مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷

مقاله پژوهشی

بررسی خواص آنتی اکسیدان و آنتی باکتریایی عصاره‌های متانولی سوگند کپه داغی (*Jurinea sintenisii Bornm*) و چترگندمی برگ‌گرد (*Bupleurium rotundifolium L*)

آزیتا جعفرنژاد [۱]، علی فیروزنیا [۱،*]

[۱] گروه شیمی، واحدبجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران

[*] **نویسنده مسئول:** علی فیروزنیا، گروه شیمی، واحدبجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران. ایمیل: Firouznia@bojnourdiau.ac.ir

DOI: 10.29252/nkjmd-0100110

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۰

واژگان کلیدی:
آنتی باکتریایی
آنتی اکسیدان
DPPH
FRAP
Jurinea
Bupleurium

چکیده

مقدمه: امروزه عواملی نظیر بروز حساسیت‌ها، پیدایش عوارض جانبی، سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و نیاز بدن به ترکیبات آنتی‌اکسیدان، اهمیت گیاهان دارویی را مجدداً مورد توجه قرار داده است. در این پژوهش خواص آنتی‌اکسیدان و آنتی‌باکتریایی عصاره متانولی دو گیاه سوگند کپه داغی (*Jurinea sintenisii Bornm*) و چترگندمی برگ‌گرد (*Bupleurium rotundifolium L*) از استان خراسان شمالی مورد بررسی قرارگرفته است.

روش کار: عصاره متانولی دو گیاه ذکر شده به روش خیساندن تهیه شد و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان آن‌ها با دو روش (DPPH) و (FRAP) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اثر آنتی‌باکتریایی عصاره گیاهان مورد نظر بر علیه ۴ نمونه باکتری با روش چاهک آگار مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: مقدار IC50 برای عصاره چترگندمی برگ‌گرد ۰/۶۱، سوگند کپه داغی ۱/۱۷ و برای BHT 35/0 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. در حالیکه در روش FRAP میزان فعالیت آنتی اکسیدانی برحسب میلی‌مول Fe^{+2} بر گرم عصاره برای سوگند کپه‌داغی و چترگندمی برگ‌گرد به ترتیب ۴۲۴/۳۹۰ و ۱۸۰/۴۸۸ محاسبه گردید. بررسی خواص آنتی‌باکتریایی نشان داد عصاره متانولی هر دو گیاه تأثیر خوبی بر باکتری‌های گرم مثبت از خود نشان دادند و MIC برای سوگند کپه داغی در مقابل باکتری‌های باسیلوس سوبتیلوس، استافیلوکوکوس اورئوس و میکروکوکوس لوتئوس به ترتیب ۷/۱۵،۸۱/۶۵ و ۳۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر و برای چتر گندمی برگ‌گرد به ترتیب ۱۲۵، ۳۱/۲۵ و ۱۲۵ به دست آمد.

نتیجه گیری: چتر گندمی برگ‌گرد توانایی بیشتری در مهار رادیکال DPPH دارد در حالی‌که توانایی سوگند کپه‌داغی در احیا کاتیون‌های آهن بیشتر می‌باشد. در بررسی خواص آنتی باکتریایی بهترین تأثیر مربوط به سوگند کپه‌داغی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با مقدار MCI = ۷/۸۱۲ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد.

مقدمه

تاریخ پیشینیان مبین این مطلب است که همواره گیاهان به عنوان یکی از مهمترین منابع غذایی و دارویی بشمار می‌آمده‌اند. سالیان متمادی، داروهای طبیعی خصوصاً گیاهان دارویی اساس و حتی در برخی موارد تنها طریق درمان محسوب می‌شده‌اند. پیشرفت‌های علم شیمی منجر به جایگزینی داروهای سنتزی و شیمیایی به جای داروهای گیاهی گردید. امروزه عواملی نظیر بروز حساسیت‌ها، پیدایش عوارض جانبی، سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک و نیاز بدن به ترکیبات آنتی‌اکسیدان اهمیت گیاهان دارویی را مجدداً مورد توجه قرار داده است. از طرفی بهره‌گیری از روش‌های نوین، امکان شناسایی مواد مؤثره موجود در گیاهان را فراهم کرده است. تخمین زده می‌شود که یک سوم کلیه فرآورده‌های دارویی مورد مصرف در جوامع انسانی دارای منشاء گیاهی باشند [۱]. گیاهان دارویی یکی از منابع بسیار ارزشمند در گستره وسیع منابع طبیعی ایران هستند که در صورت شناخت علمی کشت، توسعه و بهره‌برداری صحیح نقش مهمی در سلامت جامعه، اشتغال زایی و صادرات غیرنفتی خواهند داشت. آمار جهانی نشان می‌دهد که مواد مؤثره حدود پنجاه درصد داروهای عرضه شده به بازار و بیشتر اسانسهای خوراکی و صنعتی، رنگ‌ها و عصاره‌های مورد مصرف در صنایع غذایی دارای منشأ گیاهی هستند [۲]. چترگندمی برگ‌گرد (*Bupleurium rotundifolium* L) گیاهی است از خانواده چتریان (*Umbelliferae*) یکساله، کوتاه با بلندی بیست تا پنجاه سانتی‌متر برگ‌های آن بیضی و نوک‌تیز است که بن برگ ساقه را در آغوش گرفته و تقریباً ساقه از وسط برگ خارج می‌شود. گل‌های آن زرد و به صورت چتر مرکب می‌باشد، این گیاه در مزارع می‌روید و دانه آن مخلوط با دانه غلات در جریان حمل و نقل به اطراف و سایر مزارع منتشر می‌شود. بررسی‌ها برروی ترکیب شیمیایی و فعالیت بیولوژیکی اسانس به دست آمده ازسایرگونه‌های این گیاه نشان داد که روغن اسانس آن‌ها دارای فعالیت ضدالتهابی امید بخشی همراه با سیتوتوکسیستی شدید در برابر بسیاری از سلول‌های سرطانی است. با این‌حال، فعالیت ضد میکروبی

محدود آن نشان می‌دهد که ترکیب با داروهای دیگر برای استفاده مؤثر ضروری است [۳]. علاوه بر این، گیاه اثر آنتی اکسیدانی قابل توجهی در روشی وابسته به غلظت دارد [۴]. محققین موفق شدند به طور همزمان ۱۲ فلاونوئید را در ۲۸ نمونه از این گیاه، در مناطق مختلف چین اندازه گیری کنند [۵]. همچنین Radix Bupleuri یکی از موفق‌ترین و کاربردی‌ترین داروهای گیاهی در آسیا برای درمان بسیاری از بیماری‌ها در ۲۰۰۰ سال گذشته است. پس از بررسی مواد شیمیایی این گونه‌ها، مشخص شد تری‌ترپن‌های جدا شده از ساپونین، به عنوان عوامل ایمن سازی، ضد التهابی و ضد ویروسی عمل می‌کنند [۶]. گیاه سوگند کپه داغی (*Jurinea sintenisii* Bornm)، گیاهی است از خانواده کاسنی (Asteraceae) که در آسیای مرکزی انتشار دارد [۷]. گیاهی چند ساله، نیمه چوبی و با ریشه‌ای فیبری و ساقه‌های متعدد یا خیزان است و دارای شاخه‌های ساده منتهی به یک کپه گل می‌باشد. برگ‌های ساقه‌ای از طول میان گره‌ها بلندتر است. برگ‌ها خط خطی-سرنیزه‌ای بوده و در جهت قاعده باریک شده است. دمبرگ دار، ساقه آغوش و دارای گل صورتی و تقریباً نیمه کروی است و موسم گلدهی آن اردیبهشت ماه می‌باشد [۸]. مطالعات نشان دادندکه فلاونوئیدهای بیواکتیو در ریشه سایر گونه‌های این گیاه دارای ترکیبات آنتی اکسیدان بالقوه‌ای است و جداسازی و تعیین خواص می‌تواند عوامل درمانی باارزشی را برای اثراکسیدکننده‌ها و اختلالات انسانی ایجادشده تهیه کند [۹]. لاکتون‌های سزکوئی‌ترپن که ترکیبات اصلی گونه‌های jurinea می‌باشند چندین فعالیت دارویی قوی را به نمایش گذاشتند که احتمالاً مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدان و آنتی‌کولین‌استراز این گونه‌ها باشد [۱۰]. از آنجایی که تا به حال هیچ گزارشی از خواص آنتی اکسیدان و آنتی باکتریایی عصاره متانولی دو گیاه چترگندمی برگ‌گرد (Bupleurium rotundifolium L) و گیاه سوگند کپه داغی (Jurinea sintenisii Bornm) مشاهده نگردیده است، این دو گیاه انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه به بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی به دو روش مهار رادیکال ۲ و ۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH: Dipheyil1-Picryl Hydrazyl) و توانایی احیاکنندگی آهن (FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power) و همچنین خاصیت آنتی‌باکتریایی به روش چاهک آگار پرداخته شد و حداقل قدرت بازدارندگی (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) و حداقل قدرت کشندگی (MBC: Minimum Bactericidal Concentration) نیز اندازه‌گیری گردید.

روش کار

کلیه مواد مورد استفاده، بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT)، ۲ و ۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)، ۴،۲ و ۶- تری پریدیل-اس- تریازین (TPTZ)، آمونیوم فروس سولفات ($Fe(SO_4).6H_2O_2$)، (NH_4) ، کلرید آهن (III) ($FeCl_3.6H_2O$)، استات سدیم ($CH_3COONa.3H_2O$)، محیط کشت مولر هینتون آگار، و محیط کشت مولر هینتون براث از شرکت مرک آلمان تهیه گردیده است. سویه‌های میکروبی باکتری باسیلوس سوبتیلوس (PTCC1023) ایشرشیاکولای (PTCC25923)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC25923) و میکروکوکوس لوتئوس (PTCC1110) به صورت آمپول لیوفلیزه محصول سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. اندام هوایی گیاه سوگند کپه داغی (*Jurinea sintenisii* Bornm) در اردیبهشت‌ماه از منطقه حفاظت شده گلول-سرانی و چترگندمی برگ‌گرد (*Bupleurium rotundifolium* L) در خرداد ماه از ارتفاعات درکش جمع آوری گردید و توسط هرباریوم مرکز تحقیقات پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد با شماره هرباریومی (FUMH) ۴۵۸۴۲ و (NMP6/5-1) به ترتیب، شناسایی و ثبت گردید. جهت تهیه عصاره، ابتدا ۵ گرم از پودر گیاه تهیه و به روش خیساندن در طی ۳ مرحله و با به‌کارگیری حلال متانول ۸۰ درصد عصاره‌گیری شد. عصاره استخراج شده توسط دستگاه تقطیر خلأ (Rotary Buchi، ساخت کشور سوئیس) تغلیظ گردید. جهت تعیین عملکرد آنتی اکسیدانی به روش مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، ۰/۱ میلی لیتر از محلول متانولی نمونه مورد نظر در غلظت‌های مختلف را در یک لوله آزمایش ریخته و سپس به آن ۳/۹ میلی لیتر محلول متانولی DPPH (۰/۰۰۴ گرم از DPPH در ۱۰۰ میلی لیتر حلال متانول) اضافه گردید. محتویات هر لوله ورتکس و پس از گذشت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی، جذب آن‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از طیف سنج نوری UV/VIS (مدل Cecil، ساخت کشور انگلستان) در برابر شاهد حاوی متانول خوانده شد [۱۱]. کلیه مراحل ۳ بار تکرار گردید و نتایج به صورت میانگین همراه با انحراف معیار گزارش گردید. درصد مهار اکسیداسیون (AI%) هر نمونه به وسیله معادله زیر قابل محاسبه است [۱۱].

$$\%AI = \frac{(A_{blank} - A_{sample})}{A_{blank}} \times 100$$

AI%، A_{blank} و A_{sample} به ترتیب بیانگر درصد مهار، جذب شاهد و جذب نمونه می‌باشد. با رسم منحنی AI% در مقابل غلظت‌های مختلف عصاره، مقدار (IC50: Inhibition Concentration Fifty) (غلظتی از سوبسترا برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که برای کاهش DPPH به میزان ۵۰٪ مقدار اولیه نیاز است)، برای هر عصاره تعیین گردید. برای محاسبه IC_{50} عصاره‌های مورد نظر، از نرم افزار Graphpad Prism 7 استفاده شد. جهت تعیین عملکرد آنتی اکسیدانی به روش توانایی احیا کنندگی آهن (FRAP) از یک واکنش اکسیداسیون احیا استفاده می‌شود که با تغییر رنگ همراه است. زمانی که احیا کننده واکنش (آنتی اکسیدان) الکترون خود را اهدا می‌کند، کمپلکس بی‌رنگ فریک – تری پیریدیل – تریازین به کمپلکس آبی رنگ فروس – تری پیریدیل – تریازین تبدیل می‌شود که در طول موج ۵۹۳ نانومتر جذب دارد [۱۲, ۱۳]. به منظور سنجش این ویژگی، برای رسم منحنی استاندارد کاتیون آهن دوظرفیتی، در ۶ لوله آزمایش محلول‌هایی از آمونیم فروس سولفات، به حجم ۱۰۰ میکرولیتر و در غلظت‌های مختلف آماده شد. سپس به هریک از لوله‌ها مقدار ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP اضافه گردید. معرف FRAP شامل محلول ۴،۲ و ۶- تری پریدیل- اس- تریازین، ۱۰ میلی مولار در اسید کلریدریک ۴۰ میلی مولار و $FeCl_3.6H_2O$ ۲۰ میلی مولار و بافر استات ۳۰۰ میلی مولار با pH ۳/۶ به نسبت (۱۰:۱:۱) می‌باشد. مخلوط حاصل به خوبی ورتکس گردید و به مدت ۴ دقیقه در دمای $30C^{\circ}$ انکوبه شد. پس از طی این مدت، جذب محلول‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. از لوله آزمایش فاقد آمونیوم

فروس سولفات به عنوان شاهد استفاده گردید. برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها، به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به دست آمده ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP اضافه شد و پس از انجام مراحل آزمایش مطابق محلول‌های استاندارد، جذب محلول‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر نسبت به شاهد (شامل ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطرهمراه با ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP)، اندازه‌گیری شد. کلیه مراحل ۳ بار تکرار گردید. به منظور سنجش خاصیت آنتی باکتریایی ابتدا عصاره در ۵ مرحله با n-هگزان به منظور جداسازی ترکیبات غیر قطبی شستشو داده شد. سپس خاصیت آنتی باکتریایی بر اساس روش چاهک آگار مورد بررسی قرار گرفت. پس از آماده سازی محیط کشت مولر هینتون آگار سوسپانسیون میکروبی با غلظت معادل ۰/۵ مک فارلند از باکتریهای باسیلوس سوبتیلیس (PTCC1023)، ایشریشیاکولای (PTCC25923)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC25923) و میکروکوکوس لوتئوس (PTCC110) تهیه گردید. در مرحله رقت‌سازی عصاره‌ها با استفاده از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای و سرم فیزیولوژیک، در مرحله اول ۵۰ میکرو لیتر از سرم فیزیولوژیک در تمامی چاهک‌های میکروپلیت ریخته شد سپس در چاهک شماره یک هر ردیف افقی ۵۰ میکرولیتر از محلول عصاره (۰/۵ گرم عصاره در ۲ میلی لیتر آب مقطر) ریخته شد و پس از مخلوط کردن رقیق سازی انجام گرفت. پس از تهیه رقت‌های متوالی از عصاره، بر روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار به وسیله سواپ استریل آغشته به باکتری، کشت چمنی داده و سپس حفره‌هایی ایجاد نموده و در مرحله بعد هر یک از حفره‌ها با ۵۰ میکرولیتر عصاره با غلظت‌های متفاوت و حفره آخر با ۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژیک به عنوان کنترل منفی و حفره وسط با جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت پر گردید. مرحله آخر پلیت حاوی عصاره و باکتری به مدت ۲۴ ساعت درانکوباتور قرار داده شد.

پس از گذشت ۲۴ ساعت درانکوباتور همچنان که نفوذ دارویی ضد میکروبی ادامه دارد، تکثیر میکروبی نیز بوجود می‌آید. باکتری‌ها از محیط کشت تغذیه کرده به سرعت رشدمی‌کنند به موازات رشد باکتری‌ها در سطح آگار، داروی ضدمیکروبی نیز در آگار نفوذ کرده و مانع از رشد باکتری در اطراف حفره‌ها می‌شود. نتایج در مدت ۲۴ ساعت بررسی شد، اطراف هر حفره هاله‌ای تشکیل می‌شود که این نشان دهنده عدم رشد میکروارگانیسم است. قطر هاله‌های عدم رشد توسط خط‌کش اندازه‌گیری و برحسب میلی‌متر گزارش گردید. قدرت فعالیت به عنوان بسیار قوی (++++) با قطر منطقه مهار بیش از ۲۵ میلی‌متر، برای قوی (+++) با قطر منطقه مهار در محدوده ۲۴-۱۵ میلی‌متر، برای متوسط (++) با قطر منطقه مهار در محدوده ۱۴-۱۱ میلی‌متر و برای ضعیف (+) با قطر منطقه مهار در محدوده ۱۰-۸ میلی‌متر نمایش داده شد (جدول ۲). به منظور اندازه‌گیری حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نیز از روش میکرو دایلوشن و میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده گردید. در این مرحله نیز با استفاده از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای در چاهک‌های هر ردیف، عصاره با غلظت‌های مختلف ریخته و به همه چاهک‌ها سوسپانسیون میکروبی با غلظت معادل نیم مک فارلند اضافه نموده روی همه چاهک‌ها را چسب زده و بعداز ۲۴ ساعت انکوباسیون، به همه چاهک‌ها ۲۰ میکرولیتر محلول تترازولیوم کلراید (۰/۰۵ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) اضافه کرده و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد دوباره در انکوباتور قرار می‌دهیم. بعد از ۳ ساعت رنگ قرمز ایجاد شده نشان دهنده عدم خاصیت آنتی باکتریایی می‌باشد و اولین چاهکی که تغییر رنگ نداده به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی گزارش می‌شود. سپس با کشت رقت‌هایی که باکتری رشد نکرده در محیط آگارمغذی، آخرین غلظتی که هیچ باکتری رشد نکند، به صورت حداقل غلظت کشندگی گزارش می‌شود.

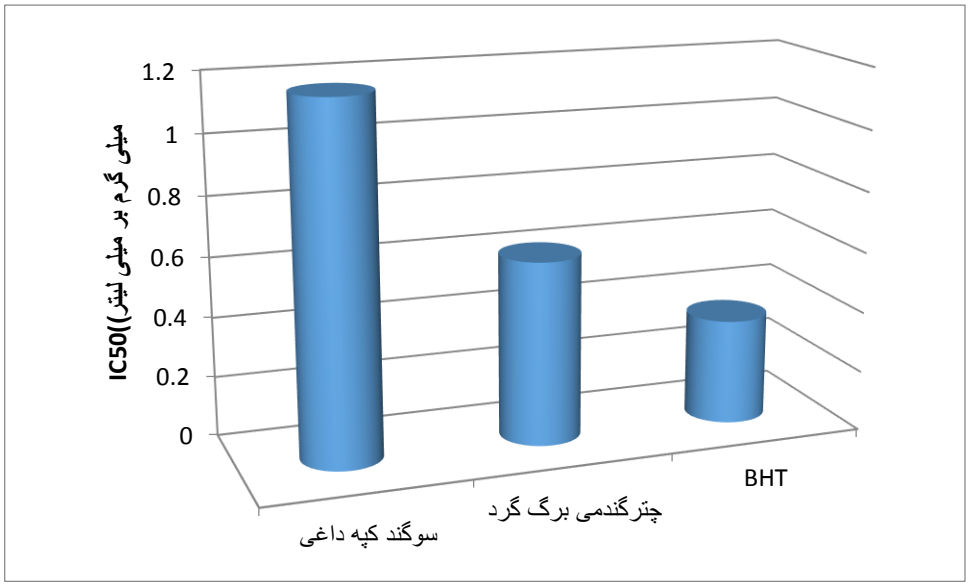
یافته‌ها

بازده عصاره‌گیری برای گیاه سوگند کپه داغی ۲۳/۶ درصد و چترگندمی برگ گرد ۲۱/۸ درصد محاسبه گردید. اثر غلظت بر میزان جذب و درصد مهار رادیکال آزاد DPPH در جدول ۱ آورده شده است. مقادیر IC_{50} برای عصاره چترگندمی برگ‌گرد ۰/۶۱، سوگند کپه داغی ۱/۱۷ و برای BHT به عنوان کنترل مثبت ۰/۳۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. مقایسه این نتایج در تصویر ۱ نشان داده شده است.

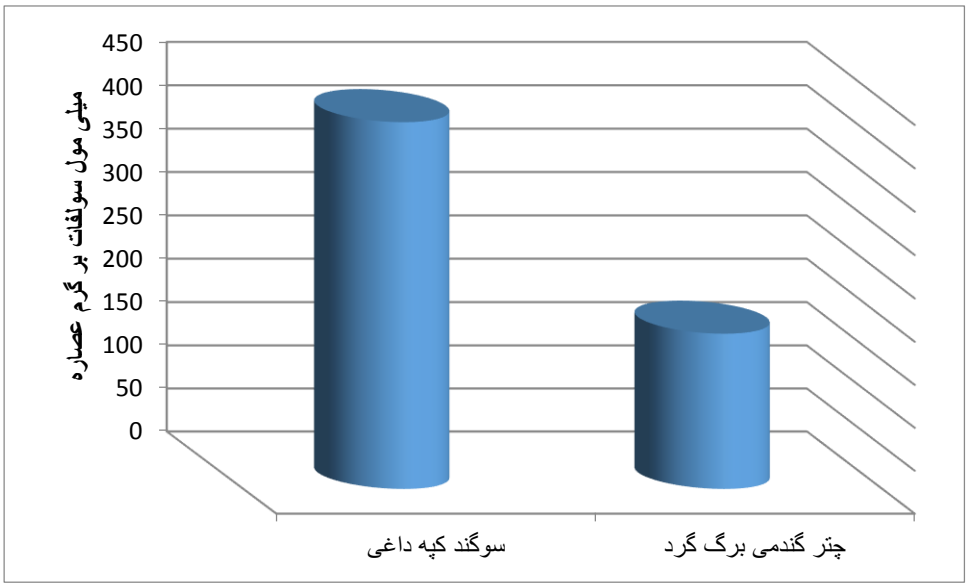
در بررسی اثر مربوط به قدرت احیای آهن با توجه به معادله منحنی استاندارد کاتیون آهن دو ظرفیتی ($Y = ۰/۸۴۰۵x + ۰/۱۵۲۳$) توانایی احیاکنندگی عصاره‌ها محاسبه گردید و نتایج معادل میلی‌مول یون فروس تولید شده بر گرم وزن عصاره برای سوگند کپه داغی ۴۲۴/۳۹۰ و چترگندمی برگ‌گرد ۱۸۰/۴۸۸ محاسبه گردید. تصویر ۲ بیانگر مقایسه خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مورد مطالعه به روش FRAP می‌باشد.

جدول ۱: مقادیر جذب و درصد مهار به روش DPPH برای عصاره متانولی دو گیاه مورد مطالعه

BHT		چتر گندمی برگ گرد		سوگند کپه داغی		
درصد مهار	میانگین جذب در ۵۱۷ نانومتر	درصد مهار	میانگین جذب در ۵۱۷ نانومتر	درصد مهار	میانگین جذب در ۵۱۷ نانومتر	غلظت (میلی گرم بر میلی لیتر)
۳۷/۸۵	۰/۴۱۵ ± ۰/۰۸	۱۸/۰۶	۱/۰۱۲ ± ۰/۰۱	۲۲/۷۵	۰/۹۵۴ ± ۰/۰۸	۰/۲۵
۵۷/۷۸	۰/۲۸۲ ± ۰/۰۴	۱۸/۶۲	۱/۰۰۵ ± ۰/۰۱	۲۶/۲۳	۰/۹۱۱ ± ۰/۰۶	۰/۵
۶۷/۳۶	۰/۲۱۸ ± ۰/۰۷	۲۱/۶۲	۰/۹۶۸ ± ۰	۴۴/۶۱	۰/۶۸۴ ± ۰/۰۸	۱
۷۲/۶۰	۰/۱۸۳ ± ۰/۰۲	۳۳/۹۳	۰/۸۱۶ ± ۰/۰۷	۸۶/۸۸	۰/۱۶۲ ± ۰/۰۲	۲
۸۹/۸۲	۰/۰۶۷ ± ۰/۰۳	۴۸/۱۰	۰/۶۴۱ ± ۰/۰۱	۹۱/۵۸	۰/۱۰۴ ± ۰/۰۵	۴
۹۲/۰۷	۰/۰۵۳ ± ۰/۰۱	۸۱/۷۸	۰/۲۲۵ ± ۰/۰۱	۹۳/۱۲	۰/۰۸۵ ± ۰/۰۱	۸
۹۳/۵۶	۰/۰۴۳ ± ۰/۰۱	۹۳/۸۵	۰/۰۷۶ ± ۰/۰۱	۹۳/۴۴	۰/۰۸۱ ± ۰/۰۱	۱۶



تصویر ۱: مقایسه IC_{50} برای کنترل‌های مثبت و عصاره‌های متانولی دوگیاه مورد مطالعه



تصویر ۲: مقایسه خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های متانولی دو گیاه مورد مطالعه در روش FRAP

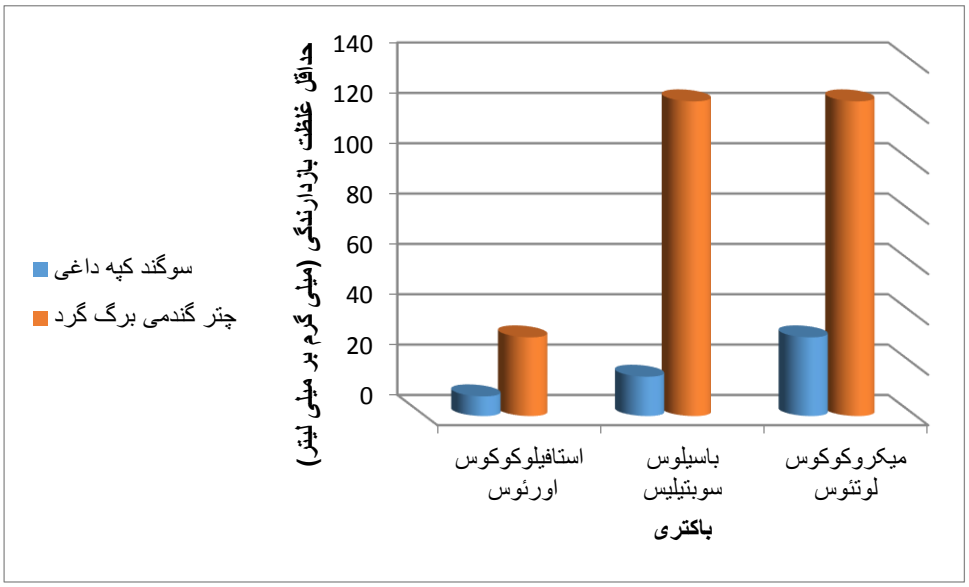
جدول ۲: قطرهاله های تشکیل دهنده عصاره دو گیاه سوگند کپه داغی و چترگندمی برگ گرد

	چترگندمی برگ گرد					سوگند کپه داغی				
Test bacteria	۰/۰۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	خالص	۰/۰۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	خالص
Esherichia coli	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Staphylococcus aureus	*	*	*	+	+++	*	*	*	++	+++
Bacillus subtilus	*	*	*	*	++	*	*	*	+	++
Micrococcus luteus	*	*	*	*	+++	*	++	++	+++	+++

* هیچ قطری از هاله عدم رشد مشاهده نشده است

جدول ۳: مقایسه حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره دو گیاه سوگند کپه داغی و چترگندمی برگ گرد

	عصاره متانولی چترگندمی برگ گرد		عصاره متانولی سوگند کپه داغی	
Test bacteria	MBC ($\frac{mg}{ml}$)	MIC ($\frac{mg}{ml}$)	MBC ($\frac{mg}{ml}$)	MIC ($\frac{mg}{ml}$)
Esherichia coli	*	*	*	*
Staphylococcus aureus	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۱۵/۶۲۵	۷/۸۱۲
Bacillus subtilus	۲۵۰	۱۲۵	۳۱/۲۵	۱۵/۶۵۲
Micrococcus luteus	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵



تصویر ۳: مقایسه حداقل غلظت بازدارندگی دو گیاه مورد مطالعه برباکتری ها

در بررسی خاصیت آنتی باکتریایی به روش چاهک آگار قطر هاله عدم رشد برای هر باکتری به طور جداگانه برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری و نتایج در جدول ۲ گزارش گردیده است. مقادیر حاصل از اندازه‌گیری MIC و MBC نیز در جدول ۳ درج گردیده است.

بحث

در این بررسی از حلال متانول ۸۰٪ استفاده شد. عصاره متانولی حاوی طیف وسیعی از ترکیبات قطبی و نسبتاً قطبی است، به طوری که آلکالوئیدها، استرول‌ها، تری‌ترپن‌ها، فلاونوئیدها، کربوهیدرات‌ها و کومارین‌ها در این عصاره شناسایی می‌شوند. همچنین این حلال ترکیباتی مانند: آنتوسیانین‌ها، ترپنوئیدها، ساپونین‌ها، تانن‌ها، لاکتون‌ها، فلاون‌ها و پلی‌فنل‌ها را استخراج می‌کند. فلاونوئیدهایی که دارای گروه‌های هیدروکسیل یا قند هستند نیز به طور متوسط با این حلال استخراج می‌شوند. ترکیباتی با قطبیت بیشتر که شامل ترکیبات گلیکوزیله می‌باشد در حلال آب موجود هستند [۱۴]. در بررسی نتایج خاصیت آنتی اکسیدان به روش مهار رادیکال DPPH با افزایش غلظت عصاره، درصد مهار نیز افزایش می‌یابد (جدول ۱). مطابق تصویر ۱، میزان IC_{50} برای BHT (به عنوان کنترل مثبت عمل می‌کند) نسبت به عصاره‌های متانولی دو گیاه سوگند کپه داغی وچترگندمی برگ‌گرد کمتر می‌باشد، در نتیجه عصاره‌های متانولی از خاصیت مهار رادیکالی کمتری نسبت به BHT برخوردار هستند. ولی در مقایسه خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره دو گیاه مورد مطالعه، عصاره متانولی گیاه چترگندمی برگ‌گرد اثر مهار رادیکالی بیشتری را نسبت به گیاه سوگند کپه داغی نشان می‌دهد. در بررسی تعیین عملکرد آنتی اکسیدانی به روش قدرت احیا کنندگی آهن (FRAP) هرچه غلظت Fe^{2+} کاهش یافته، بیشتر باشد یعنی توانایی عصاره گیاه در کاهش آهن فریک Fe^{+3} بیشتر بوده است. در مطالعه حاضر با توجه به تصویر ۲ مشاهده شد که عصاره متانولی سوگند کپه داغی از توانایی احیاکنندگی بیشتری نسبت به عصاره چتر گندمی برگ گرد برخوردار است. اما از آنجایی که در روش FRAP از رادیکال‌های آزاد جهت تعیین پتانسیل آنتی اکسیدان‌ها استفاده نمی‌شود بلکه فقط توانایی احیاءشدن آهن فریک Fe^{+3} به آهن فروس Fe^{+2} توسط آنتی اکسیدان در نمونه، اندازه گیری می‌شود، لذا پتانسیل آنتی اکسیدانی یک ماده آنتی اکسیدان بر علیه رادیکال‌های آزاد، ضرورتاً با توانایی آن ماده در احیا، آهن فریک به آهن فروس با هم برابر نمی‌باشد [۱۲]. بررسی خواص آنتی باکتریایی نشان داد باکتری ایشریشیاکولای در برابر عصاره گیاهان دارای مقاومت بود که دلیل این امر، گرم منفی بودن این باکتری می‌باشد به این معنی که چون این باکتری دارای لیپید درغشای سلولی خود می‌باشد در مقابل عصاره‌ها از خود مقاومت نشان داد. این در حالی است که عصاره‌ها بر سه باکتری دیگر باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و میکروکوکوس لوتئوس اثر داشته‌اند که این امر به دلیل گرم مثبت بودن (فاقد لیپید در غشای سلولی) آن‌ها می‌باشد [۱۵]. علاوه بر این با توجه به تصویر ۳ مقادیر MIC و MBC مندرج در جدول ۳، گیاه سوگند کپه داغی توانایی بالاتری را در مهار باکتری‌های استافیلوکوکوس

اورئوس، باسیلوس سابتیلوس و میکروکوکوس اورئوس دارا می‌باشد. همچنین مقدار MIC = ۷/۸۱۲(mg/mL) در مهار باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان می‌دهد، بیشترین تأثیر عصاره سوگند کپه داغی بر این باکتری می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به مقادیر IC_{50} در بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی دو گیاه مورد مطالعه به روش DPPH مشاهده شد که گیاه چتر گندمی برگ گرد توانایی بیشتری برای مهارادیکال پایدار DPPH دارد. درروش FRAP عصاره سوگند کپه داغی توانایی بیشتری در احیا کاتیون آهن از خود نشان می‌دهد. بنابراین هر دو گیاه پتانسیل آنتی اکسیدانی مناسبی را دارا می‌باشند که می‌توان در شرایط مختلف از آن‌ها استفاده نمود. در بررسی اثر آنتی باکتریایی، نتایج نشان می‌دهد که گیاه سوگند کپه داغی در مقابل میکروکوکوس لوتئوس، باسیلوس سوبتیلیس و به ویژه استافیلوکوکوس اورئوس اثر آنتی باکتریایی بیشتری نسبت به چتر گندمی برگ گرد از خود نشان می‌دهد و می‌توان از آن به عنوان منبع قابل دسترس و طبیعی آنتی بیوتیکی در مقابل باکتری‌های بیماری‌زا استفاده کرد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد علاوه بر بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره دو گیاه در سیستم‌های غذایی از جمله اثر آن برروی پایداری روغن، ضمن بررسی بیشتر خاصیت آنتی باکتریایی دو گیاه و استخراج آنتی باکتری گیاهی تحقیقات در شرایط in vivo انجام شود.

سپاسگزاری

با سپاس از استاد فرهیخته سرکار خانم دکتر صمدی کاظمی به دلیل همکاری ارزشمند ایشان و با تشکر از دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی که در این تحقیق نهایت همکاری را داشتند. همچنین از مساعدت بی شائبه جناب آقای دکتر جوهرچی و آقای دکتر شریفان کمال تشکر را داریم.

References

1. Saleii M, Reiesneya N, Mehrabiyan S. Investigation activity of methanolic extract of Pistacia vera. J Microbiol Biotechnol. 2011;3(10):53-9.
2. Tabrizii L, Kochakii A. Medicinal herbs Ecology, production and sustainable exploitation 2. Tehran University of Tehran Press; 2014.
3. Ashour ML, El-Readi M, Youns M, Mulyaningsih S, Sporer F, Efferth T, et al. Chemical composition and biological activity of the essential oil obtained from Bupleurum marginatum (Apiaceae). J Pharm Pharmacol. 2009;61 (8):1079-87. DOI: 10.1211/jpp/61.08.0012 PMID: 19703352
4. Sun L, Feng K, Jiang R, Chen J, Zhao Y, Ma R, et al. Water-soluble polysaccharide from Bupleurum chinense DC: Isolation, structural features and antioxidant activity. Carbohydr Polym. 2010;79(1):180-3. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.07.044
5. Zhang T-T, Zhou J-S, Wang Q. HPLC Analysis of Flavonoids from the Aerial Parts of <I>Bupleurum</I> Species. Chin J Nat Med. 2010;8(2):107-13. DOI: 10.3724/sp.j.1009.2010.00107
6. Ashour ML, Wink M. Genus Bupleurum: a review of its phytochemistry, pharmacology and modes of action. J Pharm Pharmacol. 2011;63(3):305-21. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2010.01170.x PMID: 21749378
7. Bobro V, Bochantsev M, IIjin I. Flora of U.S.S.R. India: Bishen Singh Mahendra Pal Singh and Koeltz sctenific books; 1997.
8. Ghahraman A. Flora of Iran. Iran: Forest Research Institute of Iran; 1992.
9. Shah NA, Khan MR, Naz K, Khan MA. Antioxidant potential, DNA protection, and HPLC-DAD analysis of neglected medicinal Jurinea dolomiaea roots. Biomed Res Int. 2014;2014:726241. DOI: 10.1155/2014/726241 PMID: 24982907
10. Öztürk H, Kolak U, Meric C. Antioxidant, anticholinesterase and antibacterial activities of Jurinea consanguinea DC. Rec Nat Prod. 2011;5(1):43.
11. Saha K, Lajis NH, Israf DA, Hamzah AS, Khozirah S, Khamis S, et al. Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2004;92(2-3):263-7. DOI: 10.1016/j.jep.2004.03.007 PMID: 15138010
12. Hosseini S, Gharachourlu M, Ghiasi Tarzi B, Ghavami M. Review of antioxidant capacity determination (Basis, reaction, methodology, strengths and weaknesses). J Food Technol Nutr. 2014;11(4):89-111.
13. Feizi P, Ahmadzadeh S, Kamali H, Al Sheikh P, Zarghami Moghadam P, Mqhammadi A. Qualitative and quantitative analysis of anthocyanins, cartennoids, polyphenols, flavonoids and antioxidant activity of methanolic extracts of Scutellaria pinnatifida A. J North Khorasan Univ Med Sci. 2016;7(3):645-55.
14. Leite SP, Vieira JR, de Medeiros PL, Leite RM, de Menezes Lima VL, Xavier HS, et al. Antimicrobial Activity of Indigofera suffruticosa. Evid Based Complement Alternat Med. 2006;3(2):261-5. DOI: 10.1093/ecam/nel010 PMID: 16786057
15. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal. 2016;6(2):71-9. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005 PMID: 29403965

Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
Volume 10, Issue 1, Spring 2018

Research Article

Evaluation of Antibacterial Activity and Antioxidant Properties of Methanolic Extracts of *Jurinea Sintenisii Bornm* and *Bupleurium Rotundifolium L.*

Azita Jafarnezhad [1], Ali Firouzni [1,*]

[1] Department of Chemistry, Bojnourd Branch, Islamic Azad Univercity, Bojnourd, Iran
*** Corresponding author:** Ali Firouzni, Department of Chemistry, Bojnourd Branch, Islamic Azad Univercity, Bojnourd, Iran. E-mail: Firouznia@bojnourdiau.ac.ir

DOI: 10.29252/nkjmd-0100110

How to Cite this Article:
Jafarnezhad A, Firouzni A. Evaluation of Antibacterial Activity and Antioxidant Properties of Methanolic Extracts of Jurinea Sintenisii Bornm and Bupleurium Rotundifolium L.. JNKUMS. 2018; 10 (1) :65-71
URL: http://journal.nkums.ac.ir/article-1-1416-fa.html

Received: 04 Nov 2017
Accepted: 11 Mar 2018

Keywords:
Antioxidant
DPPH
FRAP
Antibacterial
Jurinea sintenisii Bornm,
Bupleurium rotundifolium L.

Abstract

Introduction: Nowadays, the emergence of allergies, side effects of drugs, antibiotic-resistant strains, and the need of body to antioxidants emphasized the importance of herbal medicines. In the current study, the antibacterial activity and antioxidant properties of methanolic extracts of *Jurinea sintenisii* Bornm and *Bupleurium rotundifolium* L., two medical herbs from North Khorasan Province, Iran, were investigated.

Methods: Methanolic extracts of the plants were prepared by soaking method and accordingly, their antioxidant activity were assessed by DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) and FRAP (Ferric reducing antioxidant power) methods. Also, the antibacterial activity of the extracts were studied on four bacterial species by well-agar-diffusion method.

Results: The IC50 value of *Bupleurium rotundifolium* L., *Jurinea sintenisii* Bornm, and butylated hydroxytoluene (BHT) was 0.61, 1.71, and 0.35 mg/mL, respectively, while based on the FARP method, the antioxidant activity of *Jurinea sintenisii* Bornm and *Bupleurium rotundifolium* L. were 424.390 and 180.488 mM Fe + 2 /g, respectively. In addition, both plants had a good antibacterial activity on Gram-positive bacteria; the minimum inhibitory concentration (MIC) of *Jurinea sintenisii* Bornm against Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, and Micrococcus luteus was 15.65, 7.81, and 31.25 mg/mL, respectively; while it was 125, 31.25, and 125 for *Bupleurium rotundifolium* L., respectively.

Conclusions: *Bupleurium rotundifolium* L. can better inhibit DPPH radicals, while *Jurinea sintenisii* Bornm can better reduce iron cations; both plants have remarkable antioxidant capacity that can be used in different conditions. In the current study, Jurinea sintenisii Bornm extract had higher antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* (MIC = 7.812 mg/L).