

บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลองวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

ชนิดพืชที่ศึกษา ประกอบด้วยพืช 6 ชนิดได้แก่

- ว่านมหาลาภ (*Eucrosia bicolor* Ker. Gawl)
- พลับพลึง (*Hymenocallis littoralis* Salsb.)
- บัวจีน (*Zephyranthes rosea* (Spreng) Lind.)
- หอมแดง (*Allium cepa* L. var. *ascalonicum*)
- กระดุมทอง (*Wedelia triloba* (L.) A. Hitchc.)
- หอมหัวใหญ่ (*Allium cepa* Linn.)

ลักษณะของพืชที่ใช้ในการศึกษา

บัวจีน : *Zephyranthes rosea* (Spreng) Lind.

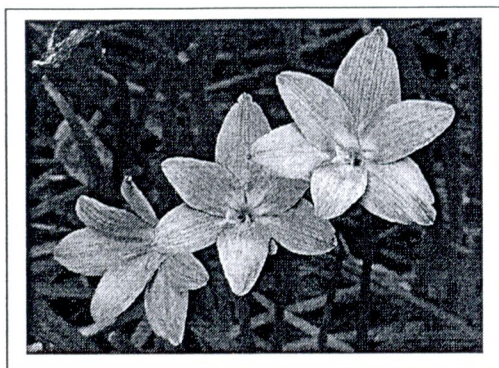
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไปคือ Zephyranthes Lily, Rain Lily, Rain flower, Fairy Lily, Little Witches บัวสวรรค์ บัวดิน หรือบัวฝรั่ง (จำนวนโครโมโซม $2n = 24$) เป็นไม้ล้มลุกมีหัวขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางของหัวประมาณ 1-2 นิ้ว ใบมีลักษณะแบนยาวเรียวบางชนิดใบกลมความยาวของใบ 6-12 นิ้ว ในประเทศหนาวบัวจีนจะทิ้งใบหมด และจะงอกใหม่ในฤดูใบไม้ผลิหรือฤดูร้อนในประเทศแถบร้อนเช่นเมืองไทย บัวจีนจะหยุดการเจริญเติบโตในฤดูแล้ง และจะเติบโตออกดอกในฤดูฝน ดอกเป็นรูปกรวย 6 กลีบดอกชั้นเดียว มีการเรียงตัวของกลีบดอกเป็นแบบสลับ ก้านดอกยาว 4-12 นิ้ว ดอกมีชนิดสีขาว เหลือง ชมพู และแดง ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดและแยกหัวปลูก (ภาพที่ 1 ก.)

(<http://www.bloggang.com/viewdiary.php?id=ainne&month=05-2005&date=26&group=7&gblog=23>)

ว่านมหาลาภ : *Eucrosia bicolor* Ker-Gawl

มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่ากวักหงษาเป็นไม้หัวขนาดเล็กคล้ายหอมหัวใหญ่ ใบ ลักษณะเป็นใบเดี่ยว เรียงเวียนสลับรอบต้นรูปใบหอกกว้าง 8-11 เซนติเมตร ยาว 20-24 เซนติเมตร ปลายใบมน โคนใบสอบขอบใบเรียบ แผ่นใบหนาอ่อนข้างอวบน้ำด้านบนมีสีเขียวอมเหลืองเป็นมัน ดอก สีส้มออกดอกเป็นช่อแบบซี่ร่ม ก้านดอกกลมชูตั้งขึ้นยาว 30-40 เซนติเมตร ดอกย่อย รูปกรวยแคบโคนกลีบดอกเชื่อมติดกันปลายแยกเป็น 5 แฉก มีเกสรเพศผู้สีเหลืองยื่นยาวโค้งขึ้นขนาดดอกบานเต็มที่ กว้าง 3-4 เซนติเมตร ผล เป็นชนิดผลแห้งแตกสีน้ำตาล เมล็ดแบนสีน้ำตาลดำ ขยายพันธุ์ โดยการแยกหัว (ภาพที่ 1 ข.)

(<http://158.108.89.200/agbbcc/Plant%20for~20Landscape~20WebSite/Webpage/Shrubs/>)



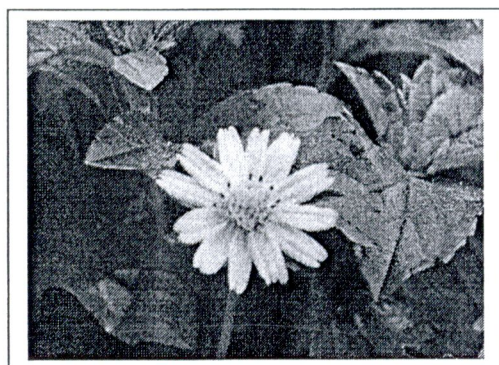
ก. บัวจีน

(*Zephyranthes rosea* (Spreng) Lind.)



ข. ว่านมहाลาภ

(*Eucrosia bicolor* ker. Gawl)



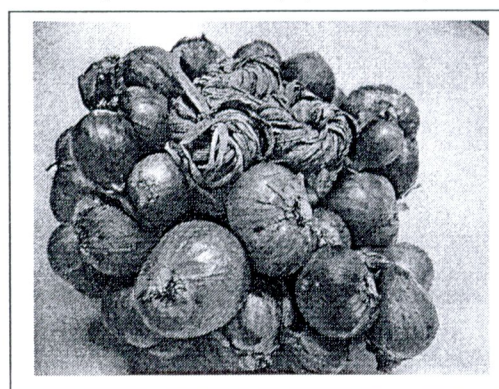
ค. กระดุมทอง

(*Wedelia tricba* (L.) A. Hitche)



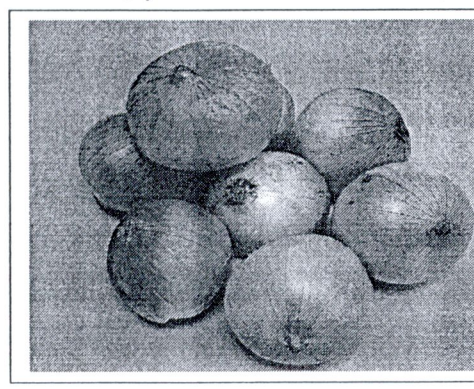
ง. พลับพลึงดินเป็ด

(*Hymenocallis littoralis* Salsb.)



จ. หอมแดง

(*Allium cepa* L. var. *ascalonicum*)



ฉ. หอมหัวใหญ่

(*Allium cepa* Linn.)

ภาพที่ 1 ลักษณะของพืชที่ใช้ทดลอง 6 ชนิด

กระดุมทองเลื้อย : *Wedelia trilobata* (L.) Hitch

ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป ได้แก่ Climbing Wedelia เป็นไม้ล้มลุกลำต้นแตกแขนงทอดราบไปตามพื้นดินปลายกิ่งมักชูตั้งขึ้นลำต้นมีขนประปราย ใบ ลักษณะเป็นใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม รูปรีกว้างหรือรูปไข่ กว้าง 2-5 ซม. ยาว 5.5 ซม. ปลายแหลม โคนสอบมีจักเป็นรูปสามเหลี่ยมที่ขอบใบทั้ง 2 ข้าง มีเส้นแขนงใบข้างละ 1 เส้น ที่โคนใบเห็นไม่ชัดเจน ดอก เป็นแบบช่อกระจุกออกตามซอกใบใกล้ยอด โคนช่อมีใบประดับรูปรีเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น ชั้นละ 4-5 ใบ ที่ขอบใบประดับมีขน กลีบดอกสีเหลือง โคนกลีบติดกันเป็นหลอดปลายแยก 5 แฉก ผลเกิดจากดอกวงนอกยาวประมาณ 5 มม. รูปไข่กลับปลายยอดผลมีเยื่อสีขาวรูปถ้วยเนื้อนุ่ม เมล็ดมีขนาดเล็กสีดำเป็นมันรูปสามเหลี่ยมปลายแหลม การขยายพันธุ์ ใช้วิธี ปักชำ (ภาพที่ 1 ก.)

(http://www.uru.ac.th/~botany/detail.php?bptany_id=7-53000-001-0241&value=&page=25)

พลับพลึงดินเป็ด : *Hymenocallis littoralis* Salisb.

ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไปคือ Spider lily เป็นไม้พุ่มขนาดเล็กมีหัวใต้ดินลักษณะเป็นกลีบๆ เรียงเวียนเป็นวงซ้อนอัดแน่นเป็นลำต้นเทียมเจริญเติบโตเป็นช่อชูส่วนของใบขึ้นมาเหนือดินแตกกอ ใบ เป็นใบเดี่ยว เรียงเวียนสลับถี่รอบต้น ใบรูปใบหอกแกมรูปขอบขนาน กว้าง 4-5 เซนติเมตร ยาว 100-120 เซนติเมตร ปลายเรียวมนถึงแหลมทู่ โคนใบแผ่เป็นกาบหุ้มลำต้น ขอบใบเรียบ แผ่นใบหนา สีเขียวเป็นมัน ปลายใบอ่อนโค้งลง ดอก มี สีขาวกลิ่นหอมอ่อนๆ ออกเป็นช่อแบบช่อซี่ร่มที่กลางต้น ก้านช่อดอกแข็งและค่อนข้างแบน ยาว 30-45 เซนติเมตร ช่อละ 4-8 ดอก ดอกย่อยเกิดเดี่ยวๆ บน ปลายก้านดอกย่อย กลีบเลี้ยง 5 กลีบ รูปรียาวยาว ส่วนโคนกลีบดอกติดกันเป็นหลอด ปลายแยกเป็น 6 แฉก มีส่วนที่ยื่นออกมาเป็นรูปแถบเรียวเล็ก ดอกบานเต็มที่กว้าง 8-10 เซนติเมตร ผล มีลักษณะเป็นผลแห้งแตก เมล็ดรูปกลม สีดำ (4kr ที่ 1ง)

(<http://158.108.200/agbbcc/plant%20for%20Landscape%20Webpage/Shrubs>)

หอมแดง : *Allium cepa* L. var *ascalonicum*

ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไปคือ Shallot หอมหัว หอมบัว (ภาคเหนือ) หอมไทย (ภาคกลาง) ดังช้าง, ช้าง (จีน)

เป็นพรรณไม้ล้มลุกขนาดเล็ก ลำต้นเป็นหัวอยู่ในดินมีลักษณะเป็นกาบสะสมอาหาร หัว มีสีแดง หรือน้ำตาลเหลืองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-4 เซนติเมตร ยาวประมาณ 1.5-4 เซนติเมตร ใบ มีลักษณะเป็นเส้นกลมข้างในกลวง ปลายใบแหลม ยาวประมาณ 12 นิ้ว มีสีเขียวแก่ ดอก มีลักษณะเป็นช่อ คล้ายกับร่ม ลักษณะของดอกย่อยมีกลีบดอก 6 กลีบ ยาวประมาณ 0.4-0.9 เซนติเมตร มีสีขาวหรือสีม่วงอ่อนๆ มีกลีบเลี้ยงเป็นเยื่อบางๆ หุ้มอยู่ ขนาด

ดอกบานเต็มทีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5-3.5 เซนติเมตร ก้านช่อเป็นเส้นกลม ข้างในกลวง ขาวประมาณ 8-10 นิ้ว ผล มีลักษณะเป็นกระจุกกกลมสีดำ (ภาพที่ 1จ.)

(<http://thaiherb.most.go.th/plantdetail.php?id=20>)

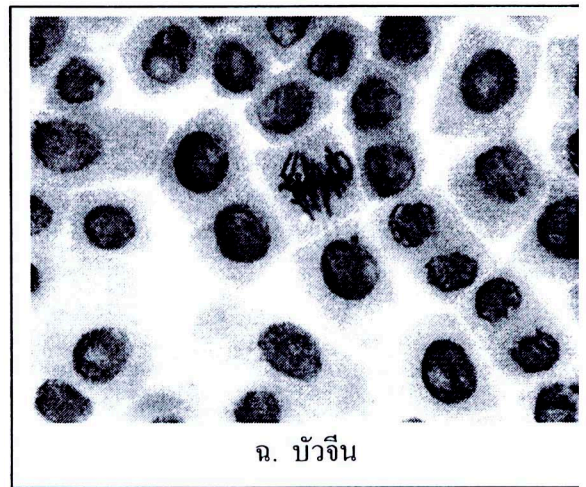
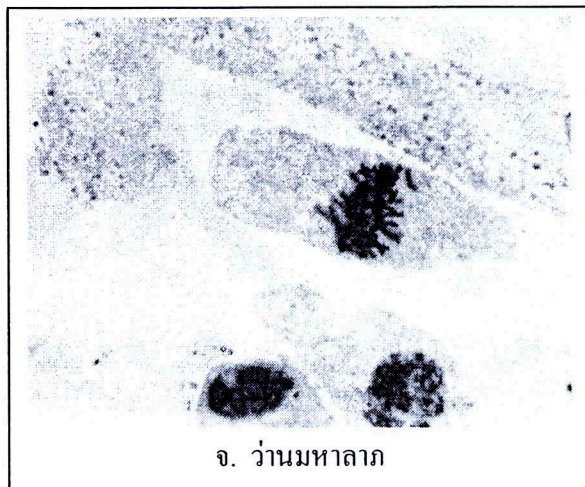
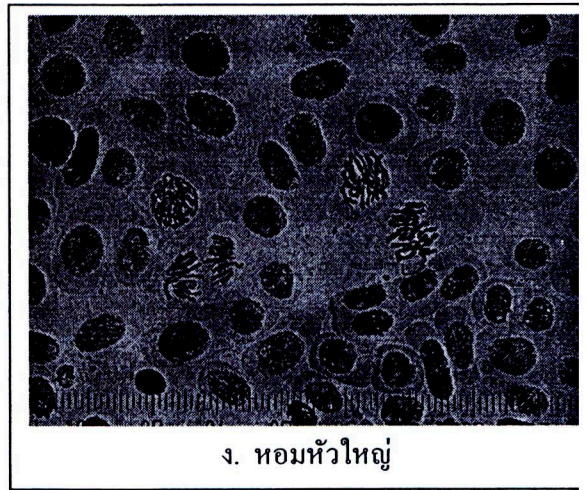
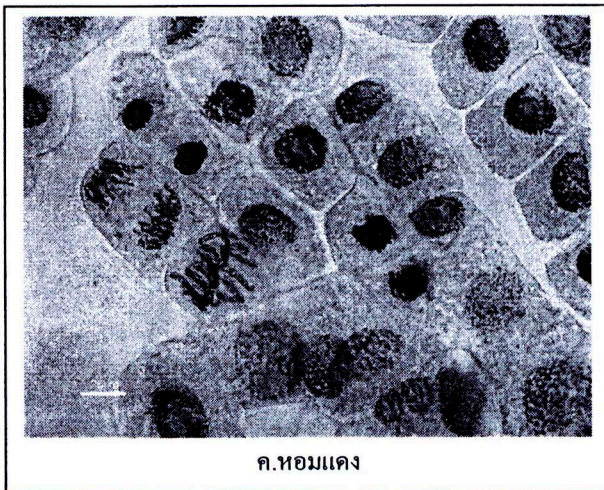
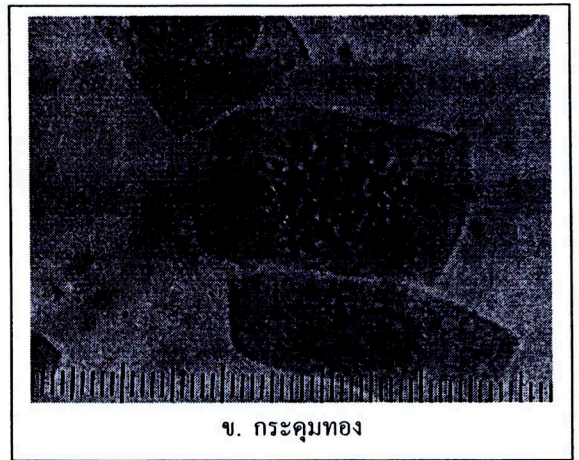
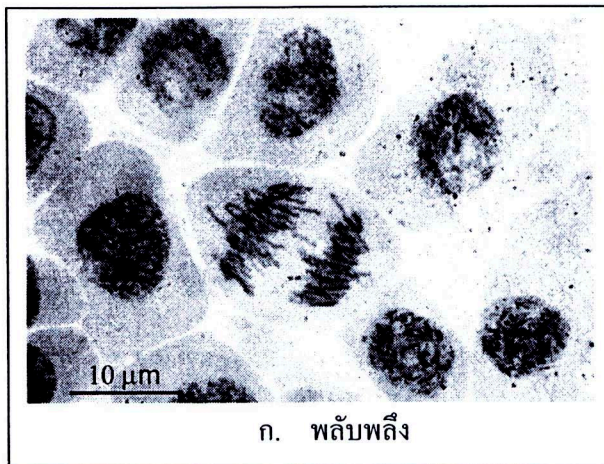
หอมหัวใหญ่ : *Allium cepa* L.

ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไปคือ หอมฝรั่ง หอมหัวใหญ่ เป็นพืชตระกูลเดียวกับกระเทียมหรือหอมแดง แต่มีขนาดหัวที่ใหญ่กว่า มีกลิ่นฉุน อายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 150 วัน หลังจากปลูกแล้ว จะเก็บเกี่ยวในช่วงเดือนธันวาคม-เมษายน ขยายพันธุ์ ด้วยการเพาะเมล็ด และเป็นพืชเศรษฐกิจที่ทำรายได้ให้แก่เกษตรกร ในหอมหัวใหญ่อุดมไปด้วยธาตุแคลเซียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม กำมะถัน ซิลิเนียม บีตาแคโรทีน กรดโฟลิก และฟลาโวนอยด์ เคอเซทิน ทุกส่วนของหอมหัวใหญ่สามารถที่จะช่วยรักษาโรคต่างๆ ได้ ไม่ว่าจะเป็นทั้งสดหรือแห้ง เช่น ใช้แก้หวัด คัดจมูก แก้อาการไอ ท้องเฟ้อ แน่นท้อง ท้องร่วง แก้ธาตุไม่ปกติ ช่วยขับปัสสาวะ ลดไขมันในเส้นเลือด กระจายเลือด ใช้พอกแผลซ้ำฝี แก้งูสุม แก้ปวด ใช้ทานและทาภายนอก มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อโรค แก้อาการอักเสบ และทำให้เจริญอาหาร

นอกจากรักษาโรคทั่วไปเหล่านี้แล้วก็ยังรักษาโรคหัวใจ มะเร็งลำไส้ มะเร็งตับ ขับพยาธิ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ความดันโลหิตสูง คอเลสเตอรอลในเลือด สลายลิ่มเลือด ภูมิแพ้ หอบหืด และเบาหวาน

นอกจากนี้ หอมหัวใหญ่ยังสามารถที่จะสกัด เป็นเครื่องสำอางได้ เช่น แชมพูสระผม ขาบำรุงเส้นผม เพราะมีสารที่ช่วยในการขจัดรังแคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย (ภาพที่ 1 ฉ.)

<http://www.bloggang.com/mainblog.php?id=healthyservice&month=26-03-2008&group=7&gblog=63>



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบขนาดและจำนวนของสารพันธุกรรมในพืชทดลอง 6 ชนิด (กำลังขยาย 600 เท่า)

สถานที่ทดลอง

ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร และ
สวนเกษตรอินทรีย์ ของนายวิที หลงสมบุญ บ้านเลขที่ 25/2 หมู่ 2 ต. สามพราน
อ. สามพราน จ. นครปฐม

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

- แคดเมียมคลอไรด์ ($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$)
- สารสกัดสะเดาเครื่องหมายการค้า 111
- สี aceto orcein 60 %
- สี aceto carmine
- 1 N HCl
- 95% ethanol
- glacial acetic acid
- light microscope 1500x พร้อม micrometer
- กล้องจุลทรรศน์

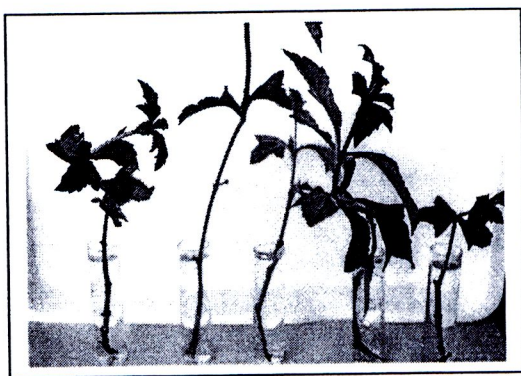
ขั้นตอนการทดลอง ประกอบด้วย

1. การคัดเลือกพืชท้องถิ่นที่มีคุณสมบัติในการใช้ตรวจสอบมลพิษ
 - 1.1 ทดสอบ genotoxicity ของแคดเมียมระดับความเข้มข้นต่างๆกับพืช 6 ชนิด
 - 1.2 ทดสอบผลทาง genotoxic กับพืชที่คัดเลือกไว้ 2 ชนิด เปรียบเทียบกับ
หอมหัวใหญ่ เมื่อได้รับแคดเมียมความเข้มข้นใดความเข้มข้นหนึ่งซึ่งแสดง
เป็นพิษชัดเจนซึ่งเป็นผลจากการทดลองในข้อ 1 โดยใช้เวลาทดลอง 24 และ 48
ชม. เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการใช้เป็น positive control
 - 1.3 ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสะเดาที่ความเข้มข้นระดับต่างๆกับสาร
พันธุกรรมของพืช 2 ชนิดที่คัดเลือกไว้เปรียบเทียบกับหอมหัวใหญ่
2. การศึกษาการเสื่อมฤทธิ์ของสารสกัดสะเดา 111 และการทดลองภาคสนาม โดยใช้พืช
ทดสอบ 2 ชนิด ที่ได้รับการคัดเลือกเปรียบเทียบกับหอมหัวใหญ่
 - 2.1 ศึกษาการเสื่อมฤทธิ์ของสารสกัดสะเดา 111 ด้วยวิธี genotoxicity testing และ
ตรวจสอบปริมาณสารสกัดสะเดาเพื่อยืนยันการเสื่อมฤทธิ์ด้วยเทคนิค High performance
liquid chromatography (HPLC)
 - 2.2 ประเมินความเป็นพิษของน้ำในแหล่งน้ำของสวนเกษตรอินทรีย์ภายหลังการฉีด
พ่นสารสกัดสะเดา วันแรก วันที่ 2 และวันที่ 3

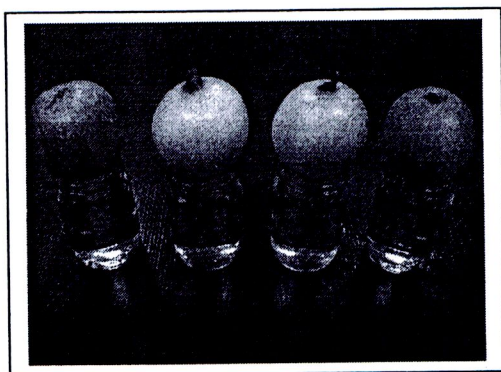
วิธีการทดลอง

การเตรียมพืช : พืชที่นำมาศึกษาแบ่งได้ตามลักษณะของพืชทดลองได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ใช้ส่วนของลำต้นบนดิน ได้แก่ พลับพลึง และกระดุมทอง เตรียมโดยการคัดเลือกพืชที่มีขนาดต้นใกล้เคียงกันกลุ่มทดลองละ 3 ต้น ลอกใบด้านล่างออก ล้างส่วนของลำต้นให้สะอาดหลายๆ ครั้งจึงนำไปแช่น้ำ ให้ส่วนที่ลอกใบออกแล้วสัมผัสกับน้ำ เปลี่ยนน้ำทุกวันจนสังเกตเห็นรากงอกออกมาตามข้อเมื่อรากมีความยาวประมาณ 0.5-1 ซม. จึงนำไปใช้กับสารทดสอบในขั้นตอนต่อไป

พืชกลุ่มที่ 2 เป็นพืชหัว (bulbs) มีลำต้นใต้ดิน ได้แก่ บัวจีน ว่านมหาลาก หอมแดง และหอมหัวใหญ่ ใช้วิธีลอกกาบใบที่แก่ออก ตัดรากเดิมออกให้หมด นำไปล้างหลายๆ ครั้งให้สะอาดในน้ำไหล จากนั้นจึงกระตุ้นให้งอกรากในน้ำกลั่น 2-3 วัน เปลี่ยนน้ำทุกวัน จนรากเริ่มงอกได้ความยาวประมาณ 0.5-1 ซม. จึงนำไปใช้ทดสอบ (ภาพที่ 3)



กระดุมทองตัวแทนของพืชที่ใช้ลำต้นบนดิน



หอมหัวใหญ่ตัวแทนของพืชที่ใช้ลำต้นใต้ดิน

ภาพที่ 3 แสดงการเตรียมพืชและการกระตุ้นให้งอกรากในพืช 2 กลุ่ม

การคัดเลือกพืชท้องถิ่นที่มีคุณสมบัติในการใช้ประเมินสารพิษปนเปื้อน

1.1. การทดสอบ genotoxicity ของแคดเมียมกับพืช 6 ชนิด

นำพืชทั้ง 6 ชนิดที่เตรียมโดยกระตุ้นให้งอกรากแล้วไปแช่ในสารละลาย $CdCl_2$ ความเข้มข้น 0.0, 0.02, 0.03, 0.06 และ 0.09 ppm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างส่วนหัวและรากให้สะอาดจึงนำไปเลี้ยงรากในน้ำกลั่นอีก 48 ชั่วโมง เพื่อให้รากฟื้นตัว จึงตัดรากมาตรวจความเป็นพิษของแคดเมียมต่อสารพันธุกรรม

1.2. ทดสอบผลทาง Genotoxic กับพืชที่คัดเลือกไว้ 2 ชนิดเปรียบเทียบกับหอมหัวใหญ่เมื่อได้รับแคดเมียมความเข้มข้นใดความเข้มข้นหนึ่งที่แสดงความเป็นพิษชัดเจนเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

นำผลการทดสอบในข้อ 1.1 มาวิเคราะห์เพื่อหาบทสรุปว่าพืชใดมีการตอบสนองที่ดีกับสารทดสอบ โดยเปรียบเทียบกับหอมหัวใหญ่ซึ่งเป็นพืชที่นิยมใช้เป็นสากลในฐานะของ Biomarker และความเข้มข้นของแคดเมียมระดับใดที่ให้ความผิดปกติของสารพันธุกรรมสูงซึ่งสมควรใช้เป็นระดับ

ความเข้มข้นของ positive control แล้วจึงดำเนินการนำพืชที่คัดเลือกไว้ 2 ชนิดมาทดสอบกับแคดเมียม ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะใช้เป็น positive control เวลาทดสอบสารเท่ากับ 24 และ 48 ชั่วโมง หลังปล่อยให้รากฟื้นตัว 48 ชั่วโมง ในน้ำกลั่นจึงตรวจสอบความเป็นพิษของแคดเมียมจากสารปนเปื้อนของเซลล์รากเช่นเดียวกัน

1.3. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสะเดาความเข้มข้นต่างๆกับพืช 2 ชนิดที่คัดเลือกไว้ เปรียบเทียบกับหอมหัวใหญ่

นำพืช 2 ชนิดที่ผ่านการกระตุ้นให้งอกรากแล้วมาทดสอบกับสารละลายของสารสกัดสะเดาที่ประกอบด้วย azadirachtin 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ppm (ข้อกำหนดให้เกษตรกรใช้ 1.25-2.5 ppm) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจผลทางเซลล์วิทยา ภายหลังกาบกิ่งฟื้นตัวในน้ำกลั่น 48 ชั่วโมง

2. การศึกษาการเสื่อมฤทธิ์ของสารสกัดสะเดา 111 และการทดลองภาคสนาม

พืชทดลอง ชนิดพืชที่ศึกษาเป็นพืชที่ได้รับการคัดเลือกมาจากผลการทดลองในขั้นตอนแรกมี 3 ชนิดคือ ว่านมหาลาภ (*E. bicolor*) บัวจีน (*Z. rosea*) และหอมหัวใหญ่ (*A. cepa*)

วิธีการทดลองประกอบด้วย 2 ส่วนคือ

2.1 การประเมินการเสื่อมฤทธิ์ของสารสกัดสะเดา

2.1.1 ประเมินการเสื่อมฤทธิ์ของสารสกัดสะเดาที่ความเข้มข้น 2.00 ppm (คำนวณตามรายละเอียดความเข้มข้นที่ระบุไว้ในฉลากข้างขวดบรรจุภัณฑ์โดยข้อบ่งชี้ที่แนะนำเกษตรกรอยู่ในช่วง 1.25-2.5 ppm) โดยให้สารละลายดังกล่าวสัมผัสกับแสงแดดเป็นเวลา 3 วันและ 7 วัน (กำหนดตามข้อ)ปฏิบัติของเกษตรกรที่เก็บผลผลิตการเกษตรภายหลังการฉีดพ่นสารกำจัดศัตรูพืช 3 วัน และข้อบ่งชี้ในการใช้สารละลายของสารสกัดสะเดาที่แนะนำให้ฉีดพ่นทุกๆ 7 วัน) ระยะเวลาให้สารทดสอบที่ปลารากพืช 24 ชั่วโมง

2.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณ *Aza* จากสารสกัดสะเดาที่ความเข้มข้น 2.00 ppm และสารสกัดสะเดาความเข้มข้น 2.00 ppm ที่ผ่านการได้รับแสงแดดเป็นเวลา 3 วัน และ 7 วัน ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้สาร Azadirachtin มาตรฐานของ Sigma-Alrich (USA) การวิเคราะห์นี้ใช้สารละลายตัวอย่าง 20 μ l. ใช้ Pursuit C 18 column (5 μ m x 250 x 4.6 mm² ID) ใน Agilent 1100 series HPLC system โดยใช้ 1100 Binary Pump และ 1100 Diode Array สำหรับ mobile phase ที่ใช้ประกอบด้วย acetonitrile-water (40 : 60 โดยปริมาตร) ด้วยอัตราการไหล 1 ml min⁻¹ ใช้ uv detector ที่ความยาวคลื่น 210 nm (Kaushik, 2002) ค่า retention time ของ standard *Aza* คือ 10.5 min และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย HP Chemstation Data System ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ

2.2 ประเมินความเป็นพิษของน้ำในแหล่งน้ำจากสวนเกษตรอินทรีย์หลังการฉีดพ่นสารสกัดสะเดาวันแรก วันที่สอง และวันที่สาม พืชที่ใช้ทดสอบ ชนิด เวลาทดสอบ 24 และ 48 ชั่วโมง

การตรวจสอบทางเซลล์วิทยา

นำปลายรากที่ผ่านการทดสอบด้วย CdCl_2 และสารสกัดสะเดามาตัดบริเวณปลายรากความยาวประมาณ 2 ม.ม. โดยตัดในช่วงเวลาที่มีการแบ่งเซลล์สูงที่สุดและแช่ปลายรากในน้ำยาตรึงเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย methanol : glacial acetic acid อัตราส่วน 3 : 1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4°C ล้างรากแล้วจึงนำมาทำให้เนื้อเยื่ออ่อนนุ่มและเซลล์แยกตัวออกด้วย 1 N HCl ที่ 60°C เป็นเวลา 5 นาที ล้างปลายรากด้วยน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง และย้อมด้วยสี aceto orcein หรือ acetocarmine 5-15 นาที ขึ้นอยู่กับชนิดพืช ปิดปลายรากที่อยู่ในหยดสีด้วยกระจกปิดสไลด์เคาะเซลล์และกดให้แบนจึงนำมาตรวจความผิดปกติของโครโมโซมและการแบ่งเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) กำลังขยาย 1500X นับจำนวนเซลล์ที่มีโครโมโซมหรือนิวเคลียสผิดปกติ จำนวนเซลล์ที่แบ่งตัวระยะต่างๆ ในจำนวนเซลล์ทั้งหมด 1000 เซลล์ต่อรากแต่ละกลุ่มทดลองบันทึกผลจาก 5 ราก (5000 เซลล์)

การบันทึกผล

ตรวจสอบอัตราการยับยั้งการแบ่งเซลล์ (mitotic inhibition assay) โดยวิเคราะห์จากค่า mitotic index และ phase index และตรวจสอบอัตราความผิดปกติของโครโมโซมและนิวเคลียส (mitotic aberration) ดังนี้

Mitotic index ได้แก่สัดส่วนของจำนวนเซลล์ที่อยู่ในระหว่างการแบ่งเซลล์(ระยะโพรเฟส เมทาเฟส แอแนเฟส และ เทโลเฟส)ต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมด (1000 เซลล์) ในช่วงเวลาที่ศึกษา

Phase index เป็นสัดส่วนระหว่างจำนวนเซลล์ในระยะหนึ่ง ๆ ต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่ศึกษา Chromosome disturb เป็นโครโมโซมที่มีการเคลื่อนตัวอย่างไม่สมบูรณ์ เช่น เคลื่อนตัวช้า หรือเร็วเกินไป

Anaphase หรือ Telophase bridge ลักษณะของโครโมโซมที่มี 2 เซนโทรเมียร์ทำให้ถูกดึงไปทั้ง 2 ด้านของเซลล์จึงมองเห็นลักษณะคล้ายสะพาน

Chromosome fragment เป็นชิ้นส่วนของโครโมโซมที่เกิดจากการแตกหัก และลอยอยู่ในไซโทพลาซึม โดยทั่วไปมักไม่มีเซนโทรเมียร์

Lagging chromosome เป็นโครโมโซมที่มีการเคลื่อนที่ช้ากว่าโครโมโซมเส้นอื่น ๆ

Micronucleus ลักษณะเป็นนิวเคลียสขนาดเล็ก ๆ ที่เกิดจากการที่เซลล์สร้างเยื่อหุ้มนิวเคลียส ล้อมรอบโครโมโซมหรือชิ้นส่วนของโครโมโซมบางแท่งไว้

Binucleus, Trinucleus เป็นเซลล์ที่มี 2 หรือ 3 นิวเคลียสที่เป็นผลจากความผิดปกติของการแบ่งไซโทพลาซึม