บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometer): Bruker AVANCE 400
2. แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass spectrometer, MS): Finnigan LC-Q
3. อินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Infrared spectrophotometer, IR): Perkin-Elmer FT-IR
4. คอลัมน์ (Column)
5. แผ่นโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin layer chromatograph, TLC): Merck
6. ตู้ตรวจวัดรังสีอัลตราไวโอเลต (UV detector)
7. เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Electrothermal melting point apparatus)
8. เครื่องชั่ง 4 และ 5 ตำแหน่ง
9. ปั๊มลม (Pump)
10. ขวดก้นกลม (Round bottom flask)
11. บีกเกอร์ (Beaker)
12. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
13. กรวยแยก (Separatory funnel)
14. หลอดทดลอง (Test tube)
15. แท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar)
16. หลอดฉีดยา (Syringe)
17. เครื่องควบแน่น (Condenser)
18. เครื่องกวน (Stirrer)
19. ขวดแก้วขนาดเล็ก (Vial)
20. หลอดหยด (Dropper)
21. Eppendorf
22. Aluminium foil

3.1.2 สารเคมี

1. สารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ผสม (Crude curcuminoid extract); Thai-China Flavours and Fragrances
2. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, CH_2Cl_2)
3. เมทานอล (Methanol, MeOH)
4. เอทิลอะซีเตต (Ethyl acetate, EtOAc)
5. เฮกเซน (Hexane)
6. พิริดีน (Pyridine)
7. 1,5- ไดโบรโมเพนเทน (1,5-Dibromopentane)
9. โบรอนไตรโบรไมด์ (Boron tribromide, BBr_3)
10. ไฮดราซีนโมโนไฮเดรต (Hydrazine monohydrate, $NH_2NH_2.H_2O$)
11. ไฮดรอกซิลามีนไฮโดรคลอไรด์ (Hydroxylamine hydrochloride, $NH_2OH.HCl$)
12. อะซีโตน (Acetone)
13. ไดเอทิล อีเทอร์ (Diethyl ether)
14. ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (Dimethylformamide, DMF)
15. โพแทสเซียมคาร์บอเนต (Potassium carbonate, K_2CO_3)
16. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Sodium sulfate anhydrous, Na_2SO_4)
17. แก๊สไนโตรเจน (N_2)
18. Sulfuric acid (H_2SO_4); Merck
19. Silica gel 60 size less than 0.063 mm no.107729 (ชนิดละเอียด); Merck
20. Silica gel 60 size 0.063 – 0.200 mm no.107734 (ชนิดหยาบ); Merck
21. Deuterochloroform ($CDCl_3$); Merck
22. Deuteromethanol (CD_3OD); Merck
23. Vancomycin
24. Gentamicin
25. Amphotericin B
26. Resazurin

3.1.3 อาหารเพาะเชื้อและสารเคมี

1. Nutrient agar
2. Mueller-Hinton broth (MHB)
3. Sterile normal saline solution (NSS)

4. Sabouraud dextrose agar (SDA)

3.1.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
2. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)
3. *Escherichia coli* ATCC 25922
4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
5. *Candida albicans* NCPF3153
6. *Cryptococcus neoformans* ATCC90113

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 แยกสารเริ่มต้นเคอร์คิวมินอยด์และวิเคราะห์โครงสร้าง

นำสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ผสมมาจำนวน 100 g แยกสารเคอร์คิวมิน (**1**) ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (**2**) และบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน (**3**) ออกจากกันด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 ซม. ใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลชนิดหยาบบรรจุลงในคอลัมน์สูง 15 ซม. ใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลายในการเตรียมคอลัมน์และชะสารออกจากคอลัมน์จนกระทั่งได้สาร **1** ออกมาเกือบหมดจำนวน 60 g จากนั้นเปลี่ยนระบบตัวทำละลายเป็นไดคลอโรมีเทน-เมทานอล โดยค่อย ๆ เพิ่มปริมาณเมทานอล(0.5-10%) ได้สารผสม **1**, **2** และ **3** และนำสารผสมนี้มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีอีก 2 ครั้งโดยใช้ระบบตัวชะสารคล้ายเดิมได้สาร **2** จำนวน 15 g และสาร **3** จำนวน 1.5 g นำเคอร์คิวมินอยด์ที่บริสุทธิ์มาวิเคราะห์หาโครงสร้างที่แน่นอนด้วยโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี (^{1}H-NMR spectroscopy) แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) และเปรียบเทียบกับสารที่มีอยู่แล้ว

3.2.2 ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารเคอร์คิวมินอยด์โดยวิธีทางเคมีและวิเคราะห์โครงสร้าง

3.2.2.1 สังเคราะห์สารดีเมทิลแอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์

1. สังเคราะห์สารดีเมทิลแอนาลอกของเคอร์คิวมิน

ละลายสาร **1** (850 mg) ใน dry CH_2Cl_2 90 ml คนสารละลายที่ 0-5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นค่อย ๆ เติมโบรอนไตรโบรไมด์ (BBr_3) 1 ml คนสารละลายผสมต่อไปอีกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมน้ำลงไป 20 ml สกัดด้วยเอทิลอะซีเตต 150 ml จำนวน 3 ครั้ง

และล้างส่วนสกัดชั้นอินทรีย์ด้วยน้ำ ทำให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous Na_2SO_4 นำส่วนสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกให้แห้ง แล้วนำไปแยกผลิตภัณฑ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลชนิดละเอียดและตัวชะเป็นไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (10:1) ได้สาร **31** จำนวน 240 mg (29%) และสาร **32** จำนวน 450 mg (57%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

2. สังเคราะห์สารดีเมทิลแอนาลอกของดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน

นำสาร **2** มาทำปฏิกิริยาดีเมทิเลชันในทำนองเดียวกันกับสาร **1** ได้สาร **33** (46%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3.2.2.2 สังเคราะห์ไอซอกซาโซลแอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์

1. สังเคราะห์ไอซอกซาโซลแอนาลอกของเคอร์คิวมิน

ละลายสาร **1** (300 mg) ในพิริดีน 6 ml แล้วเติมไฮดรอกซิลามีนไฮโดรคลอไรด์ 250 mg คนสารละลายผสมที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติมน้ำลงไป 10 ml สกัดด้วยเอทิลอะซีเตต 100 ml จำนวน 3 ครั้ง และล้างส่วนสกัดชั้นอินทรีย์ด้วยน้ำ ทำให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous Na_2SO_4 นำส่วนสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกให้แห้ง แล้วนำไปแยกผลิตภัณฑ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวดูดซับเป็น ซิลิกาเจลชนิดละเอียดและตัวชะเป็น ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (100:1.5) ได้สาร **34** จำนวน 238 mg (80%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

2. สังเคราะห์ไอซอกซาโซลแอนาลอกของดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน

นำสาร **2** มาทำปฏิกิริยากับไฮดรอกซีลามีนไฮโดรคลอไรด์ในทำนองเดียวกันกับสาร **1** ได้สารผสมไอโซเมอร์ของ demethoxycurcumin isoxazole (**35a+35b**, 72%) นำสารผสมที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3. สังเคราะห์ไอซอกซาโซลแอนาลอกของบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน

นำสาร **3** มาทำปฏิกิริยากับไฮดรอกซีลามีนไฮโดรคลอไรด์ในทำนองเดียวกันกับสาร **1** ได้สาร **36** (65%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3.2.2.3 **สังเคราะห์สารอัลคิลแอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์**

1. สังเคราะห์ไดโบรโมเพนทิลเคอร์คิวมิน

ละลายสาร **1** (500 mg) ด้วย dimethylformamide 6 ml เติม anhydrous K_2CO_3 (300 mg) แล้วเติม 1,5-dibromopentane (0.6 ml) นำสารละลายผสมไปคนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติมน้ำลงไป 20 ml จากนั้นสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 100 mg ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง นำส่วนสกัดที่ได้มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวชะไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (250:2) ได้สาร **37** จำนวน 200 mg (28%) และสาร **38** จำนวน 450 mg (50%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

2. สังเคราะห์ไดโบรโมเพนทิลดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน

นำสาร **2** (600 mg) มาละลายด้วยอะซีโตน 7 ml เติม 1,5-dibromopentane 1.5 ml นำไปรีฟลักซ์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติมน้ำลงไป 20 ml จากนั้นสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 100 ml ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง นำส่วนสกัดที่ได้มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวชะไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (250:2) ได้สาร **39** จำนวน 150 mg (17%) สาร **40** 170 mg (20%) และสาร **41** จำนวน 400 mg (36%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3. สังเคราะห์ไดโบรโมเพนทิลบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน

ละลายสาร **3** (200 mg) ด้วยอะซีโตน 5 ml เติม K_2CO_3 100 mg เติม 1,5-dibromopentane 0.5 ml นำไปรีฟลักซ์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติมน้ำ 20 ml สกัดด้วยเอทิลอะซีเตตจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 100 ml ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง นำส่วนสกัดที่ได้มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ตัวชะไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (100:1) ได้สาร **42** จำนวน 40 mg (13%) และสาร **43** จำนวน 130 mg (33%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3.2.2.4 **สังเคราะห์แอนาลอกเคอร์คิวมินอยด์ที่มีความมีขั้วสูง**

1. สังเคราะห์พิริดิเนียมแอนาลอกของเคอร์คิวมิน

ละลายสาร **38** (200 mg) ด้วยพิริดีน 3.5 ml นำสารละลายผสมมารีฟลักซ์ภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 1.5 วัน นำสารละลายออกมาวางให้เย็นแล้วเติม ไดเอทิล

อีเทอร์ 20 ml แล้วแช่น้ำแข็ง จากนั้นกรองผลึกและล้างด้วยไดเอทิลอีเทอร์และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ ตกผลึกซ้ำด้วย เมทานอล-ไดเอทิลอีเทอร์ หลาย ๆ ครั้งได้สาร **44** จำนวน 180 mg (90%) นำสารที่ได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

2. สังเคราะห์พิริดิเนียมแอนาลอกของดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน

ละลายสาร **41** (100 mg) ด้วยพิริดีน 2.5 ml นำสารละลายผสมมารีฟลักซ์ภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 1 วัน นำสารละลายออกมาวางให้เย็นแล้วแช่น้ำแข็งกรองผลึกและตกผลึกซ้ำด้วย เมทานอล-ไดเอทิลอีเทอร์ หลาย ๆ ครั้งได้สาร **45** จำนวน 115 mg (91%) นำสารที่ได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3. สังเคราะห์พิริดิเนียมแอนาลอกของบิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน

ละลายสาร **43** (70 mg) ด้วยพิริดีน 2.0 ml นำสารละลายผสมมา รีฟลักซ์ภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 10 ชั่วโมง นำสารละลายออกมาวางให้เย็นแล้วแช่น้ำแข็งกรองผลึกและตกผลึกซ้ำด้วย เมทานอล-ไดเอทิลอีเทอร์ หลาย ๆ ครั้งได้สาร **46** จำนวน 65 mg (71%) นำสารที่ได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3.2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

3.2.3.1 การเตรียมยามาตรฐาน

ชั่งยามาตรฐานด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยา vancomycin และ gentamicin และ amphotericin B เตรียมที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 mg/ml หลังจากนั้นละลายยาโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ยาที่ละลายแล้วเก็บใส่หลอด Eppendorf ไว้เป็น stock solution ที่อุณภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.3.2 การเตรียมสารตัวอย่าง

ละลายสารตัวอย่างด้วย dimethylsulfoxide ให้ได้ความเข้มข้น 10 mg/ml เก็บเป็น stock solution ที่อุณภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.3.3 การเตรียมสี Resazurin

เตรียม 1.8 % resazurin โดยใช้น้ำกลั่นในการละลายและกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 μm เก็บไว้ในหลอด Eppendorf ห่อด้วย aluminium foil เพื่อป้องกันแสง เก็บเป็น stock solution ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลาจะใช้นำมาเจือจาง 1:20 ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

3.2.3.4 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการทดสอบ

แบคทีเรีย

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย (SK1)
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

ยีสต์

- *Candida albicans* NCPF 3153
- *Cryptococcus neoformans* ATCC 90113

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมา streak บนอาหาร nutrient agar (NA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ใช้ loop เขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ มา 3-5 โคโลนี ลงใน nutrient broth (NB) จากนั้นนำไปเขย่าในเครื่องเขย่าโดยใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับความขุ่นโดยใช้ 0.85% sterile normal saline solution (NSS) ให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland standard และเจือจาง 1:200 ด้วย Mueller-Hinton broth (MHB)

การเตรียมเชื้อยีสต์

นำเชื้อยีสต์ที่ต้องการทดสอบมา streak บน Sabouraud dextrose agar (SDA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. albicans* และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. neoformans* แล้วใช้ loop เขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวๆมา 3-5 โคโลนี ลงใน Sabouraud dextrose broth (SDB) จากนั้นนำไปเขย่าในเครื่องเขย่าโดยใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับความขุ่นโดยใช้ 0.85% sterile NSS ให้ได้เท่ากับ 2 McFarland standard และเจือจาง 1:20 ด้วย SDB

3.2.3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นที่ความเข้มข้น 200 μg/ml

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (ดัดแปลงจาก CLSI M7-A4. 2002a)

นำสารตัวอย่างความเข้มข้น 10 mg/ml มาเจือจางด้วยอาหาร MHB ในอัตราส่วน 1:25 เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 400 μg/ml ดูดสารปริมาตร 50 μl ใส่ใน 96 well plate สารละ 3 หลุม นำเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard และเจือจางด้วย MHB ในอัตราส่วน 1:200 แล้วดูดมา 50 μl ใส่ลงในหลุมที่มีสารตัวอย่าง ทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นเท่ากับ 200 μg/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง หยดสี resazurin (0.09%) 20 μl ใส่ในแต่ละหลุม แล้วนำไปบ่มต่อ 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ (Sarker และคณะ. 2007)

ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของยาต้านแบคทีเรียควบคู่กับสารตัวอย่างทุกครั้งโดยใช้ยา vancomycin สำหรับเชื้อ *S. aureus* และ MRSA ใช้ยา gentamicin สำหรับเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่ความเข้มข้น 10 μg/ml

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ (ดัดแปลงจาก CLSI M27-A2. 2002b)

ทำการทดสอบในทำนองเดียวกันกับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย แต่ใช้อาหาร SDB ในการทดสอบ และใช้เชื้อยีสต์ที่เตรียมไว้ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. albicans* และ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. neoformans* จากนั้นทำการหยอดสี resazurin (0.09%) 20 μl ใส่ในแต่ละหลุม บ่มต่อ 2-3 ชั่วโมงสำหรับ *C. albicans* และ 24 ชั่วโมงสำหรับ *C. neoformans*

ทดสอบฤทธิ์ต้านยีสต์ของยาต้านยีสต์ควบคู่กับสารตัวอย่างทุกครั้งโดยใช้ยา amphotericin B ทดสอบกับยีสต์ทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10 μg/ml

การอ่านผลแบคทีเรียและยีสต์

สังเกตการยับยั้งเชื้อจากการเปลี่ยนแปลงของสี resazurin ในอาหารเลี้ยงเชื้อและบันทึกผลดังนี้

\+ มีการยับยั้ง อาหารเลี้ยงเชื้อยังคงเป็นสีน้ำเงินหรือสีม่วงหลังจากการบ่ม

\- ไม่มีการยับยั้ง อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพูหลังจากการบ่ม

นำสารสกัดที่ให้ผลบวกทั้งหมด ไปหาค่า MIC, MBC และ MFC ต่อไป

3.2.3.6. **การหาค่า** minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) **และ** minimum fungicidal concentrations (MFC) **ของสารตัวอย่าง**

ทำการทดสอบใน 96 well plate โดยใช้สารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.25-128 µg/ml ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ เช่นเดียวกับการทดสอบเบื้องต้นที่ความเข้มข้น 200 µg/ml การอ่านค่า MIC จะอ่านที่ความเข้มข้นต่ำสุดของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (สีน้ำเงิน/ม่วง) และนำสารหลุมที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ทุกหลุมมา streak บนอาหาร NA สำหรับแบคทีเรีย และบนอาหาร SDA สำหรับยีสต์บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และ *C. albicans* บ่มที่อุณหภูมิห้อง สำหรับ *C. neoformans* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการอ่านค่า MBC (แบคทีเรีย) และ MFC (ยีสต์) ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (ไม่มีเชื้อขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ)