

ผลของการเสริมสารสกัดหยาบดอกดาวเรืองในอาหารต่อความเข้มสีบริเวณลำตัวและหางของปลากัดไทย (*Betta splendens*)

Effects of Marigold Crude Extract Supplementation in Diets on Body and Caudal Fin Coloration Intensity in Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*)

พรทิพย์ ธารเปียง¹ น้ำฟ้า ยอดปา¹ สิทธิชน รัตนจันทร์^{1*} สุภาภรณ์ อุดมทรัพย์¹

สิทธิวิสันต์ ดลวงศ์จันทอง¹ และคณนา อาจสูงเนิน¹

Porntip Thapiang¹, Namfa Yodpa¹, Sitthichon Rattanachan^{1*}, Supaporn Udomsup¹,

Siddhiwasan Dolwongchantong¹ and Kanana Ardsungnearn¹

¹ โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย เชียงราย 57100

¹ Animal Health Science Program, Faculty of Science and Technology, Chiang Rai Rajabhat University, Chiang Rai, 57100

*Corresponding author E-mail: sitthichon.rat@crju.ac.th

บทคัดย่อ

ปลากัดไทยเป็นปลาสวยงามเศรษฐกิจที่ได้รับความนิยมจากผู้เลี้ยงด้วยลวดลายและสีที่หลากหลายนอกจากนี้ความเข้มของสีสัมพันธ์กับการได้รับรงควัตถุจากอาหาร โดยแหล่งวัตถุดิบจากธรรมชาติที่นิยมใช้เสริมอาหารเร่งสี คือ ดอกดาวเรืองที่มีสารลูทีนในกลุ่มแคโรทีนอยด์ในระดับสูง อย่างไรก็ตาม ข้อมูลเกี่ยวกับระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดต่อการเพิ่มสีในปลากัดยังมีจำกัด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมสารสกัดดอกดาวเรืองที่เตรียมด้วยเอทานอล 95% ในอาหารที่ระดับ 0%, 3%, 5% และ 7% ต่อการเพิ่มความเข้มสีของบริเวณลำตัวและหางของปลากัดไทยเป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยประเมินสีด้วยระบบ RGB จากภาพถ่าย ผลการทดลองพบว่า การเสริมสารสกัดดอกดาวเรืองช่วยเพิ่มความเข้มสีของลำตัวและครีบหางได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะระดับ 5% (มีลูทีน 3.66 มก./มล.) ให้ผลดีที่สุดในทุกค่าสี (R, G, B) ทั้งบริเวณลำตัว (ค่า R เพิ่มขึ้น 55.05) และครีบหาง (ค่า R เพิ่มขึ้น 48.29) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.001$) ผลการศึกษานี้ยืนยันศักยภาพของสารสกัดดอกดาวเรืองในการเสริมความเข้มสีของปลาสวยงาม โดยระดับ 5% เป็นอัตราที่เหมาะสมสำหรับปลากัดไทย

คำสำคัญ : ปลากัด, ดอกดาวเรือง, แคโรทีนอยด์, การเพิ่มสี, อาหารปลา

Abstract

Siamese fighting fish is an economically important ornamental fish popular among aquarists for its variety of patterns and colors. The shade and intensity of its color are correlated with the pigment intake from the diet. A commonly used natural source in fish feed supplementation is marigold flower, which contains high levels of lutein in the carotenoid group. However, information on the optimal concentration of marigold extract for maximizing color enhancement in this species remains limited. This study, therefore, aimed to investigate the effect of supplementing marigold

extract, prepared with 95% ethanol, in the diet at levels of 0%, 3%, 5%, and 7% on improving the color intensity of the body and caudal fin of the fish over a period of 5 weeks. Color assessment was performed using the RGB system from photographs. The results showed that marigold extract supplementation significantly enhanced the color intensity of the body and caudal fin, with the 5% level (3.66 mg/ml estimated lutein content) yielding the best results for all color values (R, G, B) on both the body (average R-value increase of 55.05) and caudal fin (average R-value increase of 48.29) when compared to the control group ($p < 0.001$). This study confirms the potential of marigold extract to enhance the coloration of this ornamental fish, with the 5% level being the appropriate inclusion rate.

Keywords : Siamese fighting fish, Marigold flower, Carotenoids, Color enhancement, Fish feed

บทนำ

ปลากัดไทย (*Betta splendens*) ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย ได้รับความนิยมสูงในตลาดโลกและมีมูลค่าการส่งออกกว่า 22.82 ล้านบาทต่อปี (Sermwatanakul, 2019) การเพิ่มมูลค่าทางการค้าของปลากัดเน้นที่การพัฒนาความงามด้านสีส่น ผู้เลี้ยงจึงนิยมใช้อาหารสำเร็จรูปที่มีการเสริมสารรงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์ซึ่งมีทั้งรูปแบบสังเคราะห์ เช่น แอสตาแซนธิน ที่ผลิตจากปิโตรเลียมและใช้แพร่หลายในอุตสาหกรรมปลาแซลมอน (Capelli et al., 2013; Shah et al., 2016) แม้สารสังเคราะห์จะเสถียรและราคาถูก แต่ข้อกังวลด้านการสะสมในเนื้อเยื่อปลา สิ่งแวดล้อม และความปลอดภัยของผู้บริโภค ได้กระตุ้นความสนใจในการใช้รงควัตถุจากแหล่งธรรมชาติทดแทน (Despy et al., 2014; Bianca et al., 2020)

ดอกดาวเรือง (*Tagetes erecta*) ถูกพิจารณาเป็นแหล่งแคโรทีนอยด์ธรรมชาติที่มีศักยภาพสูง โดยเฉพาะลูทีน (lutein) ซึ่งเป็นแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ที่ช่วยเพิ่มความเข้มสีเหลืองถึงแดงในผิวหนังและครีบของสัตว์น้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ปลาหางนกยูง (Sandkam et al., 2016) และปลาทอง (Chatzifotis et al., 2005) ดอกดาวเรืองมีปริมาณลูทีนสูงถึง 12–15 กรัมต่อกิโลกรัม (ก. /กก.) กลีบแห้ง (Lin et al., 2015) และมีต้นทุนการเพาะปลูกต่ำ อีกทั้งการสกัดด้วยเอทานอลแบบง่ายยังคงสารประกอบสำคัญไว้ได้

แม้จะมีการศึกษาผลของลูทีนจากดอกดาวเรืองในปลานิลหรือปลาตะเพียน แต่การใช้สารสกัดจากผงดอกดาวเรืองในอาหารปลากัด ซึ่งเป็นปลาสวยงามเศรษฐกิจที่เน้นลักษณะสีส่นโดดเด่น ยังมีรายงานน้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมสารสกัดจากผงดอกดาวเรืองที่เตรียมโดยการแช่ในเอทานอล ในอัตราส่วน 3%, 5%, และ 7% ลงในอาหารปลากัด เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงของสีบริเวณลำตัวและหาง โดยใช้ภาพถ่ายและวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของสีด้วยระบบ RGB ทุก 10 วัน ตลอดระยะเวลา 5 สัปดาห์

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองและการดำเนินการวิจัยปฏิบัติตามแนวทางจริยธรรมการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ผู้วิจัยหลักถือใบอนุญาตใช้สัตว์ทดลองจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติเลขที่ U1-00802-2558 โดยมีสัตวแพทย์เป็นผู้ดูแลสุขภาพสัตว์ระหว่างการเลี้ยง

การวิจัยนี้ใช้ปลากัดเพศผู้สายพันธุ์หูช้าง (*Betta splendens*) อายุ 2 เดือน จำนวน 32 ตัว ซึ่งคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม G*Power เวอร์ชัน 3.1 โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์เบื้องต้นคือ effect size (f) = 0.40, α = 0.05, power ($1-\beta$) = 0.80 และจำนวนกลุ่มทดลอง 4 กลุ่ม เพื่อให้ได้ขนาดตัวอย่างขั้นต่ำ 8 ตัวต่อกลุ่มได้นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อกักโรคและปรับสภาพของสัตว์ก่อนทดลองเป็นเวลา 7 วัน โดยปลาแต่ละตัวจะถูกแยกเลี้ยงในภาชนะพลาสติกทรงกระบอก ความสูง 15.5 เซนติเมตร (ซม.) เส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 ซม. และมีขนาดความจุ 32 ออนซ์ เติมน้ำที่ผ่านการพักอย่างน้อย 48 ชั่วโมง ในปริมาณ 500 มิลลิลิตร (มล.) ต่อภาชนะเลี้ยงให้อาหารธรรมชาติที่ไม่ใส่สารเร่งสี คือ ลูกน้ำอัดเม็ดยี่ห้อ Tokyu วันละ 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งให้อาหารในปริมาณประมาณร้อยละ 3 ของน้ำหนักตัว ซึ่งในระหว่างการเลี้ยงได้มีการควบคุมอุณหภูมิของห้องเลี้ยงสัตว์ที่ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) ด้วยระบบปรับอากาศ และควบคุมแสงสว่างโดยกำหนดให้วันละ 8 ชั่วโมง และมีการตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen, DO) ค่าความเป็นกรด-ด่าง คลอรีน ไนไตรท์ และไนเตรท

2. การเตรียมสารสกัดดอกดาวเรืองและการวิเคราะห์ปริมาณค่าสารลูทีน

กลีบดอกดาวเรืองอบแห้งน้ำหนัก 100 ก. จากการสั่งซื้อ ได้นำมาใช้เพื่อการศึกษาครั้งนี้ โดยนำกลีบดอกดาวเรืองมาแช่ในเอทานอล 95% ปริมาตร 10 มล. โดยมีสัดส่วนที่แตกต่างกัน คือ 3%, 5%, และ 7% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) ตามลำดับ เป็นเวลา 1 คืน หลังจากครบกำหนด สารละลายที่ได้จะถูกนำไปกรองเพื่อแยกกากออกและเก็บส่วนสารสกัดหยาบไว้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณค่าสารลูทีน (lutein) โดยเทียบกับสารสกัดดอกดาวเรืองในรูปแบบแคปซูลยี่ห้อ Luteina (165 มิลลิกรัม (มก.) มีลูทีน 5.12 %) ที่เตรียมอยู่ในรูปสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 1-5% ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer (BiochormTM Liba S70, United Kingdom) ที่ความยาวคลื่น 445 นาโนเมตร (nm) (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2004) เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของลูทีนกับค่าการดูดกลืนแสง และใช้สมการเชิงเส้นที่ได้จากกราฟมาตรฐานในการประมาณค่าความเข้มข้นของลูทีนในตัวอย่าง โดยแสดงผลในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มก./มล.)

3. การเตรียมอาหารปลากัดเสริมสารสกัดดอกดาวเรือง

สารสกัดจากผงดอกดาวเรืองที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน 3%, 5%, และ 7% โดยแช่ในเอทานอล 95% และกรองด้วยกระดาษกรอง นำมาผสมกับอาหารปลากัดชนิดลูกน้ำอัดเม็ดด้วยวิธีการสเปรย์สารสกัดลงบนผิวเม็ดอาหารอย่างสม่ำเสมอโดยใช้ขวดสเปรย์แบบหัวพ่นละอองละเอียด (รูหัวสเปรย์ขนาดประมาณ 0.3 มิลลิเมตร, มม.) พ่นสารสกัดในอัตรา 1 มล. ต่ออาหาร 10 ก. พร้อมเขย่าผสมเบา ๆ ระหว่างการพ่นเพื่อให้กระจายทั่วถึง สเปรย์ซ้ำสองรอบโดยเว้นระยะห่างรอบละประมาณ 5 นาที เพื่อป้องกันความชื้นสะสม แล้วนำไปตากในอุณหภูมิห้อง (ประมาณ $27-30^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้แอลกอฮอล์ระเหยจนหมด จากนั้นบรรจุในถุงซิปล็อกทึบแสงและเก็บที่ 4°C เพื่อคงคุณภาพของสารแคโรทีนอยด์ โดยเตรียมอาหารใหม่ทุกสัปดาห์ ทั้งนี้ระดับการเสริมสารสกัดที่กำหนดไว้ คือ 0%, 3%, 5%, และ 7% อ้างอิงจากรายงานที่พบว่าการใช้ผงกลีบดอกดาวเรืองช่วยเพิ่มความเข้มข้นของปลาสดหางดาบเขี้ยว (*Xiphophorus helleri*) ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่กระทบต่อการกินอาหาร (Pailan et al., 2015)

4. การทดลอง

การทดลองในครั้งนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยนำปลากัดที่ผ่านการพักเพื่อปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมแล้วแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปลากัดสำเร็จรูป (ลูกน้ำอัดเม็ด) กลุ่มที่ 2 ได้รับอาหารผสมสารสกัดดอกดาวเรือง 3% กลุ่มที่ 3

ได้รับอาหารผสมสารสกัดดอกดาวเรือง 5% และกลุ่มที่ 4 ได้รับอาหารผสมสารสกัดดอกดาวเรือง 7% โดยปลาแต่ละตัวถูกเลี้ยงแยกในภาชนะบรรจุน้ำพัก 500 มล. และให้อาหาร 0.01 ก. ต่อปลาหนึ่งตัวต่อวัน แบ่งเป็นมื้อละ 0.005 ก. ทั้งนี้ให้อาหารในช่วงเวลาเดียวกันทุกวันเพื่อความสม่ำเสมอเป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ สภาพแวดล้อม น้ำ อาหาร และปริมาณแสงควบคุมให้อยู่ในระดับสม่ำเสมอในทุกกลุ่ม

5. การเก็บผลการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

ปลากัดแต่ละตัวจะถูกบันทึกภาพเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงสีบริเวณลำตัวและหางทุก 10 วัน เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ ด้วยกล้องดิจิทัล Canon PowerShot G9X ในกล้องถ่ายภาพสตูดิโอขนาด 20x20x20 ซม. ที่มีหลอดไฟ LED 2 ดวง โดยถ่ายภาพจากด้านบนในแนวดิ่งที่ระยะ 20 ซม. และจำกัดการเคลื่อนไหวของปลาในภาชนะน้ำตั้งไฟถ่ายภาพวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop (เวอร์ชัน 2023) เพื่ออ่านค่าความเข้มสี RGB ซึ่งเป็นระบบแบบจำลองค่าสีเชิงดิจิทัลที่ประกอบด้วยสีแดง เขียว และน้ำเงิน มีช่วงค่าตั้งแต่ 0–255 เพื่อใช้ประเมินความเข้มของสีอย่างเป็นปริมาณ (Afshari-Jouybari & Farahnaky, 2011; Fiedoruk-Pogrebniak, 2024) จากตำแหน่งที่กำหนดบนลำตัว (ส่วนต้น กลาง ท้าย) และหาง (ส่วนต้น กลาง ท้าย) โดยกำหนดพื้นที่วัดให้มีขนาดเท่ากันเพื่อลดความคลาดเคลื่อน (Wallat et al., 2002) การเปลี่ยนแปลงของความเข้มสี (ΔC) ของลำตัวและหางคำนวณจากผลต่างระหว่างค่าสีในวันสิ้นสุดและวันเริ่มต้น ตามสมการ $\Delta C = C_{40} - C_0$ เมื่อ C_{40} และ C_0 คือ ค่าความเข้มสี (R, G, หรือ B) ในวันที่ 40 และวันที่ 0 ตามลำดับ ค่าความเข้มสีเฉลี่ยและการเปลี่ยนแปลงความเข้มสีเฉลี่ยถูกวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics version 23 เพื่อตรวจสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างกลุ่มทดลอง และทำการเปรียบเทียบรายคู่ด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

ผลการวิจัย

1. ปริมาณลูทีนที่พบในสารสกัดดอกดาวเรือง

การวิเคราะห์ปริมาณลูทีนในสารสกัดหยาบจากดอกดาวเรืองที่เตรียมด้วยวิธีแช่ในเอทานอล 95% พบว่าสารสกัดจากตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของผงดอกดาวเรืองแตกต่างกันให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 445 nm ที่ต่างกัน โดยเปรียบเทียบกับสารสกัดดอกดาวเรืองมาตรฐานชื่อทางการค้า คือ Luteina ที่ได้รับอนุญาตส่วนของลูทีนไว้ คือ 5.12% หรือคิดเป็น 8.6 มก./แคปซูล ซึ่งใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 1–5% (w/v) ผลการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของลูทีนกับค่าการดูดกลืนแสง โดยได้สมการกราฟมาตรฐานคือ $y = 0.1734x + 0.0306$, $R^2 = 0.9967$ โดยที่ x คือ ความเข้มข้นของลูทีน ($\mu\text{g/mL}$) และ y คือ ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 445 nm เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดดอกดาวเรืองมาแทนค่าในสมการมาตรฐาน พบว่าตัวอย่างที่ใช้ผงดอกดาวเรือง 3% 5% และ 7% ให้ค่าปริมาณลูทีนเท่ากับ 2.40 3.66 และ 3.59 มก./มล. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 445 nm และปริมาณลูทีนที่คำนวณได้จากสารสกัดหยาบของดอกดาวเรืองที่เตรียมด้วยเอทานอล 95% ในความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้นมาตรฐาน ลูทีน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 445 nm	ปริมาณลูทีน (มก./มล.)
1%	0.204	0.0172
2%	0.346	0.0344
3%	0.494	0.0516
4%	0.664	0.0688
5%	0.860	0.0860
ดอกดาวเรืองที่สกัดด้วย เอทานอล 95%		
ตัวอย่าง 3%	1.715	2.40
ตัวอย่าง 5%	2.612	3.66
ตัวอย่าง 7%	2.562	3.59

2. การเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มสีในระบบ RGB บริเวณลำตัวและหางของปลากัด

การเปลี่ยนแปลงของความเข้มสีลำตัวและหางของปลากัดที่ได้รับอาหารเสริมสารสกัดดอกดาวเรืองในระดับ 3% 5% และ 7% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ถูกประเมินจากค่าเฉลี่ยของสี R G และ B ตลอดระยะเวลา 40 วัน โดยพบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสารสกัดดอกดาวเรือง 5% และ 7% มีแนวโน้มเพิ่มค่าความเข้มสีแดง (R) อย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะในวันที่ 40 ซึ่งพบว่าค่าเฉลี่ยของกลุ่ม 5% (92.57 ± 20.08) และ 7% (87.05 ± 23.02) สูงกว่ากลุ่มควบคุม (63.29 ± 26.33) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.020$) ขณะที่กลุ่ม 3% แม้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนบริเวณหางพบว่าค่าความเข้มสี R ของปลาทุกกลุ่มเพิ่มขึ้นในลักษณะใกล้เคียงกัน โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่ม ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตาม กลุ่มที่ได้รับ 7% แสดงค่าความเข้มสี R สูงที่สุดในวันที่ 40 (115.76 ± 18.55) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยสีแดง (R) $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของบริเวณลำตัวของปลากัดที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จสารสกัดดอกดาวเรืองใน % ต่าง ๆ

บริเวณ	กลุ่ม	ระยะเวลาทดลอง (วัน)				
		วันที่ 0	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30	วันที่ 40
ลำตัว	ควบคุม	51.10 $\pm$ 27.75	55.19 $\pm$ 27.47	58.48 $\pm$ 26.99	60.81 $\pm$ 26.75	63.29 $\pm$ 26.33 ^b
	3% ดาวเรือง	37.81 $\pm$ 16.70	47.05 $\pm$ 15.95	52.67 $\pm$ 14.99	55.71 $\pm$ 14.71	61.05 $\pm$ 14.63 ^b
	5% ดาวเรือง	37.70 $\pm$ 14.33	53.57 $\pm$ 20.00	63.48 $\pm$ 22.16	77.67 $\pm$ 20.37	92.57 $\pm$ 20.08 ^a
	7% ดาวเรือง	46.90 $\pm$ 21.60	54.33 $\pm$ 21.62	61.48 $\pm$ 23.27	71.90 $\pm$ 22.29	87.05 $\pm$ 23.02 ^a
	p-value	0.586	0.891	0.816	0.232	0.020

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยสีแดง (R) $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของบริเวณลำตัวของปลากัดที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จสารสกัดดอกดาวเรืองใน % ต่าง ๆ (ต่อ)

บริเวณ	กลุ่ม	ระยะเวลาทดลอง (วัน)				
		วันที่ 0	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30	วันที่ 40
หาง	ควบคุม	74.14 $\pm$ 27.29	77.71 $\pm$ 22.83	80.81 $\pm$ 24.27	83.38 $\pm$ 23.72	86.14 $\pm$ 23.73
	3% ดาวเรือง	86.71 $\pm$ 29.22	96.76 $\pm$ 28.01	97.90 $\pm$ 24.66	107.14 $\pm$ 26.30	108.00 $\pm$ 20.98
	5% ดาวเรือง	53.71 $\pm$ 18.16	71.14 $\pm$ 22.63	81.29 $\pm$ 24.94	90.38 $\pm$ 22.65	102.00 $\pm$ 22.31
	7% ดาวเรือง	75.48 $\pm$ 17.00	83.86 $\pm$ 16.87	92.05 $\pm$ 18.70	97.81 $\pm$ 19.71	115.76 $\pm$ 18.55
	p-value	0.094	0.219	0.451	0.282	0.093

หมายเหตุ: ตัวอักษรต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการทดสอบ LSD

ส่วนของความเข้มสีเขียว (G) ของปลากัดที่บริเวณลำตัว พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.041$) ในวันที่ 40 ของการทดลอง โดยกลุ่มที่ได้รับสารสกัดดอกดาวเรือง 5% มีค่าความเข้มสีสูงที่สุด (104.00 $\pm$ 21.38) รองลงมาคือกลุ่ม 7% (95.24 $\pm$ 24.79) ขณะที่กลุ่มควบคุมและ 3% มีค่าใกล้เคียงกัน (72.29 $\pm$ 31.93 และ 72.29 $\pm$ 14.10 ตามลำดับ) ส่วนบริเวณหาง แม้ค่าความเข้มสีเฉลี่ยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกกลุ่ม โดยเฉพาะกลุ่ม 3% และ 7% แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยสีเขียว (G) $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานบริเวณลำตัวของปลากัดที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จสารสกัดดอกดาวเรืองใน % ต่าง ๆ

