รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของบัวบกและแว่นแก้ว

Effect of culture media in micropropagation on antioxidant activity of *Centella asiatica* and *Hydrocotyle umbellata*

ผศ. ดร. อัจฉรี เรืองเดช, รศ. ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

ได้รับทุนจากเงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ประจำปีงบประมาณ 2556

ชื่อโครงการ ผลของสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของบัวบก และแว่นแก้ว

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก เงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ประจำปีงบประมาณ 2556 **จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน** 40,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2555 ถึง 30 กันยายน 2556

ผู้ดำเนินการวิจัย นางสาวอัจฉรี เรืองเดช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.

นางนงนุช เลาหะวิสุทธิ์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.

บทคัดย่อ

การศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อ Murashike and Skoog (MS) ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและความความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแว่นแก้วโดยจะเลือกใช้ระดับของอาหาร MS ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแว่นแก้ว และบัวบก ที่แตกต่างกัน 4 ระดับคือ MS,1/2MS,1/4MS และ 1/8MS จำนวน 3 ซ้ำ เมื่อสิ้นสุดที่ระยะเวลาทั้งสิ้น 6 สัปดาห์ นำมาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยการหาปริมาณ Total phenolic compounds โดยใช้ Folin ciocalteu reagent วิเคราะห์ DPPH radical scavenging assayการวิเคราะห์ ABTS radical scavenging assayและวิเคราะห์ Reducing power assay จากการทดลองพบว่าระดับอาหาร 1/4MS ส่งผลให้การเจริญเติบโตของแว่นแก้วในชุดการทดลองเจริญเติบโตดีที่สุด ซึ่งค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตด้านความสูงเท่ากับ 28.9 ± 7.6 mm และ ค่าความสามารถการต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีค่าสูงสุดที่ระดับอาหารทดลอง 1/4MS โดยมีค่าเฉลี่ยการต้านอนุมูลอิสระในวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ Total phenolic compounds เท่ากับ 1.58 ± 0.01mg Gallic acid/g การกำจัดอนุมูล DPPHเท่ากับ 23.36 ± 1.61% และวิธีการวิเคราะห์ Reducing power assay 1.13 ± 0.46 %โดยอาหารทดลอง 1/4MS นั้นให้ค่าเฉลี่ยสูงในทุกวิธีการวิเคราะห์เมื่อเทียบกับอาหารทดลองสูตรอื่นๆ

การศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในบัวบกพบว่า บัวบกที่มีการเพาะเนื้อเยื่อในอาหารระดับที่ 1/2 MS นั้นมีการเจริญเติบโตดีที่สุด มีความสูงเท่ากับ 29.1±5.6mm และมีปริมาณ Total phenolic compounds เท่ากับ 1.79 ± 0.01 mg Gallic acid/g ส่วนการกำจัดอนุมูล DPPH˙มีค่าเท่ากับ 83.70± 2.70% ซึ่งมีประสิทธิภาพดีที่สุด เมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวบก ในอาหาร 1/2 MS มีความเหมาะสมที่สุด

คำสำคัญ: บัวบก, แว่นแก้ว อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อนุมูลอิสระ

Reserch Title: Effect of culture media in micropropagation on antioxidant activity of *Centella asiatica* and *Hydrocotyle umbellata*
Researcher: Uscharee Ruangdej, Nongnuch Laohavisuti,
Faculty: Agricultural Technology **Program:** Fisheries Science

Abstract

Effects of vary concentration levels of tissue media, Murashike and Skoog (MS) on the growth and antioxidant activity of water pennywort (*Hydrocotyle umbellata* L.) and Asiatic pennywort (*Centella asiatica* L.) were studied. The experiment was compared by four levels of concentration, MS,1/2MS,1/4MS and 1/8MS, with 3 replications. After 6 weeks, the plants sample were analyzed for the antioxidant activity as Total phenolic compounds by Folin ciocalteu reagent, DPPH radical scavenging assay, ABTS radical scavenging assay and Reducing power assay. The trial found that the media level 1/4MS resulted in better growth of *H. umbellate* L. than those in the series of experiments. The average growth in height is 28.9±7.6 mm. Total phenolic compound was 1.58 ± 0.01mg Gallic acid/g, DPPH radical scavenging was 23.36 ± 1.61%, and Reducing power assay was 1.13 ± 0.46 %. *H. umbellate* L. showed the best on growth and antioxidant activity when it was cultured in 1/4MS.

Effects on the growth and antioxidant activity of *C. asiatica* L. showed the best results in 1/2 MS media level. The average growth in height is 29.1±5.6mm, total phenolic compound was 1.79 ± 0.01 mg Gallic acid/g and DPPH radical scavenging was 83.70± 2.70%, which is the best performance when compared with other trials concentrations. The results showed that 1/2 MS are the most suitable.

Keywords: *Centella asiatica*, *Hydrocotyle umbellate*, Culture media, Free radicals

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้จัดทำขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร ที่สนับสนุนทุนการวิจัย และขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง คณะเทคโนโลยีการเกษตรที่ให้เครื่องมือและสถานที่ในการทำงานวิจัย

สารบัญ

สารบัญตาราง

สารบัญภาพ

บทที่ 1

บทนำ

การเลี้ยงสัตว์น้ำปัญหาหลักอย่างหนึ่งคือโรค โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย และไวรัส มักจะก่อให้เกิดการตายอย่างรวดเร็ว หรือแม้แต่สารที่มีตามธรรมชาติอย่างออกซิเจนก็อาจเป็นปัญหาได้ สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนเพื่อเป็นแหล่งของพลังงานแก่ร่างกาย แต่ในบางกรณีที่มีโมเลกุลของออกซิเจนมากเกินไปในรูปของอนุมูลอิสระ โมเลกุลเหล่านี้จะเข้าไปทำลายโมเลกุลอื่น ๆ ของร่างกายทำให้เกิดความเสียหายแก่เซลและเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจส่งผลต่อการทำลาย DNA ทำให้เซลใหม่ที่เกิดขึ้นมีความผิดปกติ หรือทำให้เอนไซม์ในร่างกายทำงานผิดปกติไป ความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระเหล่านี้เรียกว่าเกิดการออกซิเดชันเป็นที่ทราบกันว่า สารต้านอนุมูลอิสระที่มีมากเกินไปในร่างกายส่งผลให้ร่างกายอ่อนแอมีภูมิคุ้มกันลดลง การป้องกันเซลจากการทำลายของอนุมูลอิสระเหล่านี้ จะต้องใช้สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) เพราะสารต้านอนุมูลอิสระจะไปทำให้อนุมูลอิสระเป็นกลางซึ่งจะไม่เป็นอันตราย บางครั้งการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะก็จะแก้ปัญหาไม่ทัน ในปัจจุบันจึงนิยมใช้การเสริมให้ตัวสัตว์น้ำมีภูมิคุ้มกันที่ดี มีความสามารถในการกำจัดเชื้อโรคแปลกปลอมได้ด้วยตนเอง ความรุนแรงของปัญหาจะน้อยลง สารต้านอนุมูลอิสระนี้จะได้จากอาหารพวกวิตามินซี วิตามินอี เบต้ากลูแคน แอสตาแซนทิน เกลือแร่ หรือพวกไม่ใช่สารอาหารที่มักจะได้มาจากพืช เช่นพวกสารเคมีจากพืช (phytochemicals) เช่นกลุ่ม flavonoids, polyphenols และ anthocyanin พรรณไม้น้ำที่มีความสวยงามและนิยมใช้ประดับตู้ปลาที่ชื่อว่าบัวบกและแว่นแก้ว ก็มีสรรพคุณเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระที่น่าสนใจ ปัจจุบันมีการนำวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้เพื่อผลิตต้นอ่อนที่ปลอดเชื้อได้ในปริมาณมากโดยใช้ระยะเวลาที่สั้นลงกว่าการเพาะขยายพันธุ์โดยวิธีปกติ แต่ยังไม่มีข้อมูลที่จะสนับสนุนว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากต้นพันธุ์บัวบก และแว่นแก้วจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีอยู่เท่าใด ดังนั้นการศึกษาเทคนิควิธีการที่เกี่ยวข้องกับปริมาณธาตุอาหารในสูตรอาหารที่เหมาะสมโดยวิธีการเพาะเนื้อเยื่อให้ได้ปริมาณมากขึ้น และได้ผลผลิตที่สมบูรณ์แข็งแรง รวมถึงมีสารต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งจะสามารถลดการใช้ยาหรือสารเคมีสังเคราะห์ และปลอดภัยต่อผู้เลี้ยงสัตว์น้ำ ลดการใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะที่อาจมีผลตกค้างในเนื้อเยื่อและเพิ่มภูมิคุ้มกันให้สัตว์น้ำอีกด้วย รวมทั้งยังเพิ่มมูลค่าของธุรกิจพรรณไม้น้ำ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาปริมาณธาตุอาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพรรณไม้น้ำบัวบกและแว่นแก้ว

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ใบบัวบกเป็นสมุนไพรในเขตร้อนที่ขึ้นในที่ชื้น ๆ ทั่วไปแต่จะมีลักษณะใบคล้ายกับใบบัว ชื่อวิทยาศาสตร์ *Centella asiatica* (Linn.) Urban. ชื่อสามัญ Asiatic pennywort วงศ์ Umbelliferae (ภาพที่ 1 .1) ใบบัวบกเป็นที่รู้จักกันดีว่าน้ำใบบัวบกช่วยแก้ช้ำใน และยังมีสรรพคุณอื่นๆอีกมากจากการศึกษาทางเภสัชวิทยาเพื่อค้นหาสารสำคัญ หรือสารออกฤทธิ์ต่างๆ ที่มีอยู่ในใบบัวบกพบว่า ใบบัวบกจะให้สารไกลโคโซด์ (Glycosides) หลายชนิดที่ให้ผลต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Antioxidation) ซึ่งส่งผลให้การลดความเสื่อมของเซลล์ อวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสารไกลโคไซด์ที่ได้จากใบบัวบกยังส่งผลในการช่วยเสริมการสร้างสารคอลาเจน (Collagen) ที่เป็นโครงสร้างของผิว จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการกระตุ้นให้แผลสมานตัวได้เร็วขึ้น บัวบกและแว่นแก้วเมื่อดูเผิน ๆ จะมีลักษณะคล้ายกัน

ภาพที่ 1.1 ใบบัวบก *Centella asiatica* จากฟาร์มทดลอง

แว่นแก้ว หรือ บัวแก้ว ผักหนอกใหญ่ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Hydrocotyle umbellata* L. ชื่อสามัญ Water pennywort ชื่อวงศ์ Umbelliferae เป็นพืชน้ำมีอายุหลายปี ชอบความชื้นสูง เป็นไม้น้ำมีอายุหลายฤดู ลำต้นเป็นไหลทอดยาวตามพื้นดิน มีข้อปล้อง มีรากและใบงอกตามข้อทุกส่วน มีกลิ่นหอม ชอบขึ้นในที่ชื้นแฉะและริมน้ำต้นแว่นแก้วใช้กินเป็นอาหาร เป็นผักจิ้มกินกับลาบป่น เป็นผักจิ้มเครื่องหลน หรือเครื่องเคียง หรือคั้นน้ำดื่ม สรรพคุณทางสมุนไพร ทั้งต้นใช้แก้ตาแดง ช่วยขับปัสสาวะ แก้ช้ำใน แก้บวม แก้พิษไข้ ท้องอืด และท้องเสีย ใช้เป็นไม้ประดับในอ่างปลา (ภาพที่ 1.2) จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของแว่นแก้ว *Hydrocotyle umbellata* linn. โดย

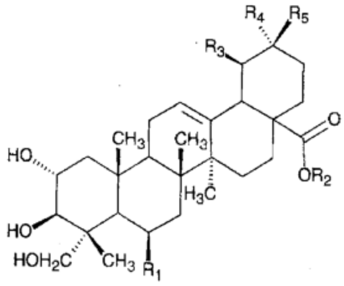
Wasana (2002) พบว่า ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น แว่นแก้วที่มีการสกัดด้วยเฮกเซนและคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถแยกสารได้ 9 ชนิด และพิสูจน์โครงสร้างโดยอาศัยสมบัติทางกายภาพ ปฏิกิริยาเคมี และหลักฐานทางสเปกโทรสโกปีคือ ของผสมของน้ำมันหอมระเหย Duangkamol *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อของสารสกัดหยาบของบัวบกและแว่นแก้วต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยทดสอบด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดได้แก่ เฮกเซน เอทานอล และน้ำ ซึ่งพบว่า ในสารสกัดหยาบของบัวบกที่สกัดด้วยเฮกเซน และ เอทานอล จะมีสาร asiatic acid และในสารสกัดหยาบใบบัวบกที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำจะพบสาร asiaticoside ซึ่งในสารสกัดหยาบของแว่นแก้วไม่พบสารทั้งสองกลุ่ม สรุปได้ว่าสารสกัดหยาบของบัวบกมีฤทธิ์ต้านต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยเฉพาะเมื่อสกัดด้วยน้ำ สารที่พืชสร้างขึ้นจะแตกต่างกันไปตามสารอาหารที่พืชได้รับ

ภาพที่ 1.2 ลักษณะของแว่นแก้ว *Hydrocotyle umbellate* L.
ที่มา : http://normar.exteen.com/20090128/entry

สารประกอบที่สำคัญ

1. บัวบกประกอบด้วยสารสำคัญหลายอย่างด้วยกัน ส่วนใหญ่จะเป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม Triterpenoid แต่มีสารสำคัญอื่นๆอีกหลายชนิด ได้แก่ๆ Steroid-like Compunds, Free acids, Volatile oil, Glycerides of fatty acid, Plants sterol, Flavonoids และสารประกอบอื่นๆ ได้แก่ Alkaloid hydrocotyline, Myoinositol, Amino acid, Resins, Tannins, Pectins, วิตามินบี วิตามินซี แร่ธาตุต่างๆ โดยแร่ธาตุที่พบคือ แคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียม โปแทสเซียม กรดอะมิโน และเบต้าแคโรทีน (Brinkhaus *et al.,* 2000, Abdul *et al*., 2002) ซึ่งสารเคมีดังกล่าวมี

