บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

(MATERIALS AND METHOD)

****

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัยมีรายละเอียดที่จะขอกล่าวถึงประกอบด้วยส่วนที่เป็น วัสดุและสารเคมี อุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สาร และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ยาต้านจุลินทรีย์ ขอบเขตของการวิจัย วิธีการสังเคราะห์และวิธีการวิเคราะห์สารด้วยเครื่องมือต่าง ๆ ดังนี้

3.1. วัสดุและสารเคมี

3.1.1 สารเคมีในการสังเคราะห์สาร

1. $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (Guangdong Guanghua Chemical Factory Co., Ltd)
2. Sodium salicylic acid (Aldrich Chemical Company, Inc)
3. 3,5- Dinitrobenzoic acid (Aldrich Chemical Company, Inc)
4. Ethanol (EtOH) (Aldrich Chemical Company, Inc)
5. Salicylic acid (Aldrich Chemical Company, Inc)

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Mueller Hinton Agar (MHA) (Becton, Dickinson and Company)
2. Mueller Hinton broth (MHB) (Becton, Dickinson and Company)
3. Nutrient Agar (NA) (Merck & Co., Inc.)
4. Nutrient broth (NB) (Merck & Co., Inc.)
5. Potato dextrose agar (PDA) (Becton, Dickinson and Company)
6. Potato dextrose agar (PDB) (Becton, Dickinson and Company)
7. Sabouraud dextrose agar (SDA) (Becton, Dickinson and Company)
8. Sabouraud dextrose broth (SDB) (Becton, Dickinson and Company)

3.1.3 ยาต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial agents)

ยาต้านแบคทีเรีย (Antibacterial agents) คือ Gentamicin (Antibacterial agent) Becton, Dickinson and Company

ยาต้านยีสต์และรา (Antifungals agents) คือ Amphotericin B (Antifungal agent) Bristol-Myers Squibb, UK

3.2. อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สาร

1. ขวดรูปชมพู่ขนาด 25 มิลลิลิตร
2. บีกเกอร์ขนาด 50, 100 มิลลิลิตร
3. กระบอกตวงขนาด 10 มิลลิลิตร
4. ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร
5. กระจกนาฬิกา
6. เทอร์มอมิเตอร์
7. แท่งแม่เหล็กสำหรับกวนสาร
8. ขวดไวแอล
9. ขวดน้ำกลั่น
10. กรวยกรองก้านยาว
11. หลอดทดลอง
12. หลอดหยด
13. กระดาษฟรอยด์
14. ถ้วยอะลูมิเนียม
15. ถุงมือ
16. ช้อนตักสารพลาสติก/เหล็ก
17. กระดาษชั่งสาร
18. กระดาษลิตมัส
19. แท่งแก้วคน
20. กระดาษกรอง
21. เครื่องชั่งสาร
22. เครื่องกวนสารและให้ความร้อน
23. ขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร

3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ทางจุลชีววิทยา

1. จานเลี้ยงเชื้อ
2. กระบอกตวง
3. หลอดทดลอง
4. หลอดฝาเกลียว
5. ขวดรูปชมพู่
6. บีกเกอร์
7. ไมโครทิวส์ (Micro tubes)
8. ไมโครปิเปต
9. ปิเปตแก้ว
10. พาสเจอร์ปิเปต (Pasture's pipette)
11. เวอร์เนียดาร์ลิปเปอร์

3.3. จุลินทรีย์สำหรับการทดสอบ

3.3.1 แบคทีเรีย มีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ คือ *S.aureus, E.coli, P. aeruginosa*

3.3.2 ยีสต์ *C. albicans*

3.3.3 รา *A.niger*

ซึ่งทั้งหมดนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

3.4 เครื่องมือ

3.4.1 เครื่องมือทางเคมี

1. การวิเคราะห์โดยการเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ ยี่ห้อ SMART Bruker 1000
2. การวิเคราะห์สารด้วยอินฟราเรด ยี่ห้อ Perkin Elmer
3. ยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรสโกปี ยี่ห้อ Shimadzu UV-1700
4. การวิเคราะห์การสูญเสียน้ำหนักทางความร้อน ยี่ห้อ Perkin Elmer, TGA 7

