ผลของปริมาณธาตุอาหารในสูตรอาหารกึ่งแข็ง MS ต่อการเจริญเติบโตและสารต้านอนุมูลอิสระของต้นพรมมิในสภาพปลอดเชื้อ

Effect of Nutrient Concentration in MS Strength on Growth and Antioxidant Properties in *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. Growing in *In Vitro* Cultures

ศศิธร พินภิรมย์[1] นงนุช เลาหะวิสุทธิ์[1*] และอัจฉรี เรืองเดช[1]
Sasithorn Pinpirom[1], Nongnuch Laohavisuti[1*] and Uscharee Ruangdej[1]

บทคัดย่อ

พรรณไม้น้ำพรมมิ (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) เป็นพืชสมุนไพรที่สามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น อัลคาลอยด์ (alkaloid) ไกลโคไซด์ (glycoside) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และซาโปนิน (saponin) ซึ่งซาโปนินเป็นสารประกอบหลักที่พบได้ในต้นพรมมิ การศึกษาผลของอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่ปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ ¼ MS, ½ MS, MS และ 2 MS ต่อการเจริญเติบโตและสารต้านอนุมูลอิสระในชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิ เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า สูตรอาหาร ¼ MS มีการเจริญเติบโตของชิ้นเนื้อเยื่อดีที่สุด โดยมีความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อเท่ากับ 45.50 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนใบเท่ากับ 18.15 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนข้อเท่ากับ 8.73 ข้อ/ชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนรากเท่ากับ 6.53 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ และมีน้ำหนักสด-แห้งมากที่สุด ($P<0.05$) มีค่าเท่ากับ 0.1837 กรัมน้ำหนักสด/ชิ้นเนื้อเยื่อ และ 0.0358 กรัมน้ำหนักแห้ง/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ แต่จำนวนยอดของชิ้นเนื้อเยื่อไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหาร ($P>0.05$) ผลจากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระในชิ้นเนื้อเยื่อพรมมิ แสดงให้เห็นว่าในสูตรอาหาร ¼ MS ส่งผลให้มีปริมาณของ TPC, TFC และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มีค่ามากที่สุด (19.32 µg gallic/g, 43.89 mg luteolin/g และ 88.28% ตามลำดับ) ส่วนปริมาณของซาโปนินพบว่า สูตรอาหารในกลุ่มควบคุม (MS) มีปริมาณของซาโปนินสูงที่สุด เท่ากับ 24,666.81 mg saponin/g ส่วนการยับยั้งด้วยวิธี DPPH พบว่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหาร ($P>0.05$)

คำสำคัญ: พรมมิ ธาตุอาหาร สารต้านอนุมูลอิสระ สภาพปลอดเชื้อ การเจริญเติบโต

Abstract

Bacopa monnieri (L.) Wettst. is a medical plant that contains a large number of metabolites including alkaloids, glycosides, flavonoids and saponins, which are compounds that have a wide range of therapeutic properties including antioxidant activities. Saponin is the main compound found in *B. monnieri* (L.) Wettst. This study was to do with the effects of Murashige and Skoog (MS) medium that contained 4 different nutrition concentrations, namely ¼ MS, ½ MS, MS and 2 MS, on the growth and antioxidant activity of *B. monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro*. The ¼ MS treatment emerged as the most effective promoter of growth and development as explants grown on it reached the experimental maximum height of 45.50 mm per explant, the highest number of leaves at 18.5 leaves per explant, the highest number of nodes at 8.73 nodes per explant, the highest number of roots at 6.53 roots per explant and the highest values of dry and fresh weight. However, across all treatments, namely ¼ MS, ½ MS, MS and 2 MS, there were no statistically significant differences in the number of shoots ($P>0.05$) produced. The study also demonstrated that the ¼ MS treatment led to the highest concentrations of TPC, TFC and antioxidant activity by ABTS assay (19.32 mg gallic/g, 43.89 mg luteolin/g and 88.28 % respectively). Significantly, the control treatment (MS) produced the highest saponin concentration, which was 24,666.81 mg saponin/g. Finally, no significant differences with respect to DPPH assay were found among the various treatments undertaken in this research ($P>0.05$).

Keywords: *Bacopa monnieri* (L.) Wettst., nutrient, antioxidant, *in vitro*, growth

[1] คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[1] Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520
*Corresponding author, Email: nongnuch.la@kmitl.ac.th