โครงสร้างและสมบัติทางกายภาพดังภาพที่ 1.3



	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
asiatic acid	– H	– H	– CH_3	– CH_3	– H
madecassic acid	– OH	– H	– CH_3	– CH_3	– H
asiaticoside	– H	1)-β-D-glc-(6-1)-β-D-glc-(4-1)- -L-rha	– CH_3	– CH_3	– H
asiaticoside A*	– OH	1)-β-D-glc-(6-1)-β-D-glc-(4-1)- -L-rha	– CH_3	– CH_3	– H
terminolic acid	– OH	– H	– CH_3	– CH_3	– CH_3
asiaticoside B	– OH	1)-β-D-glc-(6-1)-β-D-glc-(4-1)- -L-rha	– H	– CH_3	– CH_3

ภาพที่ 1.3 *Centella asiatica* และโครงสร้างหลักของ asiatic acid, asiaricoside และ asiaticoside A และ B (ดัดแปลงจาก Kartnig and Hoffrnann-Bohrn 1992)

ที่มา : Brinkhaus *et al.* (2000)

สารจากใบบัวบกสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อไวรัส และเชื้อบิดมีตัว แก้โรคเรื้อน ฆ่าแมลง ลดอาการซึมเศร้า แก้ชัก กดระบบประสาทส่วนกลาง คุมกำเนิด ลดการหดเกร็งของลำไส้เล็ก รักษาแผลในกระเพาะอาหาร ต้านฤทธิ์ของแอมเฟตามีน แก้ปวด ลดไข้ ลดความเครียด กระตุ้นการงอกของเส้นผม เพิ่มฤทธิ์ยานอนหลับ ยับยั้งเนื้องอก กระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย ยับยั้งเอนไซม์ arysulfatase, BN-acetlglucosaminase และ angiotensin converting enzyme ลดระดับ uronic acid เพิ่มระดับ GABA ลดความดันโลหิต ลดพฤติกรรมธรรมชาติของสัตว์ทดลองทำให้ความจำดีขึ้น เพิ่มการเรียนรู้ กล่อมประสาท เร่งการสมานแผล จับกับ receptor ของ cholecystokinin สกัดกั้นการจับตัวของ GABA ที่ receptor ลดปริมาณ dopamine ลดปริมาณ norepinephrine ในสมอง ลดปริมาณปัสสาวะ ขับปัสสาวะ ลดอัตราการเต้นของหัวใจ ลดความแรงในการบีบตัวของหัวใจขยายหลอดเลือด ต้านฤทธิ์ฮีสตามีน ห้ามเลือด เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง และสามารถยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ได้

จากการศึกษาผลการใช้ใบบัวบกเพื่อรักษาโรคเรื้อนและวัณโรคที่ผิวหนัง พบว่าสาร asiaticoside ในใบบัวบกสามารถทำลายสารเคลือบผิวที่หุ้มแบคทีเรีย (ปกติภูมิคุ้มกันไม่สามารถทำลายสารเคลือบผิวตัวนี้ได้) ทำให้ภูมิคุ้มกันเข้าไปจัดการกับเชื้อแบคทีเรียได้โดยตรง สารที่ออกฤทธิ์คือ Madecassic acid, Asiatic acid และ Asiaticoside ซึ่งมีฤทธิ์ช่วยสมานแผล และเร่งการสร้างเนื้อเยื่อ สามารถระงับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนองและช่วยลดการอักเสบได้

นอกจากนั้น สารสกัดบัวบกด้วยน้ำร้อนสามารถฆ่าเชื้อ *Staphytococcus aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดหนองได้ ดังนั้นใบบัวบกจึงช่วยป้องกันการติดเชื้อของแผลได้อีกด้วย ซึ่ง Duangkamol *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อของสารสกัดหยาบของบัวบกและแว่นแก้วต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยทดสอบด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน

เอทานอล และน้ำ ซึ่งพบว่า ในสารสกัดหยาบของบัวบกที่สกัดด้วยเฮกเซน และ เอทานอล จะมีสาร asiatic acid และในสารสกัดหยาบใบบัวบกที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำจะพบสาร asiaticoside ซึ่งในสารสกัดหยาบของแว่นแก้วไม่พบสารทั้งสองกลุ่ม สรุปได้ว่าสารสกัดหยาบของบัวบกมีฤทธิ์ต้านต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยเฉพาะเมื่อสกัดด้วยน้ำ

Shukla et al. (1999) ศึกษาผลของใบบัวบกในการรักษาแผลได้มาจากสารตัวหนึ่งในบัวบกเรียกว่า asiaticoside ไปกระตุ้นเอนไซม์ leucine amino peptidase ทำให้การสร้างเนื้อเยื่อซ่อมแซมแผลเร็วขึ้น นอกจากนี้ asiaticoside ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง collagen และ acid mucopolysaccharide ซึ่งเป็นตัวขัดขวางการสมานตัวของรอยแผล และพบว่าสารสกัดจากใบบัวบกลดการเกิด granulation บริเวณบาดแผล และลดการเกาะตัวของ fibrin ซึ่งจะส่งผลดีต่อรอยแผลทำให้ไม่เป็นแผลเป็นจากการสร้างเนื้อเยื่อมากเกิน (hypertrophic scars) ใช้รักษาการเกิด keloid ชนิดที่เกิดใหม่ หรือชนิดลุกลาม โดยบัวบกจะเร่งการหายของแผล และไม่ทำให้เกิดแผลเป็น เหมาะอย่างยิ่งสำหรับการรักษาแผลเรื้อรัง แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก นอกจากสมานแผลที่ผิวหนังแล้ว ยังพบว่าสารสกัดบัวบกทั้งต้นมีฤทธิ์รักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ในคนและหนูขาวได้ดีอีกด้วย

2.จากการศึกษา องค์ประกอบทางเคมีของแว่นแก้ว *Hydrocotyle umbellata* L. โดย Wasana (2002) พบว่า ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น แว่นแก้วที่มีการสกัดด้วยเฮกเซนและคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถแยกสารได้ 9 ชนิด และพิสูจน์โครงสร้างโดยอาศัยสมบัติทางกายภาพ ปฏิกิริยาเคมี และหลักฐานทางสเปกโทรสโกปีคือ ของผสมของน้ำมันหอมระเหย (chamigrene, alpha-bergamotene, alpha-santalol, germacrene D, beta-caryophyllene และ beta-pinene) ของผสมของแอลกอฮอล์โซ่ตรง ของผสมของเอสเทอร์โซ่ตรง ของผสมของ stigmasterol และ stigmasta-7, 25-dien-3-D-glucopyranoside, beta-D-glucopyranosyl tetratriacontan-2,4-dienoate และ methyl oleanolate 3-O-(beta-D-glucopyranoside) สารสองชนิดหลังพบว่าเป็นสารใหม่ นอกจากนี้ ได้นำแว่นแก้วสดมากลั่นไอน้ำได้น้ำมันหอมระเหย ซึ่งวิเคราะห์ได้ว่าประกอบด้วย longicyclene, alpha-bergamotene, beta-caryophyllene, 1H-benzocycloheptene-2, 4alpha, 5, 6, 7, 8, 9, 9alpha-octahydro-3, 5, 5-trimethylene-(4 alphaS-cis) และ alpha-santalol เป็นองค์ประกอบ

การศึกษาฤทธิ์ของแว่นแก้วที่มีผลในการยับยั้งการเติบโตของต้นกล้าไมยราบยักษ์ *Mimosa pigra* Linn. โดย Wasana (2002) พบว่า methyl oleanolate 3-O-((beta)-D-glucopyranoside) ซึ่งแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตส่วนรากได้ดีที่สุด 70%, (beta)-D-glucopyranosyl tetratriacontan-2,4-dienoate 63% และ น้ำมันหอมระเหยจากต้นสด 46% ที่ความเข้มข้น 1,000 ส่วนในล้านส่วน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเติบโตของต้นกล้าหญ้าข้าวนก *Echinochloacrus-galli* Beauv., หญ้าขจรจบดอกเล็ก *Pennisetum pedicellatum* Schult., ผักกาดหอม *Lactuca sativa* Linn., ผักเบี้ยหิน *Trianthema portulacastrum* Linn. และก้นจ้ำขาว *Bidens pilosa* Linn. พบว่า methyl oleanolate glycoside สามารถยับยั้งการเติบโตส่วนรากของพืชทุกชนิดได้ดีที่สุดด้วย

สารต้านอนุมูลอิสระในบัวบก

บัวบก นอกจากจะเป็นสมุนไพรที่นำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์แล้ว ยังพบว่าบัวบกมีสารไกลโคไซด์หลายชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและยังสามารถช่วยเสริมสร้างคอลลาเจน (Collagen) Faujan et al. (2009) กล่าวว่า บัวบกจัดว่าเป็นพืชชนิดที่เรียกว่า ROS (reactive oxygen species) คืออนุมูลอิสระอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวเป็นกลุ่มสารที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ บางตัวเป็นอนุมูลอิสระที่มีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ เช่น superoxide anion (O_2^-) และ hydroxyl (OH) บางตัวไม่ใช่ เช่น H_2O_2และ Oxygen (O_2) แต่ทุกตัวมีความว่องไวมากในการออกซิไดส์ (ดึงหรือรับอิเล็กตรอน) จากสารชีวโมเลกุลต่างๆของร่างกายไม่ว่าจะเป็นไขมันโดยเฉพาะอย่างยิ่งโคเลสเตอรอลและกรดไขมันไม่อิ่มตัว

อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลเดี่ยวที่ไม่สามารถอยู่โดดเดี่ยวได้ (Highly unstable) ต้องจับคู่กับโมเลกุลอื่นเรียกว่าการเกิดปฏิกริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ซึ่งเกิดขึ้นตลอดเวลาในเซลล์ของร่างกายส่วนที่เหลือของอนุมูลอิสระหลังจากการเกิดปฏิกริยาออกซิเดชันแล้วจะไปทำความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์และเซลล์ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ต่างไปจากเดิม (Mutation) จนอาจจะกลายเป็นเนื้อร้าย (มะเร็ง) ซึ่งในร่างกายของคนเรามีกลไกที่ทำลายพวกอนุมูลอิสระที่เหลือจากปฏิกริยาเหล่านี้ได้โดยการสร้างเอมไซม์ (Enzyme) ขึ้นมาหรือได้จากสารอาหารบางอย่างที่เรารับประทานเช่นวิตามินซี, เบต้าแคโรทีน (Beta-carotene) มาทำลายอนุมูลอิสระหรือทำให้เป็นกลาง (Neutralize) ซึ่งพบว่าในผัก, ผลไม้, สมุนไพร, เครื่องเทศเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระเช่นสารประกอบฟีนอลิก, แคโรทีนอยด์, วิตามินซีเป็นต้น (นฤมล และ ศศิธร) นอกจากนี้ Subathra et al. (2005) รายงานว่า ภาวะ oxidation มีการนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยมากหรือต่ำมาก และมีการสะสม ซึ่งจะมีผลกับกระบวนการเจริญพันธุ์ ยังพบว่า การเกิด oxidant ทำให้โปรตีนและสารพันธุกรรมของร่างกาย (DNA) ทั้งโครงสร้างและการทำงานของสารชีวโมเลกุลนั้นๆผิดปกติ และสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อเนื่องจากสารชีวโมเลกุลหนึ่งไปยังสารชีวโมเลกุลอื่นเกิดอนุพันธ์ใหม่เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ได้การเกิดปฏิกริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ซึ่งเกิดขึ้นตลอดเวลาในเซลล์ของร่างกายส่วนที่เหลือของอนุมูลอิสระหลังจากการเกิดปฏิกริยาออกซิเดชันแล้วจะไปทำความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์และเซลล์ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ต่างไปจากเดิม (Mutation) จนอาจจะกลายเป็นเนื้อร้าย (มะเร็ง) ซึ่งในร่างกายของคนเรามีกลไกที่ทำลายพวกอนุมูลอิสระที่เหลือจากปฏิกริยาเหล่านี้ได้โดยการสร้างเอมไซม์ (Enzyme) ขึ้นมาหรือได้จากสารอาหารบางอย่างที่เรารับประทานเช่นวิตามินซีเบต้าแคโรทีน (Beta-carotene) มาทำลายอนุมูลอิสระหรือทำให้เป็นกลางมีการศึกษาพบว่าในผัก , ผลไม้, สมุนไพร, เครื่องเทศเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระเช่นสารประกอบฟีโนลิกแคโรทีนอยด์วิตามินซีเป็นต้น (นันท์นภัส, 2551)

