บทที่ 2 แผนและวิธีดำเนินงานวิจัย

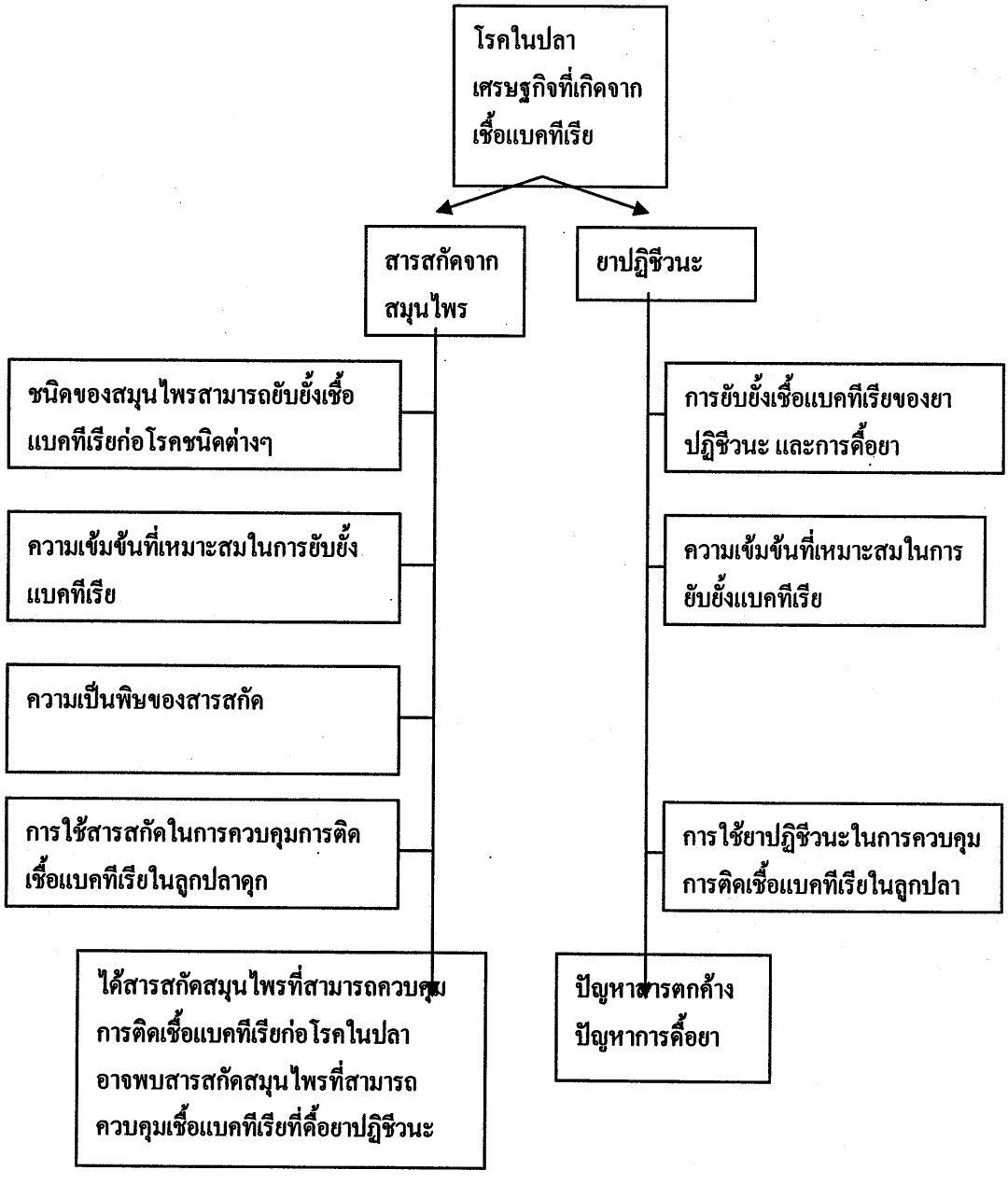
2.1 วัตถุประสงค์

1) เพื่อศึกษาพืชสมุนไพรอย่างน้อย 10 ชนิดในการยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล ปลาทับทิม และปลาดุก
2) เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นของสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่เหมาะสมต่อการทำลายแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าว (*in vitro*)
3) เพื่อสำรวจการดื้อยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและคลอแรมฟีนิคอลของแบคทีเรียก่อโรคที่พบในปลานิล ปลาทับทิมและปลาดุก (*in vitro*)
4) เพื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าวโดยการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรและยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและคลอแรมฟีนิคอล (*in vitro*)
5) เพื่อศึกษาผลของการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรในการควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียในลูกปลาดุก (*in vivo*)

2.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้ข้อมูลพื้นฐานของพืชสมุนไพรจำนวน 10 ชนิดที่สามารถสามารถยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียก่อโรคที่พบในปลานิล ปลาทับทิมและปลาดุกได้ โดยทราบถึง
    1.1) ชนิดและความเข้มข้นของพืชสมุนไพรที่เหมาะสมสำหรับใช้ควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งการทดสอบแบบ *in vitro* และ *in vivo*
    1.2) ความเป็นพิษของสมุนไพรทั้งการทดสอบแบบ *in vitro* และ *in vivo*
    1.3) การเปรียบเทียบการใช้สารสกัดสมุนไพรและยาปฏิชีวนะในการยับยั้ง/ทำลายแบคทีเรียก่อโรคในปลาข้างต้น
2) ได้ข้อมูลการดื้อยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและคลอแรมฟีนิคอลของแบคทีเรียก่อโรคที่พบในปลาน้ำจืดเศรษฐกิจที่สำคัญของภาคประวันออกเฉียงเหนือ
3) ได้องค์ความรู้ใหม่ของการใช้สารสกัดสมุนไพรทดแทนยาปฏิชีวนะในการควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาน้ำจืดเศรษฐกิจที่สำคัญ และการนำองค์ความรู้ดังกล่าวไปเผยแพร่ให้เกษตรกร ซึ่งอาจเป็นแนวทางที่สามารถลดต้นทุนการเพาะเลี้ยงของเกษตรกรและอาจช่วยลดปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในสิ่งแวดล้อม
4) อาจได้สารสกัดพืชสมุนไพรที่สามารถยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียบางชนิดที่ดื้อยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและคลอแรมฟีนิคอล
5) ได้องค์ความรู้พื้นฐานสำหรับการนำพืชสมุนไพรไปใช้ในการควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดอื่นๆต่อไป และเป็นองค์ความรู้ที่นำไปสู่การวิจัยเพื่อการสกัดสารที่ออกฤทธิ์ในสมุนไพรสำหรับใช้เป็นสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดใหม่

2.3 กรอบแนวคิด



2.4 แผนดำเนินการวิจัย

ปีที่ 1

1) แยกชนิดเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์จากแผลที่พบในปลาดุกอย่างน้อย 1 ชนิดเพื่อใช้เป็นโมเดลของเชื้อแบคทีเรียในการทดสอบกับพืชสมุนไพร
2) การเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพร โดยการสกัดพืชสมุนไพรชนิดสดและชนิดแห้ง (จัดทำเองและแบบการค้า) โดยใช้น้ำและเอทิลแอลกอฮอล์ในการสกัด ทำการเปรียบเทียบรูปแบบแถบของสารใน crude extract ที่สกัดในแต่ละครั้ง โดยใช้ SDS-PAGE และ thin layer chromatography
3) การทดสอบการต่อต้านและการทำลายเชื้อแบคทีเรียของพืชสมุนไพรแต่ละชนิด
   3.1) การทดสอบ antibacterial activities โดยใช้ 2 assays คือ Disk diffusion assay และ Microwell dilution assay โดยทำการ prescreen ตัวอย่างด้วย disk diffusion assay ก่อนที่จะทำการทดสอบพืชที่มีผลต่อแบคทีเรียต่อด้วยการทำ microwell dilution assay เพื่อหาค่า MIC (minimal inhibition concentration) ของสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิด
   3.2) การทดสอบ bactericidal activities โดยใช้ Bactericidal assay ทำการเปรียบเทียบค่า MBC (Minimal bactericidal concentration) ของสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิด
4) การตรวจสอบความเป็นพิษของสมุนไพร (*in vitro*) กับเซลล์ NIH 3T3 โดยใช้ MTT assay
5) การทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและคลอแรมฟินิคอลของแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์

   ทดสอบ antibacterial และ bactericidal activities ของยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและคลอแรมฟินิคอลของแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์เช่นเดียวกับวิธีข้างต้น

ปีที่ 2

1) เตรียมเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ทุกชนิดที่พบจากแผลในปลานิล ปลาทับทิม และปลาดุก
2) การเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพร โดยการสกัดพืชสมุนไพรชนิดสดและชนิดแห้ง (จัดทำเองและแบบการค้า) โดยใช้น้ำและเอทิลแอลกอฮอล์ในการสกัด ทำการเปรียบเทียบรูปแบบแถบของสารใน crude extract ที่สกัดในแต่ละครั้ง โดยใช้ SDS-PAGE และ thin layer chromatography
3) การทดสอบพืชสมุนไพรแต่ละชนิดในการต่อต้านและการทำลายเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดที่แยกบริสุทธิ์ได้
   3.1) การทดสอบ antibacterial activities โดยใช้ 2 assays คือ Disk diffusion assay และ Microwell dilution assay ทำการเปรียบเทียบค่า MIC (minimal inhibition concentration) ของสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิด
   3.2) การทดสอบ bactericidal activities โดยใช้ Bactericidal assay ทำการเปรียบเทียบค่า MBC (Minimal bactericidal concentration) ของสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิด
4) การตรวจสอบความเป็นพิษของสมุนไพร (*in vitro*) กับเซลล์ NIH 3T3 โดยใช้ MTT assay

5) การทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและคลอแรมฟีนิคอลของแบคทีเรียทุกชนิดที่แยกบริสุทธิ์ได้จากปลานิล ปลาทับทิมและปลาดุก

ทดสอบ antibacterial และ bactericidal activities ของยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและคลอแรมฟีนิคอลของแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์เช่นเดียวกับวิธีข้างต้น

ปีที่ 3

1) การเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพร โดยการสกัดพืชสมุนไพรชนิดสด ชนิดแห้ง และพืชสมุนไพรบดการค้า โดยใช้น้ำและเอทิลแอลกอฮอล์ในการสกัด เปรียบเทียบรูปแบบแถบของสารใน crude extract ที่สกัดในแต่ละครั้ง โดยใช้ SDS-PAGE และ thin layer chromatography
2) ทดสอบความเป็นพิษของสมุนไพรต่อลูกปลาดุก (in vivo) โดยวิธีแช่และการผสมอาหาร
3) การเปรียบเทียบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสมุนไพรที่ใช้ในการควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียในลูกปลาดุก
4) การเปรียบเทียบการใช้สมุนไพรที่เตรียมได้ ยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและคลอแรมฟีนิคอลและชุดควบคุม ในการควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียในลูกปลาดุก โดยวัดค่า MIC และอัตรารอดของลูกปลา

ตารางแผนการดำเนินงานวิจัยปีที่ 2 (1 ตุลาคม 2549 - 30 กันยายน 2550)

ปีที่ 2

การดำเนินการ	เดือน											
	ตค	พย	ธค	มค	กพ	มีค	เมย	พค	มิย	กค	สค	กย
1) เตรียมสารสกัดจากสมุนไพร และการตรวจสอบแอคติวิตีด้วยวิธี agar well diffusion กับแบคทีเรีย *Aeromonas caviae* ที่ใช้ในการทดลองปีที่ 1	←	→										
2) ใช้แบคทีเรียที่สำรวจพบจากปลาทุกชนิดในการทดสอบ 2.1) การยับยั้งและการทำลายแบคทีเรียโดยใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ดี 3 ชนิดจากการทดลองในปีที่ 1 2.2) การยับยั้งและการทำลายแบคทีเรียโดยปฏิชีวนะออกซีเตต้าไซคลินและคลอแรมฟีนิคอล (การดื้อยา)	←	—	—	—	—	—	—	→				
								←	—	—	→	
3) ทดสอบความเป็นพิษของสมุนไพรต่อเซลล์ทดสอบ (*in vitro*) ในเซลล์ NIH 3T3								←	—	→		
4) ทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสมุนไพรต่อไรน้ำเค็ม (*in vivo*)									←	—	→	
5) การวิเคราะห์แบบแผนของสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย								←	—	—	→	
6) สรุป วิเคราะห์ จัดทำรายงาน												↔
ผลที่คาดว่าจะได้รับ	1. ชนิดของแบคทีเรียที่สารสกัดสมุนไพรสามารถยับยั้งและ/หรือทำลายแบคทีเรียก่อโรคในปลา 2. ได้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งและทำลายแบคทีเรียแต่ละชนิด 3. ทราบความเป็นพิษของสมุนไพรแบบ *in vitro* (NIH 3T3 cells) และ *in vivo* (ศึกษาเบื้องต้นในไรน้ำเค็ม) 4. ผลสำรวจการดื้อยาปฏิชีวนะออกซีเตต้าไซคลินและคลอแรมฟีนิคอลของแบคทีเรียที่แยกได้ 5. ข้อมูลที่สามารถใช้ในการตีพิมพ์งานวิจัยระดับประเทศหรือนานาชาติ 1 เรื่อง											

2.5 วิธีดำเนินการวิจัย

2.5.1 การคัดเลือกชนิดของพืชสมุนไพร

ทำการคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยเพิ่มเติมจากปีที่ 1 จำนวน 20 ชนิด โดยคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคผิวหนังและ/หรืออาการท้องเสีย มีรายงานการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนได้ และพืชสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์เดียวกับ ฝรั่ง ลูกใต้ใบ และน้ำนมราชสีห์ ซึ่งจากการทดลองในปีแรกพบว่าพืชทั้ง 3 ชนิด เป็นพืชที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas caviae* และ *A. sobria* สูงสุด

2.5.2 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

ทำการสกัดสารจากพืชสมุนไพรท้องถิ่นจำนวน 20 ชนิดที่ได้จากการคัดเลือกจากการทดลองที่ 2.7.1 โดยดัดแปลงวิธีของรายงานวิจัยของ Ahmad (2000) โดยล้างพืชด้วยน้ำสะอาด แล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นบดพืชสด 25 กรัม ด้วยเครื่องปั่น ทำการสกัดด้วยน้ำกลั่นหรือ 75% เอทานอล 100 มล. ที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 หากเป็นการสกัดด้วยเอทานอลต้องทำการระเหยเอทานอลออกก่อนไปทำแห้ง โดยทำการระเหยเอทานอลในตู้ดูดควันหรืออ่างน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 45 °ซ จากนั้นทำให้สารละลายแข็งด้วย shell freezer แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยความเย็นภายใต้สภาวะสูญญากาศด้วยเครื่อง lyophilizer เก็บสารที่ได้ใน desiccator สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป สารสกัดแห้งที่ได้จะถูกละลายกลับด้วยน้ำกลั่นหรือ 25% DMSO ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

2.5.3 การตรวจสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas caviae* และ *Aeromonas sobria* เบื้องต้น ของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี Agar well diffusion assay (Owais et al., 2003)

การตรวจสอบสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียเบื้องต้นด้วยวิธี agar well diffusion assay ซึ่งผลการยับยั้งแบคทีเรียสามารถวัดได้จากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (บริเวณที่ไม่มีแบคทีเรียเจริญซึ่ง agar มีลักษณะใส) การทดลองนี้ทำโดยการ swab เชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas caviae* และ *A. sobria* (McFarland 0.5) ลงบน Luria-Bertini (LB) agar เจาะหลุมขนาด 3.2 mm. บน LB agar และเติมสารสกัดจากพืชสมุนไพร 15 µl ลงในแต่ละหลุมที่เจาะไว้ โดยสารสกัดแต่ละตัวอย่างจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ยของ clear zone โดยมี negative control คือ น้ำกลั่นหรือ 25% DMSO ที่เป็นตัวทำละลาย บ่มเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ที่เกิดขึ้นด้วยเวอร์เนีย สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด 3 ชนิด จะใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

2.5.4 การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่สำรวจพบในปลา ของสารสกัดพืชสมุนไพร

Agar well diffusion assay (Owais et al., 2003)

วิธีการตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น ของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลา 12 ชนิดคือ *A. caviae*, *A. sobria*, *A. hydrophila*, *S. agalacatiae* KKU 01002, *S. agalacatiae* KKU 04003, *S. agalacatiae* KKU 04024, *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05055, *S.*

agalacatiae KKU 05056 *S. agalacatiae* KKU 05057, *S. agalacatiae* KKU 06036, และ *S. agalacatiae* KKU 06059 ด้วยวิธี agar well diffusion assay ตามการทดลอง 2.7.3

Minimal Inhibition Concentration (MIC) และ Minimal Bactericidal Concentration (MBC) (Zampini et al., 2005)

การทดลองหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสูงที่สุด 3 ชนิด จากการทดลองข้างต้น โดยนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรมากรองผ่าน filter ขนาด 0.22 µM ทำการ เจือจางสารละลายแบบเจือจางลงทีละ 2 เท่า กับ Müller hinton broth (MHB) ใน microwell plate ให้มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดระหว่าง 50-0 mg/ml ปริมาตร 100 µl เติมเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* หรือ *A. sobria* (McFarland 0.5) ปริมาตร 100 µl ลงใน microwell plate เมื่อครบ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ค่า MIC โดยสังเกตความขุ่นของ bacterial culture ที่มีสารสกัดพืชด้วยตาเปล่า เปรียบเทียบกับ bacterial culture ที่ไม่มีสารสกัดพืช และ control well ที่ไม่มีแบคทีเรีย ค่าความเข้มข้นที่ให้สารละลายใสเมื่อเปรียบเทียบกับ negative well คือค่า MIC ของสารสกัดนั้น สำหรับการวิเคราะห์หาค่า MBC ทำโดยนำ bacteria culture ที่มีสารสกัดพืชสมุนไพรที่ความเข้มข้นคาดว่าเป็นค่า MIC และความเข้มข้นที่สูงกว่ามา streak ลงบน Müller hinton agar (MHA) ทำการบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30^{0}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ค่า MBC โดยสังเกตค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ไม่มีเชื้อเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งค่า MBC คือค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ 99.99%

2.5.5 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพืชสมุนไพร

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อเซลล์ทดสอบ (*In vitro*) ในเซลล์ NIH 3T3

เลี้ยงเซลล์ NIH 3T3 ใน flask T75 ในตู้บ่มที่ความดันบรรยากาศ อุณหภูมิ 37^{0}C มีปริมาณ CO_2 5% และความชื้น 95% โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) เมื่อเซลล์เจริญประมาณ 80% ของ flask ทำการ trypsinization เซลล์เพื่อแยกเซลล์ออกจาก flask นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 700 x g เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนตะกอนเซลล์มาละลายอีกครั้งด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ปริมาณเซลล์ 5.5x10^4 cells/ml

เตรียมสารสกัดจากพืชที่กรองผ่าน filter ขนาด 0.22 µM ทำการเจือจางสารสกัดด้วย DMEM/F12+10% FBS+100U antibiotic ให้มีความเข้มข้นสุทธิ 0, 2.5, 5, 10, 12, 15, 18, 20, 25, 40, และ 50 mg/ml ปริมาตร 100 µl จากนั้น ปิเปตเซลล์ 100 µl ลงในแต่ละหลุมของ microwell plate บ่มเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37^{0}C มีปริมาณ CO_2 5% และความชื้น 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้ MTT assay โดยกำจัดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุม เติม 1xPBS 100 µl และ 12 mM MTT stock solution 10 µl ผสมสารให้เข้ากันและบ่มที่ 37^{0}C เป็นเวลา 10 นาที สารจะกลายเป็นสีม่วง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader จากนั้นคำนวณค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เซลล์ตาย 50% (lethal concentration 50, LC_{50})

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อไรน้ำเค็ม (*In vivo*)

ฟักไข่ไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) ใน artificial sea water เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำ nauplii ที่ได้มาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดพืชสมุนไพร โดยทำการเจือจางสารสกัด artificial sea water ใน microwell plate ให้มีค่าความเข้มข้นสุทธิ 0, 2.5, 5, 10, 12, 15, 18, 20, 25, และ 40 mg/ml โดยใช้สารสกัดปริมาตร 100 µl จากนั้นเติม artificial sea water ที่มี nauplii ของไรน้ำเค็มประมาณ 20 ตัว ลงในแต่ละหลุม ทำการตรวจนับจำนวน nauplii ด้วยกล้อง stereomicroscope เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ nauplii ของไรน้ำเค็มตาย 50% (lethal concentration 50, LC_{50})

2.5.6 การศึกษากลุ่มของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดพืชสมุนไพร และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* และ *A. sobria* ที่ก่อโรคในปลาดุก

Thin layer chromatography (TLC)-phytochemical assay

นำสารสกัดจากพืชสมุนไพรความเข้มข้น 100 mg/ml ปริมาณ 4 µl มาขีดบนแผ่น TLC ที่เคลือบด้วย silica gel 60 F_{254} เป็นระยะ 1 cm จากนั้นนำแผ่น TLC ใส่ในภาชนะปิดที่มีตัวทำละลาย (mobile phase) เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 18 ซ.ม. นำแผ่น TLC ออก และทิ้งให้แห้งในตู้ดูดควัน จากนั้นนำไปพ่นด้วย Detecting agents เพื่อตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นในสารสกัดพืชสมุนไพร โดยทำการทดสอบสารเคมีกลุ่ม proanthocyanidins ด้วย vanillin-HCl (Ribereau-Gayon, 1972), กลุ่ม sterol glycosides ด้วย 20% perchloric acid และอบที่ 150^{0}C 10 นาที, กลุ่ม alkoloids ด้วย Iodine และ potassium iodide ใน glacial acetic acid, กลุ่ม coumarins และ flavonoids ด้วย สารละลาย copper sulfate, anhydrous sodium carbonate และ sodium citrate จากนั้นสังเกตผลภายใต้แสง UV 365 nm, และกลุ่ม phenolic compounds ด้วย สารละลาย 5% Aluminium chloride ใน เมทานอล (Wagner et al., 1984)

TLC-bioautography assay (Zampini et al., 2005)

การทดลอง TLC-bioautography assay เป็นการศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของกลุ่มสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดพืชสมุนไพร ซึ่งทำการทดลองตามวิธีของ Zampini และคณะ (2005) ทำการทดลองโดยนำสารสกัดที่ถูกแยกบนแผ่น TLC จากการทดลองข้างต้น มาผึ่งแห้งใน lamina flow เป็นเวลา 1 คืน จากนั้น overlay แผ่น TLC ด้วย 0.6% MHA ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* หรือ *A. sobria* ปริมาณ 10^6 CFU บ่ม TLC plate ดังกล่าวที่ 30^{0}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำแผ่น TLC ดังกล่าวมาพ่นด้วย 2 mg/ml INT (*p*-iodonitrotetrazolium) บ่มต่อที่ 30^{0}C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ในที่มืด จากนั้นสังเกตบริเวณ inhibition zone บน background สีชมพูหรือแดง บนแผ่น TLC นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลของ TLC-phytochemical assay เพื่อให้ทราบข้อมูลเบื้องต้นของกลุ่มสารเคมีในพืชสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* หรือ *A. sobria*