

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ۱۹، مرداد ۱۳۹۹، ۴۸۴-۴۶۳

بررسی گروههای عاملی ترکیبات زیستفعال، توانایی رادیکال گیرندگی، فعالیت ضدمیکروبی و اثر سمیت سلولی عصاره آبی گیاه شیشه‌شور (*Callistemon citrinus*) بر رده سلولی HT29

یک مطالعه آزمایشگاهی

زهره سوسنی غریبوند^۱، بهروز علیزاده بهبهانی^۲، محمد نوشاد^۳، حسین جویند^۴

دریافت مقاله: ۹۸/۱۲/۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۹/۳/۲۰ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۹/۴/۷ پذیرش مقاله: ۹۹/۴/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: کاربرد گسترده داروهای شیمیایی جهت درمان و کنترل بیماری‌های مزمن و عفوونی و همچنین سلطان کولون سبب افزایش تقاضا برای مواد دارویی و نگهدارنده طبیعی و ایمن شده است. بنابراین هدف از این پژوهش تعیین گروههای عاملی ترکیبات تشکیل دهنده، میزان فنول و فلاونونوئید کل، توانایی رادیکال گیرندگی، فعالیت ضدمیکروبی و برهمکنش عصاره آبی شیشه‌شور (*Callistemon citrinus*) با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی و اثر سمیت سلولی آن بر رده سلولی HT29 بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، حضور گروههای عاملی ترکیبات تشکیل دهنده عصاره آبی شیشه‌شور با کمک Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) بررسی گردید. توانایی گیرندگی رادیکال‌های آزاد، میزان فنول و فلاونونوئید کل، فعالیت ضدمیکروبی و برهمکنش عصاره آبی شیشه‌شور با آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفینیکل و جنتامایسین و میزان زنده مانی رده سلولی HT29 تحت غلظت‌های مختلف عصاره با آزمون MTT (4-[3, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5 diphenyl tetrazolium bromide) بررسی شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی Duncan تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: عصاره آبی شیشه‌شور فعالیت ضدمیکروبی قابل توجهی بر باکتری‌های اشتباهی، سودوموناس اثروزینوزا، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس /ورئوس و لیستریا /ینوکوا نشان داد. میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد در محدوده ۵۱/۳۳-۷۱/۶۸ درصد بود. وجود گروههای C-C و OH ترکیبات پلی‌فنولی عصاره توسط FTIR تأیید شد. غلظت‌های مختلف عصاره رشد سلول HT29 را نسبت به گروه کنترل بعد از ۲۴ ساعت کاهش داد (P<0.05).

نتیجه‌گیری: عصاره آبی شیشه‌شور دارای فعالیت ضدمیکروبی، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی بر رده سلولی HT29 بود. بنابراین، استفاده از عصاره آبی شیشه‌شور در صنایع داروپردازی و غذایی پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: سمیت سلولی، حداقل غلظت مهارکنندگی، شرایط برون‌تنی، عصاره آبی شیشه‌شور

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۲- (نویسنده مسئول) استادیار گروه آموزشی علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

تلفن: b.alizadeh@asnrukh.ac.ir

۳- استادیار گروه آموزشی علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۴- دانشیار گروه آموزشی علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

مقدمه

ضد میکروبی و ترکیبات فنولی مانند اسیدهای فنولیک، فلاونوئید، تانن و دیترپنهای فنولی موجود در گیاهان دارویی سبب شده استفاده از این گیاهان مورد توجه پژوهش گران قرار گیرد [۱۱].

گیاه شیشه‌شور با نام علمی *Callistemon citrinus* از خانواده Myrtaceae می‌باشد و شامل بیش از ۳۰ گونه است [۱۲]. این گیاه ۰/۵ تا ۷ متر ارتفاع دارند که به صورت درخت یا درختچه‌های چوبی معطر در نواحی استوایی مرطوب رشد می‌کنند [۱۳]. مقاومت در برابر خشکی، گرما، باد و زیبایی در زمان گلدهی از جمله دلایلی است که سبب شده از این گیاه در فضای سبز و حاشیه خیابان‌ها در سطح وسیع استفاده شود [۱۴]. در طب سنتی از برگ این درخت جهت درمان عفونت‌های دستگاه گوارش نیز استفاده می‌شود [۱۴]. در جامائیکا از این گیاه جهت درمان بیماری‌های معده و روده، عفونت‌های پوستی و اسهال به صورت چای داغ استفاده می‌شود [۱۳]. علاوه بر این، فعالیت ضد سلطانی گیاه شیشه‌شور نیز مشخص شده است [۱۵-۱۶].

سلطان کولون به عنوان سومین علت مرگ و میر در دنیا مطرح می‌باشد و پس از سلطان ریه، سلطان کولون به عنوان شایع‌ترین نوع سلطان در مردان می‌باشد [۱۷-۱۸]. این سلطان ابتدا به صورت خوش‌خیم بوده و در صورت تشخیص به موقع با عمل جراحی کاملاً قابل درمان می‌باشد و در صورت عدم درمان به موقع به صورت آدنومای پیشرفتی با درجه دیسپلازی بالا و سپس به شکل سلطان بدخیم تکامل پیدا می‌کند [۱۹]. روش‌های درمان سلطان کولون شامل ترکیبی از شیمی درمانی، پرتو درمانی و جراحی می‌باشد که پرهزینه

یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده بیماری‌های مزمن، رادیکال‌های آزاد می‌باشند. رادیکال‌های آزاد با ایجاد استرس اکسیداتیو می‌توانند نقش خود را ایفاء کنند. مهم‌ترین عامل جهت مهار و از بین بردن رادیکال‌های آزاد، آنتی‌اکسیدان‌ها هستند [۱-۲]. از جمله خواص آنتی‌اکسیدان، کاهش خطر ابتلاء به سکته مغزی، بیماری‌های قلبی-عروقی و کاهش آسیب به دزوکسی ریبیونوکلئیک اسید می‌باشد. یکی از مهم‌ترین منابع آنتی‌اکسیدان‌ها، گیاهان می‌باشند [۳-۴]. متابولیت‌های ثانویه‌ای که توسط گیاهان تولید می‌شود دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده و از آن‌ها می‌توان به عنوان ترکیب دارویی استفاده کرد [۴-۵]. از جمله متابولیت‌های ثانویه فعال گیاهی، پلی‌فنول‌ها می‌باشند که در قسمت‌های مختلف گیاهان مانند برگ، میوه، دانه، ریشه و پوست وجود دارند [۴]. فلاونوئیدها و اسیدهای فنولی از مهم‌ترین گروه‌های پلی‌فنولی با خواص هورمونی، دارویی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند [۷].

از جمله بیماری‌های مهم که همواره گریبان‌گیر انسان بوده، بیماری‌های عفونی می‌باشد [۸]. در این زمینه تلاش‌های متعددی جهت تشخیص عوامل ایجاد‌کننده، درمان و کنترل آن‌ها صورت گرفته است [۹]. عمدت‌ترین مشکل جهت درمان بیماری‌های عفونی، مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و عوارض جانبی عوامل ضد میکروبی شیمیایی می‌باشد [۸]. همین امر باعث شده تا گیاهان به عنوان مواد طبیعی، کم خطر، در دسترس و ارزان قیمت بودن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان عفونت‌های میکروبی رواج یابند [۱۰]. ترکیبات

آب سرد به صورت سطحی مورد شستشو قرار گرفت و سپس به مدت ۵ روز در سایه خشک گردید.

جهت تهیه عصاره آبی گیاه شیشه‌شور، ابتدا برگ‌های خشک شده گیاه توسط آسیاب آزمایشگاهی (T3800، توس شکن، ایران) پودر شد. گیاه پودر شده از الک آزمایشگاهی (گرم از پودر برگ گیاه شیشه‌شور در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت ۷۲ ساعت روی دستگاه همزن مغناطیسی (IKA, RH Basic، آلمان) در دمای اتاق به آرامی هم زده شد تا استخراج عصاره به صورت کامل انجام شود. مخلوط حاصل از پارچه توری تمیز عبور داده شد. عصاره اولیه به دست آمده با دور rpm ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Centurion, K2042، آمریکا) شد. پس از عمل سانتریفیوژ کردن عصاره اولیه گیاه شیشه‌شور، عصاره شفاف شده تحت عمل تغليظ شدن (۵۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ دقیقه) توسط دستگاه تقطیر در خلا (روتاری)، Heidolph Instruments (Heidolph laborota 400) قرار گرفت. در نهایت عصاره تغليظ شده توسط دستگاه LD freeze dryer، Christ-Alpha 1-4 (آلمان) انجام آزمادی (آلمان) به طور کامل خشک شد. عصاره به دست آمده تا زمان انجام آزمون‌های میکروبیولوژی و شیمیایی در ظروف درب بسته تمیز که اطراف آن با فویل آلومنینیومی پیچیده شده بود در یخچال نگهداری شد [۱۱، ۱۲].

از آنالیز طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (Fourier-transform infrared spectroscopy; FTIR

و پیچیده می‌باشد. به همین دلیل استفاده از گیاهان دارویی جهت مهار فرآیند تومورزایی و القاء آپوتیوز در سلول‌های سرطانی یک روش جدید جهت مبارزه با سلطان کولون می‌باشد که از مزایای این روش هزینه کم‌تر و اثر جانبی کم‌تر می‌باشد [۲۰]. در این مطالعه، فعالیت ضدسرطانی عصاره آبی گیاه شیشه‌شور بر رده سلولی HT29 بررسی شد که جزء سلول‌های سرطانی کولون انسان است و به طور گسترده‌ای در مطالعات سلطان کولون مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۱]. تاکنون پژوهش‌های بسیار اندکی در مورد عصاره آبی گیاه شیشه‌شور انجام شده است [۱۲، ۲۲]. لذا هدف از این پژوهش تعیین فعالیت ضدمیکروبی، برهمکنش آن با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی، تعیین پتانسیل آنتی‌اکسیدانی، شناسایی گروه‌های عاملی ترکیبات شیمیایی و تشخیص کیفی نوع پیوندها، تعیین میزان فنول و فلاونوئید کل و در نهایت اثر سمیت سلولی عصاره آبی گیاه شیشه‌شور بر رده سلولی HT29 بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه میکروبیولوژی و شیمی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام پذیرفت.

برگ‌های تازه گیاه شیشه‌شور در خرداد ماه ۱۳۹۸ از محوطه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جمع‌آوری شد. بعد از تأیید اسم علمی گیاه توسط مرکز هرباریوم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان (کد هرbarیوم KHAU302)، برگ‌های جمع‌آوری شده توسط

و سپس به آن ۷۵ میکرولیتر نیتریت سدیم ۵ درصد افزوده شد. پس از گذشت ۵ دقیقه، ۱۵۰ میکرولیتر آلومینیوم تری کلرید ۱۰ درصد به مخلوط اضافه شد. در نهایت ۱ میلی لیتر سود اضافه گردید و پس از ۵ دقیقه میزان جذب نمونه در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. از آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد. جهت رسم منحنی استاندارد از محلول کوئرستین استفاده شد [۲۶].

در آزمون میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (2,2-(diphenyl-1-picrylhydrazyl) ابتدا ۱ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره آبی برگ گیاه شیشه‌شور با ۳ میلی لیتر از DPPH (Mm/۰۱ در متابول) مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در مکان تاریک قرار داده شد. میزان جذب نمونه‌ها در برابر نمونه شاهد (آب) در طول موج ۵۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی گیاه شیشه‌شور بحسب درصد بازدارندگی بر اساس معادله ذیل محاسبه شد [۲۴].

$$\text{فعالیت بازدارندگی} = \frac{100 \times \frac{\text{جذب نمونه اسانس} - \text{جذب نمونه کنترل}}{\text{جذب نمونه کنترل}}}{\text{جذب نمونه کنترل}}$$

جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی گیاه شیشه‌شور با مهار رادیکال آزاد ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ابتدا رادیکال‌های آزاد ABTS تهیه شد. برای این منظور ابتدا محلول آبی با غلظت ۷ میلی مولار از ABTS تهیه شده و به محلول ساخته شده، پتانسیم پرسولفات اضافه شد تا غلظت نهایی آن به ۲/۴۵ میلی‌مولار برسد. محلول به دست آمده به مدت ۱۶ ساعت در مکان تاریک و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. رقیق‌سازی کاتیون رادیکال ABTS⁺ توسط متابول تا رسیدن

گروه‌های عاملی ترکیبات شیمیایی و شناسایی کیفی عصاره آبی گیاه شیشه‌شور استفاده شد. برای آماده‌سازی نمونه، ابتدا عصاره پودر شده با برミد پتانسیم (هیچ پیکی در طول موج مورد استفاده جهت شناسایی گروه‌های عاملی عصاره ایجاد نمی‌کند) مخلوط گردید. مخلوط حاصل جهت به دست آوردن قرص مناسب فشرده شد. طیف FTIR از عصاره در محدوده طول موج cm⁻¹ ۴۰۰۰-۵۰۰ و توسط دستگاه FTIR (Avatar 370, Thermo Nicolet) ثبت شد [۲۳].

از روش فولین سیوکالچو (Folin-Ciocalteu) برای تعیین میزان فنول کل عصاره آبی گیاه شیشه‌شور استفاده شد. جهت انجام آزمون، ۱ میلی لیتر از محلول عصاره ۰/۱ درصد با ۲/۵ میلی لیتر از واکنش‌گر فنول مخلوط شد. پس از گذشت مدت زمان ۵ دقیقه، ۲/۵ میلی لیتر کربنات سدیم ۷ درصد به مخلوط اضافه شده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگه داری شد. در نهایت میزان جذب با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Biochrom WPA Lightwave UV/VIS, S2000, انگلیس) در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد و اعداد آن ثبت گردید. میزان کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره آبی گیاه شیشه‌شور بحسب اسید گالیک و با استفاده از معادله حاصل از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بحسب گالیک اسید بیان گردید [۲۴].

برای اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئیدی عصاره برگ گیاه شیشه‌شور از روش Zhishen و همکاران [۲۵]، با کمی تغییر استفاده شد. مطابق با این روش، ۱ میلی لیتر از محلول عصاره برگ گیاه شیشه‌شور با ۱/۲۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شده

اندازه‌گیری شد و تا زمانی که کدورت محلول با کدورت استاندارد نیم مکفارلند برابر نشده، توسط محلول رینگر رقیق colony شد. در این حالت سوسپانسیون میکروبی حاوی 1×10^8 forming unit/mL است [۲۸، ۱۱].

در روش ضدمیکروبی انتشار در آگار به کمک دیسک، ابتدا محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه و به پتریدیش‌های استریل اضافه شد. یک لوپ از کشت پایه هر باکتری بر این محیط کشت داده شد. دیسک‌های کاغذی (قطر ۶ میلی‌متر) با غلظت‌های ۱۵۰، ۳۷/۵ و ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره تهیه و با آن آغشته شد و به کمک پنس استریل در سطح محیط کشت با فوائل معینی قرار داده شد. در هر پتریدیش ۳ دیسک قرار گرفت، ۲ دیسک مربوط به غلظت‌ها و یک دیسک نیز به عنوان شاهد (دیسک فاقد عصاره) بود. همچنین فعالیت ضد باکتریایی دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استاندارد شامل جنتامایسین و کلرامفینیکل در پتریدیش‌های جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفت. در انتهای پتریدیش‌های New Model G25 & R25 (Brunswick Scientific، آمریکا) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تلقیح شده در انکوباتور (New Brunswick Scientific، آمریکا) به مدت ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها با خطکش برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد [۲۹، ۱۱].

در روش ضدمیکروبی انتشار در آگار به کمک چاهک، ابتدا با پیپ استریل چاهک‌های روی محیط کشت مولر هینتون آگار به عمق ۶ میلی‌متر ایجاد شد. سوسپانسیون میکروبی با غلظت معادل نیم مک‌فارلند روی سطح محیط کشت با سواپ پخش گردید. سپس از غلظت‌های مختلف عصاره (۱۵۰، ۳۷/۵

جذب معرف به $0/02 \pm 0/07$ در طول موج ۷۳۴ نانومتر انجام شد. در نهایت ۳۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره به ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول رادیکال ABTS اضافه و پس از گذشت ۵ دقیقه، جذب آن در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت و ثبت شد [۲۴-۲۳].

قبل از انجام آزمون‌های میکروبیولوژی، عصاره خشک شده گیاه شیشه‌شور با استفاده از اشعه فرابنفش استریل شد. جهت تأیید عمل استریل شدن عصاره توسط اشعه فرابنفش، عصاره اشعه دیده به صورت سطحی بر سطح محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری و عدم رشد هیچ کلني میکروبی، استریل بودن عصاره آبی گیاه شیشه‌شور تأیید شد [۸].

در این پژوهش از ۲ سویه استاندارد گرم مثبت *Listeria Staphylococcus aureus* ATCC 33090 و *innocua* ATCC 25923، ۳ سویه استاندارد گرم منفی *Salmonella typhi* 25923، *Escherichia coli* ATCC 25992، PTCC 1609 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 استفاده شد.

جهت انجام هر آزمون کشت تازه تهیه گردید [۲۷]. ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمون‌های ضدمیکروبی، تلقیح از کشت ذخیره به محیط کشت نوترینت آگار انجام شد. پس از گرمخانه گذاری (New Brunswick Model G25 & R25، Scientific، آمریکا) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، از کلني تک ایجاد شده بر سطح پتریدیش توسط لوپ حلقه‌ای استریل مقداری برداشته و به لوله آزمایش حاوی محلول رینگر استریل انتقال داده شد. کدورت سوسپانسیون میکروبی در اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر

حداقل غلظت کشنده‌گی عصاره برگ شیشه‌شور با توجه به نتایج به دست آمده از حداقل غلظت مهارکننده‌گی از رشد در آزمون قبل تعیین شد. ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک‌هایی که باکتری در آن‌ها رشد نکرده بود (تفییر رنگ قرمز یا ارغوانی مشاهده نشد) توسط سمپلر برداشته و به محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل شد. پتری دیش‌های کشت داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. اولین غلظتی از عصاره که مانع از رشد ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها شد (در سطح پتری دیش هیچ کلی مشاهده نشد) به عنوان حداقل غلظت کشنده‌گی تعیین گردید [۲۹، ۳۲]. برای ارزیابی برهمنش (همافزاوی یا کاهندگی) عصاره برگ شیشه‌شور در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفینیکل و جنتامایسین از غلظت تحت مهاری (Sub-MIC) استفاده شد. در این پژوهش از غلظت تحت مهاری که ۱/۲ غلظت حداقل غلظت مهارکننده‌گی بود استفاده شد. عصاره برگ شیشه‌شور به محیط مولر هینتون آگار اضافه شد و سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلنده بر سطح محیط کشت توسط سوآپ کشت داده شد و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک کلرامفینیکل و جنتامایسین روی سطح محیط کشت قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. پس از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت، قطره‌اله عدم رشد میکروبی توسط خطکش اندازه‌گیری شده و بر حسب میلی‌متر گزارش شد [۳۲].

جهت بررسی اثر سمیت سلولی عصاره برگ گیاه شیشه‌شور بر رده سلولی HT29 (شماره سلول C10097، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران) از روش MTT [4، 5-3] م-

۷۵/۳۷ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ۵۰ میکرولیتر درون چاهک‌ها ریخته شد. در هر پتری دیش ۳ چاهک ایجاد شد. ۲ چاهک از غلظت‌های مختلف عصاره و یک چاهک به عنوان شاهد (فاقد عصاره) استفاده شد. در انتهای پتری دیش‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار داده شد و قطره‌اله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها با خط کش بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد [۱۰، ۳۰].

آزمون تعیین کمترین غلظت مهارکننده‌گی (Minimum inhibitory concentration; MIC) و کمترین غلظت باکتری (Minimum bactericidal concentration; MBC) مطابق با مطالعه Alizadeh Behbahani و همکاران، انجام پذیرفت [۳۱]. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶ و ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در پلیت ۹۶ خانه استریل ریخته شد. ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با کدورت نیم مک فارلنده به هر چاهک اضافه شد. از محیط کشت حاوی باکتری و بدون عصاره به عنوان کنترل مثبت و از محیط کشت بدون باکتری حاوی عصاره به عنوان کنترل منفی استفاده شد. سپس میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از گذشت مدت زمان گرمخانه‌گذاری (۲۴ ساعت) محلول تری‌فنیل تترازولیوم کلرايد با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان شاخص رنگی رشد باکتری تهیه و به هر خانه ۱۰ میکرولیتر از این معرف افروده شد. اولین چاهکی که بعد از ۱۵ دقیقه گرمخانه گذاری مجدد تغییر رنگ قرمز یا ارغوانی در آن مشاهده نشد به عنوان MIC در نظر گرفته شد [۳۱].

در جدول ۱، آورده شده است. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت‌های عصاره آبی شیشه‌شور قطره‌هاله عدم رشد نیز افزایش یافت. به طور کلی، حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری در برابر عصاره آبی گیاه شیشه‌شور به ترتیب/استافیلوكوکوس اورئوس و اشرشیا کلی بود. مقایسه آماری نتایج نشان داد که میان غلظت‌های $18/75$ و $37/5$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای تمامی باکتری‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده نشد. با مقایسه دوتایی میان غلظت‌های 75 و 150 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشخص گردید غلظت بالاتر عصاره اثر ضدمیکروبی قوی‌تری در برابر باکتری‌های اشرشیا کلی، سالمونلا تیفی و لیستریا اینوکوا نشان می‌دهد ($P < 0.05$). لازم به ذکر است که اختلاف معنی‌داری بین اثر ضدمیکروبی غلظت‌های مذکور برای باکتری‌های سودوموناس ائروژینوزا و استافیلوكوکوس اورئوس مشاهده نشد ($P > 0.05$). مقایسه نتایج آماری بین غلظت‌های $37/5$ و 75 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان داد که فعالیت ضدمیکروبی غلظت 75 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی گیاه شیشه‌شور در برابر باکتری‌های اشرشیا کلی، سودوموناس ائروژینوزا و استافیلوكوکوس اورئوس به طور معنی‌داری بالاتر از غلظت $37/5$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود ($P < 0.05$). در غلظت ثابت عصاره، به استثناء غلظت 75 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که در آن قطره‌اله عدم رشد برای باکتری‌های استافیلوكوکوس اورئوس به طور معنی‌داری بالاتر از سالمونلا تیفی بود، اختلاف معنی‌داری بین قطره‌اله عدم رشد برای باکتری‌های مورد مطالعه مشاهده نشد ($P > 0.05$).

با این حال، به طور کلی باکتری‌های گرم مثبت حساسیت

dimethylthiazol-2-yl]-2, 5 diphenyl tetrazolium bromide (Alizadeh Behbahani و همکاران، میزان 10^5 سلول به هر چاهک اضافه گردید. (Dulbecco's Modified Eagle DMEM سپس محیط کشت 200 میکرولیتر سرم جنینی گاو و غلظت‌های 1 ، $3/125$ ، $6/25$ ، $12/5$ ، 25 ، 50 و 100 و 200 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره برگ شیشه‌شور به چاهک‌ها اضافه شد. در انتها 30 میکرولیتر از محلول MTT به تمام چاهک‌ها اضافه شده و صفحات به مدت 3 ساعت در انکوباتور دی‌اکسید کربن DMSO قرار گرفت. پس از حذف محیط، 200 میکرولیتر Dimethyl sulfoxide) به هر چاهک اضافه شد و میزان جذب در طول موج 570 نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Bio Tek Instruments ELX 808) خوانده شد. با استفاده از سلول‌های کنترل منحنی زنده‌مانی سلولی ترسیم گشت [۲۳].

از نرم‌افزار SPSS نسخه 18 جهت آنالیز نتایج استفاده گردید. آزمون نرمالیته Shapiro-Wilk's جهت تأیید نرمال بودن داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت و توزیع فراوانی داده‌ها نرمال بود. نتایج به صورت "انحراف معیار \pm میانگین" سه تکرار گزارش شدند و از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Duncan برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها 0.05 در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج ارزیابی فعالیت ضدبакتریایی عصاره آبی گیاه شیشه‌شور به روش دیسک دیفیوژن بر باکتری‌های بیماری‌زا

۴۷۰ خصوصیات شیمیابی و خواص ضد میکروبی و سلطانزایی عصاره آبی شیشه‌شور

بیشتری نسبت به عصاره آبی شیشه‌شور در مقایسه با انواع گرم منفی نشان دادند (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین قطره‌الله عدم رشد میکروبی (دیسک دیفیوژن) عصاره آبی شیشه‌شور بر باکتری‌های بیماری‌زا بر حسب میلی‌متر

غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)					باکتری
۱۵۰	۷۵	۳۷/۵	۱۸/۷۵		
۱۱/۱۰±۰/۲۰ ^{cA}	۹/۶۰±۰/۵۷ ^{bAB}	۷/۷۰±۰/۵۰ ^{aA}	۷/۱۰±۰/۵۸ ^{aA}		اشرشیا کلی
۱۱/۰۰±۰/۱۴ ^{bA}	۱۰/۴۰±۰/۲۹ ^{bAB}	۸/۸۰±۰/۴۳ ^{aA}	۸/۰۰±۰/۲۹ ^{aA}		سودوموناس ائرورژینوزا
۱۱/۲۰±۰/۱۴ ^{bA}	۹/۰۰±۰/۴۴ ^{aB}	۸/۶۰±۰/۵۲ ^{aA}	۸/۱۰±۰/۵۸ ^{aA}		ساممونلا تیفی
۱۱/۹۰±۰/۲۰ ^{bA}	۱۰/۸۰±۰/۳۵ ^{bA}	۹/۱۰±۰/۵۰ ^{aA}	۸/۲۰±۰/۳۷ ^{aA}		استافیلکوکوس اورئوس
۱۱/۳۰±۰/۰۵ ^{bA}	۹/۵۰±۰/۰۵ ^{aAB}	۸/۸۰±۰/۲۶ ^{aA}	۸/۱۰±۰/۳۰ ^{aA}		لیستریا اینوکوا

نتایج به صورت "انحراف معیار ± میانگین" سه تکرار ($n=3$) گزارش شده‌اند و از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Duncan برای تعزیز و تحلیل داده‌ها استفاده شده است.

حروف غیر مشابه کوچک در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره آبی شیشه‌شور است ($P<0/۰۵$).

حروف غیر مشابه بزرگ در یک ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان باکتری‌های مختلف است ($P<0/۰۵$).

ساممونلا تیفی و سودوموناس ائرورژینوزا) هیچ اختلاف معنی-داری در سطح ۵ درصد وجود ندارد ($P>0/۰۵$), در حالی که برای باکتری‌های گرم مثبت (استافیلکوکوس اورئوس و لیستریا اینوکوا) اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($P<0/۰۵$). همان‌طور که در جدول ۲ نیز مشخص است در غلظت‌های ۳۷/۵ و ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی گیاه شیشه‌شور برای تمامی باکتری‌های گرم منفی اختلاف معنی-داری در سطح ۵ درصد وجود داشت ($P<0/۰۵$), در حالی که برای باکتری‌های گرم مثبت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0/۰۵$). در شکل ۱، نمایی از فعالیت ضد باکتری‌ای عصاره آبی شیشه‌شور و آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی بر باکتری اشرشیا کلی نشان داده شده است.

جدول ۲، نتایج فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی شیشه‌شور به روش چاهک آگار بر باکتری‌های عامل عفونت و مسمومیت را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که باکتری استافیلکوکوس اورئوس با قطره‌الله ۱۰/۳۰ میلی‌متر در کمترین غلظت ۱۸/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) حساس‌ترین بود. در غلظت‌های بالاتر اثر ضد میکروبی بر باکتری‌های گرم منفی (سودوموناس ائرورژینوزا و ساممونلا تیفی) به طور قابل توجهی افزایش یافت، به نحوی که در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری‌های استافیلکوکوس اورئوس و ساممونلا تیفی قطره‌الله ۱۴/۱۰ میلی‌متر مشاهده شد. مقایسه نتایج آماری میان غلظت‌های ۱۸/۷۵ و ۳۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان داد که برای باکتری‌های گرم منفی (اشرشیا کلی،

جدول ۲- میانگین قطره‌الله عدم رشد میکروبی (چاهک آگار) عصاره آبی شیشه‌شور بر باکتری‌های بیماری‌زا بر حسب میلی‌متر

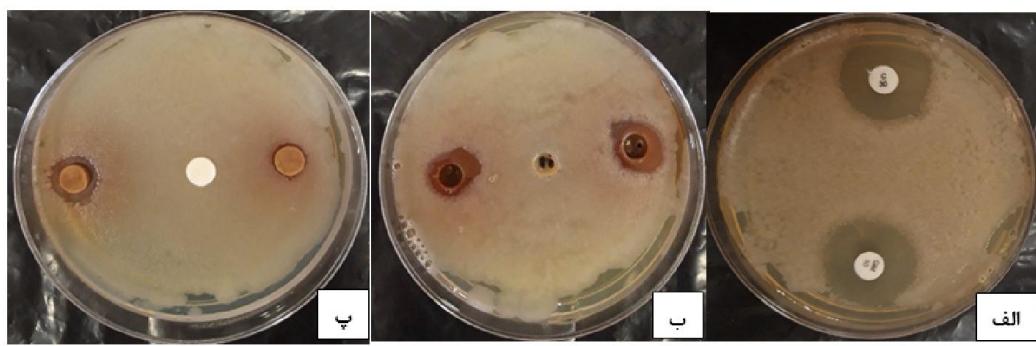
غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)					باکتری
۱۵۰	۷۵	۳۷/۵	۱۸/۷۵		

۱۱/۲۰±۰/۳۳ ^{bB}	۱۰/۱۰±۰/۲۷ ^{bC}	۹/۷۰±۰/۲۳ ^{aB}	۸/۲۰±۰/۱۹ ^{aB}	اشرشیا کلی
۱۳/۰۰±۰/۶۸ ^{bAB}	۱۰/۶۰±۰/۱۳ ^{bC}	۸/۵۰±۰/۴۰ ^{aC}	۸/۱۰±۰/۲۹ ^{aB}	سودوموناس ائرورژینوزا
۱۴/۱۰±۰/۱۴ ^{cA}	۱۱/۵۰±۰/۶۴ ^{bABC}	۸/۵۰±۰/۱۲ ^{aC}	۸/۳۰±۰/۳۷ ^{aB}	سالمونلا تیفی
۱۴/۱۰±۰/۷۷ ^{bA}	۱۲/۵۰±۰/۳۷ ^{bA}	۱۲/۰۰±۰/۴۰ ^{bA}	۱۰/۳۰±۰/۶۲ ^{aA}	استافیلوکوکوس اورئوس
۱۲/۲۰±۰/۶ ^{bAB}	۱۱/۹۰±۰/۵۰ ^{bAB}	۱۱/۵۰±۰/۳۵ ^{bA}	۸/۹۰±۰/۷۹ ^{aAB}	لیستریا اینوکوا

نتایج به صورت "انحراف معیار \pm میانگین" سه تکرار ($n=3$) گزارش شده اند و از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی *Duncan* برای تعزیزه و تحلیل داده ها استفاده شده است.

حروف غیر مشابه کوچک در یک ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح معنی داری ۵ درصد میان خلاصت های مختلف عصاره آبی شیشه شور است ($P<0.05$).

حروف غیر مشابه بزرگ در یک ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح معنی داری ۵ درصد میان باکتری های مختلف است ($P<0.05$).



شکل ۱- اثر ضد میکروبی عصاره آبی شیشه شور و آنتی بیوتیک های رایج درمانی بر باکتری اشرشیا کلی
الف) اثر آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و جنتاما یسین، پ) اثر عصاره به روش چاهک آشکار و پ) اثر عصاره به روش دیسک دیفیوژن.

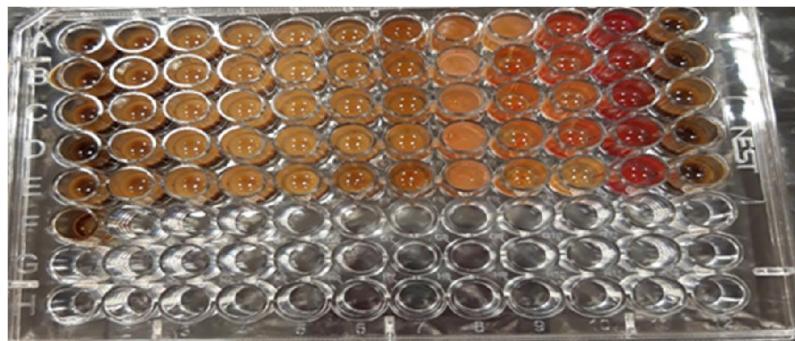
/ینوکوا به ترتیب ۸، ۸، ۱۶، ۸، ۴ و ۸ میلی گرم بر میلی لیتر بود. در شکل ۲، نمایی از اثر عصاره آبی گیاه شیشه شور به روش میکرو دیا لوشن براث (تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی) نشان داده شده است. نتایج حداقل غلظت کشنندگی نیز بزرگتر از حداقل غلظت مهار کنندگی بود.

نتایج حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشنندگی عصاره آبی شیشه شور برای باکتری های بیماری زا در جدول ۳، آورده شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهار کنندگی برای باکتری های اشرشیا کلی، سودوموناس ائرورژینوزا، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا

جدول ۳- حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشنندگی عصاره آبی شیشه شور بر باکتری های بیماری زا

باکتری	MIC (میلی گرم بر میلی لیتر)	MBC (میلی گرم بر میلی لیتر)	
اشرشیا کلی	>۵۱۲	۸	
سودوموناس ائرورژینوزا	>۵۱۲	۸	
سالمونلا تیفی	>۵۱۲	۱۶	
استافیلوکوکوس اورئوس	۵۱۲	۴	

MIC= Minimum inhibitory concentration
MBC= Minimum bactericidal concentration



شکل ۲- نمایی از تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آبی گیاه شیشه‌شور به روش میکروودا یلوشن براث

برای باکتری‌های گرم منفی که معمولاً از مقاومت بالاتری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت برخوردارند می‌تواند باعث افزایش اثر ضدباکتریایی گردد.

میزان فنول کل و فلاونوئید عصاره آبی شیشه‌شور به ترتیب $102/17$ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک و $44/95$ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک بود. نتایج بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی شیشه‌شور در جدول ۵، آورده شده است. نتایج نشان داد که میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد با افزایش غلظت عصاره افزایش پیدا کرد. میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد با استفاده از DPPH و ABTS در غلظت 125 میلی‌گرم بر میلی لیتر به ترتیب $71/68$ و $51/33$ بود.

جدول ۳- اثر آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفینیکل و جنتامايسین به تنهایی و توام (برهم‌کنش) با عصاره آبی شیشه‌شور بر باکتری‌های بیماری‌زا (میاتگین قطره‌ای عدم رشد میکروبی بر حسب میلی‌متر)

باکتری	کلرامفینیکل	جنتامايسین	کلرامفینیکل + عصاره	جنتامايسین + عصاره	ماده ضدمیکروب
اشرشیا کلی	$24/30 \pm 0/57^a$	$18/25 \pm 0/44^c$	$31/50 \pm 0/59^a$	$22/30 \pm 0/41^a$	

۲۲/۸۰±۰/۶۲ ^a	۲۲/۵۰±۰/۱۸ ^c	۲۰/۵۰±۰/۳۸ ^b	۱۸/۱۰±۰/۱۵ ^c	سودوموناس آئروژنیوزا
۲۰/۰۰±۰/۵۴ ^b	۲۰/۴۰±۰/۸۶ ^d	۱۸/۵۰±۰/۸۱ ^c	۱۸/۴۰±۰/۶۶ ^c	سالمونلا تیفی
۲۰/۲۰±۰/۷۷ ^b	۲۶/۱۰±۰/۲۷ ^b	۲۴/۴۰±۰/۷۸ ^a	۲۰/۲۰±۰/۳۲ ^b	استافیلوكوکوس اورئوس
۲۰/۱۰±۰/۴۶ ^b	۱۰/۳۰±۰/۶۶ ^c	۲۴/۵۰±۰/۳۷ ^a	۱۸/۰۰±۰/۷۲ ^c	لیستریا اینوکوا

نتایج به صورت "انحراف معیار \pm میانگین" سه تکرار ($n=3$) گزارش شده اند و از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی *Duncan* برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شده است.

حروف غیر مشابه در یک ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره آبی شیشه‌شور است.

جدول ۵- برسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی شیشه‌شور بر رادیکال‌های آزاد ABTS و DPPH

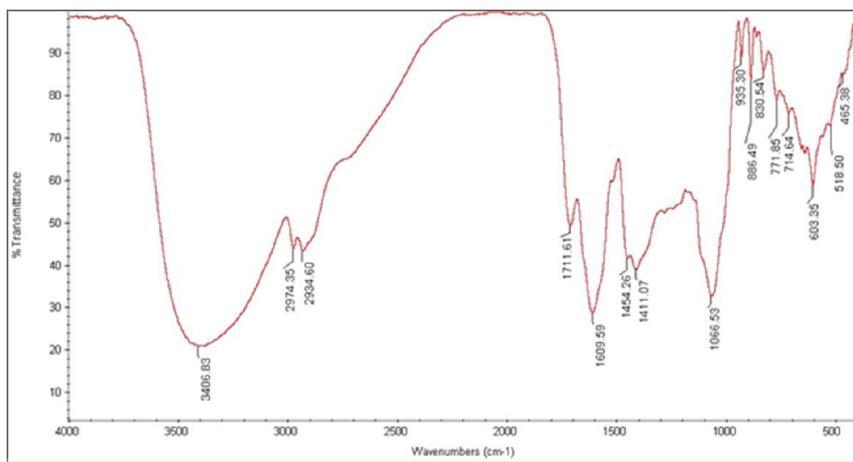
فعالیت مهارکنندگی (درصد)		غلظت عصاره (میلی گرم بر میلی لیتر)
ABTS	DPPH	
۵/۵۰ ± ۰/۲۸ ^c	۳۹/۴۵ ± ۰/۴۲ ^d	۲۵
۱۴/۲۳ ± ۰/۴۳ ^d	۵۶/۱۶ ± ۰/۳۲ ^c	۵۰
۳۲/۰۱ ± ۰/۶۹ ^c	۵۷/۹۰ ± ۰/۸۰ ^c	۷۵
۳۸/۱۴ ± ۰/۶۸ ^b	۶۸/۱۵ ± ۰/۱۵ ^b	۱۰۰
۵۱/۳۳ ± ۰/۸۹ ^a	۷۱/۶۸ ± ۰/۵۵ ^a	۱۲۵

نتایج به صورت "انحراف معیار \pm میانگین" سه تکرار ($n=3$) گزارش شده اند و از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی *Duncan* برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شده است.

حروف غیر مشابه در یک ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره آبی شیشه‌شور است.

پیک در گستره عدد موج cm^{-1} ۱۶۰۰-۱۷۰۰ در طیف است. وجود پیک در گستره cm^{-1} ۱۴۰۰-۱۵۰۰ نشان دهنده وجود گروه‌های C-C در حلقه آромاتیک ترکیبات پلی فنولی و گروه‌های OH موجود در ترکیبات فنولی در ساختار عصاره بود. وجود پیک‌ها در طول موج ۱۰۶-۱۰۲۲ احتمالاً به دلیل ارتعاشات کششی C-O در نمونه بود.

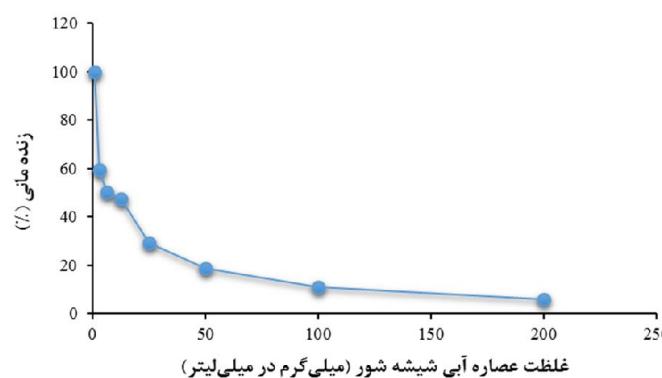
یکی از متداول‌ترین روش‌های ارزیابی ساختار ترکیبات آلی، استفاده از طیفسنجی زیر قرمز است. شکل ۳، طیف FTIR عصاره آبی گیاه شیشه‌شور را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که نوار پهن به مرکزیت $۳۴۰۶ cm^{-1}$ به دلیل وجود گروه های هیدروکسیل و گستره عدد موج cm^{-1} ۲۸۰۰-۳۰۰۰ به دلیل وجود پیوندهای C-H گروه‌های متیل در ساختار عصاره بود. حضور پیوند کششی C=O (گروه کربوکسیل) باعث ایجاد



شکل ۳- طیف FTIR عصاره آبی گیاه شیشه‌شور

۱۰/۸۶، ۱۸/۶۵ و ۱۰/۱۲ بود. بر اساس نتایج مشاهده شده، با افزایش غلظت عصاره آبی گیاه شیشه‌شور، تأثیر بر رده سلولی HT29 افزایش پیدا کرد و درصد زنده‌مانی آن کاهش یافت. بیشترین اثر سمیت سلولی عصاره آبی شیشه‌شور در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در مقابل کمترین اثر آن در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید.

نتایج مربوط به آزمون سمیت سلولی و اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه شیشه‌شور بر رده سلولی HT29 در شکل ۴، نشان داده شده است. برای تعیین سمیت سلولی عصاره آبی گیاه شیشه‌شور از غلظت‌های ۱، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید. درصد زنده‌مانی سلول‌های HT29 در غلظت‌های مذکور به ترتیب ۱۰۰، ۵۰/۱۲، ۵۹/۳۳، ۴۷/۶۶، ۵۰/۱۲، ۲۹/۲۴، ۱۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ و ۱۰/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید.



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه شیشه‌شور بر زنده‌مانی رده سلولی HT29

بحث

ضد میکروبی در برابر میکروارگانیسم‌های مورد بررسی (باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی) بود. به طوری که فعالیت ضدبacterیایی عصاره‌های الکلی شیشه‌شور با اثر آنتی‌بیوتیکی استاندارد قابل مقایسه بود [۲۲]. اثر ضد میکروبی بالاتر عصاره آبی گیاه شیشه‌شور در برابر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی به تفاوت در غشاء و دیواره سلولی این باکتری‌ها نسبت داده می‌شود، به طوری که باکتری‌های گرم مثبت دارای لایه موکوبیتیدی ضخیم‌تری در دیواره سلولی خود می‌باشند، در حالی که این لایه در باکتری‌های گرم منفی نازک‌تر است و ساختار سلولی آن‌ها اغلب متشکل از لیپوپروتئین و لیپوپلی‌ساقارید می‌باشد که منجر به مقاومت بیش‌تر باکتری نسبت به ترکیبات ضد میکروبی می‌گردد [۳۴]. جهت تأیید این فرضیه، انجام آزمون‌های تكمیلی از قبیل بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی سلول باکتری توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی و اندازه‌گیری میزان خروج گلوکز، لاکتان دهیدروژناز و پروتئین از سلول‌های باکتریایی پیشنهاد می‌گردد. علاوه بر این، ترکیبات اصلی تشکیل دهنده عصاره آبی شیشه‌شور بایستی توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیفسنج جرمی شناسایی و تعیین مقدار گرددند. با جداسازی و خالص‌سازی این ترکیبات و بررسی فعالیت ضد میکروبی آن‌ها می‌توان به طور دقیق‌تری در مورد ساز و کار ضد میکروبی عصاره آبی شیشه‌شور بحث نمود. با این حال، با مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی و کلروفرمی برگ گیاه شیشه‌شور، Krishna و همکاران گزارش نمودند که عصاره کلروفرمی دارای بالاترین اثر ضد میکروبی بود و عصاره آبی قادر فعالیت ضد میکروبی بر باکتری‌های

با توجه به مقاومت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی، یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید با کمترین اثر جانبی بسیار حائز اهمیت است. در این پژوهش آزمایشگاهی فعالیت ضد میکروبی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات فنولی و فلاونوئید کل، ساختار شیمیایی و اثر سمیت سلولی عصاره آبی گیاه شیشه‌شور مورد بررسی قرار گرفت.

با توجه به نتایج به دست آمده از آزمون ضد میکروبی عصاره آبی گیاه شیشه‌شور (جداول ۱، ۲، ۳ و ۴) مشخص شد که عصاره آبی گیاه شیشه‌شور به خوبی توانست در غلظت‌های مورد بررسی از رشد باکتری‌های بیماری‌زا بهویژه باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری کند. فعالیت ضد میکروبی انسنس و عصاره‌های آبی و الکلی گیاه شیشه‌شور در مطالعات مختلف گزارش شده است. با مطالعه اثر ضد میکروبی انسنس گیاه شیشه‌شور بر تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی، Oyedeff و همکاران گزارش نمودند که سویه استافیلوكوکوس اورئوس نسبت به انسنس شیشه‌شور حساس‌ترین بود که این اثر ضد میکروبی به ترکیبات اصلی تشکیل دهنده انسنس از قبیل ۸ و ۱-سینئول (۸۳/۲ درصد)، آلفا پین (۶/۴ درصد) و آلفا تریپینئول (۴/۹ درصد) نسبت داده شد [۳۳]. نتایج حاکی از آن است که سویه اشرشیا کلی مقاوم‌ترین سویه در برابر عصاره آبی شیشه‌شور بود. چنین نتیجه‌های در خصوص بررسی اثر عصاره اتانولی و متانولی گیاه شیشه‌شور توسط Seyydnejad و همکاران بر فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های الکلی شیشه‌شور گزارش شده است. نتایج این محققین نشان داد که عصاره اتانولی و متانولی گیاه شیشه‌شور دارای فعالیت

۳/۶۸ میلی‌گرم روتین بر گرم عصاره) بالاتری نسبت به عصاره اتیل استات است که دلیل این امر به اثر حلal بر محتوای ترکیبات فنولی هنگام استخراج نسبت داده شد [۴۰]. میزان فنول کل حدود ۱۰۰ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره فلاونوئید کل حدود ۲۵ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره آبی برگ شیشه‌شور در مطالعه Ahmed و Rahman گزارش گردید [۴۱]. تفاوت در میزان فنول و فلاونوئید کل در این مطالعه با سایر مطالعات به شرایط مختلف آب و هوایی و جغرافیایی محل رشد گیاه از قبیل نوع خاک، میزان آب و ارتفاع محیط و همچنین روش‌های مختلف اندازه‌گیری و بیان نتایج این دو ترکیب وابسته می‌باشد [۴۲]. بنابراین، شناسایی و اندازه‌گیری ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره آبی شیشه‌شور توسط روش‌های تجزیه‌ای دقیق‌تر از قبیل کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا پیشنهاد می‌گردد.

رادیکال‌های آزاد سبب تغییر عملکرد طبیعی ماکرومولکول‌های سلولی مانند کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، لیپیدها و نوکلئیک اسیدها و در نهایت تسريع صدمات التهابی، آب‌مروارید، سرطان، پیری و سایر بیماری‌های وابسته می‌شوند [۴۳]. بنابراین، دریافت مقادیر کافی ترکیبات آنتی‌اسیدانی جهت جلوگیری و درمان این اختلالات ضروری می‌باشد. ترکیبات فلاونوئیدی و فنولی نقش مهمی در فعالیت آنتی‌اسیدانی گیاهان دارویی ایفاء می‌کنند. فعالیت آنتی‌اسیدانی عصاره آبی شیشه‌شور وابسته به غلظت بود و غلظت‌های بالاتر قدرت مهارکنندگی قوی‌تری در برابر رادیکال‌های آزاد نشان دادند. قابلیت انسانس شیشه‌شور در مهار رادیکال آزاد DPPH بهصورت تابعی از غلظت انسانس در

باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس پومیلیس و اشرشیا کلی بود [۳۵]. به طور کلی شاید بتوان دلیل اختلاف بین نتایج مطالعه‌های مختلف انجام شده در جهان را به عوامل مختلفی همانند گونه گیاه، شرایط کشت، نوع خاک، شرایط آب و هوایی، نوع عصاره‌گیری و حلال‌های مورد استفاده جهت عصاره‌گیری نسبت داد [۳۱-۳۲].

آن‌تی‌اسیدان‌ها نقش اساسی در کنترل و درمان بیماری‌ها دارند و فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی به عنوان منابع طبیعی آنتی‌اسیدانی موجود در گیاهان دارویی شناخته می‌شوند [۳۶]. ترکیبات فلاونوئیدی متعددی از قبیل A callistine A, 6,7-dimethyl-5,7-dihydroxy-4'-methoxy flavone, 8- eucalyptin, catechin, querctein, astragalin و demethyleucalyptin شناسایی شده‌اند [۳۷]. از دیگر ترکیبات فنولی شناسایی شده در گیاه شیشه‌شور می‌توان به A blumenol, n- methyl gallate, gallic acid, tetratriacontanol 2,6,10- β-sitosterol, protocatechuic acid و bisabolatriene اشاره نمود [۳۸]. محتوای فنول و فلاونوئید کل عصاره آبی شیشه‌شور به ترتیب ۱۰۲/۱۷ میلی‌گرم گالیک اسید و ۴۴/۹۵ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک بود. محتوای فنول کل از ۱۲۳/۳۰ تا ۵۴۸/۸۵ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره‌های الكلی خشک برگ شیشه‌شور در مطالعه Saad و همکاران گزارش شده است [۳۹]. در مطالعه‌ای دیگر، مشخص گردید که عصاره متابولی شیشه‌شور دارای میزان فنول کل (۲۲۵/۱۱) در برابر ۱۰۹/۶۴ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره) و فلاونوئید کل (۶/۸۸ در برابر

شیشه‌شور تأیید گردید [۴۹]. با این حال، مطالعات بیشتری جهت شناسایی ترکیبات مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی این گیاه نیاز می‌باشد. علاوه بر این، ترکیبات زیست فعال گیاهان دارویی دارای جنبه‌های واکنش‌پذیری پیچیده‌ای می‌باشند و بنابراین پیشنهاد می‌شود که آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی مختلفی جهت تعیین و صحت فعالیت آنتی‌اکسیدانی انسان‌های گیاهی استفاده گردد. دو آزمون آنتی‌اکسیدانی استفاده شده در این مطالعه بر پایه اهداء DPPH هیدروژن از عصاره آبی شیشه‌شور به رادیکال‌های آزاد ABTS و استوار می‌باشند و بنابراین پیشنهاد می‌شود که از سایر روش‌های آنتی‌اکسیدانی برپایه اهداء الکترون (مانند قدرت کاهنده‌گی) و شلاته کننده‌گی (شلاته کردن فلزات واسطه) جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی شیشه‌شور استفاده شود.

ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی فعالیت ضد سرطانی قابل توجهی نشان می‌دهند. نتایج حاکی از آن است که با افزایش غلظت عصاره آبی گیاه شیشه‌شور، تأثیر بر رده سلولی سرطانی HT29 افزایش پیدا کرد و درصد زنده مانی آن کاهش یافت. در راستای نتایج این مطالعه، سمیت سلولی انسان برگ و گل گیاه شیشه‌شور در برابر سرطان ریه انسان (A549)، گلیومای موش (C-6)، سرطان روده بزرگ انسان (Colo-205) و سرطان دهانه رحم (siHa) توسط Kumar و همکاران بررسی گردید. مطابق نتایج این محققین، سمیت سلولی وابسته به غلظت انسانس گل و برگ بود و بالاترین فعالیت سمیت سلولی در برابر سلول‌های A594 و C-6 مشاهده شد. اما اثرات انسانس بر سلول‌های SiHa و Colo-205 ناچیز بود [۱۶]. اثر سمیت

مطالعه Abdelhady و همکارش نشان داده شده است، به طوری که بالاترین درصد مهارکنندگی (۹۱/۱ درصد) در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر انسانس به دست آمد [۴۴]. با مطالعه عالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره مтанولی گل، برگ و ساقه شیشه‌شور بر پایه روش آنتی‌اکسیدانی DPPH Jamzad و همکاران گزارش نمودند که بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۹۳/۳۲ درصد) در عصاره حاصل از گل‌های گیاه به دست آمد و درصد مهارکنندگی رادیکال عصاره مtanولی برگ و ساقه گیاه به ترتیب ۶۴/۱۱ و ۴۴/۱۷ درصد بود [۴۵]. در مطالعه‌ای دیگر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS) عصاره اتیل‌استات و مtanول شیشه‌شور مورد بررسی قرار گرفت. نتایج پتانسیل آنتی‌اکسیدانی نشان داد که IC₅₀ عصاره اتیل‌استات (۰/۲۵ ± ۰/۴۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) کمتر از عصاره مtanولی (۰/۲۴ ± ۰/۳۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در روش DPPH بود. همچنین در روش ABTS نیز عصاره اتیل‌استات و مtanولی به ترتیب ۰/۳۶ ± ۰/۸۰ و ۰/۵۲ ± ۰/۵۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود [۴۰]. مقایسه نتایج این پژوهش‌گران با مطالعه حاضر نشان می‌دهد که اختلاف میان اعداد گزارش شده برای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی ممکن است ناشی از شرایط کشت گیاه، شرایط آب و هوایی، زمان جمع‌آوری گیاه و همچنین نوع حلال مورد استفاده و روش اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی باشد [۴۶-۴۸]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی گیاه شیشه‌شور عمده‌تاً ناشی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آن است، به طوری که حضور کشش پیوند O-H، الکل/فنول، C-H آلکیل و C=O آلدئید، کتون، استر و کربوکسیلیک اسید در طیف FTIR عصاره آبی

نتیجه‌گیری

نتایج فعالیت ضد باکتریایی عصاره آبی برگ شیشه‌شور نشان داد که فعالیت ضد میکروبی بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود. با این حال با توجه به نتایج به دست آمده از برهم‌کنش عصاره با آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفینیکل و جنتامایسین و افزایش اثر ضد میکروبی (اثر سینئرژیستی) بهویژه بر باکتری‌های گرم منفی پیشنهاد می‌شود به طور همزمان از ترکیب آنتی‌بیوتیک و عصاره آبی شیشه‌شور استفاده شود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عصاره آبی برگ شیشه‌شور از پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردار است. با توجه به نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنول کل عصاره و همچنین اثر سمیت سلولی عصاره بر رده سلولی HT29 به نظر می‌آید بتوان از پتانسیل بالقوه این گیاه در پیش‌گیری و درمان بیماری استفاده نمود. هرچند لازم است در ادامه پژوهش‌های بیشتری در شرایط مختلف (آزمایشگاهی و مدل حیوانی) انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد می‌باشد، لذا نویسنده‌گان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

سلولی قابل توجه عصاره‌های الکلی و آبی برگ شیشه‌شور در برابر سلول‌های سلطانی در مطالعه Saad و همکاران نیز گزارش شده است [۳۹]. علاوه بر این، غلظت پایین متیل اوژنول (ترکیب زیست فعال گیاه شیشه‌شور) دارای اثر ضد توموری در برابر سلطان سینه است، اما غلظت‌های بالای آن منجر به ایجاد جهش در دزوکسی ریبونوکلئیک اسید و متعاقباً افزایش حساسیت به سلطان کبد می‌شود [۴۴]. بنابراین، گیاه شیشه‌شور حاوی ترکیبات زیست فعالی است که در غلظت‌های مشخص قادر به ایجاد فعالیت ضدسلطانی می‌باشند. در حقیقت، ترکیبات فنولی اثر ضدسلطانی خود را از طریق جلوگیری از آنزیم‌های متابولیک دخیل در فعل سازی عوامل سلطان‌زا و یا توقف سیکل سلول سلطانی بروز می‌دهند [۴۴]. لازم به ذکر است که در آزمون MTT، ترکیب تترازولیوم توسط آنزیم دهیدروژناز میتوکندری سلول زنده به فورمازان ارگانی رنگ احیاء می‌شود که مقدار فورمازان تولیدی با اندازه گیری جذب محلول در ۵۷۰ نانومتر تعیین می‌گردد [۵۰]. بنابراین، ترکیبات احیاء کننده مانند پلی فنول‌ها قادر به احیاء کردن تترازولیوم به فورمازان و تداخل در این آزمون می‌باشند. در این راستا، پیشنهاد می‌شود که از آزمون‌های تکمیلی از قبیل زنده‌مانی سلول بر پایه ATP (Adenosine triphosphate) و ارزیابی ریزساختار سلول توسط میکروسکوپ الکترونی روشی جهت تأیید فعالیت ضدسلطانی عصاره‌های گیاهی غنی از ترکیبات فنولی استفاده گردد.

References

- [1] Minadipour MM, Sharifi, A. Evaluation of chemical composition and antioxidant activity of *Cydonia Oblonga* extract. *Innov Food Sci Technol* 2019; 10(1): 109-19. [Farsi]
- [2] Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Phco Rev* 2010; 4(8): 118-26.
- [3] Azadedel S, Hanachi P, Saboora A. Investigation on antioxidant activity of pistachio (*Pistacia vera L.*) skin extraction. *J Plant Res* 2018; 30(4): 722-31. [Farsi]
- [4] Mirzaei A, Mohammadi J, Mirzaei N, Mirzaei M. The antioxidant capacities and total phenolic contents of some medicinal plants in Iran. *J Fasa Univ Med Sci* 2011; 1(3): 160-7. [Farsi]
- [5] Jafari N, Naderi P, Ebrahimzadeh MA. Evaluation of phenolic content, total flavonoid and survey of antioxidant activity of leaves of *Ficus carica* and *Pterocarya fraxinifolia* trees using spectrophotometry and high-performance liquid chromatograph methods. *Iran J Plant Biol* 2015; 7(25): 1-16. [Farsi]
- [6] Kiarostami Kh, Mosafa N. The study of antioxidant properties of *Lavandula angustifolia* in tissue culture. *J Plant Res* 2016; 28(4): 835-43. [Farsi]
- [7] Salmanian SH, Sadeghi Mahoonak AR, KHomeiri M, Masteri Farahani MR. Phenolic acid content, antiradical and antimicrobial properties of *Mentha aquatic* leaf methanolic extract. *Iran J Nutr Sci Food Technol* 2013; 7(2): 145-54. [Farsi]
- [8] Pedram Nia A, Mortazavi A, Nemat Shahi MM. Study of chemical compounds and the antimicrobial effects of leaf extract of *Laurus nobilis* L on various microbial strains. *Food Sci Technol* 2018; 15(81): 217-26. [Farsi]
- [9] Majnouni MB, Ebiri R, Adibi H. Study of antimicrobial effects of *Trigonella Foenum* hydro-alcoholic extract on different bacterial strains. *Med Lab J* 2009; 3(1): 32-35. [Farsi]
- [10] Mobaiyen H, Jafari Sales A, Sayyahi J. Evaluating Antimicrobial effects of centaurea plant's essential oil on pathogenic bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Escherichia coli* isolated from clinical specimens. *J Fasa Univ Med Sci* 2016; 5(4): 479-87. [Farsi]
- [11] Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M, Vasiee A. Antimicrobial effect aqueous and ethanolic extract of *Avicennia marina* on microorganisms the infection and intoxication in vitro. *J North Khorasan Univ Med Sci* 2014; 6(1): 99-109. [Farsi]
- [12] Cock I. Antimicrobial activity of *Callistemon citrinus* and *Callistemon salignus* methanolic extracts. *Phcog Commn* 2012; 2(3): 50-57.
- [13] Ashraf Mansuri SJA, Ramezanian M. Comparing the effect of methanolic and aquatic extract of *Callistemon viminalis* (SOL. Ex Gaertn.) G. Don with amphotericin B and their synergistic effects. *J Fasa Univ Med Sci* 2017; 7(1): 86-93. [Farsi]

- [14] Larayetan RA, Okoh OO, Sadimenko A, Okoh AI. Terpene constituents of the aerial parts, phenolic content, antibacterial potential, free radical scavenging and antioxidant activity of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels (Myrtaceae) from Eastern Cape Province of South Africa. *BMC Complement Altern Med* 2017; 17(1): 292.
- [15] Sampath S, Veeramani V, Krishnakumar GS, Sivalingam U, Madurai SL, Chellan R. Evaluation of in vitro anticancer activity of 1, 8-Cineole-containing n-hexane extract of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels plant and its apoptotic potential. *Biomed Pharmacother* 2017; 93: 296-307.
- [16] Kumar D, Sukapaka M, Babu GDK, Padwad Y. Chemical composition and in vitro cytotoxicity of essential oils from leaves and flowers of *Callistemon citrinus* from western Himalayas. *Plos One* 2015; 10(8): e0133823.
- [17] Mirzaei R, Mirzaei H, Alikhani MY, Sholeh M, Arabestani MR, Saidijam M, et al. Bacterial biofilm in colorectal cancer: What is the real mechanism of action?. *Microb Pathogenesis* 2020; 142: 104052.
- [18] International Agency for Research on Cancer. Cancer Fact Sheets. Available online: <http://gco.iarc.fr/today/factsheets-cancers>. Last access: July 4, 2019.
- [19] Dalali Isfahani L, Monajemi R, Amjad L. Cytotoxic effects of extract and essential oil leaves of *Achillea wilhelmsii* C. Koch on colon cancers cells. *Exp Anim Biol* 2013; 1(3): 1-6.
- [20] Abdalan S, Baghbani-Arani F, Sadat Shandiz SA. Evaluation of anticancer effect of aqueous and hydroalcoholic extracts of *Quercusin fectoria* leaf against colon cancer HT29 cell line. *J Arak Univ Med Sci* 2018; 21(4): 48-57. [Farsi]
- [21] Schwarz SB, Schaffer PM, Kulka U, Ertl-Wagner B, Hell R, Schaffer M. The effect of radio-adaptive doses on HT29 and GM637 cells. *Radiat Oncol* 2008; 3(1): 1-6.
- [22] Seyydnejad SM, Niknejad M, Darabpoor I, Motamed H. Antibacterial activity of hydroalcoholic extract of *Callistemon citrinus* and *Albizia lebbeck*. *Am J Appl Sci* 2010; 7(1): 13-16.
- [23] Alizadeh Behbahani B, Noshad M, Falah F. Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of *Syzygium aromaticum* essential oil on foodborne pathogens. *Potravinarstvo Slovák J Food Sci* 2019; 13(1): 875-83.
- [24] Dehghan N, Barzegar H, Mehrnia MA, Jooyandeh H. Investigation on the effect of Methanolic Bene (*pistachia atlantica*) hull extract on oxidative stability of soybean oil. *Innov Food Technol* 2018; 5(3): 499-507. [Farsi]
- [25] Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 1999; 64(4): 555-9.

- [26] Ansaripour A, Mehrnia M. A, Noshad M, Barzegar H, Alizadeh Behbahani B. Antimicrobial effect of garlic essential oil on a number of foodborne pathogens and determination of its chemical composition and antioxidant activity. *Food Sci Technol* 2019; 16(91): 17-29. [Farsi]
- [27] Alizadeh Behbahani B, shahidi F, Tabatabai Yazdi F, Mortazavi A, Mohebbi M. The antimicrobial effect and interaction between the aqueous and ethanolic extracts of *Plantago major* on *Staphylococcus aureus*, *Listeria Inocova*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Iran J Infect Dis and Trop Med* 2017; 21(75): 1-8. [Farsi]
- [28] Khosravi A, Malecan M. Effects of *Lavandula stoechas* extracts on *Staphylococcus aureus* and other gram negative bacteria. *J Qazvin Univ Med Sci* 2004; 7(5): 3-9. [Farsi]
- [29] Derakhshan S, Sattari M, Bigdeli M, Zarei Eskikand N. Antibacterial activity of essential oils from Artemisia and Cumin plants against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Vibrio cholera*. *J Qazvin Univ Med Sci* 2011; 15(1): 6-14. [Farsi]
- [30] Mahmodi R, Amini K, Asadi Dashbolagh J, Farhoodi A. Antioxidant and antibacterial properties of the *Melissa officinalis* essential oil. *J Qazvin Univ Med Sci* 2016; 20(2): 49-57. [Farsi]
- [31] Alizadeh Behbahani B, Noshad M, Falah F. Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microb Pathogenesis* 2019; 136: 103716.
- [32] Barzegar H, Alizadeh Behbahani B, Mehrnia M. A. Identification of the chemical compounds and antibacterial activity of *Ocimum basilicum* essential oil and the effects of its interaction with tetracycline and chloramphenicol antibiotics on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning. *Food Sci Technol* 2019; 16(90): 113-25. [Farsi]
- [33] Oyedele OO, Lawal OA, Shode FO, Oyedele AO. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Callistemon citrinus* and *Callistemon viminalis* from South Africa. *Molecules* 2009; 14(6): 1990-8.
- [34] Heidari-Sureshjani M, Tabatabaei-Yazdi F, Alizadeh- Behbahani B, Mortazavi A. Antimicrobial effect of aqueous, ethanol, methanol and glycerin extracts of *Satureja bachtiarica* on *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Zahedan J Res Med Sci* 2015; 17(7): e1011.
- [35] Krishna K, Surendra G, Anjana M, Siva Nagini K. Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Callistemon citrinus* (L.) leaves extracts. *Int J Pharm Tech Res* 2012; 4(2): 700-4.
- [36] Hosseiniemehr SJ, Pourmorad F, Shahabimajd N, Shahrbandy K, and Hosseinzadeh R. In vitro antioxidant activity of *Polygonum hyrcanicum*, *Centaurea depressa*, *Sambucus ebulus*, *Mentha spicata*

- and *Phytolacca americana*. *Pakistan J Biol Sci* 2007; 10(4): 637-40.
- [37] Cuong NM, Khanh PN, Duc HV, Huong TT, Kim YC, Long PQ, et al. Flavonoids and triterpenoids from *Callistemon citrinus* and their inhibitory effect on NO production in LPS-stimulated Raw264.7 macrophages. *Vietnam J Sci Technol* 2016; 54(2): 214-23.
- [38] Khanh PN, Đuc HV, Huong TT, Ha VT, Van DT, Kim YH, et al. Phenolic compounds from *Callistemon citrinus* leaves and stems. *Vietnam J Sci Technol* 2016; 54(2): 190-7.
- [39] Saad AM, Abdel-Aleem AAH, Ghareeb MA, Hamed MM, Abdel-Aziz MS, Hadad AH. In vitro antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities and green biosynthesis of silver & gold nanoparticles using *Callistemon citrinus* leaf extract. *J App Pharm Sci* 2017; 7(06): 141-9.
- [40] Larayetan R, Ololade ZS, Ogunmola OO, Ladokun A. Phytochemical constituents, antioxidant, cytotoxicity, antimicrobial, antitrypanosomal, and antimalarial potentials of the crude extracts of *Callistemon citrinus*. *Evid-Based Compl Alt* 2019; 2019: 1-14.
- [41] Ahmed F, Rahman MS. Preliminary assessment of free radical scavenging, thrombolytic and membrane stabilizing capabilities of organic fractions of *Callistemon citrinus* (Curtis.) skeels leaves. *BMC Compl Alt Med* 2016; 16(1): 1-8.
- [42] Barzegar H, Behbahani BA, Mehrnia MA. Quality retention and shelf life extension of fresh beef using *Lepidium sativum* seed mucilage-based edible coating containing *Heracleum lasiopetalum* essential oil: an experimental and modeling study. *Food Sci Biotechnol* 2020; 29: 717-28.
- [43] Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* 2010; 31(1): 37-49.
- [44] Abdelhady MI, Aly HAH. Antioxidant antimicrobial activities of *callistemon comboynensis* essential oil. *Free Radical Antioxid* 2012; 2(1): 37-41.
- [45] Jamzad M, Kazembakloo A, Tehrani AD, Rostami F. Essential oil composition and antioxidant activity of hydromethanolic extract from the flowers, leaves and stems of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels. *Indian J Nat Prod Resour* 2015; 5(4): 308-12.
- [46] Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Yazdi FT, Mortazavi SA, Mohebbi M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (*Artemisia dracunculus*) extract and chemical composition of its essential oil. *J Food Meas Charact* 2017; 11(2): 847-63.
- [47] Noshad M, Hojjati M, Alizadeh Behbahani B. Black Zira essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some pathogenic strain causing infection. *Microb Pathogenesis* 2018; 116: 153-7.
- [48] Yeganegi M, Yazdi FT, Mortazavi SA, Asili J, Alizadeh Behbahani B, Beigbabaei A. *Equisetum telmateia* extracts: Chemical compositions, antioxidant activity

- and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. *Microb Pathogenesis* 2018; 116: 62-67.
- [49] Fayemi PO, Ozturk I, Kaan D, Özcan S, Yerer MB, Dokumaci AH, et al. Bioactivities of phytochemicals in *Callistemon citrinus* against multi-resistant foodborne pathogens, alpha glucosidase inhibition and MCF-7 cancer cell line. *Biotechnol Biotech Eq* 2019; 33(1): 764-78.
- [50] Van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes* 2015; 8(1): 1-10.

Investigation of the Functional Groups of Bioactive Compounds, Radical Scavenging Potential, Antimicrobial Activity and Cytotoxic Effect of *Callistemon Citrinus* Aqueous Extract on Cell Line HT29: A Laboratory Study

Z. Sosani Gharibvand¹, B. Alizadeh Behbahani[†], M. Noshad[†], H. Jooyandeh[†]

Received: 22/02/2020 Sent for Revision: 09/06/2020 Received Revised Manuscript: 27/06/2020 Accepted: 05/07/2020

Background and Objectives: The extensive use of chemical drugs for the treatment and control of chronic and infectious diseases as well as colorectal cancer, has led to an increased demand for natural and safe drugs and preservatives. Therefore, this study aimed to evaluate the presence of functional groups of constituents, total phenol and flavonoids content, radical scavenging potential, and antimicrobial activity of *Callistemon citrinus* aqueous extract (CCE). Its interaction with common therapeutic antibiotics and cytotoxic effect on cell line HT29 was also evaluated.

Materials and Methods: In this laboratory study, the presence of functional groups of chemical constituents of *C. citrinus* aqueous extract was evaluated by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Free radical scavenging activity, total phenol and flavonoids content, antimicrobial activity of *C. citrinus* aqueous extract and its interaction with chloramphenicol and gentamicin antibiotics, and the viability of cell line HT29 (through MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] test) under different concentrations of *C. citrinus* aqueous extract were investigated. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Duncan's test.

Results: The *C. citrinus* aqueous extract had a considerable antimicrobial effect on *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria innocua*. The free radicals scavenging effect of *C. citrinus* aqueous extract was in the range of 51.33-71.68%. The presence of C-C and OH groups of phenolic compounds of *C. citrinus* aqueous extract was confirmed by FTIR. After 24 hours, the different concentrations of *C. citrinus* aqueous extract reduced the growth of cell line HT29 compared to the control group ($p<0.05$).

Conclusion: The *C. citrinus* aqueous extract had antimicrobial activity, antioxidant potential and inhibitory effect on cell line HT29. Therefore, the use of *C. citrinus* aqueous extract could be suggested in pharmaceutical and food industries.

Key words: Cytotoxic effect, Minimum inhibitory concentration, In vitro, *Callistemon citrinus* aqueous extract

Funding: This study was funded by Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: This study has been approved by the Research Deputy of Agricultural Science and Natural Resources of University of Khuzestan and Iranian Research Institute for Information Science and Technology (IR.AC.IRANDOC. SABT.1520449).

How to cite this article: Sosani Gharibvand Z, Alizadeh Behbahani B, Noshad M, Jooyandeh H. Investigation of the Functional Groups of Bioactive Compounds, Radical Scavenging Potential, Antimicrobial Activity and Cytotoxic Effect of Callistemon Citrinus Aqueous Extract on Cell Line HT29: A Laboratory Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2020; 19 (5): 463-84. [Farsi]

¹- MSc Student of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran, ORCID: 0000-0001-7194-0903

²- Assistant Prof., Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran, ORCID: 0000-0002-1447-5088
(Corresponding Author) Tel: (061) 36522425, Fax: (061) 36522425, E-mail: b.alizadeh@asnrukh.ac.ir

³- Assistant Prof., Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran, ORCID: 0000-0002-4060-9254

⁴- Associate Prof., Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran, ORCID: 0000-0002-1516-7052