สารประกอบฟิโนลิก (phenolic compounds) สารประกอบนี้พบได้ทั้งพืชที่กินได้และพืชที่กินไม่ได้ Nguyet et al. (2004) กล่าวว่า ปริมาณของโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenol) คือปริมาณของฟีนอลที่ได้หลังจากมีการ hydrolysisของ glycosides โดย HCL จากการสกัด และ Free polyphenol คือปริมาณฟีนอลที่ไม่มีการ hydrolysis (ตารางที่ 1.1) Fuajan และคณะ (200 9) รายงานว่า สารประกอบฟิโนลิกนี้มีผลต่อความหลากหลายทางเทคโนโลยีชีวภาพ รวมถึงปฏิกิริยาต่อต้านอนุมูลอิสระ หรือที่เรียกว่า antioxidant การต่อต้านอนุมูลอิสระของฟิโนลิกมีความสำคัญมากเพื่อต่อต้านการเกิด oxidation เพราะสารกระกอบฟิโนลิก มีหน้าที่ในการลดสารประกอบพวกออกซิเจนเดี่ยวและไฮโดรเจนที่มีการให้ ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้เกิดการ oxidation สารประกอบฟิโนลิกได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นในอุตสาหกรรมการทำอาหาร เพราะมันสามารถชะลอและสามารถลดการเกิด oxidant ของไขมันและเพื่อปรับปรุงคุณภาพและรักษาคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร โดยนันท์นภัสเมื่อรับประทานอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระมากทำให้ร่างกายมีสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นในกระแสเลือด ซึ่งสามารถป้องกันอันตรายที่เกิดจากการทำลายของอนุมูลอิสระได้ การรับประทานอาหารประเภทผักใบเขียว ผลไม้และสมุนไพรเป็นประจำทำให้ร่างกายสามารถป้องกันโรคที่มีสาเหตุจากการทำลายของอนุมูลอิสระเช่น โรคไขมันในเลือดสูง โรคหัวใจ เบาหวาน โรคมะเร็ง โรคไต รวมทั้งความแก่ชรา

ตารางที่ 1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลที่พบในพืช

พืชที่รับประทานได้	Total polyphenol (μmol catechin/g)	Free Polyphenols (μmol catechin/g)	%free polyphenols
Centella asiatica	44.29±2.9	2.90±0.5	65.0±4.8
Fishwort	31.5±0.3	22.6±0.4	71.7±0.9
Peristrophe roxburghiana	17.7±0.6	11.5±0.6	65.7±1.9
Peaderia tomentosa	17.7±1.2	13.6±0.3	77.2±4.0

ที่มา: ดัดแปลงจาก Nguyet et al. (2004)

ผลของการสกัดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในแว่นแก้ว

Sulaiman et al. (2011) ได้ทำการทดลองศึกษาผลของตัวทำสกัดและค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในพืช 37 ชนิด โดยมีการใช้ตัวทำสกัดทั้งหมด 4 ชนิดได้แก่ อะซิโตน 70%, เอ

ทา-นอล70% , เมทานอล70% และน้ำเป็นตัวสกัด ทำการวิเคราะห์ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี using diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) และวิธี ferric reducingantioxidant power (FRAP) ในการทดลองพบว่าอะซิโตน 70% มีประสิ ทธิภาพเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุด นอกจากนี้การพบเอนไซม์และวิตามินชนิดต่างๆ ในพืช ยังเป็นตัวที่เกี่ยวข้องกับค่าของสารต้านอนุมูลอิสระในพืชชนิดนั้นๆ

การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในกลุ่มพืช *Hydrocotyle*

Huang et al. (2008) ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในกลุ่มพืชชนิด *Hydrocotyle* โดยศึกษาในพืช 4 ชนิดที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับแว่นแก้ว ได้แก่ *H. nepalensis (HN) H. setulosa (HSe) , H. batrachium (HB) , H. sibthorpioides (HSi)* ในประเทศไต้หวัน โดยการใช้วิธีการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ผลการศึกษาผลว่าการสกัดตัวอย่างพืชทั้งสี่ชนิดด้วยน้ำนั้นให้ผลของค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดตัวอย่างด้วยเอทานอล ในการทดลองได้นำพืชในกลุ่ม *Hydrocotyle* มาทำการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งทั้งหมดเป็นพืชพื้นบ้านในประเทศไต้หวัน โดยใช้วิธีการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สนใจคือการวิเคราะห์หาค่า ABTS$^{\cdot+}$และ DPPH โดยการหาค่า ABTS$^{\cdot+}$วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และการหาค่า DPPH วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ผลการทดลองวิธีการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระพบว่า *H. nepalensis* (HN) ที่สกัดด้วยน้ำจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด ซึ่งเมื่อเทียบดูตัวอย่างอื่นที่ทำการสกัดด้วยน้ำและเอทานอล การสกัดตัวอย่างโดยการใช้น้ำนั้นให้ผลของค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าจะสกัดด้วยเอทานอล

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีด้วยกันหลายชนิด โดยการเลือกใช้อาหารจะขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และสภาพของชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเลี้ยง อาหารที่นิยมใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากที่สุด โดยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนของเนื้อเยื่อที่ได้นิยมนำมาปลูกคือส่วนของแคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มของเซลล์ที่จะมีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเซลล์และเซลล์ยังไม่มีการจัดรูปร่างที่แน่นอน อีกทั้งการเลี้ยงแคลลัสและเซลล์แขวนลอย ของพืชส่วนใหญ่เกือบทุกชนิดทำได้ง่ายกว่าการเลี้ยงจากส่วนอื่นๆ

Patra et al.(1998) กล่าวว่า การนำชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์นั้น มีความต้องการธาตุอาหารและสารบางอย่างที่จำเป็นมากกว่าการเลี้ยงพืชโดยวิธีการเพาะเลี้ยงทั้งต้น คือต้องการทั้งธาตุอาหารหลัก (macro-elements/nutrients) และธาตุอาหารรอง (micro-elements/nutrients) ที่ใช้ตามปกติในการเลี้ยงพืชในสารละลาย นอกจากนั้นยังต้องการธาตุอาหารอื่น ๆ อีกด้วย ปกติแล้วเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่แยกมาเลี้ยงจะต้องการวิตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) ต่าง ๆ ซึ่งปกติสังเคราะห์ได้เองจากส่วนหนึ่งของต้นเพื่อไปสะสมไว้ยังอีกส่วนหนึ่ง ของต้นพืช แล้วเคลื่อนย้ายไปยังส่วนอื่น ๆ เพื่อใช้ในกระบวนการเมตาโบลิซึม สูตร

อาหารที่ใช้มักถูกดัดแปลงไปตามความมุ่งหมาย เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงพัฒนาส่วนประกอบของต้นพืช

1.ประเภทของอาหาร

1.1 อาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium) จะใช้วุ้นในการปรับสภาพของสารละลายให้มีลักษณะที่แข็งขึ้น แต่มักพบว่าคุณสมบัติต่าง ๆ ของสารประกอบในอาหารอาจไม่ได้รับสูงสุดเท่ากับอาหารเหลว (liquid medium) และการใช้วุ้นปริมาณมากเกินไปอาจไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อได้ ดังนั้นความเข้มข้นของวุ้นจะต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อประเภทของเนื้อเยื่อที่จะนำมาทำการเพาะเลี้ยง

1.2 อาหารเหลว (liquid medium) อาหารเหลวเป็นที่นิยมใช้กันอย่างมาก เนื่องจากเนื้อเยื่อจะอยู่ในอาหารเหลวตลอดเวลา และจะทำให้เนื้อเยื่อได้รับสารอาหารอย่างเต็มที่เนื่องด้วยสภาพอาหารที่ไม่แข็งเพราะไม่ได้รับการเติมวุ้น

2. ส่วนประกอบของอาหาร (media constituents)

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จะประกอบด้วยธาตุอาหารต่าง ๆ ที่พืชต้องการเพื่อให้พืชนำไปใช้ในการพัฒนาเซลล์และต้นพืช

2.1 น้ำ (water)

น้ำจะเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารเพาะเลี้ยง โดยในอาหารจะประกอบไปด้วยน้ำประมาณ 95 % ซึ่งการจะน้ำมาใช้ในอาหารเพาะเนื้อเยื่อจะต้องมีการกลั่นและทำความสะอาดเป็นอย่างดีเพื่อป้องกันการเกิดแบคทีเรียหรือเชื้อราในระหว่างการเพาะเลี้ยง

2.2วุ้น (agar)

เนื้อเยื่อส่วนมากจะเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีวุ้น ซึ่งหน้าที่ช่วยพยุงเนื้อเยื่อให้ตั้งอยู่ได้บนอาหาร ในกรณีที่เลี้ยงในอาหารเหลวจะวางบนเครื่องเขย่า หรือเลี้ยงบนสะพานกระดาษกรอง (filter paper bridge) เพื่อให้เนื้อเยื่อได้รับอากาศ วุ้นเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) มีโมเลกุลใหญ่ วุ้นที่มีคุณภาพสูง เช่น difcoitek Agar มีราคาแพงมากและปราศจากสิ่งเจือปน ในห้องปฏิบัติการบางแห่งใช้วุ้นประกอบอาหารแทนได้ การใช้วุ้นในปริมาณที่ต่ำจะทำให้อาหารไม่แข็งตัว และถ้าหาก pHต่ำก็เป็นอีกหนึ่งปัญหาที่ทำให้วุ้นไม่แข็งตัวไม่สามารถพยุงเนื้อเยื่อพืชไว้ได้ แต่ถ้าใช้วุ้นในปริมาณที่สูงจะทำให้อาหารแข็งมากจนไม่สามารถให้น้ำเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของพืช และยังทำให้พืชดูดอาหารไปใช้ได้ยาก

2.3 แหล่งให้ธาตุคาร์บอน (carbon sources)

เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารทุกสูตร เป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นมากต่อ การเจริญเติบโต เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชยังไม่มีการสังเคราะห์แสงและมีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์จำกัด น้ำตาลที่นิยมใช้ คือ ซูโครส (sucrose) ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่พืชสังเคราะห์ได้เอง และ มีความจำเป็นอย่างมากต่อเนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิด

2.4 เกลืออนินทรีย์ (inorganic salt)

ธาตุอาหารมีความสำคัญในการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเช่นกันโดยแยกออกได้เป็นธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige and Skoog (MS) ได้รับการพัฒนาให้เหมาะต่อการเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืช ทั้งยังมีผลดีในการกระตุ้นการพัฒนาของพืช โดย

มีการกำหนดปริมาณเกลืออนินทรีย์ให้เหมาะต่อการเจริญของเซลล์ที่เลี้ยง ในแต่ละชนิดและสายพันธุ์ของพืช โดยปกติสารละลายเกลืออนินทรีย์ของ Murashige and Skoog (MS-salt solution) ถูกใช้เป็นส่วนผสมหลักเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เลี้ยง สาเหตุหนึ่งคือ เกลือสูตรนี้มีความเข้มข้นสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง NH_4 อิออน และ ธาตุอื่น ๆ บางชนิดมีปริมาณที่สูงมาก ซึ่งจำเป็นต่อเนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิด ในอาหารสูตร MS นั้น มีปริมาณธาตุอาหารรองค่อนข้างสูงเป็นพิเศษเมื่อเทียบกับสูตรอื่น

3.ความเป็นกรดและด่างของอาหาร (pH of nutrient medium)

pH ที่เหมาะสมของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอยู่ในช่วง 5.0 - 6.5 ถ้าต่ำมากไป (<4.5) หรือสูงมากเกินไป (>7.6) จะทำให้พืชหยุดการเจริญเติบโต ถ้า pH สูงกว่า 6 จะทำให้อาหารแข็งมาก ถ้า pH ต่ำกว่า5 จะส่งผลต่อการแข็งตัววุ้นที่ทำการใส่ลงไปในของอาหารเพาะเนื้อเยื่อ นอกจากนี้จากการศึกษายังพบว่าผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการเลือกกระตุ้นของอาหารที่ใช้เลี้ยงนั้นจะขึ้นอยู่กับ pH ด้วย ที่มีค่าสูงหรือต่ำเกินไปควรหลีกเลี่ยงเพราะจะไปขัดขวางความเป็นประโยชน์ ของธาตุอาหาร

ผลของระดับอาหาร MS ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ

รัฐภัทร์และคณะ (2553) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถชักนำให้เกิดยอดเพื่อผลิตต้นอ่อนปลอดเชื้อได้ในเชิงปริมาณได้ต้นพันธุ์คุณภาพสูงผลผลิตสม่ำเสมอคงเอกลักษณ์ของสายพันธุ์และใช้ระยะเวลาน้อยกว่าการเพาะขยายพันธุ์โดยวิธีปกติ

โดยรัฐภัทร์และคณะ (2553) ได้ทำการศึกษาถึงผลของระดับอาหาร MS ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตในต้นรากดำใบยาวซึ่งเป็นพรรณไม้น้ำในกลุ่ม Polypodiaceae จากการทดลองมีการกำหนดสูตรอาหาร MS ที่ 4 ระดับ MS , 3/4MS , 1/2MS และ 1/4MS พบว่าระดับของอาหาร MS ส่งผลให้การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อต้นรากดำใบยาวให้มีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน โดยระดับอาหารที่เนื้อเยื่อพืชโดยได้ดีที่สุด คือ ที่ระดับ 1/2 MS เนื่องจากอาหารสูตร MS มีปริมาณเกลือแร่สูงซึ่งเหมาะสาหรับพืชมีดอกแต่รากดาใบยาวเป็นพืชชั้นต่ามีความต้องการธาตุอาหารที่มีปริมาณน้อยกว่าโดยพืชในกลุ่มเฟิร์นสามารถเกิดยอดจานวนมากในอาหารสังเคราะห์ระดับความเข้มข้น 1/2 MS

การทดลองที่เกี่ยวข้องกับปริมาณธาตุอาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ Yu *et al.* (2000) ทดลองเลี้ยงมะละกอในสูตรอาหารสังเคราะห์ 4 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 MS สูตรที่ 2 ½MS (ลดธาตุอาหารหลัก ½ ของสูตรปกติ) สูตรที่ 3 ¼MS (ลดธาตุอาหารหลัก ¼ ของสูตรปกติ) และสูตรที่ 4 ไม่เติม MS ลงในวุ้น เพื่อสังเกตการณ์เกิดราก พบว่า เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ต้นอ่อนมะละกอเกิดรากใน สูตรที่ 3 ¼MS มีจำนวนรากเกิดขึ้นมากที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) Faisal *et al*. (2007) ทดลองเลี้ยงต้นคันธุลี (*Tylophora indica*) ในสูตรอาหารสังเคราะห์ 4 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 MS สูตรที่ 2 ½MS (ลดธาตุอาหารหลัก ½ ของสูตรปกติ) สูตรที่ 3 ⅓MS (ลดธาตุอาหารหลัก ¼ ของสูตรปกติ) และสูตรที่ 4 ¼MS (ลดธาตุอาหารหลัก ¼ ของสูตรปกติ) พบว่า เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สูตรที่ 1 MS มีต้นอ่อนมากที่สุดและสูตรที่ 4 ¼MS มีต้นอ่อนน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