3.4.2 เครื่องมือทางจุลชีววิทยา

1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (OUAUS,ARB120,USA)
2. ตู้บ่มเชื้อ (WTB binder, Germany)
3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Atlas ASC-174 Electric, USA)

3.5 วิธีการสังเคราะห์สารประกอบ

3.5.1 การเตรียมสารประกอบ 1

ชั่งกรด 3,5-ไดไนโตรเบนโซอิก 0.21 g (1.0 mmol) ละลายด้วยเอทานอล ปริมาตร 10 ml ในบีกเกอร์ขนาด 50 ml คนด้วยเครื่องกวนสารที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นอุ่นสารละลายที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 10 นาที ตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ทำการกรอง แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้น 4 วันเกิดเป็นผลึกสี่เหลี่ยมสีเหลืองอ่อนใสร้อยละผลิตภัณฑ์ที่ได้ (% yield) คือ 84

3.5.2 การเตรียมสารประกอบ 2

เตรียมสารประกอบ 2 เหมือนกับสารประกอบ 1 แต่เปลี่ยนจากกรด 3,5-ไดไนโตรเบนโซอิก เป็นกรดซาลิไซลิก ร้อยละผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ 73

3.5.3 การสังเคราะห์สารประกอบ 3

1. ละลาย $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ น้ำหนัก 0.16 g (1.0 mmol) ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 15 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 ml และนำมาคนด้วยเครื่องกวนสารที่อุณหภูมิ 70°C จนได้สารละลายใสสีเขียว

2. ละลายสารประกอบโซเดียมเบนโซเอต น้ำหนัก 0.14 g (1.0 mmol) ด้วยน้ำปริมาตร 10 ml หลังจากคนให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเติมลงไปในสารละลายสีเขียว $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ คนอยู่ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนสารที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น กรองสารละลายที่ได้ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจะได้ผลึกสีเขียวเข้ม ร้อยละผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ 77

3.5.4 การสังเคราะห์สารประกอบ 4

1. ละลาย $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ น้ำหนัก 0.32 g (2.0 mmol) ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 15 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 ml และนำมาคนด้วยเครื่องกวนสารที่อุณหภูมิ 70°C จนได้สารละลายใสสีเขียว

2. ละลายสารประกอบโซเดียมซาลิไซเลตน้ำหนัก 0.08 g (0.5 mmol) ด้วยเอทานอลปริมาตร 10 ml หลังจากคนให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเติมลงไปในสารละลายสีเขียว $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ คนอยู่ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนสารที่อุณหภูมิ 70°C

3. ละลายสารประกอบกรด 3,5-ไดไนโตรเบนโซอิก น้ำหนัก 0.10 g (0.5 mmol) ด้วยเอทานอลปริมาตร 10 ml หลังจากคนให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเติมลงไปในสารละลายจากข้อที่ 2 คนอยู่ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนสารที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น กรองสารละลายที่ได้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จนเกิดผลึกสีฟ้า ร้อยละผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ 65

3.5.5 การสังเคราะห์สารประกอบ 5

1. ละลาย $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ น้ำหนัก 0.32 g (2.0 mmol) ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 15 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 ml และนำมาคนด้วยเครื่องกวนสารที่อุณหภูมิ 70°C จนได้สารละลายใสสีเขียว

2. ละลายสารประกอบโซเดียมซาลิไซเลตน้ำหนัก 0.08 g (0.5 mmol) ด้วยเอทานอลปริมาตร 10 ml หลังจากคนให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเติมลงไปในสารละลายสีเขียว $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ คนอยู่ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนสารที่อุณหภูมิ 70°C

3. ละลายสารประกอบกรด 3,5-ไดไนโตรเบนโซอิก น้ำหนัก 0.10 g (0.5 mmol) ด้วยเอทานอล ปริมาตร 10 ml หลังจากคนให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเติมลงไปในสารละลายจากข้อที่ 2 คนอยู่ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนสารที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กรองสารละลายที่ได้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์จนเกิดผลึกสีเขียว ร้อยละผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ 69

3.6 วิเคราะห์หาองค์ประกอบและสมบัติเฉพาะของสาร

นำสารที่สังเคราะห์ได้ ไปหาสมบัติทางด้ายกายภาพ และเคมี โดยใช้เครื่องมือที่หลากหลาย เช่น FT-IR UV-Vis SCXRD และ TGA

