปหาปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้ง โดยวิธีเดียวกับการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ วิเคราะห์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานแป้ง (Kato-Noguchi & Macias, 2005)

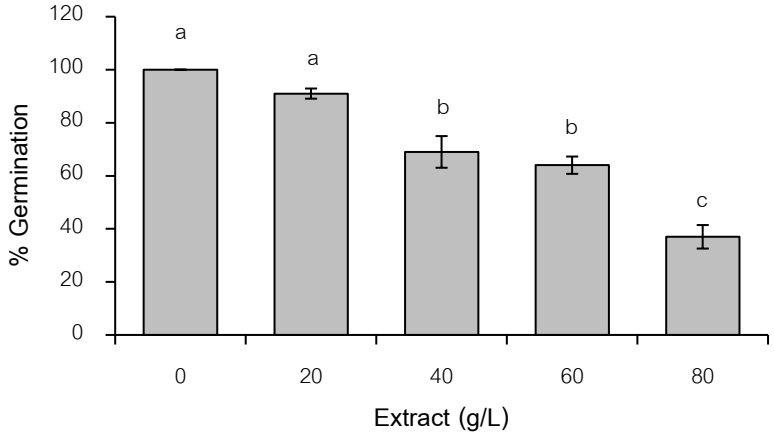
ผลการวิจัย

ผลของสารสกัดจากใบพลูต่อการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ด

ผลการงอกของเมล็ดถั่วเขียวที่แช่ในสารสกัดใบพลู ในอัตราส่วนผงใบพลูต่อน้ำ 20 40 60 และ 80 กรัม/ลิตร วางไว้ในที่มืด เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่า เมล็ดที่แช่ในสารสกัดจากใบพลูอัตราส่วนผงใบพลูต่อน้ำ 40 60 และ 80 กรัม/ลิตร มีเปอร์เซ็นต์การงอกแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดลดลง เมื่ออัตราส่วนความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 1)

การเจริญเติบโตของเมล็ดถั่วเขียวที่แช่ในสารสกัดใบพลู ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่า เมล็ดที่แช่ในสารสกัดจากใบพลูมีน้ำหนักสดลดลง แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยพบว่ามีน้ำหนักสดลดลง เมื่ออัตราส่วนความเข้มข้นของสารสกัดใบพลูเพิ่มสูงขึ้น (ภาพที่ 2a)

เมล็ดที่แช่ในสารสกัดใบพลูอัตราส่วนผงใบพลูต่อน้ำ 20 40 และ 60 กรัม/ลิตร มีน้ำหนักแห้งลดลง แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ภาพที่ 2b)



ภาพที่ 1 เปอร์เซ็นต์การงอกของถั่วเขียวที่ได้รับสารสกัดใบพลูอัตราส่วนผงใบพลูต่อน้ำ 20 40 60 และ 80 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 3 วัน (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า ±SE; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

เมื่อนำข้อมูลการงอกของเมล็ดถั่วเขียวในวันที่ 3 มาวิเคราะห์หาระดับอัตราของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการงอกของถั่วเขียวได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ด้วยการวิเคราะห์แบบโพรบิท (probit analysis) ตามวิธีของ Finney (1971) พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 60.80 กรัม/ลิตร และเมื่อนำสารสกัดที่สกัดได้จากใบพลูแห้งต่อน้ำ 60.80 กรัม/ลิตร ไปทำการระเหยน้ำออก พบว่ามีสารสกัดจากใบพลู 12.75 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

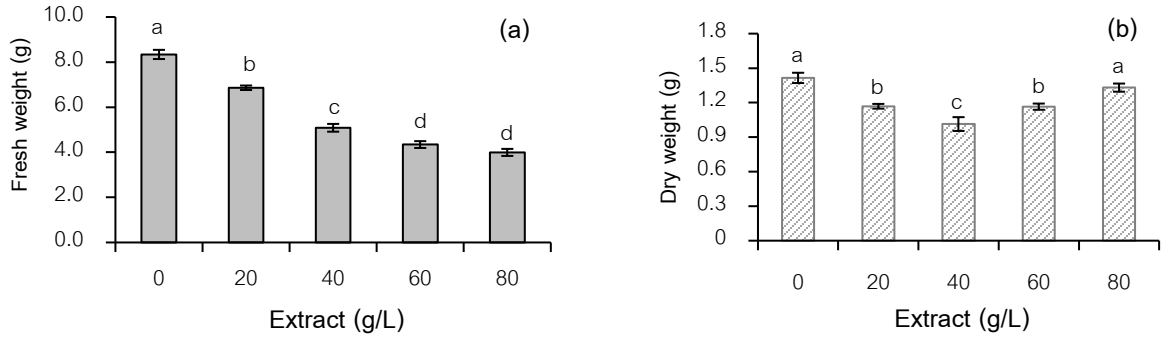
ผลของสารสกัดจากใบพลูต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

เมื่อนำเมล็ดถั่วเขียวที่แช่ในสารสกัดใบพลูที่ IC_{50} เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบโดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่าเมล็ดที่แช่ในสารสกัดจากใบพลูที่ IC_{50} มีปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 0.68 ไมโครกรัม/เมล็ด แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมี

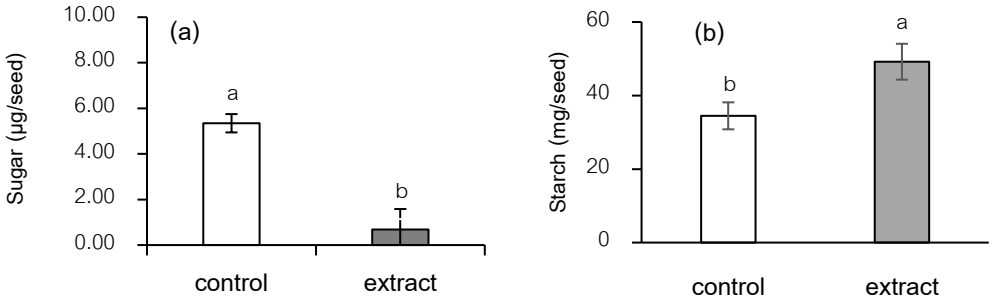
นัยสำคัญทางสถิติ (P≤ 0.05) ที่มีปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 5.35 ไมโครกรัม/เมล็ด โดยเมล็ดที่ได้รับสารสกัดจากใบพลูมีปริมาณน้ำตาลลดลงมากเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 3a)

ผลของสารสกัดจากใบพลูต่อปริมาณแป้งของเมล็ด

เมื่อนำเมล็ดถั่วเขียวที่เพาะในสารสกัดพลู IC_{50} เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่า เมล็ดถั่วเขียวที่เพาะในสารสกัดจากใบพลูที่ IC_{50} มีปริมาณแป้งเท่ากับ 49.20 มิลลิกรัมกรัม/เมล็ด แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤ 0.05) ที่มีปริมาณแป้งเท่ากับ 34.48 มิลลิกรัม/เมล็ด โดยเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีปริมาณแป้งสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 3b)



ภาพที่ 2 น้ำหนักสด (a) และน้ำหนักแห้ง (b) ของถั่วเขียวที่ได้รับสารสกัดใบพลูอัตราส่วนผงใบพลูต่อน้ำ 20 40 60 และ 80 กรัม/ลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุม เป็นเวลา 3 วัน (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า ±SE; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลแต่ละช่วงเวลาที่วิเคราะห์ด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)



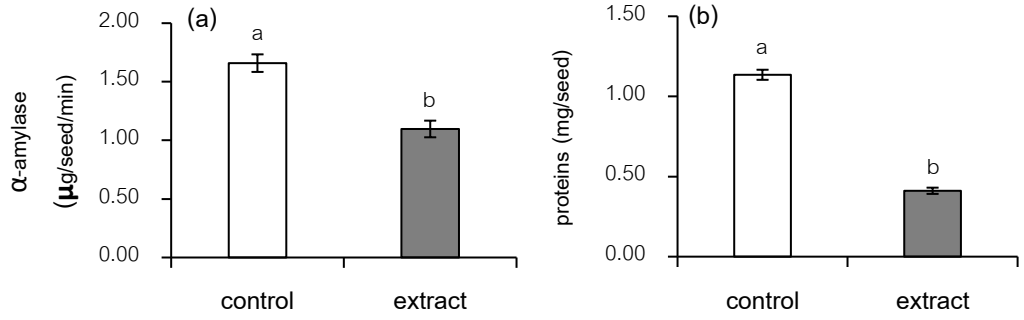
ภาพที่ 3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (a) ปริมาณแป้ง (b) ในเมล็ดถั่วเขียวที่แช่ในสารสกัดใบพลูที่ IC_{50} เปรียบเทียบกับชุดควบคุม เป็นเวลา 3 วัน (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า ±SE; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลแต่ละช่วงเวลาที่วิเคราะห์ด้วย t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

ผลของสารสกัดจากใบพลูต่อกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ในเมล็ด

ผลการหากิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase เมื่อนำเมล็ดถั่วเขียวที่แช่ในสารสกัดพลู IC_{50} เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่า เมล็ดถั่วเขียวที่เพาะในสารสกัดจากใบพลู IC_{50} มีกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase เท่ากับ 1.10 ไมโครกรัม/เมล็ด/นาที แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase เท่ากับ 1.66 ไมโครกรัม/เมล็ด/นาที โดยเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 4a)

ผลของสารสกัดจากใบพลูต่อปริมาณโปรตีนของเมล็ด

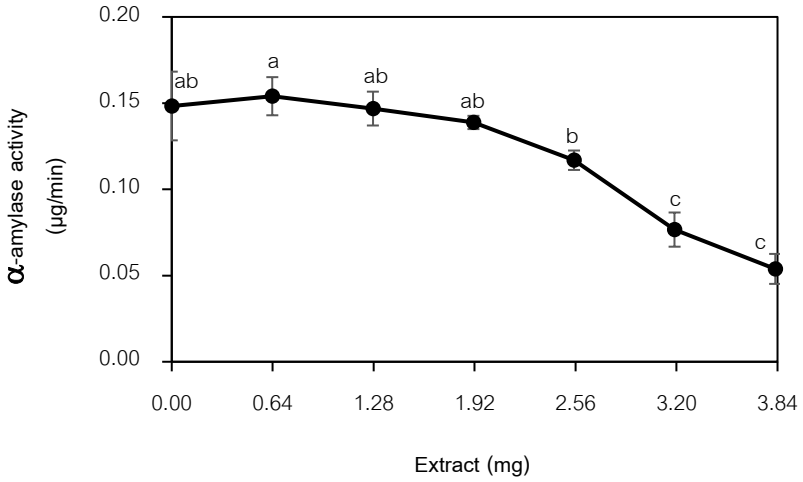
ผลการหาปริมาณโปรตีน เมื่อนำเมล็ดถั่วเขียวที่แช่ในสารสกัดพลู IC_{50} เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่า เมล็ดถั่วเขียวที่เพาะในสารสกัดจากใบพลู IC_{50} มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.41 มิลลิกรัม/เมล็ด แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.14 มิลลิกรัม/เมล็ด โดย เมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีโปรตีนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 4b)



ภาพที่ 4 ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์ α-amylase (a) ปริมาณโปรตีน (b)ในเมล็ดถั่วเขียวที่แช่ในสารสกัดใบพลูเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เป็นเวลา 3 วัน (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า ±SE; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลแต่ละช่วงเวลาที่วิเคราะห์ด้วย t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

ผลของสารสกัดจากใบพลูต่อกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase

เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ที่เติมสารสกัด 0.64 1.28 1.92 2.56 3.20 และ 3.84 มิลลิกรัม ตามลำดับ พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase เท่ากับ 0.148, 0.154, 0.147, 0.139, 0.117, 0.077, และ 0.054 ไมโครกรัม/นาที ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเมื่อสารสกัดมีความเข้มข้นมากขึ้นมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ลดลง (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ผลของสารสกัดใบพลูต่อกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase (แถบความคลาดเคลื่อนแสดงค่า ±SE; ตัวอักษร abc แสดงความแตกต่างของข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

วิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาผลของสารอัลลีโลพาทีจากใบพลูต่อการงอกและการเจริญเติบโตของถั่วเขียว พบว่า เมื่อแช่เมล็ดถั่วเขียวในสารสกัดใบพลูในอัตราส่วนของผงใบพลูต่อน้ำต่างกัน มีผลให้เปอร์เซ็นต์การงอกลดลงเมื่ออัตราส่วนผงใบพลูต่อน้ำเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Netsawang *et al.* (2013) ที่ศึกษาผลของสารสกัดด้วยน้ำจากพลูเขียว (*P. betle* L.) พบว่าสามารถยับยั้งการงอก และการเจริญเติบโตของหญ้าข้าวนกและถั่วผีได้ และพบอีกว่าถั่วเขียวที่ได้รับสารสกัดด้วยน้ำจากใบพลู มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งลดลง ทั้งนี้มีรายงานว่าสารสกัดด้วยน้ำจาก *Euphorbia helioscopia* มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเมล็ดถั่วลันเตา (*Pisum sativum* L.) โดยทำให้มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งลดลง (Madany & Saleh, 2015) ซึ่งจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบพลูที่มีความเข้มข้นมาก อาจมีผลลดกระบวนการสลายสารอาหารที่สะสมอยู่ในเมล็ด น้ำหนักเมล็ดที่ได้รับสารสกัดจากใบพลูจึงมีน้ำหนักมากกว่าชุดควบคุมที่มีการงอกเป็นปกติ รวมทั้งเมล็ดที่ได้รับสารสกัดจากใบพลูพัฒนาเป็นต้นอ่อนลดลง

เมื่อทำการศึกษาผลของสารสกัดจากใบพลูต่อสรีรวิทยาการงอกของเมล็ดถั่วเขียว โดยสารสกัดใบพลูที่ความเข้มข้น 28.16 มิลลิกรัม/ลิตร (IC_{50}) มีผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง ปริมาณแป้งมากกว่าชุดควบคุม และกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ลดลง แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบพลูมีผลทำให้กิจกรรมของเอ็นไซม์ α-amylase ลดลง ดังนั้นกระบวนการสลายอาหารสะสมภายในเมล็ดจึงเกิดได้น้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่พบว่ามีปริมาณลดลงในเมล็ดที่ได้รับสารสกัดจากใบพลู ทั้งนี้เมล็ดถั่วเขียวมีสารอาหารสะสมได้แก่ แป้ง ไขมัน และโปรตีน โดยมีแป้งเป็นอาหารสะสมหลัก (Lee *et al.*, 2011) ในระหว่างการงอกและการเจริญเติบโต ซึ่งมีรายงานว่าในระหว่างการงอกของเมล็ดที่มีการสะสมแป้งจะมีการเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลโดยเอนไซม์ α-amylase (Kato-Noguchi & Macias, 2005) ซึ่งสอดคล้องกับ Madany and Saleh (2015) และ Kingthong and Phraprasert (2017) ที่รายงานว่าเมล็ดข้าวที่ได้รับสารสกัดจากใบผักแครด

(*Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงและมีแป้งสูงกว่าชุดควบคุม เป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ α-amylase ลดลง และจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเมล็ดถั่วเขียวในการทดลองนี้พบว่ามีปริมาณโปรตีนลดลงด้วยเช่นกัน ซึ่งมีรายงานการศึกษาผลของสารสกัดจากใบทองอุไร (*Tecoma stans* L.) มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase และลดปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเขียว (Bhat & Yogamoorthi, 2018)

สารสกัดจากใบพลูที่ IC_{50} มีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ของเมล็ดถั่วเขียวลดลง อาจมีสาเหตุหลักได้ 2 ประการ คือ ประการแรกสารสกัดไปมีผลลดการแสดงออกของยีนและมีผลให้มีปริมาณ α-amylase ลดลง หรือประการที่ 2 คือ สารสกัดจากใบพลูไปมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเมล็ดที่ได้รับสารสกัดมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าชุดควบคุม ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า สารสกัดมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีน (Bhat & Yogamoorthi, 2018) อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าสารสกัดไปมีผลต่อกระบวนการใดในขั้นตอนการสังเคราะห์โปรตีนซึ่งยังคงต้องมีการศึกษาในเชิงลึกต่อไป อย่างไรก็ตามได้ทำการศึกษาสาเหตุประการที่ 2 คือ สารสกัดไปมีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ α-amylase หรือไม่ โดยนำสารสกัดจากใบพลูความเข้มข้นแตกต่างกันไปทดสอบกับเอนไซม์ α-amylase โดยตรง พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจากใบพลูมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ลดลง สอดคล้องกับ ที่รายงานว่าสารสกัดจากใบพลูสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ได้ โดย Ferreres *et al.* (2014) ทำการศึกษาสารทุติยภูมิจากใบพลูที่สกัดด้วยน้ำ พบว่ามีสารกลุ่ม ฟีโนลิก (phenolics) เช่น phenylpropanoid กลุ่ม cinnamoyl และกลุ่ม polypropanoids และสารประกอบหลักที่พบมากที่สุดได้แก่ Hydroxychavicol ซึ่งสารกลุ่มฟีโนลิกเป็นกลุ่มที่มีรายงานว่ามีคุณสมบัติในการเป็นสารอัลลีโลพาธีที่สำคัญ (Ferreres *et al*., 2014) และ Nouri *et al.* (2014) รายงานว่าสารสกัดจากพลูในกลุ่มฟีโนลิกสามารถลดกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ดังนั้นการที่สารสกัดจากใบพลูสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α-amylase จึงทำให้เมล็ดไม่สามารถนำแป้งที่สะสมในเมล็ดมาใช้ได้ เป็นผลให้เมล็ดถั่วเขียวมีเปอร์เซ็นต์การงอกและการเจริญเติบโตน้อยกว่าชุดควบคุม และแสดงให้เห็นว่าพลูมีสารอัลลีโลพาธีที่อาจพัฒนาไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตรได้ โดยเฉพาะการทำเกษตรอินทรีย์ที่งดเว้นการพึ่งพาสารเคมีสังเคราะห์ที่อาจเป็นอันตรายต่อเกษตรกร ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดจากใบพลูมีสารอัลลีโลพาทีสามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ดถั่วเขียวได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งลดลง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม เมล็ดที่ได้รับสารสกัดจากใบพลูมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ลดลง แต่ปริมาณแป้งของเมล็ดที่ได้รับสารสกัดจากพลูมากกว่าชุดควบคุม เป็นผลจากสารสกัดจากใบพลูยับยั้งกิจกรรมและการสร้างเอนไซม์ α-amylase ซึ่งส่งผลยับยั้งสรีรวิทยาการงอกและการเจริญเติบโตของถั่วเขียว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ได้อนุเคราะห์ทุนอุดหนุนวิจัยประจำปีงบประมาณ 2561 และได้รับทุนสนับสนุนจากหน่วยบริการนวัตกรรมทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (SIF-IN-610070) ขอบคุณคณะผู้บริหารและคณะครูโรงเรียนวิทยาศาสตร์จุฬาภรณราชวิทยาลัย ชลบุรี ในการสนับสนุนการทำวิจัยตลอดมา

เอกสารอ้างอิง

Alam, B., Akter, F., Parvin, N., Pia, R.S., Akter, S., Chowdhury, J., Sifath-E-Jahan, K., & Haque , E. (2013). Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory activities of the methanolic extract of *Piper betle* leaves. *Avicenna J Phytomed, 3*(2), 112-125

Ali, A., Chong, C.H., Mah, S.H., Abdullah, L.C., Choong, T.S.Y., & Chua, B.L. (2018). Impact of storage conditions on the stability of predominant phenolic constituents and antioxidant activity of dried *Piper betle* extracts. *Molecules, 23*(2).doi:org/10.3390/molecules23020484

Bhat, M., & Yogamoorthi, A. (2018). Allelopathic influence of *Tecoma stan*s (L.) on the seed germination and biochemical changes in Green Gram. *International Journal of Agriculture & Environmental Science., 5*(5), 38-48

Bhullar, M., Kaur, T., Kaur, S., & Yadav, R. (2015). Weed management in vegetable and flower crop-based systems. *Indian Journal of Weed Science, 47*(3), 277-287

Charoenwattana, P. (2007). Antifungal efficiency of *Piper betle* L. on *Aspergillus flavus*. *Agricultural Science Journal, 36*(6), 50-53

Doğan, M.N., Jabran, K., & Unay, A. (2014). Integrated weed management in cotton. In B.S. Chauhan & G. Mahajan (Eds.), *Recent Advances in Weed Management* (pp. 197-222). New York, NY: Springer New York.