คำนำ

พรรณไม้น้ำพรมมิ (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) (Sosa et al., 2018) พบได้ในพื้นที่เขตร้อนชื้น สามารถเติบโตในพื้นที่ชุ่มน้ำ และในแหล่งน้ำตื้น ๆ ทั่วไป (Gohil and Patel, 2010) ต้นพรมมิเป็นพืชสมุนไพรที่เป็นไม้ล้มลุกขนาดเล็กแตกกิ่งก้านจำนวนมาก ลำต้นเลื้อยไปตามพื้น มีลำต้นอวบน้ำ ใบมีขนาดเล็กเป็นรูปไข่กลับ ปลายใบกว้างมน โคนใบแคบ และมีดอกขนาดเล็กสีม่วงอ่อนหรือสีขาว ออกดอกตามซอกใบ ดอกมี 4-5 กลีบ (ชาญชัย สาดแสงจันทร์, 2556; Pushkar et al., 2015) ต้นพรมมิสามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ได้หลายกลุ่ม เช่น อัลคาลอยด์ (alkaloid) ไกลโคไซด์ (glycoside) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และซาโปนิน (saponin) (Mathew et al., 2010) โดยซาโปนินเป็นสารประกอบหลักที่พบได้มากในต้นพรมมิ ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีหน้าที่เกี่ยวกับการช่วยส่งกระแสประสาท และช่วยบำรุงสมอง ส่งเสริมความจำ การรับรู้ และช่วยรักษาอาการผิดปกติทางจิต (Devendra et al., 2018) ต้นพรมมิจึงเป็นพืชสมุนไพรที่ให้สรรพคุณทางยามากมาย ในปัจจุบันนี้พืชสมุนไพรและอาหารที่ส่งเสริมสุขภาพเป็นที่นิยมมากขึ้น สารสกัดจากต้นพรมมิจึงได้รับความนิยมอย่างสูงในเชิงพาณิชย์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชหรือการเพาะเลี้ยงแบบปลอดเชื้อเป็นการนำส่วนต่าง ๆ ของพืชภายใต้การควบคุมธาตุอาหาร และสภาพแวดล้อมในห้องทดลอง (Thorpe, 2007) ด้วยเหตุนี้พืชที่เติบโตในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นพืชที่ปลอดเชื้อและยังสามารถเพิ่มผลผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิได้อีกด้วย ชิ้นเนื้อเยื่อเพียงหนึ่งชิ้นของพืชสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตได้อีกเป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น และยังใช้พื้นที่เพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงส่งผลทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกลายมาเป็นกระบวนการที่สำคัญในอุตสาหกรรมการขยายพันธุ์พืชเพื่อการพาณิชย์ (Hassain et al., 2012)

อาหารกึ่งแข็ง Murashige and Skoog (1962) (MS) เป็นอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถนำไปใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชได้หลากหลายชนิด เนื่องจาก MS เป็นอาหารที่มีส่วนประกอบของธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง วิตามิน และกรดอะมิโนอย่างเพียงพอต่อความต้องการของพืช พืชต้องการธาตุอาหารที่จำเป็นเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต สร้างระบบสืบพันธุ์และใช้ในการทำหน้าที่ต่าง ๆ พืชที่ได้รับปริมาณธาตุอาหารอย่างเพียงพอต่อความต้องการจะทำให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ดี ซึ่งจะขึ้นอยู่กับธาตุอาหารที่เฉพาะเจาะจงและชนิดของพืชด้วย ถ้าพืชได้รับปริมาณธาตุอาหารมากหรือน้อยเกินไปจะส่งผลให้การเจริญเติบโตหรือสุขภาพของพืชแย่ลง โดยในพืชบางชนิดการลดปริมาณของธาตุอาหารลงสามารถทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดีกว่าเดิม (Thorpe, 2007; McCauley et al., 2011; Saad and Elshahed, 2012; DelCorso et al., 2014) จากการศึกษาของ Monfort et al. (2018) พบว่าการลดปริมาณธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง (½ MS) ส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตดีไม่แตกต่างกับพืชที่ให้อาหารปกติ (MS) ส่วนการที่พืชได้รับธาตุอาหารไม่เพียงพอต่อความต้องการ พืชจะแสดงอาการของการขาดธาตุอาหารออกมาให้เห็น (McCauley et al., 2011) จากการศึกษาของ Tewari et al. (2007) พบว่าพืชที่มีการขาดไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสส่งผลให้ใบแก่เร็วขึ้น ใบมีสีเขียวซีด ยอดดอกมีขนาดผอมและสั้น รวมทั้งยังไปยับยั้งการเติบโตของราก ความสูงของต้น และผลผลิตมวลแห้งลดลง หรือถ้าพืชได้รับสารอาหารมากเกินไปก็ส่งผลเสียต่อพืชได้เช่นกัน จากการศึกษาของ Monfort et al. (2018) พบว่าพืชที่ได้รับธาตุอาหารมากเกินไปส่งผลทำให้มีการเจริญเติบโตลดลงไม่แตกต่างกับพืชที่ได้รับธาตุอาหารไม่เพียงพอ และเป็นอันตรายต่อรากด้วย

สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นมาสะสมเอาไว้ภายในเซลล์ เพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่มารบกวนทั้งจากสิ่งมีชีวิต (เชื้อโรค หรือแมลง) สภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม น้ำ กัมมันตภาพรังสี โลหะหนัก และธาตุอาหาร รวมทั้งความเครียดต่าง ๆ ซึ่งเป็นกลไกของพืชเพื่อใช้ในการต่อต้านกับเชื้อโรคและความเครียดที่เกิดขึ้น การที่พืชได้รับการกระตุ้นจากสิ่งเร้าเหล่านี้ส่งผลให้พืชมีการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิเพิ่มมากขึ้น (Rao and Ravishankar, 2002; Murthy et al., 2014) เมแทบอไลต์ทุติยภูมิสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มหลัก ๆ ได้แก่ เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) สารประกอบฟีนอลิก (phenolics compounds) อัลคาลอยด์ (alkaloids) และ กลุ่มสารประกอบกำมะถัน (sulphur-containing compounds) (Guerriero et al., 2018)

ดังนั้นการศึกษาผลของปริมาณธาตุอาหารที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโต และสารต้านอนุมูลอิสระของต้นพรมมิที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ จึงเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มผลผลิต และเพิ่มปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในต้นพรมมิให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด และยังสามารถนำไปสกัดเป็นยาเพื่อใช้ในทางการแพทย์ได้อีกด้วย

วิธีการศึกษา

พรรณไม้น้ำที่ใช้ในการทดลอง

พรรณไม้น้ำพรมมิที่ได้มาจากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD) มีความเข้มข้นของปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ ¼ MS, ½ MS, MS (ชุดควบคุม) และ 2 MS ชุดทดลองละ 20 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ต้น

ขั้นตอนการทดลอง

เตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ (Table 1) ทำการปรับ pH ให้ได้ 5.62 โดยใช้ HCl 1 N และ KOH 1 N หลังจากนั้นเติมเจลไรต์ (gelrite) 1.6 กรัม ต้มจนเจลไรต์ละลายแล้วจึงบรรจุใส่ลงขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 6 ออนซ์ จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้ออาหารด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เตรียมชิ้นเนื้อเยื่อที่ใช้ในการศึกษาโดยการนำชิ้นเนื้อเยื่อของต้นพรมมิมาตัดเป็นชิ้นเนื้อเยื่อขนาด 1 เซนติเมตร ย้ายชิ้นเนื้อเยื่อดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกัน จากนั้นนำไปเลี้ยงไว้บนชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยมีการให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

Table 1 Nutrients in MS solution.

Ingredients (mg/L)		MS concentration			
		¼ MS	½ MS	MS (Control)	2 MS
1. Macroelements	NH_4NO_3	412.5	825	1,650	3,300
	KNO_3	475	950	1,900	3,800
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	110	220	440	880
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	92.5	185	370	740
	KH_2PO_4	42.5	85	170	340
2. Microelements	H_3BO_3	1.55	3.10	6.2	12.4
	$MnSO_4 \cdot H_2O$	5.575	11.15	22.3	44.6
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.15	4.3	8.6	17.2
	KI	0.2075	0.415	0.83	1.66
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.0625	0.125	0.25	0.5
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0063	0.0125	0.025	0.05
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.0063	0.0125	0.025	0.05
3. Irons	Na_2EDTA	9.3125	18.625	37.25	74.5
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	6.9625	13.925	27.85	55.7
4. Vitamins	Glycine	0.5	1	2	4
	Nicotinic acid	0.125	0.25	0.5	1
	Pyridoxine	0.125	0.25	0.5	1
	Thiamine	0.025	0.05	0.1	0.2
	Inositol	25	50	100	200
5. Sucrose		7,500	15,000	30,000	60,000

การเก็บข้อมูล

การเก็บผลการเจริญเติบโตของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิ จะทำการบันทึกข้อมูลผลการเจริญเติบโตของความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิด้วยการวัดความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ (vernier caliper) ทำการวัดจากส่วนของชิ้นเนื้อเยื่อที่โผล่พ้นจากอาหารกึ่งแข็ง MS ไปจนถึงยอดที่สูงที่สุดของชิ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นบันทึกจำนวนใบ จำนวนข้อ จำนวนราก และจำนวน

กิ่งที่เพิ่มขึ้น โดยบันทึกข้อมูลทั้งก่อนการทดลองและระหว่างการทดลองทุก ๆ สัปดาห์เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นนำแต่ละชุดการทดลองมาชั่งปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

การศึกษาการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิ เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะนำเอาชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นละเอียด จากนั้นนำตัวอย่างแห้งปริมาณ 0.20 กรัม มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมาใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) กรองสารสกัดที่ได้โดยเอาส่วนที่เป็นสารละลายแยกเก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำเอาสารสกัดที่ได้ไปใช้ในการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ปริมาณฟีนอลทั้งหมด (total phenolic compounds, TPC) ด้วยวิธีโฟลินซิโอแคลตู (Folin-ciocalteu reagent) (ดัดแปลงจาก Lim and Mutijaya, 2007) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoid content, TFC) (ดัดแปลงจาก Shirazi et al., 2014) และปริมาณซาโปนินรวม (total saponin content, TSC) (ดัดแปลงจาก Vador et al., 2012) รวมทั้งนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปฏิกิริยาในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ดัดแปลงจาก Lim and Mutijaya (2007) และการวิเคราะห์ 2, 2'-azinobis-[3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonic acid] (ABTS) radical scavenging assay ดัดแปลงจาก Nilsson et al. (2005)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลผลการเจริญเติบโตและสารต้านอนุมูลอิสระของต้นพรมมิที่ปลูกในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกันมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองตามวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (correlation) ตามวิธีของ Pearson correlation (two-tailed) test ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลของปริมาณธาตุอาหารที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อต้นพรมมิในสภาพปลอดเชื้อ

ผลของปริมาณธาตุอาหารต่อความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิพบว่า ความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อเริ่มมีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหารตั้งแต่ในสัปดาห์ที่ 1 โดยในสูตรอาหาร ¼ MS และ 2 MS มีความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อมากที่สุด ($P<0.05$) มีค่าเท่ากับ 10.42 และ 10.43 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 2 จนถึงสัปดาห์ที่ 5 พบว่า ความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร ¼ และ ½ MS มีความสูงมากกว่าอาหารสูตรอื่น ($P<0.05$) ซึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง 17.7-37.74 และ 17.88-35.73 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ และในสัปดาห์ที่ 6 พบว่า สูตรอาหาร ¼ MS, ½ MS, MS และ 2 MS มีความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อเท่ากับ 45.50, 41.03, 33.98 และ 30.74 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ โดยค่าที่สูงที่สุด ($P<0.05$) อยู่ในสูตรอาหาร ¼ MS และน้อยที่สุดในสูตรอาหาร MS และ 2 MS (Table 2)

Table 2 Explant height (mm) of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures with different MS strengths.

