ประสิทธิผลของไทเดียซูรอน (TDZ) ต่อการเจริญเติบโตและสารสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพรมมิ

Effectiveness of Thidiazuron (TDZ) on Growth and Phytochemicals in *In vitro Bacopa monnieri* (L.) Wettst.

ปิยธิดา อุณหคงคา[1] นงนุช เลาหะวิสุทธิ์[1*] และบุปผา จงพัฒน์[1]
Piyatida Ounnahakhongkha[1], Nongnuch Laohavisuti[1*] and Buppha Jongput[1]

บทคัดย่อ

ผลการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำพรมมิ (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.4, 1.6 และ 6.4 mg/L ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระด้วยการเติมไทเดียซูรอน (Thidiazuron, TDZ) ในอาหารกึ่งแข็ง (MS) พบว่า เมื่อครบ 6 สัปดาห์ ต้นพรมมิที่ไม่เติม TDZ ในอาหาร MS มีการเจริญเติบโตมากกว่าชุดการทดลองที่เติม TDZ ($P<0.05$) ส่วนต้นพรมมิที่เติม TDZ 0.1 และ 0.4 mg/L ในอาหาร MS มีเส้นผ่านศูนย์กลางยอดกระจุก (multiple shoots) มากกว่าชุดการทดลองอื่น ($P<0.05$) และต้นพรมมิที่เติม TDZ 0.4 mg/L มีน้ำหนักสดและแห้งมากที่สุดซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองอื่น ($P<0.05$) ส่วนการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ฟีนอลิกรวม ซาโปนินรวม DPPH และ ABTS มีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง ($P<0.05$) แต่ฟลาโวนอยด์รวม ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง ($P>0.05$) ดังนั้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพรมมิเพื่อนำไปเป็นต้นพันธุ์ โดยใช้อาหาร MS ที่ไม่เติม TDZ มีความเหมาะสมที่สุด และการเติม TDZ 0.4 mg/L ลงในอาหารเหมาะสำหรับการผลิตและสร้างสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดต่อการนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

คำสำคัญ: พรมมิ ไทเดียซูรอน เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ยอดกระจุก สารต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Brahmi (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) is an aquatic plant. The aim of this research was to study the effects of Thidiazuron (TDZ) on the growth and antioxidant activities of *B. monnieri* (L.) Wettst. tissue culture. The explants were cultured on semi-solid MS basal medium supplemented with TDZ at 0, 0.1, 0.4, 1.6 and 6.4 mg/L. The results after 6 weeks indicated that explants grown on TDZ free MS medium exhibited significantly more growth than explants grown on media containing TDZ ($P<0.05$). In addition, MS medium with 0.1 and 0.4 mg/L TDZ was able to induce the diameter of multiple shoots more than other treatments ($P<0.05$). The fresh and dry weight of explants cultured with MS medium containing 0.4 mg/L TDZ were significantly different from all other treatments ($P<0.05$). The antioxidant activity was examined by five methods: total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), total saponin content (TSC), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay and 2,2' azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) assay. TPC, TSC, DPPH and ABTS were significantly different in all treatments ($P<0.05$), but TFC did not differ significantly across the treatments ($P>0.05$). Consequently, TDZ free MS medium was the optimal agent to stimulate plantlet propagation and MS medium with 0.4 mg/L TDZ produced appropriate antioxidant activities for medical usefulness.

Keywords: *Bacopa monnieri* (L.) Wettst., Thidiazuron, tissue culture, multiple shoots, antioxidant

คำนำ

พรมมิ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. (Sosa et al., 2018) เป็นพืชสมุนไพรที่เป็นพรรณไม้น้ำจัดอยู่ในวงศ์ Plantaginaceae ลักษณะลำต้นมีขนาดเล็ก มีกิ่งก้านจำนวนมาก ใบเรียวรูปไข่ขนาดเล็ก ดอกสีม่วงอ่อน มักพบบริเวณพื้นดินที่ชื้นแฉะหรือมีน้ำท่วมถึง เป็นพืชพื้นเมืองของประเทศอินเดียและประเทศอื่น ๆ ในเขตร้อน (Devendra et al., 2018) สารต้านอนุมูลอิสระในต้นพรมมิ ช่วยด้านความจำ ชะลอภาวะสมองเสื่อม (Simpson et al., 2015) โรคอัลไซเมอร์ พาร์กินสัน (Garg et al., 2009) และถูกจัดเป็นยาอายุรเวทที่ใช้ประโยชน์ในทางเภสัชวิทยา เช่น ลดอาการอักเสบ บรรเทาปวด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[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

