

ฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของลิโมนีนนาโนอิมัลชัน

นางสาวชญาดา โกวิทวงศ์  
นางสาวสรารัตน์ จันทบุรณันท์

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล  
พ.ศ. 2555

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LIMONENE  
NANOEMULSION

MISS CHAYADA KOWITTHAWONG  
MISS SARARUT CHANTHABURANUN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE BACHELOR DEGREE OF SCIENCE IN PHARMACY  
FACULTY OF PHARMACY  
MAHIDOL UNIVERSITY

2012

โครงการพิเศษ  
เรื่อง ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของลิโมนีนนาโนอิมัลชัน

.....  
(นางสาวชญาดา โกวิทวงศ์)

.....  
(นางสาวสรารัตน์ จันทบูรานันท์)

.....  
(อ.ดร. จตุรงค์ ประเทืองเดชกุล)  
อาจารย์ที่ปรึกษา

.....  
(รศ.ดร.สาธิต พุทธิพิพัฒน์ขจร)  
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

.....  
(ผศ.ดร. วิณา นุฎการ)  
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

## บทคัดย่อ

### ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของลิโมนีนนาโนอิมัลชัน

ชญาดา โกวิทวงศ์, สวรรค์รัตน์ จันทบุรานันท์

**อาจารย์ที่ปรึกษา :** จตุรงค์ ประเทืองเดชกุล\*, สาทิต พุทธิพิพัฒน์ขจร\*\*, วิดีมา นุกูลการ\*\*\*

\*ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

\*\*ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

\*\*\*ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

**คำสำคัญ :** ลิโมนีน, ลิโมนีนนาโนอิมัลชัน, ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

ลิโมนีนเป็นน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากผลตระกูลส้ม ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (Minimum inhibitory concentration; MIC) ของแบคทีเรียของลิโมนีนมีค่าค่อนข้างสูง เนื่องจากลิโมนีนมีขีดการละลายน้ำต่ำ จุดมุ่งหมายของโครงการพิเศษนี้คือพัฒนาตำรับลิโมนีนนาโนอิมัลชันเพื่อเพิ่มการละลาย ผลจาก Phase diagram พบว่าระบบลิโมนีนนาโนอิมัลชันที่เหมาะสม ประกอบด้วยลิโมนีน 10% w/w และสารก่ออิมัลชัน (Cremophor EL:propylene glycol 2:1) 35% w/w ความคงตัวของกายภาพของลิโมนีนนาโนอิมัลชัน คือมีความใสและเป็นเนื้อเดียวกันในระหว่าง 20 วันที่ทดสอบ ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 22.59 nm ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Broth microdilution พบว่าทั้งลิโมนีนนาโนอิมัลชันและลิโมนีนที่ความเข้มข้นสุดท้าย 4000 µg/ml ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 Methicillin-Resistance *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 อย่างไรก็ตาม ลิโมนีนและลิโมนีนนาโนอิมัลชันให้ฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* JE 6617 ที่ค่า MIC เท่ากับ 4000 µg/ml และ 2000 µg/ml ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ของ *E. coli* JE 6617 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลิโมนีนนาโนอิมัลชันจะเรียงต่อเป็นสายยาวเป็นจำนวนมาก ขณะที่เซลล์ *E. coli* JE 6617 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีและไม่มีลิโมนีนจะเรียงตัวเป็นสายยาวที่น้อยกว่าและอยู่กระจายตัวแบบเดี่ยวๆ ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรีนี้นี้ยังพบได้ในการเลี้ยง *E. coli* ATCC 25922 สรุปคือลิโมนีนนาโนอิมัลชันช่วยเพิ่มฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบและยังส่งเสริมการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรียด้วย

## Abstract

### Antibacterial activity of limonene nanoemulsion

Chayada Kowitthawong, Sararut Chanthaburanun

**Project advisor:** Jaturong Pratuangdejkul\*, Satit Puttipipatkachorn\*\*, Veena Nukoolkarn\*\*\*

\*Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

\*\*Department of Manufacturing Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

\*\*\*Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

**Key word:** limonene, limonene nanoemulsion, antibacterial

Limonene, the essential oil extracted from citrus fruits, shows an antibacterial effect against Gram-positive and Gram-negative bacteria. However, the minimum inhibitory concentration (MIC) value of limonene is commonly high because it's slightly soluble in water. The aim of this special project was to formulate limonene nanoemulsion for improving solubility. According to phase diagram, the optimal nanoemulsion consisted of 10% w/w limonene and 35% w/w emulsifier (Cremophor EL:propylene glycol 2:1). For stability, limonene nanoemulsion was transparent and homogenous during 20 days of testing. The average particle diameter was 22.56 nm. Antibacterial activity was assayed using broth microdilution method. At a final concentration of 4000 µg/ml, limonene and limonene nanoemulsion showed no antibacterial effect against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, Methicillin-Resistance *S. aureus* (MRSA) DMST 20654, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Nevertheless, limonene and limonene nanoemulsion showed antibacterial activity toward *E. coli* JE 6617 with the MIC value of 4000 µg/ml and 2000 µg/ml, respectively. The microscopic cellular morphology of *E. coli* JE cultured in medium with limonene nanoemulsion was highly filamentous, while those cultured in medium with and without limonene were less filamentous and separately single, respectively. These morphological changes were also found in *E. coli* ATCC cultures. In conclusion, our limonene nanoemulsion can improve antibacterial activity against the tested *E. coli* strain and also promote inhibition of bacterial cell division.