

## ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและยับยั้งไวรัสตับอักเสบบี ของส่วนสกัดด้วยน้ำจากลูกใต้ใบและหนุ่ใต้ใบ

Antibacterial Activity and Inhibitory Effect on Hepatitis B virus of Aqueous  
Extracts from *Phyllanthus amarus* and *Phyllanthus urinaria*

บังอร ศรีพานิชกุลชัย (Bungorn Sripanidkulchai)\* อัญชลี ตัดตะวะศาสตร์ (Unchalee Tattawasart)\*\*  
ปราโมทย์ ทองกระจาย (Pramote Thongkrajai)\*\*\*  
พิสมัย เหล่าภัทรเกษม (Pisamai Laupatarakasem)\*\*\*\*

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้ต้องการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและผลยับยั้งไวรัสตับอักเสบบีของส่วนสกัดด้วยน้ำจากลูกใต้ใบและหนุ่ใต้ใบ พบว่า ส่วนสกัดจากลูกใต้ใบมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดีกว่าส่วนสกัดจากหนุ่ใต้ใบ โดยให้ค่า minimum bactericidal concentration (MBC) ต่อ *Staphylococcus aureus* ต่ำสุดคือ 3.91 mg/ml และค่า MBC ต่อ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Shigella species* เท่ากันคือ 31.25 mg/ml ส่วนค่า MBC ต่อ *Escherichia coli* เท่ากับ 62.5 mg/ml ส่วนสกัดจากหนุ่ใต้ใบมีฤทธิ์ต่อ *S. aureus* มากที่สุดให้ค่า MBC เท่ากับ 62.5 mg/ml และ ค่า MBC ต่อเชื้ออื่น ๆ ที่ทดสอบสูงกว่า 125 mg/ml และยังพบว่า ส่วนสกัดจากลูกใต้ใบมีผลยับยั้งไวรัสตับอักเสบบีได้ดีกว่าส่วนสกัดจากหนุ่ใต้ใบมากกว่า 1000 เท่า คือให้ค่า  $IC_{50} = 1,682 \text{ ng}/100 \mu\text{I}$  ของส่วนสกัดซึ่งเทียบได้เท่ากับ 11.5  $\mu\text{g}$  ของผงสมุนไพรแห้งก่อนสกัด ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นศักยภาพทางเภสัชวิทยาของลูกใต้ใบที่แตกต่างจากหนุ่ใต้ใบ จึงเป็นเรื่องสำคัญที่ต้องพิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพรที่ศึกษาให้ถูกต้อง

### Abstract

The objective of this study was to compare antibacterial activity and inhibitory effect on hepatitis B virus of aqueous extracts from *Phyllanthus amarus* and *P. urinaria*. It was found that *P. amarus* extract had stronger antibacterial activity than *P. urinaria* extract with minimum bactericidal concentration (MBC) for *Staphylococcus aureus* at 3.91 mg/ml. MBCs of *P. amarus* extract for *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella species* were equal to 31.25 mg/ml. Whereas its MBC for *Escherichia coli* was 62.5 mg/ml. *P. urinaria* extract showed weak antibacterial activity on *S. aureus* with MBC at 62.5 mg/ml. MBCs for other tested bacterial were higher than 125 mg/ml. Moreover, *P. amarus* extract also revealed more than 1000 times stronger inhibitory effect on hepatitis B virus than *P. urinaria* extract with  $IC_{50}$  at 1,682 ng/100 (l which was equivalent to 11.5 (g of dried plant powder before extraction. The results indicated the different potential in pharmacological activity of *P. amarus* and *P. urinaria*. Therefore, it is very important to make a correct medicinal plant identification in the study.

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ไวรัสตับอักเสบบี ลูกใต้ใบ หนุ่ใต้ใบ สมุนไพร

Keywords: Antibacterial, Virus Hepatitis B, *Phyllanthus amarus*, *Phyllanthus Urinaria*, Medicinal plant

\* รองศาสตราจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

\*\* ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

\*\*\* รองศาสตราจารย์ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

\*\*\*\* รองศาสตราจารย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## บทนำ

ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn. หรือ *Phyllanthus niruria* Linn.) และหนุ่ยใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria* Linn.) อยู่ในตระกูล Euphorbiaceae เป็นพืชล้มลุกที่มีผลเป็นลูกกลมขนาดเล็กใต้ใบเรียงไปตลอดก้าน และพบโดยทั่วไปในประเทศไทย พืชทั้งสองชนิดมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก ทำให้เกิดการสับสนทั้งการเรียกชื่อและการนำไปใช้แต่หากสังเกตอย่างใกล้ชิดสามารถแยกพืชทั้งสองชนิดได้โดยลูกใต้ใบมีผลที่มีลักษณะกลม ขนาดเล็ก ไม่มีขน ใบและยอดอ่อนมีสีเขียว ส่วนหนุ่ยใต้ใบมีผลขนาดใหญ่กว่าลักษณะแบนเล็กน้อย มีขน ใบมีสีเขียวแก่ และยอดอ่อนมีสีแดงเล็กน้อย (พะเยาว์, 2526) พืชทั้งสองชนิดมีสรรพคุณ ลดไข้ แก้ปวด ขับปัสสาวะ รักษามาลาเรีย รักษาดีซ่าน ตับอักเสบ และใช้ทาภายนอกรักษาแผลสด (คู่มือสมุนไพร เล่ม 1, 2527; พะเยาว์, 2526; ตระกูล, 2495) รายงานจากต่างประเทศพบว่า พืชทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ต้านพิษของคาร์บอนเตตราคลอไรด์ต่อตับ (Prakash et al., 1995) และต่อเอนไซม์ DNA polymerase ของไวรัสตับอักเสบบี (Unander and Blumberg, 1991) ลูกใต้ใบยังสามารถลดระดับของ hepatitis B surface antigen (HBsAg) ในผู้ที่ เป็นพาหะของไวรัสตับอักเสบบี (Thyagarajan et al., 1988) แต่การศึกษาในประเทศไทย พบว่า การให้ผงแห้งจากลูกใต้ใบ ขนาด 600 หรือ 1200mg ต่อวันให้ผลลด HBsAg ในผู้ที่เป็นพาหะไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (Thamlikitkul, Wasuwat and Kanchanapee, 1991) และผู้วิจัยสรุปว่า ลูกใต้ใบที่มีอยู่ในภาคกลางของประเทศไทย ไม่มีประสิทธิผลหรือมีประสิทธิผลต่ำมากในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นพาหะเรื้อรังของไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่า สมุนไพรที่ขึ้นในแต่ละท้องถิ่นอาจมีสารสำคัญแตกต่างกันไป Sripanidkulchai et al. (2001) ได้รายงานฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของส่วนสกัดด้วยน้ำจากลูกใต้ใบ ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ต้านสารก่อกลายพันธุ์หลายชนิด และยังต้านการทำลาย DNA ของตับที่เกิดจาก dimethylnitrosamine ในหนูแฮมสเตอร์ได้ด้วย คณะผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาเชิงเปรียบเทียบผลของส่วนสกัดด้วยน้ำจากลูกใต้ใบ และหนุ่ยใต้ใบในจังหวัดขอนแก่นในการฆ่าแบคทีเรีย และยับยั้งไวรัสตับอักเสบบีในการศึกษาครั้งนี้

## วิธีการวิจัย

1. การเก็บสมุนไพร นำลูกใต้ใบและหนุ่ยใต้ใบที่เก็บจากอำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น มาพิสูจน์เอกลักษณ์ว่าเป็นพืชทั้งสองชนิดจริง โดยเก็บพืชระหว่างเดือนพฤศจิกายน - มกราคม หลังจากล้างดินออกแล้วนำไปอบให้แห้งที่ 50-60°C จนได้น้ำหนักคงที่ จากนั้นบดให้เป็นผงละเอียดและเก็บไว้ในขวดสีชา

2. การเตรียมส่วนสกัดสมุนไพร นำผงสมุนไพรแต่ละชนิดมาประมาณ 100 กรัม แช่ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปต้มที่ 50-60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองผ่านผ้าก๊อชนำส่วนใสไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ -20°C จากนั้นคำนวณ% yield ซึ่งของลูกใต้ใบเท่ากับ 14.62% และของหนุ่ยใต้ใบเท่ากับ 7.2% เก็บส่วนสกัดสมุนไพรแห้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนกระทั่งใช้

3. สารเคมี สารเคมีที่ใช้เป็น analytical grade ที่ซื้อจากบริษัท Sigma อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นผลิตภัณฑ์ของ Difco

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้คือ *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Shigella sp.* (clinical strain) และ *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) เตรียมเชื้อสำหรับทดสอบโดยการใส่เชื้อ 2-3 โคโลนีลงใน 2 ml Mueller Hinton Broth (MHB) และบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ในอ่างเขย่าเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงมาเจือจาง 1:100 ด้วย MHB ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> ต่อมิลลิลิตร ละลายส่วนสกัดสมุนไพรแห้งในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้น 250 mg/ml จากนั้นทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี broth microdilution (Sahm and Washington, 1991) โดยใช้ MHB ทำการเจือจางสมุนไพรแล้วใส่สารละลายสมุนไพรเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 50 µl ลงใน microtiter plate เดิมเชื้อลงไป 50 µl โดยทดสอบสมุนไพรที่ความเข้มข้น 3.91-125 mg/ml ในการทดลองมีหลุมควบคุม 2 ชนิดคือ 1) ควบคุมเชื้อ

ที่ทดสอบคือ มีเชื้อแต่ไม่มีสปอร์ 2) ควบคุมการปนเปื้อน มีสปอร์แต่ไม่มีเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เนื่องจากสปอร์มีสีเข้ม จึงทำการหาฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียโดยการนำส่วนผสมที่บ่มเลี้ยงแล้วไปใส่ใน blood agar และบ่มเลี้ยงที่ 37°C อีก 24 ชั่วโมง จากนั้นหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายสปอร์ที่ฆ่าแบคทีเรียทำซ้ำสองทุกการทดสอบ

#### 5. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไวรัสตับอักเสบบี

ทดสอบโดยดัดแปลงวิธี Sandwich biotin-avidin ELISA (Thongkrajai, Lulitanon and Channanvanakit, 1989) ละลายส่วนสกัดผงสปอร์แห้งใน 0.1M phosphate buffer solution (PBS) ทำการเจือจางสปอร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วย PBS จากนั้นนำสารละลายสปอร์เจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 50  $\mu$ l ไปผสมกับซีรัมผู้ป่วยที่มี HBsAg จำนวน 50  $\mu$ l และนำไปบ่มในหลุมที่เคลือบด้วย anti-HBs Ag ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากล้างด้วย PBS เติม anti-HbsAg บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย PBS เติม biotinylated anti-serum หลังจากบ่มไว้ 30 นาที และล้างด้วย PBS แล้วเติม avidin-peroxidase และบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันให้เกิดสีโดยใช้ Ortho-phenylenediazine เป็น substrate และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm คำนวณหา 50% inhibition ( $IC_{50}$ ) โดยใช้ regression analysis ระหว่าง log ความเข้มข้นของสปอร์กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งทำการทดสอบซ้ำสองทุกการทดลอง

#### ผลการวิจัย

##### ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ผลการทดสอบส่วนสกัดด้วยน้ำจากลูกใต้ใบและหน้ใต้ใบกับแบคทีเรีย 4 ชนิด พบว่า ส่วนสกัดลูกใต้ใบมีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียได้ดีกว่า ส่วนสกัดหน้ใต้ใบ (ตารางที่ 1) โดยพบว่า ส่วนสกัดลูกใต้ใบฆ่า *S. aureus* ได้ดีที่สุดให้ค่า MBC ต่ำสุดคือ 3.91 mg/ml และฆ่า *Ps. aeruginosa* ได้พอ ๆ กับ *Shigella sp.* ให้ค่า MBC ที่ 31.25 mg/ml และฆ่า *E.coli* ให้ค่า MBC ที่

62.5 mg/ml ส่วนสกัดหน้ใต้ใบมีความสามารถฆ่า *S.aureus* ได้ค่อนข้างต่ำให้ MBC ที่ 62.5 mg/ml และให้ MBC ต่อเชื้ออื่น ๆ สูงกว่า 125 mg/ml

##### ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสตับอักเสบบี

พบว่า ส่วนสกัดด้วยน้ำจากลูกใต้ใบมีฤทธิ์ยับยั้งการจับระหว่าง HBsAg และ anti-HBsAg ได้ดีให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1,682 ng/100 (l ของส่วนสกัด คิดเป็นน้ำหนักแห้งของลูกใต้ใบก่อนสกัดเท่ากับ 11.5  $\mu$ g ส่วนสกัดจากหน้ใต้ใบให้ค่า  $IC_{50}$  ที่ความเข้มข้นสูงกว่าถึงมากกว่า 1000 เท่า คือ เท่ากับ 1,812  $\mu$ g /100  $\mu$ l ของส่วนสกัด คิดเป็นน้ำหนักแห้งของหน้ใต้ใบก่อนสกัดเท่ากับ 25.2 mg (รูปที่ 1)

#### วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

การศึกษาเปรียบเทียบลูกใต้ใบและหน้ใต้ใบโดยการสกัดด้วยน้ำในการศึกษานี้เป็นการดัดแปลงการสกัดตามแบบแผนโบราณในตำรายาไทยที่ใช้วิธีต้มรับประทาน ซึ่งส่วนสกัดด้วยน้ำของลูกใต้ใบที่ได้เคยมีรายงานว่า มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์และต้านมะเร็งมาแล้ว (Sripanidkulchai et al. 2001) สำหรับด้านสารสำคัญจากส่วนสกัดด้วยน้ำจากลูกใต้ใบที่เคยมีผู้รายงานไว้เป็น ellagitannin (Foo and Wong, 1992) และ amarillin (Foo, 1993) ซึ่งเป็นพวก gallocatechin และ gallic acid ที่พบได้ในพืชหลายชนิด ผลการศึกษาพบว่า ส่วนสกัดลูกใต้ใบมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและยับยั้งไวรัสตับอักเสบบีได้ดีกว่าส่วนสกัดหน้ใต้ใบอาจเนื่องจากสารสำคัญในส่วนสกัดแตกต่างกัน ทำให้ผลทางเภสัชวิทยาของพืชทั้งสองชนิดอาจแตกต่างกันไปได้ นอกจากนี้การปลูกในพื้นที่ที่แตกต่างกับสารสำคัญของสปอร์ก็อาจแตกต่างกันได้ การตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของส่วนสกัดลูกใต้ใบและส่วนสกัดหน้ใต้ใบต่อ *S. aureus* ที่ได้จากการศึกษานี้สอดคล้องกับที่เคยมีรายงานไว้ (Macrae, Hudson and Towers, 1988) ส่วนผลต่อไวรัสตับอักเสบบีที่เคยมีรายงานพบว่า หน้ใต้ใบที่ปลูกในพื้นที่ต่างกันให้ค่า  $IC_{50}$  ต่อ DNA polymerase ของไวรัสแตกต่างกัน (Unander and Blumberg, 1991) การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าลูกใต้ใบที่ปลูกในจังหวัดขอนแก่นมีฤทธิ์

ต้านแบคทีเรียและยับยั้งไวรัสตับอักเสบบีได้ดีกว่าหญ้าไต่ใบ ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพร ไต่ ๗ ก็ตามจำเป็นต้องทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพรให้ถูกต้อง และการเก็บสมุนไพรจากแต่ละพื้นที่ อาจให้สารสำคัญแตกต่างกันจึงควรได้ศึกษาเปรียบเทียบสารสำคัญของลูกไต่ใบและหญ้าไต่ใบที่ปลูกในจังหวัดขอนแก่นต่อไป เนื่องจากพืชทั้งสองชนิดนี้พบในท้องถิ่น และยังมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่างที่อาจนำไปพัฒนาใช้เป็นยาต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้

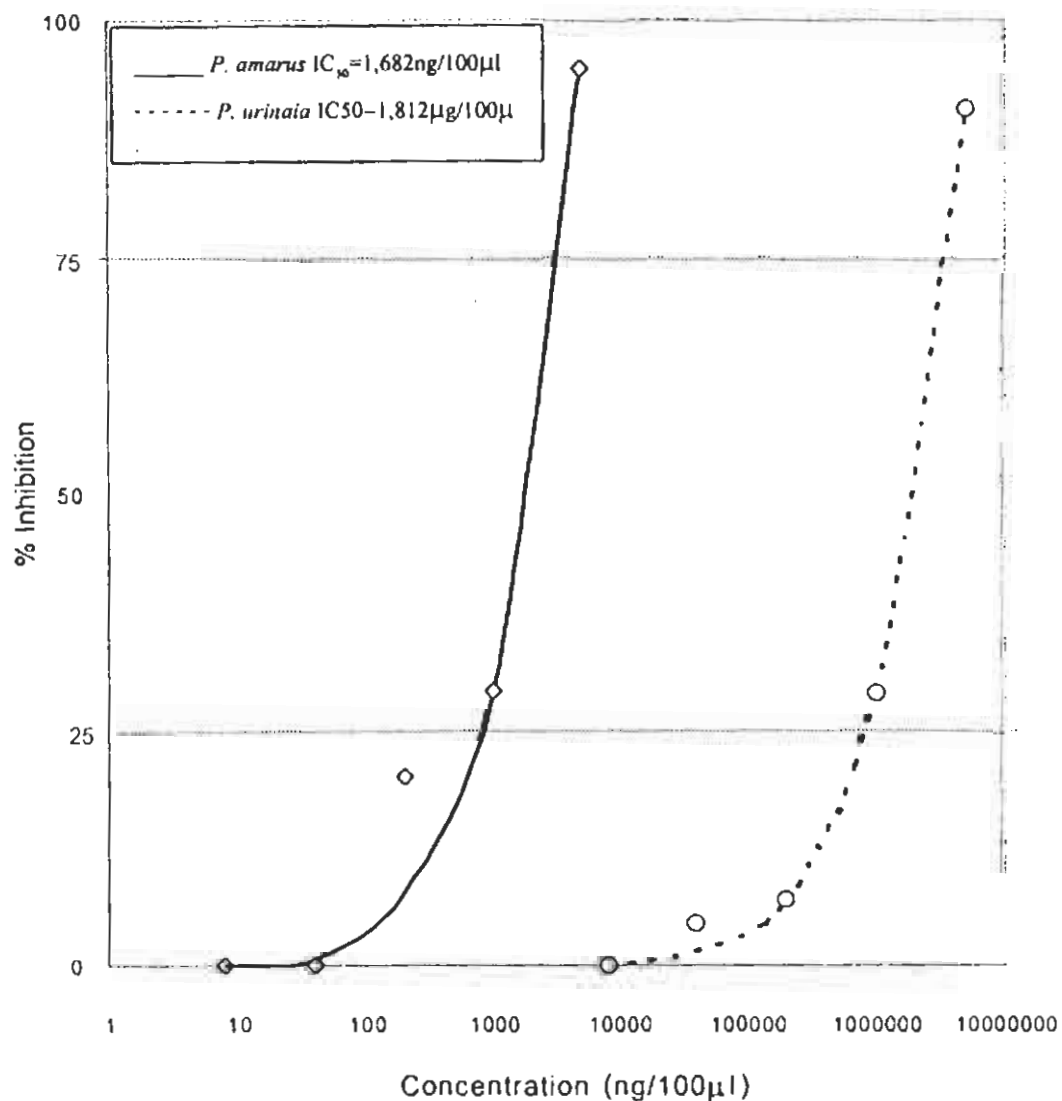
### เอกสารอ้างอิง

- คู่มือการใช้สมุนไพร เล่ม 1. 2527. โครงการสมุนไพรกับการสาธารณสุขมูลฐาน. กรุงเทพฯ : เอช-เอชการพิมพ์. หน้า 39-46.
- ตระกูล กิตติสัน. 2495. การศึกษาเภสัชวิทยา : ันหญ้าไต่ใบ. *สารศิริราช* 4 : 641-649.
- เพชรวิ เหมือนวงศ์ญาติ. 2526. *คู่มือการใช้สมุนไพร*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : เมดิคัลมีเดีย. 85.
- Foo, LY. 1993. Amiriin, a di-dehydrohexahydroxy diphenoyl hydrolysable tannin from *Phyllanthus amarus* *Phytochem* 33 (2) : 487-491.
- Foo, LY. and Wong, H. 1992 *Phyllanthusiin D*, an unusual hydrolysable tannin from *Phyllanthus amarus*. *Phytochem* 31 (2) : 711-713.
- Macrae, WD, Hudson, JB and Towers, GHN. 1988. Studies on the pharmacological activity of *Amozoniae euphorbiaceae*. *J. Ethnopharmacol.* 22 (2) : 143-172.

- Prakash, P ; Satyan, KS ; Wahi, SP and Singh, RP. 1995. Comparative hepatoprotective activity of three *Phyllanthus* species, *P. urinaria*, *P. niruri* and *P. simplex*, on carbon tetrachloride induced liver injury in the rat. *Phytother Res* 918 : 594-596.
- Sahm, DF ; Washington, JA. 1991. Antimicrobial susceptibility tests: Dilution methods. In Balows A ; Hausler Jr., WJ ; Herrmann, KL; Isenberg, HD. and Shadomy, HJ. (Eds) *Manual of Clinical Microbiology*, 5<sup>th</sup> ed. Washington, DC : American Society for Microbiology. pp. 1105-1116.
- Sripanidkulchai, B, et. al. 2001. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of *Phyllanthus amarus*. *Phytomedicine.* 9/1:26-32.
- Thamlikitkul, V ; Wasuwat, S and Kanchanapee, P. 1991. Efficacy of *Phyllanthus amarus* for eradication of hepatitis B virus in chronic carriers. *J. Med. Asso. Thai* 74(9) : 481-485.
- Thongkrajai, P ; Lulitanon, V and Chamnanvanakit. 1989. Improved ELISA with immunoabsorbent purified mycobacterial antigen for serodiagnosis of tuberculosis *J. Med. Microbiol* 30:101-104.
- Thyagarajan, SP ; Subramanian, S ; Thirunalasundari, T, Venkateswaran, PS and Blumberg, BS. 1988. Effect of *Phyllanthus* on chronic carriers of hepatitis B virus. *The Lancet* 1 (October) : 764-768.
- Unander, DW and Blumberg, BS. 1991. In vitro activity of *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) species against the DNA polymerase of hepatitis viruses : effects of growing environment and inter-and intra-specific differences. *Econ-Bot* 45(2) : 225-242.

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของส่วนสกัดด้วยน้ำจากลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ

เชื้อที่ทดสอบ	Minimum bactericidal concentration (mg/ml)	
	ลูกใต้ใบ (P. amarus)	หญ้าใต้ใบ (P. urinaria)
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	3.91	62.5
<i>Ps. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	31.25	> 125
<i>Shigella species</i>	31.25	> 125
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	62.50	> 125



รูปที่ 1 การยับยั้งไวรัสตับอักเสบบี ของส่วนสกัดด้วยน้ำของลูกใต้ใบ (*P. amarus*) และหญ้าใต้ใบ (*P. urinaria*) ให้ค่า IC<sub>50</sub> ที่ 1,682 ng/100 µl และ 1,812 µg/100 µl ตามลำดับ