JSSE Journal of Science & Science Education
https://so04.tci-thaijo.org/index.php/JSSE
วารสารวิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ศึกษา
ปีที่ 5 เล่มที่ 1 (ม.ค. – มิ.ย. 2565) | xx

บทความวิจัย

การพัฒนาสีย้อมธรรมชาติจากพืชในกลุ่มแอนโทไซยานินเพื่อใช้สำหรับย้อมเนื้อเยื่อพืช

ลัดดาวัลย์ กงพลี[1,*] และพรรณวิภา แพงศรี[1]
[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ปทุมธานี
**Email: Laddawan.kong@vru.ac.th*

รับบทความ: 5 พฤศจิกายน 2564 แก้ไขบทความ: 23 ธันวาคม 2564 ยอมรับตีพิมพ์: 23 ธันวาคม 2564

บทคัดย่อ

การศึกษาเนื้อเยื่อพืชทำได้โดยวิธีการตัดเนื้อเยื่อพืชแบบมือเปล่าและย้อมสีเซลล์เพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สีย้อมที่นิยมใช้คือสีซาฟรานินโอซึ่งมีจำหน่ายในราคาสูง จึงมีผู้ศึกษาการสกัดสีย้อมธรรมชาติเพื่อทดแทน แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดด้านการใช้งาน เช่น ไม่สะดวกต่อการใช้งาน ไม่สามารถผลิตตามปริมาณที่ต้องการใช้ ยากต่อการเก็บรักษาเพื่อใช้ระยะยาว และไม่สามารถควบคุมคุณภาพการติดสีของตัวอย่างที่ศึกษาได้ ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาสีย้อมธรรมชาติจากพืชในกลุ่มแอนโทไซยานินสำหรับย้อมเนื้อเยื่อพืชเพื่อแก้ไขปัญหาด้านข้อจำกัดการใช้สีย้อมธรรมชาติ โดยการคัดเลือกจากส่วนของพืช 3 ชนิด ได้แก่ แก่นฝาง (*Biancaea sappan* (L.) Tod.) เปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) และใบประดับเฟื่องฟ้า (*Bougainvillea* sp.) สกัดด้วย น้ำกลั่น เมททานอล และกรดอะซิติก ร่วมกับการใช้มอร์แดนท์โซเดียมคลอไรด์และคอปเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 10% ทดสอบการติดสีย้อมกับลำต้นหมอน้อย (*Cyanthillium cinereum* (L.) H.Rob) เปรียบเทียบกับสีย้อมซาฟรานินโอความเข้มข้น 0.1% พบว่าสีย้อมจากแก่นฝางที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและใช้คอปเปอร์ซัลเฟตเป็นมอร์แดนท์ ให้ผลดีที่สุด มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2.98 ให้เฉดสีแดง ค่า L* เท่ากับ 25.15 ค่า a* เท่ากับ 24.91 และค่า b* เท่ากับ 18.07 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับการย้อมด้วยสีซาฟรานินโอ จากนั้นนำสีย้อมแก่นฝางที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและคอปเปอร์ซัลเฟตเป็นมอร์แดนท์มาทำแห้งแบบพ่นฝอย ทดสอบความร้อนขาเข้าที่อุณหภูมิ 210 220 และ 230 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิขาเข้า 210 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้น้ำระเหยจากสารสีมีความชื้นในช่วงมาตรฐาน (7.5 %db) และได้ปริมาณผงสีธรรมชาติมากที่สุด (58.3 %yield) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากนั้นหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของการละลายผงสีย้อมธรรมชาติในน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1 1:2 1:5 และ 1:10 พบว่าอัตราส่วน 1:1 มีผลต่อการติดสีของเนื้อพืชดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสีย้อมแก่นฝางที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและใช้คอปเปอร์ซัลเฟตเป็นมอร์แดนท์ก่อนผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3.22 ค่า L* เท่ากับ 22.47 ค่า a* เท่ากับ 20.33 และค่า b* เท่ากับ 16.51 ดังนั้นจึงเห็นควรใช้สีย้อมธรรมชาติแก่นฝางที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเติมมอร์แดนท์คอปเปอร์ซัลเฟตในการย้อมเนื้อเยื่อพืชเพื่อทดแทนสีย้อมสังเคราะห์ซาฟรานินโอ

คำสำคัญ: การพัฒนาสีย้อมธรรมชาติ แอนโทไซยานิน เนื้อเยื่อพืช

Online-first Version

ลิขสิทธิ์โดย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

Research Article

The Development of Natural Dye from Plants in Anthocyanin group for Staining Plant Tissue

Laddawan Kongplee[1, *] and Phunwipa Pangsri[1]

[1]Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage Pathumthani

**Email: Laddawan.kong@vru.ac.th*

Received <5 November 2021>; Revised <23 December 2021>; Accepted <23 December 2021>

Abstract

Plant tissue are studied by using the Free-hand method and cell staining is studied under a light microscope. The preferred dye is Safranin-O, which is available only expensive. Therefore, there are study the extraction of natural dyes to substitute synthetic dye. But due to its inconvenient when use, cannot produce the required quantity, difficult to store for long-term use and unable to control the colorfastness of the samples studied. Then, this research aims to develop natural dyes from part of plants in anthocyanin group for dyeing plant tissues. Three types were selected, heartwood of Sappan tree (*Biancaea sappan* (L.) Tod.), pericarp of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) and bract of bougainvillea (*Bougainvillea* sp.). Extraction method by using distilled water, methyl alcohol and acetic acid and adding mordant NaCl $CuSo_4$ at a concentration of 10%. Staining test with plant tissues of little ironweed (*Cyanthillium cinereum* (L.) H.Rob) compared with Safranin-O concentration of solution 0.1%. The result was natural dye of Sappan tree extracted with distilled water and $CuSO_4$ mordant has best result with pH=2.98, a reddish tint, L*= 25.15, a*=24.91 and b*=18.07, which is closest to Safranin-O. Natural dye extracted from distilled water and $CuSO_4$ mordant for spray drying. Inlet temperatures test at 210, 220 and 230 °C, found that 210 °C is the most suitable temperature for evaporating water from the paint. The moisture content in the standard range (7.5 %db) and the highest natural pigment content (58.3 %yield) were obtained with a statistically significant level of .05. The optimum ratio of natural pigment dyeing to distilled water solubility was determined. The ratio of 1:1, 1:2, 1:5 and 1:10 showed that the ratio of 1:1 had the best effect on the colorfastness of the flesh. Compared with before spray drying method. pH=3.22, L*=22.47, a*=20.33 and b*=16.51. Therefore, it is advisable to use the natural dye essence of Sappan tree extract with distilled water and added mordant $CuSO_4$ in cell and plant tissue dyeing to substitute Safranin-O dyes.

Keywords: The development of natural dye, anthocyanin, plant tissue

Online-first Version

Copyright by Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

บทนำ

เนื้อเยื่อพืช (plant tissue) คือ กลุ่มเซลล์ที่รวมกันทำกิจกรรมหรือทำหน้าที่ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ดอก ใบ ราก และลำต้น เนื้อเยื่อพืชแบ่งออกได้หลายชนิดโดยอาศัยหลักเกณฑ์ต่าง ๆ ในการจัดจำแนกประเภท เช่น ลักษณะรูปร่าง โครงสร้าง ตำแหน่งที่อยู่ หน้าที่การทำงาน แหล่งกำเนิด ความสามารถในการแบ่งเซลล์ในเนื้อเยื่อ การเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ เป็นต้น (Hoefnagels, 2019) ในทางชีววิทยาการศึกษาโครงสร้างของเนื้อเยื่อพืชทำได้โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) มีวิธีการเตรียมสไลด์แบบง่ายคือนำตัวอย่างพืชมาตัดให้บางด้วยมือเปล่า (free-hand section) และย้อมสี (stain) เพื่อทำให้สามารถมองเห็นโครงสร้างและรายละเอียดของเซลล์ได้ชัดเจนขึ้น สีที่ใช้ย้อมเนื้อเยื่อมีทั้งสีธรรมชาติ (natural dye) และสีสังเคราะห์ (synthetic dye) แต่ส่วนใหญ่นิยมใช้สีสังเคราะห์เฉดสีแดง เช่น สีคาร์มีนในกรดอะซีติก (aceto-carmine) สีซาฟรานินโอ (safranin-O) เนื่องจากเมื่อนำไปย้อมเนื้อเยื่อพืชจะพบว่ามีคุณสมบัติย้อมติดโครโมโซม (chromosome) เยื่อหุ้มนิวเคลียส (nucleus membrane) ลิกนิน (lignin) ซูเบอริน (suberin) และคิวทิน (cutin) นอกจากนี้ยังพบว่าผนังเซลล์ทุติยภูมิ (secondary cell wall) จะติดสีชมพูหรือสีแดงชัดเจน ทำให้สามารถแยกชนิดของเนื้อเยื่อสเกลอเรงคิมา (sclerenchyma) อาทิ เซลล์เส้นใย (fiber) และเซลล์ในเนื้อเยื่อไซเล็ม คือ เซลล์เวสเซล (vessel) และเซลล์เทรคีด (tracheid) (Manit, 2009) อย่างไรก็ตามสีสังเคราะห์ที่ใช้เนื้อเยื่อในประเทศไทยเป็นสีที่นำเข้าจากต่างประเทศซึ่งมีราคาในการจำหน่ายค่อนข้างสูง การซื้อแต่ละครั้งต้องซื้อเต็มจำนวนบรรจุภัณฑ์ไม่มีแบ่งขาย (Rujira *et al.*, 2017) ทำให้มีปริมาณสีย้อมที่ซื้อมามากเกินความต้องการ เนื่องจากการย้อมเนื้อเยื่อแต่ละครั้งจะใช้สีย้อมปริมาณน้อยและสีย้อมที่เหลือจะเกิดการเสื่อมสภาพได้เมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน นอกจากนี้ยังพบว่าสีย้อมสังเคราะห์คาร์มีนในกรดอะซีติกและสีซาฟรานินโอเป็นอันตรายต่อร่างกายของผู้ใช้ที่ได้รับการสูดดมหรือการสัมผัส โดยสามารถทำให้เกิดการระคายเคืองต่อเยื่อบุทางเดินหายใจ ทำให้เยื่อบุตาอักเสบ และทำให้ผิวหนังเกิดรอยไหม้ได้ (Genesiska and Herda, 2018)

ในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการสกัดสีย้อมจากธรรมชาติจากพืชในกลุ่มแอนโทไซยานินเพื่อใช้แทนสีย้อมสังเคราะห์ เช่น การพัฒนาสีย้อมโครโมโซมจากสารสกัดข้าวเหนียวดำ (Sirirat, Namphon and Manussawee, 2021) การประยุกต์ใช้สีธรรมชาติจากข้าวโพดหวานสีม่วงในการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซีสของพืช (Rujira *et al*., 2017) เป็นต้น โดยพืชในกลุ่มแอนโทไซยานินจะมีรงควัตถุสีม่วงแดงหรือสีน้ำเงิน ซึ่งจัดเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ในกลุ่มฟีโนลิก (phenolic) มีคุณสมบัติละลายน้ำได้แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายชนิดมีไม่มีขั้ว (non-hydroxyl solvent) เช่น อีเทอร์ อะซีโตน คลอโรฟอร์ม เป็นต้น ความเสถียรภาพของแอนโทไซยานินจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีหมู่ methoxyls ในวง B-ring ลดลงเมื่อมีหมู่ hydroxyls เพิ่มขึ้น และจะเสถียรภาพที่สุดเมื่ออยู่ในสภาวะความเป็นกรด (Suwichar, 2017) นอกจากนี้ยังพบว่าสีย้อมจากธรรมชาติมีราคาถูกกว่า ปลอดภัยกับผู้ใช้มากกว่า สามารถละลายน้ำได้ดีกว่าและช่วยลดสภาวะแวดล้อมเป็นพิษได้ (Mayuree *et al*., 2018) อย่างไรก็ตามสีย้อมที่สกัดจากธรรมชาติยังมีข้อจำกัดในการใช้งานหลายประการ ได้แก่ ปัญหาด้านขั้นตอนการเตรียมสีย้อมมีความยุ่งยากหลายขั้นตอน ไม่สะดวกต่อการใช้งาน ปัญหาด้านการผลิตกล่าวคือ ผลิตได้ในปริมาณน้อยและไม่สามารถผลิตสีย้อมตามที่ตลาดต้องการ ปัญหาด้านการเก็บรักษาสีย้อมเพื่อใช้ในระยะเวลานาน และปัญหาด้านคุณภาพการย้อมสีธรรมชาติขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการซึ่งควบคุมได้ยาก การย้อมสีกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อตัวอย่างให้เหมือนเดิมจึงทำได้ยาก เป็นต้น (Gita, Zulharmita and Ridho, 2021)

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีเป้าหมายในการพัฒนาคุณภาพสีย้อมธรรมชาติเพื่อใช้แทนสีสังเคราะห์ รวมถึงการแก้ไขปัญหาด้านข้อจำกัดของการใช้สีย้อมจากธรรมชาติ โดยการนำส่วนของตัวอย่างพืชที่มีการสะสมสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และให้สารสีแดงส้ม มาสกัดสีและเติมมอร์แดนท์ (mordant) เพื่อเพิ่มคุณภาพด้านการติดสีของเซลล์และเนื้อเยื่อพืช จากนั้นนำมาพัฒนาคุณภาพด้านการเก็บรักษาด้วยวิธีทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) และพัฒนาด้านการใช้งานโดยการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดของผงสีย้อมธรรมชาติที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยต่อการละลายน้ำเพื่อไปใช้งานในครั้งต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกสีย้อมธรรมชาติสำหรับการย้อมเนื้อเยื่อพืชจากพืชในกลุ่มแอนโทไซยานินที่ได้จากการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายและมอร์แดนท์ต่างชนิดกัน
2. เพื่อพัฒนาคุณภาพสีย้อมธรรมชาติด้านการเก็บรักษาด้วยวิธีทำแห้งแบบพ่นฝอย
3. เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดของผงสีย้อมธรรมชาติที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยต่อการละลายน้ำ

Online-first version

วิธีดำเนินการวิจัย

การพัฒนาสีย้อมธรรมชาติจากพืชในกลุ่มแอนโทไซยานินสำหรับย้อมเนื้อเยื่อด้วยวิธีทำแห้งแบบพ่นฝอย ทำการทดลองที่คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี ระหว่างเดือน พฤษภาคม 2564 ถึง ตุลาคม 2564 โดยมีวิธีการดำเนินการวิจัยดังนี้

การสกัดสีย้อมธรรมชาติจากพืชในกลุ่มแอนโทไซยานิน

(1) การเตรียมพืชตัวอย่าง

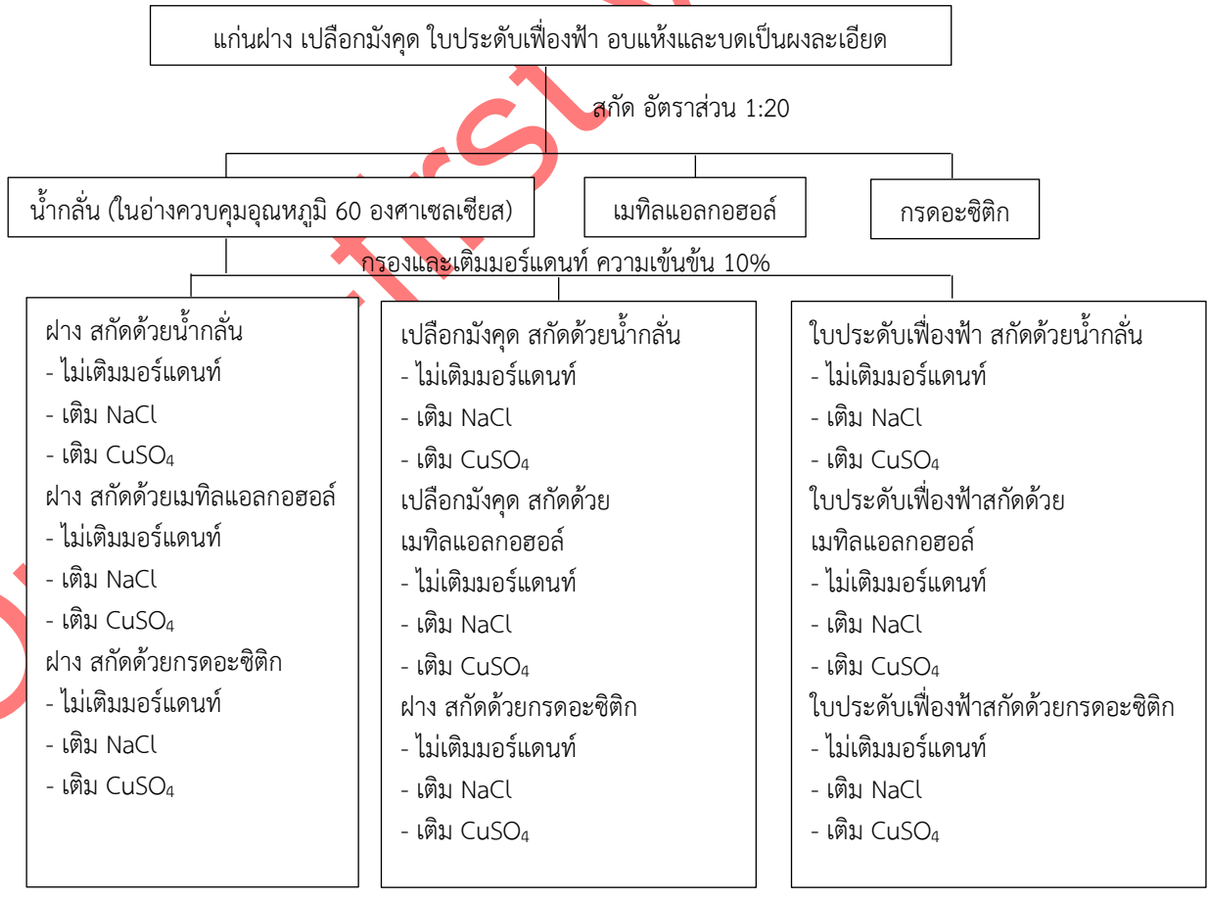
คัดเลือกพืชในกลุ่มแอนโทไซยานินซึ่งให้เฉดสีแดง ได้แก่ แก่นฝาง (*Biancaea sappan* (L.) Tod.) เปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) และใบประดับเฟื่องฟ้า (*Bougainvillea* sp.) นำมาล้างทำความสะอาดจากนั้นนำไปอบด้วยตู้อบแห้งแบบถาด (tray dry) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และนำมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดผงละเอียด (grinding machine) ความเร็วรอบ 32,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

(2) การสกัดสีย้อมธรรมชาติ

นำผงของพืชตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด มาสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น (distillation water) โดยใช้วิธีการต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 60 องศาเซลเซียส และตัวทำละลายเมทิลแอลกอฮอล์ (methyl alcohol) กรดอะซิติก (acetic acid) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยการสกัดสีย้อมธรรมชาติทั้ง 3 ชนิด ใช้อัตราส่วนผงพืชตัวอย่าง 1 กรัม ต่อตัวทำละลาย 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำสารละลายมากรองด้วยกระดาษกรอง (filter papers) เบอร์ 1

(3) การเติมมอร์แดนท์ (mordant)

แบ่งชุดสีย้อมธรรมชาติที่ได้จากการสกัดเพื่อเติมมอร์แดนท์ ดังนี้ ไม่เติมมอร์แดนท์ เติมโซเดียมคลอไรด์และคอปเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะได้สีย้อมธรรมชาติเพื่อทดลองจำนวน 27 ชุดทดลอง (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการสกัดสีย้อมและชุดสีย้อมที่ได้จากการสกัดส่วนของพืชที่มีแอนโทไซยานิน จำนวน 27 ชุดทดลอง

ตรวจสอบคุณภาพสีย้อมและการคัดเลือกสีย้อมธรรมชาติ

(1) การติดสีย้อม นำสีย้อมธรรมชาติทั้ง 27 ชุดทดลอง ไปย้อมเซลล์และเนื้อเยื่อของลำต้นหมอน้อย (*Cyanthillium cinereum* (L.) H.Rob) ที่ได้จากการตัดลำต้นหมอน้อยตามขวาง (transvers section) ด้วยวิธีการ free-hand section จากนั้น

Original First Version

หยดสีย้อม 1-2 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover slide) แล้วนำไปศึกษาโครงสร้างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)

(2) ตรวจวัดค่าความเป็นกรด - ด่างด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

(3) ตรวจวัดคุณภาพสีด้วยเครื่องวัดสี (colorimeter) ใช้ระบบสี CIE โดยค่า L* คือ ความสว่างของสี a* คือ ค่าสีแดง-เขียว และค่า b * คือ ค่าสีเหลือง-น้ำเงิน

(4) เปรียบเทียบการติดสีย้อมของเนื้อเยื่อพืช ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าสี ระหว่างสีย้อมธรรมชาติกับสีย้อมสังเคราะห์ซาฟรานินโอความเข้มข้น 0.1% ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ จำนวน 1-2 หยด คัดเลือกสีย้อมธรรมชาติที่มีคุณภาพใกล้เคียงกับสีย้อมสังเคราะห์ที่เปรียบเทียบ

การพัฒนาคุณภาพสีย้อมธรรมชาติด้านการเก็บรักษาด้วยวิธีทำแห้งแบบพ่นฝอย

การวิจัยครั้งนี้ทำการพัฒนาคุณภาพสีย้อมธรรมชาติด้านการเก็บรักษาโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) จากนั้นตรวจวิเคราะห์ค่าความชื้น (%db) และปริมาณผงสีที่ได้ (%yield) การทำแห้งแบบพ่นฝอยใช้ศึกษาเพื่อหาอุณหภูมิขาเข้า 3 ระดับ ได้แก่ 210 220 และ 230 องศาเซลเซียส ที่มีผลต่อความชื้นมาตรฐานอยู่ในช่วง 5-10% โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Phonchai, 2018) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 กำหนดสมมติฐาน ดังนี้

H_0: อุณหภูมิขาเข้าไม่มีผลต่อความชื้น

H_1: อุณหภูมิขาเข้ามีผลต่อความชื้น

และ

H_0: อุณหภูมิขาเข้าไม่มีผลต่อปริมาณผงสี

H_1: อุณหภูมิขาเข้ามีผลต่อปริมาณผงสี

การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดของผงสีย้อมธรรมชาติที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยต่อการละลายน้ำ

นำผงสีย้อมธรรมชาติที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยมาละลายกับน้ำกลั่น เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการใช้งานครั้งต่อไป โดยศึกษาอัตราส่วน 1:1 1:2 1:5 และ 1:10 [ผงแห้งสีย้อมธรรมชาติ (กรัม) : น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)] จากนั้นนำไปย้อมเนื้อเยื่อพืชตัวอย่างและศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อพืช ตรวจสอบคุณภาพสีและวัดค่าความเป็นกรด - ด่าง และทำการเปรียบเทียบกับสีย้อมธรรมชาติก่อนผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย

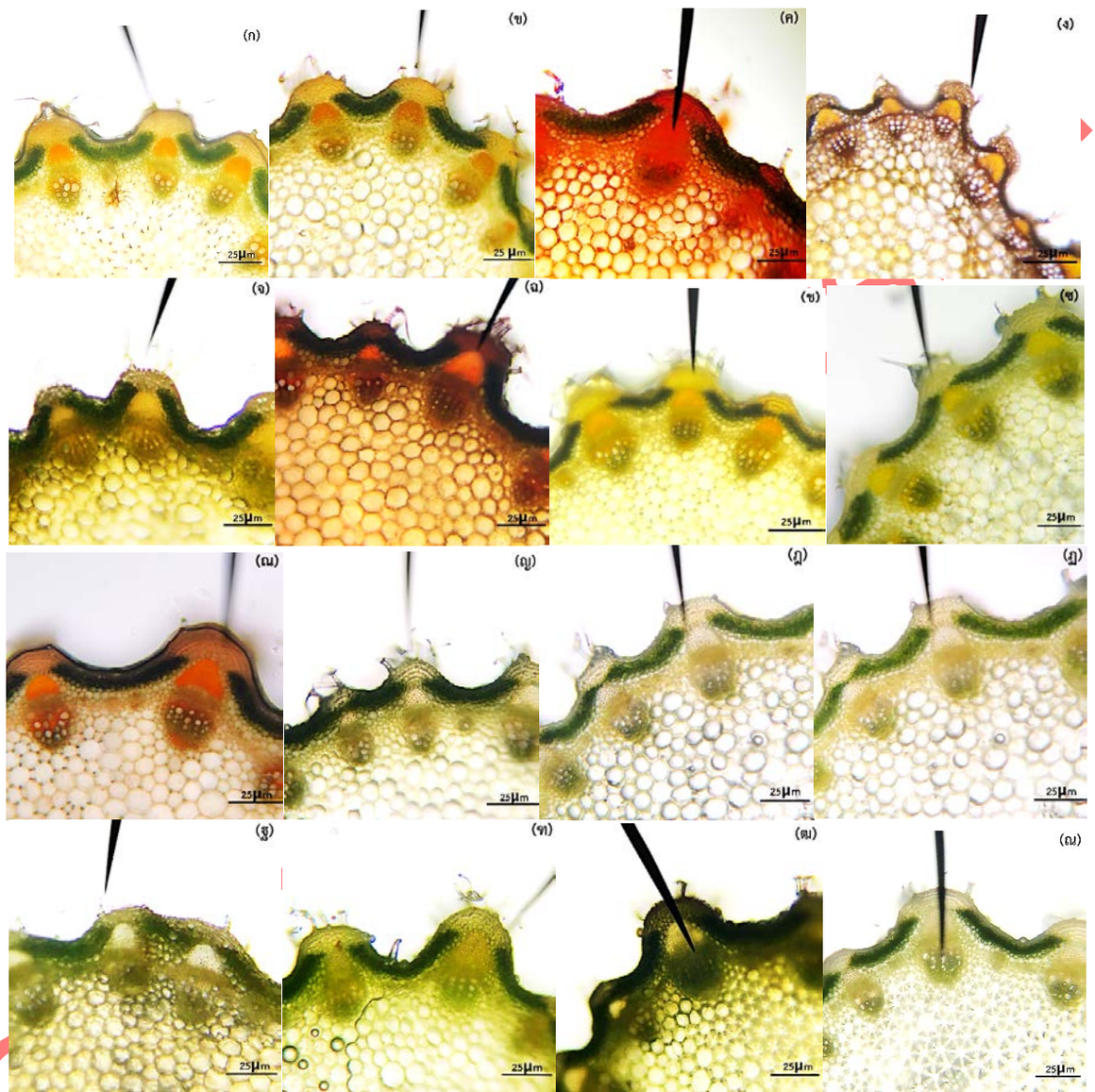
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

(1) ผลการคัดเลือกสีย้อมธรรมชาติสำหรับการย้อมเนื้อเยื่อพืชจากพืชในกลุ่มแอนโทไซยานินที่ได้จากการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายและมอร์แดนท์ต่างชนิดกัน

จากการทดลอง พบว่า สีย้อมธรรมชาติจากส่วนของพืชในกลุ่มแอนโทไซยานิน 3 ชนิด ได้แก่ แก่นฝาง เปลือกมังคุด และใบประดับเฟื่องฟ้า เมื่อนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกันและการเติมมอร์แดนท์ที่แตกต่างกัน จะทำให้ได้สีย้อมธรรมชาติที่แตกต่างกันทั้งหมด 27 ชุดทดลอง และเมื่อนำไปย้อมเนื้อเยื่อพืชของลำต้นหมอน้อย และทำการศึกษาโครงสร้างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่า สีของแก่นฝางที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเติมมอร์แดนท์ $CuSO_4$ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 2.98 ให้เฉดสีแดง โดยมีค่า L* เท่ากับ 25.15 ค่า a* เท่ากับ 24.91 และค่า b*เท่ากับ 18.07 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับสีสังเคราะห์ซาฟรานินโอ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 2.94 ซึ่งให้เฉดสีแดง มีค่า L* เท่ากับ 22.11 a* เท่ากับ 23.80 และค่า b* เท่ากับ 14.96 ทำให้สามารถมองเห็นโครงสร้างของเนื้อเยื่อพืชได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 2 ภาพที่ 3 และตารางที่ 1) ทั้งนี้การติดสีย้อมของเนื้อเยื่อในสีย้อมแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน เพราะในเซลล์พืชมีเอนไซม์ (enzyme) อยู่ในแต่ละส่วนแตกต่างกัน ซึ่งเอนไซม์บางชนิดจะจับกับโคแฟคเตอร์ (cofactor) ที่เป็นอิออนของโลหะ และความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (Hoefnagels, 2019) ดังนั้นการย้อมเนื้อเยื่อพืชด้วยสีย้อมธรรมชาติแก่นฝางที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเติม $CuSO_4$ เป็นมอร์แดนท์ ซึ่งมีสภาวะใกล้เคียงกับสีย้อมซาฟานินโอมากที่สุด จึงเป็นข้อบ่งชี้ว่าเนื้อเยื่อพืชเหมาะกับการย้อมสีในเฉดสีแดงและค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในช่วง 2.9 สอดคล้องกับการศึกษาของมานิต (Manit, 2009) ที่ทำการศึกษาสีย้อมธรรมชาติจากฝางสำหรับการศึกษาเซลล์และเนื้อเยื่อ พบว่า ส่วนของแก่นฝางเมื่อนำมาต้มกับน้ำจะได้สารสีแดงและเมื่อนำมาย้อมเซลล์จะติดผนังเซลล์ชั้นทุติยภูมิ นิวเคลียสจะติดสีชมพูหรือแดงให้ประสิทธิภาพในการย้อมใกล้เคียงกับสีสังเคราะห์ซาฟรานินโอ นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับความแตกต่างของสีย้อมธรรมชาติที่สกัดจากพืชในกลุ่มแอนโทไซยานินขึ้นอยู่ความค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อสังเกตลักษณะสีย้อมธรรมชาติด้วยตาเปล่าจะพบว่าสีย้อมเป็นน้ำเงินเข้มในสภาวะที่เป็นด่าง (pH>7) เป็นสีม่วงในสภาะที่เป็นกลาง (pH=7) และเป็นสีแดงส้มในสภาวะที่เป็นกรด (pH<7) (Department of Science Service, 2010) และจากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเสถียรภาพของสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ (Supaporn, 2019)

Online-first Version

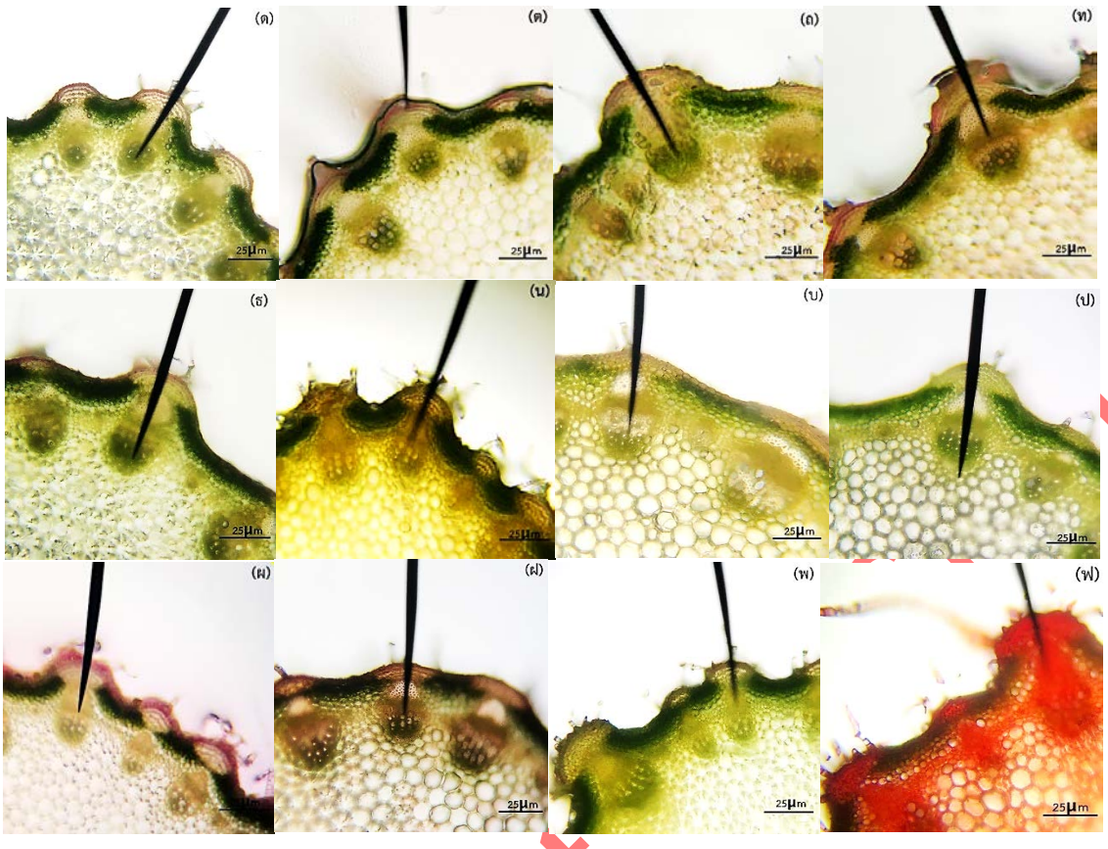
พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง มีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินในทุกตัวอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีผลต่อการคงตัวของแอนโทไซยานินมีค่าเท่ากับ 1 และ 4 แต่ไม่คงตัวเมื่อมีความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 9 จากการศึกษาการพัฒนาสีย้อมธรรมชาติสำหรับย้อมเซลล์และเนื้อเยื่อของ Sobchai (2006) ในพืช 5 ชนิดได้แก่ มะพร้าว ขนุน ฝาง ขมิ้น และคำแสด โดยทำการสกัดด้วยน้ำและเติมมอร์แดนท์สารส้ม จุนสี เหล็ก เกลือแกง และโคบอลท์ไนเตรทที่ระดับความเข้มข้นของสีย้อมและมอร์แดนท์ 10% และนำไปย้อมลำต้นของหญ้าละออง (*Vernonia cinereal*) เมื่อประเมินความพึงพอใจของกลุ่มตัวอย่างที่ตอบแบบสอบถาม พบว่า สีย้อมจากแก่นฝางที่เติมโคบอลท์ไนเตรท มีประสิทธิภาพในการย้อมดีที่สุด



ภาพที่ 2 การติดสีย้อมของเนื้อเยื่อพืชของลำต้นหมอน้อย

(ก) แก่นฝาง-น้ำกลั่น-ไม่เติมมอร์แดนท์
(ข) แก่นฝาง-น้ำกลั่น-NaCl
(ค) แก่นฝาง-น้ำกลั่น-$CuSO_4$
(ง) แก่นฝาง-Methyl alcohol-ไม่เติมมอร์แดนท์
(จ) แก่นฝาง-Methyl alcohol-NaCl
(ฉ) แก่นฝาง-Methyl alcohol-$CuSO_4$
(ช) แก่นฝาง-Acetic acid-ไม่เติมมอร์แดนท์
(ซ) แก่นฝาง- Acetic acid–NaCl
(ฌ) แก่นฝาง- Acetic acid–$CuSO_4$
(ญ) เปลือกมังคุด-น้ำกลั่น-ไม่เติมมอร์แดนท์
(ฎ) เปลือกมังคุด-น้ำกลั่น-NaCl
(ฏ) เปลือกมังคุด-น้ำกลั่น-$CuSO_4$
(ฐ) เปลือกมังคุด-Methyl alcohol-ไม่เติมมอร์แดนท์
(ฑ) เปลือกมังคุด-Methyl alcohol-NaCl
(ฒ) เปลือกมังคุด-Methyl alcohol-$CuSO_4$
(ณ) เปลือกมังคุด-Acetic acid-ไม่เติมมอร์แดนท์

Copyright by Faculty of Science, Ubon Ratchathani University



ภาพที่ 3 การติดสีย้อมของเนื้อเยื่อพืชของลำต้นหมอน้อย

(ด) เปลือกมังคุด- Acetic acid–NaCl (ต) เปลือกมังคุด- Acetic acid–$CuSO_4$
(ถ) ใบประดับเฟื้องฟ้า-น้ำกลั่น-ไม่เติมมอร์แดนท์ (ท) ใบประดับเฟื้องฟ้า-น้ำกลั่น-NaCl
(ธ) ใบประดับเฟื้องฟ้า-น้ำกลั่น-$CuSO_4$ (น) ใบประดับเฟื้องฟ้า-Methyl alcohol-ไม่เติมมอร์แดนท์
(บ) ใบประดับเฟื้องฟ้า-Methyl alcohol-NaCl (ป) ใบประดับเฟื้องฟ้า-Methyl alcohol-$CuSO_4$
(ผ) ใบประดับเฟื้องฟ้า-Acetic acid-ไม่เติมมอร์แดนท์ (ฝ) ใบประดับเฟื้องฟ้า- Acetic acid–NaCl
(พ) ใบประดับเฟื้องฟ้า- Acetic acid–$CuSO_4$ (ฟ) สีย้อมสังเคราะห์ซาฟรานินโอ (safranin-O)

(2) ผลการพัฒนาคุณภาพสีย้อมธรรมชาติด้านการเก็บรักษาด้วยวิธีทำแห้งแบบพ่นฝอย

งานวิจัยนี้ทำการพัฒนาคุณภาพสีย้อมธรรมชาติแก่นฝางที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเติมมอร์แดนท์ $CuSO_4$ ด้านการเก็บรักษาโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยศึกษาอุณหภูมิขาเข้าที่มีผลต่อความชื้นหลังทำอบแห้งและปริมาณผงสี พบว่าที่อุณหภูมิขาเข้า 210 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาสีย้อมธรรมชาติจากแก่นฝางที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและใช้มอร์แดนท์ $CuSO_4$ ด้วยวิธีทำแห้งแบบพ่นฝอย เนื่องจากสามารถทำให้เกิดการระเหยน้ำจากสารละลายสีย้อมธรรมชาติโดยมีความชื้นของผงสีที่อยู่ในกำหนดมาตรฐาน (ค่าเฉลี่ย 7.5%) และทำให้ได้ปริมาณผงสีมากที่สุด (ค่าเฉลี่ย 58.3%) (ตารางที่ 2) ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของอุณหภูมิขาเข้ากับความชื้น พบว่า ค่า *p*-Value มีค่าน้อยกว่า 0.001 แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิขาเข้ามีผลความชื้น ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 3) และเมื่อทำการเปรียบเทียบความร้อนแต่ละระดับกับความชื้นพบว่าความร้อนแต่ละระดับมีผลต่อความชื้นแตกต่างกัน ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 4) และผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของอุณหภูมิขาเข้ากับปริมาณผงสี พบว่า ค่า *p*-Value มีน้อยกว่า 0.001 แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิขาเข้ามีผลต่อปริมาณผงสี ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 5) และเมื่อทำการเปรียบเทียบความร้อนแต่ละระดับกับปริมาณผงสี พบว่าที่อุณหภูมิ 210 กับ 220 องศาเซลเซียส ต่อปริมาณผงสีแตกต่างกัน แต่ที่อุณหภูมิ 220 กับ 230 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกัน ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 6) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Phonchai (2018) ที่ทำการศึกษาการเพิ่มผลิตภาพของกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยในการผลิตสีย้อมหนัง โดยทำการศึกษาอุณหภูมิขาเข้าที่เหมาะสมพบว่าอุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส เป็นที่ดีที่สุด ที่ได้ผลิตภาพและความชื้นในเกณฑ์มาตรฐานยอมรับ เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้อัตราการระเหยน้ำสูงขึ้นไปด้วย ทำให้ผงสีถูกลมร้อนเป่ามากขึ้น จึงทำให้ผงสีมีความชื้นต่ำและเมื่อผงสีมีความชื้นต่ำทำให้มีน้ำหนักเบา จึงถูกลมร้อนเป่าผ่านกลายเป็นฝุ่นลอยกลับขึ้นไปข้างบนของแชมเบอร์ (chamber) ทำให้ได้ปริมาณผงสีที่น้อยลง

Online-first

ตารางที่ 1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าสีของสีย้อมธรรมชาติกับสีย้อมสังเคราะห์

ลำดับ	สีย้อม	ค่ากรด-ด่าง (pH)	คุณภาพสี		
			L*	a*	b*
สีย้อมธรรมชาติ (พืช-สารที่ใช้สกัด-มอร์แดนท์)					
1	แก่นฝาง-น้ำกลั่น-ไม่เติมมอร์แดนท์	6.21	28.86	17.41	31.76
2	แก่นฝางแก่นฝาง-น้ำกลั่น-NaCl	6.51	27.28	17.17	30.33
3	แก่นฝาง-น้ำกลั่น-$CuSO_4$	2.98	25.15	24.91	18.07
4	แก่นฝาง-Methyl alcohol-ไม่เติมมอร์แดนท์	8.35	27.28	18.46	46.68
5	แก่นฝาง-Methyl alcohol-NaCl	8.11	25.48	16.86	24.23
6	แก่นฝาง-Methyl alcohol-$CuSO_4$	3.12	25.47	19.46	24.16
7	แก่นฝาง-Acetic acid-ไม่เติมมอร์แดนท์	4.09	43.15	-3.90	17.28
8	แก่นฝาง- Acetic acid–NaCl	4.10	38.21	-3.57	15.60
9	แก่นฝาง- Acetic acid–$CuSO_4$	3.01	37.17	-3.59	15.35
10	เปลือกมังคุด-น้ำกลั่น-ไม่เติมมอร์แดนท์	7.23	19.65	-4.40	37.76
11	เปลือกมังคุด-น้ำกลั่น-NaCl	7.53	19.30	-3.20	36.05
12	เปลือกมังคุด-น้ำกลั่น-$CuSO_4$	6.30	19.76	-2.85	35.73
13	เปลือกมังคุด-Methyl alcohol-ไม่เติมมอร์แดนท์	6.57	18.51	-2.47	20.77
14	เปลือกมังคุด-Methyl alcohol-NaCl	6.40	18.93	-2.77	21.82
15	เปลือกมังคุด-Methyl alcohol-$CuSO_4$	3.28	19.26	-2.50	20.93
16	เปลือกมังคุด-Acetic acid-ไม่เติมมอร์แดนท์	4.30	30.51	-5.86	10.95
17	เปลือกมังคุด- Acetic acid–NaCl	4.20	30.21	-5.88	10.85
18	เปลือกมังคุด- Acetic acid–$CuSO_4$	3.90	30.03	-5.69	10.74
19	ใบประดับเฟื่องฟ้า-น้ำกลั่น-ไม่เติมมอร์แดนท์	7.15	35.09	-7.59	18.21
20	ใบประดับเฟื่องฟ้า-น้ำกลั่น-NaCl	7.02	32.90	-5.36	18.90
21	ใบประดับเฟื่องฟ้า-น้ำกลั่น-$CuSO_4$	3.50	32.27	-4.92	16.93
22	ใบประดับเฟื่องฟ้า-Methyl alcohol-ไม่เติมมอร์แดนท์	7.38	31.84	-2.80	20.91
23	ใบประดับเฟื่องฟ้า-Methyl alcohol-NaCl	7.31	31.09	-2.51	20.30
24	ใบประดับเฟื่องฟ้า-Methyl alcohol-$CuSO_4$	4.20	33.17	-2.82	21.73
25	ใบประดับเฟื่องฟ้า-Acetic acid-ไม่เติมมอร์แดนท์	7.76	18.92	17.33	10.23
26	ใบประดับเฟื่องฟ้า- Acetic acid–NaCl	7.70	18.97	14.81	10.34
27	ใบประดับเฟื่องฟ้า- Acetic acid–$CuSO_4$	3.30	18.03	16.68	10.10
	สีย้อมสังเคราะห์ซาฟรานินโอ (safranin-O)	2.94	22.11	23.80	14.96

ตารางที่ 2 ผลการทดลองอุณหภูมิขาเข้า ค่าความชื้นและปริมาณผงสีย้อมธรรมชาติ

การทดลอง	อุณหภูมิขาเข้า (C°)	ความชื้น (%db)	ค่าเฉลี่ยความชื้น (mean)	ปริมาณผงสี (%yield)	ค่าเฉลี่ยปริมาณผงสี (mean)
1	210	7.8	7.5%	59.6	58.3%
2	210	7.6		58.4	
3	210	7.2		57.1	
4	220	5.8	5.6%	42.1	43.%
5	220	5.7		44.6	
6	220	5.4		43.0	
7	230	3.7	3.4%	40.2	41.8%

Online-first Version

Copyright by Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

การทดลอง	อุณหภูมิขาเข้า (C°)	ความชื้น (%db)	ค่าเฉลี่ยความชื้น (mean)	ปริมาณผงสี (%yield)	ค่าเฉลี่ยปริมาณผงสี (mean)
8	230	3.2		43.5	
9	230	3.4		42.0	

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของอุณหภูมิขาเข้าสำหรับความชื้นของสีย้อมธรรมชาติ

Groups	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	25.260	2	12.630	189.450	<.001
Within Groups	.400	6	.067		
Total	25.660	8			

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบพหุคูณแบบ LSD ระหว่างอุณหภูมิขาเข้ากับความชื้นของสีย้อมธรรมชาติ

(I) Inlet temperature	(J) Inlet temperature	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
T210	T220	1.9000*	.2108	<.001	1.384	2.416
	T230	4.1000*	.2108	<.001	3.584	4.616
T220	T210	-1.9000*	.2108	<.001	-2.416	-1.384
	T230	2.2000*	.2108	<.001	1.684	2.716
T230	T210	-4.1000*	.2108	<.001	-4.616	-3.584
	T220	-2.2000*	.2108	<.001	-2.716	-1.684

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของอุณหภูมิขาเข้าสำหรับปริมาณผงสีย้อมธรรมชาติ

Groups	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	501.947	2	250.973	127.686	<.001
Within Groups	11.793	6	1.966		
Total	513.740	8			

ตารางที่ 6 ผลการเปรียบเทียบพหุคูณแบบ LSD ระหว่างอุณหภูมิขาเข้ากับปริมาณผงสีย้อมธรรมชาติ

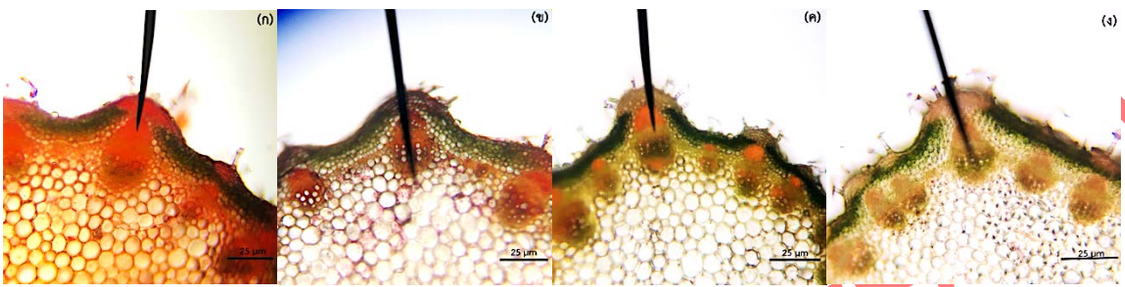
(I) temperature	(J) temperature	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
T210	T220	15.1333*	1.1447	<.001	12.332	17.934
	T230	16.4667*	1.1447	<.001	13.666	19.268
T220	T210	-15.1333*	1.1447	<.001	-17.934	-12.332
	T230	1.3333	1.1447	.288	-1.468	4.134
T230	T210	-16.4667*	1.1447	<.001	-19.268	-13.666
	T220	-1.3333	1.1447	.288	-4.134	1.468

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Online-first Version

(3) อัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดของผงสีย้อมธรรมชาติที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยต่อการละลายน้ำ

ผลจากการทดลองอัตราส่วน 1:1 1:2 1:5 และ 1:10 [ผงแห้งสีย้อมธรรมชาติแก่นฝางที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเติมมอร์แดนท์ $CuSO_4$ (กรัม) : น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)] พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด คือ 1:1 เมื่อเปรียบเทียบการติดสีย้อมของเนื้อเยื่อพืชของสีย้อมธรรมชาติก่อนผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย อาจเนื่องจากเมื่อทำการละลายผงสีย้อมธรรมชาติกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ทำให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 3.22 ค่าสีความสว่าง (L*) เท่ากับ 22.47 ค่าสีแดง (a*) เท่ากับ 20.33 และค่าสีเหลือง (b*) เท่ากับ 16.51 ซึ่งใกล้เคียงกับสีย้อมธรรมชาติก่อนผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยมากที่สุด การสีติดเนื้อเยื่อพืชอยู่ในเฉดสีแดงและสามารถมองเห็นโครงสร้างเซลล์ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4 และตารางที่ 7)



ภาพที่ 4 การติดสีของเนื้อเยื่อลำต้นหมอน้อยจากการย้อมด้วยสีย้อมธรรมชาติแก่นฝางที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเติมมอร์แดนท์ $CuSO_4$ หลังผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยละลายน้ำกลั่น อัตราส่วน (ก) 1:1 (ข) 1:2 (ค) 1:5 (ง) 1:10

ตารางที่ 7 ความเป็นกรด-ด่างและคุณภาพสีของผงสีย้อมธรรมชาติหลังผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยละลายน้ำกลั่น

อัตราส่วน ผงแห้งสีย้อมธรรมชาติแก่นฝางที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเติมมอร์แดนท์ $CuSO_4$ (กรัม) : น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ค่ากรด-ด่าง (pH)	คุณภาพสี		
		L*	a*	b*
1:1	3.22	22.47	20.33	16.51
1:2	3.51	20.28	18.17	16.33
1:5	4.02	29.15	17.82	18.07
1:10	4.21	27.28	17.46	19.68

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะจากการวิจัย

สีย้อมธรรมชาติจากแก่นฝางที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและใช้มอร์แดนท์ $CuSO_4$ เป็นวิธีการสกัดสีย้อมธรรมชาติที่ดีที่สุดจากตัวอย่างพืชที่มีการศึกษาในครั้งนี้ โดยพบว่ามีคุณภาพใกล้เคียงกับสีย้อมสังเคราะห์ซาฟรานินโอ เมื่อนำสีย้อมธรรมชาติแก่นฝางที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและใช้มอร์แดนท์ $CuSO_4$ มาทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าอุณหภูมิที่ขาเข้าที่เหมาะสมที่สุด คือ 210 องศาเซลเซียส โดยทำให้ผงสีย้อมมีค่าความชื้นที่อยู่ในช่วงมาตรฐานและทำให้ได้ปริมาณผงสีย้อมมากที่สุด การละลายผงสีย้อมในน้ำกลั่น (กรัม: มิลลิลิตร) ที่เหมาะสมที่สุด คือ อัตราส่วน 1:1 เพราะย้อมสีสามารถติดเนื้อเยื่อพืชในเฉดสีแดงและมองเห็นโครงสร้างเซลล์อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงเห็นควรใช้สีย้อมธรรมชาติจากแก่นฝางที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและใช้มอร์แดนท์ $CuSO_4$ ในการย้อมเนื้อเยื่อพืชเพื่อทดแทนสีย้อมสังเคราะห์ซาฟรานินโอ ข้อเสนอแนะในการใช้งานคือควรเก็บผงสีย้อมธรรมชาติไว้ในตู้ดูดความชื้นเพื่อรักษาคุณภาพของสีย้อม

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีโดยได้รับความอนุเคราะห์จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่อนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการศึกษาวิจัย

Online-first Version

Copyright by Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

เอกสารอ้างอิง

Department of Science Service. (2010). **Anthocyanin** (In Thai). Bangkok: Bureau of Science and Technology Information.

Genesiska, A. and Herda, R. (2018). Extract of dragon fruit pulp *(Hylocereus polyrhizus)* potentially stain chromosomes of red onion (*Allium ascaloncum*). **Biogenesis: Journal Ilmiah Biology.** 6(2), 93-97.

Gita, H., Zulharmita, Z. and Ridho, A. (2021). Utilization of natural dyes substances for histological staining: a review. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, 9(1), 149-158.

Hoefnagels, M. (2019). **Biology: the essentials.** New York: McGraw-Hill Companies, Inc.

Manit, K. (2009). Natural dry from sappan tree (*Caesalpinia sappan* L.) for studying plant cells and tissues (in Thai). **Thai Journal of Botany,** 1(2), 61-70.

Mayuree, K., Prawpran, D., Suchaya, W. and Siaporn, H. (2018). Extraction and application of natural dyes from indigenous plants for plant histological staining (In Thai). **Proceedings of 3rd North Eastern Science and Technology Conference.** (pp.462-471). Ubon Ratchathani: Ubon Ratchathani Rajabhat University.

Phonchai, P. (2018). Productivity improvement of spray drying process in the leather dye manufacturing (in Thai). **Master's Thesis**. Bangkok: Kasetsart University.

Rujira, T., Yodchai, C., Alongkod, T. and Sayan, P. (2017). Application of natural dye from purple sweet corn (*Zea mays saccharate*) for plant cell mitosis studies (in Thai). **Koch Cha Sarn Journal of Science**, 39(2), 34-44.

Sirirat, P., Naphon, W. and Manussawee, D. (2021). Development of chromosome staining dye extracted from black glutinous rice (*Oryza sativa* ver. Indica) (In Thai). **Burapha Science Journal,** 26(2), 1096-1108.

Sobchai, S. (2006). The development of natural dry for staining cell and tissue. **Master's Thesis.** Chiang Mai: Chiang Mai University.

Supapporn, P. (2019). Stability of anthocyanin extract from riceberry rice bran encapsulated with rice bran protein concentrate under different pH and heating conditions (in Thai). **RMUTSB Academic Journal**, 7(2), 205-215.

Suwichar, D. (2007). Extration and purification of anthocyanin from java plum (*Syzygium cumini* L.) (in Thai). **Master's Thesis.** Bangkok: Kasetsart University.

Online-first Version