บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1.จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบ

ตารางที่ 8 แบคทีเรียที่นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบ

Table 8 Bacteria used for antimicrobial testing of crude extracts

Strains	Source
Gram positive	
Staphylococcus aureus (TISTR 517)	Bangkok MIRCEN
Bacillus subtilis	Microbiology laboratory, Faculty of Agro-Industry,PSU
Enterococcus faecalis	Pharmaconogsy and Pharmaceutical Botany laboratory, Faculty of Pharmaceutical Sciences, PSU
Gram negative	
Pseudomonas aeruginosa	Pharmaconogsy and Pharmaceutical Botany laboratory, Faculty of Pharmaceutical Sciences, PSU
Salmonella typhi	Pharmaconogsy and Pharmaceutical Botany laboratory, Faculty of Pharmaceutical Sciences, PSU
Shigella sonnei	Pharmaconogsy and Pharmaceutical Botany laboratory, Faculty of Pharmaceutical Sciences, PSU

2. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

2.1 อาหารสำหรับแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากทะเล

อาหารสำหรับแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากทะเลดัดแปลงมา สูตรอาหารสำหรับแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ได้มีรายงานไว้มาก่อนหน้านี้ โดยอาหารบางชนิดอาจมีการดัดแปลงให้มีองค์ประกอบใกล้เคียงกับชนิดของตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อ โดยการใช้วัสดุที่ได้จากทะเลเป็นองค์ประกอบ เช่น อาหารสูตร III และ IV ซึ่งมีตะกอนดินและเปลือกหอยบดเป็นองค์ประกอบ โดยตะกอนดินดังกล่าวเก็บมาจากทะเลที่ระดับความลึกประมาณ 1 เมตร แล้วนำมาผึ่งแดดให้แห้งสนิท จากนั้นจึงร่อนแยกขนาด จะคัดเลือกเฉพาะตะกอนดินที่มีขนาดกลางและขนาดเล็กประมาณ 500-1,000 ไมครอน อบตะกอนดินดังกล่าวที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ส่วนเปลือกหอยนั้นได้มาจากการเก็บเศษเปลือกหอยบริเวณชายหาด นำมาทุบให้ละเอียด แล้วร่อนคัดเลือกเฉพาะขนาดเล็กประมาณ 500 ไมครอน จากนั้นจึงนำไปทำให้ปลอดเชื้อตามวิธีเช่นเดียวกับตะกอนดิน

ตารางที่ 9 องค์ประกอบของอาหารสำหรับแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากทะเล

Table 9 Composition of isolating media

Media	Compositions		
Medium I	Soluble starch	10.0	g
(Modified from Jiang *et al.,*1997)	KH_2PO_4	1.0	g
	$MgSO_4$	1.0	g
	Sea water	1.0	L
	Agar	15.0	g
Medium II	Peptone	10.0	g
(Modified from Mukku *et al.,* 2000)	Ferric phosphate	0.1	g
	Sea water	1.0	L
	Agar	20.0	g

ตารางที่ 9 (ต่อ) องค์ประกอบอาหารสำหรับแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากทะเล

Table 9 (Cont.) Composition of marine actinomycete isolating media

Media	Compositions		
Medium III	Yeast extract	1.0	g
(Modified from Imada and Okami 1994)	Peptone	1.0	g
	Sediment	15.0	g
	Sea water	1.0	L
	Agar	15.0	g
Medium IV	Shell (grinded)	10.0	g
(Modified from Schumacher *et al.,* 1995)	L-asparagine	1.0	g
	KH_2PO_4	1.0	g
	Sea water	1.0	L
	Agar	20.0	g

2.2 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทจากทะเล

อาหารสำหรับเลี้ยงแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่ที่ดัดแปลงมาจากสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ ส่วนใหญ่จะเป็นอาหารที่มีสารเคมีเป็นองค์ประกอบ ยกเว้นอาหารสูตร A เท่านั้น ที่มีวัสดุธรรมชาติเป็นองค์ประกอบ ซึ่งได้แก่ ตะกอนดิน สาหร่าย และเปลือกกุ้งบด ซึ่งวิธีการเตรียมตะกอนดินทำเช่นเดียวกับการเตรียมตะกอนดินในอาหารสำหรับแยกแอคติโนมัยสีทจากทะเล การเตรียมสาหร่ายเลือกใช้สาหร่าย *Porphyra* sp. แบบแห้งที่มีจำหน่ายทั่วไป นำมาบดให้ละเอียด และการเตรียมวัสดุที่มีไคติน จากเปลือกกุ้งจะทำโดยการนำเปลือกกุ้งมาตากให้แห้งสนิท ก่อนนำมาบดให้ละเอียด แล้วเก็บรักษาไว้ในที่แห้ง

ตารางที่ 10 องค์ประกอบของอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทจากทะเล

Table 10 Composition of cultivation media

Media	Compositions		
Medium A	Sediment	1.0	g
Modified from Mitchell *et al.,* 2004	Algae	2.0	g
	Shrimp shell powder	1.0	g
	Sea water	100.0	ml
Medium B	Glycerol	2.0	g
Modified from Capon *et al.,* 2000	Soytone	1.0	g
	Sea water	100.0	ml
Medium C	Polypeptone	1.0	g
Modified from Moore *et al.,* 1999	Soluble starch	1.0	g
	Yeast extracts	1.0	g
	Sea water	100.0	ml
Medium D	Peptone	0.5	g
Modified from Imada and Okami,1994	Yeast extract	0.5	g
	Sea water	100.0	ml

2.3 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้วิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

Nutrient Agar (Merck)

Nutrient Broth (Merck)

RPMI1640 (Merck)

3. สารเคมี

- Methanol (Merck)
- Absolute ethanol (Merck)
- Ethyl acetate (Merck)
- Dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma)
- Dichloromethane (Sigma)
- Hexane (Sigma)
- Alamar Blue 0.9% (Sigma)
- Vancomycin 0.2 mg/ml (Sigma)
- Silica gel 60 normal phase ขนาด 220-440 mesh(Fluca)
- Silica gel reversed phase C_{18}(Fluca)

อุปกรณ์

- เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) (Buchi)
- เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น Agilent 1100
- คอลัมน์ชนิด reversed phase (Agilent Nucleosil 100-5 C18 5µm, 4.0 x250 mm)
- คอลัมน์ชนิด reversed phase (Thermo Hypersil BDS C18 5µm, 4.5 x250 mm)
- คอลัมน์ Kontes ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 และ 1.5 เซนติเมตร ยาว 30 เซนติเมตร สำหรับ flash chromatography
- TLC Alumina Sheets silica gel 60 F_{254} (Fluca)

วิธีการ

1. การแยกแอคติโนมัยสีทจากทะเล

1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิต ตะกอนดิน และวัสดุอื่นๆที่พบในทะเล โดยแบ่งออกเป็นการเก็บตัวอย่างจากบริเวณชายฝั่งและบริเวณน้ำลึก การเก็บตัวอย่างบริเวณชาย ฝั่งกระทำโดยการสวมถุงมือแล้วหยิบตัวอย่างหรือใช้ช้อนตักตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกชนิดรีดปิดปากถุง บันทึกสถานที่และหมายเลขตัวอย่างบนถุง แล้วเก็บในถังน้ำแข็งจนกว่าจะนำไปแยกเชื้อ ส่วนการเก็บตัวอย่างบริเวณน้ำลึกจะอาศัยนักประดาน้ำช่วยในการเก็บ นักประดาน้ำจะเก็บตัวอย่างใส่ถุงตาข่ายหรือขวดแก้วขนาดเล็ก หลังจากขึ้นมาบนเรือจะนำตัวอย่างมาแยกประเภท บันทึกสถานที่และหมายเลขตัวอย่างบนถุง แล้วเก็บในถังน้ำแข็งจนกว่าจะนำไปแยกเชื้อ

1.2 การแยกแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่าง

สำหรับตัวอย่างตะกอนดินจะนำมาทำเจือจางโดยปิเปตของเหลวในตะกอนดิน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อ 4.5 มิลลิลิตรได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} จากนั้นจึงเจือจางตัวอย่างที่ได้ไปจนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-4} ปิเปตตัวอย่างที่ความเจือจาง 10^{-3} และ 10^{-4} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็งสำหรับแยกแอคติโนมัยสีท 4 ชนิด ทำการ spread plate และบ่มที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าจะเห็นโคโลนีเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตัวอย่างอื่นๆ ได้แก่ ฟองน้ำ, ปะการัง, สาหร่าย, ฟิล์มชีวภาพและเปลือกหอยนั้นจะนำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อเพื่อชะล้างสิ่งปนเปื้อนที่อยู่บริเวณผิวภายนอก แล้วหั่นตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆหรือขูดบริเวณพื้นผิวมาโฮโมจีไนซ์กับน้ำทะเลปลอดเชื้อ 1.0 มิลลิลิตร เจือจางตัวอย่างที่ได้ด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} โดยดูดตัวอย่างที่โฮโมจีไนซ์แล้ว 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำทะเลปลอดเชื้อ 4.5 มิลลิลิตร และทำการเจือจางซ้ำอีกครั้งเพื่อให้ได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} ปิเปตตัวอย่างที่ความเจือจาง 10^{-1}

และ10^{-2} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็งสำหรับแยกแอคติโนมัยสีท 4 ชนิด ทำการ spread plate และบ่มที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะเห็นโคโลนีเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการแยกและถ่ายเชื้อจนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์

เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จะนำไปเก็บรักษาไว้ในสารละลายกลีเซอรอล 50% ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาเลี้ยงเชื้อเพื่อคัดเลือกต่อไป

2. การเตรียมสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีท

2.1 การเลี้ยงแอคติโนมัยสีทระดับขวดเขย่า (shaked flask)

นำแอคติโนมัยสีทที่แยกได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร Nutrient Agar เป็นระยะเวลา 7 วัน ตัดชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีเจริญอยู่ขนาด 1x1 เซนติเมตร จำนวน 3-4 ชิ้น ถ่ายเชื้อลงในอาหาร nutrient broth เขย่าเป็นระยะเวลา 3-4 วัน เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ 4 ชนิด ได้แก่ อาหารสูตร A, B, C และ D ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าชนิดที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 220 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

2.2 การเตรียมสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีท

นำอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน รวมทั้งเซลล์มาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทปริมาตร 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:1) ในกรวยแยก (separatory funnel) เก็บส่วนเอทิลอะซิเตทแล้วนำส่วนน้ำ 100 มิลลิลิตร มาสกัดซ้ำด้วยเอทิลอะซิเตท 100 มิลลิลิตร นำส่วนเอทิลอะซิเตททั้งหมดมารวมกัน แล้วระเหยเอาเอทิลอะซิเตทออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจนได้สารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีท นำไปหาน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบที่ได้ เพื่อเตรียมเป็นสารละลายของสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 25.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน DMSO

3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีท

3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

3.1.1 **การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย**

ปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ จำนวนเชื้อแบคทีเรียและเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อที่เหมาะสม โดยเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ $1.0x10^4$ ถึง $1.0x10^7$ CFU ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลว RPMI1640 ที่ผสมกับ Alamar Blue ในอัตราส่วน 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายแบคทีเรียที่เตรียมไว้หลุมละ 100 ไมโครลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37.0 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนสีของ Alamar Blue ในหลุม ทุกๆ 2 ชั่วโมง จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมพิจารณาจากความเข้มข้นที่ Alamar Blue เปลี่ยนจากสีน้ำเงินม่วงเป็นสีแดง ในช่วงเวลา 10 -15 ชั่วโมง

3.1.2 การหาปริมาณ DMSO ที่เหมาะสมต่อการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

เนื่องจากปริมาณ DMSO ที่ใช้ในการเตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบอาจมีผลกระทบต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ หากใช้ในปริมาณที่สูงกว่าปริมาณที่แบคทีเรียสามารถเจริญได้ ดังนั้นเพื่อป้องกันการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจาก DMSO จึงจำเป็นต้องศึกษาปริมาณ DMSO ที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากปริมาณ DMSO ที่มากที่สุดที่ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ โดยการถ่ายแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ 100 ไมโครลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม ยกเว้นในแถวที่ 1 ที่มีการเติมสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 190 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเติมสารละลาย DMSO ลงไปปริมาตร 10 ไมโครลิตร ซึ่งคิดเป็นความเข้มข้นของ DMSO ที่ 5 % จากนั้นจึงเจือจางสารละลาย DMSO ลงครึ่งหนึ่งในแถวถัดไป โดยปิเปตสารแขวนลอยแบคทีเรียจากแถวที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในแถวที่ 2 ซึ่งมีสารแขวนลอยแบคทีเรีย 100 ไมโครลิตร คิดเป็นความเข้มข้นของ DMSO ที่ 2.5 % ทำการเจือจางต่อไปจนถึงหลุมสุดท้ายที่จะต้องมีการเจือจางและปิเปตสารแขวนลอยแบคทีเรียที่ผสมกับ DMSO แล้วทิ้งไปปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มจานเพาะชนิด 96 หลุมที่อุณหภูมิ 37.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10-15 ชั่วโมง โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของ Alamar Blue เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ปริมาณ DMSO ที่มากที่สุดที่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบคือ ปริมาณ DMSO ในแถวที่ Alamar Blue เปลี่ยนจากสีน้ำเงินม่วงเป็นสีแดง

3.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Nutrient Agar โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อในอาหารเหลวชนิด RPMI1640 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 -18 ชั่วโมง แล้วเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI1640 ให้ได้จำนวนเซลล์ 1.0 x10^4 ถึง 1.0 x10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบและสภาวะที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.1 เติมสารละลาย Alamar Blue ในอัตรา ส่วน 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน

3.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบจาก ข้อ 3.2 ปิเปตใส่ในจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม หลุมละ 100ไมโครลิตร จากนั้นจึงเติมสารสกัดหยาบที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียใส่ในแต่ละหลุม โดยให้มีความเข้มข้น 150 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มในอุณหภูมิ 37.0 องศาเซลเซียส 10 -15 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของ Alamar Blue

ทำชุดควบคุมซึ่งทำทุกอย่างเหมือนการทดสอบ ยกเว้นไม่เติมสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีท การทำ negative control มี 2 วิธีได้แก่ การไม่เติมสารใดๆในหลุมที่มีแบคทีเรียทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 10 -15 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของ Alamar Blue และการศึกษาผลกระทบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยการใช้สารสกัดจากอาหารสำหรับสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพแต่ไม่มีการใส่เชื้อแอคติโนมัยสีท ได้แก่อาหารสูตร A, B, C และ D โดยผลของ negative control สังเกตจากสีของ Alamar Blue เปลี่ยนเป็นสีแดงนั่นคือแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตและสำหรับการทำ positive control จะกระทำโดยการเติมสารปฏิชีวนะมาตรฐานชนิด vancomycin ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่ง

เริ่มจาก 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในหลุมที่1 จนถึงหลุมที่ 8 บ่มที่อุณหภูมิ 37.0 องศาเซลเซียส 10 -15 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของ Alamar Blue โดยผลของ positive control สังเกตจากสีของ Alamar Blue ยังคงเป็นสีน้ำเงิน นั่นคือแบคทีเรียไม่เจริญเติบโต

หลังจากบ่มจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุมที่อุณหภูมิ 37.0 องศาเซลเซียส 10-15 ชั่วโมงแล้ว สังเกตการเปลี่ยนสีของ Alamar Blue ที่ปกติจะมีสีน้ำเงินเข้ม หากหลุมใด Alamar Blue ไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าหลุมนั้นไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นสารสกัดในหลุมนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ แต่ถ้าหลุมใดมีการเปลี่ยนสีของ Alamar Blue จากสีน้ำเงินเป็นสีแดงแสดงว่าหลุมนั้นมีการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งหมายถึงว่าสารสกัดในหลุมนั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ได้ในการทดสอบได้

4. การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration โดยวิธี microdilution

ปิเปตสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบใส่ในจานเพาะเชื้อแบบ 96 หลุม หลุมละ 100ไมโครลิตร ยกเว้นในแถวที่ 1 ให้ปิเปตสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเติมสารสกัดหยาบที่ต้องการทดสอบใส่ในหลุมแถวที่ 1 โดยให้มีความเข้มข้น 150 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยปิเปตซ้ำ 10-15 ครั้ง เจือจางสารละลายทั้งหมดลงครึ่งหนึ่ง โดยปิเปตสารละลายในแถวที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในแถวที่ 2 ผสมให้เข้ากันดี ทำซ้ำในขั้นตอนดังกล่าวจนถึงแถวสุดท้ายที่มีการปิเปตสารละลายส่วนเกินทิ้ง 100 ไมโครลิตร บ่มจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 -15 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของ Alamar Blue สังเกตหลุมที่มีสีน้ำเงินเข้มหลุมสุดท้ายของแต่ละคอลัมน์ซึ่งแสดงถึงการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ คำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบในหลุมนั้น ค่าความเข้มข้นที่ได้นี้ก็คือค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

5. การแยกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบ

เมื่อสามารถคัดเลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้แล้ว จากนั้นจึงเพิ่มการผลิตสารสกัดหยาบ โดยการนำเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNA053 เลี้ยงในอาหารสูตร C ปริมาตร 8.7 ลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยง

ในเครื่องเขย่าชนิดที่ควบคุมอุณหภูมิที่ระดับความเร็ว 220 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

5.1 การแยกส่วนสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลและเฮกเซน

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากส่วนที่ละลายในเอทิลอะซิเตทมาละลายในเมทานอล 200 มิลลิลิตร ใส่ลงใน separatory funnel แล้วเติมเฮกเซน 100 มิลลิลิตร เขย่าแล้วรอให้แยกชั้น นำส่วนเมทานอล 200 มิลลิลิตร มาสกัดด้วยเฮกเซน 100 มิลลิลิตร ซ้ำอีกครั้ง แยกส่วนเมทานอลและเฮกเซน นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ แล้วหาน้ำหนักที่แน่นอน

5.2 การแยกสารด้วยวิธี flash column chromatography แบบ normal phase

เตรียมคอลัมน์ Kontes ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร โดยเติม silica gel 60 ในคอลัมน์ ประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของคอลัมน์ (20 เซนติเมตร) ชะคอลัมน์ด้วยเอทิลอะซิเตท 100 มิลลิลิตร นำสารส่วนที่ละลายในเมทานอลจากข้อ 5.1 มาละลายด้วยเอทิลอะซิเตท 1 มิลลิลิตร เติม silica gel 60 ประมาณ 0.2 กรัม ทำให้แห้ง ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ แล้วนำ silica gel 60 ที่ผสมด้วยสารสกัดหยาบใส่ในส่วนบนสุดของคอลัมน์ ชะด้วยตัวทำละลายแบบลำดับส่วน โดยเริ่มจากไดคลอโรมีเทน (100), ไดคลอโรมีเทน:เอทิลอะซิเตท (80:20),ไดคลอโรมีเทน:เอทิลอะซิเตท (60:40), ไดคลอโรมีเทน:เอทิลอะซิเตท (40:60), ไดคลอโรมีเทน:เอทิลอะซิเตท (20:80), เอทิลอะซิเตท (100), เอทิลอะซิเตท:เมทานอล (80:20), เมทานอล (100) โดยมีปริมาตรของตัวทำละลายในแต่ละส่วนเท่ากับ 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ผ่านคอลัมน์แต่ละส่วนไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยความดันสุญญากาศ วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดผ่านการแยกด้วยคอลัมน์แล้วโดยวิธี Thin Layer Chromatography หาน้ำหนักที่แน่นอนของสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขั้นต้นเพื่อใช้เตรียมตัวอย่างสำหรับทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.2 และ 3.3 ต่อไป

5.3 การแยกสารด้วยวิธี flash column chromatography แบบ reverse phase

เตรียมคอลัมน์ Kontes ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร เติม silica gel C_{18} ในคอลัมน์ ประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของคอลัมน์ (20 เซนติเมตร) ชะคอลัมน์ด้วยเมทานอล แล้วตามด้วยน้ำ อย่างละ 100 มิลลิลิตร

เตรียมตัวอย่างโดยเลือก fraction จากข้อ 5.2 ที่มีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด ละลายด้วยเอทิลอะซิเตท 1.0 มล. เติม silica gel C_{18} ประมาณ 0.2 กรัม ทำให้แห้ง ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ แล้วนำ silica gel C_{18} ที่ถูกเคลือบด้วยสารสกัดหยาบใส่ในส่วนบนสุดของคอลัมน์

ชะด้วยตัวทำละลายแบบลำดับส่วนโดยเริ่มจาก เมทานอล:น้ำ (50:50), เมทานอล:น้ำ (80:20) และเมทานอล (100) โดยมีปริมาตรของตัวทำละลายแต่ละส่วนเท่ากับ 30.0 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำสารละลายที่ผ่านคอลัมน์แต่ละส่วนไปทำให้แห้งโดยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ หาน้ำหนักที่แน่นอนและทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ตามวิธีในข้อ 3.2 และ 3.3 ต่อไป

5.4 การแยกสารด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography

นำสารสกัดจากการแยกด้วยวิธี flash column chromatography แบบ reversed phase โดยนำส่วนที่ชะด้วย เมทานอล:น้ำ (80:20) ซึ่งผ่านการทดสอบแล้วว่ามีฤทธิ์ยับยั้งารเจริญของแบคทีเรีย มาวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด reversed phase (Thermo Hypersil BDS C18 5µm, 4.0 x250 mm) วิเคราะห์สารครั้งละ 2 มิลลิกรัม ใช้เฟสเคลื่อนที่คือ เมทานอล:น้ำ (75:25) ด้วยอัตราเร็ว 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที เก็บสารทั้งหมดที่ผ่านการวิเคราะห์ จากนั้นจึงนำสารส่วนที่มีสีส้มเหลืองซึ่งมีปริมาณมากที่สุดมาแยกต่อ โดยวิเคราะห์สารครั้งละ 2 มิลลิกรัม ใช้สารละลายแบบ gradient เริ่มจาก เมทานอล:น้ำ (45:55) จนถึง 100% เมทานอล:น้ำ เป็นตัวชะ ด้วยอัตราเร็ว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นระยะเวลา 60 นาที เก็บสารละลายทั้งหมดที่ผ่านการวิเคราะห์