

ฤทธิ์ต้านไวรัสเอชไอวี 1 ของสารสกัดชั้นน้ำของพืชสมุนไพร และพืชถิ่นเดียวในอำเภออุ้มทอง จังหวัดสุพรรณบุรี

Anti-HIV 1 Activity of Medicinal and Endemic Plant Aqueous Extracts in U Thong District, Suphan Buri Province

สถิตย์ พันวิไล*

สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ถนนอิสราภาพ แขวงหิรัญรูจี เขตธนบุรี กรุงเทพมหานคร 10600

รติกร อัครวงศาพัฒน์ และชนิตา นภาสวัสดิ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ถนนพระรามที่ 4 เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

Sathit Panvilai*

Program in Microbiology, Department of Science, Faculty of Science,

Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Isaraphap Road, Hiranruchi, Dhonburi, Bangkok 10600

Radeekorn Akkarawongsapat and Chanita Napasawat

Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University,

Rama VI Road, Ratchathewi District, Bangkok 10400

บทคัดย่อ

ไวรัสเอชไอวี 1 เป็นสาเหตุของโรคเอดส์ องค์การอนามัยโลกรายงานว่าทั่วโลกมีผู้ติดเชื้อ 37.9 ล้านคน โดยมีผู้ติดเชื้อเสียชีวิตทั่วโลกกว่า 770,000 คน นอกจากนี้ยังมีผู้ติดเชื้อรายใหม่ในแต่ละปีประมาณ 1.7 ล้านคน ปัจจุบันในการรักษาผู้ติดเชื้อจะให้ยาต้านไวรัสหลายชนิด เพื่อควบคุมการดำเนินโรคด้วยการช่วยลดปริมาณไวรัสในร่างกาย อย่างไรก็ตาม พบผลข้างเคียงจากการใช้ยาในผู้ติดเชื้อบางราย รวมถึงยังพบปัญหาที่น่ากังวล คือ การดื้อยาของไวรัส ดังนั้นการศึกษาวิจัยยาต้านไวรัสเอชไอวีชนิดใหม่จึงเป็นสิ่งที่จำเป็น ซึ่งหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าพืชสมุนไพรมีฤทธิ์ต้านไวรัส รวมถึงการต้านเอชไอวี 1 ทำให้เกิดการใช้ประโยชน์สมุนไพรในฐานะยาทางเลือกสำหรับใช้ต้านไวรัส งานวิจัยนี้จึงนำพืชสมุนไพรและพืชถิ่นเดียวจากอำเภออุ้มทอง จังหวัดสุพรรณบุรี มาทดสอบการยับยั้งไวรัสเอชไอวี 1 ด้วยวิธี syncytium reduction assay ผลการทดลองพบว่าสารสกัดชั้นน้ำจากพืช 16 ใน 20 ชนิด มีสมบัติการต้านไวรัสเอชไอวี 1 โดยแสดงค่า EC_{50} ตั้งแต่ 7.62 ถึง 163.79 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อีกทั้งได้ทดสอบความ

เป็นพืชต่อเซลล์ของสารสกัด ซึ่งมีค่า IC_{50} ตั้งแต่ 31.77 ถึง >250 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร โดยสารสกัดเหล่านี้แสดงค่า selectivity index (SI) ตั้งแต่ 1.46 ถึง 12.79 โดยที่ *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb. แสดงค่า SI สูงสุด การศึกษาสารสกัดจากพืชเหล่านี้เพิ่มเติมจะนำไปสู่การค้นพบสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสามารถพัฒนาเป็นยา ป้องกันการติดเชื้อเอชไอวี 1 ในอนาคต

คำสำคัญ : เอชไอวี 1; สารสกัดชันน้ำ; พืชสมุนไพร; พืชถิ่นเดียว; อำเภออุ้มทอง

Abstract

Human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) is a causative agent of AIDS disease. The World Health Organization has reported that there are 37.9 million people living with HIV worldwide, of which approximately 1.7 million are newly infected patients each year. The treatments for infected individuals have currently used multiple antiretroviral drugs to control disease progression by reducing viral load in the body. However, adverse effects from medication are observed in some patients, as well as an even more challenging problem from the emergence of drug-resistant virus. Therefore, research for a novel antiretroviral drug is needed. Several studies have shown that naturally derived medicinal plants exhibit antiviral activities, including anti-HIV-1, giving rise to the potential use of the medicinal plants as alternative antiviral drugs. In this study, aqueous extracts of medicinal and endemic plants from U Thong district, Suphan Buri province were determined for inhibitory activities against HIV-1 by syncytium reduction assay. The result demonstrated that there were 16 out of 20 aqueous extracts of these plants possessed anti-HIV-1 activity by having EC_{50} ranged from 7.62 to 163.79 $\mu\text{g/mL}$. Cytotoxicity of these extracts was also tested and shown to have IC_{50} ranged from 31.77 to >250 $\mu\text{g/mL}$. In summary, these extracts represented selectivity index (SI) ranged from 1.46 to 12.79, by which *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb. exhibited the highest SI value. Further study on these extracts would lead to finding active compounds that can potentially be developed as an antiviral drug against HIV-1 infection in the future.

Keywords: HIV-1; aqueous extract; medicinal plant; endemic plant; U Thong district

1. บทนำ

เอดส์ (AIDS, acquired immunodeficiency syndrome) เป็นโรคที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี (HIV, human immunodeficiency virus) ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Lentivirus* วงศ์ *Retroviridae* สามารถใช้อาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA) เป็น

แม่แบบเพื่อสร้างดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA) ของไวรัสด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase (RT) ในปี พ.ศ. 2561 องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) รายงานจำนวนผู้ติดเชื้อทั่วโลกประมาณ 37.9 ล้านคน ซึ่งในจำนวนนี้มีผู้เสียชีวิต 770,000 คน และยังรายงานว่ามีผู้ติดเชื้อ

เพียงร้อยละ 62 รวมถึงเด็กที่ติดเชื้อร้อยละ 54 ที่สามารถเข้าถึงการรักษาด้วยยาต้านรีโทรไวรัส (antiretroviral therapy, ART) [1] สำหรับประเทศไทยพบว่ามีความโน้มเอียงการติดเชื้อเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มประชากรช่วงอายุ 15-24 ปี โดยผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวีส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อเอชไอวีทียป์ 1 (HIV-1) ซึ่งประเทศไทยกำหนดเป้าหมายเพื่อยุติปัญหาเอชไอวีให้ได้ภายในปี พ.ศ. 2573 [2] ปัจจุบันการรักษาผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์เป็นการใช้ยาต้านไวรัสที่ได้รับการอนุมัติจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีทั้งหมด 9 กลุ่ม คือ nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), protease inhibitors (PIs), fusion inhibitors, CCR5 antagonists, integrase inhibitors, post-attachment inhibitors, pharmacokinetic enhancers และ combination HIV medicines [3] ซึ่งทั้งหมดเป็นยาที่ใช้เพื่อลดปริมาณไวรัสในร่างกาย ไม่สามารถรักษาให้หายขาด นอกจากนี้ยังพบการดื้อยาของไวรัสในอัตราที่เพิ่มสูงขึ้นอันเป็นผลมาจากการไม่รับประทานยาอย่างต่อเนื่องของผู้ติดเชื้อ เนื่องจากได้รับผลข้างเคียงจากการรับประทานยา [4] การดื้อยาของไวรัสเอชไอวี 1 ในผู้ป่วยโรคเอดส์ของประเทศไทยพบประมาณร้อยละ 5 หลังได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัส [5] การค้นหาสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่เพื่อนำไปสู่การแก้ปัญหาเหล่านี้จึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งการศึกษาสารสกัดจากพืชเป็นอีกหนึ่งแนวทางที่สามารถนำมาพัฒนายาต้านไวรัส เนื่องจากมีความปลอดภัยและยังเป็นทรัพยากรที่มีอยู่จำนวนมากของประเทศไทย โดยพืชนำมาใช้ในทางการแพทย์และมีบทบาทสำคัญในการใช้รักษาโรคต่าง ๆ จากอดีตจนถึงปัจจุบัน เนื่องด้วยประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง โดยเฉพาะความหลากหลายของพรรณพืช สำหรับการ

ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านไวรัสเอชไอวี 1 ของสารสกัดจากพืชได้มีงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่าสาร flavonoid glycoside สกัดจาก *Ochnain tegerrima* [6] สาร plastocyanin จากใบของ *Canna indica* [7] สาร triterpenoid จาก *Gardenia carinata* [8] และสาร lectin จาก *Musa acuminata* [9] สามารถยับยั้งไวรัสเอชไอวี 1 ในระดับห้องปฏิบัติการ ด้วยเหตุนี้การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชในการยับยั้งไวรัสเอชไอวีจึงเป็นการเพิ่มโอกาสในการได้มาซึ่งตัวขนิดใหม่สำหรับใช้รักษาผู้ติดเชื้อ หรือแม้แต่การนำไปใช้เพื่อป้องกันการติดเชื้อ ประเทศไทยมีพืชสมุนไพรหลากหลายชนิดที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อต่าง ๆ รวมถึงในอำเภออุ้มทอง จังหวัดสุพรรณบุรี ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ โดยพบการใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรที่อยู่บริเวณป่าชุมชนต่าง ๆ และยังพบพืชถิ่นเดียวมากถึง 9 ชนิด [10] นอกจากนี้ยังมีแปลงรวบรวมพืชสมุนไพร คือ สวนป่าสมุนไพรเฉลิมพระเกียรติ 60 ดำเนินงานภายใต้การดูแลของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี โดยพืชสมุนไพรและพืชถิ่นเดียวในอำเภออุ้มทองเป็นแหล่งทรัพยากรที่สำคัญสามารถนำมาศึกษาวิจัยให้เกิดองค์ความรู้เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรม รวมถึงสามารถเพิ่มคุณค่าของพืชเหล่านี้และเป็นอีกหนึ่งแนวทางที่จะช่วยให้เกิดการอนุรักษ์

ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเอชไอวี 1 ของพืชสมุนไพรและพืชถิ่นเดียวในอำเภออุ้มทอง จังหวัดสุพรรณบุรี โดยเก็บตัวอย่างพืชจากบริเวณป่าชุมชนและสวนป่าสมุนไพรเฉลิมพระเกียรติ 60 นำมาสกัดด้วยน้ำ จากนั้นทดสอบการยับยั้งไวรัสเอชไอวี 1 และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยรายงานผลของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเอชไอวี 1 ในรูปแบบของค่า selectivity index (SI) ซึ่งข้อมูลจากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำพืช

สมุนไพรและพืชถิ่นเดียวไปศึกษาต่อยอดพัฒนาเป็นสารต้านการติดเชื้อไวรัส รวมถึงช่วยลดปัญหาการแพร่ระบาดของไวรัสเอชไอวี 1

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พืชสมุนไพรและพืชถิ่นเดียว

พืชสมุนไพรและพืชถิ่นเดียวที่นำมาสกัดสารและทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งไวรัสเอชไอวี 1 เก็บรวบรวมจากบริเวณป่าชุมชนในอำเภออุ้มทองและสวนป่าสมุนไพรเฉลิมพระเกียรติ 60 ตำบลจรเข้สามพัน อำเภออุ้มทอง จังหวัดสุพรรณบุรี มีทั้งหมด 20 ชนิด (ตารางที่ 1) ซึ่งได้ระบุชนิดของพืชทั้งหมดโดยผู้ช่วยศาสตราจารย์วิชัย ปทุมชาติ วัฒน และผู้ช่วยศาสตราจารย์จรัญ ประจันบาล ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ วิถีชีวิต และภูมิปัญญาท้องถิ่น มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา และตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์จากฐานข้อมูลชื่อพรรณไม้ เต็ม สมิตินันท์ (<http://www.dnp.go.th/botany/mplant/index.aspx>)

2.2 การเตรียมสารสกัด

การสกัดสารด้วยน้ำ (aqueous extraction) เป็นวิธีที่ปฏิบัติได้ง่าย สะดวก และมีค่าใช้จ่ายน้อย โดยสารที่สกัดได้เป็นกลุ่มสารที่มีขั้ว (polar constituent) เช่น glycosylated flavonoid และ sulphated polysaccharide ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านไวรัสเอชไอวี 1 [11-14] ดังนั้นจึงนำตัวอย่างพืชทั้งหมดมาสกัดสาร โดยการชั่งน้ำหนัก 500 กรัม แล้วหั่นเป็นชิ้นขนาดเล็กและบดให้ละเอียดพร้อมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile ddH₂O) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่นแล้วนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง แยกตะกอนออกจากสารสกัดโดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนชั้นของเหลวลงในถาด

อลูมิเนียมแล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Operon, Korea) เก็บสารสกัดแห้งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่แห้งแล้วมาละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส [15]

2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ 1A2 และไวรัส $\Delta_{tat/rev}$ MC99

เซลล์ 1A2 และไวรัส $\Delta_{tat/rev}$ MC99 ได้จาก NIH AIDS Reagent Program ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยเซลล์ 1A2 เป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ T lymphocyte ที่มีการแสดงออกโปรตีน Tat และ Rev ของไวรัสเอชไอวี 1 โดยนำเซลล์ 1A2 มาเลี้ยงในอาหาร RPMI1640 ที่มีการเติม 10 % fetal bovine serum (FBS) และสารปฏิชีวนะ gentamicin (1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5 % CO₂ นับจำนวนเซลล์โดยใช้ฮีโมไซโตมิเตอร์ (hemocytometer) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป สำหรับไวรัส $\Delta_{tat/rev}$ MC99 ซึ่งเป็นไวรัสเอชไอวี 1 ที่ไม่มียีน *tat* และ *rev* (defective HIV-1) ถูกเพิ่มจำนวนอนุภาคไวรัสในเซลล์ 1A2 และหาค่าไวรัสโตเตอร์ด้วยวิธี syncytium assay เพื่อให้ได้ค่า 100-200 SFU (syncytium forming unit) ต่อปริมาตร 50 ไมโครลิตร [7,16]

2.4 การทดสอบ anti-HIV 1 syncytium reduction assay

สารสกัดพืชสมุนไพรและพืชถิ่นเดียวถูกทดสอบประสิทธิภาพการต้านไวรัสเอชไอวี 1 โดยทดสอบด้วยการใช้ 96-well cell culture plate ซึ่งในแต่ละหลุมเลี้ยงเซลล์ 1A2 จำนวน 5×10^4 เซลล์/หลุม จากนั้นเติมสารสกัดที่เจือจางสองเท่า (2-fold dilution) ความเข้มข้น 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6

และ 7.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงในหลุมที่มีเซลล์ โดยทดสอบแต่ละความเข้มข้นของสารสกัด 3 ซ้ำ และนำไปบ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5 % CO₂ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังครบกำหนดเวลาเติมไวรัส $\Delta tat/rev$ MC99 (100-200 SFU) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในหลุมที่มีการเติมสารสกัด แล้วบ่มต่อไปในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงนับจำนวน syncytia ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope) การทดสอบทุกครั้งมีการใช้กลุ่มควบคุมบวก (positive control) เป็นยา azidothymidine (AZT) และใช้กลุ่มควบคุมลบ (negative control) เป็นเซลล์ที่มีการเติมเฉพาะไวรัส และการเติมเฉพาะสารสกัด รายงานผลของประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรเป็น 50 % effective concentration (EC₅₀) โดยใช้วิธี median-effect equation (MEE) [7,17]

2.5 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด (cytotoxicity assay)

ความเป็นพิษของสารสกัดพืชสมุนไพรและพืชถิ่นเดียวทดสอบด้วยวิธี colorimetric XTT assay โดยเลี้ยงเซลล์ 1A2 จำนวน 5×10^4 เซลล์/หลุม จากนั้นเติมสารสกัดที่เจือจางสองเท่ามีความเข้มข้น 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6 และ 7.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงในหลุมที่มีเซลล์และบ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5 % CO₂ เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบกำหนดเติมสารละลาย ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ของ XTT tetrazolium salt (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่ผสมกับสารละลาย 1 % phenazine methosulfate แล้วบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยเซลล์ที่ยังมีชีวิตจะสร้างสาร formazan ที่มีสีน้ำตาลอมเหลือง (yellowish-brown) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450/650 นาโนเมตร (nm) และใช้ค่าการดูดกลืนแสง

มาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ 50 % inhibitory concentration (IC₅₀) [7,17]

2.6 การหาค่า selectivity index และการแปลผลฤทธิ์ต้านไวรัสเอชไอวี 1

Selectivity index คำนวณได้จากสมการ $SI = IC_{50} \div EC_{50}$ ซึ่งค่าดังกล่าวนี้บ่งบอกถึงระดับความปลอดภัยและประสิทธิภาพของสารสกัดพืชสมุนไพร โดยหากค่า SI สูงหมายถึงสารสกัดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ กล่าวคือ ที่ระดับความเข้มข้นสูงสารสกัดไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ขณะเดียวกันที่ระดับความเข้มข้นต่ำสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งไวรัสอย่างมีประสิทธิภาพ (high IC₅₀/low EC₅₀) ขณะที่การแปลผลฤทธิ์ต้านไวรัสเอชไอวี 1 (anti-HIV-1 activity) ของสารสกัดสมุนไพรมี 3 แบบ คือ active, inactive และ toxic โดยการแปลผลเป็น active (SI มากกว่า 1) เมื่อค่า EC₅₀ อยู่ในระดับที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ขณะที่การแปลผลเป็น inactive เมื่อที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบไม่สามารถลดจำนวน syncytium ลง 50 % และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และการแปลผลเป็น toxic เมื่อค่า EC₅₀ อยู่ในระดับที่เป็นพิษต่อเซลล์ (low IC₅₀/high EC₅₀) [18,19]

3. ผลการวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืช

พืชสมุนไพรและพืชถิ่นเดียวที่เก็บรวบรวมในอำเภออุ้มถ้องมีทั้งหมด 20 ชนิด โดยเกณฑ์การเลือกชนิดพืชประกอบด้วย (1) การสำรวจคัดเลือกพืชแบบไม่เจาะจง (random screening) (2) เลือกพืชที่มีประวัติการใช้ทางยา (3) เลือกพืชจากผลการวิจัยที่มีผู้รายงานก่อนหน้า และ (4) เลือกศึกษาพืชที่อยู่ในวงศ์หรือสกุลเดียวกันกับที่มีสารต้านไวรัส [20] ดังแสดงในตารางที่ 1

Table 1 Medicinal and endemic plants collected from U Thong, Suphan Buri

| Thai name (status)* | Scientific name (species, family) | Part of use (selection criteria)** |
|------------------------|--|------------------------------------|
| หางไหลขาวเขาคินปูน (M) | <i>Derris solorioides</i> Sirich. & Adema. FABACEAE | Leaf (d) |
| อบเชยเถา (M) | <i>Zygotelma benthamii</i> Baill. APOCYNACEAE | Leaf (b) |
| เหงือกปลาหมอ (M) | <i>Acanthus ebracteatus</i> Vahl ACANTHACEAE | Leaf (b) |
| พญาไร้ใบ (M) | <i>Euphorbia tirucalli</i> L. EUPHORBIACEAE | Stem (c) |
| จอกหินตะนาวศรี (E) | <i>Dorcoeras glabrum</i> C. Puglisi GESNERIACEAE | Leaf (b) |
| ชิงชี่ (M) | <i>Capparis micracantha</i> DC. CAPPARACEAE | Stem (c) |
| สมอพิเภก (M) | <i>Terminalia bellirica</i> (Gaertn.) Roxb. COMBRETACEAE | Fresh fruit (c) |
| มหาพรหม (E) | <i>Mitrephora winitii</i> Craib ANNONACEAE | Leaf (d) |
| กระตุกไก่อดำ (M) | <i>Justicia gendarussa</i> Burm. f. ACANTHACEAE | Leaf (c) |
| ว่านงาช้าง (M) | <i>Sansevieria cylindrica</i> Bojer ex Hook. ASPARAGACEAE | Leaf (b) |
| มะกัก (E) | <i>Spondias bipinnata</i> Airy Shaw & Forman ANACARDIACEAE | Fresh fruit (d) |
| น้ำนมราชสีห์ (M) | <i>Euphorbia hirta</i> L. EUPHORBIACEAE | Whole plant (c) |
| กะดังใบแดง (M) | <i>Leea rubra</i> Blume ex Spreng. VITACEAE | Leaf (b) |
| อังกาบหนู (M) | <i>Barleria prionitis</i> L. ACANTHACEAE | Leaf (b) |
| เสลดพังพอนตัวผู้ (M) | <i>Barleria lupulina</i> Lindl. ACANTHACEAE | Leaf (c) |
| ฟ้าทะลายโจร (M) | <i>Andrographis paniculata</i> (Burm. f.) Wall. ex Nees ACANTHACEAE | Leaf (b) |
| ม่วงไทรบุญ (E) | <i>Tribounia venosa</i> (Barnett) D.J. Middleton GESNERIACEAE | Whole plant (a) |
| เจตมูลเพลิงขาว (M) | <i>Plumbago zeylanica</i> L. PLUMBAGINACEAE | Leaf (b) |
| คำมอกหลวง (M) | <i>Gardenia sootepensis</i> Hutch. RUBIACEAE | Fresh fruit (b) |
| เปราะหอม (M) | <i>Kaempferia galanga</i> L. ZINGIBERACEAE | Leaf (b) |

* Medicinal plant (M), Endemic plant (E); ** (a) random screening, (b) medicinal plant used, (c) previous report for anti-HIV-1 activity, and (d) belong to the same family or genus as plants that possessed anti-HIV-1 activity

3.2 ฤทธิ์ต้านไวรัส $\Delta^{tat/rev}$ MC99 และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด

สารสกัดชั้นน้ำของพืชสมุนไพรและพืชถิ่นเดียวในอำเภออุ้มทองใต้ถูกนำมาทดสอบการยับยั้งไวรัสเอชไอวี 1 ด้วยวิธี syncytium reduction assay และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี colorimetric XTT assay ซึ่งผลการทดสอบพบว่าสารสกัด 16 ชนิดจากทั้งหมด 20 ชนิด มีฤทธิ์ต้านไวรัสเอชไอวี 1 (แปลผลเป็น active) โดยแสดงค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 7.62 ถึง 163.79 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และแสดงค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 31.77 ถึง >250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่า selective index (SI) ของสารทั้งหมด 16 ชนิด อยู่ที่

1.46 ถึง 12.79 ซึ่งสารสกัดจาก *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb. มีค่า SI สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 2 ขณะที่สารสกัดจากพืชสมุนไพร 2 ชนิด คือ *Acanthus ebracteatus* Vahl. และ *Sansevieria cylindrica* Bojer ex Hook. ไม่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเอชไอวี 1 (แปลผลเป็น inactive) เนื่องจากค่า IC_{50} และ EC_{50} มีค่า >250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดจากพืชอีก 2 ชนิด คือ *Gardenia sootepensis* Hutch. และ *Barleria prionitis* L. มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (แปลผลเป็น toxic) เนื่องจากค่า IC_{50} อยู่ในระดับต่ำและมี EC_{50} อยู่ในระดับที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

Table 2 Anti-HIV-1 activity of medicinal and endemic plants in U Thong, Suphan Buri

| Plant extracts | IC_{50} (μ g/mL) | EC_{50} (μ g/mL) | SI | Anti-HIV 1 |
|--|-------------------------|-------------------------|-------|------------|
| (1) <i>Terminalia bellirica</i> (Gaertn.) Roxb. | 97.47 | 7.62 | 12.79 | active |
| (2) <i>Dorcoceras glabrum</i> C. Puglisi | >250 | 41.15 | >6.07 | active |
| (3) <i>Euphorbia tirucalli</i> L. | 212.18 | 36.09 | 5.89 | active |
| (4) <i>Derris solorioides</i> Sirich. & Adema. | 179.77 | 34.85 | 5.16 | active |
| (5) <i>Capparis micracantha</i> DC. | 177 | 36.65 | 4.83 | active |
| (6) <i>Zygostelma benthamii</i> Baill. | >250 | 54.29 | >4.60 | active |
| (7) <i>Euphorbia hirta</i> L. | 142.99 | 41.15 | 3.48 | active |
| (8) <i>Plumbago zeylanica</i> L. | 179.16 | 58.52 | 3.06 | active |
| (9) <i>Spondias bipinnata</i> Airy Shaw & Forman (unripe) | 117.02 | 39.75 | 2.94 | active |
| (10) <i>Tribounia venosa</i> (Barnett) D.J. Middleton | 85.29 | 34.97 | 2.44 | active |
| (11) <i>Mitrephora winitii</i> Craib | >250 | 105.66 | >2.37 | active |
| (12) <i>Barleria lupulina</i> Lindl. | 89.64 | 47.50 | 1.89 | active |
| (13) <i>Leea rubra</i> Blume ex Spreng. | 185.83 | 118.67 | 1.57 | active |
| (14) <i>Justicia gendarussa</i> Burm. f. | >250 | 163.79 | >1.53 | active |
| (15) <i>Kaempferia galanga</i> L. | 88.79 | 59.32 | 1.49 | active |
| (16) <i>Andrographis paniculata</i> (Burm. f.) Wall. ex Nees | 31.77 | 21.79 | 1.46 | active |
| (17) <i>Acanthus ebracteatus</i> Vahl | >250 | >250 | N/A | inactive |
| (18) <i>Sansevieria cylindrica</i> Bojer ex Hook. | >250 | >250 | N/A | inactive |
| (19) <i>Gardenia sootepensis</i> Hutch. | 7.23 | 7.39 | - | toxic |
| (20) <i>Barleria prionitis</i> L. | 32.80 | 68.12 | - | toxic |

N/A = not applicable; positive control, Azidothymidine (AZT), exhibited IC_{50} , EC_{50} and SI at $>10^{-8}$ μ M, 2.78×10^{-9} μ M and >3.59, respectively.

4. วิจารณ์

พืชถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการรักษาโรคต่าง ๆ เป็นระยะเวลายาวนานนับย้อนกลับไปกว่าหลายพันปีก่อนหน้านี้ กระทั่งปัจจุบันยารักษาโรคกว่าร้อยละ 50 มีที่มาจากสารออกฤทธิ์ที่พบในพืช [21] การศึกษาวิจัยสารสกัดจากพืชในการยับยั้งไวรัสเอชไอวีมีมาตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการระบาดของไวรัส โดยสาร calanolide A และ calanolide B จากพืช *Calophyllum lanigerum* มีสมบัติเป็น NNRT inhibitor สาร prostratin จากพืช *Homalanthus nutans* และสาร bryostatin analog ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยอาศัยข้อมูลโครงสร้างทางเคมีของ bryostatin จากพืช *Bugula neritina* พบว่าสารทั้ง 2 ชนิดสามารถกระตุ้นการทำงานของ provirus ของไวรัสเอชไอวีที่ช่วยยับยั้งการติดเชื้อแฝง (latent infection) ซึ่งสาร calanolide A ถูกจดสิทธิบัตรและอยู่ระหว่างกระบวนการพัฒนาเพื่อใช้เป็นยารักษาในระยะ phase II clinical trial รวมถึงสาร prostratin ถูกพัฒนาอยู่ในระยะ phase I human clinical trial [22] ขณะที่สาร bryostatin analog มีความปลอดภัยเมื่อทดสอบกับหนูทดลอง [23] ซึ่งที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าพืชเปรียบเสมือนแหล่งรวมของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคเอดส์และผู้ติดเชื้อ ซึ่งงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการต้านไวรัสเอชไอวี 1 ของสารสกัดหยาบ (crude extract) จากพืช 16 ชนิด ที่เก็บตัวอย่างจากอำเภออุทอง จังหวัดสุพรรณบุรี โดยทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งไวรัสเอชไอวี 1 ด้วยวิธี syncytium reduction assay ที่ใช้ไวรัส $\Delta\text{tat/rev}$ MC99 และเซลล์ 1A2 ซึ่งมีความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติสามารถดำเนินการได้ในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลระดับ 2 (biosafety level 2, BSL2) [19] รวมถึงสารสกัดยังถูก

ทดสอบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี colorimetric XTT assay ผลการศึกษาทำให้ทราบข้อมูลประสิทธิภาพการต้านไวรัสเอชไอวี 1 และข้อมูลความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด ซึ่งข้อมูลการทดสอบสารสกัดถูกนำมาหาค่า SI ที่บ่งชี้ถึงความปลอดภัยและฤทธิ์ต้านไวรัสเอชไอวี 1 (anti-HIV 1 activity) โดยพืชสมุนไพรที่แสดงค่า SI สูงสุด 5 อันดับ ได้แก่ *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb. (SI 12.79), *Dorcoceas glabrum* C. Puglisi (SI >6.07), *Euphorbia tirucalli* L. (SI 5.89), *Derris solorioides* Sirich. & Adema. (SI 5.16) และ *Capparis micracantha* DC. (SI 4.83)

Terminalia bellirica (Gaertn.) Roxb. เป็นพืชที่มีการใช้ประโยชน์โดยนำผลมาใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรคต่าง ๆ ในหลายประเทศ สำหรับประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งไวรัสเอชไอวี 1 พบว่างานวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานผลการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase (RT) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเป็นการสกัดสารด้วยน้ำจากผลแห้งที่เก็บจากประเทศอินเดีย [24] ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับผลการทดสอบการยับยั้งไวรัสเอชไอวี 1 การศึกษาครั้งนี้ที่สกัดสารจากผลสดและทดสอบด้วยวิธี syncytium reduction assay โดยแสดงค่า EC_{50} เท่ากับ 7.62 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นฤทธิ์ต้านไวรัสเอชไอวี 1 ที่ได้จากสารสกัดในการศึกษานี้เป็นผลมาจากฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ RT อย่างไรก็ตาม สารสกัด *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb. มีฤทธิ์ต้านไวรัสเอชไอวี 1 ด้วยกลไกอื่นเพิ่มเติมหรือไม่ จำเป็นต้องศึกษาต่อไป รวมไปถึงการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ RT ด้วย เนื่องจากมีความแตกต่างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากพืชชนิดเดียวกันหากพืชมาจากต่างพื้นที่กัน [25] ขณะที่มีการรายงานว่าสารสกัดจากผลเป็นพิษต่อเซลล์ BHK-21 ที่ ความเข้มข้นมากถึง 4

มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แต่ที่ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดไม่ทำให้เซลล์ BHK-21 ตาย โดยมีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 100 หลังการเติมสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และร้อยละการรอดชีวิตลดลงเป็นร้อยละ 90±1.77 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง [26] เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลจากการทดสอบสารสกัดต่อการยับยั้งไวรัสเอชไอวี 1 และข้อมูลความเป็นพิษต่อเซลล์แสดงให้เห็นว่าพืชชนิดนี้มีสารออกฤทธิ์ที่อาจสามารถนำไปใช้พัฒนาเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์ที่ใช้รักษาผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวี 1

ขณะที่ *Dorcoceras glabrum* C. Puglisi ไม่มีรายงานฤทธิ์ต้านไวรัสมาก่อนหน้านี้ และยังเป็นพืชถิ่นเดียวของไทยที่พบการเจริญบนภูเขาหินปูนเขตเทือกเขาตะนาวศรี ภาคตะวันตกของประเทศไทย [27] พบการใช้ประโยชน์ด้านสมุนไพรของพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน GESNERIACEAE คือ สกุลซาอูซี่ (*Paraboea* sp.) ของชนชาติกะเหรี่ยงจังหวัดแพร่ [28] เมื่อนำใบของ *Dorcoceras glabrum* C. Puglisi มาสกัดสารแล้วนำไปทดสอบการยับยั้งไวรัสเอชไอวี 1 พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสเอชไอวี 1 ($EC_{50} = 41.15 \mu\text{g/mL}$) และมีความเป็นพิษต่ำ ($IC_{50} = >250 \mu\text{g/mL}$) การนำพืชชนิดนี้ไปต่อยอดศึกษาจนทราบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญจึงอาจเป็นประโยชน์ต่อการได้มาของสารต้านไวรัสเอชไอวี 1 ชนิดใหม่ ในส่วนของประสิทธิภาพการยับยั้งไวรัสเอชไอวี 1 ของสารสกัดจาก *Euphorbia tirucalli* L. พบมีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Abreu และคณะ [29] ที่รายงานว่า สาร ingenol synthetic derivative (ISD) ที่สังเคราะห์ขึ้นจากข้อมูลโครงสร้างทางเคมีของ ingenol ที่พบในส่วนน้ำยางสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสเอชไอวี 1 subtype B และ subtype C ในเซลล์ MT-4 แสดงค่า therapeutic index (TI) มากกว่า 400 อย่างไรก็ตาม การยับยั้งการเพิ่มจำนวน

ไวรัสอาจเป็นผลมาจาก ISD ที่ไปลดการแสดงออกของ CD4, CXCR4 และ CCR5 ซึ่งเป็นตัวรับบนผิวเซลล์ ซึ่งผลการศึกษาวินิจฉัยครั้งนี้ไวรัสถูกยับยั้งการเพิ่มจำนวนด้วยสารสกัดจาก *Euphorbia tirucalli* L. แต่ต้องศึกษาต่อไปว่าเป็นการยับยั้งขั้นตอนใดของกระบวนการเพิ่มจำนวนไวรัส นอกจากการมีผลต่อการลดการแสดงออกของตัวรับบนผิวเซลล์

สารสกัดจากใบของ *Derris solorioides* Sirich. & Adema. ซึ่งเป็นพืชชนิดใหม่ (new species) พบเจริญอยู่บริเวณภูเขาหินปูนเขตภาคกลางและภาคตะวันตกของประเทศไทย [30] และยังไม่มียารักษาฤทธิ์ต้านไวรัสมาก่อนหน้านี้ โดยสารสกัดมีประสิทธิภาพในการต้านไวรัสเอชไอวี 1 แต่การศึกษาสารสกัดจากพืชที่อยู่ในสกุลเดียวกัน คือ *Derris scandens* Benth พบว่าไม่สามารถยับยั้งทั้งเอนไซม์ integrase และ protease ของไวรัสเอชไอวี 1 [31,32] รวมถึงงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจาก *Capparis micracantha* DC. ไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ integrase ที่ระดับความเข้มข้น >100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร [33] ดังนั้นผลการศึกษาของสารสกัดจากทั้ง *Derris solorioides* Sirich. & Adema. และ *Capparis micracantha* DC. ในการศึกษาครั้งนี้อาจไม่ได้ออกฤทธิ์ยับยั้งทั้ง integrase และ protease ซึ่งการศึกษาการยับยั้งขั้นตอนอื่นของกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสจึงเป็นสิ่งที่จะต้องทำเพื่อให้ทราบข้อมูลเป้าหมายการออกฤทธิ์ของสารสกัด

การศึกษาศมบัติการต้านไวรัสเอชไอวี 1 ของสารสกัดพืชสมุนไพรและพืชถิ่นเดียว 20 ชนิด ในครั้งนี้ ทำให้ทราบข้อมูลความปลอดภัยของสารสกัดโดยพืชที่มีค่า SI สูงแสดงให้เห็นว่าพืชนั้นสามารถนำไปศึกษาต่อยอดให้ทราบสารออกฤทธิ์ที่จะนำไปสู่การพัฒนาต้านไวรัสได้ ที่สำคัญไปกว่านั้นสารสกัดจากพืชถิ่นเดียวและพืชชนิดใหม่ยังมีสมบัติต้านไวรัส

เอชไอวี 1 ซึ่งพืชถิ่นเดียวในการศึกษานี้พบได้เฉพาะบริเวณเขตภูเขาหินปูนของภาคกลางและภาคตะวันตกของประเทศไทยและยังมีความสำคัญอย่างยิ่งทางด้านทรัพยากรชีวภาพเนื่องจากยังไม่พบพืชนี้ในพื้นที่อื่นใดของโลก ดังนั้นการศึกษากการใช้ประโยชน์จากพืชถิ่นเดียวถือเป็นแนวทางหนึ่งที่จะนำไปสู่การอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนได้

5. สรุป

สารสกัดเข้มข้นจากพืชสมุนไพรรวมและพืชถิ่นเดียวจำนวน 16 ชนิด จากทั้งหมด 20 ชนิด แสดงฤทธิ์ต้านไวรัส $\Delta^{Tat/Rev}$ MC99 ในเซลล์ 1A2 โดยสามารถลดจำนวนการเกิด syncytia โดยมีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 7.62 ถึง 163.79 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ขณะที่ค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 31.77 ถึง >250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รวมถึงแสดงค่า SI อยู่ในช่วง 1.46 ถึง 12.79 โดยสารสกัดจาก *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb. มีค่า SI สูงสุด คือ 12.79 ขณะที่สารสกัดจากพืชสมุนไพรรวมจำนวน 4 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเอชไอวี 1 ได้แก่ *Acanthus ebracteatus* Vahl. และ *Sansevieria cylindrica* Bojer ex Hook. ซึ่งไม่สามารถยับยั้งไวรัสถึง 50 % ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ จึงถูกพิจารณาว่าไม่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเอชไอวี 1 ขณะที่ *Barleria prionitis* L. และ *Gardenia sootepensis* Hutch. นั้นพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินที่ผ่านการพิจารณาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) รหัสโครงการ 256108A1380004 รวมถึงขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา และขอขอบคุณ Dr.David Clanton (NIH AIDS Reagent

Program) สำหรับไวรัสและเซลล์ที่ใช้ทดลองในงานวิจัยนี้

7. References

- [1] World Health Organization (WHO), HIV/AIDS, fact sheets, Available Source: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>, July 18, 2019.
- [2] Bureau of AIDS, TB and STIs, Campaign for Prevention of STIs and AIDS on Valentine Day, Available Source: <https://ddc.moph.go.th/uploads/files/a9a1017367dede84f15184d5fef73d37.pdf>, February 20, 2019. (in Thai)
- [3] U.S. Department of Health and Human Services, FDA-Approved HIV Medicines, Available Source: <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/21/58/fda-approved-hiv-medicines>, February 20, 2019.
- [4] Gesesew, H.A., Ward, P., Hajito, K.W., Feyissa, G.T., Mohammadi, L. and Mwanri, L., 2017, Discontinuation from antiretroviral therapy: A continuing challenge among adults in HIV care in ethiopia: A systematic review and meta-analysis, PLoS ONE 12(1): e0169651.
- [5] Leechawangwong, M., 2016, It's Time to Examine Drug-resistant HIV Prior to Start the Treatment of New Infected Patient, Available Source: http://www.thaiaidsociety.org/index.php?option=com_content&view=article&id=168&Itemid=90, February 20, 2019.

- (in Thai)
- [6] Reutrakul, V., Ningnuek, N., Pohmakotr, M., Yoosook, C., Napaswad, C., Kasisit, J., Santisuk, T. and Tuchinda, P., 2007, Anti-HIV 1 flavonoid glycosides from *Ochna integerrima*, *Planta Med.* 73: 683-688.
- [7] Thepouyporn, A., Yoosook, C., Chuakul, W., Thirapanmethee, K., Napaswad, C. and Wiwat, C., 2012, Purification and characterization of anti-HIV-1 protein from *Canna indica* L. leaves, *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health* 43: 1153-1160.
- [8] Kongkum, N., Tuchinda, P., Pohmakort, M., Reutrakul, V., Piyachaturawat, P., Jariyawat, S., Suksen, K., Akkarawongsapat, R., Kasisit, J. and Napaswad, C., 2013, Cytotoxic, anti topoisomerase II, and anti-HIV-1 activities of triterpenoids isolated from leaves and twigs of *Gardenia carinata*, *J. Nat. Prod.* 76: 530-537.
- [9] Swanson, M.D., Winter, H.C., Goldstein, I.J. and Markovitz, D.M., 2010, A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication, *J. Biol. Chem.* 285: 8646-8655.
- [10] Prajanban, J., Patumchartpat, W. and Kaewichian, R., 2017, Biodiversity in U Thong, Bangkok Publishing (1984), Bangkok, 168 p. (in Thai)
- [11] Harnett, S.M., Oosthuizen, V. and van de Venter, M., 2005, Anti-HIV activities of organic and aqueous extracts of *Sutherlandia frutescens* and *Lobostemon trigonus*, *J. Ethnopharmacol.* 96: 113-119.
- [12] Geuenich, S., Goffinet, C., Venzke, S., Nolkemper, S., Baumann, I., Plinkert, P., Reichling, J. and Keppler, O.T., 2008, Aqueous extracts from peppermint, sage and lemon balm leaves display potent anti-HIV-1 activity by increasing the virion density, *Retrovirology* 5: 27.
- [13] Oh, C., Price, J., Brindley, M.A., Widrlechner, M.P., Qu, L., McCoy, J.A., Murphy, P., Hauck, C. and Maury, W., 2011, Inhibition of HIV-1 infection by aqueous extracts of *Prunella vulgaris* L., *Virolog. J.* 8: 188
- [14] Ortega, J.T., Estrada, O., Serrano, M.L., Contreras, W., Orsini, G., Pujol, F.H. and Rangel, H.R., 2017, Glycosylated flavonoids from *Psidium guineense* as major inhibitors of HIV-1 replication *in vitro*, *Nat. Prod. Commun.* 12: 1049-1052.
- [15] Woradulayapinij, W., Soonthornchareon non, N. and Wiwat, C., 2005, *In vitro* HIV type 1 reverse transcriptase inhibitory activities of Thai medicinal plants and *Canna indica* L. rhizomes, *J. Ethnopharmacol.* 101: 84-89.
- [16] Chen, H., Boyle, J.T., Malim, M.H., Cullen, B.R. and Lyerly, H.K., 1992, Derivation of a biologically contained replication system for human immunodeficiency virus type 1, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 89: 7678-7682.
- [17] Chou, T.C. and Talalay, P., 1984, Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of

- multiple drugs or enzyme inhibitors, *Adv. Enzyme Regul.* 22: 27-55.
- [18] Joshua, C., Naesens, P.L. and Montoya, J., 2014, Chapter 19 – Treating HHV-6 Infections: The Laboratory Efficacy and Clinical Use of Anti-HHV-6 Agents, pp. 311-331, In Flamand, L., Lautenschlager, I., Krueger, G.R.F. and Ablashi, D.V. (Eds.), *Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B & HHV-7* (3rd Ed.), Elsevier, Netherlands.
- [19] Yoosook, C., Reutrakul, V., Santisuk, T., Chaichana, S., Pezzuto, J.M., Dong, Y., Clanton, D.J., Kiser, R. and Staley, P., 1998, A sensitive assay for anti-HIV-1 drug discovery in a biological safety level-2 laboratory, *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health* 29: 758-762.
- [20] Sommanapan, A., 1994, *Advance in Drugs and Herbs as an Antibiotic*, P. T. Printing: Bangkok, 243 p. (in Thai)
- [21] Mushtaq, S., Abbasi, B. H., Uzair, B. and Abbasi, R., 2018, Natural products as reservoirs of novel therapeutic agents, *EXCLI J.* 17: 420-451.
- [22] Dias, D.A., Urban, S. and Roessner, U., 2012, A historical overview of natural products in drug discovery, *Metabolites* 2: 303-336.
- [23] Marsden, M.D., Loy, B.A., Wu, X., Ramirez, C.M., Schrier, A.J., Murray, D., Shimizu, A., Ryckbosch, S. M., Near, K. E., Chun, T. W., Wender, P.A. and Zack, J.A., 2017, *In vivo* activation of latent HIV with a synthetic bryostatin analog effects both latent cell “kick” and “kill” in strategy for virus eradication, *PLoS Pathog.* 13(9): e1006575.
- [24] El-Mekawy, S.A., Meselhy, M.R., Kusumoto, I., Kadota, S., Hattori, M. and Namba, T., 1995, Inhibitory effects of Egyptian folk medicines on human immunodeficiency virus (HIV) reverse transcriptase, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 43: 641-648.
- [25] Kundu, S., Haque, S.M. and Ghosh, B., 2015, Comparative analysis of bioactive compounds in different habitat of *Centella asiatica* (L.) Urban: Application for *in vitro* clonal propagation of elite ecotype. *J. Appl. Pharm. Sci.* 5(2): 030-036.
- [26] Dharmaratne, M., Manoraj, A., Thevanesam, V., Ekanayake, A., Kumar, N.S., Liyanapathirana, V., Abeyratne, E. and Bandara, B.M.R., 2018, *Terminalia bellirica* fruit extracts: *In vitro* antibacterial activity against selected multidrug-resistant bacteria, radical scavenging activity and cytotoxicity study on BHK-21 cells, *BMC Complement Altern. Med.* 18(1): 325.
- [27] Puglisi, C. and Middleton, D., 2017, A revision of *Dorcoceras* (Gesneriaceae) in Thailand, *Thai Forest Bull. (Bot.)* 45(1): 10-17.
- [28] Division of Forest Biodiversity, 2012, Project of Conservation and Development for Biodiversity, Available Source: <http://fbd.forest.go.th/th/wp-content/uploads/2014/>

- 04/conservation_project55.pdf, December 22, 2018. (in Thai)
- [29] Abreu, C.M., Price, S.L., Shirk, E.N., Cunha, R.D., Pianowski, L.F., Clements, J.E., Tanuri, A. and Gama, L., 2014, Dual role of novel ingenol derivatives from *Euphorbia tirucalli* in HIV replication: Inhibition of *de novo* infection and activation of viral LTR, PLoS ONE 9(5): e97257.
- [30] Sirichamorn, Y., Adema, F.A.C.B. and van Welzen, P.C., 2014, *Derris solorioides* (Fabaceae), a new limestone species with true-paniculate inflorescences from North-Central Thailand, Blumea 59: 98-102.
- [31] Bunluepuech, K. and Tewtrakul, S., 2011, Anti-HIV-1 integrase activity of Thai medicinal plants in longevity preparations, Songklanakarin J. Sci. Technol. 33: 693-697.
- [32] Bunluepuech, K., Tewtrakul, S. and Wattanapiromsakul, C., 2016, Anti-HIV-1 protease activity of compounds from *Cassia garrettiana*, Walailak J. Sci. Tech. 13: 827-835.
- [33] Bunluepuech, K. and Tewtrakul, S., 2009, Anti-HIV-1 integrase activity of Thai medicinal plants, Songklanakarin J. Sci. Technol. 31: 289-292.