مقاله پژوهشی

بررسی فعالیت‌های ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و تعیین محتوای فنلی و فلاونوئیدی کل عصاره‌های پنج گونه از تیره‌های مختلف گیاهان دارویی رشد یافته در استان سیستان و بلوچستان

امید عزیزیان شرمه[1*]، مژگان طاهری زاده[2]، محرم ولی زاده[3]، علی قاسمی[4]

۱- مرکز پژوهشی گیاهان دارویی و زینتی دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۲- شرکت آب و فاضلاب روستایی سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۳- گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۴- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۱/۰۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۴/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: از دیرباز استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها رایج بوده است. مطالعه حاضر به بررسی فعالیت‌های ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و اندازه‌گیری ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل سه عصاره‌ی متانولی، اتانولی و آبی پنج گونه مختلف گیاهان دارویی: *Withania somnifera* L. Dunal، *Salvia rhytidea* Bent، *Levisticum officinale* L.، *Seidlitzia rosmarinus* L. و *Achillea wilhelmsii* L. می‌پردازد.

مواد و روش‌ها: پس از تهیه عصاره‌ها به روش ماسراسیون، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی با دو روش DPPH و FRAP و ضدمیکروبی علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشرشیا کلی* و قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *کاندیدا آلبیکنس* به روش دیسک دیفیوژن و محتوای فنولی و فلاونوئیدی کل به ترتیب با روش‌های معرف فولین-سیوکالتیو و رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم، سنجیده شده است.

نتایج: نتایج نشان دادند عصاره متانولی گونه‌ی پنیرباد دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولی (۴۱/۴۵±۴/۶۴ mgGAE/gExtract) و فلاونوئیدی (۳۵/۲۱±۲/۵۴ mgQUE/gExtract) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (IC_{50}= ۸/۱۲±۱/۳۶ µg/ml و ۵۸/۱۹±۱/۶۸ $mMFe^{2+}$/mgExtract) و فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* با قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۲۹±۱/۰۶ و ۲۷±۱/۰۰ میلی‌متر بوده است. در مقابل عصاره‌ی آبی گونه‌ی *انجدان رومی* دارای کمترین میزان ترکیبات فنولی (۱۷/۱۲±۱/۹۳ mg GAE/gSample) و فلاونوئیدی (۱۲/۶۱±۲/۰۶ mg QUE/gExtract) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (IC_{50}= ۱۲۱/۴۳±۳/۳۶ µg/ml و ۱۳/۷۴±۲/۵۲ mM Fe^{2+}/mgExtract) و فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری *باسیلوس سرئوس* و قارچ *آسپرژیلوس نایجر* با قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۴±۰/۵۷ و ۵±۱/۰۰ میلی‌متر بوده است.

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، گیاهان مورد مطالعه می‌توانند کاندیدای خوبی جهت درمان بیماری‌های ناشی از استرس‌های اکسیداتیوی و بیماری‌های ناشی از میکروب‌های بیماری‌زا قرار گیرند.

کلمات کلیدی: فعالیت ضدمیکروبی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنولی، محتوای فلاونوئیدی، استان سیستان و بلوچستان

مقدمه

از دیرباز استفاده از گیاهان دارویی برای درمان انواع بیماری‌ها در نقاط مختلف رایج بوده است تااندازه‌ای که اساس طب سنتی را تشکیل می‌داده است. لیکن با توسعه‌ی سریع داروهای سنتزی در سال‌های اخیر، استفاده از گیاهان کم‌تر شده بود، ولی به دلیل ظهور عوارض جانبی نامطلوب ترکیبات سنتزی و نبود سازگاری آن‌ها با طبیعت، بار دیگر محققین به گیاهان و مواد مؤثره‌ی موجود در آن‌ها توجه کردند تا حدی که دانش شیمی گیاهی (فیتوشیمی) ایجاد شد (۱). طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی، بیش از ۸۰ درصد مردم جهان، برای درمان بیماری‌ها از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند (۲) و تقریباً یک‌چهارم داروهای تهیه‌شده‌ی دنیا دارای منشأ گیاهی هستند که یا مستقیماً از گیاهان استخراج شدند یا بر اساس ترکیب گیاهی، سنتز شدند

*نویسنده مسئول: **امید عزیزیان شرمه**، مرکز پژوهشی گیاهان دارویی و زینتی دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
Email: omid_aziziyan@yahoo.com

(۳).رادیکال‌های آزاد در طیف گسترده‌ای از سیستم‌های بیولوژیکی و شیمیایی در بدن انسان تولید می‌شوند که این رادیکال‌های آزاد برای سیستم بدن مضر می‌باشند. این رادیکال-های آزاد به‌وسیله مجموعه‌ای از سیستم‌های دفاعی کنترل می-شوند که آسیب‌های اکسیداتیو را به حداقل می‌رسانند (۴). واکنش‌های بیوشیمیایی متعددی در بدن، رادیکال‌های آزاد و فعال تولید نموده که توانایی تخریب بیومولکول‌ها و ماکرومولکول‌ها نظیر لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک را دارا می‌باشند (۵ و ۶). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که مانع فعالیت رادیکال‌های آزاد شده و یا سبب حذف آن‌ها می‌شوند و سلول‌های بدن را از اثرات مخرب این ترکیبات مصون نگاه می-دارند، ازاین‌رو با روند پیری زودرس و ابتلا به بیماری‌های مختلف نظیر بیماری‌های قلبی-عروقی، سرطان، آسیب‌های مغزی، دیابت و غیره مبارزه می‌کنند (۷ و ۸). این مواد می‌توانند از تشکیل رادیکال‌های آزاد در بدن طی مکانیسم‌هایی جلوگیری کنند و در صورت تشکیل، تأثیر آن‌ها را در بدن کاهش دهند. در حقیقت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی ترکیباتی هستند که برای پیشگیری و یا کند کردن آسیب‌های ناشی از واکنش‌های اکسیداسیون در بدن به کار می‌روند و به‌عنوان خنثی‌کننده رادیکال‌های آزاد عمل نموده و ازاین‌رو باعث پیش‌گیری از آسیب‌های ناشی از این رادیکال‌ها در بدن می‌شوند (۹). آنتی‌اکسیدان‌ها در صنعت نیز به‌عنوان نگه‌دارنده مواد غذایی در جلوگیری از فساد و تغییر رنگ غذاها به کار می‌روند، ازاین‌رو طول عمر مواد غذایی و مدت‌زمان نگه‌داری آن‌ها را افزایش می‌دهند (۱۰). آنتی-اکسیدان‌ها در بدن با دو سیستم دفاعی آنزیمی و دفاعی غیر آنزیمی به مقابله با رادیکال‌های آزاد می‌پردازند. در دفاع آنزیمی، آنزیم‌هایی از قبیل Se- گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و سوپر دیسموتاز قرار دارند که سوپراکسید، هیدروژن‌پراکسید و لیپید-پراکسید را متابولیز می‌کنند و از تولید رادیکال هیدروکسیل سمی جلوگیری می‌کنند. در دفاع غیر آنزیمی دودسته آنتی-اکسیدان محلول در چربی (مانند ویتامین E و کاروتینوئیدها) و محلول در آب (شامل ویتامین C و گلوتاتیون) قرار دارند که به دام اندازنده‌ی رادیکال‌های آزاد می‌باشند (۱۱). این دو سیستم با کمک یکدیگر اکسیدان‌ها را خنثی می‌کنند. بسیاری از این اکسیدان‌ها در بدن تولید می‌شوند. بااین‌همه، بازهم اکسیدان‌ها از دام آنتی‌اکسیدان‌های تولیدی در بدن می‌گریزند و به بافت بدن آسیب می‌رسانند. در این حالت سیستم آنتی‌اکسیدانی ترمیم کننده فعال شده که اساساً آنزیم‌های لیپاز، پروتئاز، ترانسفراز و ترمیم کننده DNA می‌باشند. بااین‌حال به دلیل نقض در تولید آنتی‌اکسیدان‌ها در بدن و یا به خاطر عوامل و موقعیت‌های فیزیوپاتولوژیکی (مانند استعمال دخانیات، آلودگی هوا، تابش اشعه ماوراءبنفش و غیره)، آنتی‌اکسیدان‌های خوراکی برای مقابله با اثرات تجمعی آسیب‌های اکسیداتیوی مورد نیاز هستند (۱۲). آنتی‌اکسیدان‌ها به دو صورت طبیعی و سنتزی وجود دارند. در سال‌های اخیر استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند BHT، TBHQ و BHA همانند سایر افزودنی‌های شیمیایی به دلیل محتمل بودن سمیت و سرطان‌زایی بودن آن‌ها کم شده است (۱۳ و ۱۴). امروزه بیشتر از منابع حیوانی، گیاهی و میکروبی جهت استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها به کار گرفته می‌شود (۱۵ و ۱۶). در بین منابع ذکر شده، گیاهان دارای منابع سرشار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی هستند که این ترکیبات در دسته آنتی‌اکسیدان‌ها دسته‌بندی می‌شوند. گیاهان دارای چندین هزار نوع ترکیبات فیتوشیمیایی با ساختارهای متنوع‌اند، که بخش بزرگی از آن‌ها پلی فنل‌ها هستند (۱۷). بیشتر اثرات حفاظتی پلی فنل‌ها و فلاونوئیدها در سیستم‌های بیولوژیکی به توانایی-های آنتی‌اکسیدانی آن‌ها، ظرفیت انتقال الکترون‌ها، کاهش پراکسیداسیون هیدروژن، فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کاهش رادیکال‌های آلفا-توکوفرول و جلوگیری از اکسیدازها نسبت داده می‌شوند (۱۸). علاوه بر این، ترکیبات مذکور دارای خصوصیات ضدجهش، ضدمیکروبی، ضدویروس و ضد سرطان هستند (۱۹). با توجه به استفاده‌ی بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش مقاومت در مقابل باکتری‌ها، یافتن جایگزین‌های مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها امری ضروری است. به همین دلیل مطالعات گسترده‌ای در مورد پتانسیل استفاده از ترکیبات ضد میکروبی موجود در گیاهان برای کنترل و درمان عوامل بیماری‌زا صورت گرفته است (۲۰). میکروب‌ها با ایجاد ژن مقاوم در برابر آنتی-بیوتیک‌ها، این مقاومت را از نسلی به نسل دیگر و حتی به‌صورت شایع از گونه میکروبی به گونه دیگر انتقال می‌دهند که حتی با تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها در دوزهای بالا نتیجه‌ای حاصل نمی‌شود و عفونت پایدار است. از طرف دیگر درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها همواره نگرانی عوارض جانبی دارو را به همراه دارد به‌طوری‌که گزارش‌هایی از ایجاد سمیت و تولید سرطان منتشر شده است (۲۱). ترکیبات ضدمیکروبی به‌دست‌آمده از گیاهان با مکانیسم-هایی متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتری‌ها را حذف می‌کنند که

این مسئله در درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم میکروبی ازنظر بالینی حائز اهمیت است (۲۲). گیاهان دارویی به دلیل مزیت‌های دارویی و طبیعی، برای درمان بیماری‌ها ازجمله عفونت‌ها موردتوجه قرار گرفته‌اند. به‌طور مثال به دلیل ساختار پیچیده ترکیبات دارویی گیاهی، مقاومت میکروبی به‌سختی در برابر آن‌ها مشاهده می‌شود (۲۳). با توجه به رویکرد جهانی به استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات طبیعی در صنایع دارویی و به دلیل سازگاری آن‌ها با بدن انسان، تحقیقات برای تولید مواد ضدمیکروبی، ضروری به نظر می‌رسد. گیاهان دارویی پنیر باد (*Withania somnifera* L. Dunal) از خانواده *Solanaceae*، مریم‌گلی تفتانی (*Salvia rhytidea* Bent) از خانواده *Lamiaceae*، انجدان رومی (*Levisticum officinale* L.) از خانواده *Apiaceae*، اشنان (*Seidlitzia rosmarinus* L.) از خانواده *Chenopodiaceae* و بومادران گل زرد (*Achillea wilhelmsii* L.) از خانواده *Asteraceae* ازجمله گیاهان دارویی بومی استان سیستان و بلوچستان می‌باشند. به دلیل پراکنش قابل‌توجه این گیاهان که به‌عنوان پوشش غالب در منطقه می‌باشند و در طب سنتی و بومی مردمان استان سیستان و بلوچستان مورد استفاده قرار می‌گیرند و همچنین کم بودن تحقیقات بر روی آن‌ها، مطالعه حاضر به بررسی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و محتوای فنولی و فلاونوئیدی سه عصاره مختلف متانولی، اتانولی و آبی این گیاهان می‌پردازد.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی و میکروارگانیسم‌های مورد استفاده

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه، با خلوص بالا تهیه شدند. معرف فولین، گالیک اسید، سدیم کربنات، سولفات آهن، استات سدیم، سدیم سولفات، 2,4,6- (TPTZ) tripyridyl-s-triazine، اتانول، متانول و دی متیل سولفوکساید، از شرکت مرک و ۲،۲- دی فنیل - ۲- پیکریل- هیدرازیل (DPPH) و بوتیلات هیدروکسی تولوئن (BHT) و کوئرستین از شرکت سیگما-آلدریچ و میکروارگانیسم‌های استفاده شده شامل باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTTC 1112)، *باسیلوس سرئوس* (PTTC 1154)، *اشرشیا کلی* (PTTC 1399) و قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* (PTTC 5012) و *کاندیدا آلبیکنس* (PTTC 5027) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST) تهیه شدند. برای محلول‌سازی و شستشو از آب دوبارتقطیر استفاده شد.

تهیه عصاره‌های گیاهی

نمونه‌های تاره گیاهی شامل برگ‌های گیاه پنیرباد در مرحله شروع گلدهی، ریشه‌ی گیاه مریم‌گلی تفتانی در مرحله گلدهی، اندام هوایی و گل‌های گیاه انجدان رومی در دوره گلدهی، برگ‌های گیاه اشنان در مرحله شروع گلدهی و سرشاخه‌های گل‌دار گیاه بومادران گل زرد در دوره‌ی گلدهی در خردادماه سال ۱۳۹۴ از ارتفاعات کوه تفتان از توابع شهرستان خاش در استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری شدند. جهت تهیه عصاره، نمونه‌های گیاهی موردنظر پس از جمع‌آوری، به مرکز پژوهشی گیاهان دارویی و زینتی دانشگاه سیستان و بلوچستان منتقل شدند. در آنجا در مکانی به‌دوراز نور مستقیم خورشید و به مدت ۱۰ روز خشک شدند. عصاره‌گیری به روش ماسراسیون (خیساندن) انجام شد (۲۴). بدین منظور مقدار ۱۰ گرم از پودر خشک هر یک از گیاهان دارویی مورد آزمایش را به ۱۰۰ میلی‌لیتر از حلال‌های مختلف (متانول، اتانول و آب دوبارتقطیر) افزوده و به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر به‌هم زده شدند. نمونه‌های به‌دست‌آمده توسط کاغذ صافی واتمن ۴۲، صاف و به‌منظور حذف کامل ذرات معلق، هرکدام از عصاره‌ها به‌وسیله دستگاه سانترفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانترفیوژ شدند. پس از حذف حلال، به دلیل حساسیت بالای عصاره‌های به‌دست‌آمده به نور، حرارت و اکسیژن، درب آن‌ها بسته و تا زمان آنالیز در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های به‌دست‌آمده ابتدا با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی به کمک رادیکال پایدار ۲-۲ دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)، مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۷). ابتدا غلظت ۱۰۰۰ µg/ml از تمامی عصاره‌ها ساخته شد و به ۱ میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار اضافه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه قراردادن در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\%IP = (A_{control} - A_{sample} / A_{control}) \times 100$$

%IP: درصد مهار رادیکال‌های آزاد (درصد بازداری آنتی‌اکسیدان در برابر رادیکال‌های آزاد)

$A_{control}$: جذب شاهد (که حاوی ۱ میلی‌لیتر از متانول در ۱ میلی‌لیتر از محلول DPPH است)

A_{Sample}: جذب نمونه (که حاوی حجم‌های مختلفی از عصاره گیاهی (آنتی‌اکسیدان)، متانول و محلول DPPH است)

در این تست از بوتیلات هیدروکسی تولوئن و آسکوربیک اسید به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی به روش احیاء یون آهن (III)، FRAP

برای اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی احیاء یون آهن (III)، روش بنزی و استرین با کمی تغییرات مورد استفاده قرار گرفت (۲۵). در لوله آزمایش به ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ها، مقدار ۱/۸ میلی‌لیتر از محلول تازه فرپ افزوده شد. (محلول تازه فرپ با افزودن نسبت‌های ۱۰:۱:۱۰ میلی‌لیتر از بافر استات، محلول TPTZ و محلول $FeCl_3.6H_2O$ قبل از انجام آزمایش تهیه شد). مخلوط فوق ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده، سپس جذب محلول‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش-مرئی در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. فعالیت احیاکنندگی عصاره‌ها با استفاده از منحنی استاندارد برحسب میلی‌مول یون آهن (II) بر میلی‌گرم وزن خشک نمونه محاسبه شد. در این آزمایش از بوتیلات هیدروکسی تولوئن و آسکوربیک اسید به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

اندازه‌گیری مقدار فنول کل

محتوای فنول کل با استفاده از معرف فولین-سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره‌ها، ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر فولین سیوکالتیو ۱۰٪ و پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر از محلول ۵٪ سدیم‌کربنات به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در یک مکان تاریک و در دمای اتاق قرار داده شد. پس‌ازآن جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر فرابنفش-مرئی در مقابل بلانک قرائت شد (۲۶). گالیک اسید به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار رفت و میزان فنول کل بر اساس میزان معادل میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره گزارش گردید.

تعیین مقدار فلاونوئیدهای کل

جهت سنجش میزان فلاونوئید کل از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد (۲۷). ۵۰۰ میکرولیتر از هرکدام از عصاره‌های موجود به‌صورت جداگانه با ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول، ۰/۱میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم (۱۰٪ اتانولی)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات‌پتاسیم (۱ مولار) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شدند. سپس محلول‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. جذب محلول‌ها در طول‌موج ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش-مرئی قرائت شد. از کوئرستین جهت رسم منحنی استاندارد استفاده و در انتها میزان فلاونوئید کل بر اساس میزان معادل میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره‌ها گزارش شد.

بررسی فعالیت ضدمیکروبی

نمونه‌های میکروبی با استفاده از محیط کشت لوریا برتانی و سابورد دکستروز و بر اساس روش‌های استاندارد احیاء گردیدند و به‌منظور سوسپانسیون میکروبی از کشت ۲۴ ساعته هر میکروارگانیسم به‌صورت مجزا به لوله‌های آزمایش حاوی ۳ میلی‌لیتر مولر هینتون براث تلقیح شد و سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم مک‌فارلند آماده گردید.

بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره‌های گیاهان موردنظر ابتدا با روش انتشار از چاهک در آگار (۲۸) انجام شد. بدین منظور از سوسپانسیون هر میکروب به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بر روی پلیت حاوی مولر هینتون آگار برای باکتری‌ها و سابورد دکستروز آگار برای قارچ‌ها ریخته و با سواپ استریل در سه جهت به‌صورت انبوه کشت داده شد. سپس در سطح هر یک از پلیت‌های کشت داده شده چاهک‌هایی به قطر تقریباً ۶ میلی-متر و به فاصله ۲ سانتی‌متری از هم ایجاد گردید و درون هر چاهک مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر یک از رقت‌های آماده‌شده نمونه‌ها با سمپلر ریخته شد. از آنتی‌بیوتیک‌های ضد باکتریایی سیپروفلوکسازین و ضد قارچی کلوتریمازول به‌عنوان شاهد مثبت و از محلول DMSO به‌عنوان شاهد منفی استفاده گردید. پس از اتمام کار محیط‌های کشت باکتریایی در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت و کشت‌های قارچی در انکوباتور ۲۸ درجه به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گشت و درنهایت پس از گذشت ۴۸-۲۴ ساعت، کشت‌های میکروبی ازنظر تشکیل یا عدم تشکیل هاله عدم رشد موردبررسی قرار گرفته و قطر هاله‌های تشکیل‌شده برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری و گزارش شد.

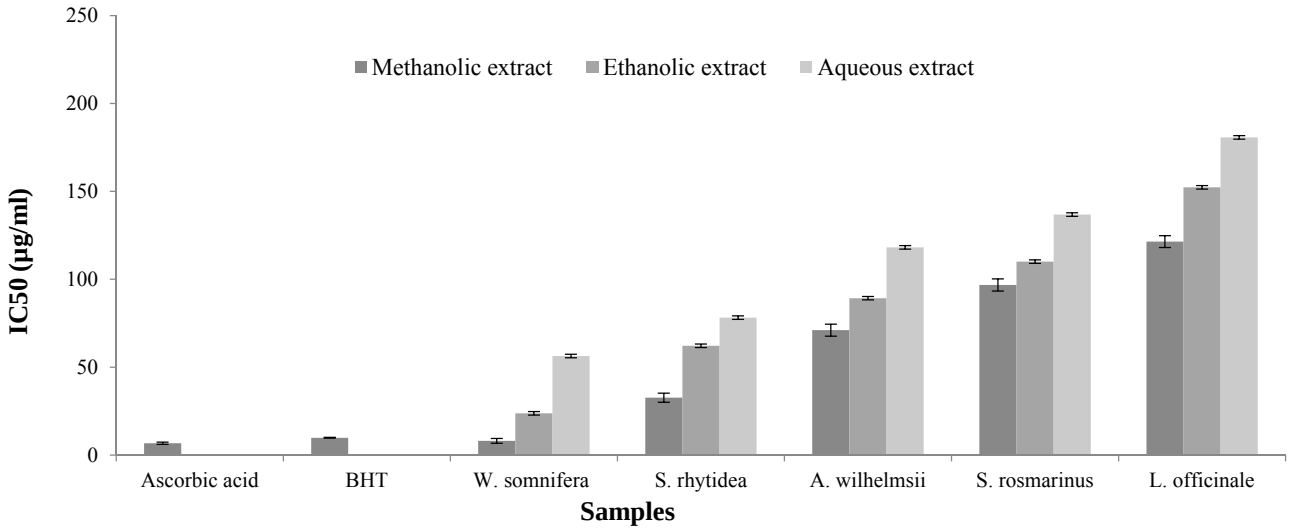
تجزیه‌وتحلیل آماری

تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی انجام گرفت و نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS.16، مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. مقایسه معنی‌داری میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دانه دانکن در سطح احتمال

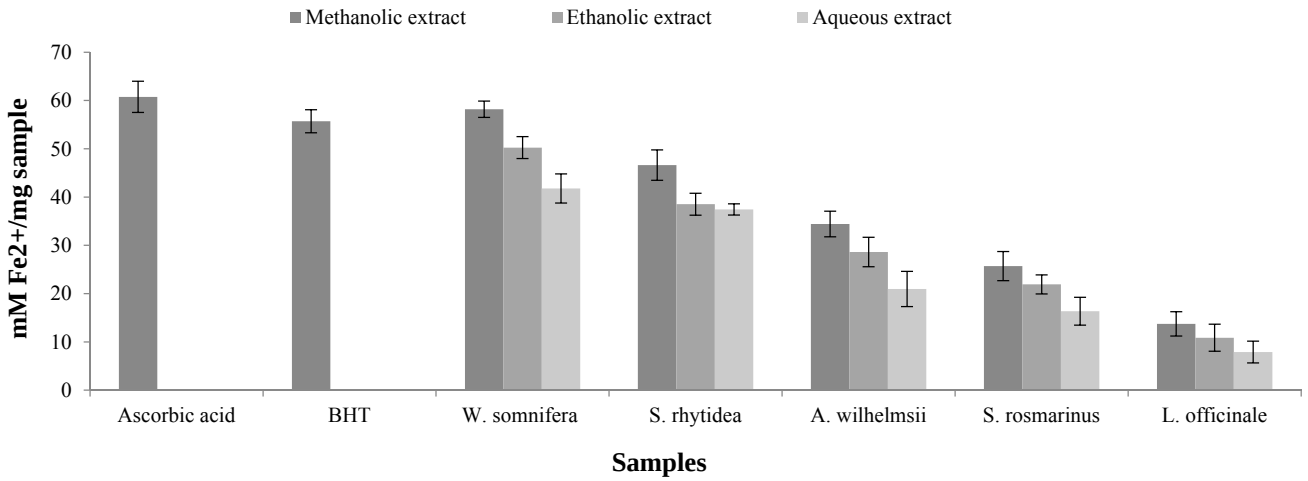
۵ درصد موردبررسی قرار گرفت. همچنین جهت رسم شکل‌ها و نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 استفاده گردید.

نتایج

در مطالعه حاضر فعالیت‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنولی و فلاونوئیدی کل عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی پنج گونه از تیره‌های مختلف گیاهان دارویی رشد یافته در ارتفاعات کوه تفتان از توابع شهرستان خاش در استان سیستان و بلوچستان موردسنجش و ارزیابی قرار گرفته است. برای تمامی عصاره‌ها غلظت، ۱۰۰۰µg/ml انتخاب شده است تا مقایسه‌ای برابر و هم‌تراز ایجاد گردد. نتایج حاصل از توان آنتی‌اکسیدانی رادیکال‌های پایدار DPPH و یون‌های آهن (III) نشان دادند که در هر دو روش DPPH و FRAP، عصاره‌ی متانولی همه‌ی پنج گونه گیاه دارویی مورد استفاده نسبت به سایر عصاره‌ها دارای بیشترین و عصاره آبی دارای کمترین قدرت آنتی‌اکسیدانی بودند. این مقدار برای عصاره‌ی متانولی گونه پنیر باد (*W. somnifera*) بیشترین مقدار بوده است به‌طوری‌که می‌توان گفت عصاره‌ی

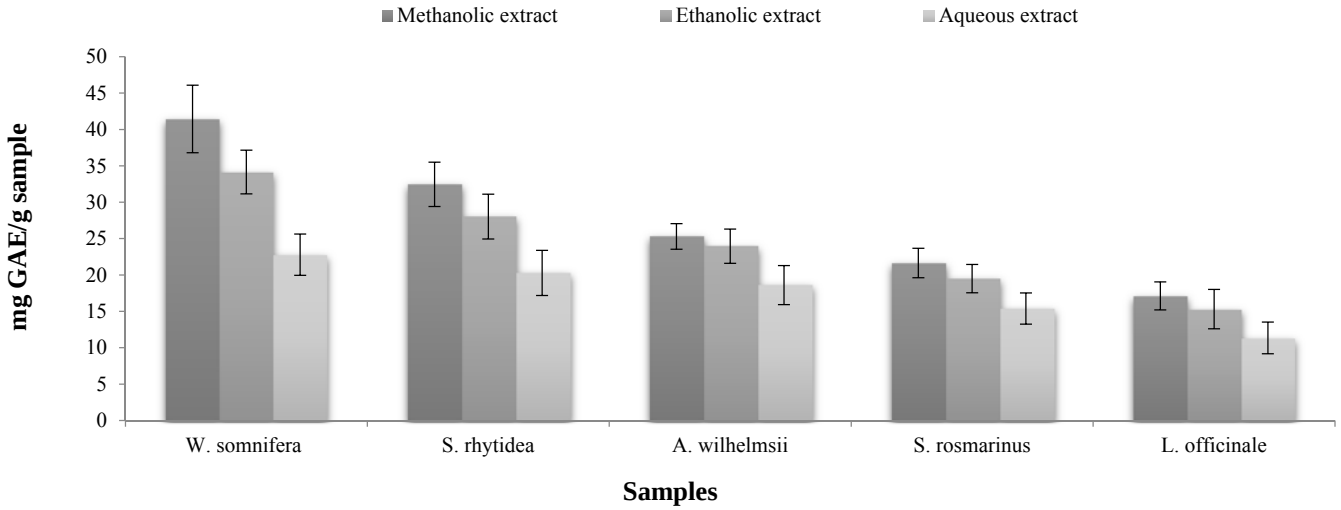


نمودار۱- مقایسه قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف پنج گونه گیاه دارویی در مقابل BHT و آسکوربیک اسید به روش DPPH

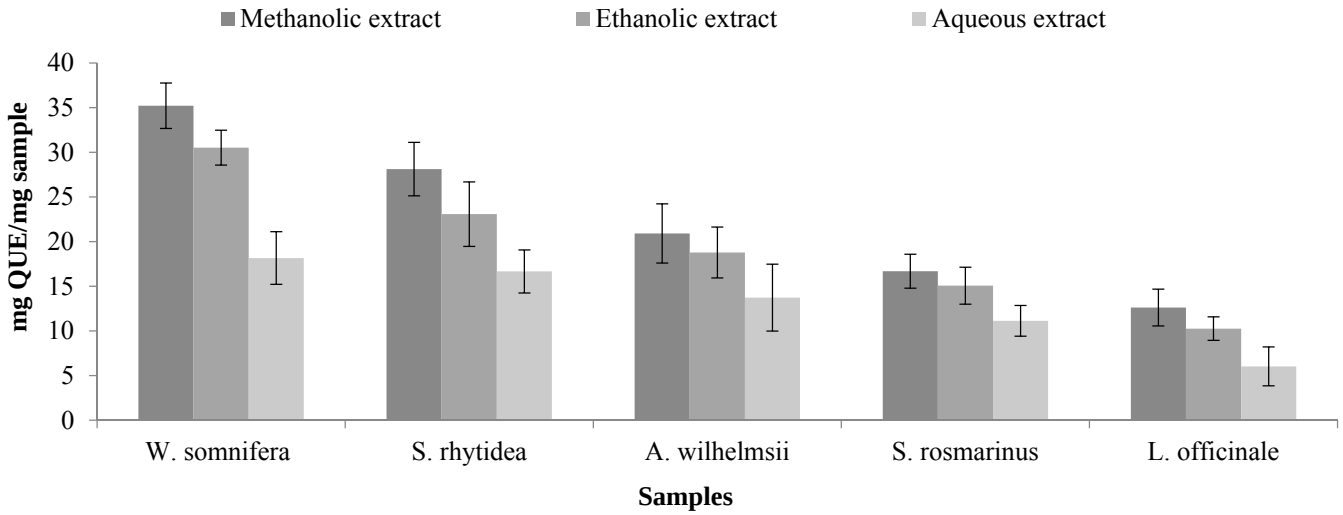


نمودار۲- مقایسه قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف پنج گونه گیاه دارویی در مقابل BHT و آسکوربیک اسید به روش FRAP

متانولی این‌گونه دارای بیشترین میزان آنتی‌اکسیدانی بوده است (IC_{50}= ۸/۱۲±۱/۳۶ µg/ml) و mM Fe^{2+}/mg sample (۵۸/۱۹±۱/۶۸). در بین گونه‌های مورد آزمایش، گونه‌ی *L. officinale* کمتری قدرت آنتی‌اکسیدانی در تمام عصاره‌ها را از خود نشان داده است. به‌طورکلی ترتیب قدرت آنتی‌اکسیدانی گونه‌های موردنظر از بیشترین به کمترین به‌صورت الگوی: *W. somnifera* ‹ *S. rhyeidea* ‹ *A. wilhelmsii* ‹ *S. rosmarinus* ‹ *L. officinale* بوده است. جهت محاسبه مقدار IC_{50}، ابتدا منحنی کالیبراسیونی درصد بازداری (IP%) بر غلظت (µg/ml) رسم شد و پس از به دست آمدن معادله‌ی خط و جایگزین کردن عدد ۵۰ در محور افقی، مقدار IC_{50} از محور عمودی محاسبه گردید.



نمودار۳- مقایسه مقادیر فنول کل عصاره‌های مختلف پنج گونه گیاه دارویی موردمطالعه



نمودار۴- مقایسه مقادیر فلاونوئید کل عصاره‌های مختلف پنج گونه گیاه دارویی موردمطالعه

نمودار۱، مقایسه مقادیر غلظتی از عصاره‌ها که ۵۰٪ مهار رادیکال‌ها را منجر می‌شوند (IC_{50}) را در مقایسه قدرت احیاکنندگی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی آسکوربیک اسید و BHT را نشان می‌دهد. درروش FRAP، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس توانایی احیای یون آهن (III) و تبدیل آن به یون آهن (II)

سنجیده می‌شود که نتایج برحسب میلی‌متر یون آهن (II) به میلی‌گرم عصاره‌ها گزارش می‌شود. نمودار۲، مقایسه نتایج حاصل از قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در مقابل آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی را نشان می‌دهد.

مقادیر فنول و فلاونوئید کل عصاره‌های مختلف گونه‌های موردبررسی به ترتیب با استفاده از روش‌های معرف فولین – سیوکالتیو و رنگ سنجی کلرید آلومینیوم موردسنجش و ارزیابی قرار گرفت. نمودارهای ۳ و ۴، به ترتیب مقایسه مقادیر فنول کل و فلاونوئید کل عصاره‌های مختلف ۵ گونه گیاه دارویی مورد آزمایش را برحسب mg GAE/g sample و mgQUE/g sample نشان می‌دهد. یافته‌ها بیانگر آن است که همانند نتایج حاصل از اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی، عصاره‌های متانولی در تمام گونه‌ها دارای بیشترین مقادیر فنول و فلاونوئید کل بوده و همچنان ترتیب میزان فنول و فلاونوئید برای پنج گونه‌ی مورد آزمایش، مشابه ترتیب حاصل از ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی به دو روش DPPH و FRAP است.

برای بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها از روش دیسک دیفیوژن (انتشار دیسک) استفاده شده است و این اثر بر روی سه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشرشیا کلی* و دو قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و *کاندیدا آلبیکنس* در مقابل آنتی‌بیوتیک ضد باکتری سیپروفلوکسازین و ضد قارچ کلروتریمازول مورد مطالعه قرار گرفته‌است. نتایج نشان دادند که همچنان، در بین عصاره‌ها، عصاره متانولی دارای بیشترین اثر مهارکنندگی بوده است و عصاره‌های اتانولی و آبی به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. مشابه آزمایش‌های پیشین، اثر مهارکنندگی توسط گونه *W. somnifera*، بیشتر از سایر گونه‌ها بوده است. عصاره متانولی *W. samnifera*، بیشترین اثر مهارکنندگی و کشندگی را در مقابل باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله عدم رشد ۲۹±۱/۰۶ میلی‌متر داشته است به‌گونه‌ای که این اثر تقریباً مشابه آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده بوده است. در مقابل، باکتری *باسیلوس سرئوس* بیشترین مقاومت را در مقابل عصاره‌ها داشته است. همچنین، کمترین اثر ضدمیکروبی مربوط به گونه *L. officinale* بوده است به‌گونه‌ای که عصاره متانولی آن توانسته است باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را با قطر هاله عدم رشد ۱۲±۲/۵۰ میلی‌متر مهار کند. عصاره آبی گونه‌ی *L. officinale* نتوانسته است مشابه سایر

جدول ۱– نتایج بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف پنج گونه گیاه دارویی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های منتخب

میکروارگانیسم‌ها (باکتری‌ها)	قطر هاله عدم رشد باکتری برحسب میلی‌متر																		آنتی‌بیوتیک‌ها	
	W. soferamni			*S. rhytidea*			*A. wilhelmsii*		*S. rosmarinus*			*L. officinale*			سیپروفلوکسازین	کلروتریمازول
	متانولی	اتانولی	آبی	متانولی	اتانولی	آبی	متانولی	اتانولی	آبی	متانولی	اتانولی	آبی	متانولی	اتانولی	آبی		
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۹±۱/۰۶	۲۴±۲/۵۴	۱۹±۱/۰۰	۲۲±۱/۱۲	۱۸±۱/۵۴	۱۵±۱/۰۰	۱۹±۲/۶۴	۱۴±۱/۰۰	۱۲±۱/۸۴	۱۵±۱/۰۰	۱۳±۱/۰۰	۱۳±۱/۰۰	۱۲±۲/۵۰	۱۱±۱/۶۶	۱۰±۱/۱۲	۳۳±۲/۶۴	---
اشرشیاکلی	۲۳±۱/۲۴	۲۰±۱/۰۰	۱۷±۱/۹۱	۲۰±۲/۴۵	۱۷±۱/۲۳	۱۴±۱/۵۷	۱۸±۱/۰۰	۱۵±۲/۰۰	۱۲±۱/۰۰	۱۴±۱/۰۰	۱۲±۱/۰۰	۱۰±۱/۰۰	۱۰±۱/۷۳	۹±۱/۵۰	۹±۱/۵۰	۳۱±۱/۰۰	---
باسیلوس سرئوس	۲۲±۱/۰۰	۱۵±۱/۰۰	۱۳±۲/۶۴	۱۵±۱/۰۰	۱۲±۱/۵۰	۱۰±۱/۰۰	۱۵±۱/۰۰	۱۲±۲/۶۴	۱۰±۱/۰۰	۱۱±۱/۵۰	۷±۱/۵۰	۵±۲/۵۰	۹±۱/۵۰	۶±۱/۷۳	۴±۰/۵۷	۲۹±۳/۰۰	---
آسپرژیلوس نایجر	۱۹±۱/۰۰	۱۵±۱/۰۰	۱۲±۲/۶۴	۱۶±۱/۵۰	۱۳±۱/۰۰	۱۰±۱/۱۵	۱۱±۱/۰۰	۹±۱/۰۰	۹±۱/۲۱	۱۱±۱/۰۰	۹±۱/۰۰	۵±۱/۵۰	۹±۲/۰۰	۶±۱/۰۰	۵±۱/۰۰	---	۲۸±۱/۱۲
کاندیدا آلبیکنس	۲۷±۱/۰۰	۲۴±۱/۱۲	۲۱±۱/۰۰	۲۲±۱/۱۵	۱۹±۱/۰۰	۱۷±۱/۱۱	۱۸±۱/۰۰	۱۵±۱/۶۴	۱۴±۱/۵۰	۱۵±۱/۱۲	۱۲±۱/۰۰	۱۰±۱/۳۴	۱۲±۱/۰۰	۸±۱/۲۱	۷±۱/۰۰	---	۳۰±۱/۵۰

عصاره‌های گونه‌های مورد آزمایش، اثر مطلوبی داشته باشد به‌گونه‌ای که بیشترین اثر مهارکنندگی را در مقابل باکتری *استافیلوکوکوس فکالیس* و با قطر هاله عدم رشد ۱۰±۱/۲ میلی‌متر و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* با قطر هاله عدم رشد ۷±۱/۰۰ میلی‌متر داشته است. نتایج حاصل از بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف پنج گونه گیاه دارویی در مقایسه به آنتی‌بیوتیک‌های منتخب در جدول ۱ آورده شده است.

بحث و نتیجه گیری

شواهد بیوشیمیایی، زیستی و بالینی فراوانی وجود دارد که نشان می‌دهد واکنش اکسایشی ناشی از رادیکال‌های آزاد در ایجاد بیماری‌های مختلف، تسریع پیری و فساد مواد غذایی دخالت دارد (۲۹). به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدان‌ها در ممانعت از اثرات رادیکال‌ها در ایجاد بیماری‌ها و فساد مواد غذایی، نقش و اثر آنتی‌اکسیدان‌ها موردتوجه محققین و پزشکان قرار گرفته است و مطالعات ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها یکی از متداول-ترین موضوعات موردبررسی در سال‌های اخیر بوده است (۳۰). پیچیدگی آزمون‌ها و محدودیت‌های بررسی مستقیم سینتیک واکنش ممانعت‌کنندگی آنتی‌اکسیدان‌ها از اکسیداسیون چربی‌ها که اغلب روش‌های دقیق‌تر و مطمئن‌تری می‌باشند موجب شده است تا روش‌های ساده‌تر و آسان‌تر سنجش ظرفیت آنتی-اکسیدانی ابداع گردد (۳۱). اغلب به‌منظور اعتباربخشی به نتایج یک مطالعه از دو یا چندین روش برای تعیین فعالیت آنتی-اکسیدانی نمونه‌ها استفاده می‌شود و ایجاد همبستگی قوی بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شده بر روی مواد یکسان به‌وسیله روش‌های متفاوت می‌تواند صحت انجام آزمایش را نشان دهد (۳۲). تحقیقات نشان می‌دهد که روش DPPH یکی از روش‌های ساده، مقرون‌به‌صرفه و دقیقی برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان و یا عصاره‌های استخراجی از آن‌هاست (۳۳). اساس این روش بر مبنای احیای رادیکال آزاد DPPH به‌وسیله آنتی‌اکسیدان‌ها در غیاب سایر رادیکال‌های آزاد در محیط است که نتیجه این عمل باعث ایجاد رنگی در محیط می-شود که شدت آن با دستگاه طیف‌سنجی قابل‌اندازه‌گیری است (۳۴). مولکول DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است مهار این رادیکال، پایه و اساس ظرفیت آنتی‌اکسیدانی است. مطالعات گسترده‌ای استفاده از این روش را برای ارزیابی ظرفت آنتی-اکسیدانی به‌کاربرده‌اند (۳۵). محلول متانولی این رادیکال دارای رنگ بنفش است که بیشترین جذب نوری را در طول‌موج ۵۲۰-۵۱۵ نانومتر دارد. رادیکال DPPH به‌عنوان پذیرنده الکترون یا یون هیدرید از آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند و به مولکول $DPPH_2$ تبدیل می‌شود و رنگ آن به بی‌رنگی یا زردرنگ متمایل می‌گردد و شدت جذب آن کاهش می‌یابد. از روی اندازه‌گیری کاهش شدت جذب به‌وسیله طیف‌سنجی نوری می‌توان به قدرت آنتی-اکسیدانی آن پی برد (۳۶). در مقابل، یکی از روش‌های مکمل در اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، روش FRAP است. اساس این روش برمبنای احیای یون آهن (III) به یون آهن (II) در حضور آنتی‌اکسیدان‌هاست و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به توانایی احیاکنندگی آنتی‌اکسیدان‌ها بستگی دارد. زمانی که احیاکننده واکنش، الکترون خود را اهدا می‌کند ماده‌ای تولید می‌شود که رنگی بوده و به‌راحتی می‌توان شدت رنگ تولیدشده که نشان‌دهنده پیشرفت واکنش و قدرت آنتی‌اکسیدانی است را اندازه گرفت (۳۷). جهت انجام این واکنش از یک کمپلکس بنام TPTZ استفاده می‌شود که پس از احیای آهن (III) به آهن (III)، به آن متصل شده و محلول آبی‌رنگ به وجود می‌آورد که در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر ماکزیمم جذب را دارد. هرچه قدرت احیاکنندگی آنتی‌اکسیدان بیشتر باشد، آهن (II) بیشتری در محیط ایجادشده که با TPTZ واکنش داده و شدت رنگ و متقابلاً شدت جذب نیز افزایش می‌یابد. ازآنجاکه متابولیت‌های ثانویه مشتق از گیاهان مانند فنل‌ها و فلاونوئیدها، رابطه مستقیمی با پتانسیل لازم جهت پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد و یا به عبارتی قدرت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها دارند (۴۰-۳۸)، در این مطالعه، مقادیر فنول و فلاونوئید کل گیاهان مورد آزمایش نیز به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. همچنین روش استخراج ترکیبات ثانویه گیاهی و حلال مناسب جهت استخراج آن‌ها نقش بسزایی در ویژگی‌های دارویی آن‌ها دارند (۴۱). مطالعات نشان می‌دهد که حلال‌های متانول و اتانول بانفوذ بر داخل سلول‌های گیاهان، ترکیبات طبیعی ثانویه شامل فنول‌ها و فلاونوئیدهای بیشتری را استخراج می‌کند و این میزان برای حلال‌هایی نظیر آب، اتیل استات و کلروفرم کمتر است (۴۲). نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که حلال متانول، نقش مهمی در استخراج ترکیبات ثانویه فنولی و فلاونوئیدی داشته است و این ترکیبات منجر به بروز خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی شده است به‌گونه‌ای که عصاره‌های متانولی در تمام پنج گونه‌ی موردمطالعه، نسبت به سایر عصاره‌ها، دارای حداکثر میزان فنول و فلاونوئید کل و بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی بوده است. از

بین پنج گونه موردمطالعه، گیاه *W. somnifera* در تمامی پارامترهای اندازه‌گیری شده دارای رتبه‌ی اول بوده است. به‌گونه‌ای که در تمام عصاره‌های آن (متانولی، اتانولی و آبی) مقادیر فنول، فلاونوئید آن بیشتر از سایر موارد بوده است و بیشتر توانسته است رادیکال‌های آزاد و باکتری و قارچ‌های بیماری‌زا را مهار کند و یون آهن (III) را احیا کند. مقدار فنول کل در گیاه *W. somnifera* به‌صورت: عصاره متانولی: mgGAE/g sample ۳۲/۵۴±۶/۴۴، عصاره اتانولی: mgGAE/g sample ۲۷/۵۱±۴/۰۱، عصاره آبی: mgGAE/g sample ۱۳/۷۶±۳/۸۴) و میزان فلاونوئید کل در آن به‌صورت: عصاره متانولی: mgGAE/g sample ۲۷/۱۱±۱/۰۰، عصاره اتانولی: mgGAE/g sample ۲۲/۱۵±۰/۹۵، عصاره آبی: mgGAE/g sample ۹/۶۱±۰/۹۵) و اثرات آنتی‌اکسیدانی در آن به‌صورت: عصاره متانولی: IC_{50}= ۱۷/۳۴±۱/۲۱ µg/ml و mM Fe^{2+}/mg sample ۵۵/۱۹±۲/۲۷، عصاره اتانولی: IC_{50}= ۲۸/۷۳±۲/۳۵ µg/ml و mM Fe^{2+}/mg sample ۴۹/۴۴±۳/۷۹، عصاره آبی: IC_{50}= ۸۹/۶۱±۳/۹۰ µg/ml و mM Fe^{2+}/mg sample ۳۰/۱۲±۲/۴۸ بوده که این مقادیر بیشتر از سایر گونه‌ها بوده است. همچنین قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی متانولی این گیاه به‌قدری بالا بوده است که تقریباً با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی آسکوربیک اسید (IC_{50}= ۶/۷۴±۰/۶۳ µg/ml) و mM Fe^{2+}/mg sample ۶۰/۷۵±۳/۲۳) و BHT (IC_{50}= ۹/۸۵±۰/۲۵ µg/ml) و mM Fe^{2+}/mg sample ۵۵/۶۹±۰/۳۸) در هر دو روش برابری می‌کند؛ اما در مقابل، گونه‌ی *L. officinale*، باآنکه عصاره‌ی متانولی آن دارای بیشترین میزان ترکیبات ثانویه (mgGAE/g sample ۱۷/۱۲±۱/۹۳ و mgGAE/g sample ۱۲/۶۱±۲/۰۶) و اثرات آنتی‌اکسیدانی (IC_{50}= ۱۲۱/۴۳±۳/۳۶ µg/ml) و mM Fe^{2+}/mg sample ۱۳/۷۴±۲/۵۲) نسبت به سایر عصاره‌های خود بوده است، لیکن در بین گونه‌های دیگر دارای کمترین میزان ترکیبات ثانویه و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در هر سه عصاره خود بوده است. نتایج حاصل از سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی به هر دو روش DPPH و FRAP کاملاً یکدیگر را تأیید می‌کنند و مکمل یکدیگر هستند. مطالعات متعددی بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و محتوای فنولی و فلاونوئیدی گونه‌های موردمطالعه در این پژوهش صورت گرفته است. گزارش‌ها حکایت از آن دارد که گیاه *W. somnifera* دارای مقادیر بالای فنل و فلاونوئید کل هست و این ترکیبات منجر به بروز خاصیت بالای آنتی‌اکسیدانی آن شده است. (۴۳). در گزارشی دیگر، مقادیر فنول کل و فلاونوئید کل این گیاه به ترتیب (mg GAE/g ۱۱۸/۹۱ و mg QUE/g ۳۲/۶۸) به‌دست‌آمده است که منجر به بروز قدرت بالای آنتی‌اکسیدانی آن با مقدار (µg/ml ۸۱/۰۱) شده است. مطالعات نشان می‌دهد که در بین سه عصاره متانولی، آبی و کلروفرمی، عصاره متانولی این گیاه با مقادیر mgGAE/g sample ۱۷/۱۲±۱/۹۳ فنل کل و IC_{50}= ۲۸/۷۳±۲/۳۵ µg/ml دارای قدرت مهارکنندگی خوبی علیه رادیکال‌های آزاد DPPH است (۴۴). جنس *Withania* دارای ۲۳ گونه گیاهی است که دو گونه‌ی *W. somnifera* و *W. coagulans* ازنظر دارویی و اقتصادی دارای اهمیت زیادی است و تحقیقات گسترده‌ای بر روی آن انجام گرفته است (۴۵). تحقیقات نشان دادند که جنس *Salvia* دارای قدرت بالای آنتی‌اکسیدانی و مقادیر بالای ترکیبات ثانویه گیاهی است (۴۶). همچنین ریشه این گیاه دارای مقادیر زیاد ترکیبات بیولوژیکی است که منجر به بروز خاصیت‌های دارویی آن می‌شود (۴۷). مطالعات گسترده‌ای بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مقادیر ترکیبات طبیعی موجود در گیاه *A. wilhelmsii* صورت گرفته است (۴۸ و ۴۹). گزارش‌ها نشان می‌دهند که قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی این گیاه جهت مهار رادیکال DPPH به مقدار IC_{50}= ۵۸/۹±۲/۲۷ µg/ml بوده است و این گیاه علاوه برداشتن ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، سرشار از سزکویی ترپن‌ها نیز است (۵۰). تاکنون مطالعات کمی بر روی خواص آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات ثانویه گیاه دارویی *S. rosmarinus* صورت گرفته است. تحقیقات نشان می‌دهد این گیاه از تجمع پروتئینی و بروز بیماری‌هایی نظیر پاکینسون و آلزایمر جلوگیری به عمل می‌آورد که این خصوصیت مربوط به قدرت بالای آنتی‌اکسیدانی این گیاه گزارش شده است (۵۱). گزارش‌ها حکایت از آن دارد که گیاه *L. officinale* توانایی نسبتاً خوبی در مهار رادیکال DPPH (IC_{50}= ۲۳۲/۰±۵/۰۳ µg/ml) و احیای یون آهن (III) (mM Fe^{2+}/mg ۱۲۵/۰±۲/۳۹) دارد و مقادیر فنول و فلاونوئید آن متناسب باقدرت آنتی‌اکسیدانی آن است (۵۲). نحوه‌ی استخراج ترکیبات ثانویه و حلال‌های مختلف بر میزان ترکیبات طبیعی گیاهان و خصوصیات دارویی آن‌ها همچون خاصیت آنتی‌اکسیدانی، تأثیر بسزایی دارد. مطالعات نشان دادند که گیاه *L. officinale* باآنکه قدرت آنتی‌اکسیدانی نسبتاً ضعیفی دارد و ترکیبات طبیعی موجود در آن به نسبت سایر گیاهان دارویی کمتر است، لیکن با تغییر درروش استخراج

عصاره و حلال، قدرت آنتی‌اکسیدانی آن به‌مراتب بیشتر شده است (۵۱). تست حساسیت ضد میکروبی، یکی از تکنیک‌های مهم در علم زیست‌شناسی و پزشکی مدرن است. این آزمون در پاتولوژی برای تعیین مقاومت سویه‌های میکروبی مشخص به عوامل ضدمیکروبی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد و در پژوهش‌های فارماکولوژیکی از آن برای تعیین کارایی عوامل ضدمیکروب از عصاره‌های بیولوژیکی علیه میکروارگانیسم‌های مختلف استفاده می‌شود. روش‌های آزمون حساسیت ضدمیکروبی مختلف توسط محققان در سراسر دنیا بکار می‌رود (۵۳). یکی از روش‌های فنوتیپیک اصلی تعیین حساسیت سویه‌های میکروبی، روش دیسک دیفیوژن یا انتشار دیسک است. این روش در سال ۱۹۴۰ توسعه یافت و هنگامی‌که توسط سازمان NCCLS پذیرفته شد به‌طور گسترده‌ای تا به امروز مورد استفاده قرار گرفت و به یکی از روش‌های رایج جهت سنجش حساسیت ضدمیکروبی تبدیل شد و عموماً به آزمون کربی-بوئر معروف است (۵۵ و ۵۴). جهت مطالعه فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های پنج گونه‌ی مورد آزمایش در این تحقیق، از روش دیسک دیفیوژن (انتشار دیسک) استفاده شده است و این اثر بر روی سه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشرشیا کلی* و دو قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و *کاندیدا آلبیکنس* در *مقابل* آنتی‌بیوتیک ضد باکتری سیپروفلوکسازین و ضد قارچ کلروتریمازول مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که عصاره متانولی تمامی گونه‌ها در مقابل عصاره‌های دیگر در گونه-های خود، دارای بیشترین اثر مهارکنندگی بوده است و عصاره-های اتانولی و آبی در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. فعالیت ضدمیکروبی گونه *W. somnifera*، از مابقی گونه‌ها بیشتر بوده است به‌گونه‌ای که عصاره متانولی آن، بیشترین اثر باکتری کشی را در مقابل باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (قطر هاله عدم رشد ۲۹±۱/۰۶ میلی‌متر) داشته است و این اثر تقریباً مشابه اثر آنتی-بیوتیک‌های مورد استفاده (سیپروفلاکسازین: ۳۳±۲/۶۴ میلی-متر) بوده است. در مقابل، باکتری *باسیلوس سرئوس* بیشترین مقاومت را در مقابل تمامی عصاره‌های گونه‌های مورد مطالعه داشته است. همچنین این عصاره بیشترین اثر قارچ کشی را بر روی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* با قطر هاله عدم رشد ۲۷±۱/۰۰ میلی‌متر داشته است. در مقابل، کمترین اثر آنتی‌باکتریایی مربوط به گونه *L. officinale* بوده است و اثر آنتی‌باکتریایی عصاره متانولی آن باآنکه از سایر عصاره‌های گونه‌ی خود بیشتر بوده است (۱۲±۲/۵۰ میلی‌متر)، اما از بسیاری از عصاره‌های گونه‌های دیگر کمتر و بعضاً با برخی از آن‌ها برابر و یا کمی بیشتر بوده است. عصاره آبی گونه‌ی *L. officinale* در بین سایر عصاره‌های مورد مطالعه در تمامی گونه‌ها، کمترین اثر مهارکنندگی را در مقابل باکتری *باسیلوس سرئوس* با قطر هاله عدم رشد ۴±۰/۵۷ میلی‌متر و در مقابل قارچ *آسپرژیلوس نایجر* با قطر هاله عدم رشد ۵±۱/۰۰ میلی‌متر داشته است. سایر عصاره‌های مربوط به گونه-های غیرازاین دو گونه گیاه دارویی موردنظر، اثراتی مابین این دو گونه داشته‌اند. به‌گونه‌ای که ترتیب اثر مهارکنندگی و باکتری کشی گونه‌ها از کمترین به بیشترین به‌صورت: *W. somnifera* ‹ *L. officinale* ‹ *S. rosmarinus* ‹ *A. wilhelmsii* ‹ *S. rhytidea* بوده است. تاکنون مطالعات مختلفی بر روی اثرات ضدمیکروبی پنج گونه‌ی گیاه دارویی موردمطالعه در این پژوهش صورت گرفته است. مطالعات نشان می‌دهند که عصاره‌های گیاه *W. somnifera*، اثر ضدمیکروبی خوبی را از علیه باکتری‌های بیماری‌زا (۵۸-۵۶)، خصوصاً باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از خود نشان داده‌اند (۵۹). در مطالعه‌ای که بر روی قدرت مهارکنندگی عصاره گیاه *W. somnifera* بر روی باکتری *K. pneumonia* انجام گرفته است، نشان داده شده که عصاره این گیاه در غلظت ۲۵۰ ppm بیشترین اثر را داشته است (۶۰). در گزارشی دیگر که بر روی عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی، قسمت‌های مختلف گیاه *W. somnifera* بر روی باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa* صورت گرفته است، عصاره‌های متانولی و اتانولی بیشترین اثر مهارکنندگی را بر روی باکتری *S. aureus* به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۲۳/۶ و ۲۲/۴ میلی‌متر از خود نشان داده‌اند درصورتی‌که عصاره آبی اثر نسبتاً متوسطی با قطر هاله عدم رشد ۲۰/۵ از خود نشان داده است (۶۱). در مطالعه‌ای مشابه که بر روی اثر ضدمیکروبی عصاره‌های استونی، متانولی، اتانولی و کلروفرمی قسمت‌های مختلف گیاه *W. somnifera* بر روی پاتوژن‌های بیماری‌زا صورت گرفته است، عصاره‌های متانولی و اتانولی همچنان بیشترین اثر مهارکنندگی را داشته است (۶۲). تاکنون مطالعات اندکی بر روی گیاه *S. rhytidea* صورت گرفته است. در گزارشی که بر روی اثر ضدمیکروبی جنس *Salvia* صورت گرفته است، نشان داده شده است که این جنس اثر مهارکنندگی قابل قبولی علیه باکتری‌های بیماری‌زا دارد (۶۳). گزارش‌ها حاکی از آن است که اسانس و

عصاره گیاه *A. wilhelmsii* اثر مهارکنندگی بالایی علیه باکتری *S. aureus* داشته است (۶۵ و ۶۴). در مطالعه‌ای دیگر، نتایج نشان داده است که گیاه دارویی بومادران دارای اثر ضدمیکروبی بالایی علیه باکتری *Y. ruckeri* و قارچ *C. albicans* به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۲۵/۴ و ۲۵ میلی‌متر داشته است. در مقابل این اثر برای باکتری *S. iniae* و قارچ *A. flavus* به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۱۶/۴ و ۱۴ میلی‌متر کمتر بوده است (۶۶). گزارش‌ها نشان می‌دهند که حتی اسانس این گیاه نیز اثر مهارکنندگی نسبتاً خوبی دارد به‌گونه‌ای که در رقت ۲۰٪ از اسانس، این اثر بیشترین حد خود را علیه قارچ *کاندیدا آلبیکنس* دارد (۶۷). گزارش‌ها حکایت از آن دارند که اسانس و عصاره‌ی اتانولی گیاه دارویی بومادران اثر مهارکنندگی قابل قبولی با قطر هاله عدم رشد ۱۸/۹±۰/۶۰ و ۱۷/۸±۰/۶۰ میلی‌متر علیه باکتری *Y. ruckeri* از خود نشان داده‌اند (۶۸). محمدی سیچانی و همکاران گزارش کرده‌اند که عصاره متانولی گل‌های *A. wilhelmsii* از رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *اشرشیا کلی* جلوگیری کرده‌اند. غلظت عصاره جهت مهار رشد باکتری‌ها از ۶/۲۵ تا ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تغییر می‌کند و غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس گل‌های این گیاه نیز اثر بازدارندگی بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *اشرشیا کلی* نشان دادند. این ترکیبات بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* مؤثر نبوده‌اند (۶۹). همچنین در مطالعات دیگر، اثر ضد میکروبی و ضدعفونی‌کنندگی گیاه *S. rosmarinus* نیز به اثبات رسیده است (۷۰). مطالعات حاکی از آن است که گیاه *L. officinale* باآنکه نسبت به گیاهان دارویی دیگر اثر ضدمیکروبی کمتری دارد، اما عصاره متانولی آن دارای فعالیت ضدمیکروبی قابل قبولی است (۷۱). همچنین گزارش شده است که گیاه *L. officinale* در غلظت ۱۰ $\mu l\ disc^{-1}$ توانایی نسبتاً خوبی در مهار باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* داشته است (۷۲). در مطالعه‌ای که بر روی اثر آنتی میکروبی عصاره‌های میوه و ریشه این گیاه علیه ۷ باکتری گرم مثبت و منفی و ۳ قارچ صورت گرفته است، نتایج نشان داد که ریشه و میوه هر دو بیشترین اثر بازدارندگی را علیه باکتری *B. subtilus* با قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۱۹/۷۰±۰/۴۰ و ۱۹/۹±۰/۲۰ داشته است. در مقابل ریشه بیشترین اثر ضد قارچی را علیه قارچ *C. albicans* با قطر هاله عدم رشد ۱۴/۵±۰/۵۰ و میوه بیشترین اثر را علیه قارچ *S. cerevisiac* با قطر هاله عدم رشد ۱۴/۷۰±۰/۳۰ داشته است (۷۳). به‌طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره‌های گیاهان موردمطالعه اثر ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی خوبی دارند و با شناسایی نوع ترکیبات عصاره‌های این گیاهان می‌توان تحقیقات کامل‌تری در خصوص خواص ضدمیکروبی و آنتی-اکسیدانی آن انجام داد. به‌عبارت‌دیگر، گیاهان موردمطالعه می-توانند کاندیدای خوبی جهت درمان بیماری‌های ناشی از استرس-های اکسیداتیوی و بیماری‌های ناشی از میکروب‌های بیماری‌زا قرار گیرند. همچنین نتایج نشان دادند که با توجه به فراوانی گیاهان مذکور در استان سیستان و بلوچستان و دسترسی راحت و آسان به عصاره‌ی آن‌ها، پیشنهاد می‌شود که از عصاره‌های گیاهان در صنایع غذایی به‌عنوان نگه‌دارنده استفاده شود. همچنین در تحقیقات آتی می‌توان اثرات سینرژیستی آنان را با نگه‌دارنده‌ها یا عصاره‌ها و اسانس‌های دیگر گیاهان بررسی و مقایسه کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل اجرای طرح پژوهشی شماره ۱۱۰/الف/۹۶ می‌باشد که با حمایت‌های مالی و معنوی دانشگاه سیستان و بلوچستان صورت گرفته است که بدینوسیله سپاسگزاری می‌شود. همچنین پژوهشگران بر خود لازم می‌دانند مراتب تقدیر و تشکر خود را نسبت به همکاران محترم مرکز پژوهشی گیاهان دارویی و زینتی دانشگاه سیستان و بلوچستان در راستای انجام هر چه بهتر این پژوهش اعلام نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Mottaghi Nezhad SEA, Mehrabi S, Nematollahi F, Larijani K, Otoufi A. Identification of components in essential oil of flower and leave of *Sambucus ebulus* L. using GC and GC/MS Spectroscopy. Journal of Plant and Ecosystem. 2010; 6(22): 53-64. [Article in persian]
2. Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. Medicinal plants in therapy. Bull World Health Organ. 1995; (63)3:965–981.
3. Ahmadi E, Abdollahi A, Fasihi-Ramandi M, Namdar N, Mousavi SM, SamiZadeh B, Evaluation of Antibacterial Activity and Total Phenol Compounds of *Punica granatum* Hydro-Alcoholic Extract**.** Journal of Fasa University of Medical Sciences**.**2016, 6(3): 319-325. [Article in Persian]
4. Abdelhady MIS, Abdel Motaal A, Beerhues L. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Standardized Extracts from Leaves and Cell Cultures of *Three Callistemon* Species. American Journal of Plant Sciences. 2011; 2(6): 847-850.
5. Saboora A, Dadmehr KH, RanjbaR M. Total phenolic and flavonoid contents and investigation on antioxidant properties of stem and leaf extracts in six Iranian species of wild *Dianthus* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic. 2013; 29(2): 281-295. [Article in Persian]
6. Einbod LS, Reynertson KA, Luo XD, Basile MJ, Kennelly EJ. Anthocyanin antioxidant from edible fruits. Food Chemistry. 2004; 84(1): 23-28.
7. Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Hafezi S. Antioxidant activities of Iranian corn silk. Turk J Biol. 2008; 32(1): 43-49.
8. Mohajerani M. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Nerium oleander* L. Grown in North of Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2012; 11(4): 1121-1126.
9. Noguchi N, Niki E. Phenolic antioxidants: A rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis. Free Rad Biol Med. 2000; 28 (10):1538-1546.
10. Akhbar M, Aghajani Z, karimi E, Mazoochi A. Composition analysis of essential oil and biological activity of oily compounds of *Mentha longifolia*. NCMBJ. 2016; 6 (21):59-66 [Article in Persian]
11. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr. 1993; 57 (5 Suppl): 715S-24S.
12. Siahpoosh A, Amraee F. Antioxidant capacity of various extracts of *Asteragalus morinus* Boiss aerial parts. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci. 2011; 19(4):437-44. [Article in Persian]
13. Mohammadi M, Kazemi tabar K, Asili J, Kamali H. Study of the antioxidant and antibacterial activity in methanolic, dichloromethan and hexane extracts of aerial parts of *Cyperus longos*. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. 2014; 6 (1): 161-167.
14. Pourreza N. Phenolic Compounds as Potential Antioxidant.Jundishapur J Nat Pharm Prod. 2013; 8(4): 149-50.
15. Mathew S, Abraham TE. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. Food Chem Toxicol. 2006; 44(2): 198-206.
16. Panacek A, Kvitek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. J Phys Chem B. 2006;110(33):16248-53.
17. Sadeghi Z, Valizadeh J, Aziziam Shermeh O. Study of Total Phenolic and Flavonoid Contents and Antioxidant Activity of Baneh (*Pistacia atlantica*) Gum, from Saravan region, Sistan and Baluchestan province. Eco-phytochemical Journal of Medicinal plants. 2015; 3(2): 18-27.
18. Ghourbani A, Bakhshi D, Haj Najjari H, Ghasem Nezhad M, Taghidoust P. Phenolic compounds and antioxidant activity of some Iranian and imported varieties of apple in Karaj region. Journal of Horticultural Science. 2010; 24(1): 83-90. [Article in Persian]
19. Du A, Li M, Ma F, Liang D. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in *Actinidia* fruits. Journal of Food Chemistry. 2009; 113(2): 557-562.
20. Mobaiyen H, Jafari Sales A, Sayyahi J, Evaluating Antimicrobial Effects of Centaurea Plant's Essential Oil on Pathogenic Bacteria: *Staphylococcus Aureus*, *Staphylococcus Epidermidis*, and *Escherichia Coli* Isolated from Clinical Specimens. Journal of Fasa University of Medical Sciences, 2016, 5(4): 479-487. [Article in Persian]
21. Alamhulu M, Nazeri S, Investigation of Antibacterial and Antioxidant Activities of Alcoholic Extracts of Flower and Root of *Dendrostellera Lesserti* on Some Human Pathogenic Bacteria. Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences. 2015; 21(4):277-285. [Article in Persian]
22. Eloff JN. It is possible to use herbarium specimens to screen for antibacterial components in some plants. J Ethnopharmacol. 1999; 67(3): 355-60.
23. Mazutti M, Mossi AJ, Cansian RL, Corazza ML, Dariva C, Oliveira JV. Boldo Chemical profile and antimicrobial activity of (*peumus boldus molina*) extracts obtained by compressed carbon dioxide extraction. Braz J Chem Eng. 2008; 25(34): 427- 434.
24. Trusheva B, Trunkova D, Bankova V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. Chemistry Central Journal. 2007; 1(13): 1-4.
25. Sadeghi Z, Valizadeh J, Azizian Shermeh O. Antioxidant activity and total phenolic content of some date varieties from Saravan Region, Baluchistan, Iran. Journal of a Medicinal Plants Research. 2015; 9(4): 78-83.
26. Sadeghi Z, Valizadeh J, Azizian Shermeh O, Akaberi M. Antioxidant activity and total phenolic content of *Boerhavia elegans* (choisy) grown in Baluchistan, Iran. Avicenna Journal of Phytomedicine. 2015; 5(1): 1-9.

27. Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analaysis. 2003; 10(3): 178-182.
28. Azizian Shermeh O, Valizadeh J, Noroozifar M, Qasemi A. Investigation of antibacterial activities of Silver Nanoparticles by aqueous extract of *Sambacus ebulus* L. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2016; 25(4):92-108. [Article in Persian]
29. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, 4th edition Clarendon, Oxford. 725 p.
30. Aldini G, Yeum KJ, Niki E, Russell RM. Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Practical Applications. Wiley Blackwell, Ames.2010. 380.
31. Muller L, Frohlich K, Bohm V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay. Food Chemistry. 2011(1); 129:139–148.
32. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005; 53(6):1841–1856.
33. Sanchez SC, Gonzalez GAM, Garcia-Parrilla MC, Granados QJJ, Serrana HLG, Martinez LMC. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. Analytica Chimica Acta. 2007; 593(1): 103–107.
34. Prevec T, Segatin N, Poklarulrih N, Cigic B. DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. Talanta. 2013; 109: 13–19.
35. Chen Z, Bertin R, Froldi G. EC_{50} estimation of antioxidant activity in DPPH_ assay using several statistical programs. Food Chemistry. 2013; 138(1): 414–420.
36. Hosseini S, Gharachorlou M, Ghaiyasi Tarzi B, Ghavami M. A review of methods for determining of antioxidant capacity (by reaction, methods, strengths and weaknesses). Food Technology and Nutrition. 2014; 11(4): 89-113. [Article in Persian]
37. Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J. Jiang Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. Nutrition Research. 2003; 23(12): 1719–1726.
38. Sharififar F, Dehghan-Nudeh G, Mirtajaldini M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. Food Chemistry. 2009; 112(4): 885–888.
39. Qingming Y, Xianhui P, Weibao K, Hong Y, Yidan S, Zhang L, et al. Antioxidant activities of malt extract from barley (*Hordeum vulgare* L.) toward various oxidative stress invitroand invivo. Food Chemistry. 2010; 118(1): 84-89.
40. Bergmeier D, Berres PHD, Filippi D, Bilibio D, Bettiol VR, Priamo WL. Extraction of total polyphenols from Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) and wax weed/'sete-sangrias'(Cuphea carthagenensis) and evaluation of their antioxidant potential. Acta Scientiarum Technology. 2014; 36: 545-51.
41. Moure A, Cruz JM, Franco D, Dominguez JM, Sineiro J, Dominguez H, et al. Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry. 2001; 72(2):145-171.
42. Khorasani Esmaeili A, Taha RM, Mohajer S, Banisalam B. Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Content of Various Solvent Extracts from In Vivo and In Vitro Grown *Trifolium pratense* L. (Red Clover). BioMed Research International, 2015: 2015: 1-11.
43. Shahriar M, Ismail Hossain MD, Anwar Sharmin F, Akhter S, Aminul Haque MD, Ahmed Bhuiyan M. InVitro Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of *Withania Somnifera* Root. Iosr Journal of Pharmacy. 2013; 3(2): 38-47.
44. Tupe RS, Kemse NG, Khaire AA. Evaluation of antioxidant potentials and total phenolic contents of selected Indian herbs powder extracts.International Food Research Journal. 2013; 20(3): 1053-1063.
45. Valizadeh M, Bagheri A, Valizadeh J, Mirjalili MH, Moshtaghi N. Autecology of *Withania coagulans* (Stocks) Dunal in Sistan and Baluchestan province.Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 2015; 31(1): 127-137. [Article in Persian]
46. Tosun M, Ercisli S, Sengul M, Ozer H, Polat T, Ozturk E. Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of Eight *Salvia* Species from Turkey. Biol Res. 2009; 42(2): 175-181.
47. Jassbi AR, Eghtesadi F, Hazeri N, Ma'sumi H, Valizadeh J, Chandran JN, et al. The roots of *Salvia rhytidea*: a rich source of biologically active diterpenoids.Natural Product Research. 2017; 31(4): 477-481.
48. Ghani A, Azizi M, Hassanzadeh-Khayyat M, Pahlavanpour AA. Essential Oil Composition of Achillea eriophora, A. nobilis, A. biebersteinii and *A. wilhelmsii* from Iran. Essent oils Bear Plants J. 2008; 11(5):460-467.
49. Niazmand S, Esparham M. Cardiovascular effects of aqueous ethanolic extract of *Achillea wilhelmsii* in rabbit. Pharmacol online. 2011;1(2):818-825.
50. Fathi H, Lashtoo Aghaee B, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity and phenolic contents of *Achillea wilhemsii*. Pharmacologyonline. 2011; 2: 942-949.
51. Heidari A, Ghahghaei A, Valizadeh J. Evaluation of chaperone ability of *S. rosmarinus* against protein aggregation. Journal of Pharmaceutical Investigation. 2014; 44(6): 423-490.
52. Wojdyło A, Oszmian´ski J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry. 2007; 105(3): 940–949.
53. Balouiri M, Sadiki M, Koraichi Ibnsouda S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. 2016; 6(2): 71–79.

54. Heatley NG. Method for the assay of penicillin. Biochemcal Journal. 1944; 38(1): 61-65.
55. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology. 1966; 45(4): 493–496.
56. Saidulu CH, Venkateshwar C, Gangadhar Rao S, Ashok Vardhan T. In-vitro Antimicrobial Activity of *Withania somnifera* Leaf and Root Extracts grown in Heavy Metal toxic soils. International Journal of Advances in Pharmacy Biology and Chemistry. 2014; 3(4): 872-879.
57. Bisht P, Rawat V. Antibacterial activity of *Withania somnifera* against Gram-positive isolates from pus samples. Ayu. 2014; 35(3): 330-332.
58. Singariya P, Kumar Mourya K, Kumar Padma. Antimicrobial activity of the Crude extracts of *Withania simnifera* and *Cenchrus setigerus* in-vitro. Pharmacognosy Journal. 2012; 4(27): 60-65.
59. Bokaeian M, Saeidi S. Evolution of Antimicrobial Activity of Leaf Extract of Withania somnifera Against Antibiotic Resistanct *Staphylococcus aureus*. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2015; 17(7): 1-4.
60. Bokaeian M, Saeidi S, Shahi Z, Sahraei Sh, Zarei H, Sohil Baigi G. Evaluation of Antibacterial Activity of *Withania somnifera* Leaf Extracts against Antibiotic-Resistant Isolates of *Klebsiella pneumonia*. International Journal of Infection. 2014; 1(2): 1-4.
61. Kaur S, Pal Kaur H, Aggarwal S. Evaluation of antibacterial activity, antioxidant potential and phytochemicals of *Withania somnifera* (*Ashwagandha*). World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2015; 4(3): 1032-1042.
62. Rizwana H, Al Hazzani AA, Shehata AI, Moubayed NMS, Antibacterial potential of *Withania somnifera* L. against human pathogenic bacteria.African Journal of Microbiology Research.2015; 6(22): 4810-4815
63. Paknejadi M, Foroohi F, Yousefzadi M. Antimicrobial activities of the essential oils of five Salvia species from Tehran province, Iran. Journal of Paramedical Sciences. 2012; 3(2): 12-18.
64. Hoseini Alfatemi SM, Sharifi Rad J, Sharifi Rad M, Mohsenzadeh S, Jaime A, Silva TD. Chemical composition, antioxidant activity and in vitro antibacterial activity of *Achillea wilhelmsii* C. Koch essential oil on methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* spp. 3 Biotech. 2015; 5(1): 39-44.
65. Jafari Sales A, Malekzadeh P, Ebrahimzadeh M, Babayi Kondlaji Kh, Purabdollah Kaleybar V, Shadi Dizaji A. Evaluation of the anti-bacterial effects of ethanolic extract of yarrow (*Achillea wilhelmsii*) on antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Journal of Science and Today's World. 2015; 4(6): 189-192.
66. Adel M, Abedian Amiri A, Divband M, Safari R, Khalili E. Chemical composition and antimicrobial activity of *Achillea wilhelmsii* C. Koch essential oil against selected bacterial and fungal pathogens isolated fish. Journal of Herbal Drugs. 2015; 6(2): 65-71. [Article in Persian]
67. Amjad L, Mousavidehmourdi K, Zahra Rezvani Z. In vitro Study on Antifungal Activity of *Achillea wilhelmsii* Flower Essential Oil Against Twenty Strains of *Candida albicans*. Chiang Mai J. Sci. 2014; 41(5.1): 1058-1064.
68. Adel M, Safari R, Ghitanchi A.H, Zorriehzahra MJ. Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of some Iranian medical herbs against Yersinia ruckeri. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 2016; 15(3): 1108-1123.
69. Mohammadi-Sichani M, Amjad L, Mohammadi-Kamalabadi M. Antibacterial activity of methanol extract and essential oil of *Achillea wilhelmsii* against pathogenic bacteria. Zahedan J Res Med Sci (ZJRMS). 2011; 13(3): 9-14.
70. Hadi MR. Biotechnological potentials of *Seidlitzia rosmarinus*: A mini review. African Journal of Biotechnology. 2009; 8(11): 2429-2431.
71. Garvey MI, Rahman M, Gibbons S, Piddock LJV. Medicinal plant extracts with efflux inhibitory activity against Gram-negative bacteria. International Journal of Antimicrobial Agents. 2011; 37 (2): 1-35.
72. Mirjalili MH, Salehi P, Sonboli A, Hadian J, Nejad Ebrahimi S, Yousefzadi M. The composition and antibacterial activity of the essential oil of *Levisticum officinale* Koch flowers and fruits at different developmental stages. J. Serb. Chem. Soc. 2010; 75 (12): 1661–1669.
73. Shafaghat A. Chemical constituents, antimicrobial and antioxidant activity of the hexane extract from root and seed of *Levisticum persicum Freyn* and *Bornm*. Journal of Medicinal Plants Research. 2011; 5(20): 5127-5131.

Original Article

Robial and Antioxidant Activities and Determining Phenolic and Flavonoid Contents of the Extracts of Five Species from Different Families of the Medicinal Plants Grown in Sistan and Baluchestan Province

Azizian Shermeh O[1*], Taherizadeh M[2], Valizadeh M[3], Qasemi A[4]

1. Medicinal and Ornamental Plant Research Center, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
2. Rural Water and Sewage Company of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
3. Department of Medicinal Plants, Faculty of Agriculture, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
4. Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

Received: 22 Mar 2017 Accepted: 20 Jul 2017

Abstract

Background & Objectives: Traditionally use of the medicinal plants for treating of diseases. This present study is carried out to evaluate the antimicrobial and antioxidant activities and determination of total phenolic and flavonoid contents of three extracts (Methanolic, Ethanolic and Aqueous) of five different species of medicinal plants such as Withania somnifera L. Dunal., Salvia rhytidea Bent, Levisticum officinale L, Seidlitzia rosmarinus L., and Achillea wilhelmsii L.

Material & Methods: After preparing the extracts with maceration method, antioxidant activities were determined by two methods (DPPH and FRAP) and antimicrobial activities were estimated by Disk-Diffusion method against bacteria (Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli and fungi (Aspergillus niger and Candida albicans) and phenolic and flavonoid contents were determined by Folin-Ciocaltiu, Aluminum Chloride colorimetric.

Results: The results showed that, the methanolic extract of W. somnifera had maximum total phenolic (41.45±4.64 mgGAE/gExtract) and flavonoid contents (35.21±2.54 mgQUE/gExtract) and antioxidant activity, (IC_{50}=8.12±1.36µg/ml, 58.19±1.68 mM Fe^{2+}/mgExtract) and antimicrobial activity against Staphylococcus aureus and Candida albicans with the diameter of inhibition zone (29±1.06 and (27±1.00 mm) respectively. In contrast, the aqueous extract of L. officinale had minimum value of total phenolic (17.12±1.93 mgGAE/gExtract) and flavonoid contents (12.61±2.06 mgQUE/gExtract) and antioxidant activity (IC_{50}=121.43±3.36µg/ml, 13.74±2.52 mM Fe^{2+}/mgExtract) and antimicrobial activity against Bacillus cereus and Aspergillus niger with the diameter of inhibition zone (4±0.57 and 5±1.00 mm) respectively.

Conclusion: Overall, based on the results, the studied plants can be a good candidate for the treatment of diseases caused by oxidative stress, and diseases are caused by pathogenic microbes.

Key Words: Antimicrobial activity, Antioxidant activity, Phenolic content, Flavonoid content, Sistan and Baluchestan province

***Corresponding Author: Omid Azizian Shermeh,** Medicinal and Ornamental Plant Research Center, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
Email: omid_aziziyan@yahoo.com

Journal of Fasa University of Medical Sciences 7 (2018): 465-479