

การพัฒนาทปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
สำหรับผู้เรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีพวิทยา
ธันวาคม 2559

การพัฒนาบทปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
สำหรับผู้เรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย



ปริญญานิพนธ์
ของ
ปวีรินทร์ รังแก้ว

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ธันวาคม 2559
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การพัฒนาทปฏบัติการวิทยาศาสตร์ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
สำหรับผู้เรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย



บทคัดย่อ
ของ
ปวีณนทร์ รังแก้ว

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีพวิทยา
ธันวาคม 2559

ปวีรินทร์ รังแกว. (2559). การพัฒนาบทปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับผู้เรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย. ปรินูญานิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษาปรินูญานิพนธ์: อาจารย์ ดร.รักษนก โคโต

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการศึกษาศึกษาเทคนิคปลอดเชื้ออย่างง่ายสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อพัฒนาเป็นบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสำหรับผู้เรียนระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย ขั้นแรกของการทดลองคือ การศึกษาวิธีการใหม่เพื่อฆ่าเชื้ออุปกรณ์และอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยใช้วิธีทางเคมีหรือกายภาพ โดยนำอุปกรณ์ 3 ชนิด คือ ปากคิบ ด้ามมีดผ่าตัดและจานเพาะเลี้ยง มาฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี 3 ชนิด ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน พบว่า คลอรีนความเข้มข้น 15% ใช้เวลา 10 นาที และ 20% ใช้เวลา 5 นาที ฆ่าเชื้อได้ 80% ตลอดระยะเวลาการทดลอง 4 สัปดาห์ ส่วนการฆ่าเชื้อในอาหารกึ่งแข็งสูตรมูราชิเกะและสกุ๊ก (Murashige and Skoog, MS) ด้วยคลอรีนปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อขวดขึ้นไป ไม่พบการปนเปื้อนเช่นเดียวกับการใช้เตาไมโครเวฟที่กำลังไฟ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที เมื่อนำอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนที่ความเข้มข้น 50 ไมโครลิตร และเตาไมโครเวฟที่กำลังไฟ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที มาเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นของพิทูเนีย (*Petunia hybrida* E.Vilm) ศึกษาการเจริญของยอด ใบและความสูงของลำต้นเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พิตูเนียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนและเตาไมโครเวฟไม่แตกต่างกัน ($p \geq 0.05$) ปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพิทูเนีย 2 บริเวณคือ ในตู้ปลอดเชื้อและบนโต๊ะปฏิบัติการที่ทำให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงที่ทำในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ ขั้นที่ 2 ของการทดลองคือการนำผลการทดลองมาสร้างบทปฏิบัติการ และสร้างเครื่องมือวัดผลการเรียนรู้ ได้แก่ แบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน จำนวน 20 ข้อและแบบประเมินความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จำนวน 14 ข้อ ขั้นสุดท้ายเมื่อนำบทปฏิบัติการและเครื่องมือวัดผลการเรียนรู้ไปสอนกับนักเรียนกลุ่มที่ศึกษาซึ่งเป็นผู้เรียนระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5 พบว่าคะแนนเฉลี่ยผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนหลังเรียน (15.03) สูงวกาก่อนเรียน (7.46) ($p < 0.05$) และผู้เรียนส่วนใหญ่มีความก้าวหน้าทางการเรียนสูงกว่าคะแนนความก้าวหน้าทางการเรียนรายชั้นซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.60 และจากการสอบถามความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบว่าผู้เรียนมีความพึงพอใจอยู่ในระดับมากทั้งในด้านการจัดการเรียนรู้และด้านบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยมีคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 4.32 ± 0.74 และ 4.11 ± 0.77 ตามลำดับ

DEVELOPMENT OF A LABORATORY PRACTICAL ON PLANT TISSUE CULTURE FOR
SENIOR SECONDARY STUDENTS



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Education Degree in Biology
at Srinakharinwirot University
December 2016

Paweenun Rangkaew. (2016). *Development of a Laboratory Practical on Plant Tissue Culture for Senior Secondary Students*. Master thesis, M.Ed. (Biology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Project Advisor: Rakchanok Koto, Ph.D.

The aim of this research was to study the simple aseptic techniques for plant tissue culture in order to develop of a laboratory practical on plant tissue culture appropriate for senior secondary students. First, to investigate new sterilization techniques for materials and plant culture medium through chemical or physical methods. The three different kinds of tools (forceps, scalpel handles and petri dishes) were sterilized by three different chemicals at various times and concentrations. The results indicated that Clorox bleach applied at a fifteen percent concentration level, for ten minutes and twenty percent for five minutes provided an eighty percent aseptic rate during an experimental period of four weeks. In order to eliminate microbes in semi-solid Murashige and Skoog (MS) media sterilized by Clorox bleach at fifty microlitres per bottle. Furthermore, every volume was found to be contamination-free as well as using microwave ovens at power levels of eight hundred watts for three minutes. Then, the media containing Clorox bleach (fifty microlitres) and the media irradiated in microwave oven (eight hundred watts for three minutes) were used to culture stem explants of petunia (*Petunia hybrida* E. Vilm). The number of shoots, leaves and total stem lengths were evaluated over four weeks. Petunia on Clorox bleach and microwaved media were not different ($p \geq 0.05$) in terms of the number of leaves and total stem length. The culturing of petunia in a modified aquarium and a lab bench were cleaned with seventy percent ethyl alcohol and not found to be contaminated, similar to the culturing process in a laminar air flow cabinet. Second, the results from previous studies were used to construct the laboratory practical and the research instruments included an achievement test (twenty items) and a satisfaction questionnaire (fourteen items). Finally, the laboratory practical and research instruments were applied with Grade Eleven students. The findings showed that the posttest scores (15.03) were higher than the pretest scores (7.46) ($p < 0.05$). Most students had higher gain progression than class normalized gain (0.60). The satisfaction survey regarding teaching plant tissue culture had satisfaction scores at a good level, both in terms of learning management and the laboratory practical by 4.32 ± 0.74 and 4.11 ± 0.77 , respectively.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การพัฒนาทปปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
สำหรับผู้เรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย
ของ
ปวีนันท์ รังแก้ว

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์จักรชัย เอกปัญญาสกุล)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ.2559

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร.รักษนก โตโต)

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.รักษนก โตโต)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.บุญรอด ชาดิยานนท์)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาด้านการให้คำปรึกษา แนะนำทาง ตลอดจนตรวจแก้ไขจาก อาจารย์ ดร.รักษนก โคโต อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ ประธานกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาในการศึกษาค้นคว้าด้านวิชาการศึกษาและแนะแนวทางในการปฏิบัติ รวมถึงอาจารย์ ดร.บุญรอด ชาดิยานนท์ กรรมการสอบปริญญานิพนธ์สำหรับข้อเสนอแนะเพิ่มเติมอันเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงแก้ไขปริญญานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมชัย วงศ์วัฒน์ อาจารย์ ดร.วชิราภรณ์ พิกุลทอง และอาจารย์นันทวรรณ ชื่นชมคุณากร ที่ให้ความกรุณาเป็นผู้เชี่ยวชาญในการตรวจสอบเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ตลอดจนให้คำแนะนำและแก้ไขเครื่องมือในการวิจัยเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณท่านผู้อำนวยการโรงเรียนสายน้ำผึ้ง ในพระอุปถัมภ์ฯ ที่อนุเคราะห์สถานที่สำหรับเก็บข้อมูลงานวิจัย คุณครูเนาวรัตน์ รุ่งเรืองบางชัน หัวหน้ากลุ่มสาระการเรียนรู้วิทยาศาสตร์ และคุณครูณิชาภัทร ใจยะทิ สำหรับคำแนะนำและให้ความร่วมมือในเก็บข้อมูลกับกลุ่มผู้เรียนที่ศึกษา ตลอดจนเอื้อเฟื้อเครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับใช้ในการเก็บข้อมูล

คุณค่าและประโยชน์ทั้งหลายจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขออุทิศแด่พระคุณของบิดามารดา ครูอาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

ปวีนันท์ รังแก้ว

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
ตัวแปรที่ใช้ในการศึกษา.....	5
สมมติฐานในงานวิจัย.....	6
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	6
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
การจัดการเรียนรู้กลุ่มสาระวิชาวิทยาศาสตร์ รายวิชาชีววิทยา.....	8
บทปฏิบัติการ.....	10
ความหมายของบทปฏิบัติการ.....	10
การสร้างบทปฏิบัติการ.....	10
การจัดการเรียนรู้ด้วยบทปฏิบัติการ.....	11
ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน.....	13
ความหมายของผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน.....	13
การสร้างแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน.....	14
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	15
ความหมายการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	15
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	17
ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	26
พิทูเนีย (Petunia).....	28
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพิทูเนีย.....	28
ประเภทของพิทูเนีย.....	29
บทปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	30
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	31
งานวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพิทูเนีย.....	31
งานวิจัยเกี่ยวกับการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	
โดยไม่ใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ.....	32

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
2 (ต่อ)	
งานวิจัยเกี่ยวกับการจัดการเรียนรู้โดยใช้บทปฏิบัติการ.....	33
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	35
ตอนที่ 1 การสำรวจความคิดเห็นในการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	35
ตอนที่ 2 การทดลองในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์.....	36
การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ด้วยสารเคมี.....	36
การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ด้วยสารเคมีคลอโรกซ์และเตาไมโครเวฟ.....	38
การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีคลอโรกซ์และเตาไมโครเวฟต่อ การเจริญเติบโตของพืช.....	39
การศึกษาประสิทธิภาพบริเวณปฏิบัติงานในการย้ายเนื้อเยื่อ.....	39
ตอนที่ 3 การสร้างและพัฒนาบทปฏิบัติการ.....	40
การสร้างและพัฒนาบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	40
การสร้างและหาคุณภาพเครื่องมือวัดผลการเรียนรู้.....	41
ตอนที่ 4 การนำบทปฏิบัติการและเครื่องมือวัดผลการเรียนรู้ไปสอน.	42
ผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา.....	42
เนื้อหาที่ใช้ในการสอน.....	42
ระยะเวลาที่ใช้ในการสอน.....	42
การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	42
การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิจัย.....	43
4 ผลการทดลอง.....	46
ตอนที่ 1 การสำรวจความคิดเห็นในการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	46
ตอนที่ 2 การทดลองในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์.....	47

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 (ต่อ)	
การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วย สารเคมี.....	47
การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ด้วยสารเคมีคลอโรกซ์และเตาไมโครเวฟ.....	51
การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีคลอโรกซ์และเตาไมโครเวฟต่อการ เจริญเติบโตของพืช.....	54
การศึกษาประสิทธิภาพบริเวณปฏิบัติงานในการย้ายเนื้อเยื่อ.....	56
ตอนที่ 3 การสร้างและพัฒนาบทปฏิบัติการ.....	57
การสร้างและพัฒนาบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	57
การสร้างและหาคุณภาพเครื่องมือวัดผลการเรียนรู้.....	57
ตอนที่ 4 การนำบทปฏิบัติการที่สร้างขึ้นไปสอน.....	57
ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	57
ผลวิเคราะห์ความก้าวหน้าทางการเรียน ของผู้เรียนที่ได้รับ การจัดการเรียนรู้ด้วยบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อพืช.....	58
ระดับความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	59
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	61
สรุปผลการวิจัย.....	61
อภิปรายผลการวิจัย.....	64
ข้อเสนอแนะ.....	69
บรรณานุกรม.....	71
ภาคผนวก.....	83

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	124



บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ชนิดและปริมาณสารละลายเข้มข้นของอาหารสูตร MS (1962).....	19
2 แบบแผนการวิจัยแบบกลุ่มเดียวทดสอบก่อนและหลังทดลอง (one group pretest-posttest design).....	43
3 ผลการสำรวจความคิดเห็นเกี่ยวกับการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อพืชของผู้สอนรายวิชาชีววิทยาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอน ปลาย.....	47
4 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลังจาก ทำการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีที่แตกต่างกัน	49
5 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (%) ในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลังจาก ทำการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีที่แตกต่างกัน.....	50
6 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS หลังจาก ทำการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีคลอริกซ์และเตาไมโครเวฟ.....	52
7 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (%) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS หลังจากทำการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอริกซ์และ เตาไมโครเวฟ.....	53
8 จำนวนยอด/ลำต้น ใบ และความสูงของลำต้นของ พืชมะเขือ (P. hybrida E.Vilm) บนอาหาร เพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อ ด้วยสารเคมีคลอริกซ์และเตาไมโครเวฟ.....	54
9 เปรียบเทียบคะแนนผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนระหว่างก่อนเรียนและ หลังเรียนด้วยบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยใช้สถิติ t-test for dependent samples.....	58
10 ค่าความก้าวหน้าทางการเรียนของผู้เรียนที่ได้รับการจัดการเรียนรู้ ด้วยบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	59
11 ความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	60
12 ผลประเมินความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหา และค่าดัชนีความสอดคล้อง (IOC) ของบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การทดลองที่ 1 เรื่อง การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	88

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
13 ผลประเมินความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหา และค่าดัชนีความสอดคล้อง (IOC) ของบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การทดลองที่ 2 เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	90
14 ผลประเมินคุณภาพของบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช...	92
15 ผลการวิเคราะห์ค่าความยาก-ง่าย (p) และค่าอำนาจจำแนก (r) ของแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน เรื่อง การเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อพืช.....	93



บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 การเจริญของเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืชที่พบได้เมื่อนำมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ.....	17
2 โมเลกุลของน้ำที่เปลี่ยนทิศสลับไปมาอย่างรวดเร็ว ตามทิศทางของสนามไฟฟ้าทำให้เกิดความร้อนในอาหาร.....	23
3 ลักษณะลำต้น ใบและดอกของต้นพิทูเนีย (<i>Petunia hybrida</i> E.Vilm).....	29
4 ตัวอย่างลักษณะการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นบนอาหาร MS ที่ใช้ทดสอบด้ามมีดผ่าตัด ปากคีบ และจานเพาะเลี้ยง ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี.....	48
5 ตัวอย่างลักษณะการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นบนอาหาร MS ที่ใช้ทดสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม.....	51
6 ตัวอย่างลักษณะการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นบนอาหาร MS ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟด้วยกำลังไฟที่ต่ำกว่า 800 วัตต์..	53
7 การเจริญของยอด ใบและลำต้นของชิ้นส่วนลำต้นพิทูเนียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	55
8 การเจริญของยอด ใบและลำต้นของชิ้นส่วนลำต้นพิทูเนียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ทำการถ่ายเนื้อเยื่อภายในตู้ปลาที่ดัดแปลงเป็นตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	56
9 ภาพตัวอย่างการสอนด้วยบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา.....	121

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

การจัดการเรียนรู้ในปัจจุบัน เป็นการปฏิรูปการเรียนรู้ตามพระราชบัญญัติการศึกษาแห่งชาติ พ.ศ. 2542 แก้ไขเพิ่มเติม 2545 (ฉบับที่ 2) และ พ.ศ. 2553 (ฉบับที่ 3) โดยสาระสำคัญหมวด 4 แนวการจัดการศึกษา มาตรา 22 ระบุว่าหลักการจัดการเรียนรู้ ต้องยึดหลักว่าผู้เรียนทุกคนมีความสามารถเรียนรู้และพัฒนาตนเองได้ และถือว่าผู้เรียนมีความสำคัญที่สุด โดยกระบวนการจัดการเรียนรู้ต้องส่งเสริมให้ผู้เรียนสามารถพัฒนาตามธรรมชาติและเต็มตามศักยภาพ และมาตรา 24 ระบุว่ากระบวนการจัดการเรียนรู้ ต้องจัดเนื้อหาสาระและกิจกรรมให้สอดคล้องกับความสนใจและความถนัดของผู้เรียน โดยคำนึงถึงความแตกต่างระหว่างบุคคล ผูกทักษะ กระบวนการคิด การจัดการ การเผชิญสถานการณ์ การประยุกต์ความรู้มาใช้เพื่อป้องกันและแก้ไขปัญหา และให้ผู้เรียนได้เรียนรู้จากประสบการณ์จริง (การจัดการเรียนการสอนที่เน้นผู้เรียนเป็นสำคัญ. 2552: ออนไลน์; กันยา มั่นเรืองศรี. 2558: ออนไลน์)

การสอนด้วยบทปฏิบัติการ (laboratory practical) จัดเป็นนวัตกรรมทางการศึกษารูปแบบหนึ่งที่เน้นผู้เรียนเป็นสำคัญ ซึ่งส่งเสริมให้ผู้เรียนได้รับประสบการณ์ตรงจากการสังเกตและทำการทดลองด้วยตนเอง ช่วยให้ผู้เรียนมีความสนใจบทเรียนมากขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความชำนาญในการใช้อุปกรณ์เครื่องมือในการทดลอง เพิ่มพูนความสามารถในการทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ ดังเช่นงานวิจัยเกี่ยวกับการจัดการเรียนรู้โดยใช้บทปฏิบัติการของ วิศิษฐ์ศรี โตศุกลวรรณ (2556) ได้ศึกษาผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนและความก้าวหน้าทางการเรียนของผู้เรียน 2 กลุ่ม ที่ได้รับการจัดการเรียนรู้ที่แตกต่างกันระหว่างวิธีทำบทปฏิบัติการก่อนบรรยายและวิธีบรรยายก่อนทำบทปฏิบัติการ พบว่า กลุ่มผู้เรียนที่ได้รับการสอนด้วยวิธีทำบทปฏิบัติการก่อนบรรยายมีคะแนนเฉลี่ยหลังเรียนและความก้าวหน้าทางการเรียนสูงกว่ากลุ่มผู้เรียนที่ได้รับการสอนด้วยวิธีบรรยายก่อนทำบทปฏิบัติการ สอดคล้องกับงานวิจัยของ ยศวดี จิตวร (2557) ได้ศึกษาผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนวิทยาศาสตร์และทักษะทางวิทยาศาสตร์ของผู้เรียนที่ได้รับการสอนโดยใช้บทปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ เรื่อง เทคนิคโครมาโตกราฟีและเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า ผู้เรียนมีผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนสูงกว่าก่อนเรียนและมีทักษะทางวิทยาศาสตร์เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นไปตามจุดมุ่งหมายของหลักสูตรแกนกลางการศึกษาขั้นพื้นฐานพุทธศักราช 2551 ที่มีเป้าหมายให้ผู้เรียนได้รับการพัฒนา

ทั้งด้านความรู้ กระบวนการคิด กระบวนการสืบเสาะหาความรู้ การแก้ปัญหา ความสามารถในการสื่อสาร สามารถนำความรู้ไปใช้ในชีวิตประจำวัน เพื่อให้ผู้เรียนเป็นมนุษย์ที่สมบูรณ์ในมิติต่าง ๆ ได้แก่ ร่างกาย จิตใจ สติปัญญา ความรู้และคุณธรรม โดยให้เป็นไปอย่างต่อเนื่องตลอดชีวิตและมีคุณภาพ อันจะส่งผลต่อการพัฒนาที่มีความสมดุลระหว่างส่วนบุคคล ส่วนรวมและประเทศชาติ (สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2557)

การจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย มีอยู่ในหนังสือเรียนรายวิชาเพิ่มเติมวิทยาศาสตร์ ชีววิทยาเล่ม 3 จัดทำขึ้นโดยสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ซึ่งเป็นไปตามหลักสูตรแกนกลางการศึกษาขั้นพื้นฐาน พุทธศักราช 2551 เพื่อให้สถานศึกษาได้นำไปใช้เทียบเคียงกับหลักสูตรของสถานศึกษาได้อย่างเหมาะสมนั้น พบปัญหาในสถานศึกษาหลายแห่งโดยเฉพาะโรงเรียนขนาดกลางและขนาดเล็ก เนื่องจากมีข้อจำกัดด้านเวลาในการจัดการเรียนรู้ซึ่งไม่เพียงพอในการเรียนรู้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างครบวงจร และความพร้อมไม่พร้อมของสถานที่ในการทำปฏิบัติการ รวมทั้งอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ต้องผ่านการฆ่าเชื้อ โดยปกตินิยมใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ซึ่งมีราคาแพง จึงทำให้การจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในระดับมัธยมศึกษาส่วนใหญ่จำกัดเฉพาะในภาคทฤษฎีเท่านั้น ส่งผลให้การเรียนรู้ของผู้เรียนไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร เนื่องจากผู้เรียนไม่เข้าใจเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ และมองไม่เห็นภาพรวมของกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และไม่มีโอกาสในการทดลองซึ่งเป็นการเรียนรู้จากการลงมือทำ (hands-on) โดยตรง

ในการปฏิบัติงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชผู้ปฏิบัติต้องมีความรู้ทางเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นอย่างดี และเพื่อให้ทุกกระบวนการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออยู่ในสภาวะปลอดเชื้อจะต้องทำการฆ่าเชื้อตั้งแต่วัสดุอุปกรณ์ สถานที่ในการปฏิบัติงาน รวมไปถึงอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย ปัจจุบันมีการคิดค้นวิธีการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์แทนการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ซึ่งมีราคาแพง โดยวิธีการฆ่าเชื้อที่เคยมีผู้ทำการศึกษา ได้แก่ การฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี (chemical sterilization) เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (Curvetto; et al. 2006: 497-500) โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ($NaClO$) (Teixeira; et al. 2006: 375-378) คลอรีน (Cl) (Yanagawa; et al. 2007: 289-298) ซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) (Kubota; & Tadokoro. 1999: 296-298) และการฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟ (microwave sterilization) (Fuller; & Pizzey. 2001: 567-570; Tisserat; et al. 1992: 358-361)

จากปัญหาดังกล่าว ผู้วิจัยเห็นความสำคัญของการส่งเสริมให้ผู้เรียนได้เรียนรู้ด้วยตนเอง และได้ใช้ทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ในการแก้ปัญหาโดยสร้างและพัฒนาบทปฏิบัติการ

เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับผู้เรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้สามารถใช้เป็นทางเลือกใหม่ให้กับผู้สอนในการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยใช้สารเคมีคลอโรกซ์ในการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแทนการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ และการใช้ตูปลูกที่ดัดแปลงขึ้นแทนการใช้ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (laminar air flow) ซึ่งสามารถลดข้อจำกัดด้านวัสดุอุปกรณ์ได้

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการฆ่าเชื้ออุปกรณ์และอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมโดยไม่ใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
2. เพื่อศึกษาผลของอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่าง ๆ ที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดและรากของชิ้นเนื้อเยื่อพืช
3. เพื่อสร้างและพัฒนาบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับผู้เรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย
4. เพื่อเปรียบเทียบผลสัมฤทธิ์ทางเรียนก่อนเรียนและหลังเรียนของผู้เรียนที่ได้รับการจัดการเรียนรู้ด้วยบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับผู้เรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย

ความสำคัญของการวิจัย

ผลจากการวิจัยครั้งนี้ มีประโยชน์ดังนี้

1. เพื่อให้ได้มาซึ่งบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับครูกลุ่มสาระการเรียนรู้วิทยาศาสตร์ รายวิชาชีววิทยา ในการนำไปใช้จัดการเรียนรู้ออกแบบกับนักเรียนระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายให้เกิดประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น
2. เพื่อให้ผู้เรียนที่เรียนด้วยบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเข้าใจในเรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้อย่างครบวงจร มีผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนและความก้าวหน้าทางเรียนที่สูงขึ้น

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้แบ่งวิธีการดำเนินงาน ดังนี้

ตอนที่ 1 การสำรวจความคิดเห็นในการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ศึกษาหลักสูตร สารการเรียนรู้ มาตรฐานการเรียนรู้และตัวชี้วัดรายวิชา วิทยาศาสตร์
2. สร้างแบบสอบถามความคิดเห็นเกี่ยวกับการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
3. นำแบบสอบถามที่ไปสอบถามความคิดเห็นกับผู้สอนรายวิชาชีววิทยา ระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย ที่มีประสบการณ์สอน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จำนวน 20 คน

ตอนที่ 2 การทดลองในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์

1. ศึกษาวิธีการฆ่าเชื้ออุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยสารเคมี 3 ชนิด ได้แก่ คลอโรกซ์ (Clorox) เอทิลแอลกอฮอล์ 70% (ethyl alcohol 70%) และเดทตอล (Dettol)
2. ศึกษาการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยคลอโรกซ์และเตาไมโครเวฟ เพื่อหาความเข้มข้นของคลอโรกซ์ กำลังของคลื่นไมโครเวฟ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการยับยั้งการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์
3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของชิ้นส่วนลำต้นพืชเนื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์และเตาไมโครเวฟ ได้แก่ จำนวนยอด จำนวนใบ และความสูงของลำต้น
4. ศึกษาการปฏิบัติงานถ่ายเนื้อเยื่อภายในตู้ปลาที่ดัดแปลงเป็นตู้ถ่ายเนื้อเยื่อและบนโต๊ะปฏิบัติการ

ตอนที่ 3 การสร้างและพัฒนาบทปฏิบัติการและเครื่องมือวัดผลการเรียนรู้

ผู้วิจัยนำผลการทดลองที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์มาสร้างและพัฒนาบทปฏิบัติการ และดำเนินการสร้างเครื่องมือในการวัดผลการเรียนรู้ ดังนี้

1. สร้างบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
2. สร้างแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน
3. สร้างแบบประเมินความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ด้วยบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

4. ตรวจสอบคุณภาพของบทปฏิบัติการและเครื่องมือในการวัดผลการเรียนรู้ โดยผู้เชี่ยวชาญ จำนวน 3 ท่าน เพื่อตรวจประเมินความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหา (content validity) ค่าดัชนีความสอดคล้อง (IOC) และคุณภาพของบทปฏิบัติการที่สร้างและพัฒนาขึ้น

5. นำบทปฏิบัติการและเครื่องมือในการวัดผลการเรียนรู้ที่ดำเนินการปรับปรุงแก้ไขแล้วไปทดลองใช้กับผู้เรียนที่ไม่ใช่กลุ่มที่ศึกษา ซึ่งก็คือผู้เรียนระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนขนาดใหญ่แห่งหนึ่ง ในเขตคลองเตย จังหวัดกรุงเทพมหานคร จำนวน 30 คน ซึ่งได้จากการชักตัวอย่างแบบเจาะจง (purposive sampling) เพื่อหาข้อบกพร่องของบทปฏิบัติการ และวิเคราะห์หาค่าความยากง่าย (p) ค่าอำนาจจำแนก (r) และค่าความเชื่อมั่นของแบบทดสอบ

ตอนที่ 4 การนำบทปฏิบัติการที่สร้างขึ้นไปสอนจริงกับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา

1. ผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา คือ ผู้เรียนระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5 โรงเรียนขนาดใหญ่แห่งหนึ่ง ในเขตคลองเตย จังหวัดกรุงเทพมหานคร จำนวน 39 คน ซึ่งได้จากการชักตัวอย่างแบบเจาะจง (purposive sampling)
2. ประเมินความรู้ของผู้เรียนก่อนลงมือทำบทปฏิบัติการด้วยแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนก่อนเรียน
3. ให้ผู้เรียนลงมือทำบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยผู้สอนมีหน้าที่ให้คำแนะนำระหว่างที่ผู้เรียนลงมือทำบทปฏิบัติการ (facilitator)
4. หลังจากเสร็จสิ้นการทำบทปฏิบัติการ ให้ผู้เรียนทำแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนหลังเรียนซึ่งเป็นชุดเดียวกันกับแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนก่อนเรียน
5. ประเมินความพึงพอใจของผู้เรียนโดยใช้แบบประเมินความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ด้วยบทปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ด้าน คือ ด้านการจัดการเรียนรู้และบทปฏิบัติการ

ตัวแปรที่ใช้ในการศึกษา

ตัวแปรอิสระ ได้แก่ การสอนด้วยบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ตัวแปรตาม ได้แก่

1. ผลสัมฤทธิ์ทางเรียน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และความก้าวหน้าทางการเรียนของผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา
2. ความพึงพอใจของผู้เรียนหลังจากที่เรียนด้วยบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สมมติฐานของงานวิจัย

1. บทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับผู้เรียนระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย มีคุณภาพอยู่ในระดับดี
2. ผู้เรียนที่ได้รับการจัดการเรียนรู้โดยใช้บทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนและความก้าวหน้าทางการเรียน สูงขึ้นกว่าก่อนเรียนอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05
3. ผู้เรียนมีความพึงพอใจต่อการจัดการเรียนรู้ด้วยบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อยู่ในระดับมาก

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หมายถึง เทคนิคที่ใช้ในการขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศ โดยการนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช ได้แก่ เซลล์ อวัยวะ หรือเนื้อเยื่อ มาเลี้ยงในหลอดทดลอง (in vitro) ซึ่งมีอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน รวมทั้งอาจเติมสารควบคุมความเจริญเติบโตลงไปด้วย ซึ่งทั้งหมดนี้กระทำภายใต้สภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์และมีการควบคุมอุณหภูมิ แสง และความชื้น ส่วนต่าง ๆ ของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงนี้สามารถพัฒนาและเจริญเป็นต้นใหม่ที่มีรากที่สมบูรณ์สำหรับการนำไปปลูกลงดินต่อไป
2. คลอโรกซ์ (Clorox) หมายถึง สารเคมีซึ่งใช้เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อ มีส่วนผสมของโซเดียม-ไฮโปคลอไรต์ 5.25% โดยปริมาตร
3. การสอนโดยใช้บทปฏิบัติการ หมายถึง การจัดการเรียนรู้โดยใช้บทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่ผู้วิจัยสร้างและพัฒนาขึ้นจากผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย ชี้อบบทปฏิบัติการ เนื้อหาบทปฏิบัติการ จุดประสงค์ ระยะเวลาที่ใช้ อุปกรณ์ วิธีดำเนินการทดลอง แบบรายงานผลการทดลองและคำถามท้ายบทปฏิบัติการ โดยบทปฏิบัติการ ประกอบด้วย การทดลอง 2 ตอน ดังนี้
 - การทดลองที่ 1 เรื่อง การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
 - การทดลองที่ 2 เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
4. ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนวิทยาศาสตร์ หมายถึง ความสามารถในการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ของผู้เรียนในระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5 จำนวน 39 คน ซึ่งได้จากการชักตัวอย่างแบบเจาะจง โดยพิจารณาจากคะแนนของผู้เรียนในการทำแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์

ทางการเรียนที่ผู้วิจัยสร้างขึ้น ซึ่งเป็นแบบปรนัย 4 ตัวเลือก จำนวน 20 ข้อ โดยวัดพฤติกรรมการเรียนรู้ 3 ด้าน คือ

4.1 ความรู้ความจำ หมายถึง ความสามารถในการระลึกสิ่งที่เรียนมาแล้วเกี่ยวกับข้อเท็จจริง ข้อตกลง คำศัพท์ หลักการ และทฤษฎีทางวิทยาศาสตร์หรือความสามารถทางสมอง

4.2 ความเข้าใจ หมายถึง ความสามารถในการอธิบายเกี่ยวกับข้อเท็จจริงจากข้อมูล กฎ หลักการ ทฤษฎี

4.3 การนำไปใช้ หมายถึง ความสามารถในการนำความรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และวิธีการต่าง ๆ มาใช้ในการแก้ปัญหาและสามารถต่อยอดในการทดลองเรื่องอื่น ๆ



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

1. การจัดการเรียนรู้กลุ่มสาระวิชาวิทยาศาสตร์ รายวิชาชีววิทยา
2. บทปฏิบัติการ
 - 2.1 ความหมายของบทปฏิบัติการ
 - 2.2 การสร้างบทปฏิบัติการ
 - 2.3 การจัดการเรียนการสอนปฏิบัติการ
3. ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน
 - 3.1 ความหมายของผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน
 - 3.2 การสร้างแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน
4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
 - 4.1 ความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
 - 4.2 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
 - 4.3 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
5. พืชเนย (*Petunia hybrida* E.Vilm)
 - 5.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชเนย
 - 5.2 ประเภทของพืชเนย
6. บทปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
7. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
 - 7.1 งานวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเนย
 - 7.2 งานวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ใช้หม้อน้ำความดันไอน้ำ
 - 7.3 งานวิจัยเกี่ยวกับการเรียนการสอนโดยใช้บทปฏิบัติการการวิทยาศาสตร์

1. การจัดการเรียนรู้กลุ่มสาระวิชาวิทยาศาสตร์ รายวิชาชีววิทยา

การจัดการเรียนรู้กลุ่มสาระวิทยาศาสตร์ตามหลักสูตรแกนกลางการศึกษาขั้นพื้นฐาน พุทธศักราช 2551 นอกจากจะเป็นการจัดการเรียนรู้ที่เน้นผู้เรียนเป็นสำคัญ เพื่อให้ผู้เรียนได้พัฒนา

เต็มศักยภาพ สามารถเรียนรู้ได้ด้วยตนเอง และรู้จักแสวงหาความรู้ได้อย่างต่อเนื่องตลอดชีวิตแล้ว สิ่งที่ควรยึดถือในการจัดการเรียนรู้วิทยาศาสตร์คือควรอยู่บนพื้นฐานของการจัดการเรียนรู้ที่ หลากหลายวิธีร่วมกัน ซึ่งโดยทั่วไปการจัดการเรียนรู้วิทยาศาสตร์ที่ดีควรมีลักษณะที่เน้นให้ผู้เรียน ได้ลงมือทดลอง กระตุ้นให้ผู้เรียนได้คิด ส่งเสริมให้ผู้เรียนได้ใช้ทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ที่ ถูกต้อง และผู้เรียนสามารถนำเนื้อหาที่เรียนรู้ไปใช้ในชีวิตประจำวันได้

สาระชีววิทยาเป็นสาระหนึ่งของกลุ่มสาระการเรียนรู้วิทยาศาสตร์ ซึ่งมีการจัดการเรียนรู้ที่ มุ่งเน้นกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ ประกอบด้วย การสังเกต การรวบรวมข้อมูล การทดลอง และ การสรุปผลเป็นสำคัญ ดังนั้นจึงเป็นการส่งเสริมให้ผู้เรียนให้เกิดพฤติกรรมการเรียนรู้ใน 3 ด้าน คือ (พฤติกรรมการสอนชีววิทยา. 2559: ออนไลน์)

ด้านที่ 1 พุทธิพิสัย (cognitive domain) หมายถึง พฤติกรรมทางด้านสมอง ซึ่งเกี่ยวกับ สติปัญญา ความรู้ ความสามารถในการคิดเรื่องราวต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งการจัดการ เรียนรู้ในปัจจุบันยังเน้นในด้านนี้มาก

ด้านที่ 2 จิตพิสัย (affective domain) หมายถึง พฤติกรรมทางด้านจิตใจ ซึ่งเกี่ยวกับ ค่านิยม ความรู้สึก ทศนคติ ความเชื่อ ความสนใจ และคุณธรรม พฤติกรรมของผู้เรียนในด้านนี้ อาจจะไม่มีเกิดขึ้นในทันที ดังนั้น การจัดการเรียนรู้จะต้องใช้วิธีปลูกฝังโดยจิตสภาพแวดล้อมที่ เหมาะสม และสอดแทรกสิ่งที่ต้องการถ่ายทอดให้ผู้เรียนอยู่ตลอดเวลา เพื่อเปลี่ยนพฤติกรรมของ ผู้เรียนไปในแนวทางที่พึงประสงค์

ด้านที่ 3 ทักษะพิสัย (psychomotor domain) หมายถึง พฤติกรรมการเรียนรู้ที่บ่งชี้ถึง ความสามารถในการปฏิบัติงานได้อย่างคล่องแคล่ว ชำนาญ พฤติกรรมด้านนี้จะเห็นได้จากกระทำ ได้โดยตรง โดยมีเวลาและคุณภาพของงานเป็นตัวชี้ระดับของทักษะที่เกิดขึ้นว่ามีมากน้อยเพียงใด

อย่างไรก็ตาม ในการจัดการเรียนรู้นั้นไม่มีวิธีใดวิธีหนึ่งที่ดีที่สุด ดังนั้นผู้สอนจะต้องใช้ ดุลยพินิจในการเลือกวิธีการจัดการเรียนรู้ให้เหมาะสมในแต่ละสถานการณ์หรือแต่ละเนื้อเรื่อง ซึ่งไม่ จำเป็นต้องใช้เพียงวิธีเดียวโดยตลอด เช่น เนื้อเรื่องหนึ่งผู้สอนอาจจะใช้วิธีการบรรยายเพื่อเริ่มต้น การเรียน หรือเพื่อแนะนำเรื่องใหม่ หรือเพื่ออธิบายสิ่งที่เข้าใจยาก แล้วตามด้วยวิธีการสาธิต หรือ ผู้สอนให้ผู้เรียนทำการทดลองเป็นกลุ่มหรือเป็นรายบุคคล และในตอนสุดท้ายให้สรุปผลโดยการ อภิปรายเป็นกลุ่ม แล้วเสนอผลงานแต่ละกลุ่มหน้าชั้นเรียน เป็นต้น การจัดการเรียนรู้วิทยาศาสตร์ที่ เป็นที่นิยม ได้แก่ การจัดการเรียนรู้แบบสืบเสาะหาความรู้ (inquiry method) การจัดการเรียนรู้โดย การสาธิต (demonstration method) การจัดการเรียนรู้โดยใช้บทปฏิบัติการ (laboratory method)

และการศึกษานอกสถานที่ (field trip) (ภาพ เลขาไพบูลย์. 2542: 123; อัญชลี สิริพันธ์วรารัง. 2543: 19)

2. บทปฏิบัติการ

2.1 ความหมายของบทปฏิบัติการ

พรทิพย์ วงศ์นาป่า (2548: 48) ได้ให้ความหมายของ “บทปฏิบัติการ” ว่าเป็น กิจกรรมหรือการทดลองที่สร้างขึ้น เพื่อมุ่งเน้นให้ผู้เรียนได้สร้างองค์ความรู้จากการได้ทดลองด้วยตนเอง เกิดความสามารถด้านทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ และสามารถนำความรู้และความสามารถที่เกิดขึ้นไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อสังคมและท้องถิ่นได้ โดยขณะทำปฏิบัติการ ผู้สอนเป็นเพียงผู้ให้คำแนะนำเท่านั้น

วารีย์ บุญลือ (2550: 13) ได้ให้ความหมายของ “บทปฏิบัติการ” ว่าเป็นการจัด กิจกรรมการเรียนรู้ให้ผู้เรียนได้ปฏิบัติจริง เน้นทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์และทักษะปฏิบัติ ของผู้เรียน เพื่อให้ผู้เรียนลงมือปฏิบัติได้อย่างชำนาญ คล่องแคล่วและปลอดภัยและมีการจัดทำ รายงาน โดยผู้สอนมีบทบาทเป็นที่ปรึกษา

บุญรอด ชาตียนนท์ (2556: 11) ได้ให้ความหมายของ “บทปฏิบัติการ” ว่าเป็น นวัตกรรมที่สร้างขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอน ทำให้ผู้เรียนได้สร้างองค์ความรู้ใหม่จากการทดลอง ด้วยตนเอง โดยมีผู้สอนเป็นผู้ให้คำแนะนำแนวทางระหว่างทำปฏิบัติการ

จากความหมายข้างต้น ผู้วิจัยสรุปได้ว่า บทปฏิบัติการ หมายถึง นวัตกรรมที่ใช้ในการจัดการเรียนรู้ที่เน้นให้ผู้เรียนได้ลงมือทดลองเพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่ด้วยตนเอง โดยใช้ทักษะ กระบวนการทางวิทยาศาสตร์และทักษะการปฏิบัติของผู้เรียน โดยมีผู้สอนมีหน้าที่ให้คำแนะนำ

2.2 การสร้างบทปฏิบัติการ

ขั้นตอนในการสร้างบทปฏิบัติการ สามารถสรุปได้ดังนี้ (ศิริกานต์ ผาสุก. 2543: 201-206; พรทิพย์ วงษ์นาป่า. 2548: 103-105)

1. รวบรวมผลการทดลองที่ได้จากห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์มาวิเคราะห์ และสรุป ขั้นตอนการดำเนินการต่าง ๆ เพื่อเก็บเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับสร้างและพัฒนาบทปฏิบัติการ
2. ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเนื้อหาที่เกี่ยวข้องกับหลักสูตรการศึกษา บทปฏิบัติการ และประสิทธิผลการเรียนรู้ที่ต้องการประเมิน ได้แก่ ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน ทักษะ กระบวนการทางวิทยาศาสตร์ เจตคติในการเรียน เป็นต้น เพื่อใช้ประกอบในการกำหนดเนื้อหา จุดประสงค์ กิจกรรม การวัดและประเมินผล ของบทปฏิบัติการที่สร้างขึ้น

3. กำหนดขอบเขตในการดำเนินการทดลอง และลงมือปฏิบัติการทดลองภายในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ตามขั้นตอนที่ได้วางแผนไว้ สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้และหาข้อบกพร่องที่อาจเกิดขึ้นได้ขณะทำการทดลอง รวมถึงหาวิธีในการป้องกันและแก้ไข เพื่อให้บทปฏิบัติการที่สร้างขึ้นมีประสิทธิภาพมากที่สุด

4. สร้างบทปฏิบัติการ โดยประกอบด้วย 3 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 ชื่อบทปฏิบัติการและใบความรู้ประกอบบทปฏิบัติการ

ส่วนที่ 2 บทปฏิบัติการ ประกอบด้วย หลักการ/ทฤษฎี วัตถุประสงค์ อุปกรณ์/เครื่องมือ สารเคมี วิธีการทดลอง

ส่วนที่ 3 แบบบันทึกผลการทดลอง คำถามท้ายบทปฏิบัติการ

5. นำบทปฏิบัติการที่สร้างขึ้นเสนอต่อผู้เชี่ยวชาญเพื่อตรวจประเมินความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหา (content validity) ค่าดัชนีความสอดคล้อง (IOC) และคุณภาพของบทปฏิบัติการที่สร้างและพัฒนาขึ้น

นอกจากนี้ผู้วิจัยสามารถหาประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการได้จากการนำบทปฏิบัติการไปทดลองใช้กับกลุ่มผู้เรียนที่มีผลการเรียนระดับ เก่ง ปานกลาง และอ่อน ในสัดส่วนใกล้เคียงกัน ซึ่งกลุ่มผู้เรียนที่ทำการทดลองนี้ไม่ใช่ผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ (1) แบบกลุ่มขนาดใหญ่ ประมาณ 30 คนขึ้นไป (2) แบบกลุ่มขนาดเล็ก ประมาณ 6 – 10 คน และ (3) แบบเดี่ยว ประมาณ 1-3 คน จากนั้นนำผลที่ได้มาปรับปรุงแก้ไขบทปฏิบัติการก่อนนำไปทดลองสอนกับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา

2.3 การจัดการเรียนรู้ด้วยบทปฏิบัติการ

การจัดการเรียนรู้ด้วยบทปฏิบัติการ ทำให้ผู้เรียนได้มีส่วนร่วมในทุกขั้นตอนโดยผ่านประสาทสัมผัสหลายด้านโดยตรง ไม่ว่าจะเป็นการสังเกตด้วยตา การสัมผัสด้วยมือ การดมกลิ่นด้วยจมูก ส่งผลให้ผู้เรียนเกิดการเรียนรู้ด้วยตนเองและจดจำความรู้ได้นานเนื่องจากเกิดจากประสบการณ์ตรงของผู้เรียน และยังก่อให้เกิดทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญในการศึกษาค้นคว้าความรู้ เพราะความรู้ความจริงที่ได้จากการศึกษาในแต่ละครั้งจะมีความน่าเชื่อถือหรือไม่นั้น ขึ้นอยู่กับวิธีการและเครื่องมือที่เหมาะสม (พันธุ์ ทองชุมชุม. 2547: 44)

การจัดการเรียนรู้ด้วยบทปฏิบัติการ สามารถแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ คือ (สุวัฒน์ นิยมคำ. 2517: 142-144)

1. การทดลองแบบไม่กำหนดแนวทาง (unstructured laboratory)

เป็นการทดลองเพื่อผู้เรียนได้ค้นหาคำตอบด้วยตนเอง โดยผู้สอนกำหนดปัญหาให้ จากนั้นผู้สอนให้ผู้เรียนวางแผนการทดลองประกอบด้วย การกำหนดขอบเขตของปัญหา การตั้งสมมติฐาน การสร้างแบบการทดลอง และลงมือทำการทดลองตามแบบที่กำหนดไว้ และขั้นตอนสุดท้ายคือการนำผลการทดลองที่ได้มาอภิปรายหน้าชั้นเรียน ซึ่งการทดลองรูปแบบนี้จะช่วยส่งเสริมกระบวนการคิดของผู้เรียน

2. การทดลองแบบกำหนดแนวทาง (structured laboratory)

เป็นการทดลองที่ผู้สอนเป็นผู้กำหนดปัญหาและวิธีการแก้ปัญหา และให้ผู้เรียนทำตามคำชี้แจงในคู่มือการทดลอง (lab direction) ซึ่งมีการกำหนดวัตถุประสงค์และวิธีการทดลองไว้แล้ว ผู้เรียนจึงไม่ต้องทำการวางแผนการทดลองเอง ดังนั้นการทดลองรูปแบบนี้จึงไม่ส่งเสริมกระบวนการคิดของผู้เรียนเท่าที่ควร

ปัจจุบันการจัดการเรียนรู้ด้วยบทปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ในระดับมัธยมศึกษาตามหนังสือเรียนรายวิชาชีววิทยาของสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) มักเป็นแบบกำหนดแนวทาง ซึ่งขั้นตอนการทดลองแบบกำหนดแนวทางสามารถสรุปได้ 3 ขั้นตอน ดังนี้ (ประวิตร ชูศิลป์. 2524: 5-6; Romey. 1968: 125)

ขั้นตอนที่ 1 อภิปรายก่อนการทดลอง (pre – laboratory discussion) เป็นขั้นตอนที่ผู้สอนตั้งคำถามหรือมีการสาธิตเพื่อช่วยให้ผู้เรียนเกิดความสนใจอยากรู้ อยากเห็น เกิดความคิด ความสงสัย และช่วยกันออกแบบการทดลอง วิธีที่สะดวกและนิยมใช้คือให้ผู้เรียนทำแบบทดสอบก่อนเรียน บางครั้งการจัดการเรียนรู้ในเรื่องที่ยากผู้สอนอาจให้ความรู้พื้นฐานกับผู้เรียนก่อน เพื่อช่วยให้ผู้เรียนสามารถเชื่อมโยงความรู้ที่ได้ไปใช้กับการลงมือทดลอง

ขั้นตอนที่ 2 ทำการทดลอง (experiment) เป็นขั้นตอนที่ผู้เรียนได้ลงมือทดลองตามวิธีการที่ระบุไว้ในบทปฏิบัติการหรือตามแนวที่ได้ออกแบบไว้ในขั้นอภิปรายก่อนการทดลอง โดยผู้สอนจะทำหน้าที่ให้คำปรึกษาและคอยช่วยเหลืออย่างใกล้ชิด ดังนั้นในขั้นตอนนี้ผู้เรียนจึงมีบทบาทสำคัญที่สุดในการค้นหาความรู้ด้วยตนเอง

ขั้นตอนที่ 3 อภิปรายผลการทดลอง (post - laboratory discussion) เป็นขั้นตอนที่ผู้เรียนนำเสนอผลการทดลอง โดยผู้สอนมีผลการทดลองที่ถูกต้องอยู่แล้วตามที่ปรากฏในคู่มือบทปฏิบัติการและนำมาเปรียบเทียบกับผลการทดลองของผู้เรียนว่าเหมือนหรือต่างกันหรือไม่ อย่างไร

ผู้สอนอาจร่วมกับผู้เรียนในการสรุปเป็นกฎเกณฑ์ ทฤษฎีหรือหลักการต่าง ๆ รวมทั้งอภิปรายถึงข้อผิดพลาดของการทดลอง

3. ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน

3.1 ความหมายของผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน

อาร์มอนด์ เพชรชื่น (2527: 46) ได้ให้ความหมายของ “ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน” ว่าเป็นผลที่เกิดจากความรู้ ความเข้าใจ ทักษะและสมรรถภาพสมองของผู้เรียนที่ได้จากการเรียนการสอน การฝึกฝน รวมทั้งจากประสบการณ์ต่าง ๆ ที่ได้รับจากโรงเรียน บ้าน และสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ

ภพ เลหาไพบุลย์ (2537: 295) ได้ให้ความหมายของ “ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน” ว่าเป็นความสำเร็จในการเรียนรู้อันเนื่องมาจากความถนัดทางการเรียน ความสามารถส่วนตัวในการทำ ความเข้าใจในสิ่งที่ผู้สอนถ่ายทอด รวมไปถึงความพยายามในการเรียนและเวลาที่ใช้ในการเรียนของผู้เรียน

ศุภพงศ์ คล้ายคลึง (2548: 27) ได้ให้ความหมายของ “ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน” ว่าเป็นผลสรุปของพฤติกรรมการณ์เรียนรู้ของแต่ละบุคคล ซึ่งสามารถสังเกตและวัดได้ด้วยเครื่องมือทางจิตวิทยาหรือแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์

ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน สามารถประเมินได้จากพฤติกรรมการณ์แสดงออกของผู้เรียนด้านพุทธิพิสัยทั้ง 6 ด้าน ตามแนวคิดของบลูม (Bloom, 1956: 201) ดังนี้

1. ด้านความรู้ความจำ (knowledge) หมายถึง ความสามารถในการระลึกถึงสิ่งที่เคยเรียนรู้อยู่แล้วเกี่ยวกับข้อเท็จจริง ศัพท์นิยาม มโนทัศน์ ข้อตกลง การจัดประเภท เทคนิควิธีการ หลักการ กฎ ทฤษฎี และแนวคิดที่สำคัญทางด้านวิทยาศาสตร์ ซึ่งผู้เรียนจะแสดงออกโดยสามารถให้คำจำกัดความหรือนิยาม เล่าเหตุการณ์ จดบันทึก เรียกชื่อ อ่านสัญลักษณ์ และระลึกข้อสรุปได้

2. ด้านความเข้าใจ (comprehension) หมายถึง ความสามารถในการอธิบาย การแปลความ ขยายความ โดยผู้เรียนจะแสดงออกโดยสามารถเปรียบเทียบแสดงความสัมพันธ์ผ่านการอธิบาย การจำแนกเข้าหมวดหมู่ ยกตัวอย่าง ให้เหตุผล เขียนภาพประกอบ ตัดสินเลือก หรืออ่านกราฟแผนภูมิและแผนภาพได้โดยใช้ถ้อยคำสำนวนภาษาของตนเอง

3. ด้านการนำไปใช้ (application) เป็นการวัดความสามารถของผู้เรียนด้านการนำเอาความรู้ความเข้าใจที่ตนมีไปประยุกต์ใช้หรือแก้ปัญหาในเหตุการณ์หรือสถานการณ์ใหม่ได้อย่างเหมาะสม

4. ด้านการวิเคราะห์ (analysis) เป็นการวัดความสามารถของผู้เรียนในการแยกแยะหรือแจกแจงรายละเอียดของเรื่องราว ความคิด การปฏิบัติออกเป็นระดับย่อย ๆ โดยอาศัยหลักการหรือกฎเกณฑ์ต่าง ๆ เพื่อค้นพบข้อเท็จจริงและคุณสมบัติบางประการ คำถามระดับการวิเคราะห์ แบ่งออก 3 ประเภท คือ การวิเคราะห์ความสำคัญ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และการวิเคราะห์หลักการ

5. ด้านการสังเคราะห์ (synthesis) เป็นการวัดความสามารถของผู้เรียนในการรวบรวมและผสมผสานในด้านรายละเอียดหรือเรื่องราวปลีกย่อยของข้อมูลที่มี และสร้างเป็นสิ่งใหม่ที่แตกต่างจากเดิม ความสามารถดังกล่าวเป็นพื้นฐานของความคิดริเริ่มสร้างสรรค์ คำถามระดับนี้แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ การสังเคราะห์ข้อความ การสังเคราะห์แผนงาน การสังเคราะห์ความสัมพันธ์

6. ด้านการวัดและประเมินค่า (evaluation) เป็นการวัดความสามารถของผู้เรียนในด้านการพิจารณาเพื่อสรุปว่าข้อมูลที่ได้หรือเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นนั้น ดี-เลว เหมาะสม-ไม่เหมาะสมหรือไม่ อย่างไร โดยมีเหตุผลประกอบ

จากความหมายข้างต้น ผู้วิจัยสรุปได้ว่า ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนหมายถึงความสามารถด้านต่าง ๆ ของผู้เรียนที่เกิดขึ้นหลังจากได้รับการจัดการเรียนรู้หรือการฝึกหัด ซึ่งสามารถวัดได้จากการใช้เครื่องมือ ทำให้ทราบได้ว่าผู้เรียนมีพัฒนาการด้านความรู้หรือด้านทักษะเพิ่มขึ้นกว่าก่อนจัดการเรียนรู้เพียงใด

3.2 การสร้างแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน

การวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน จำเป็นต้องใช้เครื่องมือในการวัด เพื่อวัดความรู้ ทักษะ และความสามารถทางวิชาการของผู้เรียนหลังจากการจัดการเรียนรู้ ซึ่งจะทำให้ทราบว่าผู้เรียนบรรลุผลสำเร็จตามจุดประสงค์ที่กำหนดไว้เพียงใด

การสร้างแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน มีขั้นตอนการสร้าง ดังนี้ (พิชิต ฤทธิ์จรรยา. 2545: 99-101; พิตร ทองชั้น. 2524: 60-61)

1. กำหนดจุดประสงค์ของการทดสอบ เป็นสิ่งสำคัญอันดับแรกสำหรับผู้สร้างข้อสอบควรคำนึงถึงว่า ทำไมจึงต้องทำการทดสอบ ผู้เรียนจะได้อะไรจากการทดสอบ และสามารถนำผลการทดสอบไปใช้อย่างไร

2. กำหนดเนื้อหาและพฤติกรรมที่ต้องการวัด เนื้อหาที่นำมาใช้ในการสร้างแบบทดสอบจะต้องมีความครอบคลุมและตรงตามจุดมุ่งหมายของการทดสอบ และพฤติกรรมที่ต้องการวัดนั้นอาจจำแนกตามทฤษฎีใดทฤษฎีหนึ่ง เช่น ทฤษฎีของบลูม ที่ได้จำแนกพฤติกรรม

ออกเป็น 6 ระดับ คือ ความรู้ความจำ ความเข้าใจ การนำไปใช้ การวิเคราะห์ การสังเคราะห์และการประเมินค่า

3. กำหนดลักษณะของแบบทดสอบ โดยอาจเป็นแบบทดสอบประเภทอัตนัย (subjective test) หรือแบบปรนัย (objective test) ซึ่งแบบทดสอบแบบปรนัยนั้นสามารถแบ่งออกได้ 4 ประเภท ได้แก่ แบบถูกผิด (true - false) แบบจับคู่ (matching) แบบเติมคำหรือข้อความให้สมบูรณ์ (completion type) และแบบเลือกตอบ (multiple choices)

4. การจัดทำตารางวิเคราะห์เนื้อหาและพฤติกรรมที่ต้องการวัด เพื่อเป็นแนวทางในการสร้างแบบทดสอบ ทำให้ผู้สร้างข้อสอบรู้ว่าในแต่ละเนื้อหาจะต้องสร้างข้อสอบเพื่อวัดพฤติกรรมการเรียนรู้ด้านใดบ้าง พฤติกรรมด้านละกี่ข้อ

5. เขียนข้อสอบตามจุดประสงค์ เนื้อหา พฤติกรรมที่ต้องการวัดและรูปแบบของแบบทดสอบที่ได้กำหนดไว้ โดยจัดทำเป็นแบบทดสอบฉบับร่าง

6. ตรวจสอบคุณภาพของแบบทดสอบ ขั้นแรกทำการตรวจสอบด้วยตนเองซึ่งเป็นการตรวจสอบคุณภาพของคำถาม-คำตอบตามหลักการสร้างข้อสอบที่ดี และขั้นที่สองคือการนำไปให้ผู้เชี่ยวชาญตรวจ เป็นการตรวจสอบความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหา เพื่อดูว่าคำถามแต่ละข้อมีความสัมพันธ์สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ ครอบคลุมเนื้อหาและเป็นตัวแทนของเนื้อหาหรือไม่

7. ทดลองสอบและวิเคราะห์ข้อสอบ เป็นการตรวจสอบคุณภาพของข้อสอบก่อนนำไปใช้จริง โดยนำไปทดลองสอบกับกลุ่มผู้เรียนที่ไม่ใช่กลุ่มที่ศึกษาซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา เพื่อวิเคราะห์ข้อสอบเป็นรายข้อ ได้แก่ ค่าความยากง่าย (difficulty) ค่าอำนาจจำแนก (discrimination) และคุณภาพของแบบทดสอบทั้งฉบับ ได้แก่ ความเที่ยงตรง (validity) และความเชื่อมั่น (reliability)

8. จัดทำแบบทดสอบฉบับจริง โดยคัดเลือกข้อสอบที่มีคุณภาพตามเกณฑ์ที่กำหนดเพื่อนำไปใช้กับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษาต่อไป

4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

4.1 ความหมายการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการขยายพันธุ์พืช มีข้อดีคือทำให้ได้ต้นพันธุ์จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น ปลอดโรค และได้สายพันธุ์ที่มีความสม่ำเสมอตามความต้องการ สามารถขยายพันธุ์ได้ทุกฤดูกาลไม่ขึ้นกับสภาวะแวดล้อม โดยการนำชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ยอด ลำต้น ตาข้าง กลีบดอก เป็นต้น มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ในหลอดทดลองใน

สภาวะปลอดเชื้อ และมีการควบคุมแสง ความชื้น และอุณหภูมิให้เหมาะสม จากนั้นชั้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงจะมีการเจริญพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์สามารถนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้

ส่วนต่าง ๆ ของพืชที่นำมาเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยทั่วไปแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ คือ ส่วนที่มีตายอดหรือตาข้าง เช่น ปลายยอด ขั้ว เอ็มบริโอ และส่วนที่ไม่มีตายอดหรือตาข้าง เช่น ปล้อง แผ่นใบ ส่วนต่างๆ ของดอก ผล ราก เมื่อนำส่วนที่มีตายอดหรือตาข้างมาเลี้ยง ตามักเจริญเป็นยอดและลำต้น ซึ่งตามปกติ ตา 1 ตามักเจริญเป็น 1 ยอด แต่หากมีการใช้สารควบคุมการเจริญในกลุ่มไซโทไคนินในอาหารสังเคราะห์ด้วย อาจพบว่าเนื้อเยื่อเจริญสามารถเจริญจาก 1 ตาเป็นหลาย ๆ ยอดพร้อมกันได้ สำหรับเนื้อเยื่อพืชส่วนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ตา โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่มีบาดแผลและรอยตัดมักพบการเจริญของแคลลัส (callus) ซึ่งเป็นเซลล์ที่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน โดยอาจจะมีลักษณะที่เกาะกันแน่น (compact callus) หรืออยู่กันอย่างหลวม ๆ (friable callus) และมีสีได้หลากหลายตั้งแต่ขาว ครีม เหลือง เขียว แดง ม่วง น้ำตาล และน้ำตาลเข้ม ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชนิดของเนื้อเยื่อที่เป็นต้นกำเนิดของแคลลัส อาหารสังเคราะห์ สารควบคุมการเจริญ รวมทั้งสภาพแวดล้อม เช่น แสง ความชื้น (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2546: 144; พัทธา ลิมปะนะเวช. 2550: 146-149)

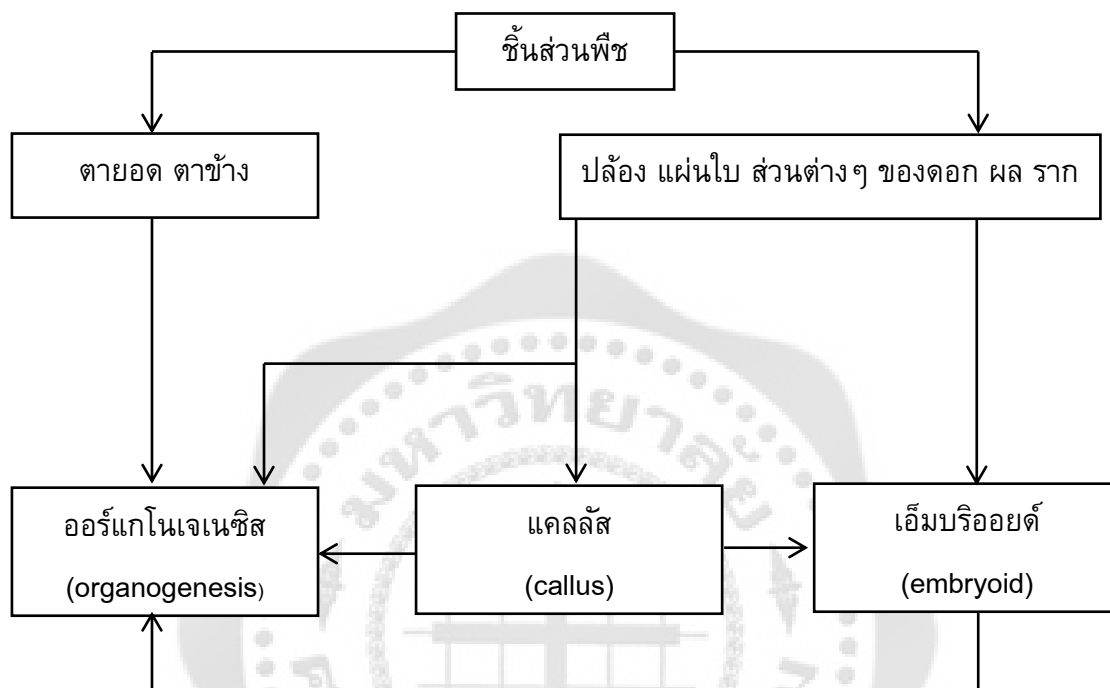
นอกจากรูปแบบการเจริญของชิ้นส่วนพืชดังที่กล่าวมา ชิ้นส่วนของพืชที่เพาะเลี้ยงสามารถมีรูปแบบการเจริญอีกแบบหนึ่ง เรียกว่าการเกิดสัณฐาน (morphogenesis) หมายถึงการพัฒนาของเซลล์และเนื้อเยื่อจากภาวะที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพ (undifferentiation) ไปสู่ภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพ (differentiation) ไปเป็นโครงสร้างหรืออวัยวะอย่างใดอย่างหนึ่ง ขึ้นอยู่กับว่านำชิ้นส่วนมาจากบริเวณใด ซึ่งมี 3 รูปแบบ ดังนี้ (การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. 2559: ออนไลน์; รังษยดี กาวีตะ. 2541: 24-57)

รูปแบบที่ 1 เจริญไปเป็นอวัยวะ (organogenesis) ได้แก่ ราก ยอด หรือดอก

รูปแบบที่ 2 เจริญเป็นแคลลัส (callus) ซึ่งเป็นกลุ่มของเซลล์ ส่วนใหญ่จะเป็นเซลล์พาเรงคิมา (parenchyma cell) ที่ยังไม่เปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นหรือรากแต่ก็สามารถเป็นต้นได้

รูปแบบที่ 3 เจริญไปเป็นเอ็มบริอยด์ (embryoid) ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับเอ็มบริโอ (embryo) ที่ได้จากไซโกต (zygote) แต่เอ็มบริอยด์ได้มาจากเซลล์ร่างกาย (somatic cell) เมื่อเอ็มบริอยด์เจริญเต็มที่ จะเป็นโครงสร้างที่เจริญได้ 2 ขั้ว คือ ขั้วหนึ่งเจริญเป็นยอด ส่วนขั้วตรงข้ามจะเจริญไปเป็นราก คล้ายการงอกของเอ็มบริโอในเมล็ด

การเกิดสัณฐานทั้งแบบที่เกิดเป็นอวัยวะและแบบที่เกิดเป็นเอ็มบริอยด์นี้ อาจเกิดโดยตรงจากเซลล์พืชที่นำมาเลี้ยงเมื่อได้รับสภาวะที่เหมาะสม หรืออาจเกิดจากแคลลัสที่เจริญมาจากส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยงก็ได้ ซึ่งสามารถแสดงเป็นแผนภาพได้ ดังนี้



ภาพประกอบ 1 การเจริญของเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืชที่พบได้เมื่อนำมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

4.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

องค์ประกอบสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วย 6 ส่วน ได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การเลือกชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การฆ่าเชื้อ การนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วลงขวด สภาวะของการเพาะเลี้ยงและการย้ายพืชจากขวดออกปลูกในสภาพธรรมชาติ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

1. อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

หลักการทั่วไปในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือเลือกใช้สูตรอาหารให้เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิด เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถจำแนกได้เป็นสารอาหารที่สำคัญออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

1.1 สารอินทรีย์ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

1) ธาตุอาหารหลัก เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมากในรูปเกลือของสารอินทรีย์ ได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และกำมะถัน (S)

2) ธาตุอาหารรอง ในสัดส่วนที่พอเหมาะในรูปเกลือของสารอินทรีย์ ได้แก่ เหล็ก (Fe) ทองแดง (Cu) สังกะสี (Zn) แมงกานีส (Mn) โมลิบดีนัม (Mo) และโบรอน (B)

1.2 สารอินทรีย์ ได้แก่ สารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน แบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ

1) น้ำตาล เป็นสารที่ให้พลังงาน ส่วนใหญ่ใช้ซูโครส (sucrose) กลูโคส (glucose) และฟรุกโตส (fructose) โดยทั่วไปแล้วในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใช้ประมาณ 20 - 60 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร

2) วิตามิน ได้แก่ อินโนซิทอล (inositol) วิตามินบี 1 (vitamin B1) วิตามินบี 2 (vitamin B2) ไนอะซิน (niacin) ไพริดอกซิน (pyridoxine) วิตามินซี (vitamin C)

3) กรดอะมิโน จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต และสร้างอวัยวะต่าง ๆ ที่นิยมใช้กัน คือ ไกลซีน (glycine)

4) สารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นสารอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ การแบ่งเซลล์และการขยายขนาดเซลล์ มีผลต่อการชักนำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ ได้แก่ ออกซิน (auxin) ไซโทไคนิน (cytokinin) จิบเบอเรลลิน (gibberellin) เอทิลีนและสารปลดปล่อยเอทิลีน (ethylene and ethylene releasing compounds) สารชะลอการเจริญเติบโตของพืช (plant growth retardants) และสารยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (plant growth inhibitors)

1.3 น้ำ

เนื่องจากคุณภาพของน้ำมีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นน้ำที่ใช้เตรียมอาหารจึงต้องมีความสะอาด สำหรับการขยายพันธุ์พืชทั่ว ๆ ไปนั้นใช้น้ำกลั่นธรรมดาหรือน้ำกรองที่มีคุณภาพก็เพียงพอแล้ว

1.4 สารที่ช่วยให้ความคงตัว

โดยทั่วไปมักใช้วุ้น (agar) ซึ่งเป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีมวลโมเลกุลสูง สกัดจากสาหร่ายทะเลสีแดง (red algae) ใช้สำหรับการเตรียมอาหารแข็ง ความเข้มข้นที่ใช้ทั่วไป คือ 0.6-1.0% หรือ 6-10 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร หากการใช้วุ้นในปริมาณที่ต่ำ

(0.5%) จะทำให้อาหารไม่แข็งตัวและไหลไปมาได้ โดยเฉพาะเมื่อมี pH ต่ำ จึงไม่สามารถพองเนื้อเยื่อพืชไว้ได้ แต่ถ้าใช้รุ้นในปริมาณที่สูง (1.0% ขึ้นไป) จะทำให้อาหารแข็งมากจนไม่สามารถให้น้ำเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของพืชและยังทำให้พืชดูดอาหารไปใช้ได้ยาก ในปัจจุบันยังมีสารที่ช่วยให้ความคงตัวอีกหลายชนิด เช่น เจลแลนแกม (gellan gum) ชื่อทางการค้าคือ เจลไรต์ (gelrite) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดประจุลบ (anionic polysaccharide) มีความบริสุทธิ์สูง มีลักษณะแข็งและเปราะ ผลิตได้จากการหมักแบคทีเรีย *Pseudomonas elodea* มีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลแรมนโนส (rhamnose) กรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) และน้ำตาลกลูโคส ด้วยลักษณะเป็นรุ้นที่คล้ายกับเจลจึงมีข้อดีคือทำให้เนื้อเยื่อพืชดูดซึมสารอาหารได้ดีกว่ารุ้น และใช้ในปริมาณที่น้อยกว่า

1.5 สารอื่น ๆ ได้แก่

1) อะดีนีนซัลเฟต เป็นสารที่ใส่เพื่อช่วยกระตุ้นการเกิดยอดในพืชบางชนิดที่เกิดยอดได้ค่อนข้างยาก ปริมาณที่ใช้ประมาณ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร

2) ผงถ่าน มีรูพรุนขนาดเล็กที่เชื่อมต่อกันมากมายทำให้พื้นที่ภายในเพิ่มขึ้น จึงสามารถดูดซับสารต่าง ๆ ได้ดี ผสมลงในอาหารเพื่อดูดซับสารพิษที่มีสีน้ำตาลหรือสีดำ หรือเพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพจากที่สว่างเป็นที่มืดเพื่อชักนำให้พืชเกิดรากและการเจริญเติบโตของรากดีขึ้น และช่วยให้ pH ของอาหารคงที่มากขึ้น ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.2-0.3% โดยปริมาตร

สูตรอาหารมาตรฐานที่นิยมใช้โดยทั่วไป คือ MS (Murashige; & Skoog. 1962) ซึ่งมักเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นสูง (stock solution) ที่ประกอบไปด้วยสารเคมีชนิดต่าง ๆ โดยแบ่งเป็น 4 stocks ดังแสดงในตารางด้านล่าง ดังนี้

ตาราง 1 ชนิดและปริมาณสารละลายของอาหารสูตร MS (Murashige; & Skoog. 1962)

สาร	ปริมาณสารในสูตร (มก./ล.)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170

ตาราง 1 (ต่อ)

สาร	ปริมาณสารในสูตร (มก./ล.)
ธาตุอาหารรอง	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
KI	0.83
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	17.50
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30
H_3BO_4	6.20
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
สารอินทรีย์	
Glycine	2.0
Thiamine-HCl	0.1
Pyridoxine-HCl	0.5
Nicotinic acid	0.5
Myo-inositol	100
สารละลายเหล็ก	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3

2. การเลือกชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เนื่องจากพื้นผิวของพืชมีจุลินทรีย์ปนอยู่มาก ดังนั้นจึงควรหลีกเลี่ยงชิ้นส่วนของพืชที่มีบาดแผล และควรเลือกชิ้นส่วนที่อายุไม่อ่อนหรือแก่เกินไป นอกจากนี้ควรเลือกชิ้นส่วนพืชให้ตรงตามวัตถุประสงค์ เช่น หากต้องการเพาะเลี้ยงเพื่อการขยายพันธุ์ควรใช้เนื้อเยื่อที่มีลักษณะปกติ ได้แก่ ส่วนตา ใบ ยอด ลำต้น หากต้องการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตพืชปลอดโรคควรใช้เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลาย (apical meristem) เป็นต้น

3. การฆ่าเชื้อ

เนื่องจากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอาหารที่มีความสมบูรณ์สูง ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว หากมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ย่อม

เป็นอุปสรรคต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นทุกขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อเพื่อให้มั่นใจว่าต้นพืชที่ทำการเพาะเลี้ยงนั้นปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

การฆ่าเชื้อในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น สามารถแบ่งได้เป็น 4 ส่วน โดยมีรายละเอียด ดังนี้

3.1 การฆ่าเชื้อในอุปกรณ์และสถานที่ปฏิบัติงาน

1) การใช้สารเคมี (chemical sterilization) ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ 70% สารละลายเดทตอล หรือเซฟฟลอน (savlon) ต่อแอลกอฮอล์ 70% ในอัตราส่วน 1:30 สำหรับแช่มีดผ่าตัดหรือปากคีบ โดยแช่เป็นเวลา 5-10 นาที (ภานุพงศ์ มหาพรหม. 2554: ออนไลน์)

2) การใช้ความร้อนแห้ง (dry heat) โดยใช้ตู้อบลมร้อน (hot-air oven) ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เวลา 1-2 ชั่วโมง ส่วนมากจะใช้สำหรับอุปกรณ์ที่เป็นเครื่องแก้ว เช่น จานเพาะเลี้ยง ปิเปต ขวดเพาะเลี้ยง

3) การใช้ความร้อนชื้น (moist heat) โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-30 นาที ใช้ในการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ได้ทั้งอุปกรณ์ที่เป็นโลหะและเครื่องแก้ว เช่น มีดผ่าตัด ปากคีบ ขวดอาหารและจานเพาะเลี้ยง

4) การเผาไฟ (incineration) วิธีนี้จะใช้ขณะปฏิบัติงานถ่ายเนื้อเยื่อ อุปกรณ์ที่ใช้วิธีนี้ ได้แก่ มีดผ่าตัดและปากคีบ วิธีการคือทำการจุ่มมีดผ่าตัดหรือปากคีบในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% แล้วลงไฟทันที รอให้อุปกรณ์เย็นสักพักแล้วจึงนำไปใช้งาน

3.2 การฆ่าเชื้อบริเวณปฏิบัติงาน

บริเวณปฏิบัติงาน ได้แก่ โต๊ะปฏิบัติการและตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 70% หรือเดทตอล (ความเข้มข้น 1:1) ฉีดพ่นและเช็ดด้วยผ้าสะอาดหรือกระดาษทิชชูทั้งก่อน ระหว่างและหลังการปฏิบัติงาน เพื่อช่วยควบคุมและลดโอกาสการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การปฏิบัติงานภายในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อมักเปิดรังสี UV เพื่อฆ่าเชื้อร่วมด้วย เป็นเวลา 20-30 นาที ก่อนปฏิบัติงาน

3.3 การฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1) การใช้ความร้อนชื้น (moist heat) โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-30 นาที ขึ้นอยู่กับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ไอน้ำร้อนจะแทรกซึมเข้าสู่เซลล์และสปอร์ ทำให้โปรตีน (เอนไซม์) ต่าง ๆ ที่อยู่

ภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เสียสภาพ การนำอาหารไปใช้ควรให้อาหารเย็นเสียก่อนและควรเก็บไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อตรวจสอบว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ (Perkins. 1969; 465-482; Burger. 1988: 1066–1068; Smith. 2013:125)

2) การกรอง (filtration) โดยมากใช้เยื่อกรองหรือแผ่นกรอง (membrane filtration) ที่ทำจากเซลลูโลสอะซีเตต (cellulose acetate) หรือ พลาสติกโพลิเมอร์ (plastic polymer) ที่มีความหนา 0.1 มิลลิเมตร ขนาดของรูเยื่อกรองตั้งแต่ 0.22 – 0.45 ไมโครเมตร ซึ่งมีความละเอียดกว่าเซลล์จุลินทรีย์ นิยมใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ออกจากอาหารเหลวหรือของเหลวที่ละลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน เช่น ยาปฏิชีวนะ ซีรัม สารละลาย น้ำตาลบางชนิด ซึ่งจุลินทรีย์จะถูกแยกออกจากอาหารเหลวโดยเซลล์จุลินทรีย์จะติดอยู่บนเยื่อกรอง

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อให้สะดวกต่อการนำไปใช้และเป็นการลดต้นทุนในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนี้

3) การใช้สารเคมี (chemical) ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite, NaOCl) เป็นสารละลายสีเหลืองอมเขียว มักพบเป็นส่วนผสมในน้ำยาซักผ้าขาว โดยมีความเข้มข้น 5.25% หรือ 12.75% สามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย สปอร์ เชื้อรา โปรโตซัว และไวรัส โดยเฉพาะชนิดที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบของเปลือกหุ้ม เช่น เชื้อไวรัสไข้หวัดนก

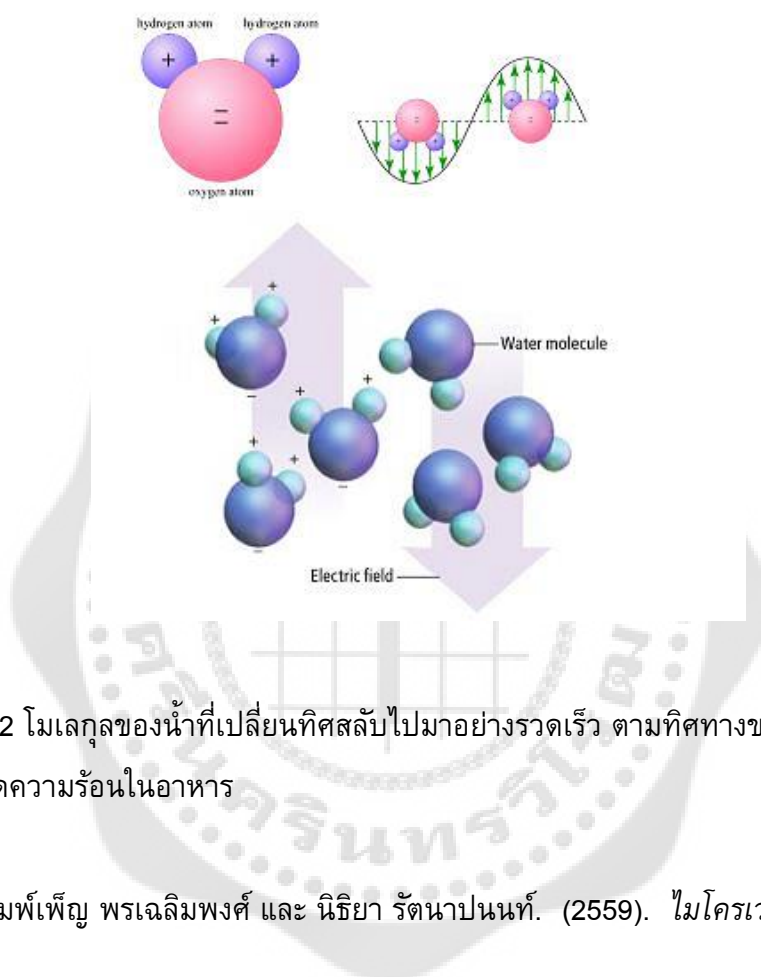
วิธีการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ในการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีรายงานว่าสามารถใช้ที่ความเข้มข้น 5.25% ซึ่งมี % available chlorine ตั้งแต่ 0.0003 – 0.0009 (Teixeira; et al. 2006: 375-378; Brondani; et al. 2012: 257-264) หรือใช้ปริมาณ 36-396 ไมโครลิตร (Deein; et al. 2013: 1041-1044) โดยเติมลงไปให้อาหาร ในขณะที่อาหารยังอุ่นเพื่อให้โซเดียมไฮโปคลอไรต์แตกตัวได้ดี โดยกลไกการออกฤทธิ์เป็นดังสมการ



โซเดียมไฮโปคลอไรต์จะละลายน้ำแล้วแตกตัวให้กรดไฮโปคลอรัส (HOCl) และเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้โปรตีนตกตะกอนและเซลล์จุลินทรีย์เสียสภาพในที่สุด

4) การใช้เตาไมโครเวฟ (microwave) เตาไมโครเวฟ มีแหล่งกำเนิดพลังงานที่เรียกว่า แมกนีตรอน (magnetron) ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนพลังงานไฟฟ้าเป็นคลื่นไมโครเวฟซึ่งเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า โดยคลื่นไมโครเวฟที่เกิดขึ้นนี้มีความถี่ 915 ถึง 2,450 เมกกะเฮิร์ตส์ เมื่ออาหาร

ได้รับคลื่นไมโครเวฟซึ่งมีความถี่ที่สูงมาก จะทำให้โมเลกุลของน้ำภายในอาหารซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีขั้ว โดยออกซิเจนเป็นขั้วลบและไฮโดรเจนเป็นขั้วบวก เปลี่ยนทิศกลับไปมาอย่างรวดเร็วตามทิศทางของสนามไฟฟ้า เกิดการเสียดสีกันระหว่างโมเลกุลของน้ำที่สั่นสะเทือนหรือกับโมเลกุลอื่น ๆ ภายในอาหารทำให้เกิดความร้อนขึ้นมา



ภาพประกอบ 2 โมเลกุลของน้ำที่เปลี่ยนทิศกลับไปมาอย่างรวดเร็ว ตามทิศทางของสนามไฟฟ้า ทำให้เกิดความร้อนในอาหาร

ที่มา: พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนพานนท์. (2559). ไมโครเวฟ. ออนไลน์.

เนื่องจากความร้อนซึ่งเกิดจากการกระตุ้นด้วยคลื่นไมโครเวฟจะแผ่จากส่วนในของอาหารออกมาด้านนอก ดังนั้น ขนาดและรูปร่างของอาหารจึงมีผลต่อการทำให้อาหารสุก โดยอาหารที่มีขนาดใหญ่หรือมีความหนามากจะใช้เวลาานกว่าอาหารชิ้นเล็กและบาง และทำให้การเพิ่มอุณหภูมิไม่สม่ำเสมอทั่วทั้งชิ้น ตัวอย่างเช่น อาหารที่มีรูปร่างกลมจะได้รับความร้อนอย่างสม่ำเสมอมากกว่าอาหารที่มีเหลี่ยมมุม นอกจากนี้ความร้อนที่เกิดขึ้นยังขึ้นอยู่กับความชื้นในอาหาร เนื่องจากน้ำมีค่า loss factor สูง ดังนั้นอาหารที่มีความชื้นสูงจึงเพิ่มอุณหภูมิได้รวดเร็วกว่าอาหารที่มีความชื้นต่ำ สำหรับในอาหารเหลว เช่น การต้มน้ำ มักพบการอมความร้อนไว้ในของเหลวมากกว่าที่ตาเรามองเห็นซึ่งเรียกว่า ปรากฏการณ์ซูเปอร์ฮีท (super heat) ซึ่งหมายถึงการที่ของเหลวนั้นมี

อุณหภูมิสูงกว่าจุดเดือดปกติ เมื่อน้ำของเหลวนั้นออกมาแล้วจะไม่เห็นฟองน้ำเดือด แต่เมื่อทำการคนจะทำให้เกิดปฏิกิริยากระตุ้นให้น้ำเดือดพลุ่งกระเด็นขึ้นมาจนลวกมือได้ จากหลักการสร้างความร้อนด้วยเตาไมโครเวฟนี้จึงทำให้มีการนำไมโครเวฟมาศึกษาการฆ่าเชื้อในอาหาร เช่น นำนมแพะดิบ กุ้งแช่แข็งและคัสตาร์ด ซึ่งพบว่าสามารถฆ่าเชื้อได้เป็นอย่างดี (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนานนท์. 2559: ออนไลน์; อนุเทพ ภาสุระ. 2559: ออนไลน์; Thompson; & Thompson. 1990: 59-64 Papadopoulou; et al. 1995: 305-309; Odani; et al. 1995: 477- 481)

3.4 การฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช

การฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช นิยมใช้วิธีฟอกด้วยสารเคมีที่มีองค์ประกอบของคลอรีน ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) และเมอร์คิวริกคลอไรด์ (HgCl₂) ซึ่งเป็นการทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับชิ้นส่วนพืชหลุดออก

ขั้นตอนในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชสามารถสรุปได้ 5 ขั้นตอน ดังนี้

- 1) เลือกชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยง เช่น เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ตา ข้าง หน่อ ใบอ่อน ราก
- 2) ทำการตัดแต่งชิ้นส่วนพืชให้มีขนาดและความยาวที่เหมาะสม
- 3) ล้างทำความสะอาดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชด้วยน้ำเปล่า สบู่หรือน้ำยาล้างจาน ซึ่งเป็นการชะล้างเชื้อจุลินทรีย์ที่พื้นผิวของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชในเบื้องต้น
- 4) ทำการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของพืช สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับลักษณะของเนื้อเยื่อพืช เช่น เนื้อเยื่อพืชที่อ่อนนุ่มและบาง ต้องทำด้วยความระมัดระวัง โดยแช่เนื้อเยื่อพืชลงในสารฟอกฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ คือไม่เกิน 0.5% เป็นเวลา 10-15 นาที สำหรับเนื้อเยื่อพืชที่ผิวหนากแข็ง เช่น ไม้เนื้อแข็ง ฝักกล้วยไม้ สามารถใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้นได้ตั้งแต่ 5-10% สำหรับเนื้อเยื่อพืชที่มีสารประกอบขี้ผึ้งหรือขนปกคลุม ให้จุ่มเนื้อเยื่อลงใน เอทิลแอลกอฮอล์ 70-95% นาน 30 วินาที ถึง 1 นาที ก่อนแล้วจึงนำไปแช่ในสารฟอกฆ่าเชื้อ ทั้งนี้ในการฟอกฆ่าเชื้อควรเติมน้ำยาจับใบ (surfactant) เช่น Tween20 ลงไปด้วย เพื่อช่วยลดแรงตึงผิวของเนื้อเยื่อ ทำให้สารละลายฟอกฆ่าเชื้อสามารถเข้าไปสัมผัสกับเนื้อเยื่อได้อย่างทั่วถึง (รกรอง วิเศษสุวรรณ. 2542: 1-10; อัญชลี จาละ. 2558: ออนไลน์; การเพาะเลี้ยงและจัดการพันธุ์พืช. 2558)
- 5) เมื่อครบกำหนดเวลาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ก่อนนำไปเพาะเลี้ยง

4. การนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วพืชลงขวด

ก่อนนำเนื้อเยื่อที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วลงในขวดอาหารเพาะเลี้ยง ควรเช็ดขวดอาหารเพื่อฆ่าเชื้อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ก่อนนำเข้าตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ เมื่อจะย้ายเนื้อเยื่อลงขวดให้เปิดฝาและลงไฟที่คอขวด จากนั้นใช้ปากคีบที่ลงไฟฆ่าเชื้อและทิ้งให้เย็นแล้วคีบเนื้อเยื่อใส่ขวด ควรกดเนื้อเยื่อให้จมลงในอาหารเล็กน้อย ทำการลงไฟบริเวณคอขวดอีกครั้งแล้วรีบปิดฝาขวดทันที

5 สภาวะของการเพาะเลี้ยง

สภาวะของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีผลอย่างมากต่อการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง ซึ่งมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้ (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง. 2558: ออนไลน์; เทิดศักดิ์ โทณลักษณะ. 2555)

5.1 แสง (light) เป็นปัจจัยที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากเนื้อเยื่อในขวดเพาะเลี้ยงยังไม่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อสร้างอาหารเองได้ ดังนั้นในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงต้องมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน แต่พืชหลายชนิดต้องการความมืดในการเกิดรากหรือยอด เมื่อนำเนื้อเยื่อของพืชเหล่านี้มาเลี้ยงในอาหาร แสงจึงเป็นตัวยับยั้ง (limiting factor) ในการเกิดตายอด ในทางตรงข้ามมีพืชอีกหลายชนิดที่เกิดยอดหรือรากได้ก็ต่อเมื่อได้รับแสงเท่านั้น นอกจากนี้ชนิดและความเข้มของแสงก็เป็นปัจจัยที่สำคัญ โดยพบว่าแหล่งของแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชคือ หลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาว จะให้แสงสีขาวซึ่งมีความเข้มของแสงประมาณ 1,000-5,000 ลักซ์ โดยให้แสง 8-16 ชั่วโมงต่อวัน การให้แสงที่มีความเข้มในระดับนี้จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายสูงเมื่อย้ายปลูกลงดิน

5.2 อุณหภูมิ (temperature) อุณหภูมิที่เหมาะสมในเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชในสภาพเพาะเลี้ยงในขวดมักต่ำกว่าในสภาพตามธรรมชาติ โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 22-28 องศาเซลเซียส และเนื้อเยื่อพืชบางชนิดต้องการอุณหภูมิต่ำสลับกับอุณหภูมิสูง เช่น กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส (Phalaenopsis) จะเจริญและพัฒนาได้ดีภายใต้อุณหภูมิกลางวัน 25 องศาเซลเซียส กลางคืน 20 องศาเซลเซียส (Su; et al. 2001: 311-318; Kataoka; et al. 2004: 121-132 ; Blanchard; & Runkle. 2006: 4043-4049; Lee; et al. 2007: 588-595; Chen; et al. 2008: 1667-1675) นอกจากนี้อุณหภูมียังสามารถทำให้พืชบางชนิดพ้นระยะการพักตัว (break dormancy) ได้ เช่น ในการเพาะเลี้ยงเหง้าลิลลี่ สามารถทำให้พ้นระยะการพักตัวได้โดยเลี้ยงในที่ที่มีอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ ก่อนย้ายปลูก (Langens-Gerrits; et al. 2003: 267-275)

5.3 ความชื้น (humidity) เนื่องจากความชื้นในขวดเพาะเลี้ยงมีค่อนข้างสูง ถ้าความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงต่ำก็จะทำให้เกิดการสูญเสียน้ำภายในขวดเพาะเลี้ยง ส่งผลให้อาหารแห้ง

เร็ว แต่ถ้าหากความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงสูงเกินไปก็จะเอื้อให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดี เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย และในบางครั้งถ้าความชื้นภายในขวดเพาะเลี้ยงสูงมากอาจทำให้น้ำเยื่อพืชเกิดอาการน้ำท่วม (hyperhydricity) ได้ โดยทั่วไปความชื้นที่เหมาะสมอยู่ที่ประมาณ 60%

5.4 อาหารเพาะเลี้ยง (medium) เนื้อเยื่อบางชนิดเมื่อเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium) จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานได้ แต่เมื่อนำเนื้อเยื่อนั้นไปเลี้ยงในอาหารเหลว (liquid medium) กลับไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน แต่พืชบางชนิดสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานได้ทั้งบนอาหารกึ่งแข็งและในอาหารเหลว นอกจากนี้ปริมาณอากาศที่อยู่ในภาชนะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็มีส่วนควบคุมการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานด้วย เช่น ปริมาณออกซิเจนมากเนื้อเยื่อมักเกิดเป็นราก แต่ถ้าปริมาณออกซิเจนน้อยเนื้อเยื่อจะเกิดเป็นยอด

6. การย้ายพืชจากขวดออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

ใช้ปากคีบหรือหลอดปลายอ่อน ๆ ดึงเอาต้นพืชที่แข็งแรงที่มีรากที่สมบูรณ์ออกจากขวดระวังอย่าให้ต้นช้ำ จากนั้นนำไปล้างเอาวุ้นออกให้หมดด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำประปา แล้วนำต้นพืชไปปลูกในถาดเพาะชำ หรือกระถางที่มีทรายผสมขุยมะพร้าวในอัตราส่วน 1:1 นำไปเก็บไว้ในที่ร่ม อย่าให้ถูกแสงโดยตรงเพราะจะทำให้ต้นสูญเสียน้ำไปและทำให้ต้นเหี่ยว เมื่อต้นพืชตั้งตัวแข็งแรงดีแล้วทำการย้ายลงปลูกในดินต่อไป

4.3 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

จากการศึกษาเพื่อพัฒนาสูตรอาหารและวิธีการเพาะเลี้ยงพืชชนิดต่าง ๆ ที่ผ่านมา ทำให้มีการนำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปประยุกต์เพื่อให้เกิดประโยชน์ในด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านเกษตรกรรม อุตสาหกรรม รวมถึงการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ซึ่งสรุปได้ดังนี้

1. การขยายพันธุ์พืช (micropropagation) การเพาะเลี้ยงแคลลัสและตายอด สามารถผลิตพันธุ์พืชที่มีลักษณะเหมือนพ่อแม่ได้ปริมาณมากและรวดเร็ว โดยอาศัยสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิด วิธีการนี้สะดวกต่อการเก็บรักษารวบรวมพันธุ์ทำให้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะพืชที่มีค่าทางเศรษฐกิจ พืชที่มีปัญหาด้านการเพาะปลูกเนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม และพืชสมุนไพรที่หายาก ตัวอย่างพืชที่ขยายพันธุ์สำเร็จด้วยวิธีนี้ เช่น กล้วยไม้ ปาล์มน้ำมัน กล้วย สตรอเบอร์รี่ ไม้ดอกไม้ประดับต่าง ๆ

2. ผลิตพืชที่ปราศจากโรค (disease-free plant) การปลูกพืชโดยทั่วไปมักเกิดปัญหาจากเชื้อแบคทีเรีย เชื้อราและเชื้อไวรัส ที่ติดมากับส่วนที่ปลูก ดังนั้นในปัจจุบันจึงหันมานิยมใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพราะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะใช้ส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อที่เจริญที่อยู่บริเวณปลายยอดของลำต้น (apical meristem) และเนื้อเยื่อของต้นอ่อนในเมล็ดหรือส่วนของ

เอ็มบริโอมาเพาะเลี้ยง เนื่องจากเนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีท่อน้ำท่ออาหารในการติดต่อกับส่วนอื่น ๆ ของต้นพืช จึงปราศจากเชื้อไวรัสมากที่สุด เพราะเชื้อไวรัสจะเคลื่อนที่ไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชโดยผ่านทางท่อน้ำท่ออาหาร

3. เก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมของพืช (germplasm) ปัจจุบันนี้มีพืชหลายชนิดสูญพันธุ์ไปเนื่องจากสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลง วิธีการเก็บรักษาพืชพรรณต่าง ๆ ไว้ในหลอดทดลองจะทำให้พืชมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ามาก และเก็บไว้ได้เป็นระยะเวลานาน โดยเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิต่ำ ๆ เพื่อหยุดยั้งกระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์ ทำให้ประหยัดเวลา แรงงานและอาหาร เมื่อใดที่ต้องการใช้พืชชนิดนั้น ๆ จึงค่อยทำการถ่ายเนื้อเยื่อลงสู่อาหารสังเคราะห์ เพื่อชักนำให้เกิดต้น และนำมาขยายเพิ่มจำนวนต้นพืช ก็จะได้พืชพันธุ์นั้นกลับคืนมา

4. ผลิตภัณฑ์ภูมิ (secondary metabolites) สารทุติยภูมิ เป็นสารเคมีที่พืชผลิตขึ้นและไม่ใช่ประโยชน์กับพืชโดยตรง แม้ว่าสารทุติยภูมิหลายชนิดสามารถผลิตได้โดยการสังเคราะห์แต่ยังคงผลิตได้ในปริมาณน้อย เช่น ควินิน (quinine) ใช้เป็นยา วานิลลา (vanilla) เป็นสารให้กลิ่น และไพเรทริน (pyrethrins) สำหรับปราบแมลงศัตรูพืช เป็นต้น ดังนั้นการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยจึงจำเป็นต้องมีการปรับสภาพแวดล้อมและอาหารที่เหมาะสม เพื่อชักนำให้เกิดการสังเคราะห์สารที่ต้องการได้มากขึ้น

5. ปรับปรุงพันธุ์พืช (plant breeding) ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนทาน (tolerance plant) โดยการจัดเงื่อนไขของอาหารและสภาวะแวดล้อม เช่น การคัดสายพันธุ์พืชทนเค็ม สายพันธุ์ทนต่อดินเปรี้ยว ทนต่อความแห้งแล้ง หรือเพิ่มความต้านทาน (resistant plant) โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเงื่อนไขต่าง ๆ เช่น การสร้างพันธุ์ต้านทานต่อสารพิษของโรค ต้านทานต่อแมลง ต้านทานต่อยากำจัดวัชพืช ฯลฯ ทำให้พันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง (high yield) โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ แล้วคัดเลือกเอาสายพันธุ์ที่ดีไว้ ซึ่งอาจทำได้โดยใช้สารเคมี การฉายรังสี การตัดต่อยีน (DNA recombination) และการถ่ายยีน (gene transformation)

6. การศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยาและพันธุศาสตร์ (Biochemical and Physiology study) ต้นพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลองสามารถติดตามผลการพัฒนา การเปลี่ยนแปลงได้ง่ายและใกล้ชิด เนื่องจากการควบคุมตัวแปรต่าง ๆ ทำได้ดีกว่าในสภาพปลูกปกติ เช่น การศึกษาการตอบสนองของเนื้อเยื่อพืชในอาหารที่มีเงื่อนไขต่าง ๆ เพื่อการคัดสายพันธุ์พืชทนเค็ม สายพันธุ์ทนต่อดินเปรี้ยว ทนต่อความแห้งแล้ง หรือเพิ่มความต้านทานต่อโรคและแมลง (นิตยสาร คัมภีรานนท์. 2549: 63)

5. พิทูเนีย (petunia)

พิทูเนีย มีถิ่นกำเนิดในแถบอเมริกา เป็นไม้ดอกชนิดหนึ่งที่รู้จักกันแพร่หลาย เพราะมีลักษณะเด่นคือมีดอกดก สีสันสะดุดตา หลากหลายสีและบานอยู่ได้นาน บางพันธุ์มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ ต้นมีขนาดสม่ำเสมอเป็นพุ่มเตี้ย ในสหรัฐอเมริกานิยมปลูกเป็นไม้ประดับในแปลง (bedding plant) ปลูกเป็นไม้กระถาง (potted plant) และปลูกเป็นไม้ในภาชนะแขวน (hanging baskets) สำหรับในประเทศไทยนิยมเพาะเลี้ยงและใช้เป็นไม้ประดับกันอย่างแพร่หลายโดยสามารถเพาะปลูกได้ทั่วทุกภาคในประเทศ (สมเพียร เกษมทรัพย์. 2526: 215-225; ปิฎฐะ บุณนาค. 2529: 175-178)

5.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพิทูเนีย

พิทูเนีย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Petunia hybrida* E.Vilm เป็นไม้ดอกที่อยู่ในสกุล *Petunia* วงศ์ Solanaceae ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับพืชไร่และพืชผักหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ ยาสูบ พริก เป็นต้น คำว่าพิทูเนีย (petunia) มาจากพิทูน (petun) ซึ่งเป็นภาษาบราซิล แปลว่า ต้นยาสูบ เนื่องจากขณะที่ต้นพิทูเนียยังเล็กอยู่จะมีลักษณะคล้ายต้นยาสูบมาก

ลักษณะทั่วไป พิทูเนียเป็นไม้ดอกหลายฤดู ต้นเป็นพุ่มเตี้ยและค่อนข้างเลื้อย ลำต้นเป็นไม้เนื้ออ่อน สูงประมาณ 30 เซนติเมตร ใบเป็นใบเดี่ยวออกใบเป็นคู่ ๆ ตรงข้ามกันไปตามลำต้น รูปรีขอบเว้าคล้ายใบยาสูบแต่มีขนาดเล็กกว่า ใบกว้างประมาณ 5 เซนติเมตร ยาว 8-10 เซนติเมตร มีขนอยู่ทั่วไปตามผิวใบทั้งด้านบนและด้านล่าง ลักษณะใบเป็นรูปไข่ (ovate) ปลายใบแหลม (acute) เนื้อใบอ่อน (soft) ขอบใบเรียบ (entire) ดอกมีรูปร่างเป็นรูปกรวย (funnel form) เป็นดอกเดี่ยว (solitary) มีทั้งชนิดดอกชั้นเดียว (single) และดอกซ้อน (double) ก้านดอกเกิดที่ยอดหรือข้างลำต้น วงกลีบเลี้ยง (calyx) มี 5 แฉก วงกลีบดอก (corolla) มี 5 แฉก มีคอดอก (throat) ยาว มีเกสรเพศผู้ (stamen) 5 อัน เกสรเพศเมีย (pistil) 1 อัน สีและขนาดของดอกแตกต่างกันไปตามประเภทและพันธุ์ เมล็ดมีลักษณะกลม ขนาดเล็ก ฝักหนึ่ง ๆ อาจจะมีตั้งแต่ 100 - 300 เมล็ด เมล็ดหนัก 1 ออนซ์ จะมีจำนวนเมล็ดประมาณ 185,000-285,000 เมล็ด แล้วแต่พันธุ์ (สมเพียร เกษมทรัพย์. 2526: 213-214; Ewart. 1984: 180-202; EI; et al. 1972: 167-176)



ภาพประกอบ 3 ลักษณะลำต้น ใบและดอกของต้นพิทูเนีย (*Petunia hybrida* E.Vilm)

5.2 ประเภทของพิทูเนีย

พิทูเนียแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ ๆ ได้ 9 ประเภท (ไม้ดอกแสนสวย. 2539: 78-81; รัญญะ เตชะศีลพิทักษ์. 2539: 219-270) ได้แก่

1. ประเภทดอกใหญ่ชั้นเดียว (grandiflora single) เป็นที่นิยมปลูกกันมากที่สุด ขนาดดอกใหญ่ 7.5-12.5 เซนติเมตร ดอกชั้นเดียว ปลายกลีบดอกหยักย่น ต้นโตแข็งแรง ใบใหญ่ จำนวนดอกน้อยกว่าประเภทดอกเล็ก พันธุ์พิทูเนียชนิดประเภทนี้เป็นลูกผสมชั่วที่ 1 (F1) ทั้งสิ้น ได้แก่ ชุด Cascade, Supercascade, Flash, Daddy, Fair, Titan, Sails, Picotee, Magic, Supermagic และ Ultra

2. ประเภทดอกใหญ่ซ้อน (grandiflora double) ขนาดดอกใหญ่เช่นเดียวกับประเภทดอกใหญ่ชั้นเดียว แต่กลีบดอกซ้อน พันธุ์ที่นิยมปลูกได้แก่พันธุ์ Circus, Bridal, Bouquete, Confetti, Sonata, Fanfare, Valentile และ Blue Danube

3. ประเภทดอกเล็กชั้นเดียว (multiflora single) ขนาดดอกเล็ก กลีบดอกชั้นเดียวเส้นผ่านศูนย์กลางดอก 4-5 เซนติเมตร ให้ดอกดก ปลายกลีบดอกเรียบ ดอกตูมมีลักษณะแหลม และขนาดเล็ก มีทรงพุ่มกะทัดรัด แตกกอได้ดี ใ้ปลูกในแปลงได้ดี ทนต่อสภาพอากาศไม่เหมาะสม เช่น อากาศร้อน ฝนตก และทนทานต่อโรคด้วย พันธุ์ที่นิยมปลูกได้แก่ พันธุ์ในชุด Joy, Carpet, Celebrity และ Plum

4. ประเภทดอกเล็กซ้อน (multiflora double) มีลักษณะเหมือนกับประเภทดอกเล็กชั้นเดียว ต่างกันที่ดอกซ้อน พันธุ์ที่นิยมปลูกได้แก่ ชุด Delight และ Sweet Tart

5. ฟลอริบันดาดอกชั้นเดียว (floribunda single) ขนาดดอกประมาณ 7.5-9.0 เซนติเมตร ดอกตก ทนโรคและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี พันธุ์ที่นิยมปลูก ได้แก่ ชุต Madness และ Primetime

6. ฟลอริบันดาดอกซ้อน (floribunda double) ขนาดดอกเท่ากับฟลอริบันดาดอกชั้นเดียว แต่กลีบดอกซ้อน พันธุ์ที่ปลูกได้แก่ พันธุ์ในชุด Double Madness

7. แคลิฟอร์เนีย ไจแอน (california giants หรือ superbissima) ขนาดดอกใหญ่มาก คือใหญ่กว่าประเภทดอกใหญ่ชั้นเดียวเกือบ 2 เท่า ลำต้นและใบค่อนข้างใหญ่และหนา ดอกไม่ตก

8. พิกูเนียหนู (multiflora หรือ miniature) เป็นพิกูเนียประเภทใหม่ ดอกของพิกูเนียประเภทนี้มีขนาดเล็กกว่าประเภทดอกเล็กชั้นเดียว แต่ดอกดกมาก ลำต้นมีข้อปล้องสั้น จึงทำให้เป็นพุ่มแน่น พันธุ์พิกูเนียประเภทนี้ ได้แก่ พันธุ์ในชุด Fantasy ซึ่งมีหลายสี

9. พิกูเนียเลื้อย (supertunia) เป็นพิกูเนียประเภทใหม่เช่นกัน มีลักษณะพิเศษที่สามารถเลื้อยยาวไปโดยรอบทิศเป็นรัศมีได้กว่า 120 เซนติเมตร จึงเหมาะที่จะใช้เป็นไม้กระถางแขวนและไม้คลุมดิน พิกูเนียประเภทนี้ ได้แก่ พันธุ์ในชุด Fortunia wave ปัจจุบันมีเพียงพันธุ์เดียว คือ พันธุ์ Purple wave ดอกสีม่วง

6. บทปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างครบวงจร ส่วนมากพบในระดับอุดมศึกษาและอาจจะพบได้บ้างในระดับมัธยมศึกษา โดยเฉพาะโรงเรียนขนาดใหญ่ที่มีความพร้อมด้านสถานที่และอุปกรณ์ หัวข้อที่ใช้ในการสอน ได้แก่ ความหมายและประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การเตรียมห้องปฏิบัติการและเครื่องมือในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การเตรียมชิ้นส่วนพืชและการฟอกฆ่าเชื้อ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและอวัยวะของพืช การชักนำให้เกิดยอดและรากด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต การเตรียมต้นกล้าและย้ายออกปลูกในสภาพธรรมชาติ นอกจากการเรียนรู้ในภาคการบรรยายแล้ว ผู้สอนมักจะมีการใช้บทปฏิบัติการร่วมด้วย โดยบทปฏิบัติการที่ใช้สอนถูกพัฒนาขึ้นให้มีเนื้อหาสอดคล้องกับภาคการบรรยาย เพื่อให้ผู้เรียนได้ลงมือทดลองด้วยตนเอง ทำให้ผู้เรียนสามารถเข้าใจเนื้อหาในภาคบรรยายได้ดียิ่งขึ้น ตัวอย่างเช่น

บทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีจุดประสงค์เพื่อให้ผู้เรียนสามารถ (1) ปฏิบัติการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืช ทั้งที่เป็นเนื้อเยื่อและที่ไม่ใช่เนื้อเยื่อ เช่น ตา ใบ ดอก เมล็ด ราก คัพภะ และอับละอองเกสร เป็นต้น (2) สามารถเตรียมอาหารเพื่อให้เหมาะสมกับชนิด

และพันธุ์พืชได้ (3) สามารถนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปประยุกต์ใช้กับพืชชนิดอื่นได้ (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์; และอารีย์ วรรณวัฒน์. 2551: 30-35)

บทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีจุดประสงค์เพื่อให้ผู้เรียนสามารถ (1) อธิบายความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ (2) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ (3) นำพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้ (เสกสรรค์ สุวรรณสุข. 2559: ออนไลน์)

บทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีจุดประสงค์เพื่อให้ผู้เรียนสามารถ (1) มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับความหมาย ความสำคัญ จุดประสงค์และประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (2) ตระหนักถึงความสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อการดำเนินชีวิตประจำวัน (3) เข้าใจและปฏิบัติงานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ (4) สร้างผลงานตามความสนใจโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (พรพรรณ อุสุวรรณ. 2557: 55-60)

จากเอกสารเกี่ยวกับบทปฏิบัติการ ดังที่กล่าวข้างต้น ผู้วิจัยสรุปได้ว่า บทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ 5 ขั้นตอนคือ (1) การเตรียมห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือ (2) การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (3) การเตรียมชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง (4) เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และ (5) การย้ายต้นกล้าออกปลูก ซึ่งขั้นตอนทั้งหมดนี้ต้องทำในสภาวะปลอดเชื้อซึ่งเป็นหัวใจสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ส่งผลทำให้ต้นพืชที่ได้ปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์

7. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

7.1 งานวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (2557) ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนลำต้นของพิทูเนียด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ความเข้มข้น 1% และ 3% และนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS พบว่าชิ้นส่วนลำต้นพิทูเนียที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ความเข้มข้น 1% มีอัตราการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์มากกว่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 3% แต่มีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่า

พรีส (Preece. 1999) ศึกษาการเกิดยอด รากและแคลลัส ของชิ้นส่วนใบพิทูเนีย โดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชลงในอาหารเพาะเลี้ยงในปริมาณที่แตกต่างกัน ได้แก่ BA ความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ IBA ความเข้มข้น 7.5 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์

โครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าเกิดการชักนำรากเฉพาะขึ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 7.5 ไมโครโมลาร์ เท่านั้น และหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าเกิดตาและยอดขนาดเล็กเฉพาะขึ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ เท่านั้น ส่วนแคลลัสพบว่าการเกิดขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7-10 วัน ในอาหารทุกสูตร แต่เกิดแคลลัสมากที่สุดในอาหารที่มีการเติม BA และ IBA ร่วมกัน รวมทั้งพบว่ามียอดพิเศษ (adventitious shoots) เกิดขึ้นด้วย

7.2 งานวิจัยเกี่ยวกับการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

กิตติศักดิ์ โชติกเดชานรงค์ (2553) ศึกษาการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเยื่อสูตร MS แทนการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำด้วยเตาไมโครเวฟกำลังไฟ 360, 600 และ 800 วัตต์เป็นเวลา 3 นาที พบว่าการใช้ไมโครเวฟกำลังไฟฟ้า 600 หรือ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที ทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลอดเชื้อได้ 93% และเมื่อนำอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยไมโครเวฟกำลังไฟ 600 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที มาใช้ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของมวงเทพรัตน์ กุหลาบหนู และหญ้าวาน พบว่าการเจริญและพัฒนาของยอดที่เกิดจากข้อของพืชทั้งสามชนิดไม่แตกต่างกับการเลี้ยงบนอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ทิสเซอร์รัต และคณะ (Tisserat; et al. 1992) ศึกษาการใช้เตาอบไมโครเวฟในการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงยอดสตรอเบอร์รี่ โดยใช้กำลังไฟ 70, 210, 350, 490 และ 700 วัตต์ เป็นเวลา 10 นาที พบว่า ที่กำลังไฟ 490 และ 700 วัตต์ ให้ผลในการฆ่าเชื้ออาหารได้อย่างสมบูรณ์

ยานากาวะ และคณะ (Yanagawa; et al. 1995) ศึกษาการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 0.01% พบว่า กล้วยไม้สามารถเจริญเติบโตได้ไม่ต่างจากชุดควบคุม

เทียเซียรา และคณะ (Teixeira; et al. 2006) ศึกษาอิทธิพลของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ในการฆ่าเชื้ออาหารสำหรับเพาะเลี้ยงหน่อสับปะรด (*Ananas comosus*) พบว่าความเข้มข้นของคลอรีนที่สามารถทำงานได้ทั้งหมด (total active chlorine) ที่เติมลงไปในการอาหาร 0.003, 0.005, 0.007 และ 0.009% สามารถฆ่าเชื้อในอาหารได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารที่เติมคลอรีน 0.0003% หรือ 0.0005% ทำให้น้ำหนักมวลและจำนวนยอดใหม่เป็น 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

ชาวอนท์ และ ทาวาร์ (Sawant; & Tawar. 2011) ศึกษาการเพาะเลี้ยงอ้อยในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 4% ความเข้มข้น 0.1 – 0.5% ลงในอาหารที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่า

เชื้อ ทั้งแบบการเติมภายในและภายนอกตู้ย่ายเนื้อเยื่อ พบว่าการเติมโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 4% ความเข้มข้น 0.1% ลงในอาหารเพาะเลี้ยง สามารถทำให้อาหารปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และพืชสามารถเติบโตได้ โดยการเติบโตของยอดและการเกิดรากไม่แตกต่างจากชุดควบคุม

บรอนดานี และคณะ (Brondani; et al. 2012) ศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของ ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus benthamii*) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ฆ่าเชื้อโดยเติมโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่มีของคลอรีนที่สามารถทำงานได้ทั้งหมด (total active chlorine) ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 0.000, 0.001, 0.003, 0.005, 0.007 และ 0.010 ร้อยละโดยปริมาตร เปรียบเทียบกับอาหารเพาะเลี้ยงที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอล หลังจากทำการเพาะเลี้ยงไป 28 วัน พบว่าความเข้มข้นของคลอรีนที่สามารถทำงานได้ทั้งหมดที่ระดับความเข้มข้น 0.005, 0.007 และ 0.010 ร้อยละโดยปริมาตร มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยูคาลิปตัสได้อย่างสมบูรณ์

เทพประสิทธิ์ และทองภักดีดี (Thepsithar; & Thongpukdee. 2013) ศึกษาการฆ่าเชื้อในอาหารสูตรไฮโปเน็กซ์ (Hyponex) สำหรับเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม (protocorms) ของกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิส (Phalaenopsis) พบว่าอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่เติมโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 5.25% ปริมาณ 150 ไมโครลิตรทำให้อาหารเหลวและอาหารแข็งอยู่ในสภาพปลอดเชื้ออย่างสมบูรณ์ 100 %

ดิอินทร์ และคณะ (Deein; et al. 2013) ศึกษาการทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชปลอดเชื้อโดยใช้สารเคมี พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้น 6% ปริมาณ 36 ไมโครลิตรต่ออาหาร 20 มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการกำจัดจุลินทรีย์ และทำให้อาหารอยู่ในสภาพปลอดเชื้ออย่างสมบูรณ์