ลดไข้ (Rai et al., 2017) ยาต้านจุลชีพ ต้านมะเร็ง และต้านโรคซึมเศร้า (Bhardwaj et al., 2016) และยังพบสารซาโปนิน (saponin) ที่มีชื่อเฉพาะเรียกว่า บาโคไซด์ (bacoside) (Mohan et al., 2011) โดย Bhattacharya et al. (2000) ได้ทดสอบสารบาโคไซด์จากต้นพรมมิในหนูทดลอง พบว่า สารบาโคไซด์ช่วยดูแลระบบประสาทของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampus) ในหนูทดลอง ที่ปริมาณ 5 และ 10 mg/kg และยังมีการรายงานว่าพบสารประกอบฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ รวมถึงวิตามินอื่น ๆ ซึ่งมีบทบาทในการป้องกันโรคที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย เช่น โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น โดยสารกลุ่มดังกล่าวเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ หรือ สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) จึงมีความปลอดภัยกว่าสารสังเคราะห์ (อเนก หาลี และบุณยกฤต รัตนพันธุ์, 2560) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (tissue culture) เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพเพื่อสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ สามารถกำหนดได้ทั้งปริมาณและคุณภาพ (Murthy et al., 2014)

Plant growth regulators (PGRs) คือ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้กระตุ้นการเจริญเติบโตและสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ โดยสารนี้พืชสามารถสร้างขึ้นเองตามธรรมชาติหรือเป็นสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นได้เช่นกัน (Basra, 2000) Dörnenburg and Knorr (1995) กล่าวว่า ไซโตไคนิน (cytokinin) เป็นสาร PGRs ชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยสารกลุ่มนี้มีหลากหลายชนิด หนึ่งในนั้น คือ สารไทเดียซูรอน (Thidiazuron, TDZ) มีชื่อเต็มว่า N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สังเคราะห์ขึ้น มีผลึกสีเหลืองอ่อน ละลายได้ดีในเอทานอล (Murthy et al., 1998) จัดเป็นอนุพันธ์ของฟีนิลยูเรีย (phenyl urea) TDZ ถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ความเข้มข้นที่นิยมใช้ประมาณ 0.22-22 mg/L (Huetteman and Preece, 1993) ประโยชน์ของ TDZ คือ ช่วยกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของพืชให้พัฒนาเป็นยอด ราก แคลลัส (Malik and Saxena, 1992) TDZ ถูกนำมาใช้ชักนำให้เกิดต้นอ่อนและเพิ่มจำนวนยอดของพืชสมุนไพร Prathanturarug et al. (2005) ได้ทำการทดลองในต้น *Curcuma longa* พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหาร MS ชนิดเหลว ร่วมกับ TDZ 16 mg/L ชักนำให้เกิดยอดกระจุก (multiple shoots)ได้ และ Siddique and Anis (2007) ได้ทำการทดลองในต้น *Ocimum basilicum* โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหาร MS ชนิดเหลว ร่วมกับ TDZ 11 mg/L พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดกระจุกได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ จากงานทดลองของ Rawat et al. (2013) ที่ใช้ PGRs กลุ่มไซโตไคนิน ร่วมกับอาหาร MS ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร *Aconitum violaceum* ผลที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่าสารกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดยอดและสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิได้ ดังนั้นงานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณของ TDZ ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพรมมิ ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระจากต้นพรมมิ เพื่อเป็นแนวทางการเพิ่มผลผลิตและสารสำคัญจากต้นพรมมิที่ปลอดภัยเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์

วิธีการศึกษา

พรรณไม้น้ำที่ใช้ในการทดลอง

พรรณไม้น้ำพรมมิ (*B. monnieri* (L.) Wettst.) ที่ปลอดเชื้อจากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพรมมิ โดยใช้อาหารกึ่งแข็ง MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม TDZ ที่ความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 0, 0.1, 0.4, 1.6 และ 6.4 mg/L ชุดการทดลองละ 15 ซ้ำ และทดลองเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ขั้นตอนดำเนินการ

วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพรมมิ

นำต้นพรมมิปลอดเชื้อมาตัดชิ้นเนื้อเยื่อส่วนข้อ ความยาวประมาณ 10-15 มิลลิเมตร ปลูกลงในอาหารกึ่งแข็ง MS ที่มีความเข้มข้นของ TDZ ต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 0, 0.1, 0.4, 1.6 และ 6.4 mg/L ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปวางบนชั้นเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ ช่วงการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน และเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตทุกสัปดาห์ ได้แก่ ความสูงต้น จำนวนกิ่ง จำนวนใบ เส้นผ่านศูนย์กลางยอดกระจุก และจำนวนราก เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ชั่งน้ำหนักสดและนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระในต้นพรมมิหลังสิ้นสุดการทดลอง

