مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره چهارم (پیاپی ۲۱) زمستان ۱۳۹۳
صفحات ۲۹۸-۲۸۹

Original Article

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

مصطفی علم هولو[۱]، سنبل ناظری[۲*]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه بو علی سینا، همدان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی، [۲]استادیار، دانشگاه بو علی سینا، همدان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

چکیده

سابقه و هدف: افزایش روزافزون مقاومت دارویی به آنتی بیوتیک ها و حساسیت به ترکیبات شیمیایی ضدمیکروبی از جمله دلایل رویکرد محققان برای یافتن ترکیبات دارای خاصیت ضدمیکروبی با منشأ گیاهی است. این مطالعه با هدف بررسی خواص آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی عصاره های برگ و ساقه گیاه سیاه گینه علیه ۱۰ سویه باکتری بیماریزای انسانی انجام شد.

مواد و روش ها: گیاه سیاه گینه از ارتفاعات ۱۹۶۱ متر کوه الوند در استان همدان جمع آوری گردید. پس از شناسایی، عصاره ها به روش خیساندن تهیه شدند. در این مطالعه مقطعی، اثرات ضدباکتریایی به روش انتشار چاهک در آگار، MIC (به روش رقت لوله ای) و MBC مشخص شدند. خواص آنتی اکسیدانی به روش DPPH و میزان فنل و فلاونوئید کل به روش فولین سیو کالتو و آلومینیوم کلرید اندازه گیری گردید.

یافته ها: بیشترین هاله بازدارندگی با قطر ۰/۶±۲۷/۳ میلی متر در کشت باکتری *میکروکوکوس لوتئوس* روی عصاره اتانولی ساقه مشاهده شد. MIC و MBC عصاره ساقه در مقایسه با برگ کمتر بود. عصاره متانولی ساقه در غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد داشت. بیشترین میزان فنل ۰/۵±۷۹/٤ (*mgGAE/g*) و فلاونوئید ۰/۱±۲/۱ (*mgQ/g*) به ترتیب در عصاره متانولی ساقه و برگ به دست آمد.

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

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

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: آبان ماه ۹۳

مقدمه

گیاهان و تولیدات طبیعی آنها ذخیره ای از ترکیباتی با خواص درمانی فعال هستند که نه تنها به عنوان دارو، بلکه به عنوان الگوهای منحصر به فرد برای شروع ساخت آنالوگ های سنتزی به کار می روند (۱). کنترل بیماری ها به ویژه بیماری های عفونی به وسیله داروهای طبیعی گیاهی در سال های اخیر رشد فزاینده ای داشته است. متخصصین عفونی تمایل زیادی به استفاده از این داروها برای درمان عفونت ها دارند. زیرا عوارض این داروها در مقایسه با داروهای شیمیایی به طور قابل ملاحظه ای پایین تر است (۲). در سال های اخیر با افزایش آگاهی نسبت به فواید مصرف ترکیبات دارای ویژگی های آنتی کسیدانی و تمایل تولید کنندگان و مصرف کنندگان به محصولات طبیعی، پژوهش های فراوانی در زمینه یافتن منابع غنی از آنتی اکسیدان های طبیعی صورت گرفته است. بسیاری از خواص آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی

*) آدرس برای مکاتبه: همدان، دانشگاه بو علی سینا، گروه بیوتکنولوژی.
تلفن: ۰۹۱۸۳۱۹۱۵۶۵ پست الکترونیک: snblnazeri@yahoo.com

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

گیاه سیاه گینه (*Dendrostellera lessertii*) از خانواده Thymelaeaceae تنها گونه جنس *دندروستلرا* در ایران است. مطالعات رچینگر (Rechinger) نشان داد که این گیاه، بوته ای، چند ساله با ساقه چوبی به ارتفاع ۲۰ تا ٦۰ سانتی متر، برگ ها نیزه ای باریک و گاهی بیضوی شکل، گل ها کرم تیره ای تا زرد رنگ می باشد که در مناطق شمال و شمال غرب ایران انتشار دارد (٤).

۳- هیدروجنکوادافنین یک استر دی ترپن نوع دافنان جدا شده از برگ های گیاه دارویی سیاه گینه با خاصیت ضد سرطانی است (۵). یزدانپرست (Yazdanparast) و مشکینی (Meshkini) اثر بازدارندگی این ترکیب را بر روی سلول سرطانی خون KG1 نشان دادند (٦). خواص دارویی در جنس های دیگر این خانواده نیزگزارش شده است. گیاه *Daphne angutica* به دلیل داشتن ترکیباتی مانند دافنان و کومارین برای درمان روماتیسم و سکته ها کاربرد دارد. همچنین دارای خاصیت سقط جنین و ضد سرطان خون نیز می باشد (۷).

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

مواد و روش ها

الف) جمع آوری گیاه و روش عصاره گیری: گیاه سیاه گینه (با کد ۲۰۲۰۵) در خرداد سال ۱۳۹۲ از ارتفاعات ۱۹٦۱ متر کوه الوند (استان همدان) جمع آوری گردید. گیاه مورد نظر توسط متخصصین زیست شناس شناسایی شد. نمونه ها در دمای اتاق و دور از نور مستقیم خورشید در سایه خشک شدند. برای تهیه عصاره های اتانول و متانول از روش خیساندن استفاده گردید. گیاه خشک شده توسط دستگاه آسیاب، پودر شد. به منظور تهیه عصاره ها، ۲۵ گرم از پودر خشک شده به طور جداگانه به ۲۵۰ میلی لیتر حلال های اتانول ۹٦ و متانول ۸۰ درصد اضافه و به روش یاد شده به مدت ٤۸ ساعت بر روی شیکر گذاشته شد (۸).

در ادامه عصاره ها به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۱، صاف شدند و به مدت ۱۰ دقیقه با شدت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس توسط دستگاه روتاری تغلیظ شدند. نمونه ها به منظور خشک شدن کامل به آون با دمای ٤۰ درجه سیلیسیوس منتقل گردیدند. عصاره ها تا زمان استفاده در دمای ۲۲- درجه سیلیسیوس نگهداری شدند.

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

برای تهیه کشت تازه از باکتری های یاد شده، یک کلنی باکتری بر روی محیط جامد مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) منتقل و ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس گرماگذاری گردید. یک لوپ از کلونی باکتری به یک میلی لیتر محیط نوترینت براث (مرک، آلمان) انتقال و در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس به مدت ٢٤ ساعت گرماگذاری شد. همچنین غلظت سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری در میلی لیتر) تعیین گردید (۹).

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

۱۰۰، ۲۰۰ و ٤۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از اندام های برگ و ساقه تهیه شدند. در ابتدا ۱۰۰، ۲۰۰ و ٤۰۰ میلی گرم از عصاره خشک ساقه و برگ به طور جداگانه در یک میلی لیتر حلال اتانول ۹٦ و متانول ۸۰ درصد حل گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بر روی پلیت های مولر هینتون آگار استریل تلقیح و با سوآب استریل به صورت یکنواخت کشت داده شد. چاهک هایی به قطر پنج میلی متر ایجاد گردید. ۵۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت های تهیه شده به درون این چاهک ها ریخته شد. پلیت ها ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس گرماگذاری گردیدند (۱۰).

از آنتی بیوتیک های اریترومایسین (۱۵ میکروگرم) برای باکتری های گرم مثبت و کانامایسین (۳۰ میکروگرم) (پادتن طب، ایران) برای باکتری های گرم منفی به عنوان کنترل مثبت و حلال های متانول و اتانول به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. سنجش خواص ضدباکتریایی برای تمام غلظت ها در سه تکرار صورت گرفت. اندازه قطر هاله های بازدارندگی رشد باکتری در اطراف چاهک بر حسب میلی متر اندازه گیری شد.

د) اندازه گیری حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC): با استفاده از روش رقت لوله ای حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum inhibitory concentration) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum bactericidal concentration) تعیین گردید (۱۱). به منظور تعیین MIC سری های رقت ٦/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر در محیط نوترینت براث تهیه گردید. پس از تهیه سری رقت ها، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند به تمامی لوله ها به جزء کنترل مثبت (محیط + عصاره) اضافه شد. در نهایت لوله های تلقیح شده ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس گرماگذاری گردیدند. کمترین رقتی از عصاره که در آن کدورتی مشاهده نگردید، به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی از تمامی لوله هایی که در آنها عدم رشد مشاهده شده بود، مقدار معینی بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. محیط کشت های تلقیح شده ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس قرار داده شدند. پس از گرماگذاری کمترین غلظتی از عصاره که در آن رشد باکتری مشاهده نگردید به عنوان MBC در نظر گرفته شد.

ه) روش 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH): به منظور بررسی فعالیت رادیکال آزاد از روش استوجیسویک (Stojicevic) و همکاران استفاده شد (۱۲). معرف ۲،۲-دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)، به دلیل حضور گروهای فنیل در ساختار آن یک منبع رادیکال پایدار است که با گرفتن یک الکترون از ترکیب آنتی اکسیدان رنگ آن از بنفش به زرد تغییر می کند. در این مطالعه غلظت های ۰/۲، ۰/٤، ۰/٦، ۰/۸ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر متانول تهیه و از آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد. نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شدند. جذب نمونه ها با دستگاه اسپکتروفتومتر با حلال متانول در طول موج ۵۱۷ نانومتر ثبت گردید. درصد فعالیت ضد رادیکالی (RSA) با استفاده از رابطه زیر به دست آمد (۱۲).

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

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

و) اندازه گیری میزان فلاونوئید کل: برای این منظور از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد (۱۳). جذب مخلوط نهایی پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در طول موج ٤۱۵ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. مقدار فلاونوئید کل به صورت میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک عصاره محاسبه گردید.

ز) اندازه گیری میزان فنل کل: برای این منظور از واکنش گر فولین سیوکالتو استفاده شد (۱٤). از معرف گالیک اسید نیز به عنوان استاندارد استفاده گردید. نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. میزان جذب نمونه ها به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷٦۵ نانومتر اندازه گیری شد. مقدار فنل کل معادل میلی گرم اسید گالیک برگرم وزن

عصاره خشک محاسبه گردید.

ح) آنالیز آماری: این پژوهش با طرح پایه کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل در سه تکرار انجام گرفت. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ توسط نرم افزار sas 9.2 و خطای استاندارد (SE) با استفاده از نسخه بیستم نرم افزار *SPSS* محاسبه شد.

یافته ها

الف) بررسی فعالیت ضدباکتریایی به روش انتشار چاهک در آگار: در کشت تمامی باکتری ها، کنترل منفی هر دو عصاره (اتانولی و متانولی) هاله عدم رشد مشاهده نشد. عصاره متانول برگ و اتانولی ساقه، بیشترین اثر بازدارندگی را بر روی باکتری گرم مثبت *میکروکوکوس لوتئوس* به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۰/۲±۲۳/٦ و ۰/٦±۲۷/۳ میلی متر داشت (جدول ۱). باکتری *انتروباکتر آئروژنز* در برابر هر دو عصاره اتانولی و متانولی و باکتری *میکروکوکوس لوتئوس* در برابر عصاره متانولی برگ در غلظت بالا حساسیت بیشتری، در مقایسه با کنترل مثبت، نشان دادند. غلظت ٤۰۰ میلی گرم در میلی لیتر هر دو عصاره اتانولی و متانولی ساقه بر رشد باکتری های *استرپتوکوکوس پیوژنز* و *میکروکوکوس لوتئوس* و همچنین غلظت ٤۰۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره اتانولی بر رشد باکتری *انتروباکتر آئروژنز* اثرات آنتی باکتریایی بیشتری در مقایسه با آنتی بیوتیک های کانامایسین و اریترومایسین نشان دادند (جدول ۲). نتایج بررسی قطر هاله نشان داد که در بیشتر موارد بین قطر هاله عدم رشد و میزان غلظت عصاره رابطه خطی وجود دارد (جدول ۱). در غلظت های پایین میزان هاله عدم رشد کم و اثرات عصاره ها بر روی باکتری ها بیشتر به صورت باکتریواستاتیک بوده و با افزایش غلظت، حساسیت باکتری ها در برابر عصاره افزایش یافته و اثرات آن بیشتر به صورت باکتریوساید مشاهده شد (جدول ۱).

ب) روش رقت لوله ای MBC و MIC: نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره های اتانولی و متانولی برگ و ساقه سیاه گینه علیه ۱۰ سویه باکتری بیماریزای انسانی به روش رقت لوله ای در جدول ۳ آورده شده است. در این مطالعه MIC و MBC در رقت پایین ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره متانولی برگ روی رشد باکتری های *استرپتوکوکوس پیوژنز* و *اشریشیا کلی* مشاهده شد. عصاره متانولی برگ در مقایسه با عصاره اتانولی اثر بازدارندگی بهتری نشان داد. حداقل رقت بازدارندگی و کشندگی عصاره اتانولی ساقه در برابر رشد باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* مشاهده گردید.

ج) تعیین میزان فعالیت ضد رادیکالی به روش: DPPH نتایج درصد مهار عصاره ها و اسید آسکوربیک نشان داد که عصاره متانولی برگ و ساقه در غلظت های ۰/۲ تا ۰/٦ درصد مهاری بیشتری در مقایسه با آسکوربیک اسید نشان دادند (نمودار ۱).

IC50 عصاره متانولی برگ، ساقه و آسکوربیک اسید به ترتیب ۰/۱۰۲٤، ۰/۱۰٤۲ و ۰/۱۰۷٦ میلی گرم در میلی لیتر محاسبه شد. اختلاف معنی داری بین مقدار IC50 عصاره های متانولی برگ ، ساقه و استاندارد آسکوربیک اسید مشاهده نشد (نمودار ۲).

د) بررسی میزان فنل و فلاونوئید کل: در این مطالعه مقدار فنل کل برگ و ساقه به ترتیب ۳/۲±٦۹/۱ و ۰/۵±۷۹/٤ (میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) و فلاونوئید ۰/۱±۲/۱ و ۰/۱±۱/۵ (میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) به دست آمد. عصاره متانولی برگ و ساقه به ترتیب بیشترین میزان فلاونوئید و فنل را داشتند. با توجه به نتایج بدست آمده، بین میانگین مقدار فنل و فلاونوئید کل هر دو بافت برگ و ساقه اختلاف معنی داری در سطح ۰/۰۵ مشاهده شد.

بحث

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

اولئوفولیالم را علیه باکتری های *اشریشیا کلی*، *باسیلوس* و *سودوموناس* (۱۶)، و یوسیه (Yosie) و همکاران در سال ۲۰۱۱، فعالیت ضدمیکروبی عصاره متانولی برگ گیاه *Phaleria macrocarpa* را بر روی باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سرئوس* مشاهده کردند (۱۷).

در پژوهش خاضر مشخص گردید که در کشت بیشتر باکتری ها، هاله عدم رشد حاصل از عصاره متانولی بیشتر از عصاره اتانولی بوده است. این مطلب نشان می دهد که احتمالاً عصاره متانول در این دو بافت ترکیبات آنتی باکتریایی بیشتر و

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

باکتری	میانگین قطر هاله های بازدارندگی رشد (میلی متر)				
		برگ		ساقه	
	غلظت (mg/ml)	اتانول	متانول	اتانول	متانول
باسیلوس سرئوس	۱۰۰	۱۰/۶±۰/۶	۱۲/۶±۰/۳	۱۱±۰/۵	۱۶/۶±۰/۶
	۲۰۰	۱۱/۶±۰/۸	۱۳/۳±۰/۳	۱۰/۳±۰/۳	۱۶/۶±۰/۸
	٤۰۰	۱۳/۳±۰/۶	۱٤±۰/۵	۱۱/۶±۰/۳	۱۷±۵/۰
انتروباکتر آئروژنز	۱۰۰	۱۲/۶±۰/۶	۱۰/۶±۰/۳	۱۳/۶±۰/۳	۰±۰/۰
	۲۰۰	۱۳/۶±۰/۶	۱۳/۶±۰/۶	۱۵±۱/۵	۰±۰/۰
	٤۰۰	۱٤±۰/۰	۱۱/۳±۰/۶	۱۵/۳±۰/۸	۰±۰/۰
میکروکوکوس لوتئوس	۱۰۰	۱۰±۰/۰	۱۰/۶±۰/۳	۱۹±۱/۷	۱۵/۶±۰/۶
	۲۰۰	۱۳±۰/۱	۱۷/۳±۰/۸	۲۵/۶±۰/۳	۲۰±۰/۱
	٤۰۰	۱۶/۶±۰/۸	۲۳/۶±۰/۲	۲۷/۳±۰/۶	۱۹/۳±۰/۳
سالمونلا تیفی	۱۰۰	۹/۶±۰/۶	۱۰±۰/۰	۱۰±۰/۵	۸±۰/۵
	۲۰۰	۹/۶±۰/۳	۱۲±۰/۵	۱۱/۶±۰/۳	۱۱/۳±۰/۳
	٤۰۰	۹/۳±۰/۳	۱۲/۶±۰/۶	۱۰±۰/۵	۱۲±۰/۵
سودوموناس آئروژینوزا	۱۰۰	۱۲±۰/۵	۱۲±۰/۷	۱۱/۶±۰/۳	۱۱/۶±۰/۸
	۲۰۰	۱۲/۶±۰/۶	۱۲/۶±۰/۸	۱۲/۳±۰/۳	۱۱/۶±۰/۳
	٤۰۰	۱۲/۶±۰/۶	۱۳/۳±۰/۶	۱۱±۰/۵	۱۳/۶±۰/۳
باسیلوس سوبتیلیس	۱۰۰	۶/۶±۰/۳	۹±۱/۰	۱۲±۱/۵	۱۱±۰/۵
	۲۰۰	۷±۰/۰	۷/۶±۰/۳	۱۱±۱/۰	۱۳/۳±۰/۶
	٤۰۰	۹±۰/۱	۹/۳±۰/۸	۱۱/۳±۰/۳	۱٤±۰/۱
اشریشیا کلی	۱۰۰	۶/۳±۰/۳	۶/۶±۰/۶	۱۲/۶±۰/۶	۱۲±۰/۵
	۲۰۰	۷/۳±۰/۸	۱۱/۳±۰/۳	۱۰±۰/۰	۱۲/۶±۰/۸
	٤۰۰	۷/۶±۰/۸	۱۱/۶±۰/۳	۱۳/۳±۰/۸	۱۱/۳±۰/۶
استرپتوکوکوس پیوژنز	۱۰۰	۷±۰/۵	۹/۶±۰/۳	۱۱±۰/۵	۱۵±/۰۵
	۲۰۰	۹±۰/۵	۹/۳±۰/۶	۱۰/۳±۰/۳	۱٤/۳±۰/۶
	٤۰۰	۸/۶±۰/۶	۱۰/۳±۰/۳	۱۵/۳±۱/۲	۱۵/۳±۰/۳
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۰۰	۱۰/۶±۰/۳	۱۰/۳±۰/۶	۱۳/۶±۰/۸	۱۱±۰/۰
	۲۰۰	۱۲±۰/۵	۹/۳±۰/۳	۱۰/۶±۰/۶	۱۲/۳±۰/۸
	٤۰۰	۸/۶±۰/۳	۸/۳±۰/۳	۱۱±۰/۵	۱۱/۳±۰/۶
شیگلا بویدی	۱۰۰	۰±۰/۰	۱۰±۰/۵	۱۱/۶±۰/۳	۱۱/۳±۰/۶
	۲۰۰	۰±۰/۰	۱۱/۳±۰/۳	۱۲/۳±۰/۳	۱۲±۰/۵
	٤۰۰	۰±۰/۰	۱۱/۶±۰/۶	۱۰±۰/۵	۱۲/۶±۰/۳

یا موثرتری را استخراج نموده است.

در این مطالعه، حداقل غلظت های بازدارندگی و کشندگی عصاره متانولی برگ و ساقه در کشت باکتری های *استرپتوکوکوس پیوژنز* و *اشریشیا کلی* مشاهده گردید. این نتایج نشان می دهد که حساسیت این دو باکتری به عصاره الکلی گیاه سیاه گینه بیش از سایر میکروارگانیسم های مورد مطالعه بوده است. نتایج بررسی آنتی باکتریایی جنس های دیگر این خانواده نشان داده است که *اشرشیا کلی* به عصاره این

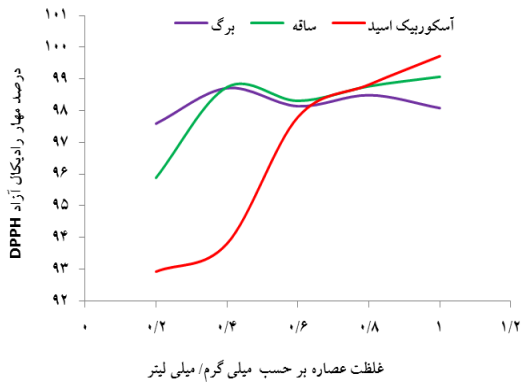
جدول۲: میانگین قطر هاله های بازدارندگی آنتی بیوتیک های اریترومایسین وکانامایسین در برابر باکتری های بیماریزای انسانی.

باکتری	اریترومایسین (۱۵میکروگرم)	کانامایسین (۳۰ میکروگرم)	باکتری	اریترومایسین (۱۵میکروگرم)	کانامایسین (۳۰ میکروگرم)
باسیلوس سوبتیلیس	۲۵±۰/۰	۱۸/۶±۰/۸	*سالمونلا تیفی*	۲٤±۰/۰	۱۵/٦±۰/٦
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۳/۳±۰/٦	۱۵±۰/۰	*شیگلا بویدی*	۱۲/۱±۰/۱	۱٤±۰/۰
استرپتوکوکوس پیوژنز	۸/۸±۰/۱	۱۲±۰/۰	*انتروباکتر آئروژنز*	۹/۱±۰/٤	۱۱±۰/۰
میکروکوکوس لوتئوس	۱۸/۳±۰/۳	۱۰±۰/۰	*اشریشیا کلی*	۲۵±۰/۰	۱۲/٦±۰/٦
باسیلوس سرئوس	۲٦±۰/۰	۲۰±۰/۰	*سودوموناس آئروژینوزا*	۱٦/۳±۰/۳	۱۲/٦±۰/۳

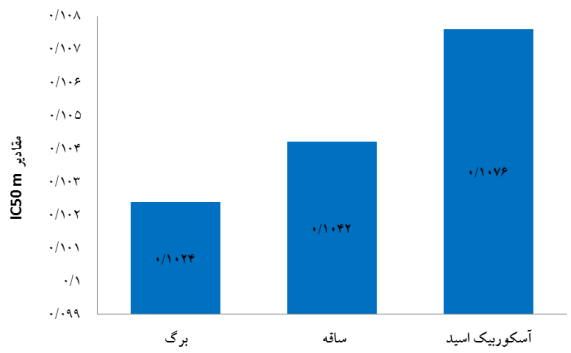
جدول۳: مقدار MIC و MBC عصاره های اتانولی و متانولی برگ و ساقه سیاه گینه علیه برخی باکتری های بیماریزای انسانی.

باکتری	برگ				ساقه			
	اتانولی		متانولی		اتانولی		متانولی	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
باسیلوس سرئوس	۱۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۲۰۰	۵۰	۱۰۰
باسیلوس سوبتیلیس	–	–	--	–	۱۰۰	–	۵۰	–
سالمونلا تیفی	–	–	۵۰	–	–	–	۲۵	–
شیگلا بویدی	۱۰۰	۲۰۰	۲۵	۵۰	–	–	۵۰	۱۰۰
انتروباکتر آئروژنز	۲۵	۵۰	۲۵	۲۵	۱۰۰	۱۰۰	–	–
میکروکوکوس لوتئوس	۵۰	۱۰۰	۵۰	۵۰	۲۵	۲۵	۱۰۰	۱۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	–	–	–	–	۱۰۰	۱۰۰	۲۵	۲۵
سودوموناس آئروژینوزا	۱۰۰	۲۰۰	۵۰	۲۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۵۰	۱۰۰
اشریشیا کلی	–	–	۱۲/۵	۱۲/۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵
استرپتوکوکوس پیوژنز	–	–	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۲۵	۲۵

-: باکتری رشد یافته



نمودار ۱: درصد مهاری عصاره های متانولی برگ و ساقه با آسکوربیک اسید.



نمودار ۲: مقادیر IC50 عصاره های متانولی برگ و ساقه در برابر اسید آسکوربیک.

گیاهان حساسیت بیشتری دارد. هر چند در تحقیق این گروه ها باکتری های دیگری نیز در گروه باکتری های حساس قرار می گیرند.

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

اختلاف مشاهده شده در ویژگی باکتریواستاتیک و باکتریوسایدی غلظت عصاره در این بررسی ها می تواند به دلیل نوع ترکیبات موجود در عصاره بافت ها، نحوه عصاره گیری و یا اختلاف در سویه باکتری مورد مطالعه باشد.

در پژوهش حاضر، میزان فنل در ساقه بیش از برگ محاسبه شد. اما دلنواز هاشملویان (Delnavaz Hashemloyan) و همکاران با استفاده از حلال کلروفرم میزان فنل کل در برگ سیاه گینه را بیش از ساقه اندازه گیری کردند. این اختلاف می تواند ناشی از نوع حلال استفاده شده، شرایط اقلیمی، ارتفاع جمع آوری شده و یا زمان برداشت باشد (۱۸). بررسی انجام گرفته بر روی سایر جنس های این خانواده میزان فنل کل متفاوتی با تحقیق حاضر نشان دادند. در تحقیق کامون واناسیت (Kamonwannasit) و همکاران در سال ۲۰۱۳، میزان فنل عصاره برگ *Aquilaria crassna* (۲۴/۴±۱۷۶/۶ میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) بیشتر (۱۹) و در بررسی ندلجکو (Nedeljko) و همکاران در سال ۲۰۱۲، میزان فنل کل عصاره متانولی برگ و ساقه گیاه *Daphne cneorum* به ترتیب (۰/۷±۷۶/۴۵ و ۰/۸±۶۹/۶ میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) مشابه تحقیق حاضر محاسبه گردید (۸). این اختلاف در نتایج می تواند مربوط به جنس گیاه مورد استفاده باشد.

در مطالعه حاضر میزان IC50 عصاره ها برابر با اسید اسکوربیک محاسبه شد. میزان IC50 عصاره برگ گیاه *Aquilaria crassna* بر اساس نتایج کامون واناسیت (Kamonwannasit) و همکاران در سال ۲۰۱۳ و عصاره متانولی برگ و ساقه گیاه *Daphne cneorum* بر اساس نتایج ندلجکو (Nedeljko) و همکاران در سال ۲۰۱۲، بیشتر از اسید اسکوربیک گزارش شده است (۸ و ۱۹). این اختلاف می تواند به دلیل تفاوت در جنس گیاه مورد استفاده است.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره الکلی به ویژه عصاره متانولی گیاه سیاه گینه، توانایی استخراج ترکیبات آنتی باکتریایی را دارد. هرچند در مواردی میزان بازدارندگی بیش از استانداردهای مورد استفاده بود. از آنجایی که ترکیبات فنل و فلاونوئید دارای خاصیت آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی هستند، این ویژگی عصاره گیاه می تواند مربوط به حضور این ترکیبات در بافت های مورد مطالعه باشد. این نتیجه گیری با بررسی خواص آنتی اکسیدانی عصاره الکلی این دو بافت تایید می گردد.

تشکر و قدردانی

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

References

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

2. Avijgan M, Saadat M, Nilforoosh-Zadeh MA, Hafizi M. Anti-fungal effect of *Echinophora platyloba* extract on some common dermatophytes. J Med Plants . 2006; 5(18): 10-16.

3. Gülçin İ, Oktay M, Kıreççr E, Küfrevıoğlu İÖ. Screening of antioxidant and antimicrobial activites of anise (*Pimpinella anisum* L) seed extracts. Food Chem. 2003; 83: 371-382.

4. Rechinger,kh. Flor iranica. 1972; 95: 1-12.

5. Moosavi MA, Yazdanparast R, Sanati MH. The cytotoxic and anti-proliferative effects of 3-hydrogenkwadaphnin in K562 and jurkat cells is reduced by guanosine. J Biochem Mol Biol. 2005; 38(4): 391-398.

6. Yazanparast R, MeshkiniA. 3-hydrogenkwadaphnine, a novel diterpene ester from Dendrostellera lessertii, its role in differentiation and apoptosis of KG1 cells. Phytomedicine. 2009; 16: 206-214.

7. He WD, Cik M, Appendino G, Van Puyvelde L, Leysen JE, De Kimpe N. *Daphnane*-type diterpene orthoesters and their biological activities. Mini Rev Med Chem. 2002; 2: 185-200.

8. Nedeljko T, Pavle Z, Perica J, Ratomir M, Marina Ž. HPLC analysis, antimicrobial and antioxidant activities of *Daphne cneorum* L. Hem Ind. 2012; 66 (5): 709-716.

9. Wikler MA, Low DE, Cockerill FR, Sheehan DJ, Craig WA, Tenover FC. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard-ninth edition, in approved standard. CLSI. 2006; 26(1).

10. Hendra R, Ahmad S, Sukari A, Yunus Shukor M, Oskoueian E. Flavonoid analyses and antimicrobial activity of various parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff) boerl fruit. Int J Mol Sci. 2011; 12: 3422-3431.

11. Tajik H, Jalali FSH. Comparative evaluation of the antibacterial effect of aqueous and alcoholic extracts of *Achillea millefolium* on pathogenic microorganisms. Urmia Med J. 2008; 19(4): 302-309. [In Persian]

12. Stojicevic SS, Stanisiavljevic IT, Velickovic DT, Veljkovic VB, Lazic ML. Comparative screening of the anti-oxidant and antimicrobial activities of *Sempervivum marmoreum* L. extracts obtained by various extraction techniques. J Serb Chem Soc. 2008; 73(6): 597-600.

13. Cshang WC, Sei CK, Soon SH, Bong KC, Hye JA, Min YL, Sang HP, Soo KK. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. Plant Sci. 2002; 163: 1161-1168.

14. Pourmorad F, Hosseinimehr S, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected iranian medicinal plants. Afr J Biotechnol. 2006; 5(11): 1142-1145.

15. Javidnia K, Miri R, Najafi RB, Jahromi NK. A preliminary study on the biological activity of *Daphne muronata* royle. Daru J Pharmaceutic Sci. 2003; 11(1): 1-28 .

16. Tayoub G, Alnaser AA, Shamma M. Microbial inhibitor of the *Daphne oleifolia* lam ethanolic extract. IJMAP. 2012; 2(1): 161-166.

17. Yosie A, Effendy MAW, Sifzizul TMT, Habsah M. Antibacterial, radical-scavenging

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

18. Delnavaz Hashemloyan B, mozhdehi M, Atai azimi O. 2012. Extraction and isolation of active ingredients (phenol and tannin) of *Dendrostellera lessertii*. Proceeding of the First National Conference of Biological Sciences. 29 Feb to 1 March, Falaverjan. Iran.

19. Kamonwannasit S, Nantapong N, Kumkrai P, Luecha P, Kupittayanant S, Hudapongse N. Antibacterial activity of *Aquilaria crassna* leaf extract against *Staphylococcus epidermidis* by disruption of cell wall. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2013; 12 (20): 1-7.

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 4, January 2015

Original Article

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

Mustafa Alamhulu[1], Sonbol Nazeri[2]

[1]MS.c., Department of Biotechnology, Agricultural Faculty, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Biotechnology, Agricultural Faculty, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Abstract

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

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

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

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

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

Correspondence to: Sonbol Nazeri

Tel: +989183191565

E-mail: snblnazeri@yahoo.com

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