การเพิ่มจำนวนยอดและปริมาณสารทุติยภูมิของกะเพราแดง ในสภาพปลอดเชื้อ

โดย

นางสาวเจิมอรุณ อุทัยแจ่มศรีผล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)
สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

Ref. code: 25615909032558LMU

การเพิ่มจำนวนยอดและปริมาณสารทุติยภูมิของกะเพราแดง ในสภาพปลอดเชื้อ

โดย

นางสาวเจิมอรุณ อุทัยแจ่มศรีผล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)
สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

Ref. code: 25615909032558LMU

SHOOT MULTIPLICATION AND SECONDARY METABOLITE ENHANCEMENT OF *OCIMUM SANCTUM* L. (HOLY BASIL PURPLE TYPE) UNDER ASEPTIC CONDITIONS

BY

MISS JERMAROON AUTAIJAMSRIPON

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (AGRICULTURAL TECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
THAMMASAT UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2018

COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

Ref. code: 25615909032558LMU

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

นางสาวเจิมอรุณ อุทัยแจ่มศรีผล

เรื่อง

การเพิ่มจำนวนยอดและปริมาณสารทุติยภูมิของกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)

เมื่อ วันที่ 1 มีนาคม พ.ศ. 2562

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ _____
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณพร อิฐรัตน์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก _____
(รองศาสตราจารย์ ดร.เยาวพา จิระเกียรติกุล)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม _____
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุมาศ ฤทธิไชย)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ _____
(อาจารย์ ดร.นงลักษณ์ เทียนเสรี)

คณบดี _____
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย ชคตระการ)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเพิ่มจำนวนยอดและปริมาณสารทุติยภูมิของกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ
ชื่อผู้เขียน	นางสาวเจิมอรุณ อุทัยแจ่มศรีผล
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.เยาวพา จิระเกียรติกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุมาศ ฤทธิไชย
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

กะเพราแดง (*Ocimum sanctum* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณต้านการอักเสบและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถผลิตพืชที่ตรงตามพันธุกรรมได้ และเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตสารทุติยภูมิ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง การเติม phenylalanine (Phe) และ methyl jasmonate (MeJA) รวมถึงระยะเวลาที่ได้รับ MeJA ต่อการเจริญเติบโต การสะสมสารทุติยภูมิ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ ในการเพิ่มจำนวนยอดกะเพราแดง เพาะเลี้ยงยอดและข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0-8.87 µM ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0-2.85 µM หรือ NAA ความเข้มข้น 0-2.69 µM เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดเมื่อใช้ชิ้นส่วนยอดและข้อในการเพาะเลี้ยง โดยมีจำนวนยอดที่พัฒนาเท่ากับ 3.80±0.51 และ 3.00±0.43 ยอด ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตรดังกล่าวเป็นเวลานาน 3-6 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ พบว่า ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อทุกระยะเวลาเพาะเลี้ยงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากกว่า และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าใบจากต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ โดยยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 5 สัปดาห์

Ref. code: 25615909032558LMU

มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (152.10±7.94 mg GAE/g dry extract) และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (122.04±3.66 mg CE/g dry extract) สูงสุด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50} เท่ากับ 12.95±1.37 µg/ml) ดีที่สุด ส่วนปริมาณสารยูจีนอลของใบกะเพราแดงจากต้นแม่ (2,931.17±286.61 µg/g dry extract) และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ (8,816.18±510.60 µg/g dry extract) มีค่าสูงกว่ายอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 3-6 สัปดาห์ (249.76±41.84 ถึง 583.24±23.28 µg/g dry extract)

ในการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิด้วยการเพาะเลี้ยงข้อกะเพราแดงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมกับ Phe ความเข้มข้น 0 25 และ 50 µM MeJA ความเข้มข้น 0 50 และ 100 µM เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า MeJA สามารถกระตุ้นให้ยอดที่พัฒนาสร้างสารทุติยภูมิ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่า Phe โดย MeJA ความเข้มข้น 100 µM สามารถกระตุ้นให้ยอดกะเพราแดงมีปริมาณยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด เมื่อศึกษาผลของระยะเวลาที่ได้รับ MeJA ต่อการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ โดยเพาะเลี้ยงข้อกะเพราแดงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลานาน 3-5 สัปดาห์ พบว่า ยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ มีปริมาณสารยูจีนอล (344.64±9.32 µg/g dry extract) สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (177.59±2.58 mg GAE/g dry extract) และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (187.93±5.93 mg CE/g dry extract) เพิ่มขึ้นสูงสุด หรือ 1.76 1.23 และ 1.32 เท่าของสิ่งทดลองควบคุมตามลำดับ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีโดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 11.59±0.69 µg/ml

คำสำคัญ: กะเพราแดง, การเพาะเลี้ยงยอด, ปริมาณสารทุติยภูมิ, การเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ

Ref. code: 25615909032558LMU

Thesis Title	SHOOT MULTIPLICATION AND SECONDARY METABOLITE ENHANCEMENT OF *OCIMUM SANCTUM* L. (HOLY BASIL PURPLE TYPE) UNDER ASEPTIC CONDITIONS
Author	Miss Jermaroon Autaijamsripon
Degree	Master of Science (Agricultural Technology)
Department/Faculty/University	Agricultural Technology Faculty of Science and Technology Thammasat University
Advisor	Associate Professor Yaowapha Jirakiattikul, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Assistant Professor Panumart Rithichai, Dr.Agr.Sci.
Academic Year	2018

ABSTRACT

Holy basil purple type (*Ocimum sanctum* L.) is a medicinal plant that used to treat anti-inflammatory and contains high antioxidant activities. True-to-type regenerated plants could be produced by plant tissue culture technique and those plants are the important sources for secondary metabolite production. Therefore, the objectives of this study were to investigate the suitable medium for shoot multiplication, and the effects of culture periods, phenylalanine (Phe) and methyl jasmonate (MeJA) including elicitation time of MeJA on growth, secondary metabolite accumulation and DPPH radical scavenging activity of holy basil purple type shoots under aseptic conditions. For shoot multiplication, shoot and single node segments were cultured on MS (Murashige and Skoog) medium supplemented with 0-8.87 μM BA (6-benzyladenine) in combination with 0-2.85 μM IAA (indole-3-acetic acid) or 0-2.69 μM NAA (1-naphthylacetic acid) for four weeks. The suitable medium for shoot multiplication was MS medium supplemented with 2.22 μM BA when shoots and single nodes were used as the explants. The number of shoots were 3.80±0.51 and 3.00±0.43, respectively.

Ref. code: 25615909032558LMU

The secondary metabolite contents and DPPH radical scavenging activities of 3 to 6-week-old *in vitro* regenerated shoots were determined and compared with those from leaves of mother plants and transplantation plants which were grown under *in vivo* conditions. The results showed that total phenolic contents, total flavonoid contents and DPPH radical scavenging activies were greater in 3 to 6-week-old regenerated shoots than *in vivo* leaves. The highest yield of total phenolic (152.10±7.94 mg GAE/g dry extract) and total flavonoid contents (122.04±3.66 mg CE/g dry extract), and DPPH radical scavenging activity (EC_{50} of 12.95±1.37 µg/ml) were obtained in 5-week-old regenerated shoots. However, the eugenol contents from leaves of mother plants (2,931.17±286.61 µg/g dry extract) and transplantation plants (8,816.18±510.60 µg/g dry extract) were higher than those of 3 to 6-week-old *in vitro* regenerated shoots (249.76±41.84 to 583.24±23.28 µg/g dry extract).

For secondary metabolite enhancement, the single node segments were cultured on MS medium supplemented with 2.22 µM BA in combination with 0, 25 and 50 µM Phe, 0, 50 and 100 µM MeJA alone, and Phe in combination with MeJA at different concentrations for three weeks. The result indicated that MeJA was more effective in secondary metabolite enhancement than Phe. The highest yield of eugenol, total phenolic and total flavonoid contents, and DPPH radical scavenging activities occurred in 100 µM MeJA shoots. The suitable MeJA elicitation time for secondary metabolite enhancement was also investigated by culturing the single node segments on MS medium supplemented with 2.22 µM BA in combination with or without 100 µM MeJA for three to five weeks. It was found that the regenerated shoots cultured on medium supplemented with 100 µM MeJA for four weeks contained the highest contents of eugenol (344.64±9.32 µg/g dry extract), total phenolic 177.59±2.58 mg GAE/g dry extract) and total flavonoid (187.93±5.93 mg CE/g dry extract) or 1.76, 1.23 and 1.32 times that of the control, respectively. In addition, DPPH radical scavenging activity with EC_{50} of 11.59±0.69 µg/ml was achieved in the 4-week-old-regenerated shoots cultured on 100 µM MeJA.

Keywords: holy basil purple type, shoot multiplication, secondary metabolite contents, secondary metabolite enhancement

Ref. code: 25615909032558LMU

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัย และวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากได้รับความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ ดร.เยาวพา จิระเกียรติกุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลักที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำในการทำการทดลอง ตลอดจนตรวจสอบ และแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุมาศ ฤทธิไชย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะ และตรวจสอบเล่มวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณพร อิฐรัตน์ และอาจารย์ ดร.นงลักษณ์ เทียนเสรี ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำในการทำงานวิจัยให้สมบูรณ์ดียิ่งขึ้น

อาจารย์ ดร.ดวงเดือน ไชยเวช ที่กรุณาให้คำปรึกษา และความรู้ในด้านการสกัดตัวอย่างพืช เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง และอาจารย์ ดร.พรชัย หาระโคตร ที่กรุณาให้คำปรึกษา และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์สารทุติยภูมิด้วยวิธีการที่เหมาะสม ทำให้การทดลองสามารถดำเนินงานได้อย่างราบรื่น

คุณกัลยารัตน์ ภู่สุดแสวง ที่กรุณาให้คำปรึกษา ตลอดจนสอนการใช้เครื่อง Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่สำคัญ ทำให้ได้ผลการทดลองที่แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ

คุณพิสมัย โพธิ์ศรี ที่กรุณาตรวจสอบความสมบูรณ์ของเล่มวิทยานิพนธ์ ตลอดจนติดต่อและประสานงานกับเจ้าหน้าที่คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

บุคลากรของสาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร สาขาวิชาเคมี ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และห้องปฏิบัติการวิจัยกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษา รวมทั้งเอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

ครอบครัว พี่ น้อง และเพื่อนที่ให้กำลังใจในการทำงานวิจัย และวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยตระหนักถึงความกรุณาของทุกท่าน และขอกราบขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ท้ายสุด ขอขอบคุณการสนับสนุนจากทุนบัณฑิตเรียนดี เพื่อศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา ปีการศึกษา 2559-2660 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

นางสาวเจิมอรุณ อุทัยแจ่มศรีผล

Ref. code: 25615909032558LMU

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญตาราง	(11)
สารบัญภาพ	(14)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 กะเพรา	4
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	4
2.1.2 ประโยชน์ และสรรพคุณของกะเพรา	5
2.1.3 สารทุติยภูมิในกะเพรา	6
2.2 การชักนำให้เกิดยอด และเพิ่มจำนวนยอดในสภาพปลอดเชื้อ	7
2.2.1 อาหารเพาะเลี้ยง	8
2.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต	8
2.2.2.1 ออกซิน	8
2.2.2.2 ไซโทไคนิน	9

Ref. code: 25615909032558LMU

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.3 สภาพในการเพาะเลี้ยง	9
2.3 สารทุติยภูมิ (secondary metabolites)	10
2.3.1 สารยูจีนอล	11
2.3.2 สารประกอบฟีนอลิค	13
2.3.3 สารฟลาโวนอยด์	14
2.3.4 อนุมูลอิสระ (free radical) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)	16
2.4 การเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ (secondary metabolite enhancement)	18
2.4.1 การเติมสารตั้งต้น	19
2.4.2 การเติมสารกระตุ้น	21
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	25
3.1 พืชทดลอง	25
3.2 อาหารเพาะเลี้ยง	26
3.3 สภาพเพาะเลี้ยง	27
3.4 การเตรียมสารตั้งต้น และสารกระตุ้น	27
3.5 ผลของ BA ร่วมกับ IAA และ NAA ต่อการเพิ่มจำนวนยอด	27
3.5.1 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอด	27
3.5.2 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ	27
3.6 ปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ	28
3.6.1 การสกัดตัวอย่างพืชสำหรับวิเคราะห์สารยูจีนอล	29
3.6.2 ปริมาณสารยูจีนอล	30
3.6.3 การสกัดตัวอย่างพืชสำหรับวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	31
3.6.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด	31
3.6.5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	32

Ref. code: 25615909032558LMU

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.6.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging activity	33
3.7 ผลของ Phe และ MeJA ต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดง	34
3.7.1 ความเข้มข้นของ Phe และ MeJA	34
3.7.2 ระยะเวลาที่ได้รับ MeJA	35
3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	35
3.9 สถานที่ทำการทดลอง	36
3.10 ระยะเวลาในการทดลอง	36
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	38
4.1 ผลของ BA ร่วมกับ IAA และ NAA ต่อการเพิ่มจำนวนยอด	38
4.1.1 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอด	38
4.1.2 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ	40
4.2 ปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ	43
4.2.1 การเจริญเติบโตของยอด	43
4.2.2 % yield	45
4.2.3 ปริมาณสารยูจีนอล	45
4.2.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด	47
4.2.5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	49
4.2.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	50
4.2.7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	52
4.3 ผลของ Phe และ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดง	54
4.3.1 การเจริญเติบโตของยอด	54
4.3.2 % yield	57

Ref. code: 25615909032558LMU

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.3 ปริมาณสารยูจีนอล	58
4.3.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด	60
4.3.5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	62
4.3.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	63
4.3.7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	65
4.4 ผลของระยะเวลาที่ได้รับ MeJA ต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดง	66
4.4.1 การเจริญเติบโตของยอด	66
4.4.2 % yield	70
4.4.3 ปริมาณสารยูจีนอล	70
4.4.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด	73
4.4.5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	74
4.4.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	75
4.4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	78
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	80
5.1 สรุปผลการวิจัย	80
5.2 ข้อเสนอแนะ	80
รายการอ้างอิง	82

Ref. code: 25615909032558LMU

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	102
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารสูตร MS สารควบคุมการเจริญเติบโตสารตั้งต้น Phe และสารกระตุ้น MeJA	103
ภาคผนวก ข จำนวนยอดที่พัฒนา ความยาวยอด และการเกิดแคลลัสของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ	107
ภาคผนวก ค น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง % น้ำหนักแห้ง ปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC50) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ	110
ภาคผนวก ง ต้นทุนการผลิตกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อและสภาพธรรมชาติ	117
ประวัติผู้เขียน	120

Ref. code: 25615909032558LMU

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 อาหารสูตร MS ที่เติม BA IAA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อเพิ่มจำนวนยอดกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ 28

3.2 อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM (สิ่งทดลองควบคุม) หรือเติมร่วมกับ Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ 35

4.1 ค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) ระหว่างปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลานาน 3-6 สัปดาห์ 53

4.2 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM (สิ่งทดลองควบคุม) หรือเติมร่วมกับ Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ 65

4.3 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และ % น้ำหนักแห้ง ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ 68

4.4 % yield ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ เพื่อวิเคราะห์สารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (TPC) สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH 71

4.5 ปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นระยะเวลานาน 3 4 และ 5 สัปดาห์ 76

Ref. code: 25615909032558LMU

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.6 ค่าสหสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ 79

ตารางผนวกที่ หน้า

ก. การเตรียม stock อาหารสูตร MS 104

ข.1 จำนวนยอดที่พัฒนา ความยาวยอด และการเกิดแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน ยอดของกะเพราแดงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0-8.87 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 2.85 µM และ NAA ความเข้มข้น 2.69 µM เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 108

ข.2 จำนวนยอดที่พัฒนา ความยาวยอด และการเกิดแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของกะเพราแดงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0-8.87 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 2.85 µM และ NAA ความเข้มข้น 2.69 µM เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 109

ค.1 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง % น้ำหนักแห้ง และ % yield ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM เป็นระยะเวลานาน 3-6 สัปดาห์ ใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ 111

ค.2 ปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM เป็นระยะเวลานาน 3-6 สัปดาห์ ใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ 112

Ref. code: 25615909032558LMU

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ หน้า

ค.3 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง % น้ำหนักแห้ง และ % yield ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM (สิ่งทดลองควบคุม) หรือเติมร่วมกับ Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ 113

ค.4 ปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM (สิ่งทดลองควบคุม) หรือเติมร่วมกับ Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ 114

ค.5 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง % น้ำหนักแห้ง และ % yield ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นระยะเวลานาน 3 4 และ 5 สัปดาห์ 115

ค.6 ปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นระยะเวลานาน 3 4 และ 5 สัปดาห์ 116

ง.1 ต้นทุนการผลิตยอดกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของกะเพราแดงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ 118

ง.2 ต้นทุนการผลิตกะเพราแดงจำนวน 200 ต้น ปลูกในสภาพธรรมชาติเป็นเวลานาน 4 เดือน (ตั้งแต่เพาะเมล็ด-เก็บเกี่ยว) 119

Ref. code: 25615909032558LMU

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 กะเพราขาว: A) ลำต้น B) ใบ และ C) ช่อดอก	5
2.2 กะเพราแดง: A) ลำต้น B) ใบ และ C) ช่อดอก	5
2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารยูจีนอล	12
2.4 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิค	14
2.5 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์	15
2.6 โครงสร้างของ phenylalanine	19
2.7 กระบวนการสังเคราะห์ยูจีนอล	21
2.8 โครงสร้าง methyl jasmonate	22
3.1 กะเพราแดงที่นำมาใช้เป็นต้นแม่ในการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	25
3.2 ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 µM: A) ตาข้างที่พัฒนาไปเป็นยอด หลังเพาะเลี้ยงข้อนาน 2 สัปดาห์ B) ยอดที่พัฒนาหลังจากย้ายเลี้ยงทุกๆ 4 สัปดาห์ (scale bar = 1 cm)	26
3.3 ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM เป็นเวลานาน: A) 3 สัปดาห์ B) 4 สัปดาห์ C) 5 สัปดาห์ D) 6 สัปดาห์ E และ F) ต้นแม่และใบกะเพราแดงที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ G และ H) ต้นและใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาตินาน 2 เดือน (scale bar = 1 cm)	29
3.4 กราฟมาตรฐานของ eugenol	31
3.5 กราฟมาตรฐานของ gallic acid	32
3.6 กราฟมาตรฐานของ catechin	33
3.7 แผนการศึกษา	37
4.1 จำนวนยอดที่พัฒนา (A) และความยาวของยอดกะเพราแดง (B) เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA IAA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	38
4.2 ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA IAA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (scale bar = 1 cm)	39

Ref. code: 25615909032558LMU

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.3 จำนวนยอดที่พัฒนา (A) และความยาวของยอดกะเพราแดง (B) เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA IAA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 40

4.4 ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA IAA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (scale bar = 1 cm) 41

4.5 น้ำหนักสด (A) น้ำหนักแห้ง (B) และ % น้ำหนักแห้ง (C) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 3-6 สัปดาห์ 44

4.6 % yield ของสารสกัดจากยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 3-6 สัปดาห์ ใบกะเพราแดงจากต้นแม่ (mother plant, MP) และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ (transplantation plant, TP) ในการวิเคราะห์: A) สารยูจีนอล B) สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH 46

4.7 A) ปริมาณสารยูจีนอล B) สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด C) สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และ D) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC50) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 3-6 สัปดาห์ ใบกะเพราแดงจากต้นแม่ (MP) และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ (TP) 51

4.8 ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM (สิ่งทดลองควบคุม) หรือเติมร่วมกับ Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (scale bar = 1 cm) 54

4.9 น้ำหนักสด (A) น้ำหนักแห้ง (B) และ % น้ำหนักแห้ง (C) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM (สิ่งทดลองควบคุม) หรือเติมร่วมกับ Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ 56

Ref. code: 25615909032558LMU

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.10	% yield ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM (สิ่งทดลองควบคุม) หรือเติมร่วมกับ Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในการวิเคราะห์: A) สารยูจีนอล B) สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	58
4.11	A) ปริมาณสารยูจีนอล B) สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด C) สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และ D) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM (สิ่งทดลองควบคุม) หรือเติมร่วมกับ Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์	64
4.12	ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µMร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ (scale bar = 1 cm)	67
4.13	น้ำหนักสด (A) และน้ำหนักแห้ง (B) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์	69
4.14	% yield สำหรับวิเคราะห์สารยูจีนอลของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์	72
4.15	A) ปริมาณสารยูจีนอล B) สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด C) สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และ D) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์	77

Ref. code: 25615909032558LMU

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

กะเพรา (*Ocimum sanctum* L.) เป็นพืชในวงศ์ Lamiaceae และเป็นไม้ล้มลุกขนาดเล็กที่มีกลิ่นหอมเฉพาะ มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย และมาเลเซีย (Saha et al., 2013) มีสรรพคุณต้านโรคหลอดลมอักเสบ โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด บรรเทาอาการปวด แก้ไข้ แก้ท้องอืด รักษาอาการโรคผิวหนัง และมีส่วนช่วยต่อต้าน HIV-I (โชติอนันต์, 2552; Sethi et al., 2006; Kayastha, 2014) ในใบกะเพรามีน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ที่สำคัญหลายชนิด เช่น ยูจีนอล (eugenol) เมธิลยูจีนอล (methyl eugenol) (Singh et al., 2012) และสารประกอบอื่นๆ ได้แก่ คาร์วาครอล (carvacrol) แคริโอฟิลลีน (caryophyllene) ลูทอีโอลิน (luteolin) โอเรียนทิน (orientin) กรดโซลิก (ursolic acid) apigenin, apigenin-7-O-glucuronide และ molludistin (Mondal et al, 2009) ซึ่งสารยูจีนอลเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาช่วยลดอาการปวด ต้านการอักเสบ (Ohkubo and Shibata, 1997) สามารถผลิตเป็นยาชา ยาลดไขมันในกระแสเลือด (Jadhav et al., 2004; Prakash and Gupta, 2005) เพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ ปัจจุบันมีการนำสารยูจีนอลมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น น้ำหอม สารปรุงแต่งกลิ่น (Świzdor et al., 2012) จากรายงานของยศกร และคณะ (2558) พบว่า ปริมาณสารยูจีนอลในใบกะเพราที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีค่าเท่ากับ 2.05% ซึ่งน้อยกว่าปริมาณที่พบในดอกตูมของกานพลู (*Syzygium aromaticum* L.) ที่มีสารยูจีนอลสูงถึง 70-90% แต่แหล่งผลิตกานพลูในประเทศไทยยังไม่แพร่หลาย รวมถึงต้นกานพลูมีการเจริญเติบโตช้า จึงต้องนำเข้ากานพลูจากต่างประเทศ (อุบลทิพย์, 2520) ดังนั้นการนำพืชสมุนไพรที่มีสารยูจีนอล และมีการเจริญเติบโตดีในประเทศไทย เช่น กะเพรามาเป็นแหล่งผลิตสารยูจีนอล จะช่วยทำให้มีปริมาณสารดังกล่าวมากเพียงพอต่อความต้องการได้ ซึ่งกะเพราสามารถแบ่งได้ 3 สายพันธุ์ คือ กะเพราขาว กะเพราแดง (Mondal et al., 2009) และกะเพราลูกผสมระหว่างกะเพราขาวและกะเพราแดง (อ.อรรถสิทธิ์, 2551) โดยกะเพราแดงมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาสูงจึงนิยมนำมาใช้ในการผลิตยา (Gupta et al., 2002) อย่างไรก็ตามการผลิตกะเพราแดงในสภาพธรรมชาติเพื่อนำสารสกัดมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์นั้นยังคงมีข้อกำจัด เนื่องจากพืชชนิดนี้สามารถผสมเกสรข้ามกับพืชอื่นๆ ที่อยู่ในสกุลเดียวกันได้ จึงทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม และส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน (Razdan, 2003) ในปัจจุบันการผลิตสารทุติยภูมิจากพืชสมุนไพรโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากต้นที่

Ref. code: 25615909032558LMU

ได้จะมีความคงตัวทางพันธุกรรมสูง (Mishra, 2015) สามารถผลิตสารได้อย่างต่อเนื่อง ให้คุณภาพสม่ำเสมอ และใช้เวลาสั้นกว่าการปลูกพืชทั่วไป ซึ่งปริมาณสารทุติยภูมิของพืชที่ผลิตในสภาพปลอดเชื้อจะไม่แปรผันตามสภาพภูมิประเทศ และสภาพภูมิอากาศ (วราภรณ์, 2551) มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกะเพราและพบว่ายอดที่พัฒนาได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถผลิตสารยูจีนอลได้ เช่น ยศกร และคณะ (2558) ที่เพาะเลี้ยงใบของกะเพราแดงบนอาหารสูตร MS (Murashige & Skoog) ที่เติม BA (6-benzyladenine) ความเข้มข้น 1 mg/l (4.44 µM) นาน 35 วัน พบว่า ยอดที่พัฒนามีสารยูจีนอลเท่ากับ 13.91% หรือ Bhuvaneshwari et al. (2016) ที่เพาะเลี้ยงข้อกะเพราบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 mg/l (4.44 µM) ร่วมกับ kinetin (6-furfuryl-aminopurine) ความเข้มข้น 0.5 mg/l (2.32 µM) นาน 4 สัปดาห์ พบว่า ใบจากยอดที่พัฒนามีสารยูจีนอลเท่ากับ 88.80±4.53 µg/g DM

นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิของพืชด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็เป็นแนวทางหนึ่งที่ได้รับความสนใจ โดยได้มีการศึกษาแล้วในพืชสมุนไพรหลายชนิด (Yu et al., 2000; Sivanandhan et al., 2013; Abeda et al., 2014; Wang et al., 2015) ซึ่งการเติมสารตั้งต้น (precursor feeding) หรือสารกระตุ้น (elicitation) ในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นวิธีการที่นิยมเพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ โดย phenylalanine (Phe) เป็นสารตั้งต้นในวิถีฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid pathway) ในการสังเคราะห์สารประกอบฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid compounds) เช่น ยูจีนอล (Anand et al., 2016) นอกจากนี้ methyl jasmonate (MeJA) เป็นสารกระตุ้นที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิของพืชหลายกลุ่ม ได้แก่ ฟีนอลิค (phenolic) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เทอร์พีนอยด์ (terpenoid) อัลคาลอยด์ (alkaloid) (Zhao et al., 2005) และสารประกอบฟีนิลโพรพานอยด์ (Gang et al., 2001; Zhao et al., 2005) มีรายงานการศึกษาเพื่อเพิ่มปริมาณสารยูจีนอล รวมถึงสารทุติยภูมิชนิดอื่นๆ ในกะเพราและพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ แล้วโดยใช้ Phe และ MeJA ซึ่งพบว่า Phe ส่งเสริมการสร้างและสะสมสารยูจีนอลในยอดของกะเพราที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ (Sharma et al., 2016) และแคลลัสของ *Verbascum thapsus* L. (Al-Jibouri et al., 2016) นอกจากนี้ Phe ยังส่งเสริมการสร้างสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในแคลลัสของแครอท (*Daucus carota*) (Arafa et al., 2015) และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในแคลลัสของ *Hydrocotyle bonariensis* (Masoumian et al., 2011) สำหรับการใช้ MeJA เพื่อเพิ่มปริมาณสารยูจีนอลของพืชพบว่า MeJA สามารถกระตุ้นให้แคลลัสของ *Dianthus caryophyllus* L. เกิดการสร้างสารยูจีนอลได้ (Matter et al., 2017) นอกจากนี้สามารถกระตุ้นให้เซลล์แขวนลอยของ *Vitis vinifera L.* cvs. Gamay (Çetin and Baydar, 2014) และ *Hypericum perforatum* (Wang et al., 2015) สร้างสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (total phenolics) และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

Ref. code: 25615909032558LMU

(total flavonoids) เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนยอดกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ รวมถึงปริมาณสารทุติยภูมิและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดกะเพราแดงเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลานานต่างกันมีค่อนข้างจำกัด อีกทั้งยังไม่มีรายงานการศึกษาการเติม Phe และ MeJA ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งผลของการศึกษาข้างต้นจะสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญจากกะเพราแดงให้เพียงพอต่อความต้องการทางการแพทย์ และภาคอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของ BA ร่วมกับ IAA (indole-3-acetic acid) หรือ NAA (1-naphthaleneacetic acid) ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเพิ่มจำนวนยอดของกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ
2. เพื่อศึกษาปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานต่างกัน
3. เพื่อศึกษาผลของ Phe และ MeJA ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาที่ได้รับสารต่างกันต่อปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาการเพิ่มจำนวนยอดกะเพราแดง โดยนำชิ้นส่วนยอดและข้อในสภาพปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IAA หรือ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการพัฒนาของยอด จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณสารทุติยภูมิ ได้แก่ สารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานต่างกัน

ศึกษาผลของการเติม Phe และ MeJA ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพียงอย่างเดียวหรือเติมร่วมกันที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดกะเพราแดง รวมทั้งศึกษาผลของระยะเวลาที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้นที่ดีที่สุดต่อการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ

Ref. code: 25615909032558LMU

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

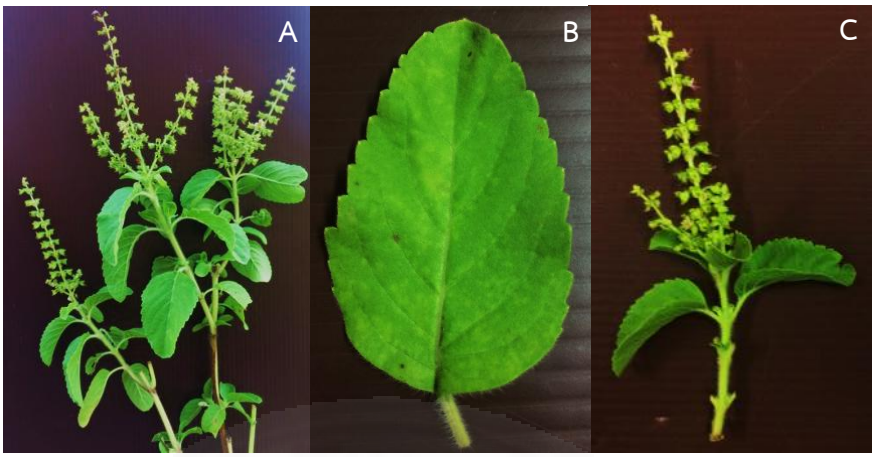
2.1 กะเพรา

กะเพรา (*Ocimum sanctum* L.) มีชื่อพ้อง *O. tenuiflorum* L. และชื่อสามัญ Holy basil มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศอินเดีย และมาเลเซีย เป็นไม้ล้มลุกขนาดเล็กที่มีกลิ่นหอม พบได้ทั่วไปในเขตร้อน กะเพราเป็นพืชสมุนไพรศักดิ์สิทธิ์ที่ชาวอินเดียใช้ประกอบพิธีกรรมต่างๆ ในศาสนาฮินดู โดยเป็นที่รู้จักทั่วไปในประเทศอินเดียว่า “ตุลซี” (Tulsi) (Banu et al., 2001; Saha et al., 2013) ในทางการแพทย์อายุรเวท (Ayurvedic medicine) ของประเทศอินเดียนำกะเพรามาใช้รักษาโรคต่างๆ จนกะเพราถูกจัดให้เป็น “ราชินีแห่งสมุนไพร” (Queen of herb) (Wakchaure et al., 2016) ในประเทศไทยกะเพราเป็นผักสวนครัวที่สำคัญ นิยมปลูกตามบ้านเรือน (สุกัญญา, 2555) เพื่อนำใบมาใช้ประกอบอาหาร เนื่องจากมีรสชาติ กลิ่นหอมเฉพาะสามารถใช้ดับกลิ่นคาวในอาหารได้ และมีสรรพคุณทางยาใช้รักษาโรคหลายชนิด (Vasts et al., 2004) โดยกะเพราแบ่งได้ 3 สายพันธุ์ คือ กะเพราขาว กะเพราแดง โดยชาวอินเดียเรียกว่า “Rama Tulsi” และ “Krishna Tulsi” ตามลำดับ (Mondal et al., 2009) และกะเพราลูกผสมระหว่างกะเพราขาวและกะเพราแดง ซึ่งกะเพราขาวและกะเพราแดงเป็นพันธุ์ที่นิยมปลูก มีชื่อเรียกต่างกันตามสีของลำต้นและใบ (อ.อรรถสิทธิ์, 2551)

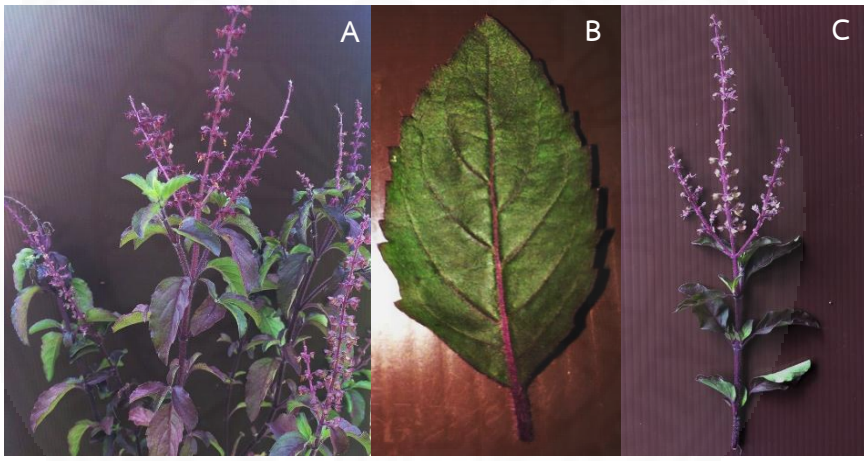
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กะเพราเป็นไม้พุ่มล้มลุก สูงประมาณ 30-60 cm ลำต้น และใบมีขนปกคลุม โคนต้นค่อนข้างแข็ง กะเพราขาวมีลำต้น และใบสีเขียวอมขาว (ภาพที่ 2.1 A และ 2.1 B) ส่วนกะเพราแดงมีลำต้น และใบสีเขียวอมม่วงแดง (ภาพที่ 2.2 A และ 2.2 B) มีกลิ่นแรงกว่ากะเพราขาว ใบเป็นใบเดี่ยวรูปไข่ ออกตรงข้ามกัน กว้าง 1-3 cm ยาว 2.5-5 cm ปลายใบและโคนใบแหลมมน ขอบใบหยัก ออกดอกเป็นช่อที่ปลายยอด ดอกกะเพราขาวมีสีขาว (ภาพที่ 2.1 C) แต่ถ้าเป็นกะเพราแดงมีสีชมพูอมม่วง (ภาพที่ 2.2 C) โคนกลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายเรียวแหลม ด้านนอกมีขน กลีบดอกแบ่งเป็น 2 ปาก ปากบนมี 4 แฉก ปากล่างมี 1 แฉก ปากล่างยาวกว่าปากบน มีขนประปราย เกสรตัวผู้มี 4 อัน ผลเป็นผลแห้ง เมื่อแตกออกจะมีเมล็ดสีดำ รูปไข่ (ณัฏฐา, 2555; Pandey and Madhuri, 2010)

Ref. code: 25615909032558LMU



ภาพที่ 2.1 กะเพราขาว: A) ลำต้น B) ใบ และ C) ช่อดอก



ภาพที่ 2.2 กะเพราแดง: A) ลำต้น B) ใบ และ C) ช่อดอก

2.1.2 ประโยชน์ และสรรพคุณของกะเพรา

กะเพรา 100 g มีคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน (protein) (4.2 g) ไขมัน (fat) (0.5 g) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) (2.3 g) วิตามินซี (vitamin C) (83 mg) เบต้าแคโรทีน (beta-carotene) (2.5 mg) โครเมียม (chromium) (2.9 µg) ทองแดง (copper) (0.4 µg) สังกะสี (zinc) (0.15 µg) วาเนเดียม (vanadium) (0.54 µg) เหล็ก (iron) (2.32 µg) และนิกเกิล (nickel) (0.73 µg) (Padayatty and Levine, 2001; Mondal et al., 2009) จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่า ใบมีองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิด ซึ่งเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Mukherjee et al., 2006) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Ramesh and Satakopan, 2010) ยับยั้ง

Ref. code: 25615909032558LMU

เชื้อจุลินทรีย์ (Awuah and Ellis, 2002) ต้านโรคหลอดลมอักเสบ โรคกระเพาะอาหาร โรคผิวหนัง โรคเบาหวาน (Sethi et al., 2006) โรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด บรรเทาอาการปวด มีส่วนช่วยต่อต้าน HIV-I (Kayastha, 2014) รวมถึงปรับสมดุลฮอร์โมนเพศหญิง (Sai et al., 2014) และมีฤทธิ์ไล่หรือฆ่ายุงได้ ดอก ช่วยรักษาอาการหลอดลมอักเสบ เมล็ด เป็นยาขับลม แก้ท้องอืด แก้โรคทางเดินปัสสาวะ และไตอักเสบ นอกจากนี้เมื่อนำเมล็ดไปแช่น้ำจนพองตัวเป็นเมือกขาว และนำมาพอกบริเวณตาจะช่วยให้ฝุ่นละอองที่เข้าตาออกมา และราก เป็นยาขับเหงื่อ แก้ไข้ และแก้ธาตุไม่ปกติ นอกจากนี้ทุกๆ ส่วนของต้นกะเพราสามารถใช้เป็นยาเพิ่มน้ำนมในสตรีหลังคลอดบุตร ช่วยขับน้ำนม และบรรเทาอาการไข้เรื้อรัง (ณัฏฐา, 2555)

2.1.3 สารทุติยภูมิในกะเพรา

จากการศึกษาสารทุติยภูมิในกะเพรา พบว่า ส่วนต่างๆ ของกะเพรามีองค์ประกอบของวิตามินเอ (vitamin A) วิตามินซี (Anbarasu and Vijayalakshmi, 2007) เบต้าแคโรทีน รวมถึงสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิค และสารฟลาโวนอยด์ที่สำคัญ เช่น กรดแกลลิก (gallic acid) กรดคาเฟอิก (caffiiec acid) กรดคลอโรจีนิก (chlorogenic acid) กรดคาร์โนซิค (carnosic acid) และกรดโรสมารินิค (rosmarinic acid) เป็นต้น (Kelm et al., 2000; Hakkim et al., 2007; Mondal et al., 2009) ในใบกะเพราประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยที่สำคัญหลายชนิด โดยน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพรา 0.7% ประกอบด้วย ยูจีนอล 71% เมธิลยูจีนอล 20% (Singh et al., 2012) และสารประกอบอื่นๆ ได้แก่ คาร์วาครอล แคริโอฟิลลีน ลูทอีโอลิน โอเรียนทิน กรดยูโซลิก apigenin, apigenin-7-O-glucuronide และ molludistin (Mondal et al, 2009) ซึ่งน้ำมันหอมระเหยเหล่านี้เป็นสารที่มีกลิ่นหอม (Saharkhiz et al., 2015) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Ramesh and Satakopan, 2010) ส่วนในเมล็ดของกะเพรา พบว่า มีน้ำมันที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ กรดปาลมิติก (palmitic acid) กรดสเตียริก (stearic acid) กรดลิโนเลนิก (linolenic acid) และกรดโอเลอิก (oleic acid) ซึ่งทั้งกะเพราขาว และกะเพราแดงมีองค์ประกอบทางเคมีของสารต่างๆ ที่คล้ายกัน (Mondal et al., 2009) แต่องค์ประกอบทางเคมีของสารเหล่านี้จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับพันธุ์ ฤดูกาล และลักษณะทางภูมิศาสตร์ (Bakkali et al., 2008) อย่างไรก็ตามกะเพราแดงจะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาสูงกว่ากะเพราขาวจึงนิยมนำมาใช้ในการผลิตยารักษาโรค (Gupta et al., 2002)

เนื่องจากกะเพราแดงเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยา ขยายพันธุ์ได้ง่ายด้วยการเพาะเมล็ด หรือใช้ลำต้นปักชำ (โชติอนันต์, 2552) และเจริญเติบโตได้ดีในประเทศไทย อีกทั้งยังเป็นแหล่งของสารทุติยภูมิที่สำคัญหลายชนิด จึงทำให้เป็นที่ต้องการมากในภาคอุตสาหกรรม และทางการแพทย์ แต่อุปสรรคอย่างหนึ่งในการผลิตและการสกัดสารสำคัญจากพืชชนิดนี้ คือ กะเพรา

Ref. code: 25615909032558LMU

สามารถผสมเกสรข้ามกับพืชอื่นๆ ที่อยู่ในสกุลเดียวกันได้ ซึ่งพืชที่อยู่ในสกุลเดียวกับกะเพรานั้นจะมีองค์ประกอบทางเคมีไม่เหมือนกัน จึงทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมและมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน (Razdan, 2003) อีกทั้งพืชชนิดนี้ยังมักพบปัญหาโรคและแมลงศัตรูพืชเข้าทำลาย ซึ่งการป้องกันด้วยการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชนอกจากจะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคแล้ว ยังส่งผลต่อคุณภาพของผลผลิต และปริมาณน้ำมันหอมระเหย (Bodhipadma et al., 2005) ปัจจุบันจึงได้นำเทคโนโลยีด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามาประยุกต์ใช้เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชที่มีประสิทธิภาพ สามารถเพิ่มจำนวนต้นกะเพราแดงให้ตรงตามพันธุ์ และมีจำนวนมากในระยะเวลาที่สั้นกว่าการเพาะปลูกตามธรรมชาติ อีกทั้งใช้เป็นแหล่งในการผลิตและสกัดสารทุติยภูมิที่สำคัญเพื่อให้มีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการในภาคอุตสาหกรรม โดยปริมาณสารทุติยภูมิของพืชที่ผลิตในสภาพปลอดเชื้อจะไม่แปรผันตามสภาพภูมิประเทศ และสภาพภูมิอากาศ (วราภรณ์, 2551)

2.2 การชักนำให้เกิดยอด และเพิ่มจำนวนยอดในสภาพปลอดเชื้อ

วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ การฟอกกำจัดเชื้อชิ้นส่วนพืช (surface sterilization) การชักนำให้เกิดยอด และเพิ่มจำนวนยอด (shoot induction and shoot multiplication) การชักนำให้เกิดราก (root induction) และการย้ายต้นที่ชักนำได้ออกปลูก (transplanting of plantlets) (ศิวพงศ์, 2546) ซึ่งมีรายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกะเพราเพื่อขยายพันธุ์แล้ว โดยชิ้นส่วนที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงได้แก่ ใบ (ยศกร และคณะ, 2558) ช่อดอก (Singh and Sehgal, 1999) ข้อ (Sharma et al., 2014; Jamal et al., 2016) ปลายยอด (Banu and Bari, 2007; Jamal et al., 2016) และแคลลัสที่พัฒนามาจากชิ้นส่วนใบ (Mishra, 2015) วิธีการฟอกกำจัดเชื้อชิ้นส่วนต่างๆ ของกะเพราก็จะแตกต่างกันตามชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง เช่น Singh and Sehgal (1999) ฟอกกำจัดเชื้อส่วนช่อดอกอ่อนกะเพราโดยล้างด้วยน้ำยาทำความสะอาด Teepol® และให้น้ำประปาไหลผ่านอย่างต่อเนื่องนาน 5-10 นาที จากนั้นฟอกกำจัดเชื้อด้วยสารละลาย $HgCl_2$ (mercuric chloride) ความเข้มข้น 0.2% (w/v) ที่เติม tween-20 จำนวน 5 หยด/100 ml เป็นเวลา 6-9 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งกำจัดเชื้อ ส่วนการฟอกกำจัดเชื้อชิ้นส่วนข้อทำได้โดยล้างชิ้นส่วนข้อกับน้ำประปาที่ไหลผ่านอย่างต่อเนื่องนาน 20 นาที จากนั้นล้างทำความสะอาดด้วย Teepol® ความเข้มข้น 5% นาน 15 นาที และน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งกำจัดเชื้อ 4 ครั้ง แล้วแช่ชิ้นส่วนข้อลงในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยสารละลาย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.1% (w/v) นาน 3-4 นาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านนึ่งกำจัดเชื้อแล้ว 3-4 ครั้ง

Ref. code: 25615909032558LMU

(Sharma et al., 2014) นอกจากนี้มีรายงานการฟอกกำจัดเชื้อชิ้นส่วนใบอ่อนกะเพราโดยล้างใบอ่อนด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านอย่างต่อเนื่องนาน 20 นาที จากนั้นฟอกกำจัดเชื้อด้วยสารละลาย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.1% (w/v) นาน 3-4 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งกำจัดชื้อแล้ว 3 ครั้ง (Mishra, 2015) ในงานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนยอดของกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อให้มียอดกะเพราแดงจำนวนมากเพียงพอสำหรับใช้เป็นแหล่งในการผลิตสารทุติยภูมิ ปัจจัยที่สำคัญในขั้นตอนนี้ ได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยง สารควบคุมการเจริญเติบโต และสภาพในการเพาะเลี้ยง (ศิวพงศ์, 2546; บุญยืน, 2547) โดยมีรายละเอียด ดังนี้

2.2.1 อาหารเพาะเลี้ยง

อาหารเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการชักนำให้เกิดยอด และเพิ่มจำนวนยอด โดยทั่วไปอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะมีส่วนประกอบของน้ำ สารอนินทรีย์ (inorganic nutrients) สารอินทรีย์ (oganic nutrients) สารที่เป็นแหล่งของคาร์บอน (carbon sources) รวมถึงสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator) สารที่ช่วยให้อาหารแข็งตัว (solidifying agents) และสารอาหารเสริมอื่นๆ เช่น น้ำมะพร้าว น้ำมะเขือเทศ ซึ่งพืชแต่ละชนิดจะต้องการทั้งชนิด และปริมาณขององค์ประกอบเหล่านี้ต่อการเจริญเติบโต และพัฒนาของยอดที่แตกต่างกันไป (บุญยืน, 2547)

2.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต

เป็นสารที่เกิดจากธรรมชาติ หรือเป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นมา ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญเติบโต และพัฒนาทางสรีรวิทยาของพืช ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชมีความสำคัญอย่างมากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ทั้งนี้หากไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชลงในอาหารเพาะเลี้ยงอาจส่งผลให้ชิ้นส่วนพืชเกิดการพัฒนาได้ไม่ดี และทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไม่ประสบความสำเร็จ โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มี 2 กลุ่ม คือ ออกซิน (auxin) และไซโทไคนิน (cytokinin) (รังสฤษดิ์, 2540; ศิวพงศ์, 2546) ซึ่งมีคุณสมบัติดังนี้

2.2.2.1 ออกซิน

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน มีบทบาทในการเร่งการเจริญเติบโตของพืชโดยมีอิทธิพลต่อการยืดตัว การขยายขนาดของเซลล์ ชักนำเกิดการแบ่งเซลล์ รวมถึงมีบทบาทในการเปลี่ยนแปลง meristem หรือแคลลัส เพื่อสร้างเป็นอวัยวะ ส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของท่อลำเลียง รักษาระดับ pH ของผนังเซลล์ และส่งเสริมการเกิดราก พืชที่ได้รับออกซินจะสร้างเอนไซม์ cellulase มาย่อย cellulose microfibrils ที่ผนังเซลล์ ทำให้การยืดตัวของผนังเซลล์ทำได้ดีขึ้น สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มนี้ ได้แก่ IBA (Indole-3-butyric acid),

Ref. code: 25615909032558LMU

2,4-D (2,4-dicholorophenoxy acetic acid) IAA และ NAA (รังสฤษดิ์, 2540; คำนูญ, 2542) ซึ่งในการเพิ่มจำนวนยอดของพืชอาจเติมหรือไม่เติมออกซินก็ได้ แต่หากเติมมักใช้ออกซินความเข้มข้นต่ำ เช่น IAA ความเข้มข้น 0.01-1 mg/l IBA NAA และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.001-1 mg/l (ศิวพงศ์, 2546)

2.2.2.2 ไซโทไคนิน

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโทไคนินมีบทบาทในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ กระตุ้นการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น และตาข้าง ทำให้เซลล์ขยายตัวออกทางด้านข้าง และควบคุมการเกิดรูปร่างของเซลล์ รวมทั้งกระตุ้นแคลลัสให้มีการเจริญเติบโต และพัฒนาไปเป็นต้น (พีรเดช, 2529) นอกจากนี้ไซโทไคนินยังสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงเกิดยอด และเกิดการพัฒนาของตาพิเศษ (adventitious bud) สนับสนุนการเกิดและป้องกันการถูกทำลายของคลอโรฟิลล์ และมีส่วนช่วยในการเคลื่อนย้ายสารอาหารภายในต้นพืช โดยไซโทไคนินที่ความเข้มข้นสูงจะช่วยลดอิทธิพลตายอดข่มการเจริญเติบโตของตาข้าง (apical dominance) แต่จะยับยั้งการเกิดราก (คำนูญ, 2542) สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มนี้ ได้แก่ 2iP (N^6-2-isopentyl adenine) BA kinetin และ zeatin (อารีย์, 2541; วราภรณ์, 2551) ความเข้มข้นที่นิยมใช้ คือ 1-10 mg/l (ศิวพงศ์, 2546) โดยสัดส่วนของไซโทไคนินต่อออกซินมีผลต่อการสร้างอวัยวะของพืช ซึ่งหากสัดส่วนของไซโทไคนินต่อออกซินสูง ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจะมีการแบ่งเซลล์ และพัฒนาไปเป็นลำต้น ตา ยอด และใบ แต่หากสัดส่วนของไซโทไคนินต่อออกซินต่ำ ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจะมีการแบ่งเซลล์และพัฒนาไปรากได้ดีกว่า (นพดล, 2537) อย่างไรก็ในตามการชักนำให้เกิดยอด และการเพิ่มจำนวนยอดของพืชบางชนิด พบว่า การใช้ไซโทไคนินร่วมกับออกซินในอัตราส่วนที่เหมาะสม สามารถส่งผลให้ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงพัฒนาไปเป็นยอดได้ (วราภรณ์, 2553) ซึ่งชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปตามชนิดพืช รวมถึงชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง (บุญยืน, 2547)

2.2.3 สภาพในการเพาะเลี้ยง

โดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมเพื่อให้ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงเกิดการพัฒนาไปเป็นยอดอยู่ที่ 24-26 ^{o}C และควรจะรักษาความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงให้อยู่ในระดับที่สูงประมาณ 70% สำหรับช่วงความยาวแสงที่ใช้ภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ 14-16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสงที่เหมาะสมคือ 1,000-4,000 lux นอกจากนี้ภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องมีอากาศหมุนเวียนภายในห้องที่ดี และควรเป็นระบบปิดเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ (รังสฤษดิ์, 2540; อารีย์, 2541) อย่างไรก็ตามหลังจากชักนำให้เกิดยอดแล้วไม่ควรเลี้ยงในอาหารเดิมเป็นเวลานานเกินไป เนื่องจากพืชดูดใช้ธาตุอาหารต่างๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงจนหมด อีกทั้งปล่อยสารพิษที่ยับยั้งการเจริญเติบโตออกมาบริเวณรอยแผล ดังนั้นควรย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ (subculture) ไปยังอาหารใหม่เพื่อเพิ่มจำนวนยอด (Rout et al., 2000)

Ref. code: 25615909032558LMU

มีรายงานการศึกษาการชักนำให้เกิดยอด และการเพิ่มจำนวนยอดของกะเพราในสภาพปลอดเชื้อแล้วโดย Pattnaik and Chand (1996) พบว่า การเพาะเลี้ยงตายอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 mg/l (4.44 µM) ร่วมกับ GA_3 (gibberellic acid) ความเข้มข้น 0.5 mg/l (1.44 µM) นาน 45 วัน เกิดการพัฒนาของยอดได้สูงถึง 15.0 ยอด และยอดที่พัฒนามีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 6.7 cm ในขณะที่ Sharma et al. (2014) พบว่า อาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ คือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.5 mg/l โดยมีจำนวนยอดที่พัฒนาเท่ากับ 11.33±0.27 ยอด และมีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 5.46±0.10 cm หลังเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ นอกจากนี้มีการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสโดยเพาะเลี้ยงแคลลัสที่พัฒนาจากชิ้นส่วนใบบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 mg/l ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l (2.85 µM) นาน 4 สัปดาห์ พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุดเท่ากับ 23.8±0.2 ยอด และมีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 6.8±0.1 cm (Mishra, 2015) และ Jamal et al. (2016) พบว่า การเพาะเลี้ยงปลายยอด และข้อกะเพราบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 2.0 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 mg/l (2.69 µM) นาน 3 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุดเท่ากับ 7 และ 9 ยอดตามลำดับ จากรายงานข้างต้นจะเห็นได้ว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยอดกะเพรามักเติม BA ความเข้มข้น 1-2 mg/l (4.44-8.87 µM) ร่วมหรือไม่ร่วมกับ IAA NAA หรือ GA_3 ความเข้มข้น 0.5 mg/l (2.85 2.69 หรือ 1.44 µM ตามลำดับ)

2.3 สารทุติยภูมิ (secondary metabolites)

สารทุติยภูมิเป็นสารกลุ่มหนึ่งในสารประกอบทางเคมี (phytochemistry) ที่เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ภายในพืช (Banthorpe, 1994) โดยการสังเคราะห์สารดังกล่าวจะเกิดขึ้นในเซลล์พืชที่มีความจำเพาะเจาะจง (Raghuveer et al., 2015) และมีความสัมพันธ์กับระยะการเจริญเติบโตของพืช (Banthorpe, 1994) ซึ่งพืชมักสังเคราะห์สารทุติยภูมิในปริมาณน้อย เนื่องจากเป็นสารที่ไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามสารนี้มีลักษณะพิเศษที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของพืช โดยจะทำหน้าที่ป้องกันพืชจากจุลชีพ แมลงและสัตว์ต่าง ๆ ที่มารบกวนทำให้พืชสามารถปรับตัวเพื่อดำรงชีวิต และเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมธรรมชาติได้ (ศุภวรรณ, 2549) ปัจจุบันมีการค้นพบสารทุติยภูมิในพืชมากกว่า 100,000 ชนิด ตัวอย่างสารทุติยภูมิที่พบมากในพืช ได้แก่ สเตียรอยด์ (steroid) ฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ เทอร์พีนอยด์ (Collin, 2001) และน้ำมันหอมระเหย เป็นต้น โดยรายละเอียดของสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีดังนี้

Ref. code: 25615909032558LMU

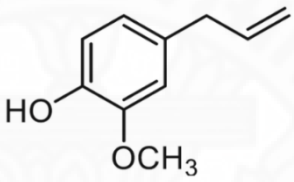
2.3.1 สารยูจีนอล

สารยูจีนอล หรือ 4-allyl-2-methoxyphenol เป็นน้ำมันหอมระเหยที่สำคัญในกลุ่มของสารประกอบฟีนิลโพรพานอยด์ เป็นสารมีขั้ว และมี allylic alkene group (ภาพที่ 2.3) (Atsumi et al., 2005) พบได้ในพืชสมุนไพร และเครื่องเทศหลายชนิด เช่น กานพลู จันทน์เทศ อบเชย ใบกระวาน โหระพา และกะเพรา เป็นต้น (Zheljazkov et al., 2007) สารยูจีนอลเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในกระบวนการผลิตวานิลลิน (vanillin) หรือ กรดวานิลลิก (vanillic acid) นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น การผลิตน้ำหอม อุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรส อาหารเสริม (Świzdor et al., 2012) และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (Lambert et al., 2014) นอกจากนี้สามารถใช้เป็นสารล่อแมลง และควบคุมแมลงศัตรูพืช เช่น แมลงวันผลไม้ (Reigart and Roberts, 1999) อีกทั้งเป็นสารที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (Atsumi et al., 2005) ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) (Pavithra, 2014) และยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) (Gupta et al., 2002) สารยูจีนอลยังเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาช่วยลดอาการปวด ต้านการอักเสบ รักษาอาการปวดฟัน (Ohkubo and Shibata, 1997) ช่วยลดระดับไตรกลีเซอไรด์ คอเลสเตอรอล รวมถึงลดกิจกรรมของเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH), glutamic pyruvic transminase (GPT), glutamic oxalacetate transminase (GOT) และ alkaline phosphatase (ALP) ในเลือด สามารถนำมาผลิตเป็นยาทางการแพทย์ได้ เช่น ยาฆ่าเชื้อโรค ยาชา (Jadhav et al., 2004) ยาลดไขมันในกระแสเลือด ยารักษาโรคเบาหวาน โรคตับ และโรคหัวใจ (Prakash and Gupta, 2005) ซึ่งในใบสดของกะเพราจะพบสารยูจีนอลเป็นส่วนใหญ่ (Rahimi et al., 2012) แต่สารชนิดนี้ไม่เสถียรทางเคมีเมื่อสัมผัสกับอากาศ แสง ความชื้น และอุณหภูมิสูง ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิค liposome-encapsulated SiO_2- eugenol เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวในระหว่างการแปรรูปและเก็บรักษา (Cui et al., 2017)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารยูจีนอลสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีทางเคมีไฟฟ้า (electrochemical methods) (Afzali et al., 2014) วิธี Briggs-Rauscher oscillation reaction (Hu et al., 2014) การใช้ gas chromatography (GC) (Yu et al., 2006) gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Pojjanapimol, 2004; Devendran and Balasubramanian, 2011) headspace solid phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry (SPME/GC-MS) (ยศกร และคณะ, 2558) และ high performance liquid chromatography (HPLC) (Saran et al., 2013) ในการศึกษาครั้งนี้วิเคราะห์หาปริมาณสารยูจีนอลด้วยวิธี HPLC ซึ่งเป็นกระบวนการแยกสารผสมที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย สามารถวิเคราะห์สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ได้ทั้งเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) และเชิงปริมาณ (quantitative analysis)

Ref. code: 25615909032558LMU

(แม้น, 2555) โดยอาศัยกลไกการแยกสารระหว่างตัวกลางที่เคลื่อนที่ได้ (mobile phase) และตัวกลางที่อยู่กับที่ (stationary phase หรือ column) โดยตัวกลางที่เคลื่อนที่ได้จะสร้างแรงพา (impelling force) ดันสารต่างๆ ในสารตัวอย่างผ่านไปบนตัวกลางที่ไม่เคลื่อนที่ ในขณะเดียวกันตัวกลางที่อยู่กับที่จะสร้างแรงหน่วง (retention force) ต่อสารที่ผ่านเข้ามา ซึ่งความแตกต่างกันของแรงหน่วงขึ้นอยู่กับ ขนาด รูปร่าง ประจุ ความจำเพาะ การดูดซับ และการละลายของสาร ดังนั้นโมเลกุลของสารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ในเวลาหน่วง (retention time) ที่แตกต่างกัน สารที่ถูกแยกออกมาได้นั้นจะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัด (detector) ชนิดต่างๆ แล้วจะแปรผลออกมาในรูปแบบกราฟเรียกว่า โครมาโตแกรม (chromatogram) (ชูชาติ, 2544)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารยูจีนอล
ที่มา: Anand et al. (2016)

มีรายงานการศึกษาปริมาณสารยูจีนอลในกะเพราแดง และพืชในสกุล *Ocimum* ด้วยวิธีการต่างๆ แล้ว เช่น Pojjanapimol (2004) ศึกษาปริมาณสารยูจีนอลในใบสดของกะเพราแดงด้วยวิธี GC-MS พบว่า ใบสดของกะเพราแดงมีปริมาณสารยูจีนอล เท่ากับ 6,330 µg/g ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณสารยูจีนอลโดยใช้วิธี SPME/GC-MS ที่รายงานโดย ยศกร และคณะ (2558) พบว่าใบกะเพราแดงที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารยูจีนอล เท่ากับ 2.05% ในขณะที่ยอดอ่อนที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารยูจีนอล เท่ากับ 13.91% นอกจากนี้ Bhuvaneshwari et al. (2016) ได้ศึกษาปริมาณสารยูจีนอลจากชิ้นส่วนต่างๆ ของโหระพา และกะเพราที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ เปรียบเทียบกับต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติด้วยเครื่อง HPLC พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo) ของโหระพา และใบของกะเพราที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารยูจีนอลสูงสุดเท่ากับ 85.40±2.42 และ 88.80±4.53 µg/g DM ตามลำดับ ในขณะที่ใบของโหระพา และกะเพราที่เจริญเติบโตในธรรมชาติมีปริมาณสารยูจีนอลเท่ากับ 33.20±3.08 และ 25.10±3.44 µg/g DM ตามลำดับ

Ref. code: 25615909032558LMU

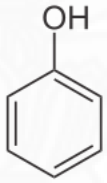
2.3.2 สารประกอบฟีนอลิค

สารประกอบฟีนอลิคเป็นกลุ่มของสารประกอบทางเคมีที่พบมากในส่วนต่างๆ ของพืช (พิชญ์อร, 2549) พบได้ในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร และเมล็ดธัญพืช มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) อย่างน้อย 1 หมู่ (ภาพที่ 2.4) (Hopkins and Hüner, 2009) มีฤทธิ์เป็นกรด อาจรวมตัวอยู่กับโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ หรือรวมตัวกับสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก กรดอินทรีย์ หมู่เอมีน และ ไขมัน (Sato et al., 1996) สารประกอบฟีนอลิคที่พบในพืชมีหลายชนิด ได้แก่ ฟีนอล (phenols) ฟลาโวน (flavones) กรดฟีนอลิค (phenolic acids) กรดเอลลาจิก (ellagic acid) แอนโทไซยานิน (anthocyanins) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) คูมาริน (coumarins) กรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acids) สารลิกนิน (lignin) กรดแกลลิก และฟลาโวนอยด์ (Rice-Evans et al.,1997; Cowan, 1999; Helmja et al., 2007) สารประกอบฟีนอลิคมีคุณสมบัติที่สำคัญ คือ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเกิดลิปิดเพอร์ออกซิเดชัน ช่วยลดการเกิดอนุมูลไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ อีกทั้งยังช่วยกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟ และทำหน้าที่เป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือให้ไฮโดรเจน (Meyer et al, 1997; Soobrattee et al., 2005) แก่อนุมูลอิสระทำให้อนุมูลอิสระไม่สามารถทำปฏิกิริยาต่อไปได้ (Williamson et al., 2000) นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิคยังมีผลในการยับยั้ง และทำลายเชื้อแบคทีเรียและไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค ป้องกันการอักเสบ ลดระดับคอเลสเตอรอล ลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจ เบาหวาน และมะเร็ง (โอภา และคณะ, 2549; วิโรจน์, 2551; Ozcan et al., 2014) อีกทั้งยังมีส่วนช่วยในการบำรุงระบบประสาท และสมอง (Zhuang et al., 2003)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometry) (John et al., 2014) การใช้ GC-MS (Al-Owaisi et al., 2014) และ HPLC (Rababah et al., 2011) สำหรับในการศึกษาครั้งนี้จะวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's colorimetric ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของ molybdotungatate ion โดยสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วย phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย phenolic hydroxyl groups ของสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดเกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงิน และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm (Tsai et al., 2005) การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในกะเพรา และพืชในสกุล *Ocimum* ได้มีรายงานแล้ว เช่น Bhuvaneshwari et al. (2016) ได้ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดจากส่วน

Ref. code: 25615909032558LMU

ต่างๆ ของโหระพา และกะเพราที่ได้จากสภาพปลอดเชื้อ และต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ พบว่า ใบโหระพา และใบกะเพราที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดสูงสุด (165.00±3.59 และ 185.00±3.25 mg GAE/g DM ตามลำดับ) ส่วนใบโหระพา และใบกะเพราจากต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารดังกล่าวเท่ากับ 119.00±2.09 และ 104.00±3.09 mg GAE/g DM ตามลำดับ Mahajan et al. (2014) พบว่า ใบและเมล็ดของกะเพราขาวที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดเท่ากับ 4.49±0.44 ถึง 9.31±0.20 และ 4.10±0.17 ถึง 9.05±0.25 µg GAE/mg extract ตามลำดับ ในขณะที่ Wangcharoen and Morasuk (2007) รายงานถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในใบกะเพราแดง และกะเพราขาว พบว่า กะเพราแดงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (2.65 mg GAE/g FW) สูงกว่ากะเพราขาว (1.78 GAE/g FW) และกิตติยา (2560) พบว่า แคลลัสของกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/l นาน 4 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 68.64±0.29 และ 67.66±1.70 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ



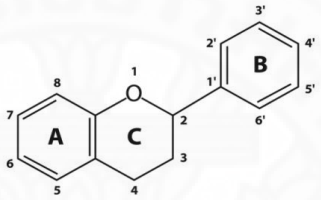
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิค
ที่มา: Hopkins and Hüner (2009)

2.3.3 สารฟลาโวนอยด์

สารฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารประกอบฟีนอลิคประเภทโพลีฟีนอล มีโครงสร้างเคมีเป็นฟีนิลเบนโซไพโรน (phenylbenzopyrones) ประกอบด้วยวงแหวนคาร์บอน 3 วง ได้แก่ วงแหวนเบนซีน 2 วง และวงแหวนไพแรน (heterocyclic pyran ring) 1 วง (ภาพที่ 2.5) มักพบอยู่รวมกับน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (Pietta, 2000) สารฟลาโวนอยด์พบได้ในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ ธัญพืช พืชตระกูลถั่ว เครื่องเทศ และสมุนไพร สามารถพบในทุกส่วนของพืชไม่ว่าจะเป็นใบ ราก เนื้อไม้ เปลือกต้น ดอก ผล หรือเมล็ด นอกจากนี้สามารถพบในเครื่องดื่มต่างๆ เช่น ชา และไวน์ เป็นต้น (Harborne and Williams, 2000) สารทุติยภูมิชนิดนี้สามารถแบ่งออกเป็น 7 กลุ่มย่อยตามโครงสร้างเคมี ได้แก่ แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) ฟลาโวนอล (flavonols) ฟลาวาโนน (flavanones) ฟลาวานอล (flavanols) ฟลาวาโนนอล (flavanonols) ไอโซฟลาโวน

Ref. code: 25615909032558LMU

(isoflavones) และฟลาโวน (วิภพ, 2556) หน้าที่ของสารฟลาโวนอยด์ คือ เป็นสารให้สีที่สำคัญในพืช ช่วยในการกรองรังสีอัลตราไวโอเลต ช่วยตรึงไนโตรเจน (Pietta, 2000) และป้องกันพืชจากแมลงหรือเชื้อโรคเข้าทำลาย (Ferreyra et al., 2012) อีกทั้งช่วยป้องกันการออกซิเดชันของไขมัน รักษาคุณสมบัติของวิตามิน และเอนไซม์ต่างๆ (Yao et al., 2004) จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Pietta, 2000) ต้านมะเร็ง ยับยั้งการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง ช่วยลดระดับของคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ต้านการอักเสบ ต้านโรคเบาหวาน ต้านจุลชีพ และมีฤทธิ์ปรับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Kothan et al., 2004; Dechsupa et al., 2007; Suttana et al., 2010)



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์

ที่มา: Pietta (2000)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวิเคราะห์ผ่านเครื่อง HPLC (Li et al., 2018) หรือการวัดการดูดกลืนแสง (Silva et al., 2015) สำหรับในการศึกษาครั้งนี้จะวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยวิธี aluminum chloride colorimetric ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย (Rohman et al., 2010; John et al., 2014) โดย $NaNO_2$ จะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลบนวงฟีนอลเกิดเป็นหมู่คีโต จากนั้น aluminum ion จะจับกับหมู่คีโตบนวงฟีนอลของฟลาโวนอยด์ที่ตำแหน่ง 3’ และ 4’ เกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อน เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเบสจะเกิดเป็นสารสีแดง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm (Hassan et al., 2013) ซึ่งจากรายงานของ Mahajan et al. (2014) พบว่า สารสกัดจากใบของกะเพราขาวที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 14.75±1.79 ถึง 255.61±1.40 µg QE/10mg extract ในขณะที่เมล็ดมีปริมาณสารดังกล่าวเพียง 0.009±0.001 ถึง 0.119±0.001 µg QE/10mg extract และ Kumar (2014) รายงานว่าใบกะเพราแดงที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (547.00 mg QE/g DW) สูงกว่าใบกะเพราขาวอย่างมีนัยสำคัญ (251.10 mg QE/g DW) นอกจากนี้ Lim et al. (2009) ศึกษาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในใบกะเพราที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

Ref. code: 25615909032558LMU

เปรียบเทียบกับแคลลัสที่พัฒนามาจากใบที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 3 สัปดาห์ พบว่า ใบกะเพราที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 0.733±0.077 mg CE/g FW ในขณะที่แคลลัสที่พัฒนาจากใบมีปริมาณสารดังกล่าวเท่ากับ 0.333±0.043 mg CE/g FW

2.3.4 อนุมูลอิสระ (free radical) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว (unpaired electron) อยู่นอกสุดของวงโคจร และมีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยาเคมีสูง (Halliwell and Gutteridge, 1989) โดยทั่วไปแล้วอนุมูลอิสระสามารถผลิตขึ้นในร่างกายจากกระบวนการหายใจในระดับเซลล์ที่ใช้ออกซิเจนในการเผาผลาญเพื่อสร้างพลังงานผ่านทางปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) อนุมูลอิสระที่สำคัญที่พบในเซลล์จากปฏิกิริยาดังกล่าว ได้แก่ oxygen radical ($O_2^{\bullet}$), superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$), peroxyl radical ($ROO^{\bullet}$) และ reactive oxygen species (ROS) เป็นต้น (Halliwell, 1999) นอกจากนี้ร่างกายสามารถรับสารอนุมูลอิสระได้จากภายนอก เช่น การทานอาหารย่างที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบสูง และมลพิษจากสิ่งแวดล้อม (ไมตรี , 2555) โดยอนุมูลอิสระจะเข้าไปแย่งจับอิเล็กตรอนจากสารอื่นเพื่อให้ตัวเองมีความเสถียรขึ้น ซึ่งสารที่สูญเสียอิเล็กตรอนไปนั้นจะมีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่เกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่เข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นต่อไปเรื่อยๆเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลาแสดงดังสมการ 1 และ 2 (บุหรัน, 2556; Halliwell, 1999) โดยสารที่สูญเสียอิเล็กตรอนไปนั้นจะเสียคุณสมบัติทำให้สารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน กรดนิวคลีอิค และเอนไซม์ เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ ส่งผลทำให้เซลล์ถูกทำลาย ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างยีน เกิดยีนที่ผิดปกติกลายเป็นเนื้องอก หรือเซลล์มะเร็ง (เอมอร, 2551; Lander, 1997; Lionis et al., 1998) และเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ โรคหัวใจวาย โรคไตวาย โรคเบาหวาน และโรคความแก่ชรา เป็นต้น (Beckman and Ames, 1998)

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet} \quad \text{(สมการ 1)}$$

$$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet} \quad \text{(สมการ 2)}$$

อย่างไรก็ตามในร่างกายจะมีระบบที่สามารถยับยั้ง และป้องกันความเสียหายจากปฏิกิริยาที่เกิดจากอนุมูลอิสระ โดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นกลุ่มของสารที่สามารถชะลอ หรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารหรือเซลล์ต่างๆ สามารถจำแนกสารต้านอนุมูลอิสระตามแหล่งที่มาได้ 2 กลุ่ม คือ สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase; SOD) คะตะเลส (catalase ; CAT) และกลูทาไทออน (glutathione) เป็นต้น (Halliwell and Gutteridge, 1989) และสารต้านอนุมูลอิสระที่

Ref. code: 25615909032558LMU

พบในอาหารประเภทผัก ผลไม้ หรือพืชสมุนไพร เช่น ยูบิควิโนน (ubiquinone) บีเอชที (BHT) บีเอชเอ (BHA) วิตามินอี (vitamin E) วิตามินซี แคโรทีนอยด์ กรดแกลลิก หรือฟลาโวนอยด์ เป็นต้น (อนันต์, 2551) โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น (radical scavenging) ยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (synergism) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ และทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระดังสมการ 3 และ 4 (เจนจิรา และประสงค์, 2554; Bonnefont-Rousselot, 2002)

$$R^{\bullet} + AH \longrightarrow RH + A^{\bullet} \qquad \text{(สมการ 3)}$$

$$RO^{\bullet} + AH \longrightarrow ROH + A^{\bullet} \qquad \text{(สมการ 4)}$$

โดย $R^{\bullet}$ และ $RO^{\bullet}$ คือ อนุมูลอิสระ และ AH คือ สารตานอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ ซึ่งการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay) การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric ion reducing antioxidant power; FRAP assay) และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging assay) โดยการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ที่เลือกใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นวิธีที่อาศัยการทำปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl radical; $DPPH^{\bullet}$) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียร และมีสีม่วง เมื่อ $DPPH^{\bullet}$ ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (AH) ทำให้ $DPPH^{\bullet}$ ได้รับอิเล็กตรอนหรืออนุมูลอิสระไฮโดรเจน และเปลี่ยนเป็น DPPH-H หากสารตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง จะทำให้ $DPPH^{\bullet}$ ที่มีสีม่วงค่อยๆ จางลงจนเป็นสีเหลือง ดังสมการ 5 (บุหรัน, 2556) โดยให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นในที่มืดนาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm (Yamasaki et al., 1994) ซึ่งข้อดีของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity คือ เป็นวิธีที่ง่าย ทราบผลรวดเร็ว สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารอนุมูลอิสระที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง อีกทั้งทำการวิเคราะห์ได้ทั้งในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาฤทธิ์ทางยาของพืชสมุนไพร (พยุงศักดิ์ และสุรศักดิ์, 2555)

Ref. code: 25615909032558LMU

$DPPH^{\bullet}+AH \longrightarrow DPPH\text{-}H+A^{\bullet}$ (สมการ 5)

จากรายงานของ Wangcharoen and Morasuk (2007) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบกะเพราแดง และกะเพราขาวโดยวิธี FRAP, ABTS และ DPPH พบว่ากะเพราแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 3.35 5.91 และ 0.72 mg Vitamin C equivalent/g FW ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ากะเพราขาวที่มีค่า 1.99 4.23 และ 0.62 mg Vitamin C equivalent/g FW ตามลำดับ ส่วน Bunrathep et al. (2007) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยวงศ์ Labiatae 4 ชนิด เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT (EC_{50} เท่ากับ 19.67 µg/ml) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากยี่หร่า (*O. gratissimum*) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (EC_{50} เท่ากับ 30.20 µg/ml) รองลงมาคือกะเพราแดง (EC_{50} เท่ากับ 343.56 µg/ml) กะเพราขาว (EC_{50} เท่ากับ 767.82 µg/ml) แมงลัก (*O. americanum*) (EC_{50} เท่ากับ 8,485.29 µg/ml) และโหระพา (EC_{50} เท่ากับ 47,057.45 µg/ml) ตามลำดับ นอกจากนี้ กิตติยา (2560) พบว่า แคลลัสที่พัฒนาจากใบของกะเพราแดงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 mg/l (2.26 µM) นาน 4 สัปดาห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 26.60±2.90 µg/ml

2.4 การเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ (secondary metabolite enhancement)

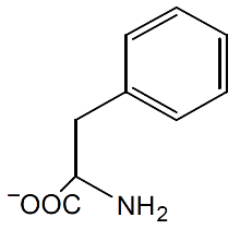
เนื่องจากการสร้างและการสะสมสารทุติยภูมิของพืชในสภาพธรรมชาติต้องใช้เวลานาน โดยส่วนใหญ่มักสร้างในปริมาณน้อย และกระจายตัวในพืชแต่ละชนิดต่างกันไป จึงทำให้ไม่เพียงพอต่อความต้องการทางการแพทย์ ในปัจจุบันได้มีการนำวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพหรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามาใช้เพื่อผลิตสารทุติยภูมิเหล่านั้นให้มีปริมาณมากกว่าที่ได้จากพืชในธรรมชาติ (ศุภวรรณ, 2549) โดยสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้อย่างต่อเนื่อง มีคุณภาพสม่ำเสมอ และใช้ระยะเวลาในการผลิตสั้นกว่าการปลูกพืชในสภาพธรรมชาติ อีกทั้งปริมาณสารจะไม่แปรผันตามสภาพภูมิประเทศ และสภาพภูมิอากาศ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถช่วยเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิที่สำคัญของพืชได้ โดยการเพิ่มการผลิตสารทุติยภูมิด้วยวิธีนี้สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเพาะเลี้ยงแคลลัส การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย การเพาะเลี้ยงยอด การเพาะเลี้ยงราก การควบคุมอาหาร และสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการสร้างสารทุติยภูมิ (วราภรณ์, 2551) นอกจากนี้มีการใช้เทคนิคอื่นๆ ร่วมกับการเพาะเลี้ยง เช่น การตรึงเซลล์ (immobilization) การซึมผ่าน (permeabilization) การดัดแปลงพันธุกรรม (genetic modification) การควบคุมการสร้างสารทุติยภูมิในวิถีชีวสังเคราะห์ของพืช (biosynthesis pathway) การเติมสารตั้งต้น (precursor feeding) และการเติมสารกระตุ้น (elicitation) (Rao and Ravishankar, 2002; Zhao et al.,

Ref. code: 25615909032558LMU

2005) ซึ่งการเติมสารตั้งต้น และสารกระตุ้นเป็นวิธีที่นิยมใช้ และนำไปศึกษากับพืชสมุนไพรหลายชนิด โดยวิธีการดังกล่าวมีรายละเอียดดังนี้

2.4.1 การเติมสารตั้งต้น

เป็นการเติมสารตั้งต้นของกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิที่ต้องการผลิตลงในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ (bioconversion) ภายในเซลล์พืช ซึ่งมีเอนไซม์หลายชนิดที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิ และทำให้เกิดการสร้างสารทุติยภูมิที่ต้องการเพิ่มมากขึ้น (วราภรณ์, 2551; Bunrathep et al., 2016) ซึ่งสารตั้งต้นที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงจะต้องไม่เป็นพิษกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยง ไม่ถูกย่อยสลายในอาหารเพาะเลี้ยง และเมื่อเนื้อเยื่อพืชดูดซึมสารเหล่านี้เข้าไปแล้วจะสะสมอยู่ที่เซลล์ส่วนต่างๆ โดยไม่เกิดการสลายตัว (ศุภวรรณ, 2549) อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิด้วยวิธีนี้จะมีประโยชน์สูงสุดหากใช้สารตั้งต้นที่ราคาไม่แพง เพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีราคาสูงจากพืช (วราภรณ์, 2551) การเติมสารตั้งต้นแบ่งได้ 2 ลักษณะ คือ การเติมสารตั้งต้นของกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิที่ต้องการผลิตลงในอาหารเพาะเลี้ยงโดยตรง และการเติมสารบางชนิดที่อยู่ในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิที่ต้องการผลิตลงในอาหารเพาะเลี้ยงแทนการเติมสารตั้งต้นโดยตรง (Shinde et al., 2009; Khirwadkar et al., 2014) ในการศึกษาครั้งนี้เติม phenylalanine (Phe) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิที่ต้องการผลิตลงในอาหารเพาะเลี้ยงโดยตรง Phe หรือ 2-amino-3-phenylpropanoic acid เป็นกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก (ภาพที่ 2.6) ที่ได้จากวิถีของกรดชิคิมิก (shikimic acid pathway) มีโครงสร้างทางเคมีเป็นไอโซเมอร์ (isomer) 2 ไอโซเมอร์ ได้แก่ L-Phenylalanine และ D-Phenylalanine เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่แตกต่างกันระหว่างการสังเคราะห์ (Lehmann et al., 1983; Masek et al., 2014)

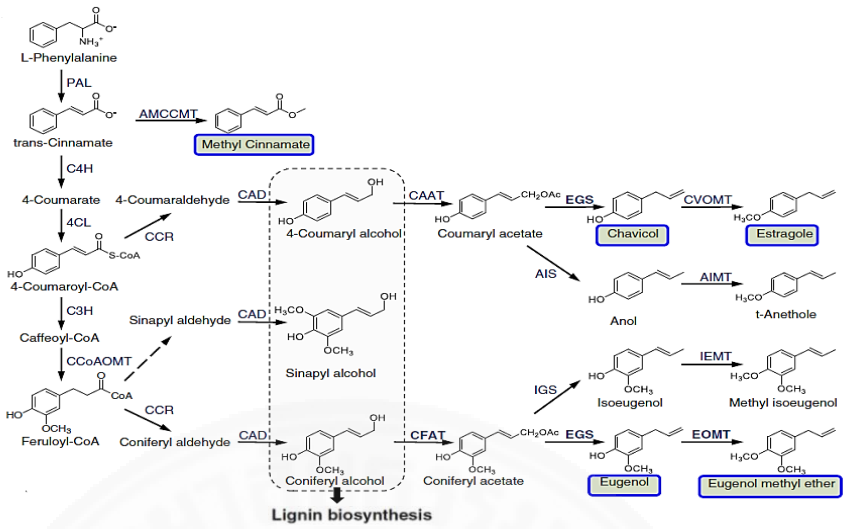


ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของ phenylalanine
ที่มา: Meena et al. (2014)

Ref. code: 25615909032558LMU

Phe เป็นสารตั้งต้นในวิถีฟีนิลโพรพานอยด์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์ ไอโซฟลาโวน ฟลาโวน แอนโทไซยานิน (Meena et al., 2014) รวมถึงสารประกอบฟีนิลโพรพานอยด์ (Gang et al., 2001) ที่เป็นน้ำมันหอมระเหย เช่น สารยูจีนอล (Anand et al., 2016) (ภาพที่ 2.7) ซึ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารทุติยภูมิเหล่านี้อาศัยเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Taiz et al. 2014) การเติม Phe ลงในอาหารเพาะเลี้ยงจะทำให้เซลล์พืชเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ และส่งผลให้เกิดการสร้างสารทุติยภูมิกลุ่มดังกล่าวเพิ่มขึ้น มีรายงานการใช้ Phe เป็นสารตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อเพิ่มปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด รวมถึงสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในพืชหลายชนิด เช่น Sharma et al. (2016) ศึกษาการเพิ่มปริมาณสารยูจีนอลจากการเพาะเลี้ยงข้อกะเพราบนอาหารที่เติม Phe ความเข้มข้น 5 mg/l นาน 2 สัปดาห์ พบว่า ยอดที่พัฒนามีปริมาณสารยูจีนอล (10.08 mg/l) สูงกว่ายอดที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (8.5 mg/l) เช่นเดียวกับการเติม Phe ความเข้มข้น 100 mg/l ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงแคลลัสของ *V. thapsus* L. นาน 4 สัปดาห์ ส่งเสริมให้แคลลัสสังเคราะห์ยูจีนอลเพิ่มขึ้น 40% เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (Al-Jibouri et al., 2016) นอกจากนี้ Arafa et al. (2015) พบว่า การเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เกิดจากราก ลำต้น และก้านใบของแครอทบนอาหารที่เติม Phe ความเข้มข้น 1000 mg/l ในสภาพมืดนาน 4 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (2.23 2.36 และ 3.68 mg GAE/g DW ตามลำดับ*)* สูงกว่าค่าดังกล่าวของสิ่งทดลองควบคุม (0.51 0.72 และ 0.54 mg GAE/g DW ตามลำดับ) ส่วน Masoumian et al. (2011) พบว่า การเติม Phe ความเข้มข้น 3 mg/l ลงในอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของ *H. bonariensis* นาน 20 วัน ส่งผลให้แคลลัสสังเคราะห์สารฟลาโวนอยด์สูงสุดเท่ากับ 11.43±0.12 mg/g DW หรือเพิ่มขึ้น 23% เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม และยอดหัวข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.) ที่พัฒนาบนอาหารที่เติม Phe ความเข้มข้น 100 mg/l นาน 4 สัปดาห์ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 59.51±6.13 mg CE/g dry extract หรือประมาณ 1.34 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (เจิมอรุณ, 2560) การเติม Phe ลงในอาหารเพาะเลี้ยงยังสามารถส่งเสริมให้พืชสร้างสารทุติยภูมิชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย เช่น สโคโปเลติน (scopoletin) ในเซลล์แขวนลอยของ *Spilanthes acmella* Murr. (Abyari et al., 2016) รูติน (rutin) แคเทชิน (catechin) กรดคูมาริค (coumaric acid) กรดคลอโรจีนิก และเควอซิทินในแคลลัสของ *Ephedra alata* Decne. (El-Moneim Hegazi and El-Lamey, 2011)

Ref. code: 25615909032558LMU



ภาพที่ 2.7 กระบวนการสังเคราะห์ยูจีนอล

ที่มา: Anand et al. (2016)

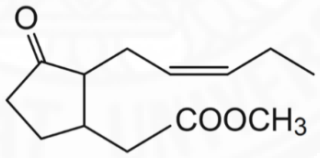
2.4.2 การเติมสารกระตุ้น

ในสภาพธรรมชาติเมื่อพืชได้รับปัจจัยจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม หรือถูกเชื้อโรค และแมลงเข้าทำลาย พืชจะเกิดกลไกการตอบสนอง และสังเคราะห์สารทุติยภูมิขึ้น เพื่อป้องกันตัวเองจากจุลชีพ แมลง และสัตว์ต่างๆ ที่มารบกวน ทำให้พืชสามารถปรับตัวเพื่อดำรงชีวิตและเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมธรรมชาติได้ ซึ่งปัจจัยที่ไม่เหมาะสมเหล่านี้เรียกว่า สิ่งกระตุ้น หรือสารกระตุ้น (elicitors) โดยสารกระตุ้นที่นำใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิแบ่งตามแหล่งที่มาของสารกระตุ้นได้ 2 กลุ่ม คือ 1) สารกระตุ้นชีวภาพ (biotic elicitors) คือ สารกระตุ้นที่ได้จากสิ่งมีชีวิต ได้แก่ methyl jasmonate (MeJA) jasmonic acid (JA) salicylicacid (SA) chitosan และสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) เป็นต้น และ 2) สารกระตุ้นอชีวภาพ (abiotic elicitors) คือ สารกระตุ้นที่ได้จากสิ่งไม่มีชีวิต ได้แก่ สารเคมี หรือสภาพแวดล้อมภายนอก เช่น อุณหภูมิ เกลือของโลหะหนัก แสง UV เป็นต้น (วราภรณ์, 2551; Zhao et al., 2005) เมื่อพืชได้รับสารกระตุ้น พืชจะมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายภาพ และชีวเคมี เพื่อป้องกันการถูกรุกรานจากสิ่งต่างๆ ซึ่งการตอบสนองนี้จะเกี่ยวข้องกับการสะสมสารทุติยภูมิที่ใช้ในกลไกการต่อต้านที่ผนังเซลล์ (Cunha et al., 2006; Hückenlhoven, 2007) มีรายงานการใช้สารกระตุ้นทั้งที่ได้จากสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิตร่วมกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ และอวัยวะของพืชแล้ว พบว่า สารดังกล่าวสามารถกระตุ้น และลดระยะเวลาของกระบวนการสังเคราะห์สารทุติยภูมิในพืชได้ (Rao and Ravishankar, 2002; Evans et al., 2003) สำหรับข้อดีของการเติมสารกระตุ้น คือ เป็นวิธีที่ง่าย และไม่ยุ่งยากซับซ้อน

Ref. code: 25615909032558LMU

(นาตยา และ สุกัญญา, 2557) อีกทั้งมีสารกระตุ้นหลายประเภท จึงสามารถนำมาเลือกใช้ให้เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณทุติยภูมิในพืชได้

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สารกระตุ้นชีวภาพ คือ MeJA ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ประเภทน้ำมันหอมระเหย (volatile oil) ที่สกัดแยกได้จากต้น *Jasminum grandiflorum* มีโครงสร้างดังภาพที่ 2.8 การสังเคราะห์ MeJA เกิดจาก jasmonic acid (JA) ถูกออกซิไดซ์ในกระบวนการ octadecanoic pathway โดยอาศัยเอนไซม์ JA carboxyl methyltransferase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Seo et al., 2001) MeJA เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโต และพัฒนาการของพืช เช่น การเจริญของเมล็ด การเจริญของราก การปฏิสนธิ การสุกของผล และการชราภาพของพืช (Wasternack and Hause, 2002; Cheong and Choi, 2003) อีกทั้งยังทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณที่สำคัญในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในพืช เพื่อป้องกันตัวเองจากการเข้าทำลายของจุลชีพ แมลง หรือโรคต่างๆ (Patel and Krishnamurthy, 2013) โดยกระตุ้นให้พืชสร้างสารเคมีสำหรับการป้องกันตัวเอง เช่น proteinase inhibitors รวมถึงกระตุ้นกลไกการป้องกันตัวของพืชจากความเครียดที่ได้รับจากสภาพแวดล้อมภายนอก เช่น ความแห้งแล้ง อุณหภูมิที่ต่ำ และระดับความเข้มข้นของเกลือที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น (Wasternack and Parthier 1997; Kang et al., 2005; Iqbal et al., 2014) นอกจากนี้ MeJA ยังกระตุ้นการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีของกรดชิคิมิก (Wang et al., 2015) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของพืชหลายกลุ่ม ได้แก่ ฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ อัลคาลอยด์ และฟีนิลโพรพานอยด์ (Zhao et al., 2005)



ภาพที่ 2.8 โครงสร้าง methyl jasmonate
ที่มา: Cheong and Choi (2003)

มีรายงานการใช้ MeJA เพิ่มปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด รวมถึงสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในพืชหลายชนิด เช่น Matter et al. (2017) พบว่า การเติม MeJA ความเข้มข้น 20 µM ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงแคลลัสของ *D. caryophyllus* L. นาน 3 สัปดาห์ ส่งผลให้แคลลัสมีปริมาณสารยูจีนอลสูงสุดเท่ากับ 14.65 µg/100 g calli ในขณะที่แคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติม MeJA ไม่มีการสร้างสารยูจีนอล หรือ Kim et al. (2006) พบว่า การสเปรย์ MeJA

Ref. code: 25615909032558LMU

ความเข้มข้น 0.5 mM ลงบนใบของโหระพาก่อนเก็บเกี่ยว ส่งผลให้ใบมีปริมาณสารยูจีนอลเพิ่มขึ้น 56% เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม และ Talebi et al. (2018) ที่สเปรย์ MeJA ความเข้มข้น 0.5 mM ลงบนใบของโหระพา 2 สายพันธุ์ คือ *O. basilicum* cv. Genove และ cv. Rubi ในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและระยะออกดอก พบว่า ใบโหระพาทั้ง 2 สายพันธุ์ มีปริมาณสารยูจีนอล (1.7 และ 5.62 %V/W ตามลำดับ) สูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม (1.47 และ 4.43 %V/W ตามลำดับ) นอกจากนี้ Danaee et al. (2015) ศึกษาการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยเติม MeJA ความเข้มข้น 10 µM ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Phyllanthus pulcher* นาน 30 วัน พบว่า สามารถกระตุ้นให้แคลลัสสร้างสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (2.702±0.005 mg GAE/g DW) และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (4.370±0.009 mg RE/g DW) สูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม (1.360±0.001mg GAE/g DW และ 2.234±0.006 mg RE/g DW ตามลำดับ) อีกทั้งยังส่งเสริมให้แคลลัสมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (90.086%) ดีกว่าสิ่งทดลองควบคุม (83.981%) เช่นเดียวกับการเติม MeJA ความเข้มข้น 100 µmol/l ลงในอาหารในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *H. perforatum* พบว่า เซลล์แขวนลอยสามารถสร้างสารฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น 2.7 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (Wang et al., 2015) และยอดของ *Eryngium planum* L. มีปริมาณกรดฟีนอลิคเพิ่มขึ้น 4.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม หลังเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM นาน 48 ชั่วโมง (Kikowska et al., 2014) ซึ่งการเติม MeJA ลงในอาหารเพาะเลี้ยงนี้ยังสามารถกระตุ้นให้พืชสร้างสารทุติยภูมิชนิดอื่นๆ เพิ่มขึ้นได้อีกด้วย เช่น เอเซียติโคไซด์ (asiaticoside) ในใบ *Centella asiatica* L. (Kim et al., 2004) ไฮออสไซยามีน (hyoscyamine) ในราก *Scopolia parviflora* (Kang et al., 2004) คาร์นาโซล (carnosol) กรดคาร์โนซิค และกรดโรสมารินิคในยอดของ *Salvia officinalis* L. (Grzagorczyk and Wysokińska, 2009) บาโคไซด์ เอ (bacoside A) ในยอดของพรมมิ (*Bacopa monnieri* L.) (Sharma et al., 2013) รวมถึงแอนโทไซยานินในเซลล์แขวนลอยขององุ่น (*Vitis vinifera*) (Tassoni et al., 2012) เป็นต้น

นอกจากการใช้สารตั้งต้น หรือสารกระตุ้นอย่างใดอย่างหนึ่งในการเพิ่มสารทุติยภูมิแล้ว ยังมีการศึกษาการเติมสารตั้งต้นร่วมกับสารกระตุ้นความเข้มข้นต่างๆ ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์สารทุติยภูมิให้ดียิ่งขึ้น ดังรายงานของ Skrzypczak-Pietraszek et al. (2014) ที่พบว่า การเพาะเลี้ยงยอด *Exacum affine* Balf. f. ex Regel ในอาหารเหลวที่เติม L-Phe ความเข้มข้น 10 µM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM นาน 1-7 วัน ส่งผลให้ยอดที่พัฒนามีปริมาณกรดฟีนอลิคอิสระเพิ่มขึ้น 2.6 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม เช่นเดียวกับการเติม L-Phe ความเข้มข้น 5 mg/l ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 50

Ref. code: 25615909032558LMU

mg/l ลงในอาหารในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงสามารถกระตุ้นให้เซลล์แขวนลอยขององุ่นสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินได้สูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 5.6 เท่า หลังเพาะเลี้ยงนาน 7 วัน (Qu et al., 2011) อย่างไรก็ตามการเติมสารตั้งต้นและสารกระตุ้นอย่างใดอย่างหนึ่งหรือใช้ร่วมกันในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยภายในพืช และสภาพการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. ความจำเพาะเจาะจงของสารตั้งต้นและสารกระตุ้น การเติมสารตั้งต้นเพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิจะต้องเติมสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องต่อกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิต้องการลงในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์สารทุติยภูมิเพิ่มมากขึ้น สำหรับการเติมสารกระตุ้นนั้น พบว่า สารกระตุ้นชนิดหนึ่งสามารถกระตุ้นให้พืชหลายชนิดเกิดการผลิตสารทุติยภูมิได้ ในขณะเดียวกันพืชชนิดหนึ่งสามารถตอบสนองต่อสารกระตุ้นได้หลายชนิดเช่นกัน ทั้งนี้เนื่องจากชนิดของสารทุติยภูมิขึ้นอยู่กับชนิดพืช แต่กลไกการเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมสารทุติยภูมินั้นอาจมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารกระตุ้น (วราภรณ์, 2551; Rao and Ravishankar, 2002)

2. ความเข้มข้น และระยะเวลาของการให้สารตั้งต้นและสารกระตุ้น ความเข้มข้นของสารตั้งต้นและสารกระตุ้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญอย่างมากต่อการตอบสนองของพืช โดยการตอบสนองจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (วราภรณ์, 2551) อย่างไรก็ตามหากเติมสารตั้งต้นและสารกระตุ้นความเข้มข้นสูงเกินไป อาจก่อให้เกิดการยับยั้งกระบวนการต่างๆ ใน metabolic pathway ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องทดสอบหาความเข้มข้นของสารตั้งต้น และสารกระตุ้นที่เหมาะสมเพื่อเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง (Ouyang et al., 2005) รวมถึงศึกษาระยะเวลาการให้สารตั้งต้น และสารกระตุ้นที่เหมาะสม เพื่อให้เซลล์พืชมีการผลิตสารทุติยภูมิได้มากที่สุด (Rao and Ravishankar, 2002)

3. ระยะการเจริญเติบโตของพืช สภาพการเพาะเลี้ยง และอาหารเพาะเลี้ยง โดย Funk and Brodelius (1990) รายงานว่าระยะการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมในการเติมสารตั้งต้น คือ ช่วงที่พืชมีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะ early stationary phase ส่วนระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมสารกระตุ้น คือ ช่วงที่พืชมีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะ exponential phase (Vasconsuelo and Boland, 2007) ซึ่งเป็นระยะที่เอนไซม์ของพืชอยู่ในสภาวะที่พร้อมมากที่สุด ทำให้พืชมีอัตราการเจริญเติบโต และมีการสร้างสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้นมาก สำหรับสภาพการเพาะเลี้ยงและอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการทำงานของสารตั้งต้นและสารกระตุ้นนั้นมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช (วราภรณ์, 2551)

Ref. code: 25615909032558LMU

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

3.1 พืชทดลอง

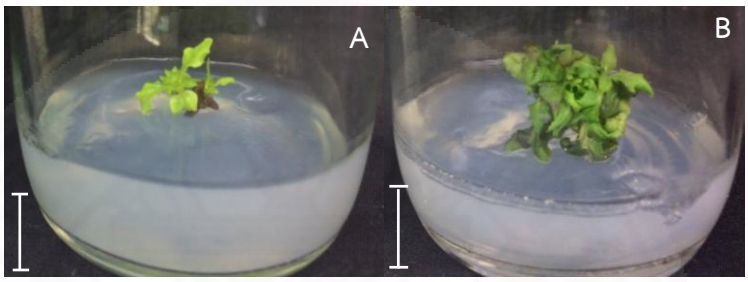
ในการทดลองครั้งนี้ใช้ต้นกะเพราแดงที่ปลูกในตำบลศรีสุราษฎร์ อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี โดยแยกต้นที่จะใช้ในการทดลองออกจากต้นแม่แล้วนำมาปลูกลงกระถางพลาสติก ขนาด 17 นิ้ว โดยมีวัสดุปลูกคือ ดิน ใบก้ามปู ถ่านแกลบ ปุ๋ยคอก และทรายหยาบ ผสมกันอย่างละ 1 ส่วน วางกระถางปลูกในโรงเรือนทดลองที่ไม่พรางแสงของสาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานีในเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 รดน้ำต้นกะเพราแดงช่วงเย็นทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 16-16-16 อัตรา 5 g/pot หลังปลูกทุกเดือน เดือนละ 1 ครั้ง และตัดแต่งทรงพุ่มในระหว่างการเพาะปลูกเพื่อลดการระบาดของโรคและแมลงหลังปลูกทุกๆ เดือน

เมื่อต้นกะเพราแดงที่นำมาปลูกมีการเจริญเติบโตเต็มที่ (ภาพที่ 3.1) ตัดชิ้นส่วนข้ออ่อนของกะเพราแดงขนาด 1 cm ล้างทำความสะอาดโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 1 คืน แล้วล้างด้วยน้ำยาล้างจานและน้ำประปา 2-3 ครั้ง จากนั้นแช่ชิ้นส่วนข้อในสารละลาย tetracycline ความเข้มข้น 0.125 g/ น้ำ 100 ml เขย่านาน 30 นาที ฟอกกำจัดเชื้อชิ้นส่วนข้อด้วยสารละลาย clorox® (sodium hypochlorite 8.25%) ความเข้มข้น 10% (v/v) และ 5% (v/v) นาน 15 และ 10 นาที ตามลำดับ จากนั้นล้างชิ้นส่วนข้อด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งกำจัดเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ตัดเนื้อเยื่อส่วนที่ถูกทำลายออก

ภาพที่ 3.1 กะเพราแดงที่นำมาใช้เป็นต้นแม่ในการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Ref. code: 25615909032558LMU

และเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 µM เมื่อตาข้างพัฒนาไปเป็นยอด (ภาพที่ 3.2 A) ทำการย้ายเลี้ยง (subculture) ยอดและข้อทุกๆ 4 สัปดาห์ลงบนอาหารสูตรเดิม (ภาพที่ 3.2 B) จนกระทั่งมีชิ้นส่วนยอดเพาะเลี้ยงจำนวนมากเพียงพอสำหรับศึกษาผลของ BA ร่วมกับ IAA และ NAA ต่อการเพิ่มจำนวนยอด (3.5.1) หลังจากทำการทดลองดังกล่าวเสร็จแล้วย้ายเลี้ยงข้อและยอดกะเพราแดงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM เพื่อเพิ่มจำนวนยอดสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 3.2 ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 µM: A) ตาข้างที่พัฒนาไปเป็นยอดหลังเพาะเลี้ยงข้อนาน 2 สัปดาห์ B) ยอดที่พัฒนาหลังจากย้ายเลี้ยงทุกๆ 4 สัปดาห์ (scale bar = 1 cm)

3.2 อาหารเพาะเลี้ยง

อาหารที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ อาหารสูตร MS (Murashige & Skoog) ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3% (w/v) ผงวุ้น (agar) ความเข้มข้น 0.8% (w/v) และสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่างๆ ตามที่กำหนดในการทดลอง ปรับค่า pH ของอาหารให้อยู่ในช่วง 5.6-5.8 ด้วย 1 N NaOH ก่อนนำอาหารเพาะเลี้ยงไปนึ่งกำจัดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และรอให้อาหารเพาะเลี้ยงเย็นก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมกับ Phe หรือ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ ให้เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงโดยเติม BA ลงในสารละลายอาหารตามวิธีการข้างต้น ปรับ pH ของอาหาร เติมผงวุ้น แล้วนึ่งกำจัดเชื้อ หลังจากนั้นนำขวดอาหารมาวางลงใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 °C รอจนอาหารเพาะเลี้ยงมีอุณหภูมิลดลง นำขวดอาหารมาไว้ในตู้ laminar flow เติม Phe หรือ MeJA ที่ผ่านการกรองด้วย filter membrane ขนาด 0.22 µm ความ

Ref. code: 25615909032558LMU

เข้มข้นต่างๆ ลงในอาหารเพาะเลี้ยง เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเทอาหารลงในขวดเพาะเลี้ยงที่ผ่านการนึ่งกำจัดเชื้อแล้ว และรอให้อาหารเพาะเลี้ยงเย็นก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

3.3 สภาพเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชทดลองในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2°C ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 3,000 lux ด้วยหลอด fluorescence ชนิด cool white และเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาตามที่กำหนดในการทดลอง

3.4 การเตรียมสารตั้งต้น และสารกระตุ้น

เตรียมสารตั้งต้น Phe ความเข้มข้น 0.006053 M ปริมาตร 100 ml โดยชั่ง Phe 0.1 g ละลายด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งกำจัดเชื้อแล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 ml และเตรียมสารกระตุ้น MeJA ความเข้มข้น 0.0044583 M ปริมาตร 100 ml โดยปิเปต MeJA ปริมาตร 97 µl ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อย และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งกำจัดเชื้อแล้วให้ครบ 100 ml

3.5 ผลของ BA ร่วมกับ IAA และ NAA ต่อการเพิ่มจำนวนยอด

3.5.1 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอด

นำยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 µM นาน 4 สัปดาห์ มาตัดให้มีความยาว 0.5 cm จากนั้นเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 2.22 4.44 6.66 และ 8.87 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 2.85 µM และ NAA ความเข้มข้น 2.69 µM เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยมีอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นสิ่งทดลองควบคุม (ตารางที่ 3.1) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มี 13 สูตรอาหาร แต่ละสูตรมี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 5 ขวด และแต่ละขวดมี 1 ยอด บันทึกการเกิดยอด (%) จำนวนยอด ความยาวยอด (cm) และการเกิดแคลลัส (%)

3.5.2 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ

นำยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM นาน 4 สัปดาห์ มาตัดชิ้นส่วนข้อให้มีความยาว 0.5 cm จากนั้นเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมหรือไม่ร่วมกับ IAA หรือ NAA

Ref. code: 25615909032558LMU

เช่นเดียวกับการทดลองใน 3.5.1 (ตารางที่ 3.1) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และบันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองใน 3.5.1

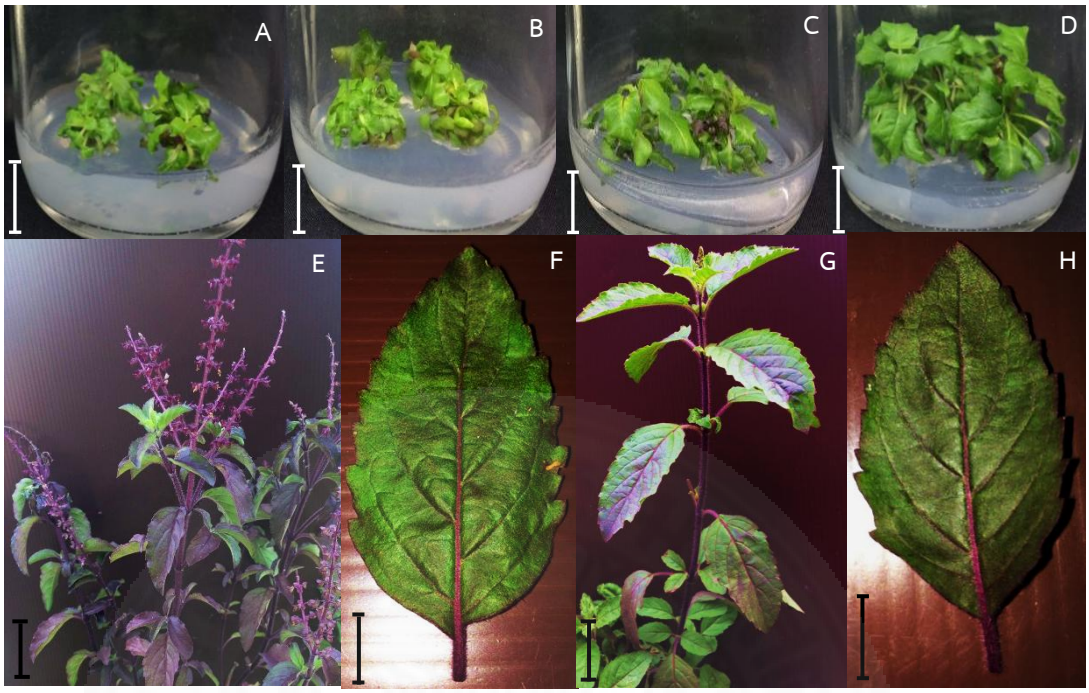
3.6 ปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ

ตัดชิ้นส่วนข้อกะเพราแดงขนาด 0.5 cm จากยอดอายุ 4 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM นาน 3 4 5 และ 6 สัปดาห์ (ภาพที่ 3.3 A 3.3 B 3.3 C และ 3.3 D ตามลำดับ) นำยอดที่พัฒนาจากชิ้นส่วนข้อตามระยะเวลาดังกล่าวมาวิเคราะห์ปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity เปรียบเทียบกับใบกะเพราแดงจากต้นแม่ที่นำชิ้นส่วนข้อมาขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 3.3 E และ 3.3 F) และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาตินาน 2 เดือน (ภาพที่ 3.3 G และ 3.3 H)

ตารางที่ 3.1 อาหารสูตร MS ที่เติม BA IAA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อเพิ่มจำนวนยอดกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ

สูตร	BA (µM)	IAA (µM)	NAA (µM)
1	-	-	-
2	2.22	-	-
3	2.22	2.85	-
4	2.22	-	2.69
5	4.44	-	-
6	4.44	2.85	-
7	4.44	-	2.69
8	6.66	-	-
9	6.66	2.85	-
10	6.66	-	2.69
11	8.87	-	-
12	8.87	2.85	-
13	8.87	-	2.69

Ref. code: 25615909032558LMU



ภาพที่ 3.3 ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM เป็นเวลานาน: A) 3 สัปดาห์ B) 4 สัปดาห์ C) 5 สัปดาห์ D) 6 สัปดาห์ E และ F) ต้นแม่และใบกะเพราแดงที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ G และ H) ต้นและใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาตินาน 2 เดือน (scale bar = 1 cm)

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 6 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ โดยวิธีการสกัดตัวอย่างพืชวิเคราะห์สารทุติยภูมิ และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีดังนี้

3.6.1 การสกัดตัวอย่างพืชสำหรับวิเคราะห์สารยูจีนอล

นำยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ ใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติมาชั่งน้ำหนักสด จากนั้นนำตัวอย่างแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 1 คืน แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze drier (รุ่น FDB-5503, Gperon) นาน 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้ง และคำนวณ % น้ำหนักแห้งจากสมการ

$$\% \text{ น้ำหนักแห้ง} = (\text{น้ำหนักแห้ง} / \text{น้ำหนักสด}) \times 100$$

Ref. code: 25615909032558LMU

นำตัวอย่างแห้งที่บดละเอียด 6 g มาสกัดแบบซอกเลต (soxhlet extraction) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Sharma et al. (2016) ด้วย methanol HPLC grade ความเข้มข้น 99.9% ปริมาตร 100 ml สกัดนาน 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 65°C แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ขนาด 11 µm จากนั้นกลั่นระเหยสารสกัดให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และคำนวณ % yield จากสมการ

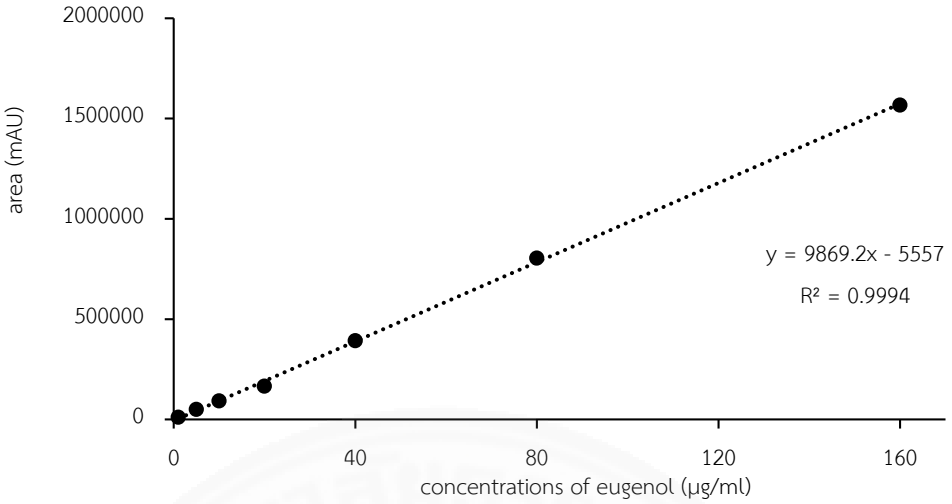
% yield = (น้ำหนักสารสกัด / น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้หมัก) × 100

นำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารยูจีนอลด้วยวิธี HPLC

3.6.2 ปริมาณสารยูจีนอล

วิเคราะห์หาปริมาณสารยูจีนอลโดยดัดแปลงตามวิธีของ Inam et al. (2014) ละลายสารสกัดตัวอย่าง 10 mg ด้วยตัวทำละลาย methanol HPLC grade ความเข้มข้น 99.9% ปริมาตร 1 ml และนำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที ส่วนสารละลายมาตรฐานยูจีนอล เตรียมโดยปิเปตสารยูจีนอลปริมาตร 93.7 µl ปรับปริมาตรด้วย methanol HPLC grade ความเข้มข้น 99.9% ให้ครบ 10 ml จากนั้นปิเปตสารละลายยูจีนอลให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 160 80 40 20 10 5 และ 1 µg/ml นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายยูจีนอลมาตรฐานทุกความเข้มข้นกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.22 µm ใส่ลงในขวด vial จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารยูจีนอลด้วยเครื่อง Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น Nexera LC-30 A ใช้ column ชนิด Zorbax Eclipse XDB-C_{18} ความยาว 150 mm x 4.6 mm I.D., 5 µm พร้อมกับ guard column ระบบที่ใช้คือ Isocratic elution mode โดยมี mobile phase คือ acetonitrile : water : methanol อัตราส่วน 50 : 40 : 10 อัตราการเคลื่อนที่ของสารเท่ากับ 0.7 ml/min ปริมาตรสารที่ฉีดเข้าระบบเท่ากับ 10 µl แต่ละตัวอย่างฉีดซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งฉีดนาน 10 นาที และ column oven temp เท่ากับ 30 °C วัดปริมาณสารยูจีนอลที่ความยาวคลื่น 280 nm คำนวณหาปริมาณสารยูจีนอลในสารละลายตัวอย่างด้วยโปรแกรม lab solution โดยนำค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area) ของสารละลายยูจีนอลมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ มากำหนดจุดในกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน x) และค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายยูจีนอลมาตรฐาน (แกน y) เปรียบเทียบค่าที่วัดได้ของสารตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานสารยูจีนอล (นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารตัวอย่างแทนที่ค่า y ในสมการจากภาพที่ 3.4) โดยมีหน่วยเป็น µg/g dry extract

Ref. code: 25615909032558LMU



ภาพที่ 3.4 กราฟมาตรฐานของ eugenol

3.6.3 การสกัดตัวอย่างพืชสำหรับวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

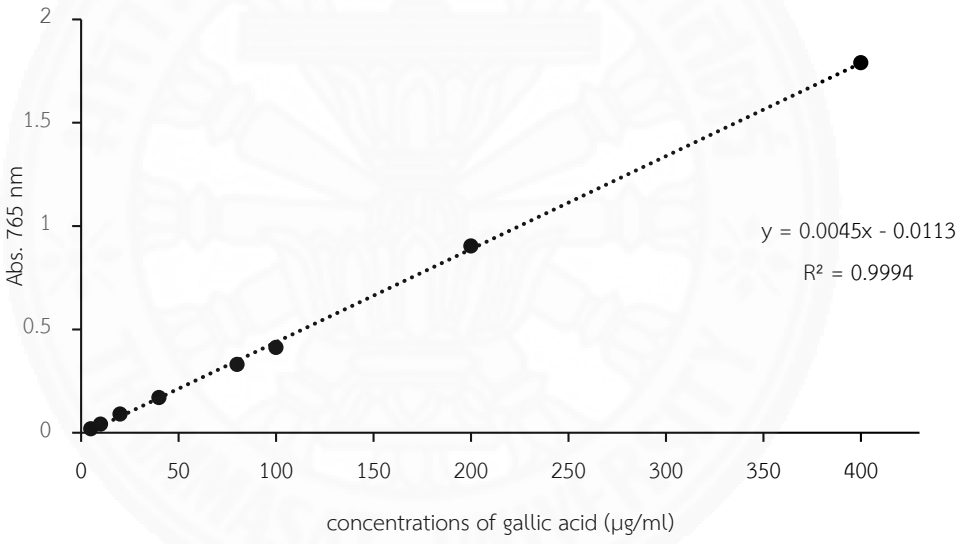
ชั่งน้ำหนักสดยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ ใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักแห้ง นำตัวอย่างที่มีน้ำหนักแห้งอย่างน้อย 2 g มาสกัดตามวิธีของ Jaiarree (2010) ด้วย ethanol ความเข้มข้น 95% ใช้ตัวอย่างแห้ง และ ethanol อัตรา 1:3 ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งสกัดนาน 3 วัน แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ขนาด 11 µm นำสารสกัดที่ได้มาระเหยใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง จนกว่าสารสกัดตัวอย่างจะมีน้ำหนักคงที่ คำนวณ % yield ตามสมการใน 3.6.1 จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity

3.6.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's colorimetric ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Folin and Ciocalteu (1927) โดยละลาย gallic acid และสารสกัดตัวอย่าง 1 mg ด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol ความเข้มข้น 99.9% ปริมาตร 1 ml จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตสารละลาย gallic acid ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 400 200 100 80 40 20 10 และ 5 µg/ml สำหรับใช้เป็นกราฟมาตรฐานของ gallic acid หลังจากนั้นปิเปตสารละลาย gallic acid ทุกความเข้มข้น และสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 µl ลงใน 96

Ref. code: 25615909032558LMU

well-microplate เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent ความเข้มข้น 2 M ที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 100 µl และเติมสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 7.5% (w/v) ปริมาตร 80 µl ทำซ้ำ 4 หลุม microplate ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ absolute ethanol เป็น blank ของสารละลายตัวอย่าง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง microplate reader ยี่ห้อ Thermo scientific รุ่น Multiskan GO ประมวลผลด้วยโปรแกรม skanit software version 3.2 คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในสารละลายตัวอย่าง โดยนำค่า OD ของ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ มากำหนดจุดในกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน x) และค่า OD ของ gallic acid (แกน y) เปรียบเทียบค่าที่วัดได้ของสารตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid (คำนวณค่า OD ของสารตัวอย่าง แทนที่ค่า y ในสมการจากภาพที่ 3.5) โดยมีหน่วยเป็น mg GAE/g dry extract



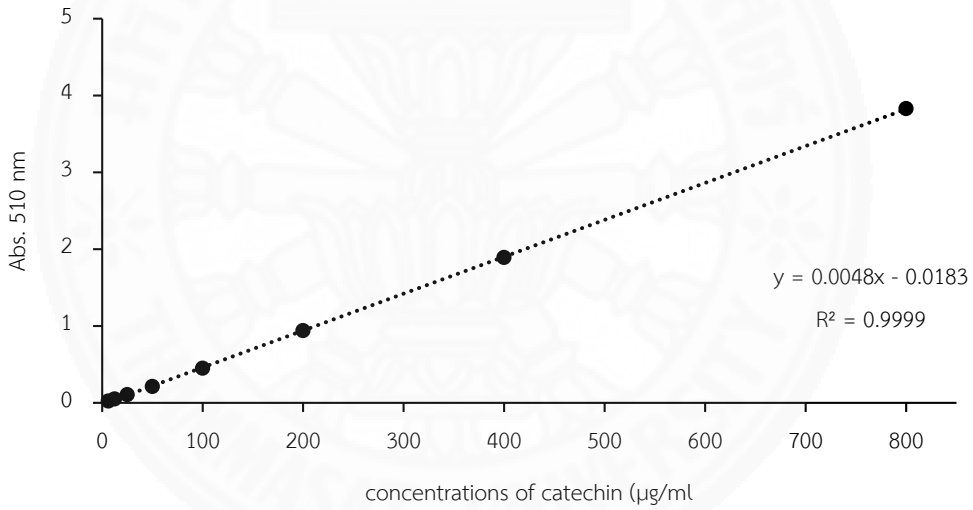
ภาพที่ 3.5 กราฟมาตรฐานของ gallic acid

3.6.5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี aluminum chloride colorimetric ดัดแปลงจากวิธีของ Zhu et al. (2010) โดยละลายสาร catechin และสารสกัดตัวอย่าง 1 mg ด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol ความเข้มข้น 99.9% ปริมาตร 1 ml จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตสารละลาย catechin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 800 400 200 100 50 25 12.5 และ 6.25 µg/ml สำหรับใช้เป็นกราฟมาตรฐานของ catechin หลังจากนั้นปิเปตสารละลาย catechin ทุกความเข้มข้น และสารละลายตัวอย่างปริมาตร 500 µl ลงในหลอด

Ref. code: 25615909032558LMU

ทดลอง เติม $NaNO_2$ ความเข้มข้น 5% (w/v) ปริมาตร 75 µl ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 6 นาที จากนั้น เติม $AlCl_3$ ความเข้มข้น 10% (w/v) ปริมาตร 150 µl ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที เติม NaOH ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 500 µl และเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 275 µl ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายปริมาตร 200 µl ลงใน 96 well-microplate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ด้วยเครื่อง microplate reader โดยใช้ absolute ethanol เป็น blank ของสารละลายตัวอย่าง คำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารละลายตัวอย่าง โดยนำค่า OD ของ catechin ที่ความเข้มข้นต่างๆ มากำหนดจุดในกราฟ ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน x) และค่า OD ของ catechin (แกน y) เปรียบเทียบค่าที่วัดได้ของสารตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานของ catechin (คำนวณค่า OD ของสารตัวอย่าง แทนที่ค่า y ในสมการจากภาพที่ 3.6) โดยมีหน่วยเป็น mg CE/g dry extract



ภาพที่ 3.6 กราฟมาตรฐานของ catechin

3.6.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging activity

ดัดแปลงจากวิธีของ Yamasaki et al. (1994) โดยละลายสารสกัด 1 mg ด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol ความเข้มข้น 99.9% ปริมาตร 1 ml จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 50 10 และ 1 µg/ml ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 µl ลงใน 96 well-microplate และเติมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhadrazyl) ปริมาตร 100 µl ทำซ้ำ 3 หลุม microplate

Ref. code: 25615909032558LMU

ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง microplate reader โดยใช้สารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 µl และเติม absolute ethanol ปริมาตร 100 µl เป็น blank ของสารละลายตัวอย่าง และใช้ absolute ethanol ปริมาตร 100 µl ร่วมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 µl เป็น control และใช้ BHT เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (positive control) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูล DPPH จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \left[\frac{\text{OD control - OD sample}}{\text{OD control}} \right] \times 100$$

เมื่อ OD control = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

OD sample = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

คำนวณหาค่า Half maximal effective concentration (EC_{50}) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ที่ 50% จากสมการลอการิทึมเปรียบเทียบค่าความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐานที่ได้จากกำหนดจุดในกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัด (แกน x) และ % inhibition (แกน y) โดยค่า EC_{50} ที่น้อยแสดงว่าสารสกัดมีความสามารถในสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี

3.7 ผลของ Phe และ MeJA ต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดง

3.7.1 ความเข้มข้นของ Phe และ MeJA

ตัดชิ้นส่วนข้อของกะเพราแดงขนาด 0.5 cm จากยอดอายุ 4 สัปดาห์ ที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมกับ Phe ความเข้มข้น 25 และ 50 µM MeJA ความเข้มข้น 50 และ 100 µM เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ตารางที่ 3.2) โดยข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM เพียงอย่างเดียวเป็นสิ่งทดลองควบคุม วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 9 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีจำนวนยอดมากพอที่จะทำการทดลอง บันทึกน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งหลังการเพาะเลี้ยง ทำการสกัดสาร คำนวณ % น้ำหนักแห้ง % yield และวิเคราะห์หาปริมาณสารทุติยภูมิเช่นเดียวกับการทดลองใน 3.6

Ref. code: 25615909032558LMU

ตารางที่ 3.2 อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 μM (สิ่งทดลองควบคุม) หรือเติมร่วมกับ Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ

สูตร	Phe (μM)	MeJA (μM)
1	-	-
2	25	-
3	50	-
4	-	50
5	-	100
6	25	50
7	25	100
8	50	50
9	50	100

