Biochemical Study of Ethanol Extracts of Saliva Officinal's Leaves

Dr.Abbas A. Mohammad
University of Technology, Applied Science Department, Biotechnology Branch /Baghdad
Sallal A.Abdullah
University of Technology,Applied Science Department, Biotechnology Branch/Baghdad
Ali H. Saadoon
University of Technology, Applied Science Department, Biotechnology Branch /Baghdad

Received on: 5/4/2012 & Accepted on: 24/6/2012

ABSTRACT

This study aimed to investigate the antimicrobial activity of ethanol extract of Saliva officinalis leaves.The active chemical components of leaves extracts were estimated and found, it's contain alkaloids,glycosides,flavonoids,terpenes,steroids,saponins, ,phenols ,cumarins and tannies. This study showed that ethanol extracts Saliva officinallis leaves have inhibitory effect on Gram posative and negative bacteria .

From this result we concluded that this plant have a promising medicinal plant as antibacterial ,through out the inhibition effects on bacteria growth.

Keywords: Saliva officinalis , antibacterial

دراسة بايوكيميائية للمستخلص الكحولي لأوراق نبات المرمية Saliva officinalis

الخلاصة

تم تقييم الفعالية المضادة للبكتريا للمستخلص الكحولي لأوراق نبات المرمية Saliva officinalis ، لقد اظهـرت نتـائج التحليـل الكشـوفات الكيميائيـة ان أوراق نبـات المرميـة تحتـوي علـى القلويـدات ، الكلايكوسيدات ، الفلافونات ، التربينات والستيرويدات ، الصابونيات ،الراتنجيات ، الفينولات ،الكومارين والتآنين و أظهر المستخلص تاثيراً سلبياً على البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام Klebsiella pneumonia , E.coli , Proteus vulgaris , Diplococcus pneumonia , Bacillus subtillis . وكان أقل تثبيط عند التركيز ٠,١ ملي غرام/مل . هذه الدراسة تبين أن المستخلص الكحولي لأوراق نبات المرمية له تأثير تثبيطي على نمو البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام .

https://doi.org/10.30684/etj.31.1B.15
2412-0758/University of Technology-Iraq, Baghdad, Iraq
This is an open access article under the CC BY 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

لذا يمكن اعتبار هذه المستخلصات ومركباتها ذات فعالية تثبيطية للبكتريا ، ويمكن الاستفادة منها للسيطرة على الامراض البكتريا كونها مصدر طبيعي لمنع العديد من الاصابات الجرثومية مضادات البكتريا .

المقدمة

أثارت النباتات الطبية أنتباه العلماء والدارسين لأهميتها وأعتمدوها كوصفات علاجية للكثير من الحالات المرضية ، بعد تحديد فعاليتها البايولوجية والكيميائية والدوائية وذلك لسرعة تأثيرها العلاجي وفقدانها التاثيرات الجانبية السلبية التي تحدثها الأدوية المصنعة كيميائياً، ولا تقتصر على هذا فحسب بل تتعداه الى أهميتها في وقاية الجسم من الامراض كونها تمتلك مركبات كيميائية عديده تختلف بانواعها وتراكيزها وتاثيرها بأختلاف النبات المستخدم[١]، ولبعض النباتات الطبية لها تاثيرات مؤثرة على نمو البكتريا والفيروسات ومقاومتها وتخليص الجسم منها ، تشير تقارير منظمة الصحة العالمية (WHO) الى أعتماد النباتات المحلية بدلاً من الأدوية المصنفة كيميائياً [٢] .

أعتمدت العديد من النباتات طبياً للامراض المختلفة فعلى سبيل المثال لا الحصر عرق السوس ، الكرفس ، الصفصاف ،المديد ، الخردل ، المعدنوس ، الحلبة في حين يعد نبات المرمية من ابرز هذه النباتات أذ تحتوي أوراق نبات المرمية على مركبات التربينات (Terpenes) , واهمها التربينات الثنائية Diterpenes مثل Carnosate methyl lacton ,Carnosic acid, Epirosmanol , Oleanane, Carnosol ، والتربينات الثلاثية مثلUrsolic acid [٣] ، كما تحتوي اوراقه على احماض الفينول phenols مثل Rosemaric acid وعلى الزيوت الطيارة [٤]، اضافة الى احتواء اوراق المرمية على العديد من الفيتامينات مثل فيتامين E,C,A ومعقد فيتامين B Vitamin B complex [٥]. لذا تعد النباتات الطبية من اهم المواد لحماية جسم الكائن الحي من تاثيرات المطفرات البيئية لقابلية مكوناته على الحماية من تاثير الطفرات [٦].

نبات المرمية ينتمي الى الفصيلة الشفوية التي تضم الريحان والنعناع والزعتر والمرمية من اشهر وأقدم النباتات التي تستخدم في الطب القديم والحديث [٧]. ونظراً لما تقدم أختير نبات المرمية *Saliva officiniallis* وهو نبات عشبي يوجد على مدار السنة واوسع الأنتشار في بلدان حوض البحر الابيض المتوسط لهذه الدراسة .

المواد وطرائق العمل

تم الحصول على اوراق نبات المرمية من السوق العراقي في كانون الثاني ٢٠١٢، تم تجفيفها في الظل وبدرجة حرارة الغرفة ضمن محيط جيد التهوية , وبعد ذلك طحنت باستعمال مطحنة كهربائية لغرض الحصول على مسحوق النبات الذي أستعمل لتحضير المستخلص الكحولي أخذ ١٠٠ غم من مسحوق اوراق النبات على دفعتين كل دفعة ٥٠ غم ووضعت كل دفعة في داخل كشتبان Thumble ووضعت في جهاز استخلاص سكسوليت Soxhlet حاوية على ٢٥٠ مل من الكحول الا ثيلي ٨٠%، لمدة ٤-٥ ساعات ، بعد ذلك أخذ المستخلص الكحولي لاوراق النبات وتم تجفيفها بدرجة حرارة الغرفة حتى اكتمال الجفاف والتخلص من الكحول . أما في الكشف عن اهم المركبات الفعالة تم وفق ماذكره عبد الوهاب [٨]. تم الحصول على وزن ٢٠ ملغم من ٥٠ غم من مسحوق الاوراق نبات الميرمية بعد

استخلاصها في الكحول الاثيلي ٨٠% والتي تقدر بنسبة استخلاص (٠,٠٠٠٤)، وكان المستخلص ذا لون اخضر داكن مائل الى السواد وذي لزوجة .

عينات البكتريا :

تم الحصول عليها من مختبر الأحياء المجهرية /فرع التقنيات الاحيائية/ الجامعة التكنولوجية , بعد تشخيص العزلات الجرثومية أخضعت لتحليل مظهري وفق لاختبارات كيموحيوية [٩]. تم تحضير المستخلص باخذ واحد غرام من المادة الفعالة مع ١٠ مل من DMF داي مثيل فورمامايد وتحضير المادة الفعالة ومنها تم تحضير عدة تخافيف وقيست اتجاه بكتريا موجبة وسالبة لصبغة كرام gram stain حيث زرعت على وسط Nutrient broth وذلك بتحضيره كما مبين في طريقة التحضير وتم ابقاء نموذجين بدون زرع حيث تم قراءة الطول الموجي لهما بأستخدام جهاز Spectrophotometer بطول موجي قدره 600 nm .

حللت النتائج احصائيا باستخدام التصميم العشوائي الكامل (CRD) Complet Randomized Desing ،ولمعرفة فيما كانت الفروقات بين المعاملات معنوية ام لا أعتمد أختبار دنكن متعدد الحدود Duncun Multiple Test وباستخدام البرنامج الاحصائي SPSS [١٠].

النتائج والمناقشة **Results and Discution**

اظهرت نتائج جدول (١) الكشف عن اهم المركبات الفعالة Active compounds وجود القلويدات ، الكلايكوسيدات ،الفلافونويدات ،التربينات، الستيرويدات ، الصابونيات ،الراتنجيات ،الفينولات ، الكومارين والتاينين في المستخلص الكحولي لاوراق نبات المرمية ، وهذه النتائج تتفق مع توصل اليه Chada [٢،١١]اذ اشار الى احتواء اوراق نبات المرمية على عدة مواد كيميائية مثل العضويات Tanins والصابونيات Saponins والكلايكوسيدات والشمع وبعض الزيوت الطيارة والتربينات Terpenes الثنائية . أما Ulabelen وجماعتة فقد لاحظوا وجود كميات كبيرة من التربينات الثنائية في نبات Saliva heldrechiana وهو أحد اجناس نبات المرمية [١٢] .

وبينت نتائج قراءة الطول الموجي باستخدام جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer بطول موجي 600nm وجود فعالية تثبيطية واضحة للمستخلص الكحولي لاوراق نبات المرمية saliva offrcinallis ضد انواع البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام مقارنة بالعينة القياسية Control ولجميع التراكيز المستخدمة (100,10,1,0.1) مايكروغم /مل ومن خلال النتائج هنالك زيادة التثبيط بزيادة التراكيز المعتمدة لكل من Klebsiella pneumonia , E.coli , Proteus vulgaris , Diplococcus pneumonia , Bacillus subtillis .

لقد أظهرت البكتريا السالبة لصبغة غرام وهي Klebsiella pneumonia وE.coli و Proteus valgaris تأثراً تثبيطياً واضحاً للمستخلص الكحولي لأوراق نبات المرمية عند التركيز ١٠٠ مايكروغم /مل ، أذ كانت قراءة الكثافة الضوئية (**0.169 ± 0.05** ، **0.193 ± 0.06** ، **0.122 ± 0.03**) على التوالي مقارنة بالسيطرة (0.41 ±٠,٠٦ ، 0.367 ±٠,٠٥ ، ٠,٣٤±٠,٠٦ ٥) وكان أفضل التراكيز تثبيطاً لنمو البكتريا عند (100 و10) مايكروغم/مل . اما البكتريا الموجبة لصبغة غرام وهي

Diplococcus pneumonia و **Bacillus subtillis** قد تأثرت عند التركيز ١٠٠ مايكروغم/مل أكثر من تأثر بكتريا السالبة لصبغة كرام ، أذ كان التركيز١٠٠ مايكروغم /مل قد أعطى تثبيطاً يتضح من خلال قراءة الـ (١١,٢±٠,٠٥ ، ٠,١١٤±٠,٠٢) على التوالي مقارنة

بالسيطر ة والتي كانت (٠,٣٣٧±٠,٠٤ ،٠,٣٨٢ ±٠,٠٥) على التوالي . كما يلاحظ أن البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام قد أظهرت التثبيط عند التركيز ٠,١ مايكروغم /مل أذ أعطى تأثيراً واضحاً في قراءة الـ O.D ، وكان التركيز ١٠٠ مايكروغم /مل أفضل التراكيز تثبيطاً لجميع ضروب البكتريا المستخدمة ، ويلاحظ من الشكل (١ و٢ و ٣) حصل تثبيط في أعداد البكتريا السالبة لصبغة غرام ممثلة بـ Klebsiella pneumonia و *E.coli* وProteus vulgaris ، كما يلاحظ في الشكل (٤ و٥) أنخفاض أعداد البكتريا الحية الموجبة لصبغة غرام Diplococcus pneumonia وBacillus subtillis .

من خلال النتائج التي تم الحصول عليها أن المستخلص الكحولي لأوراق نبات المرمية يؤثر على بكتريا الموجبة لصبغة كرام أكثر من بكتريا السالبة لصبغة غرام وهذه النتائج تتفق مع تأثيرالمستخلص الكحولي لأوراق نبات الجرير*a* Eruea sativ [١٣] وتأثير العكبر (Bees gum) العراقي [١٤] .

