



ارزیابی اثرات آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی عصاره های الکلی ساقه و برگ گیاه سیاه گینه

مصطفی علم هولوا، سنبل ناظری*

^۱ کارشناس ارشد، دانشگاه بو علی سینا، همدان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی، آستادیار، دانشگاه بو علی سینا، همدان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

چکیده

سابقه و هدف: افزایش روزافزون مقاومت دارویی به آنتی بیوتیک ها و حساسیت به ترکیبات شیمیایی ضد میکروبی از جمله دلایل رویکرد محققان برای یافتن ترکیبات دارای خاصیت ضد میکروبی با منشأ گیاهی است. این مطالعه با هدف بررسی خواص آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی عصاره های برگ و ساقه گیاه سیاه گینه علیه ۱۰ سویه باکتری بیماریزای انسانی انجام شد. **مواد و روش ها:** گیاه سیاه گینه از ارتفاعات ۱۹۶۱ متر کوه الوند در استان همدان جمع آوری گردید. پس از شناسایی، عصاره ها به روش خیساندن تهیه شدند. در این مطالعه مقطعی، اثرات ضد باکتریایی به روش انتشار چاهک در آگار، MIC (به روش رقت لوله ای) و MBC مشخص شدند. خواص آنتی اکسیدانی به روش DPPH و میزان فنل و فلاونوئید کل به روش فولین سیو کالتو و آلومینیوم کلرید اندازه گیری گردید.

یافته ها: بیشترین هاله بازدارندگی با قطر $27/3 \pm 0/6$ میلی متر در کشت باکتری میکروکوکوس لوتئوس روی عصاره اتانولی ساقه مشاهده شد. MIC و MBC عصاره ساقه در مقایسه با برگ کمتر بود. عصاره متانولی ساقه در غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد داشت. بیشترین میزان فنل $79/4 \pm 0/5$ (mgGAE/g) و فلاونوئید $2/1 \pm 0/1$ (mgQ/g) به ترتیب در عصاره متانولی ساقه و برگ به دست آمد.

نتیجه گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره الکلی به ویژه عصاره متانولی گیاه سیاه گینه توانایی استخراج ترکیبات آنتی باکتریایی را دارد. از آنجایی که ترکیبات فنول و فلاونوئید دارای خاصیت آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی هستند، این ویژگی عصاره گیاه می تواند مربوط به حضور این ترکیبات در بافت های مورد مطالعه باشد.

واژگان کلیدی: سیاه گینه، ضد باکتری، آنتی اکسیدان، باکتری های بیماریزای انسانی.

پذیرش برای چاپ: آبان ماه ۹۳

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹۳

مقدمه

استفاده از این داروها برای درمان عفونت ها دارند. زیرا عوارض این داروها در مقایسه با داروهای شیمیایی به طور قابل ملاحظه ای پایین تر است (۲). در سال های اخیر با افزایش آگاهی نسبت به فواید مصرف ترکیبات دارای ویژگی های آنتی اکسیدانی و تمایل تولید کنندگان و مصرف کنندگان به محصولات طبیعی، پژوهش های فراوانی در زمینه یافتن منابع غنی از آنتی اکسیدان های طبیعی صورت گرفته است. بسیاری از خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی

گیاهان و تولیدات طبیعی آنها ذخیره ای از ترکیباتی با خواص درمانی فعال هستند که نه تنها به عنوان دارو، بلکه به عنوان الگوهای منحصر به فرد برای شروع ساخت آنالوگ های سنتزی به کار می روند (۱). کنترل بیماری ها به ویژه بیماری های عفونی به وسیله داروهای طبیعی گیاهی در سال های اخیر رشد فزاینده ای داشته است. متخصصین عفونی تمایل زیادی به

(* آدرس برای مکاتبه: همدان، دانشگاه بو علی سینا، گروه بیوتکنولوژی.

آسیاب، پودر شد. به منظور تهیه عصاره ها، ۲۵ گرم از پودر خشک شده به طور جداگانه به ۲۵۰ میلی لیتر حلال های اتانول ۹۶ و متانول ۸۰ درصد اضافه و به روش یاد شده به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر گذاشته شد (۸).

در ادامه عصاره ها به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۱، صاف شدند و به مدت ۱۰ دقیقه با شدت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس توسط دستگاه روتاری تغلیظ شدند. نمونه ها به منظور خشک شدن کامل به آون با دمای ۴۰ درجه سیلیسیوس منتقل گردیدند. عصاره ها تا زمان استفاده در دمای ۲۲- درجه سیلیسیوس نگهداری شدند.

ب) تهیه سویه های میکروبی استاندارد: در این مطالعه سویه های استاندارد شامل اشریشیا کلی (*E. coli* ATCC25922)، شیگلا بویدی (*Shigella boydi*)، سالمونلا تیفی (*Salmonella typhi* PTCC160)، انتروباکتر آئروژنز (*Enterobacter aerogenes* PTCC1221)، میکروکوکوس لوتئوس (*Micrococcus luteus* PTCC1110)، باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus* PTCC1247)، باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis* PTCC1156)، استرپتوکوکوس پیوژنز (*Streptococcus pyogenes* PTCC1447)، سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa* PTCC1181) و استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus* PTCC1189) از دانشگاه علوم پزشکی استان همدان تهیه شدند.

برای تهیه کشت تازه از باکتری های یاد شده، یک کلنی باکتری بر روی محیط جامد مولر هیتون آگار (مرک، آلمان) منتقل و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس گرماگذاری گردید. یک لوپ از کلونی باکتری به یک میلی لیتر محیط نوترینت برات (مرک، آلمان) انتقال و در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. همچنین غلظت سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$ باکتری در میلی لیتر) تعیین گردید (۹).

ج) فعالیت ضدباکتریایی به روش انتشار چاهک در آگار: در این مطالعه عصاره های اتانولی و متانولی با غلظت های

عصاره های گیاهی به دلیل وجود موادی مانند فنل و فلاونوئید و ترکیبات مشابه آن می باشد (۳).

گیاه سیاه گینه (*Dendrostellera lessertii*) از خانواده Thymelaeaceae تنها گونه جنس *دندروستلرا* در ایران است. مطالعات رچینگر (Rechinger) نشان داد که این گیاه، بوته ای، چند ساله با ساقه چوبی به ارتفاع ۲۰ تا ۶۰ سانتی متر، برگ ها نیزه ای باریک و گاهی بیضوی شکل، گل ها کرم تیره ای تا زرد رنگ می باشد که در مناطق شمال و شمال غرب ایران انتشار دارد (۴).

۳- هیدروجنکوادافنین یک استر دی ترین نوع دافنان جدا شده از برگ های گیاه دارویی سیاه گینه با خاصیت ضد سرطانی است (۵). یزدانپرست (Yazdanparast) و مشکینی (Meshkini) اثر بازدارندگی این ترکیب را بر روی سلول سرطانی خون KG1 نشان دادند (۶). خواص دارویی در جنس های دیگر این خانواده نیز گزارش شده است. گیاه *Daphne angustica* به دلیل داشتن ترکیباتی مانند دافنان و کومارین برای درمان روماتیسم و سکنه ها کاربرد دارد. همچنین دارای خاصیت سقط جنین و ضد سرطان خون نیز می باشد (۷).

تاکنون گزارشی از اثر ضد میکروبی بافت های این گیاه منتشر نگردیده است. هدف از این مطالعه بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و اثرات ضد میکروبی عصاره های اتانولی و متانولی برگ و ساقه گیاه دارویی سیاه گینه بر روی رشد برخی باکتری های بیماری زای انسانی بود.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری گیاه و روش عصاره گیری: گیاه سیاه گینه (با کد ۲۰۲۰۵) در خرداد سال ۱۳۹۲ از ارتفاعات ۱۹۶۱ متر کوه الوند (استان همدان) جمع آوری گردید. گیاه مورد نظر توسط متخصصین زیست شناس شناسایی شد. نمونه ها در دمای اتاق و دور از نور مستقیم خورشید در سایه خشک شدند. برای تهیه عصاره های اتانول و متانول از روش خیساندن استفاده گردید. گیاه خشک شده توسط دستگاه

آنها عدم رشد مشاهده شده بود، مقدار معینی بر روی محیط کشت مولر هیتتون آگار کشت داده شد. محیط کشت‌های تلقیح شده ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس قرار داده شدند. پس از گرماگذاری کمترین غلظتی از عصاره که در آن رشد باکتری مشاهده نگردید به عنوان MBC در نظر گرفته شد. روش *(DPPH)2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*: به منظور بررسی فعالیت رادیکال آزاد از روش استوجیسویک (Stojicevic) و همکاران استفاده شد (۱۲). معرف ۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، به دلیل حضور گروه‌های فنیل در ساختار آن یک منبع رادیکال پایدار است که با گرفتن یک الکترون از ترکیب آنتی‌اکسیدان رنگ آن از بنفش به زرد تغییر می‌کند. در این مطالعه غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر متانول تهیه و از آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شدند. جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر با حلال متانول در طول موج ۵۱۷ نانومتر ثبت گردید. درصد فعالیت ضد رادیکالی (RSA) با استفاده از رابطه زیر به دست آمد (۱۲).

$$RSA(\%) = 100 (1 - (As - Ab)) / Ac$$

در این رابطه As (جذب نمونه تیمار)، Ab (جذب نمونه بلانک) و Ac (جذب نمونه شاهد) می‌باشد.

(و) اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل: برای این منظور از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد (۱۳). جذب مخلوط نهایی پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در طول موج ۴۱۵ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. مقدار فلاونوئید کل به صورت میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک عصاره محاسبه گردید.

(ز) اندازه‌گیری میزان فنل کل: برای این منظور از واکنش گر فولین سیوکالتو استفاده شد (۱۴). از معرف گالیک اسید نیز به عنوان استاندارد استفاده گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. میزان جذب نمونه‌ها به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار فنل کل معادل میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن

۱،۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اندام‌های برگ و ساقه تهیه شدند. در ابتدا ۱،۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم از عصاره خشک ساقه و برگ به طور جداگانه در یک میلی‌لیتر حلال اتانول ۹۶ و متانول ۸۰ درصد حل گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بر روی پلیت‌های مولر هیتتون آگار استریل تلقیح و با سوآب استریل به صورت یکنواخت کشت داده شد. چاهک‌هایی به قطر پنج میلی‌متر ایجاد گردید. ۵۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های تهیه شده به درون این چاهک‌ها ریخته شد. پلیت‌ها ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری گردیدند (۱۰).

از آنتی‌بیوتیک‌های اریترومیسین (۱۵ میکروگرم) برای باکتری‌های گرم مثبت و کانامایسین (۳۰ میکروگرم) (پادتن طب، ایران) برای باکتری‌های گرم منفی به عنوان کنترل مثبت و حلال‌های متانول و اتانول به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. سنجش خواص ضدباکتریایی برای تمام غلظت‌ها در سه تکرار صورت گرفت. اندازه قطر هاله‌های بازدارندگی رشد باکتری در اطراف چاهک بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

(د) اندازه‌گیری حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC): با استفاده از روش رقت لوله ای حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum inhibitory concentration) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum bactericidal concentration) تعیین گردید (۱۱). به منظور تعیین MIC سری‌های رقت ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محیط نوترینت برات تهیه گردید. پس از تهیه سری رقت‌ها، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند به تمامی لوله‌ها به جزء کنترل مثبت (محیط + عصاره) اضافه شد. در نهایت لوله‌های تلقیح شده ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری گردیدند. کمترین رقتی از عصاره که در آن کدورتی مشاهده نگردید، به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی از تمامی لوله‌هایی که در

عصاره خشک محاسبه گردید.

بیماری‌های انسانی به روش رقت لوله ای در جدول ۳ آورده شده است. در این مطالعه MIC و MBC در رقت پایین ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره متانولی برگ روی رشد باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز و اشریشیا کلی مشاهده شد. عصاره متانولی برگ در مقایسه با عصاره اتانولی اثر بازدارندگی بهتری نشان داد. حداقل رقت بازدارندگی و کشندگی عصاره اتانولی ساقه در برابر رشد باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز مشاهده گردید.

یافته‌ها

الف) بررسی فعالیت ضدباکتریایی به روش انتشار چاهک در آگار: در کشت تمامی باکتری‌ها، کنترل منفی هر دو عصاره (اتانولی و متانولی) هاله عدم رشد مشاهده نشد. عصاره متانول برگ و اتانولی ساقه، بیشترین اثر بازدارندگی را بر روی باکتری گرم مثبت میکروکوکوس لوتئوس به ترتیب با قطر هاله عدم رشد $23/6 \pm 0/2$ و $27/3 \pm 0/6$ میلی متر داشت (جدول ۱). باکتری انتروباکتر آئروژنز در برابر هر دو عصاره اتانولی و متانولی و باکتری میکروکوکوس لوتئوس در برابر عصاره متانولی برگ در غلظت بالا حساسیت بیشتری، در مقایسه با کنترل مثبت، نشان دادند. غلظت ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر هر دو عصاره اتانولی و متانولی ساقه بر رشد باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز و میکروکوکوس لوتئوس و همچنین غلظت ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره اتانولی بر رشد باکتری انتروباکتر آئروژنز اثرات آنتی‌باکتریایی بیشتری در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و اریترومایسین نشان دادند (جدول ۲). نتایج بررسی قطر هاله نشان داد که در بیشتر موارد بین قطر هاله عدم رشد و میزان غلظت عصاره رابطه خطی وجود دارد (جدول ۱). در غلظت‌های پایین میزان هاله عدم رشد کم و اثرات عصاره‌ها بر روی باکتری‌ها بیشتر به صورت باکتريواستاتیک بوده و با افزایش غلظت، حساسیت باکتری‌ها در برابر عصاره افزایش یافته و اثرات آن بیشتر به صورت باکتريوساید مشاهده شد (جدول ۱).

ب) روش رقت لوله ای MIC و MBC: نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های اتانولی و متانولی برگ و ساقه سیاه‌گینه علیه ۱۰ سویه باکتری

ج) تعیین میزان فعالیت ضد رادیکالی به روش DPPH: نتایج درصد مهار عصاره‌ها و اسید آسکوربیک نشان داد که عصاره متانولی برگ و ساقه در غلظت‌های ۰/۲ تا ۰/۶ درصد مهاری بیشتری در مقایسه با آسکوربیک اسید نشان دادند (نمودار ۱). IC50 عصاره متانولی برگ، ساقه و آسکوربیک اسید به ترتیب ۰/۱۰۲۴، ۰/۱۰۴۲ و ۰/۱۰۷۶ میلی گرم در میلی لیتر محاسبه شد. اختلاف معنی‌داری بین مقدار IC50 عصاره‌های متانولی برگ، ساقه و اسید آسکوربیک مشاهده نشد (نمودار ۲).

د) بررسی میزان فنل و فلاونوئید کل: در این مطالعه مقدار فنل کل برگ و ساقه به ترتیب $69/1 \pm 3/2$ و $79/4 \pm 0/5$ (میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) و فلاونوئید $2/1 \pm 0/1$ و $1/5 \pm 0/1$ (میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) به دست آمد. عصاره متانولی برگ و ساقه به ترتیب بیشترین میزان فلاونوئید و فنل را داشتند. با توجه به نتایج بدست آمده، بین میانگین مقدار فنل و فلاونوئید کل هر دو بافت برگ و ساقه اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ مشاهده شد.

بحث

در این بررسی عصاره الکلی بافت‌های ساقه و برگ توانایی ممانعت از رشد باکتری‌های مورد مطالعه را دارا بودند. مطالعات انجام شده بر روی جنس‌های دیگر این خانواده نشان داد که عصاره الکلی ساقه و برگ دارای ترکیباتی با خاصیت آنتی‌باکتریایی هستند. تایوب (Tayoub) و همکاران در سال ۲۰۱۲، اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی برگ و ساقه گیاه دافنه

اولئوفولیالم را علیه باکتری های اشیریشیا کلی، باسیلوس و سرئوس مشاهده کردند (۱۷). در پژوهش حاضر مشخص گردید که در کشت بیشتر باکتری ها، هاله عدم رشد حاصل از عصاره متانولی بیشتر از عصاره اتانولی بوده است. این مطلب نشان می دهد که احتمالاً عصاره متانول در این دو بافت ترکیبات آنتی باکتریایی بیشتر و سودوموناس آتروژینوزا، اشیریشیا کلی و باسیلوس گیاه *Phaleria macrocarpa* را بر روی باکتری های فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی برگ سودوموناس (۱۶)، و یوسیه (Yosie) و همکاران در سال ۲۰۱۱،

جدول ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره های اتانولی و متانولی برگ و ساقه سیاه گینه علیه برخی از باکتری های بیماریزای انسانی.

باکتری	میانگین قطر هاله های بازدارندگی رشد (میلی متر)				
	برگ		ساقه		
	غلظت (mg/ml)	اتانول	متانول	اتانول	متانول
باسیلوس سرئوس	۱۰۰	۱۰/۶±۰/۶	۱۲/۶±۰/۳	۱۱±۰/۵	۱۶/۶±۰/۶
	۲۰۰	۱۱/۶±۰/۸	۱۳/۳±۰/۳	۱۰/۳±۰/۳	۱۶/۶±۰/۸
	۴۰۰	۱۳/۳±۰/۶	۱۴±۰/۵	۱۱/۶±۰/۳	۱۷±۵/۰
	۱۰۰	۱۲/۶±۰/۶	۱۰/۶±۰/۳	۱۳/۶±۰/۳	۰±۰/۰
اتروباکتر آتروژنز	۲۰۰	۱۳/۶±۰/۶	۱۳/۶±۰/۶	۱۵±۱/۵	۰±۰/۰
	۴۰۰	۱۴±۰/۰	۱۱/۳±۰/۶	۱۵/۳±۰/۸	۰±۰/۰
	۱۰۰	۱۰±۰/۰	۱۰/۶±۰/۳	۱۹±۱/۷	۱۵/۶±۰/۶
	۲۰۰	۱۳±۰/۱	۱۷/۳±۰/۸	۲۵/۶±۰/۳	۲۰±۰/۱
میکروکوکوس لوتئوس	۴۰۰	۱۶/۶±۰/۸	۲۳/۶±۰/۲	۲۷/۳±۰/۶	۱۹/۳±۰/۳
	۱۰۰	۹/۶±۰/۶	۱۰±۰/۰	۱۰±۰/۵	۸±۰/۵
	۲۰۰	۹/۶±۰/۳	۱۲±۰/۵	۱۱/۶±۰/۳	۱۱/۳±۰/۳
	۴۰۰	۹/۳±۰/۳	۱۲/۶±۰/۶	۱۰±۰/۵	۱۲±۰/۵
سالمونلا تیفی	۱۰۰	۱۲±۰/۵	۱۲±۰/۷	۱۱/۶±۰/۳	۱۱/۶±۰/۸
	۲۰۰	۱۲/۶±۰/۶	۱۲/۶±۰/۸	۱۲/۳±۰/۳	۱۱/۶±۰/۳
	۴۰۰	۱۲/۶±۰/۶	۱۳/۳±۰/۶	۱۱±۰/۵	۱۳/۶±۰/۳
	۱۰۰	۶/۶±۰/۳	۹±۱/۰	۱۲±۱/۵	۱۱±۰/۵
سودوموناس آتروژینوزا	۲۰۰	۱۲/۶±۰/۶	۱۲/۶±۰/۸	۱۲/۳±۰/۳	۱۱/۶±۰/۳
	۴۰۰	۱۲/۶±۰/۶	۱۳/۳±۰/۶	۱۳/۳±۰/۶	۱۳/۶±۰/۳
	۱۰۰	۶/۶±۰/۳	۷±۰/۰	۷±۰/۰	۱۱±۰/۵
	۲۰۰	۷±۰/۰	۷/۶±۰/۳	۱۱±۱/۰	۱۳/۳±۰/۶
باسیلوس سوتیلیس	۴۰۰	۹±۰/۱	۹±۰/۱	۹/۳±۰/۸	۱۴±۰/۱
	۱۰۰	۶/۳±۰/۳	۶/۶±۰/۶	۶/۶±۰/۶	۱۲±۰/۵
	۲۰۰	۷/۳±۰/۸	۱۱/۳±۰/۳	۱۰±۰/۰	۱۲/۶±۰/۸
	۴۰۰	۷/۶±۰/۸	۱۱/۶±۰/۳	۱۳/۳±۰/۸	۱۱/۳±۰/۶
اشیریشیا کلی	۱۰۰	۷±۰/۵	۹/۶±۰/۳	۱۱±۰/۵	۱۵±۰/۵
	۲۰۰	۹±۰/۵	۹/۳±۰/۶	۹/۳±۰/۶	۱۴/۳±۰/۶
	۴۰۰	۸/۶±۰/۶	۱۰/۳±۰/۳	۱۰/۳±۰/۳	۱۵/۳±۰/۳
	۱۰۰	۱۰/۶±۰/۳	۱۰/۳±۰/۶	۱۳/۶±۰/۸	۱۱±۰/۰
استرپتوکوکوس پیوژنز	۲۰۰	۱۲±۰/۵	۹/۳±۰/۳	۱۰/۶±۰/۶	۱۲/۳±۰/۸
	۴۰۰	۸/۶±۰/۶	۸/۶±۰/۳	۱۰/۳±۰/۳	۱۵/۳±۰/۳
	۱۰۰	۱۰/۶±۰/۳	۱۰/۳±۰/۶	۱۰/۳±۰/۶	۱۱±۰/۰
	۲۰۰	۱۲±۰/۵	۹/۳±۰/۳	۱۰/۶±۰/۶	۱۲/۳±۰/۸
استافیلوکوکوس اورئوس	۴۰۰	۸/۶±۰/۳	۸/۳±۰/۳	۸/۳±۰/۳	۱۱/۳±۰/۶
	۱۰۰	۰±۰/۰	۰±۰/۰	۱۱/۶±۰/۳	۱۱/۳±۰/۶
	۲۰۰	۰±۰/۰	۰±۰/۰	۱۱/۳±۰/۳	۱۲±۰/۵
	۴۰۰	۰±۰/۰	۰±۰/۰	۱۱/۶±۰/۶	۱۲/۶±۰/۸
شیگلا بویدی	۲۰۰	۰±۰/۰	۱۱/۳±۰/۳	۱۲/۳±۰/۳	۱۲±۰/۵
	۴۰۰	۰±۰/۰	۱۱/۶±۰/۶	۱۱/۶±۰/۶	۱۲/۶±۰/۸

یا موثرتری را استخراج نموده است. در این مطالعه، حداقل غلظت‌های بازدارندگی و کشندگی عصاره متانولی برگ و ساقه در کشت باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنز و اشیریشیا کلی مشاهده گردید. این نتایج نشان می‌دهد که حساسیت این دو باکتری به عصاره الکلی گیاه سیاه‌گینه بیش از سایر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه بوده است. نتایج بررسی آنتی‌باکتریایی جنس‌های دیگر این خانواده نشان داده است که اشیریشیا کلی به عصاره این

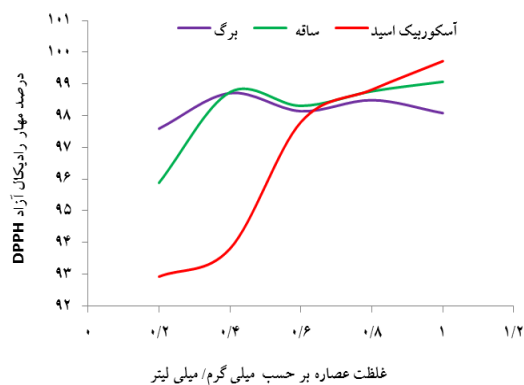
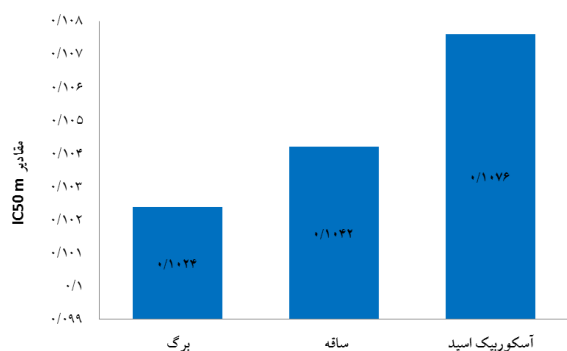
جدول ۲: میانگین قطر هاله‌های بازدارندگی آنتی‌بیوتیک‌های اریترومايسين و كاناميسين در برابر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی.

کانامایسین (۳۰ میکروگرم)	اریترومايسين (۱۵ میکروگرم)	باکتری	کانامایسین (۳۰ میکروگرم)	اریترومايسين (۱۵ میکروگرم)	باکتری
۱۵/۶±۰/۶	۲۴±۰/۰	سالمونلا تیفی	۱۸/۶±۰/۸	۲۵±۰/۰	باسیلوس سوبتیلیس
۱۴±۰/۰	۱۲/۱±۰/۱	شیگلا بویدی	۱۵±۰/۰	۲۳/۳±۰/۶	استافیلوکوکوس اورنوس
۱۱±۰/۰	۹/۱±۰/۴	انتروباکتر آنروژنز	۱۲±۰/۰	۸/۸±۰/۱	استرپتوکوکوس پیوژنز
۱۲/۶±۰/۶	۲۵±۰/۰	اشیریشیا کلی	۱۰±۰/۰	۱۸/۳±۰/۳	میکروکوکوس لوتنوس
۱۲/۶±۰/۳	۱۶/۳±۰/۳	سودوموناس آنروژینوزا	۲۰±۰/۰	۲۶±۰/۰	باسیلوس سرئوس

جدول ۳: مقدار MIC و MBC عصاره‌های اتانولی و متانولی برگ و ساقه سیاه‌گینه علیه برخی باکتری‌های بیماری‌زای انسانی.

ساقه		برگ		متانولی		اتانولی		باکتری
MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	
۱۰۰	۵۰	۲۰۰	۱۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۲۰۰	۱۰۰	
-	۵۰	-	۱۰۰	-	-	-	-	باسیلوس سوبتیلیس
-	۲۵	-	-	-	۵۰	-	-	سالمونلا تیفی
۱۰۰	۵۰	-	-	۵۰	۲۵	۲۰۰	۱۰۰	شیگلا بویدی
-	-	۱۰۰	۱۰۰	۲۵	۲۵	۵۰	۲۵	انتروباکتر آنروژنز
۱۰۰	۱۰۰	۲۵	۲۵	۵۰	۵۰	۱۰۰	۵۰	میکروکوکوس لوتنوس
۲۵	۲۵	۱۰۰	۱۰۰	-	-	-	-	استافیلوکوکوس اورنوس
۱۰۰	۵۰	۱۰۰	۱۰۰	۲۰۰	۵۰	۲۰۰	۱۰۰	سودوموناس آنروژینوزا
۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵	-	-	اشیریشیا کلی
۲۵	۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	-	-	استرپتوکوکوس پیوژنز

-: باکتری رشد یافته



نمودار ۲: مقادیر IC50 عصاره‌های متانولی برگ و ساقه در برابر اسید

آسکوربیک.

نمودار ۱: درصد مهار عصاره‌های متانولی برگ و ساقه با آسکوربیک اسید.

برگ و ساقه گیاه *Daphne cneorum* به ترتیب $76/45 \pm 0/7$ و $69/6 \pm 0/8$ میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) مشابه تحقیق حاضر محاسبه گردید (۸). این اختلاف در نتایج می‌تواند مربوط به جنس گیاه مورد استفاده باشد. در مطالعه حاضر میزان IC50 عصاره‌ها برابر با اسید اسکوربیک محاسبه شد. میزان IC50 عصاره برگ گیاه *Aquilaria crassna* بر اساس نتایج کامون واناسیت (Kamonwannasit) و همکاران در سال ۲۰۱۳ و عصاره متانولی برگ و ساقه گیاه *Daphne cneorum* بر اساس نتایج ندلجکو (Nedeljko) و همکاران در سال ۲۰۱۲، بیشتر از اسید اسکوربیک گزارش شده است (۸ و ۱۹). این اختلاف می‌تواند به دلیل تفاوت در جنس گیاه مورد استفاده است.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره الکلی به ویژه عصاره متانولی گیاه سیاه‌گینه، توانایی استخراج ترکیبات آنتی‌باکتریایی را دارد. هرچند در مواردی میزان بازدارندگی بیش از استانداردهای مورد استفاده بود. از آنجایی که ترکیبات فنل و فلاونوئید دارای خاصیت آنتی‌باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی هستند، این ویژگی عصاره گیاه می‌تواند مربوط به حضور این ترکیبات در بافت‌های مورد مطالعه باشد. این نتیجه‌گیری با بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره الکلی این دو بافت تایید می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از جناب آقای دکتر رنجبر عضو هیئت علمی و متخصص گروه زیست‌شناسی و آقای دکتر نگارش به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

گیاهان حساسیت بیشتری دارد. هر چند در تحقیق این گروه‌ها باکتری‌های دیگری نیز در گروه باکتری‌های حساس قرار می‌گیرند.

بر اساس نتایج ندلجکو (Nedeljko) و همکاران در سال ۲۰۱۲، باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره متانولی ساقه و برگ گیاه *Daphne cneorum* داشتند (۸). در بررسی جاویدنیا (Javidnia) و همکاران در سال ۲۰۰۳، بر روی عصاره اتانولی ساقه و برگ گیاه *Daphne mucronata* باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین حساسیت را در برابر عصاره داشتند (۱۵).

اختلاف مشاهده شده در ویژگی باکتریواستاتیک و باکتریوسایدی غلظت عصاره در این بررسی‌ها می‌تواند به دلیل نوع ترکیبات موجود در عصاره بافت‌ها، نحوه عصاره‌گیری و یا اختلاف در سویه باکتری مورد مطالعه باشد.

در پژوهش حاضر، میزان فنل در ساقه بیش از برگ محاسبه شد. اما دلنواز هاشملویان (Delnavaz Hashemloyan) و همکاران با استفاده از حلال کلروفرم میزان فنل کل در برگ سیاه‌گینه را بیش از ساقه اندازه‌گیری کردند. این اختلاف می‌تواند ناشی از نوع حلال استفاده شده، شرایط اقلیمی، ارتفاع جمع‌آوری شده و یا زمان برداشت باشد (۱۸). بررسی انجام گرفته بر روی سایر جنس‌های این خانواده میزان فنل کل متفاوتی با تحقیق حاضر نشان دادند. در تحقیق کامون واناسیت (Kamonwannasit) و همکاران در سال ۲۰۱۳، میزان فنل عصاره برگ *Aquilaria crassna* ($176/6 \pm 24/4$ میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) بیشتر (۱۹) و در بررسی ندلجکو (Nedeljko) و همکاران در سال ۲۰۱۲، میزان فنل کل عصاره متانولی

References

1. Rcid KA, Jager AK, light ME, Mulholland DA, Vastaden J. Phytochemical and pliarmacological screening of *Sterculiaceae* species and isolation of antibacterial compounds. J Ethnopharmacol. 2005; 97: 285-291.

2. Avijgan M, Saadat M, Nilforoosh-Zadeh MA, Hafizi M. Anti-fungal effect of *Echinophora platyloba* extract on some common dermatophytes. J Med Plants . 2006; 5(18): 10-16.
3. Gülçin İ, Oktay M, Kireçer E, Küfrevioğlu İÖ. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L) seed extracts. Food Chem. 2003; 83: 371-382.
4. Rechinger, kh. Flor iranica. 1972; 95: 1-12.
5. Moosavi MA, Yazdanparast R, Sanati MH. The cytotoxic and anti-proliferative effects of 3-hydrogenkwadaphnin in K562 and jurkat cells is reduced by guanosine. J Biochem Mol Biol. 2005; 38(4): 391-398.
6. Yazanparast R, MeshkiniA. 3-hydrogenkwadaphnine, a novel diterpene ester from *Dendrostellera lessertii*, its role in differentiation and apoptosis of KG1 cells. Phytomedicine. 2009; 16: 206-214.
7. He WD, Cik M, Appendino G, Van Puyvelde L, Leysen JE, De Kimpe N. *Daphnane*-type diterpene orthoesters and their biological activities. Mini Rev Med Chem. 2002; 2: 185-200.
8. Nedeljko T, Pavle Z, Perica J, Ratomir M, Marina Ž. HPLC analysis, antimicrobial and antioxidant activities of *Daphne cneorum* L. Hem Ind. 2012; 66 (5): 709-716.
9. Wikler MA, Low DE, Cockerill FR, Sheehan DJ, Craig WA, Tenover FC. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard-ninth edition, in approved standard. CLSI. 2006; 26(1).
10. Hendra R, Ahmad S, Sukari A, Yunus Shukor M, Oskoueian E. Flavonoid analyses and antimicrobial activity of various parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff) boerl fruit. Int J Mol Sci. 2011; 12: 3422-3431.
11. Tajik H, Jalali FSH. Comparative evaluation of the antibacterial effect of aqueous and alcoholic extracts of *Achillea millefolium* on pathogenic microorganisms. Urmia Med J. 2008; 19(4): 302-309. [In Persian]
12. Stojicevic SS, Stanisiavljevic IT, Velickovic DT, Veljkovic VB, Lazic ML. Comparative screening of the anti-oxidant and antimicrobial activities of *Sempervivum marmoreum* L. extracts obtained by various extraction techniques. J Serb Chem Soc. 2008; 73(6): 597-600.
13. Cshang WC, Sei CK, Soon SH, Bong KC, Hye JA, Min YL, Sang HP, Soo KK. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. Plant Sci. 2002; 163: 1161-1168.
14. Pourmorad F, Hosseinimehr S, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected iranian medicinal plants. Afr J Biotechnol. 2006; 5(11): 1142-1145.
15. Javidnia K, Miri R, Najafi RB, Jahromi NK. A preliminary study on the biological activity of *Daphne mucronata* royle. Daru J Pharmaceutic Sci. 2003; 11(1): 1-28 .
16. Tayoub G, Alnaser AA, Shamma M. Microbial inhibitor of the *Daphne oleifolia* lam ethanolic extract. IJMAP. 2012; 2(1): 161-166.
17. Yosie A, Effendy MAW, Sifzizul TMT, Habsah M. Antibacterial, radical-scavenging

activities and cytotoxicity properties of *Phaleria macrocarpa* (scheff) boerlleaves in cell lines. IJPSR. 2011; 2 (7): 1700-1706.

18. Delnavaz Hashemloyan B, mozhdehi M, Atai azimi O. 2012. Extraction and isolation of active ingredients (phenol and tannin) of *Dendrostellera lessertii*. Proceeding of the First National Conference of Biological Sciences. 29 Feb to 1 March, Falaverjan. Iran.
19. Kamonwannasit S, Nantapong N, Kumkrai P, Luecha P, Kupittayanant S, Hudapongse N. Antibacterial activity of *Aquilaria crassna* leaf extract against *Staphylococcus epidermidis* by disruption of cell wall. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2013; 12 (20): 1-7.



Assessment of the antioxidant and antibacterial effects of stem and leaf alcoholic extracts of *Dendrostellera lesserti*

Mustafa Alamhulu¹, Sonbol Nazeri²

¹MS.c., Department of Biotechnology, Agricultural Faculty, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

²Assistant Professor, Department of Biotechnology, Agricultural Faculty, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Abstract

Background & Objectives: The increases in the microbial antibiotic resistance and decreases in the sensitivity of bacteria to antimicrobial chemical compounds are some concerns of the researchers who look for herbal compounds as antimicrobial properties. The purpose of this study is to investigate the antibacterial and antioxidant properties of leaf and stem extracts of *Dendrostellera lesserti* against 10 human pathogenic bacteria.

Material & Methods: *Dendrostellera lesserti* was collected from the Alvand Mountain (1961 m height) located at Hamedan province. After identification, the extracts were prepared using maceration method. In this sectional study, antibacterial activity was determined by agar well diffusion method, MIC (serial dilution method) and MBC. The antioxidant properties of these extracts was determined by DPPH method. Also, the amounts of phenol and flavonoid was assayed by Folin-ciocalteu and Aluminum chloride methods, respectively.

Results: The largest growth inhibition zone with 27.3 ± 0.6 mm diameter was observed on *Micrococcus luteus* culture exposed to ethanolic extract of the stem. The MIC and MBC of the extracted obtained from stem were lower than the leaf extract. Methanolic extract of stem in concentration of 1 mg/ml had the highest scavenging percentage of free radical. The methanol extracts of stem and leaf achieved the highest amount of phenol and flavonoid, 79.4 ± 0.5 (mgGAE/g) and 2.1 ± 0.1 (mgQ/g), respectively.

Conclusion: The results of present study showed that alcoholic extract, especially methanol extract, of *Dendrostellera lesserti* showed antibacterial ability. Since the phenolic and flavonoids compounds have anti-bacterial and anti-oxidant properties, the property showed in this study can be because of the presence of these compounds in the tissues studied.

Keywords: *Dendrostellera lesserti*, Antibacterial, Antioxidant, Human pathogenic bacteria.

Correspondence to: Sonbol Nazeri

Tel: +989183191565

E-mail: snblnazeri@yahoo.com

Journal of Microbial World 2015, 7(4): 289-298.