

ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเฮอริปส์ซิมเพล็กซ์ทัยปี 2 ของสารสกัดจาก  
ดินเปิดน้ำ สำปะหลุย เนียมหูเสือ ฟันกระต่าย และ รำเพย

นางสาวอภิษฎา รัศมี



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์  
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-639-583-1

สถาบันวิทยบริการ  
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title           Antiviral activity against herpes simplex virus type 2 of extracts  
from *Cerbera odollam* Gaertn., *Clausena excavata* Burm. F.,  
*Coleus amboinicus* Lour., *Phyla nodiflora* (L.) Greene. and  
*Thevetia peruviana* Schum.

By                       Miss Apisda Rasmi

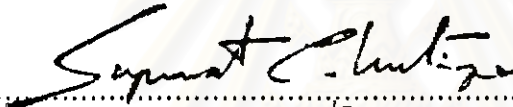
Inter-Department    Medical Microbiology

Thesis Advisor       Associate Professor Dr. Vimolmas Lipipun

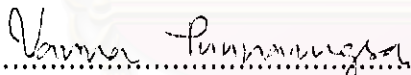
Co-Advisor           Assistant Professor Dr. Thitima Pengsuparp

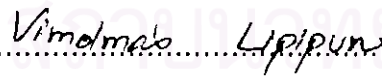
---


Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment  
of the Requirements for the Master's Degree.

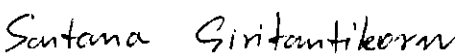
  
.....Dean of Graduate School  
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis committee:

  
.....Chairman  
(Associate Professor Dr. Vanna Punnarugsa, M.D.)

  
.....Thesis Advisor  
(Associate Professor Dr. Vimolmas Lipipun, Ph.D.)

  
.....Co-Advisor  
(Assistant Professor Dr. Thitima Pengsuparp, Ph.D.)

  
.....Member  
(Assistant Professor Dr. Santana Siritantikorn, Dr.rer.nat.)

อภิญา รัศมี : ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ทัยปี 2 ของสารสกัดจากดินเบ็ดน้ำ ลำปะหูลย  
เนียมหูลยseo ฟันกระต่าย และ รำเพย (ANTIVIRAL ACTIVITY AGAINST HERPES SIMPLEX  
VIRUS TYPE 2 OF EXTRACTS FROM CERBERA ODOLLAM GAERTN., CLAUSENA EXCAVATA  
BURM.F., COLEUS AMBOINICUS LOUR., PHYLA NODIFLORA (L.)GREENE. AND THEVETIA  
PERUVIANA SCHUM.) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร.  
จิตติมา พึ่งสุภาพ, 103 หน้า. ISBN 974-639- 583-1.

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากใบดินเบ็ดน้ำ ใบลำปะหูลย ใบเนียมหูลยseo ใบและยอดฟัน  
กระต่าย และ ใบรำเพย จำนวน 35 ชนิด ต่อเชื้อ herpes simplex virus type 2 (HSV-2) strain 186 และ HSV-2 ที่  
แยกได้จากผู้ป่วยโรคเริมจำนวน 38 isolates โดยวิธี plaque reduction assay ใน Vero cell พบว่า สารสกัดใน  
ส่วนของ methanol (F1), chloroform (F2), hexane (F4) และ aqueous-hexane (F5) ของพืชทั้ง 5 ชนิด มีฤทธิ์ใน  
การทำลายไวรัสโดยตรง (Inactivation) โดยสารสกัดที่มีฤทธิ์ดีที่สุดของ ดินเบ็ดน้ำ ลำปะหูลย นียมหูลยseo ฟัน  
กระต่าย และรำเพย คือ F5, F2, F2, F4 และ F2 ตามลำดับ ซึ่งมีค่า 50% Effective Dose (ED<sub>50</sub>) ต่อ HSV-2 strain  
186 เท่ากับ 4.25, 0.25, 3.25, 16.25 และ 3.25 µg/ml, ตามลำดับ ส่วนค่า ED<sub>50</sub> ต่ำสุด ต่อ HSV-2 isolates เท่ากับ  
4.99 ± 0.91 (F5), 8.97 ± 0.76 (F2), 3.57 ± 0.77 (F2), 20.90 ± 3.14 (F4) และ 3.04 ± 0.70 (F2) µg/ml, ตามลำดับ  
สารสกัดจำนวน 20 ชนิด จากพืช 5 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งไวรัส (inactivation) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไวรัสของ  
acyclovir ซึ่งเป็นยามาตรฐาน ต่อ HSV-2 strain 186 และ HSV-2 isolates พบว่ามีค่า ED<sub>50</sub> เท่ากับ 0.5 และ 0.59  
µg/ml. จากการศึกษาทำให้ได้ข้อมูล เป็นแนวทางในการหาสารบริสุทธิ์จาก ใบดินเบ็ดน้ำ ใบลำปะหูลย ใบ  
เนียมหูลยseo ใบและยอดฟันกระต่าย และใบรำเพย ที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อไวรัส HSV-2 และนำมาพัฒนาเป็นยาเพื่อ  
รักษาโรคเริมต่อไป.



สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์.....  
สาขาวิชา..... จุลชีววิทยาทางการแพทย์.....  
ปีการศึกษา..... 2541.....

ลายมือชื่อนิต..... อภิญา รัศมี.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... วิมลมาศ ลิปิพันธ์.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... จิตติมา พึ่งสุภาพ.....

# # 3972376930 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: ANTIVIRAL ACTIVITY / MEDICINAL PLANT EXTRACT / HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2 / PLAQUE REDUCTION ASSAY

APISDA RASMI : ANTIVIRAL ACTIVITY AGAINST HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2 OF EXTRACTS FROM *CERBERA ODOLLAM* GAERTN., *CLAUSENA EXCAVATA* BURM.F., *COLEUS AMBOINICUS* LOUR., *PHYLA NODIFLORA* (L.) GREENE. AND *THEVETIA PERUVIANA* SCHUM. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. DR. VIMOLMAS LIPIPUN, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSIST. PROF. DR. THITIMA PENGSUPARP, Ph.D. 103 pp. ISBN 974-639-583-1.

Thirty-five extracts from the leaves of *Cerbera odollam* Gaertn., *Clausena excavata* Burm. F., *Coleus amboinicus* Lour., *Thevetia peruviana* Schum. and leaves and apex of *Phyla nodiflora* (L.) Greene. were tested for antiviral activity in vitro against HSV-2 strain 186 and 38 HSV-2 isolates by plaque reduction assay using Vero cell line. The inactivation activity of active extracts from 5 plants were showed in methanol fraction (F1), chloroform fraction (F2), hexane fraction (F4) and aqueous- hexane fraction (F5). The most active extracts of *C. odollam* Gaertn., *C. excavata* Burm.F., *C. amboinicus* Lour., *P. nodiflora* (L.) Greene. and *T. peruviana* Schum. against HSV-2 strain 186 were F5, F2, F2, F4 and F2, respectively. The 50% Effective Dose (ED<sub>50</sub>) of these extracts were 4.25, 9.25, 3.25, 16.25 and 3.25 µg/ml, respectively. While the lowest ED<sub>50</sub> (µg/ml) of *C. odollam* Gaertn., *C. excavata* Burm. F., *C. amboinicus* Lour., *P. nodiflora* (L.) Greene. and *T. peruviana* Schum. against HSV-2 isolates were  $4.99 \pm 0.91$  (F5),  $8.97 \pm 0.76$  (F2),  $3.57 \pm 0.77$  (F2),  $20.90 \pm 3.14$  (F4) and  $3.04 \pm 0.70$  (F2), respectively. The results showed 20 extracts from 5 plants inhibited plaque formation of HSV-2 by inactivation activity. ED<sub>50</sub> of acyclovir (ACV) against HSV-2 strain 186 and HSV-2 isolates were 0.5 and 0.59 µg/ml. This study has indicated some of the ethnobotanical reports of Thai medicinal plants having antiviral properties against HSV-2 clinical isolates using biological assay in vitro.

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....สาขาสหวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต.....

อนันต์ ธีระ

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางการแพทย์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

วิมลมาส ลิปิพูน

ปีการศึกษา.....2541

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ทิติม่า เพงสุพารพ



## ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deep gratitude to the followings, who have helped for the completeness of this thesis.

Associate Professor Dr. Vimolmas Lipipun, Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, my advisor, for her kind advice, excellent guidance and indispensable help throughout the period of this study.

Assistant Professor Dr. Thitima Pengsuparp, Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, my co-advisor, for her kindness and advice.

Assistant Professor Dr. Ruth Suttisri, Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his kindness and medicinal plants in this thesis.

Dr. Anupong Chitwarakorn, M.D., the director of Venereal Disease Division, Department of Communicable Disease Control, Ministry of Public Health, for his kindness and encouragement.

Dr. Wichai Julwanichpong, M.D., the director of Venereal Disease and AIDS Center 3 Chonburi, Department of Communicable Disease Control, Ministry of Public Health, for his kindness, statistical advice and help in collecting the viral specimens.

All the staffs of male and female clinic at Venereal Disease Division for their kind help in collecting the specimens.

Dr. Suntana Charoenkul, M.D., Head, Department of Obstetrics and Gynecology, Vachira Hospital, for her kindness, help in collecting the viral specimens.

Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for using the instruments, glassware, chemical reagents and the laboratory rooms through the thesis.

Finally, I am also indebted to my advisory committee, Associate Professor Vanne Punnarugsa, M.D., Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and Assistant Professor Dr. Sontana Sirtantikorn, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, for their kindness and helpful suggesting for the completeness of this thesis and to my family for their understanding and support during the period of my study.

# CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF SCHEME.....	xii
ABBREVIATION.....	xiii
<b>CHAPTER</b>	
I. INTRODUCTION.....	1
II. OBJECTIVES.....	3
<b>III. LITERATURE REVEIWS</b>	
HERPES SIMPLEX VIRUS.....	4
HISTORY.....	4
PROPERTIES OF HERPES SIMPLEX VIRUS.....	5
MORPHOLOGY OF HSV VIRION.....	5
VIRAL REPLICATION.....	10
PATHOLOGY AND PATHOGENESIS.....	12
CLINICAL MANIFESTATIONS OF HSV-2 DISEASE.....	16
Genital herpes.....	17
Neonatal HSV infection.....	18
EPIDEMIOLOGY.....	20
DIAGNOSIS.....	21
Isolation by tissue culture.....	21
Serologic assessment.....	22
Polymerase chain reaction.....	22

	Page
CONTROL OF HSV INFECTIONS.....	23
TREATMENT.....	26
THAI MEDICINAL PLANTS IN THIS RESEARCH.....	33
<i>Cerbera odollam</i> Gaertn.....	33
<i>Clausena excavata</i> Burn.F.....	36
<i>Coleus amboinicus</i> Lour.....	39
<i>Phyla nodiflora</i> (L.) Greene.....	42
<i>Thevetia peruviana</i> Schum.....	44
IV. MATERIALS AND METHODS.....	47
PART I. CELL CULTURE FOR PROPAGATION OF VIRUS.....	47
1.1. Cell line and culture medium.....	47
PART II. HERPES SIMPLEX VIRUSES.....	48
2.1. Herpes simplex virus standard strain.....	48
2.2. HSV-2 isolates.....	49
2.3. HSV-2 identification.....	50
2.4. Titration of virus.....	51
PART III. STUDY OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF ACYCLOVIR AGAINST HSV-2 STRAIN 186.....	51
3.1. Pre-treatment.....	52
3.2. Post-treatment.....	52
3.3. Inactivation.....	53
PART IV. STUDY OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF ACYCLOVIR AGAINST HSV-2 ISOLATES.....	53
PART V. STUDY OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF MEDICINAL PLANT EXTRACTS AGAINST HSV-2 STRAIN 186 AND HSV-2 ISOLATES.....	53
5.1. Source of plant materials.....	53

	Page
5.2. Extraction.....	54
5.3. The cytotoxicity assay.....	56
5.4. Study of antiviral activity of medicinal plant extracts against HSV-2 strain 186.....	56
5.5. Study of antiviral activity of medicinal plant extracts against HSV-2 isolates.....	57
PART VI. STUDY OF ANTIVIRAL ACTIVITY FOR INHIBITING VIRAL ENTRY INTO CELL, GROWTH INHIBITION OF VIRAL REPLICATION IN THE CELL AND DIRECT VIRAL DOMOLISHMENT OF MEDICINAL PLANT EXTRACTS AGAINST HSV-2 STRAIN 186 AND HSV-2 ISOLATES.....	
6.1. Pre-treatment.....	57
6.2. Post-treatment.....	58
6.3. Inactivation.....	58
PART VII. STATISTICAL ANALYSIS.....	59
V. RESULTS.....	60
VI. DISCUSSION.....	79
VII. CONCLUSIONS.....	85
REFERENCES.....	86
APPENDIX I.....	95
APPENDIX II.....	97
APPENDIX III.....	100
BIOGRAPHY.....	103

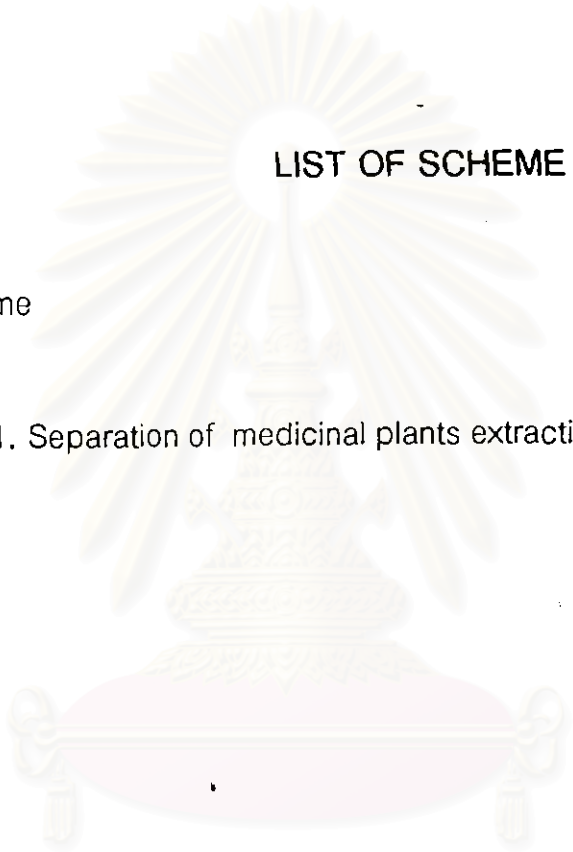


## LIST OF TABLES

TABLE	Page
1. Characteristics of herpes simplex virus type 1 and type 2.....	7
2. Indications for acyclovir therapy.....	32
3. Patients and lesion characteristics.....	65
4. Titration of dilution of rabbit anti-HSV-2 serum against viral concentration.- (Conjugate dilution 1: 200).....	66
5. Titration of dilution of conjugate rabbit anti-HSV serum against viral concentrations. (Rabbit anti-HSV-2 dilution 1: 4000).....	67
6. OD ELISA (492 nm) of HSV-2 identification.....	68
7. Viral titration of HSV-2 strain 186 and HSV-2 isolates.....	69
8. Antiviral activity of ACV against HSV-2 strain 186.....	70
9. ANOVA table of antiviral activity of ACV against HSV-2 strain 186.....	69
10. ED <sub>50</sub> of ACV against HSV-2 isolates.....	71
11. Cytotoxic concentration of medicinal plant extracts on Vero cell.....	72
12. ED <sub>50</sub> of medicinal plant extracts against HSV-2 strain 186.....	72
13. ED <sub>50</sub> of medicinal plant extracts against HSV-2 isolates.....	73
14. Tests of significance for ED <sub>50</sub> between groups of fraction in the same plant by ANOVA.....	74
15. Tests of significance for ED <sub>50</sub> between groups of plant in the same fraction by ANOVA.....	76

## LIST OF FIGURES

FIGURE	Page
1. Morphology of herpesviruses .....	8
2. Genome structure of human herpesviruses.....	9
3. The replication of herpes simplex viruses in susceptible cells.....	11
4. Multinucleated giant cell.....	14
5. The pathogenesis of HSV infection and disease.....	15
6. Formulae and abbreviations for anti- herpesvirus agents.....	29
7. Mechanism of action of anti-herpesvirus agents.....	30
8. <i>Cerbera odollam</i> Gaertn.....	35
9. <i>Clausena excavata</i> Burm.F.....	38
10. <i>Coleus amboinicus</i> Lour.....	41
11. <i>Phyla nodiflora</i> (L.) Greene.....	43
12. <i>Thevetia peruviana</i> Schum.....	46
13. Titration curves of dilution of rabbit anti-HSV-2 serum against viral concentration. (Conjugate dilution 1: 200).....	66
14. Titration curves of dilution of conjugate rabbit anti-HSV serum against viral concentration. (Rabbit anti-HSV-2 dilution 1:4000).....	67
15. Pre-treatment, post-treatment and inactivation activity of ACV and F1 extracts from 5 medicinal plants against HSV-2 at 1, 2, and 3 hours.....	78



LIST OF SCHEME

scheme	Page
1. Separation of medicinal plants extraction.....	55

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ABBREVIATIONS

ACV	acyclovir
anti-HSV	anti-herpes simplex virus
BSA	bovine serum albumin
°C	degree Celsius
CPE	cytopathic effect
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
ED <sub>50</sub>	50% effective dose
EIA	enzyme immunoassay
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
et al	et alii
FCS	fetal calf serum
gm	gram
HSV	herpes simplex virus
HSV-1	herpes simplex virus type 1
HSV-2	herpes simplex virus type 2
L	liter
µg	microgram
µl	microliter
MEM	Modified Eagle Medium
ml	milliliter
mm	millimeter
OD	optical density
OPD	ortho-phenylenediamine
PCR	polymerase chain reaction
MOI	multiplicity of infection

PBS	phosphate buffer saline
PBS-T	phosphate buffer saline with 0.05% Tween 20
PFU	plaque forming unit
rpm	round per minute
SD	standard deviation
w/v	weight per volume



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย