

Thesis Title Inhibition of Herpes Simplex Virus Activity *In vitro*
by Some Medicinal Plant Extracts

Author Miss Praty Chaliewchalad

Degree Doctor of Philosophy (Applied Microbiology)

Thesis Advisory Committee Asst. Prof. Dr. Yingmanee Tragoolpua Advisor
Asst. Prof. Dr. Sunee Chansakaow Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Narumol Thongwai Co-advisor

ABSTRACT

Herpes simplex virus (HSV) infection is a common disease in Thailand and has tendency to increase. HSV can infect several areas such as lips, genital skin and other areas. The disease is not entirely cured and it can be transmitted to other people. Synthetic antiherpes simplex virus agents are quite expensive and resistant virus strains may emerge after long-term treatment. Thus, the natural extracts are an alternative choice for treatment of the disease.

Anti-HSV activity of 23 medicinal plants that were used in primary health care to treat general diseases were investigated in this research. The plants were extracted with water and 95% ethanol and tested for toxicity on Vero cell by cell viability assay. The result revealed that 50% cytotoxicity doses ranging from

20.1-5,677 µg/ml. Aqueous extract of *Stemona tuberosa* Lour. showed the lowest toxicity while ethanolic extract of *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall. ex Nees had the highest toxicity. Then, nontoxic concentrations of extract were used to test against HSV-1F and HSV-2G by plaque reduction assay. It was found that *Eclipta prostrata* (L.) L., *Houttuynia cordata* Thunb., *Stemona tuberosa* Lour., *Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz and *Sphenodesme* sp. extracts showed the highest anti-HSV against both types of HSV. These plants were selected to study anti-viral effect on various stage of HSV infection.

Inactivation kinetic of HSV particles found that all of five plant extracts could destroy both types of HSV particles. Especially, ethanolic extract of *E. prostrata*, *H. cordata* and *Sphenodesme* sp. could inactivate viral particle within 5 minutes after incubation with virus. Ethanolic extract of *S. tuberosa* and *Sphenodesme* sp. demonstrated highest protection of HSV-1F and HSV-2G attachment to the cell. Moreover, the ethanolic extract of *Sphenodesme* sp. extract showed inhibition on both types of HSV during viral attachment, and after viral attachment. Ethanolic extract of *Sphenodesme* sp. also showed the highest inhibition on viral replication at 30 hours post infection. Five crude extracts also expressed the potent inhibitory effect against viral DNA and protein synthesis especially ethanolic extract of *E. prostrata* and *Sphenodesme* sp. that showed that highest efficacy.

Hence, ethanolic extracts of *E. prostrata* and *Sphenodesme* sp. plant extracts were selected to further fractionate in order to determine the chemical composition.

The result showed that ethanolic extract of *E. prostrata* and K101 fraction composed of tannin, flavonoid and phenolic compound whereas ethanolic extract of

Sphenodesme sp. and P107 fraction showed the presence of tannin and phenolic compound. Moreover, ethanolic extract of *Sphenodesme* sp. composed of 1,2-benzenediol, methoxy phenol, isoeugenol, phenyl propanol, propanamide, lidocaine and ester of palmitic acid when determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

Therefore, herbal gel containing ethanolic extract of *Sphenodesme* sp. was developed in order to test anti-HSV effect and stability test of this herbal gel was also performed. It was found that, although the herbal gel was changed their physical properties when storage at 4, 25 and 45°C, the herbal gel also retained the anti-viral effect against both types of HSV by 100% after 7 months of storage.

Moreover, anti-HSV activity of the herbal gel were also retained after 6 cycles of heating-cooling from storage of 4°C for 48 hours and 45°C for 48 hours.

Moreover, the herbal gel did not cause any irritation on skin of volunteers. Therefore, the knowledge from this study will be applied for development of anti-HSV agent from potential medicinal plants in the future.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การยับยั้งการทำงานของเชื้อไวรัสก่อโรคเริมในหลอด
ทดลองโดยสารสกัดสมุนไพรบางชนิด

ผู้เขียน

นางสาวปรัชญา เกลียวฉลาด

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. ยิ่งมณี ตระกูลพั้ว

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ผศ. ดร. สุนีย์ จันทร์สกา

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ผศ. ดร. นฤมล ทองไว

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

โรคติดเชื้อไวรัสเริมเป็นโรคที่พบได้บ่อยในเมืองไทยและมีแนวโน้มมากขึ้น เชื้อก่อโรคเริมก่อให้เกิดการติดเชื้อได้หลายบริเวณ เช่น ริมฝีปาก และอวัยวะเพศ รวมทั้งผิวหนังบริเวณอื่นๆ โรคเริมไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้จึงสามารถแพร่กระจายไปสู่ผู้อื่น ด้วยสาเหตุที่ที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมยังคงมีราคาค่อนข้างแพง และเมื่อใช้ขาดต่อกันเป็นระยะเวลานานทำให้เกิดปัญหาการดื้อยา ดังนั้นสารสกัดธรรมชาติจากพืชจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรค

การยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมของพืชสมุนไพร 23 ชนิดซึ่งใช้ในการดูแลสุขภาพในเบื้องต้นสำหรับการรักษาโรคทั่วไปได้ทำการศึกษาในการวิจัยครั้งนี้ พืชสมุนไพรถูกสกัดด้วยน้ำ และเอทานอล 95% และการทดสอบความเป็นพิษต่อ Vero Cell ด้วยวิธี Cell viability assay ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดที่มีค่าความเข้มข้นซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ 50% อยู่ในช่วง 20.1-5,677 $\mu\text{g/ml}$ โดยสารสกัดน้ำของหนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa*) มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำสุด ในขณะที่สารสกัดเอทานอลของฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) แสดงค่าความเป็นพิษ

สูงสุด จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์มาทำการทดสอบการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเรณูชนิดที่ 1 และ 2 โดยวิธี plaque reduction assay และพบว่าสารสกัดจากกระเม็ง (*Eclipta prostrata*) พลูดาว (*Houttuynia cordata*) หนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa*) ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) และอ้อสะพายควาย (*Sphenodesme* sp.) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดได้สูงสุด จึงคัดเลือกสารสกัดจากพืชเหล่านี้มาทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสในขั้นตอนต่างๆของการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเรณู

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งอนุภาคไวรัสโดยตรงพบว่า สารสกัดพืชทั้ง 5 ชนิด สามารถทำลายอนุภาคเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดได้ โดยเฉพาะสารสกัดเอทานอลของกระเม็ง พลูดาว และอ้อสะพายควายสามารถทำลายอนุภาคไวรัสได้ตั้งแต่ 5 นาทีหลังจากการบ่มกับเชื้อไวรัส สารสกัดเอทานอลของสารสกัดหนอนตายหยากและอ้อสะพายควายสามารถป้องกันเชื้อไวรัสก่อโรคเรณูชนิดที่ 1 และ 2 ในการเกาะติดกับผิวเซลล์ได้สูงสุด นอกจากนี้เมื่อบ่มสารสกัดเอทานอลของอ้อสะพายควายระหว่างที่ไวรัสเกาะติด และภายหลังเกาะติดกับเซลล์ พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด สารสกัดเอทานอลของอ้อสะพายควายสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้สูงสุด ที่เวลา 30 ชั่วโมงหลังจากการติดเชื้อ สารสกัดหยาบทั้ง 5 ชนิดแสดงผลการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะสารสกัดเอทานอลของกระเม็งและอ้อสะพายควาย แสดงประสิทธิภาพสูงสุด

ดังนั้นสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรอ้อสะพายควายและกระเม็งจึงถูกคัดเลือกเพื่อนำไปสกัดแยกส่วนเพื่อตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของสารสกัด โดยพบว่าสารสกัดเอทานอลของกระเม็งและสารสกัดกิ่งบริสุทธิ์ K101 ประกอบด้วย แทนนิน ฟลาโวนอยด์ สารกลุ่มฟีนอลิก ส่วนสารสกัดเอทานอลของอ้อสะพายควายและสารสกัดกิ่งบริสุทธิ์ P107 ประกอบด้วย แทนนิน และสารกลุ่มฟีนอลิก นอกจากนี้เมื่อตรวจองค์ประกอบของสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรอ้อสะพายควายด้วยวิธี Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบว่าประกอบด้วย 1,2-benzenediol, methoxy phenol, isoeugenol, phenyl propanol, propanamide, lidocaine และ ester of palmitic acid

ดังนั้นจึงได้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เจลที่มีส่วนผสมของสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรอ้อสะพายควายเพื่อทดสอบผลการต้านเชื้อไวรัสก่อโรคเรณู และทำการทดสอบความคงตัวของเจล

โดยพบว่า แม่เจลสมุนไพรมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพเมื่อเก็บเจลไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45°C เจลสมุนไพวยังคงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดได้ 100% หลังจากการเก็บรักษา 7 เดือน และฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัสของเจลสมุนไพวยังคงอยู่หลังจากกระบวนการให้ความร้อน และทำให้เย็นจำนวน 6 รอบ จากการเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่าเจลสมุนไพรมีก่อให้เกิดอาการระคายเคืองบริเวณผิวหนังของอาสาสมัคร ดังนั้นความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์เพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มจากพืชสมุนไพรมีศักยภาพในอนาคต