3.7.2 ระยะเวลาที่ได้รับ MeJA

ตัดชิ้นส่วนข้อของกะเพราแดงขนาด 0.5 cm จากยอดอายุ 4 สัปดาห์ ที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 μM มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 μM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 μM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ 2 × 3 Factorial in CRD แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีจำนวนยอดมากพอที่จะทำการทดลอง บันทึกน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งหลังการเพาะเลี้ยง ทำการสกัดสาร คำนวณ % น้ำหนักแห้ง % yield และวิเคราะห์หาปริมาณสารทุติยภูมิเช่นเดียวกับการทดลองใน 3.6

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลอง เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% โดยโปรแกรม SAS

Ref. code: 25615909032558LMU

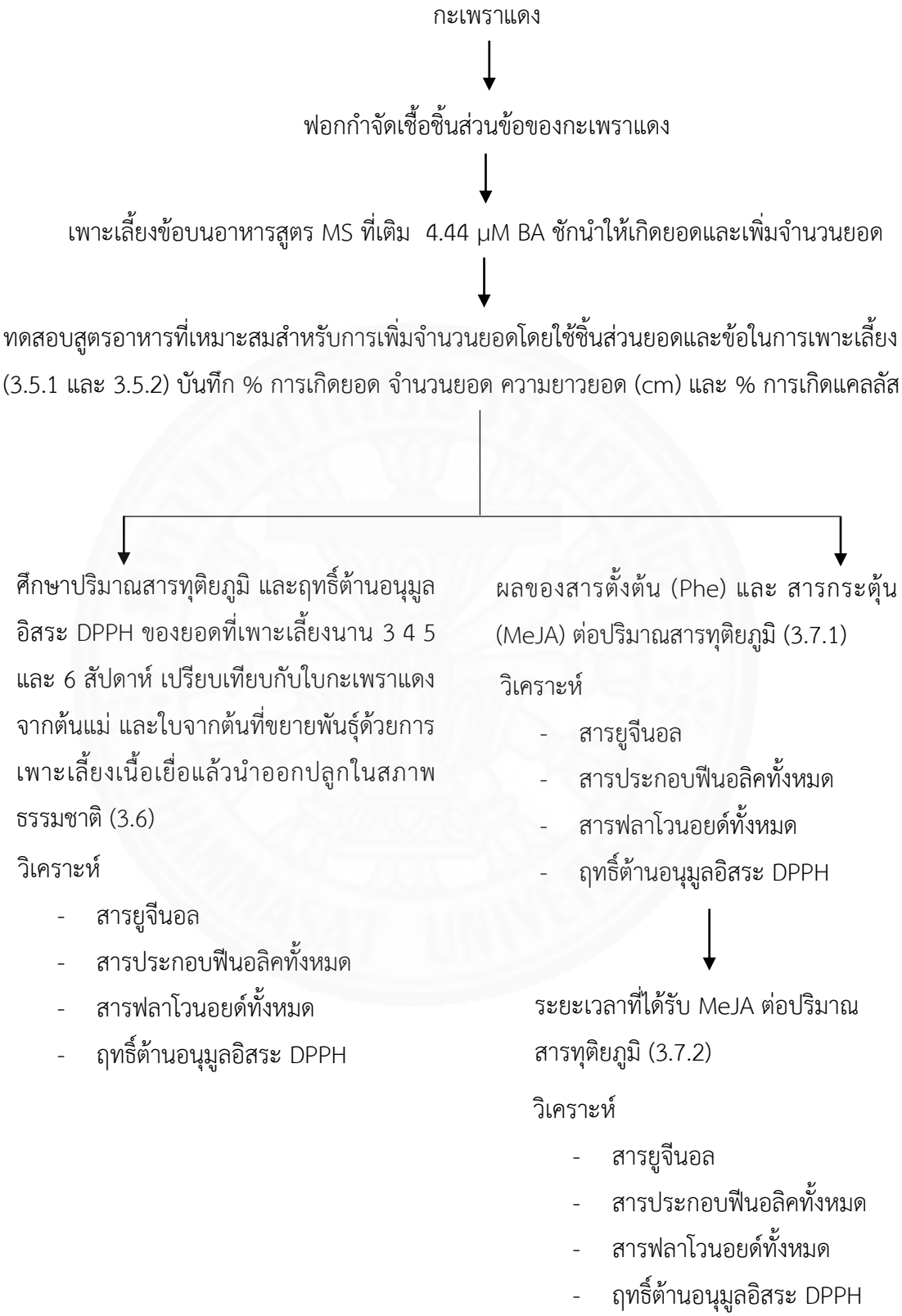
3.9 สถานที่ทำการทดลอง

- ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
- ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
- ห้องปฏิบัติการวิจัยกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

3.10 ระยะเวลาในการทดลอง

ตั้งแต่ กรกฎาคม พ.ศ. 2560 - ธันวาคม พ.ศ. 2561 เป็นระยะเวลา 1 ปี 5 เดือน

Ref. code: 25615909032558LMU



ภาพที่ 3.7 แผนการศึกษา

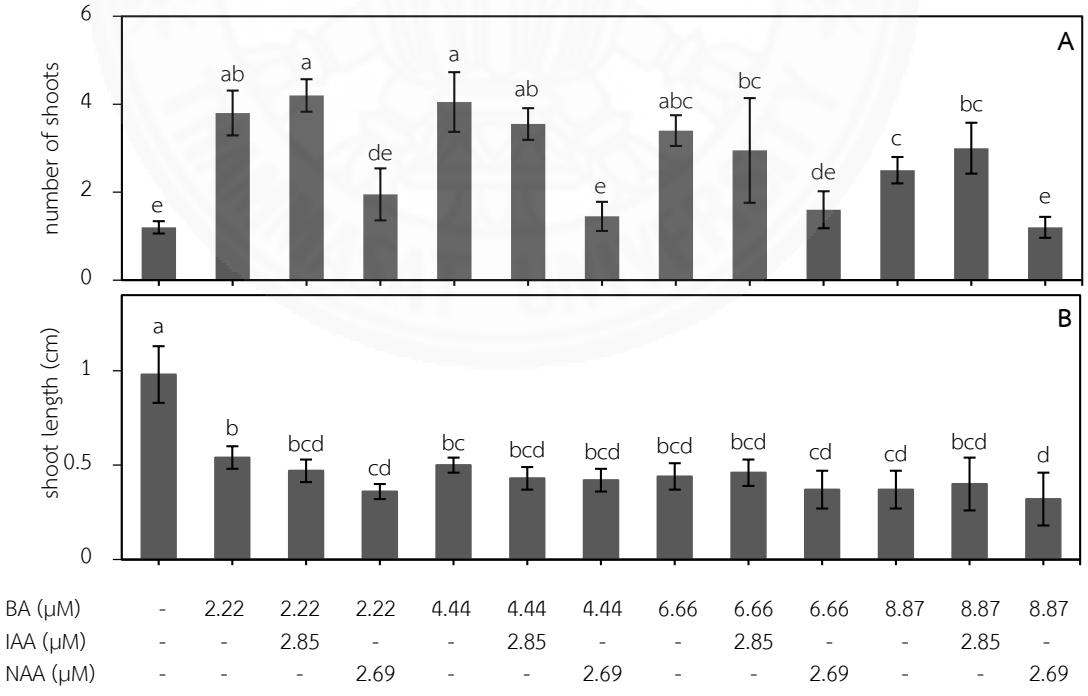
Ref. code: 25615909032558LMU

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลของ BA ร่วมกับ IAA และ NAA ต่อการเพิ่มจำนวนยอด

4.1.1 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอด

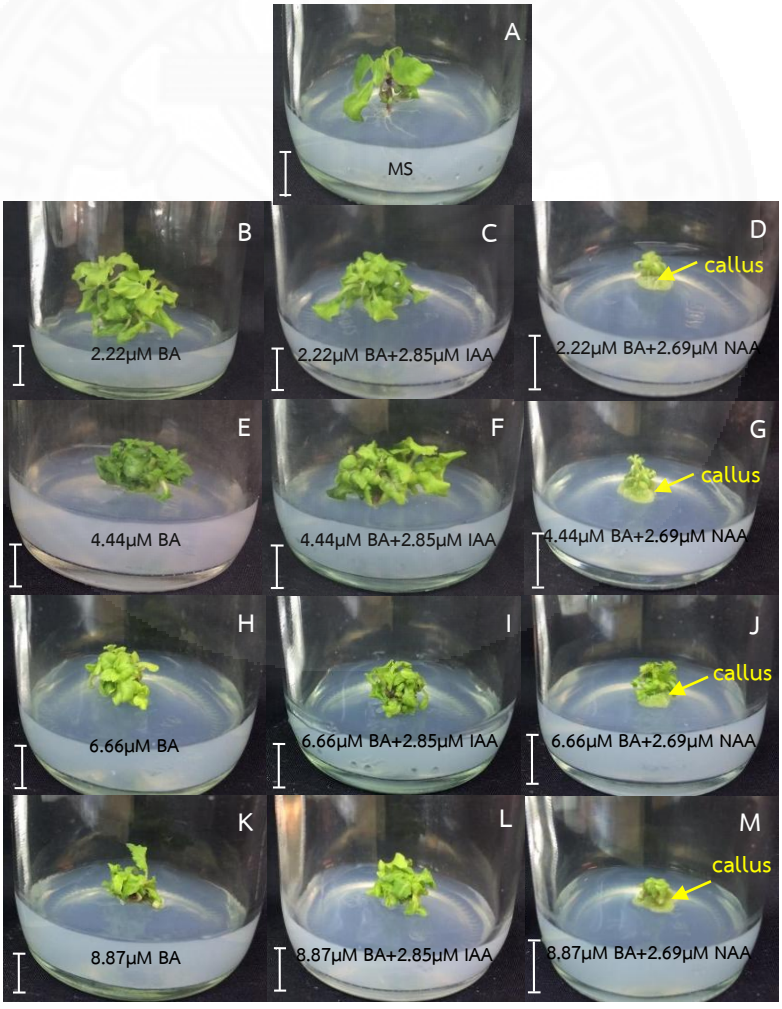
จากการใช้ส่วนยอดของกะเพราแดงเป็นชิ้นส่วนในการชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมหรือไม่ร่วมกับ IAA หรือ NAA ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า มีการพัฒนาของยอดใหม่ 100% บนอาหารทุกสูตร แต่จำนวนยอดที่พัฒนาและความยาวยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 4.1 และตารางผนวกที่ ข.1) โดยยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 2.85 µM มีจำนวนยอดที่พัฒนาสูงสุดเท่ากับ 4.20±0.37 ยอด (ภาพที่ 4.1 A) แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับจำนวนยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 4.44 6.66 µM เพียงอย่างเดียว และที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 µM ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 2.85 µM ที่มีจำนวนยอดเท่ากับ 3.80±0.51 4.05±0.68



ภาพที่ 4.1 จำนวนยอดที่พัฒนา (A) และความยาวของยอดกะเพราแดง (B) เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA IAA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Ref. code: 25615909032558LMU

3.40±0.35 และ 3.55±0.36 ยอด ตามลำดับ ส่วนยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีจำนวนยอดน้อยที่สุดเท่ากับ 1.20±0.14 ยอด สำหรับความยาวยอด พบว่า ยอดกะเพราแดงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีความยาวมากที่สุดเท่ากับ 0.98±0.15 cm (ภาพที่ 4.1 B) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับความยาวของยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมหรือไม่ร่วมกับ IAA หรือ NAA ทุกความเข้มข้น (0.32±0.14 ถึง 0.54±0.06 cm) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 µM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 µM มีความยาวน้อยที่สุด เท่ากับ 0.32±0.14 cm อย่างไรก็ตามการเติม NAA ร่วมกับ BA ลงในอาหารเพาะเลี้ยงส่งผลให้ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาเกิดแคลลัสบริเวณโคนยอด (ภาพที่ 4.2 D 4.2 G 4.2 J และ 4.2 M)

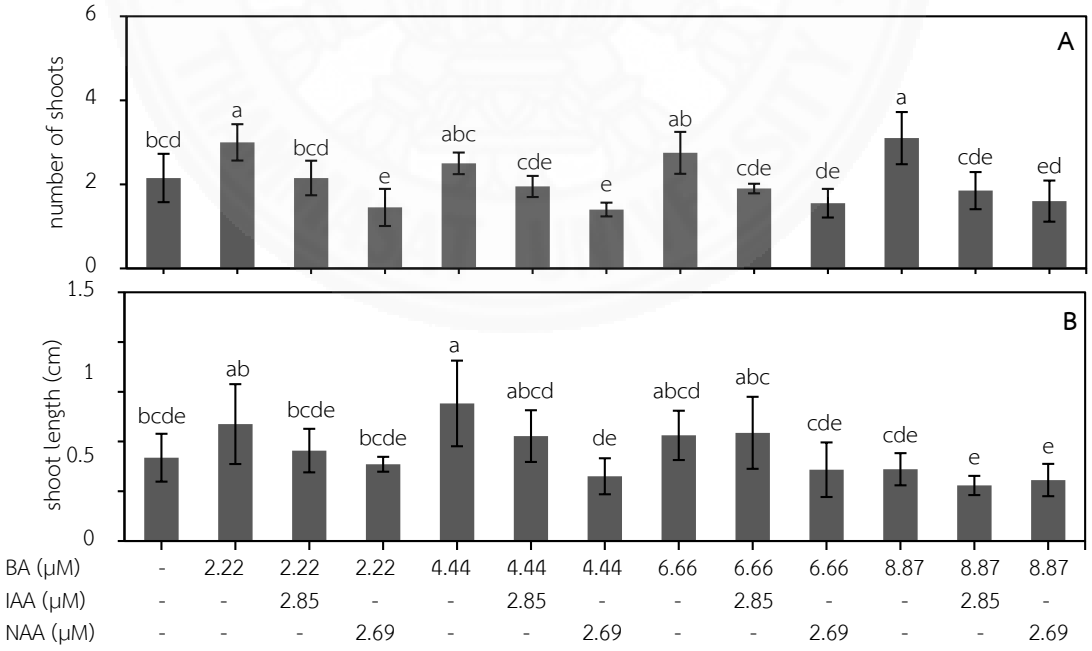


ภาพที่ 4.2 ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA IAA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (scale bar = 1 cm)

Ref. code: 25615909032558LMU

4.1.2 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ

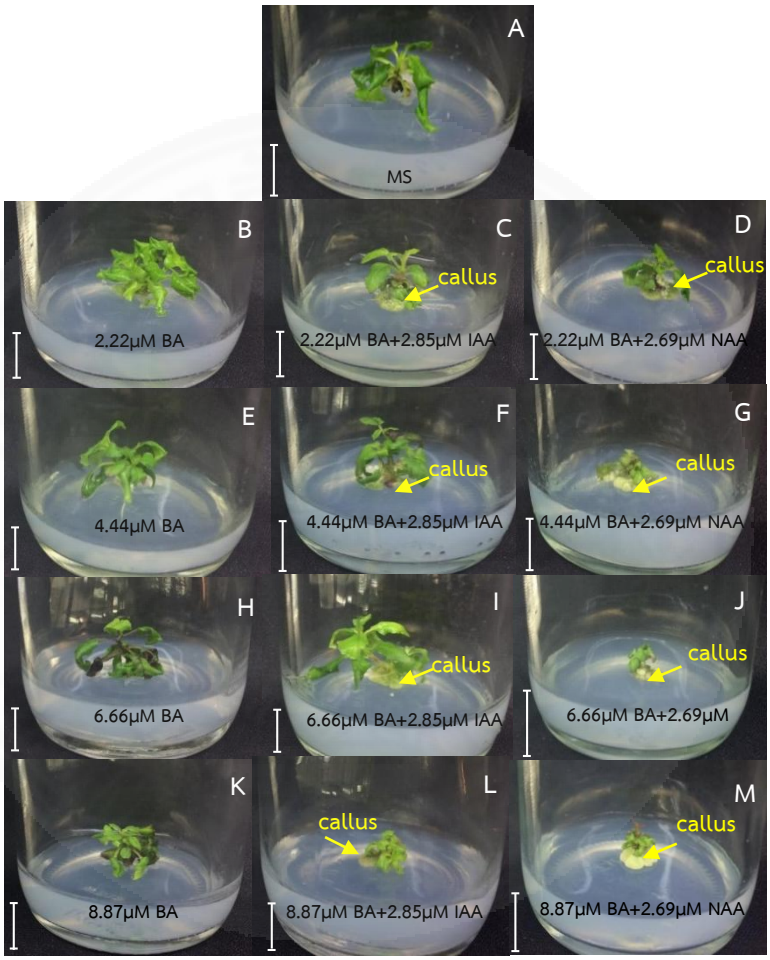
จากการใช้ข้อเป็นชิ้นส่วนในการชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมหรือไม่ร่วมกับ IAA หรือ NAA ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารทุกสูตรเกิดการพัฒนาของยอดใหม่ 100% เช่นเดียวกับการใช้ชิ้นส่วนยอด โดยจำนวนยอดที่พัฒนาและความยาวยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.3 และตารางผนวกที่ ข.2) ข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 µM มีจำนวนยอดที่พัฒนาสูงสุดเท่ากับ 3.10±0.62 ยอด (ภาพที่ 4.3 A) แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับจำนวนยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 4.44 และ 6.66 µM ที่มีจำนวนยอดเท่ากับ 3.00±0.43 2.50±0.26 และ 2.75±0.50 ยอด ตามลำดับ ส่วนยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 µM ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.69 µM มีจำนวนยอดน้อยที่สุดเท่ากับ 1.40±0.16 ยอด สำหรับความยาวยอด พบว่า ยอดที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 µM มีความยาวยอดสูงสุดเท่ากับ 0.83±0.26 cm (ภาพที่ 4.3 B) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับความยาวของยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM (0.71±0.24 cm) 6.66 µM (0.64±0.15 cm) หรือเติม BA ความเข้มข้น 4.44 และ 6.66 µM ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 2.85 µM (0.63±0.16 และ 0.65±0.22 cm ตามลำดับ) ส่วนยอดที่พัฒนาบน



ภาพที่ 4.3 จำนวนยอดที่พัฒนา (A) และความยาวของยอดกะเพราแดง (B) เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA IAA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Ref. code: 25615909032558LMU

อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 8.87 µM ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 2.85 µM มีความยาวน้อยที่สุดเท่ากับ 0.34±0.06 cm นอกจากนี้การเติม IAA หรือ NAA ร่วมกับ BA ลงในอาหารเพาะเลี้ยงข้อส่งผลให้ยอดที่พัฒนาเกิดแคลลัสบริเวณโคนยอด (ภาพที่ 4.4 C 4.4 D 4.4 F 4.4 G 4.4 I 4.4 J 4.4 L และ 4.4 M)



ภาพที่ 4.4 ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA IAA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (scale bar = 1 cm)

จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดหรือข้อกะเพราแดงบนอาหารที่เติม BA ร่วมหรือไม่ร่วมกับ IAA และ NAA สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนดังกล่าวพัฒนาเป็นยอดใหม่ได้ ทั้งนี้เนื่องจาก BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ส่งเสริมการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น รวมถึงชักนำให้ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงเกิดการพัฒนาของ

Ref. code: 25615909032558LMU

ตาพิเศษ (adventitious bud) และเกิดยอด (คำนูณ, 2542) ส่วน IAA และ NAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินมีบทบาทในการเร่งการเจริญเติบโตของพืช ควบคุมการแบ่งเซลล์ การยืดตัวของเซลล์ และการขยายขนาดของเซลล์ รวมถึงมีบทบาทในการเปลี่ยนแปลง meristem หรือแคลลัสเพื่อพัฒนาเป็นอวัยวะ (ศิวพงศ์, 2546) อย่างไรก็ตามการเติม BA ร่วมกับ NAA หรือ IAA ลงในอาหารเพาะเลี้ยง ส่งผลให้เกิดการพัฒนาของแคลลัสร่วมกับการพัฒนาของยอด ทั้งนี้เนื่องจาก IAA และ NAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่มีบทบาทในการชักนำให้ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงเกิดการพัฒนาไปเป็นราก และแคลลัส (วราภรณ์, 2553) ซึ่งรังสฤษดิ์ (2540) กล่าวไว้ว่า หากภายในเนื้อเยื่อพืชและอาหารเพาะเลี้ยงมีสัดส่วนของออกซิน และไซโทไคนินสมดุลกันจะชักนำให้เนื้อเยื่อพืชพัฒนาเป็นแคลลัสได้ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Kumlay and Ercisli (2015) ที่เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ และใบของ *Solanum tuberosum* L. บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 mg/l ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 2 mg/l หรือ NAA ความเข้มข้น 2 mg/l นาน 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนดังกล่าวเกิดการพัฒนาไปเป็นแคลลัส เท่ากับ 40.00±2.41% และ 87.50±2.02% ตามลำดับ นอกจากนี้ Shilpa et al. (2010) รายงานว่า การเติม NAA ความเข้มข้น 2 mg/l ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.3 mg/l หรือ kinetin ความเข้มข้น 0.2 mg/l (0.93 μM) ชักนำให้ใบอ่อนของกะเพราพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงปลายยอดกะเพราบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.2-1 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1-1 mg/l พบว่า ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นมีการพัฒนาของแคลลัสร่วมด้วย (Banu and Bari, 2007)

จากการทดลองยังพบอีกว่า การเติม BA ร่วมกับ IAA หรือ NAA และการเติม BA ความเข้มข้นสูง (8.87 μM) ส่งผลให้ยอดกะเพราแดงที่พัฒนามีความยาวลดลง ทั้งนี้เนื่องจาก IAA และ NAA ส่งผลให้เกิดแคลลัสบริเวณโคนยอดตามที่ได้รายงานไปแล้วข้างต้น รวมทั้งความเข้มข้นของ IAA และ NAA ไม่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้ยอดกะเพราแดงเกิดการยืดยาวทางลำต้น ดังที่นพดล (2537) ได้กล่าวไว้ว่า ออกซินความเข้มข้นที่เหมาะสมจะกระตุ้นการเจริญเติบโตทางลำต้นได้ นอกจากนี้ Monney et al. (2016) รายงานว่าเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงพัฒนาไปเป็นแคลลัสอาจใช้เวลาในการเกิดยอดและการเจริญเติบโตของยอดนาน ทำให้เนื้อเยื่อพัฒนาไปเป็นยอดได้น้อย และยอดมีความยาวสั้น ส่วนการใช้ไซโทไคนิน (BA) ความเข้มข้นสูงจะชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก แต่จะยับยั้งการยืดยาวของลำต้น ทำให้ยอดมีการเจริญเติบโตลดลง (คำนูญ, 2542) ซึ่งปัญหาความยาวยอดสั้นนี้ได้มีรายงานแล้วเช่นกันโดย Sharma et al. (2014) ที่พบว่า ยอดกะเพราที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 mg/l มีความยาวเท่ากับ 3.11±0.04 cm แต่การเติม BA ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 mg/l ส่งผลให้ยอดที่พัฒนามีความยาวลดลง (2.53±0.06 cm) เช่นเดียวกับ Banu and Bari (2007) พบว่า ยอดกะเพราที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP

Ref. code: 25615909032558LMU

ความเข้มข้น 0.2 mg/l มีความยาวยอดสูงสุดเท่ากับ 3.39 cm แต่หากเพิ่มความเข้มข้นของ BAP เป็น 0.5 1 2 และ 5 mg/l ส่งผลให้ยอดที่พัฒนามีความยาวลดลงเหลือเพียง 3.06 2.17 1.60 และ 0.30 cm ตามลำดับ นอกจากนี้การเติม BAP ความเข้มข้น 0.2-1 mg/l ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1-1 mg/l ส่งผลให้ยอดที่พัฒนามีความยาวลดลง (0.57-1.50 cm) เมื่อเทียบกับความยาวของยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม BAP เพียงอย่างเดียว (2.17-3.39 cm)

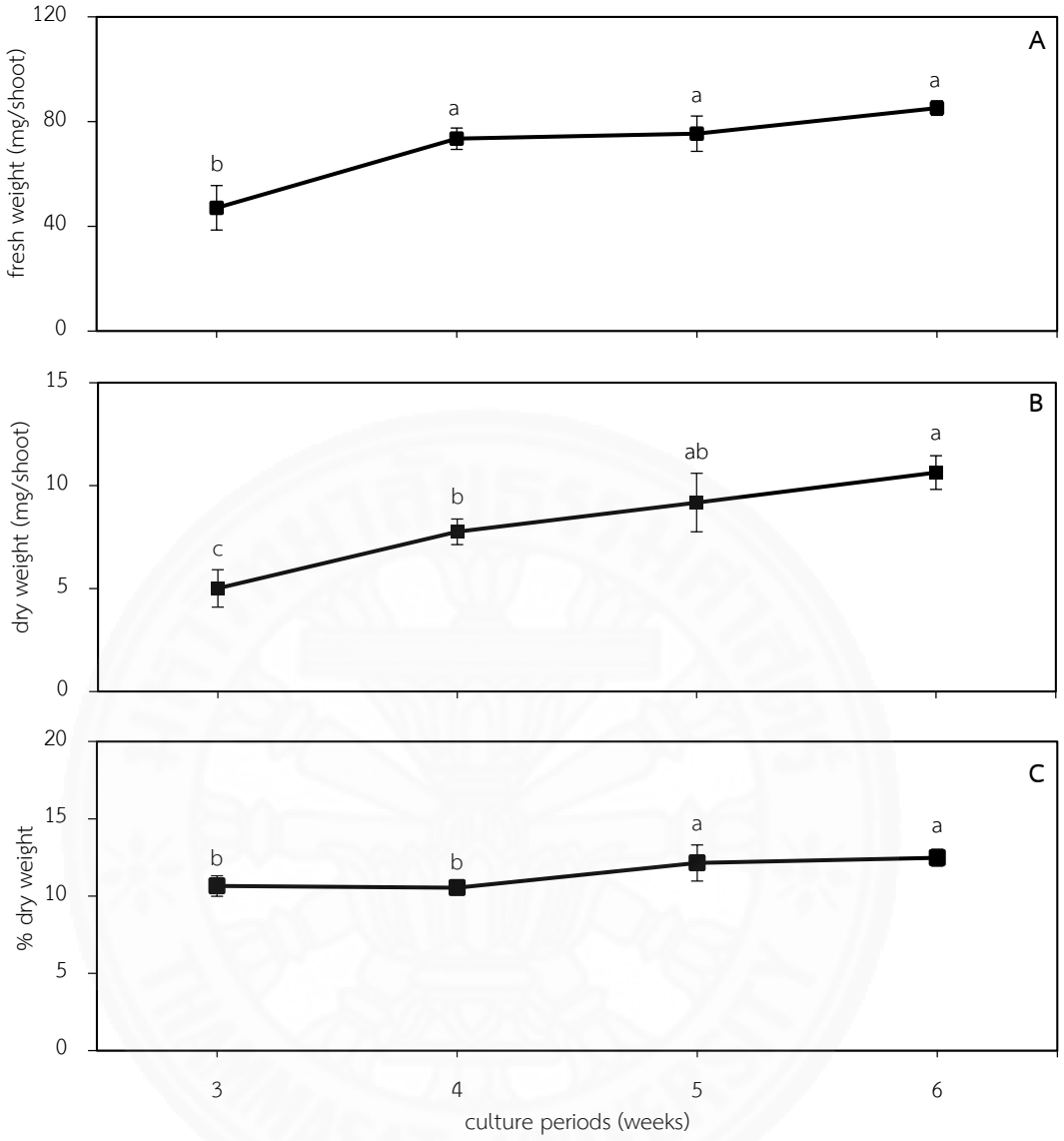
ดังนั้น จากการทดลองนี้อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 4.44 และ 6.66 μM เพียงอย่างเดียว จึงเหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดกะเพราแดงเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดและข้อ เนื่องจากจำนวนยอดที่พัฒนา ความยาวยอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 4.1 และ 4.3) แต่หากพิจารณาในเชิงการค้าควรเลือกใช้อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 μM เพื่อการขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนยอดของกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ เนื่องจากใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตปริมาณน้อยที่สุดทำให้ประหยัดต้นทุนในการผลิต ซึ่งความเข้มข้นของ BA ที่เหมาะสมกับการเพิ่มจำนวนยอดกะเพราแดงในการทดลองนี้ใกล้เคียงกับรายงานของ Sharma et al. (2014) ที่พบว่าชิ้นส่วนข้อของกะเพราที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.5 mg/l นาน 4 สัปดาห์ พัฒนาไปเป็นยอดได้สูงสุดเท่ากับ 11.33±0.27 ยอด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 μM ในการเพิ่มจำนวนยอดกะเพราแดงเพื่อนำยอดที่พัฒนามาวิเคราะห์หาปริมาณสารทุติยภูมิ และเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ

4.2 ปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ

4.2.1 การเจริญเติบโตของยอด

จากการเพาะเลี้ยงข้อของกะเพราแดงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 μM เป็นระยะเวลาต่างกันคือ 3 4 5 และ 6 สัปดาห์ พบว่า ยอดกะเพราแดงที่พัฒนามีน้ำหนักสดและแห้งเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 4.5 A 4.5 B และตารางผนวกที่ ค.1) โดยยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ มีน้ำหนักสดและแห้งสูงสุดเท่ากับ 85.17±2.80 และ 10.64±0.82 mg/shoot ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับน้ำหนักสดและแห้งของยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 5 สัปดาห์ (75.39±6.74 และ 9.18±1.42 mg/shoot ตามลำดับ) ส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ มีน้ำหนักสดและแห้งน้อยที่สุดเท่ากับ 47.08±8.50 และ 5.01±0.91 mg/shoot ตามลำดับ เมื่อนำน้ำหนักสดและแห้งมาคำนวณ % น้ำหนักแห้ง พบว่า ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 5-6 สัปดาห์ มี % น้ำหนักแห้ง (12.14±1.17 ถึง 12.48±0.55%) สูงกว่ายอดที่พัฒนานาน 3-4 สัปดาห์ (10.54±0.3 ถึง 10.65±0.66%) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 4.5 C)

Ref. code: 25615909032558LMU



ภาพที่ 4.5 น้ำหนักสด (A) น้ำหนักแห้ง (B) และ % น้ำหนักแห้ง (C) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 3-6 สัปดาห์

จากการทดลองครั้งนี้เห็นได้ว่าในช่วง 3 สัปดาห์แรกยอดกะเพราแดงที่พัฒนามีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด เนื่องจากเป็นระยะที่ชิ้นส่วนพืชเริ่มพัฒนาและปรับตัวให้เข้ากับอาหาร รวมถึงสภาพแวดล้อมที่เพาะเลี้ยงเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการเจริญเติบโต (Taiz and Zeiger, 2006) หลังจากนั้นการเจริญเติบโตของยอดกะเพราแดงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เพราะในอาหารเพาะเลี้ยงมีองค์ประกอบของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมจะกระตุ้นให้พืชเกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ ตลอดจนเกิดการขยายขนาดและยืดยาวของเซลล์ จึงส่งผลให้ยอดที่พัฒนามีขนาด น้ำหนักสดและแห้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (รังสฤษดิ์, 2540) ซึ่งผลการ

Ref. code: 25615909032558LMU

ทดลองนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับรายงานของ Komali et al. (1999) ที่เพาะเลี้ยงยอดของ *Origanum vulgare* บนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 mg/l นาน 0-35 วัน พบว่า ยอดที่พัฒนามีน้ำหนักสดและแห้งเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาเพาะเลี้ยง โดยยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 35 วัน มีน้ำหนักสดและแห้งสูงสุดเท่ากับ 2,251 และ 205 mg ตามลำดับ เช่นเดียวกับแคลลัสของกระเจี๊ยบแดง HS003 และ HS005 ที่มีน้ำหนักสดและแห้งเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงในช่วง 7-28 วัน โดยแคลลัสของกระเจี๊ยบแดง HS003 และ HS005 มีน้ำหนักสด (1,809.45±557.60 และ 442.61±182.02 mg ตามลำดับ) และแห้ง (76.89±16.16 และ 25.30±7.85 mg ตามลำดับ) เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 28 วัน (ปพิชญา, 2559) หรือการเพาะเลี้ยงยอดของ *H. perforatum* พบว่า ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับชีวมวลของยอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (r เท่ากับ 0.96) โดยยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 0-100 วัน มีค่าชีวมวลเพิ่มขึ้นเฉลี่ยเท่ากับ 0.381 g FW/วัน (Figueiról et al. 2010)

4.2.2 % yield

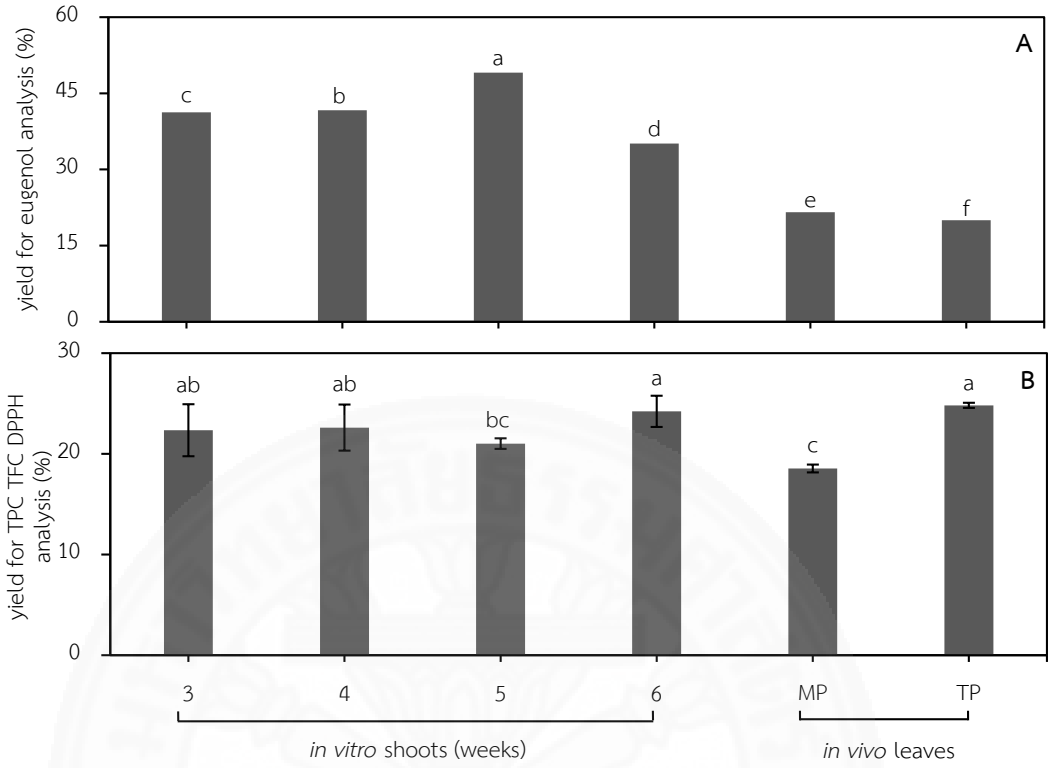
ในการสกัดสารจากยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 3-6 สัปดาห์ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารยูจีนอลเปรียบเทียบกับใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ พบว่า มี % yield แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 4.6 A) โดยยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 5 สัปดาห์ มี % yield สูงสุดเท่ากับ 49.08% ส่วนใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกมี % yield น้อยที่สุดเท่ากับ 20.01%

% yield ของสารสกัดตัวอย่างพืชเพื่อวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติระหว่างตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษา (ภาพที่ 4.6 B) โดยใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกมี % yield สูงสุดเท่ากับ 24.82±0.25% ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับ % yield ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 3 4 และ 6 สัปดาห์ (22.35±2.59 22.61±2.29 และ 24.23±1.55% ตามลำดับ) ในขณะที่สารสกัดของใบกะเพราแดงจากต้นแม่ในสภาพธรรมชาติมี % yield น้อยที่สุดเท่ากับ 18.55±0.39%

4.2.3 ปริมาณสารยูจีนอล

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารยูจีนอลของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อเปรียบเทียบกับใบจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ระหว่างสิ่งทดลอง (ภาพที่ 4.7 A และตารางผนวกที่ ค.2) โดยยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 3 4 5

Ref. code: 25615909032558LMU



ภาพที่ 4.6 % yield ของสารสกัดจากยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 3-6 สัปดาห์ ใบกะเพราแดงจากต้นแม่ (mother plant, MP) และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ (transplantation plant, TP) ในการวิเคราะห์: A) สารยูจีนอล B) สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

และ 6 สัปดาห์ มีปริมาณสารยูจีนอลไม่แตกต่างกันทางสถิติ (249.76±41.84 279.92±1.73 583.24±23.28 และ 509.61±3.78 µg/g dry extract ตามลำดับ) แต่น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่าดังกล่าวของใบกะเพราแดงจากต้นแม่ (2,931.17±286.61 µg/g dry extract) และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ (8,816.18±510.60 µg/g dry extract)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อสามารถสังเคราะห์และสะสมสารยูจีนอลได้เหมือนกับใบกะเพราแดงจากต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ เช่นเดียวกับพืชสมุนไพรชนิดอื่นๆ เช่น โหระพา (Bhuvaneshwari et al., 2016) *V. thapsus* L. (Al-Jibouri et al., 2016) และ *Daucus* spp. (Jawdat et al., 2016) เนื่องจากชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงมีข้อมูลทางพันธุกรรม และสามารถควบคุมหน้าที่ต่างๆ รวมถึงกระบวนการชีวสังเคราะห์

Ref. code: 25615909032558LMU

สารทุติยภูมิ ดังนั้นเซลล์พืชแต่ละเซลล์จึงสามารถเกิดเป็นต้นใหม่ได้ และสามารถสร้างสารทุติยภูมิได้เช่นเดียวกับต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (Banthorpe, 1994; Juliet et al., 2017) อย่างไรก็ตามสารยูจีนอลที่สังเคราะห์ได้จากยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่างๆ มีปริมาณน้อยกว่าในใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ สอดคล้องกับรายงานของ Al-Jibouri et al. (2016) ที่พบว่า ใบของต้น *V. thapsus* L. ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารยูจีนอล (41.00 ppm) สูงกว่าแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบในสภาพปลอดเชื้อ (15.00 ppm) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการสร้างสารทุติยภูมิที่สำคัญบางชนิดเกิดขึ้นบริเวณต่อมหรือในเนื้อเยื่อพืชที่มีความเฉพาะเจาะจง (Smetanska, 2008) ซึ่งสารยูจีนอลเป็นน้ำมันหอมระเหยที่พบมากในใบของพืชสมุนไพรหลายชนิด เช่น กานพลู ลูกจันทน์เทศ กระวาน อบเชย (Mohammadi Nejad et al., 2017) โหระพา และกะเพรา (Mahajan et al., 2014) จึงเป็นไปได้ว่าการใช้ยอดที่มีส่วนลำต้นมาวิเคราะห์สารยูจีนอลด้วยมีผลให้ปริมาณสารที่ได้มีค่าน้อยลง ดังรายงานของ Bhuvaneshwari et al. (2016) ที่พบว่า ใบกะเพราที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อและสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารยูจีนอล (88.80±4.53 และ 25.10±3.44 µg/g DM ตามลำดับ) สูงกว่าลำต้นที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อและสภาพธรรมชาติ (7.56±3.73 และ 13.50±3.87 µg/g DM ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามหากใช้แต่เพียงส่วนใบต้องเพาะเลี้ยงยอดจำนวนมากเพื่อตัดใบและนำมาใช้สกัดสาร ซึ่งในทางปฏิบัติอาจทำได้ยากและไม่คุ้มค่าเนื่องจากต้นทุนในการผลิตสูง ดังนั้นการศึกษาในการทดลองต่อๆ ไปจะยังคงใช้ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารยูจีนอล

4.2.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ ใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 4.7 B) โดยยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 3-6 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (87.71±6.65 ถึง 152.10±7.94 mg GAE/g dry extract) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่าดังกล่าวของใบกะเพราแดงจากต้นแม่ (73.44±1.53 mg GAE/g dry extract) และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ (73.68±5.09 mg GAE/g dry extract) โดยยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 5 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 152.10±7.94 mg GAE/g dry extract ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของยอดกะเพราแดงที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 3-6 สัปดาห์ จากการทดลองนี้มีค่าสูงกว่าแคลลัสกะเพราแดงที่พัฒนาจากชิ้นส่วนใบ (67.66±1.70 ถึง 68.64±0.29 mg GAE/g dry extract) (กิตติยา, 2560)

Ref. code: 25615909032558LMU

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ โดยยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดน้อยที่สุด (87.71±6.65 mg GAE/g dry extract) จากนั้นปริมาณสารดังกล่าวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 5 สัปดาห์ (152.10±7.94 mg GAE/g dry extract) และปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพาะเลี้ยงยอดนาน 6 สัปดาห์ (134.73±7.65 mg GAE/g dry extract) (ภาพที่ 4.7 B) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน พืชจะใช้พลังงานในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนยอดมากกว่าการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ดังนั้นสารที่พืชสังเคราะห์ได้จึงมีปริมาณลดลง (Figueiró et al., 2017) ผลการทดลองนี้สอดคล้องรายงานของ Szopa et al. (2017) ที่เพาะเลี้ยงยอดของ *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 mg/l และ NAA ความเข้มข้น 1 mg/l นาน 10-60 วัน พบว่า ยอดที่พัฒนามีปริมาณกรดฟีนอลิคเพิ่มขึ้นในช่วง 10-30 วันของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงยอดนาน 30 วัน (38.46±3.60 mg/100 g DW) หลังจากนั้นปริมาณสารดังกล่าวเริ่มลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 40-60 วัน (28.28±1.26 ถึง 32.14±4.19 mg/100 g DW) เช่นเดียวกับยอดของกล้วยหอมทองที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 22.19 µM นาน 2-8 สัปดาห์ พบว่ายอดที่พัฒนามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดเพิ่มขึ้นในช่วง 2-6 สัปดาห์ของการเพาะเลี้ยง โดยยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดสูงสุด (174.47±8.48 mg GAE/g dry extract) และปริมาณสารดังกล่าวลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 7 และ 8 สัปดาห์ (145.93±5.18 และ 141.70±6.16 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ) (กนกวรรณ, 2560)

จากการทดลองยังพบว่า ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อทุกระยะเวลาเพาะเลี้ยงสามารถสร้างและสะสมสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดได้สูงกว่าใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ ซึ่งไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณสารยูจีนอล ทั้งนี้อาจเนื่องจากการสังเคราะห์สารในกลุ่มนี้ไม่ได้มีข้อจำกัดของเนื้อเยื่อที่จะสังเคราะห์สารจึงสามารถพบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช (พิชญ์อร, 2549) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Thiruvengadam and Chung (2015) ที่พบว่า ใบของต้น *Cucumis anguria* L. ที่พัฒนาในสภาพปลอดปลอดเชื้อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดเท่ากับ 382.72 µg/g สูงกว่าใบของต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติที่มีปริมาณสารดังกล่าวเท่ากับ 352.54 µg/g เช่นเดียวกับ Bhuvaneshwari et al. (2016) ที่พบว่า ใบกะเพราที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (185.00±3.25 mg GAE/g DM) สูงกว่าใบที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (104.00±3.09 mg GAE/g DM) นอกจากนี้แคลลัสที่พัฒนาจากใบ

Ref. code: 25615909032558LMU

ของพืชในสกุล *Ocimum* 5 ชนิด ได้แก่ กะเพรา ยี่หร่า แมงลัก โหระพา และ *O. kilimandsharicum* พบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (84.6-153.4 mg GAE/g dry extract) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าดังกล่าวของใบที่เก็บมาจากต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (66.4-112.3 mg GAE/g dry extract) (Song et al., 2012) อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาของพืชบางชนิดที่พบว่า สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของชิ้นส่วน หรือเซลล์ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณน้อยกว่าส่วนต่างๆ ของพืชที่พัฒนาในสภาพธรรมชาติ เช่น หน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*) (Esmaeili et al., 2016) และพรมมิ (*Bacopa monnieri*) (Mohan et al., 2011) เป็นต้น

4.2.5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ ใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 4.7 C) โดยสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 3-6 สัปดาห์ (79.09±4.07 ถึง 122.04±3.66 mg CE/g dry extract) มีปริมาณสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่าดังกล่าวของใบจากต้นแม่และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ โดยปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีค่าสูงสุดในยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 5 สัปดาห์ (122.04±3.66 mg CE/g dry extract) และมีค่าน้อยสุดในใบจากต้นแม่ (66.33±3.55 mg CE/g dry extract) และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ (67.27±3.45 mg CE/g dry extract)

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า ยอดกะเพราแดงที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 5 สัปดาห์ มีปริมาณสารดังกล่าวสูงสุด และปริมาณสารลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดดังที่รายงานไปแล้วข้างต้น และสอดคล้องกับรายงานของ Szopa et al. (2017) ที่พบว่า ยอดของ *S. chinensis* ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 30 วัน มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงสุดเท่ากับ 17.21±2.15 mg/100 g DW และปริมาณสารดังกล่าวค่อยๆ ลดลงหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 40-60 วัน (12.26±3.27 ถึง 16.72±3.10 mg/100 g DW) หรือจากรายงานของ Wang et al. (2015) ที่พบว่าเซลล์แขวนลอยของ *H. perforatum* เริ่มสร้างสารฟลาโวนอยด์หลังจากการเพาะเลี้ยง 10 วัน และปริมาณสารดังกล่าวเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 16 mg/g DW ในวันที่ 25 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นค่อยๆ ลดลงหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน ดังนั้นระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ซึ่งนอกจากระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแล้ว

Ref. code: 25615909032558LMU

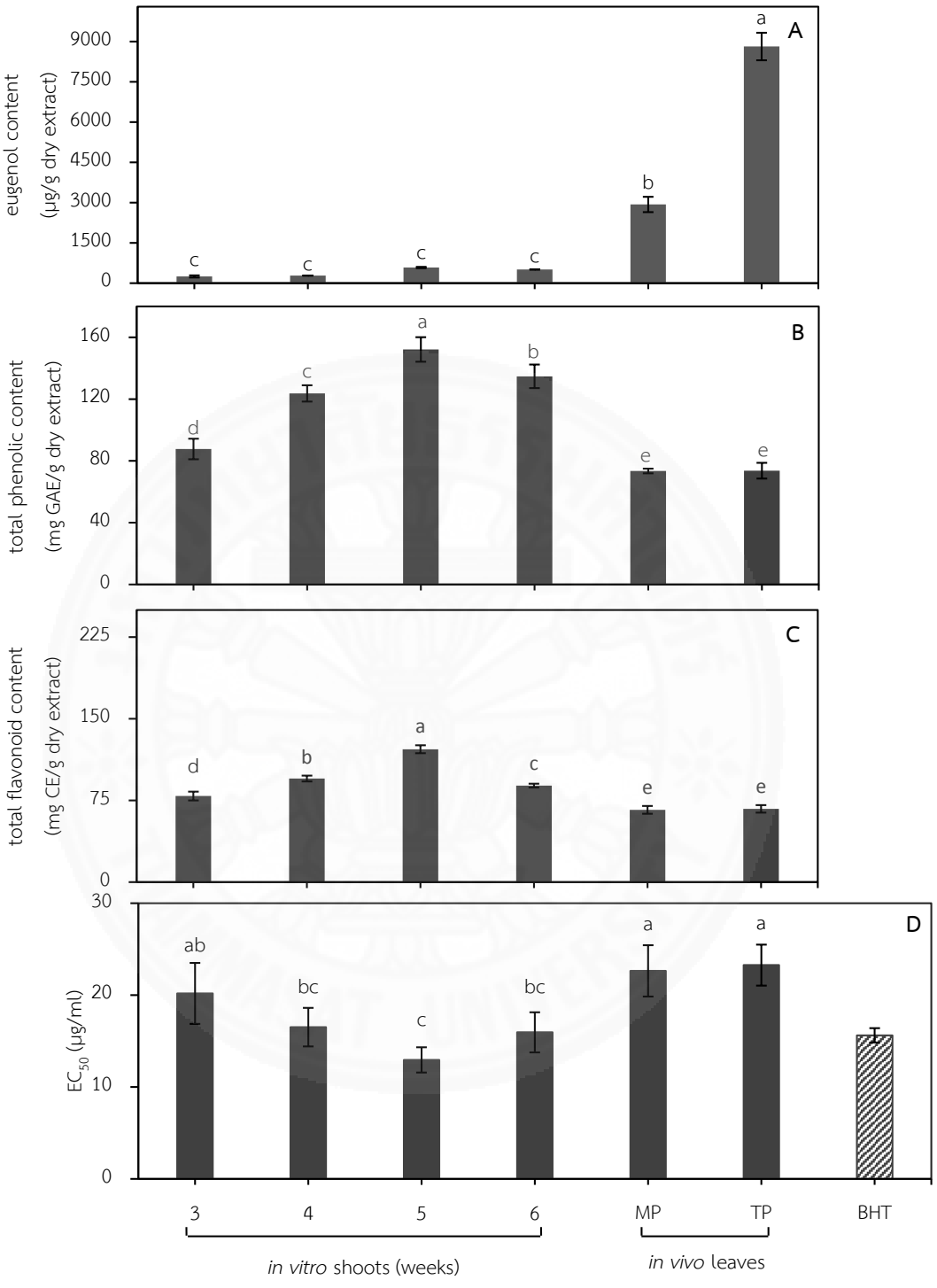
ชนิดพืช อาหารเพาะเลี้ยง รูปแบบการเพาะเลี้ยง และสภาพแวดล้อมที่เจริญเติบโตก็เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสร้างสารทุติยภูมิของพืชด้วยเช่นกัน (วราภรณ์, 2551)

นอกจากนี้จากการทดลองยังพบว่า ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ (3-6 สัปดาห์) สูงกว่าใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในการทดลองนี้ และสอดคล้องกับรายงานของ Thiruvengadam and Chung (2015) ที่พบว่า ใบของต้น *Cucumis anguria* L. ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (2,277.23 µg/g) สูงกว่าใบของต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (2,153.36 µg/g) หรือ แคลลัสของ *Terminalia arjuna* (ROXB.) ที่มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (1.29±0.04 mg/100g DW) สูงกว่าใบของต้นเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (0.98±0.05 mg/100g DW) (Sharma, 2014) และยอดของ *Ruta graveolens* L. ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่ายอดที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ 2.18 เท่า (Diwan et al., 2012) ในขณะที่ Lim et al. (2009) รายงานว่าใบกะเพรามีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าแคลลัส และยอดหน่อไม้ฝรั่งที่ปลูกในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารดังกล่าวสูงกว่ายอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ (Esmaeili et al., 2016)

4.2.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ ใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 4.7 D) โดยยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 5 สัปดาห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด มีค่า EC_{50} เท่ากับ 12.95±1.37 µg/ml ซึ่งดีกว่า BHT ที่ใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (EC_{50} เท่ากับ 15.62±0.78 µg/ml) แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 4 และ 6 สัปดาห์ (ค่า EC_{50} เท่ากับ 16.52±2.10 และ 15.95±2.19 µg/ml ตามลำดับ) ในขณะที่ใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 23.27±2.23 µg/ml แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบจากต้นแม่ในสภาพธรรมชาติ และยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 3 สัปดาห์ (ค่า EC_{50} เท่ากับ 22.64±2.79 และ 20.19±3.32 และ µg/ml ตามลำดับ) ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อจากการทดลองนี้โดยเฉพาะยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 4-6 สัปดาห์ ดีกว่าค่าดังกล่าวของแคลลัสที่พัฒนามาจากใบกะเพราแดงที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 26.60±2.90 µg/ml (กิตติยา, 2560)

Ref. code: 25615909032558LMU



ภาพที่ 4.7 A) ปริมาณสารยูจีนอล B) สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด C) สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และ D) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 3-6 สัปดาห์ ใบกะเพราแดงจากต้นแม่ (MP) และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ (TP)

Ref. code: 25615909032558LMU

จากการเพาะเลี้ยงยอดกะเพราแดงเป็นเวลานาน 5 สัปดาห์ ส่งผลให้ยอดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุดนั้น เนื่องจากยอดที่พัฒนาในระยะเวลาดังกล่าวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (Meyer et al., 1997; Pietta, 2000) นอกจากนี้จากผลการทดลองยังพบว่า ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 4-6 สัปดาห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของยอดกะเพราแดงดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สอดคล้องกับรายงานของ Thiruvengadam and Chung (2015) ที่พบว่า ใบของต้น *C. anguria* L. ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (77.50%) ดีกว่าใบของต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (62.00%) เช่นเดียวกับยอดของ *R. graveolens* ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (86.4%) สูงกว่ารากและยอดที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ (50 และ 64% ตามลำดับ) (Diwan et al., 2012) อย่างไรก็ตามพืชบางชนิดที่เจริญเติบโตภายใต้สภาพธรรมชาติมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าชิ้นส่วน หรือแคลลัสที่เจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ เช่น พรมมิ (Mohan et al., 2011) หน่อไม้ฝรั่ง (Esmaeili et al., 2016) และ *Senecio candicans* DC (Hariprasath et al., 2015) เป็นต้น

4.2.7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลานาน 3-6 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณสารยูจีนอลมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (r เท่ากับ 0.836) และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (r เท่ากับ 0.706) แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (r เท่ากับ -0.721) (ตารางที่ 4.1) แสดงให้เห็นว่าเมื่อยอดกะเพราแดงมีปริมาณสารยูจีนอลเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น รวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้นด้วย นอกจากนี้จากการทดลองยังพบว่า สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของยอดกะเพราแดงมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (r เท่ากับ 0.825) และสารทั้งสองมีความสัมพันธ์เชิงลบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (r เท่ากับ -0.688 และ -0.721 ตามลำดับ) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เมื่อยอดกะเพราแดงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้น จากการที่สารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีปริมาณเพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากสารดังกล่าวเป็นสารในกลุ่ม

Ref. code: 25615909032558LMU

ตารางที่ 4.1 ค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) ระหว่างปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลานาน 3-6 สัปดาห์

	eugenol content	total phenolic content	total flavonoid content	DPPH
eugenol content	-	0.836**	0.706*	-0.713**
total phenolic content		-	0.825**	-0.688*
total flavonoid content			-	-0.721**
DPPH				-

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

สารประกอบฟีนอลิค และมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นการที่ยอดกะเพราแดงมีปริมาณสารดังกล่าวเพิ่มขึ้น จึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้นเช่นกัน สอดคล้องกับรายงานของ Thiruvengadam and Chung (2015) ที่พบว่า การที่ใบของต้น *C. anguria* L. มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นส่งผลให้มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้นด้วย

จากการศึกษาปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลานานต่างกันเปรียบเทียบกับใบจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติสามารถสรุปได้ว่า ใบที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารยูจีนอลสูงกว่ายอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ (ภาพที่ 4.7 A) ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีค่ามากกว่า รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่า ใบที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (ภาพที่ 4.7 B 4.7 C และ 4.7 D) อย่างไรก็ตามหากพิจารณาเฉพาะปริมาณสารทุติยภูมิในยอดกะเพราแดงที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ นาน 3-6 สัปดาห์ เพื่อนำไปสกัดและใช้ประโยชน์ทางการแพทย์นั้น ควรใช้ยอดกะเพราแดงที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 5 สัปดาห์ เนื่องจากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด รวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด จากการที่ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารยูจีนอลน้อยกว่าใบที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ จึงทำการศึกษาถึงผลของสารตั้งต้น Phe

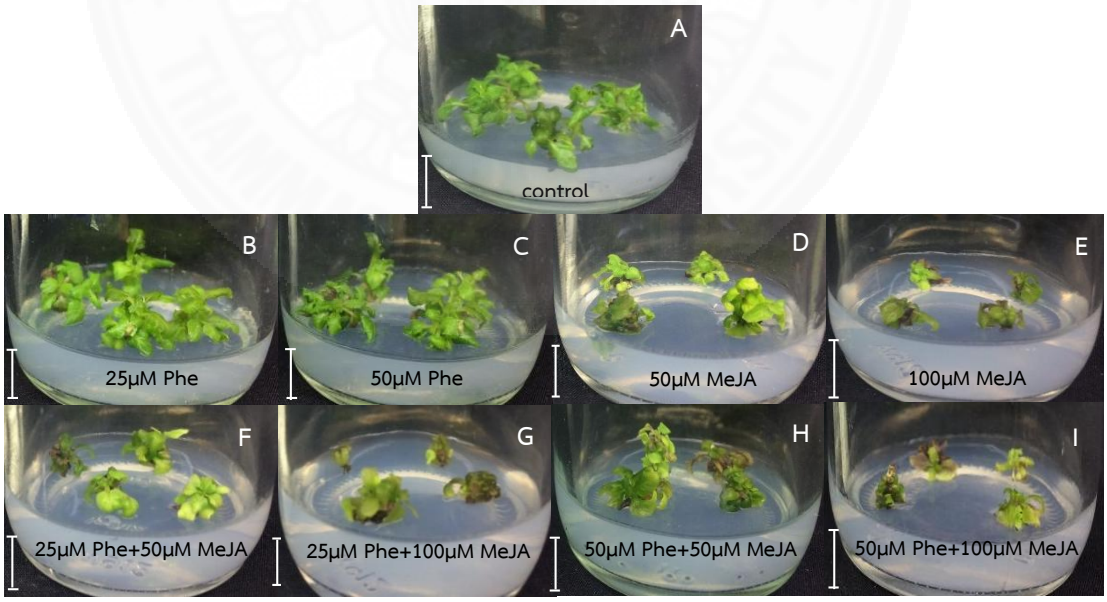
Ref. code: 25615909032558LMU

และสารกระตุ้น MeJA ต่อการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อในการทดลองต่อไป

4.3 ผลของ Phe และ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดง

4.3.1 การเจริญเติบโตของยอด

จากการเพาะเลี้ยงข้อกะเพราแดงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมกับ Phe ความเข้มข้น 25 และ 50 µM MeJA ความเข้มข้น 50 และ 100 µM เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม Phe และ MeJA (สิ่งทดลองควบคุม) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า ยอดและใบกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA เพียงอย่างเดียวหรือเติม Phe ร่วมกับ MeJA ทุกความเข้มข้น (ภาพที่ 4.8 D 4.8 E 4.8 F 4.8 G 4.8 H และ 4.8 I) มีขนาดเล็ก และสั้นกว่ายอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติม Phe และ MeJA หรือเติม Phe เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 4.8 A 4.8 B และ 4.8 C) นอกจากนี้น้ำหนักสดและแห้งของยอดที่พัฒนามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 4.9 A 4.9 B และตารางผนวกที่ ค.3) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติม Phe และ MeJA มีน้ำหนักสดและแห้งสูงสุด



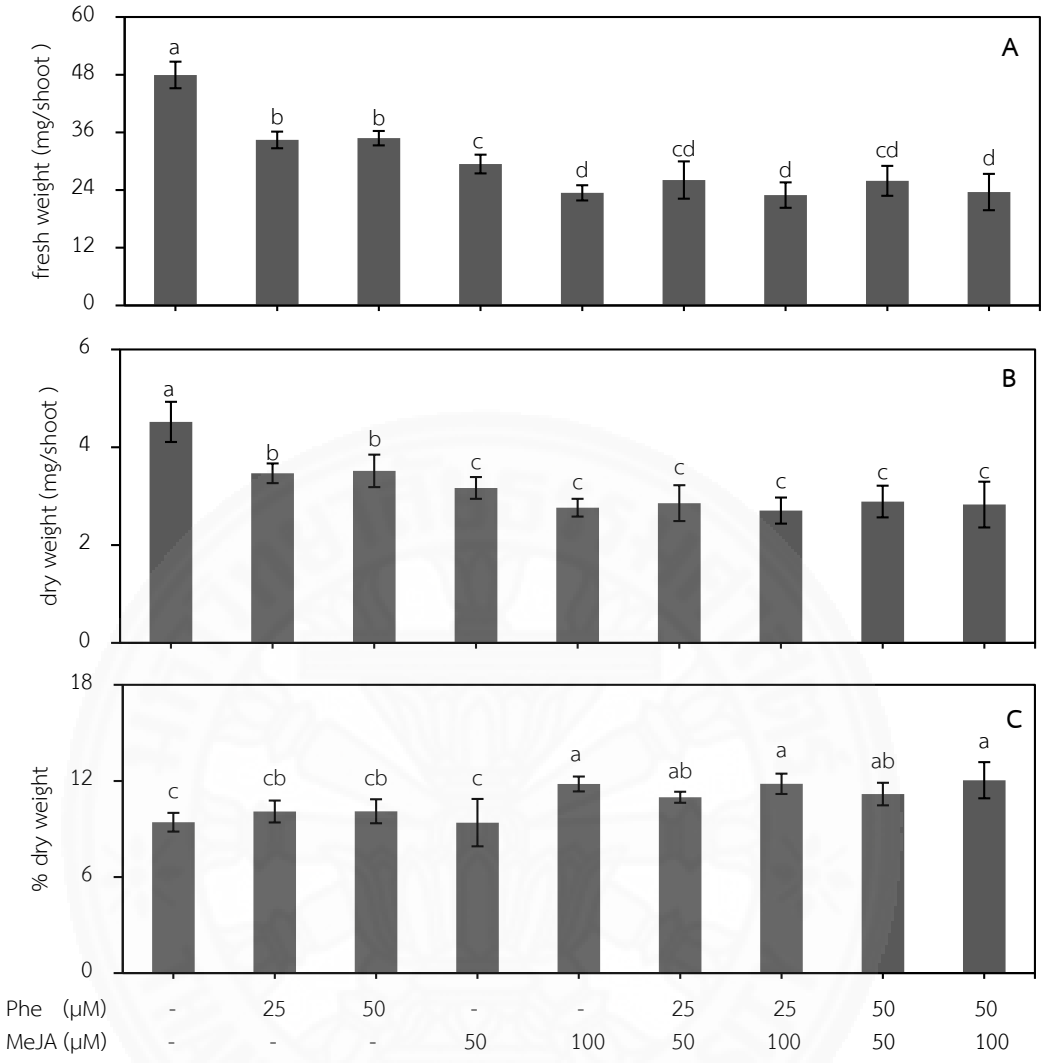
ภาพที่ 4.8 ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM (สิ่งทดลองควบคุม) หรือเติมร่วมกับ Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (scale bar = 1 cm)

Ref. code: 25615909032558LMU

เท่ากับ 47.95±2.76 และ 4.52±0.41 mg/shoot ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่าดังกล่าวของยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม Phe และ MeJA เพียงอย่างเดียว หรือเติม Phe ร่วมกับ MeJA ทุกความเข้มข้น โดยการเติม Phe ความเข้มข้น 25 µM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM ลงในอาหารเพาะเลี้ยงส่งผลให้ยอดที่พัฒนามีน้ำหนักสดและแห้งน้อยที่สุดเท่ากับ 22.96±2.65 และ 2.71±0.27 mg/shoot ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับน้ำหนักสดและแห้งของยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM (23.43±1.58 และ 2.76±0.18 mg/shoot ตามลำดับ) หรือเติม Phe ร่วมกับ MeJA ทุกความเข้มข้น (22.96±2.65 ถึง 26.08±3.88 และ 2.71±0.27 ถึง 2.89±0.32 mg/shoot ตามลำดับ) สำหรับ % น้ำหนักแห้ง พบว่า ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM เพียงอย่างเดียว และเติม Phe ร่วมกับ MeJA ทุกความเข้มข้น มี % น้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันทางสถิติเท่ากับ 10.99±0.34 ถึง 12.05±1.13% ในขณะที่ยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม Phe เพียงอย่างเดียว หรือเติม MeJA ความเข้มข้น 50 µM และสิ่งทดลองควบคุมมี % น้ำหนักแห้งน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเท่ากับ 9.40±1.48 ถึง 10.11±0.75% (ภาพที่ 4.9 C)

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเติม Phe และ MeJA เพียงอย่างเดียวหรือเติมร่วมกันลงในอาหารเพาะเลี้ยงส่งผลต่อการเจริญเติบโตของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเติมสารตั้งต้น และสารกระตุ้นลงในอาหารเพาะเลี้ยงจะทำให้พืชเกิดกระบวนเมตาบอลิซึม (metabolic pathways) ของสารปฐมภูมิลดลง และเกิดการเปลี่ยนแปลงกะทันหันของกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารทุติยภูมิ รวมถึงยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (Yu et al., 2002; Sukito and Tachibana, 2016) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Parale et al. (2010) ที่พบว่า การเพาะเลี้ยงยอดและแคลลัสของพรมมิในอาหารเหลวที่เติม Phe ความเข้มข้น 25-200 µM นาน 4 สัปดาห์ ส่งผลให้ยอดและแคลลัสที่พัฒนามีน้ำหนักแห้งลดลง โดยยอดและแคลลัสที่พัฒนาในอาหารที่เติม Phe ความเข้มข้น 200 µM มีน้ำหนักแห้งลดลง 43 และ 25% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าดังกล่าวของสิ่งทดลองควบคุม หรือ Loc et al. (2014) พบว่า การเติม MeJA ความเข้มข้น 50-250 µM ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Solanum hainanense* Hance เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ส่งผลให้น้ำหนักสดและแห้งของเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นของ MeJA ที่เพิ่มขึ้น (2.29-3.57 g และ 0.34-0.36 g ตามลำดับ) ในขณะที่เซลล์แขวนลอยที่พัฒนาในอาหารที่ไม่เติม MeJA มีน้ำหนักสด (4.98 g) และแห้ง (0.45 g) สูงที่สุด และ Skrzypczak-Pietraszek et al. (2014) ศึกษาการเพาะเลี้ยงยอด *Exacum affine* Balf. f. ex Regel ในอาหารเหลวที่เติม Phe ความเข้มข้น 10 µM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 และ 800 µM เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ยอดมีน้ำหนักแห้งลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม นอกจากนี้

Ref. code: 25615909032558LMU



ภาพที่ 4.9 น้ำหนักสด (A) น้ำหนักแห้ง (B) และ % น้ำหนักแห้ง (C) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 μM (สิ่งทดลองควบคุม) หรือเติมร่วมกับ Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ Phe และ MeJA มีผลอย่างมากต่อการตอบสนองของพืชที่เพาะเลี้ยง ดังเช่น การเติม Phe ความเข้มข้น 25-50 mg/100 ml ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์ของ *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad นาน 6 สัปดาห์ ส่งเสริมให้เซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น (ค่า Growth index; GI เท่ากับ 3.52 และ 4.85 mg/g dw ตามลำดับ) แต่หากเพิ่มความเข้มข้นของ Phe เป็น 75-100 mg/100 ml เซลล์มีการเจริญเติบโตลดลง (ค่า GI เท่ากับ 2.21 และ 1.40 mg/g dw ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (ค่า GI เท่ากับ 3.0 mg/g dw) (Meena et al., 2014) หรือการเติม MeJA ความเข้มข้น 25 μM ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 48

Ref. code: 25615909032558LMU

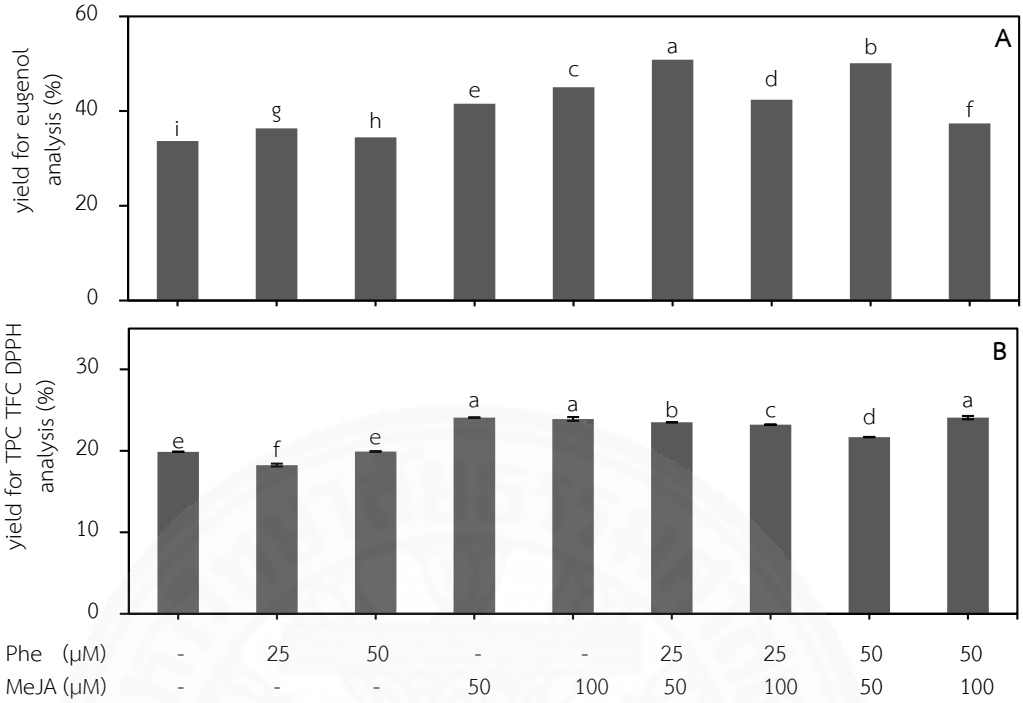
ชั่วโมง ส่งผลให้เซลล์แขวนลอยของโหระพา และกะเพรามีชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 0.95±0.03 และ 0.76±0.01 g FW/5 ml ตามลำดับ แต่หากเพิ่มความเข้มข้นของ MeJA เป็น 50-150 µM เซลล์แขวนลอยดังกล่าวมีชีวมวลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Mathew and Sankar, 2012) ดังนั้นผลของสารตั้งต้นและสารกระตุ้นที่มีต่อการเจริญเติบโตของพืชจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดพืช รูปแบบการเพาะเลี้ยง สูตรอาหารในการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง รวมถึงชนิดและความเข้มข้นของสารตั้งต้นและสารกระตุ้นที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง (วราภรณ์, 2551) ส่วน % น้ำหนักแห้งที่พบว่ายอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM และเติม Phe ร่วมกับ MeJA ทุกความเข้มข้นมีค่าสูงกว่ายอดที่พัฒนาบนอาหารสูตรอื่นๆ นั้น ทั้งนี้เนื่องจากยอดที่พัฒนาบนอาหารดังกล่าวมีน้ำหนักสดลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 4.9 A) ในขณะที่น้ำหนักแห้งลดลงในสัดส่วนที่น้อยกว่าน้ำหนักสด (ภาพที่ 4.9 B) และเมื่อนำมาคำนวณจึงทำให้ยอดที่พัฒนามี % น้ำหนักแห้งมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตรดังกล่าวดูดและสะสมสมน้ำได้น้อยลง

4.3.2 % yield

จากการสกัดสารตัวอย่างยอดกะเพราแดงเพื่อวิเคราะห์สารยูจีนอล พบว่า ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารที่เติม Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มี % yield แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 4.10 A) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม Phe ความเข้มข้น 25 µM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 50 µM มี % yield สูงสุดเท่ากับ 50.84% ในขณะที่ยอดที่พัฒนาอาหารที่ไม่เติม Phe และ MeJA มี % yield น้อยสุดเท่ากับ 33.67%

ส่วน % yield ของสารสกัดตัวอย่างยอดกะเพราแดงเพื่อวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติระหว่างสิ่งทดลองเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 4.10 B) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 50 µM หรือเติม Phe ความเข้มข้น 50 µM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM มี % yield สูงสุดเท่ากับ 24.07±0.02 และ 24.07±0.20% ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับค่าดังกล่าวของยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM ส่วนยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม Phe ความเข้มข้น 25 µM มี % yield น้อยสุดเท่ากับ 18.25±0.17%

Ref. code: 25615909032558LMU



ภาพที่ 4.10 % yield ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 μM (สิ่งทดลองควบคุม) หรือเติมร่วมกับ Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในการวิเคราะห์: A) สารยูจีนอล B) สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

4.3.3 ปริมาณสารยูจีนอล

ปริมาณสารยูจีนอลของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารที่เติม Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 4.11 A และตารางผนวกที่ ค.4) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม Phe ความเข้มข้น 25 μM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 μM มีปริมาณสารยูจีนอลสูงสุดเท่ากับ 223.62±4.97 μg/g dry extract หรือ 15.61 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม อย่างไรก็ตามปริมาณสารดังกล่าวมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติกับยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 μM (208.84±9.07 μg/g dry extract หรือ 14.57 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม) หรือเติม Phe ความเข้มข้น 50 μM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 μM (200.44±4.76 μg/g dry extract หรือ 13.99 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม) ซึ่งสิ่งทดลองควบคุมหรือยอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติม Phe และ MeJA มีปริมาณสารยูจีนอลน้อยที่สุดเท่ากับ 14.33±1.03 μg/g dry extract

Ref. code: 25615909032558LMU

จากผลการทดลองครั้งนี้เห็นได้ว่าการเติม Phe หรือ MeJA เพียงอย่างเดียว และเติม Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ ลงในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถกระตุ้นให้ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อสังเคราะห์สารยูจีนอลเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของวราภรณ์ (2551) ที่กล่าวว่า การเติมสารตั้งต้นและสารกระตุ้นลงในอาหารเพาะเลี้ยงจะทำให้วิถีชีวสังเคราะห์สารทุติยภูมิของพืชเกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้พืชสร้างสารทุติยภูมิที่สำคัญเพิ่มขึ้นได้ และสนับสนุนผลการทดลองของ Al-Jibouri et al. (2016) ที่พบว่า การเติม Phe ความเข้มข้น 100 mg/l ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงแคลลัสของ *V. thapsus* L. เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ ส่งผลให้แคลลัสเกิดการสังเคราะห์สารยูจีนอลเพิ่มขึ้น 40% เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม เช่นเดียวกับ Sharma et al. (2016) ที่พบว่า การเติม Phe ความเข้มข้น 5 mg/l ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงข้อของกะเพรา เป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ ส่งผลให้ให้ยอดที่พัฒนามีปริมาณสารยูจีนอล (10.08 mg/l) สูงกว่ายอดที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (8.5 mg/l) ซึ่งจากการทดลองนี้ พบว่า การเติม Phe ช่วยส่งเสริมให้ยอดกะเพราแดงที่พัฒนามีปริมาณสารยูจีนอลเพิ่มขึ้นได้ แต่ปริมาณสารดังกล่าวมีค่าน้อยกว่ายอดที่ได้รับ MeJA หรือ Phe ร่วมกับ MeJA นอกจากนี้ Matter et al. (2017) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *D. caryophyllus* L. บนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 20 µM เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ ส่งผลให้แคลลัสมีปริมาณสารยูจีนอลสูงสุดเท่ากับ 14.65 µg/100 g calli ส่วนแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารสูตรควบคุมไม่พบการสร้างสารยูจีนอล อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองข้างต้น พบว่า ยอดกะเพราแดงที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ Phe ความเข้มข้น 25 และ 50 µM มีปริมาณสารยูจีนอลสูงกว่ายอดที่ได้รับ Phe เพียงอย่างเดียวหรือได้รับ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 50 µM แสดงให้เห็นว่า ชนิดและความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิดมีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ โดย MeJA เป็นสารกระตุ้นที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการสังเคราะห์สารยูจีนอลของยอดกะเพราแดงได้ดีกว่า Phe ซึ่งเป็นสารตั้งต้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก MeJA เป็นสารกระตุ้นที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณเพื่อกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจง หรือถอดรหัสยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิที่สำคัญ เช่น โพลีฟีนอล (polyphenols) พอลิเพปไทด์ (polypeptides) ควิโนน (quinones) อัลคาลอยด์ เทอร์พีนอยด์ และสารประกอบฟีนิลโพรพานอยด์ (Mizukami et al., 1993; Gang et al., 2001; Zhang and Memelink 2009) จึงทำให้ MeJA สามารถกระตุ้นการสร้างสารยูจีนอลซึ่งเป็นน้ำมันหอมระเหยในกลุ่มของสารประกอบฟีนิลโพรพานอยด์ได้ดี สอดคล้องกับรายงานของ Kim et al. (2009) ที่กล่าวว่า MeJA มีบทบาทในการถ่ายโอนสัญญาณความเครียดไปยังพืช และส่งผลให้กลไกการป้องกันตัวเองของพืชสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (organic volatile compounds) มากขึ้น เช่นเดียวกับ Talebi et al. (2018) ที่รายงานว่า การสเปรย์ MeJA ความเข้มข้น 0.5 mM ลงบนใบของโหระพา 2 สายพันธุ์ คือ *O. basilicum* cv.

Ref. code: 25615909032558LMU

Genove และ cv. Rubi ที่เจริญเติบโตภายใต้สภาวะเครียดจากความเค็ม มีผลทำให้ใบโหระพาทั้ง 2 สายพันธุ์ มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาจากชนิดและความเข้มข้นของ Phe และ MeJA ที่ส่งผลดีต่อการเพิ่มปริมาณสารยูจีนอลแล้ว ควรใช้ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ Phe ความเข้มข้น 25 และ 50 µM

4.3.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

การเติม Phe หรือ MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ส่งผลให้ยอดกะเพราแดงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 4.11 B) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม Phe ความเข้มข้น 25 µM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 192.70±5.00 mg GAE/g dry extract หรือคิดเป็น 2.98 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม และไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณสารดังกล่าวของยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM (190.38±5.76 mg GAE/g dry extract หรือ 2.94 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม) หรือเติม Phe ความเข้มข้น 25 µM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 50 µM (191.40±9.53 mg GAE/g dry extract หรือ 2.96 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม) ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของยอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติม Phe และ MeJA หรือสิ่งทดลองควบคุมมีค่าน้อยที่สุดเท่ากับ 64.66±4.72 mg GAE/g dry extract และไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณสารดังกล่าวของยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม Phe ความเข้มข้น 25 และ 50 µM (66.14±7.55 และ 66.03±1.41 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การเติม Phe ความเข้มข้นต่ำ (25 µM) ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 50 และ 100 µM สามารถส่งเสริมให้ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดได้สูงกว่าการเติมร่วมกับ Phe ความเข้มข้นสูง (50 µM) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้สารตั้งต้นร่วมกับสารกระตุ้นที่ความเข้มข้นสูงเกินไปจะส่งผลให้พืชเกิดสภาวะ antagonistic effect กล่าวคือ สารทั้งสองชนิดเกิดการยับยั้งฤทธิ์กันเอง ทำให้กระบวนการต่างๆ ใน metabolic pathway ถูกยับยั้งพืชจึงสังเคราะห์สารทุติยภูมิลดลง (Ouyang et al., 2005) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงาน Koca and Karaman (2015) ที่พบว่า การนำเมล็ดโหระพามาแช่ในสารละลาย L-Phe ความเข้มข้น 0.05 mM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 0.5 mM นาน 24 ชั่วโมง ส่งผลให้ต้นกล้าที่พัฒนามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (4.80±0.74 mg GAE/g of tissue) สูงกว่าการใช้ L-Phe ความเข้มข้น 0.5 mM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 0.5 mM (3.43±0.14 mg GAE/g of tissue) โดยสิ่งทดลองควบคุมมีปริมาณสารดังกล่าวเท่ากับ 3.99± 0.26 mg GAE/g of tissue อย่างไรก็ตามการใช้สารตั้งต้นร่วมกับสารกระตุ้นความเข้มข้นที่เหมาะสม

Ref. code: 25615909032558LMU

สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์สารทุติยภูมิที่สำคัญได้ เช่น การเพาะเลี้ยงยอด *E. affine* ในอาหารเหลวที่เติม L-Phe ความเข้มข้น 10 µM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM นาน 1-7 วัน ส่งผลให้ยอดที่พัฒนามีปริมาณกรดฟีนอลิคอิสระเพิ่มขึ้น 2.6 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (Skrzypczak-Pietraszek et al., 2014)

ผลการทดลองนี้ยังพบว่า ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีการตอบสนองต่อ MeJA ในการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดได้ดีกว่า Phe ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับปริมาณสารยูจีนอล โดยยอดกะเพราแดงที่ได้รับ MeJA เพียงอย่างเดียวทุกความเข้มข้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดสูงกว่ายอดที่ได้รับ Phe เพียงอย่างเดียว โดย Wang et al. (2015) ได้กล่าวไว้ว่า MeJA ทำหน้าที่กระตุ้นให้กิจกรรมของเอนไซม์ PAL เกิดเพิ่มขึ้น โดยเอนไซม์นี้เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิในกลุ่มฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ อัลคาลอยด์ และฟีนิลโพรพานอยด์ ดังนั้นการที่กิจกรรมของเอนไซม์ PAL เกิดเพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้เนื้อเยื่อพืช หรือเซลล์มีการผลิตสารทุติยภูมิดังกล่าวเพิ่มขึ้นด้วย (Zhao et al., 2005) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Dowom et al. (2017) ที่เพาะเลี้ยงยอด *Salvia virgata* Jacq. อายุ 30 วัน ในอาหารเหลวที่เติม MeJA ความเข้มข้น 11.2-44.8 ppm เป็นเวลา 1-5 วัน พบว่า ยอดที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้น 11.2 ppm เป็นเวลา 3 วัน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 93.66±0.81 mg GAE/g DW หรือคิดเป็น 2.07 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Phyllanthus pulcher* บนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 0.1-10 µM เป็นเวลานาน 30 วัน พบว่า แคลลัสมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ MeJA โดยแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 10 µM มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 2.702±0.005 mg GAE/g DW ส่วนสิ่งทดลองควบคุมมีปริมาณสารดังกล่าวน้อยที่สุดเท่ากับ 1.360±0.001 mg GAE/g DW (Danaee et al., 2015) และ Giri et al. (2012) ศึกษาการเติม MeJA ความเข้มข้น 10-1000 µM ลงในอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัสแขวนลอยของ *Habenaria edgeworthii* Hook. f. ex. Collett เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ พบว่า การเติม MeJA ความเข้มข้น 10 µM ส่งผลให้แคลลัสแขวนลอยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 14.70±0.72 mg GAE/g DW แต่หากเพิ่มความเข้มข้นของ MeJA ส่งผลให้แคลลัสแขวนลอยมีปริมาณสารดังกล่าวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยแคลลัสแขวนลอยที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้น 1000 µM มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดน้อยที่สุดเท่ากับ 2.99±0.08 mg GAE/g DW

Ref. code: 25615909032558LMU

4.3.5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

จากการทดลอง พบว่า ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารที่เติม Phe หรือ MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 4.11 C) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 260.43±7.28 mg CE/g dry extract หรือประมาณ 4.74 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม ในขณะที่การเติม Phe ความเข้มข้น 25 µM ลงในอาหารเพาะเลี้ยง ส่งผลให้ยอดที่พัฒนามีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดน้อยที่สุดเท่ากับ 47.15±3.27 mg CE/g dry extract แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณสารดังกล่าวของยอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติม Phe และ MeJA (54.91±2.72 mg CE/g dry extract) หรือเติม Phe ความเข้มข้น 50 µM (51.95±4.87 mg CE/g dry extract)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า MeJA สามารถกระตุ้นให้ยอดกะเพราแดงสร้างและสะสมสารสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดได้ดีกว่า Phe เช่นเดียวกับสารยูจีนอล และสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Danaee et al. (2015) ที่เพาะเลี้ยงแคลลัสของ *P. pulcher* บนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 10 µM เป็นเวลานาน 30 วัน พบว่าแคลลัสมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 4.370±0.009 mg RE/g DW หรือ 1.96 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม (2.234±0.006 mg RE/g DW) นอกจากนี้ Wang et al. (2015) พบว่า การเติม MeJA ความเข้มข้น 100 µmol/l ลงในอาหารในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *H. perforatum* ส่งผลให้เซลล์แขวนลอยสร้างสารฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น 2.7 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม และ Dowom et al. (2017) พบว่า การเพาะเลี้ยงยอด *S. virgata* อายุ 30 วัน ในอาหารเหลวที่เติม MeJA ความเข้มข้น 11.2 ppm เป็นเวลา 3 วัน สามารถกระตุ้นให้ยอดที่พัฒนามีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 7.47±0.09 mg QUE/g DW หรือ 1.46 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม แต่หากเพิ่มความเข้มข้นของ MeJA เป็น 22.4 และ 44.8 ppm ส่งผลให้ยอดมีปริมาณสารดังกล่าวลดลง (7.25±0.06 และ 6.70±0.15 mg QUE/g DW ตามลำดับ) ถึงแม้ว่า Phe จะไม่ส่งเสริมการสร้างและสะสมสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในยอดกะเพราแดงแต่มีผลดีกับพืชบางชนิด ดังรายงานของ Tan and Mahmmod (2013) ที่พบว่า การเติม Phe ความเข้มข้น 60 mg/l ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *C. asiatica* นาน 12 วัน สามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้างสารฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นสูงสุด 11.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม เช่นเดียวกับยอดหัวข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.) ที่พัฒนาบนอาหารที่เติม Phe ความเข้มข้น 100 mg/l นาน 4 สัปดาห์ พบว่ามีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 59.51±6.13 mg CE/g dry extract หรือประมาณ 1.34 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (เจิมอรุณ, 2560)

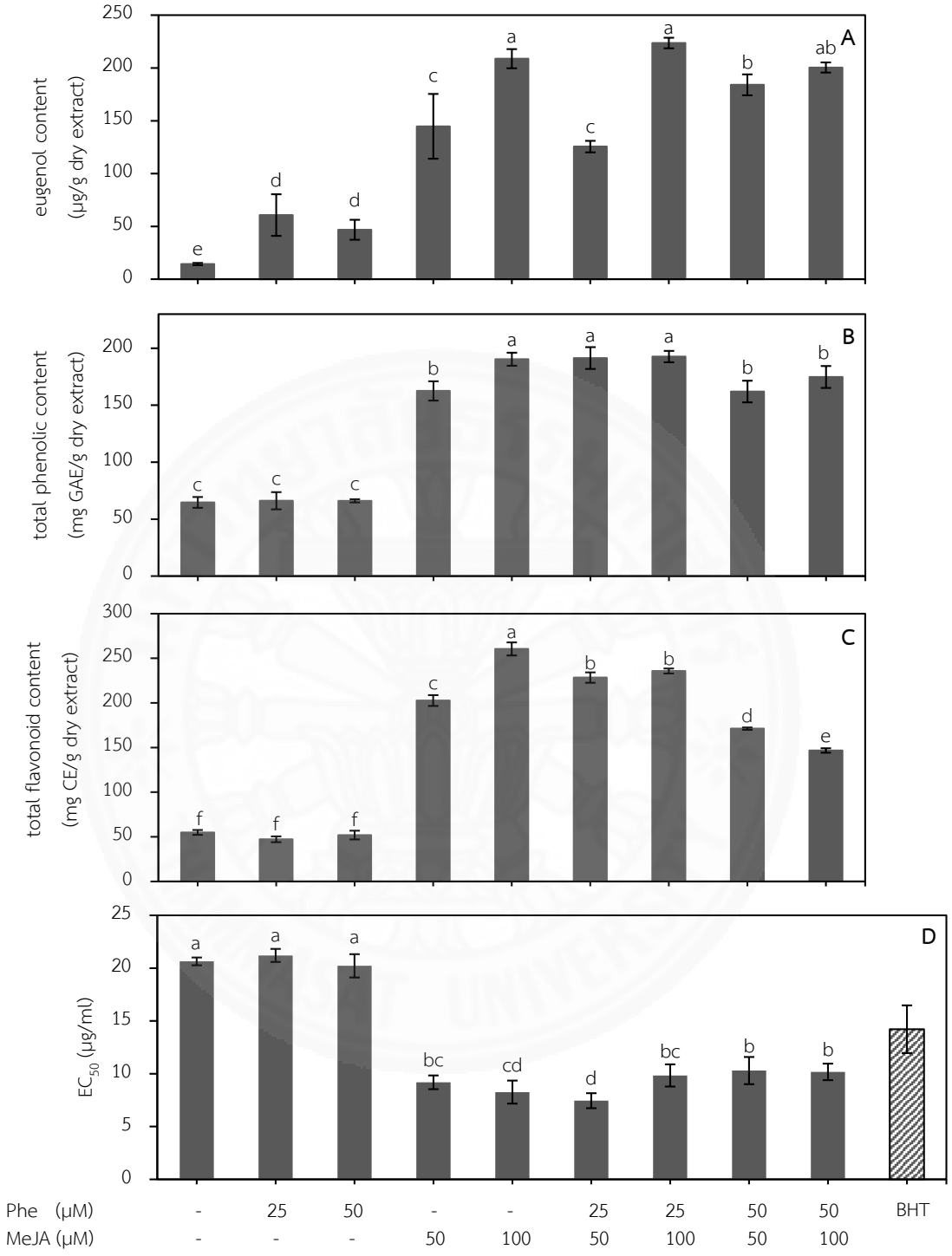
Ref. code: 25615909032558LMU

4.3.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ยอดกะเพราแดงที่พัฒนามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี Phe หรือ MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ นาน 3 สัปดาห์ (ภาพที่ 4.11 D) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม Phe ความเข้มข้น 25 µM ร่วมกับกับ MeJA ความเข้มข้น 50 µM มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 7.45±0.71 µg/ml แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวของยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM (ค่า EC_{50} เท่ากับ 8.26±1.09 µg/ml) ในขณะที่การเติม Phe ความเข้มข้น 25 และ 50 µM ส่งผลให้ยอดที่พัฒนามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 21.20±0.62 และ 20.22±1.10 µg/ml ตามลำดับ) แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวของยอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติม Phe และ MeJA (ค่า EC_{50} เท่ากับ 20.64±0.37 µg/ml) นอกจากนี้จากการทดลองยังพบว่า ยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA เพียงอย่างเดียว หรือเติม Phe ร่วมกับ MeJA ทุกความเข้มข้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (ค่า EC_{50} เท่ากับ 7.45±0.71 ถึง 10.30±1.29 µg/ml) ดีกว่า BHT ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (ค่า EC_{50} เท่ากับ 14.21±2.26 µg/ml)

จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่า ยอดกะเพราแดงที่ได้รับ MeJA ทุกความเข้มข้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่ายอดที่ได้รับ Phe ทั้งนี้อาจเนื่องจาก MeJA มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้ยอดกะเพราแดงสังเคราะห์และสะสมสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด รวมถึงสารปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Meyer et al., 1997; Pietta, 2000; Atsumi et al., 2005) ดังนั้นการที่มีปริมาณสารดังกล่าวเพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้นด้วย ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Danaee et al. (2015) ที่พบว่า การเติม MeJA ความเข้มข้น 0.1-10 µM ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงแคลลัสของ *P. pulcher* เป็นเวลานาน 30 วัน สามารถกระตุ้นให้แคลลัสที่พัฒนามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้นตามความเข้มข้นของ MeJA โดยแคลลัสที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 10 µM มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด เท่ากับ 90.086±0.413 % เช่นเดียวกับการสเปรย์ MeJA ความเข้มข้น 0.5 mM ลงบนใบของโหระพา 2 สายพันธุ์ คือ *O. basilicum* cv. Genove และ cv. Rubi ที่เจริญเติบโตภายใต้สภาวะเครียดจากความเค็ม พบว่า ใบโหระพาทั้ง 2 สายพันธุ์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Talebi et al., 2018) และ Giri et al. (2012) พบว่า การเติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM ลงในอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัสแขวนลอยของ *H. edgeworthii* ส่งผลให้แคลลัสแขวนลอยมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดเท่ากับ 1.23 mM AAE/100 g DW แต่หากเพิ่มความเข้มข้นของ MeJA ส่งผลให้แคลลัสแขวนลอยมีปริมาณสาร

Ref. code: 25615909032558LMU



ภาพที่ 4.11 A) ปริมาณสารยูจีนอล B) สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด C) สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และ D) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC50) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความ เข้มข้น 2.22 µM (สิ่งทดลองควบคุม) หรือเติมร่วมกับ Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

Ref. code: 25615909032558LMU

ดังกล่าวลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การตอบสนองต่อสารกระตุ้นในการสร้างสารทุติยภูมิ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด นอกจากนี้ปัจจัยภายในพืช และสภาพการเพาะเลี้ยงถือเป็นอีกปัจจัยที่สำคัญต่อประสิทธิภาพของสารกระตุ้น (วราภรณ์, 2551)

4.3.7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารที่เติม Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณสารยูจีนอลมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (r เท่ากับ 0.901) และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (r เท่ากับ 0.826) แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (r เท่ากับ -0.843) (ตารางที่ 4.2) แสดงให้เห็นว่า เมื่อยอดกะเพราแดงมีปริมาณสารยูจีนอลเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น รวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้น นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของยอดกะเพราแดงมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (r เท่ากับ 0.950) และสารทั้งสองมีความสัมพันธ์เชิงลบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (r เท่ากับ -0.969 และ -0.939 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่า เมื่อยอดกะเพราแดงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้นด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการ

ตารางที่ 4.2 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 μM (สิ่งทดลองควบคุม) หรือเติมร่วมกับ Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

	eugenol content	total phenolic content	total flavonoid content	DPPH
eugenol content	-	0.901**	0.826**	-0.843**
total phenolic content		-	0.950**	-0.969**
total flavonoid content			-	-0.939**
DPPH				-

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

Ref. code: 25615909032558LMU

ทดลองใน 4.2.7 และรายงานของ Danaee et al. (2015) ที่พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นในแคลลัสของ *P. pulcher* ส่งผลให้แคลลัสมีเปอร์เซ็นต์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน

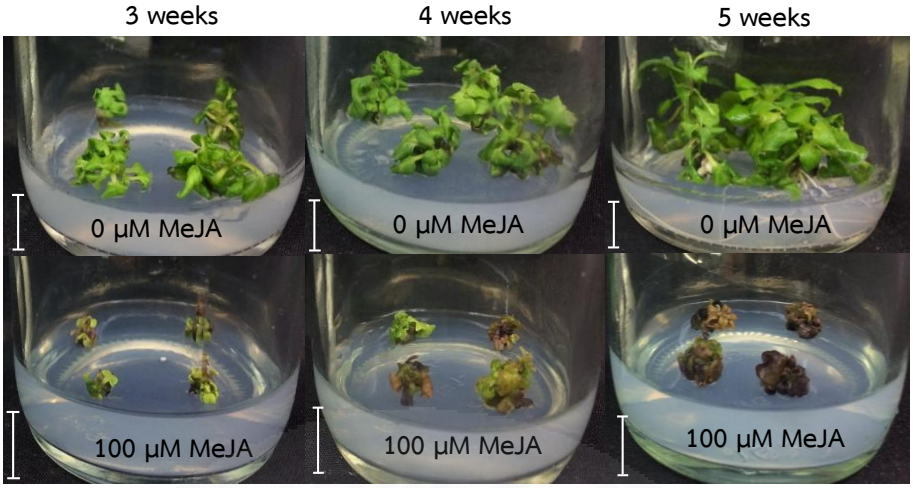
จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า ควรใช้ MeJA ความเข้มข้น 100 µM ในการเพาะเลี้ยงยอดกะเพราแดงเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ เนื่องจากสามารถกระตุ้นให้ยอดกะเพราแดงสร้างสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น อีกทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีโดยไม่จำเป็นต้องเติม Phe ร่วมด้วย อย่างไรก็ตามนอกจากชนิดและความเข้มข้นของสารกระตุ้นแล้ว ระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในส่งเสริมให้เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเกิดการสังเคราะห์และสะสมสารทุติยภูมิได้อย่างมีประสิทธิภาพ (วราภรณ์, 2551) ดังนั้นจึงได้ศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการได้รับ MeJA เพื่อเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อต่อไป

4.4 ผลของระยะเวลาที่ได้รับ MeJA ต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดง

4.4.1 การเจริญเติบโตของยอด

จากการเพาะเลี้ยงข้อกะเพราแดงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ พบว่า ยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA มีขนาดเล็ก และสั้นกว่ายอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติม MeJA ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเท่ากัน โดยยอดเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อได้รับ MeJA นาน 5 สัปดาห์ ในขณะที่การได้รับ MeJA นาน 3-4 สัปดาห์ ยอดที่พัฒนายังคงมีสีเขียว (ภาพที่ 4.12) เมื่อนำน้ำหนักสดและแห้งมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเติม MeJA และระยะเวลาที่ได้รับ MeJA ต่อน้ำหนักสดและแห้งของยอดกะเพราแดง (ตารางที่ 4.3 และตารางผนวกที่ ค.5) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติม MeJA เป็นเวลา 5 สัปดาห์ มีน้ำหนักสด และแห้งสูงสุดเท่ากับ 82.63±7.86 และ 9.58±0.43 mg/shoot ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่าดังกล่าวของสิ่งทดลองอื่นๆ ส่วนยอดที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีน้ำหนักสดและแห้งน้อยที่สุดเท่ากับ 23.89±3.41 และ 3.15±0.31 mg/shoot ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับน้ำหนักสดและแห้งของยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (26.94±1.29 และ 3.70±0.12 mg/shoot ตามลำดับ) หรือกล่าวได้ว่า ยอดกะเพราแดงที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM นาน 3-5 สัปดาห์ มีน้ำหนักสด (23.89±3.41 ถึง 29.26±2.06 mg/shoot) และแห้ง (3.15±0.31 ถึง 4.12±0.46 mg/shoot) น้อยกว่ายอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่

Ref. code: 25615909032558LMU



ภาพที่ 4.12 ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ (scale bar = 1 cm)

เติม MeJA เป็นระยะเวลานานเท่ากัน (51.49±6.21 ถึง 82.63±7.86 mg/shoot และ 4.94±0.40 ถึง 9.58±0.43 mg/shoot) (ภาพที่ 4.13 A และ 4.13 B) สำหรับ % น้ำหนักแห้ง พบว่า ไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเติม MeJA และระยะเวลาที่ได้รับ MeJA (ตารางที่ 4.3) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM มี % น้ำหนักแห้งเท่ากับ 13.69±0.61% ซึ่งสูงกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่าดังกล่าวของยอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติม MeJA (10.65±1.25%) นอกจากนี้การได้รับ MeJA นาน 5 สัปดาห์ ส่งผลให้ยอดที่พัฒนามี % น้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 12.87±1.65% แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับค่าดังกล่าวของยอดที่ได้รับ MeJA นาน 4 สัปดาห์ (12.19±1.78%)

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า การเติม MeJA ลงในอาหารเพาะเลี้ยงส่งผลต่อการเจริญเติบโตของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับผลการทดลองใน 4.3.1 โดย Yu et al. (2002) ได้กล่าวว่า การเติมสารกระตุ้นบางชนิดลงในอาหารเพาะเลี้ยง จะส่งผลให้พืชมีกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารประกอบปฐมภูมิลดลง และเกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารทุติยภูมิ รวมทั้งยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช อย่างไรก็ตามการเติมสารกระตุ้น MeJA จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้น และระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นด้วย ซึ่งได้มีรายงานการศึกษาถึงผลของความเข้มข้น และระยะเวลาในการได้รับกระตุ้น MeJA ต่อการเจริญเติบโตของอวัยวะพืชหรือเซลล์พืชที่เพาะเลี้ยงแล้ว เช่น การเติม MeJA ความเข้มข้น 50 µM ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของยี่หร่าเป็นเวลานาน 8 ชั่วโมง สามารถส่งเสริมให้เซลล์มีชีวมวลสูงสุด (1.46±0.10 g

Ref. code: 25615909032558LMU

ตารางที่ 4.3 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และ % น้ำหนักแห้ง ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์

MeJA (µM)	elicitation time (weeks)	fresh weight (mg/shoot)	dry weight (mg/shoot)	% dry weight
0		67.36±14.55[1/a]	7.08±2.09[a]	10.65±1.25[b]
100		26.70±3.13[b]	3.66±0.51[b]	13.69±0.61[a]
	3	37.69±15.76[c]	4.05±1.03[c]	11.45±2.08[b]
	4	47.44±22.64[b]	5.21±1.75[b]	12.19±1.78[ab]
	5	55.95±29.68[a]	6.85±3.02[a]	12.87±1.65[a]
MeJA (M)		**	**	**
elicitation time (E)		**	**	*
M X E		**	**	ns
C.V. (%)		10.14	9.17	5.90

[1/]ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งตามอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT

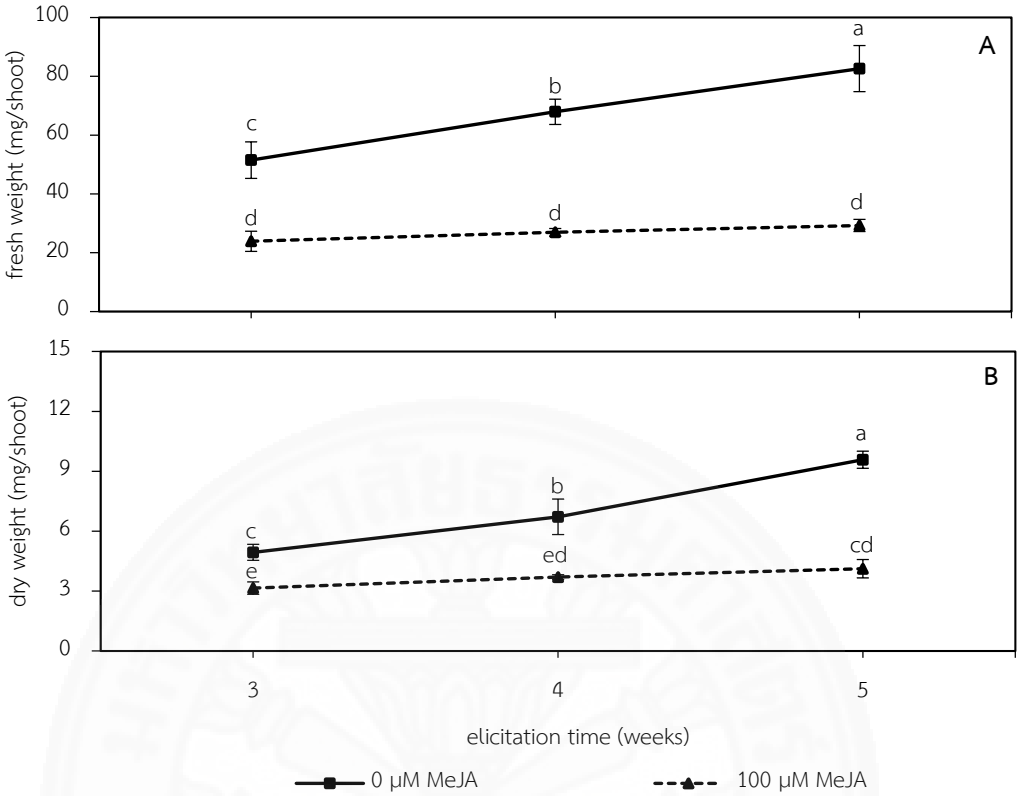
* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01)

ns ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

FW/5 ml) แต่หากเพิ่มความเข้มข้นของ MeJA เป็น 150 µM และได้รับนาน 12 ชั่วโมง ส่งผลให้เซลล์มีชีวมวลน้อยที่สุด (0.60±0.02 g FW/5 ml) (Mathew and Sankar, 2012) เช่นเดียวกับ Krzyanowska et al. (2011) ที่พบว่า หลังการเติม MeJA ความเข้มข้น 50-200 µM ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของสะระแหน่ (*Mentha × piperita*) นาน 6 ชั่วโมง เซลล์เริ่มมีการเจริญเติบโตลดลง จากนั้นน้ำหนักแห้งของเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็วตามระยะเวลาที่ได้รับสารกระตุ้น โดยเซลล์ที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้น 200 µM นาน 6-72 ชั่วโมง มีน้ำหนักแห้งลดลงเท่ากับ 10-12% เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม หรือ Kang et al. (2004) พบว่า การเพาะเลี้ยงรากของ *S. parviflora* อายุ 2 สัปดาห์ ในอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 0.01-0.1 mM เป็นเวลา 0.5-72 ชั่วโมง ไม่มีผลเสียต่อดัชนีการเจริญเติบโตของราก แต่หากเพิ่มความเข้มข้นของ MeJA เป็น 2.0 mM

Ref. code: 25615909032558LMU



ภาพที่ 4.13 น้ำหนักสด (A) และน้ำหนักแห้ง (B) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์

ส่งผลให้รากมีการเจริญเติบโตลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับสารกระตุ้น โดยรากที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้น 2.0 mM เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง มีดัชนีการเจริญเติบโตลดลง 63% เมื่อเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม นอกจากนี้ค่าชีวมวลของเซลล์แขวนลอย *Thevetia peruviana* ที่เจริญเติบโตในอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 1-5 µM นาน 24 ชั่วโมง (7.934±0.150 ถึง 8.386±0.146 g DW/l) และ 96 ชั่วโมง (8.742±0.358 ถึง 9.674±1.400 g DW/l) มีค่าน้อยกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับ MeJA ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเท่ากัน (10.850±1.282 และ 11.263±0.499 g DW/l ตามลำดับ) (Mendoza et al., 2018) เช่นเดียวกับ Krishnan et al. (2018) ที่พบว่า การเติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงยอด *Ophiorrhiza mungos* L. var. *angustifolia* (Thw.) Hook. f. เป็นเวลานาน 24-96 ชั่วโมง ส่งผลให้ยอดที่พัฒนามีน้ำหนักแห้ง (0.29±0.01 ถึง 0.33±0.01 mg) น้อยกว่ายอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรควบคุม (0.34±0.13 ถึง 0.39±0.04 mg) และยอด *E. affine* Balf. f. ex Regel ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม MeJA ความเข้มข้น 800 µM เป็นเวลา 3-7 วัน

Ref. code: 25615909032558LMU

มีน้ำหนักแห้งลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับสารกระตุ้น และมีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (Skrzypczak-Pietraszek et al., 2014) ดังนั้นความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงมากหรือน้อยแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับพืชแต่ละชนิด (วราภรณ์, 2551) ส่วน % น้ำหนักแห้งก็ให้ผลเช่นเดียวกับการทดลอง 4.3.1 กล่าวคือ ยอดที่ได้รับ MeJA มี % น้ำหนักแห้งสูงกว่ายอดที่ไม่ได้รับ MeJA นอกจากนี้ยอดที่ได้รับ MeJA เป็นระยะเวลานาน (4 และ 5 สัปดาห์) มี % น้ำหนักแห้งสูงกว่ายอดที่ได้รับ MeJA ในระยะเวลาสั้น (3 สัปดาห์) ทั้งนี้อาจเนื่องจากยอดที่ได้รับ MeJA และได้รับเป็นเวลานานดูดและสะสมน้ำลดลง

4.4.2 % yield

จากการสกัดสารตัวอย่างยอดกะเพราแดงเพื่อวิเคราะห์สารยูจีนอล พบว่า มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเติม MeJA และระยะเวลาที่ได้รับ MeJA ต่อ % yield ของสารสกัด (ตารางที่ 4.4) โดยยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติม MeJA เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ มี % yield สูงสุดเท่ากับ 49.38% ส่วนยอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติม MeJA เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ มี % yield น้อยที่สุดเท่ากับ 44.90% (ภาพที่ 4.14)

ส่วน % yield ของสารสกัดเพื่อวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า ไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเติม MeJA และระยะเวลาที่ได้รับ MeJA (ตารางที่ 4.4) นอกจากนี้ระยะเวลาที่ได้รับ MeJA ก็ไม่มีผลต่อ % yield โดยยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 3-5 สัปดาห์ มี % yield เท่ากับ 24.14±1.31 ถึง 25.63±4.07% แต่ยอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติม MeJA มี % yield เท่ากับ 27.11±2.97% ซึ่งสูงกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่าดังกล่าวของยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM (22.93±1.15%)

4.4.3 ปริมาณสารยูจีนอล

จากการทดลอง พบว่า มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเติม MeJA และระยะเวลาที่ได้รับ MeJA ต่อปริมาณสารยูจีนอลของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ (ตารางที่ 4.5 และตารางผนวกที่ ค.6) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ มีปริมาณสารยูจีนอลสูงสุดเท่ากับ 344.64±9.32 µg/g dry extract หรือสูงกว่า 1.76 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับ MeJA นาน 4 สัปดาห์ เช่นเดียวกับยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ ก็สามารถสร้างสารยูจีนอลเพิ่มขึ้นได้โดยมีค่าเท่ากับ 164.32±6.86 µg/g dry extract ซึ่งสูงกว่า 2.03 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับ MeJA นาน 3 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามการเติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM ลงในอาหารเพาะเลี้ยงยอดเป็นเวลานาน 5 สัปดาห์

Ref. code: 25615909032558LMU

ตารางที่ 4.4 % yield ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ เพื่อวิเคราะห์สารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (TPC) สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

MeJA (µM)	elicitation time (weeks)	% yield for eugenol analysis	% yield for TPC TFC DPPH analysis
0		46.47 [b]	27.11±2.97[a]
100		47.02[a]	22.93±1.15[b]
	3	45.32[c]	25.63±4.07
	4	48.90[a]	24.14±1.31
	5	46.02[b]	25.29±3.32
MeJA (M)		**	**
elicitation time (E)		**	ns
M X E		**	ns
C.V. (%)		0.00	7.73

[1/]ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งตามอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT

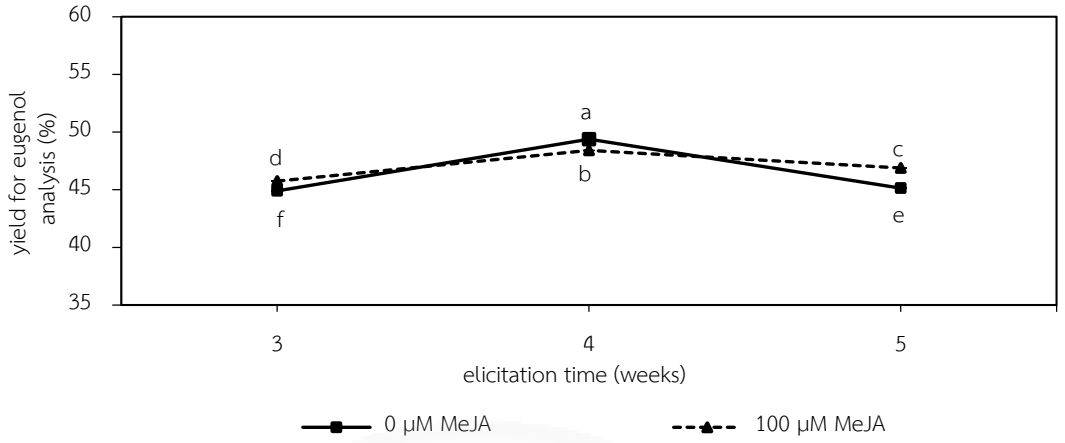
** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01)

ns ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ส่งผลให้ยอดที่พัฒนามีปริมาณสารยูจีนอลน้อยที่สุดเท่ากับ 76.78±0.55 µg/g dry extract ซึ่งน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่าดังกล่าวของยอดที่ไม่ได้รับ MeJA นาน 5 สัปดาห์ (256.52±4.41 µg/g dry extract) (ภาพที่ 4.15 A)

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาที่ได้รับ MeJA มีผลต่อการสร้างและสะสมสารยูจีนอล โดยยอดกะเพราแดงได้รับ MeJA นาน 3-4 สัปดาห์ สามารถส่งเสริมให้ยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อสังเคราะห์สารยูจีนอลเพิ่มขึ้นได้ ทั้งนี้เนื่องจาก MeJA ทำหน้าที่ส่งสัญญาณเพื่อกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (Hayashi et al., 2003) อีกทั้งยังถ่ายโอนสัญญาณความเครียดไปยังพืช และกระตุ้นให้กลไกการป้องกันตัวเองของพืชสร้างสารทุติยภูมิในกลุ่มสารประกอบฟีนิลโพรพานอยด์ ฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ และอัลคาลอยด์เพิ่มขึ้น (Kim et al., 2009) แต่ยอดกะเพราแดงได้รับ MeJA เป็นระยะเวลานานเกินไปคือ 5 สัปดาห์

Ref. code: 25615909032558LMU



ภาพที่ 4.14 % yield สำหรับวิเคราะห์สารยูจีนอลของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์

กลับมีปริมาณสารยูจีนอลลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเซลล์พืชได้รับความเครียดจากการกระตุ้นด้วย MeJA เป็นเวลานานจนเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เกิดความเสียหายสารทุติยภูมิที่สังเคราะห์ได้จึงถูกขับออกจากเซลล์มาสะสมอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง ทำให้สารทุติยภูมิที่สกัดได้จากพืชมีปริมาณน้อยลง (Kang et al., 2004, Piątczak et al., 2016) ซึ่งผลการทดลองนี้สนับสนุนรายงานของ Rao and Ravishankar (2002) ที่ได้กล่าวว่า สารกระตุ้นสามารถกระตุ้นให้เซลล์ หรืออวัยวะของพืชที่เพาะเลี้ยงสร้างสารทุติยภูมิได้ตลอดเวลาที่เนื้อเยื่อพืชสัมผัสกับสารกระตุ้น แต่ปริมาณสารที่ได้จะแตกต่างกันไปตามระยะเวลาที่รับสารกระตุ้น โดยระยะเวลาที่ได้รับสารกระตุ้นที่เหมาะสมจะส่งผลให้เซลล์หรืออวัยวะของพืชที่เพาะเลี้ยงตอบสนองต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิได้สูงสุด และสามารถสร้างสารทุติยภูมิได้มากที่สุด (Hayashi et al., 2003) ซึ่งระยะเวลาที่เหมาะสมนี้จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารนั้นๆ (วราภรณ์, 2551) ดังรายงานการศึกษาที่ใช้ MeJA เป็นสารกระตุ้น แต่ระยะเวลาที่เหมาะสมก็แตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด เช่น การเติม MeJA ความเข้มข้น 20 µM ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงแคลลัสของ *D. caryophyllus* L. เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ ส่งผลให้แคลลัสมีปริมาณสารยูจีนอลสูงสุดเท่ากับ 14.65 µg/100 g calli แต่ปริมาณสารดังกล่าวลดลงเมื่อได้รับ MeJA ความเข้มข้นและระยะเวลาเพิ่มขึ้น (Matter et al., 2017) หรือในสารทุติยภูมิชนิดอื่นๆ พบว่า MeJA ก็สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างและสะสมเพิ่มมากขึ้น เช่น สารเอเชียติโคไซด์ในรายงานของ Kim et al. (2004) ที่พบว่า การเพาะเลี้ยงยอด *C. asiatica* อายุ 5 สัปดาห์ในอาหารเหลวที่เติม MeJA ความเข้มข้น 0.1 mM เป็นเวลานาน 3-36 วัน ส่งเสริมให้ใบที่พัฒนามีปริมาณสาร asiaticoside เพิ่มขึ้นตามระยะที่ได้รับ MeJA โดยใบที่ได้รับ MeJA นาน 36 วัน มีปริมาณสาร

Ref. code: 25615909032558LMU

ดังกล่าวสูงสุดเท่ากับ 50.38 mg/g DW หรือประมาณ 3.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม หรือสารไฮออสไซยามีนของราก *S. Parviflora* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 0.01 mM เป็นเวลา 0.5-72 ชั่วโมง พบว่า รากค่อยๆ มีปริมาณสารดังกล่าวเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสารกระตุ้นในช่วงแรก โดยรากที่ได้รับ MeJA นาน 24 ชั่วโมง มีปริมาณสารดังกล่าวเพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 180% เมื่อเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม จากนั้นปริมาณสารดังกล่าวจะลดลงอย่างรวดเร็วตามระยะเวลาที่ได้รับ MeJA (Kang et al., 2004) นอกจากนี้จากการศึกษาผลของ MeJA ต่อปริมาณสารบาโคไซด์ เอ ของยอดพรมมิ พบว่า ยอดอายุ 1 เดือนที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้น 50 µM นาน 1 สัปดาห์ มีปริมาณสารดังกล่าวสูงสุดเท่ากับ 4.4±0.01 mg/g DW หรือเพิ่มขึ้น 1.8 เท่าเมื่อเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (2.27±0.01 mg/g DW) (Sharma et al., 2013) เช่นเดียวกับ Krzyanowska et al. (2011) ที่ศึกษาการเพิ่มปริมาณกรดโรสมารินิคในเซลล์แขวนลอยของสะระแหน่ที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้น 50-200 µM นาน 6-72 ชั่วโมง พบว่า เซลล์มีปริมาณสารดังกล่าวสูงสุดเท่ากับ 117.95 mg/g DW หรือประมาณ 1.5 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม หลังได้รับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM นาน 24 ชั่วโมง

4.4.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

จากการทดลอง พบว่า มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเติม MeJA และระยะเวลาที่ได้รับ MeJA ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของยอดกะเพราแดง (ตารางที่ 4.5) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 177.59±2.58 mg GAE/g dry extract หรือประมาณ 1.23 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับ MeJA นาน 4 สัปดาห์ ส่วนยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลานาน 3 และ 5 สัปดาห์ ก็สามารถกระตุ้นให้ยอดสร้างสารดังกล่าว (130.94±8.61 และ 150.68±8.36 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ) เพิ่มขึ้นได้เท่ากับ 1.22 และ 1.03 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับ MeJA เป็นระยะเวลานานเท่ากัน (107.27±5.70 และ 145.51±4.75 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ) (ภาพที่ 4.15 B)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การเติมสารกระตุ้น MeJA ความเข้มข้น 100 µM ลงในอาหารเพาะเลี้ยงนาน 3-4 สัปดาห์ สามารถส่งเสริมให้ยอดกะเพราแดงสร้างสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดได้เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารยูจีนอลในผลการทดลอง 4.4.3 โดย MeJA ส่งสัญญาณเพื่อกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ รวมถึงถ่ายโอนสัญญาณการกระตุ้นกลไกการป้องกันตนเอง ซึ่งระยะเวลาที่ได้รับ MeJA นาน 4 สัปดาห์ เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้ยอดกะเพราแดงสร้างสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีปริมาณสารดังกล่าวเพิ่มขึ้นสูงสุด ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับพืชหลายชนิดที่ใช้ MeJA ในการกระตุ้นเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิค

Ref. code: 25615909032558LMU

ทั้งหมด แต่ระยะเวลาที่เหมาะสมก็แตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ดังรายงานของ Gumerova et al. (2014) ที่พบว่า เซลล์แขวนลอยของ *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. สามารถสร้างสารประกอบฟีนอลิคได้เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับ MeJA ความเข้มข้น 10 µM นาน 4-14 วัน โดยเซลล์ที่ได้รับ MeJA นาน 4 วัน มีปริมาณสารดังกล่าวสูงสุด ซึ่งสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุมถึง 50 % เช่นเดียวกับการเติม MeJA ความเข้มข้น 11.2-44.8 ppm ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงยอด *S. Virgate* เป็นเวลานาน 1-5 วัน พบว่า การเติม MeJA ความเข้มข้น 11.2 ppm เป็นเวลานาน 3 วัน ส่งผลให้ยอดมีปริมาณสารดังกล่าวสูงสุดเท่ากับ 93.66±0.81 mg GAE/g DW หรือเพิ่มขึ้น 2.07 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม (45.06±0.41 mg GAE/g DW) (Dowom et al., 2017) นอกจากนี้เซลล์แขวนลอยของถั่วเหลือง (*Glycine max*) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดเพิ่มขึ้นหลังได้รับ MeJA ความเข้มข้น 50-200 µM เป็นเวลานาน 3-15 วัน โดยการเติม MeJA ความเข้มข้น 50 µM เป็นเวลานาน 6 วัน สามารถกระตุ้นให้เซลล์สังเคราะห์สารดังกล่าวได้สูงสุด (81.161 mg GAE/100 g DW) หรือประมาณ 1.79 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (45.308 mg GAE/100 g DW) (Rungruang et al., 2015) และจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Artemisia absinthium* L. อายุ 14 วัน ในอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 0.5-2.0 mg/l เป็นเวลานาน 3-39 วัน พบว่า เซลล์ที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้น 1.0 mg/l นาน 21 วัน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 6.70 mg GAE/g DW แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ MeJA เป็น 2.0 mg/l เซลล์มีปริมาณสารดังกล่าว (5.29 mg GAE/g DW) ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม (5.32 mg GAE/g DW) (Ali et al., 2014)

4.4.5 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

จากผลการทดลอง พบว่า มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเติม MeJA และระยะเวลาที่ได้รับ MeJA ต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของยอดกะเพราแดง (ตารางที่ 4.5) โดยการเติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ ส่งผลให้ยอดที่พัฒนามีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 187.93±5.93 mg CE/g dry extract หรือมากกว่าสิ่งทดลองควบคุมที่ระยะเวลาเดียวกัน 1.52 เท่า แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณสารดังกล่าวของยอดที่พัฒนาบนอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ (179.94±4.84 mg CE/g dry extract) ที่มากกว่าสิ่งทดลองควบคุมที่ระยะเวลาเดียวกัน 1.32 เท่า ในขณะที่ยอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติม MeJA เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ มีปริมาณสารดังกล่าวน้อยที่สุดเท่ากับ 118.54±2.36 mg CE/g dry extract อย่างไรก็ตามยอดที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลานาน 5 สัปดาห์ ส่งผลให้มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (130.22±3.31 mg CE/g dry extract) ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับยอดที่ไม่ได้รับ MeJA นาน 5 สัปดาห์ (157.96±7.87 mg CE/g dry extract) (ภาพที่ 4.15 C)

Ref. code: 25615909032558LMU

จากการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การได้รับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM นาน 3-4 สัปดาห์ เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมให้ยอดกะเพราแดงสร้างสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น แต่หากยอดได้รับ MeJA เป็นระยะเวลานานเกินไป (5 สัปดาห์) จะส่งผลเสียต่อการสร้างสารดังกล่าวซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับปริมาณสารยูจีนอลใน 4.4.3 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานการเติม MeJA ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่างๆ เพื่อเพิ่มปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในพืชหลายชนิดซึ่งระยะเวลาที่เหมาะสมก็ขึ้นอยู่กับชนิดพืช เช่น การเติม MeJA ความเข้มข้น 11.2 ppm ลงในอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงยอด *S. virgata* เป็นเวลา 1 และ 3 วัน พบว่า สามารถกระตุ้นให้ยอดที่พัฒนามีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (6.06±0.06 และ 7.47±0.09 mg QUE/g DW ตามลำดับ) เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุมที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเท่ากัน (4.73±0.10 และ 5.63±0.03 mg QUE/g DW ตามลำดับ) แต่เมื่อยอดได้รับ MeJA นาน 5 วัน ปริมาณสารดังกล่าวลดลง (5.21±0.06 mg QUE/g DW) เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุมที่ไม่ได้รับ MeJA นาน 5 วัน (5.64±0.05 mg QUE/g DW) (Dowom et al., 2017) หรือเซลล์แขวนลอยของ *A. absinthium* L. เมื่อได้รับ MeJA ความเข้มข้น 1.0 mg/l เป็นเวลานาน 3-39 วัน พบว่า เซลล์มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าสิ่งทดลองควบคุมที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลาเท่ากัน โดยเซลล์ที่ได้รับ MeJA นาน 30 วัน มีปริมาณสารดังกล่าวสูงสุดเท่ากับ 2.19 mg QE/g DW (Ali et al., 2014) นอกจากนี้ Wang et al. (2015) ได้ศึกษาถึงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย *H. perforatum* ที่เหมาะสมต่อการเติม MeJA ลงในอาหารเพาะเลี้ยง พบว่า เซลล์ที่ได้รับ MeJA ความเข้มข้น 100 µmol/l ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นช่วงที่พืชมีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะ exponential phase และได้รับ MeJA เป็นเวลา 5 วัน เซลล์สามารถสร้างสารฟลาโวนอยด์ได้สูงสุด (38.26 mg/g DW) หรือประมาณ 2.7 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม แต่หากเพิ่มระยะเวลาที่ได้รับ MeJA เป็น 10 วัน เซลล์สร้างสารดังกล่าวได้ลดลง

4.4.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากการทดลอง พบว่า มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเติม MeJA และระยะเวลาที่ได้รับ MeJA ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดง (ตารางที่ 4.5) โดยยอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติม MeJA เป็นเวลานาน 5 สัปดาห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 11.52±0.41 µg/ml แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับค่าดังกล่าวของยอดที่พัฒนาบนอาหารไม่เติม MeJA นาน 4 สัปดาห์ (ค่า EC_{50} เท่ากับ 12.23±0.58) หรือเติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลานาน 3 4 และ 5 สัปดาห์ (ค่า EC_{50} เท่ากับ 11.72±0.47 11.59±0.69 และ 11.89±0.83 µg/ml ตามลำดับ) นอกจากนี้ยอดที่พัฒนาบนอาหารสูตรดังกล่าวยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่า BHT ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (ค่า EC_{50} เท่ากับ 14.51±0.50 µg/ml) ส่วนยอดที่พัฒนาบนอาหารที่ไม่เติม MeJA เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำที่สุดโดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 14.70±0.24 µg/ml (ภาพที่ 4.15 D)

Ref. code: 25615909032558LMU

ตารางที่ 4.5 ปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นระยะเวลานาน 3 4 และ 5 สัปดาห์

MeJA (µM)	elicitation time (weeks)	eugenol content (µg/g dry extract)	TPC content (mg GAE/g dry extract)	TFC content (mg CE/g dry extract)	EC_{50} (µg/ml)
0		177.82±77.39[1/b]	132.29±19.21[b]	139.47±18.17[b]	12.82±1.49[a]
100		195.25±118.42[a]	153.07±21.19[a]	166.03±27.40[a]	11.73±0.60[b]
	3	122.64±46.01[c]	119.10±14.51[c]	149.24±33.81[b]	13.21±1.66[a]
	4	270.32±81.74[a]	160.84±18.54[a]	164.92±26.05[a]	11.91±0.66[b]
	5	166.65±98.49[b]	148.09±6.71[b]	144.09±16.13[b]	11.71±0.62[b]
MeJA (M)		**	**	**	**
elicitation time (E)		**	**	**	**
M X E		**	*	**	**
C.V. (%)		3.30	4.10	3.88	4.59

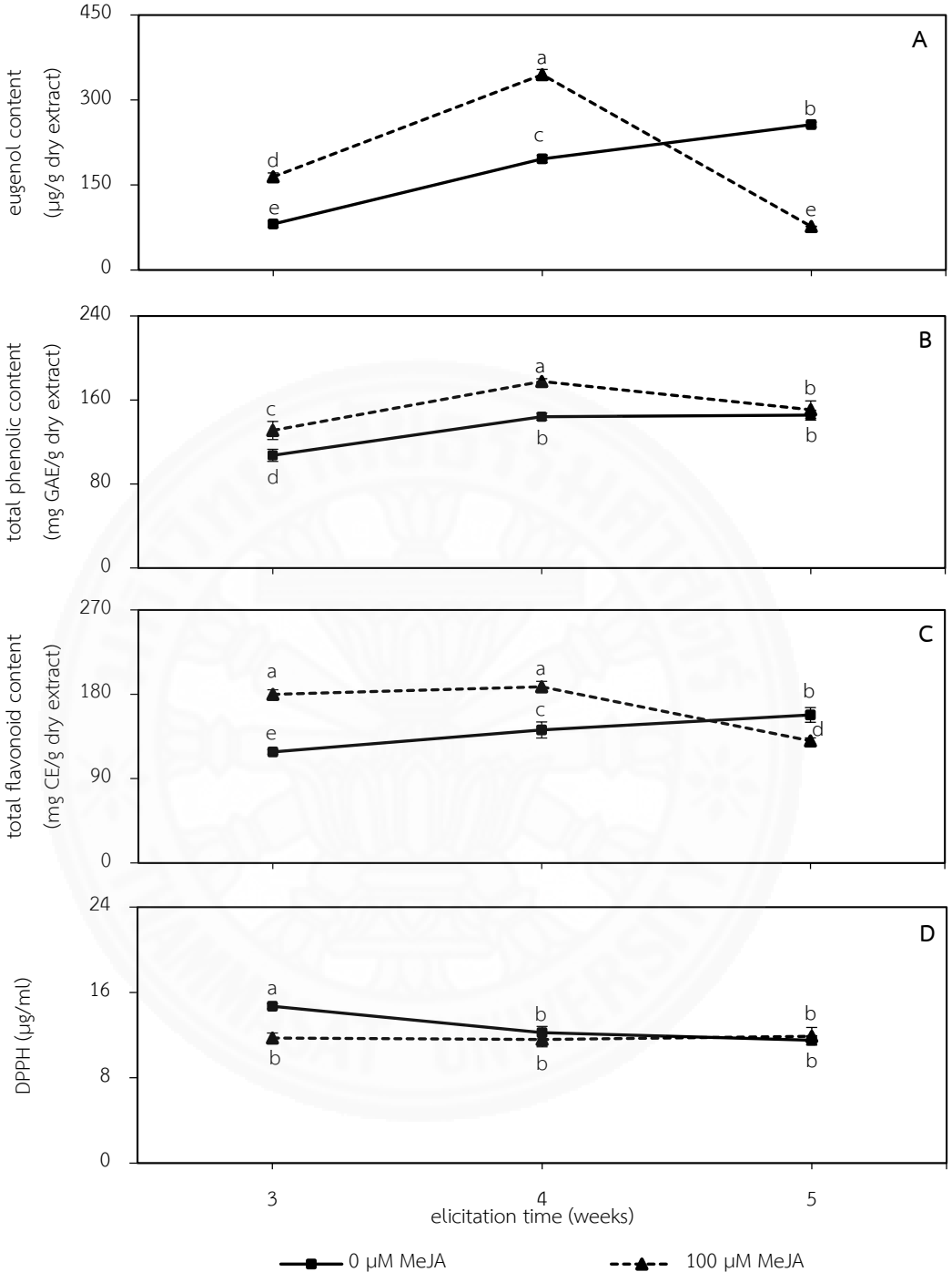
[1/]ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งตามอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$)

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การเติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลานาน 4-5 สัปดาห์ ไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ แต่หากกระตุ้นที่ระยะเวลาสั้น (3 สัปดาห์) สามารถส่งเสริมให้ยอดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม อย่างไรก็ตามความเข้มข้น และระยะเวลาที่รับสารกระตุ้นที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป เช่น ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) ที่พบว่า ยอดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุดเมื่อได้รับ JA ความเข้มข้น 100 µM นาน 5 สัปดาห์ (ค่า EC_{50} เท่ากับ 62.30±4.05 µg/ml) (ทิพย์สุคนธ์, 2557) และการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลืองในอาหารที่เติม MeJA ความเข้มข้น 50-200 µM เป็นเวลานาน

Ref. code: 25615909032558LMU



ภาพที่ 4.15 A) ปริมาณสารยูจีนอล B) สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด C) สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และ D) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์

Ref. code: 25615909032558LMU

3-15 วัน พบว่า เซลล์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุมที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเท่ากัน โดยการเติม MeJA ความเข้มข้น 50 µM เป็นเวลานาน 6 วัน สามารถส่งเสริมให้เซลล์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (86.11 µg TE/100 g DW) เพิ่มขึ้น 2.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ที่พัฒนาในอาหารที่ไม่เติม MeJA เป็นเวลานาน 6 วัน (Rungruang et al., 2015)

4.4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณสารยูจีนอลมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (r เท่ากับ 0.72) และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (r เท่ากับ 0.77) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แต่ปริมาณสารยูจีนอลมีความสัมพันธ์เชิงลบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (r เท่ากับ -0.54) (ตารางที่ 4.6) แสดงให้เห็นว่า เมื่อยอดกะเพราแดงมีปริมาณสารยูจีนอลเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น รวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้น นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของยอดกะเพราแดงมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (r เท่ากับ 0.59) อย่างไรก็ตามสารทั้งสองมีความสัมพันธ์เชิงลบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (r เท่ากับ -0.66 และ -0.64 ตามลำดับ) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เมื่อยอดกะเพราแดงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้นด้วย ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับการทดลองใน 4.2.7 และ 4.3.7

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดงเมื่อได้รับสารกระตุ้น MeJA ความเข้มข้น 0 และ 100 µM เป็นเวลานาน 3-5 สัปดาห์ สามารถสรุปได้ว่า การได้รับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM นาน 4 สัปดาห์ เป็นความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้ยอดที่พัฒนามีปริมาณสารยูจีนอล (344.64±9.32 µg/g dry extract) สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (177.59±2.58 mg GAE/g dry extract) และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (187.93±5.93 mg CE/g dry extract) เพิ่มขึ้นสูงสุด อีกทั้งยังส่งเสริมให้ยอดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดี (ค่า EC_{50} เท่ากับ 11.59±0.69 µg/ml)

Ref. code: 25615909032558LMU

ตารางที่ 4.6 ค่าสหสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลา 3 4 และ 5 สัปดาห์

	eugenol content	total phenolic content	total flavonoid content	DPPH
eugenol content	-	0.72**	0.77**	-0.54*
total phenolic content		-	0.59*	-0.66**
total flavonoid content			-	-0.64**
DPPH				-

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

จากการวิเคราะห์ต้นทุนการผลิตยอดกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของกะเพราแดงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ ใช้ต้นทุนในการผลิตทั้งหมดเท่ากับ 6.34 บาท/ยอด หรือประมาณ 481.84 บาท/g (ตารางผนวกที่ ง.1) ถึงแม้ว่าต้นทุนการผลิตในสภาพปลอดเชื้อจะสูงกว่าการปลูกในสภาพธรรมชาติ (3.25 บาท/g) (ตารางผนวกที่ ง.2) แต่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพิ่มจำนวนต้นกะเพราแดงให้ได้จำนวนมากในระยะเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งน้อยกว่าการเพาะปลูกตามธรรมชาติที่ใช้เวลานานถึง 4 เดือน นอกจากนี้ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูง และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าใบจากต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ปริมาณสารดังกล่าวไม่แปรผันตามสภาพภูมิประเทศและสภาพภูมิอากาศ (วราภรณ์, 2551) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตสารทุติยภูมิจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่นิยมใช้ผลิตสารที่สำคัญจากพืชสมุนไพรสำหรับนำสารสกัดที่ได้มาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ และภาคอุตสาหกรรม

Ref. code: 25615909032558LMU

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. อาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนยอดของกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยชิ้นส่วนยอดและข้อ คือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM

2. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีค่ามากกว่า รวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ โดยยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 5 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด แต่ใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารยูจีนอลสูงกว่ายอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ

3. ในการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิโดยเติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM เพียงอย่างเดียวลงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ สามารถกระตุ้นให้ยอดกะเพราที่พัฒนาสร้างและสะสมสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น อีกทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดี

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาเพิ่มเติมถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวน และขนาดของยอดและใบกะเพราแดง เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งในการผลิตสารทุติยภูมิต่อไป

2. ศึกษาเพิ่มเติมถึงการได้รับสารกระตุ้นชนิดอื่น เช่น Salicylic acid (SA) Chitosan หรือสารสกัดจากยีสต์ หรือใช้สารกระตุ้นเหล่านี้ร่วมกับ MeJA ที่ความเข้มข้นต่างๆ และระยะเวลานานต่างกัน เพื่อส่งเสริมให้ยอดกะเพราแดงมีปริมาณสารทุติยภูมิที่สำคัญ เช่น สารยูจีนอลเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับใบกะเพราแดงที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ รวมถึงส่งเสริมให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้น

Ref. code: 25615909032558LMU

3. ควรนำสารสกัดที่ได้จากยอดกะเพราที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อไปทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพื่อรักษาอาการอักเสบ โรคเบาหวาน หรือโรคมะเร็ง เป็นต้น รวมถึงนำยอดหรือสารสกัดกะเพราแดงไปใช้เป็นส่วนประกอบของยา เช่น ยาประสะกะเพรา ยาลดเบาหวาน ยาปรับสมดุลฮอร์โมนเพศหญิง หรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์แคปซูลกะเพราสำหรับรับประทานเพื่อรักษาโรคต่างๆ

Ref. code: 25615909032558LMU

รายการอ้างอิง

กนกวรรณ ส่งเสริม. 2560. ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงและ Salicylic Acid ต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกล้วยหอมทอง (*Musa acuminate* AAA group 'Gros Michel') ในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

กิตติยา มาตรา. 2560. การชักนำให้เกิดแคลลัสและปริมาณสารทุติยภูมิในแคลลัสของกะเพราแดง. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 162 หน้า.

เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. 2554. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์. 1: 59-70.

เจิมอรุณ อุทัยแจ่มศรีผล. 2560. ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นของ Phenylalanine ต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของยอดหัวข้าวเย็นเหนือในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์. 2544. เครื่องมือวิทยาศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 3. โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา, ขอนแก่น. 375 หน้า.

โชติอนันต์ อินทุไสตระกูล. 2552. สรรพคุณสมุนไพรไทย. ภูมิปัญญา, กรุงเทพฯ. 256 หน้า.

ณัฏฐา พรอำนาจ. 2555. 49 สมุนไพรใกล้ตัว สารพัดรักษาโรค. ณ ดา สำนักพิมพ์, กรุงเทพฯ. 208 หน้า.

ทิพย์สุคนธ์ บุญยืน. 2557. ผลของ Jasmonic acid และ Salicylic acid ต่อปริมาณ Dioscorealide B ในการเพาะเลี้ยงยอดของข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

นพดล จรัสสัมฤทธิ์. 2537. ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. สำนักพิมพ์รั้วเขียว, กรุงเทพฯ. 128 หน้า.

นาตยา มนตรี และสุกัญญา แสนภักดี. 2557. ผลของ paclobutrazol ต่อการเจริญเติบโต และการสะสมสาร stemona alkaloids รวมของรากหนอนตายหยากในสภาพปลอดเชื้อ. แก่นเกษตร. 42: 249-257.

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2547. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช. โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา, ขอนแก่น. 168 หน้า.

บุหรัน พันธุ์สวรค์ร. 2556. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 21: 275-286.

Ref. code: 25615909032558LMU

ปพิชญา ขวานทอง. 2559. ผลของ Phenylalanine และ Jasmonic acid ต่อปริมาณสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ของแคลลัสกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) ในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

พยุงศักดิ์ ตันติไพบูลย์วงศ์ และสุรศักดิ์ ใจเขียนดี. 2555. การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลดีพีพีเอชและการฟอกสีอนุมูลเอบีทีเอส, หน้า 21-26. *ใน*: ชลธิดา เทพหินลัพ (บรรณาธิการ). เทคนิคในการตรวจวัดอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และดัชนีภาวะเครียดออกซิเดชัน. บริษัท นพบุรีการพิมพ์ จำกัด, เชียงใหม่.

พิชญ์อร ไหมสุทธิสกุล. 2549. การใช้สารประกอบฟีนอลิกของพืชเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. 26: 222-238.

พีรเดช ทองอำไพ. 2529. ฮอร์โมนและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. ไดนามิคการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 196 หน้า.

ไมตรี สุทธจิตต์. 2555. ความรู้พื้นฐานของออกซิเดชัน, หน้า 1-14, *ใน*: วรพล เองวานิช (บรรณาธิการ). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ. สำนักพิมพ์นวัตกรรมสุขภาพ, เชียงใหม่.

แม้น อมรสิทธิ์. 2555. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ, จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 623 หน้า.

ยศกร ยศชาติ อรพิน เกิดชูชื่น ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์ และ แฟรงก์ บี. มาทา. 2558. ผลของสารควบคุมการเจริญในพืช และการสร้างสารหอมระเหยในกะเพราแดง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 46: 189-192.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 หน้า.

วราภรณ์ ฉุยฉาย. 2553. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์, นครสวรรค์. 147 หน้า.

วราภรณ์ ภูตะลุน. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา. ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา, ขอนแก่น. 120 หน้า.

วิภพ สุทธนะ. 2556. ฤทธิ์ต้านมะเร็งของฟลาโวนอยด์ กลไกการออกฤทธิ์. ศรีนครินทร์เวชสาร. 28: 567-582.

วิโรจน์ สุ่มใหญ่. 2551. วิตามินและโภชนาบำบัด ศาสตร์มหัศจรรย์ชะลอความชรา. บริษัทอมรินพริ้นติ้ง แอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. 240 หน้า.

Ref. code: 25615909032558LMU

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. สถาบันราชภัฏอุดรธานี, อุดรธานี. 308 หน้า.

ศุภวรรณ บุญระเทพ. 2549. การผลิตสารทุติยภูมิโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และเทคโนโลยีชีวภาพ. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์. 20: 185-196.

สุกัญญา เขียวสะอาด. 2555. กะเพรากับการต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง. 2: 54-65.

อนันต์ สกุลกิม. 2551. อนุมูลอิสระ สารอันตรายต่อสุขภาพและร่างกาย. ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์. 8: 28-33.

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. โรงพิมพ์อติสรรค์, นครราชสีมา. 133 หน้า.

อุบลทิพย์ สุพรรณานนท์. 2520. การศึกษาการผลิตและการส่งเสริมการจำหน่ายกานพลูในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

เอมอมร ตรีภิญโญยศ. 2551. รู้จักอนุมูลอิสระ. บริษัทเอ็ดดูเคชั่นไมน์ดไลน์ มัลติมีเดีย จำกัด, กรุงเทพฯ. 128 หน้า.

โอภา วัชระคุปต์ ปรีชา บุญจูง จันทนา บุณยะรัตน์ และมาลีรัตน์ อัตต์สินทอง. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. พี.เอส.พริ้นท์, กรุงเทพฯ. 200 หน้า.

อ. อรรถสิทธิ์. 2551. สมุนไพรในครัว บำบัดโรค บำรุงร่างกาย. สำนักพิมพ์อุทยานความรู้, นนทบุรี. 135 หน้า.

Abeda, H. Z., Kouassi, M. K., Yapo, K. D., Koffi, E., Sie, R. S., Kone, M. and Kouakou, H. T. 2014. Production and enhancement of anthocyanin in callus line of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). Int. J. Rec. Biotech. 2: 45-56.

Abyari, M., Nasr, N., Soorni, J. and Sadhu, D. 2016. Enhanced accumulation of scopoletin in cell suspension culture of *Spilanthes acmella* Murr. using precursor feeding. Braz. Arch. Biol. Technol. 55: 1-7.

Afzali, D., Zarei, S., Fathirad, F. and Mostafavi, A. 2014. Gold nanoparticles modified carbon paste electrode for differential pulse voltammetric determination of eugenol. Mater. Sci. Eng. C. 43: 97-101.

Ali, M., Abbasi, B. H. and Ali, G. S. 2014. Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. Plant Cell Tissue Organ Cult. 120: 1099-1106.

Ref. code: 25615909032558LMU

Al-Jibouri, A. M. J., Abed, A. S., Ali, A. A. and Majeed, D. M. 2016. Improvement of phenols production by amino acids in callus cultures of *Verbascum thapsus* L. Am. J. Plant. Sci. 7: 84-91.

Al-Owaisi, M., Al-Hadiwi, N. and Khan, S. A. 2014. GC-MS analysis, determination of total phenolics, flavonoid content and free radical scavenging activities of various crude extracts of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori leaves. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 4: 964-970.

Anand, A., Jayaramaiah, R. H., Beedkar, S. D., Singh, P. A., Joshi R. S., Mulani, F. A., Dholakia, B. B., Punekar, S. A., Gade, W. N., Thulasiram. H. V. and Giri, A. P. 2016. Comparative functional characterization of eugenol synthase from four different *Ocimum* species: Implications on eugenol accumulation. Biochim. Biophys. Acta. 1864: 1539-1547.

Anbarasu, K. and Vijayalakshmi, G. 2007. Improved shelf life of protein-rich tofu using *Ocimum sanctum* (tulsi) extracts to benefit Indian rural population. J. Food Sci. 72: 300-305.

Arafa, N. M., Ibrahim, M. M. and Aly, U. I. 2015. Evaluation of total phenolic contents and antioxidant activity of carrot callus extracts as affected by phenylalanine precursor. Plant Tissue Cult. Biotech. 25: 207-221.

Atsumi, T., Fujisawa, S. and Tonosaki, K. 2005. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. Toxicol. In Vitro. 19: 1025–1033.

Awuah, R. T. and Ellis, W. O. 2002. Effects of some groundnut packing methods and protection with *Ocimum* and *Syzygium* powders on kernel infection by fungi. Mycopathologia.154: 264-269.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils-A review. Food Chem. Toxicol. 46: 446-475.

Banthorpe, B. V. 1994. Secondary metabolism in plant tissue culture: scope and limitations. Nat. Prod. Rep. 11: 303-328.

Ref. code: 25615909032558LMU

Banu, L. A. and Bari, M. A. 2007. Protocol establishment for multiplication and regeneration of *Ocimum sanctum* L. an important medicinal plant with high religious value in Bangladesh. J. Plant Sci. 2: 530-537.

Banu, L. A., Bari, M. A. and Haque, E. 2001. *In vitro* propagation of *Ocimum sanctum* L. through nodal explants. Bangladesh J. Genet. Biotechnol. 2: 143-146.

Beckman, K. B. and Ames, B. N. 1998. The free radical theory of aging matures. Physiol. Rev. 78: 547-581.

Bhuvaneshwari, K., Gokulanathan, A., Jayanthi, M., Govindasamy, V., Milella, L., Lee, S., Yang, D. C. and Girija, S. 2016. Can *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L. *in vitro* culture be a potential source of secondary metabolites?. Food Chem. 194: 55-60.

Bodhipadma, K., Noichinda, S. and Kludnin, S. 2005. Eugenol production from holy basil (*Ocimum sanctum* L. cv. Dang) tissue culture. J. Appl. Sci. 4: 57-66.

Bonnefont-Rousselot, D. 2002. Glucose and reactive oxygen species. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 5: 561-568.

Bunrathep, S., Lockwood, G. B., Songsak, T. and Ruangrungsi, N. 2016. Chemical constituents from leaves and cell cultures of *Pogostemon cablin* and use of precursor feeding to improve patchouli alcohol level. Sci. Asia. 32: 293-296.

Bunrathep, S., Palanuvej, C. and Ruangrungsi, N., 2007. Chemical composition and antioxidative activities of essential oils from four *Ociumum* spcies endemic to Thailand. J. Health Res. 21: 201-206.

Çetin, E. S. and Baydar, N. G. 2014. Elicitor applications to cell suspension culture for production of phenolic compounds in grapevine. J. Agric. Sci. 22: 42-53.

Cheong, J. J. and Choi, Y. D. 2003. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. Trends Genet. 19: 409-413.

Collin, H. A. 2001. Secondary product formation in plant tissue culture. Plant Growth Regul. 34: 119-134.

Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiol. 12: 564-582.

Ref. code: 25615909032558LMU

Cui, H., Yuan, L., Li, W. and Lin, L. 2017. Antioxidant property of SiO_2-eugenol liposome loaded nanofibrous membranes on beef. Food Packing and Shelf Life. 11: 49-57.

Cunha, L. D., McFall, A. J. and Mackay, D. 2006. Innate immunity in plant: a continuum of layered defenses. Microbes Infect. 8: 1372-1381.

Danaee, M., Farzinebrahimi, R., Kadir, M. A., Sinniah, U. R., Mohamad, R. and Taha, R. M. 2015. Effects of MeJA and SA elicitation on secondary metabolic activity, antioxidant content and callogenesis in *Phyllanthus pulcher*. Braz. J. Bot. 38: 265–272.

Dechsupa, S., Kothan, S., Vergote, J., Leger, G., Martineau, A., Berangeo, S., Kosanlavit, R., Moretti, J. L. and Mankhetkorn, S. 2007. Quercetin, samois 1 and siamois 2 induce apoptosis in human breast cancer MDA-mB-435 cells xenograft *in vivo*. Cancer Biol. Ther. 6: 56-61.

Devendran, G. and Balasubramanian, U. 2011. Qualitative phytochemical screening and GC-MS analysis of *Ocimum sanctum* L. leaves. Asian J. Plant Sci. Res. 1:44-48.

Diwan, R., Shinde, A. and Malpathak, N. 2012. Phytochemical composition and antioxidant potential of *Ruta graveolens* L. *in vitro* culture lines. J. Bot. 1: 1-6.

Dowom, S. A., Abrishamchi, P., Radjabian, T. and Salami, S. A. 2017. Enhanced phenolic acids production in regenerated shoot cultures of *Salvia virgata* Jacq. after elicitation with Ag+ions, methyl jasmonateand yeast extract. Ind. Crops Prod. 103: 81-88.

El-Moneim Hegazi, G. A. and El-Lamey, T. M. 2011. *In vitro* production of some phenolic compounds from *Ephedra alata* Decne. J. Appl. Environ. Biol. Sci. 1: 158-163.

Esmaeili, A. K., Taha, R. M., Mohajer, S. and Banisalam, B. 2016. *In vitro* regeneration and comparison of phenolic content, antioxidant and antityrosinase activity of *in vivo* and *in vitro* grown *Asparagus officinalis*. Sains Malays. 45: 373–381.

Evans, D. E., Coleman, J. O. D. and Kearns, A. 2003. Plant Cell Culture. BIOS scientific publishers, New York. 194 p.

Ref. code: 25615909032558LMU

Ferreyra, M. L. F., Rius, S. P. and Casati, P. 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. Front. Plant Sci. 3: 1-15.

Figueiró, A. D. A., Correa, C. M., Astarita, L. V. and Santarém, E. R. 2010. Long-term maintenance of *in vitro* cultures affects growth and secondary metabolism of St. John's Wort. Cienc. Rural. 40: 2115-2121.

Folin, O. and Ciocalteu, V. 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. J. Biol. Chem. 73: 627-650.

Funk, C. and Brodelius, P. E. 1990. Phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia* Andr. II. effect of precursor feeding and metabolic inhibitors. Plant Physiol. 94: 95-101.

Gang, D. R., Wang, J., Dudareva, N., Nam K. H., Simon, J. E., Lewinsohn, E. and Pichersky, E. 2001. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. Plant Physiol. 125: 539-555.

Giri, L., Dhyani, P., Rawat, S., Bhatt, I. D., Nandi, S. K., Rawal, R. S. and Pande, V. 2012. *In vitro* production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *Habenaria edgeworthii*: A rare Himalayan medicinal orchid. Ind. Crops Prod. 39: 1-6.

Grzagorczyk, I. and Wysokińska, H. 2009. The effect of methyl jasmonate on production of antioxidant compounds in shoot cultures of *Salvia officinalis* L. Herba Pol. 55: 238-243.

Gumerova, E. A., Akulov, A. N. and Rumyantseva, N. I. 2014. Effect of methyl jasmonate on growth characteristics and accumulation of phenolic compounds in suspension culture of tartary buckwheat. Russ. J. Plant Physiol. 62: 195-203.

Gupta, S. K., Prakash, J. and Sriuastava, S. V. 2002. Validation of claim of tulsi, *Ocimum sanctum* Linn. as a medicinal plant. Indian J. Exp. Biol. 40: 765-773.

Hakkim, F. L., Shankar, C. G. and Girija, S. 2007. Chemical composition and antioxidant property of holy basil (*Ocimum santum* L.) leaves, stems and inflorescence and their *in vitro* callus cultures. J. Agric. Food. Chem. 55: 9109-9119.

Ref. code: 25615909032558LMU

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1989. Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd edition. Oxford Clarendon Press, Oxford. 543 p.

Halliwell, B., 1999. Antioxidant defense mechanism: from the beginning to the end. Soc. Free Radic. Biol. Med. 31: 261-272.

Harborne, J. B. and Williams, C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry. 55: 481-504.

Hariprasath, L., Jegadeesh, R., Arjun, P. and Raaman, N. 2015. *In vitro* propagation of *Senecio candicans* DC and comparative antioxidant properties of aqueous extracts of the *in vivo* plant and *in vitro*-derived callus. S. Afr. J. Bot. 98: 134-141.

Hassan, S. M., Al Aqil, A. A. and Attimarad, M. 2013. Determination of crude saponin and total flavonoids content in guar meal. Adv. Med. Plant Res. 1: 24-28.

Hayashi, H., Huang, P. and Inoue, K. 2003. Up-regulation of soyasaponin biosynthesis by methyl jasmonate in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra*. Plant Cell Physiol. 44: 404-411.

Helmja, K., Vaher, M., Gorbatsova, J. and Kaljurand, M. 2007. Characterization of bioactive compounds contained in vegetables of the Solanaceae family by capillary electrophoresis. Proc. Estonian Acad. Sci. Chem. 56: 172-186.

Hopkins, W. G. and Hüner, N. P. A. 2009. Introduction to Plant Physiology. 4th edition. John Wiley and Sons, USA. 503 p.

Hu, G., Zeng, Q., Hu, Y., Shen, X. and Song, J. 2014. Determination of eugenol by using a Briggs Rauscher system catalyzed by a macrocyclic nickel (II) complex. Electrochim. Acta. 136: 33-40.

Hückenlhoven, R. 2007. Transport and secretion in plant-microbe interaction. Curr. Opin. Plant Biol. 10: 563-579.

Inam, F., Deo, S. and Narkhede, N. 2014. HPLC –UV method development and quantification of eugenol from methanolic extracts of some spices. J. Chem. Biol. Phys. Sci. 3: 96-102.

Iqbal, N., Umar, S., Khan, N. A. and Khan, M. I. R. 2014. A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism. Environ. Exp. Bot. 100: 34-42.

Ref. code: 25615909032558LMU

Jadhav, B. K., Khaandelwal, K. R., Ketakr, A. R. and Pisal, S. S. 2004. Formulation and evaluation of mucoadhesive tablets containing eugenol for treatment of periodontal diseases. Drug dev. Ind. Pharma. 30: 195-203.

Jaiarree, N. 2010. Biological activities of *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill extract and its active ingredients. Disseration in Medical Science, Thammasat University.

Jamal, M. A. H M., Sharif, I. H., Shakil, Md. M., Rahman, A. N. M. R., Banu, N. A., Islam, Md. R. and Nazmuzzaman, Md. 2016. *In vitro* regeneration of a common medicinal plant, *Ocimum sanctum* L. for mass propagation. Afr. J. Biotechnol. 15: 1269-1275.

Jawdat, D., Al-Faoury, H., Odeh, A. and Al-Rayan, R. 2016. Essential oil profiling in callus of some wild and cultivated *Daucus* genotypes. Ind. Crops Prod. 94: 848-855.

John, B., Sulaiman, C. T., George, S. and Reddy, V. R. K. 2014. Total phenolics and flavonoids in selected medicinal plants from Kerala. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 6: 406-408.

Juliet, Y. S., Kalimuthu, K., Chinnadurai, V. and Krishnasamy, R. 2017. Effect of growth regulators on direct shoot formation from leaf explant and antioxidant activity of *in situ* and *in vitro* plants of *Cadaba fruticosa* - an endemic medicinal plant. European J. Med. Plants. 18: 1-10.

Kang, D. J., Seo, Y. J., Lee, J. D., Ishii, R., Kim, K. U., Shin, D. H., Park, S. K., Jang, S. W. and Lee, I. J. 2005. Jasmonic acid differentially affects growth, ion uptake and abscisic acid concentration in salt tolerant and saltsensitive rice cultivars. J. Agron. Crop Sci. 191: 273-282.

Kang, S. M., Jung, H. Y., Kang, Y. M., Yun, D. J., Bahk, J. D., Yang, J. K. and Choi, M. S. 2004. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. Plant Sci. 166: 745-751.

Kayastha, L. B. 2014. Queen of herbs tulsi (*Ocimum sanctum*) removes impurities from water and plays disinfectant role. J. Med. Plants Stud. 2: 1-8.

Ref. code: 25615909032558LMU

Kelm, M. A., Nair, M. G., Strasbury, G. M. and Dewitt, P. L. 2000. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. Phytomed. 7: 7-13.

Khirwadkar, P., Dave, V. and Dashora, K. 2014. A review on biotransformation. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 2: 1136-1140.

Kikowska, M., Kędziora, I. Krawczyk, A. and Thiem, B. 2014. Methyl jasmonate, yeast extract and sucrose stimulate phenolic acids accumulation in *Eryngium planum* L. shoot cultures. Acta Biochim Pol. 62: 197-200.

Kim, H. J., Chen, F., Wang, X. and Rajapakse, N. C. 2006. Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). J. Agric. Food. Chem. 54: 2327-2332.

Kim, H. J., Kwon, D. Y. and Yoon, S. H. 2009. Induction of phenolics and terpenoids in dibble plant using plant stress responses, pp 249-256. *In:* Hou, C. T. and Shaw, J. F. (eds). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. CRC Press, Florida.

Kim, O. T., Kim, M. Y., Hong, M. H., Ahn, J. C. and Hwang, B. 2004. Stimulation of asiaticoside accumulation in the whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban by elicitors. Plant Cell Rep. 23: 339-344.

Koca, N. and Karaman, Ş. 2015. The effects of plant growth regulators and L-phenylalanine on phenolic compounds of sweet basil. Food Chem. 166: 515-521.

Komali, A. S., Zheng, Z. and Shetty, K. 1999. A mathematical model for the growth kinetics and synthesis of phenolics in oregano (*Origanum vulgare*) shoot cultures inoculated with *Pseudomonas* species. Process Biochem. 35: 227-235.

Kothan, S., Dechsupa, S., Leger, G., Moretti, J. L., Vergote, J. and Mankhetkorn, S. 2004. Spontaneous mitochondrial membrane potential change during apoptotic induction by quercetin in K562 and K562/adr cells. Can. J. Physiol. Pharmacol. 82: 1084-1090.

Ref. code: 25615909032558LMU

Krishnan, J. J., Gangaprasad, A. and Satheeshkumar, K. 2018. Exogenous methyl jasmonate acts as a signal transducer in the enhancement of camptothecin (CPT) production from *in vitro* cultures of *Ophiorrhiza mungos* L. var. *angustifolia* (Thw.) Hook. f. Ind. Crops Prod. 119: 93-101.

Krzyanowska, J., Czubacka, A., Pecio, L. Przybys, M., Doroszewska, T., Stochmal, A. and Oleszek, W. 2011. The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha x piperita* cell suspension cultures. Plant Cell Tissue Organ Cult. 108: 73-81.

Kumar, M. 2014. Estimation and characterization of flavonoids in two different forma of *Ocimum tenuiflorum* L. Int. J. Basic Appl. Biol. 2: 34-37.

Kumlay, A. M. and Ercisli, S. 2015. Callus induction, shoot proliferation and root regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem node and leaf explants under long-day conditions. Biotechnol. Biotechnol. Equip. 29: 1075-1084.

Lambert, F., Zucca, J., Ness, F. and Aigle, M. 2014. Production of ferulic acid and coniferyl alcohol by conversion of eugenol using a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Flavour Fragr. J. 29: 14-21.

Lander, H. M. 1997. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 11: 118-124.

Lehmann, W. D., Theobald, N., Fischer, R. and Heinrich, H. C. 1983. Stereospecificity of phenylalanine plasma kinetics and hydroxylation in man following oral application of a stable isotope-labelled pseudo-racemic mixture of L- and D-phenylalanine. Clin. Chim. Acta. 128: 181-198.

Li, W., Shi, M., Wang, P., Guo, X., Li, C. and Kang, W. 2018. Efficient determination of three flavonoids in *Malus pumila* flowers by ionic liquid-HPLC. J. Mol. Liq. 263: 139-146.

Lim, Z. X., Ling, A. P. K. and Hussein, S. 2009. Callus induction of *Ocimum sanctum* and estimation of its total flavonoids content. Asian J. Agric. Sci. 1: 55-61.

Lionis, C., Faresjö, A., Skoula, M., Kapsokefalou, M. and Faresjö, T. 1998. Antioxidant effects of herbs in Crete. Lancet. 352: 1987-1988.

Ref. code: 25615909032558LMU

Loc, N. H., Anh, N. H. T., Khuyen, L. T. M. and An, T. N. T. 2014. Effects of yeast extract and methyl jasmonate on the enhancement of solasodine biosynthesis in cell cultures of Solanum hainanense Hance. J. Biosci. Biotechnol. 3: 1-6.

Mahajan, N., Singh, J. and Sinha, S. 2014. Comparison of total flavonoid, phenolic content and antioxidant capacity in leaf and seed extracts from white holy basil (*Ocimum sanctum*). Int. J. Appl. Biol. Pharm. 5: 34-42.

Masek, A., Chrzescijanska, E. and Zaborski, M. 2014. Estimation of the antioxidative properties of amino acids - an electrochemical approach. Int. J. Electrochem. Sci. 9: 7904-7915.

Masoumian, M., Arbakariya, A., Syahida, A. and Maziah, M. 2011. Effect of precursors on flavonoid production by *Hydrocotyle bonariensis* callus tissues. Afr. J. Biotechnol. 10: 6021-6029.

Mathew, R. and Sankar, P. D. 2012. Effect of methyl jasmonate and chitosan on growth characteristics of *Ocimum basilicum* L., *Ocimum sanctum* L. and *Ocimum gratissimum* L. cell suspension cultures. Afr. J. Biotechnol. 11: 4759-4766.

Matter, M. A., Hanafy, M. S. and Aly, U. I. 2017. Effect of methyl jasmonate and mannitol application on growth and eugenol content in callus cultures of carnation. Plant Tissue Cult. Biotech. 27: 227-240.

Meena, M. C., Meena, R. K. and Patni, V. 2014. Effect of elicitor on quercetin production in cell cultures of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. Pharma. Innovation. 3: 18-23.

Mendoza, D., Cuaspud, O., Arias, J. P., Ruiz, O. and Arias, M. 2018. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana.* Biotechnol. Rep. 19: 1-9.

Ref. code: 25615909032558LMU

Meyer, A. S., Yi, O. S., Pearson, D. A., Waterhouse A. L. and Frankel. E. N. 1997. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). J. Agric. Food Chem. 45: 1638-1643.

Mishra, T. 2015. Protocol establishment for multiplication and regeneration of 'Holy Basil' (*Ocimum sanctum* Linn). an important medicinal plant with high religious value in India. J. Med. *Plants.* Stud. 3: 16-19.

Mizukami, H., Tavira, Y. and Ellis, B. E. 1993. Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. Plant Cell Rep. 12: 706-709.

Mohammadi Nejad, S., Özgüneş, H. and Başaran, N. 2017. Pharmacological and toxicological properties of eugenol. Turk. J. Pharm. Sci. 14: 201-206.

Mohan, N., Jassal P. S., Kumar, V. and Singh, R. P. 2011. Comparative *in vitro* and *in vivo* study of antioxidants and phytochemical content in *Bacopa monnieri*. Recent Res. Sci. Technol. 3: 78-83.

Mondal S., Miranda, B. R. and Mahapatra, S. C. 2009. The science behind sacredness of tulsi (*Ocimum sanctum* LINN.). Ind. J. of Physiol. Pharmacol. 53: 291-306.

Monney, M. A. D., Amissah, N. and Blay, E. 2016. Influence of BA and IBA or NAA combinations on micropropagation of *Cryptolepis sanguinolenta.* Am. J. Plant Sci. 7: 572-580.

Mukherjee, P. K., Maitib, K. and Houghton, P. J. 2006. Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potential. J. Ethnopharmacol. 106: 1-28.

Ohkubo, T. and Shibata, M. 1997. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. J. Dent. Res. 76: 848-851.

Ouyang, J., Wang, X. D., Zhao, B. and Wang, Y. C. 2005. Enhanced production of phenylethanoid glycosides by precursor feeding to cell culture of *Cistanche deserticola.* Process Biochem. 40: 3480-3484.

Ozcan, T., Akpinar-Bayizit, A., Yilmaz-Ersan, L. and Delikanli, B. 2014. Phenolics in human health. Int. J. Chem. Eng. Appl. 5: 393-396.

Ref. code: 25615909032558LMU

Padayatty, S. J. and Levine, M. 2001. New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. Can. Med. Assoc. J. 164: 353-355.

Pandey, G. and Madhuri, S. 2010. Pharmacological activities of *Ocimum sanctum* (tulsi): a review. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 5: 61-66.

Parale, A., Barmukh, R. and Nikam, T. 2010. Influence of organic supplements on production of shoot and callus biomass and accumulation of bacoside in *Bacopa monniera* (L.) Pennell. Physiol. Mol. Biol. Plants. 16: 167-175.

Patel, H. and Krishnamurthy, R. 2013. Elicitors in plant tissue culture. J. Pharmacogn. Phytochem. 2: 60-65.

Pattnaik, S. and Chand P. K. 1996. *In vitro* propagation of the medicinal herbs *Ocimum americanum* L. syn. *O. canum* Sims. (hoary basil) and *Ocimum sanctum* L. (holy basil). Plant Cell Rep. 15: 846-850.

Pavithra, B. 2014. Eugenol-a review. J. Pharm. Sci. Res. 6: 153-154.

Piątczak, E., Kuźma, Ł. and Wysokińska, H. 2016. The influence of methyl jasmonate and salicylic acid on secondary metabolite production in *Rehmannia Glutinosa* Libosch. hairy root culture. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 58: 57-65.

Pietta, P. G. 2000. Flavonoids as antioxidants. J. Nat. Prod. 63: 1035-1042.

Pojjanapimol, S. 2004. Characterization of aroma impact compounds in fresh, heated and dried holy basil (*Ocimum sanctum*) leaves. Ph.D. Thesis., Kasetsart University.

Prakash, P. and Gupta, N. 2005. Therapeutic uses of ocimum sanctum linn (tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review. Indian J. Physiol. Pharmacol. 49: 125-131.

Qu, J., Zhang, W. and Yu, X. 2011. A combination of elicitation and precursor feeding leads to increased anthocyanin synthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 107: 261-269.

Rababah, T. M., Ereifej K. I., Esoh, R. B., Al-u'datt, M. H. Alrababah, M. A. and Yang, W. 2011. Antioxidant activities, total phenolics and HPLC analyses of the phenolic compounds of extracts from common Mediterranean plants. Nat. Prod. Res. 25: 596-605.

Ref. code: 25615909032558LMU

Raghuveer, I., Anurag, K., Anumalik, Y., Nitika, G., Swadesh, K., Nikhil, G., Santosh, K., Vinay, Y., Anuj, P. and Himanshu, G. 2015. Metabolites in plants and its classification. World J. Pharm. Sci. 4: 287-305.

Rahimi, A. A, Ashnagar, A. and Hamideh, N. 2012. Isolation and characterization of 4-allyl-2-methoxyphenol (eugenol) from clove buds marketed in Tehran city of Iran. Int. J. Chemtec Res. 4: 105-108.

Ramesh, B. and Satakopan, N. V. 2010. Antioxidant activities of hydroalcoholic extract of *Ocimum sanctum* against cadmium induced toxicity in rats. Indian J. Clin. Biochem. 25: 307-310.

Rao, S. R. and Ravishankar, G. A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol. Adv. 20: 101-153.

Razdan, M. K. 2003. Introduction to Plant Tissue Culture. 2nd edition. Science Publishers, New York. 375 p.

Reigart, J. R. and Roberts, J. R. 1999. Recognition and Management of Pesticide Poisoning. 5th edition. U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC. 238 p.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compound. Trends Plant Sci. 2: 152-159.

Rohman, A., Riyanto, S., Yuniarti, N., Saputra, W., Utami, R. and Mulatih, W. 2010. Antioxidant activity, total phenolic, and total flavonoid of extracts and fractions of red fruit (*Pandanus conoideus* Lam). Int. Food Res. J. 17: 97-106.

Rout, G. R., Samantaray, S. and Das, P. 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. Biotechnol. Adv. 18: 91-120.

Rungruang, R., Kerdchoechuen, O., Laohakunjit, N. and Matta, F. B. 2015. The accumulation of total phenolic content and antioxidant activity in suspension culture of *Glycine max* by methyl jasmonate. Agricultural Sci. J. 46: 81-84.

Saha, S., Dhar, T. N., Sengupta, C. and Ghosh, P. D. 2013. Biological activities of essential oils and methanol extracts of five *Ocimum* species against pathogenic bacteria. Czech J. Food Sci. 31: 194-202.

Ref. code: 25615909032558LMU

Saharkhiz, M. J., Kamyab, A. A., Kazerani, N. K., Zomorodian, K., Pakshir, K. and Rahimi, M. J. 2015. Chemical compositions and antimicrobial activities of *Ocimum sanctum* L. essential oils at different harvest stages. Jundishapur J. Microbiol. 8: 1-7.

Sai, K. G., Bhavani, R. T. and Prem, K. P. 2014. "Tulsi"- the Wonder Herb (Pharmacological Activities of *Ocimum Sanc*tum). A. J. Ethno. 1: 89-95.

Saran, S., Menon, S., Shailajan, S. and Pokharna, P. 2013. Validated RP-HPLC method to estimate eugenol from commercial formulations like *Caturjata Churna*, *Lavangadi Vati*, *Jatiphaladi Churna*, *Sitopaladi Churna* and clove oil. J. Pharm. Res. 6: 53-60.

Sato, M., Ramarathnam, N., Suzuki, Y., Ohkubo, T., Takeuchi, M. and Ochi, H. 1996. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. J. Agr. Food Chem. 44: 37-41.

Seo, H. S., Song, J. T., Cheong, J. J., Lee, Y. H., Lee, Y. W., Hwang, I., Lee, J. S. and Choi, Y. D. 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 4788-4793.

Sharma, N. K., Choudhary, R. C. and Kumar, M. 2014. An improved plant regeneration system of *Ocimum sanctum* L- An important Indian holy basil plant. J. Cell Tissue Res. 14: 4143-4148.

Sharma, P. 2014. Production of flavonoids from *Terminalia arjuna* (ROXB.) *in vivo* and *in vitro* tissue cultures. Int. J. ChemTech Res. 6: 881-885.

Sharma, P., Yadav, S., Srivastava, A. and Shrivastava, N. 2013. Methyl jasmonate mediates upregulation of bacoside A production in shoot cultures of *Bacopa monnieri*. Biotechnol. Lett. 35: 1121-1125.

Sharma, V., Wani, S. R. and Chaudhary, P. 2016. Precursor mediated enhanced eugenol production in *Ocimum sanctum* L. through tissue culture methodologies and quantitative estimation through HPLC. J. Essent. Oil Bear. Pl. 19: 241-246.

Ref. code: 25615909032558LMU

Shilpa, K., Selvakkumar, C., Senthil, A. K. and Lakshmi, B. S. 2010. *In vitro* root culture of *Ocimum sanctum* L. and evaluation of its free radical scavenging activity. Plant Cell Tissue Organ Cult. 101: 105-109.

Shinde, A. N., Malpathak, N. and Fulzele, D. P. 2009. Enhanced production of phytoestrogenic isoflavones from hairy root cultures of *Psoralea corylifolia* L. using elicitation and precursor feeding. Biotechnol. Bioprocess Eng. 14: 288-294.

Silva, L. A. L. D., Pezzini, B. R. and Soares, L. 2015. Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) leaves. Pharmacogn. Mag. 11: 96-101.

Singh, E., Sharma, S., Dwivedi, J. and Sharma, S. 2012. Diversified potentials of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi): An exhaustive survey. J. Nat. Prod. Plant Resource. 2: 39-48.

Singh, N. K. and Sehgal, C. B. 1999. Micropropagation of holy basil (*Ocimum sanctum* Linn.) from young inflorescence of mature plants. Plant Growth Regul. 29: 161-166.

Sivanandhan, G., Dev, G. K., Jeyaraj, M., Rajesh, M., Arjunan, A., Muthuselvam, M., Manickavasagam, M., Selvaraj, N. and Ganapathi, A. 2013. Increased production of withanolide A, withanone and withaferin A in hairy root cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal elicited with methyl jasmonate and salicylic acid. Plant Cell Tissue Organ Cult. 114: 121-129.

Skrzypczak-Pietraszek, E., Słota, J. and Pietraszek, J. 2014. The influence of L-phenylalanine, methyl jasmonate and sucrose concentration on the accumulation of phenolic acids in *Exacum affine* Balf. f. ex Regel shoot culture. Acta Biochim. Pol. 61: 47-53.

Smetanska, I. 2008. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 111: 187-228.

Song, H., Kumar, P., Arivazhagan, G., Lee, S. I., Yoon, H. M., Kim, I. H., Kwon, H. J., Kim, J. M. and Hakkim, F. L. 2012. Antioxidant property of leaves and calluses extracts of *in-vitro* grown 5 different *Ocimum* species. J. Plant Biotechnol. 39: 146-153.

Ref. code: 25615909032558LMU

Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I. and Bahorun, T. 2005. Phenolics as potential antioxidants therapeutic agents: mechanism and actions. Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mutagen. 579: 200-213.

Sethi, J., Sood, S., Seth, S. and Talwar, A. 2006. Evaluation of hypoglycemic and antioxidant effect of *Ocimum sanctum*. Indian J. Clin. Biochem. 19: 152-155.

Sukito, A. and Tachibana, S. 2016. Effect of methyl jasmonate and salycilic acid synergism on enhancement of bilobalide and ginkgolide production by immobilized cell cultures of *Ginkgo biloba*. Bioresour. Bioprocess. 3: 1-11.

Suttana, W., Mankhetkorn, S., Poompimon, W., Palagani, A., Zhokhov, S., Gerlo, S., Haegeman, G. and Berghe, W. V. 2010. Differential chemosensitization of P-glycoprotein overexpressing 562/Adr cells by withaferin A and siamois polyphenols. Mol. Cancer. 9: 1-22.

Świzdor, A., Panek, A., Milecka-Tronina, N. and Kolek, T. 2012. Biotransformations utilizing beta-oxidation cycle reactions in the synthesis of natural compounds and medicines. Int. J. Mol. Sci. 13: 16514-16543.

Szopa, A., Kokotkiewicz, A., Bednarz, M., Luczkiewicz, M. and Ekiert, H. 2017. Studies on the accumulation of phenolic acids and flavonoids in different *in vitro* culture systems of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. using a DAD-HPLC method. Phytochem Lett. 20: 462-469.

Taiz, L. and Zeiger, E. 2006. Plant Physiology, 4th edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland. 700 p.

Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. M. and Murphy, A. 2014. Plant Physiology and Development, 6th Edition. Sinauer Associates, Oxford. 761 p.

Talebi, M., Moghaddam, M. and Pirbalouti, A. G. 2018. Methyl jasmonate effects on volatile oil compounds and antioxidant activity of leaf extract of two basil cultivars under salinity stress. Acta Physiol. Plant. 40: 1-11.

Tan, S. H. and Mahmmod, M. 2013. Effect of precursors on flavonoid production in Pegaga cell suspension cultures, *In:* Malaysian Technical Universities Conference on Engineering & Technology (MUCET 2013). 3-4 December 2013. Pahang, Malaysia.

Ref. code: 25615909032558LMU

Tassoni, A., Durante, L. and Ferri, M. 2012. Combined elicitation of methyl-jasmonate and red light on stilbene and anthocyanin biosynthesis. J. Plant Physiol. 169: 775-781.

Thiruvengadam, M. and Chung, I. M. 2015. Phenolic compound production and biological activities from *in vitro* regenerated plants of gherkin (*Cucumis anguria* L.). Electron. J. Biotechnol. 18: 295-301.

Tsai, S. C., Tsai, L. D. and Li, Y. K. 2005. An isolated *Candida albicans* TL_3 capable of degrading phenol at large concentration. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69: 2358-2367.

Vasconsuelo, A. A. and Boland, R. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plant. Plant Sci. 172: 861-875.

Vasts, V., Yadav, S. P. and Grover, J. K. 2004. Ethanolic extract of *Ocimum sanctum* leaves partially attenuates steptozotocin-induced alterations in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats. J. Ethonopharmacol. 90: 155-160.

Wakchaure, R., Ganguly, S. and Praveen, P. K. 2016. *Ocimum sanctum* (Tulsi), the queen of herbs: a review, pp. 166-173. *In:* Mahd, A. A., Sharma, Y. K., Abid, M. and Khan, M. M. A. A. (eds.). Biochemistry and Therapeutic Uses of Medicinal Plants. Discovery Publishing House, New Delhi.

Wang, J., Qian, J., Yao, L. and Lu, Y. 2015. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. Bioresour. Bioprocess. 2: 1-9.

Wangcharoen, W. and Morasuk, W., 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of some Thai culinary plants. Mj. Int. J. Sci. Tech.1: 100-106.

Wasternack, C. and Hause, B. 2002. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and plant development. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 72: 165-221.

Wasternack, C. and Parthier, B. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. Trends Plant Sci. 2: 302-307.

Williamson, G., Day, A. J., Plumb, G. W. and Couteau, D. 2000. Human metabolic pathway of dietary flavonoids and cinnamates. Biochem. Soc. Trans. 28: 16-22.

Ref. code: 25615909032558LMU

Yamasaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T. and Sato, T. 1994. Electrochemical method for estimating the antioxidative effect of methanol extracts of crude drugs. Chem. Pharmaceut. Bull. 42: 1663-1665.

Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomás-barberán, F. A., Datta, N., Singanusong, R. and Chen, S. S. 2004. Flavonoids in food and their health benefits. Plant Food Hum. Nutr. 59: 113-122.

Yu, B. S., Lai, S. G. and Tan, Q. L. 2006. Simultaneous determination of cinnamaldehyde, eugenol and paeonol in traditional Chinese medicinal preparations by capillary GC-FID. Chem. Pharm. Bull. 54: 114-116.

Yu, K. W., Gao, W. Y., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. 2002. Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer. Biochem. Eng. J. 11: 211-215.

Yu, K. W., Gao, W. Y., Son, S. H. and Paek, K. Y. 2000. Improvement of ginsenoside production by jasmonic acid and some other elicitors in hairy root culture of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). *In Vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant. 36: 424-428.

Zhang, H. and Memelink, J. 2009. Regulation of secondary metabolism by jasmonate hormones, pp 181-194. *In:* Osbourn, A. E. and Lanzotti, V. (eds). Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application. Springer Science+Business Media publisher, New York.

Zhao, J., Davis, L. C. and Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol. Adv. 23: 283-333.

Zheljazkov, V. D., Callahan, A. and Cantrell, C. L. 2007. Yield and oil composition of 38 basil (*Ocimum basilicum* L.) accessions grown in Mississippi. J. Agric. Food Chem. 56: 241-245.

Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y. and Tang, T. 2010. Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by uv–vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. Food Anal. Methods. 3: 90-97.

Zhuang, H., Kim, Y. S., Koehler, R. C. and Dore, S. 2003. Potential mechanism by which resveratrol, a red wine constituent, protects neurons. Ann. NY. Acad. Sci. 993: 276-286.

Ref. code: 25615909032558LMU

ภาคผนวก

Ref. code: 25615909032558LMU

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารสูตร MS สารควบคุมการเจริญเติบโต สารตั้งต้น Phe และสารกระตุ้น MeJA

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS

1. ตวงสารละลายจาก stock solution ของอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS (ตารางภาคผนวกที่ ก.1) ต่อการเตรียมอาหาร 1 l โดยใช้ปริมาตร ดังนี้

Stock 1, 3-6	10 ml
Stock 2	20 ml
Stock 7	5 ml

2. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต จาก stock solution ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ตามความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองต่อการเตรียมอาหาร 1 l โดยใช้ปริมาตร ดังนี้

BA ความเข้มข้น 2.22 4.44 6.66 และ 8.87 µM	5 10 และ 20 ml ตามลำดับ
IAA ความเข้มข้น 2.85 µM	5 ml
NAA ความเข้มข้น 2.69 µM	5 ml

3. เติมน้ำตาล 30 g คนให้ละลายเข้ากัน
4. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml
5. ปรับ pH ของอาหารให้อยู่ในช่วง 5.6-5.8 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 N
6. นำส่วนผสมทั้งหมดมาต้ม ค่อยๆ เติมผงวุ้น 8 g ลงในอาหาร และคนเป็นระยะ
7. เมื่ออาหารเดือดตักใส่ขวดเพาะเลี้ยง ขวดละประมาณ 10 ml และปิดฝาให้สนิท
8. นำไปนึ่งกำจัดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
9. ทิ้งให้อาหารเย็นก่อนนำไปใช้

การเตรียม stock solution ของสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้น 0.1 mg/ml

ชั่ง BA IAA และ NAA 0.01 g ละลายด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 N ปริมาตรเล็กน้อย เมื่อละลายดีแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งจำกัดเชื้อแล้วจนครบ 100 ml สำหรับ IAA เป็นสารที่ไวแสง ดังนั้นควรบรรจุในขวดสีชา หรือห่อขวดที่บรรจุด้วยกระดาษฟอยล์

Ref. code: 25615909032558LMU

ตารางผนวกที่ ก. การเตรียม stock อาหารสูตร MS

stock	สารเคมี	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาณ (ml)	น้ำหนักสารที่ใช้ (g)	ปริมาตรที่ใช้ (ml)
1	NH_4NO_3	100	250	41.25	10
2	KNO_3	50	250	23.75	20
3	H_3BO_3	100	250	0.155	10
	KH_2PO_4			4.25	
	KI			0.0208	
	$Na_2MoO_4 \cdot H_2O$			0.0063	
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$			0.0006	
4	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	100	250	11	10
5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	100	250	9.25	10
	$MnSO_4 \cdot H_2O$			0.5575	
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$			0.215	
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$			0.006	
6	Na_2EDTA	100	250	0.9313	10
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$			0.6963	
7	myo-inosotal	200	100	2	5
	glycine			0.04	
	nicotinic acid			0.01	
	pyridoxine-HCl			0.01	
	thiamine-HCl			0.002	

Ref. code: 25615909032558LMU

การเตรียม stock solution ของสารตั้งต้น Phe ความเข้มข้น 0.006053 M

ละลาย Phe 0.1 g ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งกำจัดเชื้อแล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 ml

วิธีการคำนวณ Phe สำหรับใช้ในการทดลอง

Phe มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight, MW) เท่ากับ 165.19 g/mole

ซึ่งใน stock Phe ที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 ml จะมีเนื้อสาร Phe เท่ากับ 0.1 g

เปลี่ยนหน่วยเป็น mole จากสูตร $\text{mole} = \frac{g}{MW}$

ดังนั้น ใน stock Phe จะมีเนื้อสาร Phe อยู่ $\frac{0.1}{165.19} = 0.0006053$ mole

เปลี่ยนหน่วยให้เป็น M โดยเทียบต่อ 1 l

จากใน stock Phe ปริมาตร 100 ml มีเนื้อสาร Phe อยู่ 0.0006053 mole

ดังนั้น หากเตรียม stock Phe ปริมาตร 1000 ml มีเนื้อสาร Phe อยู่

$$\frac{0.0006053 \text{ mole} \times 1000 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 0.006053 \text{ M}$$

เมื่อต้องการเติม Phe ความเข้มข้น 25 μM ในการเตรียมอาหาร 1 l

คำนวณจากสูตร $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

จะได้ $0.006053 \text{ M} \times V_1 = 25 \text{ μM} \times 1000 \text{ ml}$

$$V_1 = \frac{25 \times 10^{-6} \text{ M} \times 1000 \text{ ml}}{0.006053 \text{ M}}$$

$$V_1 = 4.13 \text{ ml}$$

ดังนั้น เมื่อต้องการเติม Phe ความเข้มข้น 25 μM ในการเตรียมอาหาร 1 l จะต้องปิเปต Phe จาก stock ปริมาตร 4.13 ml และเมื่อต้องการเติม Phe ความเข้มข้น 50 μM ในอาหาร 1 l จะต้องปิเปต Phe จาก stock ปริมาตร 8.26 ml

Ref. code: 25615909032558LMU

การเตรียม stock solution ของสารกระตุ้น MeJA ความเข้มข้น 0.0044583 M

ปิเปต MeJA ปริมาตร 97 µl ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อย และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งกำจัดเชื้อแล้วให้ครบ 100 ml

วิธีการคำนวณ MeJA สำหรับใช้ในการทดลอง

MeJA มี MW เท่ากับ 224.30 g/mole

ซึ่งใน stock MeJA ที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 ml จะมีเนื้อสาร MeJA เท่ากับ 0.1 g

เปลี่ยนหน่วยเป็น mole จากสูตร $\text{mole} = \frac{g}{MW}$

ดังนั้น ใน stock MeJA จะมีเนื้อสาร MeJA อยู่ $\frac{0.1}{224.30} = 0.00044583$ mole

เปลี่ยนหน่วยให้เป็น M โดยเทียบต่อ 1 l

จากใน stock MeJA ปริมาตร 100 ml มีเนื้อสาร MeJA อยู่ 0.00044583 mole

ดังนั้น หากเตรียม stock MeJA ปริมาตร 1000 ml มีเนื้อสาร MeJA อยู่

$$\frac{0.00044583 \text{ mole} \times 1000 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 0.0044583 \text{ M}$$

เมื่อต้องการเติม MeJA ความเข้มข้น 50 µM ในการเตรียมอาหาร 1 l

คำนวณจากสูตร $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

จะได้ $0.0044583 \text{ M} \times V_1 = 50 \text{ µM} \times 1000 \text{ ml}$

$$V_1 = \frac{50 \times 10^{-6} \text{ M} \times 1000 \text{ ml}}{0.0044583 \text{ M}}$$

$$V_1 = 11.22 \text{ ml}$$

ดังนั้น เมื่อต้องการเติม MeJA ความเข้มข้น 50 µM ในการเตรียมอาหาร 1 l จะต้องปิเปต MeJA จาก stock ปริมาตร 11.22 ml และเมื่อต้องการเติม MeJA ความเข้มข้น 100 µM ในอาหาร 1 l จะต้องปิเปต MeJA จาก stock ปริมาตร 22.43 ml

Ref. code: 25615909032558LMU

ภาคผนวก ข
จำนวนยอดที่พัฒนา ความยาวยอด และการเกิดแคลลัสของยอดกะเพราแดง ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ

Ref. code: 25615909032558LMU

ตารางผนวกที่ ข.1 จำนวนยอดที่พัฒนา ความยาวยอด และการเกิดแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของกะเพราแดงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0-8.87 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 2.85 µM และ NAA ความเข้มข้น 2.69 µM เป็นเวลา 4 สัปดาห์

BA	IAA (µM)	NAA	การเกิดยอด (%)	จำนวนยอดที่พัฒนา	ความยาวยอด (cm)	การเกิดแคลลัส (%)
-	-	-	100	1.20±0.14[1/e]	0.98±0.15[a]	0[b]
2.22	-	-	100	3.80±0.51[ab]	0.54±0.06[b]	0[b]
2.22	2.85		100	4.20±0.37[a]	0.47±0.06[bcd]	0[b]
2.22	-	2.69	100	1.95±0.59[de]	0.36±0.04[cd]	100%[a]
4.44	-	-	100	4.05±0.68[a]	0.50±0.04[bc]	0[b]
4.44	2.85		100	3.55±0.36[ab]	0.43±0.06[bcd]	0[b]
4.44	-	2.69	100	1.45±0.33[e]	0.42±0.06[bcd]	100%[a]
6.66	-	-	100	3.40±0.35[abc]	0.44±0.07[bcd]	0[b]
6.66	2.85		100	2.95±1.19[bc]	0.46±0.07[bcd]	0[b]
6.66	-	2.69	100	1.60±0.42[de]	0.37±0.10[cd]	100%[a]
8.87	-	-	100	2.50±0.30[c]	0.37±0.10[cd]	0[b]
8.87	2.85		100	3.00±0.58[bc]	0.40±0.14[bcd]	0[b]
8.87	-	2.69	100	1.20±0.24[e]	0.32±0.14[d]	100%[a]
F-test			ns	**	**	**
C.V. (%)			0	22.88	19.96	0.00

[1/] ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งตามอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT

ns ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01)

Ref. code: 25615909032558LMU

ตารางผนวกที่ ข.2 จำนวนยอดที่พัฒนา ความยาวยอด และการเกิดแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของกะเพราแดงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0-8.87 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 2.85 µM และ NAA ความเข้มข้น 2.69 µM เป็นเวลา 4 สัปดาห์

BA	IAA (µM)	NAA	การเกิดยอด (%)	จำนวนยอดที่พัฒนา	ความยาวยอด (cm)	การเกิดแคลลัส (%)
-	-	-	100	2.15±0.57[1/bcd]	0.50±0.14[bcde]	0[b]
2.22	-	-	100	3.00±0.43[a]	0.71±0.24[ab]	0[b]
2.22	2.85		100	2.15±0.41[bcd]	0.55±0.13[bcde]	100%[a]
2.22	-	2.69	100	1.45±0.44[e]	0.46±0.05[bcde]	100%[a]
4.44	-	-	100	2.50±0.26[abc]	0.83±0.26[a]	0[b]
4.44	2.85		100	1.95±0.25[cde]	0.63±0.16[abcd]	100%[a]
4.44	-	2.69	100	1.40±0.16[e]	0.39±0.11[de]	100%[a]
6.66	-	-	100	2.75±0.50[ab]	0.64±0.15[abcd]	0[b]
6.66	2.85		100	1.90±0.12[cde]	0.65±0.22[abc]	100%[a]
6.66	-	2.69	100	1.55±0.34[de]	0.43±0.16[cde]	100%[a]
8.87	-	-	100	3.10±0.62[a]	0.43±0.10[cde]	0[b]
8.87	2.85		100	1.85±0.44[cde]	0.34±0.06[e]	100%[a]
8.87	-	2.69	100	1.60±0.49[de]	0.37±0.10[e]	100%[a]
F-test			ns	**	*	**
C.V. (%)			0	19.75	29.45	0.00

[1/]ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งตามอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT

ns ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01)

Ref. code: 25615909032558LMU

ภาคผนวก ค

น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง % น้ำหนักแห้ง ปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ

Ref. code: 25615909032558LMU

ตารางผนวกที่ ค.1 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง % น้ำหนักแห้ง และ % yield ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM เป็นระยะเวลานาน 3-6 สัปดาห์ ใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

treatments	fresh weight (mg/shoot)	dry weight (mg/shoot)	% dry weight	% yield for eugenol analysis	% yield for TPC TFC DPPH analysis
3-week-old *in vitro* shoots	47.08±8.50[1/b]	5.01±0.91[c]	10.65±0.66[b]	41.27[c]	22.35±2.59[ab]
4-week-old *in vitro* shoots	73.48±4.08[a]	7.76±0.62[b]	10.54±0.3[b]	41.66[b]	22.61±2.29[ab]
5-week-old *in vitro* shoots	75.39±6.74[a]	9.18±1.42[ab]	12.14±1.17[a]	49.08[a]	21.02±0.53[bc]
6-week-old *in vitro* shoots	85.17±2.80[a]	10.64±0.82[a]	12.48±0.55[a]	35.10[d]	24.23±1.55[a]
in vivo leaves of mother plant (mg/leaf)	100.14±14.03	20.34±3.38	20.30±1.43	21.56[e]	18.55±0.39[c]
in vivo leaves of transplantation plant (mg/leaf)	112.77±6.87	21.44±0.93	19.04±0.9	20.01[f]	24.82±0.25[a]
F-test	**	**	*	**	**
C.V. (%)	8.48	12.1	6.46	0.00	7.07

หมายเหตุ การวิเคราะห์ทางสถิติในน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และ % น้ำหนักแห้ง เปรียบเทียบเฉพาะยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

[1/]ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งตามอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01)

Ref. code: 25615909032558LMU

ตารางผนวกที่ ค.2 ปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM เป็นระยะเวลานาน 3-6 สัปดาห์ ใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

treatments	eugenol content (µg/g dry extract)	TPC content (mg GAE/g dry extract)	TFC content (mg CE/g dry extract)	EC_{50} (µg/ml)
3-week-old *in vitro* shoots	249.76±41.84[1/c]	87.71±6.65[d]	79.09±4.07[d]	20.19±3.32[ab]
4-week-old *in vitro* shoots	279.92±1.73[c]	123.70±5.29[c]	95.18±2.68[b]	16.52±2.10[bc]
5-week-old *in vitro* shoots	583.24±23.28[c]	152.10±7.94[a]	122.04±3.66[a]	12.95±1.37[c]
6-week-old *in vitro* shoots	509.61±3.78[c]	134.73±7.65[b]	88.62±1.72[c]	15.95±2.19[bc]
in vivo leaves of mother plant (mg/leaf)	2,931.17±286.61[b]	73.44±1.53[e]	66.33±3.55[e]	22.64±2.79[a]
in vivo leaves of transplantation plant (mg/leaf)	8,816.18±510.60[a]	73.68±5.09[e]	67.27±3.45[e]	23.27±2.23[a]
F-test	**	**	**	**
C.V. (%)	10.76	5.65	3.85	12.96

[1/]ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งตามอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$)

Ref. code: 25615909032558LMU

ตารางผนวกที่ ค.3 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง % น้ำหนักแห้ง และ % yield ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 μM (สิ่งทดลองควบคุม) หรือเติมร่วมกับ Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

Phe (μM)	MeJA (μM)	fresh weight (mg/shoot)	dry weight (mg/shoot)	% dry weight	% yield for eugenol analysis	% yield for TPC TFC DPPH analysis
-	-	47.95±2.76[1/a]	4.52±0.41[a]	9.42±0.59[c]	33.67[i]	19.88±0.02[e]
25	-	34.44±1.72[b]	3.47±0.20[b]	10.09±0.68[cb]	36.36[g]	18.25±0.17[f]
50	-	34.80±1.50[b]	3.52±0.33[b]	10.11±0.75[cb]	34.47[h]	19.91±0.03[e]
-	50	29.41±1.95[c]	2.74±0.26[c]	9.40±1.48[c]	41.54[e]	24.07±0.02[a]
-	100	23.43±1.58[d]	2.76±0.18[c]	11.81±0.46[a]	45.03[c]	23.90±0.23[a]
25	50	26.08±3.88[cd]	2.86±0.37[c]	10.99±0.34[ab]	50.84[a]	23.50±0.02[b]
25	100	22.96±2.65[d]	2.71±0.27[c]	11.82±0.64[a]	42.40[d]	23.20±0.03[c]
50	50	25.93±3.11[cd]	2.89±0.32[c]	11.18±0.70[ab]	50.09	21.68±0.02[d]
50	100	23.59±3.78[d]	2.83±0.47[c]	12.05±1.13[a]	37.40[f]	24.07±0.20[a]
F-test		**	**	**	**	**
C.V. (%)		9.02	10.35	7.63	0.00	0.54

[1/]ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งตามอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01)

Ref. code: 25615909032558LMU

ตารางผนวกที่ ค.4 ปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM (สิ่งทดลองควบคุม) หรือเติมร่วมกับ Phe MeJA เพียงอย่างเดียว และ Phe ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

Phe (µM)	MeJA (µM)	eugenol content (µg/g dry extract)	TPC content (mg GAE/g dry extract)	TFC content (mg CE/g dry extract)	EC_{50} (µg/ml)
-	-	14.33±1.03[1/e]	64.66±4.72[c]	54.91±2.72[f]	20.64±0.37[a]
25	-	60.69±19.73[d]	66.14±7.55[c]	47.15±3.27[f]	21.20±0.62[a]
50	-	46.82±9.44[d]	66.03±1.41[c]	51.95±4.87[f]	20.22±1.10[a]
-	50	144.74±30.70[c]	162.55±8.47[b]	202.68±6.10[c]	9.19±0.65[bc]
-	100	208.84±9.07[a]	190.38±5.76[a]	260.43±7.28[a]	8.26±1.09[cd]
25	50	125.59±5.44[c]	191.40±9.53[a]	228.40±5.77[b]	7.45±0.71[d]
25	100	223.62±4.97[a]	192.70±5.00[a]	235.81±2.80[b]	9.84±1.05[bc]
50	50	184.04±9.97[b]	161.96±9.50[b]	171.21±1.30[d]	10.30±1.29[b]
50	100	200.44±4.76[ab]	174.77±9.58[b]	146.66±2.50[e]	10.18±0.78[b]
F-test		**	**	**	**
C.V. (%)		10.17	5.20	2.89	6.87

[1/]ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งตามอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$)

Ref. code: 25615909032558LMU

ตารางผนวกที่ ค.5 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง % น้ำหนักแห้ง และ % yield ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นระยะเวลานาน 3 4 และ 5 สัปดาห์

MeJA (µM)	elicitation time (weeks)	fresh weight (mg/shoot)	dry weight (mg/shoot)	% dry weight	% yield for eugenol analysis	% yield for TPC TFC DPPH analysis
0		67.36±14.55[1/a]	7.08±2.09[a]	10.65±1.25[b]	46.47[b]	27.11±2.97[a]
100		26.70±3.13[b]	3.66±0.51[b]	13.69±0.61[a]	47.02[a]	22.93±1.15[b]
	3	37.69±15.76[c]	4.05±1.03[c]	11.45±2.08[b]	45.32[c]	25.63±4.07
	4	47.44±22.64[b]	5.21±1.75[b]	12.19±1.78[ab]	48.90[a]	24.14±1.31
	5	55.95±29.68[a]	6.85±3.02[a]	12.87±1.65[a]	46.02[b]	25.29±3.32
0	3	51.49±6.21[c]	4.94±0.40[c]	9.64±0.68	44.90[f]	28.22±4.59
	4	67.95±4.30[b]	6.72±0.89[b]	10.62±0.70	49.38[a]	25.06±0.32
	5	82.63±7.86[a]	9.58±0.43[a]	11.68±1.48	45.14[e]	28.04±2.19
100	3	23.89±3.41[d]	3.15±0.31[e]	13.26±0.73	45.75[d]	23.05±1.81
	4	26.94±1.29[d]	3.70±0.12[ed]	13.76±0.29	48.41[b]	23.22±1.27
	5	29.26±2.06[d]	4.12±0.46[cd]	14.05±0.63	46.89[c]	22.53±0.24
MeJA (M)		**	**	**	**	**
elicitation time (E)		**	**	*	**	ns
M X E		**	**	ns	**	ns
C.V. (%)		10.14	9.17	5.90	0.00	7.73

[1/]ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งตามอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01)

ns ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Ref. code: 25615909032558LMU

ตารางผนวกที่ ค.6 ปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมหรือไม่ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นระยะเวลานาน 3 4 และ 5 สัปดาห์

MeJA (µM)	elicitation time (weeks)	eugenol content (µg/g dry extract)	TPC content (mg GAE/g dry extract)	TFC content (mg CE/g dry extract)	EC_{50} (µg/ml)
0		177.82±77.39[1/b]	132.29±19.21[b]	139.47±18.17[b]	12.82±1.49[a]
100		195.25±118.42[a]	153.07±21.19[a]	166.03±27.40[a]	11.73±0.60[b]
	3	122.64±46.01[c]	119.10±14.51[c]	149.24±33.81[b]	13.21±1.66[a]
	4	270.32±81.74[a]	160.84±18.54[a]	164.92±26.05[a]	11.91±0.66[b]
	5	166.65±98.49[b]	148.09±6.71[b]	144.09±16.13[b]	11.71±0.62[b]
0	3	80.94±5.30[e]	107.27±5.70[d]	118.54±2.36[e]	14.70±0.24[a]
	4	196.00±6.75[c]	144.09±3.34[b]	141.92±8.56[c]	12.23±0.58[b]
	5	256.52±4.41[b]	145.51±4.75[b]	157.96±7.87[b]	11.52±0.41[b]
100	3	164.32±6.86[d]	130.94±8.61[c]	179.94±4.84[a]	11.72±0.47[b]
	4	344.64±9.32[a]	177.59±2.58[a]	187.93±5.93[a]	11.59±0.69[b]
	5	76.78±0.55[e]	150.68±8.36[b]	130.22±3.31[d]	11.89±0.83[b]
MeJA (M)		**	**	**	**
elicitation time (E)		**	**	**	**
M X E		**	*	**	**
C.V. (%)		3.30	4.10	3.88	4.59

[1/]ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งตามอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$)

Ref. code: 25615909032558LMU

ภาคผนวก ง
ต้นทุนการผลิตกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อและสภาพธรรมชาติ

Ref. code: 25615909032558LMU

ตารางผนวกที่ ง. 1 ต้นทุนการผลิตยอดกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของกะเพราแดงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.22 µM ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 µM เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์

	ราคาต่อการเตรียมอาหาร 1 l	ราคาต่อขวด	ราคาต่อชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยง (4 ข้อ/ 1ขวด)	ราคาต่อยอด (1 ข้อ มีอัตราการเพิ่มจำนวนยอด 3.80 ยอด)
สารเคมีอาหารสูตร MS	27.6906	0.3956	0.0989	0.0260
ผงวุ้น	11.5200	0.1646	0.0411	0.0108
น้ำตาล	0.6600	0.0094	0.0024	0.0006
ฮอร์โมน BA	0.7107	0.0102	0.0025	0.0007
MeJA	7.0684	0.1010	0.0252	0.0066
น้ำกลั่น	22.2000	0.3171	0.0793	0.0209
Ethanol Absolute	4.2000	0.0600	0.0150	0.0039
ค่าแรงงาน	225.0000	3.2143	0.8036	0.2115
ค่าใช้จ่ายห้อง lab และอุปกรณ์ต่างๆ	1428.5714	20.4082	5.1020	1.3426
ค่าไฟ	5,000.0000	71.4286	17.8571	4.6992
ค่าวัสดุอื่นๆ ได้แก่ ขวดเพาะเลี้ยง กระดาษรองตัด แอลกอฮอล์	21.1538	0.3022	0.0755	0.0199
รวม (บาท)	6748.7749	96.4111	24.1028	6.3428

<u>หมายเหตุ</u> ยอดกะเพราแดงจำนวน 3.80 ยอด มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.05 g หากต้องการน้ำหนักสดยอดกะเพราแดง 1 g ต้องใช้ยอดจำนวน 76 ยอด โดยยอดกะเพราแดง 1 ยอด มีต้นทุนการผลิตประมาณ 6.34 บาท ดังนั้นยอดกะเพราแดงที่มีน้ำหนักสด 1 g จะใช้ต้นทุนการผลิตเท่ากับ 481.84 บาท

Ref. code: 25615909032558LMU

ตารางผนวกที่ ง. 2 ต้นทุนการผลิตกะเพราแดงจำนวน 200 ต้น ปลูกในสภาพธรรมชาติเป็นเวลานาน 4 เดือน (ตั้งแต่เพาะเมล็ด-เก็บเกี่ยว)

รายการ	ราคา (บาท)
เมล็ดพันธุ์	300.00
ดินปลูก	5,600.00
ปุ๋ย (1 kg)	19.20
ถุงปลูก	2,200.00
น้ำ (เดือนละ 100 บาท)	400.00
ค่าแรง (วันละ 300 บาท)	36,000.00
ยาฆ่าแมลง	50.00
ไม้ค้ำต้น	500.00
อุปกรณ์อื่นๆ	500.00
รวม (200 ต้น)	45,569.20
รวม/ต้น	227.85

หมายเหตุ ต้นกะเพราแดง 1 ต้น เก็บเกี่ยวใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ได้น้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 70 g ใช้ต้นทุนการผลิตเท่ากับ 227.85 บาท

ดังนั้นใบกะเพราแดงที่มีน้ำหนักสด 1 g จะใช้ต้นทุนการผลิตเท่ากับ 3.25 บาท

Ref. code: 25615909032558LMU

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวเจิมอรุณ อุทัยแจ่มศรีผล
วันเดือนปีเกิด	5 กรกฎาคม 2536
วุฒิการศึกษา	ปีการศึกษา 2558 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ทุนการศึกษา	ปีการศึกษา 2559-2560: ทุนบัณฑิตเรียนดี เพื่อศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ผลงานทางวิชาการ

Autaijamsripon, J., Jirakiattikul, Y., Rithichai, P., Itharat, A. and Ruangnoo, S. 2016. Effect of culture periods on secondary metabolite contents and antioxidant activity in *Bacopa monnieri* (L.) Penn. 20th World Congress on Clinical Nutrition (WCCN 2016). December 14-16, 2016: Rama Gardens Hotel, Bangkok, Thailand.

เจิมอรุณ อุทัยแจ่มศรีผล เยาวพา จิระเกียรติกุล และ ภาณุมาศ ฤทธิไชย. 2561. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มจำนวนยอดของกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 49: 159-162.

Ref. code: 25615909032558LMU