นำต้นพรมมิที่อบแห้งแล้วจากข้อ 1 มาชั่งน้ำหนักหลังอบและนำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นสแตนเลสเพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ดัดแปลงจาก Shirazi et al. (2014) และนำไปวิเคราะห์การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ total phenolic content (TPC) วิเคราะห์โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน ตามวิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดัดแปลงจาก Shirazi et al. (2014), total flavonoid content (TFC) วิเคราะห์โดยใช้เควอซิทิน (quercetin) เป็นสารมาตรฐาน ตามวิธี ดัดแปลงจาก Shirazi et al. (2014) และ total saponin content (TSC) วิเคราะห์โดยใช้ซาโปนิน (saponin equivalent) เป็นสารมาตรฐาน ตามวิธี ดัดแปลงจาก Vador et al. (2012) จากนั้นทดสอบด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (ดัดแปลงจาก Shirazi et al., 2014) และ ทดสอบด้วยวิธี 2,2' azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) (ดัดแปลงจาก Leite et al., 2018)

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% รวมทั้งวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation analysis) และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของข้อมูลด้วยวิธี Pearson correlation ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลของ TDZ ต่อการเจริญเติบโตในต้นพรมมิ

จากการทดลองนำชิ้นส่วนข้อของต้นพรมมิมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่เติม TDZ ต่างกัน 5 ระดับ ต่อการเจริญเติบโตของต้นพรมมิ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ความสูงของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ มีความสูงมากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ ($P<0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนสิ้นสุดการทดลอง โดยมีความสูงของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ 0, 0.1, 1.6, 0.4 และ 6.4 mg/L มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 41.1, 28.1, 20.7, 18.6 และ 16.2 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Figure 1 และ Table 1)

ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 จนสิ้นสุดการทดลอง พบว่าจำนวนใบของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ มีใบมากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ ($P<0.05$) โดยจำนวนใบของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ 0, 0.1, 0.4, 1.6 และ 6.4 mg/L มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 25.1, 12.1, 10.0, 0.9 และ 0 ใบต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (Figure 2 และ Table 1) จากการสังเกตจำนวนใบของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารไม่เติม TDZ แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์มีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับความสูงต้นซึ่งเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมือนกัน

จำนวนกิ่งของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ มีกิ่งมากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ ($P<0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 แต่สังเกตได้ว่าในสัปดาห์ที่ 3 จนสิ้นสุดการทดลอง ต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ มีจำนวนกิ่งลดลง เนื่องจากอาจมีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาไปเป็นยอดกระจุก โดยจำนวนกิ่งของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ 0, 1.6, 0.1, 0.4 และ 6.4 mg/L มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.9, 0.3, 0.2, 0 และ 0 กิ่งต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (Figure 3 และ Table 1)

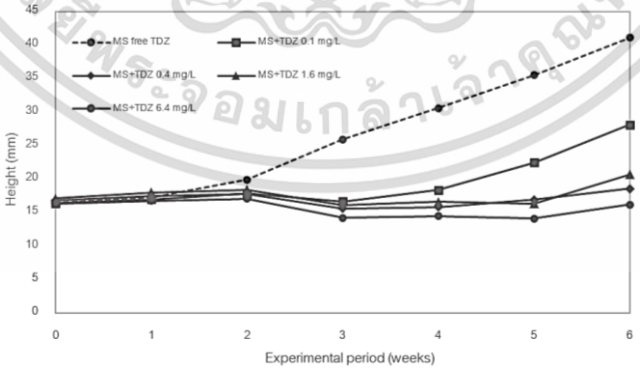

Figure 1 *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. height (mm) cultured in MS added with different concentrations of TDZ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

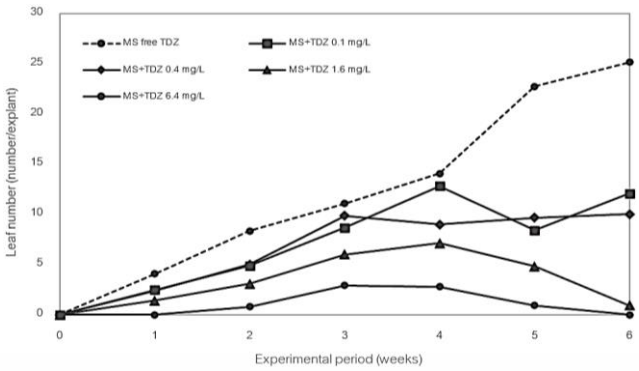

Figure 2 *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. leaf number (number/explant) cultured in MS added with different concentrations of TDZ.

