การศึกษาสารสกัดสีธรรมชาติจากพืชเพื่อการย้อมสีโครโมโซม สำหรับห้องปฏิบัติการชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม

Study of the Natural Dyes from Plants for Chromosome Staining in a Biological Laboratory, Faculty of Science and Technology, Nakhon Pathom Rajabhat University

วันเพ็ญ แก้วพุก

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม
kaewpuk2@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) คัดเลือกพืชที่เหมาะสมในการสกัดสารสีสำหรับการย้อมสีโครโมโซม 2) ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดสารสีธรรมชาติจากพืช 3) ศึกษาอัตราส่วนของพืชต่อตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสีธรรมชาติจากพืช 4) เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย้อมสีโครโมโซมของสีย้อมจากพืชกับสีย้อมคาร์บอลฟุกซิน 5) ศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาสีย้อมธรรมชาติที่สกัดได้ โดยทำการคัดเลือกพืช 5 ชนิด ได้แก่ ดอกกระเจี๊ยบแดง ดอกอัญชัน เปลือกแก้วมังกร เปลือกมังคุด และเปลือกมะเขือม่วง ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสีธรรมชาติจากพืช ได้แก่ ชนิดตัวทำละลาย อัตราส่วนของพืชต่อตัวทำละลาย และนำไปเปรียบเทียบความสามารถการย้อมสีโครโมโซมของสีย้อมจากตัวอย่างพืชกับสีย้อมคาร์บอลฟุกซิน ผลการวิจัยพบว่า 1) สารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงให้ประสิทธิภาพการย้อมติดสีโครโมโซมเป็นสีแดง และสามารถสังเกตพฤติกรรมของโครโมโซมปลายรากหอมได้ชัดเจนที่สุด 2) การสกัดสารสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำกลั่นสามารถย้อมติดสีโครโมโซม และสามารถสังเกตพฤติกรรมของโครโมโซมในระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์ได้ชัดเจนที่สุด 3) สารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดง สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:2 (กรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ให้การติดสีจนสามารถตรวจสอบลักษณะโครโมโซมปลายรากหอมในการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสได้ดี 4) สารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงมีประสิทธิภาพในการย้อมโครโมโซมใกล้เคียงกับสีคาร์บอลฟุกซิน 5) สารสกัดสีธรรมชาติจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่เก็บในรูปผง และในรูปของเหลวที่อุณหภูมิ 4 ℃ ทั้ง 2, 4 และ 6 สัปดาห์ สามารถย้อมติดสีโครโมโซม และสามารถสังเกตพฤติกรรมของโครโมโซมในระยะต่าง ๆ ของการแบ่งเซลล์ได้ใกล้เคียงกัน

คำสำคัญ: สารสกัดสีธรรมชาติจากพืช, การย้อมสี, โครโมโซม

Abstract

The objectives of this research were to: 1) Selection of optimum plants for the extraction of natural dyes for chromosomes staining. 2) A study on the optimum of solvent composition for the extraction of natural dyes from plant. 3) A study on the optimum ratio of plant per solvent for the extraction of natural dyes from plant. 4) Comparative study on the ability in staining chromosomes of sample dyes with the carbol fuchsin dye. 5) A study of the storage time of natural dyes. Five plant samples were selected: roselle, butterfly pea, dragon fruit peel, mangosteen husk and purple eggplant skin. This research also studied the optimum condition for the extraction in term of solvent composition, a ratio of plant per solvent and compared the ability in staining chromosomes of sample dyes with the carbol fuchsin dye. The results showed that 1) The extracted roselle dye produced red color stain and was the most effective dye for studying chromosome of an onion root tip. 2) The roselle dye extracted with distilled water had the most effective dye and observation for studying the cell division of

chromosomes. 3) The roselle dye extracted with distilled water at the ratio of 1:2 (g/ml) for 1 hour were good dyes that can examine the chromosomal characteristics of mitosis in the tip of an onion root. 4) The extracted roselle dye was nearly as effective as carbol fuchsin dye. 5) The extracted roselle powder and liquid, stored at 4 ℃ for 2, 4 and 6 weeks, effectively stained the chromosomes and could be nearly as effective as a powder for studying the cell division of chromosomes.

Keywords: natural dyes from plants, staining, chromosome

1. บทนำ

สีมีบทบาท และความสำคัญกับการดำรงชีวิตของมนุษย์ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน นอกจากนี้สียังเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่เข้ามามีบทบาทในการเรียนการสอนทางวิทยาศาสตร์ โดยนำมาเป็นสีย้อมซึ่งเป็นวัสดุวิทยาศาสตร์ที่มีความสำคัญในการศึกษาทางชีววิทยาทั้งระดับพื้นฐาน เช่น ศึกษาเรื่องของเซลล์ และระดับสูง เช่น ศึกษาโครโมโซม ซึ่งต้องมีการเตรียมสไลด์ เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์และโครโมโซม แต่เนื่องจากเซลล์มีลักษณะใสเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ทำให้มองเห็นลักษณะดังกล่าวไม่ชัดเจน ดังนั้นเทคนิคการย้อมสีจึงเป็นขั้นตอนสำคัญในการศึกษาทางชีววิทยา ซึ่งปัจจุบันสีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่เป็นสีสังเคราะห์ที่ต้องสั่งซื้อ และนำเข้าจากต่างประเทศในราคาที่แพง ทำให้สั่งซื้อได้เฉพาะสถานศึกษาที่มีงบประมาณเพียงพอ ส่วนสถานศึกษาที่มีงบประมาณไม่เพียงพอที่จะซื้อสีดังกล่าว จึงไม่สามารถจัดการเรียนการสอนการศึกษาโครโมโซมจากการปฏิบัติจริงได้ ทำได้เพียงศึกษาจากรูปภาพเท่านั้น และสีสังเคราะห์ยังเป็นอันตราย ซึ่งสีที่ใช้ย้อมดังกล่าวสามารถทดแทนได้โดยใช้สารสกัดสีธรรมชาติจากพืชที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น ซึ่งเป็นการประหยัด ปลอดภัย และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีการนำสีธรรมชาติจากพืชมาใช้ในการย้อมสีโครโมโซม จากการศึกษาของ จินตหรา เล็กประยูร และคณะ (2553) ได้ศึกษาการสกัดสีจากพืชธรรมชาติเพื่อทดแทนสีทางเคมีที่มีอันตรายและราคาแพง เพื่อใช้เป็นสีย้อมโครโมโซม นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยหลายเรื่องที่นิยมนำพืชมาสกัดสารสีเพื่อนำไปย้อมโครโมโซมของเซลล์รากหอม และโครงสร้างอื่น ๆ ของเซลล์พืช เช่น เปลือกแก้วมังกร (อัจฉราภรณ์ เกษรมาลา, 2549) กะหล่ำปลีสีม่วง (ยุพเยาว์ คบพิมาย และศรัณย์ จีนะเจริญ, 2551) และใบผีเสื้อราตรี (สายสุณีย์ ลิ้มชูวงศ์ และคณะ, 2551)

สารสีธรรมชาติส่วนใหญ่อยู่ในรูปของแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) ควินิน (quinines) แอลคาลอยด์ (alkaloids) และเบทาเลน (betalains) สกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช และสัตว์ ซึ่งสารสกัดสีที่มีความสามารถในการย้อมติดโครโมโซม คือ สารกลุ่มแอนโทไซยานิน เป็นสารที่มีอยู่ในพืชหลายชนิดทั้งในผิวของผล เนื้อ เมล็ด ดอก และใบ พบในผัก ผลไม้ และดอกไม้หลายชนิด เช่น เมล็ดข้าวเหนียวดำ ผลหนามแดง เปลือกแก้วมังกร ดอกกระเจี๊ยบแดง ดอกอัญชัน สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น ย้อมโครโมโซม และในอุตสาหกรรมอาหารใช้เป็นสีผสมอาหาร เป็นต้น แอนโทไซยานินจัดเป็นรงควัตถุธรรมชาติที่ให้สีชมพู แดง ม่วง และน้ำเงิน ซึ่งจัดเป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีโครงสร้างหลักเป็น $C_6C_3C_6$ เป็นรงควัตถุที่สามารถละลายน้ำได้ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิล เช่น อะซิโตน เบนซิน คลอโรฟอร์ม และอีเทอร์ เป็นต้น สีของแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะความเป็นกรด-ด่าง

ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะใช้สารสกัดสีธรรมชาติจากพืช เพื่อเป็นสีย้อมโครโมโซมทดแทนการใช้สีสังเคราะห์ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเพื่อคัดเลือกตัวอย่างพืช และตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสีจากพืชสำหรับการย้อมสีโครโมโซมพร้อมทั้งหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาสีย้อมที่สกัดได้

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อคัดเลือกพืชที่เหมาะสมในการสกัดสารสีสำหรับการย้อมสีโครโมโซม
2.2 เพื่อศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดสารสีธรรมชาติจากพืชที่คัดเลือก
2.3 เพื่อศึกษาอัตราส่วนของพืชต่อตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสีธรรมชาติจากพืช
2.4 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย้อมสีโครโมโซมของสีย้อมจากพืชกับสีย้อมคาร์บอลฟุกซิน
2.5 เพื่อศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาสีย้อมธรรมชาติที่สกัดได้

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การคัดเลือกพืชที่เหมาะสมสำหรับใช้ย้อมสีโครโมโซมของปลายรากหอม

นำตัวอย่างพืช 5 ชนิด ได้แก่ ดอกกระเจี๊ยบแดง ดอกอัญชัน เปลือกแก้วมังกร เปลือกมังคุด และเปลือกมะเขือม่วง หั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ บดให้ละเอียด จากนั้นนำมาชั่งในอัตราส่วนพืชต่อสารสกัด (น้ำกลั่น) 1:1 (กรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ยกเว้นดอกกระเจี๊ยบแดง (แห้ง) ซึ่งมีน้ำหนักเบาใช้อัตราส่วนพืชต่อสารสกัด (น้ำกลั่น) 1:2 (กรัม/มิลลิลิตร) กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้จากพืชแต่ละชนิดไปทดสอบการย้อมสีโครโมโซมของปลายรากหอม

3.2 ศึกษาผลของสารสกัดจากพืชในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

นำพืชที่ให้การติดสีย้อมโครโมโซมดีที่สุด จากผลการทดลองข้อ 4.1 โดยหั่นตัวอย่างพืชเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำมาบดละเอียด แล้วทำการสกัดโดยใช้น้ำกลั่น กรดอะซีติก 20% กรดไฮโดรคลอริก 20 % และเอธานอล 20 % เป็นตัวทำละลายในอัตราส่วนพืชต่อตัวทำละลาย 1:2 (กรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบการย้อมสีโครโมโซมของปลายรากหอม

3.3 ศึกษาอัตราส่วนของพืชต่อตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสีธรรมชาติจากพืช

นำตัวอย่างพืชจากการทดลองที่ 1 หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำมาบดละเอียดแล้วทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่ดีที่สุด (จากการทดลองข้อ 4.2) ในอัตราส่วนของพืชต่อตัวทำละลาย 1:2, 1:4, 1:6 และ 1:8 (กรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบการย้อมสีโครโมโซมของปลายรากหอม

3.4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย้อมสีโครโมโซมของสีย้อมจากพืชกับสีย้อมคาร์บอลฟุกซิน

นำสารสกัดที่ได้จากผลการทดลองข้อ 4.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย้อมสีโครโมโซมของปลายรากหอมกับสีย้อมคาร์บอลฟุกซิน ซึ่งเป็นสีสังเคราะห์

3.5 การศึกษาระยะเวลาในการเก็บรักษาสีย้อมที่เหมาะสม

นำสารสกัดที่ได้จากผลการทดลองข้อ 4.3 มาเก็บรักษาในรูปของผง โดยใช้เครื่องทำแห้งแบบระเหิด (freeze drier) และเก็บในรูปของเหลวโดยเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 ℃ เป็นระยะเวลา 2, 4 และ 6 สัปดาห์ ตามลำดับ หลังจากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการย้อมสีโครโมโซมของปลายรากหอมอีกครั้ง

4. ผลการวิจัย

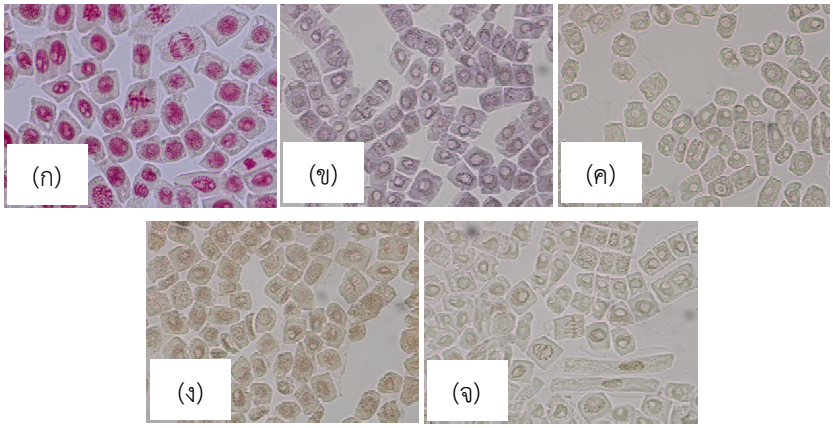
4.1 ผลการคัดเลือกพืชที่เหมาะสมสำหรับใช้ย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอม

จากการคัดเลือกพืชสำหรับการย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอมโดยใช้ตัวอย่างพืช 5 ชนิด ได้แก่ ดอกกระเจี๊ยบแดง ดอกอัญชัน เปลือกแก้วมังกร เปลือกมังคุด และเปลือกมะเขือม่วง มาทำการสกัดด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงมีค่าความพึงพอใจการย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอมที่มีประสิทธิภาพการย้อมติดสีโครโมโซมเป็นสีแดง และสามารถสังเกตพฤติกรรมของโครโมโซมในระยะต่าง ๆ ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสได้ชัดเจนที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 1 ในขณะที่สารสกัดสีจากดอกอัญชัน เปลือกมังคุด เปลือกแก้วมังกร และเปลือกมะเขือม่วง จะให้การย้อมติดสีโครโมโซมเป็นสีม่วง น้ำตาล และเทา ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการสังเกตลักษณะการเรียงตัวของโครโมโซมจากสารสกัดสีธรรมชาติจากพืชทั้ง 5 ชนิด ที่นำมาทดสอบ พบว่า ดอกอัญชัน เปลือกมังคุด และเปลือกมะเขือม่วง สามารถสังเกตพฤติกรรมของโครโมโซมในระยะต่าง ๆ ของการแบ่งเซลล์ได้ ในขณะที่สารสกัดสีจากเปลือกแก้วมังกรไม่สามารถสังเกตพฤติกรรมของโครโมโซมได้ ดังแสดงในภาพที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติความพึงพอใจของการย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอม ที่ย้อมด้วยสารสกัดสีธรรมชาติจากพืช 5 ชนิด

ชนิดพืช	ค่าระดับความพึงพอใจ	
	การติดสีของโครโมโซม	ความชัดเจนของโครโมโซม
ดอกกระเจี๊ยบแดง	4.79^{a}±0.08	4.58^{a}±0.09
ดอกอัญชัน	3.33^{b}±0.02	3.30^{b}±0.05
เปลือกมังคุด	2.48^{c}±0.13	2.90^{c}±0.09
เปลือกแก้วมังกร	2.30^{c}±0.08	2.61^{d}±0.04
เปลือกมะเขือม่วง	2.04^{d}±0.06	2.40^{d}±0.04

