

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 tannins. This study showed that ethanol extracts Saliva officinalis leaves have inhibitory effect on Gram positive 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 بايو كيميائية للمستخلص الكحولي لأوراق نبات المرمية Saliva officinalis

الخلاصة

تم تقييم الفعالية المضادة للبكتيريا للمستخلص الكحولي لأوراق نبات المرمية Saliva officinalis، لقد أظهرت نتائج التحليل الكشوفات الكيميائية ان أوراق نبات المرمية تحتوي على القلويدات، الكلايكوسيدات، الفلافونات، التربينات والسترويدات، الصابونيات، الراتنجيات، الفينولات، الكومارين والتانين و أظهر المستخلص تأثيراً سلبياً على البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام Klebsiella pneumoniae, E.coli, Proteus vulgaris, Diplococcus pneumonia, Bacillus subtilis. وكان أقل تثبيط عند التركيز 0.1 ملي غرام/مل. هذه الدراسة تبين أن المستخلص الكحولي لأوراق نبات المرمية له تأثير تثبيطي على نمو البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام.

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

المقدمة

أثارت النباتات الطبية أنباه العلماء والدارسين لأهميتها وأعتمدوها كوصفات علاجية للكثير من الحالات المرضية ، بعد تحديد فعاليتها البايولوجية والكيميائية والدوائية وذلك لسرعة تأثيرها العلاجي وفقدانها للتأثيرات 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 عديدة تختلف بانواعها وتراكيزها وتأثيرها باختلاف النبات المستخدم [1]، ولبعض النباتات الطبية لها تأثيرات مؤثرة على نمو البكتيريا والفيروسات ومقاومتها وتخليص الجسم منها ، تشير تقارير منظمة الصحة العالمية (WHO) الى اعتماد النباتات المحلية بدلاً من الأدوية المصنفة كيميائياً [2] .

أعتمدت العديد من النباتات طبيياً للأمراض 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 Epirosmanol , Carnosic acid , Carnosate methyl lacton , Oleanane, Carnosol ، والتربينات الثلاثية مثل Ursolic acid [3] ، كما تحتوي اوراقه على احماض الفينول phenols مثل Rosemaric acid وعلى الزيوت الطيارة [4]، اضافة الى احتواء اوراق المرمية على العديد من الفيتامينات مثل فيتامين E,C,A ومعقد فيتامين B Vitamin B complex [5]. لذا تعد النباتات الطبية من اهم المواد لحماية جسم الكائن الحي من تأثيرات المطفرات البيئية لقابلية مكوناته على الحماية من تأثير الطفرات [6].

نبات المرمية ينتمي الى الفصيلة الشفوية التي تضم الريحان والنعناع والزعتر والمرمية من اشهر وأقدم النباتات التي تستخدم في الطب القديم والحديث [7]. ونظراً لما تقدم أختير نبات المرمية *Salvia officinalis* وهو نبات عشبي يوجد على مدار السنة واوسع الانتشار في بلدان حوض البحر الابيض المتوسط لهذه الدراسة .

المواد وطرائق العمل

تم الحصول على اوراق نبات المرمية من السوق العراقي في كانون الثاني 2012، 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 100 غم من مسحوق اوراق النبات على دفعتين كل دفعة 50 غم ووضعت كل دفعة في داخل كشتبان Thumble ووضعت في جهاز استخلاص سكسوليت Soxhlet حاوية على 250 مل من الكحول الاثيلي 80%،

لمدة 4-5 ساعات ، بعد ذلك أخذ المستخلص الكحولي لأوراق النبات وتم تجفيفها بدرجة حرارة الغرفة حتى اكتمال الجفاف والتخلص من الكحول . أما في الكشف عن اهم المركبات الفعالة تم وفق ماذكره عبد الوهاب [8]. تم الحصول على وزن 20 ملغم من 50 غم من مسحوق الاوراق نبات الميرمية بعد استخلاصها في الكحول الايثيلي 80% والتي تقدر بنسبة استخلاص (0.0004)، وكان المستخلص ذا لون اخضر داكن مائل الى السواد وذو 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 [9]. تم تحضير المستخلص باخذ واحد غرام من المادة الفعالة مع 10 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 [10].

Results and Discution

النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج جدول (1) الكشف عن اهم المركبات الفعالة Active compounds وجود القلويدات ، الكلايكوسيدات ، الفلافونويدات ، التربينات، السترويدات ، الصابونيات ، الراتنجيات ، الفينولات ، الكومارين والتانين في المستخلص الكحولي لأوراق نبات المرمية ، وهذه النتائج تتفق مع توصل اليه Chada [2011] إذ اشار الى احتواء اوراق نبات المرمية على عدة مواد كيميائية مثل العضويات Tanins والصابونيات Saponins والكلايكوسيدات والشمع وبعض الزيوت الطيارة والتربينات Terpenes الثنائية . أما Ulabeleden وجماعة فقد لاحظوا وجود كميات كبيرة من التربينات الثنائية في نبات Saliva heldrechiana وهو أحد اجناس نبات المرمية [12] .

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

أظهرت البكتيريا السالبة لصبغة غرام وهي *E.coli* و *Klebsiella pneumonia* و *Proteus vulgaris* تأثيراً تثبيطياً واضحاً للمستخلص الكحولي لأوراق نبات المرمية عند التركيز 100 مايكروغم /مل ، أذ كانت قراءة الكثافة الضوئية (0.03 ± 0.122 ، 0.06 ± 0.193 ، 0.05 ± 0.169) على التوالي مقارنة بالسيطرة (0.06 ± 0.345 ، 0.05 ± 0.367 ، 0.06 ± 0.41) وكان أفضل التراكيز تثبيطاً لنمو البكتيريا عند (100 و 10) مايكروغم/مل . اما البكتيريا الموجبة لصبغة غرام وهي *Diplococcus pneumonia* و *Bacillus subtilis* قد تأثرت عند التركيز 100 مايكروغم/مل أكثر من تأثير بكتيريا السالبة لصبغة غرام ، أذ كان التركيز 100 مايكروغم /مل قد أعطى تثبيطاً يتضح من خلال قراءة الـ (0.02 ± 0.114 ، 0.05 ± 11.2) على التوالي مقارنة

بالسيطرة والتي كانت (0.04 ± 0.337 ، 0.05 ± 0.382) على التوالي . كما يلاحظ أن البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام قد أظهرت التثبيط عند التركيز 0.1 مايكروغم /مل أذ أعطى تأثيراً واضحاً في قراءة الـ O.D ، وكان التركيز 100 مايكروغم /مل أفضل التراكيز تثبيطاً لجميع ضروب البكتيريا المستخدمة ، ويلاحظ من الشكل (1 و 2 و 3) حصل تثبيط في أعداد البكتيريا السالبة لصبغة غرام ممثلة بـ *E.coli* و *Klebsiella pneumonia* و *Proteus vulgaris* ، كما يلاحظ في الشكل (4 و 5) انخفاض أعداد البكتيريا الحية الموجبة لصبغة غرام *Diplococcus pneumonia* و *Bacillus subtilis* .

من خلال النتائج التي تم الحصول عليها أن المستخلص الكحولي لأوراق نبات المرمية يؤثر على بكتيريا الموجبة لصبغة غرام أكثر من بكتيريا السالبة لصبغة غرام وهذه النتائج تتفق مع تأثير المستخلص الكحولي لأوراق نبات الجريز *Eruea sativa* [13] وتأثير العكبر (Bees gum) العراقي [14] . ان احتواء اوراق نبات المرمية على العديد من المركبات الكيميائية مثل Tanins , Fumaric acid , Mlic acid , Vrsoloc acid وكذلك الصابونيات sponins والشموع waxes و pentoses وبعض الزيوت الطيارة [11] و وجود التربينات الثنائية التي تمتاز بكونها مضادة لنمو البكتيريا وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه [15] وجماعته بوجود فعالية تثبيطية لمستخلصات نبات المرمية ضد بكتيريا الموجبة لصبغة غرام وبتراكيز (0.3%) والتي تعود الى احتواء نبات المرمية على نسبة ما بين (3-8%) من Tanins ذات التأثير المضاد لنمو البكتيريا [16] كما ان احتواء هذا المستخلص على الفلافونيات والقلويدات ، وكذلك لوجود بعض أنواع التربينات الثنائية التي تمتاز بكونها مضادات لنمو البكتيريا [17 و 18] .

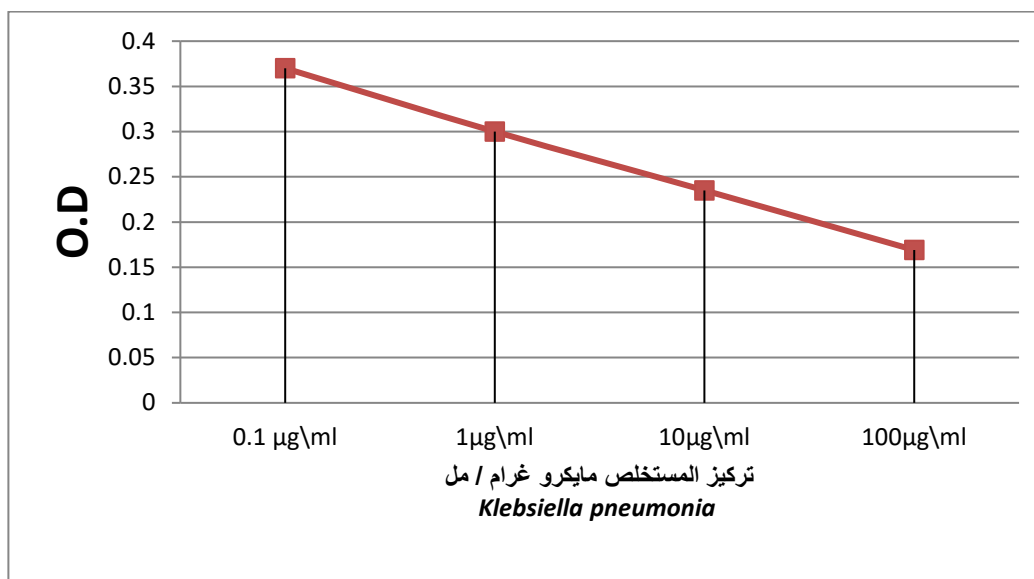
كذلك لوحظ في هذه الدراسة تفوق التأثير التثبيطي للمستخلص الكحولي لأوراق نبات مرمية والذي يتوافق مع ما اكده عدد من الباحثين على ان الكحول الايثيلي له القدرة على اذابة عدد من المواد الفعالة مثل التربينات والقلويدات والفلافونيدات وتجميعها في المستخلص الخام بكميات كافية لاجداث إيقاف نمو الخلايا ومنعها من الانقسام الخلوي والتي وجدت في المستخلصات المماثلة لنبات المعدنوس

[19] وربما التأثيرات على فعاليات الانزيمات التضاعف DNA والاستنساخ mRNA وتنشيط جميع الفعاليات الحيوية الأساسية للخلايا [20 و 21] المختلفة لهذا تعتبر هذه المستخلصات كمضادات بكتيرية وميكروبية Antimicrobial, Antibacterial لفعاليتها لذا نقرح في الدراسة الحالية استخدام هذه المستخلصات في علاج بعض الأمراض البكتيرية .

