

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

- 1) เครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator), R-124, Buchi, Switzerland
- 2) เครื่องชั่งสำหรับการวิเคราะห์ (Analytical Balance), MS 204, Mettler Toledo, Switzerland
- 3) เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลต (Microplate Reader), SPECTRO star Nano, BMG Labtech, Germany
- 4) เครื่องผสมสาร (Vortex), VTX-3000 L, Laboratory & Medical Supplies, Japan
- 5) เครื่องดูดจ่ายสารละลายแบบทางเดียว (Single Channel Pipette), Pipetman G P100G, Gilson, USA
- 6) เครื่องดูดจ่ายสารละลายแบบหลายทาง (Multi Channel Pipette), Pipetman L P8X200L, Gilson, USA
- 7) เตาอบลมร้อน (Hot Air Oven), DLE500, Memmert, Germany
- 8) เครื่องปั่น (Blender), MX-337N, Matsushita Electronic Industrial, Malaysia
- 9) เครื่องให้ความร้อน (Hot plate), Kendo Electric, Thailand
- 10) ขวดโหลแก้ว (Glass jar) ขนาด 2.5 ลิตร
- 11) ถุงผ้าฝ้าย (Cotton bag)
- 12) ขวดบรรจุสาร (Laboratory Bottle)
- 13) ขวดระเหย (Evaporating Flask)
- 14) หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube)
- 15) ไมโครเวลเพลต (Microwellplate)
- 16) ไมโครปิเปตต์ทิป (Micropipette Tip)
- 17) จานเพาะเชื้อจุลินทรีย์ (Petri dish)

3.1.2 สารเคมี

- 1) เมทานอล (Methanol, CH_3OH), MW 32.04 g/mol, Commercial, Zen Point, Thailand
- 2) ดีพีพีเอช (DPPH, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$), AR, Assay

85.0 %, MW 394.32 g /mol, Sigma Aldrich, USA

3) เอบีทีเอส (ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt, $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$), HPLC, Assay 98%, MW 514.62 g /mol, Sigma Aldrich, USA

4) โทรลอกซ์ (Trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, $C_{14}H_{18}O_7$), Assay 97.0 %, MW 250.29 g /mol, Sigma Aldrich, USA

5) วิตามินซี (L-ascorbic acid, $C_6H_8O_6$), AR, Assay 99.0 %, MW 176.13 g /mol, Chem Supply, Australia

6) โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium Persulphate, $K_2S_2O_8$), AR, Assay 99.0 %, MW 270.32 g /mol, Ajax Finechem, Australia

7) กรดแกลลิก (Gallic acid monohydrate, $C_7H_6O_5 \cdot H_2O$), AR, Assay 98.0 %, MW 188.13 g/mol, Sigma Aldrich, USA

8) สารโฟลีน-ซีโอแคลเตอู (Folin-Ciocalteu reagent), Assay 99.9 %, Lobachemie, India

9) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate, Na_2CO_3), AR, Assay 99.8 %, MW 105.99 g/mol, Ajax Finechem, Australia

10) เควอร์ซีทิน (Quercetin, $C_{15}H_{10}O_7$), AR, Assay 95.0 %, MW 302.24 g/mol, Sigma Aldrich, USA

11) โซเดียมไนไตรต์ (Sodium nitrite, $NaNO_2$), AR, Assay 98.0 %, MW 69.0 g/mol, RCI Labscan, Thailand

12) อะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminium chloride, $AlCl_3 \cdot 6H_2O$), AR, Assay 99.0 %, MW 241.45 g/mol, Lobachemie, India

13) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH), AR, Assay 99.0 %, MW 40.0 g/mol, RCI Labscan, Thailand

14) คลอโรฟอร์ม (Chloroform, $CHCl_3$), AR, Assay 99.8 %, MW 119.38 g/mol, RCI Labscan, Thailand

15) กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, H_2SO_4), AR, Assay 98.0 %, MW 98.08 g/mol, RCI Labscan, Thailand

16) กรดแกลเซียลแอซิดิก (Glacial acetic acid, CH_3COOH), AR, Assay 99.7 %, MW 60.05 g/mol, RCI Labscan, Thailand

17) เฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride, $FeCl_3$), Assay 98.0 %, MW 162.21 g/mol, Ajax Finechem, Australia

18) กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl), ACS, Assay 37.0 %, MW 36.50 g/mol, Emsure, Australia

19) แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Ammonium hydroxide, NH_4OH), AR/ACS, Assay 30.0 %, MW 35.05 g/mol, Lobachemie, India

20) น้ำยาทดสอบเมเยอร์ (Mayer's reagent)

- เมอร์คิวริก (II) คลอไรด์ (Mercuric (II) chloride, HgCl_2), AR, Assay 99.5 %, MW 271.50 g/mol, RFCL Limited, India
- โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide, KI), ACS, Assay 99 %, MW 166.00 g/mol, Ajax Finechem, Australia

21) โลหะแมกนีเซียม (Magnesium, Mg)

22) อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ Nutrient agar (NA) และ Nutrient broth (NB)

3.1.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

- 1) *Bacillus cereus*
- 2) *Staphylococcus aureus*
- 3) *Escherichia coli*
- 4) *Enterobacter aerogenes*

3.2 การเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพรตัวอย่าง

นำกล้วยไม้เอื้องคำตัวอย่าง ล้างให้สะอาดสะเด็ดน้ำให้แห้ง จากนั้นนำไปตากในที่ร่มที่มีอากาศถ่ายเทสะดวกจนแห้ง แล้วนำไปอบแห้งอีกครั้งด้วยเตาอบลมร้อนที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปบดให้ละเอียดแล้วนำมาทำการสกัดด้วยเมทานอล 3 ครั้ง ครั้งละ 1 สัปดาห์ โดยใช้อัตราส่วนของตัวอย่าง 1 กรัมต่อเมทานอล 5 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Vacuum evaporator) คำนวณร้อยละสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักพืชแห้ง (% yield) หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิด

3.3 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.3.1 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีดีพีพีเอช (DPPH Method)

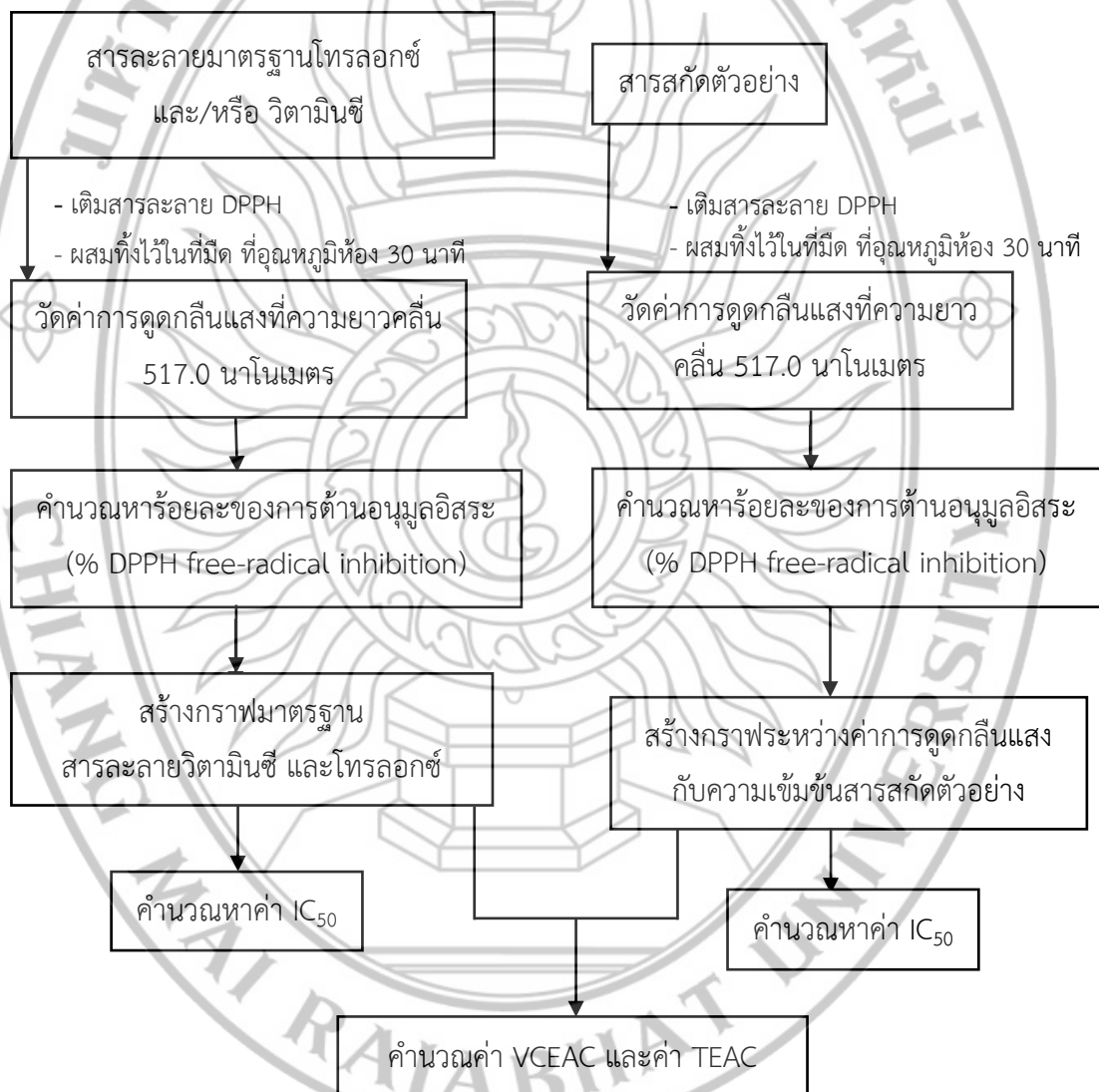
การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH ดัดแปลงมาจากวิธีของ สุริสา ศรีสุวรรณ และคณะ (2557) โดยใช้ โทรลอกซ์ (Trolox) และวิตามินซี (Ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน เตรียมในเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl : DPPH) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 180 ไมโครลิตร นำสารผสมที่ได้เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517.0 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มา คำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free-radical inhibition) ดังสมการที่ (3.1) จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานวิตามินซี และกราฟมาตรฐานโทร็อกซ์ และหาความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่าง ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการเทียบกับกราฟมาตรฐาน นำไปคำนวณหา (Vitamin C equivalent antioxidant capacity : VCEAC) ในรูปมิลลิกรัมของวิตามินซี ต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg Vitamin C /g extract) และนำไปคำนวณหาค่า (Trolox equivalent antioxidant

capacity : TEAC) ในรูปมิลลิกรัมของโทรลอกซ์ต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg Trolox /g extract) ดังแสดงในรูปที่ 3.4

$$\% \text{ DPPH free-radical inhibition} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100 \dots (3.1)$$

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารตัวอย่าง

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารตัวอย่าง



รูป 3.1 แผนภาพแสดงการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีดีพีพีเอช (DPPH Method)

3.3.2 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีเอบีทีเอส (ABTS Method)

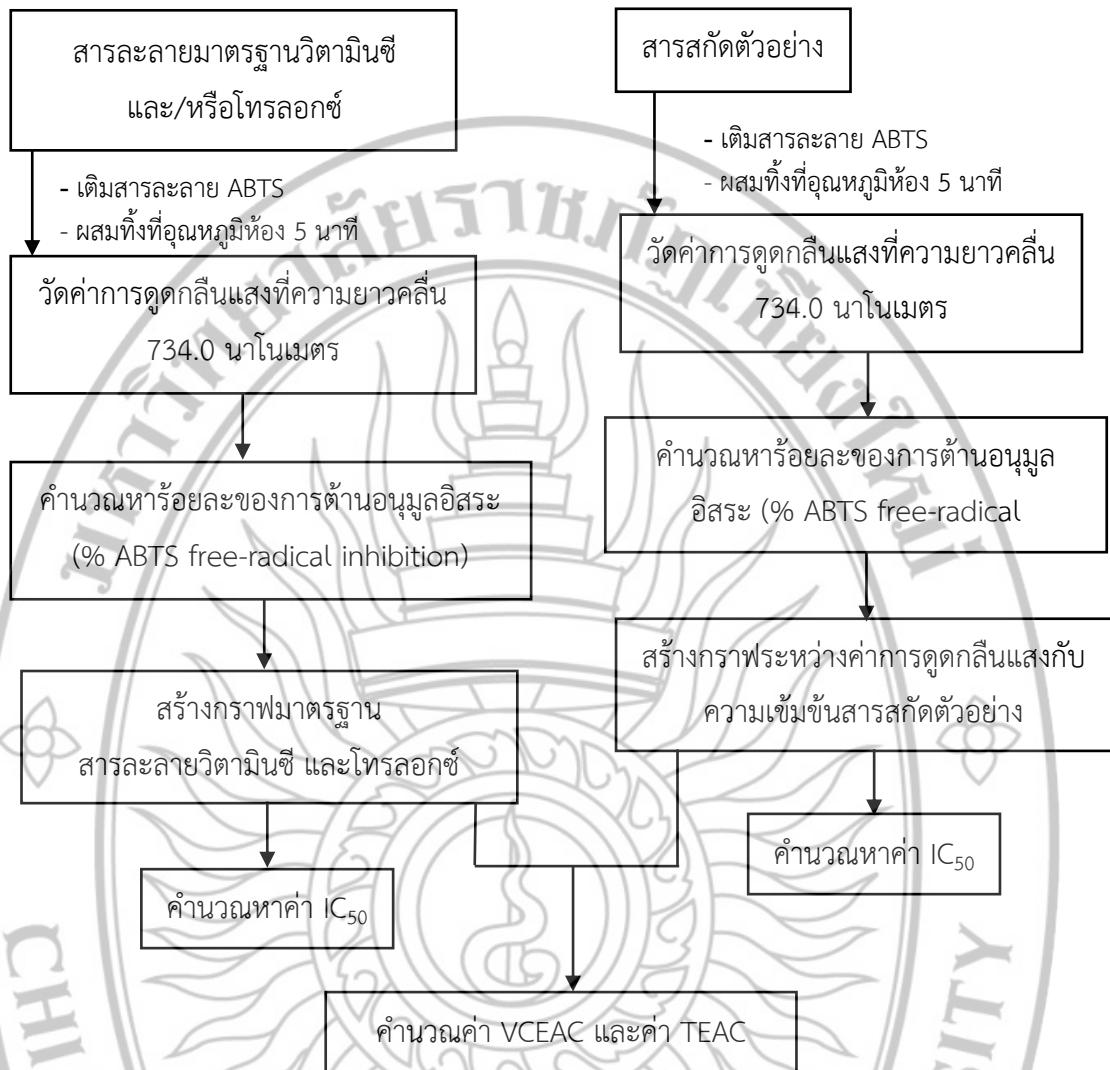
การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS ดัดแปลงมาจากวิธีของ สุริสา ศรีสุวรรณ และคณะ (2557) โดยใช้ วิตามินซี (Ascorbic acid) และโทรลอกซ์ (Trolox) เป็นสารมาตรฐานเตรียมในเมทานอล การเตรียมสารอนุมูลอิสระ (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt : ABTS) โดยการผสมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7.0 มิลลิโมลาร์ กับ สารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสารละลายผสมที่เตรียมได้ 180 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 734.0 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาคำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% ABTS free-radical inhibition) ดังสมการที่ (3.2) จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานวิตามินซี และกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์ และหาความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการเทียบกับกราฟมาตรฐาน นำไปคำนวณหา (Vitamin C equivalent antioxidant capacity : VCEAC) ในรูปมิลลิกรัมของวิตามินซีต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg Vitamin C /g Extract) และนำไปคำนวณหาค่า (Trolox equivalent antioxidant capacity : TEAC) ในรูปมิลลิกรัมของโทรลอกซ์ต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg Trolox /g extract) ดังแสดงในรูปที่ 3.5

$$\% \text{ ABTS free-radical inhibition} = \left[\frac{A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample}_0})}{A_{\text{control}}} \right] \times 100 \quad \dots (3.2)$$

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผสม ที่ไม่มีสารตัวอย่าง

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผสม ที่มีสารตัวอย่าง

A_{sample_0} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสาร ABTS ที่ไม่มีสารตัวอย่าง



รูป 3.2 แผนภาพแสดงการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีเอบีทีเอส (ABTS Method)

3.4 การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิดของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้เอื้องคำ

3.4.1 การเจือจางสารสกัดหยาบเพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

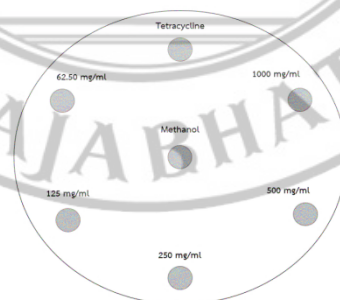
เตรียมสารสกัดหยาบจากดอกเอื้องคำที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย จากนั้นทำการเจือจางสารสกัดลงทีละ 2 เท่า จนได้ 5 ความเข้มข้น คือ 1,000, 500, 250, 125, และ 62.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

3.4.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes* โดยการ streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายโคลนเชื้อจุลินทรีย์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชม. แล้วนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD₆₀₀) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ให้ได้ประมาณ 0.80-1.00 (เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10⁸ CFU/ml)

3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพร ด้วย วิธี Disc diffusion method

นำไม้พินสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงในเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.4.2 จากนั้นเกลี่ยให้ทั่วจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร NA อยู่ วางกระดาษกรองซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร ลงบนจานเพาะเชื้อจุลินทรีย์ดังแสดงในรูป 3.1 แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดสารสกัดที่เจือจางไว้ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ปริมาตร 10 ไมโครลิตรหยอดลงบนกระดาษกรอง โดยใช้ยาเตตราไซคลีนเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) และเมทานอลเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (Negative control) นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส



รูป 3.3 การวางกระดาษกรองเพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

3.4.4 วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรมสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองแบบ One-way ANOVA โดยทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.5 การขยายพันธุ์กล้วยไม้เอื้องคำด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3.5.1 การเตรียมตัวอย่างพืชสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลอง คือ เอื้องคำ (*Dendrobium chrysotoxum* Lindl.) ซึ่งเก็บเมล็ดจากกลุ่มอนุรักษ์พันธุ์กรรมกล้วยไม้พาม่วยท้องถิ่นบ้านปางไคร้ ตำบลโป่งแยง อำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่ นำไปทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Vacin and Went (VW) ณ สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่ จนพัฒนาเป็น protocorm แล้วจึงนำไปเลี้ยงในโรงเรือนของกลุ่มอนุรักษ์พันธุ์กรรมกล้วยไม้พาม่วยท้องถิ่นบ้านปางไคร้เพื่อให้เกิดเป็นต้นอ่อนอายุประมาณ 2 ปี จากนั้นนำต้นอ่อนปลอดเชื้อที่ได้มาย้ายเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรกิตติศักดิ์ (KS, 2558) ที่เติมน้ำตาล 20 g/L ปรับ pH เป็น 4.9 และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารโดยวิธีของ กิตติศักดิ์ (2556) คือ เติมน้ำไฮเตอร์ 0.5 ml/L ลงในอาหาร ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 ปี

3.5.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ชุดควบคุมเชิงบวกใช้อาหารวุ้นสูตร VW ที่เติมน้ำตาล 20 g/L ปรับ pH เป็น 4.9 ผงวุ้น (ทรานางเจือก) 7 g/L สำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตรกิตติศักดิ์ (KS, 2558) ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0KS, 1/5KS, 2/5KS, 3/5KS, 4/5KS และ KS ทำได้โดยเติมน้ำประปา 300 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร จากนั้นเติมน้ำตาลละลายสำหรับปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ตรา Hydrowork สูตรสำหรับผักสลัด Stock A และ B ความเข้มข้นอย่างละเท่าๆ กันคือ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร เติมน้ำตาล 20 g/L ปรับปริมาตรด้วยน้ำประปาเป็น 1 ลิตร ปรับค่า pH เป็น 4.9 ด้วย 1 M NaOH หรือ 1 M HCl เติมน้ำวุ้น (ทรานางเจือก) 7 g/L อาหารทุกสูตรนำไปต้มจนวุ้นละลาย รอให้อุณหภูมิของอาหารลดลงถึง 60°C จึงเติมน้ำยาฟอกผ้าขาว Haitei 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร (Kittisak, 2013) เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร เทใส่แก้วพลาสติกขนาด 4 ออนซ์ ปิดฝา รอจนวุ้นแข็งตัวแล้วจึงนำไปใช้ในการทดลอง

3.5.3 การศึกษาผลของอาหารวุ้นสูตร KS ความเข้มข้นต่างๆ และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องคำในสภาพปลอดเชื้อ

เตรียมตู้เนื้อเยื่อซึ่งในการทดลองนี้ใช้ตู้ปลาขนาด $20 \times 10 \times 12$ นิ้ว โดยพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70% และเช็ดจนทั่วก่อนใช้งาน ถาดสแตนเลสสำหรับรองตัดเนื้อเยื่อให้พ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70% ให้ชุ่มอยู่ตลอดเวลา และอุปกรณ์สำหรับตัดเนื้อเยื่อ ได้แก่ มีดผ่าตัด และคีมคีบให้

แช่ในแอลกอฮอล์ 70% ก่อนและหลังการใช้งานเสมอเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ขณะใช้งาน จากนั้นคัดเลือกต้นอ่อนเอื้องคำในสภาพปลอดเชื้อที่มีความสูงประมาณ 0.5 cm มาทำการย้ายเลี้ยงภายในตู้ย่ายเนื้อเยื่อโดยนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร VW และอาหารวุ้นสูตร 0KS, 1/5KS, 2/5KS, 3/5KS, 4/5KS และ KS รวม 7 ชุดการทดลอง นำไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในห้องที่เปิดหน้าต่างและมีการถ่ายเทอากาศตลอดเวลา โดยมีอุณหภูมิเฉลี่ยในระหว่างการทดลองคือเดือนสิงหาคม ถึงกันยายน พ.ศ. 2561 เท่ากับ 29.9°C รวม 14 ชุดๆ ละ 15 ซ้ำ การทดลองทั้งหมดให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึก อัตราการปนเปื้อน จำนวนยอด ความสูงของยอด จำนวนใบ และจำนวนราก

3.5.4 การวิเคราะห์ผล

การทดลองทั้งหมด 14 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 15 ซ้ำ ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomization design) โดยอัตราการปนเปื้อน และอัตราการรอดชีวิตภายหลังการย้ายออกปลูกแสดงผลเป็นร้อยละ สำหรับจำนวนยอด ความสูงของยอด จำนวนใบ และจำนวนราก แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวจากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05