วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 2560 : 35 (2) : 76 - 83

ผลของ Kinetin และ IAA ต่อการเจริญเติบโตและการต้านอนุมูลอิสระจากพรรณไม้น้ำพรมมิ

Effect of Kinetin and IAA on Growth and Antioxidants in *Bacopa monnieri*

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์*[1] อัจฉรี เรืองเดช[1] และสมชาย หวังวิบูลย์กิจ[1]
Nongnuch Laohavisuti*[1], Uscharee Ruangdej[1] and Somchai Wangwibulkit[1]

บทคัดย่อ

พรรณไม้น้ำพรมมิ (*Bacopa monnieri*) เป็นไม้ประดับตู้ปลาที่พบว่ามีคุณสมบัติทางด้านเภสัช ในการควบคุมคุณภาพด้านเภสัช ให้สม่ำเสมอ จึงต้องใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนั้นจึงศึกษาการเลี้ยงพรรณไม้น้ำพรมมิด้วยอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับฮอร์โมนออกซิน Indole-3-acetic acid (IAA) ที่ระดับความเข้มข้น 0,0.1,0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และไซโตไคนิน (kinetin) ที่ระดับความเข้มข้น 0,0.5,1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้พรรณไม้น้ำพรมมิมีความสูงมากที่สุดคือ 80.74±4.10 มิลลิเมตร แต่สูตร MS ที่เติม IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เพิ่มจำนวนกิ่งได้ดีคือ 12.67±0.91 กิ่ง สำหรับน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งที่สูงสุดได้จากอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดพรมมิ 3 วิธี ได้แก่ total phenolic compounds (TPC), DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีจากต้นพรมมิที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MSที่มีความเข้มข้นของ IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

คำสำคัญ : พรมมิ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไอเอเอ ไคเนติน สารต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Brahmi (*Bacopa monnieri*) is not only aquarium ornamental plant but also is used as folk medicine. In order to control constant quality, the tissue culture of Brahmi was applied. Semi-solid MS basal medium supplemented with auxin (indole-3-acetic acid ; IAA) at concentrations of 0, 0.1, 0.2 and 0.3 mg/ L with combination of cytokinin (furfurylaminopurine; kinetin) at concentrations of 0, 0.5, 1.0 and 1.5 mg/ L was evaluated. Then, the axenic tissue were cultured on those media. The result showed that medium supplemented with kinetin 1.5 mg/L could induce maximum height as 80.74 ± 4.10mm. The highest number of branches of 12.67 ± 0.91 was recorded at the combination of 0.1 mg/L IAA and 0.5 mg/L kinetin on MS media.The highest fresh weight and dry weight as well occurred on medium with combination of 0.1 mg/L IAA and 0.5 mg/L kinetin. Subsequently, antioxidant activities were determined from ethanolic extract by three methods: total phenolic compounds (TPC), DPPH (1,1-diphenyl-2 - picrylhydrazyl radical) and ABTS (2,20azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). The highest antioxidant activity was recorded at concentration of 0.1 mg/ L IAA combined with 1.5 mg/ L kinetin.

Keywords: Brahmi (*Bacopa monnieri*), tissue culture, indole-3-acetic acid (IAA), kinetin, antioxidant

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

* Corresponding author: E-mail: nonmgnuch.la@kmitl.ac.th; Tel. 0 23298517

คำนำ

พรรณไม้น้ำพรมมิ (*Bacopa monnieri*: Family-Scrophulariaceae) เป็นพรรณไม้น้ำที่ขึ้นในที่ชื้นแฉะ เลื้อยทอดไปตามพื้นและชูยอดขึ้น ใบเดี่ยวรูปไข่ค่อนข้างยาว โคนใบแคบปลายใบกว้าง ดอกเดี่ยวสมบูรณ์เพศ ออกตามซอกใบกลีบดอกสีขาว ครามอ่อน จนถึงม่วงอ่อน ปลายกลีบแยกออกจากกันเป็น 5 แฉก (ชาญชัย, 2556) นอกจากใช้เป็นไม้ประดับตกแต่งตู้ปลายังมีคุณสมบัติในด้านเภสัชจัดเป็นสมุนไพร สารหลักที่แสดงผลในการใช้เพื่อเสริมสร้างความจำคือ bacoside และรวมถึง bacosaponin ที่อยู่ในกลุ่มไตรเทอพีนอยด์ (Rastogi *et al.,* 1994; Singh and Dhawan, 1997) เนื่องจากสารประกอบที่พรมมิสร้างขึ้นมีองค์ประกอบของสารพฤกษเคมีหลายกลุ่ม ได้แก่กลุ่มอัลคาลอยด์ เช่น Brahmine (Russo and Borrelli, 2005) กลุ่มไกลโคไซด์ เช่น Asiaticoside กลุ่ม ฟลาโวนอยด์ เช่น Apigenin, Luteonin และกลุ่มซาโปนิน เช่น Monnierin, Bacoside (Mathew *et al.,* 2010) สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในพรมมิ เช่นสารโพลีฟีนอลมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิด lipid peroxidation ได้ (Russo and Borrelli, 2005) มีงานวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบจากพรมมิจะสามารถชักนำให้เพิ่มเอนไซม์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระในหนู (Bhattacharya, 2000) การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในพรรณไม้น้ำจะสัมพันธ์กับสารอาหาร และฮอร์โมน (Naik *et al.,* 2010) เทคโนโลยีที่ช่วยให้พรรณไม้น้ำสร้างสารเคมีอย่างสม่ำเสมอคือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพราะปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมคงที่ ข้อมูลการเลี้ยงในอาหารที่เสริมฮอร์โมนช่วยในการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน เช่น IAA (Indole-3-acetic acid) และ kinetin ที่จะส่งผลให้พรมมิมีการเจริญเติบโต และการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระได้มากยังไม่ได้มีการบันทึกไว้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อให้ทราบผลของการเสริมฮอร์โมนทั้งสองชนิดในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการเจริญเติบโต และความสามารถในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในพรรณไม้น้ำพรมมิ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ใช้พรรณไม้น้ำพรมมิจากโรงเรือนพรรณไม้น้ำของหลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ โดยนำชิ้นส่วนของต้นพรมมิที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ นำมาตัดส่วนใบและรากออกเป็นชิ้นขนาดตามต้องการและวางลงบนอาหารเหลวกึ่งแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม IAA (FLUKA) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin (FLUKA) ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ขวดละ 1 ต้น จำนวน 15 ซ้ำ เลี้ยงไว้ในห้องที่มีการควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 2,500 LUX วันละ 12 ชั่วโมง เลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เก็บข้อมูลด้านการเจริญเติบโตโดยนับจำนวนกิ่ง และวัดความสูงของต้น ระหว่างการทดลองทุก ๆ 2 สัปดาห์ และชั่งน้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

นำต้นพรมมิที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ มาอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 6-12ชั่วโมง จากนั้นจึงปั่นละเอียด แล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอล 95% โดยใช้ตัวอย่างแห้งต่อตัวทำละลายในอัตราส่วน 1:100 แช่และเขย่าเป็นครั้งคราวเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองด้วยผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 เก็บรักษาในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระต่อไป ประกอบด้วย

1. การทดสอบเพื่อหาปริมาณฟีนอลทั้งหมด (total phenolic content; TPC) จากพรมมิโดยวิธี Folin- Ciocalteu (ดัดแปลงจาก Lim and Mutijaya, 2007) โดยใช้กรดแกลลิคเป็นสารมาตรฐาน ใช้ตัวอย่างสารสกัด 0.4 มิลลิลิตร เติม 10 % Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งพักไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 7.5% โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร พักไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำสารที่ได้ มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm โดยใช้เครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Genesys 10S Vis,Thermo scientific)

2. การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยสารสกัดปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เติมลงใน DPPH ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 10 นาที ตั้งพักไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็น เวลา 30 นาที (ดัดแปลงจาก Lim and Mutijaya, 2007) แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 516 nm โดยใช้เครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Genesys 10S Vis, Thermo scientific) ใช้ BHT เป็นสารมาตรฐาน คำนวณเป็น % inhibition ของสารจากสูตร (% inhibition = [(AbsDPPH –AbsDPPHสารสกัด) x 100] /AbsDPPH)

3. การวิเคราะห์ด้วยวิธี 2, 2'-azinobis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS) radical scavenging assay (ดัดแปลงจาก Nilsson et al., 2005) สารสกัดความเข้มข้น 1%,50 ไมโครลิตร เติม ABTS 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank และคำนวณตามสูตร (% inhibition = [(AbsABTS –AbsABTSสารสกัด) x 100] /AbsABTS)

นำข้อมูลการวิเคราะห์ total phenolic compounds, DPPH radical scavenging assay และ ABTS radical scavenging assay มาวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองตามวิธี Duncan's new multiple range test ด้วยโปรแกรม statistical package for the social sciences (SPSS)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของ IAA และ kinetin ที่มีผลต่อความสูง จำนวนกิ่ง และน้ำหนัก

จากการทดลอง พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA และ kinetin มีอิทธิพลร่วมกัน (interaction) ต่อการชักนำให้เกิดความสูงและจำนวนกิ่ง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่มีผลต่อน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งโดยเนื้อเยื่อพรมมิที่เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม IAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดความสูงเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 80.74±4.10 มิลลิเมตร (Figure 1) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับอาหารที่เติม IAA ร่วมกับ kinetin ที่ระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ส่วนของจำนวนกิ่งจากอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนกิ่งเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 12.67±0.91 กิ่ง ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับอาหารที่เติม IAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีจำนวนกิ่ง เฉลี่ย 11.33±1.04 กิ่ง (Figure 2) และ อาหารที่เติม IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยมีจำนวนกิ่งเฉลี่ย11.20±1.28 นอกจากนี้ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA และ kinetin ต่อน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของพรมมิ (Figure 3) พบว่า kinetin มีผลต่อการเจริญเติบโตอย่างชัดเจน การเพิ่ม IAA ในทุกระดับความเข้มข้นไม่มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักถ้าไม่เติม kinetin แม้ว่าการใช้ IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลผลิตสูงสุดจากการทดลองนี้ (0.87± 0.12 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง) แต่ไม่แตกต่าง ($P> 0.05$) กับชุดการทดลองที่ใช้ IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลผลิตเท่ากับ 0.77± 0.08 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง ดังนั้นการใช้ kinetin เพียง 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น่าจะเพียงพอในการเจริญเติบโตของพรมมิ ทั้งยังเป็นการประหยัดกว่าอีกด้วย

