ارزیابی اثر سمیت سلولی گیاهان *Elatostema umbellatum* و *Pilea microphylla* با استفاده از روش سنجش میزان کشندگی میگوی آب شور

امیر مدرسی چهاردهی[1*]، لیلا موسوی[2]، داراه ابراهیم[1]، شیدا فریضا سلیمان[3]، عظیم هدایت پور[4]

۱- آزمایشگاه تخصصی بیوتکنولوژی صنعتی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه علوم مالزی، جزیره پینانگ، مالزی
۲- گروه صنایع غذایی، دانشکده تکنولوژی صنعتی، دانشگاه علوم مالزی، جزیره پینانگ، مالزی
۳- آزمایشگاه شیمی گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه علوم مالزی، جزیره پینانگ، مالزی
۴- گروه آناتومی، دانشکده پزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
[*]مسئول مکاتبات: amirmch@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۳

چکیده

گونه‌های *Elatostema umbellatum* و *Pilea microphylla* دو جنس از خانواده گزنه (Urticaceae) هستند که در منطقه جنوب شرقی آسیا به خصوص مالزی یافت می گردند. در این مطالعه اثر سمیت سلولی این دو گونه به روش آزمون سمیت میگوی آب شور (Brine shrimp cytotoxicity assay) مورد بررسی گردید که تا کنون مورد مطالعه سیتوتوکسیک قرار نگرفته‌اند. پس از شناسایی و جمع‌آوری دو گیاه مذکور، عصاره‌های الکلی آن‌ها به منظور آزمون غربالگیری از آزمون Brine Shrimp Cytotoxicity Bioassay مورد استفاده قرار گرفت که به اثرات و تعیین میزان سیتوتوکسیک بر علیه لارو آرتمیا سالینا می‌پردازد. عصاره CEPM II (عصاره کلروفورمی از روش دوم استخراج) از گیاه *P. microphylla* و عصاره MEEU II (عصاره متانولی از روش دوّم استخراج) از گیاه *E. umbellatum* کمترین میزان های LC_{50} به ترتیب ٤٦/۷۰ و ۵۷/٦۲ میکروگرم بر میلی لیتر و پس از آن عصاره HEPM I (عصاره هگزان از روش اوّل استخراج) از گیاه *P. microphylla* بالاترین میزان LC_{50} (۵۷٤۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) را نشان دادند. همچنین می‌توان نتیجه گرفت که روش دوّم عصاره گیری با استفاده از فانل جداکننده کارایی به مراتب بیشتری نسبت به روش اوّل عصاره‌گیری داشته است. در کل عصاره‌های *E. umbellatum* اثرات کشنده‌تری بر روی لارو میگوی آب شور از خود نشان دادند. هرچند هر دو جنس می توانند به عنوان گیاهان دارای سیتوتوکسیک مثبت جهت آزمون‌های اختصاصی‌تر شامل آنتی کنسر و آنتی تومور قرار گیرند.

کلمات کلیدی: سیتوتوکسیک، *Elatostema umbellatum*،*Pilea microphylla*، لارو آرتمیا سالینا

مقدمه

با وجود استفاده فراوان از گیاهان در درمان بیماری‌ها و دیگر صنایع مختلف، سمیت بسیاری از آنها مورد بررسی قرار نگرفته است [۲۲] و مطالعات اخیر نشان داده است که برخی گیاهان دارای پتانسیل سمیت بالایی برای انسان و حیوانات دارند [۸]. علاوه براین، در ترکیبات فعال زیستی در گیاهان دارویی می تواند ترکیبات متعدد دیگری در این گیاهان باشد که در موادغذایی یا داروها بطور ناخودآگاه وجود دارند و اطلاعاتی درست از آنها در دسترس نیست [۱۷]. بنابراین، با انتخاب یک آزمون مناسب جهت تعیین سمیت مناسب به منظور مطالعه بر روی عصاره های گیاهان مورد نیاز می‌باشد تا به توان ایمنی محصولات چه در تولید گیاهان دارویی و چه در صنایع دیگر را سنجید. یکی از آزمون‌های سنجش، جهت توانایی طیف وسیعی از ترکیبات موثر در عصاره گیاهان، آزمون سنجش میزان کشندگی میگوی آب شور یا آرتمیا سالینا است [۱۸]. از این آزمون برای اطمینان از ایمنی محصولات مورد استفاده چه در

بخش تولید گیاهان دارویی و چه در صنایع دیگر استفاده می‌شود. این آزمون با وجود سادگی، قادر به تشخیص در میزان‌های کم سمیت و همچنین قابل انجام و اندازه‌گیری میزان‌های کوچک می‌باشد [۲۰]. نتایج به دست آمده را اغلب با EC_{50} یا LC_{50} نشان می‌دهند که بیانگر میزان غلظتی از نمونه عصاره گیاهی است که توانسته بر روی ۵۰٪ از جمعیت مورد بررسی تاثیر مستقیم بگذارد [۱۱]. در این تحقیق دو جنس گیاهی از خانواده Urticaceae مورد مطالعه قرار گرفتند که عبارتند از:

۱)گیاه Gunpowder با نام علمی *Pilea microphylla* این گیاه دارای اندازه‌ای کوچک با برگ‌های سبز روشن و شاداب است که مختص مناطق استوایی و سایه‌خیز است. برگ‌ها بی‌نهایت ریز و گوشتالو با شاخه‌های متعدد که در دو ردیف به صورت غیرمساوی رشد می‌کنند. شاخه بزرگتر کمتر از ۵ میلی‌متر طول همراه با گل‌های ریز در انبوهی از محورهای ساقه قرار گرفته‌اند. گل‌ها به صورت تک جنسی و صورتی رنگ می‌باشند [۳، ۱۹]. همچنین این گیاه دارای خواص دارویی در مناطقی از آسیا و آمریکای مرکزی می‌باشد [۷، ۱۰].

۲)گیاه *Elatostema umbellatum* درختچه‌ای است که در مناطق مرتفع استوایی آسیا به میزان زیاد و به میزان کمتر در بخش‌هایی از قاره آفریقا رشد می‌کند. این گیاه به صورت بوته رونده تکثیر می‌یابد. برگ‌ها متناوب و به طور غیرمساوی در پایه ساقه قرار می‌گیرند [۱٤، ۲۳].

مواد و روش کار

کل اندام‌های گیاه *P. microphylla* از منطقه دانشگاه ساینز مالزی واقع در جزیره پنانگ در شمال‌غربی مالزی در پاییز سال ۱۳۸٦ جمع‌آوری گردید و توسط کارشناس دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه ساینز در جزیره پنانگ تأیید شد و به شماره ۱۱۳۲۱ در هرباریوم دانشکده زیست‌شناسی نگهداری می‌گردد.

برگ‌های گیاه *E. umbellatum* از منطقه کوهستانی مکسول هیل (Maxwell Hill) واقع در شهرستان تایپینگ در ایالت پراک مالزی جمع‌آوری گردید و توسط کارشناس-دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه ساینز تأیید گردید. اندام‌های هر دو گیاه مزبور، ابتدا شسته شده و به مدت ۳ روز در خشک کن (۲۷ $^{\circ}C$) خشک شدند و سپس آسیاب گردیده و به پودر تبدیل گردیدند. به منظور تهیه عصاره های الکلی دو روش مورد برای استخراج مورد استفاده قرار گرفت. در روش اوّل با استفاده از حلال‌های غیر قطبی تا قطبی با استفاده از دستگاه عصاره‌گیری (سوکسله) انجام گردید. حلال‌های مورد استفاده عبارت بودند از: هگزان، کلروفورم، اتیل‌استات و متانول. در روش دوّم تنها ۵ حلال مورد استفاده قرار گرفت (با استفاده از فانل جداکننده). در این روش ابتدا مواد خشک گیاهی به میزان ۱۰۰ گرم و به مدت ۷۲ ساعت به دستگاه عصاره‌گیری سوکسله با حلال متانول منتقل گردید. بخشی از عصاره متانول به منظور آزمایش جمع‌آوری گردید و سپس در ادامه با استفاده از فانل جداکننده بخش دیگری از عصاره متانول توسط روش ملیدیس و همکاران (۱۹۹۳) به همراه دو برابر و هم حجم میزان متانول، به ترتیب آب مقطر و کلروفورم اضافه گردید. پس از جمع‌آوری عصاره الکلی کلروفورم، به ترتیب حلال-های دی اتیل اتر، اتیل استات و بوتانل نیز استخراج گردید [۱۲]، سپس این عصاره‌ها تا زمان استفاده در دمای یخچال نگهداری گردیدند. به منظور تسهیل در خواندن عصاره‌ها، نام‌های اختصار برای آن‌ها در نظر گرفته شد که به شرح ذیل است: نام‌های اختصار برای گیاه *P. microphylla*: HEPM I (عصاره هگزان به روش اول)، CEPM I (عصاره کلروفورم به روش اوّل)، EAEPM I (عصاره اتیل استات به روش اوّل)، MEPM I (عصاره متانول به روش اوّل)، MEPM II (عصاره متانول به روش دوّم)، CEPM II (عصاره کلروفورم به روش دوّم)، DEPM II (عصاره

دی اتیل اتر به روش دوم)، EAEPM II (عصاره اتیل استات به روش دوم) و BEPM II (عصاره بوتانل به روش دوّم).

همچنین نام‌های اختصار برای گیاه *E. umbellatum*: HEEU I (عصاره هگزان به روش اول)، CEEU I (عصاره کلروفورم به روش اول)، EAEEU I (عصاره اتیل استات به روش اول)، MEEU I (عصاره متانول به روش اول)، MEEU II (عصاره متانول به روش دوم)، EEU II (عصاره کلروفورم به روش دوم)، DEEU II (عصاره دی اتیل اتر به روش دوم)، EAEEU II (عصاره اتیل استات به روش دوم) و BEEU II (عصاره بوتانل به روش دوم).

تفریخ سیست‌های آرتمیا سالینا: در ابتدا سیست‌های آرتمیا سالینا در آب محتوی ۳/۸ درصد نمک دریا در دمای مناسب رشد این میگو، ۲۲ تا ۲۹ درجه سلسیوس همراه با نور و سیستم هوادهی کافی مورد کشت قرار گرفتند. پس از حدود ۱۸–۱۶ ساعت به تدریج میزان قابل توجهی از سیست‌ها تفریخ گردیدند. سپس لاروهای زنده از پوسته سیست‌ها توسط ویژگی فوتوتروپی جدا گردیده و لاروها آماده انجام آزمون شدند. میگوی آرتمیا در مرحله لارو یا ناپلی دوم و سوم حساسیت به سموم دارند [۸]. با استفاده از شمارش لاروهای زنده باقی مانده، میزان سمیت به دست آمده عصاره‌ها محاسبه گردید. توسط نرم افزار Excel و با رسم نمودار غلظت در برابر میانگین مرگ و میر به دست آمده در سه تکرار در هر غلظت به کار رفته به دست آمد.

نتایج

در این مطالعه، میزان سمیت دو گیاه *E. umbellatum* و *P. microphylla* جمع‌آوری شده از شمال غربی کشور مالزی مورد بررسی قرار گرفت. جدول ۱ میزان استخراج عصاره‌های دو گیاه *E.umbellatum* و *P. microphylla* را به درصد نشان می‌دهد. بر اساس نتایج به دست آمده، عصاره کلروفورمی و متانولی به روش دوم شامل عصاره‌های CEEU II، CEPM II، MEEU II و MEPM II دارای بالاترین میزان تولید استخراج بوده‌اند. همچنین دو عصاره کلروفورمی CEEU II و CEPM II به ترتیب ۳/۶۵٪ و ۳/۴۶٪ بودند. نتایج به دست آمده از آزمون سنجش اثرات سیتوتوکسیک به صورت LC_{50} و بازه اطمینان یا حدود اطمینان ۹۵ درصد در جداول ۲ و ۳ بیان شده است. ترتیب عصاره‌ها بر اساس میزان پایین LC_{50} سمیت حاد به شرح ذیل است:

MEEU II > CEEU II > EAEEU I > HEEU I > BEEU II > EAEEU II > CEEU I > MEEU I

همچنین براساس میزان کم LC_{50} سمیت مزمن به ترتیب زیر می باشد:

EAEEU II > CEEU II > HEEU II > MEEU I > BEEU II > CEEU I > MEEU II > EAEEU I

بر این اساس عصاره MEEU II بالاترین میزان سمیت حاد (در طول مدت ۶ ساعت) و عصاره EAEEU II بالاترین میزان سمیت مزمن (در طول مدت ۲۴ ساعت) را نشان دادند. به نظر می رسد با توجه به نتایج به دست آمده، استفاده از روش دوم عصاره‌گیری (با استفاده از فانل جدا کننده) تاثیر بیشتری در نتایج به دست آمده داشته است. در این میان گیاه *P. microphylla* طیف وسیعی از میزان LC_{50} را از ۴۶/۷ تا ۶۰۰۰< µg/mL را نشان داد. جدول شماره ۳ نتایج به دست آمده از گیاه *P. microphylla* را نشان می‌دهد.

بر اساس جدول شماره ۳، به ترتیب میزان پایین LC_{50} برای سمیت حاد به شرح ذیل می‌باشد:

EAEPM II < CEPM II < BEPM II < MEPM I < MEPM II < CEPM I < EAEPM I < HEPM I

بر اساس میزان پایین LC_{50} برای سمیت مزمن (۲۴ ساعت) به شرح زیر است:

CEPM II > BEPM II > EAEPM II > EAEPM I > MEPM I > MEPM II > CEPM I > HEPM I

همچنین پتاسیم دی‌کرومات به عنوان کنترل مثبت در این آزمون به کار گرفته شد. میزان LC_{50} (۲۴ ساعت) برابر با

µg/mL ۳۲/٤ بود که بیانگر سمیت بیش از اندازه (میزان هست.
LC_{50} کمتر از µg/mL ۱۰۰) برای میگوی آب شور

جدول ۱- درصد میزان استخراج به دست آمده از عصاره‌ها در دو روش متفاوت عصاره‌گیری

عصاره های گیاه ***E. umbellatum***		عصاره های گیاه ***P. microphylla***	
نام عصاره گیاهی	میزان استخراج عصاره (%)	نام عصاره گیاهی	میزان استخراج عصاره (%)
HEEU I	۰/۸٦	HEPM I	۱/۵۵
CEEU I	۲/٦۲	CEPM I	۲/۰٤
EAEEU I	۰/۸٤	EAEPM I	۰/۲٦
MEEU I	۱/۷۸	MEPM I	۱/۲۳
MEEU II	۳/۲۱	MEPM II	۳/۹٤
CEEU II	۳/٦۵	CEPM II	۳/٤٦
DEEU II	۰/۲۸	DEPM II	۰/۱٦
EAEEU II	۰/٦۵	EAEPM II	۰/٤۳
BEEU II	۰/٤۰	BEPM II	۱/۲۲

جدول ۲- نتایج کلی تست لارو آرتمیا سالینا بر روی گیاه ***E. umbellatum*** بر روی عصاره‌های الکلی

ردیف	نام عصاره گیاهی	LC_{50} (µg/mL) (سمیت حاد)[۱]	حدود اطمینان ۹۵ درصد (سمیت حاد)	LC_{50} (µg/mL) (سمیت مزمن)[۲]	حدود اطمینان ۹۵ درصد (سمیت مزمن)
۱	HEEU I	۱۸٦/۳	٤۱/۱ – ۸٤۵/۰	۱۲۲۰	۹٦۸/۱ – ۱۵۳۸
۲	CEEU I	۲٤۰۰	۲۱۱٦ – ۲۷۲۵	۷۰۲/۱	٦۲٤/۷ – ۷۸۹/۳
۳	EAEEU I	۱۲۱٤	۱۱٤۹ – ۱۲۸۲	۸٤۰/۵	٤۸۹/۵ – ۱٤٤۳
٤	MEEU I	۵۲۹٦	۲۲۳/۹ – ۵۵۹/۱	۳۵۳/۸	غیرقابل تشخیص
۵	MEEU II	۸۱۸/۳	٤۷۹/۰ – ۱۳۹۳	۵۷/٦۲	غیرقابل تشخیص
٦	CEEU II	٦۲۱/۳	۵۰۱/۵ – ۷٦۹/۸	۱٤۰/۹	غیرقابل تشخیص
۷	EAEEU II	۲۰۵۳	۱۰۱۰ – ۱۷۱۸	۱۱۳/۱	۱۰/۳ – ۱۲٤۱
۸	DEEU II	–	–	–	–
۹	BEEU II	۱۸٦۵	۱۹٦۳ – ۳۱۲٦	۵۹۳/٦	٤۰۰/٦ – ۸۷۹/۵

[۱] سمیت حاد: ٦ ساعت طول مدت در معرض قرار گرفتن عصاره‌ها در مجاورت لاروها

[۲] سمیت مزمن: ۲٤ ساعت طول مدت در معرض قرار گرفتن عصاره‌ها در مجاورت لاروها

جدول ۳- نتایج کلی تست لارو آرتمیا سالینا بر روی گیاه *P. microphylla* بر روی عصاره‌های الکلی

ردیف	نام عصاره گیاهی	LC_{50} (µg/mL) (سمیت حاد)[1]	حدود اطمینان ۹۵ درصد (سمیت حاد)	LC_{50} (µg/mL) (سمیت مزمن)[2]	حدود اطمینان ۹۵ درصد (سمیت مزمن)
۱	HEPM I	٤٩٠٢	غیرقابل تشخیص	٥٧٤٢	غیرقابل تشخیص
۲	CEPM I	٤١٠٣	٩٧٤/٨ – >٦٠٠٠	٥٣٩/١	٦٣٩/١ – ١٢٨٨
۳	EAEPM I	٤٣٠٩	٣٦١٨ – ٤٥٥٥	١٢٩٦	١٠٧٢ – ١٤١٦
٤	MEPM I	٢٧١٤	١٧٧٦ – ٣٧٩١	٢٣٤/٠	٢٢٠/١ – ٢٥٠/٠
٥	MEPM II	٢٩٧٨	٢١٧٥ – ٣٧٥٧	٢٤١٥	٢١٩/٣ – >٦٠٠٠
٦	CEPM II	١٩٧٧	١٥٦٠ – ٢٥٠٧	٤٦/٧	غیرقابل تشخیص
۷	EAEPM II	٦٨٣/٣	٦١٩/٣ – ٧٥٤	١٩٧/٢	غیرقابل تشخیص
۸	DEPM II	–	–	–	–
۹	BEPM II	٢٤٠٥	١٣٥١ – ٣٩٦٩	١١٧/٠	٥٦/٢ – ٦٦/٢

[1] سمیت حاد: ٦ ساعت طول مدت در معرض قرار گرفتن عصاره‌ها در مجاورت لاروها

[2] سمیت مزمن: ٢٤ ساعت طول مدت در معرض قرار گرفتن عصاره‌ها در مجاورت لاروها

بحث

بسیاری از مطالعات نشان داده که استفاده از آزمون میگوی آب شور به عنوان بهترین روش مقدماتی برای تشخیص سمیت می‌باشد. هرچند این آزمون به تنهایی جهت تفسیر مکانیسم‌های سمیت کافی نمی‌باشد اما با این حال یک روش مطمئن و مفید در ارزیابی اولیه و تعیین سمیت ترکیبات مختلف در عصاره‌های گیاهان کاربرد دارد [۲۱، ۲۲]. اگرچه این آزمون به دلیل نامشخص بودن و واضح نبودن مکانیسم عمل آن در عمل ناقص به نظر می‌آید ولی از نظر صرفه اقتصادی این آزمون در درجه اول به دلیل مقرون به صرفه بودن و در درجه دوم از جهت به رسمیت شناخته شدن در ارزیابی فعالیت‌های زیستی عصاره‌های گیاهی برای مقاصد مختلف و تعیین میزان سمیت ترکیبات فعال زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۱]. همچنین جهت ارزیابی عصاره‌های خام نیاز به یکسری آزمایشات غربالگری می‌باشد که یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های اینگونه آزمایشات تشخیص سمیت و دلالت بر حضور ترکیبات ضدسرطان در آن گیاهان را دارد. از این جهت، آزمون آرتمیا سالینا به عنوان یکی از بهترین آزمون‌های غربالگری شناخته می شود [۲، ۵] و از این‌رو جهت مطالعه این پژوهش به کار گرفته شده است.

افزایش عملکرد استخراج در عصاره‌های متانولی براساس روش دوم عصاره‌گیری همانند عصاره‌های متانولی MEEU II و MEPM II که می‌تواند به دلیل اضافه نمودن آب مقطر به حلال های قطبی همانند استون، اتانل و متانل باشد که باعث افزایش قطبیت و همچنین افزایش عملکرد استخراج عصاره‌های خام می‌گردد. معمولاً استفاده از حلال‌های غیرقطبی مانند هگزان و پترولیم اتر سبب کاهش عملکرد میزان عصاره خام می‌گردد [۹] که با توجه به نتایج جدول شماره ۱ مطابقت کامل دارد. همچنین در تحقیق دیگری مقادیری از فلاونوئید به میزان ۰/۲۱ ± ۲/۲۷ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تازه از گیاه *P. mircophylla* به دست آمد [۱]. براساس قطبیت، کلروفورم به عنوان حلال

اغلب برای استخراج ترکیبات ترپنویید و فلاونوئید از اندام های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳]، با توجه به این نظر و با استناد به روش کروماتوگرافی TLC (با استفاده از ترکیب حلال‌های اتیل استات به هگزان به نسبت ٤:١٦)، حضور ترکیب فلاونول با میزان ۹۸/٦۸٪ (R_f) با توجه به رنگ زرد روشن آن مورد شناسایی قرار گرفت، هرچند بر اساس نظر هاربورن (۱۹۹۸)، لکه‌های با رنگ صورتی پررنگ و نارنجی تا زرد روشن بر روی ورق کروماتوگرافی TLC به عنوان ترکیبات فلاونوئیدی می‌توان در نظر گرفت [٦]، از این رو به نظر می‌رسد که عصاره کلروفورمی CEPM II دارای بیشترین ترکیبات فلاونوئید باشد.

در تحقیقاتی که میازاوا و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام دادند، موفق گردیدند مقادیری از ترکیبات گیاهی فیتول، اسید لینولئیک، اسید پالمیتیک، سالسیلات متیل و نیوفیتادئین را در گیاه *E. umbellatum* var *majus* پیدا نمایند [۱۳]. در این میان برخی ترکیبات معطر فرّار در خانواده آلدئیدهای شش کربنی همانند (2E)-hexenal و (3Z)-hexenol و نیز دو ترکیب معطر بسیار قوی مانند 1-octen-3-ol (با بوی شبیه خاک) و 4-vinyl-o-guaiacol (با بوی دارویی) از روغن معطر این گیاه یافت گردید. براساس نتایج این پروژه از جداول ۲ و ۳، طیف وسیعی از میزان LC_{50} در دو گیاه مذکور بین ٤٦/۷ تا ٦۰۰۰µg/mL بدست آمد، البته این طیف بیشتر در مورد گیاه *P. microphylla* دیده شد. از بین عصاره‌های خام گیاه *E. umbellatum*، تنها عصاره HEEU I و از گیاه *P. microphylla* عصاره‌های HEPM I و EAEPM I در غلظت‌های به کار رفته در این آزمون، سمیت سلولی ایجاد نکردند و میزان LC_{50} آنها بالاتر از ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد و از آن جهت که عصاره‌های بیش از میزان ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر فاقد اثر سمیت سلولی هستند، این عصاره‌ها فاقد کشندگی سلولی تشخیص داده شدند [۱۵] و عصاره‌های پایین‌تر از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر همانند عصاره‌های MEEU II و CEPM II دارای اثر فعال کشندگی سلولی می‌باشند. از این جهت از بین تمام عصاره‌های مورد بررسی دو گیاه مذکور، عصاره CEPM II از گیاه *P. microphylla* کمترین میزان LC_{50} و عصاره MEPM II از همان گیاه بالاترین میزان LC_{50} (براساس سمیت مزمن) را نشان دادند. همچنین نتایج مطالعه قبلی مان نشان داده است که دو عصاره MEEU II و CEEU II دارای اثرات ضد میکروبی [١٦] و نیز دارای حجم میزان بالای عصاره به دست آمده از عصاره‌گیری مرحله دوم بودند، با این حال به نظر می‌رسد که عصاره MEEU II با داشتن میزان پایین LC_{50} (۵۷/٦۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نسبت به سایر عصاره‌های گیاه *E. umbellatum* سمیت بیشتری داشته باشد.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این تحقیق، عصاره‌های گیاه *E. umbellatum* سمیت بیشتری نسبت به عصاره‌های گیاه *P. microphylla* بر علیه لاروهای آرتمیا سالینا از خود نشان دادند. با این حال دو عصاره MEEU II و CEPM II با میزان پایین بودن LC_{50} سمیت به مراتب بیشتری نسبت به بقیه عصاره‌های هر دو گیاه از خود نشان دادند.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از دانشگاه ساینز مالزی (Universiti Sains Malaysia) بخاطر فراهم نمودن بورس تحصیلی و امکانات کامل آزمایشگاهی برای تحقیق در این زمینه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Andarwulan N., Batari R., Sandrasari D.A., Bolling B., Wijaya H. (2010), Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chemistry*, 121: 1231-1235.

2. Ara J., Sultana V., Ehteshamul-Haque S., Ahmad Q.R.V.U. (1999), Cytotoxic activity of marine macroalgae on Artemia salina (brine shrimp). *Phytotherapy Research*, 13: 304-307.

3. Cowan M.M. (1999), Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 564-582.

4. Christophersen E. (1971), Flowering plants of Samoa. Kraus Reprint Co. New York, p. 45.

5. Hanskell C.M. (1995), Cancer Treatment. 4th edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company.

6. Harborne J.B. (1998), Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. Third edition, Chapman and Hall, U.K.

7. Hirschhorn H.H. (1982), Botanical remedies of South and Central America, and the Caribbean: An Archival Analysis. Parts I & II. *Journal of Ethnopharmacology*, 4:129-158, 5:163-180.

8. Khalighi-Sigaroodi F., Hadjiakhoondi A., Ahvazi M., Taghizadeh M., Yazdani D., Khalighi-Sigaroodi S. (2008), Cytotoxicity evaluation of two species from Caesalpinia genus. *Journal of Medicinal Plants*, 1(25): 60-70.

9. Kumoro A.C., Hasan M., Singh H. (2009), Effect of solvent properties on the Soxhlet extraction of diterpenoid lactones from *Andrographis paniculata* leaves. *ScienceAsia*, 35: 306-309.

10. Lans C. (2007), Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3: 1-13.

11. McLaughlin J.L. (1991), Crown gall tumors on potato discs and brine shrimp lethality: Two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. *Methods in Plant Biochemistry*, 6: 1-32.

12. Mellidis A.S., Papageorgiou V.P. (1993), Phenolic constituents from Onosma heterophylla. *Journal of Natural Products*, 56(6): 949-952.

13. Meyer N., Ferrigni N.R., Putnam J.E. (1982), Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45: 31-32.

14. Miyazawa M., Utsumi Y., Kawata J. (2009), Aroma-active compounds of *Elatostema laetevirens* and *Elatostema umbellatum* var. majus. *Journal of Oleo Science*, 58(4): 163-69.

15. Modarresi Chahardehi A, Ibrahim D, Fariza Sulaiman S. (2010), Antioxidant, antimicrobial activity and toxicity test of *Pilea microphylla*. *International Journal of Microbiology*, DOI:10.1155/2010/826830.

16. Modarresi Chahardehi A., Ibrahim D., Fariza Sulaiman S. (2009), Antimicrobial activity of some medicinal plants in Urticaceae family. Life Science: Synergy for enhancement of quality of life, 2nd collaborative conference, Universitas Airlangga, Indonesia, p: 165.

17. Orech F.O., Akenga T., Ochora J., Friis H., Aagaard-Hansen J. (2005), Potential toxicity of some traditional leafy vegetables consumed in Nyang`oma division, Western Kenya. African Journal of Food Agriculture, Nutrition and Development, 5(1): 1-13.

18. Pisutthanan S., Plianbangchang P., Pisutthanan N., Ruanruay S., Muanrit O. (2010), Brine shrimp lethality activity of Thai medicinal plants in the family Meliaceae. *Naresuan Universiti Journal*, 12(2): 13-18.

19. Prabhakar K.R., Veerapura V.P., Bansal P., Parihar, V.K., Reddy Kandadi M., Bhagath Kumar P., Priyadarsini K.I., Unnikrishnan M.K. (2007), Antioxidant and radioprotective effect of the active fraction of Pilea microphylla (L.) ethanolic extract. *Chemico-Biological Interacteraction*, 165(1): 22-32.

20. Praveen M., Radha K., Hari K.R., Padmaja V., Mathew A., Ajith Kumar P. (2012), Preliminary phytochemical, antimicrobial and toxicity studies on *Clerodendrum paniculatum* Linn leaves. *Hygeia Journal of Drug and Medicine*, 4(1): 41-50.

21. Quignard E.L., Pohlit A.M., Nunomura S.M., Pinto A.C., Santos E.V., Morais S.K., Alecrim A.M., Pedroso A.C., Cyrino B.R., Melo C.S., Finney E.K., Gomes E.O., Souza K.S., Oliveira L.C., Don L.C., Silva, L.F., Queiroz M.M., Henrique M.C., Santos M., Pinto P.S., Silva S.G. (2003), Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp. *Acta Amazon*, 33: 93-104.

22. Sadighara P., Esfahani T.A., Jafari A, Farkhondeh T. (2010), Assessment of cytotoxic activity of three plants of Pigweed, Bermuda grass and Burdock via *Artemia salina* test. *Knowledge and Health*, 5(2-3): 1-4.

23. Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K. (2003), Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and* Food Chemistry, 51(3): 571-581.