3.6.1 FT-IR

วิเคราะห์หาองค์ประกอบและสมบัติเฉพาะของสารด้วยเครื่อง Perkin Elmer โดยใช้ KBr pellet ช่วงความยาวคลื่น 400-4000 cm^{-1}

3.6.2 UV-Vis

วิเคราะห์หาช่วงความยาวคลื่นที่สูงที่สุดในการดูดกลืนแสงของสารที่เป็นองค์ประกอบสารประกอบ โดยใช้ความยาวคลื่นระหว่าง 350-850 nm โดยใช้เครื่อง UV-Visible Spectrometer รุ่น UV-1601 ของบริษัท Shimadzu

3.6.3 SCXRD

บันทึกโดยเครื่อง SMART Bruker 1000 โดยใช้ Mo เป็นแหล่งกำเนิดรังสีเอกซ์ (λ =0.71073 อังสตรอมเพื่อวิเคราะห์หาโครงสร้างของสาร

3.6.2 TGA

บันทึกโดยเครื่อง Thermogravimetric Analyzer รุ่น TGA7 ของบริษัท Perkin Elmer ช่วงอุณหภูมิการทดสอบ 50 °C ถึง 1000 °C (อัตราการให้ความร้อน คือ 10 °C/ min) กระทำภายใต้สภาวะที่มีแก๊สไนโตรเจน

3.7 วิธีการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

3.7.1 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Disc diffusion techniques

3.7.1.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus E.coli* และ *P. aeruginosa* โดยทำการเขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *C. albican* เตรียมโดยเขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง และเชื้อ *A.niger* เตรียมโดยเขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อที่ต้องการทดสอบมีการเจริญเต็มที่ โดยเป็นการเจริญในช่วง log phase

3.7.1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้ง

1) เขียนที่จานอาหารแข็ง เพื่อระบุตำแหน่งที่จะวางแผ่นกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิลิตร ทั้งหมด 4 ตำแหน่ง

2) เพาะแบคทีเรียลงบนอาหารทดสอบ ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นไว้โดยมีปริมาณเชื้อประมาณ 10^5-10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วบิดให้แห้งพอหมาด ๆ กับข้างหลอดทดลอง จากนั้นทำการป้ายหรือเขี่ยเชื้อ (Swab) ให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยลากเส้นผ่านศูนย์กลางจานเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วป้ายเป็นเส้นตั้งฉากผ่านเส้นที่ลากไว้ถี่ ๆ ให้ทั่วผิวหน้าแล้วหมุนจานเพาะเชื้อไปประมาณ 60° แล้วป้ายเช่นกันทำเช่นนี้ 3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาทีเพื่อให้ส่วนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

3) การทดสอบสารสังเคราะห์โดยใช้กระดาษกรองปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ใช้ปากคีบ (Forceps) คีบกระดาษวางบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้นแล้วกดเบา ๆ มาวางที่ตำแหน่งที่กำหนดไว้

4) หยดตัวอย่างสารประกอบ 1 2 3 4 และ 5 ที่จะทดสอบวางใส่ลงแผ่นกระดาษกรองคนละตำแหน่งตามลำดับ ใช้ตำแหน่งละ 10 µL รวมทั้งหยดตัวทำละลายนั้น ๆ เป็นตัวควบคุม (Control) โดยใช้ปิเปตอัตโนมัติ (Automatic pipette) ที่ปราศจากเชื้อ เสร็จแล้วนำจานเพาะเชื้อบ่มที่ 35-37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือวงใส ใช้เวอร์เนียดาร์ลิปเปอร์ (โดยวัดหน่วยเป็น mm)

หลังจากนั้นนำเชื้อที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ นำมาทำการปรับความขุ่นของเชื้อที่ต้องการทดสอบให้ได้ความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 Mcfarland โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบประมาณ 3-4 โคโลนี ใส่ลงในน้ำเกลือ 0.85% แล้วเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปเทียบ กับสารละลายมาตรฐาน 0.5 Mcfarland ซึ่งเชื้อที่ความขุ่นระดับนี้มีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 1.5 (10^8 เซลล์/มล.) ทำให้สามารถเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับวิธีมาตรฐาน โดยใช้กระดาษที่มีลายสีดำวางไว้ด้านหลังหลอดทั้งสอง แล้วมองผ่าน หลอดทั้งสองเพื่อดูเส้นสีดำที่กระดาษ แล้วเปรียบเทียบความชัดเจนที่เห็นเส้นสีดำที่กระดาษให้เท่ากัน เมื่อปรับความขุ่นของเชื้อแล้ว ใช้ไม้พันสำลีจุ่มลงในเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว พอหมาด ๆ แล้วนำไปเขี่ยเชื้อบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA โดยทำการเกลี่ยเชื้อทั้ง 3 ด้าน ให้เชื้อกระจายทั่วทั้งจานอาหารเพาะเชื้อ (จุรีย์รัตน์ ลีสมิทธิ์, 2548)

3.7.1.3 การเตรียมสารสังเคราะห์ที่ใช้ในการทดสอบ

โดยเตรียมสารประกอบ 1-5 ซึ่งในการทดสอบด้วย Disc diffusion techniques สารสังเคราะห์ต่างๆ ทั้ง 5 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบมีความเข้มข้นเท่ากับ 25 mg/ml

3.7.1.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสังเคราะห์

การทดสอบสารสังเคราะห์โดยใช้กระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm ใช้ปากคีบที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้วคีบแผ่นกระดาษกรอง วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการเกลี่ยเชื้อแล้วกดเบา ๆ ให้กระดาษติดกับอาหารเลี้ยงเชื้อให้ดี โดยเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus*, *E.coli* และ

P. aeruginosa จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MHA หรือ NA ส่วนเชื้อยีสต์ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ SDA และเชื้อรา ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หยดตัวอย่างสารสังเคราะห์ต่าง ๆ ที่จะทดสอบวางใส่บนแผ่นกระดาษกรองตามลำดับตำแหน่งละ 10 µL โดยใช้ไมโครปิเปตที่ปราศจากเชื้อ

นำจานอาหารที่ทำเสร็จแล้ว ไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้นเชื้อรา *A.niger* ซึ่งจะต้องบ่มไว้เป็นระยะเวลานาน 48-72 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบผลการทดลองด้วยวิธีการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีแบคทีเรียขึ้น โดยวัดหน่วยเป็น mm

การอ่านผล

เมื่อบ่มเชื้อจนครบ 16 -18 ชั่วโมง แล้ว ให้วัดขนาดของโซนใสที่เกิดขึ้น โดยวัดจากขอบโซนข้างหนึ่งไปยังขอบโซนอีกข้างหนึ่ง โดยให้ผ่านจุดศูนย์กลางของ Paper disc บันทึกหน่วยเป็นมิลลิเมตร (ขอบวงใสที่วัดต้องเป็นวงใสที่ชัด ถ้ามีเชื้อขึ้นบางๆ ให้ถือว่าบริเวณนั้นยังมีปริมาณยาหรือสารประกอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

ขนาดของวงใส (หน่วยคือ mm) = (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้อและวงใสของเชื้อ) ลบด้วย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้อ (6 mm)

$$\text{อัตราส่วนของวงใส} = \frac{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของเชื้อ}}{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Negative control}}$$

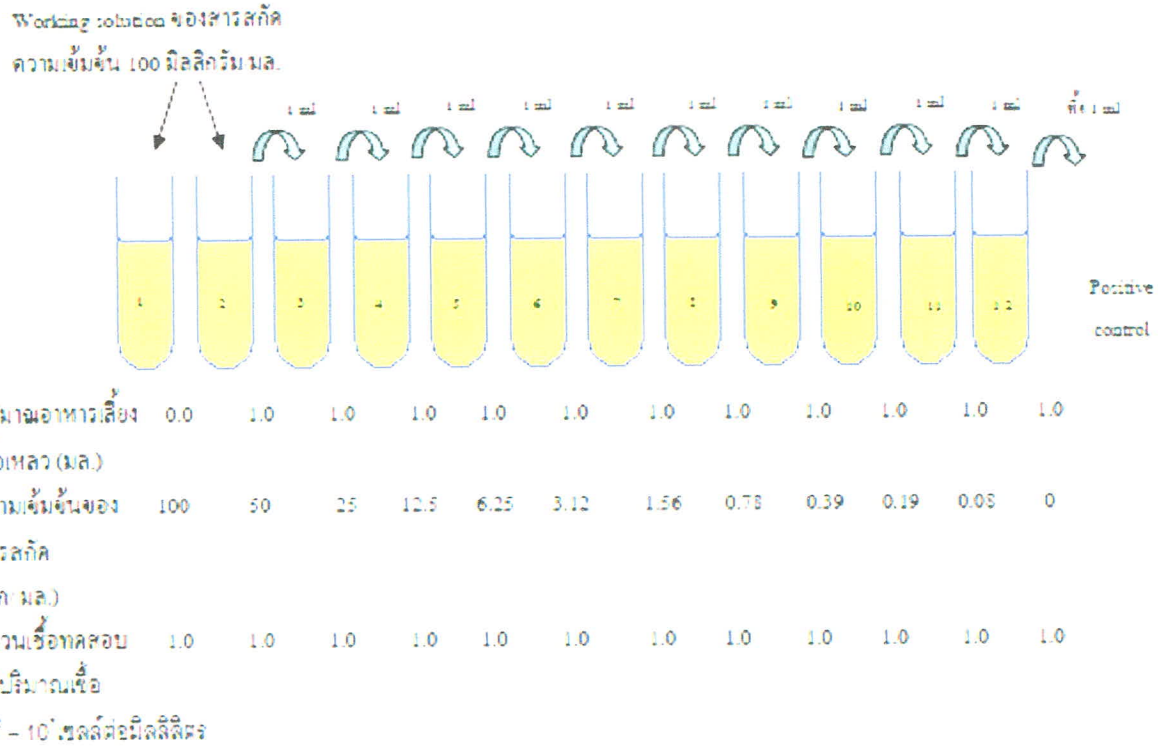
3.7.2 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ด้วย Broth Dilution Technique

3.7.2.1 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Minimal inhibitory concentration (MIC)

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมียาปฏิชีวนะในปริมาณต่างๆกัน โดยใช้วิธีการเจือจางยาปฏิชีวนะที่ต้องการทดสอบให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของแต่ละเชื้อ และสังเกตการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมียาปฏิชีวนะในปริมาณต่างๆ กัน วิธีการนี้สามารถที่จะใช้บอกถึงระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยาปฏิชีวนะสามารถยับยั้งเชื้อหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้

การเตรียมสารสังเคราะห์ที่ใช้ในการทดสอบ โดยเตรียม สารประกอบ 1 2 3 4 และ5โดยเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 100 mg/ml เพื่อใช้ในการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยมีวิธีการทดลอง ดังนี้

1. นำหลอดทดลองขนาด 13 x 100 mm ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อและทำให้แห้ง จำนวน 12 หลอด เขียนหมายเลขกำกับไว้ที่หลอด



ภาพที่ 3.1 แผนภูมิสรุปขั้นตอนการปฏิบัติสำหรับ Macro broth dilution technique

2. ใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ (broth) ใส่ลงในหลอดที่ 2 - 12 หลอดละ 1 ml

3. ใช้ปิเปตดูดสารสังเคราะห์ลงในหลอดที่ 1 และ 2 หลอดละ 1 ml ผสมสารในหลอดที่ 2 ให้เข้ากัน

4. ใช้ปิเปตดูดสารในหลอดที่ 2 หลอด จำนวน 1 ml ใส่ลงในหลอดที่ 3

5. ทำซ้ำ ไปจนถึงหลอดที่ 11 (เปลี่ยนปิเปตทุกครั้งที่เปลี่ยนหลอด) เมื่อผสมสารละลายในหลอดที่ 11 ให้เข้ากันได้ดีแล้วให้ใช้ปิเปตดูดสารละลายทิ้งไป 1 ml หลอดที่ 12 จะมีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่มีสารสังเคราะห์ จึงใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก (Positive control)

6. เติมเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ลงไปในทุกหลอด จำนวนหลอดละ 1 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 16 - 18 ชั่วโมง ยกเว้นเชื้อรา *A.niger* ซึ่งจะต้องบ่มไว้เป็นระยะเวลานาน 48-72 ชั่วโมง

7. อ่านผล โดยการอ่านผลการหา MIC โดยเมื่อบ่มเชื้อจนครบ 16 -18 ชั่วโมง แล้วให้สังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดไม่ขุ่น อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่า MIC บันทึกหน่วยเป็น mg/ml