

Antibacterial Activity of *Rumex cyprius* Seeds Against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Farinaz Pouremadi¹, Maryam Mohammadi Sichani^{1*}, Majid Tavakoli²

¹Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

²Agricultural & Natural Resources Research Center of Lorestan, Khorramabad, Iran.

*Corresponding Author: Maryam Mohammadi Sichani, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Email: mohamadi_m@iaufala.ac.ir

Received: 16 Feb, 2016

Accepted: 30 Apr, 2016

Abstract

Background and Objectives: The infections caused by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* resistant strains often originate from hospitals, and their prevalence is increasing worldwide. Therefore, many efforts are being made to find new active plant compounds as alternatives to antibiotics. In this research, the antibacterial effect of methanol and ethanol extracts of *Rumex cyprius* seeds against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains.

Methods: In this experimental study, methanol and ethanol extracts of *Rumex cyprius* seed, were prepared using Soxhlet apparatus. Antibacterial activity of the extracts were evaluated by well diffusion method, and minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), were determined using microdilution method. Active compounds of the seed, were identified by gas chromatography-mass spectrometry. The data were analyzed using ANOVA and Tukey tests. The level of significance was considered $p < 0.05$.

Results: In this study, ethanol and methanol extracts of *Rumex cyprius* seed prevented the growth of *S. aureus* and *E. coli*. Inhibition zone diameter of the ethanol extract in concentration of 500mg/ml against *E. coli* and *S. aureus*, was 16.5 and 19mm, respectively. Inhibition zone diameter of the methanol extract in concentration of 500mg/ml against *E. coli* and *S. aureus* was 14 and 16.5mm. MIC and MBC values of ethanol and methanol extracts against *E. coli* and *S. aureus*, were obtained 62.5 and 125mg/ml, respectively. In this study, The highest compound obtained from the seeds was 1,2-Benzenedicarboxylic Acid (24.25%).

Conclusion: Ethanol and methanol extracts of *Rumex cyprius* seeds had inhibitory effect against *S. aureus* and *E. coli*. The effect of these extracts on *S. aureus* is more than *E. coli*.

Keywords: Plant extracts; Antibacterial activity; *Rumex cyprius*; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*.

فعالیت ضدباکتریایی بذر گیاه رومکس کیپریوس بر اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس

فریناز پورعمادی^۱، مریم محمدی سیجانی^{۱*}، مجید توکلی^۲

چکیده

زمینه و هدف: عفونت‌های سویه‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم، در بیشتر موارد منشأ بیمارستانی دارند و شیوع آنها در سراسر جهان در حال افزایش است. از این رو تلاش‌های بسیاری جهت یافتن ترکیبات فعال گیاهی جدید برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها انجام می‌شود. در این تحقیق اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی و متانولی بذر رومکس کیپریوس بر استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، عصاره متانولی و اتانولی بذر رومکس کیپریوس با دستگاه سوکسله تهیه شد. فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها به روش انتشار چاهک و حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی به شیوه میکرودايلوشن تعیین شد. ترکیبات فعال بذر با گاز کروماتوگرافی - طیف‌سنجی جرمی شناسایی شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های واریانس و توکی تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، عصاره‌های اتانولی و متانولی بذر رومکس کیپریوس، مانع رشد استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی شد. قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر روی اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۱۶/۵ و ۱۹ میلی متر بود. قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر روی اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۱۴ و ۱۶/۵ میلی متر بود. مقادیر MIC و MBC عصاره اتانولی و متانولی علیه اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس نیز به ترتیب ۶۲/۵ و ۱۲۵ میلی گرم بر میلی متر به دست آمد. در این تحقیق ۱، ۲ بنزن دی کربوکسیل اسید دی ایزواستیل استر با ۲۴/۲۵٪، بیشترین ترکیب جدا شده از بذر بود.

نتیجه گیری: عصاره اتانولی و متانولی بذر *Rumex cyprius* بر اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس، اثر مهارکنندگی دارد و تأثیر این عصاره‌ها بر استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر از اشرشیاکلی می‌باشد.

کلید واژه‌ها: عصاره‌های گیاهی؛ فعالیت ضدباکتریایی؛ رومکس کیپریوس؛ استافیلوکوکوس اورئوس؛ اشرشیاکلی.

^۱گروه میکروب‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

^۲مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی لرستان، لرستان، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

مریم محمدی سیجانی، گروه میکروب‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
mohamadi_m@iaufala.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۲۸

تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۱۱

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Pouremadi F, Mohammadi Sichani M, Tavakoli M. Antibacterial activity of *Rumex cyprius* Seeds against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Qom Univ Med Sci J* 2017;11(2):56-65. [Full Text in Persian]

مقدمه

مواد فعال موجود در گیاهان باعث مهار رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شود و به‌همین علت عصاره‌های گیاهی به‌عنوان عوامل ضد میکروبی، کاربردهای زیادی دارند (۱). امروزه، به دلیل دسترسی آسان، قیمت نسبتاً ارزان و بروز بیماری‌های عفونی مختلف، مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها چنان فراوان و وسیع انجام می‌گیرد که منجر به شکل‌گیری جمعیت‌های باکتریایی مقاوم و متعاقب آن مشکلات درمانی، بروز عوارض جانبی بر میزبان و ضرر و زیان اقتصادی شده است. همچنین ارگانیسم‌های حساس می‌توانند حتی در طول درمان نیز مقاوم شوند که این امر به‌وسیله القای ساخت آنزیم‌های غیرفعال‌کننده آنتی‌بیوتیکی، موتاسیون در ژن‌های کدکننده پروتئین‌های غشای خارجی و یا از طریق انتقال مقاومت به‌واسطه پلاسمید از سلول مقاوم به سلول حساس صورت می‌گیرد (۲). در حال حاضر، گونه‌های مختلفی از گیاهان به‌صورت عصاره یا اسانس برای درمان عفونت‌های گوارشی باکتریایی مطرح شده‌اند. گیاه رومکس کیپریوس با اسم ترشک موج، از خانواده پلی‌گوناسه می‌باشد. جنس رومکس در ایران بیش از ۲۴ گونه دارد که در نواحی غربی، ارتفاعات البرز، زاگرس و آذربایجان می‌روید. رومکس کیپریوس گیاه علفی چندساله، با ساقه ایستاده به ارتفاع ۳۰-۱۵ سانتی‌متر است که به‌وسیله بذر تکثیر می‌شود. برگ‌های آن به طول ۳۰ سانتی‌متر و در وسط پهن تر بوده و حاشیه‌ای موج‌دار یا چین‌دار دارند. این گیاه نواحی مرطوب را ترجیح داده و بیشتر در زمین‌های زراعی، علفزارها، مراتع و حاشیه جاده‌ها به‌صورت گیاهی خودرو می‌روید. زمان گل‌دهی آن از خرداد تا مهرماه است. گل‌های رومکس کیپریوس، زرد مایل به قرمز است. هر گیاه حدود ۴۰۰۰-۳۰۰۰ بذر تولید می‌کند که برای مدت طولانی در خاک باقی مانده و در صورت مساعد بودن شرایط جوانه می‌زنند (۳). رومکس کیپریوس حاوی کربوهیدرات، فیبر، چربی، پروتئین، تیامین، ریبوفلاوین، نیاسین، ویتامین‌های A، B₆ و C، فولات، مواد معدنی (کلسیم، آهن، فسفر، پتاسیم و منگنز، ...)، بتاستوسترون، اسید کریزوفانیک، کریزوفانول و امودین است. براساس تحقیقات صورت گرفته در سراسر جهان مشخص شده است گونه‌های رومکس دارای اثرات ضدقارچی، ضدباکتریایی و ضدویروسی

هستند (۴-۷). تاکنون، هیچ‌گونه مطالعه‌ای در مورد بذر رومکس کیپریوس منتشر نشده است. این مطالعه با هدف تعیین تأثیر عصاره‌های اتانولی و متانولی بذر گیاه *Rumex cyprius* بر سویه‌های استاندارد و بالینی اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد.

روش بررسی

گیاه رومکس کیپریوس در اردیبهشت‌ماه سال ۱۳۹۳ از استان لرستان، منطقه اشترانکوه و اطراف دریاچه گهر با عرض جغرافیایی (۳۴° ۱۸' ۹۸") و طول جغرافیایی (۴۹° ۱۷' ۱۶") و ارتفاع ۲۳۵۰ متری از سطح دریا جمع‌آوری شد و پس از انتقال به آزمایشگاه، بذر گیاه از سایر قسمت‌های گیاه جدا گردید و در درجه حرارت اتاق و سپس در سایه خشک و آسیاب شد. پودر تهیه‌شده در ظرف تیره در یخچال نگهداری شد. به‌منظور مطالعه خاصیت ضدباکتریایی عصاره‌های اتانولی و متانولی بذر رومکس کیپریوس، سویه‌های باکتریایی اشرشیاکلی (ATCC:۲۵۹۲۲)، کپریوس (ATCC:۸۷۳۹) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC:۲۵۹۲۳)، به‌صورت لیوفیلیزه از کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. همچنین پنج سویه بالینی از هریک از گونه‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس از بیمارستان، تهیه و به کمک آزمون‌های تشخیصی مرسوم و رنگ‌آمیزی، تأیید شد.

عصاره اتانولی و متانولی بذر رومکس کیپریوس به روش سوکسله تهیه گردید. ۳۰ گرم از بذر پودر شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال به مدت ۶ ساعت عصاره‌گیری شد. عصاره حاصل بر روی روتاری خشک گردید و سپس از عصاره اتانولی و متانولی، غلظت‌های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶، ۷/۸، ۳/۹، ۱/۹۵، ۰/۹۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد.

از کشت ۲۴ ساعته سوسپانسیون هریک از سویه‌های باکتری‌ها در محیط کشت مولر هینتون آگار، کدورتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند معادل ۱/۵×۱۰^۸ باکتری در هر میلی‌لیتر به دست آمد. برای اطمینان، جذب سوسپانسیون میکروبی با دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر در محدوده ۰/۱-۰/۰۸ تنظیم گردید. سپس این غلظت، ۰/۱ رقیق شد تا غلظتی معادل ۱/۵×۱۰^۷ باکتری

به دست آید. در این تحقیق اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها به روش انتشار چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. سوسپانسیون باکتری بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار به صورت یکنواخت کشت داده شد. سپس در هر پلیت ۶ چاهک به قطر ۶ میلی متر ایجاد گردید. در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت عصاره ریخته شد. از محلول 20% DMSO به عنوان کنترل منفی و از دیسک آنتی بیوتیک سفنازوکسیم به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفتند، سپس قطر هاله عدم رشد برحسب میلی متر اندازه گیری شد. هر سری از آزمایشها برای هر عصاره و هریک از ایزوله‌های مورد بررسی ۳ بار تکرار شد و میانگین قطر هاله عدم رشد محاسبه گردید (۸).

برای تعیین MIC و MBC به روش میکروتیتراپل؛ ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت از عصاره به داخل چاهک ستون ۱۰-۱ میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با غلظت $1/5 \times 10^7$ باکتری، به هر چاهک اضافه شد. به ستون شماره ۱۱ به عنوان کنترل منفی، ۲۰۰ میکرولیتر محیط مولر هیتون براث و به ستون شماره ۱۲ به عنوان کنترل مثبت، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هیتون براث اضافه گردید. پس از تلقیح، جذب نوری چاهک‌ها به وسیله دستگاه ELISA rider در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید. میکروپلیت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت، مجدداً جذب نوری چاهک‌ها به وسیله دستگاه ELISA rider در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید. هر سری آزمایش، ۳ بار انجام و میانگین نتایج محاسبه شد. (آخرین چاهک شفاف، نشان‌دهنده کمترین غلظتی از عصاره است که مانع از رشد باکتری شده و به عنوان MIC در نظر گرفته می‌شود). برای تعیین MBC،

۲۰ میکرولیتر از سه خانه شفاف ماقبل خانه MIC بر روی محیط کشت‌های مولر هیتون آگار کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت، کمترین غلظت از عصاره که باکتری در آن رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) گزارش گردید (۹، ۱۰). به منظور تعیین ترکیبات تشکیل دهنده بذر رومکس کیپریوس، از دستگاه GC - MS شامل ردیاب جرمی Aglient 5975 C با منبع یونیزاسیون الکترونی کوپل شده با دستگاه کروماتوگرافی گازی Aglient 7890، از ستون HP-5MS (با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر) استفاده شد. دمای محل تزریق دستگاه کروماتوگرافی گازی روی ۲۸۰ درجه سانتیگراد، دمای منبع یونیزاسیون ردیاب جرمی روی ۱۵۰ درجه سانتیگراد، دمای آنالایزر (کوادرپل) روی ۲۳۰ درجه سانتیگراد و دمای واسط بین GC، MS روی ۲۸۰ درجه سانتیگراد تنظیم گردید. شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده عصاره با استفاده از شاخص‌های بازداري کواتس، بررسی طیف‌های جرمی ترکیبات و مقایسه آنها با طیف‌های جرمی استاندارد موجود در کتابخانه‌های کامپیوتری و مراجع معتبر صورت گرفت.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۷ و آزمون‌های واریانس و توکی (جهت بررسی وجود اختلاف معنی‌دار در نتایج به دست آمده) تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

حساسیت ایزوله‌های بالینی و استاندارد/استافیلوکوکوس اورئوس و/شرشیاکلی نسبت به عصاره اتانولی و متانولی بذر گیاه رومکس کیپریوس به روش انتشار چاهک مورد بررسی قرار گرفت که نتایج مربوطه در جدول شماره ۱ و ۲ ارائه شده است.

جدول شماره ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد غلظت‌های گوناگون عصاره اتانولی و متانولی بر روی سویه‌های مختلف اشرشیاکلی (برحسب میلی‌متر)

شاهد مثبت (سفت‌آزوکسیم)	غلظت (میلی گرم بر میلی لیتر)				نوع عصاره	نمونه
	۶۲/۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰		
۵۰/۰۰±۱/۰۰	۹/۰۰±۰/۵۰	۱۲/۵۰±۰/۵۰	۱۶/۵۰±۰/۵۰	۱۸/۵۰±۰/۵۰	اتانولی	اشرشیاکلی
۵۰/۰۰±۱/۰۰	-	۱۱/۰۰±۰/۵۰	۱۲/۰۰±۰/۵۰	۱۵/۰۰±۰/۵۰	متانولی	(ATCC: ۲۵۹۲۲)
۵۰/۰۰±۱/۰۰	۸/۰۰±۰/۵۰	۱۱/۵۰±۰/۵۰	۱۵/۵۰±۰/۵۰	۱۷/۵۰±۰/۵۰	اتانولی	اشرشیاکلی
۵۰/۰۰±۱/۰۰	-	۱۰/۰۰±۰/۵۰	۱۱/۰۰±۰/۵۰	۱۴/۰۰±۰/۵۰	متانولی	(ATCC: ۸۷۳۹)
۳۰/۰۰±۱/۰۰	-	۸/۵۰±۰/۵۰	۱۲/۵۰±۰/۵۰	۱۴/۵۰±۰/۵۰	اتانولی	اشرشیاکلی بالینی
۳۰/۰۰±۱/۰۰	-	-	۱۰/۸۰±۰/۲۸	۱۱/۸۰±۰/۲۸	متانولی	ایزوله ۱
۲۹/۰۰±۱/۰۰	۸/۰۰±۰/۵۰	۱۱/۱۰±۰/۲۸	۱۴/۸۰±۰/۷۶	۱۶/۵۰±۰/۵۰	اتانولی	اشرشیاکلی بالینی ایزوله ۲
۲۹/۰۰±۱/۰۰	-	۱۰/۸۰±۰/۲۸	۱۲/۰۰±۰/۵۰	۱۵/۰۰±۰/۵۰	متانولی	
۳۰/۰۰±۱/۰۰	۷/۵۰±۰/۵۰	۱۱/۰۰±۰/۵۰	۱۳/۰۰±۰/۵۰	۱۴/۸۰±۰/۲۸	اتانولی	اشرشیاکلی بالینی ایزوله ۳
۳۰/۰۰±۱/۰۰	-	۱۱/۰۰±۰/۵۰	۱۲/۰۰±۰/۵۰	۱۵/۰۰±۰/۵۰	متانولی	
۲۷/۶۶±۰/۵۷	۷/۸۰±۰/۲۸	۱۰/۳۰±۰/۵۷	۱۴/۵۰±۰/۵۶	۱۶/۱۰±۰/۲۸	اتانولی	اشرشیاکلی بالینی ایزوله ۴
۲۷/۶۶±۰/۵۷	-	۱۰/۸۰±۰/۲۸	۱۲/۰۰±۰/۵۰	۱۴/۸۰±۰/۲۸	متانولی	
۳۰/۰۰±۱/۰۰	۸/۰۰±۰/۵۰	۱۱/۵۰±۰/۵۰	۱۵/۵۰±۰/۵۰	۱۷/۵۰±۰/۵۰	اتانولی	اشرشیاکلی بالینی ایزوله ۵
۳۰/۰۰±۱/۰۰	-	۹/۸۰±۰/۲۸	۱۲/۱۰±۰/۲۸	۱۳/۶۰±۰/۲۸	متانولی	

طبق آزمون آنالیز واریانس دوطرفه، میانگین قطر هاله عدم رشد با افزایش غلظت عصاره‌ها، رابطه مستقیم داشت ($p < ۰/۰۰۱$). به عبارت دیگر؛ با افزایش غلظت عصاره‌های بذر رومکس کیپریوس، فعالیت ضد میکروبی آن علیه اشرشیاکلی استاندارد و بالینی افزایش می‌یابد. در غلظت‌های کمتر از ۶۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر، هیچ گونه اثر ضدباکتریایی از عصاره اتانولی مشاهده نشد. عصاره متانولی نیز در غلظت‌های کمتر از ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر فعالیت نداشت. براساس آزمون مقایسه‌های زوجی توکی؛ بین غلظت‌های ۵۰۰ و ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر و غلظت‌های ۵۰۰ با ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر، اختلاف معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۰۵$)، اما بین غلظت‌های ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

همچنین طبق آزمون مقایسه‌های زوجی توکی؛ میانگین ایزوله‌های بالینی اشرشیاکلی ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر با شاهد مثبت، تفاوت معنی‌داری داشت ($p < ۰/۰۰۵$) و از شاهد مثبت کمتر بود. اختلاف شاهد مثبت نیز با غلظت‌های ۲۵۰ و ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر ($p < ۰/۰۰۵$) معنی‌دار شد. با توجه به آزمون توکی، به‌طور کلی بین غلظت‌های ۵۰۰ و ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر ($p > ۰/۰۰۵$)، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، اما بین غلظت‌های ۵۰۰ با ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر، اختلاف معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۰۵$). بین غلظت‌های ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نیز تفاوت معنی‌داری وجود داشت.

جدول شماره ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد حاصل از تأثیر غلظت‌های گوناگون عصاره اتانولی و متانولی بر روی سوبه‌های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس (بر حسب میلی‌متر)

نمونه	نوع عصاره	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	شاهد مثبت سقتازوسکسیم
استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: ۲۵۹۲۳)	اتانولی	۲۲/۰۰±۰/۵۰	۲۰/۰۰±۰/۵۰	۱۶/۰۰±۰/۵۰	۱۲/۰۰±۰/۵۰	۹/۰۰±۰/۵۰	۲۸/۰۰±۱/۰۰
	متانولی	۱۶/۰۰±۰/۵۰	۱۴/۰۰±۰/۵۰	۱۲/۰۰±۰/۵۰	۱۱/۱۰±۰/۲۸	۹/۰۰±۰/۵۰	۲۸/۰۰±۱/۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: ۶۵۳۸)	اتانولی	۱۹/۵۰±۰/۵۰	۱۷/۵۰±۰/۵۰	۱۳/۰۵±۰/۵۰	۱۰/۵۰±۰/۵۰	۸/۰۰±۰/۵۰	۲۸/۰۰±۱/۰۰
	متانولی	۱۷/۵۰±۰/۵۰	۱۵/۰۰±۰/۵۰	۱۳/۰۰±۰/۵۰	۱۱/۰۰±۰/۵۰	۱۰/۱۰±۰/۲۸	۲۸/۰۰±۱/۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس بالینی ایزوله ۱	اتانولی	۱۸/۵۰±۰/۵۰	۱۶/۵۰±۰/۵۰	۱۳/۰۰±۱	۹/۸۰±۰/۷۶	۷/۵±۰/۵۰	۲۶/۰۰±۱/۰۰
	متانولی	۱۶/۰۰±۰/۵۰	۱۴/۹۰±۰/۴۰	۱۳/۰۰±۰/۵۰	۱۱/۱۰±۰/۲۸	-	۲۶/۰۰±۱/۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس بالینی ایزوله ۲	اتانولی	۱۹/۵۰±۰/۵۰	۱۷/۵۰±۰/۵۰	۱۳/۵۰±۰/۵۰	۱۰/۵۰±۰/۵۰	۸/۰۰±۰/۵۰	۲۷/۰۰±۱/۰۰
	متانولی	۱۶/۰۰±۰/۵۰	۱۴/۰۰±۰/۵۰	۱۲/۰۰±۰/۵۰	۹/۸۰±۰/۲۸	۹/۰۰±۰/۵۰	۲۷/۰۰±۱/۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس بالینی ایزوله ۳	اتانولی	۱۷/۵۰±۰/۵۰	۱۵/۱۰±۰/۲۸	۱۲/۱۰±۰/۲۸	۱۰/۵۰±۰/۵۰	۷/۵۰±۰/۵۰	۲۸/۰۰±۱/۰۰
	متانولی	۱۷/۰۰±۰/۵۰	۱۵/۶۰±۰/۷۶	۱۳/۰۰±۰/۵۰	۱۱/۱۰±۰/۲۸	۹/۰۰±۰/۵۰	۲۸/۰۰±۱/۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس بالینی ایزوله ۴	اتانولی	۱۶/۵۰±۰/۵۰	۱۴/۰۰±۰/۵۰	۱۰/۸۰±۰/۲۸	۷/۶۰±۰/۵۷	-	۲۵/۰۰±۱/۰۰
	متانولی	۱۵/۱۰±۰/۵۰	۱۳/۰۰±۰/۵۰	۱۱/۰۰±۰/۵۰	-	-	۲۵/۰۰±۱/۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس بالینی ایزوله ۵	اتانولی	۱۹/۵۰±۰/۵۰	۱۷/۵۰±۰/۵۰	۱۳/۵۰±۰/۵۰	۱۰/۵۰±۰/۵۰	۸/۰۰±۰/۵۰	۲۷/۰۰±۱/۰۰
	متانولی	۱۷/۰۰±۰/۵۰	۱۵/۰۰±۰/۵۰	۱۴/۰۰±۰/۵۰	۱۱/۱۰±۰/۲۸	۹/۰۰±۰/۵۰	۲۷/۰۰±۱/۰۰

طبق آزمون آنالیز واریانس دوطرفه؛ میانگین قطر هاله عدم رشد با افزایش غلظت عصاره‌ها، رابطه مستقیم داشت ($p < ۰/۰۰۱$). به عبارت دیگر، با افزایش غلظت عصاره‌های بذر رومکس کیپریوس، فعالیت ضد میکروبی آن بر علیه باکتری‌های مورد بررسی افزایش می‌یابد. همچنین براساس آزمون مقایسه‌های زوجی توکی؛ میانگین استافیلوکوکوس اورئوس بالینی ایزوله ۱، ۲، ۳ و ۴ در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر با شاهد مثبت، تفاوت معنی‌داری داشت ($p < ۰/۰۰۵$) و از شاهد مثبت کمتر بود. اختلاف شاهد مثبت نیز با غلظت‌های ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر ($p < ۰/۰۰۵$)، معنی‌دار شد.

به‌طور کلی بین غلظت‌های ۵۰۰ با غلظت‌های ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر، اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < ۰/۰۰۵$)، اما بین غلظت ۵۰۰ با غلظت ۲۵۰ ($p < ۰/۰۰۵$)، تفاوت معنی‌دار نبود. بین غلظت‌های ۲۵۰ با ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر ($p < ۰/۰۰۵$)، تفاوت معنی‌داری وجود داشت، اما بین غلظت ۲۵۰ با غلظت ۱۲۵ ($p < ۰/۰۰۵$)، تفاوت معنی‌دار نبود. بین غلظت‌های ۱۲۵ با ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر نیز ($p < ۰/۰۰۵$)، تفاوت معنی‌داری وجود داشت. بین غلظت‌های ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر ($p < ۰/۰۰۵$)، تفاوت معنی‌دار بود. در جدول شماره ۳ نتایج MIC و MBC عصاره اتانولی و متانولی بذر گیاه رومکس کیپریوس ارائه شده است.

جدول شماره ۳: مقادیر MIC و MBC عصاره اتانولی و متانولی بذر گیاه رومکس کیپریوس (میلی گرم بر میلی لیتر)

عصاره متانولی		عصاره اتانولی		باکتری مورد آزمایش
MBC	MIC	MBC	MIC	
۶۲/۵	۳۱/۲۵	۱۲۵	۶۲/۵	اشرشیا کلی استاندارد
۶۲/۵	۳۱/۲۵	۱۲۵	۶۲/۵	نمونه اشرشیا کلی بالینی
۶۲/۵	۳۱/۲۵	۱۲۵	۶۲/۵	استافیلوکوکوس اورئوس استاندارد
۶۲/۵	۳۱/۲۵	۱۲۵	۶۲/۵	نمونه استافیلوکوکوس اورئوس بالینی

ترکیبات موجود در بذر رومکس کیپریوس به روش GC/MS مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول شماره ۴).

جدول شماره ۴: مهم ترین ترکیبات شناسایی شده در بذر گیاه رومکس کیپریوس به روش GC/MS

ترکیبات شناسایی شده	درصد ترکیب	درصد احتمال حضور در بذر گیاه	زمان رهاسازی	اندیس بازداری کوانتس
۱ و ۲- بنزن دی کربوکسیلیک اسید	۲۵/۲۴	۸۳	۳۴/۲۸۳	۲۳۲۰
۱ و ۴- سیکلو هگزادین	۱۹/۱	۹۵	۱۳/۲۰۷	-
بنزن	۱۴/۸	۹۷	۱۱/۴۹۳	-
هگزادکا متیل	۲/۳۸	۸۶	۲۷/۵۴	۱۴۶۷
۱ و ۳- سیکلو هگزادین	۱/۴۸	۹۴	۱۱/۰۶	-
سیلیکونفت	۱/۴۲	۸۷	۳۳/۷۲۸	۲۳۰۱
اکسیم	۱/۳۶	۶۴	۷/۶۵۷	-
اکتا دکا متیل سیکلونونا سیکلوکسان	۱/۱۴	۹۰	۳۰/۰۰۹	۱۶۲۷
تترا متیل سیکلو دود کامتیل	۱/۰۸	۷۴	۳۲/۶۶۲	۱۹۴۴
سیکلو هگزاد سیکلوکسان	۰/۹۳	۸۶	۲۱/۳۱۳	۱۱۲۹
سیکلو تترا سیکلوکسان	۰/۸۴	۸۳	۱۰/۴۷۶	-
فنل	۰/۷۱	۷۴	۲۳/۱۹۳	۱۲۲۰
سیکلو تترا سیکلوکسان	۰/۷	۹۰	۱۰/۴۲۷	-
ییس تری متیل سیلیل ان استیل	۰/۷	۶۴	۳۱/۷۹۶	۱۷۸۳
سیلیکونفت	۰/۵۷	۸۰	۳۴/۸	۲۳۳۷
سیکلو هگزاد سیکلوکسان	۰/۴۹	۸۰	۲۱/۱۱۴	۱۱۲۰
تریس ارسان	۰/۴۲	۴۹	۳۷/۶۱۴	-
۵ و ۲- دی اتیل فنل	۰/۳۲	۷۰	۲۱/۷۹۵	۱۱۵۲
تیمول	۰/۳	۹۹	۲۳/۵۸۷	۱۲۴۱
سیکلو هگزاد سیکلوکسان	۰/۲۸	۸۳	۲۱/۲۷۹	۱۱۲۷
اکسیم	۰/۲۶	۶۸	۷/۶۸۱	-
۲ اتوکسی و ۶ دی کلرو سیمتریازین	۰/۲۶	۵۰	۸/۹۶۷	-

بحث

در این پژوهش مشخص گردید عصاره‌های اتانولی و متانولی بذر گیاه *Rumex cyprius* از رشد سویه‌های بالینی و استاندارد استفیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی مورد آزمایش جلوگیری می‌کنند.

همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد میانگین قطر هاله عدم رشد با افزایش غلظت عصاره، رابطه مستقیم دارد ($p < 0.001$)، همچنین میانگین قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های مختلف با هم تفاوت معنی‌داری داشت ($p < 0.001$)؛ بدین معنی که نوع باکتری بر اندازه قطر هاله عدم رشد تأثیر دارد.

El-Bakry در مطالعه خود، با بررسی اثر ضد میکروبی بخش‌های هوایی رومکس وزیکاریوس، قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی رومکس وزیکاریوس برای اشرشیاکلی، استرپتوکوکوس پنومونیه و استفیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۵۵، ۵۵ و ۲۶ میلی‌متر به‌دست آورد که تأثیر این عصاره روی استفیلوکوکوس اورئوس به مراتب کمتر بود (۱۵/۵۷ میلی‌متر) و روی کلبسیلا پنومونیه هیچ اثری نداشت (۱۱). در مطالعه‌ای که توسط Nisa و همکاران با عنوان "غربالگری فیتوشیمیایی" انجام شد، اثر ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف از رومکس دنتاتوس بررسی گردید. فعالیت ضد میکروبی غلظت‌های مختلف (محدوده غلظت عصاره ۵۰۰-۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) پنج عصاره رومکس دنتاتوس در برابر گونه‌های مختلف بالینی شیگلا فلکسنری، کلبسیلا پنومونیه، اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، استفیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم با روش دیسک دیفیوژن نشان داد عصاره بوتانولی، فعالیت ضد میکروبی قوی در برابر کلبسیلا پنومونیه دارد؛ لیکن عصاره آبی هیچ فعالیتی بر علیه باکتری‌ها نشان نداد (۱۲).

در مطالعه‌ای که توسط کوچک با عنوان "ارزیابی مقدماتی بر روی اثرات ضد میکروبی تعدادی از گیاهان دارویی استان خوزستان" انجام شد، از روش دیسک دیفیوژن برای بررسی خاصیت ضد باکتریایی استفاده گردید که میانگین قطر هاله ممانعت از رشد عصاره اتانولی رومکس ایتوسیفولیوس در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی استفیلوکوکوس اورئوس، ۹ میلی‌متر به دست آمد. گیاه مذکور فاقد اثر مهار بر روی

اشرشیاکلی، سالمونلا تیفی، کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس آئروژینوزا بود (۱۳).

در مطالعه کیمنش و همکاران با بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی بخش هوایی گیاه رومکس کیپریوس؛ حداقل غلظت مهار بر این عصاره برای باکتری‌های استفیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سلین، انتروکوکوس فیکالیس (NCTC:۸۲۱۳)، سودوموناس آئروژینوزا (ATCC:۹۰۲۷)، سالمونلا انتریکا (NCTC:۵۷۶۱) و اشرشیاکلی (ATCC:۸۷۳۹) به ترتیب برابر با ۳۳، ۱۳۳، ۱۳۳ و ۱۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. در این مطالعه عصاره رومکس کیپریوس، بیشترین تأثیر را بر روی باکتری استفیلوکوکوس اورئوس داشت که با مطالعه حاضر همسو بود (۱۴).

Yildirim و همکاران فعالیت ضد میکروبی عصاره رومکس کریسپوس را روی استفیلوکوکوس اورئوس (ATCC:۲۵۹۲۳) و اشرشیاکلی (ATCC:۲۵۹۲۲) مورد ارزیابی قرار دادند که در نتیجه میانگین قطر هاله ممانعت از رشد در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتری تهیه‌شده از برگ، بذر و عصاره الکلی از برگ این گیاه بر روی استفیلوکوکوس اورئوس به ترتیب برابر ۱۰، ۱۱ و ۸ میلی‌متر به دست آمد. در تحقیق حاضر نیز استفیلوکوکوس اورئوس بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره از خود نشان داد که با نتایج Yildirim مطابقت داشت. شاید این تفاوت به دلیل بیشتر بودن ترکیبات مؤثره در بذر این گیاه نسبت به سایر بخش‌ها باشد. در مطالعه Yildirim هیچ یک از عصاره‌ها روی اشرشیاکلی اثری نداشت (۱۵).

نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر و مطالعه کیمنش نشان داد باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره گیاه رومکس کیپریوس حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی هستند که این یافته با نتایج تحقیقات پیشین در مورد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی یکسان است (۱۴). علت حساس‌تر بودن باکتری‌های گرم مثبت نسبت به مواد شیمیایی، اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی احتمالاً به اختلاف ساختمان دیوار آنها مربوط می‌باشد. ارتباط بین ساختارهای شیمیایی برخی از اجزای غالب موجود در اسانس‌ها و عصاره‌ها نیز با فعالیت ضد باکتریایی آنها گزارش شده که در این تحقیق نیز این موضوع اثبات گردید.

در این تحقیق ۱،۲ بنزن دی کربوکسیل اسید، دی ایزو استیل استر، ۴،۱ سیکلو هگزادین، ۱ متیل - ۴ متیل اتیل و بنزن ۱ متیل - ۲ متیل اتیل به ترتیب با ۲۵/۲۴، ۱۹/۱ و ۱۴/۸٪، بیشترین ترکیب جدا شده از عصاره بودند. وجود ترکیبات فنولی در بذر این گیاه با خاصیت ضدباکتریایی این عصاره ها مرتبط است (جدول شماره ۴). فلاونوئیدها از طریق جلوگیری از سنتز اسید نوکلئیک، جلوگیری از عملکرد غشای سیتوپلاسمی و متابولیسم انرژی باعث ایجاد خاصیت ضدباکتریایی می شوند. همچنین ترکیبات متفاوتی در فلاونوئیدها وجود دارد که بر ترکیبات و ساختارهای مختلفی از باکتری ها اثر می گذارد، به طوری که فلاونوئید، سلول های باکتریایی را نمی کشد؛ بلکه مانع از تجمع باکتری ها شده که در نتیجه باعث ایجاد خاصیت ضدباکتریایی می شود (۱۶، ۱۷). همچنین در تحقیقی مشخص گردید رومکس وزیکولاریوس و رومکس دنتاتوس حاوی ترکیبات لیپوفیلی هستند که مانند ترکیبات فعال در سطح عمل می کنند (۱۸). بنابراین، به نظر می رسد اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی و متانولی بذر رومکس کیپریوس، مرهون این ترکیبات است (۱۹).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد بذر رومکس کیپریوس حاوی ترکیباتی است که خاصیت ضد میکروبی دارند. براساس نتایج، مقدار MIC عصاره اتانولی و متانولی برای هر دو باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۳۱/۲۵ و ۶۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. غلظت ضد میکروبی بالای این عصاره ها، احتمالاً به دلیل خام بودن آنها است. بنابراین، پیشنهاد می شود ترکیبات مؤثره بذر رومکس کیپریوس جداسازی شده و ترکیبات ضدباکتریایی این ترکیبات خالص ارزیابی شوند. بدیهی است که در این حالت، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی ترکیب مؤثره خالص کاهش خواهد داشت. در مطالعه کوچک و همکاران، میانگین قطر هاله ممانعت از رشد عصاره اتانولی رومکس ایتوسیفولیوس در غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ بر روی استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب برابر ۷، ۷ و ۹ میلی متر به دست آمد. نتایج آنالیز یک طرفه در این پژوهش و مطالعه حاضر نشان داد با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله عدم رشد به طور معنی داری در سطح $p < 0.05$ افزایش می یابد که

می توان تفاوت معنی دار میانگین قطر هاله عدم رشد غلظت های مختلف را برحسب مقدار ماده مؤثر موجود در عصاره ها به آن نسبت داد. گیاه مذکور فاقد اثر مهار بر روی اشرشیاکلی، سالمونلا تیفی، کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس آئروژینوزا بود (۱۳).

در مطالعه Humeera و همکاران، میانگین قطر هاله ممانعت از رشد عصاره اتانولی رومکس دنتاتوس در غلظت های ۱۵۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی اشرشیاکلی به ترتیب برابر ۱۰، ۱۲ و ۱۳ میلی متر به دست آمد و میانگین قطر هاله ممانعت از رشد عصاره اتانولی در غلظت های ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب برابر ۱۱ و ۱۳ میلی متر بود (۲۰). با مقایسه این پژوهش و مطالعه حاضر می توان نتیجه گرفت که عصاره رومکس کریسپوس اثر ضدباکتریایی بیشتری نسبت به عصاره رومکس دنتاتوس دارد. همچنین در مطالعه حاضر، عصاره اتانولی دارای اثر مهار رشد بر روی اشرشیاکلی با هاله ۱۶/۵ میلی متر و بر استافیلوکوکوس اورئوس با هاله ۱۹ میلی متر بود که این نتیجه می تواند مربوط به زیستگاه رشد گیاه یا تیپ گیاه باشد که عاملی مهم برای میزان ترکیبات مؤثره گیاه محسوب می شود. عدم فعالیت ضدباکتری در برخی از غلظت ها به حضور مقادیر کمتری از ترکیبات ضد میکروبی نسبت داده می شود.

نتیجه گیری

به طور کلی می توان نتیجه گرفت اثرات ضدباکتریایی عصاره بذر رومکس کیپریوس بر استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به اشرشیاکلی بیشتر است. بررسی غلظت های مختلف عصاره بر باکتری ها نشان داد با افزایش غلظت عصاره، فعالیت مهار افزایش می یابد. با توجه به اثراتی که عصاره اتانولی و متانولی رومکس کیپریوس روی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی داشته، می توان تحقیقاتی در جهت شناسایی و جداسازی ترکیبات مؤثر و فعال بذر رومکس کیپریوس طرح ریزی کرد.

References:

1. Weckesser S, Engel K, Simon-Haarhaus B, Wittmer A, Pelz K, Schempp CM. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine* 2007;14(7-8):508-16.
2. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL, Oliveira DF, Figueiredo HCP. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol* 2000;31(4):247-56.
3. Koc M, Hamzaoglu E. *Herniaria caucasica* (Caryophyllaceae), *Rumex cyprius* (Polygonaceae), and *Potentilla multifida* (Rosaceae); 3 new records for Turkey. *Turk J Bot* 2014;38(4):819-25.
4. 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. [Full Text in Persian]
5. Fatima N, Zia M, Rehman R, Rizvi Z, Ahmad S, Mirza B, et al. Biological activities of *Rumex dentatus* L: Evaluation of methanol and hexane extracts. *Afr J Biotech* 2009;8(24):6945-51.
6. Hussein G, Miyashiro H, Nakamura N, Hattori M, Kakiuchi N, Shimotohno K. Inhibitory effects of Sudanese medicinal plant extracts on hepatitis C virus (HCV) protease. *Phytother Res* 2000;14(7):510-6.
7. Gescher K, Hensel A, Hafezi W, Derksen A, Kühn J. Oligomeric proanthocyanidins from *Rumex acetosa* L. inhibit the attachment of herpes simplex virus type-1. *Antiviral Res* 2011;89(1):9-18.
8. Bonev B, Hooper J, Parisot J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *J Antimicrob Chemother* 2008;61(6):1295-301.
9. Valgas C, Souza SMD, Smânia EFA, Smânia JrA. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz J Microbiol* 2007;38(2):369-80.
10. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protocols* 2008;3(2):163-75.
11. El-Bakry A, Mostafa A, Alam EA. Antibacterial and antioxidant activities of seedlings of *Rumex vesicarius* L. (Polygonaceae) *J Med Plants Res* 2013;7(29):2158-64.
12. Nisa H, Kamili AN, Bandh SA, Amin SU, Lone BA, Parray JA. Phytochemical screening, antimicrobial and antioxidant efficacy of different extracts of *Rumex dentatus* L. - A locally used medicinal herb of Kashmir Himalaya. *Asian Pac J Trop Dis* 2013;3(6):434-40.
13. Koochak H, Seyyednejad SM, Motamedi H. Preliminary study on the antibacterial activity of some medicinal plants of Khuzestan (Iran). *Asian Pac J Trop Med* 2010;3(3):180-4.
14. Keymanesh K, Hamed J, Moradi S, Mohammadipanah F, Sardari S. Antibacterial, antifungal and toxicity of rare Iranian plants. *Int J Pharmacol* 2009;5(1):81-5.
15. Yıldırım A, Mavi A, Kara AA. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. Extracts. *J Agric Food Chem* 2001;49(8):4083-9.
16. Kumar S, Joseph L, George M. Phytochemical analysis of leaf extracts of *Rumex nepalensis*. *Int J Pharm Med Innov* 2011;1(1):16-21.
17. Liang HX, Dai HQ, Fu HA, Dong XP, Adebayo AH, Zhang LX, et al. Bioactive compounds from *Rumex* plants. *Phytochem Let* 2010;3(4):181-4.
18. Abou Elfotouh MA, Shams KA, Anthony KP, Shahat AA, Ibrahim MT, Abdelhady NM, et al. Lipophilic Constituents of *Rumex vesicarius* L. and *Rumex dentatus* L. *Antioxidants (Basel)* 2013;2(3):167-80.
19. Dholwani K, Saluja A, Gupta A, Shah D. A review on plant-derived natural products and their analogs with anti-tumor activity. *Indian J Pharmacol* 2008;40(2):49-58.
20. Humeera N, Kamili AN, Bandh SA, Amin SU, Lone BA, Gousia N. Antimicrobial and antioxidant activities of alcoholic extracts of *Rumex dentatus* L. *Microb Pathog* 2013;57:17-20.