Treatments	Experiment period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
¼ MS	10.00 ± 0.00	10.42 ± 0.15^{a}	17.17 ± 0.56^{a}	22.25 ± 1.02^{ab}	29.19 ± 1.41^{a}	37.74 ± 2.04^{a}	45.50 ± 2.51^{a}
½ MS	10.00 ± 0.00	9.92 ± 0.09^{b}	17.88 ± 0.37^{a}	22.99 ± 0.51^{a}	29.51 ± 0.63^{a}	35.73 ± 0.73^{a}	41.03 ± 0.77^{b}
MS	10.00 ± 0.00	9.96 ± 0.13^{b}	15.59 ± 0.48^{b}	19.85 ± 0.73^{c}	24.77 ± 0.76^{b}	29.80 ± 0.74^{b}	33.98 ± 1.14^{c}
2 MS	10.00 ± 0.00	10.43 ± 0.14^{a}	16.47 ± 0.52^{ab}	20.37 ± 0.81^{bc}	23.75 ± 0.84^{b}	26.82 ± 1.07^{b}	30.74 ± 1.27^{c}
P-value	ns	0.005	0.010	0.018	<0.001	<0.001	<0.001

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at $P<0.05$, ns is for non-significant.

ผลของปริมาณธาตุอาหารต่อจำนวนใบของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิพบว่า ในสัปดาห์ที่ 0-2 จำนวนใบของชิ้นเนื้อเยื่อไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหาร ($P>0.05$) ในสัปดาห์ที่ 3-6 พบว่าจำนวนใบของชิ้นเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร ¼ MS มีจำนวนใบมากที่สุด และในสัปดาห์ที่ 6 จำนวนใบของชิ้นเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่ ¼ MS, ½ MS, MS และ 2 MS มีค่าเท่ากับ 18.15, 12.50, 13.53 และ 13.40 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (Table 3)

ผลของปริมาณธาตุอาหารต่อจำนวนข้อของเนื้อเยื่อต้นพรมมิพบว่า เริ่มมีความแตกต่างกันในสัปดาห์ที่ 3 โดยในสูตรอาหาร ½ MS มีจำนวนข้อมากที่สุด (P>0.05) มีค่าเท่ากับ 3.28 ข้อ/ชิ้นเนื้อเยื่อ และในสัปดาห์ที่ 4-6 พบว่า จำนวนข้อของชิ้นเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร ¼ MS มีจำนวนข้อมากที่สุด (P>0.05) โดยในสัปดาห์ที่ 6 จำนวนข้อของชิ้นเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่ ¼ MS, ½ MS, MS และ 2 MS มีค่าเท่ากับ 8.73, 6.10, 6.68 และ 6.25 ข้อ/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (Table 4)

ผลของปริมาณธาตุอาหารต่อจำนวนรากของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิ จำนวนรากเริ่มมีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหารในสัปดาห์ที่ 1 โดยพบว่าจำนวนรากของชิ้นเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร 2 MS มีจำนวนรากมากที่สุด (P<0.05) มีค่าเท่ากับ 0.98 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ ต่อมาในสัปดาห์ที่ 2 พบว่า จำนวนรากในสูตรอาหาร ¼ MS มีจำนวนรากมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 2.48 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ ต่อเนื่องไปจนสิ้นสุดการทดลอง โดยในสัปดาห์ที่ 6 จำนวนรากของชิ้นเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่ ¼ MS, ½ MS, MS และ 2 MS มีค่าเท่ากับ 6.53, 4.58, 4.53 และ 3.70 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (Table 5)

Table 3 Explant leaf number (number/explant) of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures with different MS strengths.

Treatments	Experiment period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
1/4 MS	0.00 ± 0.00	2.83 ± 0.20	5.60 ± 0.29	7.90 ± 0.35^{a}	11.00 ± 0.56^{a}	14.80 ± 0.80^{a}	18.15 ± 0.90^{a}
1/2 MS	0.00 ± 0.00	2.65 ± 0.20	5.20 ± 0.29	6.70 ± 0.30^{b}	8.20 ± 0.36^{b}	10.50 ± 0.45^{b}	12.50 ± 0.53^{b}
MS	0.00 ± 0.00	2.35 ± 0.19	4.65 ± 0.22	6.23 ± 0.20^{b}	8.83 ± 0.37^{b}	11.33 ± 0.50^{b}	13.53 ± 0.59^{b}
2 MS	0.00 ± 0.00	2.90 ± 0.22	5.10 ± 0.27	6.83 ± 0.33^{b}	8.65 ± 0.44^{b}	11.25 ± 0.59^{b}	13.40 ± 0.63^{b}
P-value	ns	0.231	0.106	0.002	<0.001	<0.001	<0.001

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

Table 4 Explant node number (number/explant) of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures with different MS strengths.

Treatments	Experiment period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
1/4 MS	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.13 ± 0.06	2.88 ± 0.14^{b}	4.33 ± 0.14^{a}	6.85 ± 0.37^{a}	8.73 ± 0.39^{a}
1/2 MS	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.15 ± 0.05	3.28 ± 0.12^{a}	3.75 ± 0.09^{bc}	4.78 ± 0.24^{b}	6.10 ± 0.46^{b}
MS	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.05 ± 0.03	2.15 ± 0.11^{c}	3.95 ± 0.08^{b}	5.55 ± 0.23^{b}	6.68 ± 0.25^{b}
2 MS	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.05 ± 0.03	2.10 ± 0.07^{c}	3.48 ± 0.12^{c}	4.88 ± 0.25^{b}	6.25 ± 0.28^{b}
P-value	ns	ns	0.319	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

Table 5 Explant root number (number/explant) of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures with different MS strengths.

Treatments	Experiment period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
1/4 MS	0.00 ± 0.00	0.45 ± 0.09^{b}	2.48 ± 0.27^{a}	3.55 ± 0.31^{a}	4.68 ± 0.35^{a}	5.78 ± 0.47^{a}	6.53 ± 0.46^{a}
1/2 MS	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.13^{b}	1.95 ± 0.17^{ab}	2.85 ± 0.18^{b}	3.43 ± 0.21^{b}	4.13 ± 0.18^{b}	4.58 ± 0.19^{b}
MS	0.00 ± 0.00	0.45 ± 0.10^{b}	1.33 ± 0.18^{b}	2.65 ± 0.14^{b}	3.28 ± 0.21^{b}	4.08 ± 0.28^{b}	4.53 ± 0.41^{b}
2 MS	0.00 ± 0.00	0.98 ± 0.12^{a}	1.73 ± 0.22^{b}	2.45 ± 0.15^{b}	2.75 ± 0.13^{b}	3.25 ± 0.16^{b}	3.70 ± 0.16^{b}
P-value	ns	0.003	0.003	0.002	<0.001	<0.001	<0.001

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

ผลของปริมาณธาตุอาหารต่อจำนวนยอดของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิพบว่า มีความแตกต่างกันในสัปดาห์ที่ 3 และ 5 สูตรอาหาร ¼ MS มีจำนวนยอดของชิ้นเนื้อเยื่อมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 1.38 และ 1.53 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ แต่ในสัปดาห์ที่ 0-2, 4 และ 6 ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหาร (P>0.05) โดยในสัปดาห์ที่ 6 ในแต่ละสูตรอาหาร ¼ MS, ½ MS, MS และ 2 MS มีจำนวนยอดเท่ากับ 1.58, 1.35, 1.53 และ 1.58 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (Table 6)

Table 6 Explant shoot number (number/explant) of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures with different MS strengths.

Treatments	Experiment period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
1/4 MS	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.33 ± 0.08	1.38 ± 0.08^{a}	1.38 ± 0.08	1.53 ± 0.10^{a}	1.58 ± 0.10
1/2 MS	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.15 ± 0.05	1.15 ± 0.05^{b}	1.18 ± 0.07	1.25 ± 0.08^{b}	1.35 ± 0.12
MS	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.15 ± 0.05	1.15 ± 0.05^{b}	1.15 ± 0.05	1.28 ± 0.09^{ab}	1.53 ± 0.11
2 MS	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.25 ± 0.08	1.33 ± 0.08^{ab}	1.35 ± 0.08	1.50 ± 0.08^{ab}	1.58 ± 0.09
P-value	ns	ns	ns	0.040	0.053	0.050	0.363

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

ผลของปริมาณธาตุอาหารต่อปริมาณน้ำหนักสด-แห้งของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิ ตอนเริ่มต้นการทดลองและเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า น้ำหนักสด-แห้งแรกเริ่มของทุกสูตรอาหารไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า น้ำหนักสดในสูตรอาหาร ¼ MS และ ½ MS มีน้ำหนักสดมากที่สุด (P<0.05) มีค่าเท่ากับ 0.1837 และ 0.1904 กรัมน้ำหนักสด/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ และน้ำหนักแห้งในสูตรอาหาร ¼ MS มีน้ำหนักแห้งมากที่สุด (P<0.05) มีค่าเท่ากับ 0.0358 กรัมน้ำหนักแห้ง/ชิ้นเนื้อเยื่อ (Table 7)

Table 7 Explant weight (g) of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures with different MS strengths.

Treatments	Initial weight		Final weight	
	Fresh weight	Dry weight	Fresh weight	Dry weight
1/4 MS	0.0123 ± 0.0002	0.0014 ± 0.0000	0.1837 ± 0.0038^{a}	0.0358 ± 0.0014^{a}
1/2 MS	0.0123 ± 0.0002	0.0014 ± 0.0000	0.1904 ± 0.003^{a}	0.0284 ± 0.0004^{b}
MS	0.0123 ± 0.0002	0.0014 ± 0.0000	0.1658 ± 0.0026^{b}	0.0273 ± 0.0004^{b}
2 MS	0.0123 ± 0.0002	0.0014 ± 0.0000	0.0761 ± 0.0022^{c}	0.0224 ± 0.0006^{c}
P-value	ns	ns	<0.001	<0.001

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

จากการศึกษาผลการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อต้นพรมมิในสภาพปลอดเชื้อเมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 6 พบว่า สูตรอาหาร MS ไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อต้นพรมมิ เมื่อเทียบกับสูตรอาหารที่ลดปริมาณธาตุอาหารลง ¼ เท่า (¼ MS) ส่งผลทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตดีที่สุด (P<0.05) โดยผลของความสูง มีค่าเท่ากับ 45.50 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนใบเท่ากับ 18.15 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนข้อเท่ากับ 8.73 ข้อ/ชิ้นเนื้อเยื่อ และจำนวนรากเท่ากับ 6.53 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ แต่จำนวนยอดของชิ้นเนื้อเยื่อไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหาร (P>0.05) (Table 8) และมีน้ำหนักสด-แห้งของเนื้อเยื่อต้นพรมมิดีที่สุด (P>0.05) จากการศึกษาของ Monfort et al. (2018) ซึ่งศึกษาผลของปริมาณธาตุอาหารที่ต่างกันในอาหารกึ่งแข็ง MS ต่อผลผลิตขององค์ประกอบสารสำคัญ (volatile fraction composition) ที่พบในต้นโหระพา (*Ocimum basilicum* L.) เมื่อเพาะเลี้ยงต้นโหระพาในอาหารกึ่งแข็ง MS ที่มีปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกัน ได้แก่ ¼ MS, ½ MS, MS และ 2 MS พบว่าต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS และ ½ MS มีการเจริญเติบโตดีที่สุด และจากการศึกษาของ Assis et al. (2012) ที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นมะม่วงหิมพานต์ (*Anacardium othonianum* Rizz) ในอาหารกึ่งแข็ง MS ที่มีปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกัน ได้แก่ ¼ MS, ½ MS และ MS พบว่า เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร ¼ และ ½ MS มีความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อ และความยาวใบดีกว่าในสูตรอาหาร MS และการศึกษาของ Baque et al. (2010) ที่ศึกษาผลของปริมาณ

ธาตุอาหารในอาหารกึ่งแข็ง MS ในต้นยอ (*Morinda citrifolia* L.) พบว่าสูตรอาหาร ¼ MS มีอัตราการเจริญเติบโตของชิ้นเนื้อเยื่อ ราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของรากดีกว่าในสูตรอาหารที่มีปริมาณธาตุอาหารสูง 1.5 และ 2.0 เท่า (1.5 MS และ 2.0 MS ตามลำดับ) จากการศึกษาของ Saad and Elshahed (2012) กล่าวว่า เมื่อมีการลดปริมาณธาตุอาหารลงแต่กลับส่งผลทำให้การเจริญเติบโตของชิ้นเนื้อเยื่อดีขึ้น เนื่องจากอาหารกึ่งแข็ง MS เป็นอาหารที่มีส่วนประกอบของธาตุอาหารหลักธาตุอาหารรองอยู่ค่อนข้างสูง รวมทั้งมีปริมาณของวิตามินและกรดอะมิโนอย่างเพียงพอต่อความต้องการของพืช (การที่พืชได้รับธาตุอาหารอย่างเพียงพอเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโต โครงสร้างของพืช การพัฒนาออร์แกนต่าง ๆ (organs) การสร้างระบบสืบพันธุ์ และการสะสมของสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ ซึ่งความต้องการธาตุอาหารของพืชก็จะแตกต่างกันตามแต่ชนิดของพืช (Sivakumar et al., 2005; DelCorso et al., 2014; Monfort et al., 2018)

Table 8 Explant growth of six- week -old *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures with different MS strengths.

Treatments	Height (mm/explant)	Leaf number (numbers/explant)	Node number (numbers/explant)	Root number (numbers/explant)	Shoot number (numbers/explant)
1/4 MS	45.50 ± 2.51[a]	18.15 ± 0.90[a]	8.73 ± 0.39[a]	6.53 ± 0.46[a]	1.58 ± 0.10
1/2 MS	41.03 ± 0.77[b]	12.50 ± 0.53[b]	6.10 ± 0.46[b]	4.58 ± 0.19[b]	1.35 ± 0.12
MS	33.98 ± 1.14[c]	13.53 ± 0.59[b]	6.68 ± 0.25[b]	4.53 ± 0.41[b]	1.53 ± 0.11
2 MS	30.74 ± 1.27[c]	13.40 ± 0.63[b]	6.25 ± 0.28[b]	3.70 ± 0.16[b]	1.58 ± 0.09
P-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.363

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05.

ผลของปริมาณธาตุอาหารที่แตกต่างกันต่อความสามารถในการยับยั้งและต้านสารอนุมูลอิสระของเนื้อเยื่อต้นพรมมิในสภาพปลอดเชื้อ

ความสามารถในการยับยั้งและต้านสารต้านอนุมูลอิสระของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (Table 9) พบว่า ปริมาณ TPC ในแต่ละสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ (P<0.05) โดยสูตรอาหารที่มีปริมาณ TPC มากที่สุด คือ สูตรอาหาร ¼ MS มีค่าเท่ากับ 19.32 µg gallic/g ปริมาณ TFC พบว่าในแต่ละสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ (P<0.05) โดยสูตรอาหารที่มีปริมาณ TFC มากที่สุด คือ สูตรอาหาร ¼ MS มีค่าเท่ากับ 43.89 mg luteolin/g และพบว่าปริมาณ saponin ในแต่ละสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ (P<0.05) โดยสูตรอาหารที่มีปริมาณ saponin มากที่สุด คือ สูตรอาหาร MS มีค่าเท่ากับ 24,666.81 mg saponin/g

ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างสูตรอาหาร โดยในสูตรอาหาร ¼ MS, สูตร ½ MS, สูตร MS และสูตร 2 MS มีค่าเท่ากับ 88.93, 88.51, 88.62 และ 89.12% ตามลำดับ การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่า ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระในแต่ละสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยสูตรอาหารที่มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระมากที่สุด คือ สูตรอาหาร ¼ MS มีค่าเท่ากับ 88.28% (Table 9)

การวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (correlation analysis) ของสารต้านอนุมูลอิสระในชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิ

ผลจากการวิเคราะห์ค่า correlation พบว่าปริมาณของ TFC มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกกับปริมาณของ TPC ส่วนปริมาณของ TPC มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกกับความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของ ABTS และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของ ABTS มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกกับปริมาณของ TFC และ TPC (Table 10)

ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการยับยั้งและต้านสารอนุมูลอิสระในชิ้นเนื้อเยื่อพรมมิ ในสูตรอาหาร ¼ MS ส่งผลให้มีปริมาณของ TPC, TFC และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มีค่ามากที่สุด ส่วนปริมาณของซาโปนินพบว่า สูตรอาหารในกลุ่มควบคุม (MS) มีปริมาณของซาโปนินสูงที่สุด จากการศึกษาของ Monfort et al. (2018) ที่ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ และอาหารกึ่งแข็ง MS ต่อผลผลิตขององค์ประกอบ volatile fraction ที่พบในต้นโหระพา เมื่อเพาะเลี้ยงต้นโหระพาในอาหารกึ่งแข็ง MS ที่มีปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกัน ได้แก่ ¼ MS, ½ MS, MS และ 2 MS พบว่า ในสูตรอาหาร MS ที่มีการลดปริมาณธาตุอาหารลง ¼ เท่า, ½ เท่า และ MS มีผลผลิตขององค์ประกอบอยู่ 21-23 ชนิด แต่ต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เพิ่มปริมาณธาตุอาหารเป็น 2 เท่า (2 MS) มีผลผลิตของ

องค์ประกอบอยู่เพียง 15 ชนิด ซึ่งแตกต่างกับสูตรอาหารอื่น ๆ จากการศึกษาของ Wu et al. (2006) ที่ศึกษาสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงต้นเอ็กไคนาเซีย (*Echinacea angustifolia* DC.) ให้เหมาะสมเพื่อเพิ่มผลผลิตทางมวลชีวภาพและปริมาณฟีนอลิกในราก พบว่า สูตรอาหาร ¼ MS และ ½ MS มีปริมาณผลผลิตของฟีนอลและฟลอโวนอยด์สูงกว่าในสูตรอาหารที่มีปริมาณมากกว่า และจากการศึกษาของ Baque et al. (2010) พบว่า ปริมาณของสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิในต้นยอที่ปลูกในสูตรอาหาร ¼ MS และ 2 MS มีปริมาณสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสูตรอาหารอื่น Monfort et al. (2018) กล่าวว่าปริมาณของธาตุอาหารที่พืชได้รับเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อปริมาณสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ เช่น ปริมาณของฟอสฟอรัส (phosphorus) ไนเตรต (nitrate) และคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เป็นต้น นอกจากนั้นแล้วปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างพืชกับสภาวะแวดล้อมในการเพาะปลูกเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ จากการศึกษาในข้างต้นชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณธาตุอาหารมากเกินไปไม่ได้ส่งผลดีต่อพืชเสมอไป และพืชแต่ละชนิดมีความต้องการธาตุอาหารในปริมาณที่แตกต่างกัน (Sivakumar et al., 2005)

Table 9 Antioxidant activities of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures with different MS strengths after 6 weeks.

Treatments	Total phenolic content (TPC) (µg gallic/g)	Total flavonoid content (TFC) (mg luteolin/g)	Total saponin content (TSC) (mg saponin/g)	DPPH (% inhibition)	ABTS (%inhibition)
1/4 MS	19.32 ± 0.32^{a}	43.89 ± 0.53^{a}	6,859.12 ± 459.85^{b}	88.93 ± 0.77	88.28 ± 2.21^{a}
1/2 MS	8.52 ± 0.04^{c}	18.45 ± 0.09^{b}	5,702.26 ± 88.99^{b}	88.51 ± 0.17	60.89 ± 1.53^{c}
MS	11.08 ± 0.29^{b}	20.55 ± 2.33^{b}	24,666.81 ± 720.99^{a}	88.62 ± 0.20	74.81 ± 5.98^{b}
2 MS	10.98 ± 0.23^{b}	20.98 ± 0.73^{b}	6,117.55 ± 231.68^{b}	89.12 ± 0.04	69.40 ± 3.96^{bc}
P-value	<0.001	<0.001	<0.001	0.712	0.006

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05.

Table 10 Correlation between different antioxidant parameters of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures after 6 weeks.

Parameter	TPC	TFC	Saponin	DPPH	ABTS
TPC	1				
TFC	0.974**	1			
Saponin	-0.145	-0.240	1		
DPPH	0.138	0.186	-0.111	1	
ABTS	0.870**	0.811**	0.133	0.132	1

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed) (Pearson correlation).

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาผลของปริมาณธาตุอาหารต่อการเจริญเติบโตและสารต้านอนุมูลอิสระของเนื้อเยื่อต้นพรมมิในสภาพปลอดเชื้อเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า สูตรอาหารที่มีการลดปริมาณธาตุอาหารลง ¼ เท่า ของสูตรอาหาร MS เป็นสูตรอาหารที่ทำให้การเจริญเติบโต ปริมาณของ TPC, TFC และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิดีที่สุด แต่ไม่พบว่าปริมาณธาตุอาหารที่แตกต่างกันส่งผลต่อจำนวนยอดของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิ ในขณะที่ปริมาณของซาโปนินในชิ้นเนื้อเยื่อซึ่งเป็นสารประกอบหลักในต้นพรมมิในสูตรอาหารในกลุ่มควบคุม (MS) พบว่ามีปริมาณของซาโปนินสูงที่สุด

เอกสารอ้างอิง

ชาญชัย สาดแสงจันทร์. 2556. พรมมิสมุนไพรเพื่อสุขภาพสมอง. *ธรรมศาสตร์เวชสาร* 13(4): 554-560.

Assis, K. C. D., Pereira, F. D., Cabral, J. S. R., Silva, F. G., Silva, J. W., and Santos, S. C. D. 2012. *In vitro* cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: effects of salt concentration and culture medium volume. *Acta Scientiarum Agronomy* 34: 77-83.

Baque, M. A., Lee, E. J., and Paek, K. Y. 2010. Medium salt strength induced changes in growth, physiology and secondary metabolite content in adventitious roots of *Morinda citrifolia*: the role of antioxidant enzymes and phenylalanine ammonia lyase. *Plant Cell Reports* 29: 685-694.

DalCorso G., Manara, A., Piasentin, S., and Furini, A. 2014. Nutrient metal elements in plants. *Metallomics* 10(6): 1770-1788.

Devendra, P. Shankar, S. Preeti, B., Santanu, B., Gajanan, D., and Rupesh, D. 2018. *Brahmi (Bacopa monnieri*) as functional food ingredient in food processing industry. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 7(3): 189-194.

Gohil, K. J., and Patel, J. A. 2010. A review on *Bacopa monniera*: Current research and future prospects. *International Journal of Green Pharmacy* 4(1): 1-9.

Guerriero, G., Berni, R., Sanchez, J. A. M., Apone, F., Salam, E. M. A., Qahtan, A. A., Alatar, A. A., Cantini, C., Cai, G., Hausmanet, J. F., et al. 2018. Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. *Genes* 9 (6): 1-22.

Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., and Ullah, I. 2012. Plant tissue culture: Current status and opportunities. In *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, A. Leva, and L. Rinaldi, eds. pp. 1-28. ISBN: 978-953-51-0787-3, DOI: 10.5772/52760.

Lim, Y. Y., and Murtijaya, Y. 2007. Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. LWT - *Food Science and Technology* 40: 1664-1669.

Mathew, J., Paul, J., Nandhu, M. S., and Paulose, C. S. 2010. *Bacopa monnieri* and Bacoside-A for ameliorating epilepsy associated behavioral deficits. *Fitoterapia* 81: 315-322.

McCauley, A., Jones, C., and Jacobsen, J. 2011. Plant nutrient functions and deficiency and toxicity symptoms. *Nutrient Management Module* 9: 1-16.

Monfort, L. E. F., Bertolucci, S. K. V., Lima, A. F., Carvalho, A. A., Mohammed, A., Blank, A. F., and Pinto, J. E. B. P. 2018. Effects of plant growth regulators, different culture media and strength MS on production of volatile fraction composition in shoot cultures of *Ocimum basilicum*. *Industrial Crops and Products* 116: 231-239.

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

Murthy, H. N., Lee, E. J., and Paek, K. Y. 2014. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 118: 1–16.

Nilsson, J., Pillai, D., Onning, G., Persson, C., Nilsson, A., and Akesson, B. 2005. Comparison of the 2,29-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Molecular Nutrition & Food Research* 49: 239-246.

Pushkar, G., Pushkar, B., and Sivabalan, R. 2015. A review on major bioactivities of *Bacopa monnieri*. *Annals of Applied Bio-Sciences* 2(2): 1-11.

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

Saad, A. I. M., and Elshahed, A. M. 2012. Plant tissue culture media. In *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, A. Leva, and L. Rinaldi, eds. pp. 29-40. ISBN: 978-953-51-0787-3, DOI: 10.5772/52760.

Shirazi, O. U., Khattak, M. M. A. K., Shukri, N. A. M., and Anuar, M. N. N. 2014. Determination of total Phenolic, flavonoid content and free radical scavenging activities of common herbs and spices. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 3(3): 104-108.

Sivakumar, G., Yu, K. W., and Paek, K. Y. 2005. Production of biomass and ginsenisides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures. *Engineering in Life Sciences* 5(4): 333-342.

Sosa, M. D. L. M., Moroni, P., and Leary, N. O. A. 2018. Taxonomic revision of the genus *Bacopa* (Gratioleae, Plantaginaceae) in Argentina. *Phytotaxa* 336(1): 1-27.

Tewari, R. K., Kumar, P., and Sharma, P. N. 2007. Oxidative stress and antioxidant responses in young leaves of mulberry plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium deficiency. *Journal of Integrative Plant Biology* 49(3): 313-322.

Thorpe, T. A. 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37: 169-180.

Vador, N., Vador, B., and Hole, R. 2012. Simple spectrophotometric methods for standardizing Ayurvedic formulation. *Indian Journal of Phamaceutical Sciences* 74(2): 161-163.

Wu, C. H., Dewir, Y. H., Hahn, E. J., and Paek, K. Y. 2006. Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. *Journal of Plant Biology* 49(3): 193-199.

วันรับบทความ (Received date) : 15 พ.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 2 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63