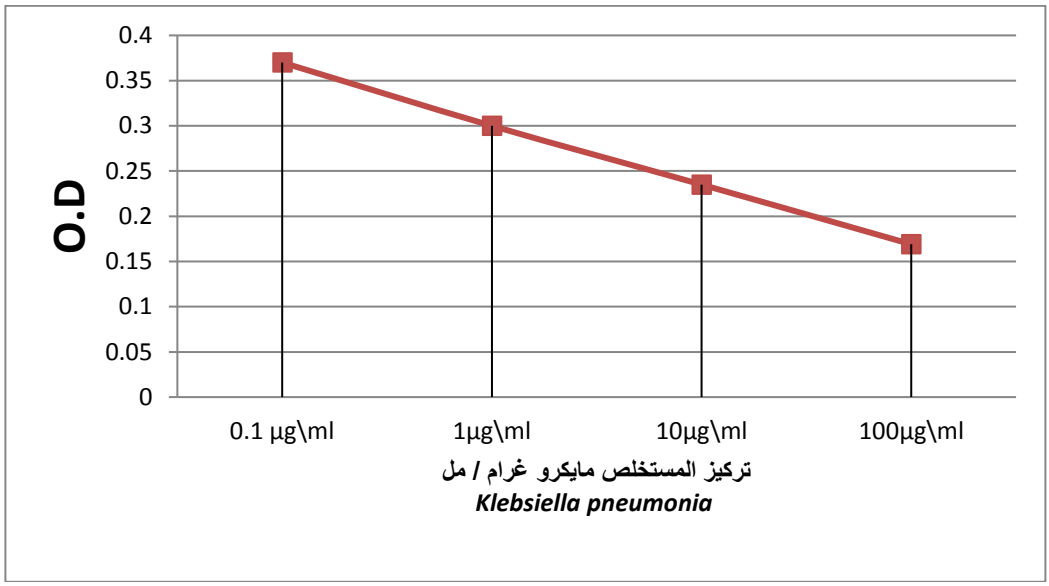
ان احتواء اوراق نبات المرمية على العديد من المركبات الكيميائية مثل Fumaric , Tanins , Mlic acid, Vrsoloc acid وكذلك الصابونيات sponins والشموع waxes و pentoses وبعض الزيوت الطيارة [11] و وجود التربينات الثنائية التي تمتاز بكونها مضادة لنمو البكتريا وهذه النتائج تتفق مع ما توصل الية [15] وجماعته بوجود فعالية تثبيطية لمستخلصات نبات المرمية ضد بكتريا الموجبة لصبغة غرام وبتركيز (٠,٣%) والتي تعود الى احتواء نبات المرمية على نسبة ما بين (3–8 %) من Tanins ذات التاثير المضاد لنمو البكتيريا [16] كما ان احتواء هذا المستخلص على الفلافوينات والقلويدات ، وكذلك لوجود بعض أنواع التربينات الثنائية التي تمتاز بكونها مضادات لنموالبكتريا [١٧ و١٨] .

كذلك لوحظ في هذه الدراسة تفوق التاثير التثبيطي للمستخلص الكحولي لاوراق نبات مرمية والذي يتوافق مع ما اكدة عدد من الباحثين على ان الكحول الاثيلي له القدرة على اذابة عدد من المواد الفعالة مثل التربينات والقلويدات والفلافنويدات وتجميعها في المستخلص الخام بكميات كافية لاحداث أيقاف نمو الخلايا ومنعها من الانقسام الخلوي والتي وجدت في المستخلصات المماثلة لنبات المعدنوس [١٩] وربما التاثيرات على فعاليات الانزيمات التضاعف DNA والاستنساخ mRNA وتثبيط جميع الفعاليات الحيوية الاساسية للخلايا[٢٠ و٢١] المختلفة لهذا تعتبر هذه المستخلصات كمضادات بكتيرية ومايكروبية Antimicrobial, Antibacterial لفعاليتها لذا نقرح في الدراسة الحالية أستخدام هذه المستخلصات في علاج بعض الأمراض البكتيرية .

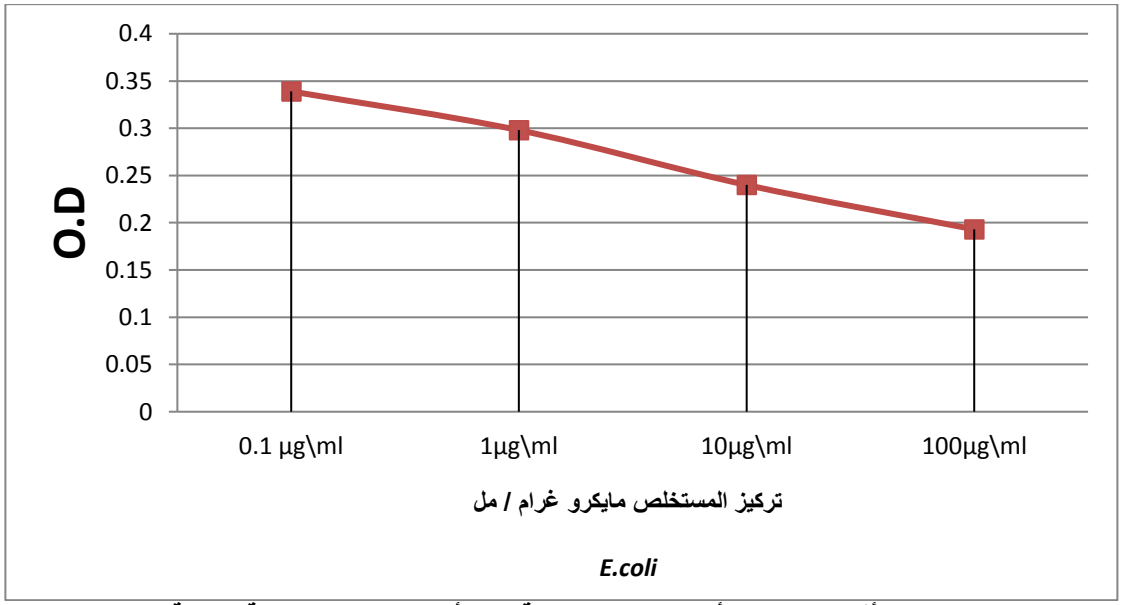
جدول (١) أهم المركبات الفعالة في مستخلص الكحولي لأوراق نبات المرمية

اسم المادة	الكاشف	دليل الكشف	نتيجة الكشف
القلويدات	كاشف ماير	راسب ابيض	+
الكلايكوسيدات	كاشف بنديكت	راسب احمر	+
الفلافونات	KOH+كحول اثيلي	راسب اصفر	+
التربينات	كلوروفورم +حامض الخليك+قطرة حامض الكبريتيك المركز	لون بني فاتح	+
الستيرويدات	كلوروفورم +حامض الخليك+قطرة حامض الكبريتيك المركز	لون ازرق داكن	+
الصابونيات	كلوريد الزئبقيك	راسب ابيض	+
الراتينجات	كحول اثيلي+ماء محمض HCL ٤%	عكورة واضحة	+
الفينولات	كلوريد الحديد ١%	الاخضر المزرق	+
الكومارين	ورق ترشيح مبلل بهايدروكسيد الصوديوم	اصفر مخضر	+
التانين	خلات الرصاص او كلوريد الحديد ١%	راسب ابيض هلامي اخضر مزرق	+

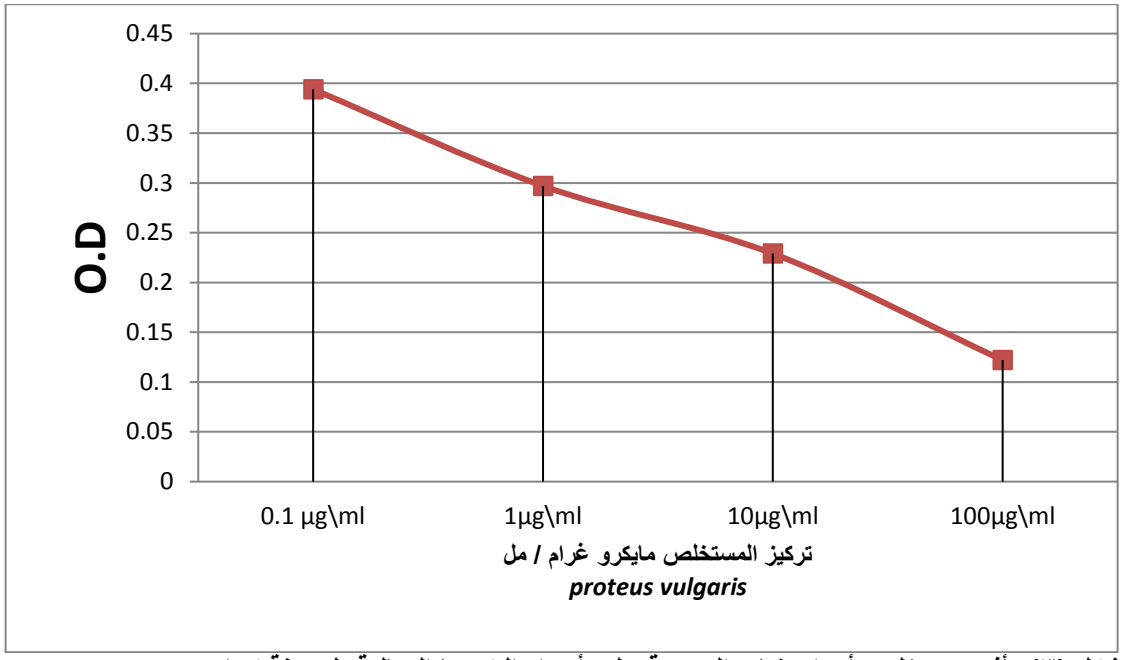
(+) كشف موجب ، (-) كشف سلبي



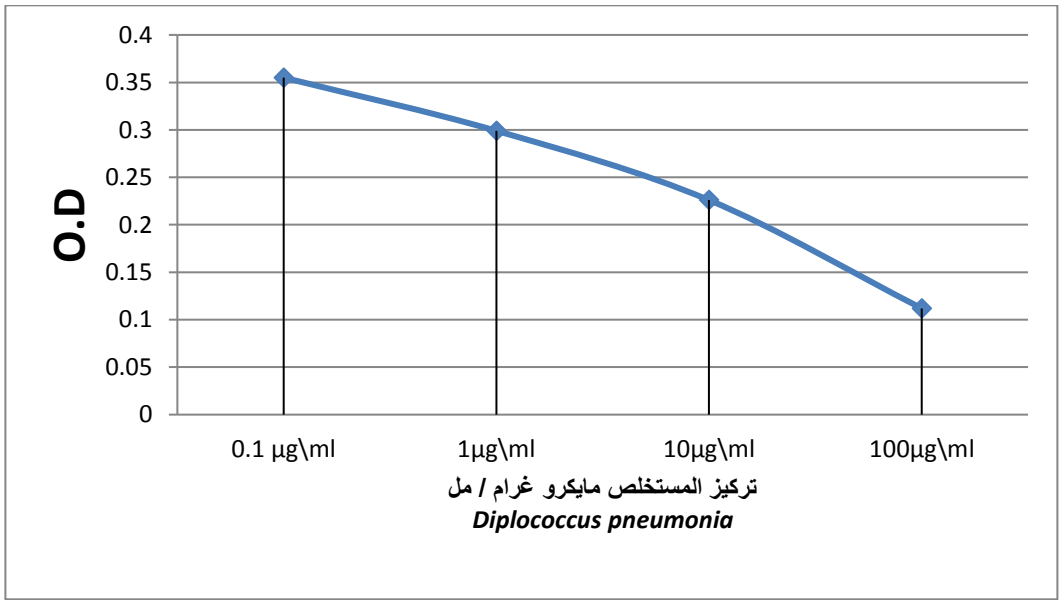
شكل (١) تأثير مستخلص أوراق نبات المرمية على أعداد البكتريا السالبة لصبغة كرام .Klebsiella pneumonia



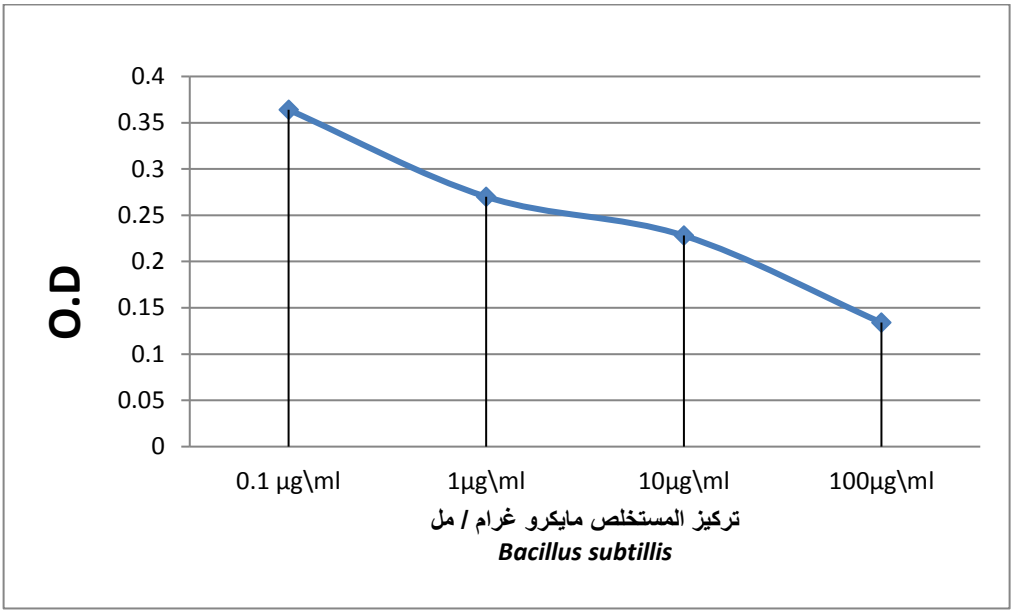
شكل (٢) تأثير مستخلص أوراق نبات المرمية على أعداد البكتريا السالبة لصبغة كرامE.coli



شكل (٣) تأثير مستخلص أوراق نبات المرمية على أعداد البكتريا السالبة لصبغة كرام Proteus vulgaris



شكل (٤) تأثير مستخلص أوراق نبات المرمية على أعداد البكتريا الموجبة لصبغة كرام Diplococcus pneumonia



شكل (٥) تأثير مستخلص أوراق نبات المرمية على أعداد البكتريا الموجبة لصبغة كرام *Bacillus subtillis*.

المصادر

[1].Islam,M.W.R;Radhakrishnan,X.M.;Liu,H.B. and AL-Naji,M.A.(1994). Safety evaluation of *Zizyphus spinachristi* L.and *Teucrium stocksianum* biss.,used in traditional medicine in the Arabian Gulf.From,Afnan,I.(2009)Effect of crude alcoholic extracted from seeds and leaves of Petroselium crispum plant on line cells cancer normal inVitro.Thesis.M.Sc. Biotechnology Dep.Uni.of Technology.

[2].Chada, Y.R. (1972) the wealth of india (Raw materials) V.lx, Publication and information directorate, C.S.IR. New Delhi, India.

[3].Ulubelen, A. and Uygur, I. (1967) Flavonoidal and other components of saliva aethiopis. Planta medica. p:318-320 .

[4].Hazendaroglu, M.;Karabay,N. and Zeybeek,U.(2001) Antibacterial Activity of *Salvia tomentosa* Essential Oil .Fitoterapia.72:829-831.

[5].Veklikova, M.; Bankova, V.; Sorkun, K.; Houcine, S.; Tsvetkova, I. and Kujumgiev, A. (2000) propolis sfom the Mediterranean region: chemical

composition and antimicrobial activity Zeitcshrift f ' ur Naturforschurg, Vol.55: 790-793.

[6]الموسوي ، علي حسين عيسى (١٩٧٩) علم تصنيف النبات . الطبعة الأولى . كلية العلوم / جامعة بغداد .

[7].Willis,J.C.(1973) A dietionary of the Flowering and Ferns. 8th ed.Univ. Press. Cambridge .pp 1022.

[٨]. عبد الوهاب ، أفنان أسماعيل (٢٠١٠) تأثير مستخلص الكحول الأثيلي الخام لبذور وأوراق نبات المعدنوس *Petroselium crispum* في الفئران البيض وفي بعض الخطوط الخلوية السرطانية . رسالة ماجستير ، قسم العلوم التطبيقية / الجامعة التكنولوجية .

[9].Rizk,.A.M.(1986) The phytochemistry of the flora of Qatar PP:454. Great Britain by King print of Richmond. UK.

[10] العقيلي ،صالح رشيد والشايب ، محمد سامر (١٩٩٨) استخدام البرنامج الاحصائي SPSS. مطبوعات الجامعة ، دار الشرق للطباعة ،صفحة ٣٥٨ .

[11].Dobrynin, V.; Kolosou, M.; Chernov, B. and Derbensteva, N. (1976). Diterpenes from saliva officinales. Kim. Prip soedin, 5:686-690 (lited from nadir *et al* 1986).

[12].Ulabelen, A.; Topeu, G. and Tan, N. (1995) Deterpenoids from saliva heldrechiana phytoch. 40(5): 1473-1475.

١٣] علي، أنتصارحسين وحسين ،أمل على (٢٠٠٧) فعالية مستخلص نبات الجرجير كمضاد لبكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام . مجلة أم سلمة للعلوم . المجلد ٤ (٣):٣٧٥-٣٧٨

[14].Sulaiman,G. and Ali,E.(2006)Effect of Iraqi Propolis (Bees gum)Extract on Gram Negative and Positive Bacteria .J.of Al-Nabrain Univ.Vol.9(2):39-45.

[15].Cherevatyi, B.; Vashchenka, T.and Shishkov,G. (1980) comparative study of antibacterial effect of different extract from sage saliva officinalis Rastit. Resur, 16-137-139.

[16].Petri, G.; Then, M. and Chanthabout, L.(1988) Tannins and other poly phenolic compounds in the genus saliva . planta Medica, 54(6):575-579.

[17]Tade, M.; Okuno, K.; Ckiba, K.; Ohnishi, E. and Yoshii, T.(1994) Antiviral diterpenes from saliva officinalis phytoch -1 35(2):539-541.

[18].Masterovaa, I.; Misikova, E.; Sirothova, L.; Vaverkova, S. and Ubik, K. (1996). Roy leanones on the root of saliva officinalis L. of domestic provenance andtheir antibial activity . ceska.A. Slovenska.

[19]. عبد الوهاب ، افنان اسماعيل ومحمد ، عباس عبد الله وحسين ، شلال مراد (٢٠١١) التاثير الوراثي الخلوي للمستخلص الكحولي الاثيلي لاوراق المعدنوس Petroselium crispum في خلايا نقي العظم للفئران المختبرية Mus musculus . مجلة الهندسة والتكنولوجيا :المجلد ٢٩ (١)

[20].محمد ، عباس عبدالله ومراد ، شلال حسين و عبد الوهاب ،افنان اسماعيل (٢٠١١) التأثير السمي الخلوي للمستخلص الأثيلي الخام لأوراق نبات المعدنوس في خط خلايا سرطان الرحم Hela . مجلة الهندسة والتكنولوجيا / الجامعة التكنولوجية المجلد ٢٩(١٢)

[21]. محمد، عباس عبد الله ومراد ، شلال وعبد الوهاب،افنان أسماعيل(٢٠١١) التاثير السمي للمستخلص الاثيلي لاوراق نبات المعدنوس في خط خلايا سرطان الغدد اللبنية الفأري AMN-3 . مجلة الهندسة والتكنولوجيا المجلة ٢٩(١).