

# Resazurin(alarmar Blue™)을 이용한 효과적인 *in vitro* 항비듬력 측정법

박병덕, 홍선영, 정세규, 조인식, 구형서, 한일민, 이상명<sup>1)</sup>, 이완규<sup>1)</sup>

애경산업 중앙연구소

<sup>1)</sup> 충북대학교 수의과대학

## The Effective *in vitro* Anti-dandruff Test Method with Resazurin(alarmar Blue™)

Byeong Deog Park, Seon Young Hong, Sekyoo Jeong, In Sik Jo, Hyeong Seo Gu, Il Min Han,  
Sang Myeong Lee<sup>1)</sup>, Wan Kyu Lee<sup>1)</sup>

Aekyung Central Research Lab.

<sup>1)</sup> College of Veterinary Medicine Chung Buk National University

### 요 약

Resazurin(alarmar Blue™)을 이용하여 *in vitro* 적으로 *P. ovale*의 최소 발육저지농도 (Minimum Inhibitory Concentration ; MIC)를 측정함으로써 여러 가지 조성의 항비듬제의 항비듬 효과를 측정하고자 하였다. 최적의 실험 조건을 결정하기 위한 기초 실험 결과, 약  $2.6 \times 10^5$ cfu/ml 이상의 농도로 *P. ovale*가 주입되는 경우 alarmar Blue™ 흡광도의 변화를 정

확하게 관찰할 수 있었고, alarmer Blue™ 자체의 희석 배율이 1:1 ~ 1:4 이며, 16 시간과 24 시간 배양을 하여야 비교적 정량적인 결과를 얻을 수 있었다. alarmer Blue™가 균체의 증식에 미치는 영향을 고찰하여 본 결과 1:1 의 희석 용액에서도 alarmer Blue™가 균체의 증식에 영향을 미치지 못함을 알 수 있었다. Zinc pyrithione 과 Climbazole 의 혼합계에서 항비듬 효과를 관찰하여 본 결과 일정 혼합비에서 효과적인 항비듬 효과를 관찰할 수 있었고, 현미경 관찰에 의한 MIC 측정법과, SDDM(Skin-Disk Diffusion Method) 법에 의한 항비듬 효과와 비교하여 본 결과 유사한 경향성을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 alarmer Blue™를 사용한 *in vitro* 항비듬 효과 측정법은 시료나 배지의 탁도에 크게 영향을 받지 않으며, Micro-plate reader 를 사용함으로써 많은 종류의 시료에 대한 결과를 빠르고 정확하게 얻을 수 있다는 장점을 가지고 있으므로, 향후 효율적인 *in-vitro* 항비듬 평가 방법으로 활용이 기대된다.

## Abstract

We have tried to measure the anti-dandruff effect of the several kinds of formulations by determining the MIC values of the *P. ovale* which was determined by resazurin(alarmer Blue™). To get high reproducibility, it was suggested that about  $2.6 \times 10^5$ cfu/ml of *P. ovale* should be incubated with alarmer Blue™, optimum dilution ratio between alarmer Blue™ and PBS buffer should be 1:1 ~ 1:4, and optimum incubation time should be 16 ~ 24 hours. Even though 1:1 diluted alarmer Blue™ was incubated with *P. ovale*, the metabolic activity of *P. ovale* was not inhibited by alarmer Blue™. The Minimum Inhibitory Concentration(MIC) values of several kinds of anti-dandruff formulation which were the mixture system between Zinc pyrithione and Climbazole make it possible to determine the optimal anti-dandruff formulation, which show similar results with that of microscopic MIC determination and that of SDDM(Skin-Disk Diffusion Method). It is expected that the anti-dandruff

test method which uses alarmer Blue™ could be used as an effective *in vitro* test method because it was not so much affected by the turbidity of the broth and samples, and it can afford the MIC values of many samples within relatively short time by using microplate reader.

## 서 론

비듬이란 임상적으로는 두피가 벗겨지는 이상 증상으로, 박리(desquamation)가 증가되고, 피지가 육안으로 관찰 가능한 각질 세포 덩어리의 형성에 작용하는 현상으로 모발의 미용상의 문제가 아니라 피부의 문제라고 알려져 있다<sup>1)</sup>. 비듬은 피지 분비물의 증가, 효소에 의한 피지의 분열, 상피조직의 각화 이상, 표피에서의 유사핵 분열 속도의 증가, 그리고 두피에 상재하는 미생물 등이 원인으로서 알려져 있다<sup>2),3)</sup>.

*Pityrosporum ovale* 는 인체에서 대개 비강진(pityriasis versicolor)과 관련이 있고<sup>4)</sup>, 비듬을 포함한 지루성 피부염<sup>5)</sup>과 같은 다른 피부 질환과도 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 이런 증상이 있을 때, *P. ovale* 의 개체 밀도는 일반적으로 정상 개체의 피부 면적에 상응하는 것보다 높아지는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>.

현재 가장 널리 사용되고 있는 Zinc pyrithione 과 octopirox, selenium sulfide 와 같은 물질은 모두 미생물의 성장을 억제하거나 미생물을 죽이는 항진균제이고, 두피의 지방 분해를 감소시키는 물질로 알려져 있다<sup>1),7),8)</sup>.

항비듬 제품을 개발하는 개발자들은 항비듬제를 스크리닝 하는 방법으로 *P. ovale* 에 대한 항진균 효과를 측정하는 방법으로서 MIC(Minimum Inhibitory Concentration) test 와 Disk Diffusion Test 를 널리 사용하고 있다. 그러나, *P. ovale* 의 특별한 영양 요구성으로 인해 지금까지 단지 몇 가지의 *P. ovale* 의 배양법과 감수성 시험법만이 보고되어 있다<sup>4), 6)</sup>. MIC Test 의 경우 *P. ovale* 의 배양 배지 자체의 탁도와 샴푸와 같이 시료 자체가 혼탁한 경우에는 균의 성장 여부를 육안으로 관찰하기 어렵다는 단점이 있었다.

본 연구자들은 이와 같은 단점을 극복하기 위하여 배지나 시료의 탁도에 영향을 받지 않는 항비듬력 측정법으로 colorimetric growth indicator 인 alamar Blue™<sup>4),6)</sup> 을 이용한 간편한 MIC 측정법을 개발하게 되었다. 또한 이 방법을 기존의 MIC Test 방법과 비교하고, 이를 항비듬력 확인 시험법인 Disk Diffusion Test<sup>9)</sup>의 결과와 비교하였기에 소개하고자 한다.

## 실험 재료 및 방법

### 1. 기기 및 시약

실험에 사용한 시약 중 bacteriological peptone, glucose, yeast extract, oxbile 등은 DIFCO 사로부터 구입하였고, alamar Blue™은 Laboserv(Giessen, Germany)사로부터 구입하였다. 기타의 시약은 1 급 이상의 것을 사용하였다.

흡광도 측정을 위한 micro-plate reader 는 Molecular Device 사의 SPECTRA MAX 340PC 를, *P. ovale* 의 형태 및 증식 여부를 관찰을 위한 inverted microscope 으로는 NIKON 사의 ECLIPSE TE 300 을 이용하였다.

### 2. 시료

항비듬제로 알려져 있는 Climbazole 과 Zinc pyrithione 의 조성비를 달리하여 제조한 샴푸를 시료로 사용하였으며, 항비듬 제제의 조성비는 table 1 과 같다.

### 3. 시험 균주

본 실험에 사용한 공시균주는 KCTC(Korean Collection for Type Cultures)에서 분양 받은 *P. ovale* KCTC7546(ATCC 12078)을 사용하였다.

#### 4. 배지

배지는 bacteriological peptone 0.1%, glucose 0.5%, yeast extract 0.01%, oxbile 0.4%, glyceryl monostearate 0.05%, whole-fat cow's milk 0.1%, glycerol 0.1%를 함유한 *P. ovale* 배지를 사용하였으며, 한천 배지일 경우 1.2%의 bactoagar 를 첨가하였다.

#### 5. 디스크 제작

Paper disk 는 filter paper (Watmann, U.S.A)는 직경 13 mm의 디스크로 만들어 사용하였고, 피부 디스크는 CIBA-Geigy 사의 calf skin disk 제조 방법과 기존에 발표된 기니픽 스킨 디스크 제조 방법<sup>9)</sup>을 응용하여 직경 13 mm의 디스크로 만들어 사용하였다.

#### 6. MIC (Minimum Inhibitory Concentration) Test

*P. ovale* KCTC 7546(ATCC 12078) 균주를 *P. ovale* 액체 배지를 사용하여 37℃에서 48 시간 전배양하고, 이를 105~6cfu/ml가 되도록 희석하여 접종균액으로 준비하였다. 미리 제조하여 멸균한 *P. ovale* 액체 배지를 96-well, U-form micro plate(Falcon, U.S.A)의 각 well 에 100  $\mu$ l씩 넣었다. 미리 준비한 삼푸 용액을 96-well, U-form micro plate 의 두 번째 well 에 100  $\mu$ l 넣고, 1:1 계단 희석을 20 회 시행하였다. 각 well 에 들어 있는 시료 희석액에 *P. ovale* 접종 균액을 50  $\mu$ l씩 취하여 첨가하였다. 처리된 96-well, U-form micro plate 를 37℃ 배양기에서 2 일간 배양하였다.

##### 6-1. 현미경 관찰

앞서 기술한 MIC Test 방법으로 처리한 후, 37℃ 배양기에서 2 일간 배양한 micro plate 의 각 well 의 용액을 현미경으로 관찰하여 *P. ovale* 의 증식 여부 및 형태 변화를 관찰하였고, 균의 형태 변화가 없고 증식되지 않는 시료의 가장 낮은 농도를 MIC 로 결정하였다.

## 6-2. 흡광도 측정

앞서 기술한 MIC Test 방법으로 처리한 후, 37°C 배양기에서 2 일간 배양한 micro plate 를 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 6-3. alamar Blue™의 변색관찰

앞서 기술한 MIC Test 방법으로 처리한 후, 37°C 배양기에서 2 일간 배양한 micro plate 의 각 well 에 PBS 를 사용하여 1:4 로 희석한 alamar Blue™을 30  $\mu$ l씩 주입한 후 육안으 로 색변화를 확인하여 균의 대사활성을 관찰하였고, 청색에서 분홍색으로의 색변화가 일 어나지 않는 시료의 가장 낮은 농도를 MIC 로 결정하였다.

## 6-4. alamar Blue™ 주입 후 흡광도 측정

앞서 기술한 MIC Test 방법으로 처리한 후, 37°C 배양기에서 2 일간 배양한 micro plate 의 각 well 에 PBS 를 사용하여 1:4 로 희석한 alamar Blue™을 30  $\mu$ l씩 주입한 후 570 nm와 600 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

## 7. Disk Diffusion test

Disk Diffusion test 는 기존에 발표된 시험 방법<sup>9)</sup>을 응용하였고, *P. ovale* KCTC 7546(=ATCC 12078) 균주를 *P. ovale* 액체 배지를 사용하여 37°C에서 48 시간 전배양하고, 이를  $10^{5-6}$ cfu/ml가 되도록 *P. ovale* 한천 배지에 접종하여 먼저 굳혀 놓은 Sabouraud Dextrose 한천 배지 위에 부어서 고체 평판 배지를 만들었다.

종이 디스크와 피부 디스크의 두께 및 무게가 동일한 것을 골라 70% ethanol 에 하룻 밤 담아 살균하였다. 여분의 ethanol 을 증발시켜 건조시키고, 건조된 디스크를 멸균 증류 수에 1 시간 담아 수화시켰다. 수화된 디스크는 멸균한 거름종이 사이에 넣어 물기를 제거한 후, 1/10 로 희석한 샴푸 시료에 디스크를 3 분 동안 담아 흡착시킨 후, 디스크를 흐르는 물(300 ml/min)에 20 초간 씻어내었다. 디스크를 거름종이 사이에 넣어 물기를 제거

한 후, *P. ovale* 가 접종되어 있는 고체 평판 배지에 올려 놓은 후 핀셋으로 밀착시켰다. 4℃에서 16~18 시간 확산 처리한 후, 37℃에서 2 일간 배양하고 저지대(Inhibition-zone)의 크기를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

본 연구에서는 *P. ovale* 에 대한 항균력을 측정하는 새로운 *in vitro* 방법을 개발하기 위하여, 균체가 증식함에 따라 흡광도의 변화가 일어나는 지시약을 이용하여 MIC 값을 측정하는 방법을 사용하여 기존의 *in vitro* 방법을 이용한 결과와 비교하는 실험을 수행하였다. 이를 위하여 *P. ovale* 증식 억제 효과가 있다고 알려진 두 가지의 물질, Zinc pyrithione 과 Climbazole 을 각각의 조성비를 달리하여 제작한 일곱 가지의 시료에 대하여 각각의 최소 발육 억제 농도(Minimum Inhibitory Concentration : MIC)의 측정을 시도하였다.

일반적으로 미생물이 배지 내에서 증식을 하면, 배지 내의 탁도가 증가하며, 이를 이용하여 가시광선 영역 근방에서의 흡광도를 측정함으로써 미생물의 증식 여부를 비교적 간단하게 확인할 수 있다. 그러나 *P. ovale* 의 경우 배지 자체의 탁도가 다른 배지에 비하여 매우 높다는 문제점 때문에, 원하는 결과를 얻어낼 수 없었다(Fig. 1a). 또한 실험에 사용한 시료에도 많은 종류의 입자들이 포함되어 있으므로 실험의 결과에 오차를 유발할 수 있고(Fig. 1b), 위에서 언급한 이유들로 인하여 UV-Spectrophotometer 를 이용하여 세포 증식 여부를 확인하는 것은 불가능하였다.

이를 해결하기 위하여 미생물의 대사 활성에 의하여 변색이 일어나는 alamar Blue™ 를 이용하여 *P. ovale* 의 증식을 확인하였다. alamar Blue™ 는 동물 세포, 세균, 곰팡이 등의 대사활성에 의하여 변색을 나타내는 지시약<sup>10), 11), 12)</sup>으로서, alamar Blue™ 가 포함된 배지 내에서 미생물이 증식을 하는 경우 환원되어, 분홍색( $\lambda_{max}=570\text{ nm}$ )을 나타내게 된다 (Fig. 2). 미생물이 증식하지 못하는 경우, 청색( $\lambda_{max}=600\text{ nm}$ )을 유지하게 되고, 각각의 색

에 대한  $\lambda_{\max}$  인 570 nm와 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 세포의 증식 여부를 판별할 수 있다. 환원된 형태의 alarmar Blue™( $\lambda_{\max}=570$  nm)와 산화된 형태의 alarmar Blue™( $\lambda_{\max}=600$  nm)는 약간의 간섭을 나타내므로, Ansar Ahmed 등이 제안한 바 대로<sup>13)</sup> 570 nm에서의 흡광도와 600 nm에서의 흡광도의 차를 계산하여 증식 여부를 판별할 수 있었다.(Fig. 3). 배지 내에 주입되는 미생물 농도가 alarmar Blue™의 변색에 미치는 영향을 확인한 결과, 약  $2.6 \times 10^5$  cfu/ml 이상의 농도로 *P. ovale*가 주입되는 경우 흡광도의 변화를 정확하게 관찰할 수 있었고(Fig. 3a), alarmar Blue™ 자체의 희석 배율이 1:1 ~ 1:4 인 경우 정확한 관찰이 가능하였다(Fig. 3b). 또한, 약  $2.6 \times 10^5$  cfu/ml 이상의 농도로 균체를 접종한 경우, 16 시간과 24 시간에 있어서 균체 접종 농도와 흡광도의 차에 대한 각각의 correlation factor가 0.9858, 0.9914를 나타내었다(Fig. 4a). 즉 약  $2.6 \times 10^5$  cfu/ml 이상의 농도로 균체를 접종하는 경우 세포의 농도와 alarmar Blue™의 변색이 시간에 관계없이 비교적 정량적인 관계를 지님을 확인할 수 있었다. alarmar Blue™가 균체의 증식에 미치는 영향은 alarmar Blue™ 원액을 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 순차적으로 희석하여 확인하였다. 가장 흔히 사용되는 alarmar Blue™의 희석 배율이 1:4 이므로, 1:1로부터 1:31까지의 희석 용액을 사용하여 실험한 결과 1:1의 희석 용액에서도 alarmar Blue™가 균체의 증식에 영향을 미치지 못함을 알 수 있었다. 또한 1:4 이상의 희석 용액을 사용하는 경우 16 시간과 24 시간에 있어서 희석 배율과 흡광도의 차에 대한 각각의 correlation factor가 약 0.9929, 0.9893을 나타내었다(Fig. 4b). 이러한 실험 결과를 이용하여 이후의 실험 조건을 결정할 수 있었다.

앞에서 언급한 조성을 지닌 7 종류의 시료에 대한 MIC 값을 결정하기 위하여 micro-plate reader 용 96-well plate에 각각의 시료를 순차적으로 희석하여 주입한 후, 약  $2.1 \times 10^6$  cfu/ml의 균체를 주입하였다. 각각의 96-well plate를 48 시간 동안 배양하고, alarmar Blue™를 주입한 후 시간에 따른 흡광도의 차를 측정하였다(Fig. 5a). alarmar Blue™를 주입한 후, 4 시간이 지나면서 흡광도의 변화가 일어나기 시작하였으며, 이후 특정 농도 이하의 시료를 주입한 well에서 흡광도의 차가 증가하기 시작하였다. alarmar Blue™를 주입한 후 24 시간이 지나면 7 종류의 시료에 대하여 이러한 흡광도의 차를 매우 확실히



관찰할 수 있었다(Fig. 5b). 균체가 증식하는 경우 흡광도의 차가 변화하게 되므로, 흡광도의 차가 변화하지 않는 가장 낮은 시료의 농도를 MIC로 결정하였으며, alamar Blue™를 주입한 후 24 시간 동안 배양한 well에 대한 흡광도의 차를 이용하여 각각의 시료에 대한 MIC 값을 계산하였다(Fig. 6).

위에서 얻어낸 결과를 확인하기 위해, 현미경을 이용하여 7 종류의 시료에 대한 MIC 값을 측정하였다(Fig. 7). 시료의 농도가 MIC 값보다 현저히 낮은 경우, *P. ovale*의 증식이 일어나며 균체의 형태 또한 정상적인 상태를 유지하였다(Fig. 7a). 시료의 농도가 MIC에 근접하면서 세포벽의 손상이 일어나기 시작하며(Fig. 7b), MIC 하에서는 세포 벽의 손상 이외에 균집을 이루는 균 수 자체도 현저히 감소하였다(Fig. 7c). MIC 이상의 농도에서는 정상적인 morphology를 지니는 균체가 사라지게 되며, 손상된 균체만이 존재하였다(Fig. 7d).

각각의 시료 농도에 대한 well을 모두 관찰하는 것은 불가능하므로, alamar Blue™에 의하여 결정한 MIC 값 주위의 세포 상태를 현미경으로 관찰하여 결과를 확인하였다. 현미경 관찰의 결과 위의 그림에 제시된 건강한 균체와 손상된 균체가 공존하는 well에서의 시료의 농도를 MIC로 결정하였고, 이렇게 결정한 MIC 결과는 alamar Blue™로부터 얻어낸 결과와 유사한 값을 나타내었다(data not shown).

위의 방법에 의하여 계산한 MIC 값을 기존에 발표된 방법인 skin-disk diffusion method (SDDM)를 이용하여 측정한 각 시료의 항균력과 비교하여 확인하였다(Fig. 8). SDDM 방법을 이용한 실험 결과 항균력에 있어서 alamar Blue™를 이용한 실험 결과와 거의 유사한 경향성을 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 alamar Blue™를 사용하는 경우, *P. ovale*에 대하여 항균력을 지니는 시료의 MIC 값을 매우 정확하게 결정할 수 있었다. 기존의 항균력 측정 방법으로 알려진 broth dilution method의 경우 앞에서 제시한 결과에서 볼 수 있듯이 시료나 배지 자체의 탁도로 인하여 균의 증식 여부를 확인 할 수 없다는 단점을 지니고 있다. 또한 disk diffusion method의 경우 시료의 확산에 의하여 생성되는 저해 지대의 직경을 측

정하여 항균력을 평가하는 방법이므로, 다양한 종류의 시료를 사용하여 항균력을 결정하는 경우 시료 자체의 확산 계수에 의하여 실험 결과에 오차가 발생할 수 있다. 본 논문에서 사용한 alarmar Blue™ 를 사용하여 MIC 를 측정하는 실험법의 경우 시료나 배지의 탁도에 크게 영향을 받지 않으며, 시료의 물리적인 성질에도 크게 영향을 받지 않는다는 장점을 지니고 있다. 또한, Micro-plate reader 를 사용함으로써 많은 종류의 시료에 대한 결과를 빠르고 정확하게 얻을 수 있다는 장점을 지니고 있다.

## 결 론

Resazurin(alarmar Blue™)을 이용하여 *in vitro* 에서 *Pityrosporum ovale* 의 최소 발육저지농도(Minimum Inhibitory Concentration ; MIC)를 측정함으로써 여러가지 조성의 항비듬제의 항비듬 효과를 측정하였다. 균체의 농도는 실험 조건 하에서 alarmar Blue™ 변색과 정량적으로 반응하였고, alarmar Blue™ 의 희석 배율도 균체의 성장에 영향을 미치지 않았다. Zinc pyrithione 과 Climbazole 의 혼합제에서 MIC 값을 측정한 결과, 현미경 관찰에 의한 MIC 측정법과 SDDM 법에 의한 항비듬 효과에 의한 결과와 유사한 경향성을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 alarmar Blue™를 사용한 *in vitro* 항비듬 효과 측정법은 시료나 배지의 탁도에 크게 영향을 받지 않으며, Micro-plate reader 를 사용함으로써 많은 종류의 시료에 대한 결과를 빠르고 정확하게 얻을 수 있다는 장점을 가져 향후 효율적인 *in-vitro* 항비듬 평가 방법으로 활용이 기대된다.

## 참 고 문 헌

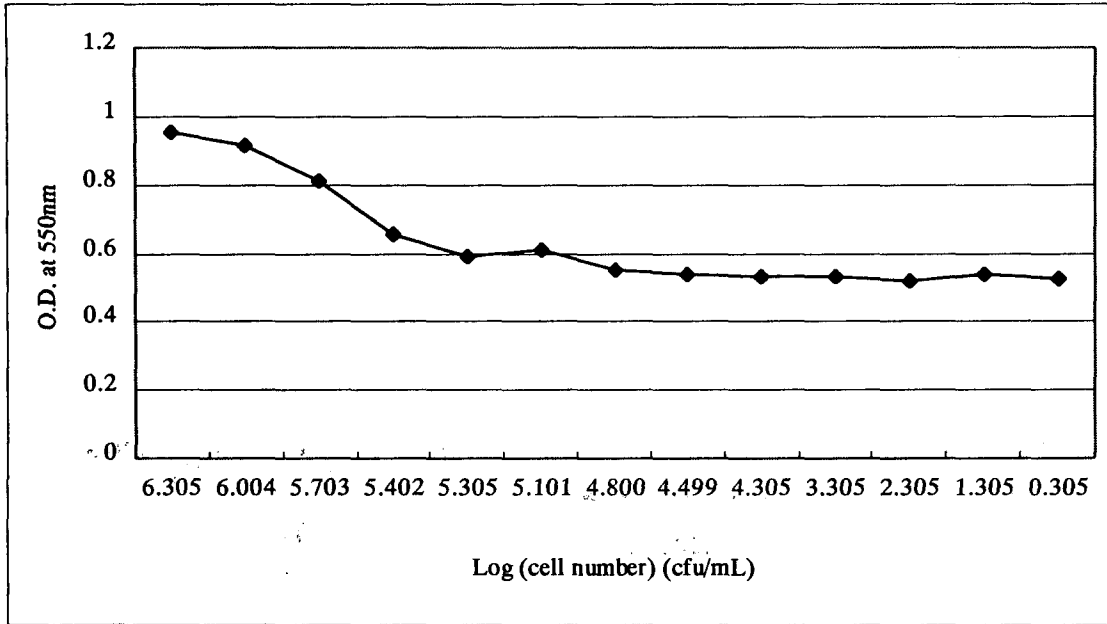
1. The Aetiology of Dandruff and the Mode of Action of Anti-dandruff Agents, 1984, Unilever Research Report
2. Piroctone Olamine—a versatile anti-dandruff agent, Skrypzak W., Reng A. K. and Futterer E.
3. CRINIPAN AD—an effective antidandruff agent, H&R

4. Schmidt A. and Ruhl-Horster B., *MYCOSES*, 1996, Vol. 39, 309-312
5. Ackerman A. B. and Kligman A. M., *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1969, Vol. 20, 81-101
6. Schmidt A. and Ruhl-Horster B., *Drug Res.*, 1996, Vol. 46(I), 4, 442-444
7. Imokaya G., Shimizu H. and Okamoto K. I., *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1982, Vol. 33, 27-37
8. McGrath J. and Murphy G. M. *Drugs*, 1991, Vol. 41, 178-184
9. 서경희, 신계호, 신문삼, 김종일, 서성환, *대한화장품학회지*, 1998, Vol. 24-1, 100-112
10. Nakayama G. R., Caton M. C., Nova M. P., Parandoosh Z., *Journal of Immunological Methods*, 1997, Vol. 204, 205-208
11. Davey K. G., Szekely A., Johnson E. M. and Warnock D. W., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1998, Vol. 42, 439-444
12. Breinholt V. and Larsen J. C., *Chem. Res. Toxicol.*, 1998, Vol. 11, 622-629 Ansar Ahmed S., Gogal R. M. Jr., Walsh J. E., *J. Immunol. Methods*, 1994, Vol. 170, 211-224

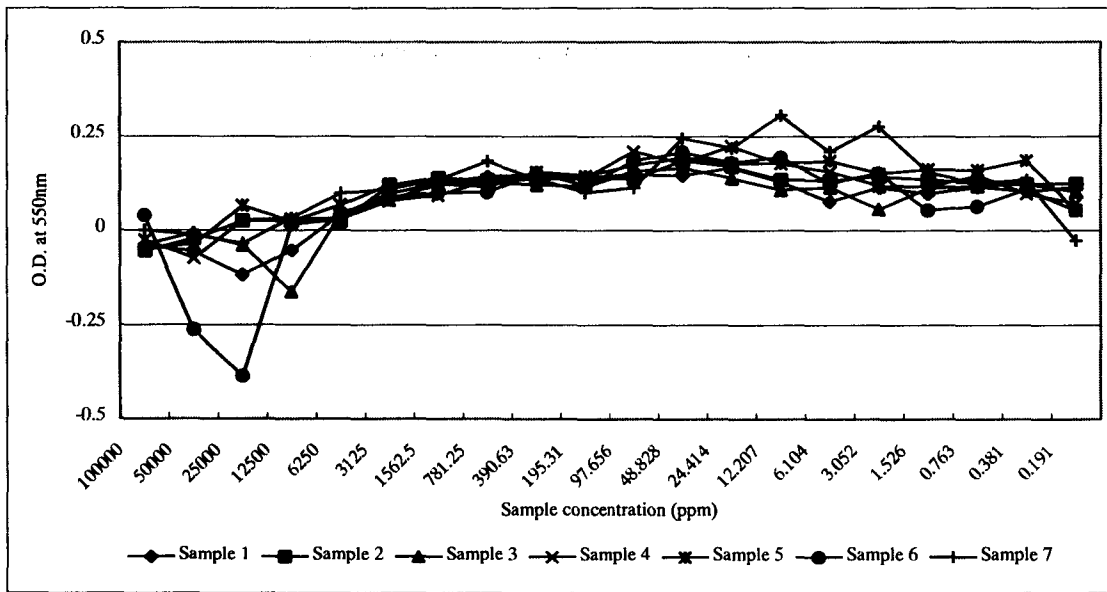
Table 1. 시료 내역

		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7
항비듬제	ZPT <sup>1</sup> (%)	1.00	0.75	0.67	0.50	0.33	0.25	0.00
	CAD <sup>2</sup> (%)	0.00	0.25	0.33	0.50	0.67	0.75	1.00

<sup>1</sup>ZPT : Zinc pyrithione, <sup>2</sup>CAD : Climbazole



a)



b)

Fig. 1.  $A_{550nm}$  of *P. ovale* grown in broth without samples (a) and with samples of various concentration (b) for 48 hours. Sample descriptions are noted in the text.

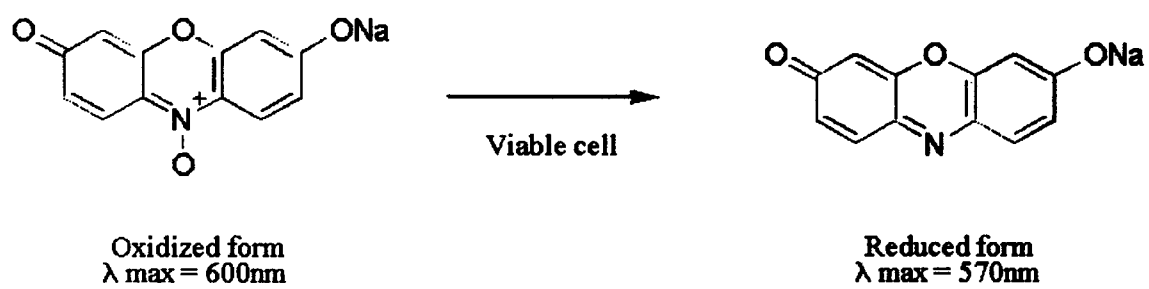
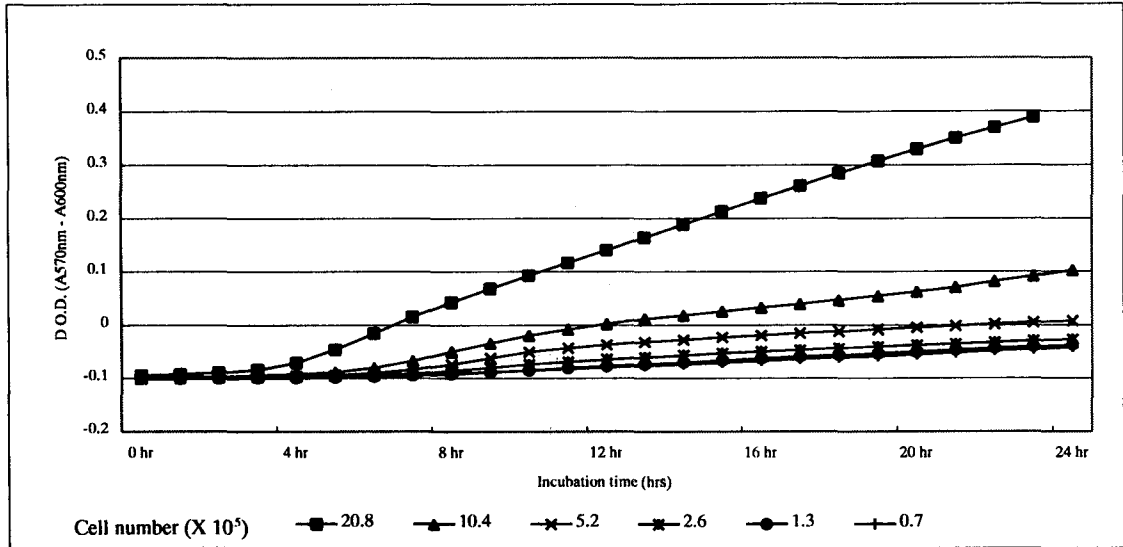
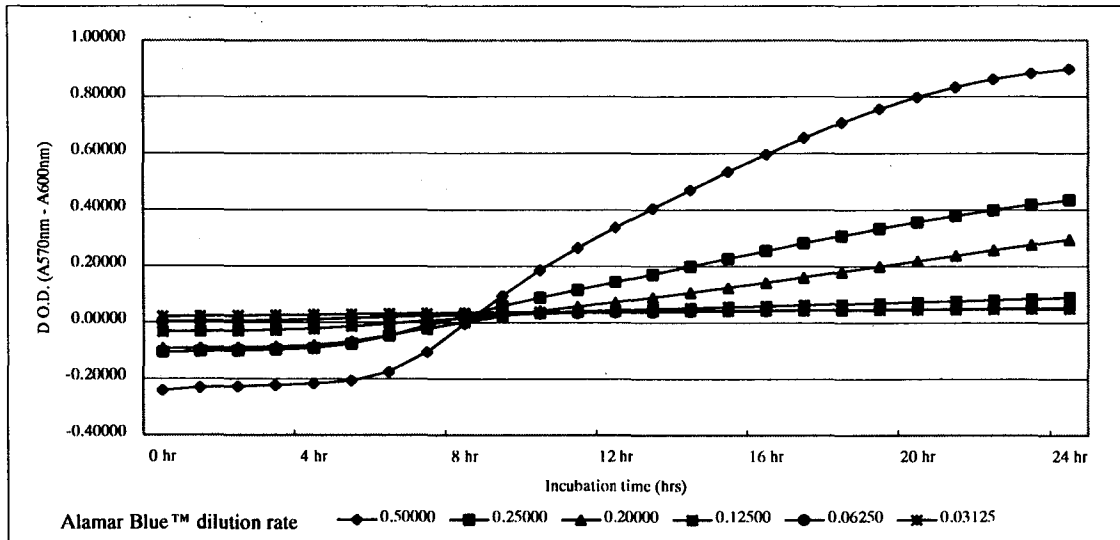


Fig. 2. Schematic diagram of alamar Blue™ reduction reaction in living cell.

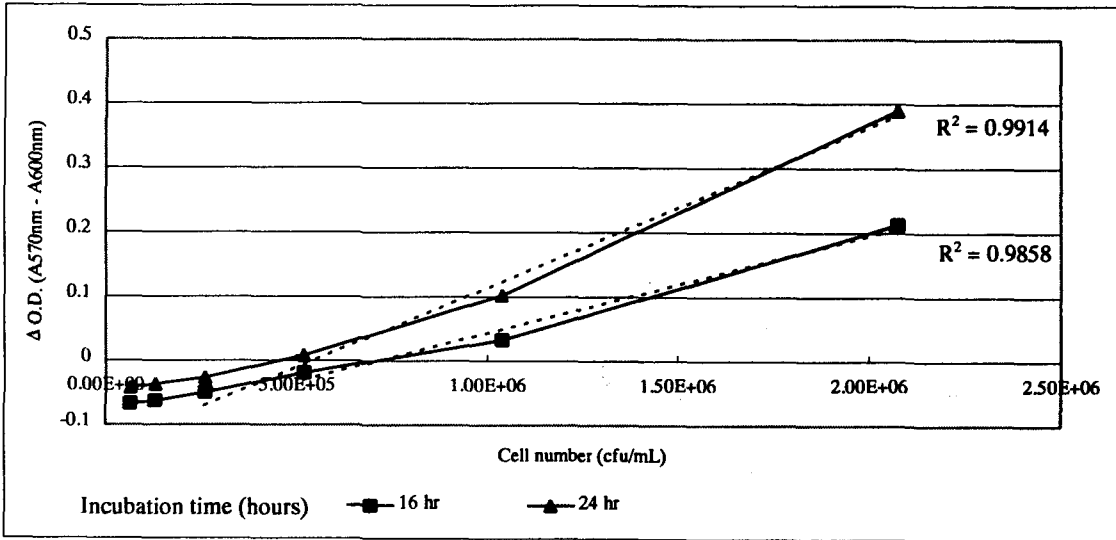


a)

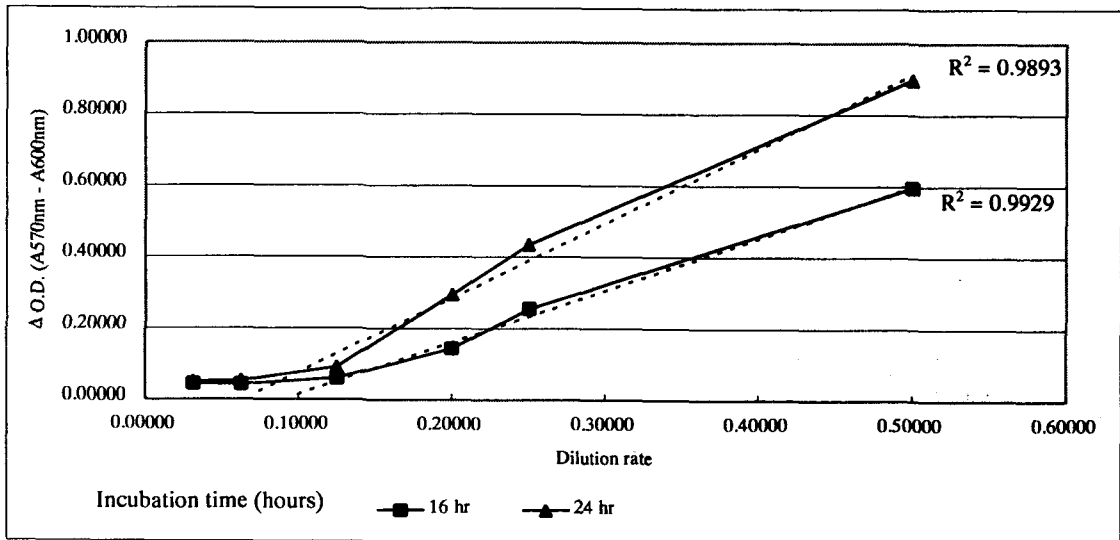


b)

Fig. 3. O.D. change of alamar Blue™ incubated with various cell density and fixed alamar Blue™ dilution rate (1:4) (a), with fixed cell density (2.075 X 10<sup>6</sup> cfu/mL) and various alamar Blue™ dilution rate.



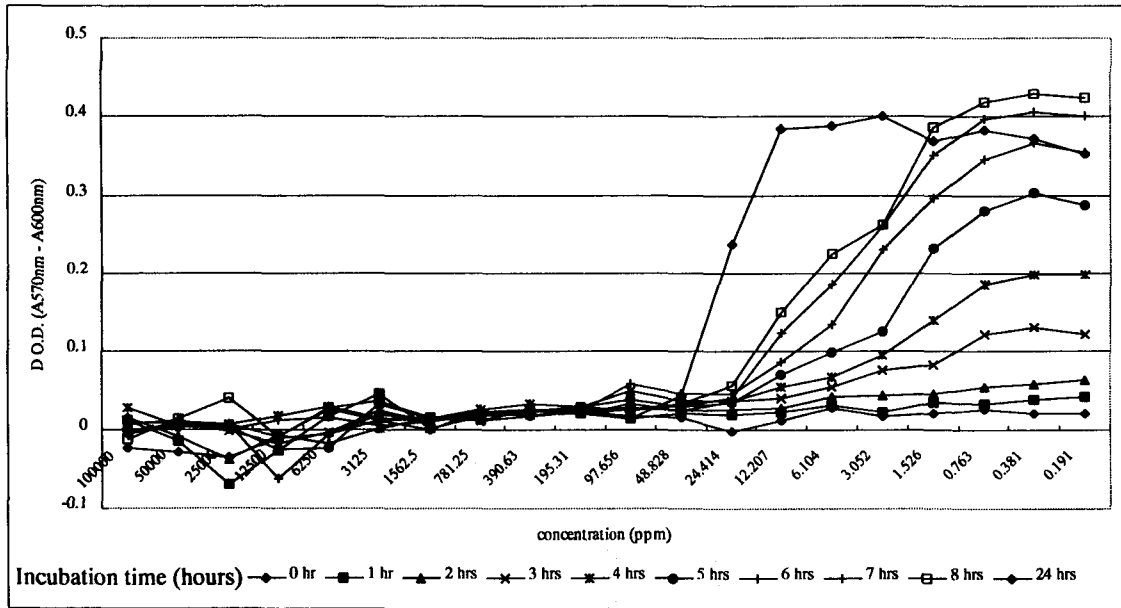
a)



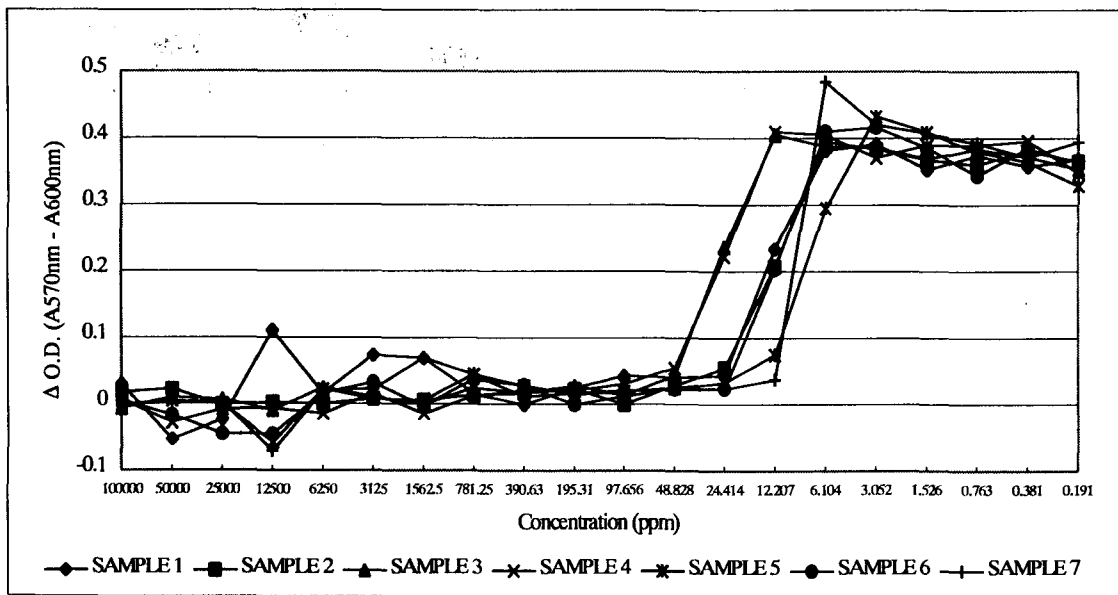
b)

Fig. 4. Effect of cell number (a) and dilution rate of alamar blue™ (b) on the color change of alamar Blue™





a)



b)

Fig. 5. alamar Blue™ absorbance change with incubation time in sample 3 (a) and comparison of alamar Blue™ absorbance with various sample concentration at 24 hours (b).

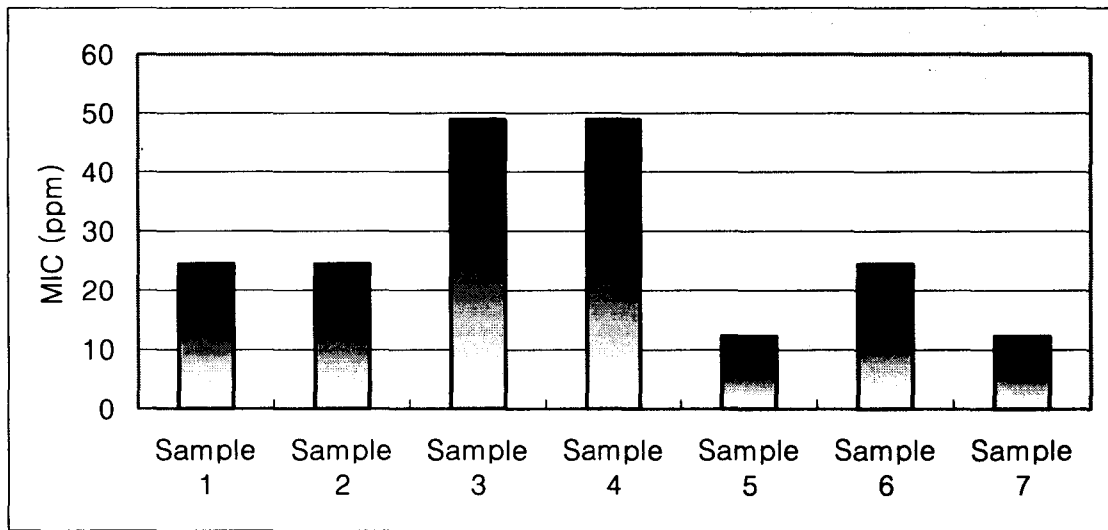
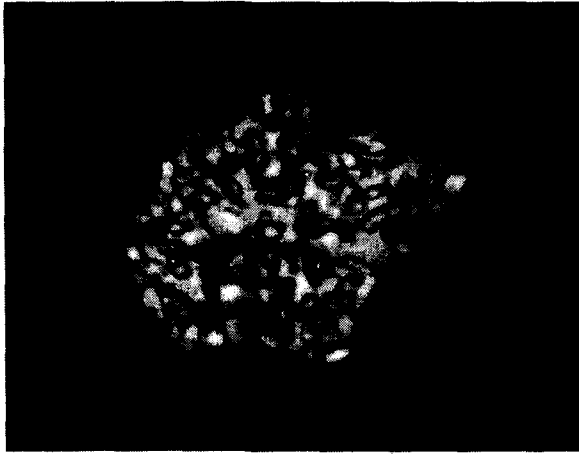
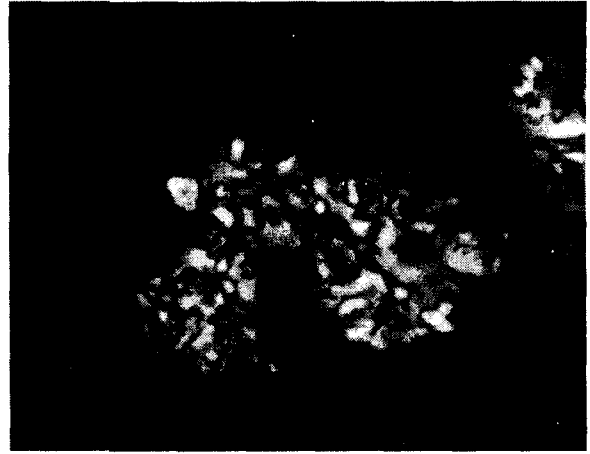


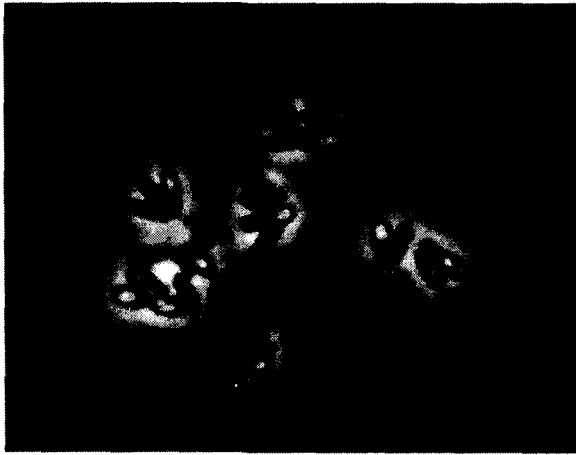
Fig. 6. MIC value determined using alamar Blue™



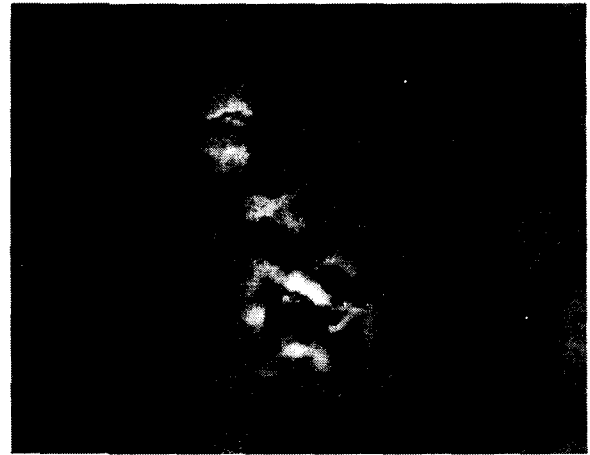
a)



b)



c)



d)

Fig. 7. MIC determination using Microscope. a) normal cell at low sample concentration, b) slightly inhibited cell at MIC point, c) inhibited cell, d) severely inhibited cell at high sample concentration

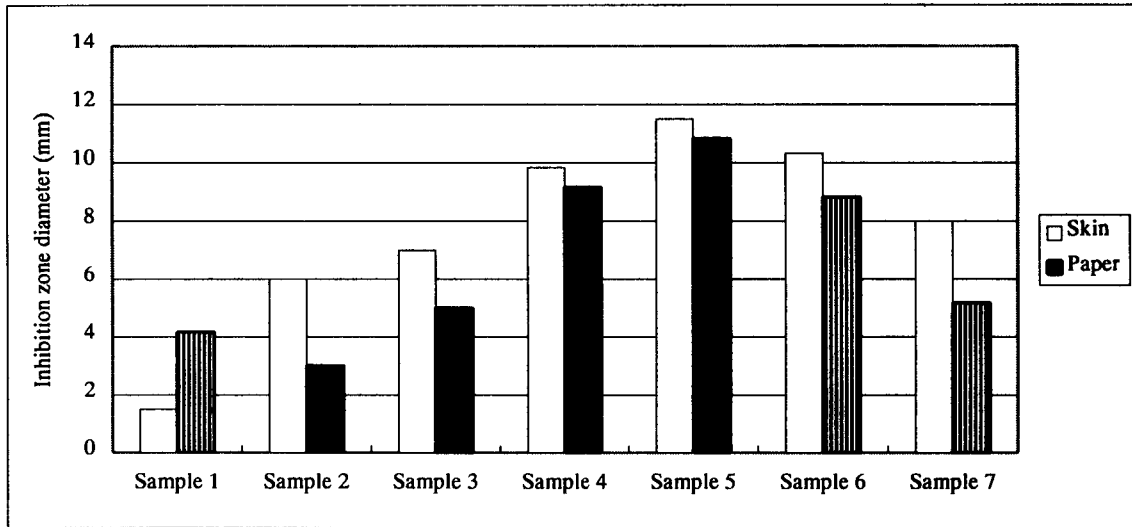


Fig. 8. Anti-fungal effects of various samples