หมายเหตุ a, b, c และ d หมายถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



ภาพที่ 1 การย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอม ด้วยสารสกัดสีธรรมชาติจากพืช 5 ชนิด
(ก) ดอกกระเจี๊ยบแดง (ข) ดอกอัญชัน (ค) เปลือกแก้วมังกร (ง) เปลือกมังคุด (จ) เปลือกมะเขือม่วง

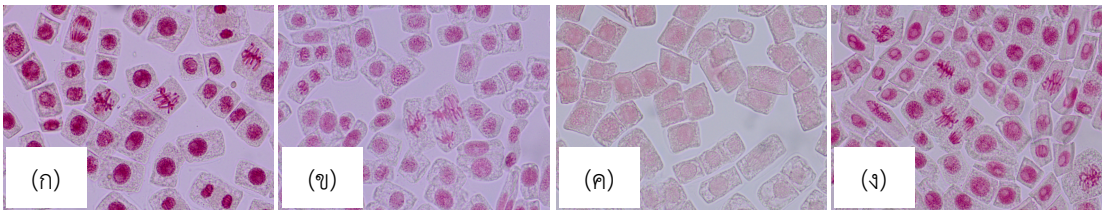
4.2 ผลการศึกษาผลของสารสกัดจากพืชในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

จากการย้อมสีโครโมโซมของปลายรากหอมด้วยสารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงโดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น กรดอะซีติก 20 % กรดไฮโดรคลอริก 20 % และเอธานอล 20 % พบว่า สารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่สกัดโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย สามารถย้อมติดสีโครโมโซม และสามารถสังเกตพฤติกรรมของโครโมโซมในระยะต่าง ๆ ของการแบ่งเซลล์ได้ชัดเจนที่สุด รองลงมา คือ เอธานอล 20 % และกรดอะซีติก 20 % ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 ในขณะที่สารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก 20 % จะไม่สามารถย้อมติดสีโครโมโซม แต่สามารถสังเกตพฤติกรรมของโครโมโซมในระยะต่าง ๆ ได้อย่างเลือนลาง ดังแสดงในภาพที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติความพึงพอใจของการย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอม ที่ย้อมด้วยสารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

ชนิดตัวทำละลาย	ค่าระดับความพึงพอใจ	
	การติดสีของโครโมโซม	ความชัดเจนของโครโมโซม
น้ำกลั่น	4.93^{a}±0.02	4.94^{a}±0.01
เอธานอล 20 %	4.29^{b}±0.03	4.31^{b}±0.03
กรดอะซีติก 20 %	3.27^{c}±0.02	3.33^{c}±0.10
กรดไฮโดรคลอริก 20 %	2.03^{d}±0.05	2.21^{d}±0.02

หมายเหตุ a, b, c และ d หมายถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



ภาพที่ 2 การย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอม ด้วยสารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่สกัดจากตัวทำละลาย 4 ชนิด (ก) น้ำกลั่น (ข) กรดอะซีติก 20 % (ค) กรดไฮโดรคลอริก 20 % (ง) เอธานอล 20 %

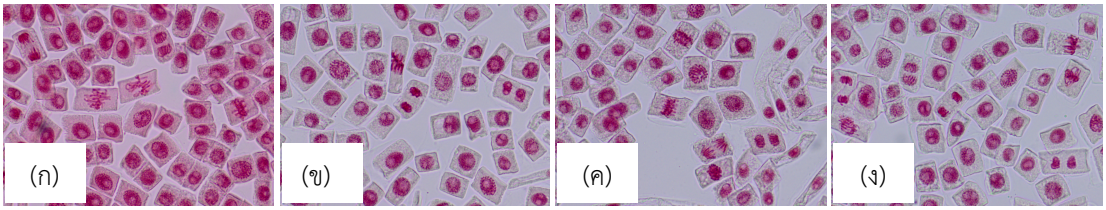
4.3 ผลการศึกษาอัตราส่วนของพืชต่อตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสีธรรมชาติจากพืช

จากการสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำกลั่น โดยใช้อัตราส่วน 4 อัตราส่วน คือ 1:2, 1:4, 1:6 และ 1:8 (กรัม/มิลลิลิตร) เมื่อนำสารสกัดสีธรรมชาติจากพืชแต่ละชนิดที่ได้มาทดสอบย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอม พบว่า สารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงทุกอัตราส่วนมีค่าความพึงพอใจการย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอมที่สามารถย้อมติดสีโครโมโซม และสามารถสังเกตพฤติกรรมของโครโมโซมในระยะต่าง ๆ ได้ แต่ที่อัตราส่วน 1:2 ให้การติดสีที่มีความเข้มมากที่สุด และติดสีโครโมโซมชัดเจนที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติความพึงพอใจของการย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอม ที่ย้อมด้วยสารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงต่อน้ำกลั่นที่อัตราส่วนต่าง ๆ

อัตราส่วน	ค่าระดับความพึงพอใจ	
	การติดสีของโครโมโซม	ความชัดเจนของโครโมโซม
1:2	5.00^{a}	$4.80^{a}\pm0.02$
1:4	$4.47^{b}\pm0.03$	$4.49^{b}\pm0.05$
1:6	$4.38^{b}\pm0.05$	$4.42^{b}\pm0.06$
1:8	$3.99^{c}\pm0.18$	$4.07^{c}\pm0.10$