แผนการทดลอง

การทดลองใช้แผนการทดลองแบบ CRD หรือการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ เพื่อศึกษาปริมาณ antioxidant ในต้นแว่นแก้ว และบัวบก ทำการศึกษาโดยใช้สูตรอาหาร MS ความเข้มข้นเท่ากับ MS, 1/2MS, 1/4MS และ1/8MS สูตรละ 15 ต้นในการเพาะเลี้ยง เพื่อตรวจสอบ ว่าแต่ละสูตรส่งผลต่อการเจริญเติบโต และค่าความสามารถการต้านสารอนุมูลอิสระ ของต้นแว่นแก้ว และบัวบก จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในเวลา 6 สัปดาห์

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1 อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ตัดชิ้นส่วนแว่นแก้ว เช่น มีด ,คีมคีบ ,ที่วางหลอดทดลอง
1.2 ขวดน้ำเกลือ
1.3 น้ำกลั่น
1.4 บีกเกอร์ (Beaker)
1.5 ขวดแก้วใส่อาหารวุ้น
1.6 ตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
1.7 กระดาษ (Tissue)
1.8 ฟอยล์ (Foil)
1.9 ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)
1.10แท่งแก้ว (Rod)

2 สารเคมี

2.1 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Murashige and Skoog(MS)
2.2น้ำตาล
2.3 ผงวุ้น
2.4 Innositol
2.5 Stock 3(ตารางผนวกที่ 1)
2.6 น้ำกลั่น
2.7 Alcohol 70%
2.8 Chlorox 10 % (ไฮเตอร์10 ml เจือจางด้วยน้ำกลั่น 90 ml)
2.9 Silver nitrate 1%
2.10 Tween 20
2.11 น้ำยาล้างผัก
2.12 น้ำส้มสายชู

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทดสอบ (แว่นแก้ว และบัวบก)

1.1 วิธีการเตรียมสูตรอาหาร MS

1.1.1 ทำการชั่ง MS ตามสูตรอาหาร MS ต่าง ๆ ที่ใช้โดยสูตร MS ใช้ MS ปริมาณ 4.33 g สูตร 1/2MS ใช้ MS ปริมาณ 2.17 g สูตรอาหาร 1/4MS ใช้ MS ปริมาณ 1.08 g และสูตรอาหาร 1/8MS ใช้ MS ปริมาณ 0.52 g

1.1.2 แต่ละสูตร MS ใช้น้ำตาล 30 gและ Innositol 0.1 g คนให้ละลายเปลี่ยนใส่ Volume flash ขนาด 1000 ml

1.1.3 เติม Stock 3 ปริมาตร 1 ml

1.1.4 ปรับปริมาตร 1000 ml ในขวดปรับปริมาตร และเขย่าให้เข้ากัน

1.1.5 ปรับให้ pH เท่ากับ 5.6

1.1.6 นำไปต้มโดยใช้เวลาประมาณ 5นาที ใส่ผงวุ้น 7 g

1.1.7 เติมอาหารลงในขวดแก้ว แล้วนำไปเข้า เครื่อง Autoclave

2. วิธีการฟอกแว่นแก้ว

2.1 เลือกส่วนของแว่นแก้วที่เป็นเนื้อเยื่อส่วนเจริญ ล้างน้ำผสมน้ำยาล้างจานให้สะอาดเปลี่ยนใส่ขวดเปล่าเติมน้ำยาล้างผักผัก 1-2 หยด และน้ำส้มสายชู 2 หยด ปิดฝาขวด เขย่า5-10 นาทีเทน้ำออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาทีจนหมดฟอง

2.2 นำแว่นแก้วเปลี่ยนใส่ขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยเข้าเครื่อง Autocave

2.3 เติม Alcohol 70% ให้พอท่วม เขย่า 1 นาที

2.4 เท Alcohol 70% ออก ล้างน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที

2.5 เติม Clolox 10 % เขย่า 10 นาที

2.6 เท Clorox ออก ล้างน้ำกลั้น 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที

2.7 เติม Silver nitrate 1% และ Tween 20 ประมาณ1-2 หยด เขย่า 30 วินาที

2.8 เทออก แล้วล้างน้ำกลั้น 3 ครั้ง จากนั้นนำเข้าตู้เพาะเนื้อเยื่อเพื่อปลูกแว่นแก้วลงในอาหาร MS ที่เตรียมไว้

3. การฟอกฆ่าเชื้อบัวบก

3.1 ต้นบัวบกที่มีการเพาะเลี้ยงในรางปลูกพรรณไม้น้ำจากการปลูกเลี้ยงในเรือนเพาะชำ ตัดส่วนยอดนำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำ ถ้าบริเวณยอดมีสิ่งสกปรกมาก ให้นำมาล้างน้ำและฟอกด้วยน้ำผสมน้ำยาล้างจานเป็นเวลาประมาณ 1 นาที จากนั้นนำส่วนยอดมาตัดใบและกาบใบทิ้ง เขย่าในน้ำยาล้างผักกับน้ำส้มสายชูเป็นเวลา 5-10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งครั้งละ 2 นาที นำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70%เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ (clorox)10% +tween 20 ประมาณ 2-3 หยด เขย่านาน 10-15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาทีขั้นตอนสุดท้าย ฟอกฆ่าเชื้อด้วย ซิลเวอร์ไนเตรต (Silver nitrate) 1% เขย่า1 นาทีล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที

3.2 นำบัวบกที่ผ่านการฟอกมาตัดแต่งให้เหลือเพียงส่วนหน่อหรือตา เพื่อปลูกบนอาหารเหลวกึ่งแข็ง สูตร MS เลี้ยงในห้องที่มีการควบคุมอุณหภูมิ 25°c ให้แสงวันละ 12 ชั่วโมง บัวบกที่มีการงอกและเจริญเติบโตโดนไม่เกิดการเจือปนของจุลินทรีย์ รา หรือแบคทีเรีย จะถูกนำมาใช้ปลูกในการทดลองอาหารสูตร MS ที่ต่างกันต่อไป

4. การเตรียมสารวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ

4.1 สารเคมี

4.1.1 การวิเคราะห์ Total phenolic compounds โดยใช้ Folin ciocalteu reagent

4.1.1.1 Gallic acid0.0200 กรัม ปรับปริมาตรด้วย Ethanol ความเข้มข้น 95% (มาจาก Ethanolความเข้มข้น 100% 95 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น100 มิลลิลิตร) 50 มิลลิลิตร

4.1.1.2 Folinciocalteu ความเข้มข้นเจือจาง 10 เท่า เตรียมจากFolin ciocalteu 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4.1.1.3 Sodium hydroxide ความเข้มข้น 7.5% (W/V) เตรียมจาก Sodium hydroxide 7.5 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4.1.2 การวิเคราะห์ 2,2 -Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay

4.1.2.1 DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ เตรียมจาก DPPH (มวลโมเลกุล 394.32 กรัม/โมล) 0.0079 กรัม ปรับปริมาตรด้วย Ethanol ความเข้มข้น 95%(มาจาก Ethanol ความเข้มข้น 100% 95 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) 100 มิลลิลิตร

4.1.3 การวิเคราะห์วิธี Reducing power assay

4.1.3.1 Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์pH 7.4 เตรียมจาก Sodium hydrogen phosphate anhydrous (กรด) 2.40 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และ Disodium hydrogen phosphate anhydrous (ด่าง) 2.84 กรัมปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น100 มิลลิลิตร นำสารละลายทั้ง 2 ชนิดมาผสมและปรับค่า pH เท่ากับ 7.4

4.1.3.2 Potassium ferricyanide ความเข้มข้น 1%เตรียมจาก Potassium ferricyanide 1 กรัม ปรับปริมาตรด้วย Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 7.4 100 มิลลิลิตร

4.1.3.3 Trichloroacetic acid ความเข้มข้น 10% (W/V) เตรียมจาก Trichloroacetic acid10 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4.1.3.4 Ferric chloride anhydrous ความเข้มข้น 0.1%เตรียมจาก Ferric chloride anhydrous0.1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4.1.4 การวิเคราะห์วิธี 2, 2 ’-azinobis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS) radical scavenging assay

4.1.4.1 ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ เตรียมจาก ABTS (มวลโมเลกุล 548.68 กรัม/โมล) 0.0384 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

4.1.4.2 Potassium persulfateความเข้มข้น 140 มิลลิโมลาร์ เตรียมจาก Potassium persulfate (มวลโมเลกุล 270.31 กรัม/โมล) 0.3784 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น10 มิลลิลิตร

* ผสมสารละลายในข้อ 4.4.1.1 ในอัตราส่วน 10 มิลลิลิตร ต่อสารละลายในข้อ 4.4.1.2 ในอัตราส่วน 176 ไมโครลิตร ลงในขวดสีชา และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง (สารละลาย Stock A)

* นำสารละลาย Stock A ที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วนสารละลาย Stock A 1 มิลลิลิตร: น้ำกลั่น 49 มิลลิลิตร หรือเจือจาง 50 เท่าด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm จะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วงประมาณ 0.700 – 0.800 (สารละลาย Stock B)

5. การวัดการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ

5.1หลังจากที่มีบัวบกมีการเจริญเติบโตโดยไม่มีการเจือปนของจุลินทรีย์ แบคทีเรียและราในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MS แล้ว นำต้นบัวบกย้ายลงในอาหารสูตรต่างๆ คือ MS 1/2,MS 1/4 และ MS 1/8 สูตรละ 7-10 ต้น วัดจำนวนใบและความสูงของต้นไม้ด้วยเวอร์เนีย (vernier) เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ โดยวัดจากลำต้นเหนือขอบวุ้นจนถึงปลายใบ และจากยอดตาที่มีการแตกหน่อจนถึงปลายยอด

5.2 เมื่อบัวบกมีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อครบ 6 สัปดาห์ นำบัวบกออกมาจากขวด วัดความยาวตลอดลำต้นด้วยเวอร์เนีย (vernier) จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักรวมของแต่ละสูตร แล้วนำบัวบกไปเข้าเครื่องอบต้นไม้แยกตามสูตรอาหาร ทิ้งไว้ 8 ชั่วโมง

6. การสกัดแว่นแก้ว

6.1 ชั่งตัวอย่างแว่นแก้วบดละเอียดประมาณ 1 กรัม และน้ำกลั่น 100 ml (ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1%) ลงใน Beaker จากนั้นให้ใช้ Foil ปิดปากของ Beaker เอาไว้เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำออกจาก Beaker

6.2 ต้มเป็นเวลา 30 นาทีแล้วพักไว้ให้สารสกัดเย็นลง จากนั้นให้กรองด้วยผ้าขาวบาง 1 ครั้งและกรองต่อด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 อีก 1ครั้ง

6.3 นำสารสกัดที่กรองได้มาใส่ลงในขวดสีชา และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ (สารสกัดจะเก็บไว้ไม่เกินกว่า 7 วัน)

7. การวิเคราะห์หาสารต้านอนุมูลอิสระ

7.1 การวิเคราะห์ Total phenolic compounds โดยวิธี Folin ciocalteu reagent

7.1.1 ปิเปตสารสกัดแว่นแก้วความเข้มข้น 1% มา 0.4 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 9.96 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

7.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ลงในหลอดทดลองดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สารละลายมาตรฐาน Gallic acid สำหรับการวิเคราะห์ Total phenolic compounds

หลอดที่	ปริมาณ Gallic acid (µg)	ปริมาณ Gallic acid (µl)	ปริมาณน้ำกลั่น (ml)
1 (Blank)	0	0	0
2	20	50	9.95
3	40	100	9.90
4	60	150	9.85
5	80	200	9.80
6	100	250	9.75
7	120	300	9.70
8	140	350	9.65

7.1.3 นำสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.1 และ 3.1.2 มาเติม Folin ciocalteu reagent 2 ml เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที

7.1.4 เติม Na_2CO_3 2 ml เขย่าให้เข้ากัน และทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 60 นาที

7.1.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตและบันทึกผลการวิเคราะห์

7.2 การวิเคราะห์ 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay

7.2.1 นำสารสกัดแว่นแก้วความเข้มข้น 1% มาเจือจาง 5 เท่า ด้วย Ethanol 95%

7.2.2 ปิเปตสารสกัดที่เจือจางแล้วในข้อ 3.2.1 มา 1 มิลลิลิตร ส่วนหลอดควบคุมให้ใช้ Ethanol 95% 1 มิลลิลิตร แทนสารสกัดแว่นแก้ว

7.2.3 เติม DPPH 2 ml เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

7.2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 516 นาโนเมตร โดยใช้Ethanol 95% เป็น Blank

7.2.5 บันทึกผลการวิเคราะห์ และคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\text{การกำจัดอนุมูล DPPH}\,(\%) = \left(\frac{\text{ค่า A ของหลอดควบคุม-ค่า A ของหลอดตัวอย่างค่า}}{\text{A ของหลอดควบคุม}}\right)\times 100$$

7.3 การวิเคราะห์วิธี Reducing power assay

7.3.1 ปิเปตตัวอย่างสารสกัดแว่นแก้วความเข้มข้น 1%มา 120 ไมโครลิตร

7.3.2 เติม Phosphate buffer 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

7.3.3 เติม Potassium ferricyanide 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

7.3.4 บ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 50 ^{O}C เป็นเวลา 20 นาที

7.3.5 เติม TCA 2.5 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน

7.3.6 ปิเปตสารละลายส่วนใสในข้อ 3.3.5 มา 2.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน

7.3.7 เติม Ferric chloride (anhydrous) 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

7.3.8 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรโดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลการวิเคราะห์ Total phenolic compounds,DPPH radical scavenging assay, Reducing power assay และ ABTS radical scavengingassay มาวิเคราะห์โดยใช้ General linear model และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองตามวิธี Duncan’s new multiple range test ด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)

สถานที่ทำการทดลอง

หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมงสาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตรสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังเขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การทดลองกับแว่นแก้ว

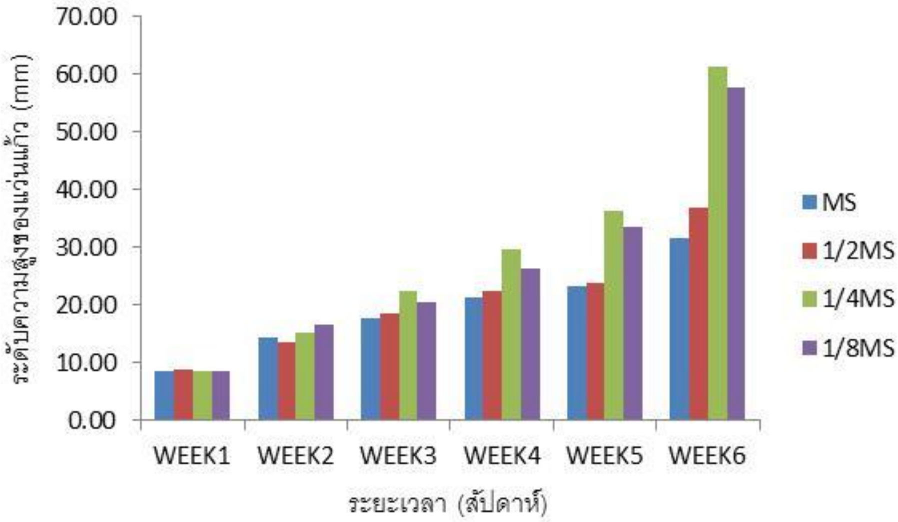
4.1.1 ผลของระดับอาหาร MS ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแว่นแก้ว

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นแว่นแก้วในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS ทั้ง 4 ระดับคือ MS , 1/2MS , 1/4MS , 1/8MS ที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแว่นแก้วอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยคิดค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตจากความสูงของแว่นแก้วที่เพิ่มขึ้นในแต่ละสัปดาห์

ตารางที่ 4.1 ความสูงของแว่นแก้ว (mm) ที่มีการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS 4 ระดับ

ระดับ	ระยะเวลา (วัน)						
อาหาร MS	7	14	21	28	35	42	Mean±SE
MS	8.60±0.64	14.40±3.64	17.73±4.23	21.33±5.02	23.37±5.26	31.48±7.60	19.48±3.21
1/2MS	8.73±0.48	13.44±2.05	18.68±2.94	22.32±4.07	23.90±4.08	36.86±4.65	20.65±3.97
1/4MS	8.49±0.46	15.22±2.37	22.35±2.76	29.72±3.69	36.29±4.38	61.32±9.71	28.90±7.64
1/8MS	8.47±0.62	16.50±2.36	20.59±2.51	26.22±3.13	33.44±4.07	57.54±7.55	27.13±6.99

จากตารางที่ 4.1 เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของแว่นแก้วที่เพาะเลี้ยงในทดลองระดับอาหาร MS ที่แตกต่างกัน เมื่อครบระยะเวลา 6 สัปดาห์พบว่า ชุดการทดลองที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแว่นแก้วที่ระดับอาหาร 1/4MS มีค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตสูงที่สุด เท่ากับ 28.90 ± 7.64 และชุดการทดลองที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแว่นแก้วที่ระดับอาหาร MS ,1/2MS และ 1/8MS มีค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของแว่นแก้ว เท่ากับ 19.48 ± 3.21, 20.65 ± 3.97 และ 27.13 ± 6.99 ตามลำดับ แต่ทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) การที่เนื้อเยื่อแว่นแก้วสามารถเจริญเติบโตในชุดอาหารทดลอง 1/4MS เจริญเติบโตได้ดีที่สุดอาจเนื่องมาจากเป็นระดับสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแว่นแก้ว (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 ผลของระดับอาหาร MS ที่ส่งผลต่อความสูงของแว่นแก้วในแต่ละสัปดาห์

4.1.2 ผลของระดับอาหาร MS ที่ส่งผลต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ

4.1.2.1ผลต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH˙

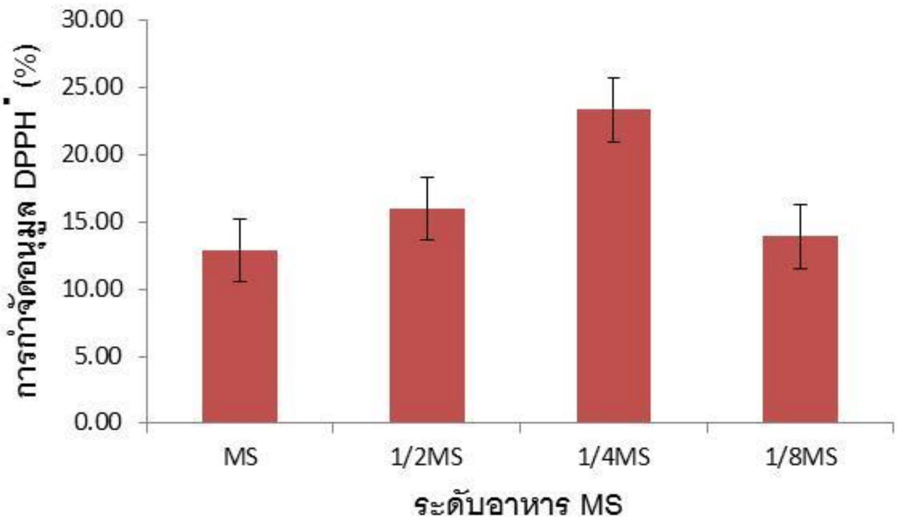
จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นแว่นแก้วในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS ทั้ง 4 ระดับคือ MS , 1/2MS , 1/4MS , 1/8MS ที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์ ส่งผลต่อการกำจัดอนุมูล DPPH˙ของแว่นแก้วอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 4.2 การกำจัดอนุมูล DPPH˙(%) ของแว่นแก้ว ที่เพาะเลี้ยงในระดับอาหาร MS ที่ต่างกัน

ระดับของอาหาร MS	ค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH˙(%)
MS	12.8603 ± 0.06^{b}
1/2MS	15.9645 ± 1.92^{b}
1/4MS	23.3555 ± 1.61^{a}
1/8MS	13.8951 ± 1.22^{b}

*ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวเดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากตารางที่ 4.2 เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองระดับอาหาร MS พบว่า ชุดการทดลองที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแว่นแก้วที่ระดับอาหาร 1/4MS มี % การกำจัดอนุมูล DPPH˙สูงที่สุด เท่ากับ 23.3555 ± 1.61 รองลงมา คือ ชุดการทดลองที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแว่นแก้วที่ระดับอาหาร MS , 1/2MS และ 1/8MS โดยมี % การกำจัดอนุมูล DPPH˙ เท่ากับ 12.8603 ± 0.06, 15.9645 ± 1.92 และ 13.8951 ± 1.22 ตามลำดับ ซึ่งชุดทดลองการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแว่นแก้วที่ระดับอาหาร MS , 1/2MS และ 1/8MS ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$; ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 ผลของระดับอาหาร MS ต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH˙ ของแว่นแก้ว

4.1.2.2 ผลต่อความสามารถในการเป็น Reducing power

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นแว่นแก้วในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS ทั้ง 4 ระดับคือ MS , 1/2MS , 1/4MS , 1/8MS ที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์ การเป็น Reducing power ของแว่นแก้วอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

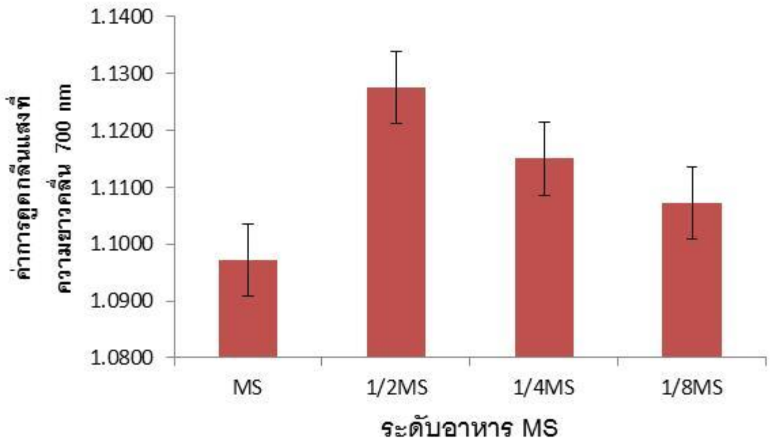
ตารางที่ 4.3 การเป็น Reducing power (%) ของแว่นแก้ว ที่เพาะเลี้ยงในระดับอาหาร MS ที่ต่างกัน

ระดับของอาหาร MS	ค่าความสามารถในการเป็น Reducing power (%)
MS	1.0972 ± 0.47^{b}
1/2MS	1.1275 ± 0.46^{a}
1/4MS	1.1150 ± 0.47^{ab}
1/8MS	1.1072 ± 0.47^{b}

*ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวเดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากตารางที่ 4.3 เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองระดับอาหาร MS พบว่า ชุดการทดลองที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแว่นแก้วที่ระดับอาหาร 1/2MS มี % การเป็น Reducing power ของแว่นแก้วสูงที่สุด เท่ากับ 1.1275 ± 0.46 และชุดการทดลองที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแว่นแก้วที่ระดับอาหาร 1/4MS โดยมี % การเป็น Reducing power เท่ากับ 1.1150 ± 0.47 รองลงมา คือ ชุดการทดลองที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแว่นแก้วที่ระดับอาหาร MS และ 1/8MS มี

% การเป็น Reducing power ของแว่นแก้ว เท่ากับ 1.0972 ± 0.47 และ 1.1072 ± 0.47 ตามลำดับซึ่งชุดการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแว่นแก้วที่ระดับอาหาร 1/2MS และชุดการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแว่นแก้วที่ระดับ 1/4MSนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแว่นแก้วที่ระดับอาหาร MS และ 1/8MS อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05; ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.3 ผลของระดับอาหาร MS ต่อความสามารถในการเป็น Reducing power ของแว่นแก้ว

4.1.2.3ผลของระดับอาหาร MS ต่อปริมาณสารฟีนอลของแว่นแก้วเมื่อเทียบเท่ากับ Gallic acid

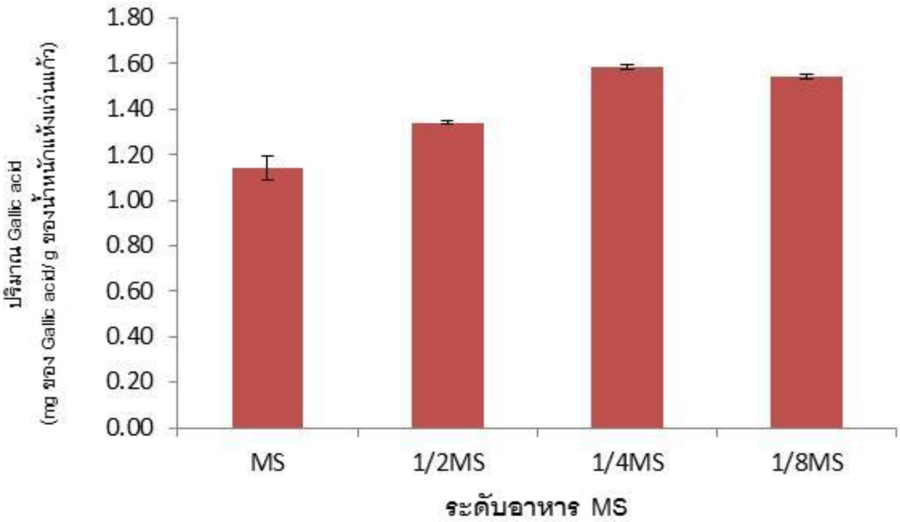
จากตารางที่ 4.4 เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองระดับอาหาร MS พบว่า ชุดการทดลองที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแว่นแก้วที่ระดับอาหาร 1/4MS มีปริมาณฟีนอลรวมสูงที่สุดเท่ากับ 1.5849 ± 0.01และชุดการทดลองที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแว่นแก้วที่ระดับอาหาร 1/8MS มีปริมาณฟีนอลรวมเท่ากับ 1.5432 ± 0.01รองมา คือ ชุดการทดลองที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแว่นแก้วที่ระดับอาหาร1/2MS และ MS มีปริมาณฟีนอลรวมเท่ากับ 1.3410 ± 0.01และ

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารฟีนอลรวมของแว่นแก้วเมื่อเทียบเท่ากับ Gallic acid (mg ของ Gallic acid/ g ของน้ำหนักแห้งแว่นแก้ว)

ระดับของอาหาร MS	ปริมาณฟีนอลรวมของแว่นแก้ว(mg Gallic acid/ g)
MS	1.1404 ± 0.05^{c}
1/2MS	1.3410 ± 0.01 ^{b}
1/4MS	1.5849 ± 0.01 ^{a}
1/8MS	1.5432 ± 0.01 ^{a}

*ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวเดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

1.1404 ± 0.05ซึ่งชุดการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแว่นแก้วที่ระดับอาหาร 1/4MS และ 1/8MS นั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแว่นแก้วที่ระดับอาหาร MS และ 1/2MS และชุดการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแว่นแก้วที่ระดับอาหาร MS และ 1/2MSมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$; ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 ผลของระดับอาหาร MS ต่อปริมาณสารฟีนอลของแว่นแก้วเมื่อเทียบเท่ากับ Gallic acid

จากการทดลองของ รัฐภัทร์และคณะ (2553) ที่ได้ทำการทดลองในเรื่อง ผลของระดับความเข้มข้นของอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ต่อการเจริญพัฒนาของรากดำใบยาวในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าระดับอาหารสังเคราะห์ 1/2MS มีการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชต้นรากดำใบยาวดีที่สุด โดยจะสามารถเกิดยอดได้สูงกว่าระดับอาหารอื่นๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอาหารสูตร MS มีปริมาณเกลือแร่สูงซึ่งเหมาะสาหรับพืชมีดอกแต่รากดำใบยาวเป็นพืชชั้นต่ำมีความต้องการธาตุอาหารที่มีปริมาณน้อยกว่าโดยพืชในกลุ่มเฟิร์นสามารถเกิดยอดจานวนมากในอาหารสังเคราะห์ระดับความเข้มข้น 1/2MSซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการทดลองในโครงงานวิจัยที่พบว่าเนื้อเยื่อของแว่นแก้วสามารถเจริญเติบโตได้ดีในระดับอาหาร 1/4 MS แต่เหตุผลอาจจะเป็นเหตุผลเดียวกันที่ว่าแว่นแก้วต้องการธาตุอาหารในปริมาณน้อย โดยที่ระดับอาหารสังเคราะห์ 1/4MS เป็นระดับอาหารที่มีสารอาหารเพียงพอต่อเนื้อเยื่อแว่นแก้วที่จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและการพัฒนาเซลล์

4.2 การทดลองกับบัวบก

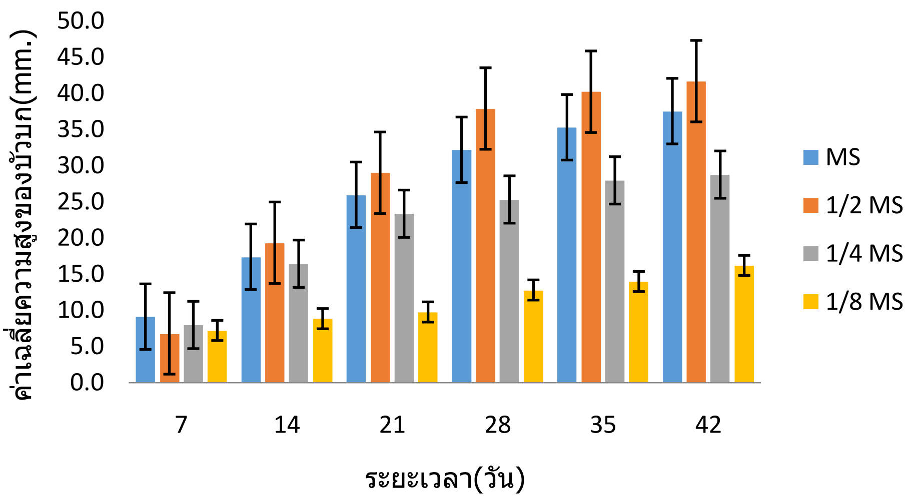
4.2.1 ผลของระดับอาหาร MS ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของบัวบก

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวบก (*Centella asiatica*) ในระดับอาหารที่ต่างกัน(MS, 1/2 MS, 1/4 MS และ 1/8 MS) เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากการทดลองพบว่า ทุกสัปดาห์มีการเจริญเติบโตของบัวบกที่ต่างกัน และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(P<0.05)เมื่อครบ 6 สัปดาห์ บัวบกมีการเจริญเติบโตได้ดีอย่างต่อเนื่องและมีความสูงมากที่สุดพบในสูตรอาหาร 1/2 MS คือ 29.1±5.6 mm รองลงมาคือ สูตรอาหาร MS, 1/4 MS และ 1/8 MS มีค่าเท่ากับ 26.2±4.5, 21.5±3.2 และ 11.4±1.3 mm ตามลำดับ ทุกสูตรอาหาร MS ที่ระดับต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ยกเว้นเพียงสูตรอาหาร 1/4 MS และ 1/8 MS ที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) นอกจากนี้ยังพบว่าบัวบกที่มีการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร 1/8 MS จะมีใบสีเขียวอ่อนแกมเหลือง ลำต้นเล็กและใบมีขนาดเล็ก(ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 ความสูงของบัวบก(mm) ที่มีการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรMS 4 ระดับ

ระดับอาหาร	ระยะเวลา (วัน)						
	7	14	21	28	35	42	Mean±SE
MS	$9.0±0.8^{a}$	$17.3±1.5^{ab}$	$25.9±1.6^{ab}$	$32.1±3.9^{b}$	$35.2±4.3^{b}$	$37.4±4.6^{b}$	$26.2±4.5^{b}$
1/2 MS	$6.7±1.4^{d}$	$19.2±4.1^{a}$	$28.9±6.7^{a}$	$37.8±9.6^{a}$	$40.1±10.2^{a}$	$41.6±10.6^{a}$	$29.1±5.6^{a}$
1/4 MS	$7.9±1.7^{b}$	$16.3±4.0^{c}$	$23.3±5.7^{b}$	$25.2±6.4^{c}$	$27.9±7.7^{c}$	$28.7±8.0^{c}$	$21.5±3.2^{cd}$
1/8 MS	$7.1±0.7^{cd}$	$8.7±1.2^{d}$	$9.7±1.0^{c}$	$12.7±3.0^{d}$	$13.9±3.5^{d}$	$16.1±3.6^{d}$	$11.4±1.3^{d}$

*ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวเดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



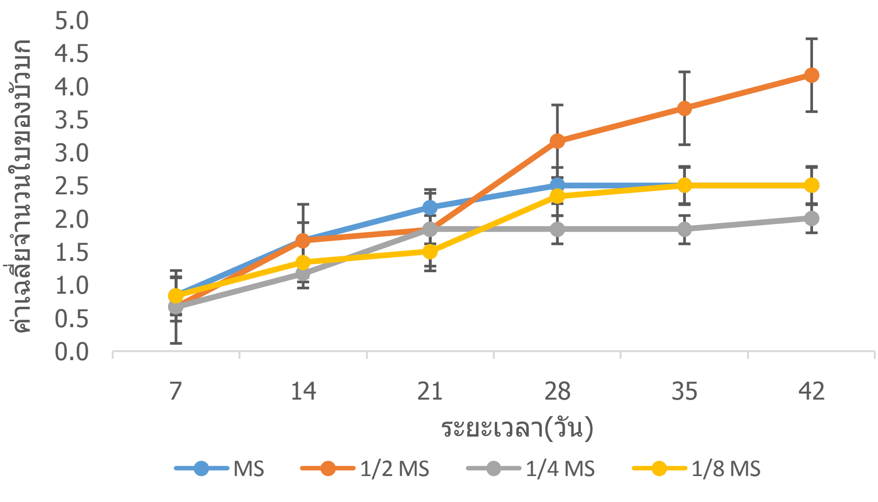
ภาพที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยความสูง (mm) ของบัวบกที่มีการเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ระดับต่างกัน

จากภาพที่ 4.5 แสดงค่าเฉลี่ยความสูงของบัวบก (*Centella asiatica*) ในระดับอาหาร MS ที่ต่างกัน 4 ระดับ พบว่า ค่าเฉลี่ยความสูงและการเจริญเติบโตของบัวบกที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ระดับ 1/2 MS มีค่าสูงที่สุดหลังจาก 42 วัน คือ 41.63 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ระดับอาหาร MS 37.49 มิลลิเมตร,1/4MS เท่ากับ 28.71 มิลลิเมตร และ 1/8MS เท่ากับ 16.15 มิลลิเมตร ตามลำดับ

การนับจำนวนใบที่งอกใหม่ในการทดลองเพาะเลี้ยงบัวบก (*Centella asiatica*) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 4 ระดับที่ต่างกัน คือ MS, 1/2 MS, 1/4 MS และ 1/8 MS ระดับละ 6 ต้น ทุกๆ 7 วันเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์จากตารางที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนใบในทดลองการเพาะเลี้ยงบัวบก (*Centella asiatica*)ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 4 ระดับที่ต่างกัน ระดับละ 6 ต้น ทุกๆ 7 วัน ในช่วง 7 วันแรกพบว่า ระดับอาหาร MS และ 1/8 MS มีค่าเฉลี่ยจำนวนใบที่งอกใหม่มากที่สุด คือ 0.8±0.17ต่อ1 ใบต่อต้น รองลงมาคือ 1/2 MS และ 1/4MS คือ0.7±0.33 และ 0.7±0.21ใบต่อ 1 ต้น ช่วงวันที่ 14 มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนใบที่มากขึ้น คือบัวบกที่เพาะในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้ง 4ระดับมีอัตราการงอกใหม่ของใบที่เพิ่มขึ้น เท่ากับ 1.7±0.56, 1.7±0.42, 1.2±0.31และ 1.3±0.21ใบต่อต้น ตามลำดับ หลังจากวันที่ 21-42 วัน พบว่า อัตราการงอกใหม่ของบัวบกที่เพาะในอาหาร 1/4MS มีค่าเฉลี่ยคงที่ คือ1.8±0.48 ใบต่อต้น หลังจาก 28-42 วัน อาหาร MS มีอัตราการงอกใหม่ของใบคงที่เช่นกัน คือ2.5±0.85 ใบต่อต้น และหลังจาก 35-42 วัน บัวบกที่เพาะในอาหาร 1/8 MS มีค่าเฉลี่ยคงที่ คือ 2.5±0.42ใบต่อต้น ส่วนบัวบกที่เพาะในอาหาร 1/2MS มีอัตราการงอกใหม่ของใบเพิ่มขึ้นต่อเนื่องทุก7 วัน นอกจากนี้ยังพบว่า บัวบกที่เพาะในอาหารระดับ 1/2MS มีการงอกของตาหรือหน่อเพิ่มขึ้นทุก14 วัน (ภาพที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยจำนวนใบที่งอกใหม่ของบัวบก ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากระดับอาหารที่ต่างกัน

ระดับอาหาร	**ระยะเวลา (วัน)**					
	7	14	21	28	35	42
MS	0.8±0.17	1.7±0.56	2.2±0.70	2.5±0.85	2.5±0.85	2.5±0.85
1/2 MS	0.7±0.33	1.7±0.42	1.8±0.40	1.8±0.75	3.7±0.88	4.2±0.95
1/4 MS	0.7±0.21	1.2±0.31	1.8±0.48	1.8±0.48	1.8±0.48	1.8±0.48
1/8 MS	0.8±0.31	1.3±0.21	1.5±0.22	2.3±0.42	2.5±0.42	2.5±0.42



ภาพที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของบัวบก (*Centella asiatica*) ทุก 7 วัน

4.2.2 ผลของระดับอาหาร MS ที่ส่งผลต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ

4.2.2.1 ผลต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นบัวบก (*Centella asiatica*) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ทั้ง 4 ระดับคือ MS , 1/2 MS , 1/4 MS , 1/8MS ตารางที่ 4.7 แสดงให้เห็นถึงระดับของอาหาร MS ที่ต่างกันต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ระดับ 1/8 MS มีการกำจัดอนุมูล DPPH มากที่สุด 85.9145± 0.25% รองลงมาคือระดับอาหาร 1/2 MS (83.7021± 2.70%), ระดับอาหาร MS (79.0929± 1.00%) และระดับอาหาร 1/4 MS (73.5619± 0.73%) ตามลำดับ ซึ่ง 1/4 MS มีค่าการกำจัดอนุมูล DPPH ต่ำที่สุด อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระดับ 1/8 MS มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)กับอาหารระดับ MS และ 1/4 MS แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ 1/2 MS ($P>0.05$)

ตารางที่ 4.7 การกำจัดอนุมูล DPPH (%) ของบัวบกที่เพาะเลี้ยงในระดับอาหาร MS ที่แตกต่างกัน

ระดับของอาหาร	ค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูล $DPPH^{\cdot}$(%)
MS	79.0929 ± 1.00^{b}
1/2 MS	83.7021 ± 2.70^{ab}
1/4MS	73.5619 ± 0.73^{c}
1/8MS	85.9145 ± 0.25^{a}

*ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวเดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

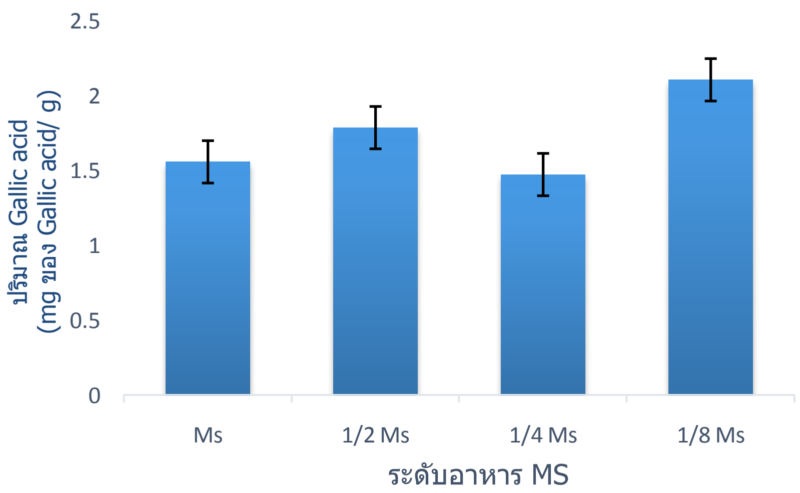
4.2.2.2 ผลของปริมาณสารฟีนอลรวมในบัวบก(*Centellaasiatica*) ที่เพาะในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ระดับต่างๆ เมื่อเทียบเท่ากับ Gallic acid