Ferreres, F., Oliveira, A.P., Gil-Izquierdo, A., Valentao, P., & Andrade, P.B. (2014). *Piper betle* leaves: profiling phenolic compounds by HPLC/DAD-ESI/MSn and anti-cholinesterase activity. *Phytochemical Analysis, 25*(5), 453-460

Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis*. Cambridge: Cambridge University Press.

Kato-Noguchi, H., & Macias, F.A. (2005). Effects of 6-methoxy-2-benzoxazolinone on the germination and alpha-amylase activity in lettuce seeds. *J Plant Physiol, 162*(12), 1304-1307

Kato-Noguchi, H., Thi, H.L., Teruya, T., & Suenaga, K. (2011). Two potent allelopathic substances in cucumber plants. *Scientia Horticulturae, 129*(4), 894-897

Kingthong, Y., & Phraprasert, P. (2017). Effect of allelopathic from *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn. leaves on seed germination, growth, and physiology of rice (*Oryza sativa* L.). *Burapha Science Journal, 22*(3), 188-204. (in Thai)

Korres, N.E., Burgos, N.R., Travlos, I., Vurro, M., Gitsopoulos, T.K., Varanasi, V.K., Duke, S.O., Kudsk, P., Brabham, C., Rouse, E., & Salas-Perez, R. (2019). New directions for integrated weed management: Modern technologies, tools and knowledge discovery. *Advances in Agronomy, 155*, 243-319

Lawrancea, S., Varghesea, S., Varghesea, E.M., Asokb, A.K., & Jisha, M.S. (2019). Quinoline derivatives producing *Pseudomonas aeruginosa* H6 as an efficient bioherbicide for weed management. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnolog, 18*, 101096.doi:10.1016/j.bcab.2019.101096

Lee, S., Lee, J.H., Lee, H., Lee, S., Kim, S.H., Chun, T., & Imm, J. (2011). Effect of mung bean ethanol extract on pro-inflammtory cytokines in LPS stimulated macrophages. *Food Science and Biotechnology, 20*(2), 519-524.doi:10.1007/s10068-011-0072-z

Madany, M.M.Y., & Saleh, A.M. (2015). Phytotoxicity of *Euphorbia helioscopia* L. on *Triticum aestivum* L. and *Pisum sativum* L. *Annals of Agricultural Sciences, 60*(1), 141-151

Netsawang, P., Wichittrakarn, P., Laosinwattana, C., & M. Teerarak, M. (2013). Effect of leaf extracts from Piperaceae plant on germination and seedling growth of test weeds *In The 11" National Plant Protection Conference "Crop Protection in Thailand, Keeping in Step with ASEAN Community". Thailand: Bangkok*., 1447-1454 (in Thai)

Nilugal, K.C., Perumal, K., Ugander, R.E., & Chittor , A.I. (2014). Evaluation of wound healing activity of *Piper betle* leaves and stem extract in experimental Wistar rats. *Am.J. PharmTech Res., 4*(3), 276–289

Nouri, L., Nafchi, A.M., & Karim, A.A. (2014). Phytochemical, antioxidant, antibacterial, and alpha-amylase inhibitory properties of different extracts from betel leaves. *Industrial Crops and Products, 62*, 47-52

Poonpaiboonpipat, T., Pangnakorn, U., Suvunnamek, U., Teerarak, M., Charoenying, P., & Laosinwattana, C. (2013). Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Industrial Crops and Products, 41*, 403-407

Pradhan, D., Suri, K., Pradhan, D., & Biswasroy, P. (2013). Golden heart of the nature: *Piper betle* L. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 1*(6), 147–167

Rice, E.L. (1984). *Allelopathy* (2 nd ed.). Florida: Academic Press.

Rose, R., Rose, C.L., Omi, S.K., Forry, K.R., Durall, D.M., & Bigg, W.L. (1991). Starch determination by perchloric acid vs enzymes: evaluating the accuracy and precision of six colorimetric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39*(1), 2-11

Woranoot, K., Naree, P., Kongbangkerd, A., Wongkrajang, K., Buaruaeng, R., & Choopayak, C. (2015). Phytotoxic effects of *Piper betle* L. extracts on germination of *Eclipta prostrata* L. and *Chloris barbata* Sw. weeds. *NU. International Journal of Science, 12*(1), 11-24