المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

المجلد (8) العدد (1)
لسنة 2016

تحديد المحتوى الكيميائي لمستخلص أوراق نبات الغار ***Laurus*** **Bay (*nobilis* L.) وفعاليته المضاده تجاه بعض الأنواع البكتيرية**

علي محمود ريشان*
قسم العلوم/ كلية التربية الاساسية
الجامعة المستنصرية

رغد أكرم عزيز
سالم صالح التميمي
مركز بحوث السوق وحماية المستهلك
جامعة بغداد

تأريخ استلام البحث: 2015 /11/8 تأريخ قبول النشر: 2016 /3/14

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لغرض معرفة الفعالية التثبيطية للمستخلصات الخام لورق نبات الغار(*Laurus nobilis* L.) Bay تجاه بعض العزلات البكتيرية المتمثلة ببكتريا *Staphylococcus aureus* و*Staphylococcus epidermids* و *Bacillus subtilis* و*Proteus vulgaris* و*Escherichia coli* و *Pseudomonas aeroginosa* خارج جسم الكائن الحي *In vitro*، وبلغت النسب المئوية للمكونات الكيميائية الأساس لإوراق نبات الغار التي تمثلت تمثلت بالرطوبة والزيت الكلي والرماد الكلي والبروتين الخام والالياف الخام والكربوهيدرات والقيمة السعرية على اساس الوزن الجاف 5.96 و4.28 و14.2 و8.75 و24.8 و66.81% و340.76 كيلو سعرة/ 100 غم على التوالي، وأظهرت النتائج تركيزاً لبعض العناصر المعدنية الكبرى والصغرى لمسحوق أوراق نبات الغار الجافة التي تمثلت بالمغنيسيوم والحديد والنحاس والرصاص والكادميوم والزرنيخ انها كانت 0.211 و0.165 و0.023 و0.011 و0.0004 و3.140 جزء بالمليون على التوالي، في حين لم يظهر الكوبالت في ورق نبات الغار، وكان النبات ذو سلوك حامضي، إذ بلغ الأس الهيدروجيني 5.97، وبينت نتائج الكشف الأولي (الترسيبي) لمستخلص ورق الغار لخلات الأثيل والمائي أحتوائه على كافة المركبات الكيميائية الفعالة المتمثلة بالدباغيات والصابونيات والفلافونويدات والكلايكوسيدات

* **جزء من رسالة ماجستير للباحث الاول.**

والفينولات والتربينات والستيرولات والكومارين، في حين ان المستخلصين الكحولي والهكسان احتويا ايضا على المركبات الكيميائية الفعالة بإستثناء الصابونيات في محلولهما ولم يحتوِ الأخير على الفينولات، ومن دراسة تأثير المستخلصات في نمو البكتريا خارج الجسم الكائن الحي، لوحظ وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية ($p<0.05$)، اذ وجد ان المستخلص خلات الأثيل والكحولي كان أعلى تأثيراً من بقية المستخلصات الأخرى في تثبيط نمو البكتريا، وبلغت القدرة التثبيطية في نمو كافة انواع البكتريا عند تركيز 3.125 ملغم/مللتر وكانت أكثر فعالية على بكتريا *S. epidermids* من مستخلص خلات الأثيل، اذ اعطى قطر مقداره 15.5 ملم، اما المستخلص الكحولي فكان فعال ضد بكتريا *E. coli* بقطر تثبيطي مقداره 15 ملم، في حين ان مستخلص الهكسان والمائي تباين تأثيره ضد كافة الأنواع البكتيرية، اذ تأثرت بكتريا *S. aureus* فقط عند تركيز 3.125 ملغم/مللتر بقطر 10.5 ملم من مستخلص الهكسان، اما في المستخلص المائي ظهر تأثير بكتريا *S. aureus* و *P. vulgaris* فقط عند تركيز 25 ملغم/مللتر بقطر 14 و 10 ملم على التوالي، في حين ظهر تأثير بكتريا *E. coli* و *P. aeruginosa* فقط عند تركيز 50 ملغم/مللتر بقطر 15 و 13 ملم على التوالي، وعند قياس التركيز المثبط الأدنى (MIC) لكل من الأنواع البكتيرية، اظهرت التراكيز 6.28 الى 25 ملغم/مللتر من مستخلص خلات الأثيل والكحولي قدرة تثبيطية عالية مقارنة مع بقية التراكيز الأخرى، اما المستخلصين الهكسان والمائي فقد تأثرت الأنواع البكتيرية في 12.5 الى 100 ملغم/مللتر ماعدا بكتريا *S. aureus* و*B. subtilis* التي لم تتأثر في تراكيز اي من المستخلصين.

<u>الكلمات المفتاحية:</u> المحتوى الكيميائي، اوراق نبات الغار، الفعالية المضادة، بعض الانواع البكتيرية.

المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

المجلد (8) العدد (1)
لسنة 2016

Determine the chemical content of Bay (*Laurus nobilis* L.) leaves extract and its effectivenss against some bacterial species

[*]Ali M. Rishan Raghad A. Aziz
Department of Science, College of Basic Education, Al-Mustansiriyah University

Salem S. Al-Temimi
Market Research and Consumer Protection Center, University of Baghdad

Abstract

This study has been performed to study the inhibitory effects of crude plant extracts of Bay (*laurus nobilis*) leaves against some bacterial isolates represented by *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermids, Proteus vulgaris, Bacillus subtilis, Escherichia coli,* and *Pseudomonas aeroginosa in vitro*. The results showed that percentages of essential chemical of *laurus nobilis* leaves which represented by moisture, total oil, total ash, crude protein, crude fibers, carbohydrites and caloric values in dry weight are 5.96, 4.28, 14.2, 8.75, 24.8, 76.99%, and 284.92 kcal/100g respectively, the percentages of some major and minor mineral elements of *laurus nobilis* leaves powder which represented by Mg, Fe, Cu, Pb, Cd and As, are: 0.211, 0.165, 0.023, 0.011, 0.00, 0.0004 mg/g and 3.140 ppm, respectively, while Co did not appear in the *laurus nobilis* leaves. The aqueous extract of the plant was acidic its pH 5.79. The results of initial detection (precipitation) showed that ethyl acetate and aqueous extracts of *laurus nobilis* leaves contain all active compounds represented by tannins, saponins, flavonoides, glycosides, phenols, terpenoids, sterols and cumarin, while alcoholic and hexan extracts contain also the some compounds except saponins, hexane extracts no phenols. Through the study of the effect of *laurus nobilis* leaves extracts against growth of bacteria *in vitro* a significant differences at ($p<0.05$) was observed, It was found that the ethyl acetate and alcoholic extracts more were effective on the bacterial species than the other remaining extracts against the growth of bacteria, inhibitory activity was of all bacterial species at concentration of 3.125mg/ml and it was more

[*]Part of M. Sc. Thesis for the first author.

effective on *Staphyloccocus epidermids* for ethyl acetate extract giving inhibitory zone estimated 15.5mm, while alchoholic extract was activity against bacteria *E. coli* at inhibition zone estimated 15mm, while hexan extracts has been showed inhibition activity of same concentration only on bacteria *Staphyloccocus aureus* with zone 10.5mm, as for it has been showed inhibitory activity of bacteria *Proteus vulgaris* at concentration 12.5mg/ml with zone 13mm, as for *Staphyloccocus epidermids*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* and *Pseudomonas aeroginosa* were their inhibition activity at concentration 25mg/ml while *Staphyloccocus aureus* was highest inhibition at zone 16.5mm and 14mm of same concentration as for the hexan and aqueous extracts respectively, while the inhibition of bacteria *Proteus vulgaris* was zone 10mm of aqueous extract, inhibitory activity of bacteria *Pseudomonas aeroginosa* has been showed at concentration 50mg/ml of zone 16mm, as for the bacteria *Staphyloccocus epidermids*, *Bacillus subtilis* were the inhibitory zone at 12mm and *E. coli* at zone 18mm of concentration 100mg/ml. When measuring the minimum inhibitory concentration (MIC) for each bacterial species at a concentrations 6.25-12.5mg/ml for ethyl acetate and alcoholic extracts have high inhibitory activity compared with the other concentrations, but the hexane and aqueous extracts have affected bacterial species at 12.5-100 mg/ml, except for *Staphyloccocus aureus* and *Bacillus subtilis*, which was not affected by any of the concentrations of extracts.

Key words: chemical content, Bay (*Laurus nobilis* L.) leaves, effectivenss against, some bacterial species.

المقدمة

يعود نبات الغار او ما يسمى بأكليل الغار او الرند او ورق الغار Bay Laurel الى عائلة Lauraceae واسمه العلمي هو *Laurus nobilis L.*، ويوجد هذا النبات طبيعيا في مناطق البحر الابيض المتوسط وينتشر في كافة المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية من العالم وبشكل خاص في شرق اسيا وجنوب وشمال أمريكا، وتعد شجرة الغار من الاشجار دائمة الخضرة مخروطية الشكل يصل طولها الى 41 قدم، تحمل اوراق رمحية مدببة كثيفة وذات لون اخضر لامع لاسيما عندما تكون فتية، وتتميز اوراق الغار برائحة عطرية نفاذه لاسيما عندما يتم خدشها (15)، وتحتوي اوراق وثمار نبات الغار على مركبات كيميائية فعالة عدة مثل الفلافونات Flavones لاسيما ابجينين Apigenin ولوتولين Luteolin وكامبفيرول Kaempferol وماريسيتين Myricetin وكورسيتين Quercitin، فضلاً عن ذلك يتميز نبات الغار لاسيما الاوراق بأحتواءه على القلويدات Alkaloids والكلايكوسيدات Glycosides (28)، وقد بين Go`mez–Coronado وBarbas (7) ان اوراق نبات الغار تحوي على التوكوفيرولات Tocopherols والتانينات Tannins، واستعمل نبات الغار في علاج الكثير من الامراض، اذ استعمل في علاج مختلف الاضطرابات العصبية لاسيما علاج الصرع وداء الشقيقة، كما ان لنبات الغار مركبات كيميائية تتميز بفعالية كبيرة ضد انواع عدة من البكتريا وكذلك الخمائر وبعض الاعفان (27)، وتستعمل اوراق وثمار نبات الغار بوصفها مدرر للبول ولتسكين الالم لاسيما الام المعدة والامعاء والآم الاذن، اذ يعد هذا النبات مخدرا موضعيا، ومادة طاردة للغازات ومساعدة لعملية الهضم، وان لهذا النبات فعالية ضد الروماتزم والطفح الجلدي (14)، وقد اثبت Qnais وآخرون (21) ان اوراق نبات الغار دوراً في علاج اضطرابات الجهاز الهضمي لاسيما الاسهال من خلال اختبار فعالية المستخلص المائي لاوراق نبات الغار على الفئران المختبرية والمستحدث بها الاسهال نتيجة اعطاءها زيت الخروع، ونظرا لكثرة استعمال النباتات بوصفها مصدراً للعقاقير وذلك لسهولة استعمالها مقارنة بالأدوية الكيمياوية الصناعية لتأثيراتها الجانبية، لذا هدف البحث الى دراسة القيمة الغذائية (الرطوبة والبروتين والدهن والرماد والكربوهيدرات والألياف) ودراسة محتوى هذه النبات من المكونات والمركبات الفعالة، ومعرفة تأثير مستخلص خلات الأثيل والمستخلص الكحولي ومستخلص الهكسان والمستخلص المائي للنبات قيد الدراسة وبتراكيز مختلفة في تثبيط نمو بعض انواع البكتريا في المختبر.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات النباتية وتحضيرها:

حصل على نبات الغار (*Laurus nobilis*) Bay من محافظة أربيل (منطقة حرير)، وتم تشخيصه بوساطة المعشب التابع الى كلية العلوم جامعة بغداد، وقد تم نقل الجزء المطلوب للدراسة (الأوراق) في أكياس بلاستيكية معقمة خاصة لحفظ الأغذية، وضعت الأوراق في أواني نظيفة عند درجة حرارة الغرفة وفي مكان مفتوح مع التقليب المستمر حتى الجفاف بعدها طحنت العينات بإستعمال الطاحونة للحصول على مسحوق ناعم والذي تم وضعه في عبوات بلاستيكية جافة معتمة ومحكمة الغلق وحفظت في الثلاجة لحين الأستعمال.

تقدير المكونات الكيميائية:

قدر التركيب الكيمياوي لمسحوق اوراق الغار وفقا للطرائق القياسية المذكورة في AOAC (3) وقد اجريت التحاليل الكيمياوية بثلاث مكررات وعبرت عنها كنسبة مئوية، وقدرت الرطوبة بإستعمال فرن حراري بدرجة حرارة 105 م لمدة ساعتين ولحين ثبات الوزن، كما قدرت نسبة الزيت بطريقة الاستخلاص المتقطع في جهاز السوكسليت Soxhlet بأستعمال الأيثر النفطي ذي درجة غليان 40 الى 60م في عملية الاستخلاص التي أستغرقت 8 ساعات، وقدرت نسبة الرماد الكلي وذلك بحرق 5 غم من مسحوق النباتي في فرن الترميد Muffle–furnace بدرجة حرارة 550م لمدة 6 ساعات، وقدر البروتين الكلي للنماذج بأتباع طريقة مايكروكلدال القياسية وذلك من خلال تقدير كمية النتروجين في 0.2 غم من العينة، كما قدرت نسبة الألياف الخام في 2 غم من المسحوق النباتي منزوع الدهن، وحسبت نسبة المواد الكربوهيدراتية بالفرق بين مجموع المكونات المتمثلة بنسب الرطوبة والدهن والبروتين والرماد مطروحا من 100.

تقدير القيمة السعرية:

قدرت القيمة السعرية لمسحوق ورق الغار (كيلوسعرة/ 100غم) وفقا لما ذكره Nwinuka وجماعته (18)، بضرب النسبة المئوية للبروتين الخام والدهون والكربوهيدرات بالعامل 4 و9 و4 على التوالي.

تقدير نسب بعض العناصر المعدنية:

قدرت نسب بعض العناصر المعدنية المتمثلة بالمغنيسيوم والحديد والنحاس والرصاص والكوبالت والكادميوم والزرنيخ باستعمال جهاز مطياف الامتصاص الذري Atomic absorption spectrophotometer– AA 7000 وكما وردت في AOAC (3).

تحضير المستخلصات المائية:

وزن 20غم من المسحوق النباتي وأضيف إليه 400 مللتر من الماء المقطر المعقم وترك لمدة 24 ساعة مع التحريك المستمر وتحت درجة حرارة 40م بوساطة جهاز الحاضنة الهزازة، ثم رشح المستخلص بوساطة طبقات عدة من الشاش الطبي الناعم المعقم، بعدها ركز المستخلص من خلال تبخير الماء باستعمال جهاز المبخر الدوار عند درجة حرارة لاتتجاوز 40م لحين الحصول على سائل كثيف، ثم جفف السائل بدرجة حرارة 37م لمدة 3 الى 4 أيام للحصول على المستخلص النهائي، وحفظ المستخلص النهائي عند درجة حرارة التجميد لحين الاستعمال (16).

تحضير مستخلصات خلات الأثيل والأيثانول والهكسان:

اتبعت الخطوات نفسها في الفقرة السابقة ماعدا إذابة 20غم من المسحوق في 500 مللتر من الكحول الأثيلي ذي تركيز 99% وخلات الأثيل والهكسان بدلا من 400 مللتر من الماء المقطر (4).

تقدير الرقم الهيدروجيني للمستخلص النباتي:

وزن 5غم من مسحوق النبات ووضع في 25 مللتر ماء مقطر ومزج بوساطة مازج لمدة 10 دقائق، ثم رشح المحلول وقيس الأس الهيدروجيني بوساطة جهاز pH meter (24).

الكشف الكيميائي (النوعي) عن بعض المجاميع الفعالة في المستخلصات النباتية:

كشف عن المجاميع والمركبات الفعالة الموجودة في مستخلصات اوراق الغار وقد تضمن الكشف عن التانينات (الدباغيات) Tannins والراتنجات Resins والصابونيات Saponins والفلافونويدات Flavonoids والقلويدات Alkaloids والكلايكوسيدات Glycosides والكومارين Coumarin وحسب ما جاء به Newall وجماعته (17)، كما كشف عن الفينولات Phenols والتربينات Triterpenoids والستيرولات Sterols باتباع طريقة Harborne (9).

تحضير التركيز الأساس:

حضر المحلول الخزين Stock solution لكل من المستخلصات النباتية قيد الدراسة والذي حضرت منه التراكيز الأخرى التي استعملت في التجارب اللاحقة، وذلك بوزن 2غم من المستخلص النباتي الجاف، وإذابته في 10 مللتر من الماء المقطر المعقم مع التحريك لإتمام الإذابة وقد تمت هذه الخطوات تحت ظروف معقمة وبهذا تم الحصول على تركيز الأساس للمستخلصات النباتية الذي بلغ 200 ملغم/مللتر (22).

العزلات البكتيرية الأختبارية المستعملة في الدراسة:

استعملت ست عزلات بكتيرية مختلفة (الجدول، 1) لتقدير كفاءة المستخلصات التثبيطية ضدها، ثلاثة موجبة لصبغة غرام هي: *S. aureus* و*S. epidermidis* و *B. subtilis* وثلاثة سالبة لها *P. vulgaris* و*E. coli* و *P. aeroginosa*، وحصل على العزلات كافة من قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بغداد، وتم تأكيد انواعها باستعمال الاختبارات المظهرية والمزرعية والكيميائية الحيوية (10).

جدول (1): عزلات البكتريا المستعملة في الدراسة ومصادر عزلها.

ت	الكائن	مصدر العزل
1	*Staphylococcus aureus*	الجروح
2	*Staphylococcus epidermidis*	الجروح
3	*Bacillus subtilis*	التسمم الغذائي
4	*Proteus vulgaris*	الأدرار
5	*Escherichia coli*	البراز
6	*Pseudomonas aeruginsa*	الحروق

محلول ثابت العكارة القياسي– ماكفرلاند:

حُضّر محلول ماكفرلاند بحسب ماجاء في NCCLS (17).

اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات ضد العزلات البكتيرية الأختبارية:

استعملت طريقة الانتشار في الآكار Agar Diffusion Method بوساطة الحفر Wells لأختبار حساسية البكتريا للمستخلصات النباتية وكما جاء في Egorove (6)، وقد تم تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibition Concentration (MIC) والتركيز القاتل الأدنى(MBC) Minimum Bacteriacidal Concentration للمستخلصات النباتية

قيد الدراسة باستعمال طريقة التخافيف بالآكار Agar Dilution Method وحسب ما جاء في NCCLS (17)، وباستعمال الوسط الزرعي مولر هنتون الصلب Mollar Henton Agar.

التحليل الاحصائي:

تم تحليل النتائج احصائيا باستعمال البرنامج الاحصائي الجاهز (SAS, 2010) (23)، وحددت الفروقات المعنوية ما بين متوسطات العوامل المؤثرة على الصفات المدروسة عند مستوى احتمالية مقداره ($p<0.05$)

النتائج والمناقشة

تحليل التركيب الكيميائي لأوراق نبات الغار:

يوضح (الجدول، 2) النسب المئوية للمكونات الكيميائية الاساس لاوراق نبات الغار والتي شملت الرطوبة والزيت الكلي والرماد الكلي والبروتين الخام والالياف الخام والكربوهيدرات على اساس الوزن الجاف، اذ لوحظ من النتائج ارتفاع نسب الالياف الخام والكربوهيدرات في اوراق نبات الغار، اذ بلغت نسبة الالياف 24.8%، في حين ان Ifesan وجماعته (11) قد اشاروا الى ان النسبة المئوية للالياف كانت بحدود 15.62%، وقد بلغت نسبة الكربوهيدرات الكلية 66.81%، بينما كانت نسبة البروتين 8.75%، فيما وجد Edeoga وجماعته (5) ان نسبة البروتين كانت 17.94%، وبلغت نسبة الزيت الكلي 4.28%، اما بالنسبة الى الرماد الكلي فقد بلغت النسبة المئوية له 14.2%، وكانت النسبة المئوية للرطوبة 5.96%، وقد يعزى اختلاف نسب المكونات لهذه الدراسة مع الدراسات المشار اليها الى اختلاف نوع النبات وصنفه او لاختلاف الاجزاء النباتية ومواعيد الحصاد والظروف البيئية والموقع الجغرافي (1)، وعند تقدير القيمة السعرية وجد انها 340.76 كيلو سعرة/ 100 غم، فيما وجد Nwinuka وجماعته (18) ان القيم السعرية للثوم والبصل والزنجبيل بلغت 367.64 و357.19 و375.37 كيلو سعرة/ 100 غم على التوالي، ويبدو ان القيم السعرية تتأثر بنسبة الدهن في الانموذج، وبلغ الاس الهيدروجيني للمستخلص المائي 5.97، مما يعطي ذلك الطعم الحامضي للمستخلص المائي لاوراق النباتات، وقد يعزى انخفاض الاس الهيدروجيني الى احتواء اوراق هذه النباتات على الحوامض العضوية فضلاً عن المركبات الكيميائية الفعالة،

كما يعد الاس الهيدروجيني من العوامل المهمة التي تؤدي دوراً اساس في فعالية المغذيات بالتربة وامتصاصها بوساطة جذور النباتات (5).

جدول (2): النسب المئوية لبعض المكونات الكيميائية الأساس في اوراق نبات الغار.

المكونات الأساسية	النسبة المئوية (%) لكل 100غم
الرطوبة Moisture	5.96
الزيت الكلي Total oil	4.28
الرماد الكلي Total minerls (Ash)	14.2
البروتين الخام Grud Protein	8.75
الالياف الخام Grud Fiber	24.8
الكربوهيدرات Carbohydrate	66.81
القيمة السعرية كيلو سعرة / 100 غم	340.76

ويبين (الجدول، 3) النسب المئوية لبعض العناصر المعدنية الكبرى والصغرى لمسحوق للاوراق الجافة لنبات الغار والتي شملت المغنيسيوم والحديد والنحاس والرصاص والكوبالت والكادميوم والزرنيخ، اذ بلغ تركيز المغنيسيوم 0.211 ملغم/غم، وكانت هذه النتيجة متقاربة مع ماذكره Yasar وجماعته (28) من ان تركيز المغنسيوم بلغ 0.268 ملغم/غم، وعزا ذلك التباين البسيط الى ان اختلاف تركيز المغنسيوم داخل أنسجة النبات الواحد بسبب التنوع الوراثي للأنواع المختلفة العائدة لنفس الجنس، وبلغ تركيز الحديد 0.165 ملغم/غم، وكانت متقاربة حسب ماأشاره اليهِ Yasar وجماعته (28) الذي اشار الى ان تركيز الحديد بلغ 0.203 ملغم/غم، وبلغ تركيز النحاس 0.023 ملغم/غم، ويعود السبب التفاوت هذا الى التراكيب النباتية للنبات والتراكيب المعدنية للتربة، او قد يعود الى التنوع الوراثي للنوع نفسه او الى مكان الحصاد والظروف البيئية (2)، وبلغ تركيز الرصاص 0.011 ملغم/غم، اما تركيز الكادميوم فكان 0.0004 ملغم/غم، وكانت هذه النتائج متقاربة مع ماذكره Yasar وجماعته (28) من ان تركيز الرصاص والكادميوم بلغ 0.005 و 0.0008 ملغم/غم على التوالي، واظهرت النتائج احتواء المسحوق النباتي لاوراق نبات الغار على 3.140 جزء بالمليون من عنصر الزرنيخ، فيما خلت النماذج المدروسة من عنصر الكوبالت.

جدول (3): تراكيز بعض العناصر المعدنية في مسحوق اوراق نبات الغار.

العنصر المعدني	تركيز العنصر المعدني في مسحوق اوراق نبات الغار
المغنيسيوم Mg	0.211 ملغم/غم
الحديد Fe	0.165 ملغم/غم
النحاس Cu	0.023 ملغم/غم
الرصاص Pb	0.011 ملغم/غم
الكوبالت Co	0.0000 ملغم/غم
الكادميوم Cd	0.0004 ملغم/غم
الزرنيخ As	3.140 جزء بالمليون

الكشف النوعي للمركبات الفعالة في اوراق الغار:

يبين (الجدول، 4) نتائج الكشف النوعي لبعض المكونات الفعالة في المستخلصات الخام المائية والكحولية وخلات الاثيل والهكسان لاوراق الغار، وقد تبين احتواء كافة المستخلصات على التانينات والصابونيات في المستخلص المائي ومستخلص خلات الاثيل خلافا للمستخلص الكحولي ولمستخلص الهكسان، وقد احتوى المستخلص المائي والمستخلص الكحولي ومستخلص خلات الاثيل ومستخلص الهكسان على الفلافونويدات، ولوحظ ايضاً وجود الكلايكوسيدات في كل من مستخلص خلات الاثيل ومستخلص الهكسان، وظهرت القلويدات في كل من المستخلص المائي والمستخلص الكحولي ومستخلص خلات الاثيل ومستخلص الهكسان، واحتوى المستخلص المائي والكحولي ومستخلص خلات الاثيل على الفينولات، كما لوحظ وجود الترايتربينويد والستيرولات في المستخلص المائي والكحولي ومستخلص خلات الاثيل والهكسان، واحتوى المستخلص المائي والكحولي ومستخلص الهكسان على الراتنجات، ولوحظ وجود الكومارين في المستخلص المائي والكحولي ومستخلص خلات الاثيل والهكسان.