หมายเหตุ a, b, และ c หมายถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 3 การย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอม ด้วยน้ำกลั่นจากสารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่อัตราส่วน (ก) อัตราส่วน 1:2 (ข) อัตราส่วน 1:4 (ค) อัตราส่วน 1:6 (ง) อัตราส่วน 1:8

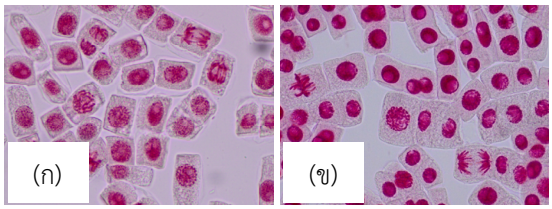
4.4 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย้อมสีโครโมโซมของสีย้อมจากพืชกับสีคาร์บอลฟุกซิน

จากการสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงโดยใช้น้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:2 นำมาทดสอบย้อมโครโมโซมของปลายรากหอม เปรียบเทียบกับการย้อมด้วยสีคาร์บอลฟุกซิน พบว่า สารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงมีประสิทธิภาพในการย้อมสีโครโมโซมใกล้เคียงกับสีคาร์บอลฟุกซิน ดังแสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติความพึงพอใจการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอม ที่ย้อมด้วยสารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงกับสีคาร์บอลฟุกซิน

สี	ค่าระดับความพึงพอใจ	
	การติดสีของโครโมโซม	ความชัดเจนของโครโมโซม
สีคาร์บอลฟุกซิน	14.13±0.32	12.37±0.49
สีจากดอกกระเจี๊ยบแดง	13.33±0.26	12.63±0.31
t-test	ns	ns

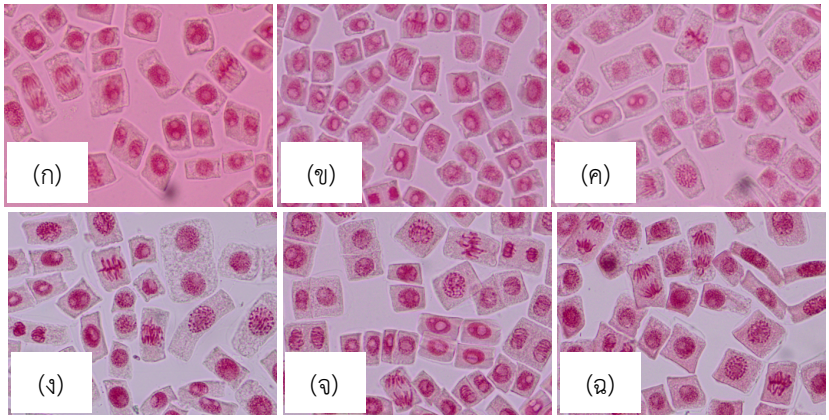
หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



ภาพที่ 4 การย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอม ด้วยสารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงและสีคาร์บอลฟุกซิน
(ก) สีจากดอกกระเจี๊ยบแดง (ข) สีคาร์บอลฟุกซิน

4.5 ผลการศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาสีย้อมที่เหมาะสม

จากการเก็บรักษาสารสกัดสารสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่สกัดได้ในรูปผง และรูปของเหลวโดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 ℃ เป็นเวลา 2, 4 และ 6 สัปดาห์ พบว่า สารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่เก็บในรูปผง และรูปของเหลวที่อุณหภูมิ 4 ℃ ทั้ง 2, 4 และ 6 สัปดาห์ สามารถย้อมติดสีโครโมโซม และสามารถสังเกตพฤติกรรมของโครโมโซมในระยะต่าง ๆ ของการแบ่งเซลล์ได้ ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 การย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอม ด้วยสารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่เก็บรักษาในรูปผง (ก, ข และ ค) และรูปของเหลวที่อุณหภูมิ 4 ℃ (ง, จ และ ฉ) เป็นระยะเวลา (ก, ง) 2 สัปดาห์ (ข, จ) 4 สัปดาห์ (ค, ฉ) 6 สัปดาห์

5. สรุปผลการวิจัย

5.1 การคัดเลือกพืชที่เหมาะสมสำหรับใช้ย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอม

จากการศึกษาการคัดเลือกพืชสำหรับการย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอมโดยใช้ตัวอย่างพืช 5 ชนิด ได้แก่ ดอกกระเจี๊ยบแดง ดอกอัญชัน เปลือกแก้วมังกร เปลือกมังคุด และเปลือกมะเขือม่วง สกัดด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงมีประสิทธิภาพการย้อมติดสีโครโมโซมเป็นสีแดง และสามารถสังเกตพฤติกรรมของโครโมโซมได้ชัดเจนที่สุด

5.2 การศึกษาผลของสารสกัดจากพืชในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

จากการสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดง โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น กรดอะซีติก 20 % กรดไฮโดรคลอริก 20 % และเอธานอล 20 % พบว่า ตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดง คือ น้ำกลั่น ซึ่งสามารถย้อมติดสีโครโมโซม และสามารถสังเกตพฤติกรรมของโครโมโซมได้ชัดเจนที่สุด

5.3 การหาอัตราส่วนของพืชและตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสีธรรมชาติจากพืช

จากการสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำกลั่น โดยใช้อัตราส่วน 4 อัตราส่วน คือ 1:2, 1:4, 1:6 และ 1:8 (กรัม/มิลลิลิตร) พบว่า สารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่อัตราส่วน 1:2 ให้การติดสีที่มีความเข้มมากที่สุด และติดสีโครโมโซมชัดเจนที่สุด

5.4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย้อมสีโครโมโซมของสีย้อมจากพืชกับสีย้อมคาร์บอลฟุกซิน

จากการสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงโดยใช้น้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:2 นำมาทดสอบย้อมสีโครโมโซมของปลายรากหอมเปรียบเทียบกับการย้อมด้วยสีคาร์บอลฟุกซิน พบว่า สีคาร์บอลฟุกซินให้การติดสีที่มีความเข้มมากที่สุด ส่วนสารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงสามารถสังเกตพฤติกรรมของโครโมโซมได้ชัดเจนที่สุด ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย้อมโครโมโซมใกล้เคียงกับสีคาร์บอลฟุกซิน

5.5 การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาสีย้อมที่เหมาะสม

จากการเก็บรักษาสารสกัดสารสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่สกัดได้ในรูปผง และรูปของของเหลวโดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 ℃ เป็นเวลา 2, 4 และ 6 สัปดาห์ พบว่า สารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่เก็บในรูปผง และรูปของเหลวที่อุณหภูมิ 4 ℃ ทั้ง 2, 4 และ 6 สัปดาห์ สามารถย้อมติดสีโครโมโซม และสามารถสังเกตพฤติกรรมของโครโมโซมในระยะต่าง ๆ ของการแบ่งเซลล์ได้ชัดเจนที่สุด

6. อภิปรายผล

จากการศึกษาการคัดเลือกพืชสำหรับย้อมสีโครโมโซมปลายรากหอมจากตัวอย่างพืช 5 ชนิด ได้แก่ ดอกกระเจี๊ยบแดง ดอกอัญชัน เปลือกแก้วมังกร เปลือกมังคุด และเปลือกมะเขือม่วง พบว่า ดอกกระเจี๊ยบแดง สามารถให้สารสกัดสีที่ใช้ในการย้อมติดสี และสังเกตพฤติกรรมของโครโมโซมได้ชัดเจนที่สุด เนื่องจากในดอกกระเจี๊ยบแดงมีสารกลุ่มแอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการย้อมติดสีโครโมโซมได้เป็นอย่างดี จึงเป็นที่นิยม และนำมาใช้เป็นสีย้อมโครโมโซม ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ จินตหรา เล็กประยูร และคณะ (2553) ที่พบว่า สีที่สกัดจากหม่อนมาทำให้บริสุทธิ์สามารถย้อมติดสีโครโมโซมได้ดีที่สุด จากนั้นนำแอนโทไซยานินบริสุทธ์ที่ได้จากสารสกัดสีจากหม่อนมาศึกษาโครงสร้างทางเคมีด้วย NMR Spectrometer โดยค่าเคมิคัลชิฟท์ที่ได้บ่งบอกถึงจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) ในโครงสร้างแอนโทไซยานิน ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับมาตรฐานแล้ว สามารถสรุปได้ว่าเป็นแอนโทไซยานิน ในกลุ่มของไซยานิดิน (cyanidin)

เมื่อนำดอกกระเจี๊ยบแดงสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น กรดอะซีติก 20 % กรดไฮโดรคลอริก 20 % และเอธานอล 20 % พบว่า ภายหลังการย้อมโครโมโซมของปลายรากหอมด้วยสารสกัดสีที่สกัดด้วยน้ำกลั่น ให้ผลการย้อมติดสีและเห็นโครโมโซมชัดเจนกว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ แสดงว่า ความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการย้อมสีโครโมโซม เนื่องจากสารกลุ่มแอนโทไซยานินในดอกกระเจี๊ยบแดงมีโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวนฟีนิล เมื่อจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลเพิ่มขึ้นจะมีผลต่อสีแอนโทไซยานิน (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2553) ทำให้สารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงจางลง ซึ่งในการทดลองดอกกระเจี๊ยบแดงนอกจากมีแอนโทไซยานินซึ่งเป็นสารสีแล้ว ยังมีกรดอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดอะซิติก กรดซิตริก กรดมาลิก และกรดทาร์ทาริก (สถาบันการแพทย์แผนไทย, 2557) ดังนั้นการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์จึงมีผลต่อการติดสีของโครโมโซม นอกจากนี้ความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่แอนโทไซยานินละลายอยู่มีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของแอนโทไซยานิน โดยสารละลายที่มีความเป็นกรด-ด่าง 3.0 หรือต่ำกว่า เปลี่ยนจาก flavylium cation ซึ่งมีสีแดงไปเป็น carbinal ซึ่งไม่มีสี เมื่อความเป็นกรด-ด่าง 4.0-6.0 โดยพบว่า ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ดีที่สุด ที่สามารถย้อมโครโมโซม คือ pH 1.0-3.0 สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ สิริลักษณ์ ทิพย์ฤาตรี และคณะ (2555) ซึ่งพบว่า สารสกัดสีจากข้าวเหนียวดำ ผลหม่อน และครั่ง ที่สกัดด้วยกรดอะซิติก 45 % ความเป็นกรด-ด่าง 1.0-3.0 และเอทานอล 45 % ความเป็นกรด-ด่าง 1.0-2.0 นำสารสีที่สกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ ผลหม่อน และครั่ง ย้อมสีโครโมโซมพลับพลึงตีนเป็ด พบว่า สามารถย้อมติดสีโครโมโซมได้