การทดลองเพาะเลี้ยงบัวบกในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่ต่างกัน 4 ระดับ คือ MS, 1/2 MS, 1/4 MS และ 1/8 MS เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชนิดเดียวกัน พืชชนิดเดียวกัน แต่มีปริมาณระดับอาหารที่ต่างกัน ทำให้ปริมาณสารฟีนอลรวมของบัวบกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากการทดสอบปริมาณสารฟีนอลรวมของบัวบก (*Centella asiatica*) ที่มีการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ต่างระดับกัน มีปริมาณสารฟีนอลรวมในบัวบกแตกต่างเช่นกัน จากตารางที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่า สูตรอาหาร 1/8 MS มีปริมาณสารฟีนอลรวมเท่ากับ 2.1080±0.01 ซึ่งเป็นระดับอาหารที่ทำให้บัวบกมีปริมาณสารฟีนอลรวมสูงที่สุด รองลงมาคือ 1/2 MS, MS และ 1/4 MS มีค่า 1.7886±0.01, 1.5602±0.00 และ 1.4753±0.01 ตามลำดับ ซึ่งอาหารสูตร MS ทั้ง 4 ระดับมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ภาพที่ 4.7)

ตารางที่ 4.8 ปริมาณสารฟีนอลรวมของบัวบกที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ระดับต่างๆ

ระดับของอาหาร	ปริมาณสารฟีนอลรวมเมื่อเทียบกับ Galic acid (mg ของ Galic acid/g ของน้ำหนักแห้งบัวบก)
MS	1.5602±0.00[c]
1/2 MS	1.7886±0.01[b]
1/4MS	1.4753±0.01[d]
1/8MS	2.1080±0.01[a]

*ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวเดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



ภาพที่ 4.7 ปริมาณสารฟีนอลรวมของบัวบก (*Centella asiatica*) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ระดับต่าง ๆ 4 ระดับ เมื่อเทียบเท่ากับ Gallic acid

จากการศึกษาผลของการเจริญเติบโตกับความสัมพันธ์ในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ไม่สอดคล้องกับ Zainola et al.(2003) ที่กล่าวว่า บัวบกที่มีรากยาว มีจำนวนใบมากและมีความยาวลำต้นมาก จะมีปริมาณสารฟีนอลรวมมาก ทำให้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี ซึ่งจากการทดลองนี้ บัวบกที่มีการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS มีการเจริญเติบโตและความสูงมากที่สุด แต่ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ จะพบว่าบัวบกที่มีการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/8 MS มีปริมาณสารฟีนอลรวมมากที่สุดและมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาผลต่อการเจริญเติบโต และ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแว่นแก้วที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับอาหาร MS ที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ สูตร MS, 1/2 MS, 1/4 MS และ 1/8 MS ในระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าระดับอาหาร 1/4MS ส่งผลให้การเจริญเติบโตของแว่นแก้วในชุดการทดลองเจริญเติบโตดีที่สุด ซึ่งค่าเฉลี่ยความสูงเท่ากับ 28.90 ± 7.64 mm ผลของค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าแว่นแก้วที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ระดับ 1/4MS มีค่าความสามารถในการต้านทานอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยในทุกวิธีวิเคราะห์ คือ ปริมาณ Total phenolic compounds เท่ากับ 1.5849 ± 0.01mg Gallic acid/ g, DPPH radical scavenging assay เท่ากับ 23.3555 ± 1.61% วิธีการวิเคราะห์ Reducing power assay 1.1150 ± 0.47% โดยอาหารทดลอง 1/4MS นั้นให้ค่าเฉลี่ยสูงในทุกวิธีการวิเคราะห์เมื่อเทียบกับอาหารทดลองสูตรอื่นๆ ซึ่งระดับอาหาร 1/4MS นั้นนอกจากจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแว่นแก้วแล้วส่งผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาผลของการเจริญเติบโตและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของบัวบกที่มีการะเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระดับต่างกัน พบว่า ระดับอาหารที่ต่างกันมีอิทธิพลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลรวมของบัวบกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระดับที่มีความเหมาะสมกับบัวบกมากที่สุดคือ สูตรอาหาร1/2 MS เนื่องจากบัวบกที่มีการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรนี้ มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด คือค่าเฉลี่ยความสูงเท่ากับ 29.1±5.6 mm มีจำนวนใบมากที่สุด คือ 4.2 ±0.95 ใบต่อต้น ส่วนความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะพบว่า มีปริมาณสารฟีนอลรวมในบัวบกเท่ากับ 2.1080±0.01mg.ของ Gallic acid/ g และประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH˙ เท่ากับ 83.7021± 2.70% ซึ่งอยู่ในระดับที่ดีและมีประสิทธิภาพมากที่สุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ

เอกสารอ้างอิง

นฤมล น้อยหวอย และ ศศิธร จันทนวรางกูร. 2550. ผลกระทบของการแปรรูปต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันในบัวบก : 681-688 [online]http://kucon.lib.ku.ac.th/cgi-bin/kucon.exe?rec_id=010448&database=kucon&search_type=link&table=mona&back_path=/agre/mona&lang=thai&format_name=TFMON

นันท์นภัส เติมวงศ์ . 2551. ความสัมพันธ์ของสารประกอบฟีโนลิกส์และวิตามินซีกับความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระในใบบัวบก .ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์ 8: 117-126.

รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์ , กาญจนรี พงษ์ฉวี และ ววรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย . 2553. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบยาว. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ: 1-47.

Abdul, A. Hamida, Z. Md. Shaha, R. Museb and S. Mohameda. 2002. Characterisation of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. Food Chemistry 77: 465-469.

Brinkhaus, B., M. Lindner, D. Schuppan and E. G. Hahn. 2000. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. Phytomedicine 7(5): 427-448.

Duangkamol T., T. Rukkwamsuk and T. Sukpuaram. 2008. A Study on antibacterial activity of crude extracts of Asiatic pennywort and water pennywort against *Staphylococcus aureus.* Kmitl Sci .J. 8(2) (Section A):July-December.

Faisal, M., N. Ahmad and M. Anis. 2007. An efficient micropropagation system for Tylophora indica: an endangered, medicinally important plant Plant Biotechnol. Rep.1:155–161.

Faujan, H., N. Noriham, A. Norrakiah and A.Babji. 2009.Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds.African journal of biotechnology vol. 8 (3): 484-489.

Huang, S., G. Huang, Y. Ho, Y. Lin, H. Huang, T. Chang, M. Chang, J. Chen and Y. Chang. 2008. Antioxidant and antiproliferative activities of the four *Hydrocotyle* species from Taiwan. Botanical Studies 49: 311-322.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A resived medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15 : 473-497.

Nguyet, N.Thu, C. Sakurai, H. Uto, N.V. Chuyen, D. T. K. Lein, S. Yamamoto,R. Ohmori and K. Kondo.2004. The polyphenol content and antioxidant activities of the main edible vegetables in northern Vietnam. J Nutr Sci Vitaminol 50:203-210.

Patra, A., B. Rai, G.R. Rout1 and P. Das;.1998.Successful plant regeneration from callus cultures of *Centella asiatica* (Linn.)Urban. Plant Growth Regulation 24: 13–16.

Shukla, A., A.M. Rasik, G.K. Jain, R. Shanka, D.K. Kulshrestha and B.N. Dhawan. 1999. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from Centella asiatica. Journal of Ethnopharmacology 65: 1-11.

Subathra, M., S. Shila, M. A. Devi and C.Panneerselvam. 2005. Emerging role of Centella asiatica in improving age-related neurological antioxidant status. Experimental Gerontology 40: 707–715.

Sulaiman, S.F., A. A.B. Sajak, K. L. Ooi, and E. M. Seow, 2011. Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. Journal of Food Composition and Analysis 24: 506 – 511.

Wassana P. 2002. Chemical constituents from Hydrocotyle umbellata linn. and effect on growth of *Mimosa pigra* linn. **Journal Article:** DOI: 9741798695 Chulalongkorn University**.**

Yu, T.-A., S.-D. Yeh, Y.-H. Cheng and J.-S. Yang. 2000. Efficient rooting for establishment of papaya plantlets by micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 61: 29–35.

Zainola, M.K., A. Abd-Hamida, S. Yusofb and R. Musec. 2003. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica (L.)* Urban. Food Chemistry 81: 575–581.

ประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-นามสกุล นางสาวอัจฉรี เรืองเดช

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ. (ประมง)	การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	**2530**
วท.ม. (วิทยาศาสตร์การประมง)	วิทยาศาสตร์การประมง	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	**2535**
M.Sc.	Aquatic Environmental Science	Kochi University	**2544**
Ph.D.	Aquatic Environmental Science	Ehime University	**2547**

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ: การใช้ประโยชน์จากสารธรรมชาติในทางประมง เน้นกลุ่มสาหร่ายและพืชน้ำ และอาหารสัตว์น้ำ

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

อัจฉรี เรืองเดช, วิไลวรรณ พวงสันเทียะ, นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และสมชาย หวังวิบูลย์กิจ . 2556. การใช้โคพีพอด *Apocyclops* sp. และอาร์ทีเมียเป็นอาหารเพิ่มสีธรรมชาติในลูกปลาการ์ตูนส้มขาว *Amphiprion ocellaris*. *การประชุมทางวิชาการงานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 11. ระหว่างวันที่ 30-31 กรกฎาคม 2556. มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก.* รอตีพิมพ์.

อัจฉรี เรืองเดช และ นงนุช เลาหะวิสุทธิ์. 2555. ผลของสารละลายธาตุอาหารต่อการเจริญเติบโตและการต้านอนุมูลอิสระของพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิในระบบปลูกแบบไร้ดิน. *การประชุมทางวิชาการงานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 10. ระหว่างวันที่ 24-25 กรกฎาคม 2555 . มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก.* หน้า 182-189.

อัจฉรี เรืองเดช, นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และหัสชัย จันทร์ศรีทอง . **2553**. การเพิ่มภูมิคุ้มกันของปลาโรซี่บาร์บด้วยอาหารเสริมเบต้ากลูแคน. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*. 12(4) 37-42

โสมลดา ประเสริฐสม, นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และ อัจฉรี เรืองเดช. **2553**. การเสริมสารสกัดจากเปลือกผลแก้วมังกร *Hylocereus undatus* (Haw) Britt and Rose ในอาหารต่อการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงสีผิว ค่าโลหิตวิทยา และการต้านเชื้อของปลากะพงขาว *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). *วารสารการประมง.* 63(5) 393-403

โสมลดา ประเสริฐสม, นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และ อัจฉรี เรืองเดช. **2553**. การเพิ่มสีปลาการ์ตูนมะเขือเทศ (*Amphiprion frenatus* Brevoort, 1856) ด้วยอาหารเสริมสารสกัดเบตาเลนจากเปลือกผลแก้วมังกร. *วารสารการประมง.* 63(6) 526-531

อัจฉรี เรืองเดช, นงนุช เลาหะวิสุทธิ์, สมชาย หวังวิบูลย์กิจ และ พรแก้ว ภูมิเกษมศักดิ์. **2552**. การใช้น้ำสกัดจากสาหร่ายทุ่นเป็นสารอาหารชีวภาพฉีดพ่นทางใบของผักคะน้า. *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยนเรศวร ครั้งที่ 5. สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมและวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม. พิษณุโลก : มหาวิทยาลัยนเรศวร*, หน้า 533-540

อัจฉรี เรืองเดช และนงนุช เลาหะวิสุทธิ์. **2552**. การใช้แอสตาแซนทินเร่งสีในปลาพลาตี้. *วารสารเกษตรนเรศวร* 12 (ฉบับพิเศษ) 230-235

พรแก้ว ภูมิเกษมศักดิ์ และ อัจฉรี เรืองเดช. **2552**. การใช้สารสกัดจากสาหร่ายทุ่น (*Sargassum oligocystum*) เพิ่มการเจริญเติบโตของต้นอเมซอนแอฟริกานัส. *วารสารเกษตรนเรศวร* 12 (ฉบับพิเศษ) 218-223

อัจฉรี เรืองเดช, ลำพึง พุ่มจันทร์ และ นงนุช เลาหะวิสุทธิ์. **2551**. ลักษณะสีของปลาหมอคอนวิคเผือกที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมสารสีเบตาเลนจากธรรมชาติ.*การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยนเรศวร ครั้งที่ 4. ระหว่างวันที่ 26-27 พฤษภาคม 2551 มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พะเยา*, หน้า 597-604

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์, บุปผา จงพัฒน์ และ อัจฉรี เรืองเดช. **2551**. ผลของแอมโมเนียม-ไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของพรรณไม้น้ำใบพายศรีลังกาในระบบปลูกแบบไม่ใช้ดิน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยนเรศวร ครั้งที่ 4. ระหว่างวันที่ 26-27 พฤษภาคม 2551 มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พะเยา*, หน้า 571-580

อัจฉรี เรืองเดช, นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และ พรเทพ แซ่ก๊วย. **2550**. สารสกัดจากสาหร่ายขนนก (*Myriophyllum brasiliense*) เพื่อควบคุมการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็กและแบคทีเรีย. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยมหาสารคาม* 27(2) 366-374

โสมลดา ประเสริฐสม, นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และ อัจฉรี เรืองเดช. **2550**. ผลของโอโซนต่อการอนุบาลลูกปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*, Bloch) ในระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิด. เอกสารวิชาการฉบับที่ 21/2550. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง

โสมลดา ประเสริฐสม, นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และ อัจฉรี เรืองเดช. **2550**. ผลของสารสกัดพรมมิ [*Bacopa monnieri* (Linnaeus) Pennell, 1946] ต่อการต้านเชื้อ *Vibrio harveyi* และปริมาณเม็ดเลือดชนิดที่มีแกรนูลในกุ้งขาวแวนนาไม (*Penaeus vannamei* Boone,1931) เอกสารวิชาการฉบับที่ 23/2550. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง

อัจฉรี เรืองเดช, ลำพึง พุ่มจันทร์ และนงนุช เลาหะวิสุทธิ์ . **2549**. การเพิ่มสีของปลาหมอสีโดยใช้อาหารเสริมแอสตาแซนทิน. *การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 7 มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ระหว่างวันที่ 25-26 พฤษภาคม 2549 จ.เชียงใหม่.* หน้า 290 - 297

อัจฉรี เรืองเดช และนงนุช เลาหะวิสุทธิ์ . **2549**. การจำกัดการเพิ่มจำนวนของสาหร่ายขนาดเล็กด้วยสารสกัดจากสาหร่ายเม็ดพริกไทย. *การประชุมทางวิชาการ “สิ่งแวดล้อมนเรศวร” ครั้งที่ 2 มหาวิทยาลัยนเรศวร ระหว่างวันที่ 28-29 มิถุนายน 2549 จ.พิษณุโลก*. หน้า 717-724

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์, ลำพึง พุ่มจันทร์ และ อัจฉรี เรืองเดช. **2549**. การเร่งสีปลาทองโดยใช้สารสีจากธรรมชาติ. *การประชุมทางวิชาการ "สิ่งแวดล้อมนเรศวร" ครั้งที่ 2 มหาวิทยาลัยนเรศวร ระหว่างวันที่ 28-29 มิถุนายน 2549 จ.พิษณุโลก* หน้า 725-732

สมชาย หวังวิบูลย์กิจ, อัจฉรี เรืองเดช และบุปผา จงพัฒน์. **2548**. ผลของวิตามินบี 1 และบี 12 ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์-เอและการเจริญเติบโตของคลอเรลล่า. *การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 43 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาประมง ระหว่างวันที่ 1 – 4 กุมภาพันธ์ 2548 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.* 260-266

โสมลดา ประเสริฐสม และ อัจฉรี เรืองเดช. **2548**. ผลของความเค็มต่อการกำหนดเพศของปลาเซลฟิน (*Poecilia latipinna*) (Lesueur,1821). เอกสารวิชาการฉบับที่ 29/2548. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง

สมชาย หวังวิบูลย์กิจ และ อัจฉรี เรืองเดช. **2542**. การศึกษาคุณภาพน้ำและแพลงค์ตอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า.* 17(2) 10-21

Ruangdej, U. and Laohavisuti, N. **2011.** Aquarium plant, *Bacopa monnieri* L., enhances immune response of aquatic animals against bacteria. *International Journal of Art and Sciences* 4(2) 115-120

Laohavisuti, N., Phumjan, L. and Ruangdej, U. **2011**. Betalain from dragon fruit (*Hylocereus undatus* Haw Britt. & Rose) peel act as an antioxidant in fancy carp (*Cyprinus carpio* Linn.) *International Journal of Art and Sciences* 4(2) 121-128

Ruangdej, U. and Laohavisuti, N. **2010**. Antioxidant and antimicrobial characteristics of submerged aquarium plants. *Proceedings 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology 25-27 August 2010, Bangkok, Thailand.* 484-487

Angthong, P., Watthanasurorot, A., Klinbunga, S., Ruangdej, U., Soderhall, I., and Jiravanichpaisal, P. **2010.** Cloning and characterization of melanization inhibition protein (PmMIP) of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon. Fish & Shellfish Immunology*. 29(3), 464-468

Ruangdej, U. and K. Fukami. **2004**. Stimulation of photosynthesis and consequent oxygen production in anoxic bottom water by supply of low-intensity light through an optical fiber. *Fisheries Science*. 70, 421-429

Fukami, K., U. Ruangdej, A. B. Patel and T. Nishijima. **2002**. Improvement of eutrophic coastal bottom environments by using an optical fiber and effective psychrophilic bacteria. *Fisheries Science*. 68, 617-620

ประวัติผู้วิจัยร่วม 1

ชื่อ – นามสกุล นางนงนุช เลาหะวิสุทธิ์ (อ๋องสุวรรณ)

Mrs. Nongnuch Laohavisuti (Ongsuwan)

ตำแหน่งปัจจุบัน: รองศาสตราจารย์ระดับ 9

ประวัติการศึกษา:

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2528	ปริญญาตรี	วท.บ. (ประมง) วิทยาศาสตร์บัณฑิต	การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2530	ปริญญาโท	วท.ม. (วิทยาศาสตร์การประมง)วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต	วิทยาศาสตร์การประมง	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2543	ปริญญาเอก	Doc. Tech. Sci. (Aquaculture and Aquatic Resources Management) Doctor of Technical Science	Aquaculture and Aquatic Resources Management	สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (AIT)	ไทย

สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ :

ปลาสวยงามและพรรณไม้น้ำ การเลี้ยงปลาและพรรณไม้น้ำแบบผสมผสาน

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ วันเพ็ญ มีนกาญจน์ และพงโสภี อัตศาสตร์ . 2535. ผลของเอสโตรเจนต่อการเจริญของต่อมเพศปลากัด (*Betta Splendens* Regan). การสัมมนาวิชาการประจำปี 2535 ระหว่างวันที่ 16-18 กันยายน 2535 สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด กรมประมง บางเขน กรุงเทพฯ

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ มณีรัตน์ หวังวิบูลย์กิจ และอิทธิสุนทร นันทกิจ . 2545. การเลี้ยงปลาสวยงามร่วมกับการผลิตพรรณไม้น้ำแบบไร้ดินในระบบปิด. การประชุมทางวิชาการด้านเกษตร ทรัพยากร และสิ่งแวดล้อม งานเกษตรภาคใต้ ครั้งที่ 10. 10 – 11 สิงหาคม 2545 คณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อ .หาดใหญ่ จ . สงขลา.

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ มณีรัตน์ หวังวิบูลย์กิจ และอิทธิสุนทร นันทกิจ. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออเมซอนแดง *Echinodorus barthii* เพื่อการส่งออกโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. การสัมมนาวิชาการประจำปี 2546 ระหว่างวันที่ 7-9 กรกฎาคม 2546 กรมประมง บางเขน กรุงเทพฯ

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และมัลลิกา มิตรน้อย . 2548. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำอะโกลนีม่า *Aglaonema simplex*. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 43 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาประมง ระหว่างวันที่ 1 – 4 กุมภาพันธ์ 2548 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ มณีรัตน์ หวังวิบูลย์กิจ และอิทธิสุนทร นันทกิจ และยุทธนา เกียรติธร . 2548. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของพรรณไม้น้ำชนิดใบพายเขาใหญ่ (*Cryptocoryne crispatula* var. balansae) ในระบบการปลูกพืชแบบไม่ใช้ดิน. การประชุมทางวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5 ระหว่างวันที่ 26 – 29 เมษายน 2548 โรงแรมเวลคัมจอมเทียนบีช พัทยา จังหวัดชลบุรี

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ อิทธิสุนทร นันทกิจ และยุทธนา เกียรติธร. 2548. สัดส่วนของแอมโมเนียมต่อไนเตรทและความเข้มข้นของสารละลายธาตุอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพรรณไม้น้ำชนิดใบพายเขาใหญ่ (*Cryptocoryne crispatula* var. balansae) การประชุมทางวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5 ระหว่างวันที่ 26 – 29 เมษายน 2548 โรงแรมเวลคัมจอมเทียนบีช พัทยา จังหวัดชลบุรี

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ สมชาย หวังวิบูลย์กิจ ภวรรณตรี สมบุญโต และอิทธิสุนทร นันทกิจ . 2548. การเลี้ยงปลาทับทิมร่วมกับการผลิตผักสลัดแบบไร้ดินในระบบปิด การประชุมทางวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5 ระหว่างวันที่ 26 – 29 เมษายน 2548 โรงแรมเวลคัมจอมเทียนบีช พัทยา จังหวัดชลบุรี

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ มณีรัตน์ หวังวิบูลย์กิจ และมัลลิกา มิตรน้อย. 2548. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำอเมซอนแอฟริกานัส *Echinodorus*. การประชุมทางวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5 ระหว่างวันที่ 26 – 29 เมษายน 2548 โรงแรมเวลคัมจอมเทียนบีช พัทยา จังหวัดชลบุรี

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และยุทธนา เกียรติธร. 2548. สัดส่วนของแอมโมเนียมต่อไนเตรทและความเข้มข้นของสารละลายธาตุอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพรรณไม้น้ำชนิดใบพายเขาใหญ่ (*Cryptocoryne crispatula* var. balansae). วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 36 (5-6) ฉบับพิเศษ: 151- 154.

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ มณีรัตน์ หวังวิบูลย์กิจ และวรารัตน์ จูเจริญ. 2549. ผลของความยาวคลื่นต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำกลุ่ม Rosette plant. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 7 มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ระหว่างวันที่ 25-26 พฤษภาคม 2549 จ.เชียงใหม่ 53 - 59 หน้า.

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ ลำพึง พุ่มจันทร์ และอัจฉรี เรืองเดช. 2549. การร่งสีปลาทองโดยใช้สารสีจากธรรมชาติ. การประชุมทางวิชาการ “สิ่งแวดล้อมนเรศวร” ครั้งที่ 2 มหาวิทยาลัยนเรศวร ระหว่างวันที่ 28-29 มิถุนายน 2549 จ.พิษณุโลก 725-732 หน้า.

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ มณีรัตน์ หวังวิบูลย์กิจ และนงพะงา เรียงเรียบ. 2549. การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของพรรณไม้น้ำลานไพลินต่อรังสียูวี. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 44 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน. กรุงเทพฯ. 445 - 452 หน้า.

7.3.2 ผู้ร่วมโครงการวิจัย

วันเพ็ญ มีนกาญจน์ นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และสุภาพ พรหมยศ . 2534. ชีวประวัติของปลากระทิงไฟ (*Mastacembelus erythrotaenia* Beeker). การสัมมนาวิชาการประจำปี 2534 ระหว่างวันที่ 16-18 กันยายน 2534 สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด กรมประมง บางเขน กรุงเทพฯ

วันเพ็ญ มีนกาญจน์ และนงนุช เลาหะวิสุทธิ์ . 2536. การใช้ยาสลบบางชนิดในการขนส่งปลาทรงเครื่อง (*Epalzcorhynchos bicolor* (Smith)). การสัมมนาวิชาการประจำปี 2536 ระหว่างวันที่ 15-17 กันยายน 2536 สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด กรมประมง บางเขน กรุงเทพฯ

สุปราณี ชินบุตร นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล และ เต็มดวง พึ่งขจรบุญ . 2533. การเกิดโรคจากเชื้อ Mycobacterium ในปลาน้ำจืด: ปลากัด วารสารการประมง 43(2) : 119-122.

สมชาย หวังวิบูลย์กิจ นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ ดุสิต เอื้ออำนวย และวารินทร์ พิศโหมก . 2545. ผลของระบบหมุนเวียนน้ำที่มีตัวกรองชีวภาพต่อการอนุบาลลูกปลาโรซี่บาร์บ (Barbus conchonius). การประชุมทางวิชาการด้านเกษตร ทรัพยากร และสิ่งแวดล้อม งานเกษตรภาคใต้ ครั้งที่ 10. 10 – 11 สิงหาคม 2545 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา.

นันทิมา สุทธิวรรณกุล นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และอิทธิสุนทร นันทกิจ. 2546. ผลของ ระบบปลูกพรรณไม้น้ำร่วมกับการเลี้ยงปลาในระบบต่างๆ ที่มีผลผลิตและคุณภาพน้ำ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 34 (1-3) ฉบับพิเศษ: 18 – 21.

มณีรัตน์ หวังวิบูลย์กิจ วิไลวรรณ เหมศิริ นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และวรางคณา กาซัม . 2548. ผลของความเข้มแสงและคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของพรรณไม้น้ำในตู้ การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 43 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาประมง ระหว่างวันที่ 1 – 4 กุมภาพันธ์ 2548 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

มณีรัตน์ หวังวิบูลย์กิจ นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และอิทธิสุนทร นันทกิจ และยุทธนา เกียรติธร . 2548. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของพรรณไม้น้ำชนิดใบพายเขาใหญ่ (*Cryptocoryne crispatula* var. balansae) ในระบบการปลูกพืชแบบไม่ใช้ดิน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 36 (5-6) ฉบับพิเศษ: 741 - 744.

อัจฉรี เรืองเดช ลำพึง พุ่มจันทร์ และนงนุช เลาหะวิสุทธิ์. 2549. การเพิ่มสีของปลาหมอสีโดยใช้อาหารเสริมแอสตาแซนทิน. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 7 มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ระหว่างวันที่ 25-26 พฤษภาคม 2549 จ.เชียงใหม่ 290 - 297 หน้า.

อัจฉรี เรืองเดช และนงนุช เลาหะวิสุทธิ์. 2549. การจำกัดการเพิ่มจำนวนของสาหร่ายขนาดเล็กด้วยสารสกัดจากสาหร่ายเม็ดพริกไทย. การประชุมทางวิชาการ “สิ่งแวดล้อมนเรศวร” ครั้งที่ 2 มหาวิทยาลัยนเรศวร ระหว่างวันที่ 28-29 มิถุนายน 2549 จ.พิษณุโลก 717-724 หน้า.

มณีรัตน์ หวังวิบูลย์กิจ นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และวรางคณา กาซัม. 2549. การขยายพันธุ์รากดำใบยาว. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 44 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน . กรุงเทพฯ. 409 – 418 หน้า.

Phumjan, L. and N. Laohavisuti. 2007. Betalain extraction from peeled dragon fruit for enhancing color in red platy (*Xiphophorus maculatus*). International Conference on Integration of Science & Technology for Sustainable Development, Bangkok, Thailand. 26 – 27 April 2007, 504-507.