

## การประยุกต์ใช้และประเมินประสิทธิภาพสี้อมจากสารสกัดธรรมชาติรงควัตถุกลุ่มโพลีฟีนอล เพื่อทดแทนสี้อมสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการระดับมัธยมศึกษา

พิชณุตม์ วงศ์วรรณ, อิศริย์ เลิศประเสริฐ, อนุสรา สังข์ผาด, ภาพร สิทธิบุตร, ญาณกร วิฑูรย์เสถียร,  
เทิดศักดิ์ สกกุลสุข, และ จิราภรณ์ แสงประทุม\*

โรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ตำบลนครปฐม อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย

\*Corresponding author: jiraporns@webmail.npru.ac.th

### บทคัดย่อ

การย้อมสีเนื้อเยื่อพืชเพื่อการศึกษาในระดับมัธยมศึกษายังคงพึ่งพาสี้อมสังเคราะห์จากสารเคมีเป็นหลัก ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมทางอ้อมจากกระบวนการผลิต การใช้งาน และการกำจัดของเสีย งานวิจัยนี้จึงประเมินศักยภาพของสี้อมธรรมชาติที่รงควัตถุกลุ่มโพลีฟีนอล (Polyphenol group) ในฐานะทางเลือกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยเปรียบเทียบกับสี้อมสังเคราะห์ Safranin O ที่ใช้แพร่หลายสำหรับการย้อมเนื้อเยื่อพืช โดยทำการศึกษาสารสกัดจากพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Caesalpinia sappan* L., *Vaccinium* spp. และ *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* แล้วนำไปย้อมเนื้อเยื่อบริเวณลำต้นของ *Oenanthe javanica* จากนั้นประเมินการติดสีของโครงสร้างเนื้อเยื่อ ได้แก่ epidermis, collenchyma, sclerenchyma, parenchyma และ vascular tissue ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสง (40x) ด้วยมาตราส่วนเชิงคุณภาพ 3 ระดับ (+ ถึง +++) ควบคู่กับการวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของรงควัตถุด้วยโครมาโทกราฟีกระดาษ (ค่า  $R_f$ ) และวัดความเข้มสีเชิงปริมาณด้วย ImageJ จากค่าเฉลี่ย RGB และดัชนีความแดง (Redness index)

ผลการศึกษาพบว่า *Caesalpinia sappan* L. และ *Vaccinium* spp. ให้การติดสีสม่ำเสมอและเข้มสูง โดยปรากฏระดับ +++ ในเนื้อเยื่อโครงสร้าง Epidermis, Sclerenchyma, และ Parenchyma ผลการวิเคราะห์ค่า  $R_f$  พบสูงที่สุดในสารสกัดจาก *C. sappan* (0.70) และให้ดัชนีความแดงสูงสุด (104.8675) จากสกัดสกัดทั้งหมด รองลงมาคือ *Vaccinium* spp. (95.0775) และ *B. oleracea* (86.5835) ตามลำดับ ในขณะที่ Safranin O ให้การติดสีระดับ +++ ในโครงสร้าง Parenchyma เท่านั้น แต่มีค่า  $R_f$  (0.95) ที่สูงกว่าสารสกัดทุกชนิด แต่อย่างไรก็ตาม Safranin O ได้ผลการวิเคราะห์ดัชนีความแดง (78.8945) ที่ต่ำกว่าทุกสารสกัด

ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าสี้อมธรรมชาติ โดยเฉพาะสารสกัดจาก *C. sappan* มีศักยภาพเป็นสี้อมเนื้อเยื่อพืชได้ดี สามารถใช้ทดแทนสี้อมสังเคราะห์สำหรับการเรียนการสอนระดับมัธยมศึกษา รวมถึงเป็นทางเลือกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่ช่วยสนับสนุนการลดการใช้สารเคมีได้

คำสำคัญ: สี้อมธรรมชาติ / Polyphenol / Safranin O / Image J / Paper Chromatography

## Application and Performance evaluation of Polyphenol-based natural dye extracts as Substitutes for Synthetic stains in Secondary school laboratories

Pitchayut Wongwanna, Issaree Lertprasert, Anusaba Sungpad, Phakkaphorn Sittibut, Yanakorn Witoonsatian, Teardsak Skunsuk, and Jiraporn Sangpratun\*

Demonstration School of Nakhon Pathom Rajabhat University, Thailand

\*Corresponding author: jiraporns@webmail.npru.ac.th

### Abstract

Plant tissue staining for secondary education still relies primarily on synthetic chemical dyes, which may indirectly contribute to environmental impacts through their production, use, and waste disposal. This study, therefore, evaluated the potential of natural dyes containing polyphenol pigments as an environmentally friendly alternative, in comparison with Safranin O, a widely used synthetic stain for plant tissues.

Extracts from three plant sources *Caesalpinia sappan* L., *Vaccinium* spp. and *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* were prepared and used to stain stem tissues of *Oenanthe javanica*. Staining performance of key tissue structures, including the epidermis, collenchyma, sclerenchyma, parenchyma, and vascular tissue, was examined under a light microscope (40 $\times$ ) using a three-level qualitative scale (+ to +++). In parallel, pigment migration was assessed using paper chromatography ( $R_f$  values), and color intensity was quantified in ImageJ based on mean RGB values and a redness index.