جدول (4): الكشف النوعي للمركبات الفعالة في ورق الغار

المركبات الفعالة	طرق الكشف		المستخلصات			
	الكاشف المستعمل	النتيجة الموجبة	مستخلص المائي	مستخلص كحولي	مستخلص خلات الأثيل	مستخلص الهكسان
التانينات Tannins	خلات الرصاص	راسب هلامي القوام	+Ve	+Ve	+Ve	+Ve
	كلوريدالحديديك	اللون الاخضر المزرق				
الصابونيات Saponins	رَج المستخلص	ظهور رغوة كثيفة تبقى لمدة	+Ve	−Ve	+Ve	−Ve
	كلوريد الزئبقيك	راسب ابيض	+Ve	+Ve	+Ve	+Ve
الفلافونويدات Flavonoids	مستخلص+كحول الاثيلي 95%+هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي 50%	ظهور اللون الاصفر	+Ve	+Ve	+Ve	+Ve
الكلايكوسيدات Glycosides	كاشف فهلنك	ظهور راسب أحمر	+Ve	+Ve	+Ve	+Ve
	كاسف بندكت	ظهور راسب أحمر				
القلويدات Alkaloids	كاشف درانكدروف	ظهورراسب أبيض	+Ve	+Ve	+Ve	+Ve
	كاشف ماركس	ظهور عكورة				
	كاشف واكنر	ظهور راسب بني				
	كاشف ماير	ظهور راسب برتقالي				
	حامض البكريك 5%	ظهور راسب أصفر				
الفينولات Phenols	كاشف فولن	ظهور اللون الأزرق	+Ve	+Ve	+Ve	−Ve
	كلوريد الحديديك	اللون الأخضر المزرق				
الترايتربينويد Triterpenoids	حامض الكبريتيك المركز + كلوروفورم	ظهور اللون الأحمر او الأرجواني	+Ve	+Ve	+Ve	+Ve
الستيرولات Sterols	كاشف ليبرمان– بوركارد	ظهور اللون الأخضر المزرق	+Ve	+Ve	+Ve	+Ve
الراتنجات Resins	اضافة ماء محمض بـ 4% HCl الى المستخلص	ظهور عكارة	+Ve	+Ve	+Ve	+Ve
الكومارين Cumarins	تعريض ورقة ترشيح المشبعة بالمستخلص لاشعة UV light	ظهور اللون الأصفر المخضر	−Ve	−Ve	+Ve	−Ve
الفيوكومارينات Fuocoumarins	هيدروكسيد البوتاسيوم 10%	ظهور اللون الأصفر او الأصفر المخضر	−Ve	−Ve	+Ve	−Ve

+Ve = الكشف الموجب - Ve = الكشف السالب

تتفق هذه النتائج مع ما أشار اليه Kaurinovic وجماعته (14) من أحتواء كافة المستخلصات النباتية لأوراق نبات الغار على مركبات فعالة أهمها الفلافونويدات والفينولات والقلويدات والتربينات، في حين لاتتفق هذه النتائج على ما جاء به Haddouchi وجماعته (8) من ان المستخلص الكحولي لورق الغار لايحتوي على التانينات والقلويدات والصابونيات والكومارينات والستيرولات.

اختبار الفعالية التثبيطية لمستخلصات ورق الغار:

يوضح (الجدول، 5) تأثير كل من المستخلصات المائية والكحولية ومستخلص خلات الاثيل ومستخلص الهكسان لورق الغار وعند التراكيز 3.125 الى 200 ملغم/ مللتر في ثبيط بعض أنواع البكتريا الأختبارية قيد الدراسة *S.aureus* و*S. epidermids* و *B. subtilis*و*P. vulgaris* و*E. coli* و*P. aeroginosa* مقدره بقطر منطقة التثبيط وبعد المقارنة مع المضاد الحياتي السبروفلوكساسين *Ciprofloxacin* عند التراكيز 0.125 الى 20 ملغم/مللتر، وبينت النتائج ان التأثير اعتمد على نوع المستخلص وتركيزه ونوع البكتريا، فقد أظهر مستخلص خلات الأثيل قدرة تثبيطية عالية تجاه البكتريا الاختبارية وجاء بالمرتبة الأولى وتلاه مستخلص الكحول الأثيلي ثم مستخلص الهكسان واخيراً المستخلص المائي، وان معدلات أقطار التثبيط ازدادت بزيادة تركيز المستخلص، ففي مستخلص خلات الأثيل بلغ اقصى قطر لمنطقة التثبيط 25 ملم لبكتريا *E. coli* وذلك عند التركيز 200 ملغم/مللتر، اما اقل قطر لمناطق التثبيط فقد بلغ 12.5 ملم لبكتريا *S. aureus*، واعطى المستخلص الكحولي اقصى تأثيراً مثبطاً بقطر 23 ملم لبكتريا *E. coli* عند التركيز 200 ملغم/مللتر، اما اقل قطر لمنطقة التثبيط فقد كانت 10 ملم تجاه بكتريا *B. subtilis* عند التركيز 3.125 ملغم/مللتر، في حين كان لمستخلص الهكسان قدرة تثبيطية تجاه البكتريا الاختبارية لكل من *S. aureus* و*P. vulgaris* و*E. coli*، اذ بلغ اقصى قطر تثبيطي تجاه تلك البكتريا 20 ملم عند التركيز 200 ملغم/ مللتر، اما أقل قطر لمناطق التثبيط فكان إتجاه بكتريا *B. subtilis* وبلغ 11 ملم عند التركيز 25 ملغم/مللتر، اما التراكيز 3.125 و6.25 ملغم/ مللتر فلم تعط اي فعالية تثبيطية تجاه كل من بكتريا *S. epidermids* و *P. aeroginosa*، في حين ان المستخلص المائي كان تأثيره التثبيطي تجاه البكتريا الاختبارية قليلاً بالمقارنة مع باقي المستخلصات، اذ بلغ اقصى قطر تثبيطي 19 ملم تجاه كل من بكتريا *S. aureus* و*E. coli* عند تركيز 200 ملغم/مللتر، اما التركيز 50 ملغم/ مللتر فقد كان له

تأثير تثبيطي تجاه كل من بكتريا *S. aureus* و*P. aeroginosa* و*S. epidermids* وكانت اقطار مناطق التثبيط 16 و14.5 و11 ملم على التوالي، وكان للتركيز 25 ملغم/ مللتر تأثير تثبيطي فقط تجاه بكتريا *S. aureus* و*S. epidermids*، اذ كانت اقطار مناطق التثبيط 14 و 10 ملم على التوالي، في حين لم تعطي التراكيز من 3.125 الى 12.5 ملغم/مللتر أي فعالية تثبيطية تجاه أي نوع من البكتريا الاختبارية، وعند مقارنة كل من مستخلص خلات الاثيل والكحولي والهكسان والمائي لورق الغار في كافة التراكيز مع تراكيز المضاد الحياتي السبروفلوكساسين عند 20 و10 و5 و1 و0.5 و0.25 و0.125 ملغم/ مللتر في قدرتها التثبيطية، وجد ان التأثير التثبيطي الأعلى ضد بكتريا *P. vulgaris* عند التراكيز المذكورة انفاً من المضاد الحياتي هي 43 و38 و37 و34 و17 و12 و8 ملم على التوالي، وفيما يخص بكتريا *P. aeroginosa* فقد كانت 44 و39 و33 و28 و19 و15 و9 ملم على التوالي، وفي بكتريا *S. aureus* بلغت 42 و37 و32 و27 و18 و14 و11 ملم على التوالي، ومع بكتريا *E. coli* كانت 40 و31 و28 و23 و17 و13 و10 ملم على التوالي، ومع بكتريا *B. subtilis* بلغت 23 و21 و18 و14 و12 و11 و6 ملم على التوالي، اما بكتريا *S. epidermids* فكانت 22 و19 و17 و14 و12 و10 و7 ملم على التوالي، وقد جاءت هذه النتائج متوافقة مع ماتوصل اليه Kaurinovic وجماعته (14) الذين اشاروا إلى ان مستخلص خلات الأثيل له فعالية تثبيطية تجاه انواع عدة من البكتريا وكذلك امتلاكها خصائص مضادة للأكسدة داخل وخارج جسم الكائن الحي، وأتفقت نتائج المستخلص الكحولي ضد بكتريا *S. aureus* و*B. subtilis* و*P. vulgaris* و*E. coli* مع ماجاء به Keskin وجماعته (13) الذي اشار الى قدرة المستخلص الكحولي لانواع منتخبة من النباتات الموجودة في الاسواق في تثبيط العديد من العزلات البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة كرام، في حين لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما جاء به Thakare (26) الذي بين عدم امتلاك المستخلص الكحولي ولعدد من النباتات ومنها ورق الغار اي فعالية تثبيطية تجاه عدة انواع بكتيرية وقد يعود ذلك الى اختلاف في (طريقة الاستخلاص وطريقة قياس الفعالية التثبيطية وعمر النبات والظروف البيئية التي ينمو فيها النبات والتنوع الوراثي للنبات)، واتفقت النتائج مع ما توصل اليه Khan و Khan (12) في الهند اللذين أشارا إلى أن المستخلص المائي لنبات الياسمين الزفر *Clerodendrum inerme* أظهر فاعلية تثبيطية معنوية ضد 15 نوع بكتيري ومنها *S. aureus* و*P. aeruginosa* و*E. coli* و*S. typhi*، وتتفق النتائج مع

ما اشار اليه Suffredini وجماعته (25) في البرازيل بأن المستخلص المائي لـ 16 نباتاً من نباتات غابات الأمازون أظهرت فاعلية تثبيطية ضد انواع عدة من البكتريا، وتقاربت ايضاً مع Parekh و Chanda (20) في الهند اللذين أشارا إلى أن المستخلص المائي لبعض النباتات الهندية الطبية قد أظهر فاعلية تثبيطية عالية ضد الأنواع البكتيرية التي شملت *S. aureus* و*B. subtilis* و*E. coli* و*K. pneumoniae* و*E. aerogenes*، وقد يعود السبب في كفاءة المستخلصات المدروسة إلى طبيعة المركبات الفعالة الموجودة فيه ولاسيما الفينولات والفلافونات والكلايكوسيدات والصابونينات والتانينات، وتوافقت ايضاً مع ماجاء به Verdian-rizi (27) من قدرة مستخلصات اوراق نبات الغار في تثبيط انواع عدة من البكتريا، ومن خلال الدراسة نلاحظ ان فعالية التثبيطية لورق الغار تعود الى ما تحتويها من مركبات طبيعية فعالة مضادة للاكسدة ومضادة للأحياء المجهرية، كما لوحظ وجود فرقاً معنوياً عند مستوى احتمالية ($p<0.05$) اذ اعطى مستخلص خلات الأثيل عند التركيز 3.125 ملغم/مللتر قدرة تثبيطية تجاه بكتريا *S. epidermids*، اذ بلغ قطر منطقة التثبيط 15.5 ملم، في حين أعطى المستخلص الكحولي وعند التركيز نفسه قدرة تثبيطية تجاه بكتريا *E .coli* بقطر 15 ملم، اما مستخلص الهكسان فقد كان للتركيز 25 ملغم/مللتر القدرة التثبيطية تجاه بكتريا *S. aureus*، اذ بلغت 16.5 ملم، اما عند التركيز 3.125 ملغم/مللتر فقد اظهر هذا التركيز قدرة تثبيطية تحديداً تجاه تلك البكتريا بلغت 10.5 ملم، اما المستخلص المائي فقد كان لتركيز 100 ملغم/مللتر قدرة تثبيطية تجاه بكتريا *S. aureus* بلغت 18 ملم، اما تركيز 25 ملغم/مللتر، فقد اظهر قدرة تثبيطية تجاه البكتريا نفسها والتي بلغت 14 ملم، في حين لم تعطي التراكيز 12.5 و 6.25 و3.125 ملغم/مللتر اي فعالية تثبيطية تجاه انواع البكتريا الاختبارية.

جدول (5): تأثير المستخلص المائي والكحولي وخلات الاثيل والهكسان لورق الغار تجاه انواع من البكتريا.

المستخلص النباتي لورق الغار	تركيز المسخلص (ملغم/مللتر)	قابلية المسخلصات في تثبيط أنواع البكتريا					
		S. aureus	*S. epidermids*	*B. subtilis*	*P.vulgaris*	*E. coli*	*P. aeroginosa*
		قطر منطقة التثبيط (ملم)					
خلات الأثيل Ethyl acetate	200	22	20	20	22	25	20
	100	20	19.5	19	18.5	22	19
	50	18	18.5	17	17.5	20	18
	25	16	18	16.5	16.5	19	17
	12.5	15	17.5	15.5	16	18	16
	6. 25	13.5	16.5	14.5	15	17	15
	3.125	12.5	15.5	13.5	13	15	14
الكحولي Alcohol	200	21.5	19	16	20.5	23	19
	100	19	18	15	18.5	20	17.5
	50	17.5	17.5	14	16.5	19	16
	25	15.5	17	13	15	18	15
	12.5	14.5	16	12	14.5	17.5	14.5
	6.25	13.5	15	11	13.5	16	13.5
	3.125	12.5	13	10	13	15	11
الهكسان n-Hexane	200	20	18.5	14.5	20	20	18
	100	19.5	18	13	18	19.5	17.5
	50	18	17	12.5	17.5	18	16
	25	16.5	15.5	11	14.5	16	15
	12.5	14.5	0	0	13	0	0
	6.25	12.5	0	0	0	0	0
	3.125	10.5	0	0	0	0	0
المائي Aqueous	200	19	15	13	15	19	17
	100	18	12	12	12	18	16
	50	16	0	0	11	0	14.5
	25	14	0	0	10	0	0
	12.5	0	0	0	0	0	0
	6.25	0	0	0	0	0	0
	3.125	0	0	0	0	0	0
المضاد الحياتي Ciprofloxacin	20	42	22	23	43	40	44
	10	37	19	21	38	31	39
	5	32	17	18	37	28	33
	1	27	14	14	34	23	28
	0.5	18	12	12	17	17	19
	0.25	14	10	11	12	13	15
	0.125	11	7	6	8	10	9
قيمة LSD	----	* 13.87	* 10.52	* 11.47	* 14.79	*13.60	* 15.38
*(p<0.05)							

تحديد التركيز المثبط الادنى MIC والتركيز القاتل الادنى MBC لمستخلصات ورق الغار:

ويبين (الجدول، 6 و7) أن قيمتي التركيز المثبط الأدنى MIC والقاتل الأدنى MBC تزداد مع زيادة تركيز المستخلص في الوسط أي أن عملية تثبيط نمو بكتريا الاختبار تتناسب طردياً مع زيادة تركيز المستخلص النباتي وقد يعود سبب ذلك إلى زيادة تركيز المادة الفعالة المثبطة فيه.

أظهرت النتائج ان لمستخلص خلات الأثيل لورق الغار فعلاً تثبيطياً، اذ ظهر بداية تأثيره التثبيطي تجاه بكتريا *E. coli* بتركيز 6.25 ملغم/ مللتر، وكما اثر في كل من بكتريا *S. aureus* و*P. vulgaris* و*P.aeroginosa* عند التركيز 12.5 ملغم/ مللتر، اما تأثيره التثبيطي حيال بكتريا *S. epidermids* و*B. subtilis* كان عند التركيز 25 ملغم/ مللتر، كما كان لمستخلص خلات الاثيل تأثير قاتل حيال البكتريا الاختبارية، اذ كان التركيز القاتل الادنى حيال كل من بكتريا *S. aureus* و*S. epidermids* و*B. Subtilis* و *P. vulgaris* و*E. coli* و*P. aeroginosa* هو 25 و50 و50 و25 و12.5 و25 ملغم/ مللتر على التوالي، في حين ان المستخلص الكحولي اظهر تثبيطه تجاه كل انواع البكتريا الاختبارية قيد الدراسة، اذ بدأ التأثير التثبيطي في نمو بكتريا *E. coli* و*S. aureus* وبتركيز 12.5 ملغم/ مللتر، وفي كل من بكتريا *S. epidermids* و *P. aeroginosa* عند التركيز 25 ملغم/ مللتر، أما بكتريا *B. subtilis* ظهر تثبيطها بتركيز 50 ملغم/ مللتر، كما كان للمستخلص الكحولي تأثير قاتل حيال البكتريا الاختبارية، اذ كان التركيز القاتل الادنى حيال كل من بكتريا *S. aureus* و *S. epidermids* و*B. subtilis* و*P. vulgaris* و *E. coli* و*P. aeroginosa* هو 25 و50 و100 و50 و25 و50 ملغم/ مللتر على التوالي، اما مستخلص الهكسان فقد تبين تأثيره في نمو البكتريا الاختبارية، اذ تأثرت كل من بكتريا *S. aureus* أكثر من بقية الانواع الاخرى وبالتركيز 12.5 ملغم/ مللتر، بينما تأثرت بكتريا *E. coli* و*P. aeroginosa* بتركيز 25 ملغم/ مللتر وكان الفعل التثبيطي لبكتريا *S. epidermids* و*P. vulgaris* بالتركيز 50 ملغم/ مللتر في حين تأثرت بكتريا *B. subtilis* بالتركيز 100 ملغم/ مللتر كما كان لمستخلص الهكسان تأثير قاتل حيال البكتريا الاختبارية، اذ كان التركيز القاتل الادنى حيال كل من بكتريا *S. aureus* و *S. epidermids* و*B. subtilis* و*P. vulgaris* و*E. coli* و*P. aeroginosa* هو 25 و100 و200 و100 و50 و50 ملغم/ مللتر على التوالي، ويلاحظ من النتائج وجود فرق

معنوي لقيم التركيز المثبط الأدنى MIC وقيم التركيز القاتل الأدنى MBC للبكتريا مع المستخلص عند مستوى احتمالية ($p<0.05$)، أما المستخلص المائي فقد تأثرت كافة انواع البكتريا الاختبارية قيد الدراسة، اذ كانت بكتريا *S. aureus* اكثر تأثراً تثبيطياً من بقية الانواع وبتركيز 25 ملغم/ مللتر، بينما كان هناك تأثير تثبيطي لبكتريا *P. vulgaris* و *P. aeroginosa* وبالتركيز 50 ملغم/ مللتر، وتأثرت بتثبيط مساوي لبكتريا *S. epidermids* و*B. subtilis* و*E. coli* بالتركيز 100 ملغم/ مللتر، ويلاحظ أن هناك تبايناً في الفعالية المضادة لمستخلصات المذيبات العضوية (خلات الأثيل والكحول الأثيلي والهكسان) والمستخلص المائي تجاه البكتريا الاختبارية، وقد يعزى سبب هذا التباين إلى نوع المستخلص النباتي ونوع بكتريا الأختبار،

جدول (6): التركيز المثبط الأدنى MIC لمستخلصات ورق الغار تجاه البكتريا الاختبارية.

المستخلص النباتي	التركيز المثبط (ملغم/مللتر) لمستخلصات ورق الغار تجاه البكتريا الاختبارية						قيمة LSD
	S. aureus	*S. epidermids*	*B. subtilis*	*P. vulgaris*	*E. coli*	*P. aeroginosa*	
خلات الاثل Ethyl acetate	±12.5 0.44	0.82±25	0.82±25	0.44±12.5	±6.25 0.15	0.44±12.5	*7.25
الكحولي Alcohol	±12.5 0.44	0.82±25	17.5±50	0.82 ± 25	±12.5 0.44	0.82±25	*10.50
الهكسان n-Hexane	±12.5 0.44	17.5±50	0.00±100	17.5±50	0.82±25	0.82±25	*8.75
المائي Aqueous	0.82±25	0.00±100	0.00±100	17.5±50	0.00±100	17.5±50	*10.25
قيمة LSD	*7.25	*12.50	*10.33	* 8.55	*10.25	*8.55	----
*(p<0.05)							

جدول (7): التركيز المثبط الأدنى MBC لمستخلصات ورق الغار تجاه البكتريا الاختبارية.

المستخلص النباتي	التركيز المثبط (ملغم/مللتر) لمستخلصات ورق الغار تجاه البكتريا الاختبارية						قيمة LSD
	S. aureus	*S. epidermids*	*B. subtilis*	*P. vulgaris*	*E. coli*	*P. aeroginosa*	
خلات الاثل Ethyl acetate	0.82±25	17.5±50	17.5±50	0.82±25	±12.5 0.44	0.82±25	*8.75
الكحولي Alcohol	0.82±25	17.5±50	0.00±100	17.5±50	0.82±25	17.5±50	*10.25
الهكسان n-Hexane	0.82±25	0.00±100	10.0±200	0.00±100	17.5±50	17.5±50	*10.25
المائي Aqueous	17.5±50	10.0±200	10.0±200	0.00±100	10.0±200	0.00±100	*15.00
قيمة LSD	*8.55	*15.75	*10.25	*15.00	*17.00	*10.50	----
*(P<0.05)							

وقد جاءت هذه النتيجة متوافقة مع نتائج وردت في دراسات مشابهة (1)، اذ ان الأختلاف في درجة تأثير أنواع المستخلصات النباتية في نمو الأحياء المجهرية يعود إلى عوامل مختلفة أهمها نوع المستخلص والطريقة المتبعة في الأستخلاص وقطبية المذيب المستعمل فضلا عن نوع بكتريا الاختبار التي تقع تحت تأثير المستخلص، اذ تبين من النتائج التي حصلنا عليها ان مستخلص خلات الأثيل لكل من ورق الغار كان الأكثر كفاءة من بين المستخلصات يليها مستخلص الكحول الأثيلي تلاهما مستخلص الهكسان ثم المستخلص المائي.

المصادر

1. عجينة، صبا جعفر محسن. (2006). تأثير الفعالية التثبيطية لمستخلصات بعض النباتات في نمو بعض الأحياء المجهرية وكمضادات أكسدة في الأنظمة الحيوية وتطبيقه في النظم الغذائية. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة، جامعة بغداد.

2. هولفورد، باتريك. (200). التغذية/الدليل الكامل. ترجمة مركز التعريب والبرمجة. الدار العربية للعلوم، بيروت، لبنان، ص 73–122.

3. Association of Official Analytical Chemists. (AOAC.) (2005). Official Methods of Analysis 4th ed., Assoc. Office. Anal. Chem. Virginia. USA.

4. Banso, A. and Adeyemo, S. (2006). Phytochemical screening and antimicrobial assessment of *Abution mauritianum*, *Baccopa monnifera* and *Datura stramonium*. Biokemistri. 8(1): 39-44.

5. Edeoga, H. O.; Okwu, D. E. and Mbaebie, B. O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. African. J. Biotechnology. 4 (7): 685-688.

6. Egorove, N. S. (1985). Antibiotics Scientific Approach. Mirpublishers. Moscow.

7. Go`mez-Coronado, D. and Barbas, C. (2003). Optimized and validated HPLC method for R- and G-tocopherol measurement in *Laurus nobilis* leaves new data on tocopherol content. J. Agric. Food Chem. 51: 5196-5201.

8. Haddouchi, F.; Chaouche, T.; Benmansour, A. and Lazouni, H. A. (2011). Phytochemical study of *Thymus fontanesii* and *Laurus nobilis*. J. Scholars Research Library Der Pharmacia Letter. 3(2): 343-350.

9. Harborn, J. B. (1984). Phytochemical Methods, a Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. 2nd ed., Chapman and Hall Ltd., London, New York.

10. Holt, J. G.; Krieg, N. R. and Sneath, P. A. (1994). Bergey's Manual of Determination Bacteriology, 9thed., Williams and Wilkins, Library of Congress Cataloging, Baltimore.

11. Ifesan, B. O. T.; Ijarotimi, O. S. and Osundahuns, O. F. (2006). Evaluation of the antioxidant activity of *Ocimum* sp. J. Food Techonol. 4(4): 318-327.

12. Khan, A. V. and Khan, A. A. (2002). Antibacterial potential of *Clerodendrum inerme* crude extracts against some human pathogenic bacteria. Ethnomed and Pharmacog. II Rec. Prog. In Med. Plants. 20: 1-6, (Sci. Tech. Pub. USA).

13. Keskin, D. D.; Oskay and Oskay, M. (2010). Antimicrobial activity of selected plant spices marketed in the West Anatolia. Int. J. Agric. Biol. 12: 916-920.

14. Kaurinovic, B.; Popovic, M. and Vlaisavljevic, S. (2010). In vitro and in vivo effects of *Laurus nobilis* L. leaf extracts. J. Molecules. 15: 3378-90.

15. Kilic, A.; Kollmannsberger, H. and Nitz, S., (2005). Glycosidically bound volatiles and flavor precursors in *Laurus nobilis* L. J. Agric. Food Chem. 53: 2231-2235.

16. Krishnaiah, D.; Devi, T.; Bono, A. and Sarbatly, R. (2009). Studies on phytochemical constituents of six Malaysian medicinal plants. J. Med. Plant. Res. 3(2): 67-72.

17. National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS). (2003). Approved Standards. M100-S12, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test: Twelfth Informational Supplement. Pennsylvania, USA.

18. Nwinuka, N. M.; Ibeh, G. O. and Ekeke, G. I. (2005). Proximate composition and levels of some toxicants in four commonly consumed spices. J. Appl. Sci. Environ. Mgt. 9(1): 150-155.

19. Okwu, D. E. and Iroabuchi, F. (2009). Phytochemical composition and biological activities of *Uvaria chama* and *Clerodendoron splendens*. J. Chem. 6(2): 553-560.

20. Parekh, J. and Chanda, S. (2007). In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. J. Biol. 31: 53-58.

21. Qnais, E. Y; Abdulla, F. A.; Kaddumi, E. G. and Abdalla, S. S. (2012). Antidiarrheal activity of *Laurus nobilis* L. leaf extract in rats. J. Med. Food. Jan. 15(1): 51-57.

22. Rios, J. L.; Recio, M. C. and Villar, A. (1987). Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. J. Ethnopharmacology. 21: 139-152.

23. SAS, Statistical Analysis System. (2010). Users Guide. Statistical. Version 7th ed., SAS. Inst. Inc. Cary. N. C. USA.

24. Shihata, I. M. (1951). A Pharmacological Study of *Anagallis arvensis*. M. D. Vet. Thesis. Cairo. University.

25. Suffredini, I.; Paciencia, M.; Varella, A. and Younes, R. (2006). Antibacterial activity of Barzilian amazon plant extracts. Brazil. J. Infec. Dis. 10(6): 400-402.

26. Thakare, M. (2004). Pharmacological Screening of Some Medical Plant as Antimicrobial and Feed Additives. Master Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg .USA Virginia.

27. Verdian-rizi, M. (2009). Variation in the essential oil composition of *Laurus nobilis* of different growth stages cultivated in Iran. J. Basic and Applied. Sci. 5(1): 33-36.

28. Yasar, U.; Ibrahim, I. O.; Ibrahim, E. Y.; Iihan, D. and Goksel, D. (2012). Dtereminaton of some heavy metans and mineral nutrient of bay tree (*Laurus nobilis*) in Bratin City, Turkey. Pak. J. 44: 81-89.