บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร
2. หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร
3. ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร
4. จานเพาะเชื้อ
5. แผ่นกระดาษวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Whatman)
6. แผ่น TLC 60F-254 (Merck) และ TLC tank
7. ไมโครปิเปตขนาด 200 ไมโครลิตร และ 1,000 ไมโครลิตร
8. Cork borer เบอร์ 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
9. ขวดยาพลาสติกฝาเกลียวขนาด 60 มิลลิเมตร
10. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator : BUCHI Rotavapor R-205)
11. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave : Tommy SS-245)
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge: Beckman J2-MC)
13. ตู้เขี่ยเชื้อ (microflow biological safety cabinet : Holten HVR2472)
14. ตู้บ่มเชื้อชนิดแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker : Innova 4340)
15. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer : Phamacia Novaspec II)
16. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter : Mettler Toledo Seven Easy)
17. กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)
18. สารเคมีต่างๆ ที่จำเป็น (ดังระบุในแต่ละการทดลอง)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

1. *Mycobacterium smegmatis*
2. *Bacillus subtilis*
3. *Staphylococcus aureus*

4. *Pseudomonas aeruginosa*

5. *Escherichia coli*

6. *Candida albicans*

จุลินทรีย์ทดสอบข้อ 2.1 ได้มาจากความอนุเคราะห์ของ พท.ดร. สมพงศ์ ตรีวัชรีกร สถาบันพยาธิวิทยา ศูนย์อำนวยการแพทย์ พระมงกุฎเกล้า กรมแพทย์ทหารบก กรุงเทพมหานคร

จุลินทรีย์ทดสอบข้อ 2.2 ถึง 2.6 ได้มาจาก ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

การเก็บตัวอย่างดิน

1. ทำการเกลี่ยผิวหน้าดินบริเวณที่จะเก็บออกประมาณ 3 เซนติเมตร หลังจากนั้นใช้พลั่วตักดินขุดลึกจากผิวดินลงไปประมาณ 10 เซนติเมตร (El-Naggar, El-Assar and Gawad, 2006) ตักดินใส่ถุงพลาสติกใช้ยางรัดปากถุงให้แน่น

2. เมื่อนำตัวอย่างดินมาที่ห้องปฏิบัติการ ทำการผึ่งตัวอย่างดินให้แห้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลซียส เป็นเวลา 2-7 วัน จนแห้งดีแล้วใช้โกร่งบดตัวอย่างดินให้ละเอียด เก็บใส่ถุงพลาสติกใช้ยางรัดปากถุงให้แน่น (Busti, et al., 2006)

การแยกแอคติโนมัยสีท (ดัดแปลงจาก Thakur, et al., 2007)

1. ชั่งตัวอย่างดินที่บดละเอียดแล้ว 10 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เขย่าให้ผสมเข้ากัน

2. ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างดิน โดยดูดสารละลายตัวอย่างดินในข้อ 4.1 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร เขย่าให้ผสมเข้ากัน ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างดินต่อจนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-5}

3. ใช้ปิเปตขนาด 1.0 มิลลิลิตรดูดสารละลายตัวอย่างดินที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร actinomycete isolation agar (AIA ; ภาคผนวก) ปริมาตรประมาณ 20 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

4. ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการจุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์แล้วเผาไฟ เกลี่ยสารละลายตัวอย่างดินให้กระจายบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างสม่ำเสมอ ในแต่ละระดับความเจือจาง ความเจือจางละ 3 ซ้ำ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน

5. คัดเลือกโคโลนีแอคติโนมัยสีทที่เจริญขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยสังเกตจากลักษณะขอบของโคโลนีที่ฝังลึกลงไปในเนื้อวุ้น และมีการสร้างสปอร์ที่มีลักษณะคล้ายผงแป้งที่บริเวณผิวหน้าของโคโลนี

6. นำไปทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี cross streak บนอาหาร AIA ทำการเก็บโคโลนีเดี่ยว ๆ ไว้ในหลอดอาหารผิวเอียง AIA เพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ต่อไป

การทดสอบการเจริญของ *M. smegmatis* บนอาหารที่ใช้เลี้ยงแอคติโนมัยสีท

1. อาหารสำหรับเลี้ยงแอคติโนมัยสีทที่ใช้ในการทดสอบการเจริญของ *M. smegmatis* ได้แก่ Nutrient Agar (NA), Actinomycete Isolation Agar (AIA), Bennett's medium, Emerson Agar, Glucose Asparagine Agar, Yeast extract Glucose Medium, Yeast extract Malt extract Agar (ISP2) และ Mueller-Hinton Agar (ภาคผนวก)

2. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ย *M. smegmatis* จาก stock ทำการ cross streak ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารสำหรับเลี้ยงแอคติโนมัยสีท

3. นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตการเจริญของ *M. smegmatis* บนจานเพาะเชื้อ

4. คัดเลือกอาหารเลี้ยงแอคติโนมัยสีทที่เชื้อ *M. smegmatis* สามารถเจริญได้ดีที่สุด เพื่อใช้ในการเลี้ยง *M. smegmatis* ในการทดลองต่อไป

การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่ผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ

1. การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (Primary screening) โดยวิธี streak plate (ดัดแปลงจาก Williston, Walrath and Youmans, 1947)

1.1 ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยแอคติโนมัยสีทที่เจริญบนอาหารผิวเอียง AIA อายุ 7 วัน ทำการ streak เป็นเส้นตรงตามแนวกึ่งกลางจานเพาะเชื้อ ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้คัดเลือก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

1.2 ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยจุลินทรีย์ทดสอบได้แก่ *M. smegmatis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, และ *C. albicans* จากอาหารผิวเอียงมา streak ในจานเพาะเชื้อในแนวตั้งฉากกับแนวของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เจริญบนอาหาร นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน

1.3 คัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* โดยดูจากการที่ไม่มีรอยการเจริญของ *M. smegmatis* เข้าใกล้กับแนวของแอคติโนมัยสีท หรืออาจไม่พบการเจริญของ *M. smegmatis* นำไปทดสอบในขั้นทุติยภูมิต่อไป

2. **การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ** (Secondary screening) **โดยวิธี** agar well diffusion

2.1 **การเตรียมกล้าเชื้อแอคติโนมัยสีท** (Imai and Kuwatsuka, 1986)

2.1.1 ถ่ายเชื้อที่ได้คัดเลือกแล้วจากข้อ 6.1 ลงบนอาหารผิวเอียงที่ได้คัดเลือก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

2.1.2 ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยแอคติโนมัยสีทจากข้อ 6.2.1.1 จำนวนหนึ่งห่วงใส่ลงในอาหารเหลวที่ได้คัดเลือก (ข้อ 5) และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.1.3 นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วของการเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เจือจางเชื้อโดยปรับให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1

2.2 **การเลี้ยงแอคติโนมัยสีทเพื่อให้ผลิตสารปฏิชีวนะ** (ดัดแปลงจาก Thakur, et al., 2007)

2.2.1 ดูดกล้าเชื้อจากข้อ 6.2.1 มา 2.5 มิลลิลิตร (5 %) ใส่ลงในอาหารเหลวที่ได้คัดเลือก และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.2.2 นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศา เซลเซียส ความเร็วของการเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

2.2.3 เมื่อครบกำหนดเวลา นำอาหารเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่สามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (9,168 g) เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ในขวดยาพลาสติกฝาเกลียวขนาด 60 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.3 **การเตรียม *M. smegmatis* เพื่อใช้ในการทดสอบ** (ดัดแปลงจาก wenson, Thornsberry and Silcox, 1982)

2.3.1 **ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ย *M. smegmatis* อายุ 3 วันจากหลอดอาหาร จำนวนหนึ่งห่วง ใส่ลงในอาหารเหลวที่ได้คัดเลือกจากข้อ 5 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่**บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.3.2 นำฟลาสก์ที่ใส่กล้าเชื้อแล้วจากข้อ 6.2.3.1 นำไปบ่มในเครื่องเขย่า**ที่**ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 250 **รอบต่อนาที** เป็นเวลา 3 วัน ให้มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml หรือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1

2.4 **การทดสอบความสามารถของสารจากแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* โดยวิธี agar well diffusion** (ดัดแปลงจาก Thakur, et al., 2007)

2.4.1 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในจานเพาะเชื้อ จานละประมาณ 30 มิลลิลิตร ทิ้งให้อาหารแข็งตัว

2.4.2 ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุ่ม *M. smegmatis* ที่เตรียมไว้ มาเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเกลี่ยเชื้อเป็น 3 ระนาบ ทิ้งให้ผิวหน้าอาหารแห้ง

2.4.3 นำ cork borer เบอร์ 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร ที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยจุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเผาไฟ เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 6.2.4.3 ให้เป็นหลุม

2.4.4 ใช้ไมโครปิเปตขนาด 200 ไมโครลิตร ดูดวุ้นหลอมเหลวความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ หยดลงในหลุม 1-2 หยด เพื่อรองก้นหลุม ทิ้งให้วุ้นแข็งตัว

2.4.5 ใช้ไมโครปิเปตขนาด 200 ไมโครลิตร ดูดสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อ**ที่**เตรียมไว้ในข้อ 6.2.2 มาปริมาตร 60 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมที่เตรียมไว้ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

2.4.6 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบๆ หลุม ทั้งแนวตั้ง และแนวนอน แล้วหา**ค่าเฉลี่ย**

2.4.7 **คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสารปฏิชีวนะที่ทำให้เกิดบริเวณใสกว้างมากที่สุดมาทำการทดลองต่อไป**

การผลิตสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่คัดเลือกในถังหมัก (ดัดแปลงจาก Badj, et al., 2007)

1. เตรียมกล้าเชื้อของแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกตามวิธีในข้อ 6.2.4

2. ดูดกล้าเชื้อจำนวน 400 มิลลิลิตร (5%) ใส่ลงในอาหารเหลวที่ได้คัดเลือกแล้ว และผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 8 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.0 บรรจุในถังหมักขนาด 10 ลิตร

3. ควบคุมอุณหภูมิของถังหมักให้อยู่ในช่วง 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ให้อากาศในอัตรา 0.6 vvm และอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 10 วัน

4. เก็บตัวอย่างปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทุก 3 ชั่วโมงในช่วง 3 วันแรก ทุก 6 ชั่วโมงในช่วง 2วันถัดมา และทุก 12 ชั่วโมงในช่วง 5 วันสุดท้าย

5. นำตัวอย่างไปวัดค่าความขุ่นที่ความความคลื่น 660 นาโนเมตร (Imai and Kuwatsuka, 1986) และวัดค่าพีเอช จากนั้นนำตัวอย่างที่เหลือไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (9,168 g) เป็นเวลา 15 นาที (Thakur, et al., 2007) เก็บส่วนใสไว้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ตามวิธีในข้อ 6.2.4

6. เมื่อครบกำหนดเวลา เก็บตัวอย่างทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยง โดยแบ่งใส่ในหลอดขนาดปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (9,168 g) เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บส่วนใสเพื่อนำไปสกัดสารต่อไป

การสกัดสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่คัดเลือก (ดัดแปลงจาก Thakur, et al., 2007)

1. นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 7.6 ปริมาตร 500 มิลลิลิตรนำมาผสมกับ ethyl acetate ในอัตราส่วน 1:1 กวนให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง magnetic stirrer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2. นำสารผสมจากข้อ 8.1 ปริมาตร 1 ลิตร เทใส่ลงในกรวยแยก ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น นำชั้นของ ethyl acetate ซึ่งอยู่ชั้นบนของกรวยแยก มาระเหยเอา ethyl acetate ออกจนแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 240 มิลลิบาร์ อัตราการหมุน 50 รอบต่อนาที

3. ละลายสารสกัดที่ได้ด้วย methanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เทใส่ขวดเปิดฝาตั้งทิ้งไว้ในที่มืดให้ methanol ระเหยจนแห้ง ปิดฝาให้แน่น

4. ชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง และเก็บสารไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

การหาค่า Minimum Inhibition Concentration (MIC) ของสารสกัดจากแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่คัดเลือก โดยวิธี Broth dilution (ดัดแปลงจาก Busti, et al., 2006; Swenson, Thornsberry and Silcox, 1982)

1. ชั่งสารสกัดที่ได้จากข้อ 8.4 มาละลายด้วย DMSO (dimethyl sulfoxide) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

2. นำสารสกัดที่ผ่านการละลายจากข้อ 9.1 ไปเจือจาง (half fold dilution) ในอาหาร Mueller Hinton Broth (MHB ; ภาคผนวก) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้มีความเข้มข้น 2,048, 1,024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 และ 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3. ใช้ไมโครปิเปตขนาด 200 ไมโครลิตร ดูดกล้าเชื้อ *M. smegmatis* ที่เตรียมโดยวิธีในข้อ 6.2.3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดอาหารที่มีสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ เขย่าให้ผสมเข้ากัน

4. นำหลอดอาหารจากข้อ 9.4 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

5. อ่านผลโดยดูจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดจากแอคติโนมัยสีท ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มี *M. smegmatis* เจริญ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อจะใสเมื่อเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม และถือว่าที่ความเข้มข้นนี้เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากแอคติโนมัยสีท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis*

การสกัดแยกสารด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ (Thin-layer chromatography) (ดัดแปลงจาก Phillips, Wellington and Rees, 1994)

1. ตัดแผ่น TLC ให้มีขนาดกว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร

2. หยดสารสกัดของแอคติโนมัยสีทจากข้อ 9.1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น TLC โดยให้ห่างจากปลายด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร

3. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้จุดของสารสกัดแห้ง

4. นำแผ่น TLC ใส่ลงในโถที่อิ่มตัวด้วยไอของสารผสมระหว่าง ethyl acetate และ methanol ในอัตราส่วน 1:0, 0:1, 1:1, 1:5, 5:1, 1:10, 10:1, 1:15, 15:1, 1:20, 20:1, 1:25 และ 25:1 ปล่อยทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่จนกระทั่งห่างจากขอบบนประมาณ 0.5 เซนติเมตร

5. ตรวจหาแถบสารสกัดของแอคติโนมัยสีทโดย นำไปส่องภายใต้รังสีอัลตร้าไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร เลือกแผ่น TLC ที่อัตราส่วนของสารผสมระหว่าง ethyl

acetate และ methanol ที่สามารถแยกแถบของสารสกัดจากแอคติโนมัยสีทออกจากกันได้ชัดเจนที่สุดมาทำการทดลองต่อไป และคำนวณหาอัตราการเคลื่อนที่ของสาร (Rf : Rate of flow)

อัตราการเคลื่อนที่ของสาร (Rf : Rate of flow)

Rf = ระยะทางที่เคลื่อนที่ได้ / ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

การทำไบโอออโทกราฟี (Bioautography) **เพื่อตรวจหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ** *M. smegmatis* **โดยวิธี** agar diffusion bioautography (ดัดแปลงจาก Zheng, et al., 2005)

1. ทำการทดลองเหมือนในข้อ 10 แต่เพิ่มปริมาตรสารจาก 5 ไมโครลิตรเป็น 10 ไมโครลิตร นำแผ่น TLC ที่ได้คัดเลือกไปผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อโดยวางไว้ภายใต้รังสีอัลตร้าไวโอเลตเป็นเวลา 30 นาที

2. ใช้ไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่ม *M. smegmatis* ที่เตรียมโดยวิธีในข้อ 6.2.3 มาเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA โดยเกลี่ยเชื้อเป็น 3 ระนาบ ทิ้งให้ผิวหน้าอาหารแห้ง

3. หลังจากนั้นใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วนำแผ่น TLC จากข้อ 11.1 ไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี *M. smegmatis* เกลี่ยอยู่บนผิวหน้าอาหาร โดยวางแผ่น TLC หันด้านที่มีสารสกัดจากแอคติโนมัยสีททาบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ กดแผ่น TLC ให้แนบสนิทกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆ แผ่น TLC นำไปเปรียบเทียบกับแผ่น TLC จากข้อ 10.5