The results showed that *C. sappan* L. and *Vaccinium* spp. produced uniform and strong staining, reaching a +++ level in the epidermis, sclerenchyma, and parenchyma.  $R_f$  analysis revealed the highest value among the extracts for *C. sappan* (0.70), which also yielded the highest redness index (104.8675), followed by *Vaccinium* spp. (95.0775) and *B. oleracea* (86.5835), respectively. In contrast, Safranin O exhibited +++ staining only in the parenchyma, and although it showed a higher  $R_f$  value (0.95) than all extracts, its redness index (78.8945) was lower than that of every natural extract.

Overall, this study indicates that natural dyes particularly the *C. sappan* extract have strong potential as effective plant tissue stains and could serve as substitutes for synthetic dyes in secondary school teaching laboratories. In addition, they represent an environmentally friendly option that may help reduce chemical use in educational settings.

**Keywords:** Natural dyes / Polyphenol / Safranin O / Image J / Paper Chromatography

## 1. บทนำ

ในการจัดการเรียนการสอนรายวิชาชีววิทยาระดับมัธยมศึกษาในหัวข้อพืช การตัดชิ้นเนื้อเพื่อศึกษากายวิภาคของพืชเป็นกิจกรรมปฏิบัติการที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เพื่อช่วยให้นักเรียนสังเกตและจำแนกระบบเนื้อเยื่อสำคัญ ได้แก่ Epidermis, Parenchyma, Collenchyma, Sclerenchyma และ Vascular tissue ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง [1] อย่างไรก็ตาม เนื้อเยื่อพืชจำนวนมากมีลักษณะโปร่งแสง ทำให้การแยกแยะรายละเอียดของโครงสร้างทำได้ไม่ชัดเจนหากไม่มีการเพิ่มความเปรียบต่าง ดังนั้น การย้อมสีจึงเป็นขั้นตอนสำคัญที่ช่วยให้โครงสร้างเนื้อเยื่อปรากฏเด่นชัด และสนับสนุนการสังเกตทางกายวิภาคของพืชได้อย่างถูกต้องยิ่งขึ้น

ในห้องปฏิบัติการเพื่อการเรียนการสอน สีย้อมสังเคราะห์เชิงพาณิชย์ เช่น Safranin O ยังคงเป็นทางเลือกหลักในการย้อมเนื้อเยื่อ เนื่องจากสามารถแยกความแตกต่างของโครงสร้างเนื้อเยื่อพืชได้ชัดเจน จึงเหมาะสมต่อการใช้เป็นมาตรฐานในการสังเกตทางกายวิภาคของพืช [1, 2] อย่างไรก็ตาม การพึ่งพาสีย้อมสังเคราะห์อย่างต่อเนื่องอาจก่อให้เกิดข้อกังวลด้านความปลอดภัยของผู้ใช้ ซึ่งอาจก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังได้ รวมไปถึงข้อจำกัดด้านการจัดการของเสียอันตรายภายหลังการใช้งานโดยเฉพาะใช้ในพื้นที่ของโรงเรียนที่ยังมีข้อจำกัดด้านการจัดการของเสียสู่สิ่งแวดล้อม ประเด็นดังกล่าวสอดคล้องกับเป้าหมายการพัฒนาที่ยั่งยืน (SDGs) เป้าหมายที่ 12 ซึ่งมุ่งเน้นการจัดการสารเคมีและของเสียอย่างถูกต้องตามหลักสิ่งแวดล้อม และลดการปล่อยสารเคมีสู่สิ่งแวดล้อม [3] ด้วยเหตุนี้ สีย้อมจากธรรมชาติจึงได้รับความสนใจในฐานะทางเลือกสำหรับการพัฒนาสีย้อมเนื้อเยื่อพืช

สารพฤกษเคมีกลุ่มโพลีฟีนอล (Polyphenol group) เป็นกลุ่มที่มีความโดดเด่นด้านองค์ประกอบรงควัตถุสารสี (pigment) เช่น แอนโทไซยานิน (anthocyanins) และสารสีบราซิลิน (brazilin) ซึ่งพบได้ในพืชหลายชนิด สารกลุ่มดังกล่าวมีศักยภาพในการลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ เพิ่มความปลอดภัยในการใช้งาน และสนับสนุนการใช้ทรัพยากรอย่างยั่งยืน อีกทั้งมีรายงานการประยุกต์ใช้ในการย้อมตัวอย่างพืชมาแล้วในหลายงานวิจัย [4] อย่างไรก็ตาม แม้มีรายงานการใช้สีธรรมชาติ แต่ยังมีข้อมูลจำกัดในบริบทการนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการระดับมัธยมศึกษา รวมถึงการประเมินผลเชิงปริมาณร่วมกับการวิเคราะห์ความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ

ดังนั้น การศึกษานี้จึงมุ่งประเมินประสิทธิภาพและความสามารถในการย้อมติดสีของสีย้อมธรรมชาติรงควัตถุกลุ่ม polyphenol ในเนื้อเยื่อพืชลำต้น *Oenanthe javanica* (ผักชีล้อม) ในโครงสร้างเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ Epidermis, Parenchyma, Collenchyma, Sclerenchyma และ Vascular tissue ด้วยมาตราส่วนเชิงคุณภาพ 3 ระดับ (+ ถึง +++)

## 2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อประเมินประสิทธิภาพและความสามารถในการย้อมติดสีของสีย้อมธรรมชาติรงควัตถุกลุ่ม polyphenol ในเนื้อเยื่อพืชลำต้น *Oenanthe javanica* (ผักชีล้อม) ในโครงสร้างเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ Epidermis, Parenchyma, Collenchyma, Sclerenchyma และ Vascular tissue ด้วยมาตราส่วนเชิงคุณภาพ 3 ระดับ (+ ถึง +++)

2. เพื่อศึกษาการแยกตัวและความสามารถในการเคลื่อนที่ของรงควัตถุในสีย้อมธรรมชาติรงควัตถุกลุ่ม polyphenol ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีกระดาษ

3. เพื่อประเมินและเปรียบเทียบความเข้มของสีย้อมธรรมชาติรงควัตถุกลุ่ม polyphenol ภายหลังจากการย้อมติดสีของเนื้อเยื่อพืชในเชิงปริมาณ ด้วยโปรแกรม ImageJ

### 3. ขอบเขตของการศึกษา

การศึกษานี้มุ่งเน้นการประเมินประสิทธิภาพของสีย้อมธรรมชาติจากพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Caesalpinia sappan* L. (แก่นฝาง), *Vaccinium* spp. (บลูเบอร์รี่) และ *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* (กะหล่ำปลีม่วง)

1. สีย้อมที่ศึกษาใช้สารสกัดธรรมชาติจากพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Caesalpinia sappan* L. (แก่นฝาง), *Vaccinium* spp. (บลูเบอร์รี่) และ *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* (กะหล่ำปลีม่วง)
2. การศึกษาและสังเกตกายวิภาคพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscopy) ที่กำลังขยาย 40x
3. เกณฑ์การวัดและประเมินผลประสิทธิภาพการติดสี แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่
  - 3.1. ใช้มาตราส่วนเชิงคุณภาพของความเข้มการติดสีในโครงสร้างเนื้อเยื่อ 5 ชนิด แบ่งเป็น 3 ระดับ (+ ถึง +++)
  - 3.2. หาค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ของรงควัตถุ (Retention factor :  $R_f$ ) ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ
  - 3.3. วัดความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ คำนวณหาค่าเฉลี่ย RGB และดัชนีความแดง (Redness index)

### 4. วิธีการศึกษา

#### 4.1 การเตรียมสารสกัดสีย้อมธรรมชาติ

การศึกษานี้ใช้พืช 3 ชนิด ได้แก่ แก่นฝาง เปลือกผลบลูเบอร์รี่ และกะหล่ำปลีม่วง โดยชั่งตัวอย่างชนิดละ 10 กรัม แล้วเติม 70% Ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 กรัมของสารตัวอย่าง : 10 มิลลิลิตรของตัวทำละลาย) (ดัดแปลงจากงานวิจัย [5]) จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยถ้วยบด เมื่อบดเสร็จแล้วนำเฉพาะส่วนน้ำที่ถูกรับรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No.1) จะได้สีย้อมสารสกัดธรรมชาติ

#### 4.2 การย้อมสี

สำหรับการเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อ ใช้ลำต้นสดของผักชีล้อม (*Oenanthe javanica*) ตัดเป็นชิ้นตามขวางบาง ๆ ตัดบริเวณที่ระยะห่างเหนือโคนรากขึ้นมา 3 เซนติเมตร ด้วยวิธีตัดด้วยมือ (free hand section) แล้ววางบนสไลด์ที่สะอาด ทำการกำหนด 3 กลุ่มทดลอง ได้แก่ กลุ่มควบคุมไม่ย้อมสี (negative control) กลุ่มที่ย้อมด้วย Safranin O (1% w/v) (positive control) และกลุ่มที่ย้อมด้วยสารสกัดจากธรรมชาติของแต่ละพืช หลังจากนั้นทำการหยดสีย้อมให้ท่วมชิ้นเนื้อเยื่อ ทิ้งไว้ 1 นาที เมื่อครบเวลาใช้ดรอปเป็ดูดสีย้อมส่วนเกินออก แล้วหยดด้วยน้ำกลั่นเพื่อชะสีย้อมส่วนเกินออก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย cover slip และนำไปสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus CX-30) ที่เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 40x โดยตั้งค่ารูรับแสงที่ 0.75x และปรับความสว่างสูงสุดในทุกการทดลอง ทำการสังเกตการณ์ติดสีของเนื้อเยื่อแต่ละโครงสร้าง ได้แก่ Epidermis, Parenchyma, Collenchyma, Sclerenchyma และ Vascular tissue ประเมินการติดสีย้อมด้วยมาตราส่วนเชิงคุณภาพ ได้แก่ ติดสีน้อย (+) ติดสีปานกลาง (++) และติดสีมาก (+++) หากไม่พบการติดสีอย่างชัดเจนบันทึกเป็น “-” หลังจากนั้นทำการบันทึกภาพไว้สำหรับการสังเกตและการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ

#### 4.3 โครมาโทกราฟีกระดาษและการหาค่า $R_f$

นำสีย้อมที่สกัดได้ มาทำโครมาโทกราฟีกระดาษ โดยตัดกระดาษโครมาโทกราฟีขนาด 3\*5 ซม. ต่อ 1 ตัวอย่างของสารสกัดสีย้อม ทำการเตรียมกระดาษโครมาโทกราฟี โดยใช้ดินสอดสีขีดเส้นฐาน (baseline) ขอบล่างและขอบบนของกระดาษโครมาโทกราฟี ระยะห่าง 1 ซม. จากขอบ หลังจากนั้นนำสีย้อม spot ลงบนกระดาษบนเส้นฐานจำนวน 1 ครั้ง และปล่อยให้แห้ง (กำหนดให้ปริมาตร 1 spot = 10  $\mu$ L) ใส่ลงในถังสำหรับทำโครมาโทกราฟีที่บรรจุด้วยตัวทำละลาย 70% Ethanol โดยควบคุมระดับตัวทำละลายให้อยู่ต่ำกว่าเส้นฐาน หลังจากตัวทำละลายเคลื่อนที่จนถึงเส้นฐานตัวทำละลายขอบบน (Solvent front) เมื่อเสร็จแล้วนำ

กระดาษโครมาโทกราฟีออกและฝังให้แห้ง วัดระยะทางที่แถบสีหลักเคลื่อนที่ และระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ โดยทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นนำค่าที่ได้คำนวณหาค่า R<sub>f</sub> ตามสมการ:

$$R_f = \text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่} / \text{ระยะทางตัวทำละลายเคลื่อนที่}$$

#### 4.4 การวิเคราะห์ค่า RGB และดัชนีความแดง (Redness index) ด้วยโปรแกรม ImageJ

นำภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ โดยนำเข้าภาพและกำหนดบริเวณขอบเขตเนื้อเยื่อที่สนใจทั้งหมด (region of interest; ROI) ให้ให้พื้นที่ใกล้เคียงกันสำหรับทุกตัวอย่าง วัดค่าเฉลี่ยความเข้มของพิกเซลในช่องสีแดง (R) เขียว (G) และน้ำเงิน (B) โดยทำการวิเคราะห์จากกลุ่มตัวอย่างละ 3 ภาพ จากนั้นนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าดัชนีความแดง (redness index) ตามสมการ:

$$\text{Redness} = R - (G + B)/2$$

#### 4.5 สถิติที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษานี้ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพรรณนา โดยประเมินผลการติดสีของเนื้อเยื่อพืชด้วยมาตราส่วนเชิงคุณภาพ 3 ระดับ ได้แก่ +, ++ และ +++ (ดัดแปลงจากงานวิจัย [5]) ตามเกณฑ์ที่กำหนด โดยที่ “-” แสดงถึงไม่พบการติดสี สำหรับข้อมูลเชิงปริมาณการวิเคราะห์ข้อมูลผลการแยกรงควัตถุด้วยการหาค่าเฉลี่ย R<sub>f</sub> จากการโครมาโทกราฟีกระดาษ หาค่าเฉลี่ยความเข้มสีในช่องสีแดง เขียว และน้ำเงิน (RGB) และหาค่าดัชนีความแดง (redness index) จากโปรแกรม ImageJ โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel ในการคำนวณวิเคราะห์ข้อมูล

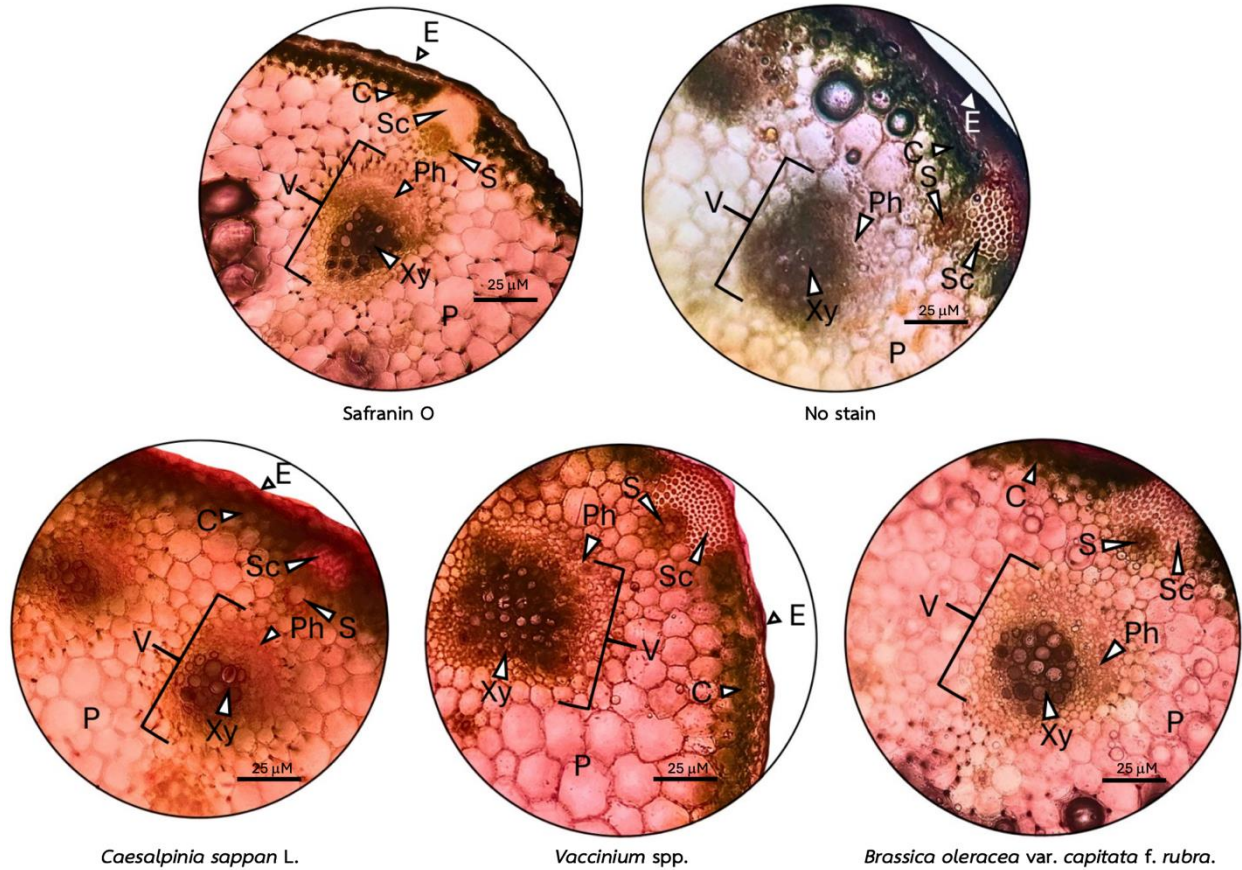
### 5. ผลการศึกษา

จากการศึกษาประสิทธิภาพการย้อมติดสีของสารสกัดรงควัตถุกลุ่ม polyphenol ใช้พืช 3 ชนิด ได้แก่ *Caesalpinia sappan* L. (แก่นฝาง), *Vaccinium* spp. (บลูเบอร์รี่) และ *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* (กะหล่ำปลีม่วง) ได้ผลการศึกษา ดังนี้

#### 5.1 ผลการศึกษาหลังการย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยสีย้อมจากพืชต่างชนิด

ผลการศึกษาพบว่า ภายหลังจากการย้อมด้วยสีย้อม ได้แก่ สารสกัดสีย้อมธรรมชาติ (*Caesalpinia sappan* L., *Vaccinium* spp. และ *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) สีย้อมเชิงพาณิชย์ (Safranin O) และ ชุดควบคุมที่ไม่ย้อมสี โดยการประเมินเชิงคุณภาพของความสามารถในการติดสีในเนื้อเยื่อแต่โครงสร้าง พบว่าสารสกัดสีย้อมจาก *Vaccinium* spp. และ *C. sappan* L. ให้ผลการติดสี เต็มชัดและสม่ำเสมอมากที่สุด โดยมีความเข้มการติดสีระดับสูง (+++) ในโครงสร้าง Epidermis Sclerenchyma Parenchyma และ Vascular tissue ขณะที่ Collenchyma มีความเข้มอยู่ในระดับปานกลาง (++) เมื่อพิจารณาสีย้อมธรรมชาติชนิดอื่น พบว่า *Brassica oleracea* มีการติดสีระดับสูง (+++) ใน Epidermis Sclerenchyma และ Parenchyma แต่มีการติดสีระดับต่ำ (+) ใน Collenchyma และ Vascular tissue สำหรับสีย้อมเชิงพาณิชย์ Safranin O พบ

การติดสีระดับปานกลาง (++) ใน Epidermis และ Sclerenchyma และติดสีระดับสูง (+++) ใน Parenchyma อย่างไรก็ตาม การติดสีใน Collenchyma และ Vascular tissue อยู่ในระดับต่ำ (+) ทั้งนี้ ชุดควบคุมที่ไม่ย้อมสีไม่พบการติดสีที่สังเกตได้ ในทุกส่วนของเนื้อเยื่อดังรูปที่ 1 แสดงภาพตัวแทนของชิ้นเนื้อเยื่อที่สังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง (กำลังขยาย 40x) และแสดงผลการประเมินความสามารถในการติดสีย้อม ดังตารางที่ 1



รูปที่ 1 ภาพถ่ายตัวแทนของชิ้นเนื้อเยื่อภายหลังการย้อมด้วยสีย้อมชนิดต่าง ๆ โดยตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงที่กำลังขยาย 40x ได้แก่ (A) Safranin O, (B) No stain, (C) สารสกัดจาก *Caesalpinia sappan* L., (D) สารสกัดจาก *Vaccinium* spp. และ (E) สารสกัดจาก *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*. (E; Epidermis, C; Collenchyma, Sc; Sclerenchyma, V; Vascular tissue, P; Phloem, Xy; Xylem, P; Parenchyma, S; Secretory duct)

ตารางที่ 1 การประเมินความสามารถในการติดสีของสีย้อมในแต่ละบริเวณของเนื้อเยื่อลำต้น *Oenanthe javanica*

ตัวอย่างที่ใช้	ประเภทเนื้อเยื่อพืช				
	Epidermis	Collenchyma	Sclerenchyma	Parenchyma	Vascular
<i>Brassica oleracea</i> var.	+++	+	+++	+++	+
<i>Caesalpinia sappan</i> L.	+++	++	+++	+++	+++
<i>Vaccinium</i> spp.	+++	++	+++	+++	+++
Safranin O	++	+	++	+++	+
No stain	-	-	-	-	-

\*เกณฑ์การประเมินความสามารถในการติดสี: ติดสีมากที่สุด +++ , ติดสีปานกลาง ++, ติดสีต่ำ +, ไม่พบการติดสี -

## 5.2 ผลการศึกษาการแยกรงควัสดุสีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ

ผลการศึกษา ระยะเวลาเคลื่อนที่ และค่า Retention factor ( $R_f$ ) ของตัวอย่างสีย้อมธรรมชาติแต่ละชนิด โดยพบว่า *Caesalpinia sappan* L. มีค่า  $R_f$  สูงที่สุด ( $R_f = 0.70$ ) รองลงมาคือ *Vaccinium* spp. ( $R_f = 0.66$ ) ขณะที่ *Brassica oleracea* มีการเคลื่อนที่ในระดับปานกลาง ( $R_f = 0.44$ ) ผลดังกล่าวสะท้อนให้เห็นถึงความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของรงควัตถุภายใต้สภาวะโครมาโทกราฟีเดียวกัน โดยรงควัตถุที่ได้จาก *Caesalpinia sappan* L. แสดงการเคลื่อนที่มากที่สุด แสดงผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ระยะเวลาเคลื่อนที่และค่า  $R_f$  ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบกระดาษของสารสกัดสีย้อมธรรมชาติ

ตัวอย่างที่ใช้	ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้ (cm)	ค่า $R_f$
<i>Brassica oleracea</i> var.	2.2	0.44
<i>Caesalpinia sappan</i> L.	3.5	0.7
<i>Vaccinium</i> spp.	3.3	0.66
Safranin O	4.8	0.95

## 5.3 ผลการศึกษาความเข้มของสีโดยใช้โปรแกรม ImageJ

ทำการวิเคราะห์ความเข้มของสีเชิงปริมาณโดยใช้โปรแกรม ImageJ ด้วยการวัดค่าเฉลี่ยความเข้มของพิกเซล (mean pixel intensity) และพื้นที่ของบริเวณที่สนใจ (ROI area) สำหรับช่องสีแดง (R) เขียว (G) น้ำเงิน (B) ของแต่ละตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์พบว่า ค่าเฉลี่ยความเข้มในช่องสีแดง (red-channel mean intensity) สูงที่สุดใน *Brassica oleracea* (201.536) และ Safranin O (197.094) ดังตารางที่ 3 จากการคำนวณ พบว่าดัชนีความแดง (redness index) (ตารางที่ 4) จากค่าดัชนีดังกล่าวพบว่า *Caesalpinia sappan* L. ให้สัญญาณความแดงสูงที่สุด (104.8675) รองลงมาคือ *Vaccinium* spp. (95.0775) และ *Brassica oleracea* (86.5835) ส่วน Safranin O ให้ค่าดัชนีความแดงอยู่ในระดับปานกลาง (78.8945) สำหรับชุดควบคุมที่ไม่ย้อมสี (No stain) มีค่าดัชนีความแดงต่ำ (28.3435)

ตารางที่ 3 ผลการวัดค่าเฉลี่ยความเข้มของสีและพื้นที่ ROI ด้วยโปรแกรม ImageJ

สี	สารตัวอย่าง	พื้นที่	ค่าเฉลี่ย
Green	<i>Brassica oleracea</i> var.	39428	119.873
	<i>Caesalpinia sappan</i> L.	34977	96.458
	<i>Vaccinium</i> spp.	35124	96.657
	Safranin O	31250	126.86
	No strain	30936	134.87
Red	<i>Brassica oleracea</i> var.	39602	201.536
	<i>Caesalpinia sappan</i> L.	34138	188.504
	<i>Vaccinium</i> spp.	35142	187.694
	Safranin O	31256	197.094
	No strain	30792	159.082

ตารางที่ 3 ผลการวัดค่าเฉลี่ยความเข้มของสีและพื้นที่ ROI ด้วยโปรแกรม ImageJ (ต่อ)

สี	สารตัวอย่าง	พื้นที่	ค่าเฉลี่ย
Blue	<i>Brassica oleracea</i> var.	39232	110.032
	<i>Caesalpinia sappan</i> L.	34146	70.815
	<i>Vaccinium</i> spp.	36466	88.576
	Safranin O	31270	109.539
	No stain	30934	126.607

ตารางที่ 4 ค่าการวิเคราะห์ดัชนีความแดง (Redness index)

สารตัวอย่าง	ค่าดัชนีความแดง
<i>Brassica oleracea</i> var.	86.5835
<i>Caesalpinia sappan</i> L.	104.8675
<i>Vaccinium</i> spp.	95.0775
Safranin O	78.8945
No stain	28.3435

## 6. อภิปรายผลการศึกษา

ผลการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่า สารสกัดจากพืชธรรมชาติสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นสีย้อมเนื้อเยื่อพืชในห้องปฏิบัติการระดับมัธยมศึกษาได้ อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพในการย้อมแตกต่างกันในเชิงคุณภาพตามชนิดพืชและองค์ประกอบของสารสีที่อยู่ในสารสกัดแต่ละชนิด เมื่อพิจารณาผลเชิงปริมาณจากการวิเคราะห์ภาพด้วยโปรแกรม ImageJ พบว่า *Caesalpinia sappan* L. (แก่นฝาง) ให้ค่า redness index สูงที่สุด (104.8675) รองลงมาคือ *Vaccinium* spp. (บลูเบอร์รี่) และ *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* (กะหล่ำปลีม่วง) ผลดังกล่าวสะท้อนว่า สีย้อมจากธรรมชาติสามารถใช้ทดแทนสีย้อมสังเคราะห์ได้โดยให้ประสิทธิภาพที่ดี

ผลการสังเกตโครงสร้างเนื้อเยื่อหลังการย้อมสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงให้เห็นว่า สารสกัดสีจาก *Caesalpinia sappan* L. (แก่นฝาง) และ *Vaccinium* spp. (บลูเบอร์รี่) สามารถย้อมติดได้ในทุกโครงสร้างของเนื้อเยื่อในระดับดี (+++) ถึงแม้ *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* (กะหล่ำปลีม่วง) จะย้อมติดสีโครงสร้างได้น้อยกว่า แต่ทั้ง 3 ชนิดนี้ ให้ผลการย้อมสีที่ดีกว่าสีย้อมสังเคราะห์ Safranin O นอกจากนี้การย้อมติดสีมีความสัมพันธ์กับเนื้อเยื่อพืชโดยตรง จากผลที่ได้ เนื้อเยื่อ Parenchyma เป็นบริเวณที่ติดสีได้ชัดเจนกว่าบริเวณอื่น ขณะที่ epidermis sclerenchyma และ Vascular tissue มีแนวโน้มติดสีอ่อนกว่า หรือมีความสม่ำเสมอในการติดสีต่ำกว่าในบางสารสกัด และ collenchyma ให้การติดสีต่ำที่สุด รูปแบบดังกล่าวสอดคล้องกับหลักการทางพฤกษศาสตร์ที่เนื้อเยื่อซึ่งมีผนังเซลล์หนาและมีการลิกนินฟิเคชันสูง มักแสดงการติดสีได้เด่นกว่าเนื้อเยื่อผนังบาง โดยเฉพาะเมื่อใช้สารสีที่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับองค์ประกอบของผนังเซลล์ได้ดี [6] นอกจากนี้การติดสีของสารสกัดแก่นฝางสัมพันธ์กับรงควัตถุหลักกลุ่ม brazilin ซึ่งสามารถถูกออกซิไดซ์ไปเป็น brazilein ที่ให้สีแดงเด่นชัด [7] ขณะที่รงควัตถุแอนโทไซยานินมีรายงานความเสถียรต่ำและไวต่อ pH แสง อุณหภูมิ และออกซิเจน [8] ดังนั้นสีจากแก่นฝางจึงมีแนวโน้มให้ความคงตัวในการใช้งานได้ดีกว่าแอนโทไซยานินภายใต้บางสภาวะการทดลองซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ยังไม่ได้ตรวจสอบกลไกการจับของสารสีในระดับโมเลกุล การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาและประเมินผลเบื้องต้น

ในกรณีของบลูเบอร์รี่ (*Vaccinium* spp.) และกะหล่ำปลีม่วง (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) ผลการย้อมที่ได้สามารถอธิบายได้บนพื้นฐานของสารสีหลักกลุ่ม anthocyanins ซึ่งเป็นรงควัตถุที่มีความไวต่อสภาพแวดล้อมอย่างมาก โดยเฉพาะค่า pH อุณหภูมิ แสง และออกซิเจน [8]

ผลการแยกสารด้วย paper chromatography ยังช่วยสนับสนุนข้อค้นพบจากการย้อมและการวิเคราะห์ภาพ โดยพบว่ากลุ่มสารสกัดธรรมชาติมีค่า  $R_f$  แตกต่างกัน โดยที่สารสกัดจาก *Caesalpinia sappan* L. (แก่นฝาง) มีค่าสูงที่สุด (0.70) ขณะที่ Safranin O มีค่า  $R_f$  สูงกว่า (0.95) ความแตกต่างของค่า  $R_f$  นี้สะท้อนความแตกต่างของสมบัติทางเคมีของสารสี เช่น ความมีขี้้วและแรงยึดเหนี่ยวต่อเฟสอยู่กับที่ในระบบตัวทำละลายที่ใช้ ซึ่งสอดคล้องกับข้อสังเกตที่ว่าสารสกัดจากพืชแต่ละชนิดให้ความเข้มข้นและรูปแบบการติดสีต่อเนื้อเยื่อต่างกัน ซึ่งบ่งชี้ว่า Safranin O สามารถละลายได้ดีในสารละลาย 70% ethanol และสามารถเคลื่อนที่ได้ดีกว่าสารสกัด ซึ่งสารสกัดมีปัจจัยหลายอย่างเช่น ความเข้มข้นของสาร ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด เป็นต้น [9] ผลการวิเคราะห์ค่าดัชนีความแดง พบว่ามีค่าสูงใน *Caesalpinia sappan* L. (แก่นฝาง), *Vaccinium* spp. (บลูเบอร์รี่), และ *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* (กะหล่ำปลีม่วง) ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 ชนิดให้ค่าดัชนีความเป็นสีแดงสูงกว่าสีย้อมสังเคราะห์ Safranin O ซึ่งให้เห็นว่า จากการที่แก่นฝางมีสารกลุ่ม brazilin/brazilein ซึ่งให้โทนแดงและเปลี่ยนแปลงตาม pH ขณะที่บลูเบอร์รี่และกะหล่ำปลีม่วงอุดมไปด้วยสารกลุ่ม anthocyanins แม้สารสกัดจะมีค่า  $R_f$  ต่ำกว่า ใน Safranin O ซึ่งสอดคล้องกับความสัมพันธ์การมีขี้้วมากและยึดกับ stationary phase (เช่น กระดาษ) ของสารมากกว่า เมื่อย้อมเนื้อเยื่อ ความเข้มข้นกับ dye-tissue affinity และแรงยึดเหนี่ยวหลายชนิด รวมทั้งการที่รงควัตถุกลุ่ม anthocyanins/polyphenols สามารถเกิดการยึดหรือดูดซับกับโครงสร้าง polysaccharide ของผนังเซลล์พืช (เช่น cellulose และ pectin) ได้ จึงทำให้สารสกัดคงอยู่ในชั้นเนื้อเยื่อและให้สีเข้มกว่าได้ [10]

ดังนั้นผลการศึกษานี้สนับสนุนว่าสารสกัดจากพืชธรรมชาติมีศักยภาพในการใช้เป็นสีย้อมเนื้อเยื่อพืช โดยเฉพาะ *Caesalpinia sappan* L. (แก่นฝาง) ซึ่งให้ผลเด่นทั้งในเชิงความเข้มข้นและค่า redness จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับบริบทของโรงเรียนระดับมัธยมศึกษา เพื่อลดค่าใช้จ่าย และลดการใช้สารเคมี อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาพิจารณาร่วมกับองค์ประกอบทางเคมีของสารสีในพืชแต่ละชนิด รวมถึงข้อจำกัดด้านวิธีวิจัยที่อาจมีผลต่อการวิเคราะห์ภาพและการตีความผล และเสริมการวิเคราะห์องค์ประกอบสารสีด้วยเทคนิคเชิงเครื่องมือในระดับที่สูงขึ้น จึงจะมีศักยภาพสูงในการต่อยอดเป็นแนวทางการใช้สีย้อมทางพฤกษศาสตร์ในบริบทที่กว้างขึ้นต่อไป

## 7. สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาการประยุกต์ใช้และประเมินประสิทธิภาพของสีย้อมจากสารสกัดธรรมชาติรงควัตถุกลุ่ม polyphenol ได้แก่ *Caesalpinia sappan* L. (แก่นฝาง), *Vaccinium* spp. (บลูเบอร์รี่) และ *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* (กะหล่ำปลีม่วง) ในการย้อมเนื้อเยื่อลำต้นผักชีล้อม (*Oenanthe javanica*) เปรียบเทียบกับสีย้อมมาตรฐาน Safranin O พบว่าสารสกัดจากพืชแต่ละชนิดมีสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการย้อมเชิงคุณภาพ พบว่า สารสกัดจาก *Caesalpinia sappan* L. (แก่นฝาง) ให้ผลดีที่สุดในทุกเกณฑ์ ทั้งความชัดเจนของการติดสีในแต่ละส่วนของเนื้อเยื่อ มีความใกล้เคียงกับสีมาตรฐาน Safranin O มากที่สุด ในขณะที่การวิเคราะห์ความเข้มข้นเชิงปริมาณด้วยโปรแกรม ImageJ พบว่า สารสกัดจากแก่นฝางให้ค่าดัชนีความแดงสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสีย้อมสังเคราะห์ Safranin O

ทั้งนี้ สารสกัดธรรมชาติทุกชนิดที่นำมาทดสอบมีศักยภาพในการย้อมติดเนื้อเยื่อพืชได้ โดยเฉพาะสารสกัดจาก *Caesalpinia sappan* L. (แก่นฝาง) ซึ่งให้เห็นว่า การเลือกใช้สีย้อมธรรมชาติสามารถนำมาประยุกต์ใช้การทำปฏิบัติการย้อมเนื้อเยื่อพืชระดับมัธยมศึกษาได้จริง

### เอกสารอ้างอิง

- [1] Ruzin, S.E. (1999). Plant microtechnique and microscopy.
- [2] Maceda, A., Andrés-Hernández, A. R., & Terrazas, T. (2024). Protocol to analyse the structural composition by fluorescence microscopy and different conventional and fluorescence staining methods. *MethodsX*, 13.
- [3] United Nations Department of Economic and Social Affairs, S.D. (2025). The Sustainable Development Goals Report 2025. United Nations.
- [4] Sachdev, S.S., Chettiankandy, T. J., Sonawane, S. G., Sardar, M. A., Kende, P. P., & Pakhmode, V. (2021). Toward developing natural histologic stains using anthocyanins: A novel approach. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 25(1), 199.
- [5] นภัสสรณ์ กุญวารี และอรุวรรณ วนะชีวิน. (2566). สีสกัดจากฝางและอัญชัญสำหรับการย้อมสีเนื้อเยื่อพืชแบบย้อมทับ. *วารสาร มรภ.ภพ.วิทยาศาสตร์ คณิตศาสตร์ และเทคโนโลยี*, 2(1).
- [6] Vij, R., Sharma, M., Prashar, R., & Kaushik, P. (2023). Therapeutic and technological applications of *Caesalpinia sappan*L.: A review. *Molecules*, 28(17).
- [7] Dapson, R.W., & Bain, C. L. (2015). Brazilwood, sappanwood, brazilin and the red dye brazilin: from textile dyeing and folk medicine to biological staining and musical instruments. *Biotech Histochemistry*, 90(6), 401-423.
- [8] Xue, H., Zhao, J., Wang, Y., Shi, Z., Xie, K., Liao, X., & Tan, J. (2024). Factors affecting the stability of anthocyanins and strategies for improving their stability: A review. *Food Chemistry*, 24.
- [9] Baron, G., Ferrario, G., Marinello, C., Carini, M., Morazzoni, P., & Aldini, G. (2021). Effect of extraction solvent and temperature on polyphenol profiles, antioxidant and anti-inflammatory effects of red grape skin by-product. *Molecules*, 26(18).
- [10] Shahidi, F., & Athiyappan, K. D. (2025). Polyphenol–polysaccharide interactions: Molecular mechanisms and potential applications in food systems – A comprehensive review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 7(1), 42.