

ฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ด้านสีของเจลพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียน



นางสาวนฤภัท ปัทมพงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเวชเคมี ภาควิชาชีวเคมี

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-4752-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ANTI-ACNE PREPARATION OF POLYSACCHARIDE GEL
FROM DURIAN FRUIT-HULLS

Miss Naruphat Paphattarapong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biomedical Chemistry

Department of Biochemistry
Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-17-4752-7

481620

Thesis Title ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ANTI-ACNE
 PREPARATION OF POLYSACCHARIDE GEL
 FROM DURIAN FRUIT-HULLS

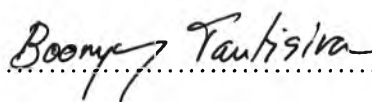
By Miss Naruphat Paphattarapong

Field of Study Biomedical Chemistry

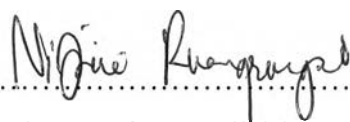
Thesis Advisor Associate Professor Sunanta Pongsamart, Ph.D.

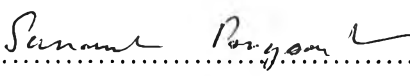
Thesis Co-advisor Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.

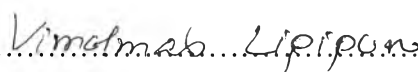
Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn
University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

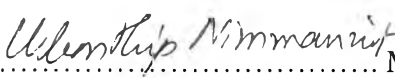
..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)

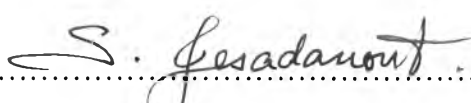
THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Nijjiri Ruangrunsi, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Sunanta Pongsamart, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Ubonthip Nimmanit, Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Sukanya Jesadanont, Ph.D.)

นฤภัส ปัทภพพงษ์: ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ด้านผิวหนังของเจลพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียน (ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ANTI-ACNE PREPARATION OF POLYSACCHARIDE GEL FROM DURIAN FRUIT-HULLS) อ.ที่ปรึกษา: รศ. ดร. สุนันท์ พงษ์สามารถ, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ. ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์, 212 หน้า, ISBN 974-17-4752-7

เจลพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียนในความเข้มข้น 2.5% ได้มีการศึกษาพบว่ามาแบคทีเรียได้ ในการศึกษาครั้งนี้ทำการประเมินผลของปัจจัยต่างๆต่อความหนืดของเจลพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า อีออนที่มีประจุบวกชนิด divalent ทำให้ความหนืดของเจลพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้นอย่างมาก ตัวทำละลาย และสารให้ความชุ่มชื้นที่ความเข้มข้นมากกว่า 15% ทำให้ความหนืดของเจลพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้น แต่สารกันบูดมีผลต่อความหนืดเพียงเล็กน้อย phosphate buffer ทำให้ความหนืดของเจลพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้นมาก ในขณะที่ citrate buffer ทำให้เจลพอลิแซ็กคาไรด์มีความหนืดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำมันพลูตต่อแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ และยีสต์ 2 สายพันธุ์ โดยวิธี agar diffusion พบว่าน้ำมันพลูตที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.08 เปอร์เซ็นต์ ให้ inhibition zone เป็นวงใสมีขอบเขตที่คมและชัดเจนบนอาหารวุ้นต่อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9721 และต่อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 ให้ inhibition zone ต่อยีสต์ *Candida albicans* ATCC 10230 ที่ความเข้มข้นของน้ำมันพลูต 0.16 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 0.31 เปอร์เซ็นต์ต่อ *Propionibacterium acnes* ATCC 6919, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 และ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 ทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี broth macrodilution พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันพลูตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) มีค่า 0.010 ถึง 0.078 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) มีค่า 0.020 ถึง 0.156 เปอร์เซ็นต์ (v/v) การตั้งสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ด้านผิวหนังของเจลพอลิแซ็กคาไรด์ร่วมกับน้ำมันพลูตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง จุลินทรีย์ได้กว้างขึ้น สูตรตำรับที่มีน้ำมันพลูตเตรียมได้เป็นเจลที่มีลักษณะใสได้ผลิตภัณฑ์เจลเป็นที่พอใจ เมื่อผ่านการทดสอบความคงตัวโดยวิธี freeze-thaw cycle ครบ 6 รอบ ผลิตภัณฑ์เจลที่ได้มีความคงตัวที่ดี การตรวจสอบแสดงให้เห็นศักยภาพฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ด้านผิวหนังของเจลพอลิแซ็กคาไรด์ ที่มีส่วนผสมของน้ำมันพลูตความเข้มข้น 1 หรือ 2% โดยวิธี agar diffusion และ broth microdilution พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้สามารถยับยั้ง *S. epidermidis*, *S. aureus* และ *P. acnes* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคผิวหนังและสิว ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของเจลพอลิแซ็กคาไรด์มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมาย

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....
สาขาวิชา.....ชีวเวชเคมี.....
ปีการศึกษา.....2548.....

ลายมือชื่อนิสิต.....นฤภัส ปัทภพพงษ์.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....สุนันท์ พงษ์สามารถ.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....วิมลมาศ ลิปิพันธ์.....

4576571133: MAJOR BIOMEDICINAL CHEMISTRY

KEY WORD: *Durio zibethinus*/ DURIAN POLYSACCHAIDE/ ACNE GEL/
BETEL VINE OIL

NARUPHAT PAPHATTARAPONG: ANTIBACTERIAL ACTIVITY
OF ANTI-ACNE PREPARATION OF POLYSACCHARIDE GEL
FROM DURIAN FRUIT-HULLS. THESIS ADVISOR: ASSOC.
PROF. SUNANTA PONGSAMART, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR:
ASSOC. PROF. VIMOLMAS LIPIPUN, Ph.D., 212 pp. ISBN 974-17-
4752-7

Polysaccharide gel (PG) from durian fruit-hulls at concentration 2.5% w/v have been demonstrated bactericidal activity, the present studies was to determine factors effecting the viscosity of PG. Divalent cations showed high effect on increasing PG viscosity. Organic solvents and humectants at higher concentration than 15% increase PG viscosity but paraben shows less effect. Phosphate buffer increases PG viscosity greatly, whereas citrate buffer slightly increases viscosity of PG dispersion. Screening test for antimicrobial activity of betel vine oil against 10 bacteria and 2 fungi was performed. The susceptibility test was determined by agar diffusion method. The zones of inhibition were obtained at the lowest concentration 0.08% v/v of betel vine oil against bacteria, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9721; and fungus, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763; inhibition zone against *Candida albicans* ATCC 10230 was at 0.16%; and against *Propionibacterium acnes* ATCC 6919, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 was at 0.31%. Broth macrodilution test was used to determine a quantitative antimicrobial activity of betel vine oil. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of betel vine oil against tested microorganisms were in ranges 0.010 to 0.078% (v/v) and minimal bactericidal concentrations (MBCs) were at 0.020 to 0.156%. Antimicrobial PG gel preparations were formulated together with betel vine oil in order to obtain broader antimicrobial activity of the products. The formulation contained betel vine oil gave a satisfactory clear gel products. After stability tested by freeze-thaw cycle for 6 cycles, the products remain unchanged and the gel characteristics was the same as after freshly prepared. The antibacterial potential of the antimicrobial PG gel finished products which composed of PG and 1 or 2% betel vine oil was explored. The susceptibility test of the products was evaluated by agar diffusion method and broth microdilution method against bacteria, *S. epidermidis*, *S. aureus* and *P. acnes*, which cause skin infection and pimples. The results indicated that both antimicrobial PG gel products exhibited antibacterial activity against target bacteria.

Department.....Biochemistry.....Student's signature.....Naruphat Paphattara pong
Field of study.....Biomedical Chemistry.....Advisor's signature.....Sunanta Pongsamart
Academic year.....2005.....Co-advisor's signature.....Vimolmas Lipipun

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my sincere gratitude and appreciation to my advisor, Associate Professor Dr. Sununta Pongsamart for her kindness, invaluable advice and encouragement throughout this study. Her kindness and helpfulness are also deeply appreciated.

I wish to express my grateful thank to my thesis co-advisor, Associate Professor Dr. Vimolmas Lipipun of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univesity, for her kindness, helpful and valuable advice for this study.

I am obliged to all members of the thesis committee for their suggestions and comments.

I am very thankful to my friends and all staff members of Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univesity, and other person whose names have not been mentioned for their kindness and assistance.

I would like to thank the Ministry of University affairs for granting financial support to fulfill this investigation.

Finally, I wish to express my infinite thanks and deepest gratitude to my family for their love, understanding and supporting throughout my life.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (Thai).....	iv
ABSTRACT (English).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER	
I. GENERAL BACKGROUND.....	1
1. Introduction.....	1
2. Literature Review.....	3
II. MATERIALS AND METHODS.....	54
1. Preparation of Polysaccharide Gel (PG) from Fruit-Hulls of Durian.....	57
2. Physical properties of Polysaccharide Gel (PG).....	57
3. Compatibility studies of Polysaccharide Gel (PG).....	58
4. Effect of buffer on Polysaccharide gel (PG).....	60
5. Determination of free radical scavenging activity using DPPH method.....	60
6. Antimicrobial susceptibility tests of betel vine oil.....	61
7. Surfactant optimization.....	64
8. Formulation of antimicrobial PG preparation.....	64
9. Evaluation the physical properties of antimicrobial preparation.....	70
10. Assessment of antimicrobial PG preparation stability.....	70
11. Antibacterial susceptibility tests of antimicrobial PG preparation.....	71

III. RESULTS.....	74
1. Polysaccharide Gel (PG) from Fruit-Hulls of Durian.....	74
2. Physical properties of Polysaccharide Gel (PG).....	74
3. Compatibility studies of Polysaccharide Gel (PG).....	77
4. Effect of buffers on polysaccharide gel (PG).....	87
5. Determination of free radical scavenging activity of curcuminoid by using DPPH method.....	87
6. Antimicrobial susceptibility test of betel vine oil.....	91
7. Surfactant optimization.....	103
8. Formulation of antimicrobial PG preparation.....	103
9. Physical properties evaluation of the finished products.....	104
10. Assessment of antimicrobial PG preparation stability.....	109
11. Bacterial susceptibility tests of the finished products antimicrobial PG preparation.....	114
IV. DISCUSSION AND CONCLUSIONS.....	120
REFERENCES.....	134
APPENDICES.....	147
VITA.....	212

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Constituents of semi-solid formulations.....	23
2. General classification and description of gels.....	25
3. Classification of surfactants.....	46
4. IC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activities in various samples.....	90
5. Antibacterial activity of betel oil on growth of gram positive bacteria by agar diffusion method.....	93
6. Antibacterial activity of betel oil on growth of gram negative bacteria by agar diffusion method.....	94
7. Antibacterial activity of betel oil on growth of fungi by agar diffusion method.....	95
8. Antimicrobial activity of curcuminoid and oleoresin on growth of microorganisms by agar diffusion method. NZ = no inhibition zone.....	98
9. Antimicrobial activity of oleoresin on growth of microorganisms by agar diffusion method.....	99
10. Minimal inhibitory concentration (MIC) and Minimal bactericidal concentration (MBC) of betel vine oil against microorganisms by broth macrodilution method in MHB medium except for <i>P. acnes</i> was in BHB medium.....	100
11. Compatibility test of betel vine oil with surfactant.....	105
12. Formulation of PG gel base and formulation of PG gel base contained betel vine oil.....	106
13. Formulation of PG gel contained lactic acid.....	107
14. Formulation of PG gel contained salicylic acid.....	108
15. Assessment of antimicrobial PG preparation stability.....	110

Table	Page
16. Antibacterial activity of various samples on growth of bacteria by agar well diffusion method.....	115
17. Minimal inhibitory concentrations (MIC) and Minimal bactericidal concentrations (MBC) of finished products and ingredients against microorganisms by broth microdilution method.....	118

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. The skin is composed of epidermis, dermis, and subcutaneous tissue (fat).....	5
2. Structure of alginate that composed of homopolymeric blocks MM or GG, and blocks with an alternating sequence, the MG blocks.....	29
3. Structural unit of carrageenan.....	30
4. There are three major types of carrageenan; (A)- kappa (κ), (B)-iota (ι) and (C)-lambda (λ)-carrageenans.....	32
5. Deacetylation of chitin to chitosan by the chitin deacetylase.....	33
6. Structural unit of Guar gum.....	34
7. Structural unit of Locust bean gum.....	36
8. Structurally pectin consist of a backbone of (1,4)- α -D-galacturonosyl residues interrupted with substitution of (1,2)- α -L-rhamnopyranosyl residues.....	37
9. Molecular structure of xanthan gum.....	40
10. Structural unit of methycellulose.....	41
11. Structural unit of Hydroxypropylmethylcellulose.....	42
12. Structural unit of Sodium carboxymethylcellulose.....	43
13. Acrylic acid monomer unit in carbomer resins.....	44
14. Polysaccharide gel (PG) isolated from dried fruit-hulls of durian.....	75
15. The pH profile of polysaccharide gel (PG) at different concentrations Data are means \pm SD.....	76
16. Viscosity profile of polysaccharide gel (PG) at different concentrations.....	78
17. Effect of acid (HCl) and base (NaOH) on the apparent viscosity of 3% w/v polysaccharide gel (PG) in distilled water.....	79

Figure	Page
18. Effect of eletrolytes of divalent cations on the apparent viscosity of 3% w/v polysaccharide gel (PG) in distilled water -▲ - CaCl ₂ ; -■ - MgCl ₂ ; -● - FeSO ₄ ; -◆ - ZnSO ₄	81
19. Effect of organic solvents on the apparent viscosity of 3% w/v polysaccharide gel (PG) in distilled water -▲- Ethyl alcohol; -■- Isopropyl alcohol.....	82
20. Effect of humectants on the apparent viscosity of 3% w/v polysaccharide gel (PG) in distilled water -▲ - Propylene glycol; -■ - Glycerine; -● - Sorbitol.....	84
21. Effect of amerchol L101 on the apparent viscosity of 3% w/v polysaccharide gel (PG) in distilled water.....	85
22. Effect of paraben concentrate on the apparent viscosity of 3% w/v polysaccharide gel (PG) in distilled water.....	86
23. Effect of buffers on the apparent viscosity of 3% w/v polysaccharide gel (PG) in distilled water.....	88
24. A logarithmic regression curve of gallic acid standard.....	89
25. Microbiological assay plate for <i>S. aureus</i> ATCC 6538P on medium MHA at different concentrations (%) of betel vine oil in 0.1% tween 80 and control was 0.1% tween 80.....	96
26. Microbiological assay plate for <i>Propionibacterium acnes</i> on medium BHIA. Cups contain different concentrations (%) of betel vine oil in 0.1% tween 80 was used as control.....	97
27. Broth macrodilution test for MIC value of betel vine oil against <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 no visible growth demonstrated at the lowest concentration 0.039% (v/v) of betel vine oil in MHB medium.....	101
28. Broth macrodilution test for MIC of betel vine oil against <i>P. acnes</i> , no visible growth at the lowest concentration 0.0195% (v/v) of betel vine oil in BHIB medium was demonstrated.....	102

Figure	Page
29. Antimicrobial PG preparation: (A) contained betel vine oil 1%, (B) contained betel vine oil 2%; 1=Freshly prepared, 2=After stand 30 days, 3=After six freeze- thaw cycles.....	112
30. Antimicrobial PG preparation: (A) contained lactic acid 0.5%, (B) contained salicylic acid 0.5%; 1=Freshly prepared, 2= After stand 30 days, 3= After six freeze- thaw cycles.....	113
31. Microbiological assay plate of various samples against (A) <i>Propionibacterium acnes</i> , (B) <i>Staphylococcus aureus</i> , (C) <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; a- antimicrobial PG preparation contained 1% betel vine oil (No. 26), b- antimicrobial PG preparation contained 2% betel vine oil (No. 45), c- PG base preparation (No. 1), d-1% betel vine oil, e-2% betel vine oil, f- 2.5% PG, g- Panoxyl 5 [®] gel.....	116
32. Broth microdilution test for MIC of various sample against (A) <i>Propionibacterium acnes</i> , (B) <i>Staphylococcus aureus</i> , (C) <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; a- antimicrobial PG preparation contained 1% betel vine oil (No. 26), b- antimicrobial PG preparation contained 2% betel vine oil (No. 45), c-PG base preparation (No. 1), d- 1% betel vine oil, e- 2% betel vine oil, f- 2.5% PG, g- Panoxyl 5 [®] gel, h-control.....	119

ABBREVIATIONS

ATCC	=	American Type Culture Collection, Maryland, USA
BHIA	=	brain heart infusion agar
BHIB	=	brain heart infusion broth
°C	=	degree Celsius
cm	=	centimeter (s)
cps	=	centipoises
CFU	=	colony forming unit
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
g	=	gram
hr.	=	hour
hrs.	=	hours
kg	=	kilogram
L	=	liter
MBC	=	minimal bactericidal concentration
mg	=	milligram
MHA	=	mueller hinton agar
MHB	=	mueller hinton broth
MIC	=	minimal inhibitory concentration
min	=	minute
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
µg	=	microgram
µl	=	microliter
NSS	=	normal saline solution
SDA	=	sabouraud dextrose agar
SDB	=	sabouraud dextrose broth
S.E.M.	=	standard error of mean
TSA	=	tryptic soy agar