مقاله پژوهشی

مطالعه اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی گیاه ترشک (Rumexalveollatus L.) بر میکروارگانیسم‌های شاخص در شرایط آزمایشگاهی

اعظم مرادی[۱]، غلامحسین ابراهیمی پور[۱]، مریم کارخانه[۲]، عبدالرزاق مرزبان[۱و۳*]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات گوارش و بیماری‌های کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۳/۱۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۵/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر توجه بیشتری به داروهای مشتق شده از گیاهان معطوف شده است. تاکنون ترکیبات متنوعی از گیاهان به دست آمده است که طیف وسیعی از اثرات درمانی را پوشش می‌دهد. هدف از این تحقیق بررسی اثر آنتی اکسیدانی و آنتی میکروبی گیاه ترشک و تشخیص نسبی ماهیت ترکیبات موثره آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا عصاره‌گیری به روش خیساندن از نمونه خشک شده گل گیاه ترشک انجام گرفت. سپس اثر ضدمیکروبی عصاره آبی و اتانولی به روش انتشار دیسک بر روی ۸ باکتری و ۲ نوع قارچ انجام شد. اثر آنتی اکسیدانی با روش‌های توان احیای آهن و فسفومولیبدنیوم به همراه تعیین مقدار فنل تام صورت پذیرفت. در انتها تشخیص نسبی ماهیت ترکیبات گیاهی توسط روش‌های شیمیایی و رنگ سنجی انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد که عصاره اتانولی دارای بیشترین فعالیت ضدمیکروبی بوده، در حالی که اثر ضدمیکروبی عصاره آبی در حد بسیار ضعیفی بود. بررسی خواص آنتی اکسیدانی نیز نشان داد که عصاره اتانولی اثر قویتری نسبت به عصاره آبی دارد. این نتایج در مورد مقدار فنل تام نیز به همین صورت بود. در تعیین ماهیت ترکیبات گیاهی وجود فلاونوئید، آلکالوئید، آنتراکینون، تانن، گلیکوزید و قندهای احیایی تائید شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به این که مطالعات کمی بر روی اثرات داروئی گیاه ترشک منتشر شده است، نتایج این تحقیق می‌تواند گزارش ارزشمندی در رابطه با نقش موثر آن بر کنترل عفونت و تاثیر آن بر ضد عوامل اکسیدان باشد.

کلمات کلیدی: **ترشک، اثر ضد میکروبی، اثر آنتی اکسیدانی**

مقدمه

استفاده از ترکیبات داروئی با منشا گیاهی از زمان‌های بسیار دور مورد توجه بشر بوده است. داروهایی که امروزه در دنیا به طور وسیعی برای درمان انواع بیماری‌ها اعم از عفونت‌های باکتریایی، ویروسی و قارچی تا انواع بیماری‌های متابولیک و حتی سرطان به کار می‌رود منشا طبیعی داشته‌اند (۱).

امروزه محققین به مزایای داروهای گیاهی پی برده‌اند به طوری که ترکیبات گیاهی و مشتقات آن‌ها تقریبا یک سوم کل داروهای موجود را تشکیل می‌دهد (۲). یکی از دلایل مهم تمایل جوامع پزشکی به استفاده از ترکیبات گیاهی عوارض جانبی پایین آن‌ها نسبت به داروهای شیمیایی بوده که طی سال‌ها مصرف در طب سنتی به اثبات رسیده است (۳) .

علاوه براین مصرف داروهای صنعتی و ترکیبات شیمیایی می‌تواند منجر به ایجاد واکنش‌های متابولیسمی نامطلوب گردد و در اغلب اوقات رادیکال‌های آزاد و پراکسیدها تولید شوند. تحقیقات نشان داده است که داروهای گیاهی سرشار از ترکیبات مختلف دارای فعالیت زیستی بوده به طوری که از تولید ترکیبات اکسیدان جلوگیری می‌کنند (۴).

* **نویسنده مسئول: عبدالرزاق مرزبان**، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. تلفن: ۸۸۲۳۲۵۵ -۹۸۵۱۱+ email: Marzbana901@mums.ac.ir

همان طور که سازمان بهداشت جهانی در مورد استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک‌های رایج هشدار داده و نگرانی‌های جدی در رابطه با افزایش مقاومت در میکروارگانیسم‌های بیماری زا به وجود آمده است، تحقیقات در زمینه کشف مواد ضد میکروبی موثر بر روی این میکروارگانیسم‌های مقاوم به طور جدی آغاز شده است (۵ و ۶). تاکنون گزارشات متعددی در مورد فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات گیاهی منتشر شده است. ترکیباتی نظیر پلی فنل‌ها، آلکالوئیدها، ترپن‌ها و کومارین‌ها نقش مهمی در تاثیر عصاره گیاهان بر رشد میکروارگانیسم‌ها دارند (۷).

