ฤทธิ์ต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ทัยป์ 2 ของสารสกัดสมุนไพรไทยบางชนิด

นางสาวสกุลรัตน์ รัตนาเกียรติ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1337-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20473102

ANTI-HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2 ACTIVITY OF SOME THAI MEDICINAL PLANT EXTRACTS

Miss Sakulrat Rattanakiat

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Microbiology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-1337-1

Thesis Title	ANTI-HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2 ACTIVITY OF SOME THAI MEDICINAL PLANT EXTRACTS
By	Miss Sakulrat Rattanakiat
Field of Study	Microbiology
Thesis Advisor	Assistant Professor Mali Wirotesangthong, 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

Boonyong Tantisira .....Dean of Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph. D.)

THESIS COMMITTEE

Pintip Pongpech ..... Chairman

(Associate Professor Pintip Pongpech, Ph. D.)

Mali Wirotesangthong ..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Mali Wirotesangthong, Ph.D.)

Rutt Suttisri ..... Member

(Assistant Professor Rutt Suttisri, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวสกุลรัตน์ รัตนาเกียรติ์ : ฤทธิ์ต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ทัยป์ 2 ของสารสกัดสมุนไพรไทยบางชนิด. ANTI-HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2 ACTIVITY OF SOME THAI MEDICINAL PLANT EXTRACTS อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. มะลิ วิโรจน์แสงทอง, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์, 78 หน้า ISBN 974-17-1337-1

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือการคัดกรองฤทธิ์ต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ทัยป์ 2 สายพันธุ์ Baylor 186 (HSV-2 strain Baylor 186) ของสารสกัดหยาบของสมุนไพรไทย 17 ชนิด เปรียบเทียบกับฤทธิ์ของอะซัยคลอเวียร์ โดยวิธี plaque reduction assay ซึ่งทำการทดสอบ 3 แบบ ได้แก่ inactivation, pre-treatment และ post-treatment จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบส่วนใหญ่ (79 จาก 90 fractions) ของพืชทั้งหมดที่นำมาศึกษามีฤทธิ์ต้าน HSV-2 โดยมีค่า ED_{50} (effective dose ที่ยับยั้งการเจริญของไวรัส 50%) น้อยกว่าค่า CD_{50} (cytotoxic dose ที่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง 50%) ซึ่งการทดสอบแบบ inactivation ให้ผลดีที่สุด ในการประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้าน HSV ของสารสกัดหยาบพิจารณาจากค่า selective index (SI) มากกว่า 10 ในการทดลองนี้สารสกัดหยาบที่คาดว่ามีประสิทธิภาพได้จาก 28 fractions ของพืช 11 ชนิด ได้แก่ F1 (ethanol fraction), F2 (hexane fraction) ของเสลดพังพอน; F3 (aqueous-ethanol fraction), F4 (ethyl acetate fraction), F5 (aqueous-ethyl acetate fraction) ของเงาะ ; F1, F3, F4 ของลิ้นงูเห่า; F1, F3, F5 ขององุ่น; F1, F5 ของรางจืด; F3, F4, F5 ของลูกใต้ใบ; F2, F3, F5 ของหญ้าหนวดแมว; F1, F3, F4 ของเอื้องดิน; F3, F4, F5 ของมะกา; F4 ของพญายอ; และ F1, F5 ของเพชรสังฆาต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา
สาขาวิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2545

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

4376629833 : MAJOR Microbiology

KEY WORD: Herpes simplex virus type 2/Crude extracts/Antiherpes simplex virus activity/ Medicinal plants/Plaque reduction assay

SAKULRAT RATTANAKIAT : THESIS TITLE. ANTI-HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2 ACTIVITY OF SOME THAI MEDICINAL PLANT EXTRACTS. THESIS ADVISOR : Assistant Professor MALI WIROTESANGTHONG, Ph.D., THESIS COADVISOR : Associate Professor VIMOLMAS LIPIPUN, Ph.D., 78 pp. ISBN 974-17-1337-1

The purpose of this study was to screen for antiviral activity of seventeen Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 2 (HSV-2) strain Baylor 186 compared with that of acyclovir using plaque reduction assay (PRA) including inactivation, pre-treatment and post-treatment. In this study, most of crude extracts (79 of 90 fractions), of the selected plants exhibited positive activity [median effective dose (ED_{50}) < median cytotoxic dose (CD_{50})]. The most successful treatment in PRA has inactivation. The efficacy of anti-HSV- activity was evaluated by using selective index (SI). Based on the SI > 10, there were 28 fractions, 11 plants including *Barleria lupulina*, F1 (ethanol fraction), F2 (hexane fraction); *Nephelium lappaceum* F3 (aqueous-ethanol fraction), F4 (ethyl acetate fraction), F5 (aqueous-ethyl acetate fraction); *Clinacanthus siamensis*, F1, F3, F4; *Vitis vinifera*, F1, F3, F5; *Thunbergia laurifolia*, F1, F5; *Phyllanthus amarus*, F3, F4, F5; *Orthosiphon aristatus*, F2, F3, F5; *Costus speciosus*, F1, F3, F4; *Bridelia ovata*, F3, F4, F5; *Clinacanthus nutans,* F4; and *Cissus quadrangularis,* F1, F5.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department/Program Microbiology Student's signature Sakulrat Rattanakiat

Field of study Microbiology Advisor's signature Mali Wirotesangthong

Academic year 2002

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my infinite gratitude and deep appreciation to my thesis advisor, Assistant Professor Dr. Mali Wirotesangthong for their guidance, suggestion, kindness and encouragement throughout my research study. They are always stand beside me to help, consult and advise me in every way that would bring me success and great development.

I would like to express my sincere gratitude and deep appreciation to Associate Professor Dr. Pintip Pongpech, Assistant Professor Dr. Rutt Suttisri and Associate Professor Dr. Vimolmas Lipipun for their kindness and helpful suggestion for the completion of this thesis.

I also would like to express my thanks to all stuff in the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their kindness and help during my study.

My financial support was provided by the University Developing Commissions (UDC) of Mahasarakham University and a teaching assistantship of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.

The budget of this study was supported by a research budget of Ministry of University Affairs and a supporting fund of the Graduate School, Chulalongkorn University.

I wish to express my sincere appreciation to the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for providing facilities during my study.

My sincere gratitude is also given to my friends for their great love, understanding, assistance, and encouragement throughout this graduate study.

Finally, special gratitude is extended to my dear parents and my sister for their love, understanding, helpful and continuous support all my life.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI).....iv

ABSTRACT (ENGLISH).....v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....viii

LIST OF FIGURES.....ix

LIST OF ABBREVIATIONS.....x

CHAPTER I INTRODUCTION.....1

CHAPTER II LITERATURE REVIEWS.....11

CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.....33

CHAPTER IV RESULTS.....39

CHAPTER V DISCUSSION.....51

CHAPTER VI CONCLUSION.....55

REFERENCES.....56

APPENDIX.....73

BIOGRAPHY

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table

Page

1. List of plants with antiherpes simplex activities 5
2. *In vitro* antiviral screening assays 24
3. Plant materials used in this study..... 34
4. *In vitro* median cytotoxic dose (CD_{50}) of medicinal plant extracts 41
5. *In vitro* median effective dose (ED_{50}) of medicinal plant extracts.....43
6. Selectivity index (SI) [CD_{50} / ED_{50}]..... 45
7. Active extracts with SI >10 47
8. Percent yield of crude extracts..... 48
9. Example of data arrangement for calculation of CD_{50} from extract by Reed-Muench.....76

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Diagram of a virion of herpes simplex virus	14
2	Sequence of events in the multiplication of herpes simplex virus	15
3	Acyclovir inhibition of viral DNA synthesis	28
4	Extraction scheme of medicinal plants extraction	36

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

ACV	acyclovir
AIDS	autoimmune deficiency syndrome
AMP	adenosine monophosphate
araA	vidarabine
BVDU	brivudin
^0C	degree centigrade
CD_{50}	median cytotoxic dose
CO_2	carbondioxide
cm	centimeter
CMV	cytomegalovirus
CPE	cytopathic effect
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytosine triphosphate
dGTP	deoxyguanosine 5'-triphosphate
diam	diameter
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
EBV	Epstein-Barr virus
EC_{50}	median effective concentration
ED_{50}	median effective dose
EDTA	ethylene diamine tetra acetate
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPTT	end point titration technique
EtOH	ethanol
F1	ethanol extract
F2	hexane extract
F3	aqueous-ethanol extract
F4	ethyl acetate extract
F5	aqueous-ethyl acetate extract
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FBS	fetal bovine serum
GCV	ganciclovir
gp	glycoprotein
h or hr	hour
H_2O	water
HHV	human herpesvirus
HIV	human immunodeficiency virus
HPMP	3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl
HPMPA	3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl adenine
HPMPC	3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl cytosine
HSV	herpes simplex virus
IC_{50}	median inhibitory concentration
ICP	infected cell polypeptide
ICSP	infected cell specific polypeptide
ICTV	International Conference for Taxonomy of Viruses
ID_{50}	median inhibitory dose
Ig	immunoglobulin
kg	kilogram
l	litre

LIST OF ABBREVIATIONS (continued)

LDL	low density lipoprotein
m	meter
MEM	Minimum Essential Medium
mg	milligram
µg	microgram
µl	microliter
µM	micromolar
min	minute
ml	milliliter
mm	millimeter
mo	month
MOI	multiplicity of infection
NA	no activity in subcytotoxic concentration or 1,000 µg/ml
ND	not determined
NI	not indicated
nm	nanometer
PAA	phosphonoacetic acid
PBS	phosphate buffered saline solution
PCV	penciclovir
PFA	phosphonoformic acid; foscarnet
PFU	plaque forming unit
PME	phosphonylmethoxyethyl
PMEA	phosphonylmethoxyethyl adenine
PMEDAP	phosphonylmethoxyethyl 2,6-diaminopurine
PT	plaque test
PVP	polyvinyl pyrrolidone
RNA	ribonucleic acid
rpm	round per minute
TCD50	50% tissue culture dose end point test
TI	therapeutic index
TK	thymidine kinase
TTP	ribothymidine 5'-triphosphate
USA	United State of America
VZV	varicella-zoster virus

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย