# ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาแคลลัสและยอดในสภาพปลอดเชื้อ และปริมาณสารสำคัญของเสม็ดขาว

# FACTOR AND DEVELOPMENT OF CALLUS AND SHOOT IN VITRO AND SECONDARY COMPOUND CONTENT OF MELALEUCA CAJUPUTI POWELL


**อุษณา ปรางทอง**

USANA PRANGTHONG


**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร**
**วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรศาสตร์**
**คณะเทคโนโลยีการเกษตร**
**สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**
**พ.ศ. 2566**


KMITL-2023-AG-M-065-394



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# FACTOR AND DEVELOPMENT OF CALLUS AND SHOOT IN VITRO AND SECONDARY COMPOUND CONTENT OF MELALEUCA CAJUPUTI POWELL

USANA PRANGTHONG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN AGICULTURE

FACULTY OF AGICULTURE TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2023

KMITL-2023-AG-M-065-394

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2023
FACULTY OF AGICULTURE TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **หัวข้อวิทยานิพนธ์** | ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาแคลลัสและยอดในสภาพปลอดเชื้อและปริมาณสารสำคัญของเสม็ดขาว |
| **นักศึกษา** | นางสาวอุษณา ปรางทอง |
| **รหัสประจำตัว** | 61604021 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต |
| **สาขาวิชา** | เกษตรศาสตร์ |
| **พ.ศ.** | 2566 |
| **อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** | รองศาสตราจารย์ ดร. กัญจนา แซ่เตียว |
| **อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม** | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นาตยา มนตรี |

## บทคัดย่อ

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของเสม็ดขาว ทำการฟอกฆ่าเชื้อเสม็ดขาวโดยนำชิ้นส่วนข้อผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 60 นาที ล้างในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ฟอกฆ่าเชื้อใน NaOCl 1.8 เปอร์เซ็นต์ (corlox 30%) เป็นเวลา 30 นาที พบการปนเปื้อน 49.63 เปอร์เซ็นต์ และการรอดชีวิต 37.95 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นชักนำให้เกิดแคลลัส นำชิ้นส่วนข้อที่มีตาขนาด 0.5 เซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าข้อที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ เข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสดีที่สุด โดยแคลลัสที่ได้มีขนาดความกว้างและความยาวเท่ากับ 1.65 และ 3.52 เซนติเมตร ตามลำดับ และเกิดยอดได้ดีที่สุดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ เข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนของความสูงยอดพบในอาหาร MS ที่เติม TDZ เข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูงยอดดีที่สุดโดยพบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการเพาะเลี้ยงรากของเสม็ดขาวในอาหารเหลวที่สภาพปลอดเชื้อต่อการชักนำ hairy root โดยศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 3 สูตร ใน MS ที่เติม 2,4-D หรือ TDZ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D ในปริมาณ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร และมี MS เป็นตัวควบคุม พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D พบการเปลี่ยนแปลงของรากจากรากที่พัฒนาไปเป็นก้อนแคลลัส เกาะกันแน่น โดยมีน้ำหนักค่าเฉลี่ยสูงสุดและเป็นสูตรที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาแคลลัสและยอด นำชิ้นส่วนตามาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ และ 2,4-D พบว่าบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตของแคลลัสและน้ำหนักสดสูงที่สุด ความกว้างของแคลลัสเท่ากับ 0.85เซนติเมตร และ 0.66 กรัม ตามลำดับ และบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ความสูงของแคลลัสเฉลี่ย 1.21 เซนติเมตร โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสมีการพัฒนาเป็นต้น แต่ไม่มีพัฒนาผ่านโซมาติกเอ็มบริโอ แต่อย่างไรก็ตามต้นที่ได้สามารถชักนำให้เกิดรากได้ในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

การศึกษาปริมาณสารสำคัญต่างๆ จากต้นเสม็ดขาวที่ได้จากสภาพปลอดเชื้อ ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอายุ 1 ปี ในระยะอายุใบต่างกัน ได้แก่ ใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ และต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดอายุ 8 ปี แล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ ethanol hexane และ methanol ในอัตรา 0.03 กรัมแห้งต่อ 10 มิลลิลิตร ได้แก่ eugenol cineole total phenolics total flavonoids และสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ใบเสม็ดขาวรวมทุกระยะที่นำมาจากสภาพธรรมชาติที่ได้จากการเพาะเมล็ดและมีอายุ 8 ปีที่สกัดด้วย hexane มีปริมาณสาร eugenol และปริมาณสาร cineole มากที่สุด เท่ากับ 57.94 และ 95.13 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH และสารประกอบฟีนอลิค มีปริมาณมากที่สุดในใบแก่ เท่ากับ 71.58 และ 68.80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารฟลาโวนอยด์พบมากที่สุดในใบเพสลาดที่ได้จากการนำต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปปลูกเป็นเวลา 1 ปี ที่ 11.58 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **Thesis Title** | Factor and development of callus and shoot *in vitro* and secondary compound of *Melaleuca cajuputi* Powell |
| **Student Name** | Miss Usana Prangthong |
| **Student ID** | 61604021 |
| **Degree** | Master of Science |
| **Department** | Agriculture |
| **Year** | 2023 |
| **Thesis Advisor** | Assoc. Prof. Dr.Kanjana Saetiew |
| **Thesis Co-Advisor** | Asst. Prof. Dr.Nattaya Montri |


## Abstract

The effect of plant growth regulators on callus induction of cajuput (*Melaleuca cajuputi)* was studied. The explants were sterilized though running water tap for 60 min, rinsed in 70% ethanol for 1 min, surface sterilization in 1.8 % NaOCl for 30 min. The percentage of contamination and survival of the explants were 49.63% , 37.95% respectively. Callus was inducted by culturing node on Murashige and Skoog (MS) medium (1962) supplemented with 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 mg/l 2,4-D combination with 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 mg/l TDZ for 8 weeks under 16 hours photoperiods cool white fluorescence. The results showed that the nodes that cultured on MS medium supplemented with 0.04 mg/l TDZ developed was the best callus with width and length of 1.65 and 3.52 cm respectively. The highest number of new shoots were found on MS medium supplemented with 0.04 mg/l TDZ combination with 0.02 mg/l 2,4-D. The hairy root induction was studied. The root explants were cultured in liquid MS medium supplemented with 0.04 mg/l TDZ, 0.04 mg/l 2,4-D and MS medium as the control. The result found that the roots cultured on MS medium supplemented with 0.04 mg/l 2,4-D were the highest weight of hairy root and the hairy root developed to callus.

The effect of TDZ and 2,4-D on induction of callus and shoot was studied. The node explants were cultured on MS medium supplemented with 0.06 mg/l TDZ. The best callus width was 0.85 cm. when the explants were developed. The highest callus was found on MS medium supplemented with 0.04 mg/l TDZ combination with 0.02 mg/l 2,4-D (1.21 cm). The greatest callus weight was found on MS medium supplemented with 0.06 mg/l TDZ (0.66 g.). The callus was developed to shoots via



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

organogenesis. However, root induction was found when the calluses were transferred to MS medium.

The study on some phytochemical content; i.e. eugenol and cineole, total phenolics, total flavonoids, and antioxidants were investigated. The various sources of leaf were obtained from *in vitro* plant, one-year-old plants obtained from plant tissue culture at different leaf stages (young, immature and mature leaf). and 8-year-old plants grown from seeds. The leaves were collected and washed, then dried at 50 °C and extracted with various solvents. The 0.03 g dry weight of leaf sample were extracted in ethanol, hexane and methanol for 30 ml (10 x3). and measured for by spectrophotometer at the wavelength 234 nm respectively. It was found that the natural hexane-extracted leaves from all stages of seed cultivation at the age of 8 years had the highest content of eugenol and cineole at 57.94 and 95.13 mg/g dry weight. The highest of total amount of antioxidant activity by DPPH assay and phenolic compounds in mature leaves at the concentration of 0.06% was achieved at 68.80 and 71.58 percent the highest content of total flavonoid was found in immature leaves from one year's old plant from tissue culture at 11.58 mg QE/g DW.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่อง การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ และรากฝอยของเสม็ดขาวด้วย 2,4-D และTDZ ในสภาพปลอดเชื้อ สำเร็จอย่างสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือจากหลายท่าน ข้าพเจ้าขอขอบคุณ รศ. ดร. กัญจนา แซ่เตียว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำแนะนำ และให้แนวทางแก้ไขปัญหาต่างๆ ในการจัดทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ ผศ. ดร.นาตยา มนตรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างต้นเสม็ดขาวเพื่อใช้ในงานวิจัย รวมไปถึงให้คำปรึกษาให้ความรู้และให้คำแนะนำระหว่างการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จได้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. มณทินี ธีรารักษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำชี้แนะช่วยแก้ปัญหาและให้ความรู้เกี่ยวกับงานวิจัยที่กำลังจะศึกษา ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และห้องปฏิบัติการในการศึกษาจนสำเร็จด้วยดี

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ ที่กรุณาเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการศึกษาจนสำเร็จด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆ และ น้องๆ ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่คอยช่วยเหลือในการเตรียมสารเคมีและอุปกรณ์ ตลอดจนคอยให้กำลังใจ และคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกๆเรื่อง ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

นางสาว อุษณา ปรางทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญรูป ..... ฌ
**บทที่ 1 บทนำ ..... 1**
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา ..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา ..... 3
1.3 สมมุติฐานของการศึกษา ..... 3
1.4 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย ..... 3
1.5 ขอบเขตของงาน ..... 4
1.6 ขั้นตอนของการศึกษา ..... 4
1.7 ผลที่คาดว่าจะได้รับ ..... 4
**บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... 5**
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเสม็ดขาว ..... 5
2.2 การขยายพันธุ์เสม็ดขาว ..... 6
2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ..... 7
2.4 แคลลัสและยอด ..... 11
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกับสารควบคุมการเจริญเติบโต ..... 12
2.6 Hairy root ..... 13
2.7 น้ำมันหอมระเหยที่สำคัญในเสม็ดขาว องค์ประกอบทางเคมีของใบเสม็ดขาว ..... 13
2.8 การสกัดสารสำคัญจากพืชด้วยตัวทำละลาย ..... 15
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับสารสกัด ..... 16
2.10 วิเคราะห์สารสำคัญ ..... 17
2.11 อนุมูลอิสระ ..... 18
2.12 ความหมายของสารต้านออกซิเดชัน ..... 18
2.13 สารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ ..... 22
2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... 24



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

**บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย** ..... 27
3.1 อุปกรณ์การทดลอง ..... 27
3.2 วิธีการทดลอง ..... 28
**บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล** ..... 39
4.1 ผลการทดลองที่ 1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ..... 39
4.1.1 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส3 ..... 39
4.1.2 ความสูงแคลลัส ..... 42
4.1.3 ความกว้างแคลลัส ..... 44
4.1.4 จำนวนการเกิดยอดที่เกิดใหม่ต่อชิ้นส่วน ..... 46
4.1.5 ความสูงยอด ..... 49
4.2 ผลการทดลองที่ 2 ผลของ 2,4-D และ TDZ ที่มีผลต่อการชักนำรากของต้นเสม็ดขาว ..... 51
4.3 ผลการทดลองที่ 3 การศึกษาการพัฒนาเกิดยอดและแคลลัส ..... 54
4.3.1 การเจริญเติบโตของแคลลัส ..... 54
4.3.2 ความกว้างแคลลัส ..... 56
4.3.3 ความสูงแคลลัส ..... 57
4.3.4 น้ำหนักแคลลัส ..... 58
4.3.5 จำนวนการเกิดยอด ..... 59
4.4 การทดลองที่ 4. การวิเคราะห์หาปริมาณ eugenol และ cineole ของสารสกัดที่ได้จากใบของเสม็ดขาว ..... 60
4.4.1 ปริมาณสาร eugenol และ cineole ..... 60
4.4.2 ปริมาณสาร eugenol และ cineole ในแหล่งที่มาของใบที่แตกต่างกัน ..... 62
4.4.3 ปริมาณสาร eugenol และ cineole ในใบเสม็ดขาวที่มีอายุใบที่มีอายุใบที่แตกต่างกัน ..... 64
4.4.4 การศึกษาฤธิ์ต้านอนุมูลออิสระด้วยวิธี DPPH ..... 66
4.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ..... 67
4.4.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ..... 68
**บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง** ..... 69
**บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ** ..... 77
บรรณานุกรม ..... 79
ภาคผนวก ..... 90
ประวัติผู้เขียน ..... 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

**ตารางที่** **หน้า**

4.1 ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกิดแคลลัส ในการเพาะเลี้ยงข้อเสม็ดขาวในสัปดาห์ที่ 2-8....41
4.2 ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อความสูงแคลลัสในการเพาะเลี้ยงข้อเสม็ดขาวในสัปดาห์ที่ 2-8....43
4.3 ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อความกว้างแคลลัสในการเพาะเลี้ยงข้อเสม็ดขาวในสัปดาห์ที่ 2-8....45
4.4 ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนการเกิดยอดในการเพาะเลี้ยงข้อเสม็ดขาวในสัปดาห์ที่ 2-8....48
4.5 ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อความสูงยอดในการเพาะเลี้ยงข้อเสม็ดขาวในสัปดาห์ที่ 2-8....50
4.6 การชักนำ Hairy root ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ TDZ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา10 สัปดาห์....53
4.7 ผลของสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ 2,4-D ต่อขนาดความกว้างแคลลัสในสัปดาห์ที่ 2-5....56
4.8 ผลของสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ 2,4-D ต่อขนาดความสูงแคลลัส ในสัปดาห์ที่ 2-5....57
4.9 ผลของสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2.4-D และ TDZ ต่อน้ำหนักแคลลัส ในสัปดาห์ที่ 2-5....58
4.10 ผลของสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ต่อจำนวนการเกิดยอดในสัปดาห์ที่ 2-5....59
4.11 ปริมาณสารยูจีนอล และซิเนออลของใบเสม็ดขาว (Melaleuca cajuputi) ที่มีระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน....61
4.12 แหล่งที่มาของใบเสม็ดขาวต่อปริมาณสาร eugenol และ cineole....63
4.13 เปรียบเทียบอายุของใบเสม็ดขาวที่ปลูกจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อายุ 1 ปี ต่อปริมาณสาร eugenol และ cineole....65
4.14 ผลการทดสอบทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบเสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi*) ที่มีระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน โดยวิธี DPPH assay....66
4.15 ผลการทดสอบปริมาณสารฟีนอลิกของต้นเสม็ดขาว (Melaleuca cajuputi) ด้วยวิธี Folin – Ciocalteu assay....67
4.16 ผลการทดสอบปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของต้นเสม็ดขาว (Melaleuca cajuputi) โดยวิธีa luminium chloride colorimetric assay....68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ

**ภาพที่** **หน้า**

2.1 เสม็ดขาว อ.แกลง จังหวัดระยอง ..... 6
2.2 โครงสร้างทางเคมีของยูจีนอล ..... 14
2.3 โครงสร้างเคมีของ Eucalyptol (1,8-cineole, 1,8-epoxy-p-menthane) ..... 15
2.4 กลไกการต้านอนุมูลอิสระแบบ Free radical scavenging ..... 19
3.1 แผนภาพการเตรียมสารละลายมาตรฐาน ..... 31
4.1 การชักนำแคลลัสและยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ..... 40
4.2 ลักษณะการเจริญเติบโตของเสม็ดขาวในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 0.08 ร่วมกับ 2,4-D 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตรในสัปดาห์ที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (A-D) และบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและตายไป (E) ..... 40
4.3 ลักษณะการเจริญเติบโตของเสม็ดขาวในสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร (A) และMS ที่เติม TDZ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร (B) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ..... 42
4.4 ลักษณะการเจริญเติบโตของเสม็ดขาวที่มีการเกิดยอดในสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร (A) และMS ที่เติม TDZ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร (B) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ..... 47
4.5 ลักษณะการเจริญเติบโตของเสม็ดขาวที่มีความสูงยอดที่ดีในสูตรอาหาร MS ที่ TDZ ร่วมกับ 2,4-D 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร (A) และสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (B)หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ..... 49
4.6 การเพาะเลี้ยง Hairy root ของเสม็ดขาวในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS control (a) MS ที่เติม TDZ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร (b) และบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร (c) เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ ..... 52
4.7 การเจริญเติบโตของแคลลัสบนชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารคุมการเจริญโต TDZ และ 2,4-D เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ..... 55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi* Powell) เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่พบได้ทั่วไปในภาคใต้และภาคตะวันออกของประเทศ เนื่องจากสามารถนำส่วนต่างๆ ของเสม็ดขาวมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น นำไม้มาสร้างบ้าน ทำฟืน ทำค้างสำหรับปลูกพืช และยังนำใบมาสกัดเพื่อนำน้ำมันเขียวมาใช้เป็นยาต่างๆ (cajuput oil) ทั้งยาหม่อง ยาไล่แมลง ซึ่งน้ำมันเขียวที่ได้จากเสม็ดขาวนี้ให้คุณภาพดีและมีราคาสูงกว่าน้ำมันเขียวที่สกัดจากใบยูคาลิปตัส (Thinh. 1997) นำมาใช้เป็นอาหารสัตว์เลี้ยง นำใบและยอดอ่อนมารับประทานเป็นผัก (ธนิตย์ หนูยิ้ม และบุญชุบ บุญทวี. 2542) ซึ่งใบสดสามารถนำมาต้มเป็นยาได้ เช่น แก้ปวดเมื่อย ยาแก้ไอ ถ่ายพยาธิ และยอดอ่อนก็สามารถนำมารับประทานเป็นผักสดได้อีกด้วย ประโยชน์ทั้งหมดในเรื่องของสรรพคุณต่างๆ ของเสม็ดขาวจึงมีความจำเป็นต่อการขยายพันธุ์เสม็ดขาวเพื่อเป็นการอนุรักษ์สายพันธุ์พืชและนำประโยชน์มาใช้ต่อไป อีกทั้งการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็มีความสะดวก ประหยัดพื้นที่ และยังขยายพันธุ์ได้ปริมาณมากและรวดเร็ว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเครื่องมือที่สำคัญส่วนหนึ่งของเทคโนโลยีชีวภาพพืชซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในหลายๆ ด้าน ในการอนุรักษ์และฟื้นฟูสภาพป่าอย่างรวดเร็ว (Grossnickle and Sutton. 1999; Bodhipadma *et. al*. 2006; Nathalang. 2012) ปัญหาหลักที่เป็นข้อจำกัดเมื่อมีการขยายพันธุ์ไม้ต้น (tree) หรือไม้เนื้อแข็ง (woody plant) แบบไม่อาศัยเพศด้วยวิธีการตัดชำกิ่ง คือการที่ไม่สามารถทำให้เกิดรากได้ในพืชทุกชนิดหรือทุกกิ่งที่ถูกตัดชำ และหากไม่มีเทคนิคในการทำให้กิ่งหรือต้นที่ถูกตัดชำเกิดรากได้ รวมถึงส่วนของพืชที่นำมาขยายพันธุ์อาจมีข้อจำกัดอีกด้วย การเพิ่มปริมาณของไม้ต้นดังกล่าวจึงเป็นไปได้ยาก นอกจากนี้ถ้าเลือกใช้วิธีการขยายพันธุ์ไม้ต้นด้วยการเกิดยอด (shoot organogenesis) จากชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็ยังต้องมีขั้นตอนของการเกิดราก (root organogenesis) เพิ่มขึ้นมาอีก ซึ่งขั้นตอนนี้อาจทำได้โดยง่ายหรือยากก็ได้ ซึ่งในการเพาะเลี้ยงโดยใช้ส่วนต่างๆ ของพืชในอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ เช่น ก้านใบ แผ่นใบ ปลายราก ยอด ลำต้น สามารถเจริญเติบโตขึ้นเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ เมื่อใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมาะสม (ภูวดล บุตรรัตน์. 2559) จึงขึ้นอยู่กับปริมาตรและชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตและชนิดของพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ สารกลุ่มออกซิน ช่วยส่งเสริมการขยายขนาดของเซลล์ การเกิดราก ยับยั้งการเกิดตาข้าง ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น ออกซินสามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ และกลุ่มของไซโตไคนิน จะกระตุ้นการแบ่งเซลล์ และการสร้างอวัยวะ ส่งเสริมการพัฒนาของตาและยอด (บุญยืน กิจวิจารณ์. 2547) โดย Skoog and Miller (1957) รายงานว่าอัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนิน เป็นส่วนส่งเสริมการเกิดลักษณะต่างๆ รูปร่างของพืชจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง ทั้งนี้ความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินมีความแตกต่างกันไปตามแต่สกุลและชนิดของพืช เพื่อกระตุ้นให้เกิดการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อ ซึ่งการทดลองส่วนใหญ่ที่นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส (callus) โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) แคลลัส คือ เนื้อเยื่อที่เกิดใหม่จากการเพาะเลี้ยงส่วนต่างๆ ของพืช ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงคิมาที่ยังไม่มีการแปรสภาพไปเป็นอวัยวะ (เปรมฤดี ดำยศ. 2550) จากนั้นนำแคลลัสที่ได้ไปชักนำให้เกิดยอด นอกจากนี้ยังมีการทดลองใช้ N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea (TDZ) ในการชักนำการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดโดยไม่ผ่านการเกิดแคลลัส และในการเพาะเลี้ยง hairy root เพื่อผลิตสารทุติยภูมิมีรายงานในพืชสมุนไพรหลายชนิดรวมทั้งเจตมูลเพลิงแดง ซึ่งพบว่า hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงที่ชักนำด้วย *Agrobacterium rhizogenes* สายพันธุ์ K599 สามารถผลิตสาร plumbagin ได้ปริมาณมากซึ่งมากกว่ารากปกติที่เพาะเลี้ยง (Tatreerod *et. al*. 2003) เซลล์เพาะเลี้ยงและแคลลัส Chuntaratin. (2006) รากชนิดนี้เจริญเติบโตได้รวดเร็วและเหมาะสมสำหรับการผลิตสารทุติยภูมิ เนื่องจากสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ปริมาณมากเมื่อเทียบกับรากปกติ เซลล์แขวนลอยและแคลลัส (Kuzma *et. al*. 2017) ปริมาณสารทุติยภูมิที่ผลิตได้มีความแน่นอน เนื่องจากราก hairy root มีความคงที่ทางพันธุกรรมสูง (Häkkinen *et. al*. 2016) น้ำมันเสม็ดหรือน้ำมันเขียวจากเสม็ดขาวมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกตางกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และแหล่งที่ปลูก โดยน้ำมันเสม็ด (Cajuput oil) ที่เป็นที่ต้องการของตลาดและมีราคาสูงจะต้องมีปริมาณสารประกอบ 1,8-cineole สูง (Brophy *et. al.* 1989; Oyen and Xuan Dung. 1999) เนื่องจากน้ำมันเสม็ดมีราคาสูงกว่าน้ำมันยูคาลิปตัส บางครั้งจึงมีการผสมน้ำมันยูคาลิปตัสซึ่งมีปริมาณ 1,8-cineole สูงลงในน้ำมันเสม็ดเพื่อผลประโยชน์ในทางการค้า การสร้างและการสะสมสารทุติยภูมิ ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาอย่างกว้างขวางด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชเพื่อการผลิตสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทุติยภูมิ ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ ไปจนถึงการเพิ่มปริมาณการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรม รวมถึงการชักนำให้มีการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิในเซลล์ที่เพาะเลี้ยง ข้อดีของการผลิตสารทุติยภูมิ จากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชคือ สามารถเพาะเลี้ยง และผลิตสารได้ตลอดทั้งปี สารที่ได้มีคุณภาพสม่ำเสมอ รากพืชนับเป็นส่วนของพืชที่มีศักยภาพในการนำมาเพาะเลี้ยง

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของ 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) และ N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea (TDZ) ต่อการสร้างแคลลัสและยอดในเสม็ดขาว

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อรากฝอยในอาหารเหลวในสภาพปลอดเชื้อ

1.2.3 เพื่อศึกษาปริมาณสารสำคัญที่ได้จากใบเสม็ดขาวจากสภาพปลอดเชื้อ และปลูกในธรรมชาติที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

## 1.3 สมมุติฐานของการศึกษา

สารควบคุมการเจริญเติบโตของ 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) และ N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea (TDZ) ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ต่อการสร้างแคลลัสและยอดในเสม็ดขาว และการสร้างรากฝอย

ใบที่มาจากสภาพปลอดเชื้อ และที่ปลูกในธรรมชาติที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและเมล็ด อายุของใบ และตัวทำละลายมีผลต่อปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

## 1.4 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย

การใช้ TDZ จึงมีคุณสมบัติช่วยให้เกิดการแบ่งเซลล์ เพิ่มขนาดเซลล์ กระตุ้นการแตกตาข้าง สร้างยอดและการเกิดต้นใหม่ และ 2,4-D ซึ่งเป็นสารกลุ่มออกซินเป็นกลุ่มที่กระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ทั้งในส่วนต้นและราก มีผลต่อการแบ่งเซลล์การยืดยาวของเซลล์ ซึ่งในการทดลองการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของ TDZ และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ต่อการสร้างแคลลัสและยอดในเสม็ดขาว และการสร้างรากฝอย เสม็ดขาวเป็นไม้ยืนต้นที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นพันธุ์ไม้เด่นที่พบได้ทั่วไปในภาคใต้และภาคตะวันออก เนื่องจากสามารถนำส่วนต่างๆ ของเสม็ดขาวมาใช้ประโยชน์ได้ และเสม็ดขาวได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านสารสำคัญ ซึ่งการทดลองนี้ได้ทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากชิ้นส่วนใบของเสม็ดขาวที่ได้จากสภาพธรรมชาติและในสภาพปลอดเชื้อ

## 1.5 ขอบเขตของงาน

1.5.1 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของ 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) และ N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea (TDZ) ต่อการสร้างแคลลัสและยอดในเสม็ดขาว

1.5.2 ศึกษาวิธีการสร้างรากฝอยในอาหารเหลวในสภาพปลอดเชื้อ

1.5.3 ศึกษาปริมาณสารสำคัญและการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากชิ้นส่วนใบของเสม็ดขาวที่ได้จากสภาพธรรมชาติและในสภาพปลอดเชื้อ

## 1.6 ขั้นตอนของการศึกษา

1.6.1 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) และ N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea (TDZ) ต่อการสร้างแคลลัสและยอดในเสม็ดขาว

1.6.2 ศึกษาผลของการเพาะเลี้ยงรากของเสม็ดขาวในอาหารเหลวที่สภาพปลอดเชื้อ

1.6.3 ศึกษาการวัดปริมาณสารสำคัญในใบที่มาจากสภาพปลอดเชื้อ และที่ปลูกในธรรมชาติที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

## 1.7 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.7.1 ทราบถึงผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของ 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) และ N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea (TDZ) ต่อการสร้างแคลลัสและยอดในเสม็ดขาว

1.7.2 ทราบถึงผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อรากฝอยในอาหารเหลวที่สภาพปลอดเชื้อ

1.7.3 ทราบถึงปริมาณสารสำคัญในใบเสม็ดขาวที่มาจากสภาพปลอดเชื้อ และที่ปลูกในธรรมชาติที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเสม็ดขาว

ไม้เสม็ดขาวสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ทั้งในสภาวะดินเป็นกรดจัด ดินเค็ม สภาพน้ำท่วมและแห้งแล้ง (Sasaki *et. al.* 1995) ทนต่อไอน้ำเค็ม (โอเยน และ ดุง. 1999) แต่สามารถเจริญเติบโตและมีกระจายพันธุ์ได้ดีในที่ลุ่มมีน้ำขังตามขอบพรุ สำหรับในพื้นที่แห้งแล้งมักมีรูปทรงของลำต้นแคระแกร็น คดงอ และมีขนาดเล็ก โดยส่วนใหญ่ในสภาพที่ป่าพรุชอบขึ้นเป็นไม้ชนิดเดียว ส่วนในบริเวณป่าที่มีน้ำท่วมขัง มักขึ้นปนกับพันธุ์ไม้ประเภทอื่นๆ ไม้เสม็ดขาวเป็นพันธุ์ไม้ที่มีความสามารถในการปรับตัวให้เจริญเติบโตได้ดี พบว่าในพื้นที่ที่มีระดับน้ำท่วมขังลึกจะสามารถเจริญเติบโตได้ดี และเร็วกว่าในพื้นที่ที่มีน้ำท่วมขังในที่ตื้น (Tange *et. al.* 1998)

**ลำต้น** เสม็ดขาวเป็นไม้ยืนต้นที่ไม่ผลัดใบ มีรูปทรงชีวิต (life form) ได้หลายรูปแบบ เช่น เป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่ (large bush) เป็นไม้ยืนต้นที่สามารถแตกหน่อได้ดี (bushy coppiced tree) และเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ (tall tree) ไม้เสม็ดขาวที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่มีขนาดเล็ก คือมีความสูงตั้งแต่ 5-25 เมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่อต้นเฉลี่ยประมาณ 20 เซนติเมตร แต่มีพบได้บ้างในบางพื้นที่พบว่ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่อต้น มากกว่า 50 เซนติเมตร เช่นในป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส ส่วนในต่างประเทศ พบว่าบางต้นมีความสูงถึง 35 เมตร ต้นไม้เสม็ดขาวมีเรือนยอดทรงแคบรูปกรวยคว่ำ เปลือกนอกเป็นแผ่นบางๆ ซ้อนกันเป็นชั้นหนา มีสีขาวถึงสีน้ำตาลเทา เปลือกชั้นในสีน้ำตาลอ่อน

**ใบ** ใบเดี่ยว เรียงเวียนสลับ แผ่นใบรูปหอก ยาว 5-10 เซนติเมตร กว้าง 1.5-4 เซนติเมตร ใบอ่อนมีขนสีขาวเป็นมัน ใบแก่ผิวใบเกลี้ยง สีเทาแกมเขียว ปลายใบแหลม ก้านใบยาว 0.5-1 เซนติเมตร

**ราก** ระบบรากเป็นรากฝอยไม่มีรากแก้ว

**ดอก** มีสีขาว ออกดอก 1-3 ดอกตามง่ามใบ ออกดอกเกือบตลอดปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ผลและเมล็ด** ผลมีขนาดกว้างประมาณ 4 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตรคล้ายรูปถ้วย ผล เสม็ดขาว 1 ผล มีเมล็ดขนาดเล็กอยู่ภายในผลประมาณ 200 เมล็ด ผลสดจำนวน 1 กิโลกรัมที่เก็บจากป่ารวมทั้งกิ่งขนาดเล็ก เมื่อนำไปตากแดดแล้วแยกเอาเพียงเมล็ด ให้น้ำหนักเมล็ดได้ประมาณ 67 กรัม แต่ถ้าแยกเอากิ่งออกก่อนแล้วนำผลสดเพียงอย่างเดียวมาแยก พบว่าผลสดจำนวน 1 กิโลกรัม ให้เมล็ดได้ประมาณ 125 กรัม ซึ่งในทางปฏิบัติการเก็บเมล็ดเสม็ดขาวจะทำการเก็บผลรวมทั้งกิ่งขนาดเล็ก เพราะจะเป็นการประหยัดทั้งเวลา และค่าใช้จ่าย ผลสดของเสม็ดขาว ปริมาตร 1 ลิตร มีจำนวนผลประมาณ 11,300 ผลสดไม่รวมกิ่ง จำนวน 1 กิโลกรัม มีผลประมาณ 26,000 ผล เมล็ดเสม็ดขาว 1 กิโลกรัม มีจำนวนเมล็ดประมาณ 5-9 ล้านเมล็ด เก็บผลได้เกือบตลอดปี (โครงการศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทอง (งานป่าไม้) กรมป่าไม้. 2550)

**ภาพที่ 2.1** เสม็ดขาว อ.แกลง จังหวัดระยอง

## 2.2 การขยายพันธุ์เสม็ดขาว

การปลูกเสม็ดขาวสามารถทำได้หลากหลายทั้งการเพาะด้วยเมล็ด และถอนกล้าเปลือยรากจากป่าธรรมชาติมาชำลงในถุงดิน และรวมถึงการขุดล้อมต้นที่มีขนาดใหญ่ก็สามารถทำได้ง่าย การเพาะชำจากเมล็ดทำได้โดยวิธีการใช้เมล็ดหว่านลงแปลงแล้วรดน้ำ จากนั้นนำพลาสติกใสคลุมเพื่อกันน้ำฝน เมื่อต้นกล้าแข็งแรงโตเต็มที่แล้วให้ย้ายชำลงในถุง การเตรียมกล้าพันธุ์จนถึงการเพาะเมล็ดจะใช้ระยะเวลาประมาณ 7 เดือน เมล็ดก็จะสามารถงอกได้ (Sasaki *et. al.* 1995) การเตรียมกล้าจากกล้าเปลือยรากที่งอกขึ้นเองตามธรรมชาติ พบว่าการเลือกถอนต้นกล้าที่ขึ้นอยู่ในพื้นที่น้ำไม่ท่วมให้การรอดตายสูงกว่าต้นกล้าที่ถอนจากพื้นที่ที่มีน้ำท่วมขัง การเตรียมกล้าโดยวิธีนี้จะช่วยลดระยะเวลาการเตรียมกล้าได้มาก โดยใช้ระยะเวลาเตรียม 2-3 เดือน ก็สามารถนำไปปลูกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำเอาชิ้นส่วนของพืช เช่น อวัยวะต่างๆ ข้อ ราก ตาปลาย ยอด โพรโทพลาสต์ มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบไปด้วย เกลือแร่ ธาตุอาหาร วิตามิน น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินหรือไซโตไคนิน โดยเนื้อเยื่อจะถูกเก็บไว้ในที่ปลอดเชื้อและมีการรักษาสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงต่างๆ เช่น อุณหภูมิ แสง และความชื้น เป็นต้น (รงรอง วิเศษสุวรรณ. 2542) หลักการที่สำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ ต้องใช้เทคนิคที่จะทำให้เกิดการปลอดเชื้อ โดยการที่ตัดนำเอาชิ้นส่วนที่สะอาด นำมาเลี้ยงในภาชนะที่บรรจุอาหารสังเคราะห์ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว เมื่อเซลล์พืชหรือส่วนต่างๆ ของพืช ได้รับแร่ธาตุ วิตามิน สารควบคุมการเจริญเติบโต และน้ำตาลจากอาหารที่ใช้เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ จะมีการเจริญเติบโตเป็นต้นโดยตรง หรือเกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า แคลลัส หรือเกิดเป็นคัพภะที่เรียกว่า โซมาติกเอ็มบริโอ หรือเอมบริออยด์ เมื่อตัดแบ่งเป็นชิ้นๆ แล้วเปลี่ยนอาหารใหม่บ่อยๆ ก็สามารถเพิ่มปริมาณได้ไม่มีที่สิ้นสุด ผลสุดท้ายก็จะได้ต้นที่เหมือนกันทุกประการ (อรดี สหวัชรินทร์. 2539)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะประสบความสำเร็จมากน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างที่มีบทบาทควบคุมการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืช สรุปได้ ดังนี้

2.3.1 ปัจจัยภายในพืช (endogenous factors)

2.3.1.1 ลักษณะทางพันธุกรรม (genetic factor) การเจริญและพัฒนาไปเป็นต้น และรากได้ง่ายหรือยากจะแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดพันธุ์ของพืช ถึงแม้ว่าได้เลี้ยงในกลุ่มของอาหารที่เหมาะสม ซึ่งพืชบางชนิดการเจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นต้นและรากได้ต้องผ่านขบวนการออร์แกโนเจเนซิส หรือขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส เป็นต้น (พรพิมล สุริยจันทราทอง. 2545)

2.3.1.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators) ที่ใช้เรียกทั้งสารที่เกิดจากธรรมชาติและสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาซึ่งมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของพืช ถ้าเป็นสารอินทรีย์ที่พบในธรรมชาติซึ่งพืชสร้างขึ้นมาเองจะเรียกว่า ฮอร์โมน สารเหล่านี้พืชจะสร้างขึ้นมาจากอวัยวะแห่งหนึ่ง ซึ่งเป็นคนละที่กับบริเวณที่สารทำงานและออกฤทธิ์ของฮอร์โมนไม่ว่าจะมีปริมาณมากหรือน้อยก็ตาม แต่ในปัจจุบันคำว่าฮอร์โมนมักใช้แทนสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาซึ่งมีอิทธิพลเหมือนกับฮอร์โมนที่พืชสังเคราะห์ขึ้นมา (ประภัสสร สูทกวาทิน. 2547) สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่นิยมใช้ในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกันมากได้แก่ สารในกลุ่มออกซิน และไซโตไคนิน (แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ. 2547)

2.3.1.2.1 ออกซิน (Auxin) ในธรรมชาติฮอร์โมนกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการยืดของลำต้นและปล้อง ส่วนของพืชโค้งเข้าหาสิ่งเร้า (tropism) การยับยั้งการเจริญของตาข้าง (apical dominance) การหลุดร่วงของ ใบ ดอก และผลการเกิดราก เป็นต้น ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้นำเอาออกซินไปใช้ในการกระตุ้น การแบ่งเซลล์และการเกิดรากออกซินที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีดังต่อไปนี้ คือ indole-3 acetic acid (IAA), indole-3 butyric acid (IBA), naphthalene acetic acid (NAA), naphthoxy acetic acid (NOA), para-chlorophenoxy acetic acid (p-CPA), 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) และ 2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid (2,4,5-T)

2.3.1.2.2 ไซโตไคนิน (Cytokinin) ฮอร์โมนกลุ่มนี้มีผลกระตุ้นให้พืชเจริญเติบโตส่งเสริมการแบ่งเซลล์ กระตุ้นการเกิดยอดขณะที่ยับยั้งการเกิดรากและกระตุ้นให้เกิดแคลลัส เมื่อใช้ร่วมกันกับออกซินในอัตราส่วนที่เหมาะสม ไซโตไคนินเป็นสารประเภทที่ถูกสร้างขึ้นจากบริเวณปลายราก และ ใบอ่อน ไซโตไคนินชนิดที่นิยมใช้ส่วนใหญ่มีดังต่อไปนี้ คือ 6-benzyladenin (BA), 6-benzylaminopurine (BAP), 6-furfurylaminopurine (Kinetin) และ N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea (TDZ) ซึ่งเป็นกลุ่มของสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้น และถูกลำเลียงไปยังส่วนต่างๆ ของพืชในปริมาณต่ำ และมีผลต่อกระบวนการตอบสนองทางสรีรวิทยา ตลอดจนการเจริญเติบโตของพืชผลของฮอร์โมนพืช ที่จะแสดงออกในแต่ละส่วนของพืช (กนกวรรณ เสรีภาพ. 2554)

## คุณสมบัติของสาร 2,4-dichlorophenoxy acetic acid

2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) เป็นสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม chlorophenoxyacetic acid ประโยชน์หลักในการใช้จะใช้สำหรับกำจัดวัชพืชใบกว้าง สำหรับธัญพืช สนามหญ้า สวนสาธารณะ และสนามกอล์ฟ นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในพืชใบเลี้ยงคู่เพื่อให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นในทางการค้า นอกจาก 2,4-D ในรูปของกรดที่ใช้เป็นสารออกฤทธิ์แล้วยังมีอนุพันธ์ที่เป็นเกลือและเอสเตอร์ (ester) จำนวนหลายสาร (สุเทพ เรืองวิเศษ และคณะ. 2553)

การใช้ 2,4-D ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการชักนำให้เกิด embryogenesis นั้นสามารถยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงและช่วยให้เซลล์กลายพันธุ์ (mutated cells) เพิ่มปริมาณได้รวดเร็ว การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้ 2,4-D จะต้องระมัดระวังกว่าการใช้ออกซินชนิดอื่น เพราะมีฤทธิ์รุนแรงและสลายตัวยากกว่าออกซินชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Zaerr and Mapes. 1982)

## คุณสมบัติของสาร Thidiazuron (TDZ)

Thidiazuron (TDZ) หรือ N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea เป็นสารประกอบพวก phenylurea มีสูตรเคมีคือ $C_9H_8N_4OS$ มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน (light-yellow-crystal) มวลโมเลกุลเท่ากับ 220.2 g/mol มีจุดหลอมเหลวที่ 213 องศาเซลเซียส และละลายได้ดีในเอทานอลหรือตัวทำละลายอื่น ๆ เช่น Acetone, Benzene และ *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) เป็นต้น (Murthy *et. al.* 1998) TDZ ถูกพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในทางการค้า เพื่อทำให้ใบฝ้ายหลุดร่วงก่อนเก็บเกี่ยว (Arndt *et. al*. 1976; Huetteman and Preece. 1993) และจดทะเบียนในชื่อทางการค้าเป็นครั้งแรกว่า Dropp นอกจากนี้ TDZ ยังมีความเสถียรสูง สามารถเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นและเก็บไว้ในตู้เย็นได้โดยไม่เสื่อมสภาพ และสามารถเตรียมรวมกับอาหารและนึ่งฆ่าเชื้อได้โดยไม่สูญเสียการออกฤทธิ์ (Huetteman and Preece. 1993)

ในการใช้สาร TDZ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่ามีการแสดงออกหลายแบบ และมีประสิทธิภาพสูงในพืชหลาย ๆ ชนิด ตั้งแต่ไม้พุ่มจนถึงไม้ยืนต้น โดยเฉพาะในไม้เนื้อแข็ง Mok *et al.* (1982) ได้นำ TDZ มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Phaseolus lunatus* L. พันธุ์ Kingston เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1982 พบว่ามีการออกฤทธิ์ของไซโตไคนินโดยมีการกระตุ้นให้มีการเจริญของแคลลัสสูงกว่า zeatin (Mok *et. al*. 1982; Murthy *et. al*. 1998) ซึ่ง TDZ มีประสิทธิภาพสูงกว่าไซโตไคนินชนิด amino purine แต่ใช้ความเข้มข้นต่ำกว่ามาก ด้วยเหตุผลดังกล่าวทำให้มีการใช้ TDZ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพิ่มมากขึ้น โดยความเข้มข้นของ TDZ ที่สูงกว่า 0.22 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัส ยอด หรือเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายได้ และความเข้มข้นต่ำกว่า 2.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นช่วงความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการชักนำให้เกิดต้น ดังนั้นในการชักนำยอดจาก TDZ ควรใช้ความเข้มข้นอยู่ในช่วงไม่เกิน 2.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แม้ว่าการใช้ TDZ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีประสิทธิภาพสูง แต่ยอดที่ได้สั้น แคระแกร็น และมีปัญหาในการเกิดราก (Huetteman and Preece. 1993; Murthy *et. al*. 1998)

การแสดงออกของ TDZ ได้แก่ การกระตุ้นให้เกิดแคลลัส การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ การเจริญของแคลลัส การชักนำให้เกิดยอด การชักนำให้เกิดรากเป็นต้น (Huetteman and Preece. 1993;

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Murthy *et. al*. 1998; Lu. 1993) การแสดงออกเหล่านี้เกิดได้ทั้งจากการใช้ TDZ เพียงอย่างเดียว หรือมีการใช้ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น เช่น NAA, BA, kinetin หรือ 2,4-D

2.3.2 ปัจจัยภายนอก (exogenous factors)

2.3.2.1 อุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช นอกจากจะมีความสำคัญต่อกระบวนการทางชีวเคมีของเนื้อเยื่อพืชแล้ว ยังมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเนื้อเยื่อ การสร้างอวัยวะตลอดจนการเจริญของต้นพืชหลังย้ายออกปลูกนอกสภาพปลอดเชื้อ ในการควบคุมอุณหภูมิเพื่อให้ได้ตามวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักใช้การควบคุมอุณหภูมิและแสง ส่วนในห้องเป็นอุณหภูมิคงที่ทั้งตอนกลางวันและกลางคืน (พรพิมล สุริยจันทราทอง. 2545)

2.3.2.2 แสง มีการศึกษาเรื่องคุณสมบัติของแสงต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช ทั้งในด้านปริมาณความเข้มแสงและปริมาณแสงที่ได้รับ จำนวนชั่วโมงของแสงที่ได้รับต่อวัน สำหรับความเข้มของแสงจะมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์แสงของพืช โดยส่วนใหญ่พืชที่นำมาเพาะเลี้ยงในขวดแก้วจะมีความเข้มแสงต่ำและน้ำตาลซูโครสที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงยังเกิดน้อยกว่าพืชที่ปลูกอยู่ในดิน ส่วนการเกิดรากและการเจริญของรากจะต้องการปริมาณแสงน้อยกว่ายอด นิยมใช้ที่ 12-16 ชั่วโมงต่อวัน (พรพิมล สุริยจันทราทอง. 2545) มีรายงานความเข้มแสงที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมากกว่าระยะต่อการให้แสง ถ้าหากพืชในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้รับความเข้มแสงสูงเท่าในแปลงปลูกพืชอาจเป็นอันตรายได้ เนื่องจากทำให้พืชได้รับอุณหภูมิสูงไปด้วย พืชในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อควรเลี้ยงภายใต้สภาพแสงประมาณ 1000-4,000 ลักซ์ ส่วนในระยะที่ต้องการให้ต้นพืชเจริญเตรียมออกรากต้องการความเข้มแสง คือ 3,000 ลักซ์โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน การให้แสงที่มีความเข้มในระดับนี้มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายสูงเมื่อย้ายปลูก อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการให้แสงกับความเข้มของแสงจะต้องมีความสัมพันธ์กัน เช่น ถ้าให้แสงที่มีความเข้มสูง อาจจะใช้ระยะเวลาในการให้แสงน้อยลง เป็นต้น

2.3.2.3 ความชื้น (humidity) เนื่องจากความชื้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อค่อนข้างสูง ถ้าความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงต่ำก็จะทำให้เกิดการสูญเสียน้ำภายในขวดจะส่งผลทำให้อาหารแห้งเร็ว แต่ถ้าความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงสูงเกินไปก็จะทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้ดี ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย และในบางครั้งถ้าความชื้นภายในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูงมาก จะทำให้พืชเกิดอาการบวมน้ำ โดยอากาศในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อควรจะมีความชื้นอยู่ร้อยละ 70 ซึ่งเป็นความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช (พรพิมล สุริยจันทราทอง. 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 แคลลัสและยอด (Callus and shoot)

2.4.1 แคลลัส คือ เซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ แคลลัสประกอบด้วยเซลล์พาเรนคิมา (parenchyma) เพียงอย่างเดียว มีขนาดต่างๆ มีรูปร่างไม่แน่นอน แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่นเรียกว่า compact callus แต่ถ้าเกาะกันอย่างหลวมๆ เรียกว่า friable callus แคลลัสที่ได้จะมีรูปร่าง สี ที่แตกต่างออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และอาหารที่ใช้เลี้ยง การเจริญของแคลลัสในอาหารแข็งเห็นได้จากการที่มีก้อนของเนื้อเยื่อโตขึ้น ส่วนใหญ่ใช้การเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อการขยายพันธุ์ การผลิตพืชพันธุ์ทนทานหรือต้านทาน การชักนำแคลลัสต้องอาศัยปัจจัยภายนอก ได้แก่ สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต ตลอดทั้งปัจจัยภายในต้นพืช ได้แก่ อายุและความพร้อม ลักษณะทางพันธุกรรม และฮอร์โมนภายในพืช ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดหรือสายพันธุ์ของพืช นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการศึกษาด้วย (อัมพา ว่องวิชชกร และคณะ. 2546)

2.4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส

2.4.2.1 ขนาดและรูปร่างของชิ้นส่วน (size and shape) ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้เลี้ยงต้องใช้ชิ้นส่วนที่มีขนาดค่อนข้างเล็กแต่ไม่ถึงกับเล็กมากจนเกินไป ซึ่งถ้าชิ้นส่วนมีขนาดเล็กกว่านี้แล้วจะไม่สามารถชักนำการเกิดแคลลัส

2.4.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) ออกซินและไซโตไคนิน สัดส่วนของฮอร์โมนทั้ง 2 กลุ่มนี้มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ โดยทั่วๆไป ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนออกซินน้อยกว่าไซโตไคนิน จะพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้น และถ้าสัดส่วนมีความสมดุลกัน จะพัฒนาไปเป็นแคลลัสต่อไป ความเข้มข้นที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่างๆ พบว่าออกซินจะอยู่ในช่วง 0.01-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนตินซึ่งเป็นไซโตไคนินสังเคราะห์จะอยู่ในช่วง 0.1-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ปริมาณและสัดส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสจะขึ้นอยู่กับชนิดพืช ชิ้นส่วน และระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้

2.4.2.3 ธาตุอาหาร (nutrients) นอกจากนี้ความต้องการของธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบหลัก ทั่วๆ ไปของสูตรอาหารที่นำมาใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชแล้ว อาหารเสริมต่างๆ พวกกรดอะมิโน เช่น กลูตามิน แอสปาติน พิวรีน อาร์จินิน และไพริมิดิน สารพวกเคซีน ไฮโดรไลเซท สารสกัดจากมอลท์ ยีสต์ และน้ำมะพร้าว จึงมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสในพืชบางชนิดอีกด้วย

2.4.2.4 แหล่งคาร์บอน (carbon sources) ที่สำคัญ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส หรือ แซคคาโรส ความเข้มข้น 2-4 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.5 สภาพอาหาร (media status) แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งมักเจริญเติบโตได้น้อยและช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่า และตำแหน่งที่ชิ้นส่วนแคลลัสสัมผัสกับอาหารจะมีสารที่เป็นของเสียจากเมตาโบลิซึม (metabolic wastes) ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2540)

2.4.3 การพัฒนาการเจริญเติบโตของพืช

ซึ่งการเกิด organogenesis เกิดได้ 2 ทาง ได้แก่

ทางตรง (direct organogenesis) หมายถึง การนำเนื้อเยื่อพืชส่วนใดส่วนหนึ่งมาเลี้ยงบนอาหารโดยการพัฒนาเป็นอวัยวะต่างๆจะไม่เกิดเป็นแคลลัสมาก่อน ซึ่งวิธีนี้เหมาะกับพืชพวกไม้ล้มลุก โดยใช้ส่วนของ ใบ หัว และลำต้นซึ่งสามารถควบคุมให้พืชหลีกเลี่ยงการเกิดแคลลัสก่อน

ทางอ้อม (indirect organogenesis) เป็นการชักนำยอดโดยมีการเกิดจากแคลลัสก่อน ซึ่ง แคลลัส หมายถึง กลุ่มเซลล์ที่รวมกันเป็นกลุ่ม และมีการเปลี่ยนแปลงหรือพัฒนาไปเป็นวัยวะอื่นๆ ซึ่งมีขนาดไม่แน่นอน ส่วนมากจะไม่มีรงควัตถุ แต่อาจจะมีสีเขียว สีเหลือง จาก คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และฟลาโวทีนอยด์ ซึ่งปริมาณและชนิดของรงควัตถุขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหารที่ได้รับ และปัจจัยของสภาพแวดล้อมต่างๆ โดยเฉพาะแสง (กัญจนา แซ่เตียว. 2555)

## 2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกับสารควบคุมการเจริญเติบโต

Skoog และ Miller. (1957) แสดงให้เห็นว่าออกซินและไซไคนินในอาหารสามารถควบคุมความแตกต่างของการเกิดรากและยอดของแคลลัสของยาสูบ ความเข้มข้นของออกซินสูงจะชักนำให้เกิดราก และความเข้มข้นของไซโตไคนินสูงจะสามารถชักนำให้เกิดยอดในขณะที่ความเข้มข้นเท่ากันเนื้อเยื่อจะเกิดเป็นแคลลัส กระบวนการพัฒนาอวัยวะเรียกว่า organogenesis (กระบวนการเปลี่ยนแปลงจนกระทั่งได้ อวัยวะหรือเป็นการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยตรง)

Collin และ Edwards. (1998) การทำงานร่วมกันระหว่างออกซินและไซโทไคนิน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมักใช้ออกซินร่วมกับไซโทไคนิน เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส และเพิ่มปริมาณแคลลัส ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซินและไซโทไคนิน มีบทบาทต่อการเกิดออร์แกนโนเจเนซีส หากความเข้มข้นของออกซินสูง มีผลชักนำให้เกิดราก ในขณะเดียวกันก็ยับยั้งการเกิดยอด แต่ถ้ามีความเข้มข้นของไซโทไคนินสูงจะชักนำให้เกิดยอดและยับยั้งการเกิดราก ดังนั้นการเกิดยอดและรากของพืชจึงขึ้นอยู่กับสมดุลของออกซินและไซโทไคนินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หากเติมออกซินร่วมกับไซโทไคนินจะมีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อดีกว่าการใช้ออกซินหรือไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6 Hairy root

Hairy root คือ รากพิเศษที่เกิดขึ้นบนเนื้อเยื่อพืช รากชนิดนี้เจริญเติบโตได้รวดเร็วและเหมาะสมสำหรับการผลิตสารทุติยภูมิ เนื่องจากสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ปริมาณมากเมื่อเทียบกับรากปกติ เซลล์แขวนลอยและแคลลัส (Kuzma *et. al*. 2017) ปริมาณสารทุติยภูมิที่ผลิตได้มีความแน่นอน เนื่องจากราก hairy root มีความคงที่ทางพันธุกรรมสูง (Häkkinen *et. al*. 2016) การเพาะเลี้ยง hairy root เพื่อผลิตสารทุติยภูมิมีรายงานในพืชสมุนไพรหลายชนิดรวม ทั้งเจตมูลเพลิงแดง ซึ่งพบว่า hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงที่ชักนำด้วย *Agrobacterium rhizogenes* สายพันธุ์ K599 สามารถผลิตสาร plumbagin ได้ปริมาณมาก ซึ่งมากกว่ารากปกติที่เพาะเลี้ยง (Tatreerod *et al*. 2003) เซลล์เพาะเลี้ยงและแคลลัส (Chuntaratin. 2006)

## 2.7 น้ำมันหอมระเหยที่สำคัญในเสม็ดขาว องค์ประกอบทางเคมีของใบเสม็ดขาว

องค์ประกอบที่พบมากที่สุดในน้ำมันเสม็ดที่ได้ คือ terpinolene (24.74%) และ gammaterpinene (22.84%) ตามลำดับ ซึ่งไม่ใช้สารสำคัญที่ตลาดต้องการและยังมีปริมาณไม่สูงที่จะนำมาเป็นจุดขายในท้องตลาด แต่เนื่องจากมีรายงานว่าองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเสม็ดขาวมีความผันแปรสูงขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เสม็ดเจริญเติบโต (Brophy *et. al.* 1989) จึงไม่ควรสรุปว่าเสม็ดในไทยไม่สามารถนำมาใช้ในการผลิตน้ำมันเสม็ดเพื่อการค้า แต่ควรศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเสม็ดที่เจริญเติบโตอยู่ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน เช่น เสม็ดที่พบในภาคตะวันออก หรือที่พบในป่าพรุเช่นเดียวกันแต่มีสภาพดินแตกต่างกัน เพราะมีรายงานว่าเสม็ดที่พบโดยรอบป่าพรุที่เจริญเติบโตในสภาพดินที่แตกต่างกัน มีการสะสมและปลดปล่อยแร่ธาตุบางชนิดที่ใบแตกต่างกัน (Osaki *et. al.* 1998) ซึ่งอาจมีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเสม็ดที่ถูกสร้าง และเก็บไว้ที่ต่อมน้ำมันซึ่งพบมากที่ใบ

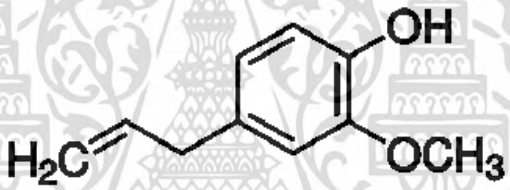
เสม็ดขาวเป็นพันธุ์พืชที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านสารสำคัญ เนื่องจากมีน้ำมันที่สกัดได้จากใบเสม็ดขาวเรียกว่า cajuput oil ซึ่งมีสารเคมีสำคัญประกอบด้วย 1,8-cineole (14-65%), terpineol, terpinyl acetate, pinene, nerolidol, และสารเคมีกลุ่ม terpenes ซึ่งมีปริมาณเล็กน้อย เช่น laevo-pinene โดยน้ำมันเสม็ด (Cajuput oil) ที่เป็นที่ต้องการของตลาดและมีราคาสูงจะต้องมีปริมาณสารประกอบ 1,8-cineole สูง โดยแบ่งเป็น 3 เกรด คือ ถ้าปริมาณสารนี้อยู่ระหว่าง 55-65% จะจัดเป็นน้ำมันเกรด 1 มีราคาสูงสุด และ ราคาลดลงไปเมื่อปริมาณสารนี้อยู่ระหว่าง 20-55% และมีปริมาณต่ำกว่า 20% ตามลำดับ (Brophy *et. al.* 1989; Oyen *et. al.* 1999) เนื่องจากน้ำมันเสม็ดมีราคาสูงกว่าน้ำมันยูคาลิปตัส จึงมีการผสมน้ำมันยูคาลิปตัสซึ่งมีปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1,8-cineole สูงลงในน้ำมันเสม็ดเพื่อผลประโยชน์ในทางการค้าด้วย ใบที่นำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยที่เรียกว่า Cajuput oil หรือ น้ำมันเขียว หรือน้ำมันเสม็ด มีกลิ่นคล้ายการบูรและมีรสขมในน้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ดขาว มีสรรพคุณทางด้าน ไล่ยุง, ฆ่าหมัดเหา, ฆ่าพยาธิไส้เดือน, ต้านยีสต์, ต้านแบคทีเรีย, ต้านเชื้อราและฆ่าหอย เป็นต้น และสารเคมีที่ พบในใบเสม็ดขาวนั้นมีไม่ต่ำกว่า 60 ชนิด แต่สารที่สำคัญคือ Cineole ซึ่งมีปริมาณมากที่สุดใน น้ำมันหอมระเหย พบประมาณ 45 - 50%

2.7.1 Eugenol

ยูจีนอลหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า 4-allyl2-methoxyphenol เป็นน้ำมันหอมระเหยในกลุ่มของสารประกอบอะโรมาติกซึ่งมีสูตรโมเลกุล คือ $C_{10}H_{12}O_2$ น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 164.20 กรัม/โมล จุดเดือด 254 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลว -7.5 องศาเซลเซียส มีค่า $pK_a$ เท่ากับ 10.19 ที่ 25 องศาเซลเซียส โครงสร้างทางเคมีแสดงดังภาพที่ 2.2 และมีลักษณะทางกายภาพ คือ มีลักษณะเป็นของเหลว ไม่มีสีจนถึงสีเหลือง สามารถละลายน้ำได้ (Katja Schulz *et. al.* 2008)



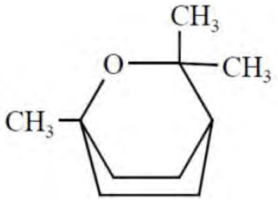

**ภาพที่ 2.2** โครงสร้างทางเคมีของยูจีนอล

**ที่มา:** http://ejournals.swu.ac.th/index.php/SWUJournal/article/viewFile/9002/7748

2.7.2 Cineole

Cineole หรือ Eucalyptol นิยมใช้เป็นแบบสารผสม (complex mixture) เช่น monoterpenes, sesquiterpenes and aromatic phenols (Batish *et. al.* 2008) ในปัจจุบันมีการใช้เพื่อจุดประสงค์ที่หลากหลาย เช่น การใช้ในอุตสาหกรรมน้ำหอม เครื่องสำอาง น้ำยาบ้วนปาก เป็นต้น 1,8-cineole (eucalyptol) ยังเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของน้ำมันหอมระเหย ลักษณะเป็นของเหลว ไม่มีสี กลิ่นคล้ายการบูร จุดเดือด 177 องศาเซลเซียส ที่อุณหภมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของน้ำเล็กน้อย สารจะมีลักษณะเป็นวุ้นและสามารถเปลี่ยนกลับไปอยู่รูปเดิมได้ด้วยการเติม hydrobromic acid มีคุณสมบัติในการแสดงความเป็นพิษต่อแมลง (นฤมล สังข์โอราน. 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 2.3** โครงสร้างเคมีของ Eucalyptol (1,8-cineole, 1,8-epoxy-p-menthane)
**ที่มา**: European commission (2002)

## 2.8 การสกัดสารสำคัญจากพืชด้วยตัวทำละลาย

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชธรรมชาติมีหลายวิธีด้วยกัน โดยการเลือกวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจะต้องพิจารณาลักษณะและปัจจัยต่างๆ เช่น ส่วนของพืชที่นำมาสกัด คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของน้ำมันหอมระเหยที่ต้องการ วัตถุประสงค์ของการนำน้ำมันหอมระเหยไปใช้ (Mcguinness. 2003)

วิธีนี้จะทำให้ได้น้ำมันหอมระเหยที่มีความเข้มข้นสูง (สิริลักษณ์ มาลานิยม. 2545) แต่คุณภาพไม่ดีเท่ากับการกลั่นเพราะหลังการสกัดจะได้สารอื่นปนมาด้วย การเลือกตัวทำละลายต้องพิจารณาคุณสมบัติของตัวทำละลายเช่น จุดเดือด ความหนาแน่น และความหนืด เป็นต้น เพื่อให้การสกัดโดยการใช้สารเคมีเป็นไปอย่างสมบูรณ์ และคุ้มค่าในทางเศรษฐศาสตร์

**คุณสมบัติของตัวทำละลาย**

1. เป็นสารละลายหรือตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติของขั้วไฟฟ้าที่คล้ายคลึงกัน
2. เป็นสารละลายหรือตัวทำละลายที่สามารถละลายสารสกัดตามที่ต้องการได้มากที่สุด
3. เป็นสารละลายที่มีแรงดึงดูดภายในตัวสารละลายซึ่งเกี่ยวข้องในการละลายที่สำคัญ
   - Dispersion force
   - Dipple- dipple force
   - M- bonding

ตัวอย่างตัวทำละลายที่นิยมใช้ เช่น คลอโรฟอร์ม (chloroform) อีเธอร์ (ether) เฮกเซน (hexane) เหมาะสำหรับพวกสารไม่มีขั้ว และแอลกอฮอล์ ที่ใช้มากคือ เมทานอล (methanol) และ เอทานอล (ethanol)

การสกัดโดยวิธีนี้มีข้อเสียตรงที่ราคาแพงคือ ต้นทุนการผลิตสูง เพราะว่าต้องใช้ตัวทำละลายที่มีราคาแพง แต่มีข้อดีคือ องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจะได้ปริมาตรลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีกทั้งไม่ต้องใช้วิธีซับซ้อนและได้กลิ่นหอม บางโรงงานจะนำน้ำมันหอมระเหยที่สกัดซึ่งเรียกว่า concrete ไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยกลั่นด้วยแอลกอฮอล์จะได้ absolute ซึ่งเป็นหัวน้ำหอมที่มีกลิ่นหอมเหมือนกลิ่นดอกไม้ตามธรรมชาติ

## 2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับสารสกัด

การศึกษาการสกัดสารจากใบเสม็ดขาวโดยการสกัดด้วยเครื่อง soxhlet extraction ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิดคือเฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทานอล และไอโพรพานอล พบว่า ใบเสม็ดขาวแห้ง จะให้เปอร์เซ็นต์ผลิตผลของสารสกัดมากกว่าใบสดและสารสกัดใบเสม็ดขาวที่สกัดด้วยเอทานอล จะได้ปริมาณสูงที่สุด (วิชัย หฤทัยธนาสันติ์ และคณะ. 2546)

จากการศึกษาของ Brophy *et. al*. 1989 ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเสม็ดที่ได้จากการกลั่นใบเสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi* Powell.) ที่เก็บจากจังหวัดนราธิวาส โดยการกลั่นในน้ำ (Hydrodistillation) 2 วิธีคือ แกสโครมาโตกราฟีและแกสโครมาโตกราฟีที่ต่อกับแมสสเปคโตรเมทรี พบว่า น้ำมันเสม็ดที่ได้ค่อนข้างเบา มีความหนาแน่นที่ 20 องศาเซลเซียส 0.8549 กรัมต่อมิลลิลิตร สีใส เขียวอ่อน ค่าดัชนีการหักเหแสง 1.4996 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าดัชนีการหักเหแสงของน้ำมันเสม็ดที่วางขายอยู่ในท้องตลาด 1.4708-1.4832 (สุวรรณา เป็นสุข. 2538; Oyen and Dung. 1999)

มีรายงานว่าองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเสม็ดขาวมีความผันแปรสูงขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เสม็ดเจริญเติบโต (Brophy *et. al.* 1989)

นันทวัฒน์ กิตติศักดิ์เสรี และรัตติกร ล้อมจันทร์. 2549 ศึกษาน้ำมันหอมละเหยจากไม้กฤษณาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ตัวแปรที่ศึกษา คือ ชนิดตัวทำละลาย ระยะเวลาในการสกัด และปริมาตรตัวทำละลายในการสกัด ศึกษาตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เอทานอล เอทิลแอซิเตต ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน ระยะเวลาในการสกัด 1, 2, 3, 5 และ 7 วัน และปริมาตรตัวทำละลาย 100, 200, 400 และ 600 มิลลิลิตร ต่อไม้กฤษณา 20 กรัม วิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ/แมสสเปกโทรมิเตอร์ พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ ไดคลอโรมีเทน ระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 3 วัน และปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ 200 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.10 วิเคราะห์สารสำคัญ (Identification)

การวิเคราะห์สารสำคัญมีเครื่องมือที่สามารถวิเคราะห์ได้หลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น Thin-Layer Chromatography (TLC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Infrared (IR), UV-Visible Spectrophotometric, Mass Spectrometry (MS), Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) เป็นต้น

การวิเคราะห์หาปริมาณของสารด้วยการใช้เทคนิค UV-VIS Spectrophotometric UV-VIS Spectrophotometer การดูดกลืนคลื่นแสงหรือรังสีที่อยู่ในช่วง UV-VIS ซึ่งอยู่ในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 190-800 นาโนเมตร ของสารเคมีนั้น ส่วนใหญ่ได้แก่สารพวกอินทรีย์ (Origanic Compound) สารประกอบเชิงซ้อน (Complex Compound ) หรือสารอนินทรีย์ (Inorganic Compound) ทั้งที่มีสีและไม่มีสีสมบัติของสารดังกล่าวนี้ได้นำมาเป็นวิธีวิเคราะห์ในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพอย่างกว้างขวาง เพราะวิธีนี้ให้ความถูกต้องแม่นยำดี และมีความไว (Sensitivity) โดยอาจทำการวิเคราะห์อยู่ในรูปของธาตุหรือโมเลกุลก็ได้แต่ในกรณีที่จะนำไปใช้ พิสูจน์ว่าสารตัวอย่างนั้นเป็นสารอะไร มีโครงสร้างอย่างไร อาจจะต้องใช้เทคนิคอย่างอื่นเข้าช่วยด้วย (แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม. 2535)

สารละลายตัวอย่างที่จะวิเคราะห์มีเพียงสารเดียวอาจใช้วิธีทำกราฟมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปวัดค่าแอบเซอร์แบนซ์ที่ L โดย เปรียบเทียบกับ Blank แล้วนำผลมาเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น จะได้กราฟเส้นตรง เมื่อวัดค่าแอบเซอร์แบนซ์ของสารตัวอย่างได้ และหาปริมาณของสารที่จะวิเคราะห์ได้โดยอ่านกราฟมาตรฐาน (แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม. 2535)

ค่าการดูดกลืนแสงควรอยู่ในช่วงที่พอเหมาะ เพื่อให้ถูกต้องคือ ควรอยู่ ในช่วง 0.1-1.0 ถ้าสารละลายเจือจางเกินไปจะวัดค่าแอบเซอร์แบนซ์ได้น้อย แต่ถ้าสารละลายเข้มข้นมากเกินไปก็ใช้วิธีเจือจาง

**หลักการหาปริมาณของสารโดยใช้การดูดกลืนแสง**

ในการหาปริมาณของสารในสารละลายชนิดใดชนิดหนึ่งนั้นทำได้โดยการผ่านคลื่นแสงที่ทำให้มีสีเดียว (Monochromatic Radiation) เข้าไปในสารละลายที่มีสารซึ่งดูดกลืนแสงและวัดความเข้มข้นของแสงที่ผ่านออกมา ซึ่งจะมีค่าลดลงจากความเข้มข้นก่อนผ่านสารละลาย ความเข้มของแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะลดลงมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับปริมาณสารที่มีอยู่ในสารละลายนั้น ถ้าสารมีความเข้มมากจะดูดกลืนแสงไปได้มากทำให้ความเข้มแสงที่ผ่านออกมาลดลง

## 2.11 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ โมเลกุลที่มี unpaired electron อย่างน้อย 1 อิเล็กตรอน จะเกิดขึ้นได้โดยมีพันธะระหว่างอะตอมแตกออก อนุมูลอิสระไม่เสถียรจึงทำให้มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลข้างเคียงเพื่อทำให้เสถียรขึ้น ผลที่ตามมาคือ โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอน จะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) การที่จะสรุปว่าอนุมูลอิสระทุกชนิดเป็นสารพิษต่อร่างกายนั้นจึงไม่ถูกต้อง สิ่งที่ควรนำมาบ่งบอกระดับความเป็นพิษควรจะเป็นความสามารถในการ oxidized สารชีวโมเลกุลในร่างกายมากกว่า สารที่มีความสามารถในการ oxidized สารชีวโมเลกุลในร่างกายเรียกว่า Reactive species (RS) ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ reactive oxygen species (ROS) และยังพบในรูปของ reactive chlorine species และ reactive nitrogen species ตามโมเลกุลที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ซึ่งอาจจะพบได้ในรูปของ lipid radical หรือ genetic radical RS นั้นไม่จำเป็นว่าจะต้องอยู่ในรูปของ free radical เสมอไป สารประกอบบางโมเลกุลที่อยู่ในรูป non-radical แต่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา oxidation เช่น $H_2O_2$ ก็จัดเป็น RS ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องรับประทานอาหารที่เป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติสามารถพบได้ในพืชและสัตว์ ได้แก่ วิตามิน เอ วิตามิน ซี วิตามิน อี เอนไซม์ สารสกัดจากพืชที่มีสารประกอบฟีนอลิกที่ทำหน้าที่เป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระโดยอาศัยหลักพื้นฐาน คือ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สารตั้งต้นก็จะสามารถถูกชะลอ หรือสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้ และอนุมูลอิสระที่ถูกกำจัดออกไปแล้วจะต้องมีความเสถียร์ (Stable) (รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ และคณะ. 2554)

## 2.12 ความหมายของสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant)

สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) คือสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย ร่างกายมีระบบต้านออกซิเดชัน แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ประเภทแรกป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ เอนไซม์ superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, peroxidase, cytochrome C peroxidase ทองแดง สังกะสี ซีเลเนียม โปรตีนซึ่งมีทองแดงอยู่ในโมเลกุล (ceruloplasmin) ส่วนอีกประเภทหนึ่ง คือ สารต้านออกซิเดชัน ในกลุ่มที่ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่นี้ ได้แก่ วิตามินอี เบต้า-แคโรทีน วิตามินซี

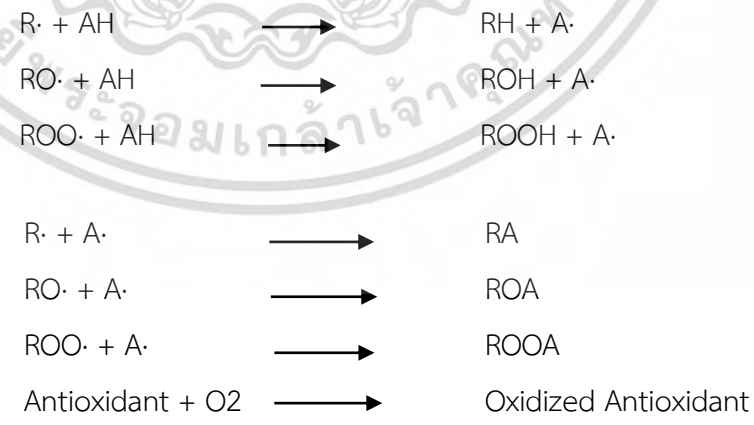
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ubiquinone, uric acid, bilirubin, albumin, sulfhydryl groups ในกรดอะมิโน cysteine ซึ่งมีอยู่ในโปรตีน เช่น เนื้อสัตว์นอกจากวิธีนี้ยังมีสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds) และสารกลุ่ม flavanoids ที่เป็นสารต้านออกซิเดชันที่น่าสนใจอีกด้วย (มลศิริ วีโรทัย. 2540) ซึ่งมีรายงานพบมากในพืช ผัก ผลไม้ ทั่วไปยังจัดเป็นสารออกฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชันจากแหล่งธรรมชาติที่ดีที่สุดอีกหนึ่งกลุ่มสารต้านการเกิดออกซิเดชันสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามลักษณะการออกฤทธิ์ คือ สารต้านการเกิดออกซิเดชันปฐมภูมิ เป็นสารที่หยุดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระโดยการให้อนุมูลไฮโดรเจน หรืออิเล็คตรอน แก่อนุมูลโดยตรงเป็นผลให้อนุมูลนั้นกลายเป็นสารที่มีความเสถียรขึ้น สารออกกฤทธิ์ในลักษณะดังกล่าว ได้แก่ สารประกอบกลุ่ม phenolic เช่น flavonoids, eugenol และ vanillin เป็นต้น มีรายงานว่าสารต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้จะทำหน้าที่ได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นต่ำๆ แต่เมื่อมีความเข้มข้นสูงขึ้นอาจกลายเป็นสารเสริมฤทธิ์ออกซิเดชันได้ สารต้านการเกิดออกซิเดชันทุติยภูมิ สารต้านการเกิดออกซิเดชันประเภทนี้ไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระแต่จะช่วยการทำงานของสารต้านการเกิดออกซิเดชันปฐมภูมิในลักษณะต่างๆ เช่น จับกับ $Fe^{2+}$ ดักจับออกซิเจนดูดซับรังสี UV ไว้ เป็นต้น

2.12.1 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านการเกิดออกซิเดชันมีกลไกการทำงาน 6 แบบใหญ่ๆ คือ

2.12.1.1 Free radical scavenging สารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็คตรอนแก่อนุมูลอิสระ และทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้น แสดงในภาพที่ 2.5




**ภาพที่ 2.4** กลไกการต้านอนุมูลอิสระแบบ Free radical scavenging

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12.1.2 Singlet oxygen quenching ออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen โดยการเปลี่ยน Singlet oxygen ($^1O_2^-$) ให้ไปอยู่ในรูป triplet oxygen ($^3O_2$) และปล่อยพลังงานที่ได้รับ ออกไปในรูปความร้อน สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ เช่น carotenoids โดย carotenoids 1 โมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยากับ singlet oxygen ได้ 1,000 โมเลกุล

2.12.1.3 Metal chelating โลหะหนัก เช่น $Fe^{2+}$ และ $Cu^{2+}$ สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ได้แก่ flavonoids, phosphoric acid, citric acid และ ascorbic acid เป็นต้น

2.12.1.4 หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (Chain-breaking)

2.12.1.5 เสริมฤทธิ์ สารชนิดนี้จะช่วยให้สารต้านการเกิดออกซิเดชันทำงานได้ดีขึ้น

2.12.1.6 ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibitor) สารประกอบ phenolics บางชนิด เช่น flavonoids phenolic acid และ gallates สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็น cofactor ส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้ (Silvia *et. al*. 2004)

2.12.2 วิธีการวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ

2.12.2.1 วิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydraryl) radical Hou *et. al*. (2001) อนุมูล $DPPH^{\bullet}$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วง อยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลเหมือนกับกรณีอนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอม การวัดทำโดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) วัดการลดลงของสี เมื่อเติมสารต้านออกซิเดชันลงไป โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

DPPH radical ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระของ สารตัวอย่าง (scavenging activity) สารละลายของ DPPH มีสีม่วงในเอทานอล และเมื่อได้รับ H จะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลือง ตามสมการดังนี้ (Blois. 1958)

$$DPPH^{\bullet} + RH \longrightarrow DPPH\text{-}H + R^{\bullet}$$

ค่าที่วัดได้จะแสดงความสามารถในการสารต้านออกซิเดชันออกมาในค่า % inhibition ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{517\ control} - A_{517\ test\ sample})/A_{517\ control})] \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อดีของวิธีนี้คือ ทำได้ง่าย นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ

ข้อเสียของวิธีนี้คือ อนุมูล DPPH มีความคงตัวไม่ไวต่อการทำปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถและระงับอนุมูลที่มีความไวสูงได้

2.12.2.2 วิธี lipid peroxidation (Halliwell *et. al.* 1987) เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบลูกโซ่ของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว อนุมูลอิสระเพียง 1 อนุมูลสามารถทำให้เกิดเปอร์ออกไซด์ เป็นจำนวนหลายร้อยโมเลกุลก่อนที่จะสิ้นสุดปฏิกิริยา เนื่องจากปฏิกิริยา led pesasidation สามารถเกิดได้ง่ายกับเยื่อหุ้มเซลล์ ที่ประกอบด้วยลิปิด 2 ชั้นการเกิดลิปิดออกซิเดชันกับลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ มีสมบัติเปลี่ยนไป ยังส่งผลกระทบต่อเอนไซน์และรีเซพเตอร์ที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เอนไซม์และรีเซพเตอร์มีการทำงานที่เสียไปเป็นสาเหตุในเกิดโรคต่างๆ ได้อีกด้วย ผลผลิตที่เกิดขึ้นมาจาก lipid peroxidation ได้แก่ สารไฮโดรคาร์บอน เช่น อีเทน อีทีน และเพนเทน รวมถึง สารคีโตน และสารอัลดีไฮด์ เป็นต้น ซึ่งสารอัลดีไฮด์ที่มีความสำคัญ คือ มาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde, MDA) lipid peroxidation เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ ปฏิกิริยาเริ่มต้นของการเกิดใช้ปฏิกิริยาการทวีเพิ่มขึ้น และการสิ้นสุดปฏิกิริยา ปฏิกิริยาลูกโซ่เริ่มต้นด้วยการมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น และอนุมูลอิสระนี้เข้าทำปฏิกิริยากับ ลิปิดและทำให้เกิดอนุมูลลิปิด ($L^{\bullet}$ หรือ $R^{\bullet}$) วิธีนี้เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง lipid peroxidation ของสารสกัดทดสอบ โดยใช้ตับหนูมาทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น แล้วทำให้เกิดผลผลิตจากปฏิกิริยา Lipid peroxidation ได้เป็นสารมาลอน ไดอัลดีไฮด์ (MDA) จากนั้นเติมกรดไทโอบาร์บีทริก ใน สภาวะกรดสาร MDA จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บีทริก ได้เป็นสารมีสีเรียกว่า TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) เมื่อเติมสารสกัดทดสอบที่มีความสามารถในการยับยั้ง lipid peroxidation ลงไป จะทำให้สารสีจางลง จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ. 2549)

ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ทำการศึกษาง่าย สะดวก ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง แต่มีข้อเสีย คือต้องใช้สิ่งมีชีวิตในการทำการทดลอง ทำให้ลดความนิยมลงเมื่อได้ค่าการดูดกลืน แสงแล้วน่าไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{532\ control}-A_{532\ test\ sample})/A_{532\ control})] \times 100$$

2.12.2.3 วิธี metal chelating activity (Dins *et. al.* 1994) การวัดความสามารถในการแย่งจับกับโลหะเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการหาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารที่ต้องการทดสอบ เพราะโลหะไอออนเป็นตัวการสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระต่างๆ มากมายหลายชนิด โดยเฉพาะธาตุเหล็กที่อยู่ในรูปเฟอร์รัส หรือ $Fe^{2+}$ จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศ เกิดเป็นสารอนุมูล superoxide anion radical ($0_2^{-\bullet}$) ซึ่งเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุมูลระดับเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระอื่นๆต่อไป ดังนั้นวิธีการวัดความสามารถในการแข่งขันโลหะ $Fe^{2+}$ ของสารที่ต้องการทดสอบนั้น อาศัยจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 562 mm ที่มีค่าลดลง โดยเมื่อเติมสาร ferrozine ลงไป สารนี้จะไปจับกับ $Fe^{2+}$ แล้วอยู่ในรูป ferrozine $Fe^{2+}$ complex ซึ่งจะให้สีแดง และถ้าสารที่ต้องการทดสอบมีความสามารถในการแย่งจับกับ $Fe^{2+}$ จะ อยู่ในรูป antioxidant - $Fe^{2+}$ complex แล้วจะทำให้สีแดงของ ferrozine - $Fe^{2+}$ complex จางลงได้เมื่อ ได้ค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{562 \text{ control}}-A_{562 \text{ test sample}})/A_{562 \text{ control}})] \times 100$$

2.11.2.4 วิธี reducing power Oyaizu. (1986) ความสามารถของการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชันของสารที่ต้องการทดสอบ สามารถใช้ในการหาความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้

วิธีนี้เป็นการศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์ หรือให้อิเล็กตรอนของสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบแก่สารอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นภายในระบบ โดยสารที่ต้องการทดสอบจะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระแล้วทำให้เปลี่ยนเป็นสารที่คงตัว อีกทั้งยังสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระอีกด้วย โดยอาศัยจากการวัดปฏิกิริยา reduction ของ $Fe^{3+}$ $(CN)_6$ ไปเป็น $Fe^{2+}$ $(CN)_6$ ซึ่งจะทำให้มีสีน้ำเงินที่เข้มขึ้น สามารถตรวจสอบความสามารถในการรีดิวซ์ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงความสามารถในการรีดิวซ์ที่มากขึ้น

## 2.13 สารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์

2.13.1 สารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds) สารประกอบฟีโนลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือ มากกว่านั้น สามารถละลายน้ำได้ ที่พบในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycosides) และพบได้ในส่วนของช่องว่างภายในเซลล์ (cell vacuole) สารประกอบฟีโนลิกที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด มีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบจะเป็นสารประกอบพวก ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) นอกจากนั้น ยังมีสารประกอบต่างๆ เช่น simple monocyclic phenol, phenyl propanoid, phenolic quinine และ polyphenolic ซึ่งได้แก่พวก lignin, tammain เป็นต้น รวมทั้งยังพบว่ามีสารประกอบที่มีกลุ่มฟีนอล (phenolic unit) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีนอัลคาลอยด์ (alkaloid) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) เป็นต้น (อัญชนา เจนวิถีสุข. 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบฟีโนลิกหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีโนลิก และ แทนนิน เป็นต้น สารประกอบฟีโนลิกทำหน้าที่เป็นตัวขับไล่อนุมูลอิสระที่สำคัญคืออนุมูล peroxyl Packer *et. al.* (1999) โดยมีกลไก 2 แบบคือ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับสารออกซิไดซ์ สารประกอบฟีโนลิกจะป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร สามารถป้องกันการเกิดขั้นตอน ที่อนุมูลอิสระถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระตัวอื่นต่อๆกันไป นอกจากนี้สารประกอบฟีโนลิกบางชนิดยังทำหน้าที่เป็นสารคีเลต ดักจับไอออนของโลหะเข้าไว้ในโมเลกุล เช่น เคอร์ซิทิน (quercetin) สารประกอบฟีโนลิกยังทำหน้าที่ทั้งเป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวให้ไฮโดรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูป แอคทีฟด้วยหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีโนลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญ ชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป Rice-Evans and Miller. (1996)

2.13.2 ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นสารเมตาบอไลต์ขั้นทุติยภูมิ (secondary metabolite) จากธรรมชาติในกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenolic compounds) (สิรินุช พละภิญโญ. 2561) สร้างจากกรดอะมิโนที่มีวงแหวน (aromatic amino acids) ได้แก่ phenylalanine, tyrosine และ malonate ทำหน้าที่เป็นสารสีที่สำคัญในพืช ช่วยในการกรองรังสีอัลตราไวเลต และการช่วยตรึงไนโตรเจน ฟลาโวนอยด์พบได้ใน ผัก ผลไม้ ธัญพืช พืชตระกูลถั่ว เครื่องเทศ สมุนไพร ลำต้น กิ่งก้าน ดอก และเมล็ด รวมถึงเครื่องดื่มบางชนิด เช่น ชา โกโก้ เบียร์ และไวน์ เป็นต้น ฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่จับอยู่กับน้ำตาลในรูปเบต้าไกลโคไซด์ (β-glycosides) ในระบบทางเดินอาหารฟลาโวนอยด์จะถูกย่อยโดยน้ำย่อย และถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็กเป็นส่วนใหญ่ ส่วนฟลาโวนอยด์ที่ไม่ถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็ก และฟลาโวนอยด์ที่ถูกดูดซึมแล้วถูกขับออกทางน้ำดีจะเข้าสู่ลำไส้ใหญ่และถูกสลายโดยจุลชีพบางชนิดทำให้ได้กรดฟินอลิกซึ่งจะถูกดูดซึมกลับเข้ากระแสเลือดอีกครั้ง โดยฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในกระแสเลือดก็จะไปยังเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ ทั่วร่างกาย และสามารถถูกกำจัดได้ทางไตโดยเซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆ ฟลาโวนอยด์อาจผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างซึ่งอาจทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพเปลี่ยนแปลงไปได้ สารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประเภทหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในอาหารที่ เป็นพืช เช่น ผัก และผลไม้ โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นฟีนอลเบนโซไพโรน (phenylbenzopyrones) ประกอบด้วยคาร์บอน 15 ตัว (C6 - C3 - C6) จัดเรียงเป็น 3 วงแหวน เรียกเป็น วงแหวน A, B, และ C โดย วงแหวน A และ B เป็นวงเบนซีน (benzene ring) ส่วนวงแหวน C เป็นวงแหวน heterocyclic pyran ซึ่งอยู่ตรงกลางของโครงสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พืชสมุนไพรหลายชนิดเป็นแหล่งของยาที่สำคัญ เนื่องจากพืชสมุนไพรมักมีสารสำคัญหลายชนิด และแต่ละชนิดก็ยังมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างกว้างขวาง เช่น สารกลุ่ม แอลคาลอยด์ หรือ ฟลาโวนอยด์ หลายตัวที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบร่วมกับฤทธิ์อื่นๆ (ปณต ตั้งสุจริต และคณะ. 2549) มีการนำน้ำมันหอมระเหยของพืชในวงศ์ Myrtaceae มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลากหลายประเภทอย่างกว้างขวาง เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยของพืชกลุ่มนี้มีองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางยาที่น่าสนใจซึ่งมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางชีวภาพ (Luiz *et. al*. 2013) น้ำมันหอมระเหยของพืชในวงศ์ Myrtaceae มีฤทธิ์ยับยั้งเอมไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (วิภาพร เสรีเด่นชัย และ ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย. 2557) เห็ดเสม็ด เป็นเห็ดกินได้ที่งอกบริเวณพื้นที่ป่าเสม็ด มีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระ 43 ชนิดในเห็ดเสม็ดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ Yuswan *et. al*. (2015) เห็ดเสม็ดที่เก็บจากรัฐกลันตัน ประเทศมาเลเซีย นำมาสกัดด้วยน้ำร้อนน้ำเย็น และเมทานอลมาศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีพบแอลคาลอยด์ แอนทราควิโนน ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน สเตียรอยด์ และแทนนิน มีประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ให้ค่า IC50 เท่ากับ 1.79, 1.97 และ 3.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Sutha *et. al*. 2016)

ฟลาโวนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ และสูญสลายไปในธรรมชาติได้น้อยกว่า6 สารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่นๆ แม้เก็บรักษาไว้นาน มีการวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ในใบสะระแหน่ ใบทับทิม และใบว่านแร้งคอดำเพื่อแปรรูปเป็นชาสมุนไพร พบว่าใบสะระแหน่และใบว่านแร้งคอดำมีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ ส่วนยอดและใบอ่อนของทับทิมมีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ สารสกัดเอทานอลของใบทับทิมมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด คือ ระหว่าง 13.10 - 21.55 มิลลิกรัม รองลงมา คือ ใบสะระแหน่ และใบว่านแร้ง คอดำ คือ ระหว่าง 8.82 - 17.13 และ 1.30 - 2.50 มิลลิกรัม ตามลำดับ และผลการแปรรูปเป็นชาสมุนไพร พบว่าเครื่องดื่มชาใบสะระแหน่ (พืช 2 กรัม ต่อน้ำ 200 มิลลิลิตร) มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุด คือ ประมาณ 100.86 รองลงมา คือ เครื่องดื่มชาใบทับทิม และเครื่องดื่มชาใบว่านแร้งคอดำ คือ ประมาณ 32.53 และ 15.42 มิลลิกรัม ตามลำดับ (ณัฐนนท์ อยู่สถิตย์ และ ชญาดา กลิ่นจันทร์. 2559)

มีการศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของการสกัดและปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบดาวเรือง โดยการศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของการสกัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบดาวเรืองสด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยใช้ระบบตัวทำละลายที่แตกต่างกันทั้งหมด 12 ระบบ พบว่า สารสกัดของระบบ 10% EtOH/EtOAc ได้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด คือร้อยละ 54 ซึ่งสูงกว่าระบบอื่นเป็น 13 เท่า และการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกและ ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี Folin – Ciocalteu Colorimetric assay, วิธี Aluminium chloride colorimetric assay และวิธี DPPH assay ตามลำดับ พบว่า ปริมาณฟีนอลิกอยู่ในช่วง 51.5-56.0 mg GAE/g crude extract และพบว่าระบบ 40-80% H2O/EtOH มีปริมาณมากใกล้เคียงกัน ระบบที่แสดงค่ามากที่สุดคือ 60% H2O/EtOH (IC50= 12.44 ± 0.01 ppm) เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ในช่วง 13.0-56.0 mg GAE/g crude extract และดังนั้นระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด มี 2 ระบบ คือ 10% EtOH:EtOAc (ได้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด) และ ระบบ 40 - 60% $H_2O$/EtOH แสดงค่าปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด (Gallic acid คือ 5.80 ppm) (ปิยนุช เจริญผล และ กาญจนา วงศ์กระจ่าง. 2558)

มีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ในสารสกัดตะขบฝรั่งโดยการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากส่วนราก ลำต้น และใบของตะขบฝรั่งที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล แล้วตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ด้วย Folin - Ciocaltue และ Aluminum chloride colorimetric assays ตามลำดับ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH และ FRAP assays พบว่าสารสกัด methanol ของรากตะขบฝรั่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ทั้งวิธี DPPH และ FRAP และมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุดเช่นกัน ส่วนปริมาณฟลาโวนอยด์พบมากที่สุดในสารสกัดเมทานอลของใบ (อรรถพล พันธุ์งาม. 2560)

Singh *et. al.* (2010) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากใบสมบูรณ์ และใบอ่อนของ *Artemisia scoparia* โดยวิธี DPPH radical scavenging ที่ระดับความเข้มข้น 25-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบสมบูรณ์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าใบอ่อน

Afify *et. al*. (2012) ได้ศึกษากิจกรรมเอนไซม์สารต้านอนุมูลอิสระ และการเกิด lipid peroxidation ที่เป็นตัวชี้วัดในการเก็บรักษาหัวมันฝรั่งโดยใช้น้ำมันหอมระเหยจากกานพลู กับยี่หร่า ซึ่งมีสาร carvone และ eugenol เป็นองค์ประกอบหลัก พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากยี่หร่า ที่ความเข้มข้น 300 ppm สามารถลดการเกิด lipid peroxidation ในการเก็บรักษาหัวมันฝรั่งได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูทุกความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ เช่น cinnamic acid, caffeic acid, sinapic acid, ferulic acid และ rosemarinic acid ในโหระพาได้เคยมีการรายงานไว้ (Grayer *et. al.* 1996) องค์ประกอบทางเคมีของใบโหระพามีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ฤดูกาล ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมและพันธุกรรม chemotype และต้นกำเนิดของพืช (Sajjadi. 2006) ตัวทำละลายที่มีขั้วถูกนำมาใช้บ่อยๆ สำหรับการ recovering polyphenols จากเมทริกซ์ของพืช ตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดคือสารผสมของน้ำที่ประกอบด้วย Athanol, Methanol, Acetone และ Ethyl Acetate athanol เป็นที่รู้จักว่าเป็นตัวทำละลายที่ดีในการสกัดสารโพลีฟีนอลและปลอดภัยสำหรับการบริโภคของมนุษย์ (Quy *et. al.* 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3

# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## 3.1 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 พืชทดลอง

ต้นเสม็ดขาว (*Mealaleuca cajuputi* Powell)

3.1.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

3.1.1.1.1 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร

- MS (Murashige and Skoog. 1962)
- Agar
- น้ำตาลซูโครส (sucrose)

3.1.1.1.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต

- 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)
- N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea (thidiazuron) (TDZ)

3.1.1.1.3 สารเคมี

- น้ำกลั่น (Distilled water)
- เอทานอล (ethanol, $C_2H_5OH$)
- เมทานอล (methanol, $CH_3OH$)
- เฮกเซน (hexane)
- กรดแกลลิก (Gallic acid)
- โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, $Na_2CO_3$ )
- DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)
- แอมโมเนีย (Ammonia, $NH_3$ )
- โซเดียมไฮดรอกไซต์ (Sodium hydroxide, NaOH)
- *Folin-Ciocalteu reagent*
- Quercetin
- อะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminium chloride)

3.1.2 อุปกรณ์

- หม้อนึ่งอบไอน้ำ
- ตู้ laminar flow
- เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เครื่องวัดพีเอช (pH-meter)
- ช้อนตักสารเคมี
- บีกเกอร์ขนาดต่างๆ
- ขวดแก้วรูปชมพู่
- แท่งแก้วคนสาร
- ช้อนตักสาร
- หลอดฟอลคอน
- กระดาษฟอยด์
- กระบอกตวง
- ปิเปตต์
- ขวดใส่อาหารขนาด 4 ออนซ์
- ปากคีบ มีดผ่าตัด
- ชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- เครื่อง UV-Vis spectrophotometer
- เครื่องผสมสารละลาย(vortex mixer)

## 3.2 วิธีการทดลอง

**การทดลองที่ 1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) และ N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea (TDZ) ต่อการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส**

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเสม็ดขาวโดยนำชิ้นส่วนกิ่งอ่อนจากนั้นนำใบออกให้เหลือแต่ก้าน ขนาด 10-12 เซนติเมตร แล้วนำชิ้นส่วนพืชไปผ่านน้ำสะอาด 1 ชั่วโมง ฟอกฆ่าเชื้อด้วย แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 1 นาที คลอร็อกซ์ 30 เปอร์เซ็นต์ 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วจึงนำชิ้นส่วนมาตัดเป็นข้อที่มีตาติดมา ขนาด 5 เซนติเมตร ในขั้นตอนนี้ทำในสภาพปลอดเชื้อ

หลังจากการฟอกฆ่าเชื้อ นำกิ่งที่มีตาติดมา ตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5 เซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซินและไซโทไคนิน ได้แก่ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไซโตไคนิน ได้แก่ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร นำเนื้อเยื่อไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน (1,800 ลักซ์) บันทึกผลทุกๆ 1 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองนี้จัดสิ่งทดลองด้วยวิธี 5x5 factorial แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (5x5 factorial in completely randomized design) มี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด มี 2 ปัจจัย กำหนดให้

ปัจจัย A คือ สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)

$a_1$ = MS (control)

$a_2$ = MS + 2,4-D 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร

$a_3$ = MS + 2,4-D 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร

$a_4$ = MS + 2,4-D 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร

$a_5$ = MS + 2,4-D 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปัจจัย B คือ สารควบคุมการเจริญเติบโต N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea (TDZ)

$b_1$ = MS (control)

$b_2$ = MS + TDZ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร

$b_3$ = MS + TDZ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร

$b_4$ = MS + TDZ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร

$b_5$ = MS + TDZ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร

**การบันทึกผล** 1. ขนาดแคลลัส ความสูง (เซนติเมตร) และความกว้าง (เซนติเมตร)

2. จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน

**การทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงรากของเสม็ดขาวในอาหารเหลวที่สภาพปลอดเชื้อ**

ศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 3 สูตร โดยนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ในปริมาณ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D ในปริมาณ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร และมี MS เป็นตัวควบคุม โดยนำรากของเสม็ดขาวที่เพาะเลี้ยงจากข้อตัดเป็นรากเดี่ยว ความยาว 2 เซนติเมตร โดยในอาหารเหลวใช้ Erlenmeyer Flask ขนาด 125 มิลลิลิตร มีอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่า 90 รอบต่อนาทีในที่มืดและบันทึกผลทุกๆ 1 สัปดาห์

**2.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) และ N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea (TDZ) ต่อการเจริญชักนำ hairy root**

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำ 3 ทรีตเมนต์ๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 3 ขวด ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 เป็นตัวควบคุม คือ MS

ทรีตเมนต์ที่ 2 อาหารเหลวสูตร MS + TDZ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทรีตเมนต์ที่ 3 อาหารเหลวสูตร MS + 2,4-D 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร

**การบันทึกผล** 1. ชั่งน้ำหนักสดของรากด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. ชั่งน้ำหนักแห้งของราก โดยนำรากไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้ง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งที่เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง เพื่อหาน้ำหนักแห้ง

**การทดลองที่ 3 การศึกษาการพัฒนาของแคลลัสและยอดของเสม็ดขาว**

โดยเลือกสูตรอาหารที่ดีที่สุดมา 3 สูตร จากการทดลองที่ 1 โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำ 3 ทรีตเมนต์ๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 5 ขวด ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 อาหารแข็งสูตร MS + TDZ 0.04 + 2,4-D 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 2 อาหารแข็งสูตร MS + TDZ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทรีตเมนต์ที่ 3 อาหารแข็งสูตร MS + TDZ 0.08 + 2,4-D 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร

**การบันทึกผล** 1. วัดความสูง (เซนติเมตร) และความกว้าง (เซนติเมตร) ของขนาดแคลลัส
2. นับจำนวนการเกิดยอด
3. ความสูงยอด

**การทดลองที่ 4 การศึกษาปริมาณสารสำคัญ**

**4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ eugenol และ cineole ของสารสกัดที่ได้จากใบของเสม็ดขาวด้วยตัวละลาย เอทานอล (ethanol) 95% เฮกเซน (hexane) และเมทานอล (methanol) โดยเปรียบเทียบลักษณะใบ มี 5 ชนิด ได้แก่**

4.1.1 ชิ้นส่วนใบเสม็ดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.1.2. ชิ้นส่วนใบเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (รวมทุกระยะ อายุ 8 ปี)

4.1.3. ชิ้นส่วนใบอ่อนเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

4.1.4. ชิ้นส่วนใบเพสลาดเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

4.1.5. ชิ้นส่วนใบแก่เสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

**4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ eugenol และ cineole ของสารสกัดที่ได้จากใบของเสม็ดขาวด้วยตัวละลาย เอทานอล (ethanol) 95% เฮกเซน (hexane) และเมทานอล (methanol) โดยเปรียบเทียบแหล่งที่มาของใบ มี 3 ชนิด ได้แก่**

4.2.1 ชิ้นส่วนใบเสม็ดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.2.2 ชิ้นส่วนใบเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (รวมทุกระยะ อายุ 8 ปี)

4.2.3 ชิ้นส่วนใบแก่เสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ eugenol และ cineole ของสารสกัดที่ได้จากใบของเสม็ดขาวด้วยตัวละลาย เอทานอล (ethanol) 95% เฮกเซน (hexane) และเมทานอล (methanol) โดยเปรียบเทียบเปรียบเทียบอายุใบ มี 3 ชนิด ได้แก่**

4.3.1 ชิ้นส่วนใบอ่อนเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

4.3.2 ชิ้นส่วนใบเพสลาดเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

4.3.3 ชิ้นส่วนใบแก่เสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

**4.4 การเตรียมตัวอย่างพืช**

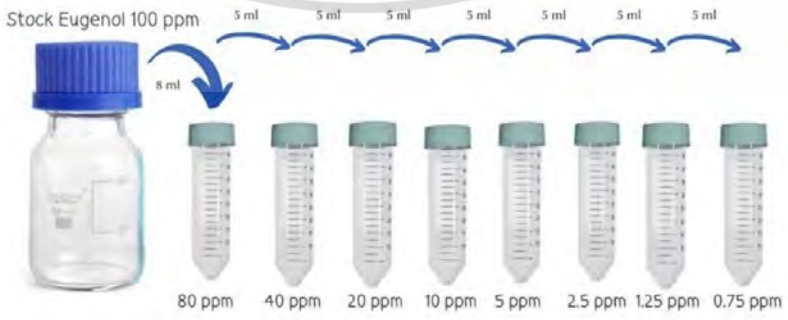
นำชิ้นส่วนของพืชที่ได้จากใบของเสม็ดขาว ไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะแห้ง

**4.5 การเตรียมสารสกัดจากพืชด้วยตัวทำละลาย**

ชั่งตัวอย่างพืชที่อบแห้งที่ได้จากส่วนต่างๆ ในปริมาตร 0.3 กรัม แล้วนำมาสกัดด้วยตัวละลายชนิดต่างๆ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ตัวทำละลายทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล ความเข้มข้น Absolute ethanol 95 %, เฮกเซน (hexane) และเมทานอล (methanol) ความเข้มข้น 95% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปสกัดโดยวางในเครื่องอัลตราโซนิคเป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิที่ใช้อยู่ที่ 40 องศาเซลเซียส ทำ 3 ครั้ง เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรองแยกกากออกจากตัวทำละลาย

**4.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน eugenol**

เตรียม stock ใหญ่ เพื่อนำไป dilute เป็น stock ย่อยๆ โดยใช้ eugenol 100 ppm และนำไปเจือจางที่ความเข้มข้น 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.75 ppm จากนั้นนำ Absolute ethanol 95 % นำมาเจือจางจากความเข้มข้นมากไปถึงความเข้มข้นน้อย




**ภาพที่ 3.1** แผนภาพการเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเตรียมสารละลายมาตรฐาน จึงนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง spectrophotometer uv-vis ก่อนใช้เครื่องทำการเปิดเครื่องเพื่อวอร์ม

**4.7 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน cineole**

เตรียม stock เพื่อนำไป dilute โดยใช้ cineole 100 ppm และนำไปเจือจางที่ความเข้มข้น 2, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1, 0.006 และ 0 ppm จากนั้นนำ Absolute ethanol 95 % นำมาเจือจางจากความเข้มข้นมากไปถึงความเข้มข้นน้อย เมื่อเตรียมสารละลายมาตรฐาน จึงนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง spectrophotometer uv-vis ก่อนใช้เครื่องทำการเปิดเครื่องเพื่อวอร์ม

**4.8 การวิเคราะห์สารสำคัญ**

วัดค่า eugenol, cineole ด้วยเครื่อง Spectrophotometry UV-VIS ที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร โดยใช้สาร ethanol 95 %, methanol และ hexane เป็นสารละลายมาตรฐาน

**4.8.1 การวิเคราะห์หาปริมาณของสารด้วยการใช้เทคนิค UV-VIS**

โดยใช้เครื่อง Spectrophotometry UV-VIS รุ่น GENESYS 10s UV-Vis เปิดเครื่องก่อนใช้งาน 30 นาที จากนั้นนำ cuvette quartz มาใส่ตัวอย่าง และเริ่มวัดค่า blank จากนั้นกดที่เครื่องเพื่อปรับค่า blank เป็น 0 และนำตัวอย่างในแต่ละทรีทเม้นท์มาวัดค่า โดยใช้ cuvette quartz อันใหม่ในการวัดสารแต่ละความเข้มข้น จากนั้นจึงอ่านค่าที่ได้จากเครื่อง Spectrophotometry UV-VIS

ค่าดูดกลืนแสงควรอยู่ในช่วงที่พอเหมาะ เพื่อให้ถูกต้องคือ ควรอยู่ในช่วง 0.1-1.0 ถ้าสารละลายเจือจางเกินไปจะวัดค่าแอบเซอร์แบนซ์ได้น้อย แต่ถ้าสารละลายเข้มข้นมากเกินไปจะใช้วิธีเจือจาง

**4.9 การวางแผนการทดลอง**

การทดลองนี้จัดสิ่งทดลองด้วยวิธี 5x3 factorial แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (5x3 factorial in completely randomized design) มี 2 ปัจจัย กำหนดให้

การทดลองที่ 4.1. ลักษณะของใบ

ปัจจัย A คือชิ้นส่วนของพืช

$a_1$ = ชิ้นส่วนใบเสม็ดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

$a_2$ = ชิ้นส่วนใบเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (รวมทุกระยะ อายุ 8 ปี)

$a_3$ = ชิ้นส่วนใบอ่อนเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

$a_4$ = ชิ้นส่วนใบเพสลาดเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$a_5$ = ชิ้นส่วนใบแก่เสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

ปัจจัย B คือตัวทำละลาย

$b_1$ = ethanol

$b_2$ = hexane

$b_3$ = methanol

การทดลองนี้จัดสิ่งทดลองด้วยวิธี 3x3 factorial แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (3x3 factorial in completely randomized design) มี 2 ปัจจัย กำหนดให้

การทดลองที่ 4.2 แหล่งที่มาของใบ

ปัจจัย A คือชิ้นส่วนของพืช

$a_1$ = ชิ้นส่วนใบเสม็ดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

$a_2$ = ชิ้นส่วนใบเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (รวมทุกระยะ อายุ 8 ปี)

$a_3$ = ชิ้นส่วนใบแก่เสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

ปัจจัย B คือตัวทำละลาย

$b_1$ = ethanol

$b_2$ = hexane

$b_3$ = methanol

การทดลองนี้จัดสิ่งทดลองด้วยวิธี 3x3 factorial แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (3x3 factorial in completely randomized design) มี 2 ปัจจัย กำหนดให้

การทดลอง 4.3 เปรียบเทียบอายุใบ

ปัจจัย A คือชิ้นส่วนของพืช

$a_1$ = ชิ้นส่วนใบอ่อนเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

$a_2$ = ชิ้นส่วนใบเพสลาดเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

$a_3$ = ชิ้นส่วนใบแก่เสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

ปัจจัย B คือตัวทำละลาย

$b_1$ = ethanol

$b_2$ = hexane

$b_3$ = methanol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.10 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี radical scavenging activity (DPPH)**

การเตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) โดยชั่ง DPPH 0.0039 กรัม ละลายด้วย ethanol ริสุทธิ์ 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการทดสอบสารตัวอย่างที่ได้สกัดไว้ โดยผสมสารละลายตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร กับสารละลาย DPPH 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟมิเตอร์ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์จากสมการ

**4.10.1 การเตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร**

ชั่ง DPPH มา 0.0039 กรัม ละลายด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ เทลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

**4.10.2 ขั้นตอนการเติมสารละลายเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay**

ทำการเตรียม Bank โดยใช้ Ethanol 4 มิลลิลิตร จะมีหลอด Control ที่เติมสารละลาย DPPH ใน Absolute Ethanol 2 มิลลิลิตร และ ethanol 2 มิลลิลิตร และในหลออด Test Sample เติมสารละลาย DPPH 3 มิลลิลิตร กับสารละลายตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร (0.125 % และ 0.06 %) และ Ethanol 2 มิลลิลิตร กับสารละลายตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร (0.125 % และ 0.06 %) ผสมสารทุกหลอดให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ในที่มืด

**4.10.3 การบันทึกผล และการวิเคราะห์ผลการทดลอง**

นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (scavenging capacity) วัดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ หลังจากนั้นคำนวณหาร้อยละของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดังนี้ คือ

$$\text{คำนวณหา \% DPPH Scavenging} = \frac{(A-B)-(C-D)}{(A-B)} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำหนดให้

A = ค่าดูดกลืนแสงของ DPPH ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับสารละลายตัวอย่างจากเสม็ดขาว

B = ค่าดูดกลืนแสงของ ethanol

C = ค่าดูดกลืนแสงของ DPPH ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายตัวอย่างจากเสม็ดขาว

D = ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างจากเสม็ดขาวใน ethanol

**4.10.4 การวางแผนการทดลอง**

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำ 5 ทรีตเมนต์ๆ ละ 3 ซ้ำๆ ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 ชิ้นส่วนใบเสม็ดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ทรีตเมนต์ที่ 2 ชิ้นส่วนใบเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (รวมทุกระยะ อายุ 8 ปี)

ทรีตเมนต์ที่ 3 ชิ้นส่วนใบอ่อนเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

ทรีตเมนต์ที่ 4 ชิ้นส่วนใบเพสลาดเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

ทรีตเมนต์ที่ 5 ชิ้นส่วนใบแก่เสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

**4.11 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก**

นำสารละลายตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 4.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย *Folin-ciocalteu reagent 0.5* มิลลิลิตร *และ*เติม Sodium cabonate เข้มข้น 7.5 % ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง

**4.11.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน**

การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิกเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำโดย ละลายกรดแกลลิก (Gallic acid) นำไปชั้งที่ 0.056 กรัม ละลายในเอทานอล 10 มิลลิลิตรเทลงในขวดวัด ปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสารละลายด้วยเอทานอลจนครบ 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.075, 0.05, 0.025 และ 0.0125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิกเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรมา 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5 และ 0.25 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดฟอลคอนขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.11.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ($Na_2CO_3$) เข้มข้น 7.5 % w/ v**

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

**4.11.3 การสร้างกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก**

โดยปิเปตน้ำกลั่น 4.5 มิลลิลิตรในหลอดทดลองตามด้วยสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu Reagent 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน 5 วินาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 % w/ v ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร (Nm) โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

**4.11.4 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง**

นำสารสกัดจากใบของเสม็ดขาวปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ที่ stock ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu Reagent 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 % w/ v ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วจึงนำสารละลาย ที่เตรียมไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ สำหรับสารละลายตัวที่เป็นแบลงค์ใช้เอทานอลแทนสารละลายตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ และจากนั้นจึงนำค่าการดูดกลืนแสงมาวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกโดยคำนวณจากสมการมาตรฐานของกรดแกลลิก ของสารสกัดน้ำเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 0.1, 0.075, 0.05, 0.025 และ 0.0125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

**4.11.5 การบันทึกผล และการวิเคราะห์ผลการทดลอง**

วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณ Total phenolic โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของ gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.075, 0.05, 0.025, 0.0125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำค่าการดูดกลืนแสงทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณปริมาณสารฟินอลิกในสารสกัด เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (mg of gallic acid equivalent/g of extract)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.11.6 การวางแผนการทดลอง**

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำ 5 ทรีตเมนต์ๆ ละ 3 ซ้ำๆ ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 ชิ้นส่วนใบเสม็ดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
ทรีตเมนต์ที่ 2 ชิ้นส่วนใบเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (รวมทุกระยะ อายุ 8 ปี)
ทรีตเมนต์ที่ 3 ชิ้นส่วนใบอ่อนเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)
ทรีตเมนต์ที่ 4 ชิ้นส่วนใบเพสลาดเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)
ทรีตเมนต์ที่ 5 ชิ้นส่วนใบแก่เสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

**4.12 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์**

เตรียมสารละลายของสารสกัดเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ต่าง ๆ ตามวิธีการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของ Wolfe et al. (2003) หลังจากนั้น นำค่าการดูดกลืนแสงทั้งหมด 3 ซ้ำ ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร เทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐาน Quercetin 80, 60, 40, 20 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเควอซิทินในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของแคทีชินต่อกรัมของสารสกัด (mg of gallic acid equivalent/g of extract)

**4.12.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน**

การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ Quercetin เข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำโดย ละลาย Quercetin นำไปชั่งที่ 0.0026 กรัม ละลายในเอทานอล 10 มิลลิลิตรเทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสารละลายด้วยเอทานอลจนครบ 25 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin ที่ระดับความเข้มข้น 100, 75, 50, 25, 10 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานของ Quercetin เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 5, 3.75, 2.5, 1.25, 0.5, และ 0.25 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดฟอลคอนขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอล จนครบ 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.12.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของ Quercetin**

สร้างกราฟมาตรฐาน quercetin โดยวิธี Aluminium nitrate colorimetric method โดยปิเปต 5% $NaNO_2$ 0.1มิลลิลิตร ลงในสารละลาย quercetin ใน methanol 0.5 และ 0.25 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 2.25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที เติม 10% อะลูมิเนียมคลอไรด์ $Al(NO_3)_3$ 0.2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 1M โซเดียมไฮดรอกไซด์ NaOH 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร

**4.12.3 การบันทึกผล และการวิเคราะห์ผลการทดลอง**

วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของ quercetin ที่ความเข้มข้น 100, 75, 50, 25, 10 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำค่าการดูดกลืนแสงทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเควอซิทินในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของแคทีชินต่อกรัมของสารสกัด (mg of gallic acid equivalent/g of extract)

**4.12.4 การวางแผนการทดลอง**

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำ 5 ทรีตเมนต์ๆ ละ 3 ซ้ำๆ ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 ชิ้นส่วนใบเสม็ดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
ทรีตเมนต์ที่ 2 ชิ้นส่วนใบเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (รวมทุกระยะ อายุ 8 ปี)
ทรีตเมนต์ที่ 3 ชิ้นส่วนใบอ่อนเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)
ทรีตเมนต์ที่ 4 ชิ้นส่วนใบเพสลาดเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)
ทรีตเมนต์ที่ 5 ชิ้นส่วนใบแก่เสม็ดจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี)

**4.12.5 การวิเคราะข้อมูล**

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยวิธี Analysis of Varience (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New Multiple Range Test (DMRT) ในระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4

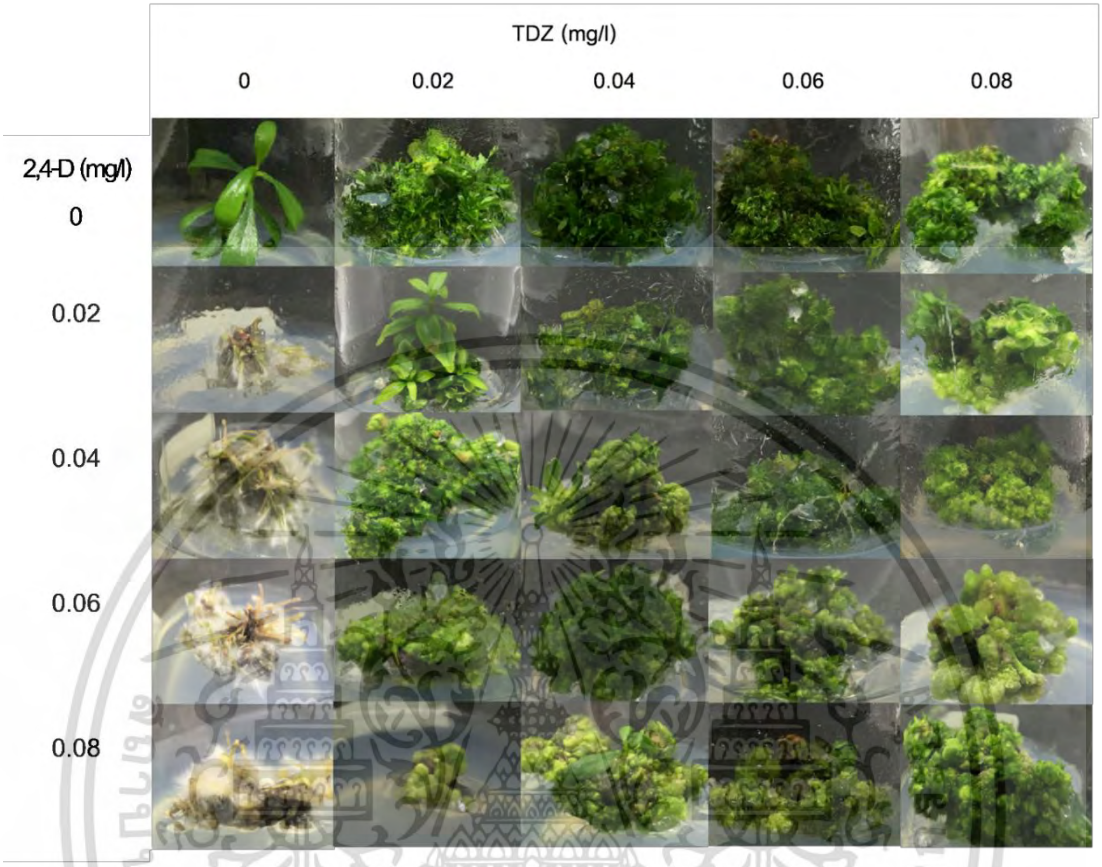
# ผลการทดลอง

## 4.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต

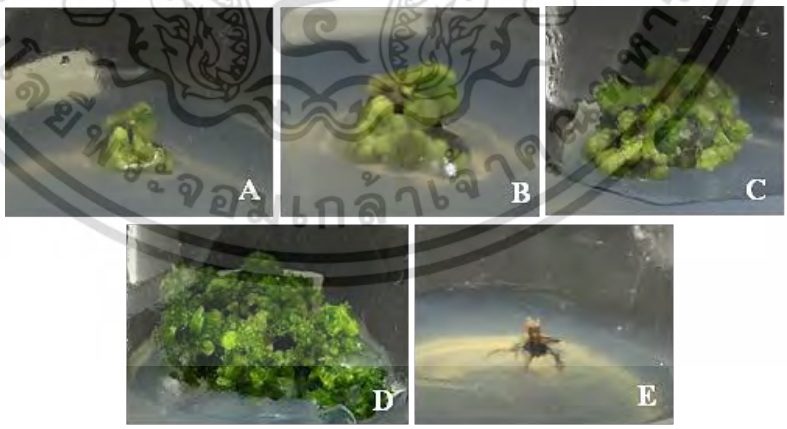
### 4.1.1 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

จากการศึกษาโดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเสม็ดขาว โดยใช้กิ่งอ่อนเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น นำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D พบว่า ที่ทุกระดับความเข้มข้นมีการเกิดของแคลลัสตั้งแต่สัปดาห์ที่4 แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่4.1) เมื่อพิจารณาผลของ TDZ พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากที่สุด 88.00 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ TDZ ความเข้มข้นอื่นๆ ในสัปดาห์ที่ 8 (ตารางที่4.1) และเมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D ร่วมกับ TDZ ได้แก่ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นของ 0, 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ทุกสัปดาห์เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่4.1) (ภาพที่4.1) โดยการใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียว พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กและไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ในสัปดาห์ที่ 6 (ตารางที่ 4.1) (ภาพที่ 4.2) ส่วนการใช้ 2,4-D ร่วมกับ TDZ เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนการเกิดแคลลัสค่อนข้างสูงทุกความเข้มข้น และมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดคือ สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร และ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ร่วมกับ TDZ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดของแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.1** การชักนำแคลลัสและยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และTDZ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์




**ภาพที่ 4.2** ลักษณะการเจริญเติบโตของเสม็ดขาวในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 0.08 ร่วมกับ 2,4-D 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตรในสัปดาห์ที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (A-D) และบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและตายไป (E)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.1** ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกิดแคลลัสในการเพาะเลี้ยงข้อเสม็ดขาวในสัปดาห์ที่ 4-8

| ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | เปอร์เซ็นการเกิดแคลลัส (±SE) 1/ สัปดาห์ | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 4 | 6 | 8 |
| 2,4-D | | 0 | 57.33±32.83a | 57.33±32.83a | 57.33±32.83a |
| | | 0.02 | 62.66±34.53a | 61.33±36.61a | 61.33±36.61a |
| | | 0.04 | 57.33±28.14a | 57.33±28.14a | 57.33±28.14a |
| | | 0.06 | 68.00±33.63a | 69.33±31.95a | 69.33±31.95a |
| | | 0.08 | 66.66±39.03a | 66.66±39.03a | 66.66±39.03a |
| F-test | | | ns | ns | ns |
| TDZ | | 0 | 25.33±30.67d | 24.00±31.35d | 24.00±31.35d |
| | | 0.02 | 44.00±26.40c | 45.33±25.59c | 45.33±25.59c |
| | | 0.04 | 72.00±23.66b | 72.00±23.66b | 72.00±23.66b |
| | | 0.06 | 82.66±18.30ab | 82.66±18.30ab | 82.66±18.30ab |
| | | 0.08 | 88.00±14.73a | 88.00±14.73a | 88.00±14.73a |
| F-test | | | ** | ** | ** |
| 2,4-D 0 | TDZ | 0 | 00.00±00.00f | 00.00±00.00g | 00.00±00.00g |
| 0.02 | | 0 | 6.67±11.54f | 0.00±0.00g | 0.00±0.00g |
| 0.04 | | 0 | 46.67±30.55cde | 46.67±30.55cdef | 46.67±30.55cdef |
| 0.06 | | 0 | 53.33±30.55cde | 53.33±30.55cdef | 53.33±30.55cdef |
| 0.08 | | 0 | 20.00±34.64ef | 20.00±34.64fg | 20.00±34.64fg |
| 0 | | 0.02 | 66.67±11.54abcd | 66.67±11.54abcd | 66.67±11.54abcd |
| 0.02 | | 0.02 | 46.67±11.54cde | 46.67±11.54cdef | 46.67±11.54cdef |
| 0.04 | | 0.02 | 53.33±41.63cde | 53.33±41.63cdef | 53.33±41.63cdef |
| 0.06 | | 0.02 | 20.00±0.00ef | 26.66±11.54efg | 26.66±11.54efg |
| 0.08 | | 0.02 | 33.33±30.55def | 33.33±30.55defg | 33.33±30.55defg |
| 0 | | 0.04 | 60.00±20.00bcd | 60.00±20.00bcde | 60.00±20.00bcde |
| 0.02 | | 0.04 | 86.67±11.54abc | 86.67±11.54abc | 86.67±11.54abc |
| 0.04 | | 0.04 | 46.67±30.55cde | 46.67±30.55cdef | 46.67±30.55cdef |
| 0.06 | | 0.04 | 80.00±20.00abc | 80.00±20.00abc | 80.00±20.00abc |
| 0.08 | | 0.04 | 86.67±11.54abc | 86.67±0.35abc | 86.67±0.35abc |
| 0 | | 0.06 | 86.67±11.54abc | 86.66±11.54abc | 86.66±11.54abc |
| 0.02 | | 0.06 | 86.76±11.54abc | 86.66±11.54abc | 86.66±11.54abc |
| 0.04 | | 0.06 | 60.00±20.00bcd | 60.00±20.00bcde | 60.00±20.00bcde |
| 0.06 | | 0.06 | 86.67±23.09abc | 86.67±23.09abc | 86.67±23.09abc |
| 0.08 | | 0.06 | 93.33±11.54ab | 93.33±11.54ab | 93.33±11.54ab |
| 0 | | 0.08 | 73.33±11.54abc | 73.33±11.54abc | 73.33±11.54abc |
| 0.02 | | 0.08 | 86.67±11.54abc | 86.67±11.54abc | 86.67±11.54abc |
| 0.04 | | 0.08 | 80.00±20.00abc | 80.00±20.00abc | 80.00±20.00abc |
| 0.06 | | 0.08 | 100.00±0.00a | 100.00±0.00a | 100.00±0.00a |
| 0.08 | | 0.08 | 100.00±0.00a | 100.00±0.00a | 100.00±0.00a |
| F-test | | | ** | ** | ** |
| cv (%) | | | 32.26 | 32.26 | 32.26 |

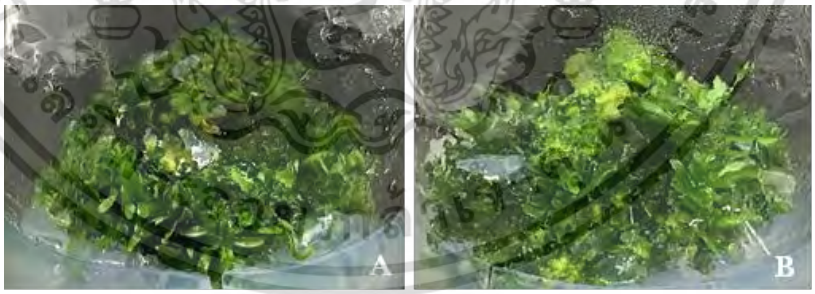
1/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan' s New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.1.2 ความสูงของแคลลัส

จากการศึกษาเกี่ยวกับความสูงของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน โดยนำเนื้อเยื่อเสม็ดขาวมาเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 2, 4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D พบว่า การใช้ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่ำส่งผลให้ความสูงของแคลลัสเพิ่มขึ้น ในขณะที่ผลของ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นสูงดีกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ (ตารางที่ 4.2) และเมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D ร่วมกับ TDZ 2, 4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ในอาหารที่มี 2,4-D และ TDZ ร่วมกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ทุกระดับความเข้มข้นมีผลต่อการเกิดแคลลัส แคลลัสมีลักษณะเป็นก้อนเหลืองมีสีเขียวอ่อนถึงเข้มและมียอดเกิดขึ้น ก้อนแคลลัสที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นมีขนาดที่แตกต่างกัน ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยแคลลัสมีความสูงเฉลี่ยสูงสุด 2.75 เซนติเมตร แคลลัสมีความสูงกว่าแคลลัสในอาหารสูตรอื่น อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง รองลงมาคือความเข้มข้น TDZ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าสูตรอาหารที่มี TDZ เพียงอย่างเดียวมีขนาดความสูงของแคลลัสมากที่สุดในสัปดาห์ที่ 4 และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และเมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหารที่มี 2,4-D ร่วมกับ TDZ พบว่าขนาดของแคลลัสเล็กกว่าสูตรที่เติม TDZ เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 4.3)




**ภาพที่ 4.3** ลักษณะการเจริญเติบโตของเสม็ดขาวในสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร (A) และ MS ที่เติม TDZ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร (B) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.2** ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อความสูงแคลลัสในการเพาะเลี้ยงข้อเสม็ดขาวในสัปดาห์ที่ 4-8

| ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | ความสูงแคลลัส (เซนติเมตร) (±SE) 1/ สัปดาห์ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 4 | 6 | 8 |
| 2,4-D | | | 0 | 2.04±1.12a | 2.48±1.33a | 2.62±1.38a |
| | | | 0.02 | 1.66±1.00b | 1.94±1.10b | 2.09±1.21b |
| | | | 0.04 | 1.88±0.68ab | 2.21±0.69b | 2.43±0.64ab |
| | | | 0.06 | 1.85±0.51b | 1.95±0.56ab | 2.12±0.54b |
| | | | 0.08 | 1.14±0.37c | 1.36±0.94c | 1.53±1.01c |
| F-test | | | | ** | ** | ** |
| TDZ | | | 0 | 0.60±0.78c | 0.82±1.00c | 0.89±1.07c |
| | | | 0.02 | 1.71±1.04b | 2.05±1.06b | 2.23±1.14b |
| | | | 0.04 | 1.88±0.68ab | 2.30±0.92ab | 2.53±0.79ab |
| | | | 0.06 | 1.85±0.51ab | 2.33±0.57ab | 2.51±0.56ab |
| | | | 0.08 | 2.20±0.37a | 2.44±0.44a | 2.63±0.49a |
| F-test | | | | ** | ** | ** |
| 2,4-D | 0 | TDZ | 0 | 0.00±0.00i | 0.00±0.00i | 0.00±0.00g |
| | 0.02 | | 0 | 0.00±0.00i | 0.00±0.00i | 0.00±0.00g |
| | 0.04 | | 0 | 1.73±0.41cdefg | 2.25±0.31cdefg | 2.34±0.32cdef |
| | 0.06 | | 0 | 1.01±0.67gh | 1.42±0.71gh | 1.66±0.73f |
| | 0.08 | | 0 | 0.28±0.49hi | 0.44±0.75i | 0.48±0.84g |
| | 0 | | 0.02 | 2.75±0.43a | 3.30±0.27ab | 3.38±0.28ab |
| | 0.02 | | 0.02 | 2.39±1.04abcd | 2.76±0.47bcdef | 2.85±0.93abcde |
| | 0.04 | | 0.02 | 1.77±0.69bcdefg | 2.02±0.59defgh | 2.22±0.52def |
| | 0.06 | | 0.02 | 1.36±0.56efg | 2.06±0.80defgh | 2.20±0.75def |
| | 0.08 | | 0.02 | 0.29±0.31hi | 0.43±0.43i | 0.50±0.50g |
| | 0 | | 0.04 | 2.71±0.46ab | 3.38±0.34a | 3.52±0.28a |
| | 0.02 | | 0.04 | 2.31±0.43abcde | 2.92±0.63abcd | 3.08±0.44abcd |
| | 0.04 | | 0.04 | 1.33±0.07fg | 1.32±0.30h | 1.71±0.29f |
| | 0.06 | | 0.04 | 1.75±0.60cdefg | 2.20±0.47cdefgh | 2.31±0.49def |
| | 0.08 | | 0.04 | 1.32±0.52fg | 1.68±0.87fgh | 2.05±0.68ef |
| | 0 | | 0.06 | 2.18±0.42abcdef | 2.72±0.37abcde | 2.96±0.34abcde |
| | 0.02 | | 0.06 | 1.76±0.31cdefg | 2.33±0.42cdefg | 2.41±0.24cdef |
| | 0.04 | | 0.06 | 2.15±0.86abcdef | 2.81±0.80abcde | 2.99±0.80abcde |
| | 0.06 | | 0.06 | 1.56±0.54defg | 1.87±0.46efgh | 2.07±0.49ef |
| | 0.08 | | 0.06 | 1.63±0.07cdefg | 1.94±0.05efgh | 2.14±0.06def |
| | 0 | | 0.08 | 2.56±0.43abc | 3.04±0.19abc | 3.27±0.06abc |
| | 0.02 | | 0.08 | 1.86±0.29abcdefg | 2.01±0.27defgh | 2.14±0.30def |
| | 0.04 | | 0.08 | 2.43±0.28abcd | 2.64±0.37abcde | 2.90±0.42abcde |
| | 0.06 | | 0.08 | 2.00±0.04abcdef | 2.19±0.11cdefgh | 2.35±0.06cdef |
| | 0.08 | | 0.08 | 2.15±0.32abcdef | 2.31±0.37cdefg | 2.50±0.42bcdef |
| F-test | | | | ** | ** | ** |
| cv (%) | | | | 29.35 | 24.3 | 22.67 |

1/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan' s New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

**มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.1.3 ความกว้างของแคลลัส

จากการศึกษาเกี่ยวกับความกว้างแคลลัสในสูตรอาหารที่แตกต่างกันโดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเสม็ดขาว นำมาเลี้ยงบนสูตรอาหาร ที่เติม 2, 4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D พบว่า การใช้ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่ำส่งผลให้ความสูงของแคลลัสเพิ่มขึ้น ในขณะที่ผลของ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นสูงดีกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ (ตารางที่ 4.3) และเมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D ร่วมกับ TDZ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ในอาหารที่มีทั้ง 2,4-D และ TDZ ร่วมกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ทุกระดับความเข้มข้นมีผลต่อการเกิดแคลลัส มีลักษณะเป็นก้อนเหลืองที่มีสีเขียวอ่อนถึงเข้ม และก้อนแคลลัสที่ได้ในแต่ละสูตรมีลักษณะขนาดที่แตกต่างกัน เมื่ออายุครบ 4 สัปดาห์ พบว่า ในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสโดยมีลักษณะความกว้างของแคลลัสเฉลี่ยที่สูงสุด 1.49 เซนติเมตร ซึ่งมีความกว้างมากกว่าอาหารสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง รองลงมาคือความเข้มข้น TDZ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าสูตรอาหารที่มี TDZ เพียงอย่างเดียวมีขนาดความกว้างของแคลลัสมากที่สุดในสัปดาห์ที่ 4 และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.3** ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อความกว้างแคลลัสในการเพาะเลี้ยงข้อเสม็ดขาวในสัปดาห์ที่ 4-8

| ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | ความกว้างแคลลัส (เซนติเมตร) (±SE) 1/ สัปดาห์ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 4 | 6 | 8 |
| 2,4-D | | | 0 | 0.99±0.56a | 1.09±0.59a | 1.20±0.65a |
| | | | 0.02 | 0.68±0.41b | 0.75±0.44b | 0.86±0.50b |
| | | | 0.04 | 0.73±0.26b | 0.85±0.28b | 0.91±0.29b |
| | | | 0.06 | 0.59±0.21bc | 0.72±0.20b | 0.79±0.19b |
| | | | 0.08 | 0.48±0.31c | 0.50±0.32c | 0.53±0.34c |
| F-test | | | | ** | ** | ** |
| TDZ | | | 0 | 0.23±0.28c | 0.28±0.33c | 0.32±0.36c |
| | | | 0.02 | 0.71±0.44b | 0.80±0.44b | 0.88±0.50b |
| | | | 0.04 | 0.90±0.40a | 0.97±0.39a | 1.04±0.43ab |
| | | | 0.06 | 0.81±0.27ab | 0.90±0.32ab | 0.97±0.33ab |
| | | | 0.08 | 0.83±0.19ab | 0.95±0.23ab | 1.09±0.26a |
| F-test | | | | ** | ** | ** |
| 2,4-D | 0 | TDZ | 0 | 0.00±0.00k | 0.00±0.00h | 0.00±0.00g |
| | 0.02 | | 0 | 0.00±0.00k | 0.00±0.00h | 0.00±0.00g |
| | 0.04 | | 0 | 0.61±0.18efghi | 0.73±0.16cdef | 0.75±0.12f |
| | 0.06 | | 0 | 0.37±0.12ijk | 0.50±0.11fg | 0.65±0.14f |
| | 0.08 | | 0 | 0.16±0.28jk | 0.18±0.32gh | 0.20±0.34g |
| | 0 | | 0.02 | 1.28±0.33ab | 1.31±0.28ab | 1.53±0.32ab |
| | 0.02 | | 0.02 | 0.98±0.35bcdef | 1.03±0.37bcd | 1.08±0.37cdef |
| | 0.04 | | 0.02 | 0.63±0.15efghi | 0.73±0.25cdef | 0.80±0.26ef |
| | 0.06 | | 0.02 | 0.48±0.12hij | 0.75±0.22cdef | 0.78±0.17f |
| | 0.08 | | 0.02 | 0.19±0.17jk | 0.20±0.18gh | 0.20±0.18g |
| | 0 | | 0.04 | 1.49±0.16a | 1.55±0.09a | 1.65±0.20a |
| | 0.02 | | 0.04 | 1.03±0.12bcde | 1.10±0.19bc | 1.25±0.16abcd |
| | 0.04 | | 0.04 | 0.60±0.30fghi | 0.69±0.30def | 0.71±0.32f |
| | 0.06 | | 0.04 | 0.77±0.28cdefghi | 0.88±0.20cdef | 0.92±0.24cdef |
| | 0.08 | | 0.04 | 0.60±0.27fghi | 0.65±0.27def | 0.69±0.30fg |
| | 0 | | 0.06 | 1.15±0.24abc | 1.34±0.19ab | 1.45±0.15ab |
| | 0.02 | | 0.06 | 0.75±0.18defghi | 0.85±0.19cdef | 0.92±0.20def |
| | 0.04 | | 0.06 | 0.86±0.36cdefgh | 1.00±0.33bcde | 1.05±0.31cdef |
| | 0.06 | | 0.06 | 0.57±0.15ghi | 0.61±0.18ef | 0.68±0.22f |
| | 0.08 | | 0.06 | 0.72±0.11defghi | 0.73±0.12cdef | 0.77±0.08f |
| | 0 | | 0.08 | 1.07±0.17bcd | 1.27±0.06ab | 1.40±0.07abc |
| | 0.02 | | 0.08 | 0.65±0.12efghi | 0.78±0.05cdef | 1.07±0.34cdef |
| | 0.04 | | 0.08 | 0.96±0.17bcdefg | 1.12±0.19bc | 1.22±0.15bcde |
| | 0.06 | | 0.08 | 0.77±0.05cdefghi | 0.85±0.04cdef | 0.95±0.05def |
| | 0.08 | | 0.08 | 0.72±0.12defghi | 0.74±0.11cdef | 0.82±0.14ef |
| F-test | | | | ** | ** | ** |
| cv (%) | | | | 29.69 | 26.18 | 25.92 |

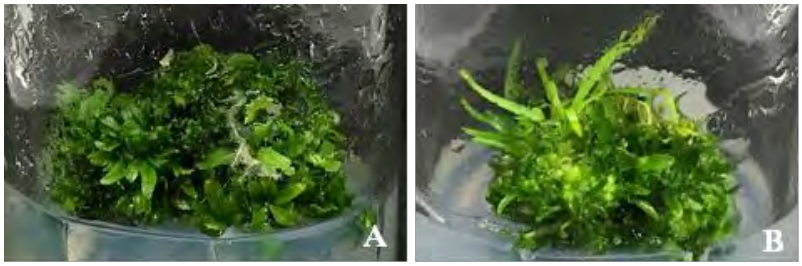
1/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan' s New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.1.4 จำนวนการเกิดยอดที่เกิดใหม่ต่อชิ้นส่วน

ผลการเกิดยอดใหม่ของชิ้นเนื้อเยื่อของเสม็ดขาว หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยนำมาเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ เมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D เพียงอย่างเดียว พบว่า มีจำนวนการเกิดยอดดีที่สุดในสัปดาห์ที่ 4 และ 6 และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.4) เมื่อเปรียบเทียบกับ 2,4-D ความเข้มข้นอื่นๆ และจำนวนการเกิดยอดยังเกิดเพิ่มขึ้นอีกในสัปดาห์ที่ 8 โดยการใช้ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนการเกิดยอดดีที่สุด 3.68 ยอดต่อชิ้นส่วน และมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ 2,4-D ความเข้มข้นอื่นๆ (ตารางที่ 4.4) เมื่อพิจารณาผลของ TDZ พบว่าการใช้ TDZ ที่ความเข้มข้น 0.04 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนการเกิดยอดดีที่สุดในสัปดาห์ที่ 4 และ 6 และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.4) เมื่อเปรียบเทียบกับ TDZ ความเข้มข้นอื่นๆ และมีจำนวนการเกิดยอดเกิดเพิ่มขึ้นอีกในสัปดาห์ที่ 8 โดยการใช้ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีจำนวนการเกิดยอดดีที่สุด 2.73 ยอดต่อชิ้นส่วน และมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ TDZ ความเข้มข้นอื่นๆ (ตารางที่ 4.4) และเมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D ร่วมกับ TDZ พบว่าในช่วงสัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 2 ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของเสม็ดขาวยังไม่มีการเจริญเติบโตของยอดใหม่ในทุกสูตรอาหาร แต่เมื่อชิ้นส่วนข้อมีอายุ 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนข้อมีการเจริญเติบโตของแคลลัสและพัฒนาเป็นยอดเกิดขึ้น เมื่ออายุครบ 6 สัปดาห์ จากการพิจารณาค่าทางสถิติพบว่า ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสของเสม็ดขาวมีจำนวนการเกิดยอดเฉลี่ย เท่ากับ 3.33 ยอดต่อชิ้นส่วนมากที่สุด และรองลงมาพบว่าบนสูตรอาหาร TDZ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดยอด 2.50 ยอดต่อชิ้นส่วน โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่ออายุครบ 8 สัปดาห์พบว่า แคลลัสมีการเกิดยอดมากที่สุดเฉลี่ย 7.16 ยอดต่อชิ้นส่วน (ภาพที่ 4.4) บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาพบว่าบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดยอด 3.66 ยอดต่อชิ้นส่วน และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และลักษณะยอดที่ได้มีลักษณะที่แตกต่างกัน แคลลัสที่อยู่บนอาหารที่แตกต่างกันได้แคลลัสที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.4** ลักษณะการเจริญเติบโตของเสม็ดขาวที่มีการเกิดยอดในสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร (A) และMS ที่เติม TDZ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร (B) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.4** ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนการเกิดยอดในการเพาะเลี้ยงข้อเสม็ดขาวในสัปดาห์ที่ 4-8

| ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดยอด (ยอด) (±SE) 1/ สัปดาห์ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 4 | 6 | 8 |
| 2,4-D | | | 0 | 1.31±0.80a | 2.03±1.36a | 3.68±2.68a |
| | | | 0.02 | 0.63±0.89b | 1.17±1.11b | 1.46±1.40b |
| | | | 0.04 | 0.33±0.61b | 0.63±0.85bc | 0.83±1.15b |
| | | | 0.06 | 0.26±0.59b | 0.40±1.05c | 0.46±1.30b |
| | | | 0.08 | 0.33±0.48b | 0.40±0.63c | 0.53±0.74b |
| F-test | | | | ** | ** | ** |
| TDZ | | | 0 | 0.13±0.35c | 0.13±0.35c | 0.13±0.35c |
| | | | 0.02 | 0.30±0.64c | 0.97±1.37ab | 1.11±1.60b |
| | | | 0.04 | 1.01±0.95a | 1.60±1.41a | 2.73±2.71a |
| | | | 0.06 | 0.50±0.73bc | 0.76±1.04bc | 1.20±1.69b |
| | | | 0.08 | 0.93±0.77ab | 1.16±1.02ab | 1.80±1.88ab |
| F-test | | | | ** | ** | ** |
| 2,4-D | 0 | TDZ | 0 | 0.66±0.57abc | 0.66±0.57bc | 0.66±0.57cd |
| | 0.02 | | 0 | 0.00±0.00c | 0.00±0.00c | 0.00±0.00d |
| | 0.04 | | 0 | 0.00±0.00c | 0.00±0.00c | 0.00±0.00d |
| | 0.06 | | 0 | 0.00±0.00c | 0.00±0.00c | 0.00±0.00d |
| | 0.08 | | 0 | 0.00±0.00c | 0.00±0.00c | 0.00±0.00d |
| | 0 | | 0.02 | 1.50±0.5ab | 2.50±1.39ab | 3.23±1.75abc |
| | 0.02 | | 0.02 | 0.00±0.00c | 2.38±0.67ab | 2.33±0.57abcd |
| | 0.04 | | 0.02 | 0.00±0.00c | 0.00±0.00c | 0.00±0.00d |
| | 0.06 | | 0.02 | 0.00±0.00c | 0.00±0.00c | 0.00±0.00d |
| | 0.08 | | 0.02 | 0.00±0.00c | 0.00±0.00c | 0.00±0.00d |
| | 0 | | 0.04 | 1.88±1.01abc | 3.33±0.57a | 7.16±0.66a |
| | 0.02 | | 0.04 | 1.163±1.25abc | 1.16±1.25bc | 1.66±2.08bcd |
| | 0.04 | | 0.04 | 0.66±0.57abc | 1.50±0.50abc | 2.16±0.76abcd |
| | 0.06 | | 0.04 | 0.66±1.15abc | 1.33±2.30abc | 1.66±2.88bcd |
| | 0.08 | | 0.04 | 0.66±0.57abc | 0.66±0.57bc | 1.00±0.00bcd |
| | 0 | | 0.06 | 1.50±0.86ab | 1.83±1.44abc | 3.66±2.08ab |
| | 0.02 | | 0.06 | 0.66±0.57abc | 1.00±1.00bc | 1.33±1.15bcd |
| | 0.04 | | 0.06 | 0.00±0.00c | 0.33±0.57c | 0.33±0.57d |
| | 0.06 | | 0.06 | 0.00±0.00c | 0.00±0.00c | 0.00±0.00d |
| | 0.08 | | 0.06 | 0.33±0.57bc | 0.66±1.15bc | 0.66±1.15cd |
| | 0 | | 0.08 | 1.00±0.86abc | 1.83±1.60abc | 3.66±3.17ab |
| | 0.02 | | 0.08 | 1.33±1.15abc | 1.33±1.15abc | 2.00±1.73abcd |
| | 0.04 | | 0.08 | 1.00±1.00abc | 1.33±1.15abc | 1.66±1.52bcd |
| | 0.06 | | 0.08 | 0.66±0.57abc | 0.66±0.57bc | 0.66±0.57cd |
| | 0.08 | | 0.08 | 0.66±0.57abc | 0.66±0.57bc | 1.00±1.00bcd |
| F-test | | | | ** | ** | ** |
| cv (%) | | | | 11.57 | 10.96 | 10.61 |

1/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan' s New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

**มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.1.5 ความสูงยอด

ผลของการเกิดยอดของชิ้นเนื้อเยื่อของเสม็ดขาว โดยการนำเอาชิ้นส่วนข้อเสม็ดขาวที่มีตาติดอยู่ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ เมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D พบว่า การใช้ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูงยอดมากที่สุดในสัปดาห์ที่ 4 และ 6 และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.5) เมื่อเปรียบเทียบกับ 2,4-D ความเข้มข้นอื่นๆ และจำนวนการเกิดยอดยังเกิดเพิ่มขึ้นอีกในสัปดาห์ที่ 8 มีความสูงยอดดีที่สุด 0.88 เซนติเมตร และมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ 2,4-D ความเข้มข้นอื่นๆ (ตารางที่ 4.5) เมื่อพิจารณาผลของ TDZ พบว่าการใช้ TDZ ที่ทุกระดับความเข้มข้นมีความสูงยอด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.5) และเมื่อพิจารณาผลของ 2,4-D ร่วมกับ TDZ พบว่า ในช่วงสัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 2 ชิ้นเนื้อเยื่อของเสม็ดขาวยังไม่มีการเจริญเติบโตเกิดขึ้นในทุกสูตรอาหาร เมื่อชิ้นส่วนข้อมีอายุ 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนข้อของเสม็ดขาว ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีการสร้างยอดเกิดขึ้น ลักษณะของความสูงยอดที่ได้มีลักษณะยอดใบที่เรียว และมีความสูงยอดเฉลี่ย 0.86 เซนติเมตร แต่เมื่อชิ้นส่วนข้อมีอายุ 6 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนข้อของเสม็ดขาว ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.02 ร่วมกับ TDZ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนข้อที่พัฒนาเป็นแคลลัสมีการเจริญเติบโตเป็นยอดเกิดขึ้น แต่ได้ยอดที่มีลักษณะยืดยาวมีความสูงยอดเฉลี่ย 1.50 เซนติเมตร โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 4.6) เมื่ออายุครบ 8 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อของเสม็ดขาวที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 0.02 ร่วมกับ TDZ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความสูงยอดเฉลี่ยสูงสุด คือ 1.76 เซนติเมตร และรองลงมาคือ 1.50 และ 1.30 เซนติเมตร ตามลำดับ มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.5)

**ภาพที่ 4.5** ลักษณะการเจริญเติบโตของเสม็ดขาวที่มีความสูงยอดที่ดีในสูตรอาหาร MS ที่ TDZ 0.02 ร่วมกับ 2,4-D 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร (A) และสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต(B) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.5** ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อความสูงยอดในการเพาะเลี้ยงข้อเสม็ดขาวในสัปดาห์ที่ 4-8

| ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | ความสูงยอด (เซนติเมตร) (±SE) 1/ สัปดาห์ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 4 | 6 | 8 |
| 2,4-D | | | 0 | 0.46±0.44a | 0.62±0.50a | 0.88±0.71a |
| | | | 0.02 | 0.08±0.11b | 0.41±0.64b | 0.55±0.71b |
| | | | 0.04 | 0.05±0.09b | 0.08±0.12c | 0.08±0.15c |
| | | | 0.06 | 0.06±0.10b | 0.08±0.13c | 0.11±0.19c |
| | | | 0.08 | 0.10±0.18b | 0.11±0.21c | 0.18±0.24c |
| F-test | | | | ** | ** | ** |
| TDZ | | | 0 | 0.17±0.45a | 0.20±0.52a | 0.30±0.79a |
| | | | 0.02 | 0.14±0.10a | 0.40±0.67a | 0.50±0.78a |
| | | | 0.04 | 0.18±0.15a | 0.23±0.20a | 0.36±0.22a |
| | | | 0.06 | 0.19±0.32a | 0.25±0.42a | 0.39±0.52a |
| | | | 0.08 | 0.16±0.15a | 0.21±0.19a | 0.26±0.25a |
| F-test | | | | ns | ns | ns |
| 2,4-D | 0 | TDZ | 0 | 0.86±0.75a | 1.00±0.86b | 1.50±1.32a |
| | 0.02 | | 0 | 0.00±0.00b | 0.00±0.00c | 0.00±0.00d |
| | 0.04 | | 0 | 0.00±0.00b | 0.00±0.00c | 0.00±0.00d |
| | 0.06 | | 0 | 0.00±0.00b | 0.00±0.00c | 0.00±0.00d |
| | 0.08 | | 0 | 0.00±0.00b | 0.00±0.00c | 0.00±0.00d |
| | 0 | | 0.02 | 0.25±0.05b | 0.53±0.23bc | 0.74±0.31bc |
| | 0.02 | | 0.02 | 0.45±0.00b | 1.50±0.72a | 1.76±0.75a |
| | 0.04 | | 0.02 | 0.00±0.00b | 0.00±0.00c | 0.00±0.00d |
| | 0.06 | | 0.02 | 0.00±0.00b | 0.00±0.00c | 0.00±0.00d |
| | 0.08 | | 0.02 | 0.00±0.00b | 0.00±0.00c | 0.00±0.00d |
| | 0 | | 0.04 | 0.33±0.15b | 0.46±0.15c | 0.63±0.05cd |
| | 0.02 | | 0.04 | 0.16±0.15b | 0.16±0.15c | 0.36±0.05cd |
| | 0.04 | | 0.04 | 0.13±0.11b | 0.16±0.15c | 0.20±0.17cd |
| | 0.06 | | 0.04 | 0.16±0.15b | 0.20±0.17c | 0.30±0.26cd |
| | 0.08 | | 0.04 | 0.13±0.23b | 0.16±0.28c | 0.33±0.28cd |
| | 0 | | 0.06 | 0.70±0.61a | 0.96±0.47b | 1.30±0.36ab |
| | 0.02 | | 0.06 | 0.13±0.11b | 0.15±0.13c | 0.28±0.24cd |
| | 0.04 | | 0.06 | 0.00±0.00b | 0.06±0.11c | 0.13±0.23cd |
| | 0.06 | | 0.06 | 0.00±0.00b | 0.00±0.00c | 0.00±0.00d |
| | 0.08 | | 0.06 | 0.13±0.11b | 0.20±0.17c | 0.23±0.20cd |
| | 0 | | 0.08 | 0.15±0.13b | 0.18±0.16c | 0.26±0.23cd |
| | 0.02 | | 0.08 | 0.13±0.11b | 0.23±0.20c | 0.36±0.32cd |
| | 0.04 | | 0.08 | 0.13±0.11b | 0.16±0.15c | 0.20±0.17cd |
| | 0.06 | | 0.08 | 0.13±0.11b | 0.20±0.17c | 0.26±0.25cd |
| | 0.08 | | 0.08 | 0.26±0.30b | 0.30±0.36c | 0.33±0.35cd |
| | F-test | | | * | ** | ** |
| | cv (%) | | | 12.64 | 11.43 | 10.95 |

1/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan' s New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ * มีความแตกต่างกันทางสถิติ **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

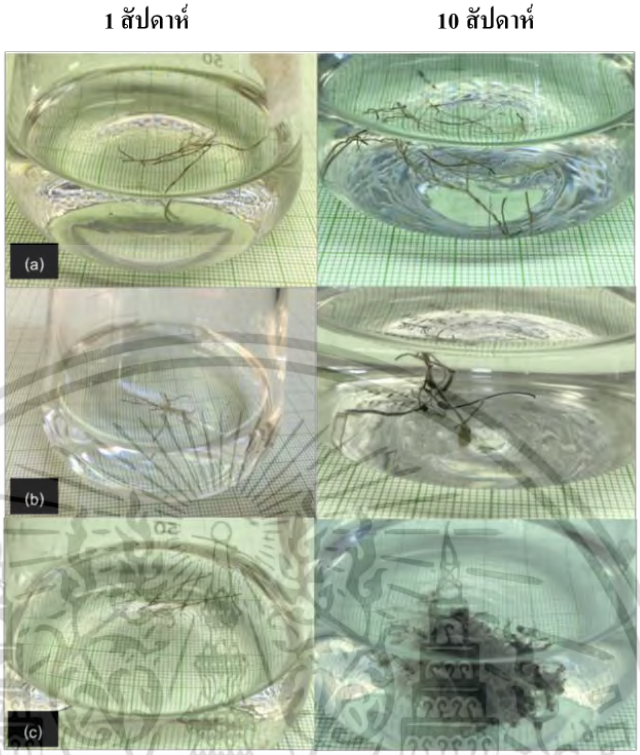
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 การทดลองที่ 2 ผลของ 2,4-D และ TDZ ที่มีต่อผลการชักนำรากของต้นเสม็ดขาว

ผลของ 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) และ Thidiazuron (TDZ) ที่มีต่อผลการชักนำรากของต้นเสม็ดขาว โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากในอาหารเหลว สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใน 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D) เข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Thidiazuron (TDZ) 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร และ MS ที่เป็นตัว control หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 10 สัปดาห์ จะเห็นได้ว่า ผลของการชักนำในทรีตเม้นท์ของสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 กลุ่มที่ได้ทำการทดลอง สามารถสังเกตเห็นการพัฒนาของเนื้อเยื่อจากรากเป็นแคลลัสและมีการเจริญในช่วง 3 สัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกันและในทุกสูตรสามารถชักนำรากของเสม็ดขาวได้ อีกทั้งยังมีจำนวนรากที่มีแนวโน้มสูงขึ้นทุกสัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.6)

จากการเพาะเลี้ยงรากของเสม็ดขาว บนอาหารเหลวสูตรต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าความเร็ว 90 รอบต่อนาที ในสภาพมืด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงครบ 10 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D มีการเปลี่ยนแปลงของรากมากที่สุด เท่ากับ 2.71±1.56 กรัม โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลองอื่นๆ รองลงมาคือ MS ที่ เติม TDZ และ MS ที่เป็นตัว control เท่ากับ 0.06 กรัม และ 0.03 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) ลักษณะรากที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆ มีลักษณะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ในสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตยังคงเป็นเส้นสีขาวบางไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง และในสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ สูตร MS ที่เติม 2,4-D และ MS ที่เติม TDZ ที่ความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น สูตร MS ที่เติม TDZ มีลักษณะเป็นเส้นสีดำ เกิดปมที่ราก และสูตร MS ที่เติม 2,4-D เกิดเป็นแคลลัสเกาะกันแน่น ในช่วง 2-3 สัปดาห์แรก ในบริเวณผิวของก้อนแคลลัส พบว่ามีรากสีขาวเกิดขึ้นเล็กน้อย และมีน้ำหนักค่าเฉลี่ยที่สูงที่สุดและเป็นสูตรที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด (ภาพที่ 4.7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.6** การเพาะเลี้ยง Hairy root ของเสม็ดขาวในสภาพปลอดเชื้อที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS control (a) MS ที่เติม TDZ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร (b) และบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร (c) เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.6** การชักนำ Hairy root ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และ TDZ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา10 สัปดาห์

| ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) | น้ำหนักสด (กรัม) (±SE)[1/] | | | | | | | | | | น้ำหนักแห้ง (กรัม) (±SE)[1/] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | สัปดาห์ | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| MS | 0.03±0.03b | 0.36±0.27b | 0.03±0.24b | 0.04±0.02b | 0.04±0.01b | 0.04±0.01b | 0.03±0.01b | 0.03±0.01b | 0.03±0.00b | 0.03±0.01b | 0.00±0.00b |
| MS+TDZ 0.04 | 0.03±0.02b | 0.04±0.27b | 0.05±0.02b | 0.05±0.02b | 0.05±0.02b | 0.05±0.02b | 0.05±0.02b | 0.04±0.01b | 0.05±0.02b | 0.06±0.02b | 0.03±0.00b |
| MS+2,4-D 0.04 | 0.54±0.23a | 0.64±0.29a | 0.78±0.30a | 0.81±0.41a | 0.92±0.42a | 1.26±0.38a | 1.54±0.49a | 2.08±1.17a | 2.36±1.34a | 2.71±1.56a | 0.38±0.11a |
| F-test | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| cv (%) | 9.13 | 9.5 | 8.79 | 9.87 | 9.48 | 7.99 | 8.27 | 10.68 | 10.75 | 10.81 | 8.09 |

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan' s New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

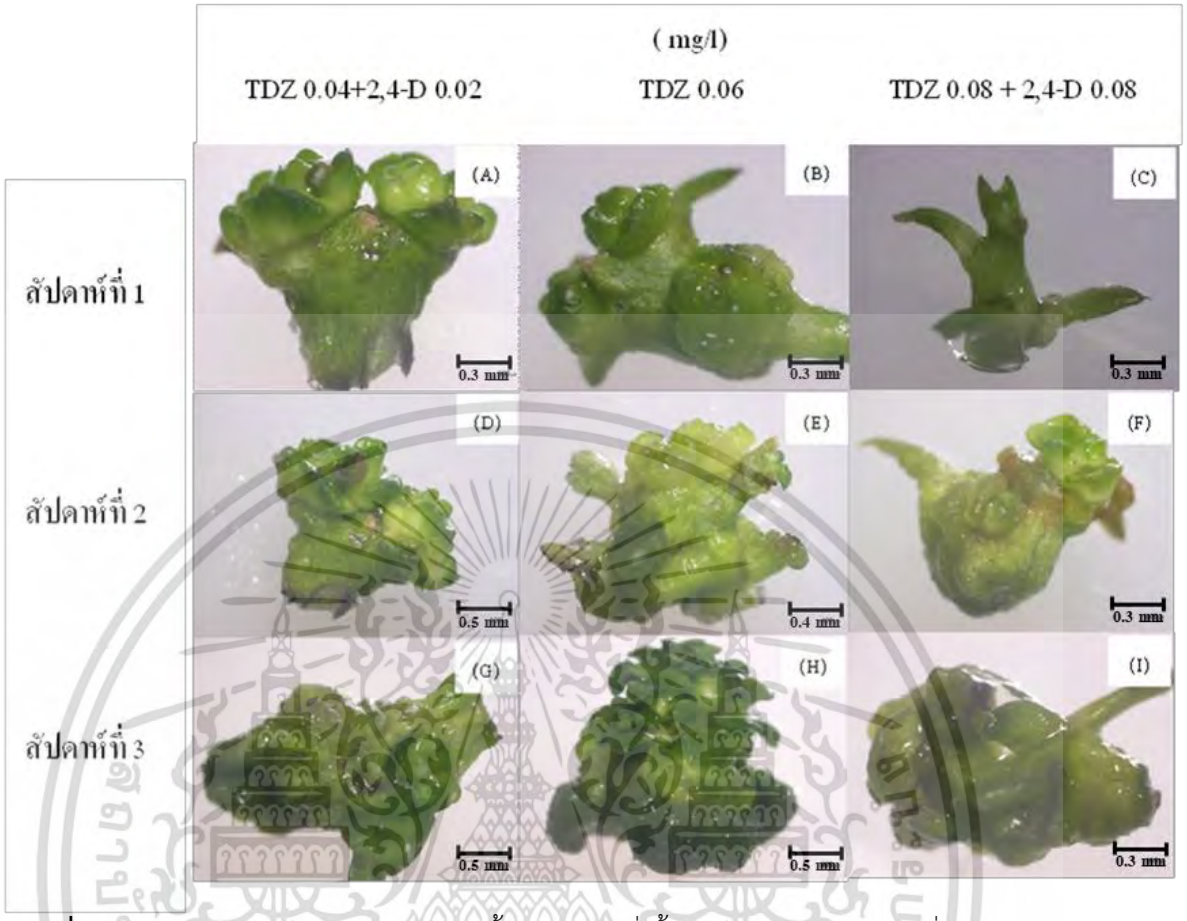
**มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต

## 4.3 การทดลองที่ 3. การศึกษาการพัฒนาการเกิดยอดและแคลลัส

### 4.3.1 การเจริญเติบโตของแคลลัส

จากการศึกษาโดยนำข้อของเสม็ดขาว ไปเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ดีที่สุดมา 3 สูตร จากการทดลองที่ 1 ได้แก่ TDZ 0.04 + 2,4-D 0.02 , TDZ 0.06 และ TDZ 0.08 + 2,4-D 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ เมื่อชิ้นส่วนมีอายุได้ 1 สัปดาห์ พบว่า มีลักษณะเป็นตุ่มพัฒนาขึ้นบนชิ้นส่วนข้อในอาหารทุกทรีตเมนต์ และยังมีลักษณะคล้ายพัฒนาไปเป็นยอด โดยเรียกการเจริญในลักษณะแบบนี้ว่า direct organogenesis (ภาพที่ 4.7 A) เมื่อชิ้นส่วนมีอายุได้ 2 สัปดาห์ พบว่า บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีขนาดเฉลี่ยความกว้างและความสูงแคลลัสเท่ากับ 0.64 และ 0.46 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7, ตารางที่ 4.8) ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เมื่อชิ้นส่วนมีอายุได้ 3 สัปดาห์ พบว่า บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตของแคลลัสมากที่สุด เฉลี่ยความกว้างและความยาวของแคลลัสเท่ากับ 0.53 และ 0.73 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7 ตารางที่ 4.8, ภาพที่ 4.7 E) และเมื่อชิ้นส่วนมีอายุ 5 สัปดาห์ พบว่าชิ้นมีการพัฒนาขึ้นเรื่อยๆ และมีน้ำหนักของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นบนสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.66 กรัม ซึ่งเป็นน้ำหนักที่มากที่สุด (ตารางที่ 4.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.7** การเจริญเติบโตของแคลลัสบนชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารคุมการเจริญโต TDZ และ 2,4-D เป็นเวลา 3 สัปดาห์

(A, D, G) เลี้ยงบนอาหารที่เติมสารคุมการเจริญเติบโต TDZ 0.04 ร่วมกับ 2,4-D 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1-3 สัปดาห์

(B, E, H) เลี้ยงบนอาหารที่เติมสารคุมการเจริญเติบโต TDZ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1-3 สัปดาห์

(C, H, I) เลี้ยงบนอาหารที่เติมสารคุมการเจริญเติบโต TDZ 0.08 ร่วมกับ 2,4-D 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1-3 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.3.2 ความกว้างแคลลัส

จากการศึกษาเกี่ยวกับความกว้างแคลลัสในสูตรอาหารที่แตกต่างกันโดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้อของเสม็ดขาว นำมาเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ TDZ 0.04 + 2,4-D 0.02 , TDZ 0.06 และ TDZ 0.08 + 2,4-D 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงจนถึง 2 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อมีการขยายขนาดและมีการเกิดแคลลัส โดยชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดความกว้างของแคลลัสมากที่สุด คือ 0.53 เซนติเมตร และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 4.7) และในสัปดาห์ที่ 3 พบว่าชิ้นส่วนข้อมีการเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้นและมีขนาดความกว้างของแคลลัสมากที่สุด คือ 0.53 เซนติเมตร โดยชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่ออายุครบ 5 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ลักษณะของความกว้างแคลลัสมากที่สุด 0.85 เซนติเมตร และรองลงมาในสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.04 ร่วมกับ 2,4-D 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร 0.83 เซนติเมตร ตามลำดับ

**ตารางที่ 4.7** ผลของสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ 2,4-D ต่อขนาดความกว้างแคลลัสในสัปดาห์ที่ 2-5

| สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) | ความกว้างแคลลัส (เซนติเมตร) (±SE)[1/] | | | |
|---|---|---|---|---|
| | สัปดาห์ | | | |
| TDZ + 2,4-D | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 0.04 + 0.02 | 0.38±0.18b | 0.39±0.19ab | 0.66±0.19a | 0.83±0.24a |
| 0.06 + 0.00 | 0.53±0.27a | 0.53±0.28a | 0.70±0.33a | 0.85±0.34a |
| 0.08 + 0.08 | 0.22±0.10c | 0.22±0.10b | 0.30±0.11b | 0.35±0.13b |
| F-tast | ** | ** | ** | ** |
| cv (%) | 9.95 | 12.31 | 8.26 | 8.13 |

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan' s New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

**มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.3.3 ความสูงแคลลัส

จากการศึกษาความสูงแคลลัสในสูตรอาหารที่แตกต่างกันโดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเสม็ดขาว นำมาเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 0.04 ร่วมกับ 2,4-D 0.02 , TDZ 0.06 และ TDZ 0.08 + 2,4-D 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงจนถึง 2 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อมีการขยายขนาด และมีการเกิดแคลลัส โดยชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ความสูงของแคลลัสมากที่สุด คือ 0.64 เซนติเมตร และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 4.8) และในสัปดาห์ที่ 3 พบว่า ชิ้นส่วนข้อมีการเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้นและมีขนาดความสูงของแคลลัสมากที่สุด คือ 0.73 เซนติเมตร โดยชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่ออายุครบ 4 ถึง 5 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.04 ร่วมกับ 2,4-D 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความสูงแคลลัสมากที่สุด 1.04 และ 1.21 เซนติเมตร ตามลำดับ และรองลงมาในสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร 1.00 และ 1.14 เซนติเมตร ตามลำดับ

**ตารางที่ 4.8** ผลของสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ 2,4-D ต่อขนาดความสูงแคลลัส ในสัปดาห์ที่ 2-5

| สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) | ความสูงแคลลัส (เซนติเมตร) (±SE)[1/] สัปดาห์ | | | |
|---|---|---|---|---|
| TDZ + 2,4-D | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 0.04 + 0.02 | 0.53±0.28ab | 0.61±0.31a | 1.04±0.32a | 1.21±0.36a |
| 0.06 + 0.00 | 0.64±0.33a | 0.73±0.34a | 1.00±0.46a | 1.14±0.47a |
| 0.08 + 0.08 | 0.31±0.17b | 0.31±0.17b | 0.50±0.18b | 0.48±0.20b |
| F-tast | ** | ** | ** | ** |
| cv (%) | 10.89 | 16.29 | 13.28 | 6.76 |

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan' s New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

**มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.3.4 น้ำหนักแคลลัส

จากการศึกษาโดยนำข้อของเสม็ดขาว ไปเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ดีที่สุดมา 3 สูตร จากการทดลองที่ 1 ได้แก่ TDZ 0.04 ร่วมกับ 2,4-D 0.02 , TDZ 0.06 และ TDZ 0.08 ร่วมกับ 2,4-D 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ เมื่อชิ้นส่วนมีอายุได้ 2 สัปดาห์ พบว่า มีลักษณะเป็นตุ่มและปูดเกิดขึ้นบนชิ้นส่วนข้อในอาหารทุกทรีตเมนต์ จากการเพาะเลี้ยงข้อของเสม็ดขาว บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.04 + 2,4-D 0.02 , TDZ 0.06 และ TDZ 0.08 + 2,4-D 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการใช้ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น TDZ 0.04 ร่วมกับ 2,4-D 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักแคลลัสดีที่สุด เมื่ออายุได้ 3 สัปดาห์ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และรองลงมาในสูตร TDZ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ 0.10 กรัม โดยทั้ง 2 ความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และในสัปดาห์ที่ 4 น้ำหนักสดแคลลัสยังมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น โดยการใช้ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นดีที่สุด คือ 0.28 กรัม และรองลงมาในสูตร TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.04 ร่วมกับ 2,4-D 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ 0.24 โดยทั้ง 2 ความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 5 โดย TDZ ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักสดแคลัสเพิ่มขึ้นดีที่สุด คือ 0.66 และรองลงมาในสูตร TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.04 ร่วมกับ 2,4-D 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ 0.58 (ตารางที่ 4.9)

**ตารางที่ 4.9** ผลของสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ต่อน้ำหนักแคลลัส ในสัปดาห์ที่ 2-5

| สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) | น้ำหนักแคลลัส (กรัม) (±SE)[1/] | | | |
|---|---|---|---|---|
| | สัปดาห์ | | | |
| TDZ + 2,4-D | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 0.04 + 0.02 | 0.46±0.03a | 0.15±0.11a | 0.24±0.11a | 0.58±0.22a |
| 0.06 + 0.00 | 0.46±0.03a | 0.10±0.05a | 0.28±0.15a | 0.66±0.38a |
| 0.08 + 0.08 | 0.01±0.00b | 0.02±0.01b | 0.04±0.02b | 0.08±0.04b |
| F-tast | * | * | ** | ** |
| cv (%) | 32.21 | 37.18 | 20.47 | 17.61 |

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan' s New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

**มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.3.5 จำนวนการเกิดยอด

ผลของการเกิดยอดของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเสม็ดขาวหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ระดับ TDZ และ 2,4-D แตกต่างกันเป็นเวลา 5 สัปดาห์ (ตารางที่ 4.10) พบว่า ในช่วงสัปดาห์ที่ 1-2 เนื้อเยื่อของเสม็ดขาว สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ แต่เมื่อชิ้นส่วนข้อมีอายุ 3 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนข้อมีการเจริญเติบโตเป็นยอดเกิดขึ้น โดยเกิดจากการนำข้อของเสม็ดขาวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 0.04 ร่วมกับ 2,4-D 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนการเกิดยอดสูงสุด คือ 1.75 ยอด รองลงมาคือ การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนการเกิดยอด คือ 1.53 ยอด ทั้งสองสูตรให้จำนวนการเกิดยอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้นอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 0.08 ร่วมกับ 2,4-D 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนการเกิดยอดต่ำที่สุดเท่ากับ 1.00 ยอด (ตารางที่ 4.10) เมื่ออายุครบ 4 สัปดาห์พบว่า ชิ้นส่วนข้อที่มีลักษณะเป็นแคลลัส มีการเกิดยอดมากที่สุดเฉลี่ย 2.21 ยอด และรองลงมาพบว่าสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจรญเติบโต TDZ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดยอด 2.17 ยอด โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่ออายุครบ 5 สัปดาห์ พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเสม็ดขาวในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนการเกิดยอดมากกว่า ซึ่งให้จำนวนการเกิดยอดเท่ากับ 2.56 ยอด เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตอีก 2 สูตรที่ทำการทดลองคือ อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 0.04 ร่วมกับ 2,4-D 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และในสูตรอาหาร TDZ 0.08 ร่วมกับ 2,4-D 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำยอดได้ 2.25 และ 1.00 ยอด ตามลำดับ

**ตารางที่ 4.10** ผลของสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ต่อจำนวนการเกิดยอดในสัปดาห์ที่ 2-5

| สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร) | จำนวนการเกิดยอด (ยอด/ชิ้นส่วน) (±SE)[1/] สัปดาห์ | | | |
|---|---|---|---|---|
| TDZ + 2,4-D | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 0.04 + 0.02 | 1.75±0.87a | 1.79±0.91a | 2.21±1.07a | 2.25±1.12a |
| 0.06 + 0.00 | 1.53±0.84a | 1.59±0.85a | 2.17±1.12a | 2.56±1.43a |
| 0.08 + 0.08 | 1.00±0.38b | 1.00±0.38b | 1.00±0.46b | 1.00±0.46b |
| F-tast | * | * | ** | ** |
| cv (%) | 16.83 | 17.81 | 14.28 | 17.09 |

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan' s New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

**มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.4 การทดลองที่ 4. การวิเคราะห์หาปริมาณ eugenol และ cineole ของสารสกัดที่ได้จากใบของเสม็ดขาว

### 4.4.1 ปริมาณสาร eugenol และ cineole

การศึกษาปริมาณสารสำคัญโดยการวิเคราะห์หาปริมาณ eugenol และ cineole ของสารสกัดที่ได้จากใบเสม็ดขาวที่มีระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ได้แก่ ใบเสม็ดขาวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, ใบเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ, ใบอ่อนเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ, ใบเพสลาดเสม็ดจากสภาพธรรมชาติ และใบแก่เสม็ดจากสภาพธรรมชาติ โดยทำการเตรียมสารสกัดจากพืชด้วยตัวทำละลาย แล้วนำมาสกัดด้วยตัวละลายชนิดต่างๆ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ตัวทำละลายทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ ethanol 95%, เฮกเซน (hexane) และเมทานอล (methanol) ความเข้มข้น 95% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อนำมาวัดค่า eugenol, cineole ด้วยเครื่องUV-VIS Spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร เพื่อหาความสัมพันธ์และสมการเส้นตรงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดใบเสม็ดขาวที่มีระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน พบว่า ชนิดของตัวทำละลาย และผลของปริมาณ eugenol และ cineole มีผลต่อการสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่า ตัวทำละลาย hexane สามารถสกัดสารสำคัญทั้งสาร eugenol และ cineole ปริมาณมากที่สุด เมื่อเทียบกับตัวทำละลาย ethanol และ methanol มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ในขณะที่ ethanol มีความสามารถในการสกัดได้ปริมาณต่ำที่สุดกว่าตัวทำละลายชนิดอื่นๆ และใบที่มาจากสภาพธรรมชาติกับใบเสม็ดขาวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้สารสำคัญทั้งสาร eugenol และ cineole ปริมาณมากที่สุด เมื่อเทียบกับใบประเภทอื่นๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และเมื่อนำทั้งสองปัจจัยมาเปรียบเทียบกันใบเสม็ดขาวที่นำมาจากสภาพธรรมชาติที่สกัดด้วย hexane มีปริมาณสาร eugenol และปริมาณสาร cineole มากที่สุด และมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.11)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.11** ปริมาณสาร eugenol และ cineole ของใบเสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi*) ที่มีระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน

| การทดลอง | | ปริมาณสาร eugenol | ปริมาณสาร cineole |
|---|---|---|---|
| ลักษณะใบ | | (mg/gDW) (±SE) [1/] | (mg/gDW) (±SE) [1/] |
| ใบเสม็ดขาวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ | | 30.67±17.59a | 50.33±28.92a |
| ใบเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ (รวมทุกระยะ อายุ 8 ปี) | | 32.37±19.69a | 53.12±32.36a |
| ใบแก่เสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี) | | 17.08±3.10d | 27.26±5.10d |
| ใบเพสลาดเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี) | | 22.31±6.74c | 36.57±11.08c |
| ใบอ่อนเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี) | | 25.46±5.11b | 41.76±8.40b |
| F-test | | ** | ** |
| ตัวทำละลาย | ethanol | 21.33±10.29c | 34.98±16.91c |
| | methanol | 25.81±10.20b | 42.34±16.77b |
| | hexane | 29.32±17.47a | 48.10±28.71a |
| F-test | | ** | ** |
| ลักษณะใบ | ตัวทำละลาย | | |
| ใบเสม็ดขาวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ | ethanol | 39.86±3.05b | 65.43±5.02b |
| | methanol | 44.44±5.24b | 72.96±8.61b |
| | hexane | 7.72±0.73g | 12.59±1.20h |
| ใบเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ | ethanol | 18.44±5.13def | 30.22±8.44defg |
| (รวมทุกระยะ อายุ 8 ปี) | methanol | 20.75±1.24de | 34.01±2.03de |
| | hexane | 57.94±7.01a | 95.13±11.52a |
| ใบแก่เสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ | ethanol | 13.08±0.68hi | 21.41±1.11g |
| (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี) | methanol | 17.03±0.80fgh | 27.91±1.31efg |
| | hexane | 19.80±1.78fgh | 32.46±2.93def |
| ใบเพสลาดเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ | ethanol | 14.41±0.35f | 23.62±0.57fg |
| (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี) | methanol | 22.72±0.24de | 37.25±0.40de |
| | hexane | 29.78±2.13c | 48.86±3.50c |
| ใบอ่อนเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ | ethanol | 20.87±1.85de | 34.21±3.04de |
| (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี) | methanol | 24.14±2.53d | 39.59±4.15d |
| | hexane | 31.37±2.87c | 51.47±4.71c |
| F-test | | ** | ** |
| CV% | | 11.98 | 12.09 |

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan' s New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % **มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.4.2 ปริมาณสาร eugenol และ cineole ในแหล่งที่มาของใบที่แตกต่างกัน**

การศึกษาปริมาณสารสำคัญโดยการวิเคราะห์หาปริมาณ eugenol และ cineole ของสารสกัดที่ได้จากใบเสม็ดขาวที่มีแหล่งที่มาของใบที่แตกต่างกัน ได้แก่ ใบเสม็ดขาวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใบเสม็ดขาวจากต้นที่ปลูกจากการเพาะเมล็ด อายุ 8 ปี และใบแก่เสม็ดขาวจากต้นที่ปลูกจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อายุ 1 ปี โดยทำการเตรียมสารสกัดจากพืชด้วยตัวทำละลาย แล้วนำมาสกัดด้วยตัวละลายชนิดต่างๆ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ตัวทำละลายทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ ethanol 95%, เฮกเซน (hexane) และเมทานอล (methanol) ความเข้มข้น 95% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อหาปริมาณ eugenol, cineole โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตรเพื่อหาความสัมพันธ์และสมการเส้นตรงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดใบเสม็ดขาวที่มีแหล่งที่มาของใบที่แตกต่างกัน พบว่า แหล่งที่มาและชนิดของตัวทำละลายมีผลต่อปริมาณ eugenol และ cineole มีผลต่อการสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่า ตัวทำละลาย methanol และ hexane สามารถสกัดสารสำคัญทั้งสาร eugenol และ cineole ปริมาณมากที่สุด มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ methanol ที่สกัดได้ปริมาณที่ต่ำ และใบเสม็ดขาวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับใบเสม็ดขาวจากต้นที่ปลูกจากการเพาะเมล็ด อายุ 8 ปี ได้สารสำคัญทั้งสาร eugenol และ cineole ปริมาณมากที่สุด เมื่อเทียบกับใบแก่เสม็ดขาวจากต้นที่ปลูกจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อายุ 1 ปี มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และเมื่อนำทั้งสองปัจจัยมาเปรียบเทียบกันใบเสม็ดขาวจากต้นที่ปลูกจากการเพาะเมล็ด อายุ 8 ปี ที่สกัดด้วย hexane มีปริมาณสาร eugenol และปริมาณสาร cineole มากที่สุด และมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.11)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.12** แหล่งที่มาของใบเสม็ดขาวต่อปริมาณสาร eugenol และ cineole

| การทดลอง | | ปริมาณสาร eugenol | ปริมาณสาร cineole |
|---|---|---|---|
| แหล่งที่มาของใบ | | (mg/gDW) (±SE) [1/] | (mg/gDW) (±SE) [1/] |
| ใบเสม็ดขาวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ | | 30.67±17.59a | 50.33±28.92a |
| ใบเสม็ดขาวจากต้นที่ปลูกจากการเพาะเมล็ด อายุ 8 ปี | | 32.37±19.69a | 53.12±32.36a |
| ใบแก่เสม็ดขาวจากต้นที่ปลูกจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อายุ 1 ปี | | 16.64±3.10b | 27.26±5.10b |
| F-test | | ** | ** |
| ตัวทำละลาย | ethanol | 23.79±12.63b | 39.02±20.77b |
| | methanol | 27.40±13.16a | 44.96±21.63a |
| | hexane | 18.48±22.98a | 46.73±37.78a |
| F-test | | * | * |
| แหล่งที่มาของใบ | ตัวทำละลาย | | |
| ใบเสม็ดขาวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ | ethanol | 39.86±3.05b | 65.43±5.01b |
| | methanol | 44.44±5.23b | 72.96±8.60b |
| | hexane | 7.72±0.72e | 12.59±1.19e |
| ใบเสม็ดขาวจากต้นที่ปลูกจากการเพาะเมล็ด อายุ 8 ปี | ethanol | 18.44±5.13cd | 30.22±8.43cd |
| | methanol | 20.75±1.23c | 34.01±2.03c |
| | hexane | 57.94±7.00a | 95.13±11.51a |
| ใบแก่เสม็ดขาวจากต้นที่ปลูกจากต้นที่ได้จากการ | ethanol | 13.08±0.67de | 21.41±1.11de |
| เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อายุ 1 ปี | methanol | 17.03±0.79cd | 27.91±1.31cd |
| | hexane | 19.80±1.78c | 32.46±2.93cd |
| F-test | | ** | ** |
| CV% | | 13.66 | 13.68 |

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan' s New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

**มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.4.3 ปริมาณสาร eugenol และ cineole ในใบเสม็ดขาวที่มีอายุใบที่มีอายุใบที่แตกต่างกัน**

การศึกษาปริมาณสารสำคัญโดยการวิเคราะห์หาปริมาณ eugenol และ cineole ของสารสกัดที่ได้จากใบเสม็ดขาวที่มีอายุใบที่แตกต่างกัน ได้แก่ ใบแก่ ใบอ่อน และใบเพสลาด โดยทำการเตรียมสารสกัดจากพืชด้วยตัวทำละลาย แล้วนำมาสกัดด้วยตัวละลายชนิดต่างๆ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ตัวทำละลายทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ ethanol 95%, เฮกเซน (hexane) และเมทานอล (methanol) ความเข้มข้น 95% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อหาปริมาณ eugenol, cineole โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร หาความสัมพันธ์และสมการเส้นตรงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดใบเสม็ดขาวที่มีแหล่งที่มาของใบที่แตกต่างกัน พบว่า อายุใบและชนิดของตัวทำละลาย มีผลต่อปริมาณ eugenol และ cineole อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ตัวทำละลาย hexane สามารถสกัดสารสำคัญทั้งสาร eugenol และ cineole ปริมาณมากที่สุด มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ในขณะที่ ethanol มีความสามารถในการสกัดได้ปริมาณต่ำที่สุด ตัวทำละลายชนิดอื่นๆ และใบอ่อนเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติได้สารสำคัญทั้งสาร eugenol และ cineole ปริมาณมากที่สุด มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และเมื่อนำทั้งสองปัจจัยมาเปรียบเทียบกันใบเพสลาดจากสภาพธรรมชาติและใบอ่อนจากสภาพธรรมชาติที่สกัดด้วย hexane มีปริมาณสาร eugenol และปริมาณสาร cineole มากที่สุด และมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.11)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**การทดลอง 4.13** เปรียบเทียบอายุของใบเสม็ดขาวที่ปลูกจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อายุ 1 ปี ต่อปริมาณสาร eugenol และ cineole

| การทดลอง | | ปริมาณสาร eugenol | ปริมาณสาร cineole |
|---|---|---|---|
| อายุใบ | | (mg/gDW) (±SE) [1/] | (mg/gDW) (±SE) [1/] |
| ใบแก่ | | 16.64±3.10c | 27.26±5.10c |
| ใบเพสลาด | | 22.31±6.74b | 36.57±11.08b |
| ใบอ่อน | | 25.46±5.15a | 41.76±8.40a |
| F-test | | ** | ** |
| ตัวทำละลาย | ethanol | 16.12±3.74c | 26.41±6.14c |
| | methanol | 21.29±3.51b | 34.92±5.78b |
| | hexane | 26.98±5.78a | 44.26±9.50a |
| F-test | | ** | ** |
| อายุใบ | ตัวทำละลาย | | |
| ใบแก่เสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ | ethanol | 13.08±0.67f | 21.41±1.11f |
| | methanol | 17.03±0.79de | 27.91±1.31de |
| | hexane | 19.08±1.78cd | 32.46±2.93cd |
| ใบเพสลาดเสม็ดขาวจากสภาพ | ethanol | 14.42±0.35ef | 23.62±0.57ef |
| ธรรมชาติ | methanol | 22.72±0.24bc | 37.25±0.39bc |
| | hexane | 29.78±2.12a | 48.86±3.50a |
| ใบอ่อนเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ | ethanol | 20.87±1.84c | 34.21±3.03c |
| | methanol | 24.14±2.52b | 39.59±4.15b |
| | hexane | 31.37±2.86a | 51.47±4.70a |
| F-test | | ** | ** |
| CV% | | 8.06 | 8.08 |

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan' s New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

**มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.4.4 การศึกษาฤธิ์ต้านอนุมูลออิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay**

เมื่อนำสารสกัดจากใบเสม็ดขาวที่มีระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน มาทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ DPPH แล้วนำมาวัดการเปลี่ยนแปลงของสีของสารละลายจากสีม่วง สีน้ำเงิน ไปเป็นสีเหลืองที่ความยาวคลื่น 517นาโนเมตร ในที่มืด ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.14 พบว่า สารสกัดจากใบเสม็ดขาวในสภาพธรรมชาติให้ผลที่ดีกว่าใบเสม็ดขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่สารทดสอบความเข้มข้น 0.125% มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด คิดเป็น 82.63 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อใบมีพัฒนาการ จากระยะใบเพสลาดไปเป็นระยะใบแก่ พบว่ามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.14) รองลงมาคือใบแก่เสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ คิดเป็น 81.35 เปอร์เซ็นต์ และใบเสม็ดขาวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH น้อยที่สุด สารทดสอบความที่เข้มข้น 0.06 % พบว่า สารสกัดใบแก่เสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด คิดเป็น 71.58 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือใบอ่อนเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ และใบเสม็ดขาวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH น้อยที่สุด

**ตารางที่ 4.14** ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบเสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi*) ที่มีระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน โดยวิธี DPPH assay

| เสม็ดขาว | %DPPH Radical Seavenging Activity (% DPPH± SE) | |
|---|---|---|
| | 0.125 % | 0.06% |
| ใบเสม็ดขาวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ | 16.09±3.16b | 6.63±2.68c |
| ใบเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ (รวมทุกระยะ อายุ 8 ปี) | 76.02±9.23a | 46.33±7.08b |
| ใบอ่อนเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี) | 82.63±2.50a | 58.73±4.22ab |
| ใบเพสลาดเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี) | 73.25±3.89a | 45.51±7.73b |
| ใบแก่เสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี) | 81.35±2.21a | 71.58±7.02a |
| F-test | ** | ** |
| CV (%) | 7.49 | 13.27 |

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan' s New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

**มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวที่มีระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.15 พบว่า สารสกัดใบแก่เสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีค่ามากที่สุด มีค่าเท่ากับ 68.80 มิลลิกรัมกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง แตกต่างจากชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมา คือ ใบอ่อนเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ มีค่าเท่ากับ 47.15 มิลลิกรัมกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และใบเสม็ดขาวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อน้อยที่สุด มีค่าเท่ากับ 7.86 มิลลิกรัมกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ โดยที่การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดคำนวณได้จากสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของ สารละลายกรดแกลลิก คือ $y = 11.318x + 0.0179$ มีค่า $R^2 = 0.9973$

**ตารางที่ 4.15** ผลการทดสอบปริมาณสารฟีนอลิกของต้นเสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi*) ด้วยวิธี Folin – Ciocalteu assay

| สารสกัดเสม็ดขาว | ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ± SE (mg GAE/100 g DW) |
|---|---|
| ใบเสม็ดขาวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ | 7.86±0.23e |
| ใบเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ (รวมทุกระยะ อายุ 8 ปี) | 44.24±0.80c |
| ใบอ่อนเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี) | 47.15±1.66b |
| ใบเพสลาดเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี) | 34.40±2.21d |
| ใบแก่เสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี) | 68.80±1.87a |
| F-test | ** |
| CV (%) | 3.8 |

1/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan’ s New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

**มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.4.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content; TFC)

ผลการศึกษาการวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวที่มีระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี Aluminium Chloride Colorimetric ได้แสดงในตารางที่ 4.16 ซึ่งค่าปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเสม็ดขาวนี้คำนวณได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารละลายเคอซิติน คือ $Y = 0.0009x + 0.0436$ ค่า $R^2 = 0.9988$ รายงานในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเควอร์ซิตินต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, mg QE/g DW) จากการวิเคราะห์พบว่า ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุดพบในสารสกัดใบเพสลาดเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ มีค่าเท่ากับ 11.58 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง รองลงมา คือ ใบเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ มีค่าเท่ากับ 7.35 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง และใบเสม็ดขาวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีค่าเท่ากับ 3.48 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

**ตารางที่ 4.16** ผลการทดสอบปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของต้นเสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi*) โดยวิธี aluminium chloride colorimetric assay

| สารสกัดเสม็ดขาว | มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง (ค่าเฉลี่ย±SE) |
|---|---|
| ใบเสม็ดขาวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ | 3.48±0.87c |
| ใบเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ (รวมทุกระยะ อายุ 8 ปี) | 7.35±2.72b |
| ใบอ่อนเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี) | 3.38±0.26c |
| ใบเพสลาดเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี) | 11.58±1.06a |
| ใบแก่เสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ (จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ปี) | 5.53±1.70bc |
| F-test | ** |
| CV (%) | 25.05 |

[1/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan’ s New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

**มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5

# วิจารณ์ผลการทดลอง

## 5.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ต่อการชักนำให้เกิดเป็น friable callus

จากการศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของเสม็ดขาวในสูตรอาหารที่แตกต่างกันโดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้อเสม็ดขาวบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ามีการสร้างแคลลัสในทุกสูตรอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีขนาดใหญ่ที่สุด บนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Malabadi *et. al.* (2004) ได้ศึกษาการชักนำแคลลัส ของ *Vanda coerulea* โดยนำไปเลี้ยงบนสูตรอาหาร TDZ พบว่ามีการเกิดแคลลัส ถึงแม้ว่า TDZ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และยังสามารถกระตุ้นให้แคลลัสขยายตัวได้ดี แต่โดยทั่วไปแล้ว ถ้าใช้ความเข้มข้นของปริมาณไซโตไคนินที่ต่ำจะได้แคลลัสที่แน่น และสีเขียว ถ้าปริมาณของไซโตไคนิน ต่อออกซินต่ำ จะทำให้เกิดการเจริญเติบโตไปเป็นรากหรือแคลลัส (ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546) จากผลการทดลองข้างต้น ทำให้พบว่า ชิ้นส่วนข้อที่ได้รับ 2,4-D เพียงอย่างเดียว ทำให้ชิ้นส่วนเจริญไปเป็นราก เมื่อพิจารณาการตอบสนองของข้อของเสม็ดขาวที่นำมาเพาะเลี้ยง จะเห็นได้ว่าชิ้นส่วนของพืชที่เลี้ยงบน TDZ จะตอบสนองต่อ TDZ ต่อการเกิดแคลลัสได้ดี แต่แตกต่างจากการชักนำแคลลัสจากรากของกล้วยไม้ที่มีการตอบสนองต่อ TDZ ได้น้อยกว่าไซโตไคนินชนิดอื่น ชิ้นส่วนของพืชที่เจริญไปเป็นรากจะตอบสนองต่อ TDZ ได้น้อย (**Wu** *et. al*. 2004) เมื่อใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียวทำให้ชิ้นส่วนข้อของเสม็ดขาวไม่มีการพัฒนาไปเป็นยอดหรือแคลลัส เมื่อดูการเจริญเติบโตความสัมพันธ์ของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ พบว่า ออกซินและไซโทไคนินสามารถทำให้พืชมีการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อแล้วพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ในความเข้มข้นที่เหมาะสม พืชที่ได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองชนิดเซลล์พืชจะพัฒนาเป็นแคลลัสหรือมีการพัฒนาเป็นอวัยวะอื่นๆ ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของออกซินและไซโตไคนินที่พืชได้รับ ถ้าได้รับออกซินมากกว่าไซโตไคนินชิ้นส่วนจะมีการพัฒนาไปเป็นราก แต่ถ้าได้รับสัดส่วนที่มีออกซินน้อยกว่าไซโตไคนิน ชิ้นส่วนจะมีการพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้น และถ้าสัดส่วนนั้นมีความสมดุลกัน จะสามารถเจริญเติบโตหรือพัฒนาไปเป็นแคลลัสซึ่งสิ่งต่างๆหรือผลที่เกิดขึ้นเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของชิ้นส่วน และระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่นำมาใช้ (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2540) และความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ต่ำหรือสูงกินไปจะมีผลให้แคลลัสมีขนาดลดลง (Upadhyaya *et. al.* 2015) ทั้งนี้เพราะ 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มออกซินที่มีบทบาทในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการขยายขนาดของเซลล์ซึ่งการใช้ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่ำจะส่งเสริมการแบ่งเซลล์และการขยายขนาดของเซลล์ แต่หากใช้ที่ความเข้มข้นสูง ๆ จะมีผลยับยั้งการสร้างแคลลัส (Song. 2014) Michiba *et. al.* (2001) กล่าวว่าการใช้ TDZ ซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มฟีนิลยูเรีย (phenylureas) ที่ออกฤทธิ์คล้ายไซโทไคนิน โดยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ ระดับพลังงาน และการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารของพืช และมีผลกระตุ้นให้เกิดตายอดจำนวนมาก เช่นเดียวกับ Murthy *et. al.* (1998) กล่าวว่า TDZ มีคุณสมบัติช่วยให้เกิดการแบ่งเซลล์ เพิ่มขนาดเซลล์ของเซลล์ กระตุ้นการแตกตาข้าง ส่งเสริมการสร้างยอด และการเกิดต้นใหม่ รวมถึงกระตุ้นการทำงานของโปรตีนและเอนไซม์ในเนื้อเยื่อพืช จึงส่งเสริมการเจริญได้ดี ทั้งยังชักนำการเกิดยอดได้ปริมาณมากกว่าและใช้ระยะเวลาน้อยกว่าอีกด้วย Visser *et. al.* (1992) พบว่าชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดแคลลัสที่ใหญ่สุด มีขนาดความสูงและความกว้าง 3.52 และ 1.65 เซนติเมตร ตามลำดับ และมีจำนวนการเกิดยอดมากที่สุด 7.16 ยอด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Burikam and Kavita (2007) ที่รายงานว่า การชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของสบู่ดำ ได้แก่ ตายอด ตาข้าง ใบอ่อน ลำต้นใต้ใบเลี้ยง และ ก้านใบ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ความ เข้มข้น 0.01-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแคลลัสที่ได้สามารถพัฒนาเป็นต้นจำนวนมากต่อไปได้ TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนที่มากกว่า BA ในพืชบางชนิดเช่น *Cyclamen pesicumr* จะเกิดยอดจำนวนมากเมื่อถูกชักนำด้วย TDZ เพียงอย่างเดียว และเช่นเดียวกับการศึกษาของ Kuehnle *et. al.* (1992) รายงานว่าในการชักนำแคลลัสของหน้าวัว เมื่อเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถส่งเสริมการชักนำแคลลัส และถ้าเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ที่ระดับความเข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้น้อยมากมีแคลลัสสีเขียวปนน้ำตาลและตายไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**5.2 การเพาะเลี้ยงรากของเสม็ดขาวในอาหารเหลวที่สภาพปลอดเชื้อ**

ในการศึกษาผลของ TDZ และ 2,4-D ที่มีต่อผลการชักนำรากของเสม็ดขาว ในการทดลองนี้พบว่า รากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่แตกต่างกับรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ และ 2,4-D อย่างชัดเจน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 10 สัปดาห์ โดยรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนั้นไม่พบการเปลี่ยนแปลง ส่วนรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียวพบการเกิดแคลลัส แสดงให้เห็นว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D นั้นเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินมีคุณสมบัติดียิ่งในการปิดกั้นกระบวนการกำเนิดอวัยวะและใช้ได้ดีในการเพิ่มจำนวนและรักษาสภาพการเป็นแคลลัสไว้ (รังสฤษฎ์. 2545) การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตดังกล่าวนี้จึงมีผลในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อของรากได้ เมื่อพิจารณาในด้านการตอบสนองของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง TDZ ชิ้นส่วนใบและยอดจะตอบสนองต่อ TDZ ได้ดี แต่เนื้อเยื่อรากจะตอบสนองต่อ TDZ ได้น้อย ดังเช่น การชักนำให้เกิดไรโซมจากแคลลัส ที่ได้จากรากของ *Oncidium* “Gower Ramsey” (Wu *et. al.*2004) หรือในกรณีในการชักนำยอดจากรากของ *Albizzia julibrissin* พบว่า TDZ จะชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด (Hosseini-Nasr and Rashid. 2000)

จากผลการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงรากของเสม็ดขาวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้รากมีน้ำหนักสดเฉลี่ยและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุดเมื่อเทียบกับสูตรอาหารอื่นๆ ซึ่งการเกิดแคลลัสนั้นอาจเป็นผลมาจากการใช้ไซโตไคนินและออกซินในอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อเนื้อเยื่อพืช (Davies. 1987 และ Narayanaswamy. 1989) ทำให้เนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการกระตุ้นจะเกิดการแบ่งเซลล์และการขยายขนาดของเซลล์เพิ่มมากขึ้นจึงเกิดแคลลัสได้ดี (Leopold. 1963) แต่อย่างไรก็ตามการเลือกใช้สารสังเคราะห์กลุ่มออกซินชนิดต่างๆ ในการชักนำให้เกิดรากจากเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของชนิดและความเข้มข้นของสารกลุ่มออกซินต่อชนิดและชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของพืช นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อ เช่น ปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโต pHของอาหาร ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ปริมาณน้ำตาลที่เติมลงในอาหาร หรือสูตรอาหารที่ใช้หรือการเพิ่มหรือลดปริมาณแร่ธาตุในสูตรอาหารนั้น ๆ (Baksha *et. al*. 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**5.3 การศึกษาการพัฒนาของแคลลัสและยอดของเสม็ดขาว**

จากการทดลองพบว่าการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดของเสม็ดขาว โดยเลือกสูตรอาหารที่ดีที่สุด 3 สูตร ได้แก่ TDZ 0.04 + 2,4-D 0.02 , TDZ 0.06 และ TDZ 0.08 + 2,4-D 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสมีลักษณะการเจริญเติบโตเป็นต้นที่มีลักษณะเป็นตุ่มและปูดเกิดขึ้นบนชิ้นส่วนข้อในอาหารทุกสูตร และยังมีลักษณะคล้ายพัฒนาไปเป็นยอดเกิดขึ้นพร้อมกัน พบว่า บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตของแคลลัสและมีน้ำหนักมากที่สุด เฉลี่ยความกว้างและความยาวของแคลลัสเท่ากับ 0.85 และ 1.14 เซนติเมตร ตามลำดับ เนื่องจาก TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ช่วยในการเจริญเติบโตทางลำต้น และเนื้อเยื่อเจริญตาข้าง พร้อมทั้งชักนำการเพิ่มจำนวนยอดของพืช (Hutchinson *et. al.* 1985; Taji and Williams. 1996) เมื่อใช้ร่วมกับ 2,4-D ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินเป็นกลุ่มสารที่กระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ทั้งในส่วนต้นและราก มีผลต่อการแบ่งเซลล์การยืดยาวของเซลล์ ทั้งนี้ Fellman *et. al.* (1987) รายงานว่า TDZ เป็นสารประกอบประเภท phenyl urea สามารถช่วยกระตุ้นการเกิดเนื้อเยื่อเจริญเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ และ Junyan *et. al.* (1994) รายงานว่า TDZ สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของแคลลัส ทำลายการพักตัวของตา และส่งเสริมการเกิด organogenesis ของ *Cayratia japonica* นอกจากนี้ยังมีรายงานการ ค้นพบในทำนองเดียวกันนี้ในพืชชนิดอื่น เช่น Carica pentagona (Zhou and Collet. 1989), Malus domestica (Wang *et. al.* 1986; Van Nieuwkerk *et. al.* 1986) และ Rubus sp. (Fiola *et. al.* 1990)

**5.4 การศึกษาปริมาณสารสำคัญ**

**5.4.1 ปริมาณสาร eugenol และ cineole**

การศึกษาปริมาณสารสำคัญโดยการวิเคราะห์หาปริมาณ eugenol และ cineole ของสารสกัดที่ได้จากใบเสม็ดขาวที่มีระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน โดยทำการเตรียมสารสกัดจากพืชด้วยตัวทำละลาย แล้วนำมาสกัดด้วยตัวละลายชนิดต่างๆให้ผลที่ต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Tsiri *et. al.* (2003) ที่กล่าวว่า ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบยูคาลิปตัสพบสาร 1, 8-Cineole (Eucalyptol) จะสูงในช่วงฤดูร้อน นอกจากนี้อาจเกิดจากความแตกต่าง ของปัจจัยด้านอื่น เช่น ปัจจัยสิ่งแวดล้อมของพื้นที่ปลูก ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณคุณภาพของสารสำคัญ ได้แก่ พันธุกรรม แหล่งเพาะปลูก สภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโต ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวและกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยว (Abad *et. al.* 1994) โดยเฉพาะวิธีการสกัด ส่วนของพืชที่นำมาสกัด ตลอดจนพืชชนิดสดหรือแห้ง และความอ่อนแก่ของพืช จากในการทดลองการเปรียบเทียบอายุของพืชในเสม็ดขาว ใบอ่อนจากสภาพธรรมชาติได้สารสำคัญทั้งสาร eugenol และ cineole ปริมาณมากที่สุด ซึ่งในใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชที่มีอายุอ่อนหรือแก่เกินไป จะทำการสังเคราะห์ด้วยแสงได้ไม่ดีเท่าใบพืชที่เจริญเติบโตเต็มที่ เพราะใบที่อายุอ่อนเกินไป คลอโรพลาสต์ยังเจริญไม่เต็มที่ ส่วนใบที่มีอายุแก่เกินไป กรานาและคลอโรฟิลล์มีการสลายตัวจึงทำให้พืชนั้นมีการสังเคราะห์ด้วยแสงน้อยลง และทำให้เกิดการสลายตัวของสารด้วย ปัจจัยต่างๆเหล่านั้นจึงมีผลต่อปริมาณคุณภาพของสารสำคัญ และองค์ประกอบของสารที่ได้แตกต่างกัน El-Ghorab *et. al.* (2010) พบสาร camphene ปริมาณสูงในขิงแก่สดและแห้งได้จากการสกัดด้วยการต้มกลั่นและการสกัดด้วย ethanol และ haxsen และ Kale and Unhalkar. (2011) พบสาร camphene ปริมาณมากในน้ำมันหอมระเหยขิงแก่ที่ได้จากการต้มกลั่น การที่ขิงอ่อนสดและขิงอ่อนแห้งที่สกัดโดยการต้มกลั่นมีสาร องค์ประกอบที่ได้แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากการนำตัวอย่างขิงสดไปอบแห้งที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งในระหว่างการให้ความร้อน น้ำ และสารระเหยอื่นๆ อาจระเหยและสูญเสียไป รวมทั้งในขิงอ่อนสดมีน้ำอยู่ในเซลล์มาก เมื่อนำมาต้มกลั่น น้ำที่อยู่ภายในเซลล์อาจเป็นตัวสกัดกั้นไม่ให้สารบางตัวระเหยออกมา (Purseglove *et. al.* 1981) จึงทำให้ตัวอย่างพืชสดและพืชแห้งมีสารองค์ประกอบหลักที่แตกต่างกัน สำหรับการสกัดด้วย ethanol ในขิงอ่อนและแห้งนั้น ถึงแม้ว่าได้สารองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกัน คือ สาร zingiberene แต่ในการสกัดด้วย ethanol เป็นเพียงวิธีเดียวที่สามารถสกัดสาร gingerol ได้ เนื่องจากความสามารถในการสกัดสารของ ethanol จึงทำให้สารองค์ประกอบหลักที่ได้ของทั้ง 2 วิธีแตกต่างกัน ในการทดลองทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย และจากผลการทดลองพบว่า ตัวทำละลาย hexane สามารถสกัดสารสำคัญทั้งสาร eugenol และ cineole ได้ปริมาณมากที่สุด โดยใน hexane เป็นสารสกัดที่ไม่มีขั้วเป็นตัวทำละลายที่ให้สารสำคัญทั้งยู eugenol และ cineole ได้ในปริมาณที่มาก เมื่อเทียบกับตัวทำละลาย methanol และ ethanol (Pandey and Tripathi. 2014) โดยในการแยกสารโดยอาศัยหลักการละลายระหว่างตัวทำละลายกับสารสำคัญในสมุนไพร ทั้งนี้จะอาศัยหลักการของการละลายความมีขั้ว (Polarity) ของทั้งตัวทำละลายและสารสำคัญ โดยสารสำคัญจะสามารถละลายในตัวทำละลายได้ก็ต่อเมื่อความเป็นขั้วของตัวสารสำคัญกับตัวทำละลายมีค่าใกล้เคียงกัน ในทางตรงข้ามตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเพราะแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลไม่มีขั้วเป็นแรงแวนเดอวาลส์ (Van der Waals Force) เหมือนกัน (รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547) สำหรับ methanol และ ethanol มีคุณสมบัติในการละลายได้กว้างทั้งสารที่มีขั้วและไม่มีขั้วและยังใช้ทำลายเอนไซม์ในพืชได้ (นันทวัน บุณยะประภัศร. 2536)

### 5.4.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การศึกษาในครั้งนี้พบว่าระยะพัฒนาการของใบที่ต่างกันทั้ง 5 แบบ ทำให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (*DPPH*) assay และในความเข้มข้นของสารทดสอบ 2 ความเข้มข้น แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยในใบแก่เสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ที่ความเข้มข้น 0.06% อาจมาจากการที่ใบในระยะนี้เป็นระยะที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารพฤกษเคมีสะสมอยู่ในปริมาณมาก ซึ่งสารพฤกษเคมีมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จึงมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าใบในระยะอื่นๆ และในระยะใบเจริญเต็มที่ยังเป็นระยะที่ใบมีสารทุติยภูมิมากอีกระยะหนึ่งเช่นกัน ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่ได้จากกระบวนการชีวสังเคราะห์ เพื่อสร้างสารชนิดต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตของพืช ได้แก่ สาร alkaloid phenolic acetogenins และ terpenes (ประไพรัตน์ สีพลไกร. 2555) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาระยะพัฒนาการของใบข้าวต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่า มีสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุดที่ 4.16 เปอร์เซ็นต์ (Krasaetep *et. al.* 2011) แต่ขัดแย้งกับการศึกษาของนิภาพร และคณะ (2557) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH ของใบอ่อนมีค่ามากกว่าในใบแก่ เนื่องจากพืชแต่ละชนิด มีการสร้างสารสำคัญต่างๆ แตกต่างกันออกไปในแต่ละระยะ ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ พันธุกรรม ชนิดพืช และพื้นที่ปลูก โดยมีรายงานพืชสมุนไพรหลายชนิดที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารทุติยภูมิน้อยกว่าและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ดังรายงานของ อรอุมา. (2556) ที่พบว่าเหง้าของหัวข้าวเย็น (Dioscorea *birmanica*) อายุมากกว่า 1 ปี ที่พัฒนาในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (259.27±7.34mg GAE/g dry extract) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC50 เท่ากับ 9.35±0.62 µg/mL) สูงกว่าค่าดังกล่าวของยอดหัวข้าวเย็นอายุ 2 เดือน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (44.24±8.47 mg GAE/g dry extract และ EC50 เท่ากับ 53.67± 4. 16 µg/mL ตามลำดับ) และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (76.55 %) สูงกว่าปริมาณที่พบในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบในสภาพปลอดเชื้อ (660.5 µg/mL, 535 µg/mL และ 71.17 % ตามลำดับ) (Mohan *et. al.* 2011) การที่ยอดหัวข้าวเย็นเหนือที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าเหง้าที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ อาจเนื่องมาจากยอดหัวข้าวเย็นเหนือที่เพาะเลี้ยงยังมีอายุน้อยและเป็นส่วนยอดจึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าเหง้าที่มีอายุมากกว่าและเป็นส่วนที่สะสมสารทุติยภูมิของต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ดังที่ Banthorpe. (1994) ได้รายงานไว้ว่าการสังเคราะห์สารทุติยภูมิในพืชมีความสัมพันธ์กับระยะการเจริญเติบโตของพืช โดยในช่วงที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่หรือในระยะที่พืชยังมีอายุน้อยอาจมีการสังเคราะห์และสะสมสารทุติยภูมิบางชนิดในปริมาณมากซึ่งความสัมพันธ์นี้จะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 5.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

จากการศึกษาพบว่าการนำส่วนใบของเสม็ดขาวที่ระยะพัฒนาของใบที่ต่างกันทั้ง 5 แบบ จากการเก็บตัวอย่างมาสกัดด้วย eathnol แล้วนำสารสกัดที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม พบว่า สารสกัดใบแก่เสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติมีปริมาณฟีนอลิคทั้งหมดมีค่ามากที่สุด มีค่าเท่ากับ 68.80 มิลลิกรัมกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง แตกต่างจากใบในระยะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมา คือ ใบอ่อนเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ มีค่าเท่ากับ 47.77 มิลลิกรัมกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลิกมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา เช่น มีการสังเคราะห์และมีการสลายตัว โดยมีปัจจัยต่างๆเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น แสง และอุณหภูมิ เป็นต้น (ศิวาพร ศิวเวชช และ ณัฏฐินี ใจสะอาด. 2546) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกในพืชชนิดเดียวกันอาจพบในปริมาณที่เท่ากันหรือแตกต่างกัน เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารเมทาบอไลต์ทุติยภูมิที่พบในพืช โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างขึ้นเพื่อทำลายเชื้อโรค ต่อต้านผู้บุกรุก หรืออยู่ในสภาวะที่กดดัน (Acamovic *et. al*. 2005; Edreva *et. al*. 2008; Dai and Mumper. 2010) พืชต่างชนิดกันจะมีสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน ซึ่งโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกัน และปริมาณที่แตกต่างกัน ทำให้มีความสามารถในการรับหรือให้อิเล็กตรอนได้แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน (Dai and Mumper. 2010) ในพืชต่างชนิดกัน รวมถึงในพืชชนิดเดียวกันที่อยู่ในสภาวะที่แตกต่างกัน

### 5.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content; TFC)

จากการศึกษาพบว่าการนำส่วนใบของเสม็ดขาวที่ระยะพัฒนาของใบที่ต่างกันทั้ง 5 แบบ จากการเก็บตัวอย่างมาสกัดด้วยเอทานอล แล้วนำสารสกัดที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ พบว่า ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุดพบในสารสกัดใบเพสลาดเสม็ดขาวจากสภาพธรรมชาติ จากผลการศึกษาพบว่า การใช้สารสกัด ethanol มีปริมาณ total flavonoid สูงสุด เนื่องจากฟลาโวนอยด์เป็นสารกลุ่มหนึ่งของสารประกอบฟีนอลิกสารสกัดหนึ่ง อาจมีฟีนอลิกมากแต่มีฟลาโวนอยด์น้อยเป็นเพราะอาจมีสารตัวอื่นในกลุ่มฟีนอลิกอยู่มากส่วนสารสกัดที่มีฟีนอลิกน้อยแต่ฟลาโวนอยด์มากอาจเป็นเพราะในสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดนี้มีฟลาโวนอยด์อยู่มาก ซึ่งฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลิกประเภทโพลีฟีนอลสามารถละลายในน้ำและตัวทำละลายที่มีขั้วได้ดี ส่วนใหญ่มักพบอยู่รวมกับน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) ความแตกต่างในโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกกำหนดการละลายในตัวทำละลายของขั้วที่แตกต่างกัน และการใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันที่ใช้ในการสกัดส่งผลให้มีความแตกต่างในองค์ประกอบของสารสกัด แต่ในองค์ประกอบทางเคมีมีความแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ฤดูกาล ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุกรรม สารสำคัญ และต้นกำเนิดของพืช (Sajjadi. 2006) นอกจากนี้ Szopa *et. al.* (2017) รายงานว่ายอดของ *Salacia chinensis* ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 30 วัน มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงสุด 17.21±2.15 mg/100 g DW และปริมาณสารดังกล่าวค่อยๆ ลดลงหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 40-60 วัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ซึ่งนอกจากระยะเวลา ในการเพาะเลี้ยงแล้ว ชนิดพืช อาหารเพาะเลี้ยง และรูปแบบการเพาะเลี้ยงถือเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสร้างสารทุติยภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 6

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดจากข้อของเสม็ดขาว โดยจากการนำชิ้นส่วนข้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการพัฒนาเจริญเป็นแคลลัสได้ดี ให้ความสูงและความกว้าง เท่ากับ 3.52 และ 1.65 เซนติเมตร ตามลำดับ และเกิดยอดได้ดีที่สุด ส่วนของความสูงยอดที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ เข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูงยอดดีที่สุด และการศึกษาการพัฒนาการเกิดยอดและแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ และ 2,4-D พบว่าบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตของแคลลัส น้ำหนักของแคลลัส และจำนวนยอดมากที่สุด เช่นเดียวกับ สูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ความสูงของแคลลัสเฉลี่ย 1.21 เซนติเมตร และบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนการเกิดยอดมากที่สุด เท่ากับ 2.56 ยอด

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงรากของเสม็ดขาวในอาหารเหลวที่สภาพปลอดเชื้อต่อการชักนำ hairy root โดยศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 3 สูตร นำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ หรือ 2,4-D 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D พบการเปลี่ยนแปลงของรากโดยมีน้ำหนักแคลลัสสูงที่สุดและเป็นสูตรที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด

การศึกษาปริมาณสารสำคัญโดยการวิเคราะห์หาปริมาณ eugenol และ cineole ของสารสกัดที่ได้จากใบเสม็ดขาวที่มีระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน จึงพบว่า ใบเสม็ดขาวที่นำมาจากสภาพธรรมชาติที่สกัดด้วย hexane ให้ปริมาณ eugenol และ cineole มากที่สุด และในการศึกษาต้านอนุมูลอิสระของระยะพัฒนาการของใบที่ต่างกันทั้ง 5 แบบ พบว่า ใบแก่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฟีนอลิกสูงที่สุด และฟลาโวนอยด์ในใบอ่อนสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.2 ข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาของการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าในการชักนำแคลลัสและยอดมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องที่สำคัญในการชักนำ เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโต แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และสารประกอบต่างๆที่อยู่ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยง รวมถึงปัจจัยของชิ้นส่วนพืช อาจจะเป็นมาจากปัจจัยต่างๆที่ยังไม่มีความเหมาะสมต่อเสม็ดขาว อาจจะต้องหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัสและยอดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บรรณานุกรม

กัญจนา แซ่เตียว. 2555. **เอกสารประกอบการสอนหลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

กนกวรรณ เสรีภาพ. 2554. **คู่มือประกอบการสอนวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ ระดับมัธยศึกษาตอนปลาย วิชาชีววิทยา เรื่อง ออกซิน.** สำนักงานคณะกรรมการการศึกษาขั้นพื้นฐานและ กรุงเทพฯ : คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

โครงการศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทอง (งานป่าไม้) กรมป่าไม้เทคโนโลยีชีวภาพ. [Online]. แหล่งข้อมูล : http://forprod.forest.go.th/forprod/samadkhow/Samadkhow.pdf

ณัฐนนท์ อยู่สถิตย์ และชญาดา กลิ่นจันทร์. 2559. **การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ในใบสะระแหน่ ใบทับทิม และใบว่านแร้งคอดำ เพื่อแปรรูปเป็นชาสมุนไพร. รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ครั้งที่ 3 (322 - 338).** กำแพงเพชร : มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร.

ธนิตย์ หนูยิ้ม และบุญชุบ บุญทวี. 2542. **ไม้เสม็ดขาว.** ศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร โครงการศูนย์ศึกษาพัฒนาพิกุลทองอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (งานป่าไม้) เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ ฉบับที่ 1. 27 หน้า.

นันทวัน บุณยะประภัศร. 2536. **การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากพืช. ใน : ยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เล่มที่ 1**, วันดี กฤษณพันธ์ (ผู้รวบรวม). ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 116-129.

นิภาพร ยลสวัสดิ, มณทินี ธีรารักษ์ และจำรูญ เล้าสิน วัฒนา. 2557. “การประเมินความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ และการจับโลหะ และ ปริมาณฟินอลิคจากใบทุเรียน 10 พันธุ์”. **แก่นเกษตร.** 42 : 88-93.

นันฑวัฒน์ กิตติศักดิ์เสรี และรัตติกร ล้อมจันทร์. 2549. **การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากไม้กฤษณาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์**. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี อุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ.

นฤมล สังข์โอราน. 2546. **ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวในการควบคุมแมลงศัตรูพืช**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2547. **เทคโนโลยีเบื้องต้นการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ปณต ตั้งสุจริต, วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์, ยุพา คู่คงวิริยพันธุ์ และวันชัย ไอยารัตน์. 2549. การตรวจสอบฤทธิ์ระงับปวดและฤทธิ์ต้านอักเสบของพืชผักพื้นบ้านอีสาน. **ศรีนครินทร์เวชสาร**. 21(4) : 305-310.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปณต ตั้งสุจริต, วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์, ยุพา คู่คงวิริยพันธุ์ และวันชัย ไอยารัตน์. 2549. การตรวจสอบฤทธิ์ระงับปวดและฤทธิ์ต้านอักเสบของพืชผักพื้นบ้านอีสาน. **ศรีนครินทร์เวชสาร.** 21(4) : 305-310.

ปรีดาวรรณ ขอช่วยกลาง และวรนุช ศรีเจษฎารักข์. 2556. การเปรียบเทียบวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายต่อการสกัดวิตามินอี และแกมมา-โอไรซานอลจากรำข้าวพันธุ์ กข 6. **วารสารวิจัย มข.** หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ประภัสสร สูทกวาทิน. 2547**. งานวิจัยอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ**. [Online]. แหล่งข้อมูล : http://www.gpo.or.th/rdi/html/tissue.html. (วันที่ค้น:20 กันยายน 2560).

ประไพรัตน์ สีพลไกร. 2555. สารอินโดลอัลคาลอยด์ และฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นพญาสัตบรรณ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 14 : 54-65.

ปิยนุช เจริญผล และ กาญจนา วงศ์กระจ่าง. 2558. การศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของการสกัดและปริมาณฟีนอลิกฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบดาวเรือง. **วารสารวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์. 7(7) : 17 - 27.

เปรมฤดี ดำยศ. 2550. **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** พัทลุง : วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีพัทลุง.

พรพิมล สุริยจันทราทอง. 2545. **หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

ภูวดล บุตรรัตน์. 2529. **พฤกษศาสตร์ทั่วไป ตอน ลักษณะภายนอกของพืชดอก**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, ปัตตานี.

มลศิริ วีโรทัย. 2540. ส่วนประกอบของอาหารเพื่อสุขภาพชนิดใหม่ๆ. **วารสารวิทยาศาสตร์.** มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 13(2) : 67-75.

แม้น อมรสิทธิ์และอมรเพชรสม. 2535. **Principles and techniques of instrumental analysis.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชวนพิมพ์.

รงรอง วิเศษสุวรรณ. 2542. **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** เอกสารประกอบการฝึกอบรมทาง. วิชาการเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขั้นพื้นฐาน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กำแพงแสน. นครปฐม.

รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2540. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค.** ภาควิชาพืชไร่. คณะเกษตร. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2545. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์, จิราวรรณ อุ่นเมตตาอารี และจิตรา สิงห์ทอง. 2554. **ฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดย่านาง เครือหมาน้อย และรางจืด**. สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

วิชัย หฤทัยธนาสันติ์และคณะ. 2546. **รายงานการวิจัยโครงการพัฒนากรรมวิธีการผลิตและการใช้ประโยชน์จากสารสกัดใบเสม็ดขาว**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 125 น.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. **การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร**. กรุงเทพมหานคร:สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิภาพร เสรีเด่นชัย และศิริวรรณ อธิคมกุลชัย. 2557. **รายงานวิจัยฤทธิ์ยับยั้งเอมไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสของน้ำมันหอมระเหยจากพืชวงศ์ Zingiberaceae และ Myrtaceae**. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี.

ศิวาพร ศิวเวชช และ ณัฏฐินี ใจสะอาด. 2546. **การสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกมันฝรั่ง**. รายงาน สืบเนื่องการประชุมทางวิชาการระดับชาติของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41: สาขาอุตสาหกรรม เกษตร (น. 12-19). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2548. **น้ำมันหอมระเหยไทย**. กรุงเทพฯ : บริษัท เซเว่น กรุ๊ป จำกัด. หน้า 8-11, 15-21, 24-27.

สิริลักษณ์ มาลานิยม. 2545. น้ำมันหอมระเหย สารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย. **สมอ สาร.** 28(325) : 3-6.

สุเทพ เรืองวิเศษ, นงลักษณ์ เรืองวิเศษ, สวรรยา บูรณะผลิน, ปิยะวัฒน์ สายพันธุ์ และนฤมล โพธิ์ศรีทอง. 2553. **2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกแอซิด (2,4-D).** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุวรรณา เป็นสุข. 2538. **การใช้ประโยชน์ใบเสม็ดขาวเพื่อการผลิตน้ำมันเขียว**. รายงานผลการดำเนินงาน โครงการศึกษาความเหมาะสมในการใช้ประโยชน์ใบเสม็ดขาวเพื่อการผลิตน้ำมันเขียว. ศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร โครงการศูนย์ศึกษาพัฒนาพิกุลทอง อันเนื่องมาจากพระราชดำริ (งานป่าไม้). 11 หน้า.

แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ. 2547. **คู่มือปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. เชียงใหม่ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.

อรดี สหวัชรินทร์. 2539. **เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 48 น.

อรรถพล พันธุ์งาม, สุรพงศ์ รัตนะ และ บรรลือ สังข์ทอง. 2560. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ในสารสกัดตะขบฝรั่ง. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ฉบับพิเศษ**. 13. 563 - 572.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อรอุมา สองศรี. 2556. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวข้าวเย็น ( *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) และการสะสมสารทุติยภูมิ**, วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี.

อัมพา ว่องวิชชกร, ปริญญารัตน์ ภูศิริ และ วรนัฐ ศรีพาเพลิน. 2546. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับงานขยายพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ : กรมส่งเสริมการเกษตร.

อัญชนา เจนวิถีสุข. 2544. การตรวจหาและบ่งชนิดสารต้านอนุมูลอิสระผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

โอภา วัชระคุปต์ ปรีชา บุญจง จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. 2549. **สารต้านอนุมูลอิสระ Radical Scavenging Agent.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : พี.เอส.พริ้นท์. 190 หน้า.

โอเยน และ ดุง 1999. **ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้**. ลำดับที่ 19. พืชที่ให้น้ำมันหอม. สหมิตรพริ้นติ้ง. นนทบุรี.

Abad, F.A.H., Misra, A. and Naqvi, A.A. 1994. **Effect of plants age quality and quantity of oil in Japanese mint: Medicinal Essential Oil Culinary Herb and Pesticides Plant of the Labiates (1973- 1993) Part I**, CAB International, Wallingford, p.147.

Acamovic, T. and Brooker, J.D. 2005. **Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals.** The Proceedings of the Nutrition Society 64: 403–412.

Afify, A. El-M.M.R., H.S. El-Beltagi, A.A. Aly and A.E. El-Ansary. 2012. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation as biomarker for potato tuber stored by two essential oils from Caraway and Clove and its main component carvone and eugenol. **APJTB**, 772-780.

Arndt, F. R., Rusch, R., Stillfried, H. V., Hanisch, B., and Martin, W. C. 1976. A new defoliant. **Plant Physiol**. 57 : 99-99. (Abstr.)

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

Baksha R, Alam R, Karim M.Z, Paul,b SK, Hossain MA, Miah MAS, Rahman ABMM. 2002. In vitro shoot tip culture of sugarcane (Saccharum officinarum) variety LSD28. **Biotechnology**, 1(2-4): 67- 72.

Batish, D. R., H. P. Singh, R. K. Kohli, and S. Kaur. 2008. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. ***Forest Ecology* and *Management***. 256 : 2166–2174.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Blois, M.S. 1958. **Antioxidant determinations by the use of a stable free radical**. Nature. 181 : 1199-1200.

Bodhipadma K., Noichinda S., Udomrati S., Nathalang G., Kijwijan B. and Leung D.W.M. 2006. Anthocyanin accumulation in the hypocotyl and petal of red agati (Sesbania grandiflora), an ornamental legume. ***Journal* of Applied *Horticulture***. 8(2) : 143–146.

Brophy, J.J., D.J. Boland and E.V. Lassak. 1989. Leaf Essentail Oils of Melaleuca and Leptospermum Species from Tropical Australia. In Tree for the Tropics: Growing Australia Multipurpose Trees and Shrubs in Developing Countries. **Australian Centre for International Agricultural Research**, Canberra, Monograph No. 10, p. 193-203.

Burikam, S. and R. Kavita. 2007. In vitro culture of Jatropha curcas. p.130-135. In Proc. the 1st Conf. of Jatropha curcas. Kasetsart University. Bangkok. (In Thai)

Chuntaratin, P. 2006. **Production of Plumbagin by Hairy Root, Callus and Cell Suspension Cultures of *Plumbago indica* L.** Ph.D. Thesis. Kasetsart University, Bangkok.

Dai, J. and Mumper, R. 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules 15,** 7313-7352.

Davies, P.J. 1987. **The plant hormone : their nature, accurence, and function**, pp. 1-7. In P.J.Davies (ed.). Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht.

El-Ghorab, A.H., Nauman, M., Anjum, F.M., Hussain, S. and Nadeem, M. 2010. A Comparative study on chemical composition and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) and cumin (Cuminum cyminum), **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 58, No. 14, pp. 8231-8237.

Fiola, J.A., A. Mahmoud, M.A. Hassan, H.J. Swartz, R.H. Bors and R. McNicols. 1990. Effects of thidiazuron, light fluence rate and kanamycin on in vitroshoot organogenesis from excised Rubuscotyledons and leaves. **Plant Cell Tiss. Org. Cult**. 20: 223-228.

Grayer, R.J., Bryan, S.E., Veitch, N.C., Goldstone, F.J., Paton, A., and Wollenweber, E. 1996. External flavones in sweet basil Ocimum basilicum, and related taxa. **Phytochemistry**. 43: 1041-1047.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Grossnickle S.C. and Sutton B.C.S. 1999. Applications of biotechnology for forest regeneration. **New Forests**. 17(1) : 213-226.

Häkkinen, S.T., E. Moyano, R.M. Cusidó and K.M. Oksman-Caldentey. 2016. Exploring the metabolic stability of engineered hairy roots after 16 years maintenance**. Frontiers in Plant Science.** 7:1486. doi: 10.3389/fpls.2016.01486

Halliwell, B., J.M.C. Gutteridge and L. Aruoma. 1987. The deoxyribose method: a simple test tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. J. Anal. **Biochem**. 165(1) : 215-219.

Hosseini-Nasr, M. and Rashid. 2000. A.: Thidiazuron-induced shoot-bud formation on root segment of Albizzia julibrissin is an apex-controlled, light-independent and calcium-mediated response. **Plant Growth** Reg. 36: 81-85

Huetteman, C. A., and Preece, J. E. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell *Tissue* and Organ Culture**. 33: 105-119.

Hutchinson, J.F., D.V. Beardsell and J.A. Mc Comb. 1985. Propagation by Tissue Culture Introduction, pp. 38-52. In Lamont, B.B. and P.A. Watkins (eds). **Horticulture of Australian Plants**. Western Australian Dept. Agriculture, South Perth, W.A.

Junyan, Z., H. Ma, F. Guoand X. Lao. 1994. Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of Cayratia japonica. **Plant Cell *Tissue* and Organ Culture**. 36: 73-79.

Katja Schulz; et al. 2008. Headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry for the quantitative determination of the characteristic flavouring agent eugenol in serum samples after enzymatic cleavage to validate post-offence alcohol drinking claims. **Chromatography A**. 1211:113–119

Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnon, S., Gürel, A.L. and Aktas, L. 2008. Stressprotective role of secondary metabolites: Diversity of functionsand mechanisms. **General and Applied Plant Physiology**. 34: 67–78.

Kale, S.S. and Unhalkar, S.R. 2011. Extraction, characterization and comparison of esential oil of rhizomes of Alpinia galanga (Lin.) Wild. And Zingiber officinale (Roscoe), Fam. Zingiberaceae, **Indian Drugs**, Vol. 48, No. 10, pp. 16-20.

Kuehnle A R, Chen F, Sugii N. 1992. **Somatic embryogenesis and plant regeneration in Anthurium andraeanum hybrids**. Plant Cell Reports. 11:438-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

442.

Fellman, C.D., P.E. Read and M.A. Hosier. 1987. Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation. **Hort. Sci**. 22: 1197-1200

Krasaetep, J., M. Nakornriab, D. Puangpronpitag. 2011. Antioxidant activity and total phe- nolic contents in leaf of some Thai rice cultivars. **Int. J. Applied Chem**. 7: 285- 296.

Kuzma, L., M. Kaiser and H. Wysokińska. 2017. The production and antiprotozoal activity of abietane diterpenes in Salvia austriaca hairy roots grown in shake flasks and bioreactor. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**. 47: 58-66.

Lawson, H. 1995. **Food oils and Fats: Technology**, Utilization and nutrition. CHAPMAN., and HALL.

Leopold, A.C. 1963. **Auxin and Plant Growth**. University of California Press, Berkely. 345p.

Lu, C. Y. 1993. **The use of TDZ in tissue culture**. In Vitro Cell. Dev. Biol. 29P:92–96.

Luiz, C. A. B., Cleber, J. S., Robson, R. T., Renata, M. S. A. M. and Antonio, L. P. 2013. Chemistry and Biological Activities of Essential Oils from *Melaleuca* L. Species. **Agriculturae Conspectus Scientificus**. 78(1). 11–23.

McGuinness, H. 2003. **Aromatherapy therapy basics**. 2nded., London : Hodder&Stoughton. p. 23-28, 37, 57, 59-60, 62, 68-69, 71-72.

Malabadi RB, Mulgund GS, Nataraja K. 2004. Efficient regeneration of Vanda coerulea, an endangered orchid using thidiazuron. **Plant Cell Tissue Organ Cult**. 76:289–93.

Michiba, K., et al. 2001. Increasing ploiding level in cell suspension cultures of Doritaenopsis by exogenous application of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. **Physiology Planta**. 112: 142- 148.

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

Mok, M. C., Mok, D. W. S., Armstrong, D. J. , Shudo, K., Isogai, Y., and Okamoto, T. 1982. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea (TDZ). **Phytochemistry**. 21: 1509-1511.

Murthy, B. N. S. et. al. 1998. **Review Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis.** Society for In Vitro Biology**.** 34(4) : 267-275.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Murthy, B. N. S., Murch, S. J., and Saxena, P. K. 1998. **Review Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis.** *In Vitro* Cell velopmental *Biology – Plant.* 34: 267-275.

Narayanaswamy, S. 1989. **Regeneration of plant from tissue cultures**, pp. 179-248. In: J. Reinert and Y.P.S. Bajai (eds). Applied and Fundamental Aspect of Plant Cell Tissue and Organ Culture. Narosa Publishing House. New Delhi.

Nathalang K. 2012. Factors important for somatic embryo induction and proliferation from young leaf explant of the most gigantic teak. **J.of KMUTNB**, 22(1): 24-30.

Nieuwkerk, J.P., R.H. Zimmerman, and I. Fordham. 1986. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation in vitro. **HortScience** 21:516-518.

Osaki, M., T. Watanabe, T. Ishizawa, C. Nilnond, T. Nuyim, C. Sittibush and T. Tadano. 1998. Nutritional Charateristics in Leaves of Native Plants Grown in Acid Sulfate, Peat, Sandy Podzolic and saline Soils Distributed in Peninsular Thailand. **Plant and Soil**. 201:175-182.

Oyen, L.P.A. and Nguyen Xuan Dung (ed.). 1999. **Plant Resources of South-East Asia, No.19 Essential-oil plants**. Prosea Foundation, Bogor, Indonesia. 126-135, 215-216 pp.

Packer, L., M. Hiramatsu and T. Yoshikawa. 1999. Antioxidant Food Supplements in Human Health. **Academic Press**. U.S.A. 511 p.

Pandey A. and Tripathi S. 2014. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.** 2 (5): 115-119.

Purseglove, J.W., Brown, E.G., Green, C.L. and Robbins, S.R.J. 1981. **Spice, Vol. 1, D**. Van Nostrand Co., New York, pp. 100-173.

Quy, D.D., Artik, E.A., Phuong, L.T.N., Lien, H.H., Felycia, E.S., Suryadi, I., and Yi-Hsu, J. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavoids content, and antioxidant activity of Lamnophila aromatic. **Journal of Food and Drug Analysis**. 22(3) : 296-302.

Reverchon E, Taddeo R, Porta GD. 1995. Extraction of sage oil by supercritical CO2: Influence of some process parameters. **The Journal of Supercritical Fluids**; 8(4): 302-9.

Rice-Evans, C.A. and N.J. Miller. 1996. Antioxidant acitivities of flavonoids as bioactive compounds of foods. J. **Biochem**. Soc. Trans. 24(3): 790-795.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sajjadi, S.E. 2006. Analysis of the essential oils of two cultivated basil (Ocimum basilicum L.) from Iran. DARU **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 14 : 128-130.

Sasaki, S., Yagi, H., Yamanoshita, T., Masumori, M., Kojima, K., Tange, T., Nuyim, T. and Niyomdham, C. 1995. **Reforestation trial of degraded peat swamp forest and sanddune in Narathiwat, Thailand**. In the International Workshop on Global Environmental Studies on Greenhouse Gas Emission and Tropical Peat Swamp in Southeast Asia. Pisoot Vijarnsorn). (ed.), Tokyo : Nodai research instilute. Tokyo university of agriculture. pp. 55-61.

Silvia V, Angela A, Stefano M. 2004. The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. **Current Pharmaceutical Design**. 10(14) : 1677-94.

Singh, H.P., S. Kaur, S. Mittal, D.R. Batish and R.K. Kohli. 2010. In vitro screening of essential oil from young and mature leaves of Artemisia scoparia compared to its major constituents for free radical scavenging activity**. Food Chem. Toxicol**. 48: 1040-1044.

Siramon, P. and Y. Ohtani. 2007. Antioxidative and antiradical activities of Eucalyptus camaldulensis leaf oils from Thailand. **J Wood** Sci 53: 498-504.

Skoog, F. and Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue grown in vitro**, Symp. Soc. Exp. Biol**. 11: 118.

Song, Y. 2014. Insight into the mode of action of 2,4**-**dichlorophenoxyacetic acid (2,4**-**D) as an herbicide. **Journal of Integrative Plant Biology**. 56(2) : 106-113.

Sutha, M., Fauzi, D., Sahidan, S., Mahanem, M. N., Malina, K., Andi, N., Andik, M., Ayumawarni, Y. Y. J. L., Rahimah, B. M. Z., Janet, S. I., Subhashini, K., Deeviya, G., Yi, C. L., Azwan, M. L. and Shazrul, F. 2016. Active Compound, Antioxidant, Antiproliferative and Effect on STZ induced Zebrafish of Various Crude Extracts from *Boletus qriseipurpureus*. **Malaysian Applied Biology Journal**. 45(1) : 69 – 80.

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.

Taji A & Williams R. 1996. **Tissue Culture of Australian Plants. University of New**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**England**, Armidale, NSW 2351, Australia.

Tange, T., Yamanoshita, T., Kawazoe, T., Nuyim, T., Masumori, M., Kojima, K., Morikawa, Y., Urapeepatanapong, C., Boontawee, B., Yagi, H. and Sasaki, S. 1998. **Regeneration and growth of *Melaleuca cajuputi* at degraded peat swamp**. In International Seminar The development of Sustainable Biological Production Technologies in the Problem soil in Southeast Asia, August 10-12, 1998. Narathiwat, Thailand.

Tatreerod, S., P. Saralamp and S. Chanprame. 2003. **Hairy root induction and culture of Plumbago indica L.** In The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare. Chiang Mai, Thailand. pp. 306.

Thinh, P.T. 1997. **Zones and their functions in Tram chim National Reserve, In Towards Sustainable Management of Tram Chin National Reserve, Vietnam**. Proceedings of a Workshop on Balancing Economic Development with Environmental Conservation. Safford, R.J., D.V. Ni, E. Maltby & V.-T. Xuan, (ed), London: Royal Holloway Institute for Enivironmental Research.Yuswan, M. H. M. pp. 77-85.

Tsiri, D., O. Kretsi, I.B. Chinou and C.G. Spyropoulos. 2003. Composition of fruit volatiles and annual changes in the volatiles of leaves of Eucalyptus camaldulensis Dehnh. growing in Greece. **Flavour Fragr. J**. 18 : 244-247.

Upadhyaya, G., et. al. 2015. In vitro callus induction and plant regeneration of rice (Oryza sativa L.) var. ‘Sita’, ‘Rupali’ and ‘Swarna Masuri’. Asian **Journal of Plant Science and Research**, 5(5), 24-27.

Van Nieuwkerk, J.P., R.H. Zimmerman and I. Fordham. 1986. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation in vitro. **Hort. Sci**. 21: 516-518.

Visser, C., et. al. 1992. Morphoregulatory role of thidiazuron. Substitution of auxin and Cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. **Plant Physiology**. 99 : 1704–1707.

Wang, S.Y., J.L. Ji, T. Sun and M. Faust. 1986. Breaking bud dormancy in apple with a plant bioregulator thidiazuron. **Phytochemistry**. 25: 311-317.

Wu, I., Chen, J., and Chang, W. 2004. Effect of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of Oncidium 'Gower Ramsey'. **Plant Cell Tissue Organ Cult**. 77: 107-109.

Yuswan, M. H. M. Y., Al-Obaidi, J., Rahayu, A., Sahidan, S., Shazrul, F. and Fauzi, D.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2015. **New bioactive molecules with potential antioxidant activity from various extracts of wild edible gelam mushroom (Boletus spp.)**. Advances in Bioscience and Biotechnology 6: 320-329.

Zaerr, J., and Mapes, M. 1982. **Action of growth regulators**. Tissue Culture in Forestry. 1: 231–255.

Zhou, J.Y. and G. F. Collet. 1989. Studies on cytokinin-activity of thidiazuron I. **Effect on callus induction and shoot growth in tissue culture of Carica pontagona. Acta Bot**. BorealiOccidentalia Sin.9: 203-211.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**1.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS (Murashige and Skoog. 1962)**

1.1.1 การเตรียม stock solution ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

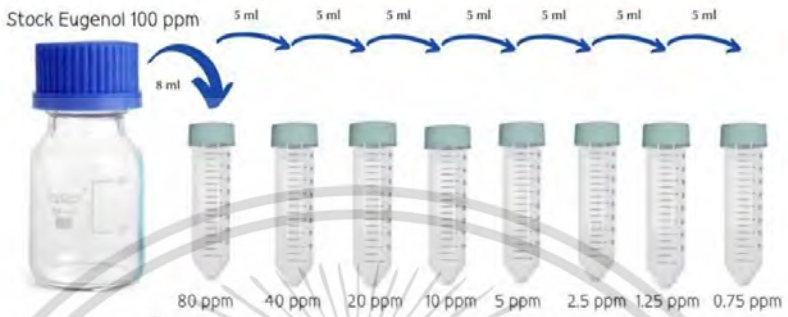
การเตรียม stock solution ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS โดยเตรียมส่วนของ Macroelements (MS1-MS5) ให้มีความเข้มข้น 10 เท่า ของความเข้มข้นที่ต้องการใช้ และส่วนของ Microelements (MS6-MS8) ให้มีความเข้มข้น 100 เท่า ดังตารางด้านล่าง

| MS | สารเคมี | ความเข้มข้น (mg/L) | ความเข้มข้นของ stock solution (g/L) | ปริมาตรของ stock solution |
|---|---|---|---|---|
| Macroelements | | | (100 เท่า) | |
| MS1 | NH4NO3 | 1,650.00 | 16.50 | 100 มิลลิลิตร |
| MS2 | KNO3 | 1,900.00 | 19.00 | 100 มิลลิลิตร |
| MS3 | CaCl2·2H2O | 450.00 | 4.50 | 100 มิลลิลิตร |
| MS4 | MgSO4·7H2O | 370.00 | 3.70 | 100 มิลลิลิตร |
| MS5 | KH2PO4 | 170.00 | 1.70 | 100 มิลลิลิตร |
| Microelements | | | (10 เท่า) | |
| MS6 | ZnSO4·5H2O | 86.00 | 8.60 | 10 มิลลิลิตร |
| | MnSO4·4H2O | 22.30 | 2.23 | |
| | H3BO3 | 6.20 | 0.62 | |
| | KI | 0.83 | 0.083 | |
| | Na2MoO4·2H2O | 0.25 | 0.025 | |
| | cuSO4·5H2O | 0.025 | 0.0025 | |
| | Cocl2·6H2O | 0.025 | 0.0025 | |
| Microelements | | | (10 เท่า) | 10 มิลลิลิตร |
| MS7 | Na2EDTA·2H2O | 37.30 | 3.73 | |
| | FeSO4·7H2O | 27.85 | 2.785 | |
| Organic | | | (10 เท่า) | 10 มิลลิลิตร |
| nutrients | Myo-inositol | 100.00 | 10.00 | |
| MS8 | Nicotinic acid | 0.50 | 0.05 | |
| | Pyridoxine·HCl | 0.50 | 0.05 | |
| | Thiamine·HCl | 0.10 | 0.01 | |
| | Glycine | 2.00 | 0.20 | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Eugenol**

เตรียม stock ใหญ่ เพื่อนำไป dilute เป็น stock ย่อยๆ โดยใช้ eugenol 100 ppm และนำไปเจือจางที่ความเข้มข้น 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.75 ppm จากนั้นนำ Absolute Ethanol 95 % นำมาเจือจางจากความเข้มข้นมากไปถึงความเข้มข้นน้อย




**ภาคผนวกที่1** แผนภาพการเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เมื่อเตรียมสารละลายมาตรฐาน จึงนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง spectrophotometer uv-vis ก่อนใช้เครื่องทำการเปิดเครื่องเพื่อวอร์ม

เมื่อสมการ $Y = A^* X + B$ $A=0.0166$ $B= 0.0002$

แทนสมการได้ดังนี้ $Y = 0.0166x + 0.0002$ ($R^2 = 0.999$)

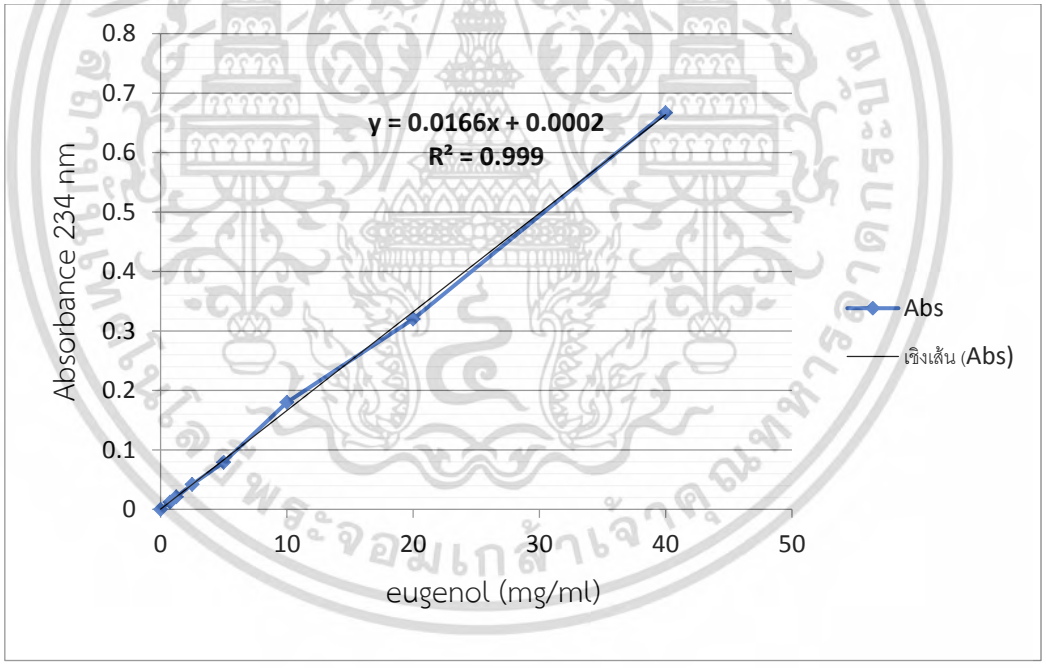
**หมายเหตุ** เมื่อค่า Y= ความเข้มข้นของสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)

ค่า X = ค่าดูดกลืนแสง (Abs)

ดังแสดงในภาพผนวกที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| eugenol (mg/ml) | Abs |
|---|---|
| 0 | 0 |
| 0.75 | 0.012 |
| 1.25 | 0.021 |
| 2.5 | 0.042 |
| 5 | 0.079 |
| 10 | 0.18 |
| 20 | 0.32 |
| 40 | 0.667 |




**ภาคผนวกที่ 2** กราฟมาตรฐานยูจีนอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**การเตรียมสารละลายมาตรฐาน cineole**

เตรียม stock เพื่อนำไป dilute โดยใช้ cineole 100 ppm และนำไปเจือจางที่ความเข้มข้น 2, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1, 0.006 และ 0 ppm จากนั้นนำ Absolute Ethanol 95 % นำมาเจือจางจากความเข้มข้นมากไปถึงความเข้มข้นน้อย

เมื่อเตรียมสารละลายมาตรฐาน จึงนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง spectrophotometer uv-vis ก่อนใช้เครื่องทำการเปิดเครื่องเพื่อวอร์ม

เมื่อสมการ $Y = A^* X + B$ $A=0.0101$ $B= 0.0011$

แทนสมการได้ดังนี้ $y = 0.0101x + 0.0011$ ($R^2 = 0.9906$)

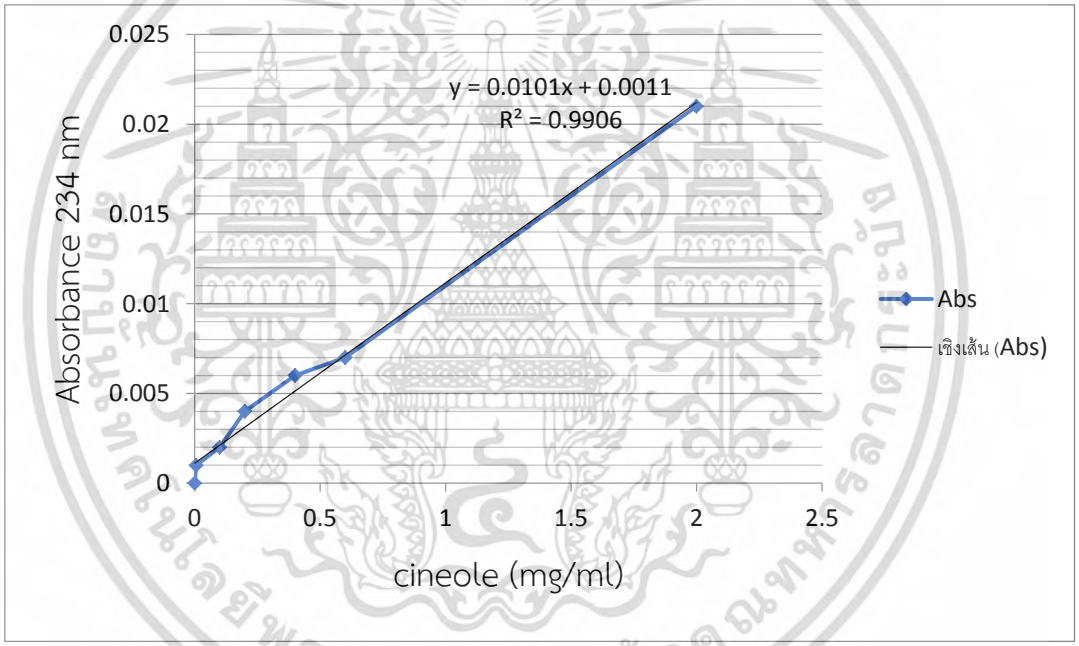
**หมายเหตุ** เมื่อค่า Y= ความเข้มข้นของสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)

ค่า X = ค่าดูดกลืนแสง (Abs)

ดังแสดงในภาพผนวกที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| cineole (mg/ml) | Abs |
|---|---|
| 0 | 0 |
| 0.006 | 0.001 |
| 0.1 | 0.002 |
| 0.2 | 0.004 |
| 0.4 | 0.006 |
| 0.6 | 0.007 |
| 2 | 0.021 |




**ภาคผนวกที่ 3** กราฟมาตราฐานซิเนออล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**การเตรียมสารละลายมาตรฐาน**

การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิกเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำโดยละลายกรดแกลลิก (Gallic acid) นำไปชั้งที่ 0.056 กรัม ละลายในเอทานอล 10 มิลลิลิตรเทลงในขวดวัด ปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสารละลายด้วยเอทานอลจนครบ 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ระดับความเข้มข้น 0.075, 0.05, 0.025 และ 0.0125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิกเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรมา 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5 และ 0.25 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดฟอลคอนขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร

**การสร้างกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก**

โดยปิเปตน้ำกลั่น 4.5 มิลลิลิตรในหลอดทดลองตามด้วยสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu Reagent 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน 5 วินาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 % w/ v ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร (Nm) โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

เมื่อสมการ $Y = A^* X + B$ $A=11.318$ $B= 0.0179$

แทนสมการได้ดังนี้ $y = 11.318x + 0.0179$ ($R^2 = 0.9973$)

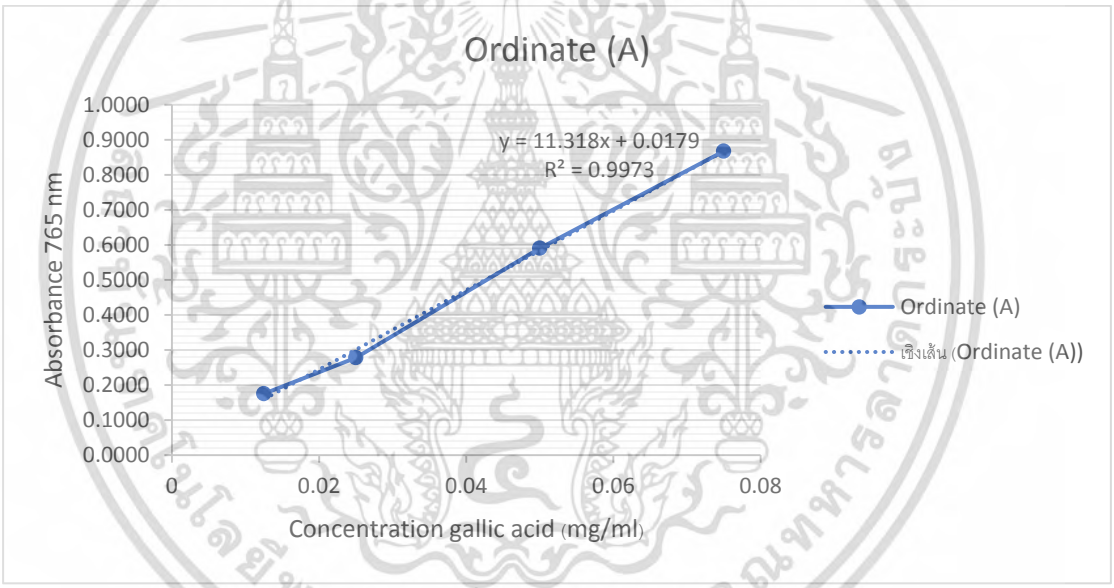
**หมายเหตุ** เมื่อค่า Y= ความเข้มข้นของสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)

ค่า X = ค่าดูดกลืนแสง (Abs)

ดังแสดงในภาพผนวกที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| gallic acid (mg/ml) | Abs |
|---|---|
| 0.0125 | 0.1750 |
| 0.025 | 0.2780 |
| 0.05 | 0.5903 |
| 0.075 | 0.8673 |




**ภาคผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐาน gallic**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**การเตรียมสารละลายมาตรฐาน**

การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ Quercetin เข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำโดยละลาย Quercetin นำไปชั้งที่ 0.0026 กรัม ละลายในเอทานอล 10 มิลลิลิตรเทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสารละลายด้วยเอทานอลจนครบ 25 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin ที่ระดับความเข้มข้น 100, 75, 50, 25, 10 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานของ Quercetin เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา5, 3.75, 2.5, 1.25, 0.5, และ 0.25 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดฟอลคอนขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอล จนครบ 10 มิลลิลิตร

**การสร้างกราฟมาตรฐาน standard flavonoids**

สร้างกราฟมาตรฐาน quercetin โดยวิธี Aluminium nitrate colorimetric method โดยปิเปต 5% $NaNO_2$ 0.1มิลลิลิตร ลงในสารละลาย quercetin ในเมทานอล 0.5 และ 0.25 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 2.25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที เติม 10% อะลูมิเนียมคลอไรด์ $Al(NO_3)_3$ 0.2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ NaOH 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร

เมื่อสมการ $Y = A^* X + B$ $A=0.0009$ $B= 0.0436$

แทนสมการได้ดังนี้ $y = 0.0009x + 0.0436$ ($R^2 = 0.9988$)

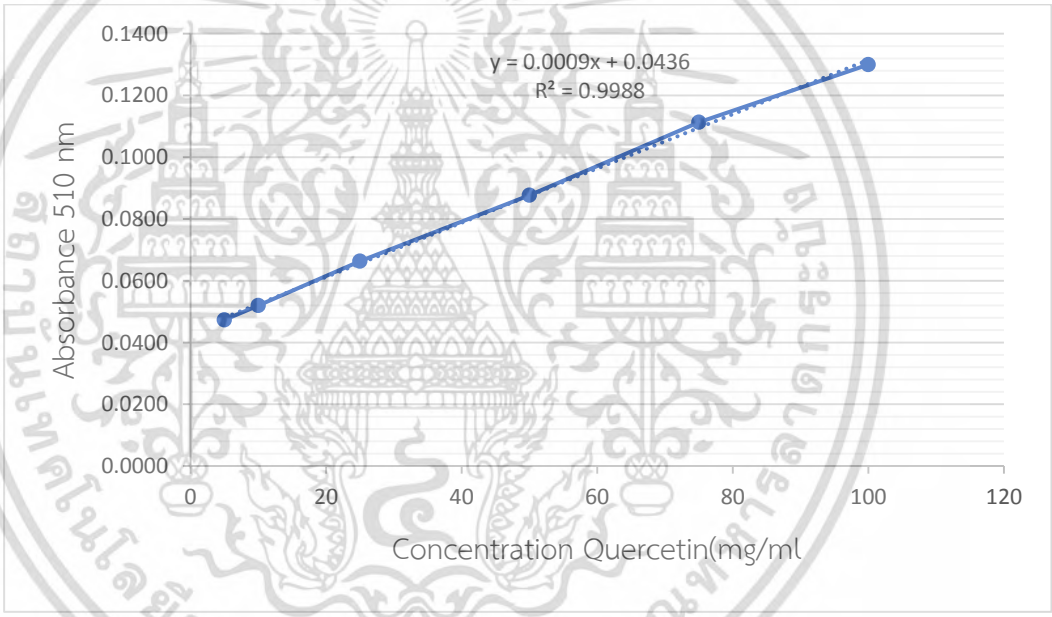
**หมายเหตุ** เมื่อค่า Y= ความเข้มข้นของสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)

ค่า X = ค่าดูดกลืนแสง (Abs)

ดังแสดงในภาพผนวกที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| Quercetin(mg/ml) | Ordinate (A) |
|---|---|
| 5 | 0.0473 |
| 10 | 0.0520 |
| 25 | 0.0663 |
| 50 | 0.0877 |
| 75 | 0.1113 |
| 100 | 0.1300 |




**ภาคผนวกที่ 5 กราฟมาตรฐาน Quercetin**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ประวัติผู้เขียน

**ชื่อ-นามสกุล** นางสาวอุษณา ปรางทอง

**วัน เดือน ปีเกิด** 24 กันยายน 2538

**ที่อยู่ปัจจุบัน** 32/53 หมู่บ้านทิพย์วารีซอย2 ถนนเลียบคลองลำมะขาม แขวงลำผักชี เขตหนองจอก กรุงเทพ 10530

**ประวัติการศึกษา** พ.ศ. 2561 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 10520

**ทุนการศึกษาที่ได้รับ** ทุนส่งเสริมการวิจัยของบัณฑิตศึกษา หน่วยงานคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

**ทุนการศึกษาที่ได้รับ** **Prangthong, U.**, Montri, N. and Saetiew, K. (2020). Callus and hairy root induction of *Melaleuca cajuputi* Powell. International Journal of Agricultural Technology 16(3): 677-684.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้