บริเวณ	กลุ่ม	ระยะเวลาทดลอง (วัน)				
		วันที่ 0	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30	วันที่ 40
ลำตัว	ควบคุม	63.52 $\pm$ 27.59	60.05 $\pm$ 32.92	60.90 $\pm$ 31.88	66.33 $\pm$ 29.76	72.29 $\pm$ 31.93 ^b
	3% ดาวเรือง	51.19 $\pm$ 16.05	45.89 $\pm$ 13.92	60.90 $\pm$ 14.20	66.33 $\pm$ 14.96	72.29 $\pm$ 14.10 ^b
	5% ดาวเรือง	53.05 $\pm$ 27.37	67.19 $\pm$ 28.04	78.57 $\pm$ 25.29	91.81 $\pm$ 23.80	104.00 $\pm$ 21.38 ^a
	7% ดาวเรือง	53.05 $\pm$ 22.46	62.67 $\pm$ 24.60	70.67 $\pm$ 27.30	83.86 $\pm$ 25.60	95.24 $\pm$ 24.79 ^{ab}
	p-value	0.638	0.916	0.532	0.171	0.041
หาง	ควบคุม	68.81 $\pm$ 41.24	65.05 $\pm$ 41.03	71.33 $\pm$ 40.83	74.67 $\pm$ 41.58	72.33 $\pm$ 40.59
	3% ดาวเรือง	73.29 $\pm$ 50.09	79.81 $\pm$ 49.83	82.24 $\pm$ 48.41	96.38 $\pm$ 50.27	98.90 $\pm$ 47.04
	5% ดาวเรือง	42.95 $\pm$ 32.53	62.00 $\pm$ 37.22	71.57 $\pm$ 36.07	85.29 $\pm$ 35.84	95.14 $\pm$ 33.88
	7% ดาวเรือง	63.14 $\pm$ 32.27	70.86 $\pm$ 29.56	78.86 $\pm$ 28.95	83.00 $\pm$ 30.96	102.81 $\pm$ 31.88
	p-value	0.164	0.615	0.789	0.457	0.102

หมายเหตุ: ตัวอักษรต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการทดสอบ LSD

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยสีน้ำเงิน (B) $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานบริเวณลำตัวของปลากัดที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จสารสกัดดอกดาวเรืองใน % ต่าง ๆ

บริเวณ	กลุ่ม	ระยะเวลาทดลอง (วัน)				
		วันที่ 0	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30	วันที่ 40
ลำตัว	ควบคุม	80.43 $\pm$ 27.51	87.00 $\pm$ 35.86	91.67 $\pm$ 33.85	91.29 $\pm$ 35.42	89.19 $\pm$ 31.70
	3% ดาวเรือง	89.19 $\pm$ 31.64	102.57 $\pm$ 33.64	103.52 $\pm$ 33.19	103.81 $\pm$ 33.79	107.33 $\pm$ 31.74
	5% ดาวเรือง	62.71 $\pm$ 25.02	72.10 $\pm$ 23.85	84.14 $\pm$ 18.51	97.67 $\pm$ 18.86	109.24 $\pm$ 18.03
	7% ดาวเรือง	68.14 $\pm$ 27.33	74.95 $\pm$ 27.15	83.57 $\pm$ 28.10	97.81 $\pm$ 25.67	108.38 $\pm$ 24.86
	p-value	0.172	0.142	0.469	0.845	0.383
หาง	ควบคุม	80.76 $\pm$ 42.55 ^x	74.95 $\pm$ 37.63	79.43 $\pm$ 40.24	83.05 $\pm$ 41.25	77.48 $\pm$ 37.89
	3% ดาวเรือง	85.38 $\pm$ 49.28 ^{xy}	91.05 $\pm$ 48.69	93.10 $\pm$ 47.40	106.62 $\pm$ 45.47	108.90 $\pm$ 42.35
	5% ดาวเรือง	45.76 $\pm$ 34.38 ^z	67.43 $\pm$ 38.73	78.00 $\pm$ 36.20	89.71 $\pm$ 36.12	99.71 $\pm$ 35.62
	7% ดาวเรือง	64.62 $\pm$ 34.40 ^{xyz}	70.81 $\pm$ 31.57	82.57 $\pm$ 33.50	91.38 $\pm$ 32.22	109.00 $\pm$ 34.73
	p-value	0.042	0.374	0.674	0.339	0.061

หมายเหตุ: ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการทดสอบ LSD

สำหรับค่าความเข้มสีน้ำเงิน (B) ในวันที่ 0 ของการทดลองนั้นพบว่าปลากัดแต่ละกลุ่มมีความเข้มสีเริ่มต้นที่ต่างกันโดยเฉพาะบริเวณหาง ($p = 0.042$) อย่างไรก็ตามพบว่าปลากัดทุกกลุ่มมีแนวโน้มค่าความเข้มสีของบริเวณลำตัวเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยในวันที่ 40 ของการทดลอง ปลากัดที่ได้รับอาหารเสริมสารสกัดดอกดาวเรืองในระดับ 5% และ 7% แสดงค่า B เท่ากับ 109.24 ± 18.03 และ 108.38 ± 24.86 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.383$) ส่วนบริเวณหาง พบว่าค่าความเข้มสี B มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกกลุ่ม โดยในวันที่ 40 กลุ่ม 7% มีค่าเฉลี่ยสูงสุด (109.00 ± 34.73) รองลงมาคือกลุ่ม 3% (108.90 ± 42.35) ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.061$)

3. แนวโน้มของการเพิ่มขึ้นของความเข้มสีที่ลำตัวและหางของปลากัด

จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยความเข้มสีที่เปลี่ยนแปลงไปในระบบสี RGB ของปลากัด โดยคำนวณจากผลต่างระหว่างค่าสีหลังสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 40) กับค่าสีเมื่อเริ่มทดลอง (วันที่ 0) (ตารางที่ 5) พบว่าการเสริมสารสกัดดอกดาวเรืองในอาหารส่งผลให้ความเข้มสีของลำตัวและหางเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม ซึ่งบริเวณลำตัวนั้น กลุ่มที่ได้รับสารสกัดดอกดาวเรือง 5% มีค่าความเข้มสีที่เพิ่มขึ้นสูงสุดในทุกค่าสี ได้แก่ สีแดง 55.05 ± 6.97 สีเขียว 50.95 ± 8.63 และสีน้ำเงิน 46.52 ± 10.66 ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่ม 3% อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่กลุ่ม 7% มีค่าความเข้มสีรองลงมา และแตกต่างจาก 5% อย่างมีนัยสำคัญในค่าสีแดง ส่วนในบริเวณหาง พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัด 5% เช่นเดียวกัน แสดงค่าความเข้มสีที่เพิ่มขึ้นสูงสุดในทุกมิติของสี โดยมีค่าความเข้มสีแดง 48.29 ± 7.28 สีเขียว 52.19 ± 15.85 และสีน้ำเงิน 53.95 ± 12.96 ซึ่งแตกต่างอย่างชัดเจนจากกลุ่มควบคุมและกลุ่ม 3% ในขณะที่กลุ่ม 7% มีแนวโน้มใกล้เคียงกับกลุ่ม 5%

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการเปลี่ยนแปลงค่าสี RGB บริเวณลำตัวและหางของปลากัดหลังได้รับอาหารเสริมสารสกัดดอกดาวเรืองในระดับต่าง ๆ

บริเวณ	กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยความเข้มสีที่เพิ่มขึ้น (Mean $\pm$ SD)		
		R	G	B
ลำตัว	ควบคุม	12.19 $\pm$ 4.29 ^c	13.62 $\pm$ 6.38 ^b	8.76 $\pm$ 12.08 ^b
	3% ดาวเรือง	23.24 $\pm$ 7.20 ^c	21.10 $\pm$ 12.13 ^b	18.14 $\pm$ 20.38 ^b
	5% ดาวเรือง	55.05 $\pm$ 6.97 ^a	50.95 $\pm$ 8.63 ^a	46.52 $\pm$ 10.66 ^a
	7% ดาวเรือง	40.14 $\pm$ 12.69 ^b	42.19 $\pm$ 12.42 ^a	40.24 $\pm$ 7.91 ^a
	p-value	< 0.001	< 0.001	< 0.001
หาง	ควบคุม	12.00 $\pm$ 8.37 ^y	3.52 $\pm$ 14.44 ^y	3.29 $\pm$ 23.49 ^y
	3% ดาวเรือง	10.05 $\pm$ 4.07 ^y	6.52 $\pm$ 4.44 ^y	5.67 $\pm$ 5.32 ^y
	5% ดาวเรือง	48.29 $\pm$ 7.28 ^x	52.19 $\pm$ 15.85 ^x	53.95 $\pm$ 12.96 ^x
	7% ดาวเรือง	40.29 $\pm$ 12.1 ^x	39.67 $\pm$ 15.15 ^x	44.38 $\pm$ 10.07 ^x
	p-value	< 0.001	< 0.001	< 0.001

หมายเหตุ: ตัวอักษรต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการทดสอบ LSD

วิจารณ์ผล

จากผลการวิเคราะห์พบว่าการสกัดลูทีนจากผงดอกดาวเรืองด้วยเอทานอล 95% ให้ปริมาณลูทีนสูง สอดคล้องกับรายงานของ Casella et al. (2021) ที่พบว่าการใช้เอทานอลสกัดภายใต้แรงดันและอุณหภูมิสูงให้ลูทีนสูงสุด 2.76 มก. ต่อดอกดาวเรือง 1 ก. ทั้งนี้ ลูทีนละลายในเอทานอลได้ดีเนื่องจากมีโครงสร้างกิ่งไม่มีขั้วแต่มีหมู่ -OH ซึ่งมีขั้วบางส่วน ขณะที่เอทานอลเป็นตัวทำละลายกึ่งขั้วจึงสามารถละลายสารได้ทั้งขั้วและไม่ขั้ว (Li & Engelberth, 2018) อย่างไรก็ตาม ปริมาณลูทีนจากกลุ่ม 7% ไม่เพิ่มขึ้นจากกลุ่ม 5% อย่างมีนัยสำคัญ สะท้อนแนวโน้มภาวะอิ่มตัวของกระบวนการสกัดจากข้อจำกัดของการละลายในตัวทำละลายภายใต้เงื่อนไขนี้ สอดคล้องกับ Manzoor et al. (2022) ที่รายงานว่า การเพิ่มสัดส่วนดอกดาวเรืองต่อสารละลายเกิน 0.15 ไม่เพิ่มปริมาณลูทีนเมื่อใช้ปริมาณตัวทำละลายเท่าเดิม ทั้งยังอาจมีสารร่วมสกัด เช่น flavonoid หรือ phenolics ที่รบกวนการละลายลูทีน (Li et al., 2007)

สำหรับการเปลี่ยนแปลงของความเข้มสีในปลากัด พบความแตกต่างของค่าความเข้มสีก่อนทดลอง (วันที่ 0) ในบางกลุ่มที่อาจเกิดจากลักษณะสีพื้นฐานของปลากัดแต่ละตัวซึ่งมีความแปรปรวนตามธรรมชาติ ดังนั้นผลการทดลองจึงพิจารณาทั้งจากการเปรียบเทียบค่าความเข้มสีระหว่างกลุ่มในแต่ละช่วงเวลาและการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสัมพัทธ์ภายในกลุ่มเดียวกัน โดยพบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมสารสกัดดาวเรือง 5% แสดงการเพิ่มขึ้นของความเข้มสีอย่างเด่นชัด โดยเฉพาะสีแดงและเขียวทั้งบริเวณลำตัวและหาง ซึ่งสะท้อนถึงบทบาทของลูทีนในการเสริมสร้างสีผิวผ่านการสะสมรงควัตถุชนิด erythrophore และ xanthophore ในเนื้อเยื่อชั้นผิวหนังคล้ายกับปลาสวยงามสายพันธุ์อื่น ส่งผลให้สีแดงและเหลืองมีความเข้มขึ้น (Besen et al., 2019; Bjerkeng, 2008) ความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองชี้ให้เห็นว่าแคโรทีนอยด์ในสารสกัดมีความสามารถในการเร่งสีได้จริง อย่างไรก็ตามกลุ่มที่ได้รับ 7% แม้มีแนวโน้มค่าเฉลี่ยสีสูงแต่ไม่แสดงผลเหนือกว่ากลุ่ม 5% อย่างชัดเจนในบางมิติของสี ซึ่งอาจเกิดจากกลไกการ

ดูดซึมหรือการสะสมแคโรทีนอยด์ที่มีขีดจำกัดที่เรียกว่าภาวะอิ่มตัว (saturation effect) หรือมีการเร่งจัดสรรส่วนเกินออกจากร่างกาย (Dani et al., 2017) นอกจากนี้การดูดซึมแคโรทีนอยด์อาจถูกจำกัดโดยความสามารถของระบบทางเดินอาหารหรือการจับตัวของสารในโปรตีนพาหะ (carotenoid-binding proteins) ทำให้การเพิ่มระดับสารสกัดเกิน 5% ไม่ส่งผลเพิ่มเติมอย่างมีนัยสำคัญ (Ho et al., 2013) ในส่วนความเข้มข้นสีน้ำเงินที่ไม่ใช่ช่วงสีเป้าหมายของลูทีนโดยตรง พบว่าค่าความเปลี่ยนแปลงไม่แสดงความแตกต่างที่เด่นชัดมากนัก สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่าลูทีนมีบทบาทหลักในการเพิ่มความเข้มข้นของสีแดงถึงเหลือง (De Carvalho & Caramujo, 2017)

อย่างไรก็ตาม การเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นสีควรพิจารณาพร้อมกับองค์ประกอบอื่นๆ ของสารสกัดที่อาจมีผลรบกวน เช่น ฟลาโวนอยด์หรือสารฟีนอลิกซึ่งพบได้ร่วมในสารสกัดจากพืช และอาจมีอิทธิพลต่อกระบวนการดูดซึมหรือเมตาบอลิซึมของลูทีนในร่างกายปลา รวมทั้งปัจจัยอื่นๆ ที่อาจส่งผลต่อการแสดงสี เช่น อายุปลา สุขภาพ และองค์ประกอบอื่นในอาหาร (Miao et al., 2024) ซึ่งมีผลต่อการดูดซึมและการใช้ประโยชน์จากแคโรทีนอยด์ (Monica et al., 2022) การศึกษาต่อไปอาจรวมถึงการทดสอบระยะยาว หรือการเปรียบเทียบรูปแบบการสกัดต่างๆ เช่น การใช้เอนไซม์หรือสารช่วยสกัดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดึงลูทีนจากดอกดาวเรือง นอกจากนี้วิธีการวัดค่าสีด้วยระบบ RGB ซึ่งใช้การประมวลผลภาพถ่าย อาจมีข้อจำกัดด้านความแม่นยำและไวต่อสภาวะแสงโดยรอบ (Minz & Saini, 2021) แม้จะมีการควบคุมแสงขณะถ่ายภาพก็ตาม การใช้วิธีอื่นเสริม เช่น การวัดค่า CIE L*a*b* หรือการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์จากเนื้อเยื่อของสัตว์อาจให้ผลสนับสนุนที่ชัดเจนและแม่นยำมากขึ้น

สรุปผล

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมสารสกัดดอกดาวเรืองในอาหารสามารถเพิ่มความเข้มข้นสีของลำตัวและครีบหางของปลากัดได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะที่ระดับ 5% ซึ่งให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองอื่น การประเมินสีด้วยระบบ RGB ภายใต้การควบคุมที่เหมาะสมสามารถสะท้อนแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงสีได้อย่างชัดเจน ผลการทดลองในครั้งนี้สนับสนุนศักยภาพของสารสกัดดอกดาวเรืองในฐานะวัตถุดิบเสริมอาหารเพื่อเพิ่มคุณลักษณะด้านสีในปลาสวยงาม การศึกษาต่อยอดด้วยวิธีวัดสีที่แม่นยำยิ่งขึ้น เช่น CIE L*a*b* หรือการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเนื้อเยื่อ จะช่วยยืนยันและขยายผลในเชิงอุตสาหกรรมได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณโรงพยาบาลสัตว์ และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย เป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณโปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพที่ได้อนุเคราะห์เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์สำหรับการตรวจวัดปริมาณลูทีนในตัวอย่างดอกดาวเรือง ทำให้การทดลองสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Afshari-Jouybari, H., & Farahnaky, A. 2011. Evaluation of Photoshop software potential for food colorimetry. *Journal of Food Engineering*, 106(2), 170-175.
- Besen, K. P., Hessa Melim, E. W., Favaretto, E. D., Moreira, M., & Hadi Perez Fabregat, T. E. 2019. Lutein as a natural carotenoid source: Effect on growth, survival and skin pigmentation of goldfish juveniles (*Carassius auratus*). *Aquaculture Research*, 50(8), 2200-2206.

- Bianca, R. A., Pinela, J., Barros, L., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. 2020. Anthocyanin-rich extract of jabuticaba epicarp as a natural colorant: Optimization of heat- and ultrasound-assisted extractions and application in a bakery product. *Food Chemistry*, 316, 126364.
- Bjerkeng, B. 2008. Carotenoids in aquaculture: fish and crustaceans. In Birkhäuser Basel eBooks (pp. 237–254). https://doi.org/10.1007/978-3-7643-7499-0_12
- Capelli, B., Bagchi, D., & Cysewski, G. R. 2013. Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement. *Nutrafoods*, 12(4), 145–152.
- Casella, P., Molino, A., Mehariya, S., Iovine, A., Di Sanzo, G., Larocca, V., Martino, M., Leone, G. P., Marino, T., Musmarra, D., & Molino, A. 2021. Optimization of lutein extraction from *Scenedesmus almeriensis* using pressurized liquid extraction. *Chemical Engineering Transactions*, 87, 475–480.
- Chatzifotis, S., Pavlidis, M., Jimeno, C. D., Vardanis, G., Sterioti, A., & Divanach, P. 2005. The effect of different carotenoid sources on skin coloration of cultured red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture Research*, 36(15), 1517–1525.
- Dani, D., Thirugnanamurthy, S., Subramaniyan, Faizhullah, M., & Fernando, H. 2017. Application of carotenoids on coloration of aquatic animals. *International Journal of Fisheries and Aquatic Research*, 2, 01-07.
- De Carvalho, C. C. C. R., & Caramujo, M. J. 2017. Carotenoids in aquatic ecosystems and aquaculture: a colorful business with implications for human health. *Frontiers in Marine Science*, 4.
- Despy, J., Wymeersch, N., Bouchat, I., Destree, C., Burette, A., Richel, A., & Olive, G. 2014. *P13 - Old inks: Pigments extracted from plants*. Proceedings of the 19th National Symposium on Applied Biological Sciences, Gembloux, Belgium, 83.
- Fiedoruk-Pogrebniak, M. 2024. Mathematical processing of RGB data in microfluidic paper-based analytical devices. *Scientific Reports*, 14. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63546-2>
- Ho, A. L. F. C., O'Shea, S. K., & Pomeroy, H. F. 2013. Dietary esterified astaxanthin effects on color, carotenoid concentrations, and compositions of clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*, skin. *Aquaculture International*, 21(2), 361-374. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9558-9>
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2004. *Lutein from Tagetes erecta*. https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/monograph3/additive-255.pdf
- Li, J., & Engelberth, A. S. 2018. Quantification and purification of lutein and zeaxanthin recovered from distillers dried grains with solubles (DDGS). *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), Article 32.
- Li, W., Gao, Y., Zhao, J., & Wang, Q. 2007. Phenolic, flavonoid and lutein ester content and antioxidant activity of eleven cultivars of Chinese marigold. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8478–8484.

- Lin, J. H., Lee, D. J., & Chang, J. S. 2015. Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae. *Bioresource Technology*, 184, 421–428.
- Manzoor, S., Ansari, M. J., Shah, A. A., Hussain, K., Khan, A., Al-Abbasi, F. A., & Alshammari, A. S. 2022. Green extraction of lutein from marigold flower petals, process optimization and its potential to improve the oxidative stability of sunflower oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 85, 105994.
- Miao, Q., Si, X., Zhao, Q., Zhang, H., Qin, Y., Tang, C., & Zhang, J. 2024. Deposition and enrichment of carotenoids in livestock products: an overview. *Food Chemistry: X*, 21, 101245.
- Minz, P. S., & Saini, C. S. 2021. RGB camera-based image technique for color measurement of flavored milk. *Measurement: Food*, 4, 100012
- Monica, K. S., Saravanan, S., Bhuvaneswari, K. S., & Suresh, R. 2022. Role of Carotenoids in ornamental fish culture: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 11(1), 1-10.
- Pailan, G., Sardar, P., & Mahapatra, B. 2015. Marigold petal meal: a natural carotenoid source for pigmentation in swordtail (*Xiphophorus helleri*). *Animal Nutrition and Feed Technology*, 15, 417-425. <https://doi.org/10.5958/0974-181X.2015.00042.6>
- Sandkam, B. A., Deere-Machemer, K. A., Johnson, A. M., Grether, G. F., Rodd, F. H., & Fuller, R. C. 2016. Exploring visual plasticity: dietary carotenoids can change color vision in guppies (*Poecilia reticulata*). *Journal of Comparative Physiology A*, 202(7), 527–534.
- Sermwatanakul, A. 2019. Capacitating the local farmers to enhance global marketing of Thailand's national aquatic animal, the Siamese fighting fish. *Fish for the People*, 17(2), 42–48. <https://repository.seafdec.org/handle/20.500.12066/5516>
- Shah, T. R., Prasad, K., & Kumar, P. 2016. Maize—A potential source of human nutrition and health: a review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1166995.
- Wallat, G. K., Luzuriaga, D. A., Balaban, M. O., & Chapman, F. A. 2002. Analysis of skin color development in live goldfish using a color machine vision system. *North American Journal of Aquaculture*, 64(1), 79–84.