ชัดเจน และสามารถตรวจสอบพฤติกรรมของโครโมโซมได้ในทุกระยะของการแบ่งเซลล์ นอกจากนี้ สิริลักษณ์ ทิพย์ฤาตรี (2549) ยังรายงานว่า สารสกัดสีจากข้าวเหนียวดำ และครั่ง ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ความเข้มข้น 3 ระดับ และปรับความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 1-7 ได้แก่ กรดอะซิติก 45 % ความเป็นกรด-ด่าง 1.18 บิวทานอล 45 % ความเป็นกรดด่าง 1.64 บิวทานอล 30 % ความเป็นกรด-ด่าง 1.69 และเอทานอล 60 % ความเป็นกรด-ด่าง 2.35 นำสีที่สกัดได้ย้อมรากที่กำลังมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซีส พบว่า สารสีจากธรรมชาติที่สกัดสามารถย้อมติดโครโมโซมได้ชัดเจน และยังมีรายงานว่า แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่พบได้ทั่วไปในแวคิวโอล และเซลล์เนื้อเยื่อชั้นนอกของดอก ผล และใบ ซึ่งการเตรียมตัวอย่างสำหรับสกัดจะบดจนละเอียดทำให้เซลล์ส่วนใหญ่ของตัวอย่างแตกออก และสารต่าง ๆ ที่อยู่ในเซลล์จะละลายออกมาได้ง่ายขึ้นตามหลักการ และวิธีการของกรมวิทยาศาสตร์บริการ (2553) นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยหลายเรื่องที่นิยมนำพืชมาสกัดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปย้อมโครโมโซมของเซลล์รากหอม และโครงสร้างอื่น ๆ ของเซลล์พืช พบว่า เห็นระยะการแบ่งเซลล์ และโครงสร้างของเซลล์ได้ชัดเจน เช่น ใบผีเสื้อราตรี ตามรายงานของ สายสุณีย์ ลิ้มชูวงศ์ และคณะ (2551) หัวบีท ตามรายงานของ ปัณณิกา ไชยนวล (2554) และฝาง ตามรายงานของ มานิต คิดอยู่ (2552)

นอกจากชนิดตัวทำละลายที่มีผลต่อการสกัดสารสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงแล้ว อัตราส่วนของน้ำหนักตัวอย่างต่อปริมาตรของตัวทำละลายยังมีผลต่อการสกัดสารสีได้เช่นกัน โดยพบว่า จากอัตราส่วน 1:2 (กรัม/มิลลิลิตร) มีประสิทธิภาพการติดสีและเห็นโครโมโซมชัดเจนที่สุด เมื่ออัตราส่วนตัวทำละลายเพิ่มขึ้นเป็น 1:4, 1:6 และ 1:8 (กรัม:มิลลิลิตร) สารสกัดสีที่ได้เมื่อนำมาย้อมสีโครโมโซมของปลายรากหอมจะทำให้การติดสีของโครโมโซมไม่ชัดเจน ดังนั้นในการเพิ่มตัวทำลายที่มากขึ้นจะทำให้สารสกัดสีที่สกัดได้มีความเจือจางมาก อัตราส่วน 1:2 จึงเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการนำมาใช้เป็นสีย้อมโครโมโซมเพื่อใช้ในการศึกษาและการเรียนการสอน

เมื่อนำสารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงมาเปรียบเทียบความสามารถในการย้อมสีโครโมโซมของปลายรากหอมกับการย้อมสีคาร์บอลฟุกซิน สารสีที่สกัดได้จากดอกกระเจี๊ยบแดงมีประสิทธิภาพการย้อมสีโครโมโซมใกล้เคียงกับสีคาร์บอลฟุกซิน สอดคล้องกับงานวิจัยของ ยุพเยาว์ คบพิมาย และศรัณย์ จีนะเจริญ (2551) ซึ่งพบว่า สีที่สกัดได้จากกะหล่ำปลีม่วงมีประสิทธิภาพในการย้อมสีโครโมโซมใกล้เคียงกับสีอะซีโต-ออร์ซีน ความเข้มข้น 1.67% นอกจากนี้ อัจฉราภรณ์ เกษรมาลา (2549) ยังรายงานว่า สารสกัดสีจากเปลือกแก้วมังกร สามารถใช้เป็นสีย้อมโครโมโซม และเมื่อเปรียบเทียบคุณภาพของสไลด์แล้วพบว่า สีย้อมจากเปลือกแก้วมังกรสามารถใช้แทนสีสังเคราะห์ได้ และจากการเก็บรักษาสารสกัดสีจากดอกกระเจี๊ยบแดงในรูปของเหลวที่อุณหภูมิ 4 ℃ เป็นระยะเวลา 2, 4 และ 6 สัปดาห์ เมื่อนำมาย้อมสี พบว่า สามารถย้อมติดสี และเห็นความชัดเจนของโครโมโซมใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามจากรายงานวิจัยของ ยุพเยาว์ คบพิมาย และศรัณย์ จีนะเจริญ (2551) พบว่า สามารถเก็บรักษาได้นาน 2 วันเท่านั้น และนอกจากนี้ เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ (2535) ยังรายงานว่า อุณหภูมิในการเก็บรักษาสีของสารสกัดควรเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ℃ จะให้ผลในการชะลอการลดลงของปริมาณแอนโทไซยานินในการสกัด อีกทั้งยังสามารถเก็บรักษาได้นานมากกว่าเดือน 4

จากงานวิจัยครั้งนี้จะเห็นได้ว่าการสกัดสีธรรมชาติจากพืชเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อใช้เป็นสีย้อมในการทดแทนสีสังเคราะห์ที่มีราคาแพง และอันตราย ซึ่งสถานศึกษาที่มีงบประมาณน้อยสามารถนำกระเจี๊ยบ หรือพืชชนิดอื่น ๆ มาใช้ประโยชน์เพื่อไว้ใช้ย้อมสีโครงสร้างของเซลล์พืช และโครโมโซมในการเรียนการสอนทางชีววิทยาได้

7. ข้อเสนอแนะ

7.1 ควรมีการนำพืชที่มีในท้องถิ่นมาใช้เพื่อนำไปพัฒนาเป็นสีย้อมโครโมโซมต่อไป

7.2 การนำพืชที่มีเฉพาะฤดูกาลมาใช้ ควรมีการเปรียบเทียบคุณภาพของสีสารสกัดจากทั้งตัวอย่างสด และตัวอย่างแห้งด้วยว่ามีความประสิทธิภาพเหมือนกัน หรือไม่

7.3 ควรหาวิธีการอื่น ๆ ในการเก็บรักษาสีของสารสกัดให้มีประสิทธิภาพได้นานต่อไป

8. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับสนับสนุนงบประมาณรายได้ จากมหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐมงบประมาณ 2556 ภายใต้โครงการวิจัยสถาบันบูรณาการงานวิจัยกับงานประจำ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ชลีรัตน์ พยอมแย้ม และอาจารย์สาขาชีววิทยาที่ให้คำแนะนำ ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐมที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ ขอขอบคุณบุคลากรสาขาวิชาชีววิทยา สาขาวิชาเคมี สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร และนักศึกษาสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐมที่ให้ความร่วมมือ และช่วยทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์บริการ. (2553). **แอนโทไซยานิน.** กรุงเทพมหานคร: สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์. (2535). **การสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน *Clitoria ternatea* L.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จินตหรา เล็กประยูร นวลจันทร์ มัจฉริยกุล และศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม. (2553). สารสกัดแอนโทไซยานินจากพืชเพื่อใช้เป็นสีย้อมโครโมโซม: แหล่งที่มา ความเข้มข้น และโครงสร้างของสารเคมี. ใน **เอกสารประกอบการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 7.** 7-8 ธันวาคม 2553, หน้า 1615-1623.

นิธิยา รัตนาปนนท์. (2553). **เคมีอาหาร.** กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.

ปัณณิกา ไชยนวล. (2554). **การสกัดเบทาเลนจากพืชบางชนิดสำหรับการย้อมตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การสอนชีววิทยา). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มานิต คิดอยู่. (2552). สีย้อมธรรมชาติจากฝางสำหรับการศึกษาเซลล์และเนื้อเยื่อพืช. **วารสารพฤกษศาสตร์ไทย**, **1**(2) หน้า 61-70.

ยุพเยาว์ คบพิมาย และศรัณย์ จีนะเจริญ. (2551). การย้อมโครโมโซมด้วยสารสีธรรมชาติ. ใน **รายงานการประชุมทางวิชาการ ประจำปี 2551.** ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 4-5 ธันวาคม 2551, หน้า 416-422.

สถาบันการแพทย์แผนไทย. (2557). **กระเจี๊ยบแดง.** ค้นเมื่อ 25 สิงหาคม 2557จาก http://www.ittm-old.dtam.moph.go.th/product_champin/herb2.htm

สายสุณีย์ ลิ้มชูวงค์ ชาริณี สัมพันธารักษ์ และสมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ. (2551). การย้อมสีโครโมโซมรากหอมแดงด้วยสีสกัดจากพืช. **นเรศวรวิจัย ครั้งที่ 4.** พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.

สิริลักษณ์ ทิพย์ฤาตรี. (2549). **การเปรียบเทียบการติดสีโครโมโซมของเซลล์พืชด้วยข้าวเหนียวดำ (*Oryza sativa* L.) และครั่ง (*Laccifer lacca* Kerr) ในตัวทำละลายความเข้มข้น และระดับความเป็นกรดด่างที่ต่างกัน.** ขอนแก่น: ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สิริลักษณ์ ทิพย์ฤาตรี ประวีรณ์ สุพรรณอ่วม และอลงกลด แทนออมทอง. (2555). การใช้สารสีจากธรรมชาติเพื่อศึกษาโครโมโซมพืช. **จดหมายข่าวศูนย์วิจัยอนุกรมวิธานประยุกต์. 9**(2) พฤษภาคม-สิงหาคม, หน้า 2-3.

อัจฉราภรณ์ เกษรมาลา. (2549). **การสกัดสีจากแก้วมังกรและหว้าเพื่อใช้เป็นสีย้อมโครโมโซมพืช.** ปัญหาพิเศษ สาขาเคมี. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม.