บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 Ultraviolet-visible Spectrophotometer (UV-VIS)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Varian Cary 50 Probe ทำได้โดยนำสารที่ต้องการวัดมาละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่สารนั้นละลายได้ดี แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.1.2 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR)

เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR) ของบริษัท Nicolet Impact รุ่น 410 สำหรับวัดอินฟราเรดสเปกตราของสาร สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยบดผสมกับโปแตสเซียมโบรไมด์ (KBr) อัดเป็นแผ่น (pellet) เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร หนาประมาณ 1 มิลลิเมตร

3.1.3 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR)

เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR) รุ่น Varian Mercury 400 NMR สำหรับการหาโปรตอนและคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรา โดยวัดค่าเคมิคอลชิฟท์เป็นพีพีเอ็ม (ppm) สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยละลายในคลอโรฟอร์ม-ดี ($CDCl_3$) ดิวเทอร์เรียมออกไซด์ (D_2O) และไดเมธิลซัลฟอกไซด์- d_6 (DMSO-d_6) ^{1}H-NMR สเปกตรัมวิเคราะห์ที่ 400 MHz สำหรับ ^{1}H nuclei โดยอ้างอิงกับค่าเคมิคอลชิฟท์ของตัวทำละลายที่เหลืออยู่ ค่าเคมิคอลชิฟท์ (δ) 7.26 ppm สำหรับ $CDCl_3$, 2.50 ppm สำหรับ DMSO-d_6, 4.87 ppm สำหรับ MeOH-d_4 และ 4.80 ppm สำหรับ D_2O และวิเคราะห์ ^{13}C-NMR ที่ 100 MHz สำหรับ ^{13}C nuclei มีค่าเคมิคอลชิฟท์ (δ) 77.1 ppm

3.1.4 Mass Spectrometer (MS)

เครื่อง Polaris Q Finnigan Instrument Mass Spectrometer โดยใช้ Electron Impact Source (EI) ซึ่งมีความต่างศักย์ 70 อิเล็กตรอนโวลต์ กระแส 300 ไมโครแอมป์ อุณหภูมิ 180-300 องศาเซลเซียส สำหรับบันทึกแมสสเปกตรา

3.1.5 เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Fisher-John Melting Point Apparatus)

สำหรับการหาจุดหลอมเหลวใช้เครื่อง Fisher-John Melting Point Apparatus ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำได้โดยนำสารตัวอย่างมาบดให้ละเอียด จากนั้นบรรจุลงในหลอดแก้วสำหรับตรวจหาจุดหลอมเหลว (capillary tube) ให้ได้ความสูงพอประมาณ แล้วนำไปหาจุดหลอมเหลวด้วยเครื่องวัดจุดหลอมเหลว

3.1.6 Specific Optical Rotation

Polarimeter รุ่น 341 โดยใช้ sodium lamp ที่ความยาวคลื่น 589 นาโนเมตร ของบริษัท Perkin-Elmer

3.1.7 Rotary Vacuum Evaporator

เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) ของบริษัท Buchi ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.2 สารเคมี

3.2.1 ตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลองเป็นตัวทำละลาย Commercial Grade และ Analytical Grade แต่สำหรับตัวทำละลาย Commercial Grade นั้น จะต้องทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่นก่อนนำมาใช้ทุกครั้ง ตัวทำละลายที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, ไดคลอโรมีเธน, เอธิลแอซิเตต, เมธานอล และ แอซิโตน

3.2.2 สารเคมีชนิดอื่นๆ

1. ตัวดูดซับใช้ซิลิกาเจล Silica gel 60 No. 109385.1000 (230-400 Mesh ASTM) (E.Merck). สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี

2. แผ่นธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography) สำเร็จรูปชนิด Art. 5554 TLC Aluminium sheets Silica gel $60F_{254}$ (1.05554.0001) ของบริษัท Merck, Damstadt ประเทศเยอรมนี

3. Sephadex LH-20 ของบริษัท Pharmacia Bi otech AB. ประเทศสวีเดน

3.3 เทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

บรรจุตัวดูดซับซิลิกาเจล Silica gel 60 No. 109385.1000 หรือ Sephadex LH-20 ลงในคอลัมน์ ซึ่งวิธีนี้จะใช้ปั๊มช่วย เพื่อให้ตัวทำละลายไหลได้เร็วขึ้น

3.3.2 ธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC)

ใช้แผ่น TLC สำเร็จรูปแต้มสารด้วยหลอดรูเล็ก (Capillary tube) แล้วทำให้เกิดการแยก (develop)ในขวดแก้วปล่อยให้วัฏภาคเคลื่อนที่เคลื่อนไปจนถึงแนวเส้นตัวทำละลาย (solvent front) ทำให้แห้ง จากนั้นนำไปตรวจหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC โดยส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร หรือนำแผ่น TLC ใส่ลงในภาชนะที่อิ่มด้วยไอของไอโอดีน หรือใช้รีเอเจนต์ Vanillin/H_2SO_4 (ซึ่งประกอบด้วย วานิลิน 0.50 กรัม, เอธานอล 95 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 4.5 มิลลิลิตร) พอให้สารซึมเข้าแผ่น TLC จนทั่ว แล้วนำแผ่น TLC ไปให้ความร้อนจนปรากฏจุดของสารขึ้นบนแผ่น TLC

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง (ดูรายละเอียดสูตรอาหารในภาคผนวก ก.)

อาหารแข็ง

1. Glucose Yeast Extract Agar (GYA)
2. Malt Extract Agar (MEA)
3. Nutreint Agar (NA)
4. Potato Dextrose Agar (PDA)
5. Sabouraud's Dextrose Agar (SDA)
6. Yeast Extract Sucrose Agar (YEA)
7. Yeast-Malt Extract Agar (YMA)

อาหารเหลว

1. Glucose Yeast Extract Broth(GYB)
2. Malt Extract Broth (MEB)
3. Nutreint Broth (NB)
4. Potato Dextrose Broth (PDB)
5. Sabouraud's Dextrose Broth (SDB)
6. Yeast Extract Sucrose Broth (YEB)
7. Yeast-Malt Extract Broth (YMB)
8. Mueller-Hinton Broth (MHB)

3.5 ราเอ็นโดไฟต์ที่ใช้ในการทดลอง

ราเอ็นโดไฟต์ที่ใช้ในการทดลอง คือ ราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 ที่แยกไว้โดย วันทนีย์ ทมมีด จากบริเวณใบของต้นเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius* ในจังหวัดกาญจนบุรี [8]

3.6 การเก็บรักษาราเอ็นโดไฟต์

ราเอ็นโดไฟต์สามารถทำการเก็บรักษาได้ 2 วิธี ดังนี้

1. ตัดราเอ็นโดไฟต์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ขนาด 0.3x0.3 เซนติเมตร จำนวน 8-10 ชิ้น เขี่ยใส่ลงในขวดบรรจุน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

2. เพาะราเอ็นโดไฟต์ลงบนแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง จนเชื่อเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร ราดทับด้วยพาราฟินเหลว (liquid paraffin) สูงจากผิวหน้าอาหารประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์และการจัดจำแนกราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13

3.7.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ก. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่ต่างกัน 5 ชนิด

นำราเอ็นโดไฟต์ที่มีความบริสุทธิ์แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5 ชนิด ได้แก่ GYA, MEA, PDA, SDA และ YEA ที่เตรียมไว้ในจานเพาะเชื้อที่มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 9 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องจนราเจริญเต็มจานเพาะเชื้อ หลังจากนั้นนำมาศึกษาลักษณะต่างๆ ของเชื้อรา เช่น ลักษณะของโคโลนีหรือสีของเส้นใยและสปอร์ สีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ราสร้างขึ้น เป็นต้น โดยสังเกตด้วยตาเปล่าและส่องดูด้วยกล้อง บันทึกภาพ

ข. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนกิ่งไม้ในขวดทรงสูง

นำราเอ็นโดไฟต์ที่มีความบริสุทธิ์แล้ว เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ในขวดทรงสูง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 20 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำกิ่งเปล้าใหญ่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอแล้ว ใส่ลงไปในขวดที่มีเชื้อเจริญอยู่ นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อมีการเจริญไปยังกิ่งเปล้าใหญ่และมีการงอกของสโตรมาเกิดขึ้น แล้วทำการศึกษาลักษณะของเส้นใย และสโตรมาของเชื้อด้วยตาเปล่า บันทึกภาพ

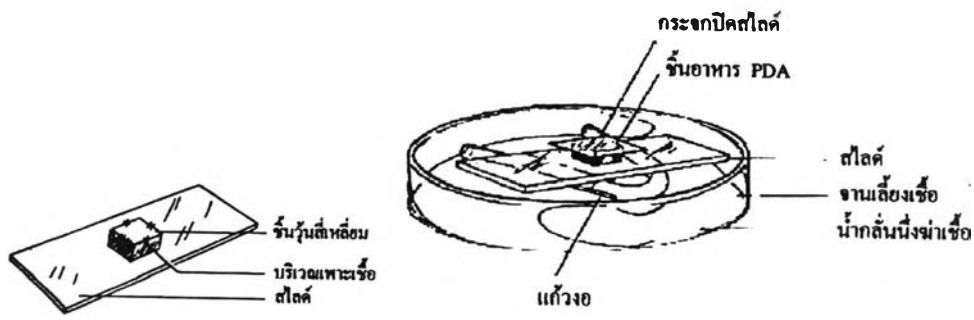
ค. การทำ slide culture

การทำ slide culture (ภาพที่ 3.1) เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใย สปอร์ ก้านชูสปอร์ หรือลักษณะอื่นๆ ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีวิธีการทำดังนี้

1. นำกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ววางลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ววางแท่งแก้วรูปตัววีหรือแท่งไม้ที่มีความยาวพอเหมาะ 2 แท่ง ที่ฆ่าเชื้อแล้วทับบนกระดาษกรอง จากนั้นวางแผ่นสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงบนแท่งแก้วหรือแท่งไม้อีกที
2. ตัดชิ้นวุ้นขนาดประมาณ 1x1x0.3 ตารางเซนติเมตร วางลงบนแผ่นสไลด์ แล้วเขี่ยเชื้อราที่ต้องการศึกษาใส่ลงที่ด้านข้างของชิ้นวุ้นทั้ง 4 ด้าน จากนั้นปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยการจุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนไฟ

3. เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในจานเพาะเชื้อพอให้ชุ่มกระดาษกรองหรือผ้าก๊อซ ปิดฝาจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 30° C เป็นเวลา 3-5 วันหรือจนกว่าเชื้อราจะเจริญเต็มที่ สังเกตการเจริญของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกวัน โดยยกทั้งจานเพาะเชื้อขึ้นมาวางบนแท่นรองรับ ของกล้องจุลทรรศน์ เปิดฝาออก แล้วจึงส่องดูด้วยเลนส์กำลังขยายต่ำสุด

4. ตรวจสอบลักษณะโครงสร้างของสปอร์ โดยการหยดสีย้อมแลคโตฟีนอลคอตตอนบลู (Lactophenol Cotton Blue) ลงบนแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ที่เส้นใยของเชื้อราเจริญอยู่ นำไปศึกษาลักษณะเส้นใยของสปอร์ หรือลักษณะอื่นๆ ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทาขอบสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บเพื่อป้องกันสีย้อมแห้งหากเก็บไว้ศึกษาต่อไป



ภาพที่ 3.1 การทำ Slide Culture

3.8 การเตรียมเชื้อจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.8.1 การเตรียมวัสดุอุปกรณ์ปราศจากเชื้อ

- เครื่องแก้วทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง ทำให้ปราศจากเชื้อโดยความร้อนด้วย Hot Air Oven โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมง

- ส่วนอุปกรณ์อื่นๆ ที่ไม่ใช่เครื่องแก้ว ทำให้ปราศจากเชื้อโดยความร้อน โดยนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

3.8.2 เชื้อจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 เชื้อจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

เชื้อจุลชีพทดสอบ		สายพันธุ์
แบคทีเรีย	แบคทีเรียแกรมบวก	*Bacillus subtilis* ATCC 6633
		Staphylococcus aureus ATCC 25923
	แบคทีเรียแกรมลบ	*Escherichia coli* ATCC 25922
		Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
ยีสต์	ราที่เจริญในรูปของยีสต์	*Candida albicans* ATCC 10231

เชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ที่นำมาใช้ในการทดสอบ จะต้องวัดความขุ่นของเชื้อก่อนนำมาทดสอบ โดยปรับความขุ่นเทียบกับ 0.5 McFarland standard และอ่านค่าจากเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.05-0.10 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 10^6-10^7 CFU/ml ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานสำหรับใช้เปรียบเทียบกับเชื้อราเอ็นโดไฟต์ที่นำมาทดสอบฤทธิ์ด้วย และจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลชีพทดสอบที่อ่านค่าได้จะมีหน่วยเป็น CFU/ml ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 จำนวนจุลชีพทดสอบ (CFU/ml) ที่มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland standard

จุลชีพทดสอบ	จำนวนจุลชีพทดสอบ (CFU/ml)
Bacillus subtilis ATCC 6633	5.1×10^6
Staphylococcus aureus ATCC 25923	6.1×10^6
Escherichia coli ATCC 25922	2.3×10^7
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	2.1×10^7
Candida albicans ATCC 10231	2.4×10^6

หมายเหตุ 0.5 McFarland standard คือ ค่าความขุ่นมาตรฐานของเชื้อจุลชีพทดสอบ ที่มีจำนวนเชื้ออยู่ประมาณ 1×10^6 CFU/ml

3.8.3 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

นำแบคทีเรียทดสอบเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง NA ให้เป็นโคโลนีเดี่ยว นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูปเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่บ่มไว้แล้วนั้นมาประมาณ 4-5 โคโลนี ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลาประมาณ 6-8 ชั่วโมง หรือสังเกตเห็นว่าอาหารในหลอดทดลองนั้นมีความขุ่น โดยจะทำการปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ให้มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland standard แล้วทำการอ่านค่าความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.10 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 10^6-10^7 CFU/ml เมื่อจะทำการทดสอบใช้สำลีพันปลายไม้ที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ กดสำลีพันปลายไม้กับข้างหลอดเพื่อไม่ให้ได้ปริมาณของเชื้อมากเกินไป แล้วป้ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA ให้ทั่ว หมุนจานเพาะเชื้อ 60° ป้ายให้ทั่ว หมุนอีก 60° ป้ายซ้ำอีกครั้ง และหมุนอีก 60° ป้ายซ้ำอีกครั้ง แล้วนำไปใช้เพื่อการทดสอบต่อไป

3.8.4 การเตรียมยีสต์ทดสอบ

ทำการปฏิบัติเช่นเดียวกับการเตรียมแบคทีเรียทดสอบในข้อ 3.8.3 แต่เปลี่ยนจากอาหารเลี้ยงเชื้ออาหารแข็ง NA และอาหารเหลว NB มาทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็ง YMA และอาหารเหลว YMB ตามลำดับ แล้วนำไปใช้เพื่อการทดสอบต่อไป

3.9 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13

3.9.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ

เตรียมราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 ให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมีส่วนประกอบที่ต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ GYB, MEB, PDB, SDB และ YEB บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 28 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ราส่วนใหญ่ที่การสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แยกส่วนของเส้นใยรา (Mycelium) และน้ำเลี้ยงเชื้อ (Broth) ออกจากกัน แล้วนำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Agar-well Diffusion Method [127]

3.9.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Agar-well Diffusion Method [127]

1. เจาะรูอาหารเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.8.3 และ 3.8.4 โดยใช้ sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 8.0 มิลลิเมตร และใช้เข็มเขี่ยชิ้นวุ้นทิ้งในน้ำยาฆ่าเชื้อ

2. หยอดน้ำเลี้ยงเชื้อที่จะทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งลงหลุมที่เจาะไว้ด้วย micropipette หลุมละประมาณ 200 ไมโครลิตร

3. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารแพร่ออกเป็นโซนก่อนเชื้อเจริญ แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. วัดผลการยับยั้งที่ได้ด้วยไม้บรรทัด โดยวัดโซนใสที่เกิดขึ้นรอบๆ รูที่เจาะไว้จากขอบด้านหนึ่งถึงอีกด้านหนึ่ง หาค่าเฉลี่ย แล้วบันทึกผล.

3.10 การหาอัตราการเจริญเติบโต (growth curve) และการหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13

3.10.1 การหาอัตราการเจริญเติบโต (growth curve)

1. เตรียมราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 ให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง SDA เป็นเวลา 14 วัน หรือเมื่อราเจริญเต็มจานเพาะเชื้อ

2. เจาะชิ้นวุ้นที่มีราเจริญอยู่เต็มบนอาหารเพาะเชื้อโดยใช้ sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 8.0 มิลลิเมตร 5 ชิ้น ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 6 ลิตร ทำการบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. เก็บตัวอย่างโดยจะทำการเก็บวันเว้นวัน ครั้งละ 3 flask นำมากรองแยกเส้นใยรากับน้ำเลี้ยงออกจากกันด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

4. เส้นใยราที่กรองได้ นำมาหาน้ำหนักแห้ง โดยนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60-70° C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ หาค่าเฉลี่ย แล้วบักทึกผลที่ได้ นำไปเขียนกราฟเส้นเพื่อดูอัตราการเจริญเติบโต

3.10.2 การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ

1. นำน้ำเลี้ยงเชื้อราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 จากการหาอัตราการเจริญเติบโตในข้อ 3.10.1 ที่เก็บในแต่ละครั้ง นำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพตามวิธีในข้อ 3.9.2

2. วัดผลการยับยั้งที่ได้ด้วยไม้บรรทัด โดยวัดโซนใสที่เกิดขึ้นรอบๆ รูที่เจาะไว้จากขอบด้านหนึ่งถึงอีกด้านหนึ่ง หาค่าเฉลี่ย แล้วบันทึกผล.

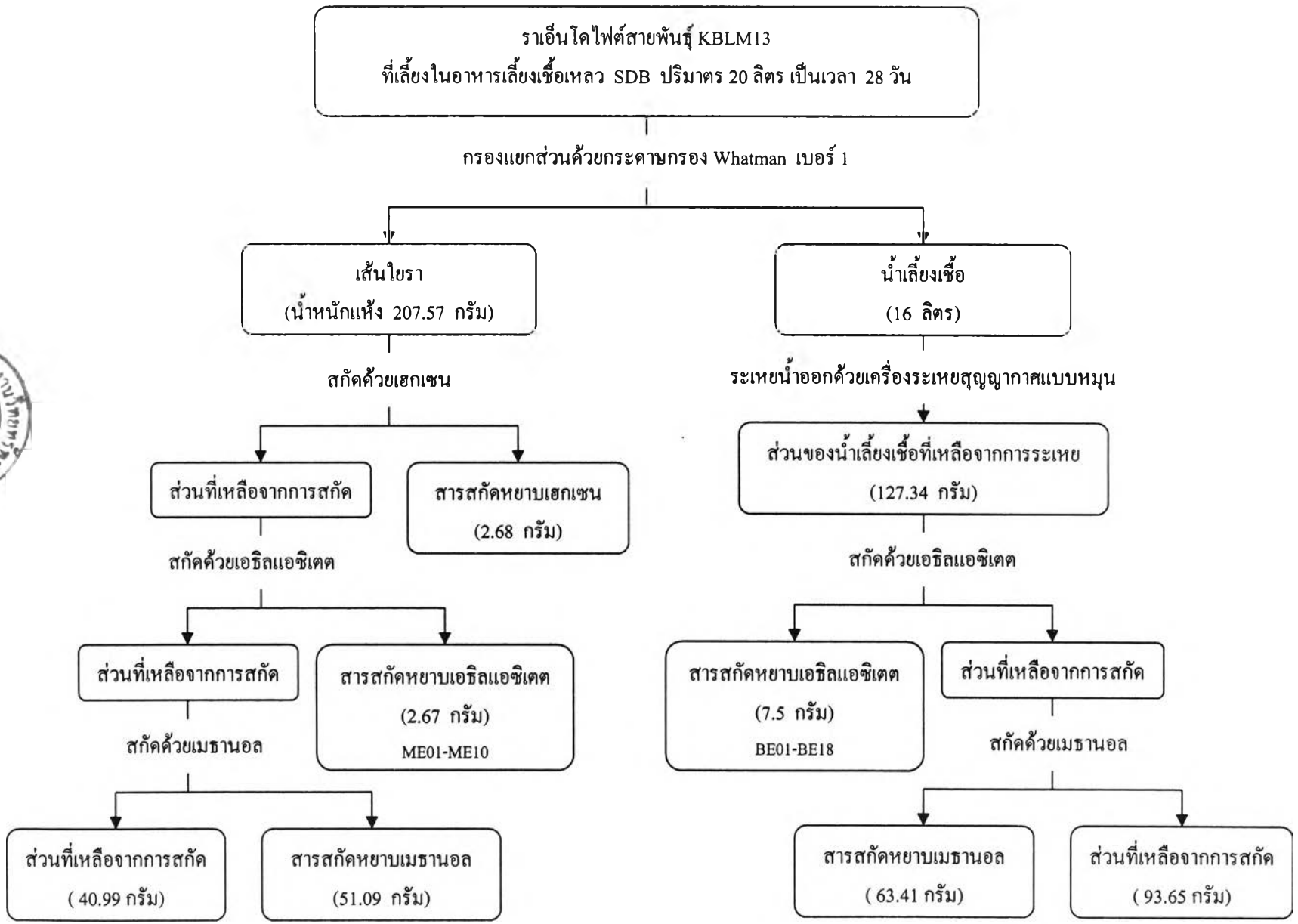
3.11 การสกัดและการแยกสารประกอบของสารสกัดที่ได้จากราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13

3.11.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13

ใช้ sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 8.0 มิลลิเมตร เจาะเอาเส้นใยของเชื้อราเอ็นโดไฟต์ สายพันธุ์ KBLM13 อายุ 14 วัน ที่เจริญอยู่บนอาหารแข็ง SDA มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ชิ้นต่อ 1 flask เลี้ยงทั้งหมดปริมาตร 20 ลิตร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 28 วัน

3.11.2 การสกัดสารจากราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13

นำราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 ที่เพาะเลี้ยงไว้ในข้อ 3.11.1 มาทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ซึ่งจะได้ส่วนของเส้นใยราและส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงนำทั้ง 2 ส่วนที่แยกได้นี้มาสกัดต่อด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอธิลแอซิเตต และเมธานอล ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 3.1



แผนภาพที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารจากเส้นใยและน้ำลี้ยงเชื้อราเอื่นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13

3.12 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13

3.12.1 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตจากเส้นใย

นำสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตจากเส้นใย น้ำหนัก 2.67 กรัม มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (300 กรัม) คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติมตร สูง 80 เซนติมตร ตัวชะที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน, เฮกเซน-ไดคลอโรมีเธน, ไดคลอโรมีเธน, ไดคลอโรมีเธน-เมธานอล และเมธานอล ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 การแยกสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตจากเส้นใยราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13

ลำดับส่วนที่ (ก่อน)	ลำดับส่วนที่ (หลัง)	ตัวชะ	ลักษณะของสาร	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
1-40	ME01	100 % เฮกเซน	น้ำมันสีเหลืองใส	249.8
41-70	ME02	50-80% ไดคลอโรมีเธนในเฮกเซน	ครูดสีเหลือง	52.5
71-85	ME03	100 % ไดคลอโรมีเธน	ครูดสีเหลือง	21.6
86-155	ME04	100 % ไดคลอโรมีเธน	ครูดสีเหลืองปนของแข็งสีขาว	24.0
156-170	ME05	5 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ครูดสีเหลืองส้มปนน้ำมัน	250.8
171-190	ME06	5 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ครูดสีเหลืองปนน้ำมัน	156.6
191-320	ME07	5 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ครูดสีเหลืองอ่อนเหนียว	344.0
321-400	ME08	5-10 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ครูดสีส้ม	215.9
401-530	ME09	10-25%เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ครูดสีน้ำตาล	237.5
531-620	ME10	100 % เมธานอล	ครูดสีน้ำตาลเข้ม	144.4

3.12.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

นำสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ น้ำหนัก 7.0 กรัม มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (300 กรัม) คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 80 เซนติเมตร ตัวชะที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน, เฮกเซน-ไดคลอโรมีเธน, ไดคลอโรมีเธน, ไดคลอโรมีเธน-เมธานอล และเมธานอล ตามลำดับ ดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 การแยกสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13

ลำดับส่วนที่ (ก่อน)	ลำดับส่วนที่ (หลัง)	ตัวชะ	ลักษณะของสาร	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
1-16	BE01	100 % เฮกเซน	ครูดสีเหลือง	29.5
17-25	BE02	50 % ไดคลอโรมีเธนในเฮกเซน	ครูดสีเหลือง	61.8
26-45	BE03	100 % ไดคลอโรมีเธน	ครูดสีเหลือง	19.4
46-56	BE04	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ครูดสีเหลือง	4.4
57-70	BE05	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ครูดสีเหลืองปนของแข็งสีขาว	7.3
71-76	BE06	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ครูดสีเหลือง	157.6
77-96	BE07	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ของเหลวสีเหลืองส้ม	1703.6
97-110	BE08	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ครูดสีส้มปนของแข็งสีขาว	158.9
111-134	BE09	5 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ครูดสีส้ม	461.8
135-146	BE10	5 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ครูดสีส้ม	434.4
147-160	BE11	5 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ครูดสีส้ม	271.6
161-170	BE12	5 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ครูดสีเหลือง	93.6
171-205	BE13	5 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ครูดสีเหลืองปนของแข็งสีขาว	1070.7
206-225	BE14	5 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ครูดสีเหลืองปนของแข็งสีขาว	171.3
226-240	BE15	10% เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ครูดสีน้ำตาลเหลือง	560.0
241-280	BE16	10% เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ครูดสีน้ำตาลเข้ม	346.2
281-335	BE17	50% เมธานอลในไดคลอโรมีเธน	ครูดสีน้ำตาลเข้ม	265.6
335-400	BE18	100% เมธานอล	ครูดสีน้ำตาลเข้ม	551.3

3.13 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13

3.13.1 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 1

สารบริสุทธิ์ 1 เป็นผงสีขาว ซึ่งได้มาจากลำดับส่วนที่ ME02 ของสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตจากเส้นใย ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 50 % ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซนเป็นตัวชะจะได้ครูดสีเหลือง แล้วนำมาทำการแยกสารต่อด้วยวิธี Preparative TLC โดยใช้ 5% เมธานอลในคลอโรฟอร์มเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ จะได้ผงสีขาวหนัก 18.2 มิลลิกรัม (สารบริสุทธิ์ 1) ซึ่งสามารถละลายได้ในคลอโรฟอร์ม และเมธานอล

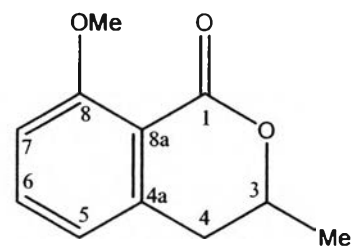
สารบริสุทธิ์ 1 มีค่า R_f = 0.75 (5 % MeOH ใน $CHCl_3$), mp = 85-86 °C, $[\alpha]_D^{25}$ + 253 (c 0.10, $CHCl_3$), λ_{max} ($CHCl_3$) = 243 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข. รูปที่ 1), ν_{max}(KBr) = 2925 (w), 1710 (m), 1643 (m), 1563 (s), 1419 (s), 1244 (m) และ 808 (m)cm^{-1} (ภาคผนวก ข. รูปที่ 2)

EI-MS สเปกตรัม (70 eV): *m/z* 192.2 (17%) (ภาคผนวก ข. รูปที่ 3)

δ_H ($CDCl_3$, 400 MHz) (ภาคผนวก ข. รูปที่ 4): 7.48 (1H, dd, *J* = 8.4 และ 7.6 Hz, 6-H), 6.83 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, 5-H), 6.95 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 7-H), 4.59 (1H, ddq, *J* = 3.6, 10.8 และ 6.0 Hz, 3-H), 3.98 (3H, s, OMe), 2.88 (2H, dd, *J* = 3.6 และ 16.0 Hz, 4-H), 2.29 (2H, dd, *J* = 10.8 และ16.0 Hz, 4-H)และ 1.52 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, Me) ppm;

δ_C ($CDCl_3$, 100 MHz) (ภาคผนวก ข. รูปที่ 5): 162.80 (C-1), 161.19 (C-8), 141.99 (C-4a), 134.46 (C-6), 119.20 (C-5), 113.50 (C-8a), 110.88 (C-7), 74.14 (C-3), 56.19 (OMe), 36.12 (C-4) และ 20.72 (Me) ppm;

จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D-NMR ประกอบด้วย gHSQC, gCOSY และ gHMBC (ภาคผนวก ข. รูปที่ 6-8) ทำให้ได้โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 1 ดังรูปที่ 3.2



8-methoxy-3-methylisochroman-1-one

รูปที่ 3.2 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 1

3.13.2 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 2

สารบริสุทธิ์ 2 เป็นผลึกสีขาว ซึ่งได้มาจากลำดับส่วนที่ BE08 ของสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ 2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธนเป็นตัวชะ แยกผลึกออกมาโดยการตกผลึกซ้ำด้วยตัวทำละลายผสม เฮกเซน - ไดคลอโรมีเธน ได้ผลึกสีขาวหนัก 31.3 มิลลิกรัม (สารบริสุทธิ์ 2) ละลายได้ในไดคลอโรมีเธน คลอโรฟอร์ม และเมธานอล

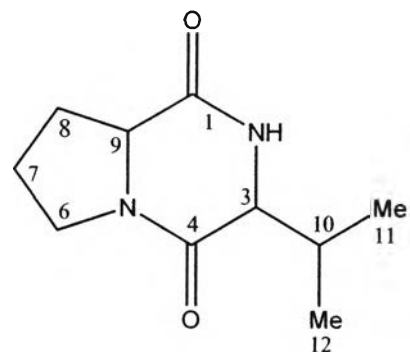
สารบริสุทธิ์ 2 มีค่า R_f = 0.46 (5 % MeOH ใน $CHCl_3$), mp = 147-149 °C, $[\alpha]_D^{25}$ -189 (c 0.10, $CHCl_3$), λ_{max} ($CHCl_3$) = 245 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข. รูปที่ 9), ν_{max}(KBr) = 3216 (m), 2963 (w), 2875 (w), 1674 (s), 1419 (s), 645 (w) และ 528 (w) cm^{-1} (ภาคผนวก ข. รูปที่ 10)

EI-MS สเปกตรัม (70 eV): *m/z* 198.2 (2%) (ภาคผนวก ข. รูปที่ 11)

δ_H ($CDCl_3$, 400 MHz) (ภาคผนวก ข. รูปที่ 12): 4.07 (1H,brt, J = 4.0 Hz, 6-H), 3.93 (1H, brs, 9-H), 3.64 (2H, m, 3-H), 3.60 (2H, m, 3-H), 2.62 (1H, dsep, J = 2.4 และ 7.2 Hz, 10-H), 2.37 (2H, 5-H), 2.04 (2H, m, 8-H), 2.03 (2H, m, 4-H), 1.90 (2H, m, 4-H), 1.06 (3H, d, J = 4.0 Hz, 12-H) และ 0.90 (3H, d, J = 4.0 Hz, 11-H) ppm;

δ_C ($CDCl_3$, 100 MHz) (ภาคผนวก ข. รูปที่ 13): 170.06 (C-1), 164.92 (C-7), 60.37 (C-9), 58.81 (C-6), 45.14 (C-3), 28.52 (C-5), 28.34 (C-10), 22.36(C-4), 19.23 (C-11) และ 16.03 (C-12) ppm;

จากผลการวิเคราะห์ 2D-NMR ประกอบด้วย gHSQC, gCOSY และ gHMBC (ภาคผนวก ข. รูปที่ 14-16) ทำให้ได้โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 2 ดังรูปที่ 3.3



3-isopropyl-hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-1,4-dione

รูปที่ 3.3 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 2

3.13.3 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 3

สารบริสุทธิ์ 3 เป็นผลึกสีขาว ซึ่งได้มาจากลำดับส่วนที่ BE13 ของสารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ 5 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธนเป็นตัวชะ แยกผลึกออกมาโดยการตกผลึกซ้ำด้วยตัวทำละลายผสมเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม ได้ผลึกสีขาวหนัก 243.8 มิลลิกรัม (สารบริสุทธิ์ 3) ละลายได้ในไดคลอโรมีเธน คลอโรฟอร์ม และเมธานอล

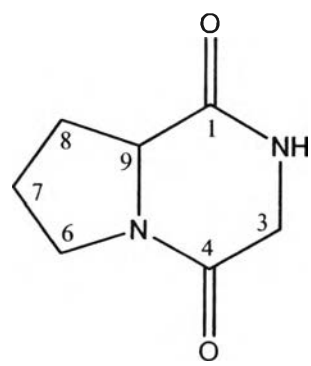
สารบริสุทธิ์ 3 มีค่า R_f = 0.30 (5 % MeOH ใน $CHCl_3$), mp = 210-212 °C, $[\alpha]_D^{25}$ - 198 (c 0.10, MeOH), λ_{max} (MeOH) = 210 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข. รูปที่ 17), ν_{max}(KBr) = 34082 (m), 2871-3089 (w), 1683 (s), 1646 (s), 1561 (m), 1412 (s) และ 793 (s) cm^{-1} (ภาคผนวก ข. รูปที่ 18)

EI-MS สเปกตรัม (70 eV): *m/z* 154.1 (99%) (ภาคผนวก ข. รูปที่ 19)

δ_H ($CDCl_3$, 400 MHz) (ภาคผนวก ข. รูปที่ 20): 4.08 (1H, dd, *J* = 5.2 และ 15.6 Hz, 9-H), 4.08 (2H, d, *J* = 15.2 Hz, 3-H), 3.89 (2H, dd, *J* = 4.4 และ 16.4 Hz, 3-H), 3.61 (2H, m, 6-H), 3.55 (2H, m, 3-H), 2.37 (2H, m, 8-H), 2.06 (2H, m, 8-H), 2.03 (2H, m, 7-H) และ 1.91 (2H, m, 7-H) ppm;

δ_C ($CDCl_3$, 100 MHz) (ภาคผนวก ข. รูปที่ 21): 169.97 (C-1), 163.51 (C-4), 58.53 (C-9), 46.62 (C-3), 45.32 (C-6), 28.44 (C-8) และ 22.40 (C-7) ppm;

จากผลการวิเคราะห์ 2D-NMR ประกอบด้วย gHSQC, gCOSY และ gHMBC (ภาคผนวก ข. รูปที่ 22-24) ทำให้ได้โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 3 ดังรูปที่ 3.4



hexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-1,4-dione

รูปที่ 3.4 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 3

3.14 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์

3.14.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพของสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC) [127]

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพของสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี MIC นี้ เป็นการหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพได้โดยใช้ Microtiter Plate Broth Dilution Technique ที่มีขั้นตอนการทดสอบ ดังนี้

ก. <u>การเตรียมสารละลายสารบริสุทธิ์</u>

ในการเจือจางสารละลายสารบริสุทธิ์ให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการนั้น ทำได้โดยการนำสารบริสุทธิ์ 1.0 มิลลิกรัม ผสมกับตัวทำละลาย 10 % DMSO ในน้ำปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสารบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร (1,000 µg / ml) แล้วนำไปเจือจางต่อด้วย Broth Media ในอัตราส่วน 1:1 จนได้ความเข้มข้น 500 µg / ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นแรกในระดับความเข้มข้นที่เราต้องการ หลังจากนั้นก็เจือจางด้วย Broth Media ให้ได้ระดับความเข้มข้น 250, 125,62.5, 31.25, 15.63, 7.82 และ 3.91 µg / ml ตามลำดับ

ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารบริสุทธิ์ คือ

500 µg / ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 250 µg / ml)
250 µg / ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 125 µg / ml)
125 µg / ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 62.5 µg / ml)
62.5 µg / ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 31.25 µg / ml)
31.25 µg / ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 15.63 µg / ml)
15.63 µg / ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 7.82 µg / ml)
7.82 µg / ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 3.91 µg / ml)
3.91 µg / ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 1.96 µg / ml)

ความเข้มข้นสุดท้าย คือ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายสารบริสุทธิ์ที่วัดได้ใน 96 well microtiter plate หลังจากเติม Broth Media + Suspension ของเชื้อลงไป

ข. <u>การเตรียมสารละลายสารชุดควบคุมบวก</u> (Positive Control)

ในการเจือจางสารละลายสารชุดควบคุมบวก ทำเช่นเดียวกับการเจือจางสารละลายสารบริสุทธิ์ในข้อ 3.14.1 ก

ค. <u>การเตรียมเชื้อจุลชีพ</u>

เชื้อจุลชีพสำหรับทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ประกอบด้วย เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด แบคมีเสียแกรมลบ 2 ชนิด และเชื้อรา 1 ชนิด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.2 การเตรียมเชื้อทดสอบจะเตรียมตามข้อ 3.8.2 และ 3.8.3 โดยเชื้อแบคทีเรียจะนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) และเชื้อราจะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast-Malt Extract Broth (YMB) และความเข้มข้นของเชื้อทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 3.3

ง. <u>การทดสอบฤทธิ์</u>

การทดสอบฤทธิ์จะทำการทดสอบใน 96 well microtiter plate โดยก่อนการหยอดสารละลายสารบริสุทธิ์และสารชุดควบคุมบวก ให้ทำแผนผังระบุชนิดและตำแหน่งของสารที่จะหยอดลงใน 96 well microtiter plate เสียก่อนเพื่อความถูกต้องของการแปลผลการทดสอบที่ได้

สารที่จะหยอดลงใน 96 well microtiter plate มีดังนี้

<u>Blank</u> - Broth Media

- Broth Media + Suspension จุลชีพทดสอบ
- Broth Media + สารละลายสารบริสุทธิ์ตามระดับความเข้มข้น

<u>ยา Positive Control</u> - Broth Media + Suspension จุลชีพทดสอบ + ระดับความเข้มข้นของยา

<u>Test Sample</u> - Broth Media + Suspension จุลชีพทดสอบ + ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารบริสุทธิ์

ปริมาตรที่ใช้ คือ Suspension ของเชื้อ 50 µl และ Broth Media + สารละลายสารบริสุทธิ์ 50 µl ซึ่งจะรวมได้ปริมาตรที่ใช้ 100 µl / 1 well

จ. <u>การอ่านผล</u>

อ่านผลการทดลองเป็นค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ด้วยเครื่อง Sunrise Microtiter Plate Reader ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร

ฉ. <u>การแปลผล</u>

ให้เปรียบเทียบค่า Absorbance ของ Broth media + suspension ของเชื้อก่อนบ่มเชื้อกับค่า Absorbance ของ Broth media + ลำดับความเข้มข้นของสารละลายสารบริสุทธิ์ โดยให้เปรียบเทียบกับค่า Absorbance ของ Broth media + suspension ของเชื้อ + ลำดับความเข้มข้นของสารละลายสารบริสุทธิ์ (Test Sample) หลังจากบ่มเชื้อแล้ว 24 ชั่วโมง

หากค่า Absorbance ของ Test Sample หรือยา Positive Control มีค่าสูงกว่า แสดงว่าสารละลายสารบริสุทธิ์หรือยาในความเข้มข้นนั้นๆ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพได้

แต่ถ้าค่า Absorbance ของ Test Sample หรือยา Positive Control มีค่าต่ำกว่า แสดงว่าสารละลายสารบริสุทธิ์หรือยาในความเข้มข้นนั้นๆ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพได้

ความเข้มข้นของสารละลายสารบริสุทธิ์ตัวสุดท้ายที่มีค่าต่ำกว่า ค่านั้นคือค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentration)

<u>หมายเหตุ</u> อาจมีการเพิ่มระดับความเข้มข้น หรือลดระดับความของสารละลายสารบริสุทธิ์เพื่อหาค่า MIC