7.3 งานวิจัยเกี่ยวกับการจัดการเรียนรู้โดยใช้บทปฏิบัติการ

อรอุมา ละมุล (2541) ศึกษาการพัฒนาบทปฏิบัติการ เรื่อง ความสามารถของวัสดุธรรมชาติในการดูดซับโลหะหนัก สำหรับใช้สอนวิชาสิ่งแวดล้อม และนำไปสอนกับผู้เรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 จำนวน 30 คน พบว่าบทปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพตามเกณฑ์ที่กำหนด โดยมีค่าประสิทธิภาพเท่ากับ 80.11/80.27

ประเทืองทิพย์ สุกุมลจันท์ (2545) ศึกษาการพัฒนาบทปฏิบัติการ เรื่อง การแปรรูปและทดสอบสารอาหารในพืชสมุนไพร สำหรับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5 และนำไปสอนกับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา จำนวน 40 คน พบว่า หลังจากผู้เรียนเรียนด้วยบทปฏิบัติการที่พัฒนาขึ้น ทักษะกระบวนการ

ทางวิทยาศาสตร์และผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนสูงขึ้นกว่าก่อนเรียนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 ($p = 0.000$)

พรทิพย์ วงษ์นาป่า (2548) ศึกษาการพัฒนาบทปฏิบัติการ เรื่อง การสกัดและแยกสารประกอบแซนโทนจากผลมังคุด สำหรับผู้เรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 และนำไปสอนกับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา จำนวน 60 คน โดยแบ่งผู้เรียนออกเป็นกลุ่ม ๆ ละ 30 คน พบว่า บทปฏิบัติการที่พัฒนาขึ้นมีคุณภาพอยู่ในระดับดีมาก และผู้เรียนที่เรียนด้วยบทปฏิบัติการที่สร้างขึ้นมีผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนสูงขึ้นกว่าผู้เรียนที่เรียนด้วยวิธีปกติ

ทรงกลด ไบยา (2558) ศึกษาการพัฒนาบทปฏิบัติการ เรื่อง การเปลี่ยนแปลงพลังงาน โดยใช้วิธีการจัดการเรียนรู้แบบสร้างความรู้ด้วยตนเอง สำหรับผู้เรียนระดับปริญญาตรี และนำไปสอนกับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษาจำนวน 34 คน พบว่า ผู้เรียนที่เรียนด้วยบทปฏิบัติการที่สร้างขึ้นมีผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนสูงขึ้นกว่าก่อนเรียน ($p < 0.05$) และมีความพึงพอใจต่อการจัดการเรียนรู้ด้วยบทปฏิบัติการที่พัฒนาขึ้นในระดับมาก



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาบทปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับผู้เรียนในระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย ซึ่งผู้วิจัยแบ่งขั้นตอนในการทำวิจัยเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

- ตอนที่ 1 การสำรวจความคิดเห็นในการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- ตอนที่ 2 การทดลองในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์
- ตอนที่ 3 การสร้างและพัฒนาบทปฏิบัติการ
- ตอนที่ 4 การนำบทปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ที่สร้างขึ้นไปสอน

ตอนที่ 1 การสำรวจความคิดเห็นในการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เพื่อศึกษาสภาพปัญหาในการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ผู้วิจัยจึงสร้างแบบสอบถามความคิดเห็นของผู้สอนรายวิชาชีววิทยาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายขึ้น โดยมีขั้นตอนในการสร้างแบบสอบถาม ดังนี้

1. ศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้องกับรูปแบบและขั้นตอนการสร้างแบบสอบถามแบบมาตราส่วนประมาณค่า (rating scale) ตามวิธีของลิเคิร์ต (Likert, 1967: 90-95)
2. ศึกษาเนื้อหาสาระ จุดประสงค์การเรียนรู้และระยะเวลาในการเรียนการสอนในหน่วยการเรียนรู้รายวิชาชีววิทยาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายตามหลักสูตรแกนกลางการศึกษาขั้นพื้นฐาน พุทธศักราช 2551
3. กำหนดประเด็นและขอบเขตของแบบสอบถาม จากนั้นสร้างแบบสอบถามจำนวน 7 ข้อ โดยกำหนดเกณฑ์การประเมินแบบมาตราส่วนประมาณค่า 5 ระดับ คือ 5 4 3 2 1 หมายถึง เห็นด้วยมากที่สุด เห็นด้วยมาก เห็นด้วยปานกลาง เห็นด้วยน้อย และเห็นด้วยน้อยที่สุด ตามลำดับ
4. นำแบบสอบถามที่สร้างขึ้นไปให้ผู้เชี่ยวชาญจำนวน 3 ท่าน (ภาคผนวก ข) พิจารณาคำดัชนีความสอดคล้องระหว่างข้อคำถามของแบบสอบถามและจุดประสงค์ของแบบสอบถาม (IOC) โดยกำหนดเกณฑ์การพิจารณาคำดัชนีความสอดคล้อง ดังนี้

+1	หมายถึง	สอดคล้อง
0	หมายถึง	ไม่แน่ใจ
-1	หมายถึง	ไม่สอดคล้อง

และปรับปรุงแก้ไขแบบสอบถามตามข้อเสนอแนะของผู้เชี่ยวชาญ

5. นำแบบสอบถามที่ปรับปรุงแก้ไขเรียบร้อยแล้วไปสอบถามความคิดเห็นกับผู้สอนรายวิชาชีววิทยา ระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5 ในโรงเรียนขนาดใหญ่ จังหวัดกรุงเทพมหานคร จำนวน 20 คน เป็นเพศชาย 5 คน และเพศหญิง 15 คน ซึ่งได้จากการชักตัวอย่างแบบเจาะจง (purposive sampling) เนื่องจากผู้สอนที่ทำการสำรวจนี้เป็นผู้ที่มีประสบการณ์สอน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย

ตอนที่ 2 การทดลองในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์

ผู้วิจัยแบ่งการทดลองในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์เป็น 4 หัวข้อ ดังนี้

1. การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยสารเคมี
2. การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS ด้วยสารเคมี คลอโรกซ์และเตาไมโครเวฟ
3. การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี คลอโรกซ์และเตาไมโครเวฟต่อการเจริญเติบโตของพืช
4. การศึกษาประสิทธิภาพบริเวณปฏิบัติงานในการย้ายเนื้อเยื่อ

1. การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยสารเคมี

นำอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ชุด ประกอบด้วยด้ามมีดผ่าตัด ปากคีบ และจานเพาะเลี้ยง (1 คู่ ประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงและฝาปิด) อย่างละ 1 ชิ้น มาฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี 3 ชนิด ได้แก่ คลอโรกซ์ เอทิลแอลกอฮอล์ 70% และเตทอล โดยทำการแช่น้ำยาฆ่าเชื้อที่ระดับความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน และให้ชุดการทดลองที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อหนึ่งความดันไอน้ำเป็นชุดควบคุม รวมเป็น 9 ชุดการทดลอง ๆ ละ 10 ซ้ำ (ชิ้น) ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อหนึ่งความดันไอน้ำ

ชุดการทดลองที่ 2 ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ชุดการทดลองที่ 3 คลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10% เวลา 15 นาที

ชุดการทดลองที่ 4 คลอโรกซ์ ความเข้มข้น 15% เวลา 10 นาที

ชุดการทดลองที่ 5 คลอโรอ็อกซ์ ความเข้มข้น 20% เวลา 5 นาที

ชุดการทดลองที่ 6 เอทิลแอลกอฮอล์ 70% เวลา 10 นาที

ชุดการทดลองที่ 7 เอทิลแอลกอฮอล์ 70% เวลา 15 นาที

ชุดการทดลองที่ 8 เดททอล 5% เวลา 10 นาที

ชุดการทดลองที่ 9 เดททอล ผสมร่วมกับเอทิลแอลกอฮอล์ 70% อัตราส่วน 1:20 เวลา 10 นาที

หลังจากทำการฆ่าอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นำอุปกรณ์ไปผึ่งให้แห้งในที่อับลม จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของสารเคมีทั้ง 3 ชนิด โดยใช้อาหารสูตร MS (Murashige; & Skoog. 1962) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใด ๆ ที่ฆ่าเชื้อด้วยวิธีปกติ (autoclave) ในการทดสอบ ดังนี้ สำหรับด้ามมีดผ่าตัดและปากคีบ ทดสอบโดยทำการขีดลงบนผิวหน้าอาหารสูตร MS ที่เตรียมไว้ในจานเพาะเลี้ยง ๆ ละ 5 ชิ้น สำหรับจานเพาะเลี้ยงทดสอบโดยทำการเทอาหารสูตร MS ลงในจานเพาะเลี้ยงโดยเทให้อาหารมีความสูงขึ้นมาจากก้นจานเพาะเลี้ยง 0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงทั้งหมดไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกจำนวนและลักษณะการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวันที่ 2, 7, 14, 21 และ 28 เปรียบเทียบกับอุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำโดยขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพทั้งหมดนี้ ทำภายในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อ

เมื่อครบ 28 วัน ตรวจสอบการปนเปื้อนของอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และคัดเลือกชุดการทดลองที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดสำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาบทปฏิบัติการต่อไป

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่อาจเกิดขึ้นจากสิ่งแวดล้อม เพื่อนำมาวิเคราะห์ร่วมกับผลการทดลองว่าหากมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์บนผิวหน้าอาหารที่ทำการทดสอบอุปกรณ์เพาะเลี้ยงที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีแล้ว จะมีโอกาสการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมได้มากน้อยเพียงใด และใช้ระยะเวลาเท่าใดในการเกิดการปนเปื้อน วิธีทดสอบคือเทอาหารสูตร MS ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำลงในจานเพาะเลี้ยง โดยทำทั้งหมด 5 ซ้ำ (จานเพาะเลี้ยง 5 คู่) รอให้อาหารเย็น ปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา 10 วินาที (เท่ากับระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบอุปกรณ์) จากนั้นปิดฝาและนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกจำนวนและลักษณะการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวันที่ 2, 7, 14, 21 และ 28 โดยทดสอบนี้ทำภายในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อ

2. การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ด้วยสารเคมี คลอโรกซ์และเตาไมโครเวฟ

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใด ๆ เติมน้ำตาลซูโครสลงไปในการสังเคราะห์ 30 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นตามต้องการ ปรับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารให้มีค่า 5.6-5.8 และเติมผงวุ้น 7 กรัมต่อลิตร ต้มวุ้นให้ละลายและรอให้อาหารอุ่น เทอาหารที่เตรียมลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อขวด จากนั้นทำการศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอาหารด้วยวิธีดังต่อไปนี้

2.1 การฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยสารเคมีคลอโรกซ์

เติมคลอโรกซ์ซึ่งมีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 5.25% โดยปริมาตร ในปริมาตรที่ต่างกัน ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อขวด ในขณะที่อาหารยังอุ่น และให้ชุดการทดลองที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำเป็นตัวควบคุม รวมเป็น 8 ชุดการทดลอง ๆ ละ 10 ข้ว (ขวด) ดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ
- ชุดการทดลองที่ 2 ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ
- ชุดการทดลองที่ 3 เติมคลอโรกซ์ ปริมาตร 0 ไมโครลิตร
- ชุดการทดลองที่ 4 เติมคลอโรกซ์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
- ชุดการทดลองที่ 5 เติมคลอโรกซ์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
- ชุดการทดลองที่ 6 เติมคลอโรกซ์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร
- ชุดการทดลองที่ 7 เติมคลอโรกซ์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
- ชุดการทดลองที่ 8 เติมคลอโรกซ์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร

2.2 การฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยไมโครเวฟ

ทำการทดสอบการฆ่าเชื้ออาหารสูตร MS ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อขวด ด้วยกำลังไฟที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 3 นาที และให้ชุดการทดลองที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำเป็นตัวควบคุม รวมเป็น 8 ชุดการทดลอง ๆ ละ 10 ข้ว (ขวด) ดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ
- ชุดการทดลองที่ 2 ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ
- ชุดการทดลองที่ 3 กำลังไฟ 0 วัตต์
- ชุดการทดลองที่ 4 กำลังไฟ 160 วัตต์
- ชุดการทดลองที่ 5 กำลังไฟ 320 วัตต์

ชุดการทดลองที่ 6 กำลังไฟ 480 วัตต์

ชุดการทดลองที่ 7 กำลังไฟ 640 วัตต์

ชุดการทดลองที่ 8 กำลังไฟ 800 วัตต์

จากนั้นนำขวดอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกจำนวนและลักษณะการปนเปื้อนของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวันที่ 2, 7, 14, 21 และ 28 เปรียบเทียบกับอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

หลังจากครบ 28 วัน ตรวจสอบการปนเปื้อนของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และคัดเลือกชุดการทดลองที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดสำหรับนำไปใช้ในการศึกษาผลของวิธีการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการเจริญเติบโตของพืชเนื้อต่อไป

3. การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีคลอริกซ์และเตาไมโครเวฟต่อการเจริญเติบโตของพืช

เตรียมพืชเนื้อสำหรับการทดลอง โดยนำเมล็ดพืชเนื้อ (*Petunia hybrida* E.Vilm รุ่น F1 ของบริษัท Gartenland GmbH Aschersleben, Denmark) มาทำการฟอกด้วยคลอริกซ์ที่ผสมสารลดแรงตึงผิว (tween 20) 1-2 หยด โดยฟอกครั้งที่ 1 ที่ระดับความเข้มข้น 10% และฟอกครั้งที่ 2 ที่ระดับความเข้มข้น 5% โดยใช้เวลาในการฟอกครั้งละ 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS และนำไปเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ความเข้มแสง 35 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารแข็งสูตร MS ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอริกซ์และเตาไมโครเวฟ โดยคัดเลือกอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการในการทดลองหัวข้อที่ 2 ที่สามารถทำให้อาหารเพาะเลี้ยงปลอดเชื้อจุลินทรีย์ได้นานถึง 28 วัน มาทำการเพาะเลี้ยงพืชเนื้ออายุ 45 วัน โดยใช้ชิ้นส่วนลำต้นพืชเนื้อความยาว 1 เซนติเมตร 1 ชิ้นต่อขวด โดยทำการทดลอง 10 ข้ว (ขวด) /ชุดการทดลอง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ความเข้มแสง 35 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกจำนวนยอด ความสูงของยอด และจำนวนใบต่อยอด ทุก ๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

4. การศึกษาประสิทธิภาพบริเวณปฏิบัติงานในการย้ายเนื้อเยื่อ

ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการปฏิบัติงานย้ายเนื้อเยื่อในตู้ปลอดขนาด ยาว 24 นิ้ว กว้าง 12 นิ้ว สูง 18 นิ้ว ซึ่งถูกดัดแปลงเป็นตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ และปฏิบัติงานในห้องที่สะอาด ไม่

มีลมพัด ซึ่งทั้งสองบริเวณนี้จะมีการเตรียมให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อก่อนเริ่มทำการทดลอง โดยทำการฉีดพ่นเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ให้ครอบคลุมบริเวณที่จะปฏิบัติงาน และใช้ผ้าที่สะอาดหรือกระดาษทิชชูเช็ด และในขณะที่ปฏิบัติงานจะมีการพ่นเอทิลแอลกอฮอล์ 70% เป็นระยะ ๆ

หลังจากเตรียมบริเวณปฏิบัติงานเรียบร้อยแล้ว จึงดำเนินการทดลองถ่ายเนื้อเยื่อ โดยใช้ชิ้นส่วนลำต้นพืชเนื้ออายุ 45 วัน ความยาว 1 เซนติเมตร 1 ชิ้นต่อขวด โดยทำการทดลอง 10 ขั้ว (ขวด) /ชุดการทดลอง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ความเข้มแสง 35 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกจำนวนและลักษณะการปนเปื้อนของจุลินทรีย์วันที่ 2, 7, 14, 21 และ 28 เปรียบเทียบกับการปฏิบัติงานในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อตามปกติ

ตอนที่ 3 การสร้างและพัฒนาบทปฏิบัติการ

ผู้วิจัยนำผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ มาดำเนินการสร้างและพัฒนาเป็นบทปฏิบัติการ โดยดำเนินการดังนี้

1. การสร้างและพัฒนาบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ศึกษาเนื้อหาสาระ จุดประสงค์การเรียนรู้และระยะเวลาในการเรียนการสอนแต่ละหน่วยการเรียนรู้รายวิชาชีววิทยาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายตามหลักสูตรแกนกลางการศึกษาขั้นพื้นฐาน พุทธศักราช 2551 และศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อประกอบในการกำหนดเนื้อหา จุดประสงค์ การวัดและการประเมินผลของการสร้างบทปฏิบัติการ

2. กำหนดจุดประสงค์การเรียนรู้และกิจกรรมของบทปฏิบัติการที่จะสร้างขึ้น

3. สร้างบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

4. นำบทปฏิบัติการที่สร้างเสร็จเรียบร้อยแล้วเสนอต่อผู้เชี่ยวชาญจำนวน 3 ท่าน เพื่อพิจารณาความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหา (content validity) และค่าดัชนีความสอดคล้อง (IOC) และประเมินคุณภาพของบทปฏิบัติการ โดยกำหนดเกณฑ์การประเมินแบบมาตราส่วนประมาณค่า 5 ระดับ คือ 5 4 3 2 1 หมายถึงดีมาก ดี ปานกลาง พอใช้ และควรปรับปรุง ตามลำดับ จากนั้นปรับปรุงแก้ไขตามข้อเสนอแนะของผู้เชี่ยวชาญ

5. นำบทปฏิบัติการที่ได้ปรับปรุงแก้ไขเรียบร้อยแล้ว ไปทดลองสอนกับผู้เรียนที่ไม่ใช่กลุ่มที่ศึกษาจำนวน 30 คน จากนั้นนำข้อบกพร่องมาปรับปรุงแก้ไข

6. นำบทปฏิบัติการที่ได้รับการปรับปรุงแก้ไขแล้ว ไปสอนจริงกับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา

2. การสร้างและหาคุณภาพเครื่องมือวัดผลการเรียนรู้

ในการวัดผลการเรียนรู้ เครื่องมือที่ใช้คือ แผนการจัดการเรียนรู้ แบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน และแบบประเมินความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งมีขั้นตอนการสร้างเครื่องมือและหาคุณภาพเครื่องมือวัดผลการเรียนรู้ ดังนี้

1. ศึกษาเอกสารเกี่ยวกับการสร้างแผนการจัดการเรียนรู้ การวัดและประเมินผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนเพื่อออกแบบและสร้างข้อสอบแบบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน และการสร้างแบบประเมินความพึงพอใจ

2. นำผลวิเคราะห์จุดประสงค์การเรียนรู้ และเนื้อหาของบทปฏิบัติการ มาสร้าง(1) แผนการจัดการเรียนรู้ (2) แบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนแบบปรนัยชนิดเลือกตอบ 4 ตัวเลือก จำนวน 40 ข้อ โดยแบ่งพฤติกรรมที่วัดออกเป็น 3 ด้าน คือ ด้านความรู้ความจำ ด้านความเข้าใจ และด้านการนำไปใช้ และ (3) สร้างแบบประเมินความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จำนวน 9 ข้อ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ด้าน คือ ด้านการจัดการเรียนรู้และบทปฏิบัติการ โดยกำหนดเกณฑ์การประเมินแบบมาตราส่วนประมาณค่า 5 ระดับ ตามวิธีของลิเคอร์ท ดังนี้ 5 4 3 2 1 หมายถึง พึงพอใจมากที่สุด พึงพอใจมาก พึงพอใจปานกลาง พึงพอใจน้อยและพึงพอใจน้อยที่สุด ตามลำดับ

3. นำแผนการจัดการเรียนรู้ แบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน และแบบประเมินความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนการสอน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่สร้างขึ้น เสนอต่อผู้เชี่ยวชาญจำนวน 3 ท่าน เพื่อตรวจสอบความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหา (content validity) และค่าดัชนีความสอดคล้อง (IOC) จากนั้นนำข้อเสนอนี้มาปรับปรุงแก้ไข และเลือกข้อสอบของแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ที่มีค่าดัชนีความสอดคล้องตั้งแต่ 0.5 ขึ้นไปสำหรับนำไปใช้

4. นำแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนที่คัดเลือกไว้ ไปทดสอบกับผู้เรียนที่ไม่ใช่กลุ่มที่ศึกษาจำนวน 30 คน แล้วนำแบบทดสอบมาวิเคราะห์หาค่าความยากง่าย (p) และค่าอำนาจจำแนก (r) ของแบบทดสอบเป็นรายข้อ โดยใช้เทคนิค 27% ของจุง เทห์ ฟาน (Fan. 1952)

5. คัดเลือกข้อคำถามที่มีค่าความยากง่ายอยู่ระหว่าง 0.2-0.8 และค่าอำนาจจำแนกตั้งแต่ 0.20 ขึ้นไป จำนวน 20 ข้อ

6. นำข้อคำถามที่คัดเลือกไว้แล้วมาหาค่าความเชื่อมั่น ตามวิธีของคูเดอร์ ริชาร์ดสัน (Kuder; & Richardson. 1937) โดยใช้สูตร K-R 20

7. นำแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนไปใช้กับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา

ตอนที่ 4 การนำบทปฏิบัติการและเครื่องมือวัดผลการเรียนรู้ไปสอนกับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา

ผู้วิจัยนำบทปฏิบัติการและเครื่องมือวัดผลการเรียนรู้ที่ผ่านการพิจารณาความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหา (content validity) และค่าดัชนีความสอดคล้อง (IOC) ทำการปรับปรุงแก้ไขแก้ไขเรียบร้อยแล้วไปสอนกับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา เพื่อศึกษาผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนวิทยาศาสตร์ ความก้าวหน้าทางการเรียน และความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยมีขั้นตอนในการดำเนินการ ดังนี้

1. ผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา

ผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษาในการวิจัยครั้งนี้ คือ ผู้เรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5 โรงเรียนขนาดใหญ่แห่งหนึ่ง ในเขตคลองเตย จังหวัดกรุงเทพมหานคร ภาคเรียนที่ 1 ปีการศึกษา 2559 จำนวน 39 คน ซึ่งได้จากการชักตัวอย่างแบบเจาะจง (purposive sampling) เนื่องจากผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษานี้มีผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนที่ใกล้เคียงกัน และยังไม่เคยได้รับการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยบทปฏิบัติการ

2. เนื้อหาที่ใช้ในการสอน

เนื้อหาที่ใช้ในการสอน เป็นเนื้อหาในกลุ่มสาระการเรียนรู้วิทยาศาสตร์ รายวิชาชีววิทยาเพิ่มเติม ระดับมัธยมศึกษาปีที่ 5 โดยใช้บทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่พัฒนาขึ้น ซึ่งประกอบด้วยบททดลอง 2 ตอน คือ

ตอนที่ 1 เรื่อง การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ตอนที่ 2 เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเนื้อเยื่อ

3. ระยะเวลาที่ใช้ในการสอน

ระยะเวลาที่ใช้ในการสอนครั้งนี้ ผู้วิจัยทำการสอนกับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษาในภาคเรียนที่ 1 ปีการศึกษา 2559 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ๆ ละ 3 คาบๆ ละ 50 นาที

4. การเก็บรวบรวมข้อมูล

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง มีรูปแบบการทดลอง (experimental design) เป็นชนิดกลุ่มเดียวทดสอบก่อนและหลังการทดลอง (one group pretest – posttest design) โดยผู้วิจัยดำเนินการเก็บรวบรวมข้อมูลตามขั้นตอน ดังนี้

1. ติดต่อผู้บริหารโรงเรียน ครูและผู้ที่เกี่ยวข้องเพื่อขอความร่วมมือในการทำวิจัย

2. ทำการเก็บข้อมูลก่อนการทดลอง โดยให้ผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษาทำแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน เพื่อนำคะแนนที่ได้เป็นคะแนนทดสอบก่อนเรียน

3. ทำการสอนโดยใช้บทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้กับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา

4. เมื่อผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษาเรียนครบทุกบทปฏิบัติการ ทำการเก็บข้อมูลหลังการทดลอง โดยให้ผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษาทำแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนอีกครั้งโดยสลับข้อคำถาม คะแนนที่ได้เป็นคะแนนทดสอบหลังเรียน ทั้งยังให้ผู้เรียนประเมินความพึงพอใจของการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

5. นำคะแนนที่ได้จากการทำแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนทั้งก่อนเรียนและหลังเรียนมาทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเพื่อวิเคราะห์ผลการเรียนรู้ ความก้าวหน้าทางการเรียน และวิเคราะห์คะแนนจากแบบประเมินความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อประเมินผลของการจัดการเรียนรู้

ตาราง 2 แบบแผนการวิจัยแบบกลุ่มเดียวทดสอบก่อนและหลังทดลอง (one group pretest-posttest design)

กลุ่ม	สอบก่อน	ทดลอง	สอบหลัง
E	T ₁	X	T ₂

เมื่อ E แทน ผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา
 T₁ แทน คะแนนวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนก่อนเรียน
 T₂ แทน คะแนนวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนหลังเรียน
 X แทน การจัดการเรียนรู้ด้วยบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิจัย

1. วิเคราะห์ความคิดเห็นของผู้สอนเกี่ยวกับการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ด้วยค่าสถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และนำค่าเฉลี่ยมาแปลความหมายโดยใช้เกณฑ์ ดังนี้

ค่าเฉลี่ย	4.51 – 5.00	หมายถึง	เห็นด้วยมากที่สุด
ค่าเฉลี่ย	3.51 – 4.50	หมายถึง	เห็นด้วยมาก

ค่าเฉลี่ย	2.51 – 3.50	หมายถึง	เห็นด้วยปานกลาง
ค่าเฉลี่ย	1.51 – 2.50	หมายถึง	เห็นด้วยน้อย
ค่าเฉลี่ย	1.00 – 1.50	หมายถึง	เห็นด้วยน้อยที่สุด

2. วิเคราะห์ผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ ด้วยค่าสถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยทุกชุดการทดลองใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD)

3. วิเคราะห์ค่าดัชนีความสอดคล้อง (IOC) ระหว่างจุดประสงค์กับบทปฏิบัติการ และหาคุณภาพของบทปฏิบัติการ ด้วยค่าสถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย และนำค่าเฉลี่ยมาแปลความหมายของคุณภาพบทปฏิบัติการโดยใช้เกณฑ์ ดังนี้

ค่าเฉลี่ย	4.51 – 5.00	หมายถึง	มีคุณภาพดีมาก
ค่าเฉลี่ย	3.51 – 4.50	หมายถึง	มีคุณภาพดี
ค่าเฉลี่ย	2.51 – 3.50	หมายถึง	มีคุณภาพปานกลาง
ค่าเฉลี่ย	1.51 – 2.50	หมายถึง	มีคุณภาพน้อย
ค่าเฉลี่ย	1.00 – 1.50	หมายถึง	มีคุณภาพน้อยมาก

4. วิเคราะห์คุณภาพของเครื่องมือวัดผลการเรียนรู้ ได้แก่

4.1 แบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน วิเคราะห์เที่ยงตรงเชิงเนื้อหา ค่าดัชนีความสอดคล้อง (IOC) ระหว่างข้อคำถามกับจุดประสงค์การเรียนรู้เชิงพฤติกรรม วิเคราะห์ค่าความยาก-ง่าย (p) ค่าอำนาจจำแนก (r) และค่าความเชื่อมั่น แบบคูเดอร์ ริชาร์ดสัน โดยใช้สูตร K-R 20

4.2 แบบประเมินความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช วิเคราะห์เที่ยงตรงเชิงเนื้อหา ค่าดัชนีความสอดคล้อง (IOC) ระหว่างข้อคำถามกับจุดประสงค์ของการประเมิน

5. การวิเคราะห์ผลการเรียนรู้

5.1 การวิเคราะห์ผลการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยใช้สถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ผลการเรียนโดยนำคะแนนที่ได้จากการทำแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนก่อนเรียนและหลังเรียน มาวิเคราะห์ด้วยสถิติที่แบบผู้เรียนไม่เป็นอิสระต่อกัน (t – test for dependent samples)

5.2 วิเคราะห์ความก้าวหน้าทางการเรียนของผู้เรียน ด้วยวิธี average normalized gain (Hake. 1998) ซึ่งมีวิธีการหาค่าความก้าวหน้าทางการเรียนและแปลความหมายของข้อมูล ดังนี้

$$\text{Gain percentage } <g> = \frac{(\% \text{ posttest} - \% \text{ pretest})}{100 - \% \text{ pretest}}$$

คะแนนเฉลี่ย 0.00 – 0.30 แปลว่า ความก้าวหน้าทางการเรียนของผู้เรียนอยู่ในระดับต่ำ (low gain)

คะแนนเฉลี่ย 0.31 – 0.69 แปลว่า ความก้าวหน้าทางการเรียนของผู้เรียนอยู่ในระดับปานกลาง (medium gain)

คะแนนเฉลี่ย 0.70 – 1.00 แปลว่า ความก้าวหน้าทางการเรียนของผู้เรียนอยู่ในระดับสูง (high gain)

5.2 วิเคราะห์ระดับความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยใช้สถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และนำค่าเฉลี่ยมาแปลความหมายของระดับความพึงพอใจของผู้เรียนโดยใช้เกณฑ์ ดังนี้

ค่าเฉลี่ย	4.51 – 5.00	หมายถึง	พึงพอใจมากที่สุด
ค่าเฉลี่ย	3.51 – 4.50	หมายถึง	พึงพอใจมาก
ค่าเฉลี่ย	2.51 – 3.50	หมายถึง	พึงพอใจปานกลาง
ค่าเฉลี่ย	1.51 – 2.50	หมายถึง	พึงพอใจน้อย
ค่าเฉลี่ย	1.00 – 1.50	หมายถึง	พึงพอใจน้อยที่สุด

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้ มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนานาบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับผู้เรียนในระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย โดยผู้วิจัยขอเสนอผลการทดลองและผลการวิเคราะห์ข้อมูล ดังนี้

ตอนที่ 1 การสำรวจความคิดเห็นในการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ตอนที่ 2 การทดลองในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์

ตอนที่ 3 การสร้างและพัฒนานาบทปฏิบัติการ

ตอนที่ 4 การนำบทปฏิบัติการที่สร้างขึ้นไปสอน

ตอนที่ 1 การสำรวจความคิดเห็นในการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

จากการสำรวจความคิดเห็นเกี่ยวกับการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ของ ผู้สอนรายวิชาชีววิทยาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจำนวน 20 คน โดยเป็นเพศชาย 5 คน และ เพศหญิง 15 คน ซึ่งได้จากการชักตัวอย่างแบบเจาะจง ผลการสำรวจความเห็นแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ดังตาราง 3

จากผลการสำรวจผู้สอนรายวิชาชีววิทยาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายถึงความคิดเห็นในการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบว่าความคิดเห็นในระดับมากมี 3 ข้อคือ ผู้สอนคิดว่า ผู้เรียนชอบเรียน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (1) ผู้สอนคิดว่า ควรเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อให้ผู้เรียนเข้าใจการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อย่างครบวงจร (3) และ ผู้สอนคิดว่าหากสอนด้วยวิธีทำปฏิบัติการจะช่วยให้ผู้เรียนสามารถสร้าง ความรู้ความเข้าใจได้มากกว่าวิธีการบรรยายเพียงอย่างเดียว (6) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.70 ± 0.73 , 4.00 ± 0.92 และ 4.25 ± 0.55 ตามลำดับ ส่วนความคิดเห็นที่อยู่ในระดับน้อยมี 3 ข้อเช่นกันคือ ผู้สอน คิดว่าเนื้อหา เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในแบบเรียนทำให้ผู้เรียนเข้าใจเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้และ เห็นภาพรวมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (2) ผู้สอนคิดว่า สื่อและอุปกรณ์ในโรงเรียนมีความพร้อม สำหรับการสอนด้วยบทปฏิบัติการ (4) และ ผู้สอนคิดว่า สถานที่ในโรงเรียนมีความพร้อมสำหรับการ สอนด้วยบทปฏิบัติการ (5) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.25 ± 0.44 , 2.35 ± 0.49 และ 1.95 ± 0.51 ตามลำดับ

จากผลการสำรวจความคิดเห็นของผู้สอนชี้ให้เห็นว่า ผู้สอนเห็นควรให้มีการจัดการเรียนรู้ เรื่อง "การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช" โดยเฉพาะการจัดการเรียนรู้ด้วยบทปฏิบัติการ เพราะเนื้อหาในแบบเรียนไม่เพียงพอ แต่ผู้สอนมีข้อจำกัดสำคัญที่ทำให้จัดการเรียนรู้เรื่องนี้ได้ยากคือ สื่อการเรียนรู้อุปกรณ์ และสถานที่ในโรงเรียนไม่มีความพร้อม

ตาราง 3 ผลการสำรวจความคิดเห็นเกี่ยวกับการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของผู้สอนรายวิชาชีววิทยาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย

รายการประเมิน	$\bar{X}$	S.D.	ระดับความคิดเห็น
1. ผู้สอนคิดว่า ผู้เรียนชอบเรียน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	3.70	0.73	มาก
2. ผู้สอนคิดว่า เนื้อหา เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในแบบเรียนทำให้ผู้เรียนเข้าใจเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้และเห็นภาพรวมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	2.25	0.44	น้อย
3. ผู้สอนคิดว่า ควรเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อให้ผู้เรียนเข้าใจการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างครบวงจร	4.00	0.92	มาก
4. ผู้สอนคิดว่า สื่อและอุปกรณ์ในโรงเรียนมีความพร้อมสำหรับการสอนด้วยบทปฏิบัติการ	2.35	0.49	น้อย
5. ผู้สอนคิดว่า สถานที่ในโรงเรียนมีความพร้อมสำหรับการสอนด้วยบทปฏิบัติการ	1.95	0.51	น้อย
6. ผู้สอนคิดว่า หากสอนด้วยวิธีทำปฏิบัติการจะช่วยให้ผู้เรียนสามารถสร้างความรู้ความเข้าใจได้มากกว่าวิธีการบรรยายเพียงอย่างเดียว	4.25	0.55	มาก

ตอนที่ 2 การทดลองในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์

1. การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยสารเคมี

จากการศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 1 ชุด ประกอบด้วยด้ามมีดผ่าตัด ปากคีบ และจานเพาะเลี้ยง (1 คู่ ประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงและฝาปิด) อย่างละ 1 ชิ้น ด้วยสารเคมี 3 ชนิด ได้แก่ คลอริกซ์ เอทิลแอลกอฮอล์ 70% และเดทตอล โดยการแช่ในสารเคมีที่ระดับความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน โดยให้อุปกรณ์ที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำเป็นชุด

ควบคุม จากนั้นนำอุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วไปฝังให้แห้งในที่อับลม และทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของสารเคมีทั้ง 3 ชนิด โดยใช้อาหารสูตร MS ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ความดันไอน้ำในการทดสอบ โดยด้ามมีดผ่าตัดและปากคีบ ทดสอบโดยทำการขีดลงบนผิวหน้าอาหารสูตร MS ที่เตรียมไว้ในจานเพาะเลี้ยง สำหรับจานเพาะเลี้ยงทดสอบโดยทำการเทอาหารสูตร MS ลงในจานเพาะเลี้ยงให้มีความสูงจากก้นจานเพาะเลี้ยง 0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และบันทึกผลการปนเปื้อนทุกวันที่ 2,7,14,21 และ 28 ของการทดลอง (ตาราง 4)

หลังครบ 28 วัน พบว่า อุปกรณ์เพาะเลี้ยงที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีกซ์มีอัตราการปนเปื้อนของจุลินทรีย์น้อยกว่าอุปกรณ์ที่ฆ่าเชื้อโดยเอทิลแอลกอฮอล์ 70% และเจทตอล โดยการใช้คลอรีกซ์ที่ระดับความเข้มข้น 10%, 15% และ 20% เป็นเวลา 15, 10 และ 5 นาที ตามลำดับ ทำให้ด้ามมีดผ่าตัดเกิดการปนเปื้อนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้เท่ากับ 30%, 20% และ 20% ตามลำดับ ปากคีบเกิดการปนเปื้อน 40%, 20% และ 20% ตามลำดับ และจานเพาะเลี้ยงเกิดการปนเปื้อน 20% ในทุกระดับความเข้มข้น (ตาราง 5) โดยการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีกซ์ที่ระดับความเข้มข้น 10% เริ่มขึ้นหลังจากวันที่ 14 ของการทดลอง ในขณะที่คลอรีกซ์ที่ระดับความเข้มข้น 15% และ 20% เริ่มขึ้นหลังจากวันที่ 21 ของการทดลอง สำหรับอุปกรณ์เพาะเลี้ยงที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อจะเริ่มเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในวันที่ 2 ของการทดลอง และเกิดการปนเปื้อนทั้งหมดภายหลังการทดลองเป็นเวลา 7 วัน (ภาพประกอบ 4)



ภาพประกอบ 4 ตัวอย่างลักษณะการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นบนอาหาร MS ที่ใช้ทดสอบด้ามมีดผ่าตัด (ซ้าย) ปากคีบ (กลาง) และจานเพาะเลี้ยง (ขวา) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี

ตาราง 4 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลังจากทำการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีที่แตกต่างกัน

ชุดการทดลอง	การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ชิ้น) ใน 28 วัน														
	ด้ามมีดผ่าตัด					ปากคีบ					จานเพาะเลี้ยงเชื้อ				
	2	7	14	21	28	2	7	14	21	28	2	7	14	21	28
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0
ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
คลอรีน 10%, 15 นาที	0	0	1	2	3	0	0	2	3	4	0	0	1	2	2
คลอรีน 15%, 10 นาที	0	0	0	2	2	0	0	0	2	2	0	0	0	2	2
คลอรีน 20%, 5 นาที	0	0	0	1	2	0	0	0	2	2	0	0	0	2	2
เอทิลแอลกอฮอล์ 70%, 10 นาที	2	5	6	8	10	4	6	6	7	8	0	4	6	8	10
เอทิลแอลกอฮอล์ 70%, 15 นาที	3	4	5	9	10	20	4	7	8	10	0	2	4	8	10
เดทตอล 5%, 10 นาที	6	7	8	10	10	20	4	8	10	10	2	8	10	10	10
เดทตอล+ เอทิลแอลกอฮอล์ 70% (1:20), 10 นาที	5	8	10	10	10	0	7	10	10	10	5	8	9	10	10

ตาราง 5 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (%) ในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลังจากทำการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีที่แตกต่างกัน

ชุดการทดลอง	การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ชิ้น)					
	หลังครบ 28 วัน					
	ด้ามมีดผ่าตัด		ปากคีม		จานเพาะเลี้ยง	
	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ	1	10	2	20	0	0
ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ	10	100	10	100	10	100
คลอรีน 10%, 15 นาที	3	30	4	40	2	20
คลอรีน 15%, 10 นาที	2	20	2	20	2	20
คลอรีน 20%, 5 นาที	2	20	2	20	2	20
เอทิลแอลกอฮอล์ 70%, 10 นาที	10	10	8	10	10	100
เอทิลแอลกอฮอล์ 70%, 15 นาที	10	10	10	100	10	100
เดทตอล 5%, 10 นาที	10	10	10	100	10	100
เดทตอล+เอทิลแอลกอฮอล์ 70% (1:20), 10 นาที	10	10	10	100	10	100

ทั้งนี้ นอกจากผลการศึกษาวิธีการฆ่าเชื้ออุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยสารเคมีทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงข้างต้นแล้ว ผลการศึกษาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม ซึ่งทดสอบโดยการเพาะอาหารสูตร MS ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำลงในจานเพาะเลี้ยง รอให้อาหารเย็น เปิดฝาทิ้งไว้ในพื้นที่เดียวกับที่การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อของอุปกรณ์ เป็นเวลา 10 วินาที โดยทำทั้งหมด 5 ซ้ำ (จานเพาะเลี้ยง 5 คู่) รอให้อาหารเย็น จากนั้นปิดฝาและนำไปป้อนที่อุณหภูมิต่ำ 37 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบว่าในขณะปฏิบัติการอาจมีจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนบนจานอาหารได้ บันทึกจำนวนและลักษณะการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในวันที่ 2, 7, 14, 21 และ 28 พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงเริ่มเกิดการปนเปื้อนในวันที่ 2 ของการทดลอง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้เท่ากับ 60% และเกิดการปนเปื้อนทั้งหมด 100% ในวันที่ 7 ของการทดลอง (ภาพประกอบ 5)



ภาพประกอบ 5 ตัวอย่างลักษณะการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นบนอาหาร MS ที่ใช้ทดสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม

จากผลการศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยสารเคมีและผลการศึกษาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม จะเห็นได้ว่าการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นมีทั้งแบบที่เรื้อยและรา เมื่อนำทั้งสองการทดลองมาวิเคราะห์ร่วมกันจะเห็นได้ว่ามีความเป็นไปได้ที่การเกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ในอาหาร MS ที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้ออุปกรณ์เพาะเลี้ยงด้วยสารเคมีมิได้เกิดขึ้นจากตัวอุปกรณ์เพียงอย่างเดียวแต่อาจเกิดจากสิ่งแวดล้อมด้วย ถึงแม้ว่าจะทำการศึกษาภายในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อแล้วก็ตาม

จากผลการศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้ ผู้วิจัยเลือกชุดการทดลองที่ใช้คลอริกซ์ที่ระดับความเข้มข้น 15% สำหรับใช้ในการพัฒนาบทปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นคลอริกซ์ที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดีเทียบเท่ากับคลอริกซ์ที่ความเข้มข้น 20%

2. การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ด้วยสารเคมีคลอริกซ์และเตาไมโครเวฟ

จากการศึกษาวิธีการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อขวด ด้วยสารเคมีคลอริกซ์ในปริมาตรที่ต่างกัน และการฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟเป็นระยะเวลา 3 นาที ด้วยกำลังไฟที่ต่างกัน โดยให้อาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำเป็นชุดควบคุม จากนั้นนำขวดอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกจำนวนและลักษณะการปนเปื้อนของอาหารเพาะเลี้ยงวันที่ 2, 7, 14, 21 และ 28 ของการทดลอง (ตาราง 6)

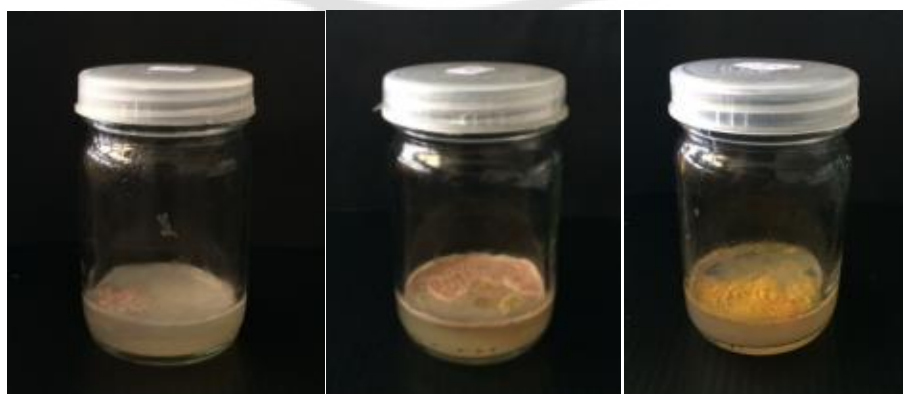
หลังครบ 28 วัน พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอริกซ์ตั้งแต่ปริมาตร 50-250 ไมโครลิตร ไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในทุกชุดการทดลอง การฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟ พบว่า การใช้กำลังไฟที่ 800 วัตต์สามารถทำให้อาหารเพาะเลี้ยงปราศจากจุลินทรีย์ได้ 100% (ตาราง 7) ในขณะที่กำลังไฟต่ำกว่า 800 วัตต์ เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (ภาพประกอบ 6) สำหรับอาหารที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อจะเริ่มเกิดการปนเปื้อนในวันที่ 2 ของการทดลอง และเกิดการปนเปื้อนทั้งหมดภายหลังการทดลองเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งลักษณะการปนเปื้อนที่พบส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียบนผิวหน้าของอาหารเพาะเลี้ยง ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงตลอดการทดลอง 28 วัน

ตาราง 6 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS หลังจากทำการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีคลอริกซ์และเตาไมโครเวฟ

ชุดการทดลอง	การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (ขวด) ใน 28 วัน				
	2	7	14	21	28
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ	0	0	0	0	0
ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ	3	5	5	5	10
คลอริกซ์ (μL)					
50	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0
150	0	0	0	0	0
200	0	0	0	0	0
250	0	0	0	0	0
ไมโครเวฟ (W), 3 นาที					
160	0	6	8	9	10
320	0	4	5	8	10
480	0	3	5	8	8
640	0	0	0	0	1
800	0	0	0	0	0

ตาราง 7 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (%) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS หลังจากทำการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอริกซ์และเตาไมโครเวฟ

ชุดการทดลอง	การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS หลังครบ 28 วัน	
	จำนวนขวด	%
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ	0	0
ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ	10	100
คลอริกซ์ (μL)		
50	0	0
100	0	0
150	0	0
200	0	0
250	0	0
เตาไมโครเวฟ (W), 3 นาที		
160	10	100
320	10	100
480	8	80
640	1	10
800	0	0



ภาพประกอบ 6 ตัวอย่างลักษณะการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นบนอาหาร MS ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟด้วยกำลังไฟที่ต่ำกว่า 800 วัตต์

จากผลการศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS นี้ผู้วิจัยเลือกชุดการทดลองที่ใช้คลอโรกซ์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟที่กำลังไฟ 800 วัตต์เป็นเวลา 3 นาที เพื่อนำไปใช้ศึกษาผลของวิธีการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการเจริญเติบโตของพืชต่อไป

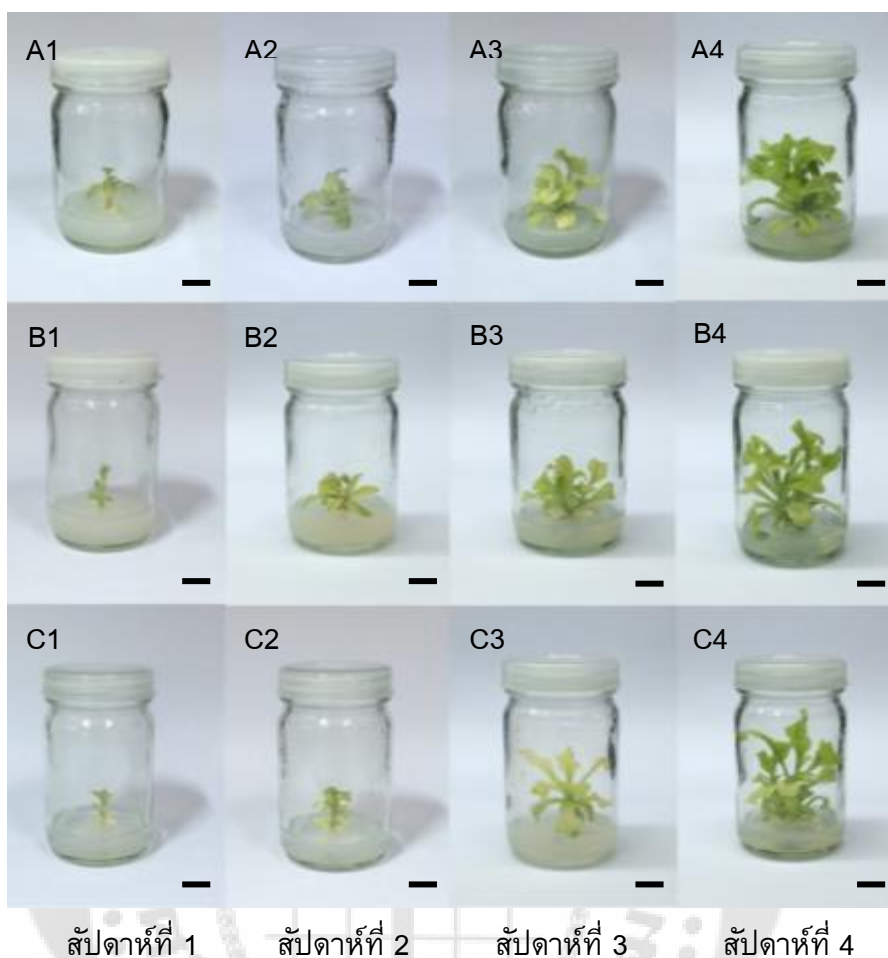
3. การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีคลอโรกซ์และเตาไมโครเวฟต่อการเจริญเติบโตของพืช

จากการศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟที่กำลังไฟ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที ต่อการเจริญเติบโตของพืชที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ความสูงของลำต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ฆ่าเชื้อทั้ง 2 วิธีนี้ไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม ส่วนจำนวนยอดต่อลำต้นและจำนวนใบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากชุดควบคุม (ตาราง 8) (ภาพประกอบ 7)

ตาราง 8 จำนวนยอด/ลำต้น ใบ และความสูงของลำต้นของพืช (P. hybrida E.Vilm) บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีคลอโรกซ์และเตาไมโครเวฟ

ชุดการทดลอง	จำนวนยอด/ลำต้น	จำนวนใบ	ความสูงของลำต้น (ซม)
หม้อน้ำความดันไอน้ำ	1.80±0.24 ^a	13.60±1.25 ^a	2.38±0.39 ^a
คลอโรกซ์	1.20±1.33 ^b	10.00±0.61 ^b	2.38±0.36 ^a
เตาไมโครเวฟ	1.20±1.33 ^b	10.07±0.54 ^b	2.29±0.43 ^a

*จากการทดลอง 10 ซ้ำ, ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ วิเคราะห์โดย DMRT



ภาพประกอบ 7 การเจริญของยอด ใบและลำต้นของชิ้นส่วนลำต้นพิทูเนียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (สเกล เท่ากับ 2.0 เซนติเมตร)

- (1) ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (ชุดควบคุม) (A1-A4)
- (2) ฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (B1-B4)
- (3) ฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที (C1-C4)

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ฆ่าจุลินทรีย์ด้วย 2 วิธีดังกล่าวต่อการเจริญเติบโตของพิทูเนีย พบว่าให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกัน ผู้วิจัยจึงเลือกใช้คลอโรกซ์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเพื่อใช้สำหรับการพัฒนาบทปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นปริมาณที่น้อยที่สุดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีผลกระทบต่อเนื้อเยื่อพืชและผู้ปฏิบัติการน้อยและสะดวกต่อการปฏิบัติงาน

4. การศึกษาประสิทธิภาพบริเวณปฏิบัติงานในการย้ายเนื้อเยื่อ

จากการศึกษาประสิทธิภาพบริเวณปฏิบัติงานในการย้ายเนื้อเยื่อ โดยเปรียบเทียบการย้ายเนื้อเยื่อลำต้นพิทูเนีย 2 บริเวณ คือ ภายในตู้ปลาที่ดัดแปลงเป็นตู้ถ่ายเนื้อเยื่อและบนโต๊ะปฏิบัติการที่สะอาด ไม่มีลมพัด โดยทั้งสองบริเวณมีการเตรียมให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อด้วยการฉีดฟีนอลแอลกอฮอล์ 70% ก่อนปฏิบัติงาน และมีการฉีดฟีนในขณะปฏิบัติงานเป็นระยะ พบว่า การย้ายชิ้นส่วนลำต้นพิทูเนียไปยังอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ทั้งในตู้ปลา (ภาพประกอบ 8) และบนโต๊ะปฏิบัติการในห้องที่สะอาด ไม่มีลมพัด ไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ตลอดการทดลอง 28 วัน เช่นเดียวกับชุดควบคุมซึ่งทำภายในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ



ภาพประกอบ 8 การเจริญของยอด ใบและลำต้นของชิ้นส่วนลำต้นพิทูเนียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ทำการถ่ายเนื้อเยื่อภายในตู้ปลาที่ดัดแปลงเป็นตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (สเกล เท่ากับ 2.0 เซนติเมตร)

จากผลทดลองดังกล่าว ผู้วิจัยเลือกการปฏิบัติงานในตู้ปลาที่ดัดแปลงเป็นตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ สำหรับใช้ในการพัฒนาหัตถปฏิบัติการ เนื่องจากผู้วิจัยเห็นว่าหากนำไปใช้สอนในโรงเรียน การเลือกใช้วิธีทำหัตถปฏิบัติการบนโต๊ะปฏิบัติจะควบคุมสภาพแวดล้อมให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อได้ยาก เพราะนักเรียนมีจำนวนมากและห้องปฏิบัติการในโรงเรียนส่วนใหญ่ไม่ได้ออกแบบให้เป็นระบบปิด ดังนั้นการเลือกวิธีปฏิบัติงานในตู้ปลาที่ถูกดัดแปลงเป็นตู้ถ่ายเนื้อเยื่อน่าจะช่วยลดโอกาสการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์จากสภาพแวดล้อมได้ดีกว่า

ตอนที่ 3 การสร้างและพัฒนาบทปฏิบัติการ

1. การสร้างและพัฒนาบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

จากการนำบทปฏิบัติการเสนอต่อผู้เชี่ยวชาญจำนวน 3 ท่าน เพื่อพิจารณาความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหา (content validity) และค่าดัชนีความสอดคล้อง (IOC) และคุณภาพของบทปฏิบัติการ พบว่า บทปฏิบัติการมีค่าดัชนีความสอดคล้องเท่ากับ 0.96 และมีคุณภาพอยู่ในระดับดี (4.49) และเมื่อนำบทปฏิบัติการไปทดลองใช้กับผู้เรียนที่ไม่ใช่กลุ่มที่ศึกษาจำนวน 30 คน ซึ่งได้จากการชักตัวอย่างแบบเจาะจง พบว่า ผู้เรียนสามารถดำเนินการตามบทปฏิบัติการได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

2. การสร้างและหาคุณภาพเครื่องมือวัดผลการเรียนรู้

จากการนำแผนการจัดการเรียนรู้ แบบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนจำนวน 40 ข้อ และแบบประเมินความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เสนอต่อผู้เชี่ยวชาญจำนวน 3 ท่าน เพื่อพิจารณาความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหา (content validity) และความสอดคล้อง (IOC) พบว่า แผนการจัดการเรียนรู้ แบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนและแบบประเมินความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนการสอน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีค่าดัชนีความสอดคล้องมากกว่า 0.5 ขึ้นไป และเมื่อนำแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนไปทดสอบกับผู้เรียนที่ไม่ใช่กลุ่มที่ศึกษาจำนวน 30 คน แล้วนำคะแนนที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าความยาก-ง่าย (p) ค่าอำนาจจำแนก (r) และค่าความเชื่อมั่นของแบบทดสอบทั้งฉบับ พบว่าข้อคำถามที่มีค่าความยาก-ง่าย อยู่ระหว่าง 0.2-0.8 มีจำนวน 38 ข้อ และมีค่าอำนาจจำแนกมากกว่า 0.2 ขึ้นไป จำนวน 28 ข้อ จากนั้นคัดเลือกข้อคำถามจำนวน 20 ข้อ สำหรับนำไปใช้กับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา โดยนำมาหาค่าความเชื่อมั่นของแบบทดสอบทั้งฉบับ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.72

ตอนที่ 4 การนำบทปฏิบัติการที่สร้างขึ้นไปสอน

1. ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

จากการนำแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จำนวน 20 ข้อ ไปใช้กับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา จำนวน 39 คน ผู้วิจัยนำคะแนนที่ได้จากการทำแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนก่อนเรียนและหลังเรียนมาวิเคราะห์ โดยใช้สถิติ *t-test for dependent samples* ได้ผลดังแสดงในตาราง 9

ตาราง 9 เปรียบเทียบคะแนนผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนระหว่างก่อนเรียนและหลังเรียนด้วยบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยใช้สถิติ *t*-test for dependent samples

คะแนนวัดผลสัมฤทธิ์	N	$\bar{X}$	S.D.	t	p-value
ก่อนเรียน	39	7.46	3.51	-16.66*	0.00*
หลังเรียน	39	15.03	3.07		

*ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

จากตาราง 9 เมื่อวิเคราะห์คะแนนเฉลี่ยผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนก่อนเรียนและหลังเรียนของผู้เรียนระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5 พบว่ามีคะแนนเฉลี่ยผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนหลังเรียน (15.03 ± 3.07) สูงกว่าก่อนเรียน (7.46 ± 3.51) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

2. ผลวิเคราะห์ความก้าวหน้าทางการเรียน (normalized gain) ของผู้เรียนที่ได้รับการจัดการเรียนรู้ด้วยบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เมื่อนำคะแนนก่อนเรียนและหลังเรียนของผู้เรียนแต่ละคนมาคำนวณค่าความก้าวหน้าทางการเรียนรายบุคคล (single student normalized gain) และรายชั้นเรียน (class normalized gain) ด้วยวิธีของ Hake (1998) (ตาราง 10) พบว่า ผู้เรียนมีความก้าวหน้าทางการเรียนในระดับสูงจำนวน 11 คน ระดับปานกลางจำนวน 26 คน และระดับต่ำจำนวน 2 คน และเมื่อคำนวณค่าความก้าวหน้ารายชั้นเรียนมีค่าเท่ากับ 0.60 ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีผู้เรียนจำนวน 23 คน มีค่าความก้าวหน้าทางการเรียนสูงกว่าความก้าวหน้าทางการเรียนรายชั้น ดังแสดงในตาราง 10

ตาราง 10 ค่าความก้าวหน้าทางการเรียนของผู้เรียนที่ได้รับการจัดการเรียนรู้ด้วยบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

คนที่	ความก้าวหน้า ทางการเรียน	คนที่	ความก้าวหน้า ทางการเรียน	คนที่	ความก้าวหน้า ทางการเรียน
1	0.64	14	0.75	27	0.67
2	0.60	15	0.83	28	0.33
3	0.54	16	0.57	29	0.50
4	0.30	17	0.56	30	0.62
5	0.88	18	0.60	31	0.64
6	0.79	19	0.70	32	0.60
7	0.82	20	0.53	33	0.55
8	0.67	21	0.43	34	0.50
9	0.50	22	0.50	35	0.64
10	0.63	23	0.71	36	0.00
11	0.69	24	0.75	37	0.64
12	0.83	25	0.75	38	0.73
13	0.63	26	0.69	39	0.50
ความก้าวหน้าทางการเรียนรายชั้นเท่ากับ 0.60					

3. ผลวิเคราะห์ระดับความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

จากการนำแบบประเมินความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ให้ผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษาจำนวน 39 คน ประเมินหลังการจัดการเรียนรู้ด้วยบทปฏิบัติการ โดยแบ่งการประเมินออกเป็น 2 ด้าน ได้แก่ ความพึงพอใจด้านการจัดการเรียนรู้และความพึงพอใจด้านบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่พัฒนาขึ้น พบว่า ผู้เรียนมีความพึงพอใจในด้านการจัดการเรียนรู้ในระดับมาก (4.32 ± 0.74) โดยผู้เรียนมีความพึงพอใจต่อการได้ลงมือปฏิบัติการทดลองด้วยตนเองและต่อการจัดเรียนรู้โดยการลงมือปฏิบัติทำให้ผู้เรียนสามารถเชื่อมโยงความรู้หรือประสบการณ์เดิมของผู้เรียนได้ ในระดับมากที่สุด โดยมีคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 4.59 ± 0.64 และ 4.74 ± 0.50 ตามลำดับ สำหรับความพึงพอใจด้านบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อพืช พบว่า ผู้เรียนมีความพึงพอใจในระดับมาก (4.11 ± 0.77) โดยผู้เรียนได้ให้ความเห็นในทุกหัวข้ออยู่ในระดับมาก ดังแสดงในตาราง 11

ตาราง 11 ความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

รายการประเมิน		ระดับความพึงพอใจ		
ด้านการจัดการเรียนรู้		$\bar{X}$	S.D.	แปลผล
1. ผู้เรียนมีความรู้ความเข้าใจใน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช		4.28	0.75	มาก
การนำเข้าสู่บทเรียนมีความน่าสนใจ กระตุ้นให้ผู้เรียนอยากเรียน		3.92	0.80	มาก
2. ผู้เรียนได้ลงมือปฏิบัติการทดลองด้วยตนเอง		4.59	0.64	มากที่สุด
ผู้สอนให้คำปรึกษาและให้การช่วยเหลือผู้เรียนอย่างเพียงพอ		4.21	0.75	มาก
ขณะทำการทดลอง				
3. ผู้เรียนได้แสดงความคิดเห็นและวิจารณ์ผลการทดลองกับ		4.44	0.69	มาก
เพื่อนภายในกลุ่ม				
4. ผู้เรียนได้อภิปราย ชักถาม และแลกเปลี่ยนความคิดเห็นอย่าง		4.15	0.84	มาก
มีหลักการระหว่างเพื่อนและผู้สอน				
5. ระยะเวลาที่ใช้ในการจัดการเรียนรู้เหมาะสม		4.21	0.86	มาก
6. การจัดการเรียนรู้โดยการลงมือปฏิบัติทำให้ผู้เรียนสามารถ		4.74	0.50	มากที่สุด
เชื่อมโยงความรู้หรือประสบการณ์เดิมของผู้เรียนได้				
7. ผู้เรียนสรุปความรู้และสามารถนำความรู้ที่ได้จากการทดลอง		4.31	0.84	มาก
ไปใช้ในการเรียนวิชาชีววิทยาในหัวข้ออื่น ๆ ได้				
ค่าเฉลี่ย		4.32	0.74	มาก
ด้านบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช		$\bar{X}$	S.D.	แปลผล
1. การทดลองสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของบทปฏิบัติการ		4.13	0.64	มาก
2. ผู้เรียนสามารถปฏิบัติตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในบทปฏิบัติการ		3.97	0.77	มาก
ได้อย่างถูกต้อง				
3. บทปฏิบัติการสามารถพัฒนาทักษะกระบวนการคิดของผู้เรียนได้		4.08	0.97	มาก
4. บทปฏิบัติการสามารถพัฒนาทักษะกระบวนการทดลองของผู้เรียน		4.36	0.82	มาก
ได้		4.03	0.64	มาก
5. บทปฏิบัติการช่วยให้ผู้เรียนเข้าใจ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้				
ค่าเฉลี่ย		4.11	0.77	มาก

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับผู้เรียนในระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย โดยผู้วิจัยขอสรุปผลการศึกษา ดังนี้

ตอนที่ 1 การสำรวจความคิดเห็นในการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

จากการสำรวจความคิดเห็นเกี่ยวกับการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ของผู้สอนรายวิชาชีววิทยาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจำนวน 20 คน พบว่า ผู้สอนมีความเห็นด้วยในระดับมากในเรื่องของ ผู้เรียนชอบเรียน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (3.70 ± 0.73) และควรเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการจัดการเรียนรู้ เพื่อให้ผู้เรียนเข้าใจการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างครบวงจร (4.00 ± 0.92) และผู้สอนยังเห็นว่าการสอนด้วยวิธีทำปฏิบัติการจะช่วยให้ผู้เรียนสามารถสร้างความรู้ความเข้าใจได้มากกว่าวิธีการบรรยายเพียงอย่างเดียว (4.25 ± 0.55) อย่างไรก็ตามเมื่อสำรวจความคิดเห็นในเรื่องของเนื้อหาเรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในแบบเรียนว่าสามารถทำให้ผู้เรียนเข้าใจเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้และเห็นภาพรวมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้มากนักน้อยเพียงใด พบว่า ผู้สอนมีความเห็นด้วยในระดับน้อย (2.25 ± 0.44) รวมทั้งสื่อและอุปกรณ์ที่ใช้ในการสอนบทปฏิบัติการ (2.35 ± 0.49) และสถานที่ในโรงเรียนสำหรับใช้ในการสอนบทปฏิบัติการ (1.95 ± 0.51) ซึ่งผู้สอนเห็นว่ามีความพร้อมอยู่ในระดับน้อยเช่นกัน

ตอนที่ 2 การทดลองในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์

1. การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยสารเคมี

จากการศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ชุด ประกอบด้วย มีดผ่าตัด ปากคีบ และจานเพาะเลี้ยง (1 คู่ ประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงและฝาปิด) อย่างละ 1 ชิ้น โดยแช่ในสารเคมี 3 ชนิด ได้แก่ คลอโรกซ์ที่ความเข้มข้น 10%, 15% และ 20% เป็นเวลา 15, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ เอทิลแอลกอฮอล์ 70% โดยใช้เวลา 10 และ 15 นาที ตามลำดับ และเตทอล ความเข้มข้น 5% เป็นเวลา 10 นาที และเตทอลผสมร่วมกับเอทิลแอลกอฮอล์ 70%

อัตราส่วน 1:20 เวลา 10 นาที พบว่า เมื่อการทดลองครบ 28 วัน คลอโรกซ์ให้ผลในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด โดยสามารถทำให้อุปกรณ์เพาะเลี้ยงปราศจากปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้นานถึง 21 วัน หลังจากนั้นจึงเริ่มเกิดการปนเปื้อน โดยคลอโรกซ์ที่ระดับความเข้มข้น เข้มข้น 10%, 15% และ 20% เป็นเวลา 15, 10 และ 5 นาที ตามลำดับ ตามลำดับ ด้ามมีดผ่าตัดเกิดการปนเปื้อน 30%, 20% และ 20% ตามลำดับ ปากคีบเกิดการปนเปื้อน 40%, 20% และ 20% ตามลำดับ และจานเพาะเลี้ยงเชื้อเกิดการปนเปื้อน 20% ในทุกระดับความเข้มข้น และผู้วิจัยเลือกคลอโรกซ์ที่ระดับความเข้มข้น 15% เป็นเวลา 10 นาที สำหรับนำไปพัฒนาบทปฏิบัติการต่อไป

2. การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS ด้วยสารเคมี คลอโรกซ์และเตาไมโครเวฟ

จากการศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ด้วยวิธีการ 2 วิธี ได้แก่ การฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ (0, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครลิตร) และการฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟ (กำลังไฟ 0, 160, 320, 480, 640 และ 800 วัตต์) เป็นเวลา 3 นาที พบว่า เมื่อการทดลองครบ 28 วัน อาหารเพาะเลี้ยงที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในทุกชุดการทดลอง ในขณะที่การฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟ พบว่า ที่กำลังไฟ 800 วัตต์ เท่านั้น ที่สามารถทำให้อาหารเพาะเลี้ยงปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้ 100% ทั้งนี้ผู้วิจัยเลือกชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดจากทั้ง 2 วิธี ได้แก่ ชุดการทดลองที่ใช้คลอโรกซ์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เนื่องจากเป็นปริมาตรน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีเทียบเท่ากับคลอโรกซ์ที่ปริมาตรสูง ๆ และชุดการทดลองที่ฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟที่กำลังไฟ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที สำหรับนำไปศึกษาประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของพืช เพื่อนำไปพัฒนาบทปฏิบัติการต่อไป

3. การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี คลอโรกซ์และเตาไมโครเวฟต่อการเจริญเติบโตของพืช

จากการศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่คัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด 2 วิธี ได้แก่ การฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเตาไมโครเวฟที่กำลังไฟ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที พบว่า เมื่อนำอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วย 2 วิธีดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงลำต้นพิทูเนียเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จำนวนยอด/ลำต้น ใบและความสูงของลำต้นพิทูเนียไม่มีความแตกต่างกัน แต่จำนวนยอด/ลำต้น และจำนวนใบแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4. การศึกษาประสิทธิภาพบริเวณปฏิบัติงานในการย้ายเนื้อเยื่อ

จากการศึกษาบริเวณปฏิบัติงานในการย้ายเนื้อเยื่อทั้ง 2 บริเวณ คือ ภายในตู้ปลา ที่ดัดแปลงเป็นตู้ถ่ายเนื้อเยื่อและบนโต๊ะปฏิบัติการ โดยทั้งสองบริเวณนี้ถูกทำให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อด้วยการฉีดพ่นเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ก่อนและระหว่างการปฏิบัติงาน พบว่า การย้ายชิ้นส่วน ลำต้นพืชน้ำไปยังอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ในทั้ง 2 บริเวณนี้ ไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ตลอดการทดลอง 28 วัน ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมซึ่งทำภายในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ

ตอนที่ 3 การสร้างและพัฒนาบทปฏิบัติการวิทยาศาสตร์

จากการนำบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ไปให้ผู้เชี่ยวชาญพิจารณา ความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหาและความสอดคล้อง และคุณภาพของบทปฏิบัติการ พบว่า บทปฏิบัติการมี ค่าดัชนีความสอดคล้องเท่ากับ 0.96 และมีคุณภาพอยู่ในระดับดี (4.49)

ตอนที่ 4 การนำบทปฏิบัติการที่สร้างขึ้นไปสอน

จากการนำบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่ผ่านการพิจารณาพิจารณา ความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหาและความสอดคล้อง และคุณภาพของบทปฏิบัติการจากผู้เชี่ยวชาญ เรียบร้อยแล้ว ไปสอนกับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษาจำนวน 39 คน พบว่า คะแนนเฉลี่ยผลสัมฤทธิ์ทางการ เรียนระหว่างก่อนเรียนและหลังเรียนแตกต่างกัน ($p < 0.05$) โดยมีคะแนนเฉลี่ยหลังเรียน (15.03) สูง กว่าก่อนเรียน (7.46) และเมื่อนำคะแนนมาวิเคราะห์ความก้าวหน้าทางการเรียนรายบุคคล พบว่า ผู้เรียนจำนวน 11 คน มีระดับความก้าวหน้าทางการเรียนอยู่ในระดับสูง ผู้เรียนจำนวน 26 คน มี ระดับความก้าวหน้าทางการเรียนอยู่ในระดับปานกลาง และผู้เรียนจำนวน 2 คน มีระดับ ความก้าวหน้าทางการเรียนอยู่ในระดับต่ำ โดยมีค่าความก้าวหน้าทางการเรียนรายชั้นเท่ากับ 0.60 และมีผู้เรียนจำนวน 23 คน ที่มีระดับความก้าวหน้าทางการเรียนสูงกว่าความก้าวหน้าทางการเรียน รายชั้น

จากการประเมินความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนการสอน เรื่อง การ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยแบ่งการประเมินออกเป็น 2 ด้าน ได้แก่ ความพึงพอใจด้านการจัดการ เรียนรู้และความพึงพอใจด้านบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่พัฒนาขึ้น พบว่า ผู้เรียนมีความพึงพอใจทั้ง 2 ด้าน อยู่ในระดับมาก โดยมีคะแนนเฉลี่ยด้านการจัดการเรียนรู้อยู่ที่ 4.32 ± 0.74 และคะแนนเฉลี่ยด้านบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่พัฒนาขึ้นอยู่ที่ 4.11 ± 0.77

อภิปรายผลการวิจัย

ตอนที่ 1 การสำรวจความคิดเห็นในการจัดการเรียนรายวิชาชีววิทยาเรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

จากการสำรวจความคิดเห็นของผู้สอนรายวิชาชีววิทยาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายเกี่ยวกับการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จำนวน 20 คน พบว่า ผู้สอนมีความคิดเห็นว่าผู้เรียนชอบเรียน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และการสอนด้วยวิธีทำปฏิบัติการจะช่วยให้ผู้เรียนสามารถสร้างความรู้ความเข้าใจได้ในเรื่องที่เรียนมากกว่าวิธีการบรรยายเพียงอย่างเดียวในระดับมาก แต่ยังมีข้อจำกัดในการจัดการเรียนรู้ ซึ่งสามารถอภิปรายโดยแบ่งเป็นหัวข้อย่อยได้ดังนี้

1. ข้อจำกัดด้านเวลาและเนื้อหาที่ใช้สอน จากผลการสำรวจซึ่งผู้สอนมีความคิดเห็นว่าผู้เรียนชอบเรียน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเรื่องที่ค่อนข้างไกลตัวผู้เรียน ซึ่งผู้เรียนอาจจะเคยได้ยิน ได้เห็นแต่ยังไม่เคยสัมผัสของจริงและยังไม่เคยลงมือปฏิบัติด้วยตนเอง ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่แปลกใหม่และกระตุ้นความสนใจของผู้เรียนได้เป็นอย่างดี แต่ด้วยเวลาที่จำกัดทำให้การจัดการเรียนรู้เหมาะที่จะใช้วิธีการบรรยายเท่านั้น ประกอบกับเนื้อหาเรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในแบบเรียนไม่เพียงพอที่จะทำให้ผู้เรียนเข้าใจเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้และเห็นภาพรวมการเพาะเลี้ยงพืชได้ เนื่องจากการเรียนการสอนตามปกติไม่ได้ถูกออกแบบให้มีการสอนด้วยบทปฏิบัติการร่วมด้วย ดังนั้นจึงทำให้ผลการสำรวจในเรื่องของเวลาและเนื้อหาที่ใช้สอน พบว่า ผู้สอนเห็นด้วยในระดับมากในการเพิ่มเวลาในการจัดการเรียนรู้ รวมถึงเพิ่มเนื้อหาในแบบเรียนเพื่อที่จะให้ผู้เรียนได้เข้าใจเกี่ยวกับเรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากยิ่งขึ้น

2. ข้อจำกัดด้านสื่อ อุปกรณ์และสถานที่ในการทำปฏิบัติการ นอกจากปัญหาในเรื่องของเวลาและเนื้อหาที่ใช้ในการสอนแล้ว ผู้สอนยังมีความกังวลในเรื่องของสื่อการสอนและอุปกรณ์ที่ต้องใช้ในการทำบทปฏิบัติการ รวมทั้งสถานที่ในโรงเรียนซึ่งผู้สอนคิดว่ามีความพร้อมในระดับน้อย ทั้งนี้เป็นเพราะว่าการทำปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่จำเพาะ เช่น ขวดเพาะเลี้ยง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ และสถานที่ในการเพาะเลี้ยงซึ่งต้องมีการควบคุมสภาวะต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิ แสง ความชื้นให้เหมาะสมเพื่อทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำเร็จได้ด้วยดี

ด้วยข้อจำกัดดังกล่าว จึงทำให้การจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อาจพบได้เฉพาะในโรงเรียนขนาดใหญ่ซึ่งมีความพร้อมเรื่องอุปกรณ์และสถานที่ในการทำปฏิบัติการ ส่วนในโรงเรียนขนาดกลางและขนาดเล็กยังคงเป็นไปได้ยาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความคิดที่จะนำ

ข้อจำกัดดังกล่าวมาพัฒนาบทปฏิบัติการ โดยใช้สารเคมีและอุปกรณ์ที่หาได้ง่ายและมีความปลอดภัยต่อผู้ทำปฏิบัติการ

ตอนที่ 2 การทดลองในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์

1. การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยสารเคมี

จากการศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยสารเคมี 3 ชนิด ได้แก่ คลอโรกซ์ เอทิลแอลกอฮอล์ 70% และเดทตอล พบว่า คลอโรกซ์มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด โดยคลอโรกซ์ที่ระดับความเข้มข้น 15% และ 20% ระยะเวลา 10 และ 5 นาที ตามลำดับ ให้ผลในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างจากคลอโรกซ์ที่ระดับความเข้มข้น 10% ระยะเวลา 15 นาทีเล็กน้อย อย่างไรก็ตามคลอโรกซ์ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกันนี้สามารถทำให้อุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปราศจากเชื้อได้ 100% นานถึง 21 วัน หลังจากนั้นจึงเริ่มเกิดการปนเปื้อน แสดงให้เห็นว่าคลอโรกซ์มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเอทิลแอลกอฮอล์ 70% และเดทตอลที่ส่วนใหญ่เริ่มเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ตั้งแต่วันที่ 2 และเกิดการปนเปื้อน 100% เมื่อครบ 28 วัน ทั้งนี้เนื่องมาจากกลไกการออกฤทธิ์ของสารเคมีทั้ง 3 ชนิดที่ต่างกัน โดยคลอโรกซ์ที่มีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ เมื่อละลายน้ำจะแตกตัวให้กรดไฮโปคลอรัส ออกฤทธิ์เข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์โดยการออกซิไดซ์หมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl group, -SH) ทำให้โปรตีนถูกทำลายและตกตะกอน สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา โปรโตซัว ไวรัสรวมทั้งสปอร์ (Estrela; et al. 2003: 58-62; Valera; et al. 2009: 555-559) แตกต่างจากเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ที่ออกฤทธิ์โดยการละลายไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้โปรตีนของจุลินทรีย์ตกตะกอน สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งเชื้อวัณโรค รา และไวรัสบางชนิด แต่ไม่มีผลต่อสปอร์ของจุลินทรีย์ (McDonnell; & Russell. 1999: 149-179) ส่วนเดทตอลเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอล (phenols) ที่เรียกว่าคลอโรไซลีนอล (chloroxylenol) ออกฤทธิ์โดยไปมีผลรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ให้ผิดปกติ สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ แต่ไม่ค่อยมีผลต่อไวรัสหรือสปอร์ (ณัฐสิทธิ์ ดันสกุล. 2016: ออนไลน์) จะเห็นได้ว่าคลอโรกซ์มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิด เนื่องจากสามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ครอบคลุมที่สุด และสามารถฆ่าสปอร์ได้ ซึ่งสารเคมีอีก 2 ชนิดที่เหลือไม่สามารถทำได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ ประทานพร อารีราชการณีย์ และคณะ (2551) ที่ทดสอบประสิทธิภาพการทำลายสปอร์ของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ในอุปกรณ์ที่ใช้ในคลินิกทันตกรรม พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0.25% สามารถทำลายสปอร์ของเบซิลัส อีโธรเพียส

(*Bacillus atrophaeus*) และจีโอเบซิลลัส สตีโรเทอร์โมฟิลัส (*Geobacillus stearothermophilus*) ได้

จากผลทดลองในครั้งนี้แม้ว่าสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ จะมีประสิทธิภาพในฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ไม่ถึง 100% ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าเป็นเพราะการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ส่วนหนึ่งมาจากจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งจากการทดสอบเปิดจานอาหารเพาะเลี้ยงในสภาวะแวดล้อมและ ใช้เวลาเท่ากับการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมี พบว่า มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นมีลักษณะที่พบได้ในทั้งสองการทดสอบ แสดงให้เห็นว่าการปนเปื้อนส่วนหนึ่งมาจากสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามในการปฏิบัติงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น ปากคืบและด้ามมีดผ่าตัดจะมีการฆ่าเชือก่อนนำไปใช้งานโดยนำไปผ่านเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ร่วมด้วย ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงได้

2. การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS ด้วยสารเคมีคลอโรอกซ์และเตาไมโครเวฟ

จากการศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ด้วยคลอโรอกซ์ ซึ่งมี 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ พบว่า คลอโรอกซ์ปริมาตร 50-250 ไมโครลิตร/อาหาร 20 มิลลิลิตร สามารถทำให้อาหารเพาะเลี้ยงปราศจากเชื้อได้ 100% สอดคล้องกับงานวิจัยของ ดีอินทร์ และคณะ (Deein; et al. 2013: 1041-1044) รายงานว่า โซเดียมไฮโปคลอไรต์ปริมาตร 36-396 ไมโครลิตร/อาหาร 20 มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้อย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกับการฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟ ที่กำลังไฟ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที ก็ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ แต่ปริมาตรอาหารในขวดเพาะเลี้ยงลดลงเล็กน้อย ในขณะที่การใช้กำลังไฟต่ำกว่า 800 วัตต์ เกิดการปนเปื้อนได้ตั้งแต่ 10-100% ผลการทดลองดังกล่าวแตกต่างกับงานวิจัยของ กิตติศักดิ์ โชติกเดชานรงค์ (2553) รายงานว่าการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารด้วยเตาไมโครเวฟที่กำลังไฟ 600 และ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที สามารถทำให้อาหารปราศจากเชื้อได้ 93.30% และที่กำลังไฟ 360 วัตต์ ทำให้อาหารปราศจากเชื้อ 76.60% สาเหตุน่าจะเกิดจากการเดือดของอาหารที่แปรผันกับกำลังไฟ โดยที่กำลังไฟต่ำอาหารจะใช้เวลาในการเดื่อนานกว่าที่กำลังไฟสูง ซึ่งอาหารอาจมีความร้อนเพิ่มขึ้นแต่ไม่ถึงจุดเดือดหรือถึงจุดเดือดเพียงชั่วครู่จึงทำให้ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการฆ่าเชื้อโดยเฉพาะสปอร์ของเชื้อราบางชนิด นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับจำนวนขวดอาหารและรูปแบบการจัดเรียงขวด เพราะถ้าหากมีจำนวนมากจะทำให้อาหารแต่ละขวดได้รับความร้อนไม่เท่ากัน เนื่องจากแหล่งกำเนิดคลื่นไมโครเวฟอยู่ด้านข้าง ดังนั้นจึงทำให้ขวดที่อยู่ด้านข้างได้รับคลื่นมากกว่าและเกิดความร้อนเร็วกว่าขวดที่อยู่ตรงกลาง เป็นสาเหตุทำให้ขวดอาหารบางขวดเกิดการปนเปื้อน แม้ว่าจะจัดวางขวดอาหารให้มีระยะห่างเท่ากัน ๆ แล้วก็ตาม

3. การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี คลอโรกซ์และเตาไมโครเวฟต่อการเจริญเติบโตของพืช

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นของพืชเนียบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยคลอโรกซ์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเตาไมโครเวฟที่กำลังไฟ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าจำนวนยอด จำนวนใบและความสูงของลำต้นพืชเนียบ จากการวิเคราะห์ทางสถิติไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อพิจารณาเทียบกับอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ พืชเนียบที่เพาะบนอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์และเตาไมโครเวฟจะมีลักษณะใบที่ชืดเหลืองและมีจำนวนน้อยกว่าอย่างเห็นได้ชัด เป็นไปได้ว่าคลอโรกซ์ที่ใช้มีความเข้มข้นสูงเกินไปอาจมีผลยับยั้งหรือทำลายการเจริญเนื้อเยื่อพืช สอดคล้องกับงานวิจัยของ ยิลดิซและเออร์ (Yildiz; & Er. 2002:) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ในการเพาะเลี้ยงปอ (*Linum usitatissimum*) ในหลอดทดลอง พบว่า การงอกของเมล็ด การเจริญเติบโตและการเกิดยอด ได้รับผลกระทบทางลบจากการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ นอกจากนี้ความร้อนของเตาไมโครเวฟที่กำลังไฟสูงอาจทำให้สารอาหารบางชนิดสลายตัวได้ เช่น แร่ธาตุต่างๆ (Davis. 2009: 15-19)

4. การศึกษาประสิทธิภาพบริเวณปฏิบัติงานในการย้ายเนื้อเยื่อ

จากการศึกษาสถานที่ปฏิบัติงานในการย้ายเนื้อเยื่อ โดยทำการย้ายชิ้นส่วนลำต้นพืชเนียบในตู้ปลาที่ดัดแปลงเป็นตู้ย้ายเนื้อเยื่อและบนโต๊ะปฏิบัติการซึ่งทั้ง 2 บริเวณถูกทำให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อ พบว่า ไม่เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงตลอดการทดลองทั้ง 28 วัน แสดงให้เห็นว่าการฉีดพ่นเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ทำให้ตู้ปลาหรือโต๊ะปฏิบัติการในห้องอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ สามารถทดแทนการปฏิบัติงานในตู้ย้ายเนื้อเยื่อได้

ตอนที่ 3 การสร้างและพัฒนาบทปฏิบัติการ

จากการนำบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ไปให้ผู้เชี่ยวชาญพิจารณาความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหาและความสอดคล้อง พบว่า บทปฏิบัติการมีค่าดัชนีความสอดคล้องเท่ากับ 0.96 และมีความเหมาะสมของบทปฏิบัติการอยู่ในระดับดี เนื่องจากบทปฏิบัติการที่พัฒนาขึ้นนั้นคำนึงถึงความเหมาะสมในด้านต่าง ๆ ทั้งด้านเนื้อหาสาระที่มีความน่าสนใจและมีปริมาณเหมาะสม วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำปฏิบัติการหาได้ง่ายและไม่เป็นอันตรายต่อผู้ทดลอง ระยะเวลาที่ใช้ในการทำกิจกรรมเหมาะสม รวมถึงคำถามท้ายบทปฏิบัติการที่ไม่ยากหรือง่ายจนเกินไป ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ พรทิพย์ วงษ์นาป่า (2548) และประเทืองทิพย์ สุขุมลจันท์ (2545) ที่

สร้างและพัฒนาบทปฏิบัติการจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ พบว่า บทปฏิบัติการที่สร้างขึ้นมีความสอดคล้องและมีความเหมาะสมในระดับดี เนื่องจากองค์ประกอบโดยรวมของบทปฏิบัติการมีความเหมาะสมและสามารถจูงใจให้ผู้เรียนสนใจมากกว่าการสอนด้วยวิธีบรรยาย

ตอนที่ 4 การนำบทปฏิบัติการและเครื่องมือวัดผลการเรียนรู้ไปสอน

จากการนำบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ไปสอนกับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษาจำนวน 39 คน พบว่า บทปฏิบัติการที่พัฒนาขึ้นมีข้อดีหลายประการ คือ (1) มีความสะดวกต่อการนำไปใช้จริง ได้แก่ การฆ่าเชื้อด้วย คลอรีนซ์ สามารถเตรียมได้จากน้ำยาซักผ้าขาวซึ่งหาได้ง่ายในท้องตลาด และการดัดแปลงตุ๋ปลามาใช้แทนตู้ถ่ายเนื้อเยื่อทำให้ไม่ต้องยุ่งยากในการเคลื่อนย้าย เพราะตุ๋ปลาที่มีขนาดเล็กสามารถเคลื่อนที่ได้ง่าย (2) ปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติการทดลอง ในบทปฏิบัติการใช้คลอรีนซ์สำหรับการฆ่าเชื้อในอุปกรณ์และอาหารเพาะเลี้ยง ที่ระดับความเข้มข้นและปริมาตรที่ค่อนข้างน้อยซึ่งช่วยลดความเสี่ยงอันตรายจากสารเคมี และหากเกิดอันตรายขึ้น เช่น ผิวน้ำผู้เรียนสัมผัสกับคลอรีนซ์ก็สามารถปฐมพยาบาลเบื้องต้นได้ทันที โดยชะล้างบริเวณผิวที่สัมผัสด้วยด้วยน้ำประปาในปริมาณมาก ๆ และ (3) ผลลัพธ์ที่ได้จากการทดลองให้ผลใกล้เคียงกับการใช้วิธีการปกติ ซึ่งหมายถึงการเพาะเลี้ยงลำต้นพืชเนื้อในอาหารเพาะเลี้ยงที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนซ์สามารถเกิดยอดและรากได้ แต่เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ พบว่า ต้นพืชเนื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนซ์มีสีซีดกว่า และมีจำนวนใบน้อยกว่า จากข้อดีที่กล่าวมาข้างต้น ผู้วิจัยเห็นว่าไม่เพียงแต่บทปฏิบัติการที่พัฒนาขึ้นนี้จะทำให้ผู้สอนได้นำไปใช้ในการสอนเสริมควบคู่กับแบบเรียนตามปกติแล้ว ยังสามารถนำไปจัดการเรียนรู้นอกเวลาเรียนได้ เช่น การจัดตั้งเป็นชุมนุม ซึ่งนอกจากจะเป็นการเพิ่มเวลาในการจัดเรียนรู้เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว ยังเป็นการฝึกทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ให้แก่ผู้เรียนได้เป็นอย่างดี

หลังจากสอนด้วยบทปฏิบัติการ เมื่อศึกษาคะแนนผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนของผู้เรียนพบว่า คะแนนเฉลี่ยระหว่างก่อนเรียนและหลังเรียนแตกต่างกัน ($p < 0.05$) โดยผู้เรียนมีคะแนนเฉลี่ยหลังเรียนสูงกว่าก่อนเรียน ทั้งนี้เป็นผลมาจากบทปฏิบัติการที่พัฒนาขึ้นนั้นมียุทธวิธีประกอบที่เหมาะสม ตามที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาจากเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการสร้างบทปฏิบัติการ ได้แก่ จุดประสงค์ของการทดลองสอดคล้องกับเนื้อหา เนื้อหาใช้ภาษาที่เข้าใจง่ายและครอบคลุมความรู้ที่ผู้เรียนควรรู้ ลำดับขั้นตอนในการทำปฏิบัติการชัดเจนไม่กำกวม คำถามท้ายบทปฏิบัติการส่งเสริมการคิดแบบวิทยาศาสตร์ และที่สำคัญคือผู้เรียนได้ลงมือปฏิบัติการทดลองด้วยตนเอง สิ่งเหล่านี้ทำ

ให้ผู้เรียนสามารถเข้าใจในเนื้อหาที่เรียนได้ง่ายเพราะเป็นสิ่งที่ป็นรูปธรรม สามารถมองเห็นและจับต้องได้จริง และเนื่องจากเป็นบทปฏิบัติการที่ผู้เรียนไม่เคยสัมผัสมาก่อน ยิ่งกระตุ้นให้ผู้เรียนเกิด ความสนใจ พร้อมทั้งจะเรียนรู้มากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมให้ผู้เรียนเกิดการแลกเปลี่ยนความ คิดเห็นกับผู้อื่น และรู้จักการวางแผนและการทำงานเป็นกลุ่ม จากเหตุผลข้างต้นทำให้ผู้เรียนเกิดการ เรียนรู้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับงานวิจัยของ กัลยารัตน์ ก้อนแก้ว (2557) ที่พัฒนาบท ปฏิบัติการ เรื่อง การลำเลียงสารผ่านเซลล์โดยใช้ชุดทดลองไข่ เพื่อพัฒนาผลการเรียนรู้วิชาชีววิทยา ของนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 4 พบว่า ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนหลังเรียนสูงกว่าก่อนเรียนอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 มีค่า t -test เท่ากับ 14.85

จากการประเมินความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อพืช โดยแบ่งเป็น 2 ด้านคือ ความพึงพอใจด้านการจัดการเรียนรู้และความพึงพอใจด้านบท ปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่พัฒนาขึ้น พบว่าผู้เรียนมีความพึงพอใจทั้ง 2 ด้าน อยู่ ในระดับมาก นั้นหมายความว่าผู้เรียนชอบทำปฏิบัติการด้วยตนเอง สามารถทำตามขั้นตอนได้ด้วย ด้วยความถูกต้อง บทปฏิบัติการช่วยส่งเสริมการทำงานเป็นกลุ่ม มีความเข้าใจเรื่องการเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อพืชเพิ่มมากขึ้น และเห็นว่าบทปฏิบัติการมีประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ใน ชีวิตประจำวันและการศึกษาต่อในระดับที่สูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ ทรงกลด ไบยา (2556) ที่ สร้างและพัฒนาบทปฏิบัติการ เรื่อง การเปลี่ยนแปลงพลังงาน โดยใช้วิธีการจัดการเรียนรู้แบบสร้าง ความรู้ด้วยตนเอง สำหรับผู้เรียนระดับปริญญาตรี พบว่า ผู้เรียนมีความพึงพอใจด้านการจัดการ เรียนรู้ด้วยตนเองและความพึงพอใจด้านบทปฏิบัติการที่พัฒนาขึ้นในระดับดี

ข้อเสนอแนะ

1. การฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยเตาไมโครเวฟอาจมีปัญหาในทางปฏิบัติ กรณีที่มีขวดอาหารเป็นจำนวนมาก ดังนั้นควรมีการวางแผนในการเตรียมอาหารให้เหมาะสมสำหรับการฆ่าเชื้อในแต่ละครั้ง รวมถึงรูปแบบการจัดเรียงขวดอาหารควรจัดเรียงให้แต่ละขวดห่างกันด้วย ระยะที่สม่ำเสมอเพื่อให้ได้รับความร้อนในการฆ่าเชื้ออย่างทั่วถึง
2. การใช้คลอโรกซ์หรือเตาไมโครเวฟเพื่อฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจมี ผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการเพาะเนื้อเยื่อ ดังนั้นจะนำวิธีการ ดังกล่าวไปใช้ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในพืชที่ต้องการว่าสามารถใช้วิธีฆ่าเชื้อด้วยวิธีดังกล่าวได้ หรือไม่ หรือศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงให้นานขึ้น หลังจากนั้นเมื่อย้ายพืช

ออกปลูกแล้วควรทำการศึกษาการเจริญเติบโตของต้นพืชว่าเป็นอย่างไรเมื่อเทียบกับต้นพืชชนิดเดียวกันที่ปลูกด้วยวิธีดั้งเดิม





บรรณานุกรม

- กรมส่งเสริมการเกษตร. (2546). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับงานขยายพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.
- กันยา มั่นเรืองศรี. (2559). การปฏิรูปการเรียนรู้ตามพระราชบัญญัติการศึกษาแห่งชาติ พ.ศ.2542 และที่แก้ไขเพิ่มเติม (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2545 และ (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2553. สืบค้นเมื่อ 8 ธันวาคม 2559, จาก <http://www.vcharkarn.com/vcafe/220320>
- กัลยารัตน์ ก้อนแก้ว. (2557). การพัฒนาทปฏิบัติการเรื่องการลำเลียงสารผ่านเซลล์โดยใช้ชุดทดลองไขเพื่อพัฒนาผลการเรียนรู้วิชาชีววิทยาของนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 4 โรงเรียนสายปัญญารังสิต. วิทยานิพนธ์ ศศ.ม. (การสอนวิทยาศาสตร์). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรังสิต. ถ่ายเอกสาร.
- การจัดการเรียนการสอนแบบเน้นผู้เรียนเป็นสำคัญ. (2552). สืบค้นเมื่อ 8 ธันวาคม 2559, จาก http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Bpl1uKyq_7wJ:childcenter-edu.blogspot.com/+&cd=7&hl=th&ct=clnk&gl=th
- การเพาะเลี้ยงและจัดการพันธุ์พืช. (2558). สืบค้นเมื่อ 21 ตุลาคม 2558, จาก <http://tissue.agriqua.doae.go.th/pdf/tissue5.pdf>
- การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. (2559). สืบค้นเมื่อ 7 ตุลาคม 2559, จาก <http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=31&chap=5&page=t31-5-infodetail05.html>
- กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์. (2553). ผลของเทคนิคการนิ่ง และไมโครเวฟต่อการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ใน เอกสารประกอบการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 53. หน้า 305-312. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เกตุณา ไทยหนูม; เทิดศักดิ์ โทณลักษณะ; และ ธัญญา ทะพิงค์แก. (2555). ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์สารที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. วารสารวิจัยราชภัฏเชียงใหม่. 13: 149-155.
- โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. (2557). ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ในการฟอกฆ่าเชื้อต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ใน รายงานการดำเนินงานเจ้าหน้าที่ อพ.สธ. ประจำปี 2557. หน้า 69-70. กรุงเทพฯ: เวิร์คสแควร์.

- จิรา ณ หนองคาย. (2551). *หลักและเทคนิคการขยายพันธุ์พืชในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- ฉลองชัย สุวัฒนสมบูรณ์. (2528). *การเลือกและการใช้สื่อการสอน*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเทคโนโลยีการศึกษา คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ไชยยศ เรืองสุวรรณ. (2522). *หลักสูตรการทฤษฎีเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางการศึกษา*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: เรื่องแก้วการพิมพ์.
- ณัฐสิทธิ์ ตันสกุล. (2016). สารฆ่าเชื้อ [แอนตี้เซปติก แอนด์ ดิสนิแนฟเลกแทนต์] *Antiseptic and Disinfectant*. สืบค้นเมื่อ 25 กันยายน 2559, จาก https://ic2topsecret.files.wordpress.com/2011/01/antiseptic_and_disinfectant.pdf
- ทรงกลด ไบยา. (2558). *การพัฒนามาตรปฏิบัติการ เรื่อง การเปลี่ยนแปลงพลังงาน โดยใช้วิธีการจัดการเรียนรู้แบบสร้างความรู้ด้วยตนเอง สำหรับผู้เรียนระดับปริญญาตรี*. ปริญญาโท กศ.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- เทิดศักดิ์ โทณลักษณ์. (2555). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเสี้ยวดอกขาว (Bauhinia variegata L.)*. เชียงใหม่: สาขาวิชาเทคโนโลยีและพัฒนากาเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.
- ธัญญะ เตชะศีลพิทักษ์. (2539). การผลิตไม้ดอก. ใน *เอกสารการสอนชุดวิชาการผลิตและการจัดการพืชสวนประดับ*. หน้า 219-270. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยสุโขทัย ธรรมมาธิราช.
- ธีระยุทธ เพลิดพริ้ง; ทักษิณา เครือหงส์; และศิริพรรณ รุ่งสังข์. (2556). การสร้างชุดการเรียนรู้ วิชาการปฏิบัติการฟิสิกส์ 1 เรื่อง การหาความเร็วเสียงโดยวิธีเรโซแนนซ์. *วารสารวิชาการและวิจัย มทร.พระนคร ฉบับพิเศษ การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 5*. 199-204.
- นิตยศรี แสงเดือน; และ สัมพันธ์ คัมภีรานนท์. (2549). *เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บุญรอด ชาติยานนท์. (2556). *การพัฒนามาตรปฏิบัติการ เรื่องการควบคุมวัชพืชโดยใช้สารจากใบพืชสำหรับนิสิตระดับปริญญาตรี*. ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต ปร.ด. (สิ่งแวดล้อมศึกษา). มหาสารคาม: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. ถ่ายเอกสาร
- บุญเกื้อ ควรหาเวช. (2545). *นวัตกรรมการศึกษา*. พิมพ์ครั้งที่ 6. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

- บุญชม ศรีสะอาด. (2541). *การพัฒนาการสอน*. กรุงเทพฯ: ชมรมเด็ก.
- . (2546). *การพัฒนาหลักสูตรและการสอน*. กรุงเทพฯ: สุวีริยาสาส์น.
- ประทานพร อาริราชการณย์; วันเพ็ญ ชินเฮง; ตะลันย์ เทพอารีย์; และอลิศรา อาริราชการณย์. (2551). อำนาจในการทำลายสปอร์ของน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้งานในคลินิกทันตกรรมในประเทศไทย. *วารสารทันตแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*. 31(1): 11-18.
- ประเทืองทิพย์ สุกุมลจันทร์. (2545). *การพัฒนามาตรปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เรื่อง การแปรรูปและทดสอบ เรื่องสารอาหารในพืชสมุนไพร สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย*. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. (วิทยาศาสตร์ศึกษา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร
- ประวิตร ชูศิลป์. (2524). *หลักการประเมินผลวิทยาศาสตร์แผนใหม่*. กรุงเทพฯ: ภาคพัฒนาตำรา และเอกสารหน่วยศึกษานิเทศก์ กรมการฝึกหัดครู. ถ่ายเอกสาร.
- ปิฎก บุนนาค. (2529). *ไม่ดกไม่ประดับ*. กรุงเทพฯ: บรรณกิจ.
- ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และอารีย์ วรญญวัฒน์. (2551). *บทปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี*.
- พรทิพย์ วงษ์นาป่า. (2548). *การพัฒนามาตรปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เรื่อง การสกัดและแยกสารประกอบแซนโทนจากผลมังคุด สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 จังหวัดจันทบุรี*. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. (วิทยาศาสตร์ศึกษา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- พรพรรณ อุสุวรรณ. (2557). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชเพื่อการเกษตร*. นครปฐม: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยราชภัฏ นครปฐม.
- พฤติกรรมการสอนชีววิทยา. (2559). สืบค้นเมื่อ 8 ธันวาคม 2559, จาก <http://e-book.ram.edu/e-book/inside/html/dlbook.asp?code=TL474>
- พัชรา ลิ้มปะนะเวช. (2550). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ใน *สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่ม 31*. หน้า 146-149. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว.
- พันธ์ ทองชุมนุม. (2547). *การสอนวิทยาศาสตร์ระดับประถมศึกษา*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- พิมพ์พันธ์ เตชะคุปต์. (2545). *พฤติกรรมการสอนวิทยาศาสตร์*. กรุงเทพฯ: พัฒนาคุณภาพวิชาการ.

- พิมพ์พันธ์ เตชะคุปป์; และ พเยาว์ ยินดีสุข. (2551). *ทักษะ 5C เพื่อการพัฒนาหน่วยการเรียนรู้และการจัดการเรียนการสอนแบบบูรณาการ*. พิมพ์ครั้งที่ 6. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พุทธิตา ดอนฟุ้งไพร. (2548). *การเปรียบเทียบผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนวิชาสังคมศึกษาและความมีวินัยในตนเองของนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 3 ที่เรียนแบบร่วมมือและการเรียนแบบปกติ*. ปรินญาณินพนธ์ ค.ม. (หลักสูตรและการสอน). นครปฐม: บัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม. ถ่ายเอกสาร.
- ภพ เลหาไฟบุรณ์. (2542). *แนวการสอนวิทยาศาสตร์*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ไทยวัฒนาพานิช.
- ภานุพงศ์ มหาพรหม. (2554). *ยาฆ่าเชื้อและยาปราศจากเชื้อ [แอนตี้เซปติก แอนต์ ดิสอินแฟคแทนต์] Antiseptic and Disinfectant*. สืบค้นเมื่อ 15 ตุลาคม 2558, จาก http://www.as.mju.ac.th/E-Book/t_panupong/Antiseptic_and_disinfectants.pdf
- ยศวดี จูติวร. (2557). *การพัฒนาบทปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์เรื่องเทคนิคโครมาโทกราฟีและเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการเรียนรู้สำหรับนิสิตปริญญาตรี*. ปรินญาณินพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- รกรอง วิเศษสุวรรณ. (2542). *เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช*. (เอกสารประกอบการฝึกอบรม). นครปฐม: งานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รังษฤดี กาวีตะ. (2541). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการคิดและเทคนิค*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วนิดา จัตรวิราคม. (2556). *การนิเทศและการแก้ปัญหาการเรียนการสอนวิทยาศาสตร์ SE 743* (เอกสารประกอบการสอน). กรุงเทพฯ: คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง. สืบค้นเมื่อ 1 ตุลาคม 2559, จาก <http://e-book.ram.edu/e-book/inside/html/dlbook.asp?code=SE743>
- วารีย์ บุญลือ. (2550). *การพัฒนาบทปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เรื่องการปลูกพืชแบบไฮโดรพอนิกส์ สำหรับนักเรียนช่วงชั้นที่ 3*. ปรินญาณินพนธ์ กศ.ม. (เอกการมัธยมศึกษา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

- วิโรจน์ แสนคำภา. (2550). การเปรียบเทียบทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ระดับชั้นประถมศึกษาปีที่ 6 ระหว่างการจัดการเรียนรู้โดยใช้ชุดกิจกรรมฝึกทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์กับการจัดการเรียนรู้ตามคู่มือครูของ สสวท. วิทยานิพนธ์ กศ.ม. (วิจัยและประเมินผลการศึกษา). เลย: มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย.
- วิศิษฐ์ศรี โตศุกลวรรณ. (2556). การพัฒนาบทปฏิบัติการโดยใช้วิธีการจัดการเรียนรู้แบบสร้างความรู้ด้วยตนเอง เรื่อง โครงสร้างและหน้าที่ของพืชดอก สำหรับผู้เรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย. ปรินญาณิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- ศิริกานต์ ผาสุก. (2543). การพัฒนาบทปฏิบัติการวิชาเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เรื่อง การสกัดและแยกองค์ประกอบทางเคมีจากพืชสมุนไพรในท้องถิ่น สำหรับหลักสูตรวิทยาศาสตร์ของสถาบันราชภัฏ. ปรินญาณิพนธ์ กศ.ด. (วิทยาศาสตร์ศึกษา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- สกุณ มุลแสดง. (2554). พฤติกรรมการสอนชีววิทยา [ทีชชิง บีแฮพเวอร์ อิน ไปโอโลจี] *Teaching Behavior in Biology*. (เอกสารประกอบการสอน). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรามคำแหง.
- สมปอง เตชะโต. (2539). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ. พิมพ์ครั้งที่ 3. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สมเพียร เกษมทรัพย์. (2526). ไม้ดอกกระถาง. กรุงเทพฯ: อักษรพิทยา.
- สายสนม ประดิษฐ์ดวง. (2546). การให้ความร้อนด้วยพลังงานไมโครเวฟและการฉายรังสีอาหาร. ใน วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. หน้า 231-235. คณะจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง. (2558). ความรู้ทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สืบค้นเมื่อ 20 ตุลาคม 2558, จาก <http://www.lartc.rmutl.ac.th/ptclab/Tissue%20Culture/factor%20tissue%20culture.html>
- สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. (2557). คู่มือครูรายวิชาเพิ่มเติม ชีววิทยา เล่ม 3 ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 4-6 กลุ่มสาระการเรียนรู้วิทยาศาสตร์ ตามหลักสูตรแกนกลางการศึกษาขั้นพื้นฐาน พุทธศักราช 2551. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว.

- สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. (2542). *ประโยชน์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช*. กรุงเทพฯ: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- ไม้ดอกแสนสวย. (2539). กรุงเทพฯ: อมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์ พับลิชชิ่ง.
- สุรจิตา เศรษฐภักดี. (2547). *ผลการเรียนรู้เรื่อง การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 4 ที่เรียนด้วยวัฏจักรการสืบเสาะหาความรู้*. วิทยานิพนธ์ ศศ.ม. (การสอนวิทยาศาสตร์). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.
- สุรางค์ สากร. (2537). *พฤติกรรมการสอนกลุ่มสร้างเสริมประสบการณ์ชีวิต: วิทยาศาสตร์*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาหลักสูตรและการสอน คณะครุศาสตร์ สถาบันราชภัฏจันทรเกษม.
- สุวัฒน์ นิยมคำ. (2517). *การสอนวิทยาศาสตร์แบบพัฒนาความคิด*. กรุงเทพฯ: วัฒนาพานิช.
- เสกสรรค์ สุวรรณสุข. (2559). *บทปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ*. สืบค้นเมื่อ 2 ธันวาคม 2559, จาก <http://www.kruseksan.com/book/tissue2.pdf>
- สุวิมล เขียวแก้ว. (2540). *การสอนวิทยาศาสตร์ระดับมัธยมศึกษา*. ปัตตานี: ภาควิชาการศึกษา คณะศึกษาศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.
- อธิพร ศรียมก. (2525). *การประเมินผลสื่อการสอน*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช.
- อรอุมา ละมูล. (2541). *การพัฒนาบทปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์เรื่อง ความสามารถของวัสดุธรรมชาติในการดูดซับโลหะหนักที่ใช้ในวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6*. วิทยานิพนธ์ กศ.ม. (วิทยาศาสตร์ศึกษา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- อัญชลี สิรินทร์วรารงค์. (2543). *สอนวิทยาศาสตร์อย่างไรในระดับมัธยมศึกษา*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อัญชลี จาละ. (2558). *การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ*. สืบค้นเมื่อ 20 ตุลาคม 2558, จาก <http://e-learning.tu.ac.th/elearning15/>
- อัฐวุฒิ คำแสน; และ สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2554, มกราคม-มิถุนายน). *การพัฒนาผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนด้วยการใช้ชุดกิจกรรมปรับปรุงคุณภาพดินและการเปลี่ยนแปลงของดินสำหรับนักเรียนมัธยมศึกษาตอนต้น*. วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้. 2(1): 11-21.

- อารมณฺ์ เพชรชื่น. (2527). *เทคนิคการวัดและประเมินผลการศึกษาในระดับประถมศึกษา*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาหลักสูตรและการสอน คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อัดสำเนา.
- Best, J.W. (1986). *Research in Education*. 5th ed. New Jersey: Prentice Hall.
- Blanchard, M.G.; & Runkl, E.S. (2006). Temperature During the Day, but not During the Night, Controls Flowering of *Phalaenopsis* Orchid. *Journal of Experimental Botany*. 57: 4043-4049.
- Bloom, B.S. (1956). *Taxonomy of Education Objective Handbook I: Cognitive Domain*. New York: David McKay.
- Brondani, G.E.; Brondani, G.E.; Oliveira, L.S.; Bergonci, T.; Brondani, A.E.; França, F.A.M; Silva, A.L.L; & Gonçalves, A.N. (2012). Chemical Sterilization of Culture Medium: a Low Cost Alternative to *In vitro* Establishment of Plants. *Scientia Forestalis*. 41(98): 257-264.
- Burger, D.W. (1988). Guidelines for Autoclaving Liquid Medium Used in Plant Tissue Culture. *HortScience*. 23: 1066–1068.
- Cardoso, J.C.; & Silva, J.A.T. (2012). Micropropagation of Gerbera Using Chlorine Dioxide (ClO₂) to Sterilize the Culture Medium. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 48(3): 362-368.
- Chen, W.H.; Tseng, Y.C.; Liu, Y.C.; Chuo, C.M.; Chen, P.T.; Tseng, K.M.; Yeh, Y.C.; Ger, M.J.; & Wang, H.L. (2008). Cool-ight Temperature Induces Spike Emergence and Affects Photosynthetic Efficiency and Metabolizable Carbohydrate and Organic Acid Pools in *Phalaenopsis aphrodite*. *Plant Cell Report*. 27: 1667-1675.
- Curvetto, N.; Marinangeli, P.; & Mockel, G. (2006). Hydrogen Peroxide in Micropropagation of Lilium. A Comparison with a Traditional Methodology. *Biocell*. 30: 497-500.
- Davis, Donald R. (2009). Declining Fruit and Vegetable Nutrient Composition: What is the Evidence?. *American Society of Horticultural Science*. 44(1): 15-19.

- Deein, W.; Thepsithar, C.; & Thongpukdee, A. (2013). *In vitro* Culture Medium Sterilization by Chemicals and Essential Oils without Autoclaving and Growth of Chrysanthemum Nodes. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. 7(6): 1041-1044.
- El, G.A.M.; Hussein, M.F.; Bishara, A.L.; Sallam, S.H.; & Ali, A.S. (1972). Studies on the Hybrid *Petunia*. *Agricultural Research Review*. 50(5): 167-176.
- Elly Waterman. (1977). *Petunia hybrida*. Retrieved September 23, 2016, from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Petunia_hybrida_ellywa.png
- Estrelal, Carlos.; Ribeiro, Rosane Galhardo; Estrelal, Cyntia R.A.; Pécora, Jesus Djalma; & Sousa-Neto, Manoel Damião. (2003). Antimicrobial Effect of 2% Sodium Hypochlorite and 2% Chlorhexidine Tested by Different Methods. *Brazilian Dental Journal*. 14(1): 58-62.
- Evelyn, M.F.; Power, J.B.; & Cocking, E.C. (1973). The Isolation, Culture and Regeneration of *Petunia* Leaf Protoplasts. *Developmental Biology*. 33: 130-137.
- Ewart, L. (1984). Plant breeding. In *Petunia: Monographs on Theoretical and Applied Genetics*. Sink K.C.(ed.). pp.180-202. Berlin: Springer-Verlag.
- Fan, Chung-Teh. (1952). *The Item Analysis Table*. New Jersey, Princeton: Educational Testing Services.
- Fuller, M. P.; & Pizzey, T. (2001). Teaching Fast and Reliable Tissue Culture Using PPM And Brassicas. *International Society for Horticultural Science. Acta horticulturae*. 560: 567–570.
- Good, C.V. (1973). *Dictionary of Education*. New York: McGraw-Hill.
- Harty, H.; & Al-Faleh, N. (1983). Saudi Arabian Students Chemistry Achievement and Science Attitudes Stemming from Lecture Demonstration and Small Group Teaching Methods. *Journal of Research in Science Teaching*. 9: 861-866.
- Kataoka, K.; Sumitomo, K.; Fudano, T.; & Kawase K. (2004). Changes in Sugar Content of *Phalaenopsis* Leaves Before Floral Transition. *Scientia Horticulturae*. 102: 121-132.

- Keller, M.D.; Bellows, W.K.; & Guillard, R.R.L. (1988). Microwave Treatment for Sterilization of Phytoplankton Culture Media. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 117: 279-283.
- Klopfer, L.E. (1971). *Evaluation of Learning in Science*. Newyork: McGraw-Hill.
- Kyte, L.; & Kleyn, J. (1999). *Plants from Test Tube*. Oregon: Timber press.
- Kubota, C.; & Tadokoro, N. (1999). Control of Microbial Contamination for Large-Scale Photoautotrophic Micropropagation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 35: 296-298.
- Kuder, G.; & Richardson, M. (1937). The theory of estimation of test reliability. *Psychometrika*. 2(3): 151-160.
- Langens-Gerrits, M.M.; Miller, W.B.M.; Croes, A.F.; & Klerk, G-j. (2003). Effect of Low Temperature on Dormancy Breaking and Growth After Planting in Lily Bulblets Regenerated *In vitro*. *Plant Growth Regulation*. 40(3): 267-275.
- Lee, H.C.; Chen, Y.J.; Markhart, A.H.; & Lin, T.Y. (2007). Temperature Effects on Systemic Endoreduplication in Orchid During Floral Development. *Plant Science*. 172: 588-595.
- Likert, R. (1967). The Method of Constructing and Attitude Scale. In *Reading in Attitude Theory and Measurement*. Fishbein, M.(Ed.). pp.90-95. New York: Wiley & Son.
- McDonnell, G. & Russell, A.D. (1999). Antiseptics and Disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(1): 149-179.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Plant Physiology*. 15(3): 473-497.
- Odani, S.; Abe, T.; & Mitsuma, T. (1995). Pasteurization of Food by Microwave Irradiation. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. 36(4): 477- 481.
- Papadopoulou, C.; Demetriou, D.; Panagiou, A.; Levidiotou, S.; Gessouli, H.; Ioannides, K. & Antoniadis, G. (1995). Survival of Enterobacteria in Liquid Cultures During Microwave Radiation and Conventional Heating. *Microbiological Research*. 150(3): 305-309.

- Payne, G.F.; Bringi, V.; Prince, C.; & Shuler, M.L. (1992). *Plant cell and Tissue Culture in Liquid Systems*. New York: Oxford University Press.
- Perkins, J.J. (1969). Laboratory and Industrial Sterilizers. In *Principles and methods of sterilization in health sciences*. Perkins, J.J. (ed.). pp. 465-482. Springfield, IL: Thomas Press.
- Preece, J.E. (1999). Shoot Organogenesis from Petunia Leaves. In *Plant tissue culture concept and laboratory exercises*. Trigiano, R.N; & Gray, D.J.(eds.). pp.167-171. 2nd edition. Boca Raton, FL: CRC press.
- Romey, W.D. (1968). *Inquiry Techniques Teaching Science*. New Jersey: Prentice-Hall.
- Smith, R.H. (2013). *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. 3rd ed. Amsterdam: Academic Press.
- Sawant, R.A.; & Tawar, P.N. (2011). Use of Sodium Hypochlorite as Media Sterilant in Sugarcane Micropropagation at Commercial Scale. *Sugar Technology*. 13(1): 27-35.
- Snow, R. (1985). Improvements in Methods for The Germination of Orchid Seeds. *American Orchid Society BULLETIN*. 54: 178–181.
- Su, V.; Hsu, D.; & Chen, W.H. (2001). The Photosynthetic Activities of Bare Rooted *Phalaenopsis* During Storage. *Scientia Horticulturae*. 87: 311-318.
- Teixeira, S.L.; Ribeiro, J.M.; & Teixeira, M.T. (2006). Influence of NaClO on Nutrient Medium Sterilization and on Pineapple (*Ananas comosus* cv. Smooth cayenne) behavior. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 86: 375-378.
- Thepsithar, C.; & Thongpukdee, A. (2013). Sterilisation of Hyponex Medium by Chemicals without Autoclaving and Growth of *Phalaenopsis* Protocorms. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. 7(6): 813-816.
- Tisserat, B.; Jones, D.; & Galletta, P.D. (1992). Microwave Sterilization of Plant Tissue Culture Media. *HortScience*. 27(4): 358-361.
- Thompson, J.S.; & Thompson, A. (1990). In-home Pasteurization of Raw Goat's Milk by Microwave Treatment. *International Journal of Food Microbiology*. 10(1): 59-64.

- Thorpe, T. (2007). History of Plant Tissue Culture. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 37: 169-180.
- Valera, Marcia Carneiro.; & et al. (2009). Antimicrobial Activity of Sodium Hypochlorite Associated with Intracanal Medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* Inoculated in Root Canals. *Journal of Applied Oral Science*. 17(6): 555–559.
- Yanagawa, T.; Nagai, M.; Ogino, T.; & Maeguchi, R. (1995). Application of Disinfectants to Orchid Seeds, Plantlets and Medium as a Means to Prevent *In vitro* Contamination. *Lyndleyana*. 10: 33-36.
- Yanagawa, T.; Tanaka, R.; & Funai, R. (2007). Simple Micropropagation of Ornamentals by Direct Application of Chlorine Disinfectants without Equipment. *Acta Horticulturae*. 64: 289-298.
- Yildiz, M.;& Er, C. (2002). The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). *Naturwissenschaften*. 89(6): 259-61.



ภาคผนวก ก

- รายนามผู้เชี่ยวชาญตรวจเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย
- หนังสือขอความอนุเคราะห์

รายนามผู้เชี่ยวชาญตรวจสอบเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

รายนามผู้เชี่ยวชาญตรวจสอบเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ แบบสอบถามความคิดเห็นของผู้สอนรายวิชาชีววิทยาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายในการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช บทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช แบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน และแบบประเมินความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีดังต่อไปนี้

1. รศ.ดร.เฉลิมชัย วงศ์วัฒน์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
2. ดร.วชิราภรณ์ พิกุลทอง สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา
3. อาจารย์นันทวรรณ ชื่นชมคุณากร โรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



ที่ ศธ 0519.12/ ๔๑๖๔



บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
สุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110

๑๖ กรกฎาคม 2559

เรื่อง ขอความอนุเคราะห์เก็บข้อมูลเพื่อการวิจัย

เรียน ผู้อำนวยการโรงเรียนสายน้ำผึ้ง ในพระอุปถัมภ์ สมเด็จพระเจ้าภคินีเธอ เจ้าฟ้าเพชรรัตนราชสุดา
สิริโสภาคย์พัฒนวงศ์

เนื่องด้วย นางสาวปรีนันท์ รังแก้ว นิสิตระดับปริญญาโท สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัย
ศรีนครินทรวิโรฒ ได้รับอนุมัติให้ทำปริญญานิพนธ์ เรื่อง “การพัฒนาบทปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ เรื่อง
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับผู้เรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย” โดยมี อาจารย์ ดร.รักชนก โคโคต เป็นอาจารย์
ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

ในการนี้ นิสิตขอความอนุเคราะห์เก็บข้อมูลเพื่อการวิจัย โดยใช้บทปฏิบัติการวิทยาศาสตร์
เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช แบบสอบถามสอบถามความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนการสอน
ด้วยบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับผู้เรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย และแบบทดสอบ
วัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช กับนักเรียนระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 จำนวน
1 ห้อง และนักเรียนระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5 จำนวน 1 ห้อง เพื่อเป็นข้อมูลในการวิจัย และขอใช้สถานที่ใน
โรงเรียนของท่าน ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2559 ถึงเดือนสิงหาคม 2559 ทั้งนี้ นิสิตจะเป็นผู้ประสานงาน
ในรายละเอียดดังกล่าว

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาให้ความอนุเคราะห์ และขอขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอแสดงความนับถือ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีนันท์ ชัยวิสุทธิธำรงกูร)

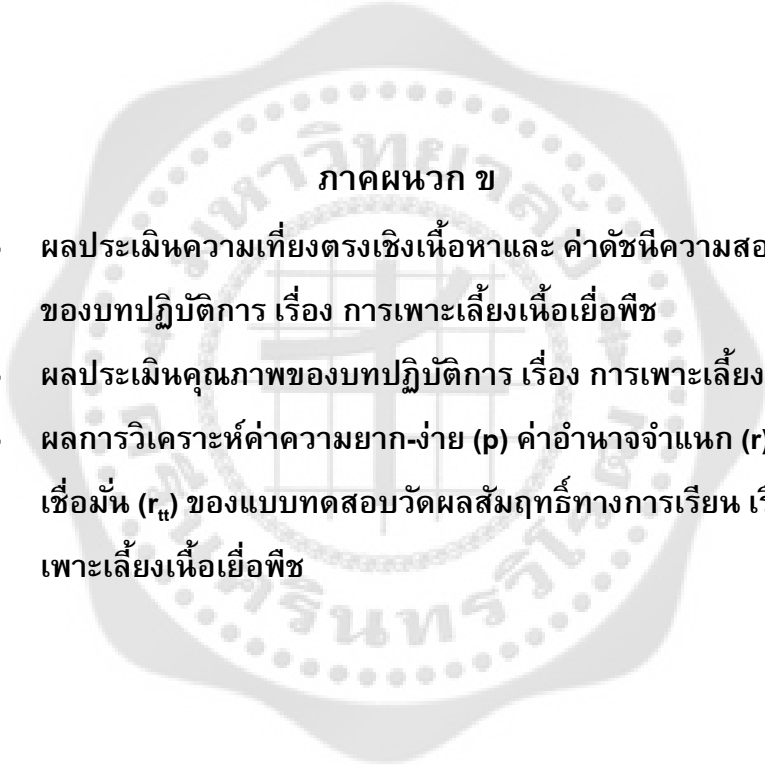
คณบดีคณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ

รักษาการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

สำนักงานคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

โทร. 0 2649 5064

หมายเหตุ : สอบถามข้อมูลเพิ่มเติมกรุณาติดต่อ นิสิต โทรศัพท์ 086 904 4676



ภาคผนวก ข

- ผลประเมินความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหาและ ค่าดัชนีความสอดคล้อง (IOC) ของบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- ผลประเมินคุณภาพของบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- ผลการวิเคราะห์ค่าความยาก-ง่าย (p) ค่าอำนาจจำแนก (r) และค่าความเชื่อมั่น (r_{tt}) ของแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ตาราง 12 ผลประเมินความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหา และค่าดัชนีความสอดคล้อง (IOC) ของบท
ปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การทดลองที่ 1 เรื่อง การเตรียมอาหาร
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

รายการประเมิน	ผลการประเมิน			รวม	IOC	สรุป
	ผู้เชี่ยวชาญคนที่					
	1	2	3			
1. จุดประสงค์						
1.1 จุดประสงค์มีความสอดคล้องกับเนื้อหา	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
1.2 จุดประสงค์มีความชัดเจน สามารถประเมินผลได้จริง	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
2. เนื้อหา						
2.1 เนื้อหามีความสอดคล้องกับจุดประสงค์	+1	+1	0	2	0.67	ใช้ได้
2.2 เนื้อหามีความถูกต้องและครอบคลุม	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
2.3 เนื้อหามีความต่อเนื่องเป็นลำดับขั้นตอน	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
2.4 เนื้อหาเหมาะสมกับระยะเวลาที่กำหนด	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
2.5 เนื้อหาใช้ภาษาที่เข้าใจง่าย ไม่กำกวม	+1	+1	0	2	0.67	ใช้ได้
3. วิธีการทดลอง						
3.1 วิธีการทดลองมีความสอดคล้องกับจุดประสงค์	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
3.2 วิธีการทดลองมีความยาก-ง่ายเหมาะสม	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
3.3 วิธีการทดลองเรียงลำดับเป็นขั้นตอนได้ถูกต้อง	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
3.4 วิธีการทดลองเหมาะสมกับระยะเวลาที่กำหนด	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
3.5 วิธีการทดลองส่งเสริมให้นักเรียนคิดและปฏิบัติเป็นวิทยาศาสตร์	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
3.6 วิธีการทดลองใช้ภาษาที่เข้าใจง่าย ไม่กำกวม	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
4. คำถามท้ายบทปฏิบัติการ						
4.1 คำถามสอดคล้องกับจุดประสงค์	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
4.2 คำถามสอดคล้องกับกิจกรรมการทดลอง	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
4.3 คำถามมีจำนวนเหมาะสม	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้

ตาราง 12 (ต่อ)

รายการประเมิน	ผลการประเมิน			รวม	IOC	สรุป
	ผู้เชี่ยวชาญคนที่					
	1	2	3			
4.4 คำถามใช้ภาษาที่เข้าใจง่าย ไม่กำกวม	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
4.5 คำถามส่งเสริมการคิดแก้ปัญหาและการนำไปใช้	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
รวม					17.34	
เฉลี่ย					0.96	ใช้ได้



ตาราง 13 ผลประเมินความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหา และค่าดัชนีความสอดคล้อง (IOC) ของบท
 ปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การทดลองที่ 2 เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
 พืชเนื้อ

รายการประเมิน	ผลการประเมิน			รวม	IOC	สรุป
	ผู้เชี่ยวชาญคนที่					
	1	2	3			
1. จุดประสงค์						
1.1 จุดประสงค์มีความสอดคล้องกับเนื้อหา	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
1.2 จุดประสงค์มีความชัดเจน สามารถประเมินผลได้จริง	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
2. เนื้อหา						
2.1 เนื้อหามีความสอดคล้องกับจุดประสงค์	+1	+1	0	2	0.67	ใช้ได้
2.2 เนื้อหามีความถูกต้องและครอบคลุม	0	+1	+1	2	0.67	ใช้ได้
2.3 เนื้อหามีความต่อเนื่องเป็นลำดับขั้นตอน	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
2.4 เนื้อหาเหมาะสมกับระยะเวลาที่กำหนด	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
2.5 เนื้อหาใช้ภาษาที่เข้าใจง่าย ไม่กำกวม	+1	+1	0	2	0.67	ใช้ได้
3. วิธีการทดลอง						
3.1 วิธีการทดลองมีความสอดคล้องกับจุดประสงค์	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
3.2 วิธีการทดลองมีความยาก-ง่ายเหมาะสม	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
3.3 วิธีการทดลองเรียงลำดับเป็นขั้นตอนได้ถูกต้อง	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
3.4 วิธีการทดลองเหมาะสมกับระยะเวลาที่กำหนด	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
3.5 วิธีการทดลองส่งเสริมให้นักเรียนคิดและปฏิบัติเป็นวิทยาศาสตร์	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
3.6 วิธีการทดลองใช้ภาษาที่เข้าใจง่าย ไม่กำกวม	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
4. คำถามท้ายบทปฏิบัติการ						
4.1 คำถามสอดคล้องกับจุดประสงค์	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
4.2 คำถามสอดคล้องกับกิจกรรมการทดลอง	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
4.3 คำถามมีจำนวนเหมาะสม	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้

ตาราง 13 (ต่อ)

รายการประเมิน	ผลการประเมิน			รวม	IOC	สรุป
	ผู้เชี่ยวชาญคนที่					
	1	2	3			
4.4 คำถามใช้ภาษาที่เข้าใจง่าย ไม่กำกวม	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
4.5 คำถามส่งเสริมการคิดแก้ปัญหาและการนำไปใช้	+1	+1	+1	3	1	ใช้ได้
รวม					17.01	
เฉลี่ย					0.95	ใช้ได้



ตาราง 14 ผลประเมินคุณภาพของบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

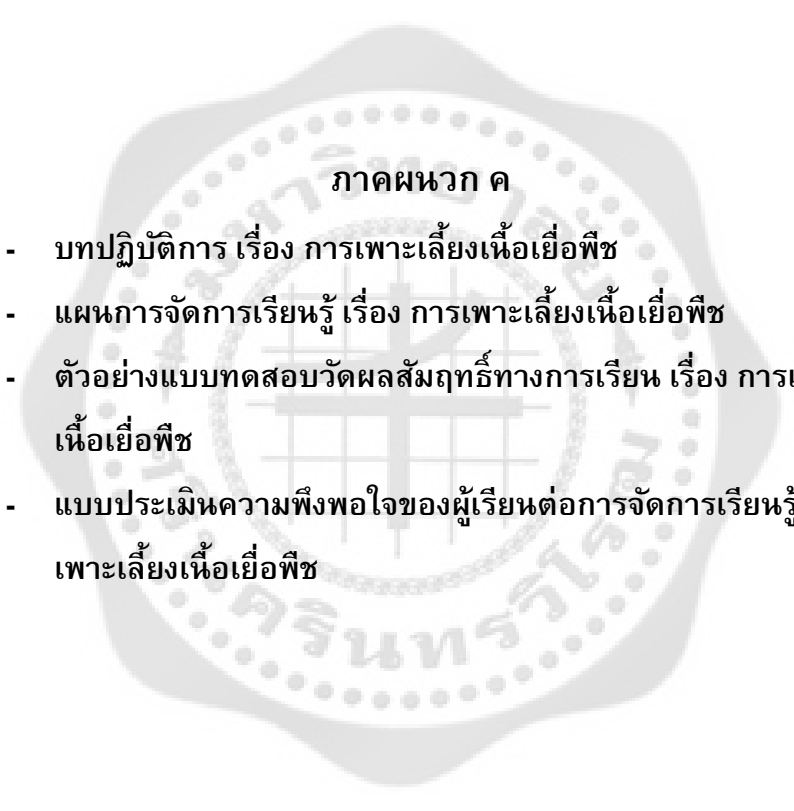
รายการประเมิน	ผลการประเมิน			รวม	$\bar{X}$
	ผู้เชี่ยวชาญคนที่				
	1	2	3		
1. จุดประสงค์					
1.1 จุดประสงค์ของการทดลองมีความชัดเจนและเป็นไป ได้	5	5	5	15	5
1.2 จุดประสงค์ของการทดลองมีความเหมาะสมกับระดับของผู้เรียน	5	5	5	15	5
2. เนื้อหา					
2.1 เนื้อหาความเป็นไปได้นในการนำไปปฏิบัติจริง	5	5	5	15	5
2.2 เนื้อหาเหมาะสมกับระดับชั้นของผู้เรียน	5	5	5	15	5
2.3 เนื้อหาครอบคลุมความรู้ที่ผู้เรียนควรได้รับ	5	4	4	13	4.33
2.4 ความถูกต้องของภาษา	4	4	4	12	4
3. วิธีการทดลอง					
3.1 การออกแบบวิธีการทดลองมีความเหมาะสมกับ ผู้เรียน	5	5	5	15	5
3.2 วิธีการทดลองช่วยกระตุ้นความสนใจให้แก่ผู้เรียน	5	5	4	14	4.67
3.3 วิธีการทดลองมีลำดับขั้นตอนที่เหมาะสม	4	5	5	14	4.67
3.4 วิธีการทดลองมีความเหมาะสมที่จะนำไปสู่การบรรลุจุดประสงค์ของการทดลอง	4	4	4	12	4
3.5 ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองมีความเหมาะสม	4	3	5	12	4
3.6 วิธีการทดลองส่งเสริมให้ผู้เรียนเกิดการเรียนรู้ด้วยตนเองด้วยการลงมือปฏิบัติ	4	5	5	14	4.67
3.7 วิธีการทดลองทำให้ผู้เรียนเข้าใจในหลักการและทฤษฎี	4	5	4	13	4.33
4. คำถามท้ายบทปฏิบัติการ					
4.1 คำถามส่งเสริมทักษะกระบวนการวิทยาศาสตร์	4	4	4	12	4
4.2 คำถามส่งเสริมการนำไปใช้ในชีวิตประจำวันและประยุกต์ใช้ในการเรียนในระดับที่สูงขึ้น	4	3	4	11	3.67
รวม					67.34
เฉลี่ย					4.49

ตาราง 15 ผลการวิเคราะห์ค่าความยาก-ง่าย (p) และค่าอำนาจจำแนก (r) ของแบบทดสอบวัดผล
สัมฤทธิ์ทางการเรียน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ข้อที่	ค่าความ ยาก-ง่าย(p)	ค่าอำนาจจำแนก (r)	ข้อที่	ค่าความ ยาก-ง่าย(p)	ค่าอำนาจจำแนก (r)
1	0.70	0.20	11	0.73	0.40
2	0.77	0.20	12	0.67	0.27
3	0.80	0.27	13	0.70	0.33
4	0.67	0.27	14	0.60	0.53
5	0.70	0.20	15	0.83	0.20
6	0.70	0.20	16	0.77	0.20
7	0.60	0.40	17	0.70	0.20
8	0.70	0.33	18	0.63	0.20
9	0.67	0.67	19	0.77	0.33
10	0.73	0.27	20	0.60	0.27

หมายเหตุ

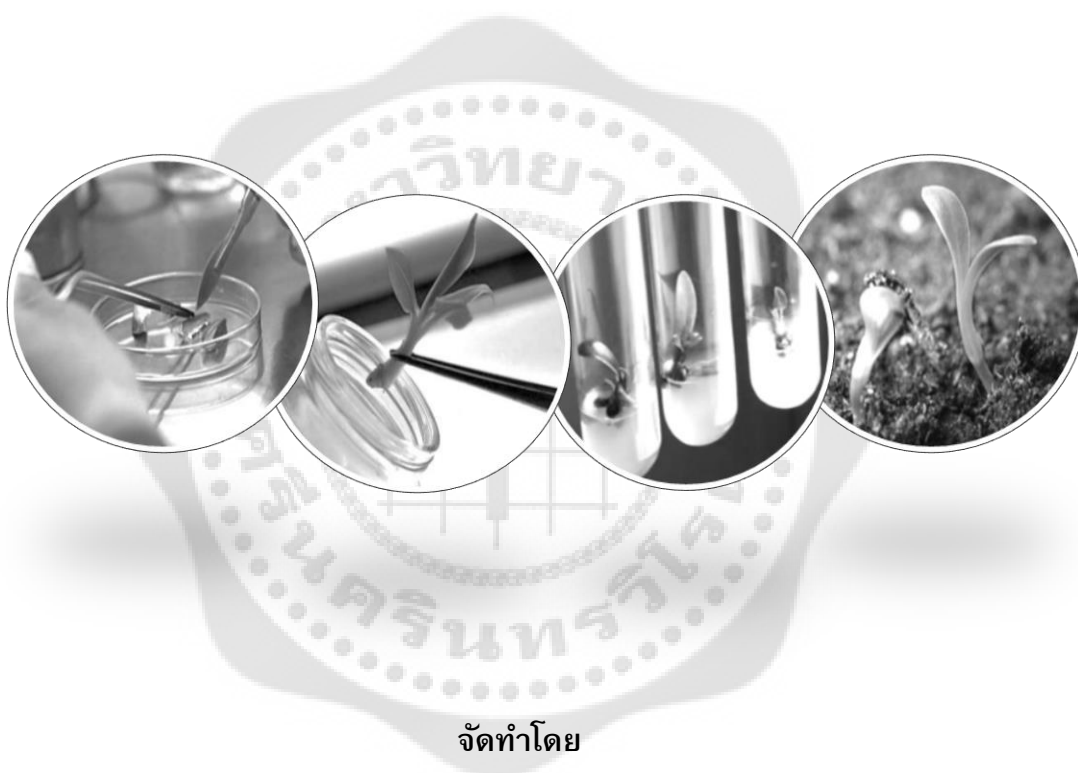
ข้อสอบที่คัดเลือกไว้ 20 ข้อ มีค่าความยาก-ง่าย อยู่ระหว่าง 0.60- 0.83 ค่าอำนาจจำแนก
ตั้งแต่ 0.20 ขึ้นไป และมีค่าความเชื่อมั่นของแบบทดสอบทั้งฉบับ (reliability) เท่ากับ 0.72



ภาคผนวก ค

- บทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- แผนการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- ตัวอย่างแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- แบบประเมินความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

บทปฏิบัติการ
เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant Tissue Culture)
สำหรับผู้เรียนระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย



จัดทำโดย

นางสาวปวีรินทร์ รังแก้ว

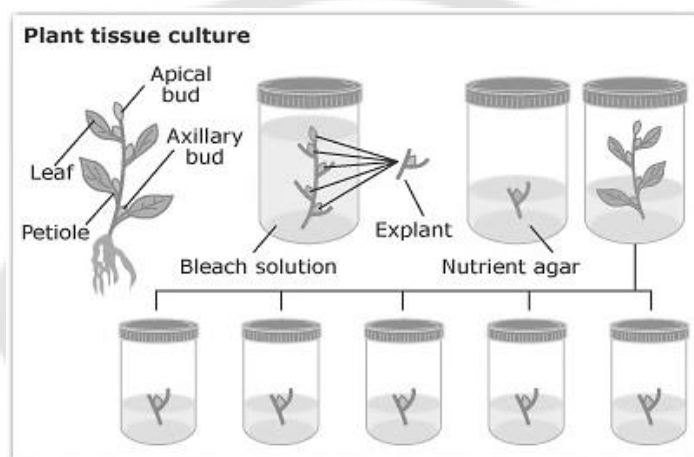
นิสิต กศ.ม.ชีววิทยา

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant Tissue Culture)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นเทคนิคหนึ่งในการขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศ โดยการนำชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ยอด ลำต้น ตาข้าง กลีบดอก อับเรณู หรือแม้กระทั่งโปรโตพลาสต์ (protoplast) มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ภายใต้สภาวะควบคุม ได้แก่ อุณหภูมิ แสง ความชื้น และต้องทำในสภาพปลอดเชื้อ ชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงจะมีคุณสมบัติเป็น Totipotency หมายถึง ความสามารถของเซลล์พืชที่พร้อมจะพัฒนากลับไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ และสามารถนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้



รูปที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน ดังนี้

1. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. การฟอกฆ่าเชื้อส่วนเนื้อเยื่อพืช
3. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
4. การนำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปเลี้ยง
5. การย้ายเนื้อเยื่อออกจากขวดออกปลูก

1. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เป็นการนำธาตุอาหารหลักที่พืชต้องการในการเจริญเติบโต และธาตุอาหารรองมาผสมกับ วุ้น วิตามินและน้ำตาล และอาจเติมฮอร์โมนหรือสารควบคุมการเจริญเติบโตในอัตราส่วนที่เหมาะสม ใส่ลงในขวดอาหารเพาะเลี้ยงแล้วนำไปฆ่าเชื้อ

1.1 องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

โดยทั่วไปอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่

1) สารอนินทรีย์ ได้แก่

- ธาตุอาหารหลัก (macronutrients) ที่พืชต้องการในปริมาณมาก ได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และกำมะถัน (S)

- ธาตุอาหารรอง (micronutrients) ที่พืชต้องการในปริมาณน้อย ได้แก่ เหล็ก (Fe) ทองแดง (Cu) สังกะสี (Zn) แมงกานีส (Mn) โมลิบดีนัม (Mo) และโบรอน (B)

2) สารอินทรีย์ ได้แก่

- สารที่ให้พลังงาน เช่น น้ำตาลซูโครส (น้ำตาลทราย) กลูโคส และฟรุกโตส มักใช้ใน ปริมาณ 20-40 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร

- วิตามิน ได้แก่ อินโนซิทอล (inositol) วิตามินบี 1 (vitamin B1) วิตามินบี 2 (vitamin B2) ไนอะซิน (niacin) ไพริดอกซิน (pyridoxine) วิตามินซี (vitamin C) ซึ่งในสภาพธรรมชาติ พืชส่วนใหญ่สังเคราะห์ได้เองบางส่วน แต่ยังไม่มากพอที่จะช่วยให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ดีได้ จึงต้องเติมวิตามินลงไปด้วย

- กรดอะมิโน จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและสร้างอวัยวะต่าง ๆ ที่นิยมใช้กัน คือ ไกลซีน (glycine)

- สารควบคุมการเจริญเติบโต กลุ่มที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ สารกลุ่ม ออกซิน (auxin) มีหน้าที่กระตุ้นให้เกิดราก ได้แก่ Indole-3-acetic acid (IAA), Indole-3-butyric acid (IBA), 1-Naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เป็นต้น และไซโทไคนิน (cytokinin) มีหน้าที่กระตุ้นให้เกิดยอดจำนวนมาก ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้ เช่น N6-Benzylaminopurine (BAP) หรือ Benzyladenine (BA), Kinetin (KN), Thidiazuron (TDZ), Zeatin (ZN) เป็นต้น

- สารอินทรีย์อื่น ๆ จากธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน(มีไซโตไคนิน) น้ำมะเขือเทศ มันฝรั่ง ถั่วยบด สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) เป็นต้น

3) สารประกอบที่ทำให้อาหารแข็งตัว ได้แก่ วุ้น (Agar) เจลไรต์ (gelrite) ไฟต้าเจล (phytagel) ดิฟโคแบคโตอะก้า (Difo-bacto agar) เป็นต้น

4) สารประกอบอื่น ๆ ได้แก่ ผงถ่าน (activated charcoal) ช่วยดูดซับสารพิษสีน้ำตาลหรือดำ (phenolic compound) ซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอลที่ขับออกมาจากชิ้นส่วนพืชลงสู่อาหารเพาะเลี้ยงซึ่งถ้ามีมากจะเป็นพิษต่อพืช ทำให้พืชไม่เจริญเติบโต อะดีนีนซัลเฟต (adenine sulfate) ช่วยกระตุ้นการเกิดยอดในพืชบางชนิด

5) น้ำ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปกติทั่วไปมักนิยมใช้น้ำกรอง แต่สำหรับในงานวิจัยต้องใช้น้ำกลั่น

จากองค์ประกอบของสูตรอาหารข้างต้น ทำให้มีการคิดค้นสูตรอาหารขึ้นมามากมายเพื่อให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ เช่น อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) สามารถใช้ได้ ในพืชเกือบทุกชนิด อาหารสูตร VW (Vacin and Went, 1949) นิยมใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ อาหารสูตร WPM (Woody Plant Medium; Lloyd and McCown, 1980) นิยมใช้เพาะเลี้ยงพืชที่เป็นไม้เนื้อแข็ง อาหารสูตร Miller (1963) ใช้เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าว

รู้หรือไม่? ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงพืชมีองค์ประกอบหลายชนิด และใช้ในปริมาณสารค่อนข้างน้อย การชั่งสารทุกครั้งที่ต้องเตรียมจึงทำให้ใช้เวลานาน ไม่สะดวก และอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ จึงจำเป็นต้องเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้นสูง (**stock solution**) เพื่อให้สามารถใช้ได้หลายครั้งและสะดวกกว่าการชั่งสาร อย่างไรก็ตามต้องควรคำนึงว่าสารชนิดใดที่อยู่ในสต็อกเดียวกัน เมื่อรวมผสมเข้าด้วยกันต้องไม่เกิดการตกตะกอนหรือไม่ผลิตสารพิษต่อพืช

1.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS

อาหารสูตร MS นิยมใช้กับพืชโดยทั่วไป ประกอบไปด้วยสารเคมีชนิดต่าง ๆ โดยแบ่งเป็น 4 stocks ดังแสดงในตารางด้านล่าง ดังนี้

ตาราง 1 ชนิดและปริมาณสารละลายของอาหารสูตร MS (Murashige; & Skoog. 1962)

สาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก./ล.)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
ธาตุอาหารรอง	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
KI	0.83
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	17.50
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30
H_3BO_4	6.20
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
สารอินทรีย์(วิตามิน)	
Glycine	2.0
Thiamine-HCl	0.1
Pyridoxine-HCl	0.5
Nicotinic acid	0.5
Myo-inositol	100
สารละลายเหล็ก	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3

อนึ่งในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะต้องมีการปรับค่า pH ของอาหารให้อยู่ระหว่าง 5.7-5.8 ถ้าหากอาหารมีความเป็นเบส ($\text{pH} > 7$) จะใช้กรดไฮโดรคลอริก(HCl) ในการปรับค่า pH แต่ถ้าอาหารมีความเป็นกรด ($\text{pH} < 7$) จะใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

1.3 การฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยง

เนื่องจากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออุดมไปด้วยสารอาหารที่เหมาะสมแก่การเจริญของจุลินทรีย์ ประกอบกับในขณะที่เตรียมอาหาร จุลินทรีย์จากทั้งในอากาศ ภาชนะที่ใช้ รวมถึงจุลินทรีย์ตามผิวหนังเราที่สัมผัสกับอุปกรณ์ต่าง ๆ ล้วนมีผลต่อการทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารและทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียได้ ดังนั้นก่อนนำอาหารเพาะเลี้ยงไปใช้ จึงต้องทำการฆ่าเชื้อเสียก่อน โดยทั่วไปจะใช้หม้อึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเพาะเลี้ยงและภาชนะที่บรรจุ ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-30 นาที ไอน้ำร้อนจะแทรกซึมเข้าสู่เซลล์และสปอร์ของจุลินทรีย์ ทำให้โปรตีนภายในเซลล์จุลินทรีย์เสียสภาพ เมื่อครบกำหนดนำขวดอาหารออกจากหม้อึ่งก็ให้เย็นก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และควรเก็บไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ก่อนนำไปใช้ เพื่อตรวจสอบว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

นอกจากการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธีดังกล่าวแล้ว ปัจจุบันยังมีวิธีการฆ่าเชื้อด้วยวิธีอื่น ๆ อีกคือ การฆ่าเชื้อด้วยวิธีทางเคมี (chemical sterilization) โดยเติมลงไปในการอาหาร เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaClO) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) เป็นต้น ซึ่งวิธีการนี้มีข้อดีคือทำได้สะดวก ราคาไม่แพง ประหยัดเวลา แต่ก็มีข้อเสียคืออาจจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงได้ และการฆ่าเชื้อด้วยวิธีทางกายภาพ (physical sterilization) ได้แก่ การฆ่าเชื้อด้วยหม้อึ่งไอน้ำและการฆ่าเชื้อด้วยเตาอบไมโครเวฟ มีข้อดีคือ เป็นอุปกรณ์ที่หาได้ง่ายแต่ผลการฆ่าเชื้ออาจจะไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้และจำนวนครั้งของการฆ่าเชื้อ

กลไกการออกฤทธิ์ของโซเดียมไฮโปคลอไรต์



โซเดียมไฮโปคลอไรต์จะละลายน้ำแล้วแตกตัวให้กรดไฮโปคลอรัส และเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์



รูปที่ 3 หม้อึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) (ซ้าย) และคลอโรกซ์ (ขวา)

2. การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช

เป็นการทำให้ชิ้นส่วนที่จะนำมาเพาะเลี้ยงปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ แบ่งออกได้ 2 วิธี คือ วิธีทางกายภาพ (physical method) เช่น รังสี ความร้อน เป็นต้น และวิธีทางเคมี (chemical method) เป็นการเป็นนำชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงแช่ในสารเคมี เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) หรือชื่อทางการค้าเรียกว่า คลอโร็กซ์ (clorox) เมอร์คิวริกคลอไรด์ (HgCl₂) เป็นต้น ซึ่งความเข้มข้นของสารเคมีและระยะเวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง เช่น เนื้อเยื่อพืชที่อ่อนนุ่มและบาง ต้องทำด้วยความระมัดระวัง โดยแช่เนื้อเยื่อพืชลงในสารละลาย โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) ความเข้มข้น 0.5% หรือคลอโร็กซ์ 10% เป็นเวลา 10-15 นาที ส่วนพืชที่ผิวหนากแข็งจะใช้ความเข้มข้นและระยะเวลานานกว่าในขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อควรเติมน้ำยาจับใบ (surfactant) เช่น Tween20 ลงไปด้วย เพื่อช่วยลดแรงตึงผิวของเนื้อเยื่อ ทำให้สารละลายฟอกฆ่าเชื้อสามารถเข้าไปสัมผัสกับเนื้อเยื่อได้อย่างทั่วถึง

3. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

หลังจากทำการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชเรียบร้อยแล้ว ขั้นตอนต่อมาคือการนำเอาชิ้นส่วนของพืชที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนอาหารเลี้ยงที่ปลอดเชื้อ โดยทำในตู้ย่ายเนื้อเยื่อ ก่อนใช้งานตู้ย่ายเนื้อเยื่อจะทำความสะอาดตู้ย่ายเนื้อเยื่อโดยฉีดพ่นแอลกอฮอล์ 70% และเปิด UV ร่วมด้วย และเครื่องมือที่ใช้ในการย้ายชิ้นส่วนพืชลงขวด ได้แก่ ปากคีบและมิดผ้าตัดต้องทำการฆ่าเชื้อโดยการจุ่มแอลกอฮอล์ 95% และนำไปลงไฟ รอให้เย็นจึงนำไปใช้ได้

4. การนำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปเลี้ยง

เป็นการนำเอาขวดอาหารเลี้ยงที่มีชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชไปเลี้ยงในห้องที่มีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 22-28 °C แสง มักให้แสงแสงสีขาวจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งมีความเข้มของแสงประมาณ 1,000-4,000 ลักซ์ เวลา 8-16 ชั่วโมง ต่อวัน ความชื้น ประมาณ 60%

5. การย้ายเนื้อเยื่อออกจากขวดออกปลูก

เมื่อชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงมียอดและรากขึ้นเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ จึงนำออกจากขวดนำไปล้างเอาวุ้นออกให้หมดด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำประปา โดยช่วงแรกปลูกในถาดเพาะชำและเก็บไว้ในที่ร่ม อย่าให้ถูกแสงโดยตรงเพราะจะทำให้ต้นสูญเสียน้ำไปและทำให้ต้นเหี่ยว เมื่อต้นพืชตั้งตัวแข็งแรงดีแล้วทำการย้ายลงปลูกในดินต่อไป

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. การขยายพันธุ์พืช (micropropagation)

สามารถผลิตพันธุ์พืชที่มีลักษณะเหมือนพ่อแม่ได้ปริมาณมากและรวดเร็ว นิยมใช้ขยายพันธุ์พืชที่มีค่าทางเศรษฐกิจ พืชที่มีปัญหาด้านการเพาะปลูกเนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม และพืชสมุนไพรหายาก เช่น กล้วยไม้ ปาล์มน้ำมัน กล้วย กล้วยไม้ ไม้ดอกไม้ประดับต่าง ๆ

2. ผลิตพืชที่ปราศจากโรค (disease-free plant)

ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อที่เจริญที่อยู่บริเวณปลายยอดของลำต้น (apical meristem) เนื่องจากเนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีท่อน้ำท่ออาหารในการติดต่อกับส่วนอื่น ๆ ของต้นพืช จึงปราศจากเชื้อไวรัสมากที่สุด ทำให้ได้ต้นพันธุ์ใหม่ที่ปราศจากโรค

3. เก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมของพืช (germplasm)

ใช้เก็บรักษาพันธุ์พืชหายากและมีแนวโน้มว่าจะสูญพันธุ์ไปเนื่องจากสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลง โดยการเก็บรักษาไว้ในหลอดทดลองจะทำให้พืชมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าลงและสามารถเก็บไว้ได้เป็นระยะเวลานาน เมื่อใดที่ต้องการใช้พืชชนิดนั้น ๆ จึงค่อยทำการถ่ายเนื้อเยื่อลงสู่อาหารสังเคราะห์ เพื่อชักนำให้เกิดต้นก็จะได้พืชพันธุ์นั้นกลับคืนมา

4. ผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites)

สารทุติยภูมิหลายชนิดสามารถผลิตได้โดยการสังเคราะห์ แต่ยังคงผลิตได้ในปริมาณน้อย เช่น ควินิน (quinine) ที่ใช้เป็นยา วานิลลา (vanilla) เป็นสารให้กลิ่น และไพรีทริน (pyrethrins) สำหรับปราบแมลงศัตรูพืช เป็นต้น ดังนั้นการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยจึงจำเป็นต้องมีการปรับสภาพแวดล้อมและอาหารที่เหมาะสม เพื่อชักนำให้เกิดการสังเคราะห์สารที่ต้องการได้มากขึ้น

5. ปรับปรุงพันธุ์พืช (plant breeding)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนทาน (tolerance plant) โดยการคัดสายพันธุ์ทนทานจากการจัดเงื่อนไขของอาหารและสภาวะแวดล้อม เช่น การคัดสายพันธุ์พืชทนเค็ม สายพันธุ์ทนต่อดินเปรี้ยว ทนต่อความแห้งแล้ง หรือเพิ่มความต้านทาน (resistant plant) โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเงื่อนไขต่าง ๆ เช่น การสร้างพันธุ์ต้านทานต่อสารพิษของโรคต้านทานต่อแมลง ต้านทานต่อยากำจัดวัชพืช ฯลฯ

6. การศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยาและพันธุศาสตร์ (Biochemical and Physiology study)

ต้นพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลองสามารถติดตามผลการพัฒนา การเปลี่ยนแปลงได้ง่าย และใกล้ชิด เนื่องจากการควบคุมตัวแปรต่าง ๆ ทำได้ดีกว่าในสภาพปลูกปกติ เช่น การศึกษาการตอบสนองของเนื้อเยื่อพืชในอาหารที่มีเงื่อนไขต่าง ๆ เพื่อการคัดสายพันธุ์พืชทนเค็ม สายพันธุ์ทนต่อดินเปรี้ยว ทนต่อความแห้งแล้ง หรือเพิ่มความต้านทานต่อโรคและแมลง



การทดลองที่ 1

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. หลักการและเหตุผล

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นปัจจัยหนึ่งที่จะทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จ เนื่องจากชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงนั้นต้องการสารอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน อาหารเพาะเลี้ยงที่เป็นที่นิยมคือ อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เพราะสามารถใช้กับพืชได้เกือบทุกชนิด โดยองค์ประกอบของอาหารสูตร MS ประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก (macronutrients) ที่พืชต้องการในปริมาณมาก ธาตุอาหารรอง (micronutrients) ที่พืชต้องการในปริมาณน้อย รวมทั้งวิตามิน แหล่งคาร์บอน และอาจมีการเติมฮอร์โมนหรือสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารอินทรีย์อื่น ๆ เช่น น้ำมะพร้าว น้ำมะเขือเทศ กล้วยบดลงในอาหารด้วย ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งคืออาหารเพาะเลี้ยงที่นำมาใช้ต้องปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ เพราะถ้าหากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จะทำให้ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงนั้นไม่สามารถพัฒนาและเจริญเติบโตได้และตายในที่สุด วิธีการซึ่งใช้ในการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงคือใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-30 นาที แต่ในบทปฏิบัติการนี้จะวิธีการฆ่าเชื้ออย่างง่ายแทนการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยใช้สารเคมีคลอโรกซ์หรือน้ำยาซักผ้าขาวไฮเตอร์ซึ่งมีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 5.25% ในการฆ่าเชื้อ

2. วัตถุประสงค์ เพื่อให้นักเรียนสามารถ

- 2.1 บอกองค์ประกอบของอาหารสูตร MS ได้อย่างถูกต้อง
- 2.2 อธิบายขั้นตอนการเตรียมอาหารสูตร MS ได้ถูกต้อง

3. เวลาที่ใช้ 3 คาบ (คาบละ 50 นาที)

4. วัสดุอุปกรณ์

- 4.1 สารละลายเข้มข้น (stock solution) สูตร MS จำนวน 4 stocks
- 4.2 กระบอกตวง (cylinder) ปริมาตร 10, 100 และ 500 มิลลิลิตร
- 4.3 บีกเกอร์ (beaker) ปริมาตร 50, 100 มิลลิลิตร
- 4.4 เขยือกพลาสติก (plastic beakers with handle) 1,000 มิลลิลิตร
- 4.5 ช้อนตักสาร (spatula) และถ้วยสำหรับชั่งสาร (weighing boat)
- 4.6 แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)
- 4.7 หลอดหยด (dropper)
- 4.8 กระบวย (dipper)
- 4.9 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (balance)
- 4.10 กระดาษวัด pH (pH paper)
- 4.11 น้ำกลั่น (distilled water) หรือน้ำ RO (reverse osmosis water)
- 4.12 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture bottle) ขนาด 4 ออนซ์ พร้อมฝาปิด (tissue culture cap)
- 4.13 คลอรีน (Clorox) หรือน้ำยาซักผ้าขาวไฮเตอร์ (Hyter liquid bleach) 1 ขวด
- 4.14 ชุดปรับค่า pH ได้แก่ NaOH ความเข้มข้น 1 N และ HCl ความเข้มข้น 1 N
- 4.15 ไมโครเวฟ (microwave) หรือ เครื่องให้ความร้อน (hot plate)

5. วิธีการทดลอง

5.1 สารละลายเข้มข้น (stock solution) และปริมาณที่ตวงมาเตรียมอาหาร

การคำนวณปริมาตรของสารละลายเข้มข้นที่นำมาใช้

$$C_1 = \text{ความเข้มข้นของ stock} \quad C_2 = \text{ความเข้มข้นของอาหาร}$$

$$V_1 = \text{ปริมาตรของ stock} \quad V_2 = \text{ปริมาตรของอาหาร}$$

ตัวอย่าง สารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง เข้มข้น 100 เท่า (100x) ถ้าต้องการเตรียมอาหาร

สูตร MS ปริมาตร 1 ลิตร ต้องตวงสารละลายเข้มข้นมากี่มิลลิลิตร

$$\begin{aligned} C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ (100x) \times V_1 &= (1x) \times 1,000 \text{ ml} \\ V_1 &= [(1x) \times 1,000 \text{ ml}] / (100x) \\ &= 10 \text{ ml} \end{aligned}$$

ตารางที่ 2 ชนิดของสารละลายเข้มข้น (stock solution) และปริมาณที่ตวงมาเตรียมอาหาร

สาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก./ล.)	สารละลายเข้มข้น (ก./ล.)	ปริมาตรที่ใช้ (มล./ล.)
1. ธาตุอาหารหลัก		10x	
NH_4NO_3	1650	16.5	100
KNO_3	1900	19.0	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	4.4	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	3.7	
KH_2PO_4	170	1.7	
2. ธาตุอาหารรอง		100x	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.0025	10
KI	0.83	0.083	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	17.50	1.750	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30	2.230	
H_3BO_4	6.20	0.620	
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.025	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.0025	
3. สารละลายเหล็ก		100x	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85	2.785	10
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.25	3.725	
4. วิตามิน		100x	
Glycine	2.0	0.20	10
Thiamine-HCl	0.1	0.01	
Pyridoxine-HCl	0.5	0.05	
Nicotinic acid	0.5	0.05	
Myo-inositol	100	10.0	

5.2 ขั้นตอนการเตรียมอาหาร (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร/ 1 กลุ่มทดลอง)

1. ใส่น้ำกลั่นหรือน้ำ RO ปริมาตร 300 มล. ในเหยือกพลาสติกขนาด 1000 มล.
2. ตวงสารละลายเข้มข้นอาหารหลัก (stock 1) สารอาหารรอง (stock 2) สารละลายเกลือ (stock 3) และวิตามิน (stock 4) จากขวดสารละลายเข้มข้นมา 50, 5, 5 และ 5 มล. ตามลำดับ และค่อย ๆ เทลงไปในเหยือกที่เติมน้ำไว้และใช้แท่งแก้วคนเพื่อให้สารละลายเข้ากันเป็นเนื้อเดียว
3. ชั่งและเติมน้ำตาลทรายลงไป 15 กรัม คนให้น้ำตาลละลายหมด
4. เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรประมาณ 480-490 มล.
5. ปรับค่า pH ด้วยกระดาษวัด pH ให้ได้ 5.7-5.8
6. เติมน้ำกลั่นและปรับปริมาตรในกระบอกตวงให้ครบ 500 มล.
7. ชั่งและเติมวัน 5 กรัม และนำไปต้มให้วันละลาย (ถ้าทำอาหารเหลวไม่ต้องเติมวัน)
8. ใช้กระบวยตักอาหารบรรจุลงขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปริมาตร 20 มล./ขวด
9. ฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยการหยดคลอรีนหรือโซเดียมไฮโปคลอไรต์ไปขวดละ 1 หยด ในขณะที่อาหารยังอุ่น และทำการปิดฝาขวดอาหารอย่างรวดเร็ว
10. เก็บขวดอาหารไว้บนชั้นวางที่อุณหภูมิห้อง และตรวจสอบการปนเปื้อนประมาณ 2-7 วัน จึงนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงต่อไป

คำถามท้ายบทปฏิบัติการ

1. จงวาดภาพหรือแผนผังลำดับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS



2. สารละลายเข้มข้นซึ่งเป็นองค์ประกอบของอาหารสูตร MS มีอะไรบ้าง และมีความสำคัญอย่างไร

.....

.....

.....

.....

.....

3. เพราะเหตุใดการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงจึงจำเป็นต้องฆ่าเชื้อก่อนนำไปใช้

.....

.....

.....

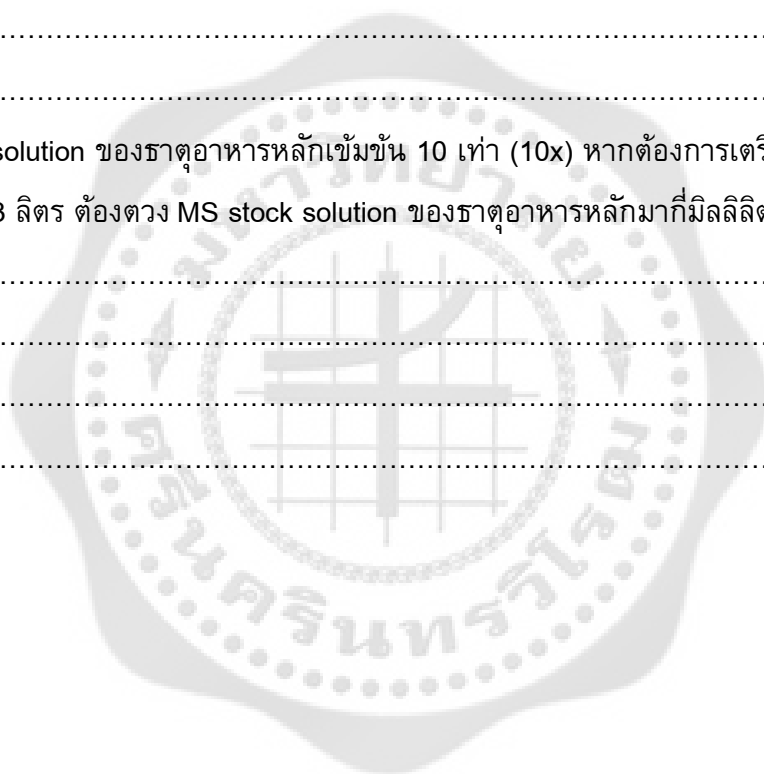
4. MS stock solution ของธาตุอาหารหลักเข้มข้น 10 เท่า (10x) หากต้องการเตรียมอาหารสูตร MS ปริมาตร 3 ลิตร ต้องตวง MS stock solution ของธาตุอาหารหลักมากี่มิลลิลิตร

.....

.....

.....

.....



การทดลองที่ 2

เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. หลักการและเหตุผล

จุดประสงค์ของการนำชิ้นส่วนใด ๆ ของพืชมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ก็เพื่อให้ได้แคลลัส ยอด ราก หรือให้ได้เป็นต้นพืชใหม่จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ยังสามารถทำได้ตลอดทั้งปีโดยไม่ขึ้นกับฤดูกาลหรือสภาพแวดล้อมเหมือนในสภาพธรรมชาติ เพราะสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมได้ อย่างไรก็ตามในกระบวนการของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังคงต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ โดยอุปกรณ์ที่ใช้และอาหารเพาะเลี้ยงต้องมีการฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้งาน รวมถึงสภาพแวดล้อมในการปฏิบัติงานก็ต้องทำให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อด้วยเช่นกัน เพื่อให้ต้นพืชที่ได้ปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ซึ่งจะเป็นอุปสรรคต่อการเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนต้นพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ในบทปฏิบัติการนี้เลือกใช้ต้นพิทูเนียสำหรับการทดลอง เนื่องจากพิทูเนียเป็นพืชที่นิยมนำมาใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพราะสามารถใช้ได้เกือบทุกส่วนไม่ว่าจะเป็น ยอด ลำต้น อีกทั้งยังเจริญเติบโตได้ง่ายซึ่งจะทำให้นักเรียนได้สังเกตการพัฒนาของชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงได้เป็น อย่างดี นอกจากนี้ในบทปฏิบัติการนี้ยังใช้ตู้ปลาซึ่งดัดแปลงเป็นตู้ถ่ายเนื้อเยื่ออย่างง่ายเพื่อลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากสภาพแวดล้อมอีกด้วย

2. วัตถุประสงค์ นักเรียนสามารถ

- 2.1 ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชด้วยเทคนิคปลอดเชื้อได้อย่างถูกต้อง
- 2.2 อธิบายขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้อย่างถูกต้อง

3. เวลาที่ใช้ 3 คาบ (คาบละ 50 นาที)

4. วัสดุอุปกรณ์

- 4.1 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (MS culture medium)
- 4.2 พืชตัวอย่าง : พิตูเนีย
- 4.3 ตู้ถ่ายเนื้อเยื่ออย่างง่าย (simple laminar flow cabinet)

- 4.4 ปากคีบ (forceps)
- 4.5 ด้ามมีด (scalpel handle) และใบมีด (scalpel blade)
- 4.6 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dishes)
- 4.7 บีกเกอร์ (beaker)
- 4.8 เอทิลแอลกอฮอล์ 95% (95% ethyl alcohol)
- 4.9 สารจับใบ (tween 20)
- 4.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)
- 4.11 ตะแกรงวางเครื่องมือ (rack)
- 4.12 กระบอกฉีดเอทิลแอลกอฮอล์ 70% (70% ethyl alcohol sprayer)
- 4.13 คลอโร็กซ์ (Clorox) หรือน้ำยาซักผ้าขาวไฮเตอร์ (Hyter liquid bleach) 1 ขวด
- 4.14 น้ำกลั่นหรือน้ำ RO ที่นิ่งมาเชื้อแล้ว (sterile distilled water or reverse osmosis water) สำหรับล้างชิ้นส่วนพืช

5. วิธีการทดลอง

5.1 การเตรียมอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. เตรียมสารละลายคลอโร็กซ์หรือไฮเตอร์ความเข้มข้น 15% จากนั้นนำปากคีบ ด้ามมีดผ่าตัดและจานเพาะเลี้ยง แช่ในสารละลายเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำอุปกรณ์ทั้งหมดไปผึ่งให้แห้งในที่ที่ไม่มีลมพัด
2. เตรียมตูปล้างซึ่งดัดแปลงเป็นตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ โดยทำการฉีดพ่นเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ให้ทั่วตู้ และใช้ผ้าสะอาดเช็ด

5.2 การเตรียมชิ้นส่วนพืชสำหรับนำไปเพาะเลี้ยง

1. นำชิ้นส่วนพืชที่ต้องการ เช่น ลำต้น ใบ เป็นต้น มาล้างด้วยน้ำยาล้างจาน ตามด้วยน้ำสะอาด
2. ตักแต่งชิ้นส่วนพืช ตัดส่วนที่ไม่ต้องการออก
3. นำชิ้นส่วนพืชมาฟอกในสารละลายไฮเตอร์ โดยฟอกครั้งแรกที่ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 5 นาที แล้วฟอกอีกครั้งที่ความเข้มข้น 5% เป็นเวลา 5 นาที โดยหยด tween 20 ลงไป 2-3 หยด ในการฟอกทุกครั้ง

4. นำภาชนะเข้าตู้ถ้ำเยื่อ ใช้ปากคีบจุ่มเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ลนไฟ รอให้เย็น แล้วคีบชิ้นส่วนพืชที่ฟอกในไฮเตอร์ล้างในน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง

****หมายเหตุ** ในกรณีที่พืชตัวอย่างเพาะเลี้ยงในขวดอยู่แล้ว สามารถตัดชิ้นส่วนพืชนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่ (subculture) ได้เลยโดยไม่ต้องทำการฟอกฆ่าเชื้อใหม่

5.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. จุ่มปากคีบและมีดผ่าตัดในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ลนไฟ รอให้เย็น
2. ตัดชิ้นส่วนพืชตามขนาดที่ต้องการบนจานเพาะเลี้ยง
3. เปิดฝาขวดอาหาร ลนปากขวด ใช้ปากคีบคีบชิ้นส่วนพืชที่เตรียมไว้ไปวางเลี้ยงในอาหารขวดละ 1 ชิ้น
4. ลนปากขวดอาหารอีกครั้ง ปิดฝาขวดให้แน่น อาจพันปิดทับด้วยพาราฟิล์มก่อนนำไปวางเลี้ยงในอุณหภูมิห้องและให้ขวดอาหารได้รับแสงอย่างทั่วถึง

แบบบันทึกผลการทดลอง

ขวด อาหาร	จำนวนใบ		จำนวนราก		หมายเหตุ
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
รวม					
เฉลี่ย					

คำถามท้ายบทปฏิบัติการ

1. จงวาดภาพหรือแผนผังลำดับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พร้อมอธิบายขั้นตอนโดยละเอียด

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. ทำไมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

.....

.....

.....

.....

.....

3. จงยกตัวอย่างขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อมา 1 ขั้นตอน และอธิบายว่ามีวิธีการทำให้ปลอดเชื้ออย่างไร

.....

.....

.....

4. ให้นักเรียนยกตัวอย่างพืชที่สนใจ 1 ชนิด มาทำการเพาะเลี้ยงพร้อมอธิบายเหตุผลของการเลือกพืชชนิดนั้นๆ

.....

.....

.....

แผนการจัดการเรียนรู้

บทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant Tissue Culture)

จุดประสงค์การเรียนรู้ หลังจากเรียนด้วยบทปฏิบัติการผู้เรียนสามารถ

1. อธิบายความหมาย ขั้นตอนและประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้
2. เขียนสรุปขั้นตอนการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้
3. ใช้เครื่องมือในการชั่ง ตวง วัดในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเครื่องมือในการปฏิบัติงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้อย่างถูกต้อง
4. แสดงความเห็นหรือมีส่วนร่วมในกิจกรรมได้

ขั้นตอนการจัดการเรียนรู้

1. ขั้นสร้างความสนใจ

ผู้สอนอธิบายภาพรวมของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หมายถึง เทคนิคการขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศ โดยการนำเอาชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ใบ ลำต้น ยอด ตาข้าง กลีบดอก อับเรณู หรือแม้กระทั่งโปรโตพลาสต์ (protoplast) มาเพาะเลี้ยงในขวดที่มีอาหารสังเคราะห์ซึ่งมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช และนำไปเลี้ยงภายใต้สภาวะควบคุม ได้แก่ อุณหภูมิ แสง ความชื้น ต่อมาเมื่อชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงซึ่งมีการพัฒนาเป็นยอดและรากและเจริญเติบโตเป็นต้นพืชใหม่ที่สมบูรณ์ ก็สามารถนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้ ซึ่งการที่ชิ้นส่วนพืชสามารถพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากได้นั้นเกิดจากคุณสมบัติที่เรียกว่า Totipotency หมายถึง ความสามารถของเซลล์พืชที่พร้อมจะพัฒนากลับไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ใหม่

ข้อดีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีด้วยกันหลายประการ คือ

1. ทำให้สามารถขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น
2. ต้นพืชที่ได้มีลักษณะเหมือนต้นพันธุ์ทุกประการ
3. ต้นพืชใหม่ที่ได้ปลอดโรค
4. ลดพื้นที่ในการเพาะปลูก
5. สามารถทำได้ตลอดปีเนื่องจากไม่ต้องพึ่งสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ

อย่างไรก็ตาม ในการปฏิบัติงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีข้อจำกัดคือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้มีราคาแพง

สำหรับขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประกอบด้วย 5 ขั้นตอน ได้แก่ (1) การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (2) การฟอกฆ่าเชื้อส่วนเนื้อเยื่อพืช (3) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (4) การนำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปเลี้ยง (5) และการย้ายเนื้อเยื่อออกจากขวดออกปลูก ซึ่งขั้นตอนทั้งหมดนี้จำเป็นต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อซึ่งเป็นหัวใจสำคัญของการปฏิบัติงานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพราะถ้าหากเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ไม่ว่าจะเกิดจากชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง อุปกรณ์ที่ใช้ในการปฏิบัติงาน สถานที่ในการปฏิบัติงาน หรือแม้กระทั่งเกิดจากตัวผู้ปฏิบัติงานเอง ย่อมทำให้ชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงนั้นไม่สามารถพัฒนาและเจริญเติบโตเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ และตายในที่สุด

ในการปฏิบัติงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถแบ่งเทคนิคปลอดเชื้อได้เป็น 5 ส่วน ดังนี้

1. ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง โดยทั่วไปนิยมฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ซึ่งมีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 5.25% เนื่องจากสามารถหาได้ง่ายและมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี โดยใช้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5-20% แล้วแต่ลักษณะของชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยง โดยหากเป็นชิ้นส่วนที่มีความอ่อนนุ่มควรใช้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ และถ้าหากชิ้นส่วนที่ใช้มีเปลือกแข็งก็สามารถใช้ที่ระดับความเข้มข้นสูง ๆ ได้ ทั้งนี้ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชทุกครั้งจะต้องมีการเติม tween 20 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวลงไป 2-3 หยด เพื่อให้สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อสัมผัสกับชิ้นส่วนพืชได้ดียิ่งขึ้น

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ ปากกิบ ด้ามมีดผ่าตัด จานเพาะเลี้ยง โดยปกติสามารถฆ่าเชื้อได้โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ซึ่งจะกำจัดเชื้อด้วยไอน้ำร้อนแรงดันสูง ซึ่งไอน้ำร้อนจะแทรกซึมเข้าสู่เซลล์และสปอร์ของจุลินทรีย์ ทำให้โปรตีนของเซลล์จุลินทรีย์เสียสภาพ โดยทั่วไปจะใช้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-30 นาที

3. อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ปกติจะใช้วิธีการฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับการฆ่าเชื้อในอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่ปัจจุบันได้มีการคิดค้นวิธีการในการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแทนการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำเพื่อลดต้นทุน โดยการใช้สารเคมี เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี

3. สถานที่ที่ใช้ในการปฏิบัติงาน ปกติจะใช้ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อในการปฏิบัติงาน ซึ่งจะมีการฆ่าเชื้อภายในตู้ด้วยรังสี UV เป็นเวลา 30 นาที ร่วมกับการฉีดพ่นเอทิลแอลกอฮอล์ 70% แต่

เนื่องจากตู้ถ่ายเนื้อเยื่อมีราคาแพง การดัดแปลงตู้ปลาเป็นตู้ถ่ายเนื้อเยื่อก็ให้ผลในการปฏิบัติงานได้ดีใกล้เคียงกับตู้ถ่ายเนื้อเยื่อแบบปกติเช่นกัน อีกทั้งยังสามารถเคลื่อนย้ายได้สะดวกอีกด้วย โดยก่อนปฏิบัติงานจะต้องทำการฆ่าเชื้อด้วยการฉีดพ่นเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ให้ทั่วบริเวณตู้ และใช้ผ้าเช็ดให้แห้ง

4. ตัวผู้ปฏิบัติงาน เพื่อเป็นการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากตัวผู้ปฏิบัติงาน ผู้ปฏิบัติควรเก็บผมให้เรียบร้อย ล้างมือให้สะอาดและทำการฉีดพ่นเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ทั้งก่อนและขณะปฏิบัติงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. ขั้นสำรวจและค้นหา

ผู้สอนอธิบายเกี่ยวกับบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยแบ่งให้ทำการทดลองสัปดาห์ละ 1 การทดลอง ดังนี้

สัปดาห์ที่ 1 การทดลองที่ 1 เรื่อง การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สัปดาห์ที่ 2 การทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

โดยหลังจากที่ผู้สอนอธิบายเกี่ยวกับเนื้อหา วิธีการทดลองและการบันทึกผลการทดลองให้แก่ผู้เรียน ผู้สอนให้ผู้เรียนแบ่งเป็นกลุ่มย่อย โดยให้มีสมาชิกในกลุ่มมีจำนวนเท่า ๆ กัน เพื่อลงมือทำปฏิบัติการ โดยผู้สอนทำหน้าที่ให้คำแนะนำและการช่วยเหลือตามสมควร และเตือนผู้เรียนให้ระมัดระวังเกี่ยวกับการใช้เครื่องแก้วและสารเคมี เพราะสารเคมีคือไฮเตอร์ที่มีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการกัดกร่อน อาจทำให้เสื้อผ้าและผิวหนังได้รับอันตรายได้

3. ขั้นลงข้อสรุป

เมื่อทำการทดลองเสร็จผู้สอนให้ผู้เรียนร่วมกันอภิปรายเพื่อนำไปสู่ข้อสรุปความรู้ที่ได้จากการเรียนรู้ด้วยบทปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยมีหัวข้อดังนี้

1. สารละลายเข้มข้นซึ่งเป็นองค์ประกอบของอาหารสูตร MS ประกอบด้วยอะไรบ้าง และแต่ละตัวมีความสำคัญอย่างไร
2. ขั้นตอนในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ปราศจากเชื้อทำได้อย่างไร
3. ผู้เรียนคิดว่าการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในขวดอาหาร มีสาเหตุจากอะไร และจะสามารถแก้ไขได้อย่างไร

แผนการจัดการเรียนรู้ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant Tissue Culture)

ระยะเวลาที่ใช้สอน 2 สัปดาห์ สัปดาห์ละ 3 คาบ ๆ ละ 50 นาที

สัปดาห์ที่	ขั้นตอน	เวลา (นาที)	กิจกรรม
1	ทดสอบก่อนเรียนด้วยแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และเก็บเป็นคะแนนก่อนเรียน	20	ใช้ข้อสอบปรนัย จำนวน 20 ข้อ
	ผู้สอนอธิบายภาพรวมของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ข้อดีและข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เทคนิคปลอดเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ผู้สอนเน้นให้ผู้เรียนมีส่วนร่วมโดยให้ผู้เรียนทำการทดลองด้วยตนเองและแลกเปลี่ยนความเห็นกับเพื่อนในกลุ่มและผู้สอนได้	25	- ผู้สอนอธิบายภาพรวมของการทำบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การทดลองที่ 1 เรื่อง การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช - ผู้สอนแบ่งผู้เรียนออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 13 คน
	ให้ผู้เรียนทำการทดลอง	105	ผู้เรียนทำการทดลองตามขั้นตอนที่ระบุในบทปฏิบัติการ โดยมีผู้สอนมีหน้าที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือ
2		25	- ผู้สอนอธิบายภาพรวมของการทำบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การทดลองที่ 2 เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเนื้อเยื่อ - ผู้สอนแบ่งผู้เรียนออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 13 คน
	ให้ผู้เรียนทำการทดลอง	105	ผู้เรียนทำการทดลองตามขั้นตอนที่ระบุในบทปฏิบัติการ โดยมีผู้สอนมีหน้าที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือ

สัปดาห์ที่	ขั้นตอน	เวลา (นาที)	กิจกรรม
	ทดสอบหลังเรียนด้วยแบบทดสอบ วัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และเก็บ เป็นคะแนนหลังเรียน	20	ใช้ข้อสอบปรนัย จำนวน 20 ข้อ



ตัวอย่างแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ข้อใดไม่ใช่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
 - ก. เป็นการขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศ
 - ข. เป็นการนำยอด ใบ ลำต้น มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์
 - ค. เป็นการเลี้ยงชิ้นส่วนของพืชในสภาพปลอดเชื้อ
 - ง. เป็นการขยายพันธุ์จากพืชที่มีอายุมาก
2. ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ปกติจะให้อาหารมีค่า pH 5.7-5.8 หากอาหารมีค่า pH เท่ากับ 8 ควรใช้สารเคมีใดในการปรับ pH
 - ก. โซเดียมไฮโปคลอไรต์
 - ข. โซเดียมไบคาร์บอเนต
 - ค. กรดไฮโดรคลอริก
 - ง. โซเดียมไฮดรอกไซด์
3. จงเรียงลำดับขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ถูกต้อง
 1. ย้ายลงปลูกในภาชนะเพาะชำ
 2. นำชิ้นส่วนพืชไปฟอกฆ่าเชื้อ
 3. นำชิ้นส่วนพืชไปล้างด้วยน้ำกลั่น
 4. นำชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์
 5. เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
 6. นำขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อไปเลี้ยงในสภาพควบคุมอุณหภูมิ แสง และความชื้นที่เหมาะสม
 - ก. 3 2 5 4 6 1
 - ข. 5 2 3 4 6 1
 - ค. 2 3 5 4 6 1
 - ง. 5 3 2 4 6 1
4. สารละลายความเข้มข้นสูง X มีความเข้มข้น 50 เท่า ต้องการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS 1.5 ลิตร ต้องตวงสารละลายความเข้มข้น X มากี่มิลลิลิตร
 - ก. 20 มิลลิลิตร
 - ข. 30 มิลลิลิตร
 - ค. 25 มิลลิลิตร
 - ง. 50 มิลลิลิตร
5. คลอริกซ์ (Clorox) คือชื่อผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่มีส่วนผสมของสารเคมีที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ สารเคมีข้างต้นคืออะไร
 - ก. แคลเซียมคลอไรด์
 - ข. โซเดียมไฮโปคลอไรต์
 - ค. โซเดียมคลอไรด์
 - ง. เมอร์คิวริกคลอไรด์

6. หากต้องการเตรียมสารฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อพืชความเข้มข้น 15% ควรเตรียมอย่างไร
- นำสารฟอกฆ่าเชื้อมา 15 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 85 มิลลิลิตร
 - นำสารฟอกฆ่าเชื้อมา 15 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
 - นำสารฟอกฆ่าเชื้อมา 50 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร
 - นำสารฟอกฆ่าเชื้อมา 50 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร
7. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนิยมเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงเพราะเหตุใด
- ลดความคลาดเคลื่อนในการชั่งสาร
 - ป้องกันสารเคมีเสื่อมสภาพเมื่อถูกแสง
 - ทำให้สามารถใช้ในปริมาณน้อย ๆ ได้
 - สารที่เตรียมไม่เกิดการตกตะกอน
8. tween 20 ซึ่งใช้ในขั้นตอนฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช มีความสำคัญอย่างไร
- ทำให้ชิ้นส่วนพืชที่ฟอกมีความใส
 - ทำให้สารฟอกฆ่าเชื้อสัมผัสกับชิ้นส่วนพืชได้ดีขึ้น
 - ทำให้ใช้เวลาในการฟอกฆ่าเชื้อลดลง
 - ทำให้ชิ้นส่วนพืชมีความอ่อนนุ่ม
9. ข้อใดเป็นข้อดีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- ต้นพืชที่ได้มีรากแก้ว
 - ต้นพืชที่ได้
 - ต้นพืชที่ได้มีลักษณะเหมือนต้นพันธุ์ทุกประการ
 - ต้นพืชที่ได้มีความหลากหลาย
10. ผงถ่านที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีหน้าที่อะไร
- ช่วยทำให้อาหารมีสีสันทึบ
 - ช่วยพยุงต้นพืช
 - ช่วยดูดซับสารพิษ
 - ช่วยป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์



ภาคผนวก ง

- ภาพตัวอย่างการสอนด้วยบทปฏิบัติ เรื่อง การเพาะเลี้ยง
เห็ดเยื่อฟิช กับผู้เรียนกลุ่มที่ศึกษา



ภาพประกอบ 9 ภาพตัวอย่างการสอนด้วยบทปฏิบัติ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกับผู้เรียนกลุ่ม
ที่ศึกษา

**แบบประเมินความพึงพอใจของผู้เรียนต่อการจัดการเรียนรู้
ด้วยบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
สำหรับผู้เรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย**

คำชี้แจง (กรุณาทำเครื่องหมาย ✓ ใน ☐ ที่ท่านต้องการเลือก)

ตอนที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของผู้ประเมิน เพศ ☐ ชาย ☐ หญิง

ตอนที่ 2 ความพึงพอใจต่อการจัดการเรียนการสอนด้วยบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับผู้เรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย

โดยที่ 5 = มากที่สุด 4 = มาก 3 = ปานกลาง 2 = น้อย 1 = น้อยที่สุด

รายการประเมิน	ระดับความพึงพอใจ				
	5	4	3	2	1
ด้านการจัดการเรียนรู้					
1. ผู้เรียนมีความรู้ความเข้าใจใน เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช					
2. การนำเข้าสู่บทเรียนมีความน่าสนใจ กระตุ้นให้ผู้เรียนอยากเรียน					
3. ผู้เรียนได้ลงมือปฏิบัติการทดลองด้วยตนเอง					
4. ผู้สอนให้คำปรึกษาและให้การช่วยเหลือผู้เรียนอย่างเพียงพอขณะทำการทดลอง					
5. ผู้เรียนได้แสดงความคิดเห็นและวิจารณ์ผลการทดลองกับเพื่อนภายในกลุ่ม					
6. ผู้เรียนได้อภิปราย ชักถาม และแลกเปลี่ยนความคิดเห็นอย่างมีหลักการระหว่างเพื่อนและผู้สอน					
7. ระยะเวลาที่ใช้ในการจัดการเรียนรู้เหมาะสม					
8. การจัดกิจกรรมโดยการลงมือปฏิบัติทำให้ผู้เรียนสามารถเชื่อมโยงความรู้หรือประสบการณ์เดิมของผู้เรียนได้					
9. ผู้เรียนสรุปความรู้และสามารถนำความรู้ที่ได้จากการทดลองไปใช้ในการเรียนวิชาชีววิทยาในหัวข้ออื่น ๆ ได้					
ด้านบทปฏิบัติการ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช					
1. การทดลองสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของบทปฏิบัติการ					

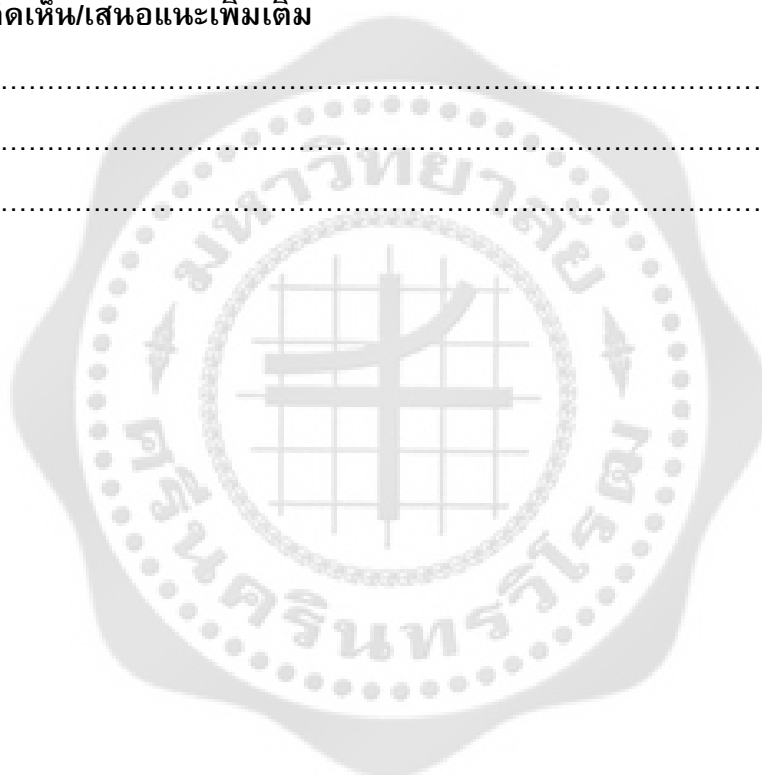
รายการประเมิน	ระดับความพึงพอใจ				
	5	4	3	2	1
2. ผู้เรียนสามารถปฏิบัติตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในบทปฏิบัติการได้อย่างถูกต้อง					
3. บทปฏิบัติการสามารถพัฒนาทักษะกระบวนการคิดของผู้เรียนได้					
4. บทปฏิบัติการสามารถพัฒนาทักษะกระบวนการทดลองของผู้เรียนได้					
5. บทปฏิบัติการช่วยให้ผู้เรียนเข้าใจ เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้					

ตอนที่ 3 ข้อคิดเห็น/เสนอแนะเพิ่มเติม

.....

.....

.....





ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ	นางสาวปวีณ์นทร์ รุ่งแก้ว
วันเดือนปีเกิด	26 ธันวาคม 2532
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	44/11 หมู่ที่ 2 ตำบลนอกเมือง อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ 32000
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ.2550	มัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนสิรินธร จังหวัดสุรินทร์
พ.ศ.2554	ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ จาก สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2559	ปริญญาโท การศึกษามหาบัณฑิต (กศ.ม.) สาขา ชีววิทยา จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