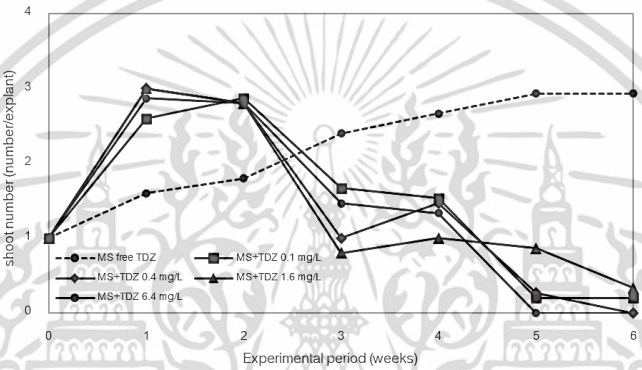

Figure 3 *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. shoot number (number/explant) cultured in MS added with different concentrations of TDZ.

ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 จนสิ้นสุดการทดลอง พบว่าจำนวนรากของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ มีรากมากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ ($P<0.05$) โดยจำนวนรากของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ 0, 0.1, 0.4, 1.6 และ 6.4 mg/L มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.6, 2.1, 0.6, 0.2 และ 0 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ จากการสังเกตจำนวนรากของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารไม่เติม TDZ สามารถเกิดรากได้มากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ ประมาณ 3 ถึง 6 เท่า (Figure 4 และ Table 1)

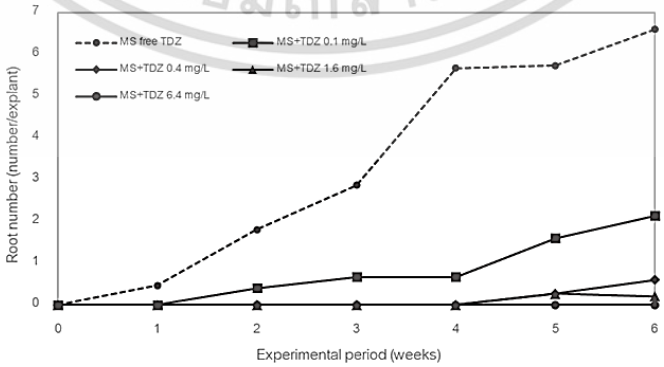

Figure 4 *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. root number (number/explant) cultured in MS added with different concentrations of TDZ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เส้นผ่านศูนย์กลางยอดกระจุกของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ มีค่ามากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ ($P<0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ 0.4, 0.1, 1.6, 6.4 และ 0 mg/L มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 21.5, 19.7, 15.6, 10.3 และ 0 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Figure 5 และ Table 1) ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงของยอดกระจุก ในสัปดาห์ที่ 3 มีความสัมพันธ์กับจำนวนกิ่งที่ลดลงจากการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา และเส้นผ่านศูนย์กลางเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ TDZ แต่ในขณะเดียวกันความเข้มข้นที่สูงกว่า 0.4 mg/L กลับมีเส้นผ่านศูนย์กลางยอดกระจุกลดลง

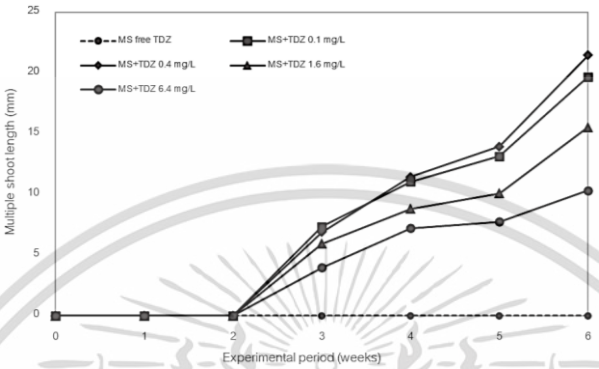

Figure 5 *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. multiple shoot length (mm) cultured in MS added with different concentrations of TDZ.

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ มีความสูงต้น จำนวนใบ จำนวนกิ่ง และจำนวนรากมากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ ($P<0.05$) แต่เส้นผ่านศูนย์กลางยอดกระจุกของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ มากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารไม่เติม TDZ ($P<0.05$) ซึ่งผลของการเจริญเติบโตในสัปดาห์สิ้นสุดการทดลองเนื้อเยื่อทดลองมีเส้นผ่านศูนย์กลางยอดกระจุกของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ 0.1 และ 0.4 mg/L มีความแตกต่างกันกับชุดการทดลองอื่น (Figure 6)

น้ำหนักภายหลังสิ้นสุดการทดลอง ได้แก่ น้ำหนักสดและแห้ง ของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ มากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารไม่เติม TDZ ($P<0.05$) โดยต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ 0.4 mg/L มีน้ำหนักสุดท้ายหลังสิ้นสุดการทดลองสูงที่สุด โดยน้ำหนักสดและแห้งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.3120 และ 0.0834 g (Table 2)

Figure 6 Proliferation of multiple shoots on MS medium (a) and MS medium with TDZ (0.1 mg/L) (b), TDZ (0.4 mg/L) (c), TDZ (1.6 mg/L) (d) and TDZ (6.4 mg/L) (e) after 6 weeks.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1 Height, shoot number, leaf number, multiple shoot length and root number of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. cultured in MS added with different concentrations of TDZ after 6 weeks.

Concentrations (mg/L)	Height (mm)	Shoot number (number/explant)	Leaf number (number/explant)	Multiple shoot length (mm)	Root number (number/explant)
MS	41.1±2.3^{a}	2.9±0.2^{a}	25.1±1.5^{a}	0.0±0.0^{d}	6.6±0.4^{a}
MS + TDZ 0.1	28.1±3.1^{b}	0.2±0.1^{bc}	12.1±1.8^{b}	19.7±1.4^{a}	2.1±0.6^{b}
MS + TDZ 0.4	18.6±0.7^{c}	0.0±0.0^{c}	10.0±1.6^{b}	21.5±0.7^{a}	0.6±0.3^{c}
MS + TDZ 1.6	20.7±0.4^{c}	0.3±0.1^{b}	0.9±0.4^{c}	15.6±0.9^{b}	0.2±0.2^{c}
MS + TDZ 6.4	16.2±0.6^{c}	0.0±0.0^{c}	0.0±0.0^{c}	10.3±1.0^{c}	0.0±0.0^{c}
F-test	*	*	*	*	*

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, * indicate whether this different is significant.

Table 2 Initial weight and final weight of *B. monnieri* (L.) Wettst. cultured in MS added with different concentrations of TDZ.

Concentrations (mg/L)	Initial weight		Final weight	
	Fresh weight (g/explant)	Dry weight (g/explant)	Fresh weight (g/explant)	Dry weight (g/explant)
MS	0.0130±0.0014	0.0013±0.0001	0.0896±0.0007^{e}	0.0271±0.0002^{e}
MS + TDZ 0.1	0.0130±0.0014	0.0013±0.0001	0.2824±0.0022^{b}	0.0685±0.0005^{b}
MS + TDZ 0.4	0.0130±0.0014	0.0013±0.0001	0.3120±0.0025^{a}	0.0834±0.0007^{a}
MS + TDZ 1.6	0.0130±0.0014	0.0013±0.0001	0.1673±0.0013^{c}	0.0439±0.0004^{d}
MS + TDZ 6.4	0.0130±0.0014	0.0013±0.0001	0.1099±0.0009^{d}	0.0457±0.0004^{c}
F-test	ns	ns	*	*

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

จากผลการทดลอง พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพรมมิในอาหาร MS ที่ไม่เติม TDZ มีความสูงต้น จำนวนใบ จำนวนกิ่ง และจำนวนราก มากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ (P<0.05) ส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางยอดกระจุกในอาหารที่เติม TDZ 0.1 และ 0.4 mg/L มากกว่าชุดการทดลองอื่น (P<0.05) แสดงให้เห็นว่า การขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มจำนวนต้นพรมมิในการนำออกปลูกโรงเรือนแบบปิดโดยใช้อาหาร MS ที่ไม่เติม TDZ มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจาก TDZ คือ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนิน มีฟีนิลยูเรียเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะช่วยกระตุ้นให้พืชเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์จนสามารถพัฒนาเป็นอวัยวะ เช่น ยอด ราก พัฒนาเป็นแคลลัส หรือกระตุ้นการเจริญของเซลล์ (Zhou et al., 1994) TDZ มีศักยภาพในการควบคุมเอนไซม์ cytokinin oxidase ที่มีหน้าที่ยับยั้งการสร้างสารไซโตไคนินในเซลล์เนื้อเยื่อพืช (Khan et al., 2014) ในธรรมชาติพืชจะสร้างไซโตไคนินเพื่อแบ่งเซลล์และแปรสภาพเซลล์ทำให้เกิดการเจริญเติบโต (Thomas and Katterman, 1986) เมื่อเอนไซม์ดังกล่าวถูกควบคุมด้วย TDZ จึงส่งผลให้การเกิดต้นอ่อนถูกกระตุ้นมากขึ้น (Ali et al., 2018) ในขณะที่การใช้ TDZ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพรมมิจึงชักนำให้เกิดยอดกระจุก แต่จากการทดลอง พบว่า การใช้ TDZ ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.4 mg/L ส่งผลให้การเกิดยอดกระจุกลดลง สอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Ainsley et al. (2001) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Prunus dulcis* Mill ในอาหาร MS ร่วมกับ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มไซโตไคนิน พบว่า ชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมดังกล่าวมีความสูงของยอดลดลง แต่ในขณะเดียวกันกลับมีการเจริญเติบโตในแนวระนาบ เรียกว่า multiple shoots และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารควบคุมให้สูงขึ้น ส่งผลให้การเกิดยอดถูกยับยั้งการเจริญเติบโตอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของ TDZ ต่อการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในต้นพรมมิ

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำต้นพรมมิแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ (Table 3) พบว่า TPC ของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ 0.4 mg/L มีค่าเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 23.3 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัม (mgGAE/g) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองอื่น การวิเคราะห์ TFC พบว่า ต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ และ เติม TDZ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) และพบว่า ต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ และเติม TDZ 0.4 mg/L มีค่าเฉลี่ย TSC เท่ากับ 60.7 และ 58.2 มิลลิกรัมซาโปนินต่อกรัม (mg saponin/g) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองอื่น

การทดสอบ DPPH เพื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระในต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ พบว่า DPPH ในอาหารที่เติม TDZ 0.1 และ 0.4 mg/L มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 74.0 และ 81.8% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองอื่น สำหรับการทดสอบ ABTS เพื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระในต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ ($P<0.05$) โดยต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ 0.1 ถึง 6.4 mg/L มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 98.8 ถึง 99.1%

Table 3 Evaluation of TDZ on TPC, TFC and TSC and efficiency of inhibition free radical on DPPH and ABTS assay in *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. after 6 weeks.

Concentrations (mg/L)	Total phenolic content (TPC) (mgGAE/g)	Total flavonoid content (TFC) (mgQE/g)	Total saponin content (TSC) (mg saponin/g)	DPPH (% Inhibition)	ABTS (% Inhibition)
MS	18.6±0.2^{b}	25.2±3.2	60.7±1.0^{a}	60.3±1.6^{b}	93.5±0.5^{b}
MS + TDZ 0.1	20.2±1.0^{b}	34.1±1.8	49.1±2.0^{b}	74.0±2.5^{a}	99.0±0.0^{a}
MS + TDZ 0.4	23.3±0.3^{a}	32.3±2.9	58.2±0.5^{a}	81.8±0.8^{a}	98.8±0.1^{a}
MS + TDZ 1.6	14.6±0.3^{c}	28.1±2.0	39.9±0.6^{c}	52.9±3.5^{bc}	99.1±0.1^{a}
MS + TDZ 6.4	13.2±1.1^{c}	34.4±1.4	44.1±2.5^{c}	47.8±5.0^{c}	99.1±0.0^{a}
F-test	*	ns	*	*	*

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

การวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในต้นพรมมิ

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า TPC กับ DPPH และ ค่า TPC กับ TSC เป็นความสัมพันธ์ในเชิงบวกซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ความสัมพันธ์ระหว่างค่า TFC กับ ABTS เป็นความสัมพันธ์ในเชิงบวกซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกัน และความสัมพันธ์ระหว่างค่า TSC กับ DPPH เป็นความสัมพันธ์ในเชิงบวกซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ในขณะที่ความสัมพันธ์ระหว่างค่า TSC กับ ABTS เป็นความสัมพันธ์ในเชิงลบซึ่งเป็นไปในทิศทางตรงกันข้าม (Table 4)

Table 4 Correlation analysis between TPC, TFC, TSC, DPPH and ABTS assay in tissue culture of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst.

Parameters	TPC	TFC	TSC	DPPH	ABTS
TPC	1				
TFC	-0.043	1			
TSC	0.760**	-0.276	1		
DPPH	0.960**	0.062	0.614*	1	
ABTS	-0.118	0.532*	-0.663**	0.061	1

** Correlation is significant at $P<0.01$, * Correlation is significant at $P<0.05$.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพรมมิในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 หรือ 0.4 mg/L มีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ มากกว่าต้นพรมมิในชุดการทดลองอื่น ($P<0.05$) มีรายงานว่าการใช้พืชสมุนไพรในธรรมชาติพบสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากมีความปลอดภัยและมีผลข้างเคียงต่อร่างกายน้อยมาก สารกลุ่มที่พบ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลที่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและมีความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ทำลายเซลล์ร่างกายมนุษย์ได้ (Asgarirad et al., 2010) สารฟีนอลิก คือสารที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นองค์ประกอบ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดย Ali et al. (2018) ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสมุนไพร *Ajuga bracteosa* ในอาหาร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มไซโตไคนิน เพื่อศึกษาสารประกอบทุติยภูมิ พบว่า เนื้อเยื่อสมุนไพรที่เลี้ยงในอาหารดังกล่าวถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดและมีการสร้างสารฟีนอลิกเพิ่มขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์ฟีนอลิกถูกกระตุ้นให้เพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน สารต้านอนุมูลอิสระอีกประเภทก็คือ สารซาโปนิน จัดอยู่ในกลุ่มสเตียรอยด์เป็นสารประกอบประเภทเทอร์พีนอยด์ที่ได้จากการสังเคราะห์ผ่านวิถีชีวสังเคราะห์ (mevalonate pathway) ซึ่งมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา (Georgiev et al., 2011) ซึ่ง Mahato (2000) ได้อธิบายถึงคุณสมบัติของสารซาโปนินที่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายมีขั้ว พบมากบริเวณใบของพืช และสารประกอบมีโครงสร้างที่ซับซ้อน โดยสารประกอบที่กล่าวมาข้างต้นล้วนมีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ จากผลการทดลองครั้งนี้ยังสอดคล้องกับการรายงานของ Olszowy and Dawidowicz (2018) ที่ได้ทำการประเมินวิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ พบว่า วิธี DPPH และ ABTS มีความเหมาะสมในการทดสอบเนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว มีความเสถียรสูง และใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ไม่นาน จึงนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่นเดียวกับ Mohan et al. (2011) ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *B. monnieri* ในอาหาร MS ร่วมกับ TDZ เพื่อศึกษาการขยายพันธุ์และเปรียบเทียบการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง อนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 71.17% ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานทดลองครั้งนี้ และ Ahmed et al. (2019) ได้อธิบายว่าฤทธิ์การยับยั้ง DPPH มีความสัมพันธ์กับปริมาณ TPC เนื่องจาก TPC เป็นกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกที่มีหน้าที่หลัก คือ ทำลายอนุมูลอิสระ (free radical) เมื่อ TPC มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น เปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะเพิ่มสูงตามไปเช่นกัน

สรุปผลการศึกษา

จากการทดลองประสิทธิผลของสาร TDZ ต่อการเจริญเติบโตและสารต้านอนุมูลอิสระในต้นพรมมิ พบว่า ชิ้นเนื้อเยื่อส่วนข้อของต้นพรมมิที่ไม่เติม TDZ เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนต้นในการนำไปขยายพันธุ์ และ การเติม TDZ ความเข้มข้น 0.4 mg/L ในอาหาร MS มีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เหมาะสมต่อการนำไปใช้เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์

เอกสารอ้างอิง

อเนก หาลี และบุณยกฤต รัตนพันธุ์. 2560. การศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระจากพืชผักสมุนไพรพื้นบ้าน 15 ชนิด. *วารสารวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี* 2: 283-293.

Ahmed, A., Ahmed, S., Shuaib, M., Ahmed, R., Somani, N., and Sharma, A. 2019. Effect of auxin and cytokinin on regeneration, total phenolic and in vitro antioxidant activities of *Bacopa monnieri* (L.) Pennell. *Journal of Ayuravedic and Herbal Medicine* 5(2): 54-59.

Ainsley, P. J., Hammerschlag, F. A., Bertozzi, T., Collins, G. G., and Sedgley, M. 2001. Regeneration of almond from immature seed cotyledons. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67: 221-226.

Ali, H., Khan, M. A., Kayani, W. K., Khan, T., Mashwani, Z. R., Ullah, N., and Khan, R. S. 2018. Thidiazuron regulated growth, secondary metabolism and essential oil profile in shoot cultures of *Ajuga bracteosa*. *Industrial Crops & Products* 121: 418-427.

Asgarirad, H., Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., Saeidnia, S., Ebrahimzadeh, M. A., and Lotfi, F. 2010. *In vitro* antioxidant analysis of *Achillea tenuifolia*. *African Journal of Biotechnology* 9(24): 3536-3541.

Basra, A. S. 2000. *Plant Growth Regulators in Agriculture and Horticulture: Their role and Commercial Uses*. New York: Haworth Press.

Bhardwaj, P., Jain, C. K., and Mathur, A. 2016. Comparative qualitative and quantitative analysis of phytochemicals in five different herbal formulations of *Bacopa monnieri*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 8(4): 675-682.

Bhattacharya, S. K., Bhattacharya, A., Kumar, A., and Ghosal, S. 2000. Antioxidant activity of *Bacopa monniera* in rat frontal cortex, striatum and hippocampus. *Phytotherapy Research* 14: 174-179.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dörnenburg, H., and Knorr, D. 1995. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell culture. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 674-684.

Garg, A. N., Kumar, A., Nair, A. G. C., and Reddy, A. V. R. 2009. Elemental analysis of brahmi (*Bacopa monnieri*) extracts by neutron activation and its bioassay for antioxidant, radioprotective and anti-lipid peroxidation activity. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 281: 53-58.

Georgiev, G. I., Maslenkova, L., Ivanova, A., Lazarova, I., and Evstatieva, L. 2011. The effect of Thidiazuron (dropp) on the growth, photostnthetic activity and saponin content of Puncture vine (*Tribulus terrestris* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 25: 2362-2365.

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

Khan, T., Abbasi, B. H., Khan, M. A., and Shinwari, Z. K. 2016. Differental effects of Thidiazuron on production of anticancer phenolic compounds in callus cultures of *Fagonia indica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 179: 46-58.

Leite, K. C. D. S., Garcia, L. F., Lobón, G. S., Thomaz, D. V., Moreno, E. K. G., Carvalho, M. F. D., Rocha, M. L., Santos, W. T. P. D., and Gil, E. D. S. 2018. Antioxidant activity evaluation of dried herbal extracts: an electroanalytical approach. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 28(3): 325-332.

Mahato, S. B. 2000. Bioactive saponins from some plants used in Indian traditional medicine. In *Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants*, W. Oleszek and A. Marston, ed. pp.13-23. Dordrecht: Springer.

Malik, K., and Saxena, P. 1992. Thidiazuron induces hight frequency shoot regeneration in intact seedlings of Pea (*Pisum sativum*), Chickpea (*Cicer arietinum*) and Lentil (*Lens culinaris*). *Australian Journal of Plant Physiology* 19(6): 731-740.

Mohan, N., Jassal, P. S., Kumar, V., and Singh, R. P. 2011. Comparative in vitro and in vivo study of antioxidants and phytochemical content in *Bacopa monnieri*. *Recent Research in Science and Technology* 3(9): 78-83.

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

Murthy, B. N. S., Murch, S. J., and Saxena, P. K. 1998. Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 34(4): 267-275.

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.

Olszowy, M., and Dawidowicz., A. L. 2017. It is possible to use the DPPH and ABTS methods for reliable estimation of antioxidant power of colored compound?. *Chemical Paper* 72: 393-400.

Prathanturarug, S., Soonthornchareonnon, N., Chuakul, W., Phaidee, Y., and Saralamp, P. 2005. Rapid micropropogation of *Curcuma longa* using bud explants pre-cultured in thidiazuron-supplemented liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80: 347-351.

Rai, K., Gupta, N., Dharamdasani, L., Nair, P., and Bodhankar, P. 2017. *Bacopa monnieri*: a wonder drug changing fortune of people. *International Journal of Applied Science and Biotechnology* 5(2): 127-132.

Rawat, J. M., Rawat, B., Chandra, A., and Nautiyal, S. 2013. Influence of plant growth regulators on indirect shoot organogenesis and secondary metabolite production in *Aconitum violaceum* Jacq. *African Journal of Biotechnology* 12(44): 6287-6293.

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

Siddique, I., and Anis, M. 2007. Rapid micropropogation of *Ocimum basilicum* using shoot tip explants pre-cultured in thidiazuron supplemented liquid medium. *Biologia Plantarum* 51(4): 787-790.

Simpson, T., Pase, M., and Stough, C. 2015. *Bacopa monnieri* as an antioxidant therapy to reduce oxidative stress in the aging brain. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine Article* 2015: 1-10.

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

Thomas, J. C., and Katterman, F. R. 1986. Cytokinin activity induced by Thidiazuron. *Plant Physiology* 81: 681-683.

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

Zhou, J., Ma, H., Guo F., and Luo, X. 1994. Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36(1): 73-79.

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

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 20 ม.ค. 63

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้