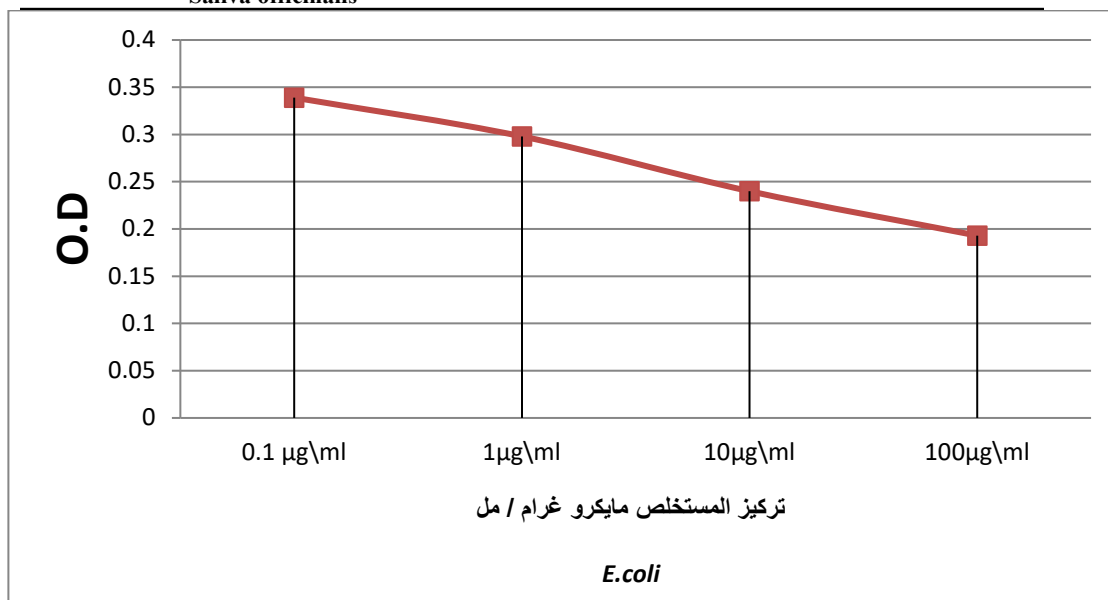
جدول (1) أهم المركبات الفعالة في مستخلص الكحولي لأوراق نبات المرمية

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 الزنبيق	راسب ابيض	+
الراتينجات	كحول اثيلي+ماء حمض 4HCL%	عكورة واضحة	+
الفينولات	كلوريد الحديد 1%	الاخضر المزرق	+
الكومارين	ورق ترشيح مبلل بهيدروكسيد الصوديوم	اصفر مخضر	+
التانين	خلات الرصاص او كلوريد الحديد 1%	راسب ابيض هلامي اخضر مزرق	+

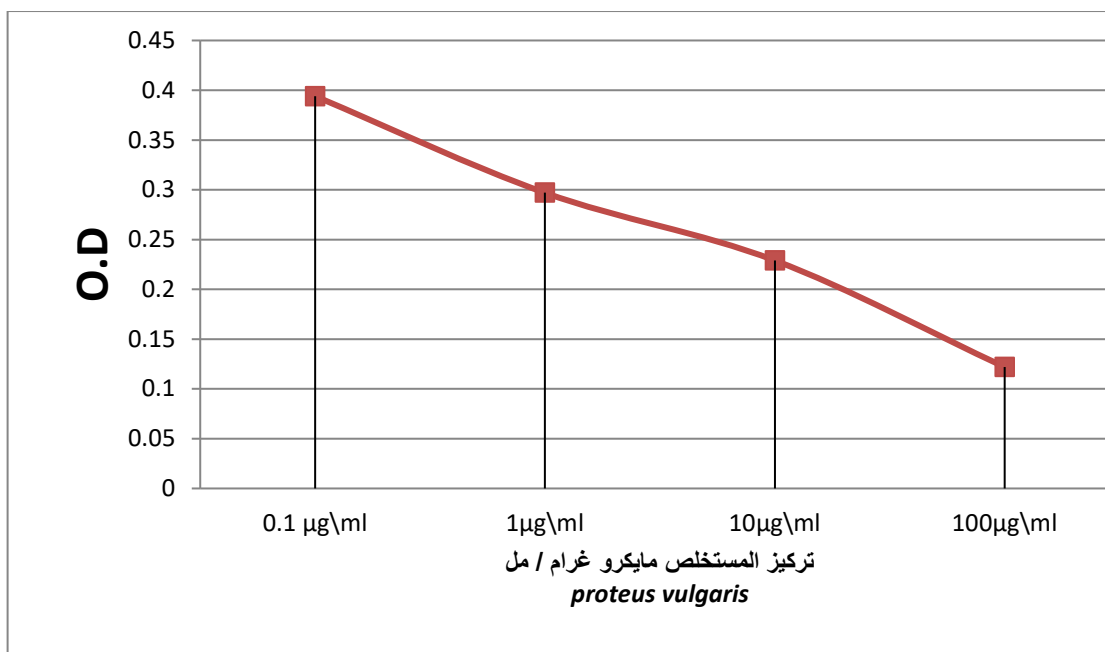
(+) كشف موجب ، (-) كشف سلبي



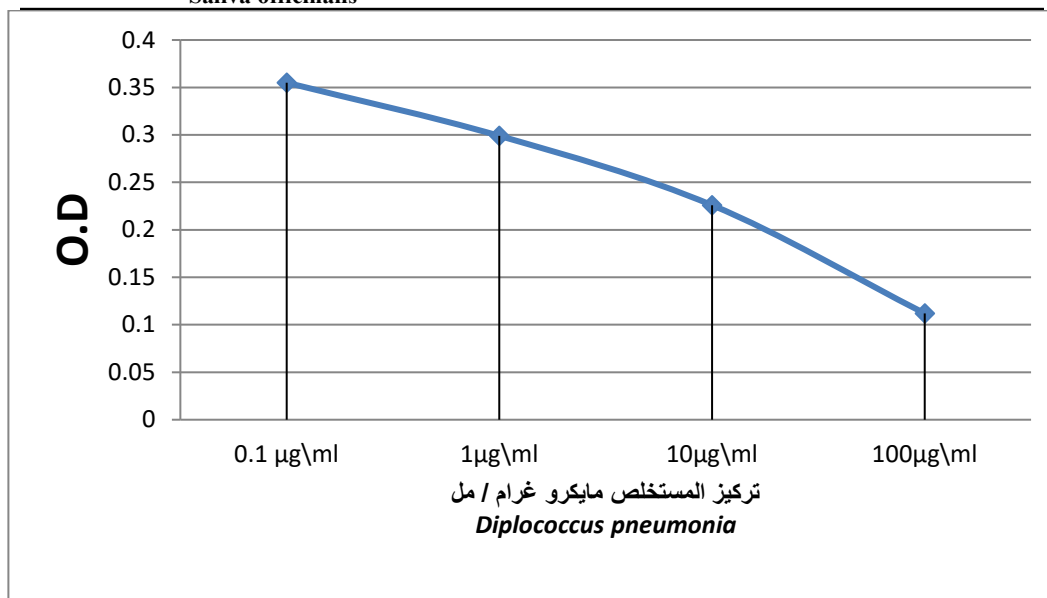
شكل (1) تأثير مستخلص أوراق نبات المرمية على أعداد البكتيريا السالبة لصبغة كرام
Klebsiella pneumonia



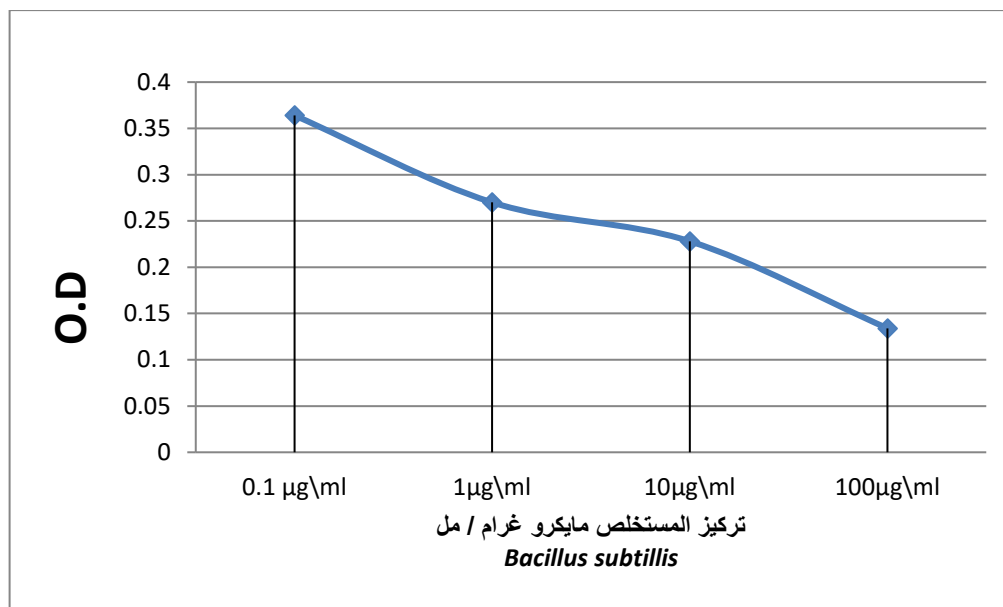
شكل (2) تأثير مستخلص أوراق نبات المرمية على أعداد البكتريا السالبة لصبغة كرام E.coli



شكل (3) تأثير مستخلص أوراق نبات المرمية على أعداد البكتريا السالبة لصبغة كرام Proteus vulgaris



شكل (4) تأثير مستخلص أوراق نبات المرمية على أعداد البكتريا الموجبة لصبغة كرام
Diplococcus pneumonia



شكل (5) تأثير مستخلص أوراق نبات المرمية على أعداد البكتريا الموجبة لصبغة كرام
Bacillus subtilis

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 *Petroselinum 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.Ix, 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 *Zeiteshrift f ' ur Naturforschung*, Vol.55: 790-793.
- [6]الموسوي ، علي حسين عيسى (1979) علم تصنيف النبات . الطبعة الأولى . كلية العلوم / جامعة بغداد .
- [7].Willis,J.C.(1973) A dictionary of the Flowering and Ferns. 8th ed.Univ. Press. Cambridge .pp 1022.
- [8] . عبد الوهاب ، أفنان أسماعيل (2010) تأثير مستخلص الكحول الأيثلي الخام لبذور وأوراق نبات المعدنوس *Petroselinum 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 (1998) استخدام البرنامج الاحصائي SPSS. مطبوعات الجامعة ، دار الشرق للطباعة ،صفحة 358 .
- [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].Ulubelen, A.; Topeu, G. and Tan, N. (1995) Deterpenoids from saliva heldrechiana phytoch. 40(5): 1473-1475.

- [13] علي، أنتصار حسين وحسين، أمل على (2007) فعالية مستخلص نبات الجرجير كمضاد لبكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام . مجلة أم سلمة للعلوم . المجلد 4 (3):375-378
- [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 (2011) التأثير الوراثي الخلوي للمستخلص الكحولي الايثيلي لاوراق المعدنوس *Petroselinum crispum* في خلايا نقي العظم للفئران المختبرية *Mus musculus* . مجلة الهندسة والتكنولوجيا :المجلد 29 (1)
- [20].محمد ، عباس عبدالله ومراد ، شلال حسين و عبد الوهاب ،افنان اسماعيل (2011) التأثير السمي الخلوي للمستخلص الايثيلي الخام لأوراق نبات المعدنوس في خط خلايا سرطان الرحم Hela . مجلة الهندسة والتكنولوجيا / الجامعة التكنولوجية المجلد 29(12)
- [21]. محمد، عباس عبد الله ومراد ، شلال وعبد الوهاب،افنان أسماعيل(2011) التأثير السمي للمستخلص الايثيلي لاوراق نبات المعدنوس في خط خلايا سرطان الغدد اللبنية الفأري AMN-3 . مجلة الهندسة والتكنولوجيا المجلد 29(1).