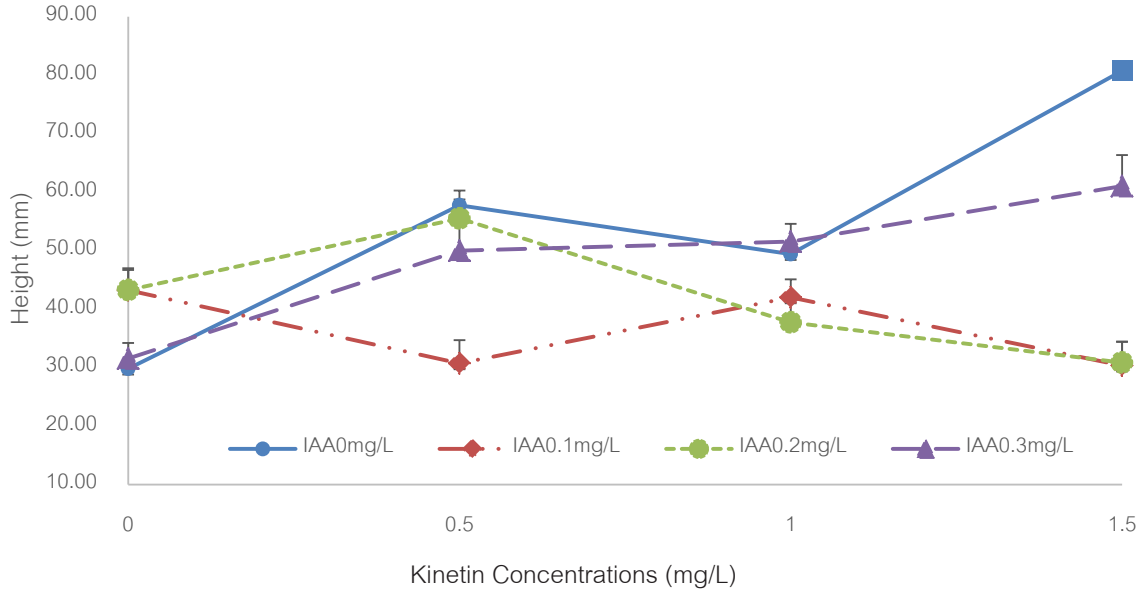

Figure 1 Effect of IAA and kinetin on height (mm.) of *Bacopa monnieri.*

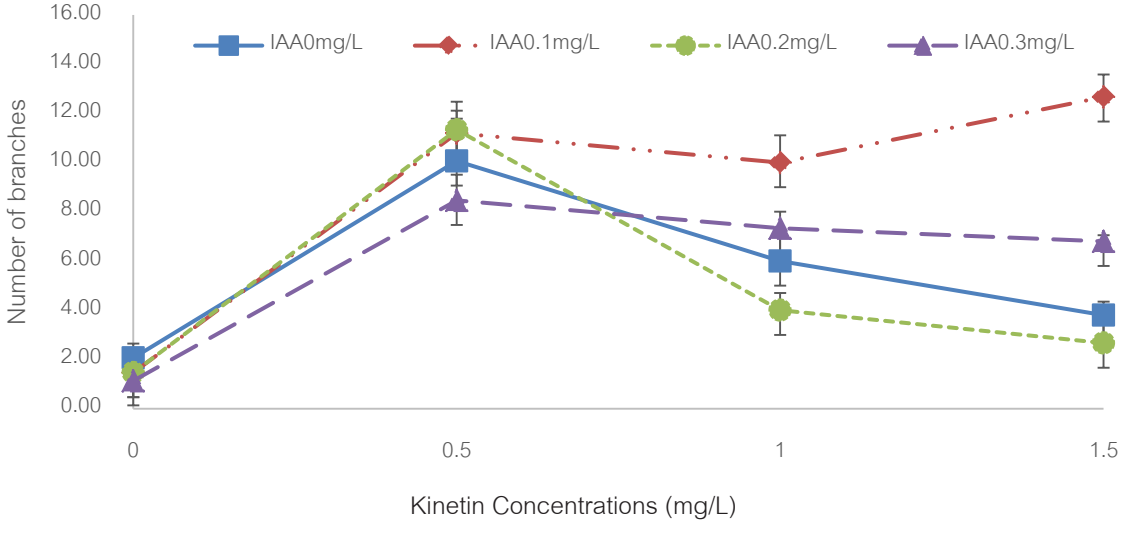

Figure 2 Effect of IAA and kinetin on branch (number) of *Bacopa monnieri.*

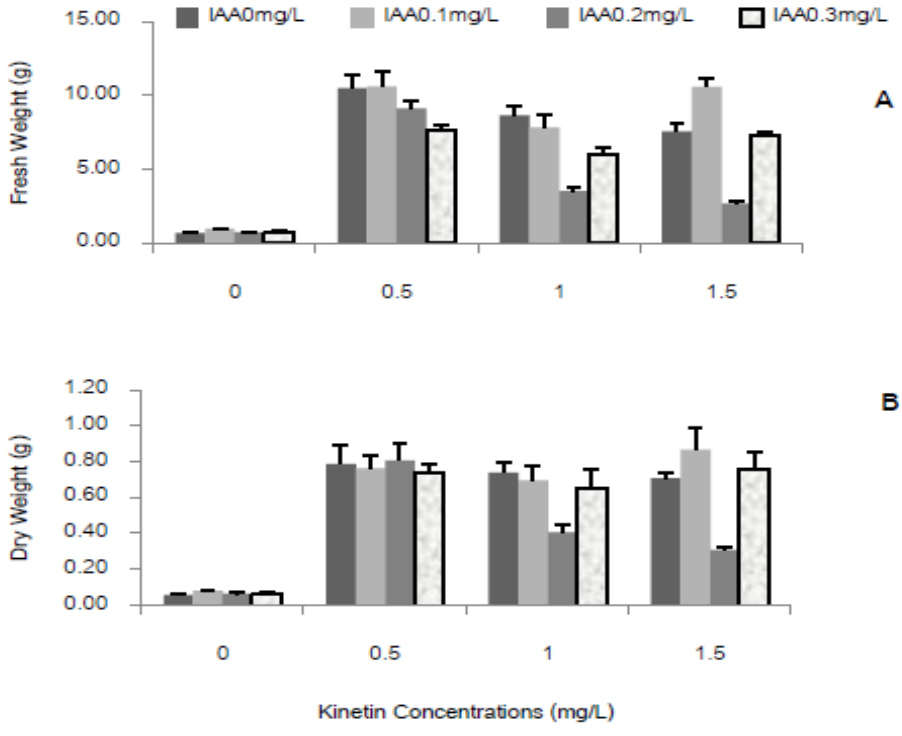

Figure 3 Effect of IAA and kinetin on fresh weight (A) and dry weight (B) of *Bacopa monnieri* after 6 weeks.

ผลของ IAA และ kinetin ที่มีผลต่อการต้านอนุมูลอิสระ

จากการทดลองนำต้นพรมมิ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS โดยการเติม IAA ที่ระดับ 0, 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ อบแห้งแล้วมาสกัด โดยใช้เอทานอล95% พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA และ kinetin มีอิทธิพลร่วมกัน (Interaction) โดยนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ดังวิธีต่อไปนี้

1. **การวิเคราะห์** total phenolic contents (TPC)

การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ โดยการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (TPC) ในพรรณไม้น้ำพรมมิ พบว่าเมื่อเพิ่มระดับ kinetin ค่า TPC เพิ่มสูงขึ้นเกือบสองเท่า จากการทดลองนี้ ความเข้มข้นของ IAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำให้เพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด คือ 44.21±0.27 ไมโครกรัมต่อกรัม (Figure 4) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารเมตาบอไลท์ ทุติยภูมิที่พืชสังเคราะห์ผ่าน phenylpropanoid และทำหน้าที่ป้องกันตัวจากสภาวะเครียด (Dixon and Paiva,1995) สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจมากเพราะมีการนำมาใช้เพื่อเสริมสุขภาพ

2. **การวิเคราะห์** DPPH

การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในพรรณไม้น้ำพรมมิ ด้วยวิธี DPPH พบว่าความสามารถในการทำลาย DPPH ของพรมมิที่ปลูกในระดับความเข้มข้นของ IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำให้เกิดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดที่ 87.89±0.24 % (Figure 5) DPPH เป็นสารอนุมูลอิสระที่มักใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มฟีนอลิก (Ali *et al.,* 2005) การที่ค่า DPPH จากการ

ทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับค่า TPC ที่ได้ อาจเนื่องจากสารประกอบในพรมมิเป็นสารผสมที่มีโครงสร้างซับซ้อนประกอบด้วย ไตรไกลโคซิดิกซาโปนิน บาโคไซด์ จูจูโบเจนิน (Deepak *et al.*, 2005) ไม่ใช่สารฟีนอลิกอย่างเดียว

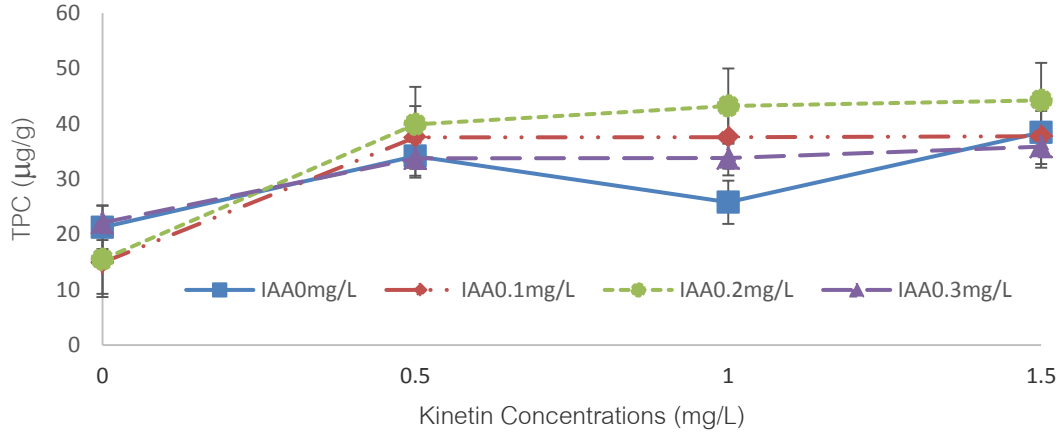

Figure 4 Effect of IAA and kinetin on total phenolic compound (TPC) of *Bacopa monnieri.*

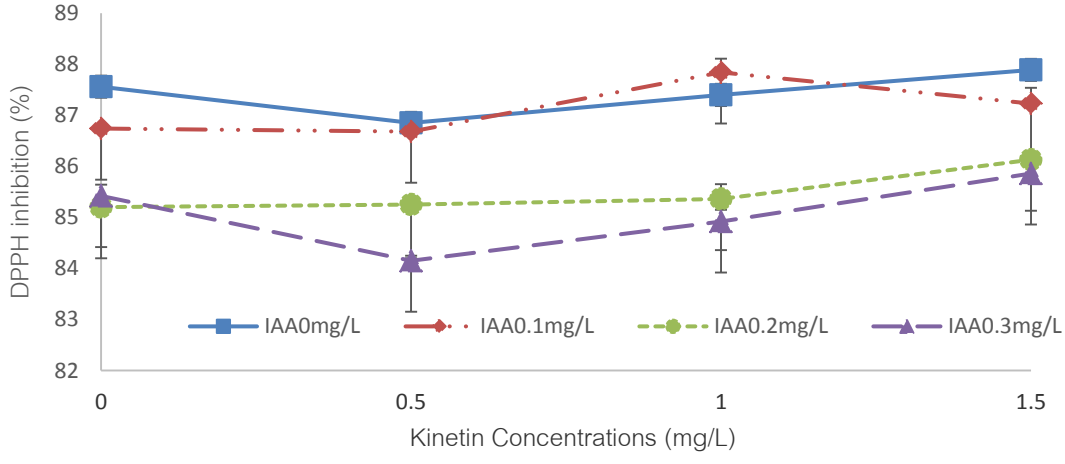

Figure 5 Effect of IAA and kinetin on DPPH scavenging effect (%) of *Bacopa monnieri.*

3. การวิเคราะห์ ABTS

ความสามารถต้านอนุมูลอิสระในพรรณไม้น้ำพรมมิ ด้วยวิธี ABTS พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดพบในชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของ IAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากับ 93.65±0.10% (Figure 6) ซึ่งการประเมินค่าการต้านออกซิเดชั่นด้วยการวัด ABTS จะใช้ความยาวคลื่นที่ 734 นาโนเมตรมีข้อดีคือลดการรบกวนของสี (Li *et al.*, 2008)

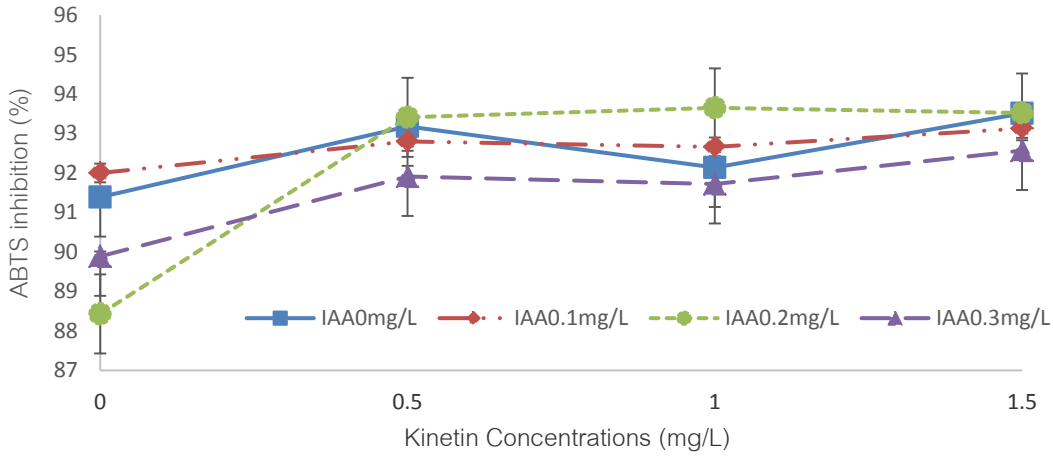

Figure 6 Effect of IAA and kinetin on ABTS radical effect (%) of *Bacopa monnieri*.

สรุป

จากการทดลองศึกษาผลของระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ IAA ร่วมกับ kinetin ต่อการพัฒนาการเจริญเติบโตของพรรณไม้น้ำพรมมิเป็นเวลา 6 สัปดาห์ การเจริญเติบโตของพรรณไม้น้ำพรมมิ ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม IAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดความสูงมากที่สุดคือ 80.74±4.10 และ IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนกิ่งได้ดีคือ 12.67±0.91 กิ่ง ส่วนค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งควรใช้อาหารที่เติม IAA 0.1มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากใช้ปริมาณน้อยแต่ให้ผลเท่ากัน

การต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดพรมมิในการวิเคราะห์ทั้ง 3 วิธี ได้แก่ TPC, DPPH และ ABTS มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่ความเข้มข้นของ IAA 0 .1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารอ้างอิง

ชาญชัย สาดแสงจันทร์. 2556. พรมมิ สมุนไพรเพื่อสุขภาพสมอง. ธรรมศาสตร์เวชสาร 13(4): 554-560.

Ali, M.B., K.W. Yu, E.J. Hahn and K.Y. Paek. 2005. Differential responses of anti-oxidants enzymes, lipoxygenase activity, ascorbate content and the production of saponins in tissue cultured root of mountain *Panax ginseng* CA Mayer and *Panax quinquefolium* L. in bioreactor subjected to methyl jasmonate stress. Plant Science, 169(1): 83-92.

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

Deepak, M., G.K. Sangli, P.C. Arun and A. Amit. 2005. Quantitative determination of the major saponin mixture bacoside A in *Bacopa monnieri* by HPLC. Phytochemical Analysis. 16(1): 24-29.

Dixon, R.A., and N.L. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. The Plant Cell 7 (7) : 1085.

Li, H. B., C.C. Wong, K.W. Cheng and F. Chen. 2008. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. LWT 41: 385–390.

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

Mathew, J., J. Paul, M.S. Nandhu and C.S. Paulose. 2010. *Bacopa monnieri* and Bacoside-A for ameliorating epilepsy

associated behavioral deficits. Fitoterapia. 81: 315-322.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15 (3): 473-497.

Naik, P. M., S. H. Manohar, N. Praveen and H. N. Murthy. 2010. Effects of sucrose and pH levels on in vitro shoot regeneration from leaf explants of *Bacopa monnieri* and accumulation of bacoside A in regenerated shoots. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 100: 235–239.

Nilsson, J., D. Pillai, G. Onning, C. Persson, A. Nilsson and B. Akesson. 2005. Comparison of the 2,29-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to asses the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. Mol. Nutr. Food Res. 49, 239 – 246.

Rastogi, S., R. Pal and D.K. Kulshreshtha. 1994. Bacoside A3-A triterpenoid saponin from *Bacopa monniera*. Phytochemistry 36: 133–137.

Russo, A. and F. Borrelli. 2005. *Bacopa monniera*, a reputed nootropic plant: an overview. Phytomedicine 12: 305–317.

Singh, H.K. and B.N. Dhawan. 1997. Neurophychopharmacological effects of the ayurvedic nootropic *Bacopa monniera* Linn (Brahmi). Indian J Pharmcol 29: 8359–8365.