

ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนของสารสกัดหยาบพิษน้ำที่รับประทานได้

ปราณี นางงาม*, ขยพล ศรีพินนาม†, ชนนิษฐ์ ชูพยัคฆ์‡

* ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

† ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

‡ ผู้รับผิดชอบบทความ: chonnanito@nu.ac.th

บทคัดย่อ

ปัญหาเชื้อแบคทีเรียคือยารักษาเป็นปัญหาใหญ่ของมนุษยชาติ จึงจำเป็นต้องทำการค้นคว้าหาสารชนิดใหม่ ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงจากธรรมชาติ เพื่อพัฒนาเป็นยากำจัดเชื้อแบคทีเรียชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพ การศึกษานี้ ได้ทำการรวบรวมพืชน้ำจากแหล่งน้ำในธรรมชาติและในตลาดสด จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 12 ชนิด โดยเลือกชนิดที่มีความสัมพันธ์กับการใช้รักษาทางการแพทย์แผนไทย ฤทธิ์ทางชีวภาพ และสารทุติยภูมิที่พบในส่วนของพืชที่รับประทานได้ นำชิ้นส่วนแห้งของพืชมาทำการสกัดด้วยเอทานอล หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจำนวน 5 สายพันธุ์ การทดสอบในเบื้องต้นด้วยวิธี agar-disc diffusion สามารถจัดกลุ่มพืชตามความสามารถในการยับยั้งได้เป็น 5 กลุ่มคือ 1) กลุ่มฤทธิ์สูง คือ แพงพวยน้ำและก้านจอง 2) กลุ่มฤทธิ์ค่อนข้างสูง คือ บัวหลวงและผักบุ้ง 3) กลุ่มฤทธิ์ปานกลาง คือ ผักกูด บัวสายและแฉ่งแก้ว 4) กลุ่มฤทธิ์น้อย คือ กระเจ็ดและโสนอินเดีย และ 5) กลุ่มไม่มีฤทธิ์ คือ ใสน้ำ ผักตบชวาและผักแว่น พบว่าสารสกัดมีผลยับยั้งเชื้อแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ เรียงความไวของเชื้อต่อสารสกัดจากมากไปน้อยได้เป็น *Staphylococcus pyogenes* > *Streptococcus pneumoniae* > *Salmonella typhimurium* > *Staphylococcus aureus* > *Escherichia coli* ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยวิธี micro-broth dilution ยืนยันว่าสารสกัดแพงพวยน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแกรมบวก *S. pyogenes* และ *S. pneumoniae* (0.625 มก./มล.) มากกว่าเชื้อแกรมลบ *S. typhimurium* (5 มก./มล.) ในขณะที่สารสกัดก้านจองมีฤทธิ์ต่อเชื้อทั้ง 5 ชนิดใกล้เคียงกัน (1.25 มก./มล.) ผลที่ได้บ่งชี้ถึงศักยภาพของแพงพวยน้ำและก้านจองที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ต่อไป

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย แบคทีเรียก่อโรคในคน พืชน้ำกินได้ สมุนไพร

Antibacterial Activity against Common Human Pathogenic Bacteria of Edible Aquatic Plant Extracts

Pranee Nanggam^{*}, Chayaphon Sripannam[†], Chonnanit Choopayak^{†,‡}

^{*}Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Tha Pho Sub-District, Mueang Phitsanulok District, Phitsanulok 65000, Thailand

[†]Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Tha Pho Sub-District, Mueang Phitsanulok District, Phitsanulok 65000, Thailand

[‡]Corresponding author: chonnanitc@nu.ac.th

Abstract

Bacterial antibiotic resistance is a big issue of mankind. It is thus necessary to discover new compounds with high antibacterial activity from natural sources for further development as a new effective antibacterial drug. In this study, 12 edible aquatic plants were collected from nature and fresh markets in Phitsanulok province based on their therapeutic uses in Thai traditional medicine, biological properties and secondary components in the edible parts. Absolute ethanol extraction of dried pieces of the plants was undertaken. Afterwards, the crude extracts were screened for antibacterial activity against five human pathogenic bacteria using agar-disc diffusion assay. Based on their antimicrobial activities, the plants were classified into five groups: 1) high activity – *Ludwigia adscendens* and *Limncharis flava*; 2) quite high activity – *Nelumbo nucifera*, *Ipomoea aquatica*; 3) moderate activity – *Diplazium esculentum*, *Nymphaea pubescens*, *Hydrocotyle speciose*; 4) low activity – *Neptunia oleracea*, *Sesbania speciose*; and 5) no activity – *Wolffia globosa*, *Eichhornia crassipes*, *Marsilea crenata*. The extracts had more inhibitory activity on Gram positive than Gram negative bacteria, ranging from high to low: *Staphylococcus pyogenes* > *Streptococcus pneumoniae* > *Salmonella typhimurium* > *Staphylococcus aureus* > *Escherichia coli*. The minimum inhibitory concentration testing by micro-dilution assay confirmed that *L. adscendens* more dramatically affected Gram positive *S. pyogenes* and *S. pneumoniae* (MIC 0.625 mg/mL) than Gram negative *S. typhimurium* (MIC 5 mg/mL), whereas *L. flava* showed a similar effect on tested bacteria (MIC 1.25 mg/mL). Taken together, *L. adscendens* and *L. flava* are promising aquatic sources for further application.

Key words: antibacterial activity, human pathogenic bacteria, edible aquatic vegetable, herb

บทนำและวัตถุประสงค์

ประเทศไทยมีความได้เปรียบด้านภูมิประเทศ ภูมิอากาศ ที่มีพื้นที่ราบลุ่มน้ำท่วมถึงอยู่หลายที่ ประกอบกับมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมากใน แหล่งน้ำทางธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นห้วย หนอง คลอง บึง สามารถพบพืชน้ำได้นานาพรรณ ที่นอกจากจะใช้ รับประทานได้แล้ว ยังใช้เป็นยาในการรักษาโรคตั้งแต่

โบราณกาล ดังที่ได้พบบันทึกเอกสารทางการแพทย์ แผนโบราณ หรือ ในตำราการแพทย์แผนไทย^[1] พืช น้ำบางชนิดมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ประโยชน์ สามารถปรับตัวได้ดี เจริญเติบโตได้รวดเร็ว ศัตรูพืชน้อย ไม่ต้องการการดูแลรักษามากนัก พบว่าพืชน้ำ เป็นแหล่งของอาหารสำหรับมนุษย์ มีรายงานถึงพืชน้ำ ที่สามารถนำมาปรุงเป็นอาหารทั้งคาวและหวานได้มาก

ถึง 59 ชนิด^[2] พืชน้ำมีสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกายสูง โดยเฉพาะวิตามิน เกลือแร่และเส้นใย และยังมีสารทุติยภูมิอยู่ในปริมาณมาก ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่เป็นประโยชน์กับมนุษย์ ไม่ว่าจะเป็นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เป็นต้น มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ด้านแบคทีเรียและองค์ประกอบทางเคมีของพืชน้ำในประเทศอินเดีย 5 ชนิด คือ *Ludwigia adscendens*, *Polygonum glabrum*, *Nagassaria marina*, *Hygraphila auriculata* และ *Lemna gibba* ต่อเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Proteus vulgaris* โดยการสกัดส่วนต่าง ๆ ของพืชด้วยตัวทำละลายหลายชนิด พบว่าเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ด้านแบคทีเรียสูงต่อแบคทีเรียหลายชนิด สารสกัดน้ำจากใบของ *P. glabrum* มีองค์ประกอบแทนนิน ฟีนอลิก และอัลคาลอยด์ ส่วนสารสกัดเมทานอลของลำต้นและดอกของ *H. auriculata* มีอัลคาลอยด์^[3] นอกจากนั้นมียางจนถึงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของบัวสายซึ่งมีศักยภาพในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง^[4] พืชน้ำจึงนับได้ว่าเป็นแหล่งของวัตถุดิบในธรรมชาติที่มีคุณค่า ในการที่จะนำมาใช้บริโภค หรือ สกัดสารหยาบ หรือ แม้กระทั่งเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตสารเคมีที่มีฤทธิ์สูง ที่จะสามารถนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรค หรือ ใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ทางด้านสุขภาพต่าง ๆ ได้

ปัจจุบันพบว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น^[5] ทำให้ต้องเร่งหาสารชนิดใหม่จากธรรมชาติเพื่อนำมาพัฒนาเป็นยากำจัดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทดแทนยาเดิมที่เชื้อดื้อไปแล้ว มีรายงานสารสกัดจากพืชหลากหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์^[6] สารสกัดจากกานพลู^[7] มีฤทธิ์ยับยั้ง

แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษ ที่พบการปนเปื้อนเป็นอันดับหนึ่งในอาหาร น้ำดื่มจากการสำรวจในเขตสุขภาพที่ 2^[8] มะเขือพวง^[9] ยับยั้ง *Salmonella typhimurium* สาเหตุของโรคในระบบทางเดินอาหาร ลำไส้อักเสบ สารสกัดมะรุ่ม^[10] ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus pyogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เป็นสาเหตุหลักของการเกิดอาการเจ็บคอ ทำให้เกิดทอนซิลอักเสบ มีไข้สูง มีโอกาสที่จะพัฒนาไปเป็นไข้รูมาติกและไตอักเสบเฉียบพลันได้ สารสกัดจากเปลือกไม้โกงกาง^[11] ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Streptococcus pneumoniae* ซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาส ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ และสารสกัดมะหาด^[12] ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* สาเหตุของการติดเชื้อที่ผิวหนัง ก่อโรคอาหารเป็นพิษ มีรายงานที่บ่งชี้ว่าพืชน้ำมีศักยภาพในการเป็นแหล่งของยาต้านแบคทีเรียที่ดีได้ ได้แก่ แพงพวนน้ำ^[13] เปลือกและใบต้นหัวลิง (*Sarcolobus globosus*) ซึ่งเป็นพืชน้ำในป่าชายเลน พบว่าสารสกัดสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus*) และแบคทีเรียแกรมลบได้ (*E. coli*)^[14] แต่อย่างไรก็ตามการจะใช้ประโยชน์จากพืชน้ำนั้น ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากการศึกษาเกี่ยวกับชนิดของสารออกฤทธิ์ รวมถึงฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชน้ำนั้น มีการศึกษาอยู่อย่างจำกัดเพียงพืชไม่กี่ชนิดส่วนใหญ่จะศึกษาพืชน้ำเดียว ไม่ได้มีการเปรียบเทียบพืชหลายชนิดอย่างเป็นระบบ และ พื้นที่ในการศึกษาพืชน้ำนั้นยังไม่หลากหลาย มีการศึกษาในพื้นที่บางแห่งเท่านั้น

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคน ของสารสกัดหยาบที่ได้จากพืชน้ำในจังหวัดพิษณุโลก จำนวน 12 ชนิด

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 พืชทดสอบและการระบุชื่อวิทยาศาสตร์

พืชที่ใช้ศึกษา ประกอบด้วยพืชน้ำที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ในธรรมชาติ จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 12 ชนิด โดยเลือกจากพืชที่มีสรรพคุณตามตำราทางการแพทย์แผนไทย ประกอบกับรายงานการศึกษาถึงฤทธิ์ด้านจุลชีพและสารทุติยภูมิที่มีความเกี่ยวข้อง (ตารางที่ 1) ตัวอย่างพืชได้รับการระบุชื่อวิทยาศาสตร์โดย ผศ.ดร.ปราณี นางงาม ซึ่งเป็นนักอนุกรมวิธานพืช ตัวอย่างพรรณไม้แห้งได้รับการใส่รหัสและถูกเก็บไว้ที่ห้องเก็บตัวอย่างพรรณไม้ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลกโดยใช้พู่

(*Piper betle* L.) เป็นพืชควบคุมบวก เนื่องจากมีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ว่า สารสกัดพุ่มมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูง ต่อทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และเป็นการเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารที่สกัดภายใต้สภาวะเดียวกันกับพืชน้ำ

2. วิธีการศึกษา

2.1 การสกัดสารจากพืช

นำชิ้นส่วนของพืชที่เก็บรวบรวมมาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง ทำให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำตัวอย่างแห้งชนิดละ 20 กรัม มาทำให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ หมักใน 99% เอทานอล (AR grade, MERCK) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในโหลแก้วที่ปิดฝาไว้แน่น วางในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ทำการเขย่าผสมเป็น

ตารางที่ 1 สรรพคุณและสารทุติยภูมิในพืชน้ำ จำนวน 12 ชนิด

พืช	สรรพคุณตามตำราแพทย์แผนไทย ^[1]	สารทุติยภูมิที่พบมากในพืช
แพงพวยน้ำ	ใบ รสจืดเย็น ดับพิษร้อน ถอนพิษไข้	protocatechuic acid, betulin, quercetin ^[15]
ก้านจอบ	-	hydroxybenzoic acid, rutin, ferulic acid ^[16]
บัวหลวง	ไหล รสหวานเย็นมัน ดับพิษร้อน แก้ไข้ แก้ร้อนใน กระหายน้ำ บำรุงกำลัง แก้ดีพิการ	betulinic acid, rutin, isoquercetin ^[17]
ผักบุ้ง	ใบ ทั้งต้น รสจืด ถอนพิษ แก้พิษ แก้ตาฟาง	rutin, nicotiflorin ^[18]
ผักกูด	ใบ รสเย็น แก้ไข้ แก้ตัวร้อน แก้พิษอักเสบ	cinnamic acid, protocatechuic acid, rutin, ecdysteroids ^[19]
บัวสาย	รสฝาดหอมเย็น บำรุงหัวใจ ช่วยเจริญอาหาร ป้องกันไข้หวัด	isorhamnetin, quercetin rhamnoside, myricetin ^[4]
แว่นแก้ว	-	limonene, β -pinene ^[20]
กระเจต	รสจืดเย็น แก้ไข้ตัวร้อน ถอนพิษอักเสบ	quercetin, kaempferol, myricetin ^[21]
โสนอินเดีย	ดอก รสหวานเย็น สมานลำไส้	quercetin rhamnosylrutinoside ^[22]
ไช้	-	β -sitosterol, stigmasterol ^[3]
ผักตบชวา	ทั้งต้น รสจืด แก้พิษภายในร่างกาย ขับลม	stigmasterol, azulene ^[23]
ผักแว่น	รสจืดเย็น แก้ร้อนในกระหายน้ำ ดับพิษ	neophytadiene, phytol ^[24]

ระยะ เมื่อครบเวลานำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำของเหลวที่ผ่านการกรองไปประเหยตัวทำละลายออกภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) จนได้สารสกัดในรูปสารสกัดหยาบ เก็บในขวดสีชา ที่มีด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2. การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการศึกษาได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.อักษรจักร คำมาสุ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ทำการคัดแยกและระบุชนิดของเชื้อด้วยตนเอง ประกอบด้วย 5 สายพันธุ์ คือ 1) *Staphylococcus pyogenes*, 2) *Streptococcus pneumoniae*, 3) *Salmonella typhimurium*, 4) *Staphylococcus aureus* และ 5) *Escherichia coli* นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีแบคทีเรียแต่ละชนิดใส่ในอาหารเหลว NA 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วนำไปศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด

2.3. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ ด้วยวิธี agar-disc diffusion^[25]

ปรับปริมาณของเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ใน 0.85% sodium chloride (แบคทีเรียมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.5×10^8 CFU/มล.) จากนั้นใช้ไม้ปั่นสำลีปาดจากเชื้อจุ่มลงในเชื้อที่เตรียมไว้แต่ละชนิด นำมาเกลี่ยให้ทั่วบนผิวหน้าอาหาร Nutrient agar (NA) หลังจากเชื้อแห้งใช้ที่คีบปลอดเชื้อ คีบแผ่นกระดาษทดสอบปาดจากเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Advantec) วางให้แนบผิวหน้าอาหาร แล้วหยดสารสกัดหยาบความเข้มข้น 10 มก./มล. ที่ละลายใน 1%DMSO ปริมาตร

20 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษ โดยใช้สารสกัดพลูเป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) และ 1%DMSO เป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกข้อมูลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสที่เกิดขึ้น ทำการทดลองแต่ละตัวอย่าง 3 ซ้ำ

2.4. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ด้วยวิธี resazurin micro-broth dilution^[25]

เติมสารสกัดหยาบลงในหลุมของ 96 microwell plates ที่มีเชื้อความเข้มข้น McFarland standard No. 0.5 โดยให้ความเข้มข้นของสารสกัดเจือจางลงครั้งละ 2 เท่า (2 folds serial dilution) ด้วยอาหาร NA ตั้งแต่ 10 มก./มล. ลงไปเป็น 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.31 และ 0.156 มก./มล. ตามลำดับ โดยมีกลุ่มควบคุมที่มีแต่สารสกัดไม่มีเชื้อ และกลุ่มควบคุมที่มีแต่เชื้อไม่มีสารสกัด นำไมโครเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาทำการเติม resazurin แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สังเกตและจดบันทึกการเปลี่ยนสีน้ำเงินเป็นสีชมพู

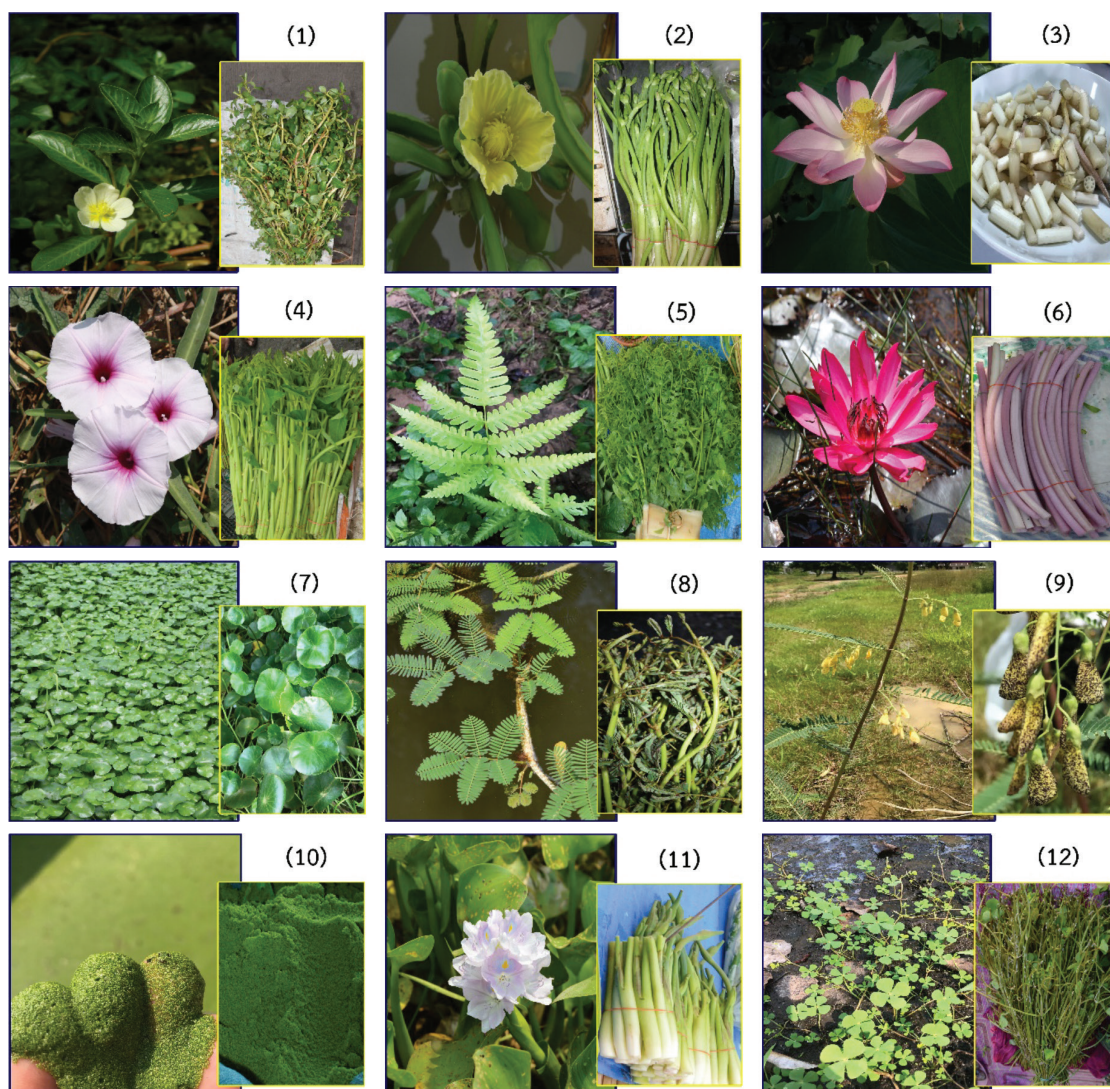
ผลการศึกษา

1. พิษทดสอบและการระบุชื่อวิทยาศาสตร์

ทำการรวบรวมพืชน้ำจากแหล่งธรรมชาติ เช่น หนอง บึง ในจังหวัดพิษณุโลก ได้จำนวน 12 ชนิด 11 วงศ์ ประกอบด้วยพืชดอก ใบเลี้ยงคู่ 7 ชนิด คือ กระเจต บัวสาย บัวหลวง ผักบุ้ง แพงพวยน้ำ แฉ่น แก้ว และ โสนอินเดีย ใบเลี้ยงเดี่ยว 3 ชนิด คือ ก้านจอบ ไข่น้ำ และ ผักตบชวา และพืชกลุ่มเฟิร์น 2 ชนิด

คือ ผักกูด และผักแว่น หรือ ถ้าแบ่งตามนิเวศวิทยา พบ 3 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ พืชลอยน้ำ 3 ชนิด ซึ่งเป็นพืช น้ำที่แท้จริง จะต้องดำรงชีวิตในน้ำ ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ถ้าไม่มีน้ำเป็นแหล่งอาศัย กลุ่มที่ 2 คือพืช โผล่เหนือน้ำ 3 ชนิด พืชกลุ่มนี้ มีความใกล้เคียงพืช ทรายน้ำ แต่การเจริญต้องมีน้ำท่วมขัง จะทนการขาด

น้ำได้ไม่เกิน 1 ฤดูกาล และสุดท้ายคือกลุ่มพืชชายน้ำ 6 ชนิด พืชชายน้ำสามารถเจริญอยู่ในแหล่งน้ำที่ไม่มี น้ำได้ระยะเวลานานคล้ายพืชบกแต่เมื่อน้ำท่วมถึงก็ จะเจริญลงในแหล่งน้ำและมีลักษณะวิสัยคล้ายพืช ลอยน้ำ การศึกษาครั้งนี้ไม่มีกลุ่มพืชใต้น้ำ (ภาพที่ 1 และ ตารางที่ 2)



ภาพที่ 1 ภาพส่วนของพืชน้ำที่ใช้ในการศึกษา เรียงตามฤทธิ์ด้านแบคทีเรียจากมีฤทธิ์มากไปน้อย (1) แพงพวยน้ำ (2) ก้านจอบ (3) บัวหลวง (4) ผักบุ้ง (5) ผักกูด (6) บัวสาย (7) แวนแกว่ (8) กระเจต (9) โสนอินเดียน (10) ไข่น้ำ (11) ผักตบชวา (12) ผักแว่น (ภาพถ่ายโดย ปราณี นางงาม)

ตารางที่ 2 ชนิดพืชน้ำที่ทดสอบ การจัดหมวดหมู่ และเลขทะเบียนตัวอย่างหลักฐาน [อักษรย่อ E = Emerged plant (พืชโผล่เหนือน้ำ), F = Floating plant (พืชลอยน้ำ), M = Marginal plant (พืชชายน้ำ)]

ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์/วงศ์	เลขทะเบียนตัวอย่าง
พืชดอกใบเลี้ยงคู่		
กระเฉด	<i>Neptunia oleracea</i> Lour./Fabaceae ^F	05700
บัวสาย	<i>Nymphaea pubescens</i> Willd./Nymphaeaceae ^E	05701
บัวหลวง	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaerth./Nelumbonaceae ^E	05702
ผักบุ้ง	<i>Ipomoea aquatica</i> Forssk./Convolvulaceae ^M	05703
แพงพวยน้ำ	<i>Ludwigia adscendens</i> (L.) H. Hara/Onagraceae ^M	05704
แว่นแก้ว	<i>Hydrocotyle umbellata</i> L./Apiaceae ^M	05705
โสนอินเดีย	<i>Sesbania speciosa</i> Taub. ex Ebgf./Fabaceae ^M	05706
พืชดอกใบเลี้ยงเดี่ยว		
ก้านจอบ	<i>Limnocharis flava</i> (L.) Buchenau/ Alismataceae ^E	05707
ไข่น้ำ	<i>Wolffia globosa</i> (Roxb.) Hartog & Plas/ Araceae ^F	05708
ผักตบชวา	<i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms/ Pontederiaceae ^F	05709
เฟิร์น		
ผักกูด	<i>Diplazium esculentum</i> (Retz.) Swartz./ Athyriaceae ^M	05710
ผักแว่น	<i>Marsilea crenata</i> C. Presl./Marsileaceae ^M	05711

2. การสกัดสารจากพืชน้ำ

ส่วนของพืชน้ำที่ใช้ในการศึกษาเป็นส่วนของพืชชนิดนั้นที่ใช้ในการบริโภค หลังจากอบจนแห้งแล้วนำมาสกัดโดยตัวทำละลาย 99% เอทานอล เมื่อระเหยตัวทำละลายออกจะได้สารสกัดที่มีลักษณะ และปริมาณที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3) ส่วนใหญ่สารที่สกัดได้จะมีลักษณะเหมือนคาราเมลข้นหนืด ยกเว้นยอดอ่อนของแพงพวยน้ำที่ได้สารสกัดเป็นผง สีของสารสกัดส่วนใหญ่จะได้สีเขียวเข้ม ในขณะที่สารสกัดดอกโสนอินเดียและไหลบัวเหลืองมีสีเหลือง สารสกัดแพงพวยน้ำมีสีน้ำตาลเข้ม

3. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดพืชน้ำในเบื้องต้น โดยวิธี agar-disc diffusion assay

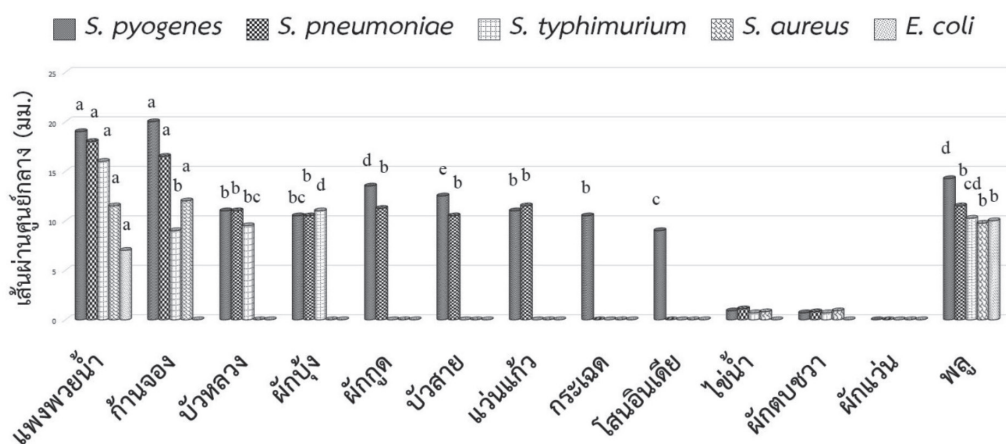
จากการตรวจสอบในเบื้องต้นพบว่าในบรรดาสารสกัดทั้งหมดที่ทดสอบนั้น สารสกัดจากยอดอ่อนและดอกของแพงพวยน้ำและก้านจอบ (หรือตาลปัตรฤๅษี) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้อย่างชัดเจน ให้น้ำขนาดของบริเวณใสกว่า เมื่อเทียบกับสารสกัดพลูซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมบวก และ DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ใช้ละลายสารสกัดและใช้เป็นตัวควบคุมลบที่ไม่พบบริเวณยับยั้ง สาร

ตารางที่ 3 ลักษณะของสารสกัดจากพืชน้ำและปริมาณที่สกัดได้

ชื่อพืช	ส่วนที่ใช้สกัดสาร	ลักษณะสารสกัด	% yield (w/dried w)
แพงพวยน้ำ	ยอดอ่อนและดอก	ผงแห้ง สีน้ำตาลเข้ม	7.50
ก้านจอก	ยอดอ่อนและดอก	ชั้นหนืด สีเขียวเข้ม	8.25
บัวหลวง	ไหล	ชั้นหนืด สีเหลือง	5.30
ผักบุ้ง	ยอดอ่อน	ชั้นหนืด สีเขียวเข้ม	4.63
ผักกูด	ยอดอ่อน	ชั้นหนืด สีเขียวเข้ม	1.45
บัวสาย	ก้านดอก	ชั้นหนืด สีเขียวเข้ม	3.25
แว่นแก้ว	ส่วนเหนือดิน	ชั้นหนืด สีเขียวเข้ม	5.80
กระเจต	ยอดอ่อน	ชั้นหนืด สีเขียวเข้ม	2.93
โสนอินเดีย	ดอก	ชั้นหนืด สีเหลือง	9.15
ไข่น้ำ	ทั้งต้น	ชั้นหนืด สีเขียวเข้ม	3.88
ผักตบชวา	ยอดอ่อน	ชั้นหนืด สีเขียวเข้ม	6.25
ผักแว่น	ส่วนเหนือดิน	ชั้นหนืด สีเขียวเข้ม	6.45

สกัดพืชน้ำมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (บริเวณใสรอบแผ่นทดสอบ) ได้แตกต่างกัน (ภาพที่ 2) โดยพบว่า สารสกัดแพงพวยน้ำและสารสกัดก้านจอกมีฤทธิ์สูงกว่าพืชทดสอบชนิดอื่น โดยมีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียทุกชนิด และมีขนาดบริเวณใสใกล้เคียงกับตัวควบคุมบวกสารสกัดพลู เมื่อแบ่งกลุ่มสารสกัดตามความสามารถในการยับยั้งหรือขนาดของบริเวณใส จะจัดกลุ่มสารสกัดได้เป็น 5 กลุ่มคือ 1) กลุ่มที่มีฤทธิ์สูง สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทุกชนิด และยับยั้งได้มาก ประกอบด้วยแพงพวยน้ำและก้านจอก 2) กลุ่มที่มีฤทธิ์ค่อนข้างสูง คือ บัวหลวงและผักบุ้ง สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ 3 ชนิด โดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกคือ *S. pyogenes* กับ *S. pneumoniae* และแบคทีเรียแกรมลบ *S. typhimurium* 3) กลุ่มที่มีฤทธิ์ปานกลาง คือ ผักกูด บัวสายและแว่นแก้ว สามารถยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *S. pyogenes* กับ *S. pneumoniae* 4) กลุ่มที่มี

ฤทธิ์น้อย คือ กระเจตและโสนอินเดีย สามารถยับยั้งได้เฉพาะ *S. pyogenes* และ 5) กลุ่มไม่มีฤทธิ์ คือ ไข่น้ำ ผักตบชวาและผักแว่น ไม่พบบริเวณยับยั้งต่อทุกเชื้อ เมื่อเรียงลำดับความไวของเชื้อต่อสารสกัด พบว่าแบคทีเรียแกรมบวกมีความไวต่อสารสกัดมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารสกัดมากที่สุดคือ แบคทีเรียแกรมบวก *S. pyogenes* รองลงมาคือ *S. pneumoniae* สามารถถูกยับยั้งได้โดยสารสกัด 9 ชนิด และ 7 ชนิด จากทั้งหมด 12 ชนิด ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ *S. typhimurium* และ *E. coli* ถูกยับยั้งได้น้อยโดยสารสกัด 4 ชนิด และ 1 ชนิด ตามลำดับ สำหรับ *S. aureus* แม้จะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก แต่พบว่าความไวต่อสารสกัดค่อนข้างต่ำ ถูกยับยั้งได้โดยสารสกัด 2 ชนิดเท่านั้น ความไวต่อสารสกัดของเชื้อเรียงจากมากไปน้อย *S. pyogenes* > *S. pneumoniae* > *S. typhimurium* > *S. aureus* > *E. coli* ตามลำดับ

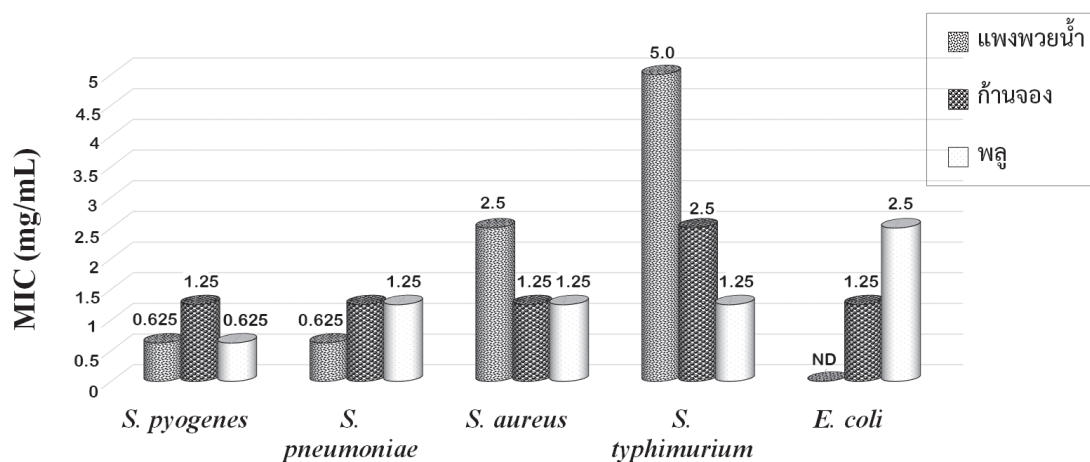


ภาพที่ 2 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเบื้องต้นของสารสกัดน้ำทั้ง 12 ชนิด โดยวิธี agar-disc diffusion โดยเทียบกับ DMSO เป็นตัวควบคุมลบ และ สารสกัดพลุเป็นตัวควบคุมบวก ตัวอักษรเล็กบนแท่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เทียบระหว่างฤทธิ์ของสารสกัดชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกัน

4. การหาความไวของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี resazurin micro-broth dilution

ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ยืนยันผลการตรวจสอบฤทธิ์ในเบื้องต้น ส่วนใหญ่ไปในทิศทางเดียวกัน โดยมีบางประเด็นที่ไม่สอดคล้องกัน พบว่าสารสกัดแผลพวยน้ำและก้านจอบมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ในขณะที่สารที่เหลืออีก 10 ชนิดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ในช่วงความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ (0-10 มก./มล.) สารสกัดแผลพวยน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแกรมบวก *S. pyogenes* และ *S. pneumoniae* (0.625 มก./มล.) *S. aureus* (2.5 มก./มล.) ได้ดีกว่า

เชื้อแกรมลบ *S. typhimurium* (5 มก./มล.) และไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ ในขณะที่สารสกัดก้านจอบมีฤทธิ์ต่อเชื้อทั้ง 5 ชนิดใกล้เคียงกัน รวมถึงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* (1.25-5 มก./มล.) ซึ่งผลต่อเชื้อ *E. coli* ของทั้งสองสารสกัด ไม่สอดคล้องกับผล agar-disc diffusion เมื่อเทียบกับสารสกัดพลุซึ่งเป็นตัวควบคุมบวกแล้ว สารสกัดพืชน้ำสามารถยับยั้งเชื้อได้แตกต่างกัน สำหรับ *S. pyogenes* และ *S. pneumoniae* แล้ว แผลพวยน้ำยับยั้งได้ดีที่สุดมากกว่าหรือเทียบเท่าพลุ สำหรับ *S. typhimurium* ไม่มีสารสกัดพืชน้ำใดมีฤทธิ์ดีเท่าพลุ สำหรับ *S. aureus* สารสกัดก้านจอบมีฤทธิ์เทียบเท่าสารสกัดพลุ และสำหรับ *E. coli* สารสกัดก้านจอบมีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดพลุ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดแพงพวยน้ำและก้านจอบ โดยวิธี micro-broth dilution โดยเทียบกับ DMSO เป็นตัวควบคุมลบ และ สารสกัดพลุเป็นตัวควบคุมบวก ตัวเลขบนแท่งคือค่า MIC, ND คือ not detected

อภิปรายผล

ผลการศึกษาของพืชน้ำ 12 ชนิดพบว่าสารสกัดเอทานอลของพืชน้ำส่วนใหญ่ 9 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ ยกเว้นใข้ น้ำ ผักตบชวาและผักแว่น สารสกัดส่วนใหญ่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยพบว่ามีสารสกัด 2 ชนิดเท่านั้นที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ได้ คือ แพงพวยน้ำและก้านจอบ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงกว่าพืชน้ำอื่น ในขณะที่แพงพวยน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. pyogenes* (MIC 0.625 มก./มล.), *S. pneumoniae* (MIC 0.625 มก./มล.) และ *S. aureus* (MIC 2.5 มก./มล.) มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ *S. typhimurium* (MIC 5 มก./มล.) และ *E. coli* (MIC >10 มก./มล.) ก้านจอบมีฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบใกล้เคียงกัน (MIC 1.25-2.5 มก./มล.) เมื่อเทียบระหว่างแพงพวยน้ำและก้านจอบแล้วพบว่าสารสกัดแพงพวยน้ำมี

ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. pyogenes* และ *S. pneumoniae* ได้มากกว่า ในขณะที่ก้านจอบมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *S. typhimurium* และ *E. coli* ได้ดีกว่าแพงพวยน้ำ

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชน้ำนั้น เนื่องมาจากชนิดของสารเคมีองค์ประกอบที่อยู่ในสารสกัดที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ และ อัลคาลอยด์ ที่ทำให้พืชน้ำที่ศึกษาในประเทศอินเดียมีฤทธิ์แตกต่างกันออกไป^[3] การที่แพงพวยน้ำมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้หลายชนิดนั้น สัมพันธ์กับการที่ประกอบด้วยสารทุติยภูมิหลายกลุ่ม ทั้งฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และ เทอร์ปีนอยด์ ส่วนผักแว่น แวนแก้วที่มีเฉพาะสารเทอร์ปีน และใข้ น้ำ ผักตบชวาที่มีสเตอรอลเป็นหลัก มีฤทธิ์น้อยกว่าพืชอื่น

สารทุติยภูมิที่มีอยู่ในสารสกัดพืชน้ำ 12 ชนิดที่ศึกษานั้น จัดกลุ่มสารได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม

ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก เทอร์พีนอยด์ และสเตอรอล พบว่าพืชน้ำมีสารส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม 1) ฟลาโวนอยด์ ได้แก่ quercetin และ rutin (quercetin rutinoside) พบได้ในแพงพวยน้ำ ก้านจอบ บัวหลวง บัวสาย ผักกูด และผักบุ้ง kaempferol และ nicotiflorin (kaempferol rutinoside) พบได้ในกระเจต และผักบุ้ง myricetin พบได้ในกระเจตและบัวสาย 2) สารในกลุ่มกรดฟีนอลิก ได้แก่ protocatechuic acid พบได้ในแพงพวยน้ำและผักกูด hydroxybenzoic acid และ ferulic acid พบได้ในก้านจอบ cinnamic acid พบได้ในผักกูด 3) สารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์และสเตอรอล ได้แก่ ไดเทอร์พีน betulin พบในแพงพวยน้ำ betulinic acid พบในบัวหลวง โมโนเทอร์พีน limonene และ β -pinene พบในแวนแก้ว สเตอรอล phytol, stigmasterol และ β -sitosterol พบใน ไข่น้ำ ผักตบชวา และ ผักแว่น

พบว่าสารฟลาโวนอยด์ rutin มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* สาร quercetin มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* สาร quercetin rhamnoside มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. typhimurium* สาร myricitrin (myricetin glycoside) มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* สาร myricitrin rhamnoside มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli*, *K. pneumonia* และ *S. aureus* สาร kaempferol มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* สาร nicotiflorin มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* สาร isorhamnetin rhamnoside ยับยั้ง *S. pyogenes* และสาร hydroxyflavanone ยับยั้ง *S. pneumoniae* เป็นต้น กรดฟีนอลิกที่พบมีรายงานว่า มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ ได้แก่ coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid, hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid เป็นต้น^[26] สารเทอร์พีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ได้แก่ betulinic acid และ betulin^[27] สารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้นเพื่อเป้าหมายใน

การปกป้องตนเองจากอันตรายภายนอก ไม่ว่าจะเป็นอันตรายจากสิ่งมีชีวิต หรือไม่มีชีวิต การที่สารเหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ ทำให้พืชที่มีสารเหล่านี้ได้รับความสนใจในการนำไปใช้ประโยชน์ ไม่ว่าจะเป็นอยู่ในรูปพืชวัตถุดิบ หรือ สารสกัดที่จะเป็นยาในการรักษา หรือนำไปทำเป็นเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ทางด้านสุขภาพ เป็นการเพิ่มมูลค่าและรายได้ให้กับเกษตรกรผู้ปลูก

ข้อสรุป

พืชน้ำส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ที่พบได้บ่อย โดยเฉพาะแพงพวยน้ำและก้านจอบ (หรือ ตาลปัตรฤาษี) ที่พบว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้หลายชนิด ทำให้พืชสองชนิดนี้ควรได้รับการส่งเสริมให้มีการปลูกและการใช้ประโยชน์ นอกจากจะใช้รับประทานเป็นอาหารได้แล้วยังสามารถนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ต้านแบคทีเรียได้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.อักษรากร คำมาสุข คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

References

1. Wutithumawech W. Pharmacy Ratanakosin. 3rd ed. Wutithumawech Thai traditional medicine. 2010. 720 p. (in Thai)
2. Nangngam P. Edible aquatic plants. Phitsanulok: Focus printing; 2017. 150 p. (in Thai)
3. Jani M, Shah S, Prajapati S. Antibacterial screening and qualitative phytochemical estimation of selected aquatic plants. Advan. Biol. Res. 2012;6(1):19-23.

4. Tungmunnithum D, Kongsawadworakul P, Hano C. A cosmetic perspective on the antioxidant flavonoids from *Nymphaea lotus* L. *Cosmetics*. 2021;8(12):1-9.
5. Thamlikitkul V. Thailand antimicrobial resistance containment and prevention program. Bangkok: Division of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University; 2015. 114 p. (in Thai)
6. Sritubtim S, Krapeeddeang S, Wongsan N. Biological activities on growth inhibition of bacteria of medicinal plant extracts from plants found in the upper Northeastern Thailand. *SDU Res. J.* 2014;7(1):21-39. (in Thai)
7. Kim SY, Kang DH, Kim JK, Ha YG, Hwang JY, Kim T, Lee SH. Antimicrobial activity of plant extracts against *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* 0157:H7, and *Listeria monocytogenes* on fresh lettuce. *J Food Sci.* 2011;76(1):M41-6.
8. Bunpatanasak S, Siriyota K. Bacterial pathogens causing food poisoning in health regions 2 and Phichit province in 2013-2017. *Journal of Disease Prevention and Control: DPC.2 Phitsanulok*. 2019;6(1):1-15. (in Thai)
9. Pornsakda S, Plainsirichai M, Srisaeard K, Nakornreab M, Laoprasert P, Vichitsoonthonkul T, Photchanachai S. Effect of plate brush (*Solanum torvum* Sw.) crude extract on the inhibition of pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium*). *Agricultural Sci. J.* 2010;41(3/1):573-6. (in Thai)
10. Jantanu S, Yuenrakul P, Jirapong C. Inhibition of *Streptococcus pyogenes* by edible film containing *Moringa oleifera* Lam. extracts. *Huachiew Chalermprakiet Sci Tech.* 2016;2(2):20-7. (in Thai)
11. Chahomchuen T, Siramon P. Antimicrobial activity of crude extract from Rhizophora barks. *King Mongkut's Agricultural Journal*. 2019;37(2):212-20. (in Thai)
12. Ratananikom K, Srikacha N, Khannalao Y. Antibacterial activity of *Artocarpus lakoocha* Roxb. crude extract towards common human pathogens. *J Thai Trad Alt Med.* 2019;17(1):54-62. (in Thai)
13. Barman AK, Kha A, Sarkar KK, Dev S, Das AK, Biswas NN. Antioxidant, antibacterial and toxicity studies of aerial parts of *Ludwigia adscendens* L. *Khulna University Studies*. 2018;15(1&2) 23-36.
14. Aunjun A, Biswas R, Ullah MS, Billah MM, Islam ED, Islam KD. Bioactivity analysis of *Sarcolobus globosus* Wall., a mangrove plant of the Sundarbans. *J Bangladesh Agril Univ.* 2019;17(4):476-82.
15. Shilpi JA, Gray AI, Seidel V. Chemical constituents from *Ludwigia adscendens*. *Biochemical systematics and ecology*. 2010;38(1):106-9.
16. Ooh KF, Ong HC, Wong FC, Chai TT. HPLC profiling of phenolic acids and flavonoids and evaluation of anti-lipoxygenase and antioxidant activities of aquatic vegetable *Limncharis flava*. *Acta Pol Pharm.* 2015;72(5):973-9.
17. Sruthi A, Panjikaran ST, Aneena ER, Pathrose B, Mathew D. Insights into the composition of lotus rhizome. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2019;8(3):3550-5.
18. Gad MH, Tuenter E, El-Sawi N, Younes S, El-Ghadban EM, Demeyer K, Pieters L, Heyden YV, Mangelings D. Identification of some bioactive metabolites in a fractionated methanol extract from *Ipomoea aquatica* (aerial parts) through TLC, HPLC, UPLC-ESI-QTOF-MS and LC-SPE-NMR fingerprints analyses. *Phytochem Anal.* 2018;29(1):5-15.
19. Watanabe M, Miyashita T, Devkota HP. Phenolic compounds and ecdysteroids of *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. (Athyriaceae) from Japan and their chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2021;94:104211.
20. Hamdy SA, Hefnawy HM, Azzam SM, Aboutabl EA. Chemical profiling, volatile oil analysis and anticholinesterase activity of *Hydrocotyle umbellata* L. aerial parts cultivated in Egypt. *South African Journal of Botany*. 2018;115:108-12.
21. Lee SY, Mediani A, Ismail IS, Maulidiani, Abas F. Antioxidant and α -glucosidase inhibitors from *Neptunia oleracea* fractions using ¹H NMR-based metabolomics approach and UHPLC-MS/MS analysis. *BMC Complement Altern Med.* 2019;19(7):1-15.
22. Kathiresan M, Devi PS, Saravanakumar M. Bioactive compounds in *Sesbania sesban* flower and its antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Pharmacy Research*. 2012;5(1):390-3.
23. Anusiya G, Bharathi S, Mukesh PK, Sainandhini G. Gowthama PU. Extraction and molecular characterization of biological compounds from water hyacinth. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 2020;8(5):14-9.
24. Ma'arif B, Agil M, Laswati H. Phytochemical assessment on n-hexane extract and fractions of *Marsilea crenata* Presl. leaves through GC-MS. *Trad. Med. J.*

- 2016;21(2):77-85.
25. Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, Banat IM. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett.* 2016;38(6):1015-9.
26. Lui J, Du C, Beaman HT, Monroe MB. Characterization of phenolic acid antimicrobial and antioxidant structure-property relationships. *Pharmaceutics.* 2020;12(419):1-17.
27. Oloyede HOB, Ajiboye HO, Salawu MO, Ajiboye TO. Influence of oxidative stress on the antibacterial activity of betulin, betulinic acid and ursolic acid. *Microb Pathog.* 2017;111:338-44.