Eco-phytochemical
Journal of Medicinal Plants
Print ISSN: 2322-3235
Online ISSN: 2783-4697
Islamic Azad University Gorgan Branch
Iranian Society of Medical Plants

Effect of extraction methods on phytochemical, antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory properties of *Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss. at different phenological stages

Mohamad Reza Samiei[1], Majid Sharifi-Rad[2*], Mohammad Saranirad[3]

[1] Department of Range Management, University of Zabol, Zabol, Iran
[2] Department of Range and Watershed Management, Faculty of Water and Soil, University of Zabol, Zabol, Iran, Email: Majidsharifirad@uoz.ac.ir
[3]Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

Article type:
Research article

Article history
Received: 2024/10/10
Revised: 2025/02/02
Accepted: 2025/02/10

Keywords
Extraction methods
biological activity
active compounds
Pulicaria gnaphalodes
phenological stages

Abstract

Plants are a crucial source of bioactive molecules for drug production, making the extraction of these compounds from plant materials vital in the pharmaceutical industry. The solvents used during the extraction process and the plant's growth stage significantly influence the quality and quantity of secondary metabolites extracted from medicinal plants. This study aimed to investigate the effect of different extraction methods on the chemical compounds, as well as the antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory activities of *Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss. at various phenological stages. Sampling was conducted using a completely random design from the plant at different phenological stages (vegetative, flowering, and seeding). The plant extracts were prepared using ethanol, methanol, distilled water, and acetone as solvents. Total phenol, total flavonoid, total tannin, total alkaloid, and total saponin content were measured using standard methods. The antioxidant activity of the various extracts was assessed using DPPH, ABTS, and FRAP methods. Additionally, the antibacterial activity was evaluated through disk diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC) methods, while the anti-inflammatory activity was assessed using the human red blood cell stabilization method. The results indicated that the methanolic extract of the plant at the flowering stage contained the highest levels of total phenols (67.5 mg gallic acid equivalent (GAE)/g dry weight), total flavonoids (37.3 mg quercetin equivalent (QE)/g dry weight), total tannins (45.3 mg catechin equivalent (CE)/g dry weight), total alkaloids (75.2 mg atropine equivalent (AE)/g dry weight), and total saponins (284.3 mg escin equivalent (EE)/g dry weight). Conversely, the lowest amounts of these compounds were found in the aqueous extract at the seeding stage. Furthermore, the methanolic extract from the flowering stage demonstrated the highest antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory activities, while the aqueous extract from the seeding stage exhibited the lowest activities in these areas. Overall, it can be concluded that the extracts of *Pulicaria gnaphalodes* have the highest concentrations of bioactive compounds and biological activity during the flowering stage. The methanolic extract at this stage can serve as an effective source of natural antioxidants, antibiotics, and anti-inflammatory agents, whereas the aqueous extract at the seeding stage had the least activity.

Cite this article as: Samiei, M.R., Sharifi-Rad, M., Saranirad, M. (2025). Effect of extraction methods on phytochemical, antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory properties of *Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss. at different phenological stages. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants,* 12(4): 61-82.

©The author(s)
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch
Doi: https://doi.org/10.71847/ejmp.2025.1186490

اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی
شاپا چاپی: ۲۳۲۲-۳۲۳۵
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۹۷
دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان
انجمن گیاهان دارویی ایران ثبت ۱۸۹۶۳

بررسی روش‌های مختلف عصاره‌گیری بر ویژگی‌های فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و ضدالتهابی گیاه کک‌کش بیابانی (*Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss.) در مراحل مختلف فنولوژی

محمدرضا سمیعی[۱]، مجید شریفی‌راد[۲]*، محمد سارانی‌راد[۳]

[۱] دانشگاه زابل، زابل، ایران
[۲] گروه مرتع و آبخیزداری دانشگاه زابل، زابل، ایران، رایانامه: majidsharifirad@uoz.ac.ir
[۳] دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران، تهران، ایران.

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۷/۱۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۱/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۲

چکیده

گیاهان منبع مهمی از مولکول های زیست فعال برای تولید دارو هستند که استخراج این ترکیبات از مواد گیاهی در صنعت داروسازی دارای اهمیت فراوانی است. حلال‌های مورد استفاده در فرآیند استخراج و همچنین مرحله رشد گیاهان بر کیفیت و میزان متابولیت‌های ثانویه استخراج شده از گیاهان دارویی تأثیر دارند. بنابراین، هدف پژوهش حاضر بررسی اثر روش‌های مختلف عصاره‌گیری بر میزان ترکیبات شیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و ضدالتهابی گونه مرتعی کک کش بیابانی (*Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss.) در مراحل مختلف فنولوژی است. بدین منظور نمونه‌برداری به‌صورت طرح کاملاً تصادفی از گیاه در مراحل مختلف فنولوژی (رشد رویشی، گلدهی و بذردهی) انجام گرفت و سپس با استفاده از حلال‌های اتانول، متانول، آب، و استون عصاره گیاه تهیه شد. میزان فنل کل، فلاونوئید کل، تانن کل، آلکالوئید کل و ساپونین کل با استفاده از روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شد. جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف از روش‌های مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ABTS و احیاء یون‌های فریک (FRAP) استفاده شد. همچنین فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف به روش‌های انتشار دیسک، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) و فعالیت ضد التهابی عصاره‌ها به روش پایداری غشای گلبول قرمز اندازه‌گیری شد. بیشترین میزان فنل کل (۶۷/۵ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک گیاه)، فلاونوئید کل (۳۷/۳ میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه)، تانن کل (۴۵/۳ میلی‌گرم معادل کاتچین در گرم وزن خشک گیاه)، آلکالوئید کل (۷۵/۲ میلی‌گرم معادل آتروپین در گرم وزن خشک گیاه) و ساپونین کل (۲۸۴/۳ میلی‌گرم معادل اسپین در گرم وزن خشک گیاه) در عصاره متانولی مرحله گلدهی گیاه مورد مطالعه و کمترین مقادیر آن‌ها در عصاره آبی مرحله فنولوژی بذردهی آن به ثبت رسید. نتایج مربوط به بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و ضدالتهابی عصاره‌ها نشان داد که عصاره متانولی گیاه در مرحله گلدهی دارای بالاترین میزان فعالیت و عصاره آبی آن در مرحله بذردهی دارای کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و ضدالتهابی است. به طور کلی و با در نظر گرفتن تمامی عصاره‌ها می‌توان بیان کرد که گونه مورد مطالعه در مرحله گلدهی از بالاترین میزان ترکیبات شیمیایی و فعالیت زیستی برخوردار است و عصاره متانولی و آبی گونه مورد مطالعه در مراحل مختلف فنولوژی به ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان ترکیبات شیمیایی و فعالیت زیستی بودند. بنابراین می توان از عصاره متانولی گیاه در مرحله گلدهی به عنوان یک منبع ترکیبات آنتی‌اکسیدان، آنتی بیوتیک و ضدالتهاب طبیعی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی:
روش‌های عصاره‌گیری
فعالیت زیستی
ماده مؤثره
Pulicaria Gnaphalodes
مراحل رشد

استناد: سمیعی، محمدرضا؛ شریفی‌راد، مجید؛ سارانی‌راد، محمد. (۱۴۰۳). بررسی روش‌های مختلف عصاره گیری بر ویژگی‌های فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و ضدالتهابی گیاه کک‌کش بیابانی (*Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss.) در مراحل مختلف فنولوژی. *فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی*، ۱۲(۴)، ۸۲-۶۱.

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
Doi: https://doi.org/10.71847/ejmp.2025.1186490
© نویسندگان.

مقدمه

گیاهان دارویی دارای ترکیبات فعال بیولوژیکی هستند که این ترکیبات گیاهی اثرات بیولوژیکی مختلفی از جمله فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد التهابی و کاهش قند خون دارند (Unuofin et al., 2018). مولکول های زیست فعال مستخرج از گیاهان به عنوان مواد اولیه برای سنتز آزمایشگاهی داروها و همچنین مدلی برای تولید ترکیبات فعال بیولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Dhanani et al., 2017).

رادیکال‌های آزاد باعث ایجاد بیش از صد اختلال در انسان می‌شوند که از جمله آن‌ها می‌توان به تصلب شرایین، روماتیسم مفصلی، آسیب سیستم عصبی مرکزی، التهاب معده و سرطان اشاره نمود (Mazandarani et al., 2012). آلاینده‌های محیطی از جمله تشعشعات، مواد شیمیایی و مواد سمی غذایی باعث اختلال در فعالیت ایمنی بدن انسان می‌شوند و ممکن است با ایجاد تغییر در بیان ژن‌ها باعث ایجاد پروتئین‌های غیرطبیعی گردند. فرآیندهای اکسیداتیو، که باعث تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه آسیب بافتی می‌شوند، عامل اصلی کاهش سلامت و ظهور طیف وسیعی از بیماری‌ها هستند (Wang et al., 2002). آنتی اکسیدان‌ها ترکیبات مهمی هستند که از ارگانیسم‌ها در برابر آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند. امروزه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مشتق شده از گیاهان به دلیل تأثیرگذاری زیاد و اثرات جانبی کم در قیاس با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی توجه ویژه‌ای را به خود جلب کرده است (Sikwese et al., 2007).

یک چالش بزرگ در مراقبت‌های بهداشتی جهانی، نیاز به داروهای جدید، مؤثر و مقرون به صرفه برای درمان عفونت های میکروبی، به ویژه در کشورهای در حال توسعه جهان است. امروزه مقاومت باکتری‌ها در برابر داروهای ضد باکتریایی به یک مسئله بزرگ جهانی تبدیل شده است. مقاومت آنتی بیوتیکی یک پدیده طبیعی است که زمانی رخ می‌دهد که میکروارگانیسم‌ها هنگامی که در معرض آنتی بیوتیک‌ها قرار بگیرند قادر به حفظ بقای خود باشند. هنگام مواجهه باکتری‌ها با آنتی بیوتیک‌ها، باکتری‌های حساس از بین می‌روند یا مهار می‌شوند، در حالی که باکتری‌هایی که به طور طبیعی (یا ذاتاً) مقاوم هستند یا ویژگی های مقاوم به آنتی بیوتیک را کسب کرده‌اند، شانس بیشتری برای زنده ماندن و تکثیر دارند. نه تنها استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک‌ها، بلکه استفاده نامناسب (انتخاب نامناسب، دوز ناکافی، پایبندی ضعیف به دستورالعمل‌های درمانی) به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی کمک می‌کند (Barbieri et al., 2017). از آنجایی‌که کشف آنتی بیوتیک‌های جدید بسیار پرهزینه و زمان بر است و حدود ده سال زمان نیاز دارد تا یک آنتی بیوتیک جدید به بازار عرضه شود بنابراین جستجو برای مواد ضد باکتریایی مشتق شده از محصولات طبیعی مانند ترکیبات شیمیایی گیاهان در کنار کشف ترکیبات شیمیایی مصنوعی جدید اهمیت فزاینده ای یافته است (Mandal et al., 2014). از زمان های قدیم، بسیاری از گیاهان به دلیل دارا بودن متابولیت‌های ثانویه دارای خوص ضدمیکروبی به منظور درمان عفونت‌های انسانی مورد استفاده قرار می‌گرفتند. در دهه گذشته، توجه زیادی به مطالعه ترکیبات شیمیایی گیاهان از نظر میزان فعالیت ضد باکتریایی معطوف شده است (Borges et al., 2015).

داروهایی که معمولاً برای درمان بیماری‌های التهابی استفاده می‌شوند به عنوان داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی (NSAIDs) و کورتیکواستروئیدها شناخته می‌شوند. داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی معمولاً برای درمان درد و شرایط التهابی مانند پوکی

استخوان، آرتریت روماتوئید و بیماری آلزایمر استفاده می‌شوند (Adebayo et al., 2015). با این حال، تایید شده است که بسیاری از داروهای ضدالتهابی غیر استروئیدی باعث برخی عوارض جانبی مانند سرکوب سیستم ایمنی و خونریزی گوارشی می‌شوند (Sostres et al., 2013). این امر باعث شده است تا جستجو برای یافتن ترکیبات طبیعی دارای اثرات مشابه با داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی شیمیایی اما با عوارض جانبی کمتر اهمیت پیدا کند (Li et al., 2020). بنابراین، یکی از اهداف این مطالعه، ارزیابی پتانسیل استفاده از عصاره‌های گونه مورد مطالعه به عنوان یک عامل ضدالتهابی است.

طریقه عصاره گیری از گیاهان اولین مرحله مهم جهت استخراج ترکیبات زیست فعال می‌باشد. نوع حلال انتخاب شده، اندام ها و بافت های گیاهی مورد استفاده بر روی کمیت و کیفیت ترکیبات شیمیایی استخراج شده از گیاهان تاثیرگذار می‌باشند. تحقیقات زیادی بر روی بهینه سازی روش های استخراج و مقایسه فعالیت‌های زیستی عصاره‌های گیاهان انجام شده است. با انتخاب روش‌های مناسب عصاره‌گیری می‌توان غلظت مواد زیست فعال را در عصاره گیاه بالا برد. به‌طورمعمول انتخاب نوع حلال‌ها جهت استخراج عصاره ها با توجه به هدف، ماهیت ترکیبات، قابل‌دسترس بودن مواد و تجهیزات صورت می‌پذیرد (Abubakar and Haque, 2020). Arya و همکاران (2024) در بررسی اثر حلال عصاره گیری بر میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی میوه گیاه *Illicium griffithii* بیان کردند که از میان حلال های متانول، اتانول، استون و آب، متانول حلال مناسب تری برای استخراج ترکیبات زیست فعال میوه این گیاه است. همچنین Chatepa و همکاران (2024) اثرات استفاده از حلال های مختلف بر میزان ترکیبات استخراج شده و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ دو گیاه *Azadirachta indica* و *Vernonia amygdalina* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن ها نشان داد که عصاره های متانولی و آبی دارای بیشترین میزان ترکیبات زیست فعال و آنتی اکسیدانی بودند. یکی دیگر از عوامل مهم و تأثیرگذار بر میزان ترکیبات شیمیایی گیاهان، مرحله رشد گیاه است. بنابراین جهت تنظیم برنامه‌های بهره‌برداری (زمان برداشت)، دستیابی به بیشترین ماده مؤثره گیاهان و استفاده درست از گیاهان دارویی ضروری است که مراحل مختلف رشد گیاهان به دقت مورد بررسی قرار گیرد و میزان تغییرات ترکیبات شیمیایی در آن‌ها تعیین گردد. این امر علاوه بر شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در مراحل مختلف رشد گیاهان می‌تواند در استفاده درست از گیاهان و دستیابی به حداکثر فعالیت زیستی آن‌ها نیز مؤثر باشد (Li et al., 2020). Lee و همکاران (2024) در بررسی ترکیبات شیمیایی و فعالیت زیستی گیاه *Filipendula glaberrima* در مراحل مختلف رشد بیان کردند که مرحله گلدهی کامل گیاه دارای بیشترین میزان ترکیبات شیمیایی و فعالیت زیستی است.

گونه کک کش بیابانی (*Pulicaria gnaphalodes*) متعلق به تیره کاسنی (Asteraceae) است. گیاهی است پایا به ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتی متر و گل‌های زرد طلایی که بیشتر در مناطق شنی، سنگی و متروکه در عربستان سعودی، افغانستان، پاکستان، ایران، هند، عراق و ترکیه می روید. این گیاه معمولاً به عنوان چای گیاهی، طعم دهنده و گیاه دارویی استفاده می شود (Kamkar et al., 2013). این گونه به طور سنتی در کشورهای مختلف برای دفع حشرات، درمان کمردرد، درمان اختلالات روده، درمان التهاب و کاهش علائم آنفولانزا و سرماخوردگی استفاده می‌شود. ترکیبات شیمیایی اصلی موجود در عصاره این گیاه شامل مونوترپن‌ها، سسکویی ترپن استیلن‌ها، فلاونوئیدها، ایزوکامن‌ها،

آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، کومارین‌ها و تانن‌ها است. تحقیقات متعددی گزارش کرده‌اند که این گونه دارای فعالیت‌های زیستی متنوعی از جمله فعالیت ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی، ضد قارچی، ضد سرطانی، و ضد التهابی است (Kamkar et al., 2013; Naqvi et al., 2020).

از آنجایی‌که نوع حلال مورد استفاده جهت عصاره‌گیری و مرحله رشد گیاهان می‌تواند کمیت و کیفیت مواد مؤثره استخراج شده از بافت‌های گیاهی را تحت تأثیر قرار دهد، پژوهش حاضر به بررسی اثر حلال عصاره‌گیری بر مقدار ترکیبات شیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و ضدالتهابی گونه کک‌کش بیابانی *(Pulicaria gnaphalodes)* در مراحل مختلف فنولوژی پرداخته است.

مواد و روش ها

تهیه نمونه گیاهی: نمونه های مربوط به اندام‌های هوایی گونه مورد مطالعه در سه مرحله فنولوژیک (رشد رویشی، گلدهی و بذر دهی) با سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی از مراتع حوزه شورستان شهرستان سربیشه در بهار سال ۱۴۰۱ برداشت شد. بدین صورت که در هر مرحله فنولوژیک ۳۰ پایه به صورت تصادفی انتخاب شدند و نمونه‌برداری از اندام‌های هوایی آن‌ها انجام گرفت. ترکیب نمونه‌های مربوط به هر ۱۰ پایه به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. گونه مورد مطالعه در آزمایشگاه مرتع و آبخیزداری دانشگاه زابل مورد بررسی و شناسایی قرار گرفت و کد هرباریومی ۱۲۳۸ به آن اختصاص یافت. پس از برداشت، نمونه‌ها در محیط خشک و سایه خشک گردیدند. نمونه‌های خشک‌شده به‌طور جداگانه با آسیاب پودر شدند.

شکل ۱: تصویر گونه کک کش بیابانی (***Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss**)

تهیه عصاره: به منظور تهیه عصاره، ۲۰ گرم از نمونه‌های پودر شده اندام‌های هوایی گیاه درون ارلن‌های مجزا ریخته شد و به آن‌ها ۱۰۰ میلی‌لیتر از حلال‌های مورد مطالعه (اتانول، متانول، آب و استون) به طور جداگانه اضافه گردید. ترکیب به دست آمده به مدت ٢٤ ساعت به وسیله همزن مخلوط شد و پس از آن عصاره‌های به دست آمده توسط کاغذ واتمن شماره ۱ صاف گردید. حذف حلال از عصاره‌ها به وسیله دستگاه روتاری انجام شد. عصاره‌های قیری شکل حاصله تا زمان انجام آزمایشات در یخچال (دمای ٤ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند (Khan et al., 2022).

تعیین میزان فنل کل: میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌ها با استفاده از روش رنگ سنجی به فولین – سیوکالچو (Folin–Ciocalteu) تعیین شد. بدین ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) درون لوله آزمایش با ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین – سیوکالچو (۵۰٪) مخلوط گردید. پس از ۵ دقیقه، میزان ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم (۲٪) به آن‌ها اضافه شد. لوله‌های آزمایش به خوبی تکان داده شدند و برای مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شدند. در نهایت، میزان جذب نمونه‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷٦۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. گالیک اسید جهت رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت ($y = 0.0098x - 0.0091$; $R^2 = 0.9985$) و میزان فنل کل در نمونه‌ها به صورت میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم وزن خشک گیاه بیان گردید (Meda et al., 2005).

تعیین میزان فلاونوئید کل: روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید جهت اندازه‌گیری مقدار فلاونوئید کل استفاده شد (Sulastri et al., 2018). بدین منظور ۵۰ میکرولیتر از هر یک از عصاره‌ها (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و در دمای اتاق به مدت ۲۰ نگهداری شدند. پس از آن میزان جذب مخلوط به‌دست‌آمده در طول موج ٤١٥ نانومتر ثبت گردید. کوئرستین جهت رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت ($y = 0.01x - 0.0067$; $R^2 = 0.9985$). در نهایت، میزان فلاونوئید کل در نمونه‌ها به صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم وزن خشک گیاه بیان گردید.

تعیین میزان تانن کل: تانن کل به روش Formagio و همکاران (۲۰۱٤) اندازه‌گیری شد. بدین صورت که ۲ میلی‌لیتر محلول وانیلین (٤ درصد) در متانول و ۱/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به ۵۰ میکرولیتر از هر یک از عصاره‌ها (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. متانول به عنوان شاهد و کاتچین به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت ($y = 0.01x + 0.0039$; $R^2 = 0.9989$). نتایج به صورت میلی‌گرم معادل کاتچین در گرم وزن خشک گیاه بیان گردید.

تعیین میزان آلکالوئید کل: میزان آلکالوئید کل به وسیله روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد (Pokhriyal et al., 2023). بدین منظور به ۱ میلی‌لیتر از هر یک از عصاره‌ها (۱ میلی‌گرم از هر عصاره در ۱ میلی‌لیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO))، ۱ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک (۲ نرمال) اضافه شد و پس از گذشت ۳۰ دقیقه مخلوط حاصله صاف گردید. مخلوط‌های حاصله به قیف‌های جداکننده انتقال یافتند. پس از آن، ۵ میلی‌لیتر محلول بروموکرزول گرین و ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات به آن‌ها اضافه گردید. مخلوط‌ها با کلروفروم ترکیب شدند و به خوبی تکان داده شدند. سپس فاز کلروفرمی زرد رنگ محتوی ترکیبات آلکالوئیدی در لوله‌های آزمایش جمع‌آوری

شـــدنـد و به وســـیله کلروفرم به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رســـیدند. جذب مخلوط‌های حاصـــل در موج ۴۷۰ نـانومتر تعیین شـــد. آتروپین جهـت رســـم منحنی اسـتاندارد مورد استفاده قرار گرفت ($y = 0.0099x + 0.0226$; $R^2 = 0.9945$). میزان آلکالوئید در نمونه‌ها به صـورت میلی‌گرم معادل آتروپین در گرم وزن خشک گیاه بیان گردید.

تعیین میزان ساپونین کل: میزان ساپونین کل بر اساس روش ارائه شـــده توســـط Syed Amran و همکاران (۲۰۱۸) تعیین شـد. به طور خلاصـه، ۰/۵ میلی لیتر از هر یک از عصـاره‌ها (۱ میلی گرم در میلی لیتر) با ۰/۵ میلی لیتر از محلول وانیلین (۸ درصـد حجمی-وزنی) و ۵ میلی‌لیتر از محلول H_2SO_4 (۵۰ درصـد حجمی-حجمی) به طور جداگانه مخلوط شد. مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سـانتی‌گراد انکوبه شـد و سـپس با اسـتفاده از حمام آب یخ به سـرعت تا دمای اتاق ســـرد شـــدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شـــد. از اســـین (Escin) به عنوان استاندارد استفاده گردید ($y = 0.0102x + 0.0077$; $R^2 = 0.9906$). در نهایت، محتوای ســـاپونین کل نمونه‌ها به صـورت میلی‌گرم اسـین در گرم وزن خشـک گیاه بیان گردید.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکســـیدانی به روش مهار رادیکال آزاد DPPH: بدین منظور ۱ میلی‌لیتر از عصاره‌های اتانولی، متانولی، آبی و استونی (۱ میلی گرم در میلی لیتر) به ۲ میلی لیتر از محلول متـانولی رادیکال DPPH اضـــافه گردید و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شـدند. پس از گذشت این زمان میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نـانومتر تعیین گردیـدنـد. نتـایج فعالیت آنتی اکسـیدانی به‌صـورت درصد مهار رادیکال آزاد DPPH توســـط عصـــاره‌ها مطابق فرمول ذیل به دســـت آمـد. از اســـید اســـکوربیک به عنوان یک آنتی‌اکسـیدان اسـتاندارد در غلظت یکسان با عصاره‌ها جهـت مقایســـه میزان فعالیت آنتی‌اکســـیدانی آن‌ها استفاده شد.

$$I\ (\%) = (A_{blank} - A_{Sample} / A_{blank}) \times 100$$

در این رابطـه: I: مهـار رادیکال آزاد DPPH، A_{blank}: میزان جذب نوری نمونه شاهد (آب مقطر) و A_{Sample}: نشـان دهنده جذب نوری غلظت‌های مختلف عصـاره تهیه شده است (Sharifi-Rad et al., 2015).

فعالیت آنتی‌اکســـیدانی به روش مهار رادیکال آزاد ABTS: جهـت تعیین میزان فعـالیت آنتی‌اکســـیدانی عصـــاره‌هـا بـه روش مهار رادیکال ABTS از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد (Ko et al., 2020). ۵۴/۲ میلی‌گرم از ABTS در بافر فســـفات (۷ میلی مولار با اسـیدیته ۵) حل شـد و سپس با افزودن ۱ گرم MnO_2 رادیکـال آزاد فعال $ABTS^+$ تولید گردید. جهت کامل شدن واکنش محلول فوق به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد و سپس با افزودن ۳۰۰ میکرولیتر از هر عصاره (۱ میلی گرم در میلی لیتر) به آن به صـــورت جداگانه و نگهداری آن‌ها به مدت ۳۰ دقیقه، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۳۴ نـانومتر قرائـت گردیـد. میزان مهار رادیکال آزاد ABTS به صـورت درصد محاسبه و بیان گردید. از اسید اسکوربیک به عنوان یک آنتی‌اکسیدان اسـتاندارد در غلظت یکسـان با عصاره‌ها جهت مقایسه میزان فعالیت آنتی‌اکسـیدانی آن‌ها اسـتفاده شد. فعالیت مهار رادیکال ABTS (درصد) با استفاده از معاله مورد استفاده در روش DPPH تعیین شد.

روش قـدرت احیاءکنندگی آهن (FRAP): قدرت احیاءکنندگی آهن به روش Alam و همکاران (۲۰۲۱) تعیین شـــد. برای تهیه معرف FRAP، ۱۰ میلی‌لیتر از بافر اســـتات ســـدیم ۳۰۰ میلی مولار (pH=۳/۶) به ۱ میلی‌لیتر از کلرید آهن (III)، ۱ میلی‌لیتر از ۲، ۴ و ۶ تـری پـیریـدیـل-s- تریـازین (TPTZ) در اســـیـد

هیدروکلریک ۴۰ میلی‌مولار اضافه شد. مخلوط حاصل در حمام آب گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. در نهایت ۵۰ میکرولیتر از هر یک از عصاره‌ها (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به ۱۵۰ میکرولیتر از معرف FRAP اضافه شدند و بلافاصله جذب آن‌ها به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. از اسید اسکوربیک به عنوان یک آنتی‌اکسیدان استاندارد در غلظت یکسان با عصاره‌ها جهت مقایسه میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها استفاده شد.

$$\text{FARP value (\%)} = [(As - Ab) / (Ac - Ab)] \times 2$$

As: میزان جذب هر یک از نمونه‌ها، Ab: جذب کنترل منفی است که حاصل از واکنش آب مقطر و معرف FRAP است و Ac: جذب کنترل مثبت است که حاصل واکنش اسید اسکوربیک و معرف FRAP است.

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی: فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های گونه مورد مطالعه در برابر باکتری‌های گرم منفی (*Escherichia coli* (ATCC2359)) و (ATCC 14028) *Salmonella typhimurium*) و گرم مثبت (*Staphylococcus aureus* (ATCC 1189)) و (PTCC 1015) *Bacillus cereus*) مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش انتشار دیسک: جهت مشخص کردن حساسیت سویه‌های میکروبی نسبت به عصاره‌های مختلف گیاه در مراحل مختلف فنولوژی از روش انتشار با دیسک استفاده شد. در این روش ابتدا از تمام سویه‌های میکروبی غلظت معادل ۰/۵ مک فارلند در محیط مولر هینتون براث تهیه و پس از آن به‌صورت یکنواخت بر سطح محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند. آنگاه دیسک‌های بلانک استریل (پادتن طب) در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ها غوطه‌ور گردید و بعد از خشک شدن در فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت بر روی سطح آگار قرار داده شدند. و سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. در نهایت پس از گذشت زمان فوق قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید (Bauer,1996).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC): در این روش از غلظت‌های مختلفی از عصاره‌ها شامل ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲، ۷/۸۱ و ۳/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. ابتدا یک کشت تازه ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید. از هرکدام از غلظت‌ها ۵۰ میکرولیتر به هرکدام از خانه‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید. پس از آن ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت مولرهینتون براث به هر چاهک اضافه شد. در ادامه به هر یک از چاهک‌ها میزان ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک‌فارلندی باکتری‌ها اضافه و میکروپلیت‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه داری شدند. پس از آن مقدار جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر تعیین شد. حداقل غلظتی عصاره‌ها که از رشد باکتری‌ها جلوگیری کرد به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد (Mogana et al., 2020).

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC): جهت اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی، ۵۰ میکرولیتر از چاهک‌هایی که در آزمایش MIC رشد باکتریایی در آن‌ها مشاهده نشده بود به صورت جداگانه بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. کمترین غلظتی از عصاره‌ها که باعث کشته شدن حداقل ۹۹٪ باکتری‌ها گردیده بود، به‌عنوان MBC گزارش گردید. (Mogana et al., 2020).

ارزیابی فعالیت ضد التهابی: برای ارزیابی فعالیت ضد التهابی عصاره‌های مختلف گونه مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاهی از روش پایداری غشای گلبول قرمز انسان استفاده شد (Vane and Botting, 1995). بدین منظور نمونه‌های خون از ۱۰ داوطلب انسان سالم گرفته شد و با حجم مساوی از محلول Alsevers

(شامل ۰/۸ درصد سیترات سدیم، ۲ درصد دکستروز، ۰/۴۲ درصد کلرید سدیم و ۰/۵ درصد اسید سیتریک) مخلوط شدند. نمونه‌های خون با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و گلبول قرمز متراکم (Packed Red Cells) جدا شدند. گلبول قرمز متراکم به دست آمده با محلول نرمال سالین ۰/۹ درصد شسته شدند و در نهایت سوسپانسیون سلولی ۱۰ درصد حجمی در نرمال سالین تهیه شد. از این سوسپانسیون برای تعیین خاصیت ضد التهابی عصاره‌های مختلف گونه مورد مطالعه استفاده شد. بدین منظور، ۱ میلی‌لیتر از عصاره‌ها (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و محلول دیکلوفناک سدیم (به عنوان استاندارد) در غلظت مشابه به طور جداگانه با ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ($0.15\ mol\ L^{-1}$، pH=۷/۴)، ۲ میلی‌لیتر نرمال سالین (۰/۳۶ درصد) و ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون گلبول‌های قرمز مخلوط شدند. در نمونه‌های شاهد از نرمال سالین به جای عصاره‌ها استفاده شد. مخلوط‌های به دست آمده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند وسپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت مایع رویی حاصل برداشته شد و جذب آن‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر تعیین شد. در پایان، درصد خاصیت پایدارکنندگی یا تثبیت غشای گلبول‌ها با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید:

۱۰۰× جذب کنترل / (جذب نمونه – جذب کنترل)= درصد خاصیت پایدار کنندگی غشاء

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل نتایج در این پژوهش به‌وسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۴ و آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) انجام گرفت. آزمون دانکن برای مقایسه میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵ استفاده شد. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گرفت و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد.

نتایج

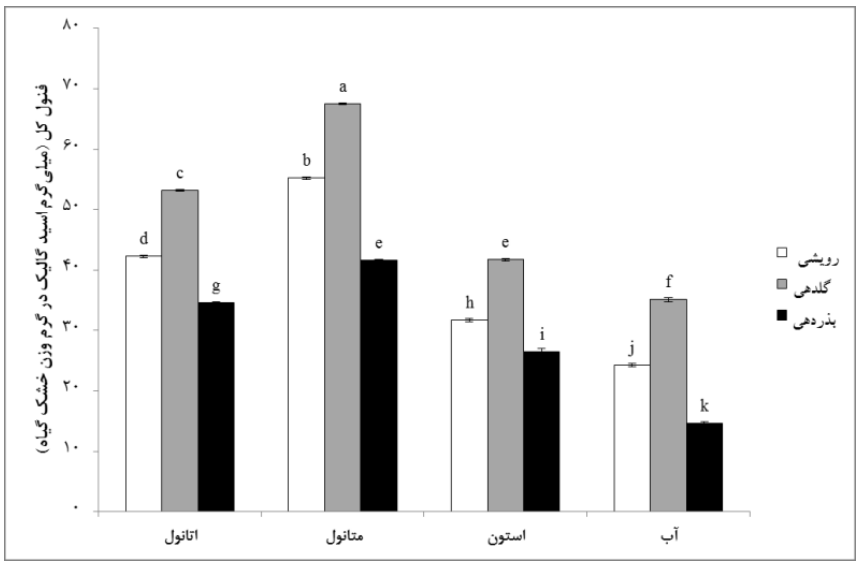
تغییرات میزان فنل کل: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد (جدول ۱) که مراحل فنولوژی و نوع عصاره مورد استفاده بر میزان فنل کل، فلاونوئید کل، تانن کل، آلکالوئید کل، ساپونین کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد باکتریایی اثر معنی‌داری دارد ($P <$ ۰/۰۵) و میزان ترکیبات در مراحل مختلف فنولوژی متفاوت می‌باشد. بیشترین میزان فنل کل برای عصاره متانولی (۶۷/۵ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک گیاه) در مرحله گلدهی گیاه و کمترین میزان آن برای عصاره آبی (۱۴/۶ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک گیاه) در مرحله بذردهی گیاه مشاهده شد. در بین مراحل مختلف فنولوژی، مرحله گلدهی بیشترین محتوای فنل کل و پس از آن به ترتیب مراحل رویشی و بذردهی قرار داشتند (شکل ۲).

تغییرات میزان فلاونوئید کل: بالاترین میزان فلاونوئید کل مربوط به عصاره متانولی (۳۷/۳ میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه) در مرحله گلدهی گیاه و کمترین مقدار آن مربوط به عصاره آبی (۱۲/۶ میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه) در مرحله بذردهی گیاه مشاهده شد. مقایسه میزان فلاونوئید کل در مراحل مختلف فنولوژی نشان داد که مرحله گلدهی گیاه بیشترین و مرحله بذردهی آن کمترین میزان فلاونوئید کل را دارا بود (شکل ۳).

جدول ۱. تجزیه واریانس تأثیر مراحل فنولوژی و حلال مورد استفاده بر میزان فنل کل، فلاونوئید کل، تانن کل، آلکالوئید کل، ساپونین کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (احیاءکنندگی آهن (FRAP)، مهار رادیکال آزاد DPPH، مهار رادیکال آزاد ABTS) گونه کک کش بیابانی(*Pulicaria gnaphalodes*)

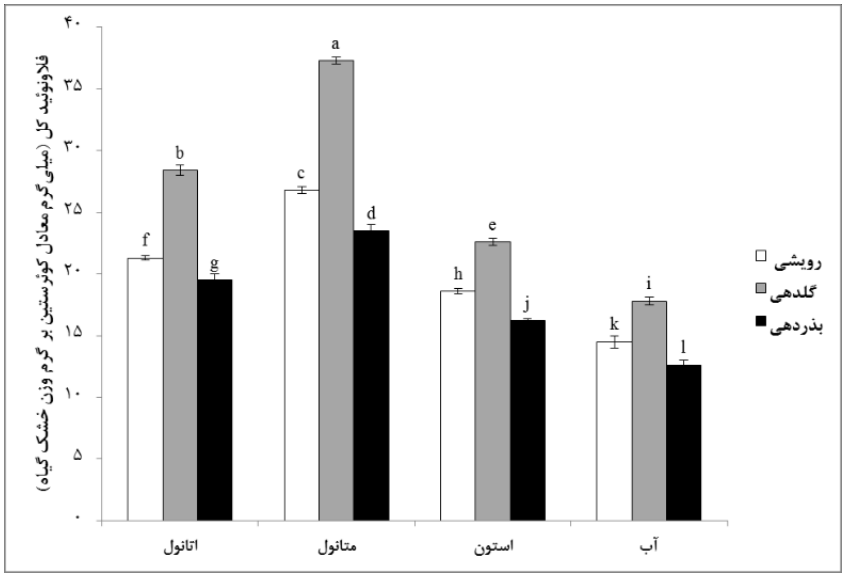
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات							
		فنل کل	فلاونوئید کل	تانن کل	آلکالوئید کل	ساپونین کل	احیاء یون‌های فریک (FRAP)	مهار رادیکال‌های آزاد DPPH	مهار رادیکال‌های آزاد ABTS
مرحله فنولوژی	۲	۱۲۰۸/۷۷۵*	۲۳۵/۶۰۷*	۶۱۲/۴۵۸*	۱۱۵۷/۷۴۸*	۱۳۳۷۸/۱۷۰*	۳۵۵/۴۸۸*	۱۳۷۹/۵۲۹*	۱۳۲۰/۹۷۲*
حلال	۳	۱۵۱۷/۷۲۰*	۳۲۹/۹۸۹*	۸۱۸/۳۳۷*	۲۹۱۷/۱۳۳*	۱۴۳۴۸/۰۰۳*	۱۰۳۷/۰۴۳*	۱۵۸۴/۷۴۰*	۱۶۳۸/۸۵۶*
مرحله‌فنولوژی*حلال	۶	۱۶/۷۵۸*	۱۲/۹۱۴*	۲۵/۳۹۰*	۱۲/۵۳۱*	۱۶۷/۷۰۳*	۱۲/۹۱۳*	۶/۷۳۲*	۲۴/۳۹۱*
خطا	۲۴	۰/۰۷۲	۰/۱۲۹	۰/۱۱۹	۰/۱۳۹	۰/۱۲۶	۰/۱۳۹	۰/۱۱۸	۰/۱۰۶
کل	۳۶								

*معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد

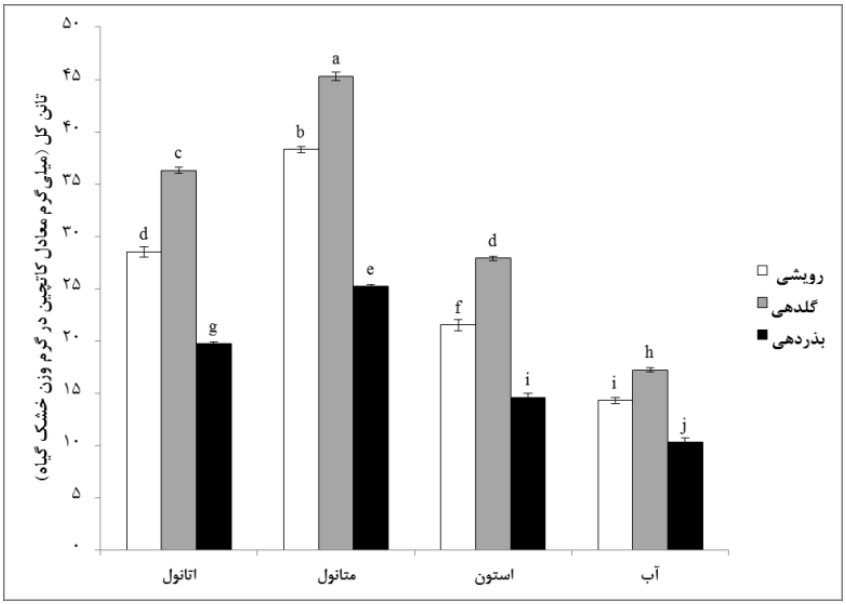


شکل ۲: تغییرات میزان فنل کل در عصاره‌های مختلف گونه کک کش بیابانی(*Pulicaria gnaphalodes*) در مراحل مختلف فنولوژی (حروف متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است)

تغییرات میزان تانن کل: بیشترین میزان تانن کل (۴۵/۳ میلی‌گرم معادل کاتچین در گرم وزن خشک گیاه) مربوط به عصاره متانولی در مرحله گلدهی گیاه و کمترین مقدار آن مربوط به عصاره آبی (۱۰/۳ میلی‌گرم معادل کاتچین بر گرم وزن خشک گیاه) در مرحله بذردهی گیاه مشاهده شد (شکل ٤). مراحل گلدهی، رویشی و بذردهی گیاه مورد مطالعه به‌ترتیب از بیشترین میزان تانن کل برخوردار بودند.

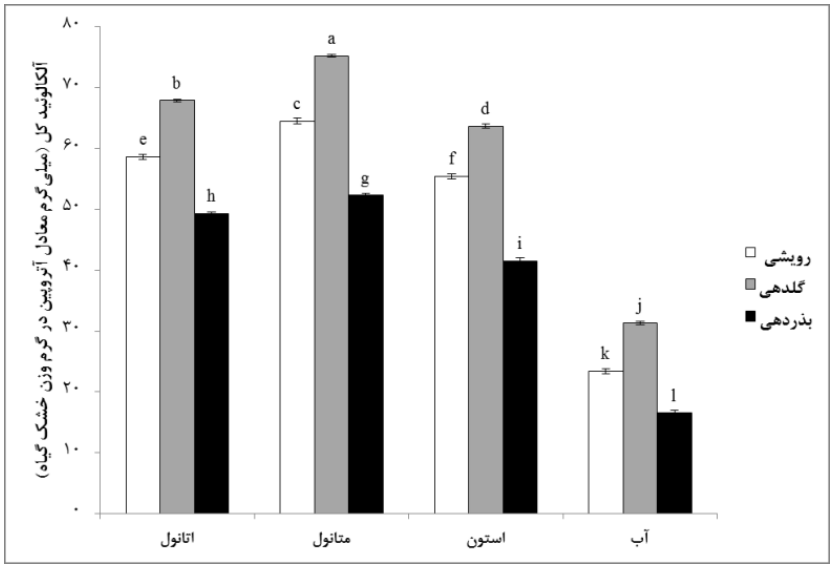


شکل ۳: تغییرات میزان فلاونوئید کل در عصاره‌های مختلف گونه کک کش بیابانی (*Pulicaria gnaphalodes*) در مراحل مختلف فنولوژی (حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است)



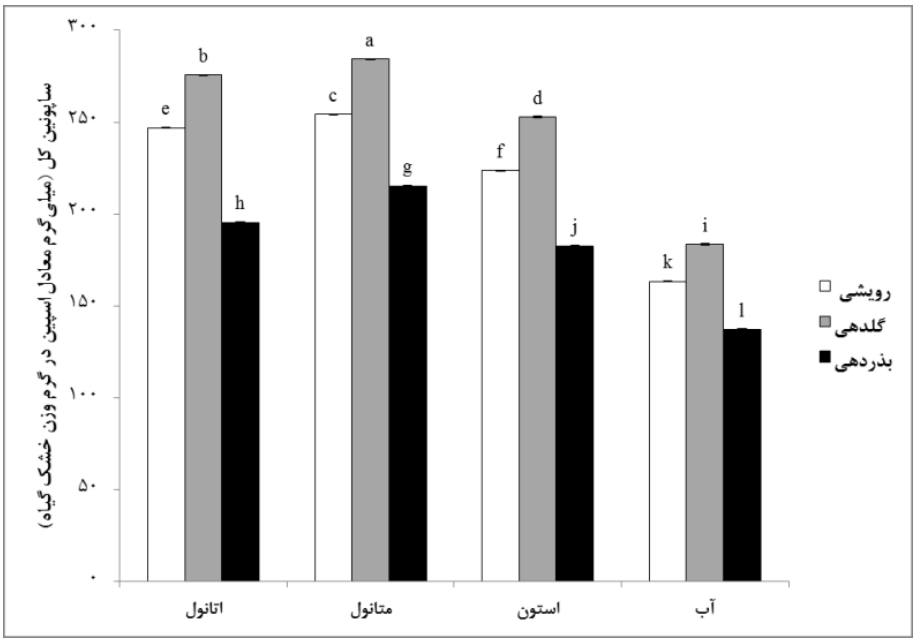
شکل ٤: تغییرات میزان تانن کل در عصاره‌های مختلف گونه کک کش بیابانی(*Pulicaria gnaphalodes*) در مراحل مختلف فنولوژی (حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است).

تغییرات میزان آلکالوئید کل: بیشترین میزان آلکالوئید کل (۷۵/۲ میلی‌گرم معادل آتروپین در گرم وزن خشک گیاه) مربوط به عصاره متانولی در مرحله گلدهی گیاه و کمترین مقدار آن (١٦/٥ میلی‌گرم معادل آتروپین در گرم وزن خشک گیاه) برای عصاره آبی در مرحله بذردهی گیاه ثبت گردید. در بین مراحل مختلف فنولوژی، مرحله گلدهی بیشترین و مرحله بذردهی کمترین میزان تانن کل را دارا بود (شکل ۵).



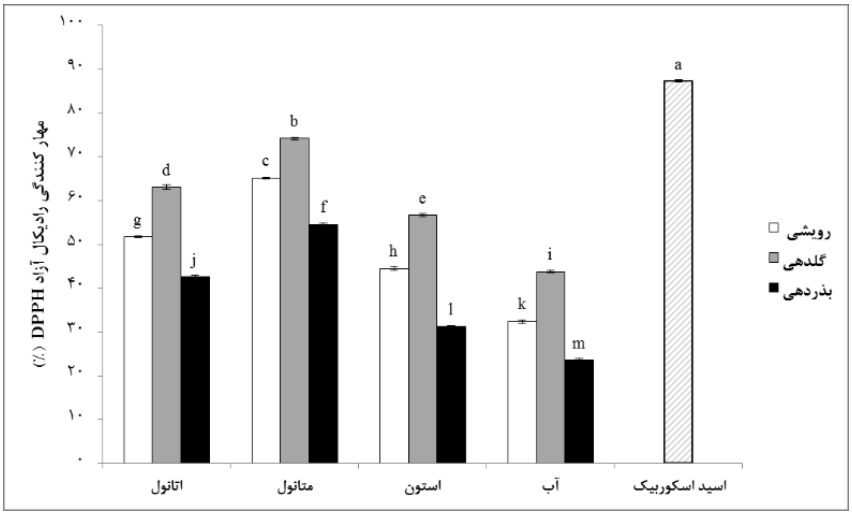
شکل ۵: تغییرات میزان آلکالوئید کل در عصاره‌های مختلف گونه کک کش بیابانی(*Pulicaria gnaphalodes*) در مراحل مختلف فنولوژی (حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است).

تغییرات میزان ساپونین کل: شکل ٦ تغییرات میزان ساپونین کل در عصاره‌های مختلف در مراحل مختلف فنولوژی را نشان می‌دهد که بر اساس آن بیشترین میزان ساپونین کل برای عصاره متانولی (۲۸٤/۳ میلی‌گرم معادل اسپین در گرم وزن خشک گیاه) در مرحله گلدهی گیاه و کمترین مقدار آن برای عصاره آبی گیاه (۱۳۷/۱ میلی‌گرم معادل اسپین در گرم وزن خشک گیاه) در مرحله بذردهی بدست آمد. در بین مراحل مختلف فنولوژی، مرحله گلدهی بیشترین و مرحله بذردهی کمترین میزان ساپونین کل را دارا بود.

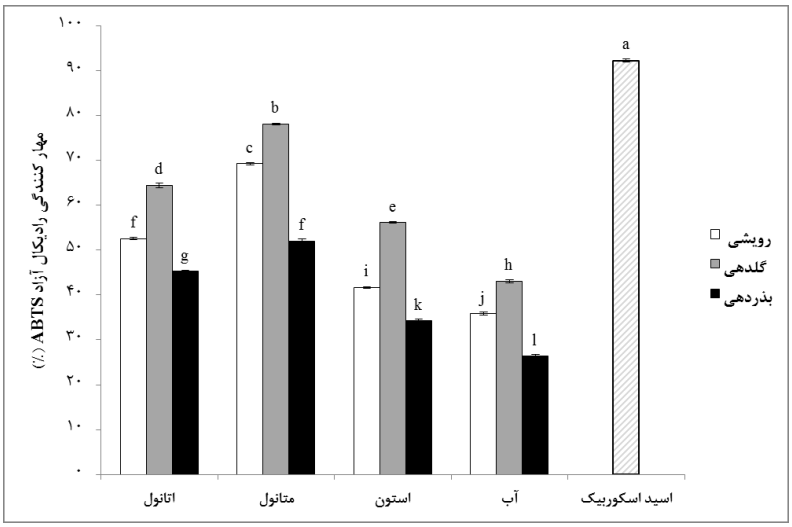


شکل ٦: تغییرات میزان ساپونین کل در عصاره‌های مختلف گونه کک کش بیابانی(*Pulicaria gnaphalodes*) در مراحل مختلف فنولوژی (حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است).

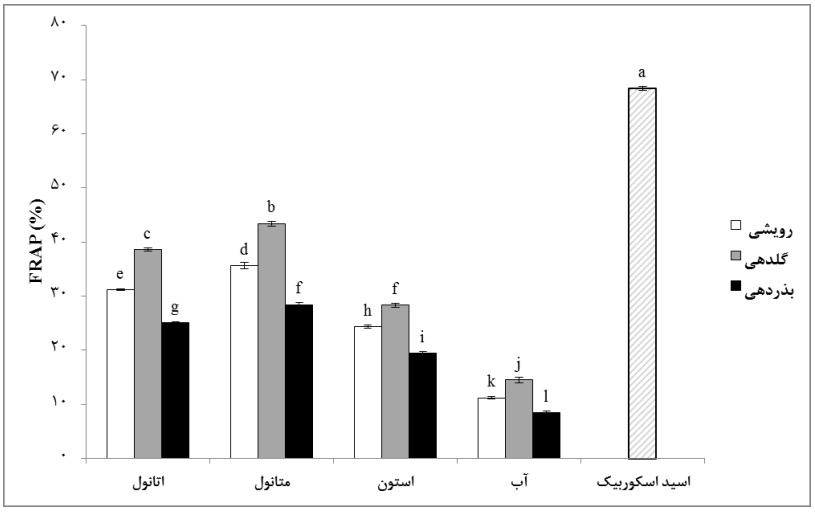
فعالیت آنتی‌اکسیدانی: در این بخش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش های مهار رادیکال‌های آزاد DPPH ، ABTS و احیاء یون‌های فریک (FRAP) موردمطالعه قرار گرفت (شکل‌های ۷، ۸ و ۹). بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی با روش‌های مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (٧٤/٢ درصد)، ABTS (٧٨/٢ درصد) و FRAP (٤٣/٤ درصد) متعلق به عصاره متانولی گیاه در مرحله گلدهی گیاه و کمترین میزان آن‌ها در عصاره آبی مرحله بذردهی گونه مورد مطالعه اندازه‌گیری شد.



شکل ۷: توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره‌های مختلف گونه کک کش بیابانی(*Pulicaria gnaphalodes*) در مراحل مختلف فنولوژی (حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است)



شکل ۸: توانایی مهار رادیکال آزاد ABTS توسط عصاره‌های مختلف گونه کک کش بیابانی(*Pulicaria gnaphalodes*) در مراحل مختلف فنولوژی (حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است).



شکل ۹: توانایی احیاکنندگی یون آهن FRAP توسط عصاره‌های مختلف گونه کک کش بیابانی (*Pulicaria gnaphalodes*) در مراحل مختلف فنولوژی (حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است)

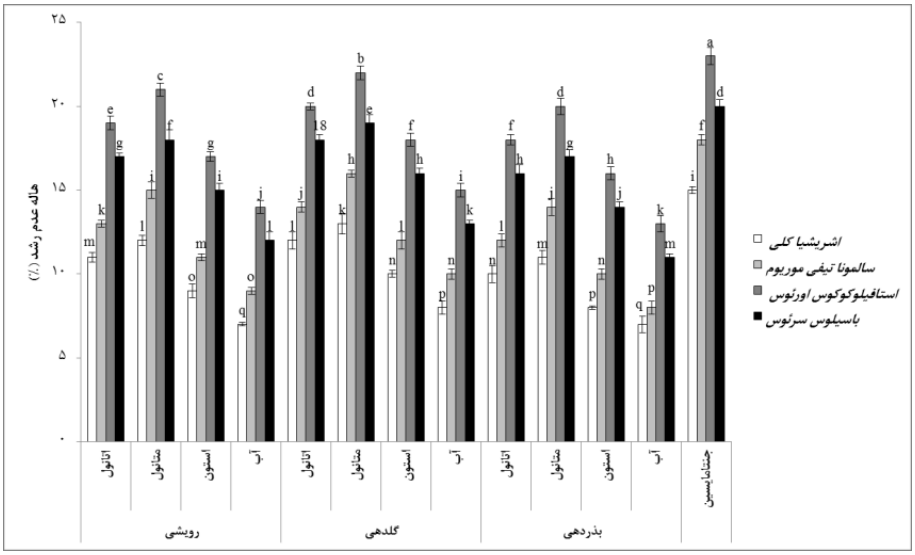
فعالیت ضد باکتریایی

روش انتشار دیسک: نتایج بررسی در همه مراحل فنولوژی نشان داد که قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم مثبت (*S. aureus* و *B. cereus*) بزرگتر از باکتری‌های گرم منفی (*E. coli* و *S. typhimurium*) می‌باشد. بیشترین قطر هاله عدم رشد (۰/٤ ± ۲۲ میلی‌متر) متعلق به باکتری *S. aureus* و برای عصاره متانولی در مرحله گلدهی گیاه و کمترین قطر هاله عدم رشد (۰/۵ ± ۷ میلی‌متر) در مقابل باکتری *E. coli* برای عصاره آبی گیاه در مرحله بذردهی مشاهده گردید (شکل ۱۰). در بین مراحل مختلف فنولوژی مرحله گلدهی گیاه بیشترین فعالیت ضد باکتریایی و مرحله بذردهی کمترین میزان فعالیت ضدباکتریایی را نشان دادند. بر اساس نتایج، عصاره‌های گیاهی اثرگذاری بیشتری بر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی مورد مطالعه داشتند.

جدول ۲: تجزیه واریانس تأثیر مراحل فنولوژی و حلال مورد استفاده بر میزان فعالیت ضدباکتریایی گونه کک کش بیابانی (*Pulicaria gnaphalodes*)

منابع تغییرات	درجه آزادی	*E. coli*	*S. typhimurium*	*S. aureus*	*B. cereus*
مرحله فنولوژی	۲	۹/۲۵۰*	۱۲/۰۰۰*	۱۲/۰۰۰*	۱۲/۰۰۰*
حلال	۳	۳۹/۰۰۰*	٦۰/۰۰۰*	۸۰/۲۵۰*	٦۳/۰۰۰*
مرحله فنولوژی*حلال	٦	۲/۲۵۰*	۲/۳۰۰*	۱/٤۲۰*	۳/۲۰۰*
خطا	۲٤	۰/۱۵۳	۰/۱۲۵	۰/۱۵۳	۰/۱۵۲
کل	۳٦				

*معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد



شکل ۱۰: قطر هاله عدم رشد عصاره‌های مختلف گونه کک کش بیابانی(*Pulicaria gnaphalodes*) بر روی باکتری‌های موردمطالعه در مراحل مختلف فنولوژی (حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است)

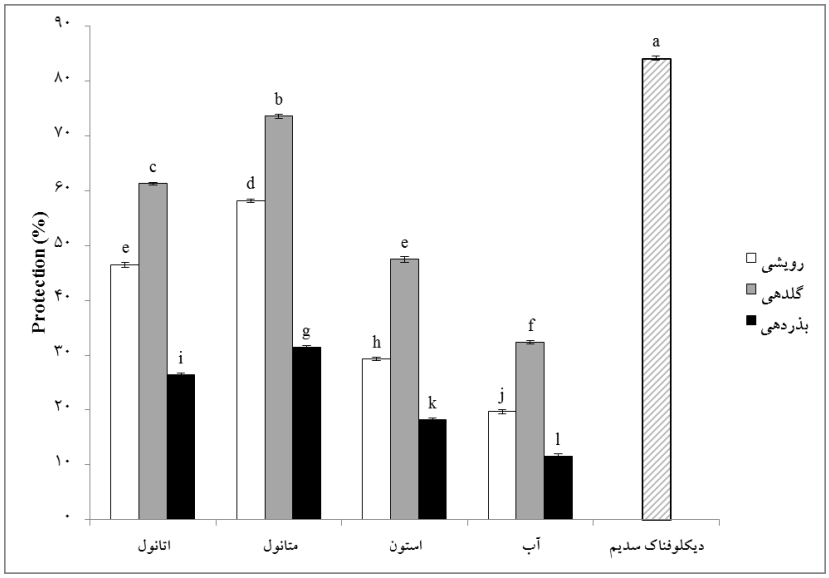
حداقل غلظت کشندگی (MBC) و حداقل غلظت مهار (MIC): در جدول ۳ نتایج مربوط به حداقل غلظت مهار (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های مختلف گونه کک‌کش بیابانی در مراحل فنولوژی برای باکتری های مورد مطالعه ارائه شده است.

جدول ۳: حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های مختلف کک کش بیابانی(*Pulicaria gnaphalodes*) در مراحل مختلف فنولوژی

مرحله فنولوژی	حلال	*S. aureus*		*B. cereus*		*S. typhimurium*		*E. coli*	
		MIC (میکروگرم بر میلی-لیتر)	MBC (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	MIC (میکروگرم بر میلی-لیتر)	MBC (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	MIC (میکروگرم بر میلی-لیتر)	MBC (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	MIC (میکروگرم بر میلی-لیتر)	MBC (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
رویشی	متانول	۷/۸۱	۱۵/۶۲	۷/۸۱	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵
	اتانول	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۶۲/۵	۱۲۵
	استون	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰
	آب	۶۲/۵	۱۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰
گلدهی	متانول	۷/۸۱	۱۵/۶۲	۷/۸۱	۱۵/۶۲	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵
	اتانول	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۶۲/۵	۱۲۵
	استون	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۶۲/۵	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰
	آب	۶۲/۵	۱۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۵۰۰
بذردهی	متانول	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۶۲/۵	۱۲۵
	اتانول	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۶۲/۵	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰
	استون	۶۲/۵	۱۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۵۰۰
	آب	۱۲۵	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰

حداقل غلظت مهارکنندگی گونه مورد مطالعه در مرحله رویشی گیاه مربوط به عصاره متانولی و برای باکتری‌های *S. aureus* ، *B. cereus* ، *S. typhimurium* و *E. coli* به ترتیب برابر با ۷/۸۱ ،۷/۸۱ ،۳۱/۲۵ و ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود درحالی که حداقل غلظت کشندگی در برابر این باکتری‌ها به ترتیب برابر با ۱۵/۱۵،۶۲/۶۲، ۶۲/۵ و ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت مهارکنندگی در مرحله گلدهی گیاه مربوط به عصاره متانولی و در برابر باکتری *S. aureus* ، *B. cereus* ، *S. typhimurium* و *E. coli* به ترتیب برابر با ۷/۸۱ ،۷/۸۱ ،۱۵/۶۲و ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و حداقل غلظت کشندگی در برابر این باکتری‌ها به ترتیب برابر با ۱۵/۶۲، ۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵ و ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت مهارکنندگی در برابر باکتری‌های *S. aureus* ، *B. cereus* ، *S. typhimurium* و *E. coli* در مرحله بذردهی گیاه نیز مربوط به عصاره متانولی و به ترتیب برابر با ۱۵/۶۲، ۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵ و ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و حداقل غلظت کشندگی در برابر باکتری‌های مذکور به ترتیب برابر با ۳۱/۲۵، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

فعالیت ضد التهابی: نتایج ارزیابی فعالیت ضد التهابی عصاره‌های مختلف گونه مورد مطالعه در مراحل مختلف فنولوژیک در شکل 11 ارائه شده است. بالاترین میزان فعالیت ضد التهابی برای عصاره متانولی گونه مورد مطالعه در مرحله گلدهی (۰/٤± ۷۳/٦ درصد) و کمترین میزان آن برای عصاره آبی در مرحله بذردهی گیاه (۰/۵± ۱۱/۵ درصد) به ثبت رسید. نتایج نشان داد که برای تمامی عصاره‌های مورد مطالعه، مرحله گلدهی گیاه بالاترین میزان فعالیت ضد التهابی را به خود اختصاص داد و پس از آن به ترتیب مراحل رویشی و بذردهی گیاه قرار داشتند.



شکل ۱۱: فعالیت ضد التهابی عصاره‌های مختلف گونه کک کش بیابانی(*Pulicaria gnaphalodes*) در مراحل مختلف فنولوژی (حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است)

بحث

در تأیید نتایج تحقیق حاضر، پژوهش‌های زیادی نشان داده‌اند که استفاده از حلال‌های مختلف برای عصاره‌گیری از گیاهان و مراحل مختلف فنولوژی آن‌ها بر میزان ترکیبات شیمیایی حاصل اثرگذار است. Baradaran و همکاران (۲۰۱٤) فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف گیاه *Artemisia Annua* را با استفاده از حلال‌های آبی، اتانولی و متانولی تهیه و با روش FRAP خواص آنتی‌اکسیدانی تعیین کردند و اعلام کردند که متانول حلال بهتری از آب و اتانول جهت استخراج مواد آنتی‌اکسیدانی گیاه درمنه می‌باشد و بیشتر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در برگ‌های گیاه در مرحله رویشی وجود دارند. Afshari و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ای که بر روی گونه *Achillea pachycephala* انجام دادند بیان کردند که میزان فلاونوئید کل در گونه کک‌کش در مراحل مختلف فنولوژی متفاوت است به‌طوری‌که بیشترین میزان فلاونوئید کل در مرحله ۵۰ درصد گلدهی گونه اندازه‌گیری شد و کمترین میزان آن در مرحله رویشی گیاه مشاهده گردید. همچنین Fazeli-Nasab و همکاران (۲۰۲۱) به بررسی اثر حلال عصاره‌گیری (استونی، هیدروالکلی، آبی و متانولی) بر میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برخی گیاهان دارویی بومی ایران پرداختند. نتایج نشان داد که نوع عصاره، برهمکنش عصاره و گیاه می‌تواند تأثیر متفاوتی بر خواص آنتی‌اکسیدانی، محتوای فلاونوئید و فنل داشته باشد. Touati و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره های متانولی، استونی و کلروفرمی گیاه *Pulicaria odora* بیان کردند که عصاره متانولی دارای بالاترین میزان ترکیبات فیتوشیمیایی و فعالیت ضدباکتریایی است. با توجه به مطالعات انجام شده میزان تجمع ترکیبات فلاونوئیدی در گیاهان جوان بیشتر است و با بالارفتن سن گیاه از مقدار آن کم می‌شود (Wang et al., 2022). در تحقیق حاضر نیز گیاه مورد مطالعه در مرحله رویشی و گلدهی از میزان فلاونوئید کل بیشتری برخوردار بود و با افزایش سن گیاه و در مرحله بذردهی مقدار آن کاهش یافت. ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، تانن کل، آلکالوئید کل، ساپونین کل ازجمله مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه گیاهی با خواص بیولوژیکی زیادی هستند. همانند تحقیقات قبلی در پژوهش حاضر نیز میزان ترکیبات ذکرشده در مراحل مختلف فنولوژی متفاوت بود به‌طوری‌که بیشترین مقدار آن‌ها در مرحله گلدهی و کمترین مقدار آن‌ها در مرحله بذردهی گیاه ثبت گردید. همچنین حلاهای عصاره گیری نیز اثر معنی‌داری بر میزان استخراج ترکیبات فیتوشیمیایی داشتند به طوری که متانول بیشترین میزان استخراج و آب کمترین میزان استخراج این ترکیبات را به خود اختصاص دادند.

ترکیبات فلاونوئیدی، آلکالوئیدی، فنلی و ساپونینی موجود در گیاهان دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌باشند و تغییرات میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با میزان حضور این ترکیبات در عصاره‌ها رابطه مستقیمی دارند (Hayat et al., 2020). بنابراین با توجه به مراحل مختلف فنولوژی می‌توان گفت که گونه کک‌کش بیابانی در مرحله گلدهی و استفاده از عصاره متانولی دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به مراحل دیگر می‌باشد و در مرحله بذردهی و استفاده از عصاره آبی از کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به مراحل دیگر برخوردار می باشد. بطور کلی نتایج حاصل نشان‌دهنده اثرات معنی‌دار مراحل مختلف فنولوژی و نوع حلال مورد استفاده بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن بود. در بسیاری از مطالعات ارتباط مثبت بین محتوای پلی فنل‌ها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزارش گردیده است و از جمله مکانیسم‌های این ترکیبات غیرفعال نمودن رادیکال‌های آزاد لیپیدی و همچنین

جلوگیری از تجزیه هیدروپروکسیدها به رادیکال‌های آزاد و همچنین توانایی آن‌ها در کلات کردن یون های فلزی، بیان‌شده است (Gebicki and Nauser, 2021). در این ارتباط نتایج مطالعه Iqbal و همکاران (۲۰۱۲) جهت تعیین اثرات آنتی‌اکسیدانی گیاه *Artemisia Annua* نشان داد که در روش های ABTS و DPPH عصاره های متانولی برگ های گیاه درمنه نسبت به عصاره‌های حاصل از حلال‌های آب، اتانول، هگزان و کلروفرم از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری برخوردار بود.Kozarević Cilović و همکاران (۲۰۲۲) با بررسی عصاره متانولی گیاه *Pulicaria dysenterica* بیان کردند که عصاره متانولی آن به‌دلیل دارا بودن میزان ترکیبات فعال زیستی بیشتر از فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی برخوردار است. در مطالعه حاضر رابطه مستقیمی بین میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، تاننی، آلکالوئیدی و ساپونینی با میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی دیده شد و همچنین نتایج نشان داد که تغییرات میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی از الگوی تغییرات میزان ترکیبات ذکر شده پیروی می‌کند و بالارفتن میزان این ترکیبات منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها می‌گردد.

عصاره‌های گیاهی با توجه به داشتن خاصیت آب‌گریزی قادر به برقراری پیوند با لایه لیپیدی غشای سلولی باکتری‌ها می‌باشند (Hemeg et al., 2020). نتایج حاصل از مطالعات نشان داده است که افزایش ترکیبات ثانویه سبب افزایش فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی می‌شود (Arip et al., 2022). به طور کلی در مطالعه حاضر، باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی در برابر عصاره‌های گیاهی نشان دادند. در واقع باکتری‌های گرم مثبت به عصاره‌های گیاهی حساسیت بیشتری نسبت به باکتری های گرم منفی دارند. این ممکن است به دلیل تحمل ذاتی باکتری‌های گرم منفی و ماهیت ترکیبات گیاهی باشد. بر اساس مطالعات، دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی، به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها، ترکیبات شیمیایی ضدمیکروبی و بسیاری از ترکیبات فیتوشیمیایی حساس‌تر است. دارا بودن دیواره لیپوپلی‌ساکاریدی و فضای پری پلاسمیک باکتری‌های گرم منفی از دلایل مقاومت نسبی آن‌ها به شمار می‌رود (Vuong, 2021). همسو با نتایج تحقیق حاضر، جمشیدی مقدم و همکاران (۱۳۹۹) فعالیت ضدباکتریایی عصاره آبی اندام های هوایی گونه *P. gnaphalodes* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن ها نشان دهنده اثرات بازدارندگی بیشتر عصاره در مقابل باکتری های گرم مثبت در قیاس با باکتری های گرم منفی بود.

در این مطالعه روش پایداری غشای گلبول قرمز انسان برای ارزیابی فعالیت ضد التهابی استفاده شد که این امر به دلیل شباهت غشای گلبول قرمز به غشای لیزوزومی است (Giessler et al., 1982) و تثبیت آن‌ها به این معنی است که عصاره گونه مورد مطالعه قادر است غشاهای لیزوزومی را نیز تثبیت کند. در فرآیند التهاب، ترکیبات لیزوزومی وارد سیتوزول می‌شوند و با آسیب رساندن به بافت‌های مجاور، اختلالات مختلفی ایجاد می کنند (Sadique et al., 1989). مطالعات نشان داده است که عصاره‌های گیاهی قادرند از آزاد شدن ترکیبات لیزوزومی توسط نوتروفیل‌ها در محل التهاب جلوگیری کنند (Govindappa et al., 2011). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که رابطه مستقیمی بین فعالیت ضد التهابی و محتوای فنل کل، فلاونوئید کل، تانن کل، آلکالوئید کل و ساپونین کل وجود دارد. مطالعات متعددی نشان داده است که این مواد فیتوشیمیایی دارای خواص ضد التهابی مناسبی هستند (Gunathilake et al., 2018; Yesmin et al., 2020).

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر، عصاره‌های مختلف گونه کک کش بیابانی(*Pulicaria gnaphalodes*) در مراحل مختلف فنولوژی از نظر محتوای فنلی، فلاونوئیدی، تانن و آلکالوئیدی، ساپونینی و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و ضد التهابی مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج، عصاره‌های گونه مورد مطالعه دارای مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، تانن، آلکالوئیدی و ساپونینی هستند. همچنین تمامی عصاره‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسبی بودند. نتایج نشان دهنده رابطه مستقیم بین میزان ترکیبات شیمیایی (فنل کل، فلاونوئید کل، تانن کل، آلکالوئید کل و ساپونین کل) با میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود. عصاره متانولی گونه مورد مطالعه در مرحله گلدهی از بالاترین میزان ترکیبات شیمیایی و بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برخوردار بود. نتایج ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی نشان داد عصاره‌های مختلف گونه مورد مطالعه اثر بازدارندگی مناسبی در برابر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دارند. نتایج نشان داد که عصاره متانولی مرحله گلدهی گیاه مورد مطالعه بیشترین اثرگذاری را بر روی باکتری‌های مورد مطالعه داشت. همچنین عصاره‌های گونه مورد مطالعه دارای فعالیت ضدالتهابی مناسبی بودند و بالاترین فعالیت ضد التهابی برای عصاره متانولی گونه مورد مطالعه در مرحله گلدهی گیاه اندازه‌گیری شد. با در نظر گرفتن تمامی عصاره‌ها می‌توان بیان کرد که گونه مورد مطالعه در مرحله گلدهی از بالاترین میزان ترکیبات شیمیایی و فعالیت زیستی برخوردار است و در بین عصاره‌های مختلف، عصاره متانولی و آبی گونه مورد مطالعه در مراحل مختلف فنولوژی به ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان ترکیبات شیمیایی و فعالیت زیستی بودند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه زابل انجام شده است (شماره گرنت: IR–UOZ–GR– 9186).

References

Abubakar, A.R., and Haque, M. 2020. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. Journal of pharmacy & bioallied sciences, 12(1): 1-11.

Adebayo, S.A., Dzoyem, J.P., Shai, L.J., and Eloff, J.N. 2015. The anti-inflammatory and antioxidant activity of 25 plant species used traditionally to treat pain in southern African. BMC complementary and alternative medicine, 15: 1-10.

Afshari, M., Rahimmalek, M., and Miroliaei, M. 2019. Influence of different phonological stage of *Achillea pachycephala* Rech.f. on albumin glycation inhibition, an in vitro study, Molecular and Cellular Researches, 32(3): 274-285.

Alam, M.Z., Alhebsi, M.S., Ghnimi, S., and Kamal-Eldin, A. 2021. Inability of total antioxidant activity assays to accurately assess the phenolic compounds of date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.). NFS Journal, 22: 32-40.

Arip, M., Selvaraja, M., Tan, L.F., Leong, M.Y., Tan, P.L., Yap, V.L., Chinnapan, S., Tat, N.C., Abdullah, M., and Jubair, N. 2022. Review on plant-based management in combating antimicrobial resistance-mechanistic perspective. Frontiers in Pharmacology, 13: 879495.

Arya, O.P., Bhatt, I.D. and Mohanty, K., 2024. Effect of different extraction solvents on bioactive phenolics and antioxidant potential of *Illicium griffithii* fruit. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 40, p.100547.

Baradaran, M., Ashrafpour, M., Rezaee, H., Sefidgar, A., and Sharifi, H. 2014. Antioxidant activity of different extracts of the *Artemisia Annua* growing in an area of Babol city. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 21(4): 529-539.

Barbieri, R., Coppo, E., Marchese, A., Daglia, M., Sobarzo-Sánchez, E., Nabavi, S.F., and Nabavi, S.M. 2017. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. Microbiological research, 196: 44-68.

Bauer, A.W. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. American Journal of Clinical Pathology, 45:149-158.

Borges, A., J Saavedra, M., and Simoes, M. 2015. Insights on antimicrobial resistance, biofilms and the use of phytochemicals as new antimicrobial agents. Current medicinal chemistry, 22(21): 2590-2614.

Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N.A., and Kumar, S. 2017. Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. Arabian journal of chemistry, 10: S1193-S1199.

Chatepa, L.E.C., Mwamatope, B., Chikowe, I. and Masamba, K.G., 2024. Effects of solvent extraction on the phytoconstituents and in vitro antioxidant activity properties of leaf extracts of the two selected medicinal plants from Malawi. BMC Complementary Medicine and Therapies, 24(1), p.317.

Fazeli-Nasab, B., Ghafari, M., and Saravani, S. 2021. The effects of different solvents on the growth-inhibitory activity of *Rhazya stricta* extract against antibiotic-resistant *Escherichia coli*. Gene, Cell and Tissue, 8(2): e112146.

Formagio, A.S.N., Volobuff, C.R.F., Santiago, M., Cardoso, C.A.L., Vieira, M.D.C., and Pereira, Z.V. 2014. Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in *Psychotria* leaf extracts. Antioxidants, 3(4): 745-757.

Gebicki, J.M., and Nauser, T. 2021. Fast antioxidant reaction of polyphenols and their metabolites. Antioxidants, 10(8): 1297-1311.

Giessler, A.J., Bekemeier, H., Hischelamann, R., and Bakatheir, H.A. 1982. Pharmacology, Biochemistry and Immunology of Inflammatory Reaction. Halle-Wittenberg, Martin Luther University.

Govindappa, M., Naga, S.S., Poojashri, M.N., Sadananda, T.S., and Chandrappa, C.P. 2011. Antimicrobial, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity of ethanol extract and active phytochemical screening of *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. Journal of pharmacognosy and phytotherapy, 3(3): 43-51.

Gunathilake, K.D.P.P., Ranaweera, K.K.D.S., and Rupasinghe, H.V. 2018. In vitro anti-inflammatory properties of selected green leafy vegetables. Biomedicines, 6(4), p.107.

Hayat, J., Akodad, M., Moumen, A., Baghour, M., Skalli, A., Ezrari, S., and Belmalha, S. 2020. Phytochemical screening, polyphenols, flavonoids and tannin content, antioxidant activities and FTIR characterization of *Marrubium vulgare* L. from 2 different localities of Northeast of Morocco. Heliyon, 6(11): e05609.

Hemeg, H.A., Moussa, I.M., Ibrahim, S., Dawoud, T.M., Alhaji, J.H., Mubarak, A.S., Kabli, S.A., Alsubki, R.A., Tawfik, A.M., and Marouf, S.A. 2020. Antimicrobial effect of different herbal plant extracts against different microbial population. Saudi Journal of Biological Sciences, 27(12): 3221-3227.

Iqbal, S., Younas, U. ,Chan, K.W., Zia-Ul-Haq, M., and Ismail, M. 2012. Chemical composition of *Artemisia annua* L. leaves and antioxidant potential of extracts as a function of extraction solvents. Molecules, 17: 6020-6032.

Jamshidi-Moghaddam, Y., Rajabizadeh, A. and Khazaeli, P., 2020. Antibacterial effects *Pulicaria gnaphalodes* extract on some gram positive and negative bacteria. Feyz Medical Sciences Journal, 24(5), pp.516-524.

Kamkar, A., Ardekani, M.R.S., Shariatifar, N., Misagi, A., Nejad, A.S.M., and Jamshidi, A.H. 2013. Antioxidative effect of Iranian *Pulicaria gnaphalodes* L. extracts in soybean oil. South African Journal of Botany, 85: 39-43.

Khan, M., Khan, M., Adil, S.F., and Alkhathlan, H.Z. 2022. Screening of potential cytotoxic activities of some medicinal plants of Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences, 29(3): 1801-1807.

Ko, M.J., Nam, H.H., and Chung, M.S. 2020. Subcritical water extraction of bioactive compounds from *Orostachys japonicus* A. Berger (Crassulaceae). Scientific Reports, 10(1): 10890-10898.

Kozarević Cilović, E., Dautović, E., Halilčević, D., Softić, A., Srabović, N., Šarić-Kundalić, B., Delić, N., Kolarević, L., Mekić, L., Ibišević, M. and Horozić, E., 2022. Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Pulicaria dysenterica* Methanol Extracts. International Research Journal of Pure and Applied Chemistry, 23(5), pp.23-32.

Lee, H.D., Tonog, G., Uy, N.P., Lee, Y., Kim, K.Y., Kim, H. and Lee, S., 2024. Phytochemical Profile, Antioxidant, Anti-Atopic, and Anti-Inflammatory Activities of *Filipendula glaberrima* Nakai at Different Growth Stages. Pharmaceuticals, 17(7), p.928.

Li, L.S., Chiroma, S.M., Hashim, T., Adam, S.K., Moklas, M.A.M., Yusuf, Z., and Rahman, S.A. 2020. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Erythroxylum cuneatum* alkaloid leaf extract. Heliyon, 6(6): e04141.

Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M.R., and Wu, H. 2020. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. Plant Physiology and Biochemistry, 148: 80-89.

Mandal, S.M., Roy, A., Ghosh, A.K., Hazra, T.K., Basak, A., and Franco, O.L. 2014. Challenges and future prospects of antibiotic therapy: from peptides to phages utilization. Frontiers in pharmacology, 5: 105-114.

Mazandarani, M., Moghaddam, Z., Zolfaghari, M.R., Ghaemi, E.A., and Bayat, H. 2012. Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in *Onosma dichroanthum* Boiss. Journal of Medicinal Plants Research, 6(28): 4481-4488.

Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., and Nacoulma, O.G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food chemistry, 91(3): 571-577.

Mogana, R., Adhikari, A., Tzar, M.N., Ramliza, R., and Wiart, C.J.B.C.M. 2020. Antibacterial activities of the extracts, fractions and isolated compounds from *Canarium patentinervium* Miq. against bacterial clinical isolates. BMC complementary medicine and therapies, 20: 1-11.

Naqvi, S.A.R., Shah, S.M.A., Kanwal, L., Saeed, M., Atta-ul-Haq, Nisar, J., Nisar, Z., and Akram, M. 2020. Antimicrobial and antihypercholesterolemic activities of *Pulicaria gnaphalodes*. Dose-Response, 18(1): 1559-1567.

Parvin, M.S., Das, N., Jahan, N., Akhter, M.A., Nahar, L., and Islam, M.E. 2015. Evaluation of in vitro anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark. BMC research notes, 8: 1-7.

Pokhriyal, A., Prakash, S., and Patni, B. 2023. Comparative study on the biochemical profile and antioxidant activity of *Picrorhiza kurrooa* Rolye ex Benth. obtained from Uttarakhand. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2023: 1-14.

Sadique, J., Al-Rqobahs, W.A., Bughaith, E.I., and Gindi, A.R. 1989. The bioactivity of certain medicinal plants on the stabilization of RBC membrane system. Fitoterapia, 60: 525–532.

Sharifi-Rad, J., Hoseini-Alfatemi, S.M., Sharifi-Rad, M., and Teixeira da Silva, J.A. 2015. Antibacterial, antioxidant, antifungal and anti-inflammatory activities of crude extract from *Nitraria schoberi* fruits. 3Biotech, 5: 677-684.

Sikwese, F.E., and Duodu, K.G. 2007. Antioxidant effect of a crude phenolic extract from *Sorghum* bran in sunflower oil in the presence of ferric ions. Food chemistry, 104(1): 324-331.

Sostres, C., Gargallo, C.J., and Lanas, A. 2013. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper and lower gastrointestinal mucosal damage. Arthritis research & therapy, 15(3): 1-8.

Sulastri, E., Zubair, M.S., Anas, N.I., Abidin, S., Hardani, R., and Yulianti, R. 2018. Total phenolic, total flavonoid, quercetin content and antioxidant activity of standardized extract of *Moringa oleifera* leaf from regions with different elevation. Pharmacognosy journal, 10(6s): s104-s108.

Syed Amran, S.N., Zainal Abidin, N., Hashim, H., and Zubairi, S.I. 2018. Saponin bitterness reduction of *Carica papaya* leaf extracts through adsorption of weakly basic ion exchange resins. Journal of Food Quality, 2018: 1-15.

Touati, N., Saidani, K., Boudries, H., Hammiche, H., Ouazene, N. and Bedjou, F., 2018. Antibacterial activity of phenolic compounds of *Pulicaria odora*, wild plant in northern Algeria. International Food Research Journal, 25(5), pp.2021-2030.

Unuofin, J.O., Otunola, G.A., and Afolayan, A.J. 2018. Polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of *Vernonia mespilifolia* Less. Used in folk medicine in the Eastern Cape Province, South Africa. Journal of Evidence-Based Integrative Medicine, 23: 251-267.

Vane, J.R., and Botting, R.M. 1995. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. Inflammation Research, 44(1): 1-10.

Vuong, T.V. 2021. Natural products and their derivatives with antibacterial, antioxidant and anticancer activities. Antibiotics, 10(1): 70-84.

Wang, Q., Jiang, Y., Mao, X., Yu, W., Lu, J., and Wang, L. 2022. Integration of morphological, physiological, cytological, metabolome and transcriptome analyses reveal age inhibited accumulation of flavonoid biosynthesis in *Ginkgo biloba* leaves. Industrial Crops and Products, 187: 115405-115419.

Wang, S.Y., Kuo, Y.H., Chang, H.N., Kang, P.L., Tsay, H.S., Lin, K.F., Yang, N.S., and Shyur, L.F. 2002. Profiling and characterization antioxidant activities in *Anoectochilus formosanus* Hayata. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(7): 1859-1865.

Yesmin, S., Paul, A., Naz, T., Rahman, A.A., Akhter, S.F., Wahed, M.I.I., Emran, T.B., and Siddiqui, S.A. 2020. Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of ethanolic root extract of Choi (*Piper chaba*). Clinical phytoscience, 6: 1-10.