گیاه ترشک از تیره Polygonaceae می‌باشد. در گذشته برگ و گل گیاه ترشک در درمان گزیدگی، کوفتگی، سوختگی و به عنوان خنثی کننده زهر کاربرد داشته است (۸). اثر گیاهان این تیره بر روی ترمیم زخم‌های دستگاه گوارش حیوانات آزمایشگاهی تائید شده است (۹). اثرات ضدمیکروبی گیاهان خانواده Polygonaceae به خصوص Rumex crispus بر ضد باکتری‌های گرم مثبت و منفی تائید شده است (۱۰). این گیاه در اکثر مناطق ایران به خصوص در نواحی کوهستانی می‌روید. گیاه ترشک که در فصل بهار در ماه‌های اول و دوم رشد می‌کند دارای برگ‌های پهن و آب‌دار است و مزه‌ای ترش دارد. در مناطق جنوبی ایران به ویژه استان فارس از آن به عنوان داروی گیاهی موثر بر دستگاه گوارش استفاده می‌شود. از برگ‌های تازه و آب‌دار این گیاه به صورت خام و گل‌های خشک شده آن پس از جوشاندن مصرف می‌شوند. اگر چه مطالعات وسیعی روی دیگر گونه‌های خانواده Polygonaceae صورت گرفته است ولی بر روی گونه Rumex alveollatus مطالعات بسیار جزئی انجام شده است. بنابراین هدف از انجام این تحقیق ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی و اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی و آبی این گیاه بر باکتری‌ها و قارچ‌های شاخص آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه: نمونه‌های بافت‌های برگ و گل‌های گیاه ترشک از مناطق کوهستانی شهرستان زرین دشت واقع در جنوب استان فارس جمع آوری شد. پس از انتقال نمونه‌های جمع آوری شده به آزمایشگاه، در دمای اتاق و دور از نور مستقیم طی مدت زمان ۱۴روز خشک شدند. پس از آن توسط هاون به صورت پودر در آمده و وزن آن‌ها با استفاده از یک ترازو سنجیده شد و به ۲ قسمت مساوی تقسیم شد.

عصاره‌گیری توسط آب: به منظور تهیه عصاره آبی از برگ و گل‌های گیاه ترشک ۳۰ گرم از نمونه پودر شده در ۱۰۰ ml آب مقطر در یک ارلن ۲۵۰ ml ریخته شد و برای مدت ۱ ساعت در بن ماری با دمای ۵۰ °C خیسانده شد. پس از آن به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر تکان داده شد. در مرحله بعد نمونه خیسانده شده توسط کاغذ واتمن ۴۵ میکرومتری فیلتر شد و عصاره آبی فیلتر شده در لیوفیلیزاتور خشک شد.

عصاره‌گیری توسط اتانول: برای تهیه عصاره اتانولی ۳۰ گرم از پودر خشک شده گیاه را در ۱۵۰ ml اتانول ۹۸ درصد ریخته و برای مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر تکان داده شد. در مرحله بعد نمونه مورد نظر از فیلتر عبور داده و در دمای ۴۵ °C با استفاده از روتاری خشک شد.

میکروارگانیسم‌های تحت بررسی: باکتری‌ها و قارچ‌های مورد استفاده در این تحقیق از آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده علوم زیستی شهید بهشتی تهیه شدند. لیست کلی این میکروارگانیسم‌ها به همراه کد اختصاری آن در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: میکروارگانیسم‌های استاندارد مورد استفاده در آزمایش اثر ضدمیکروبی

نام میکروارگانیسم	کد اختصاری	مشخصات ظاهری
سودوموناس آئروژینوزا	ATCC۸۵۳۲۷	باسیل گرم منفی
اشریشیاکلی	ATCC۲۵۹۲۲	باسیل گرم منفی
کلبسیلا پنومونیه	ATCC۱۰۰۳۱	باسیل گرم منفی
انتروکوکوس فکالیس	ATCC۲۹۷۳۷	کوکسی گرم مثبت
پروتئوس ولگاریس	PTCC۱۰۷۹	باسیل گرم منفی
سراشیا مارسسنس	ATCC۱۱۱۱	باسیل گرم منفی
استافیلوکوکوس ارئوس	ATCC۲۵۹۲۳	کوکسی گرم مثبت
باسیلوس سوبتیلیس	ATCC۶۵۴	باسیل گرم مثبت
کاندیدا آلبیکانز	ATCC۱۰۲۳۱	قارچ
آسپرژیلوس نایجر	ATCC۱۶۴۰۴	قارچ

بررسی فعالیت ضدمیکروبی: فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی با تهیه دیسک‌های آغشته به هر عصاره بدین صورت انجام شد که ۱ گرم از عصاره اتانولی خشک شده به ۱۰ml از دی متیل سولفوکساید (DMSO) ۱۰ درصد اضافه شد. برای تهیه دیسک از عصاره آبی نیز ۱ گرم در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استفاده شد. برای ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی، غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم از هر عصاره تهیه و بر روی دیسک‌های بلانک ریخته شد. روش کار بدین صورت بود که ۱ml از هر غلظت بر روی یک دیسک ریخته شد و پس از آن دیسک‌ها با دمیدن هوا توسط پمپ خشک شدند و عصاره‌ها جذب دیسک شدند. بررسی خواص ضدمیکروبی بدین روش بود که ابتدا کشت تازه ۲۴ ساعته از باکتری‌ها و قارچ‌ها روی پلیت نوترینت آگار تهیه شد. سپس از هر سویه به صورت گسترده توسط سواپ استریل بر روی مولرهینتون آگار کشت داده شد. در انتها دیسک‌های حاوی رقت‌های متفاوتی از هر عصاره روی سطح پلیت‌ها قرار داده شد. تمامی آزمایش‌ها به صورت سه تکرار موازی انجام شد. از کلرامفنیکل برای مقایسه اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی با آن و از دی متیل سولفوکسید به عنوان شاهد منفی استفاده شد. یک دیسک نیز از اتانول تهیه شد تا مشخص شود که اثر ضدمیکروبی ناشی از حلال‌های مورد استفاده نبوده است. در انتها قطر هاله عدم رشد پس از گرماگذاری پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C اندازه‌گیری شد و به صورت میانگین ۳ تکرار تعیین شد.

بررسی اثر آنتی اکسیدانی از طریق توان احیاکنندگی آهن: فعالیت آنتی اکسیدانی دو عصاره آبی و اتانولی بر اساس توان احیاکنندگی آهن فریک به فروس مطابق با روش بنزی و استرین با اندکی تغییر انجام گرفت. در این روش ابتدا ۲۰ µl از هر عصاره (با غلظت ۱mg/ml از پودر خشک) با ۱ml از معرف کاری مخلوط شده و پس از ۵ دقیقه قرار گرفتن در دمای محیط در طول موج ۵۹۳ نانومتر جذب نمونه اندازه‌گیری شد. در نمونه کنترل به جای نمونه از استاندارد سولفات آهن با غلظت ۰/۳۷ تا ۰/۱۸۵ میکرومول استفاده شد. فعالیت آنتی اکسیدانی بر حسب میزان احیاکنندگی آهن با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکرومول آهن احیاشده بر وزن خشک نمونه اندازه‌گیری شد (۱۱).

بررسی اثر آنتی اکسیدانی به طریق فسفومولیبدنیوم: فعالیت آنتی اکسیدانی از طریق ایجاد کمپلکس فسفومولیبدنیوم با احیای مولیبدن (VI) به مولیبدن (V) بر اساس روش پریتو صورت گرفت. ۰/۱ml از هر عصاره با غلظت ۱mg/ml با ۱ml از محلول معرف شامل اسید سولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸میلی مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی مولار مخلوط شد. نمونه‌ها برای مدت زمان ۹۰ دقیقه در دمای ۸۰°C در بن ماری گرما داده شد و پس از آن جذب آن در طول موج ۶۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی از محلول ترولکس با غلظت ۱/۶-۰/۴ میکرومولار استفاده شد. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها بر حسب میکرومول ترولکس بر گرم وزن عصاره در نظر گرفته شد (۱۲).

تشخیص ماهیت ترکیبات آلی در نمونه: برای تشخیص مواد آلی موجود در نمونه پودر خشک شده از روش خیساندن در آب استفاده شد و مواد آلی موجود در نمونه گیاهی با روش‌های استاندارد موجود مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایشات شامل مراحل زیر بودند:

۱-تشخیص و تعیین فنل تام نمونه: مقدار فنل تام در نمونه عصاره آبی و اتانولی با روش فولین-سیکالتو تعیین شد. مراحل اندازه‌گیری بدین صورت بود که ۲۰۰µl از نمونه با غلظت ۱mg/ml را با ۱ml از معرف فولین، ۱/۵ml کربنات سدیم (۲۰۰mg/ml) و ۱/۵ml آب مقطر در یک لوله آزمایش مخلوط کرده و برای مدت زمان ۲ ساعت در دمای اتاق نگه داشته و سپس جذب ان در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. استاندارد فنل با استفاده از اسید گالیک رسم شد و مقدار فنل تام برحسب میلی گرم اسید گالیک در گرم نمونه بیان گردید (۱۲).

۲-تشخیص فلاونوئیدها: برای تائید وجود فلاونوئید به طور کیفی، ابتدا ۱ گرم از پودر خشک را در ۱۰ml آب مقطر ریخته و سپس ۴ml متانول ۵۰ درصد به آن اضافه نموده و سپس ۱۰۰ میکروگرم فلز منیزیم به آن اضافه شد و درون بن ماری ۴۵ °C برای مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. پس از آن نمونه فیلتر شد و از مایع فیلتر شده ۴ml برداشته و ۱ml اسید کلریدریک غلیظ به آن اضافه گردید. پس از زمان اندکی مشاهده رنگ قرمز نشان دهنده

فلاونوئید و رنگ نارنجی نشان دهنده وجود فلاوون در نمونه بود (۱۱).

۳-تشخیص آلکالوئیدها: ۱ گرم از پودر خشک را برداشته به ۲۰۰ml اسید استیک ٪۱۰ در اتانول در یک ارلن ۲۵۰ml اضافه شد. سپس درب ظرف را بسته و برای مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. پس از آن نمونه فیلتر شده و به میزان یک چهارم توسط روتاری در دمای ۴۵ $^{\circ}C$ تغلیظ شد. در نهایت از معرف مایر به صورت قطره قطره به نمونه اضافه گردید تا این که محلول کدر شده و یا ترکیبات آلکالوئیدی به صورت رسوب زردرنگ در ته لوله آزمایش مشاهده شود. مقدار رسوب تشکیل شده نشان دهنده محتوای نسبی ترکیبات آلکالوئیدی در نمونه می‌باشد (۲).

۴-تشخیص تانن‌ها: ۰/۵ گرم از پودر خشک را در ۲۰ml آب مقطر ریخته و پس از جوشاندن نمونه آن را از فیلتر گذرانده و با اضافه نمودن قطره قطره از کلرید آهن (III) ٪۰/۱ رنگ سبز تیره تشکیل شده که نشان دهنده کاتکول تانن‌ها می‌باشد. در صورتی که محصول واکنش دارای رنگ آبی سیاه باشد تائید کننده وجود گالیک تانن‌ها در نمونه می‌باشد (۱۳).

۵-تشخیص ساپونین‌ها: ۵ گرم از پودر خشک در ۵ ml آب مقطر ریخته و پس از گرمادهی در بن ماری به مدت ۱۵ دقیقه فیلتراسیون صورت گرفت. سپس ۲ml از نمونه فیلتر شده با ۳ml آب مقطر مخلوط کرده و با گرم کردن و تکان دادن آن کف ایجاد شده روی سطح نشان دهنده وجود ساپونین می‌باشد. برای تائید این نکته ۱ml روغن خوراکی به نمونه اضافه نموده و خاصیت امولسیون کنندگی ساپونین‌ها بدین صورت اثبات می‌شود (۱۴).

۶-تشخیص آنتراکینون‌ها: ۱ گرم از پودر خشک را در ۱۰ml اسیدکلریدریک ٪۱۰ ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۸۰ $^{\circ}C$ گرما داده شد. سپس نمونه فیلتر شد و ۱۰ml کلروفرم به آن افزوده شد. در نهایت ۱ml آمونیاک ٪۱۰ به مخلوط اضافه گردیده و پس از گرمادهی در صورت وجود کینون‌ها به خصوص آنتراکینون رنگ صورتی پدیدار می‌شود (۱۳).

۷-تشخیص گلیکوزیدها: ۱ گرم از پودر خشک در ۲ml اسید استیک گلاسیال حل نموده، ۲۰۰ µl کلرید آهن (III) به آن اضافه گردید. سپس با اضافه نمودن ۱ml اسیدسولفوریک غلیظ و ایجاد رنگ قرمز قهوه‌ای به صورت یک حلقه در فاصله بین دو لایه اسید استیک و اسیدسولفوریک و ایجاد لایه سبز آبی در بالای آن وجود گلیکوزیدها تشخیص داده شد (۱۵).

۸-تشخیص ترپنوئیدها و استروئیدها: ۱ گرم از پودر خشک شده با ۰/۵ml انیدرید استیک و ۰/۵ml کلروفرم مخلوط کرده، سپس قطره قطره اسیدسولفوریک به آن اضافه شد. ایجاد رنگ بنفش متمایل به قرمز نشان از وجود ترپن و رنگ سبزآبی نشان دهنده استروئید در نمونه بود (۱۴).

۹-تشخیص قندهای احیاکننده : ۱ گرم از پودر را برداشته و در ۱۰ml آب مقطر حل نموده، پس از ۲۴ ساعت خیساندن و فیلتر کردن ۱ml معرف فهلینگ به آن اضافه گردید. تشکیل رسوب قرمز آجری دلیل بر وجود قندهای احیاکننده در نمونه بود (۱۳).

تجزیه و تحلیل آماری

برای اطمینان از نتایج حاصل از آزمایشات سه تکرار از هر آزمایش انجام شد و میانگین و انحراف معیار (standard deviation) آن‌ها محاسبه و به عنوان نتیجه ثبت شد. برای مقایسه میانگین هاله عدم رشد از تحلیل واریانس یک طرفه و معنی‌دار بودن اختلاف‌ها بین آزمایشات از آزمون تی در سطح $p<0.05$ استفاده شد. این محاسبات با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام گرفت.

نتایج

همان گونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، عصاره آبی گیاه ترشک بیشترین اثر مهارکنندگی بر روی سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی، آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلبیکانز را نشان داد. با این وجود عصاره اتانولی گیاه ترشک روی طیف وسیع‌تری از باکتری‌ها و قارچ‌ها موثر بود به طوری که در غلظت ۳۰۰ mg/disc بیشترین اثر به ترتیب بر روی اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، آسپرژیلوس نایجر و کمترین اثر بر روی انتروکوکوس فکالیس داشت و هیچکدام از عصاره‌ها بر روی رشد پروتئوس اثری نشان ندادند. آنالیزهای آماری نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بین هاله عدم رشد در همه باکتری‌ها در حضور عصاره‌ها و شاهد بود.

جدول ۲: نتایج تست‌های ضدمیکروبی بر اساس روش انتشار دیسک.

میکروارگانیسم	کلرامفنیکل (۳۰mg/disk)	عصاره آبی (mg/disk)		عصاره اتانولی (mg/disk)	
		۱۰۰	۳۰۰	۱۰۰	۳۰۰
سودوموناس آئروژینوزا	۳۵/۱۷±۳/۶۴	-	۱۱/۳±۳/۳۱	۱۸/۱۲±۲/۶	۲۵/۳۳±۰/۳۲
اشریشیاکلی	۳۰/۷۵±۲/۲	۱۵/۱۹±۳/۶۷	۱۷/۴±۲/۱	۱۵/۳۵±۲/۲	۲۷/۴۵±۳/۲
کلبسیلا پنومونیه	۲۳/۳۸±۱/۶۲	-	-	۵/۳۲±۰/۴۶	۱۹/۱۲±۰/۳۱
انتروکوکوس فکالیس	۱۸/۳۵±۳/۳۴	-	-	-	۸/۴۲±۱/۸
پروتئوس ولگاریس	۱۶/۶۷±۱/۳۲	-	-	-	-
سراشیا مارسسنس	۲۷/۵۳±۲۷	-	-		۱۷/۱±۰/۳۶
استافیلوکوکوس ارئوس	۳۴/۷۲±۲/۲۷	-	-	۷/۳۱±۱/۵۳	۱۶/۳۷±۱/۵۷
باسیلوس سوبتیلیس	۳۲/۵±۲/۳۷	-	-	۸/۶۱±۲/۸	۱۰/۲۱±۰/۶۵
کاندیدا آلبیکانز	-	۱۴/۳۲±۱	۱۷/۳۴±۰/۸۸	۱۲/۴±۱/۱۶	۱۴/۴۲±۰/۳۷
آسپرژیلوس نایجر	-	۲۳/۵±۲/۴۱	۲۸/۵۶±۲/۷۲	۱۳/۵±۱/۶	۲۲/۳۱±۲/۱۸

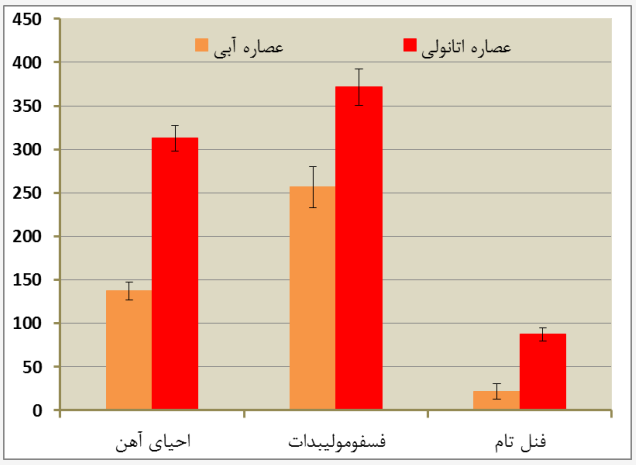
مقادیر ذکر شده در جدول قطر هاله عدم رشد (mm) در اطراف دیسک‌ها را نشان می‌دهد

جدول ۳: ماهیت نسبی ترکیبات موجود در گل و برگ‌های ترشک به همراه روش‌های شناسایی آن‌ها ذکر شده است.

ماده شیمیایی	روش شناسایی	تست‌های شناسایی	نتیجه
فلاونوئید	ایجاد رنگ قرمز	شینودا	++
آلکالوئید	رسوب سفید متمایل به زرد	تست مایر	+
ترپنوئید	قرمز -بنفش	لیبرمن بورشارد	-
استروئید	سبز- آبی	لیبرمن بورشارد	-
تانن	رنگ آبی (گالیک تانن)و سبز تیره (کاتکول تانن)	فریک کلراید	+
ساپونین	ایجاد کف پایدار و امولسیون کردن روغن	فورث	-
آنتراکینون	عدم ایجاد رنگ زرد	بورن- تراگر	+
گلیکوزید	ایجاد محلول قرمز- قهوه‌ای	کپلر کیلیانی	+
قند احیاکننده	ایجاد رنگ سبز (فهلینگA) یا قهوه‌ای (فهلینگ B)	فهلینگ	++

شناسایی مواد آلی موجود در نمونه: جدول شماره ۳ ترکیبات شیمیایی موجود در نمونه‌های مورد آزمایش به همراه تست‌های شیمیایی انجام شده را نشان می‌دهد. در این آزمایش‌ها بیشترین مقدار ماده شناسایی شده فلاونوئید و قندهای احیاکننده بودند. در عین حال ترکیبات دیگری که وجود آن‌ها مورد تائید قرار گرفت آلکالوئید، تانن و آنتراکینون و گلیکوزیدها بودند.

بررسی اثر آنتی اکسیدانی: در این آزمایش اثر آنتی اکسیدانی از طریق احیای آهن فریک به فروس به عنوان توان آنتی اکسیدانی مواد موجود در نمونه در نظر گرفته شد. همچنین اثر آنتی اکسیدانی از طریق فسفومولیبدنیوم اندازه‌گیری شد. نتایج این آزمایش به صورت نمودار ۱ ارائه شده است. همان گونه که مشاهده می‌شود در هر دو عصاره توان اکسیدانی احیای آهن و فسفومولیبدنیوم در عصاره اتانولی بیشتر از آبی بوده و اختلاف معنی داری بین ظرفیت آنتی اکسیدانی وجود دارد. مقدار فنل تام نیز در عصاره اتانولی بیشتر از آبی بود.



نمودار ۱: فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های آبی و اتانولی به روش احیای آهن و فسفومولیبدنیوم و مقدار فنل تام در هر عصاره را نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده در این آزمایش‌ها نشان دهنده اثر ضدمیکروبی بالای عصاره اتانولی در مقایسه با عصاره آبی است. این داده‌ها با تحقیق محمدی و همکاران (۲۰۱۳) شباهت داشت به طوری که آن‌ها اثر عصاره اتانولی و متانولی برگ گیاه ترشک (Rumex alveollatus) را بر رشد سودوموناس آئروژینوزا بیشتر از استافیلوکوکوس ارئوس گزارش کردند. همچنین آن‌ها عدم تاثیر عصاره آبی این گیاه را بر هر دو باکتری ذکر شده نشان دادند (۱۶). در این تحقیق اثر مهارکنندگی عصاره آبی تنها در غلظت بالا (۳۰۰mg/disc) اثر ضعیفی بر مهار رشد سودوموناس داشت. وجود ترکیبات فنلی در عصاره گیاهان یکی از علل اصلی دارا بودن اثر ضدمیکروبی آن می‌باشد، احتمالا مقدار بسیارکم ترکیبات فنلی در عصاره آبی گل گیاه ترشک نسبت به برگ آن دلیل اصلی فعالیت ضد میکروبی ضعیف آن می‌باشد (۱۷). در یک مطالعه دیگر که روی یک گونه دیگری از این تیره polygonaceae بنام R. obtusifolius انجام شد بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی برای عصاره اتانولی این گیاه به دست آمد (۱۸). یاداو و همکاران خاصیت ضد میکروبی برای گونه R. nepalensis برضد دو باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس ارئوس و استرپتوکوکوس موتانس، دو گرم منفی اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا و قارچ کاندیدا آلبیکانز را گزارش نمودند (۱۹). مصطفی نشان داد که عصاره اتری R. vesicarius L فعالیت ضد میکروبی بالایی بر ضد سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس ارئوس، کلبسیلا پنومونیه و استرپتوکوکوس پیوژنز دارد (۲۰). با مقایسه مطالعات انجام شده با این تحقیق می‌توان به یک نکته اشاره نمود که عصاره اتانولی و سایر عصاره‌های غیر آبی این گیاه و خانواده polygonaceae دارای ترکیبات مختلف آنتی اکسیدان می‌باشد. در این تحقیق مشخص گردید که ترکیباتی از قبیل فلاونوئیدها، گلیکوزیدها، قندهای احیاکننده، آنتراکینون، تانن و آلکالوئیدها وجود دارد. این ترکیبات دارای اثرات آنتی اکسیدانی قوی بوده و گزارش‌های متعددی راجع به آن‌ها منتشر شده است (۲۱). تحقیقات نشان داده است که پلی فنل‌هایی همچون تانن‌ها، آنتراکینون‌ها و ترکیبات فلاونوئیدی علاوه بر خواص آنتی اکسیدانی دارای اثرات ضدمیکروبی موثری بر ضد میکروارگانیسم‌های مختلف می‌باشند (۲۲ و ۲۳، ۱). امروزه مشخص شده است که ترکیبات آنتی اکسیدان موجود در گیاهان تیره polygonaceae عامل موثر در جلوگیری از التهاب بافت‌های آسیب دیده می‌باشد (۲۴ و ۹). ترکیبات فلاونوئیدی بخاطر خواص آنتی اکسیدانی قوی که دارند به عنوان مهار کننده قوی سیتوکین‌های التهابی شناخته شده‌اند (۲۵). وجود این ترکیبات در عصاره ترشک می‌تواند تائیدی بر خواص درمانی آن در ناراحتی‌های سیستم گوارشی باشد. در این خصوص کاظمی و همکاران (۱۹۹۴) اثرات ضدمیکروبی کینون‌ها را بر ضد سودوموناس سودومالئی، باسیلوس آنتراسیس، سودوموناس آئروژینوزا و کورینه باکتریوم سودودیفتریکوم را گزارش نمودند (۲۶). سموال و راوات (۲۰۰۹) فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات آلکالوئیدی را بر ضد استافیلوکوکوس ارئوس، استرپتوکوکوس

موتانس، میکروسپوریوم جیپسوم و مایکوباکتریوم کانیس تائید نمودند (۲۷). با توجه به وجود ترکیبات کینونی، فلاونوئیدی و آلکالوئیدی در گیاهان خانواده polygonaceae می‌توان اثرات آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی آن‌ها را به این ترکیبات نسبت داد. این تحقیق نشان داد که اگرچه مطالعات متعددی روی اعضای خانواده polygonaceae و اثرات داروئی و درمانی آن‌ها انجام شده است و رابطه اثرات درمانی آن‌ها با ترکیبات فعال بیولوژیک آن‌ها به خوبی روشن شده است (۲۸ و ۲۹)، با این وجود تحقیقات بر روی گیاه ترشک (Rumex alveollatus) که عضو خانواده polygonaceae می‌باشد در مقایسه با سایر گونه‌های Rumex بسیار اندک بوده است.

نتیجه‌گیری

گیاه ترشک از زمان‌های گذشته مصرف خوراکی داشته و بیشتر به خاطر مزه ترش آن مورد توجه بوده و به همین دلیل به طور جدی به جنبه‌های داروئی آن توجه نشده است. نتایج به دست آمده در این تحقیق می‌تواند اهمیت این گیاه داروئی را بیشتر از گذشته نشان دهد. بنابراین می‌توان از این گیاه برای پیشگیری از طیف وسیعی از بیماری‌های عفونی، سیستم ایمنی و التهابی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

از مسئولین محترم دانشکده علوم زیستی به ویژه جناب آقای دکتر جواد فخاری و دانشجویان کارشناسی ارشد و دکتری در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی که در این تحقیق لطف زیادی به ما نمودند کمال تشکر و سپاس را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Tchakam PD, Lunga PK, Kowa TK, Lonfouo AH, Wabo HK, Tapondjou LA, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of the extracts and compounds from the leaves of Psorospermum aurantiacum Engl. and Hypericum lanceolatum Lam. BMC complementary and alternative medicine. 2012; 12(1):136.
2. Safavi F, Ebrahimi P, Mighani H. In Vitro Anti-Bacterial Activity of Root And Aerial Parts of Scrophularia Striata Bioss on Escherichia Coli, Staphylococcus Aureus and Bacillus Cereus. Armaghane-danesh, Yasuj Univer Med Sci J. 2013;1(8):603-614. [Article in persian]
3. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. Brazilian J Microbiol.2000; 31(4):247-256.
4. Abdel-Hady AA, El-Nahas HA, El Nabarawy SK, Abdel Raouf HA. Evaluation of the Antioxidant Activity and the Acute Oral Toxicity of Three Plant Extracts on Albino Mice. Middle East J Appl Sci. 2014; 4(2):207-216.
5. WHO (World Health Organization). Combat antimicrobial resistance. 2011: http://www.who.int/world-health-day
6. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, et al. Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome. PloS one. 2012; 7(4):e34953.
7. Savoia D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. Future Microbiol. 2012; 7 (8): 979–990.
8. Rao KNV, Sunitha C, David B, Sandhya S, Mahesh V. study on the nutraceuticals from the genus Rumex. Hygeia J D Med.2011; 3(1):76 -88.
9. Kwak HS, Park SY, Nguyen TT, Kim CH, Lee JM, Suh JS, et al. Protective effect of extract from Rumex aquaticus herba on ethanol-induced gastric damage in rats. Pharmacol. 2012; 90(5-6):288-297
10. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Rev. 1999; 12(4): 564–582.
11. Padmaja M, Sravanthi M, Hemalatha KPJ. Evaluation of Antioxidant Activity of Two Indian Medicinal Plants. J Phytology. 2011; 3(3):86-91.

12. Mirzaei A, Mohammadi J, Mirzaei N, Mirzaei M. The Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents of Some Medicinal Plants in Iran. J Fasa Univer Med Sci. 2011; 1(3):160-167. [Article in persian]
13. Hafez Ghoran S, Mighani H, Ebrahimi P. In-Vitro anti-bacterial activity of chloroform, ethyl acetate and hydroalcoholic extracts of Scilla persica Hausskn. Journal of Gorgan University of Medical Sciences. 2014; 16(1):106-113. [Article in persian]
14. Nurdiani R, Firdaus M, Prihanto AA. Phytochemical screening and Antibacterial activity of methanol extract of mangrove plant (Rhyzophora mucronata) from Porong River Estuary. J Basic Sci Technol. 2012; 1(2):27-29.
15. Krishnaiah D, Sarbatly R, Bono A. Phytochemical antioxidants for health and medicine–A move towards nature. Biotechnol Mol Biol Rev. 2007; 1(4):97-104.
16. Mohammadi-Sichani M, Sadeghzadeh P, Madani M. Evaluation of Antibacterial Activity of Extract of Rumex alveollatus Leaf against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. Zahedan J Res Med Sci. 2013; 15(6):58-61.
17. Moneim A, Suleman E, Issa FM, Elkhalifa EA. Quantitative determination of tannin content in some sorghum cultivars and evaluation of its antimicrobial activity. Res J Microbiol. 2007; 2(3):284–288.
18. Harshaw D, Nahar L, Vadla B, Saif-E -Naser GM, Sarker SD. Bioactivity of Rumex obtusifolius (Polygonaceae). Arch Biol Sci. 2010; 62(2):387-392.
19. Yadav S, Kumar S, Jain P. Antimicrobial activity of different extracts of roots of Rumex nepalensis Spreng. Indian J Nat Prod Resour. 2011; 2(1):65-69.
20. Mostafa H, Elbakry A, Eman AA. Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Activities of Different Plant Parts of Rumex Vesicarius L.(Polygonaceae). Int J Pharmacy & Pharmaceutical Sci. 2011; 3(2):109-118.
21. Yıldırım A, Mavi A, Aydan Kara A. Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities ofRumex crispus L. Extracts. J agri food chem. 2001; 49(8):4083−4089.
22. Sokmen M, Angelova M, Krumova E, Pashova S, Ivancheva S, Sokmen A, et al. In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from Geranium sanguineum L. Life sciences. 2005; 76(25):2981-2993.
23. Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J antimicrobial agents. 2005; 26(5):343–356.
24. Suleyman H, Demirezer LO, Kuruuzum-Uz A. Effects of Rumex patientia root extract on indomethacine and ethanol induced gastric damage in rats. Die Pharmazie. 2004; 59(2):147-149.
25. Joo YE. Natural Product-Derived Drugs for the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. Intest Res. 2014; 12(2):103-109.
26. Kazmi MH, Malik A, Hameed S, Akhtar N, Noor AS. An anthraquinone derivative from Cassia italica . Photochemistry. 1994; 36(3):761–763.
27. Semwal DK, Rawat U. Antimicrobial hasubanalactam alkaloid from Stephania glabra. Planta Med. 2009; 75(4):378–380.
28. Hussain F, Ahmad B, Hameed I, Dastagir G, Sanaullah P, Azam S. Antibacterial, antifungal and insecticidal activities of some selected medicinal plants of polygonaceae. African J Biotechnol. 2013; 9(31):5032-5036.
29. El-Bakry A, Mostafa H, Alam E. Evaluation of some growth parameters and chemical composition of in vitro grown seedlings of Rumex vesicarius L.(Polygonaceae). J Am Sci. 2011; 7(6):170-179.

Original Article

Surveying the Antioxidant and the Antimicrobial Effects of Aqueous and Ethanolic Extract of Rumex Alveollatus L. on In-vitro Indicator Microorganisms

Moradi A[1], Ebrahimipour G[1], Karkhane M[2], Marzban A[1, 3*]

1- Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
2- Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical sciences, Tehran, Iran.
3- Biotechnology Research Center, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Received: 08 Jun 2014 Accepted: 06 Aug 2014

Abstract

Background & Objective: In recent years, more attention has been devoted to herbal medicines. Up to now, many compounds with therapeutic effects has been extracted from the herbs. The aim of this study is to evaluate the antioxidant and the antimicrobial effect of Rumex Alveollatus L. and to partially identify the effective compounds in this plant.

Materials & Methods: Extraction was performed by using maceration method for dried flower sample. Then, the antimicrobial effect of aqueous and ethanolic extracts on eight bacterial sp. and two fungi were tested using disc diffusion method. The antioxidant effect was also determined through ferric reducing potency and phosphomolybdenum followed by total phenol determination. Finally, partial detection of bioactive compounds was conducted using chemical and calorimetric methods.

Results: The results showed that ethanolic extract had the most antimicrobial effect; while aqueous extract weakly affected bacterial and fungal strains. Antioxidant experiments also revealed that ethanol extract had more antioxidant effects than aqueous extract. The most content of total phenolic compounds was found in ethanol extract. The results of the plant chemical determination showed the presence of flavonoids, alkaloids, anthraquinones, tannins, glycosides, and reducing sugars.

Conclusion: Considering that few reports about the therapeutic effect of Rumex alveollatus L. has been published, this study could be considered as a valuable report about the important role of this plant on preventing infections and neutralizing oxidant agents.

Keywords: **Rumex alveollatus L, Antioxidant effect, Antimicrobial effect, Aqueous extract, Ethanol extract**

***Corresponding author: Marzban Abdolrazagh,** Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
Tel:+98511-8823255
Email: marzbana901@mums.ac.ir