

## مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ۱۹، مرداد ۱۳۹۹، ۴۸۴-۴۶۳

### بررسی گروه‌های عاملی ترکیبات زیست‌فعال، توانایی رادیکال‌گیرندگی، فعالیت ضد میکروبی و اثر سمیت سلولی عصاره آبی گیاه شیشه‌شور (*Callistemon citrinus*) بر رده سلولی HT29: یک مطالعه آزمایشگاهی

زهرا سوسنی غریبوند<sup>۱</sup>، بهروز علیزاده بهبهانی<sup>۲</sup>، محمد نوشاد<sup>۳</sup>، حسین جوینده<sup>۴</sup>

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 عفونی و هم‌چنین سرطان 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 فلاوونوئید کل، توانایی رادیکال‌گیرندگی، فعالیت ضد میکروبی 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 فلاوونوئید کل، فعالیت ضد میکروبی و برهم‌کنش عصاره آبی شیشه‌شور با آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و جنتامایسین و میزان زنده مانی رده سلولی HT29 تحت غلظت‌های مختلف عصاره با آزمون MTT (3-[4, 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 ضد میکروبی قابل توجهی بر باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس اثرژیینوزا*، *سالمونلا تیفی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوا* 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 ضد میکروبی، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی بر رده سلولی HT29 بود. بنابراین، استفاده از عصاره آبی شیشه‌شور در صنایع داروسازی 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: ۰۶۱-۳۶۵۲۲۴۲۵، دورنگار: ۰۶۱-۳۶۵۲۲۴۲۵، پست الکترونیکی: 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

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 سکتة مغزی، بیماری‌های قلبی-عروقی و کاهش آسیب به دزوکسی ریبونوکلیک 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 [۵-۶]. 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]. عمده‌ترین 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، کم‌خطر، در دسترس و ارزان قیمت بودن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان عفونت‌های میکروبی رواج یابند [۱۰]. ترکیبات

ضد میکروبی و ترکیبات فنولی مانند اسیدهای فنولیک، فلاونوئید، تانن و دی‌ترین‌های فنولی موجود در گیاهان دارویی سبب شده استفاده از این گیاهان مورد توجه پژوهش‌گران 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 [۱۳]. 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 سرطانی گیاه شیشه‌شور نیز مشخص شده است [۱۵-۱۶].

سرطان کولون به عنوان سومین علت مرگ و میر در دنیا مطرح می‌باشد و پس از سرطان ریه، سرطان کولون به عنوان شایع‌ترین نوع سرطان در مردان می‌باشد [۱۷-۱۸]. این سرطان 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 پیشرفته با درجه دیسپلازی بالا و سپس به شکل سرطان بدخیم تکامل پیدا می‌کند [۱۹]. روش‌های درمان سرطان کولون شامل ترکیبی از شیمی درمانی، پرتو درمانی و جراحی می‌باشد که پرهزینه

آب سرد به صورت سطحی مورد شست‌وشو 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 جهت یکنواخت شدن اندازه ذرات عبور داده شد. عمل عصاره گیری از گیاه با روش خیساندن انجام شد. در این روش ۱۰۰ 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 هم‌زده 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 ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Centurion, K2042، آمریکا) شد. پس از عمل سانتریفیوژ کردن عصاره اولیه گیاه شیشه‌شور، عصاره شفاف شده تحت عمل تغلیظ شدن (۵۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ دقیقه) توسط دستگاه تقطیر در خلأ (روتاری) (Heidolph laborota 400, Heidolph Instruments, آلمان) قرار گرفت. در نهایت عصاره تغلیظ شده توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی (Christ-Alpha 1-4, LD freeze dryer, 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 آلومینیومی پیچیده شده بود در یخچال نگه‌داری شد [۴، ۱۱].

از آنالیز طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (Fourier transform infrared spectroscopy; FTIR) برای تعیین

و پیچیده می‌باشد. به همین دلیل استفاده از گیاهان دارویی جهت مهار فرآیند تومورزایی و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی یک روش جدید جهت مبارزه با سرطان 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 به‌طور گسترده‌ای در مطالعات سرطان کولون مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۱].

تاکنون پژوهش‌های بسیار اندکی در مورد عصاره آبی گیاه شیشه‌شور انجام شده است [۲۲، ۱۲]. لذا هدف از این پژوهش تعیین فعالیت ضد میکروبی، برهم‌کنش آن با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی، تعیین پتانسیل آنتی‌اکسیدانی، شناسایی گروه‌های عاملی ترکیبات شیمیایی و تشخیص کیفی نوع پیوندها، تعیین میزان فنول و فلاوونوئید 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 هرباریوم KHAU302)، برگ‌های جمع‌آوری شده توسط

گروه‌های عاملی ترکیبات شیمیایی و شناسایی کیفی عصاره آبی گیاه شیشه شور استفاده شد. برای آماده‌سازی نمونه، ابتدا عصاره پودر شده با برمید پتاسیم (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  $4000-500 \text{ cm}^{-1}$  و توسط دستگاه FTIR (Thermo Nicolet, مدل Avatar 370، ساخت آمریکا) ثبت شد [۲۳].

از روش فولین سیوکالچو (Folin-Ciocalteu) برای تعیین میزان فنول کل عصاره آبی گیاه شیشه شور استفاده شد. جهت انجام آزمون، ۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره ۰/۱ درصد با ۲/۵ میلی‌لیتر از واکنش‌گر فنول مخلوط شد. پس از گذشت مدت زمان ۵ دقیقه، ۲/۵ میلی‌لیتر 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 (S2000, Biochrom WPA Lightwave UV/VIS، انگلیسی) در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد و اعداد آن ثبت گردید. میزان کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره آبی گیاه شیشه شور برحسب اسید گالیک و با استفاده از معادله حاصل از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج برحسب گالیک اسید بیان گردید [۲۴].

برای اندازه‌گیری ترکیبات فلاوونوئیدی عصاره برگ گیاه شیشه شور از روش Zhishen و همکاران [۲۵]، با کمی تغییر استفاده شد. مطابق با این روش، ۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره برگ گیاه شیشه شور با ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شده

و سپس به آن ۷۵ میکرولیتر نیتريت سدیم ۵ درصد افزوده شد. پس از گذشت ۵ دقیقه، ۱۵۰ میکرولیتر آلومینیوم تری کلرید ۱۰ درصد به مخلوط اضافه شد. در نهایت ۱ میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره آبی برگ گیاه شیشه شور با ۳ میلی‌لیتر از DPPH (۰/۱ Mm در متانول) 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 شیشه شور برحسب درصد بازدارندگی بر اساس معادله ذیل محاسبه شد [۲۴].

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

جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی گیاه شیشه شور 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 میلی‌مولار از ABTS تهیه شده و به محلول ساخته شده، پتاسیم 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 متانول تا رسیدن

اندازه‌گیری شد و تا زمانی که کدورت محلول با کدورت استاندارد نیم مک‌فارلند برابر نشده، توسط محلول رینگر رقیق شد. در این حالت سوسپانسیون میکروبی حاوی colony forming unit/mL  $10^8 \times 1/5$  است [۲۸، ۱۱].

در روش ضد میکروبی 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 ۱۸/۷۵، ۳۷/۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره تهیه و با آن آغشته شد و به کمک پنس استریل در سطح محیط کشت با فواصل 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 کلرامفنیکل در پتری‌دیش‌های جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفت. در انتها پتری‌دیش‌های تلقیح شده در انکوباتور (New Brunswick Scientific، Model G25 & R25، آمریکا) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها با خط‌کش برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد [۲۹، ۱۱].

در روش ضد میکروبی انتشار در آگار به کمک چاهک، ابتدا با پیپت استریل چاهک‌هایی روی محیط کشت مولر هینتون آگار به عمق ۶ میلی‌متر ایجاد شد. سوسپانسیون میکروبی با غلظت معادل نیم مک‌فارلند روی سطح محیط کشت با سوآپ پخش گردید. سپس از غلظت‌های مختلف عصاره (۱۸/۷۵،

جذب معرف به  $0.2 \pm 0.7$  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 [۲۳-۲۴].

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 گرم‌خانه‌گذاری و عدم رشد هیچ کلنی میکروبی، استریل بودن عصاره آبی گیاه شیشه‌شور تأیید شد [۸].

در این پژوهش از ۲ سویه استاندارد گرم مثبت *Listeria innocua* ATCC 33090 و *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 و ۳ سویه استاندارد گرم منفی *Salmonella typhi* PTCC 1609، *Escherichia coli* ATCC 25992 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 استفاده شد. جهت انجام هر آزمون کشت تازه تهیه گردید [۲۷].

۲۴ ساعت قبل از شروع آزمون‌های ضد میکروبی، تلقیح از کشت ذخیره به محیط کشت نوترینت آگار انجام شد. پس از گرم‌خانه‌گذاری (New Brunswick، Model G25 & R25، Scientific، آمریکا) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، از کلنی 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

۳۷/۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، ۵۰ میکرو لیتر 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 انتها پتری دیش‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار داده شد و قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها با خط کش برحسب میلی متر اندازه گیری شد [۳۰، ۱۰].

آزمون تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی (Minimum inhibitory concentration; MIC) و کمترین غلظت باکتری کش (Minimum bactericidal concentration; MBC) مطابق با مطالعه Alizadeh Behbahani و همکاران، انجام پذیرفت [۳۱]. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرو لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶ و ۵۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر) در پلیت ۹۶ خانه استریل ریخته شد. ۲۰ میکرو لیتر سوسپانسیون میکروبی با کدورت نیم مک فارلند 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 میکرو پلیت ۹۶ خانه‌ای در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از گذشت مدت زمان گرمخانه گذاری (۲۴ ساعت) محلول تری فنیل تترازولیوم کلراید با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر به عنوان شاخص رنگی رشد باکتری تهیه و به هر خانه ۱۰ میکرو لیتر از این معرف افزوده 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].

حداقل غلظت کشندگی عصاره برگ شیشه شور با توجه به نتایج به دست آمده از حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد در آزمون قبل تعیین شد. ۱۰۰ میکرو لیتر از چاهک‌هایی که باکتری در آن‌ها رشد نکرده بود (تغییر 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 سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. اولین غلظتی از عصاره که مانع از رشد ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها شد (در سطح پتری دیش هیچ کلنی مشاهده نشد) به عنوان حداقل غلظت کشندگی تعیین گردید [۳۲، ۲۹].

برای ارزیابی برهم کنش (هم افزایی یا کاهندگی) عصاره برگ شیشه شور در ترکیب با آنتی بیوتیک‌های کلرامفنیکل و جنتامایسین از غلظت تحت مهاری (Sub-MIC) استفاده شد. در این پژوهش از غلظت تحت مهاری که ۱/۲ غلظت حداقل غلظت مهارکنندگی بود استفاده شد. عصاره برگ شیشه شور به محیط مولر هینتون آگار اضافه شد و سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند بر سطح محیط کشت توسط سوآپ کشت داده شد و سپس دیسک‌های آنتی بیوتیک کلرامفنیکل 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، قطر هاله عدم رشد میکروبی توسط خط کش اندازه گیری شده و برحسب میلی متر گزارش شد [۳۲].

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

در جدول ۱، آورده شده است. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت‌های عصاره آبی شیشه‌شور قطر هاله عدم رشد نیز افزایش یافت. به‌طور کلی، حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری در برابر عصاره آبی گیاه شیشه‌شور به ترتیب *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* بود. مقایسه آماری نتایج نشان داد که میان غلظت‌های ۱۸/۷۵ و ۳۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای تمامی باکتری‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده نشد. با مقایسه دوتایی میان غلظت‌های ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشخص گردید غلظت بالاتر عصاره اثر ضد میکروبی 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 ضد میکروبی غلظت‌های مذکور برای باکتری‌های *سودوموناس اثرورژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). مقایسه نتایج آماری بین غلظت‌های ۳۷/۵ و ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان داد که فعالیت ضد میکروبی غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی گیاه شیشه‌شور در برابر باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس اثرورژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌طور معنی‌داری بالاتر از غلظت ۳۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود ( $P < 0/05$ ). در غلظت ثابت عصاره، به استثناء غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که در آن قطر هاله عدم رشد برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌طور معنی‌داری بالاتر از *سالمونلا تیفی* بود، اختلاف معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های مورد مطالعه مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ), با این‌حال، به‌طور کلی باکتری‌های گرم مثبت حساسیت

dimethylthiazol-2-yl]-2, 5 diphenyl tetrazolium bromide) استفاده شد. این آزمون مطابق با مطالعه Alizadeh Behbahani و همکاران، انجام پذیرفت. به‌طور خلاصه بعد از رشد سلول‌ها، میزان  $10^5$  سلول به هر چاهک اضافه گردید. سپس محیط کشت (Dulbecco's Modified Eagle DMEM (Medium)، ۲۰۰ میکرولیتر سرم جنینی گاو و غلظت‌های ۱، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره برگ شیشه‌شور به چاهک‌ها اضافه شد. در انتها ۳۰ میکرولیتر از محلول MTT به تمام چاهک‌ها اضافه شده و صفحات به مدت ۳ ساعت در انکوباتور دی‌اکسید کربن قرار گرفت. پس از حذف محیط، ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر چاهک اضافه شد و میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Bio Tek Instruments، ELX 808، آمریکا) خوانده شد. با استفاده از سلول‌های کنترل منحنی زنده‌مانی سلولی ترسیم گشت [۲۳].

از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ جهت آنالیز نتایج استفاده گردید. آزمون نرمالیتته Shapiro-Wilk's جهت تأیید نرمال بودن داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت و توزیع فراوانی داده‌ها نرمال بود. نتایج به‌صورت "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 ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

## نتایج

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

بیشتری نسبت به عصاره آبی شیشه شور در مقایسه با انواع

گرم منفی نشان دادند (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی (دیسک دیفیوژن) عصاره آبی شیشه شور بر باکتری‌های بیماری‌زا بر حسب میلی‌متر

غلظت (میلی گرم بر میلی لیتر)				باکتری
۱۵۰	۷۵	۳۷/۵	۱۸/۷۵	
۱۱/۱۰±۰/۲۰ <sup>cA</sup>	۹/۶۰±۰/۵۷ <sup>bAB</sup>	۷/۷۰±۰/۵۰ <sup>aA</sup>	۷/۱۰±۰/۵۸ <sup>aA</sup>	اشرشیا کلی
۱۱/۰۰±۰/۱۴ <sup>bA</sup>	۱۰/۴۰±۰/۲۹ <sup>bAB</sup>	۸/۸۰±۰/۴۳ <sup>aA</sup>	۸/۰۰±۰/۲۹ <sup>aA</sup>	سودوموناس اتروژینوزا
۱۱/۲۰±۰/۱۴ <sup>bA</sup>	۹/۰۰±۰/۴۴ <sup>aB</sup>	۸/۶۰±۰/۵۲ <sup>aA</sup>	۸/۱۰±۰/۵۸ <sup>aA</sup>	سالمونلا تیفی
۱۱/۹۰±۰/۲۰ <sup>bA</sup>	۱۰/۸۰±۰/۳۵ <sup>bA</sup>	۹/۱۰±۰/۵۰ <sup>aA</sup>	۸/۲۰±۰/۳۷ <sup>aA</sup>	استافیلوکوکوس اورئوس
۱۱/۳۰±۰/۵۰ <sup>bA</sup>	۹/۵۰±۰/۵۰ <sup>aAB</sup>	۸/۸۰±۰/۲۶ <sup>aA</sup>	۸/۱۰±۰/۳۰ <sup>aA</sup>	لیستریا اینوکوا

نتایج به صورت "انحراف معیار ± 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 کوچک در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره آبی شیشه شور است (P<۰/۰۵).

حروف غیر مشابه بزرگ در یک ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان باکتری‌های مختلف است (P<۰/۰۵).

جدول ۲، نتایج فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی شیشه شور به روش چاهک آگار بر باکتری‌های عامل عفونت و مسمومیت را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با قطر هاله ۱۰/۳۰ میلی‌متر در کم‌ترین غلظت (۱۸/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) حساس‌ترین بود. در غلظت‌های بالاتر اثر ضد میکروبی بر باکتری‌های گرم منفی (سودوموناس اتروژینوزا و سالمونلا تیفی) به طور قابل توجهی افزایش یافت، به نحوی که در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی قطر هاله 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،

سالمونلا تیفی و سودوموناس اتروژینوزا) هیچ اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد وجود ندارد (P>۰/۰۵)، در حالی که برای باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا اینوکوا) اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (P<۰/۰۵). 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 معنی‌داری در سطح ۵ درصد وجود داشت (P<۰/۰۵)، در حالی که برای باکتری‌های گرم مثبت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در شکل ۱، نمایی از فعالیت ضدباکتریایی عصاره آبی شیشه‌شور و آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی بر باکتری اشرشیا کلی نشان داده شده است.

جدول ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی (چاهک آگار) عصاره آبی شیشه شور بر باکتری‌های بیماری‌زا بر حسب میلی‌متر

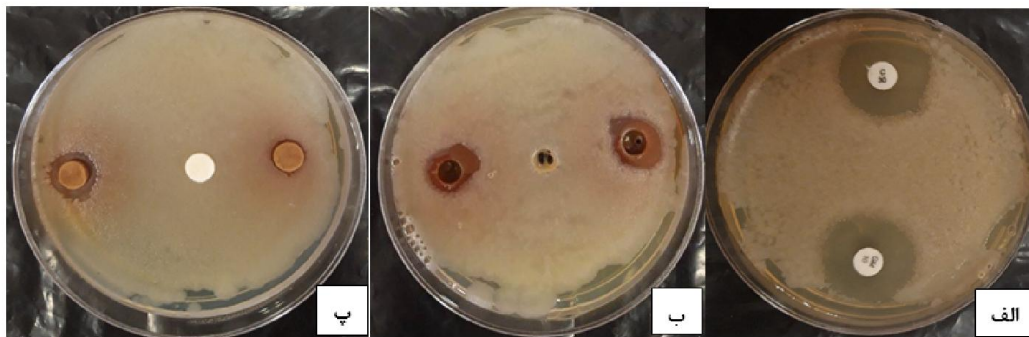
غلظت (میلی گرم بر میلی لیتر)				باکتری
۱۵۰	۷۵	۳۷/۵	۱۸/۷۵	

۱۱/۲۰±۰/۳۳ <sup>bB</sup>	۱۰/۱۰±۰/۲۷ <sup>bC</sup>	۹/۷۰±۰/۲۳ <sup>aB</sup>	۸/۲۰±۰/۱۹ <sup>aB</sup>	اشرشیا کلی
۱۳/۱۰±۰/۶۸ <sup>bAB</sup>	۱۰/۶۰±۰/۱۳ <sup>bBC</sup>	۸/۵۰±۰/۴۰ <sup>aC</sup>	۸/۱۰±۰/۲۹ <sup>aB</sup>	سودوموناس ائروژینوزا
۱۴/۱۰±۰/۱۴ <sup>cA</sup>	۱۱/۵۰±۰/۶۴ <sup>bABC</sup>	۸/۵۰±۰/۱۲ <sup>aC</sup>	۸/۳۰±۰/۳۷ <sup>aB</sup>	سالمونلا تیفی
۱۴/۱۰±۰/۷۲ <sup>bA</sup>	۱۲/۵۰±۰/۳۲ <sup>bA</sup>	۱۲/۰۰±۰/۴۰ <sup>bA</sup>	۱۰/۳۰±۰/۶۲ <sup>aA</sup>	استافیلوکوکوس اورئوس
۱۲/۲۰±۰/۶۰ <sup>bAB</sup>	۱۱/۹۰±۰/۵۰ <sup>bAB</sup>	۱۱/۵۰±۰/۳۵ <sup>bA</sup>	۸/۹۰±۰/۷۹ <sup>aAB</sup>	لیستریا اینوکوا

نتایج به صورت "انحراف معیار ± 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 کوچک در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره آبی شیشه‌شور است (P<۰/۰۵).

حروف غیر مشابه بزرگ در یک ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان باکتری‌های مختلف است (P<۰/۰۵).



شکل ۱- اثر ضد میکروبی عصاره آبی شیشه‌شور و آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی بر باکتری اشرشیا کلی

الف) اثر آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و جنتامایسین، ب) اثر عصاره به روش چاهک آگار و پ) اثر عصاره به روش دیسک دیفیوژن.

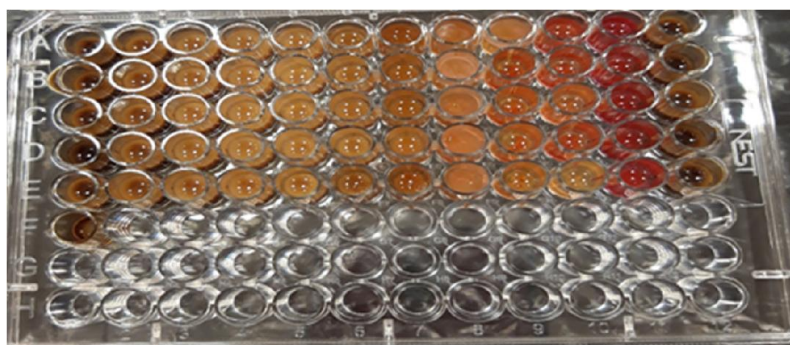
اینوکوا به ترتیب ۸، ۸، ۱۶، ۴ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در شکل ۲، نمایی از اثر عصاره آبی گیاه شیشه‌شور به روش میکروداپلوشن برات (تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی) نشان داده شده است. نتایج حداقل غلظت کشندگی نیز بزرگتر از حداقل غلظت مهارکنندگی بود.

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی شیشه‌شور برای باکتری‌های بیماری‌زا در جدول ۳، آورده شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری‌های اشرشیا کلی، سودوموناس ائروژینوزا، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا

جدول ۳- حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی شیشه‌شور بر باکتری‌های بیماری‌زا

باکتری	MIC (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	MBC (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
اشرشیا کلی	۸	>۵۱۲
سودوموناس ائروژینوزا	۸	>۵۱۲
سالمونلا تیفی	۱۶	>۵۱۲
استافیلوکوکوس اورئوس	۴	۵۱۲

MIC= Minimum inhibitory concentration  
MBC= Minimum bactericidal concentration



شکل ۲- نمایی از تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آبی گیاه شیشه شور به روش میکرودا یلوشن پراث

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 شیشه شور به ترتیب ۱۰۲/۱۷ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک و ۴۴/۹۵ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک بود. نتایج بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی شیشه شور 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 ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۷۱/۶۸ و ۵۱/۳۳ بود.

نتایج اثر آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و جنتامایسین و همچنین برهم‌کنش عصاره آبی گیاه شیشه شور با آنتی‌بیوتیک‌های مذکور در جدول ۴، آورده شده است. نتایج نشان داد که آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل با قطر ۲۴/۳۰ میلی‌متر بالاترین اثر را بر باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* داشت. بیش‌ترین اثر ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین بر باکتری گرم مثبت *لیستریا اینوکوا* مشاهده شد. نتایج حاصل از برهم‌کنش عصاره آبی شیشه شور با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل برای باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *سالمونلا تیفی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوا* به ترتیب حالت سینرژیستی، سینرژیستی، سینرژیستی و سینرژیستی و آنتاگونیستی بود. به‌طور کلی می‌توان بیان کرد که ترکیب عصاره آبی شیشه شور با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی به‌ویژه

جدول ۴- اثر آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و جنتامایسین به تنهایی و توأم (برهم‌کنش) با عصاره آبی شیشه شور بر باکتری‌های بیماری‌زا (میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی بر حسب میلی‌متر)

باکتری	ماده ضد میکروب		
	کلرامفنیکل	جنتامایسین	کلرامفنیکل + عصاره
<i>اشرشیاکلی</i>	۲۴/۳۰ ± ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۱۸/۲۵ ± ۰/۴۴ <sup>c</sup>	۳۱/۵۰ ± ۰/۵۹ <sup>a</sup>
جنتامایسین + عصاره			۲۲/۳۰ ± ۰/۴۱ <sup>a</sup>

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

نتایج به صورت "انحراف معیار ± 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 نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره آبی شیشه‌شور است.

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

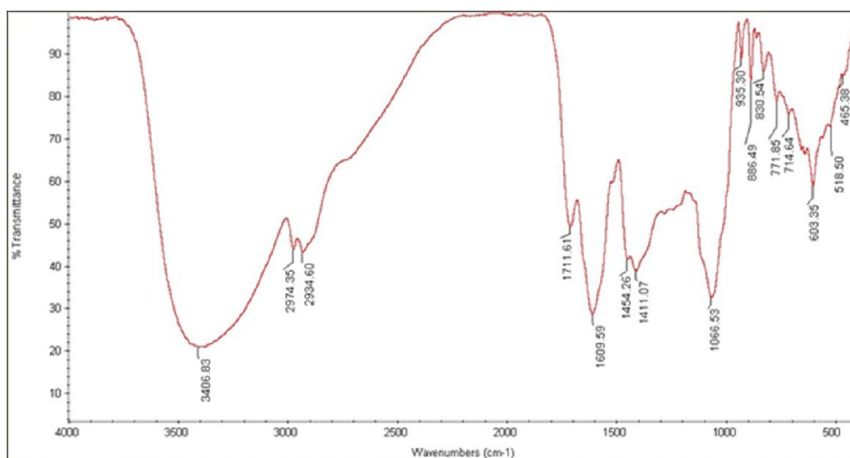
فعالیت مهارکنندگی (درصد)		غلظت عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
ABTS	DPPH	
۵/۵۰ ± ۰/۲۸ <sup>c</sup>	۳۹/۴۵ ± ۰/۴۲ <sup>d</sup>	۲۵
۱۴/۲۳ ± ۰/۴۳ <sup>d</sup>	۵۶/۱۶ ± ۰/۳۳ <sup>c</sup>	۵۰
۳۲/۰۱ ± ۰/۶۹ <sup>c</sup>	۵۷/۹۰ ± ۰/۸۰ <sup>c</sup>	۷۵
۳۸/۱۴ ± ۰/۶۸ <sup>b</sup>	۶۸/۱۵ ± ۰/۱۵ <sup>b</sup>	۱۰۰
۵۱/۳۳ ± ۰/۸۹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

نتایج به صورت "انحراف معیار ± 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 نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره آبی شیشه‌شور است.

پیک در گستره عدد موج  $1600-1700\text{ cm}^{-1}$  در طیف است. وجود پیک در گستره  $1400-1500\text{ cm}^{-1}$  نشان‌دهنده وجود گروه‌های C-C در حلقه آروماتیک ترکیبات پلی فنولی و گروه‌های OH موجود در ترکیبات فنولی در ساختار عصاره بود. وجود پیک‌ها در طول موج  $1023-106$  احتمالاً به دلیل ارتعاشات کششی C-O در نمونه بود.

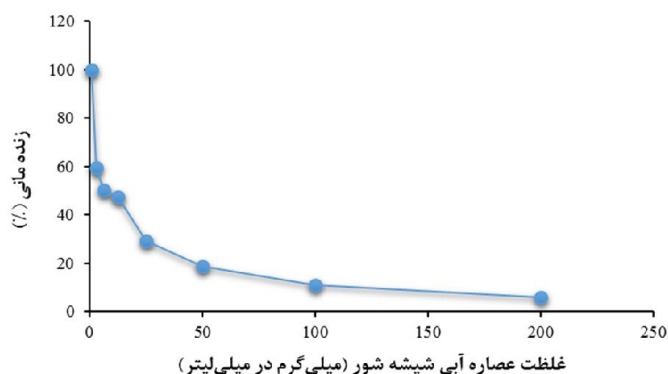
یکی از متداول‌ترین روش‌های ارزیابی ساختار ترکیبات آلی، استفاده از طیف‌سنجی زیر قرمز است. شکل ۳، طیف FTIR عصاره آبی گیاه شیشه‌شور را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که نوار پهن به مرکزیت  $3406\text{ cm}^{-1}$  به دلیل وجود گروه‌های هیدروکسیل و گستره عدد موج  $2800-3000\text{ cm}^{-1}$  به دلیل وجود پیوندهای C-H گروه‌های متیل در ساختار عصاره بود. حضور پیوند کششی C=O (گروه کربوکسیل) باعث ایجاد



شکل ۳- طیف FTIR عصاره آبی گیاه شیشه شور

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

افزایش غلظت عصاره آبی گیاه شیشه شور، تأثیر بر رده سلولی HT29 افزایش پیدا کرد و درصد زنده‌مانی آن کاهش یافت. بیش‌ترین اثر سمیت سلولی عصاره آبی شیشه شور در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر و در مقابل کم‌ترین اثر آن در غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده گردید.



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی شیشه شور بر زنده‌مانی رده سلولی HT29

## بحث

با توجه به مقاومت میکروارگانیزم‌های 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 فلاوونوئید 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 (جدول 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 اسانس و عصاره‌های آبی و الکلی گیاه شیشه‌شور در مطالعات مختلف گزارش شده است. با مطالعه اثر ضد میکروبی اسانس گیاه شیشه‌شور بر تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی، Oyedeji و همکاران گزارش نمودند که سویه *ستافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به اسانس شیشه‌شور حساس‌ترین بود که این اثر ضد میکروبی به ترکیبات اصلی تشکیل دهنده اسانس از قبیل ۸ و ۱-سینئول (۸۳/۲ درصد)، آلفا پینن (۶/۴ درصد) و آلفا ترپینئول (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 نتیجه‌ای در خصوص بررسی اثر عصاره اتانولی و متانولی گیاه شیشه‌شور توسط Seyydneyad 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

ضد میکروبی در برابر میکروارگانیزم‌های مورد بررسی (باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی) بود. به‌طوری‌که فعالیت ضد باکتریایی 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، به‌طوری‌که باکتری‌های گرم مثبت دارای لایه موکوپتیدی ضخیم‌تری در دیواره سلولی خود می‌باشند، درحالی‌که این لایه در باکتری‌های گرم منفی نازک‌تر است و ساختار سلولی آن‌ها اغلب متشکل از لیپوپروتئین و لیپوپلی‌ساکارید می‌باشد که منجر به مقاومت بیش‌تر باکتری نسبت به ترکیبات ضد میکروبی می‌گردد [۳۴]. جهت تأیید این فرضیه، انجام آزمون‌های تکمیلی از قبیل بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی سلول باکتری توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی و اندازه‌گیری میزان خروج گلوکز، لاکتات 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 گردند. با جداسازی و خالص‌سازی این ترکیبات و بررسی فعالیت ضد میکروبی آن‌ها می‌توان به‌طور 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 کلروفومی برگ گیاه شیشه‌شور، Krishna و همکاران گزارش نمودند که عصاره کلروفومی دارای بالاترین اثر ضد میکروبی بود و عصاره آبی فاقد فعالیت ضد میکروبی بر باکتری‌های

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].

آنتی‌اکسیدان‌ها نقش اساسی در کنترل و درمان بیماری‌ها دارند و فلاوونوئیدها و ترکیبات فنولی به‌عنوان منابع طبیعی آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاهان دارویی شناخته می‌شوند [۳۶]. ترکیبات فلاوونوئیدی متعددی از قبیل *callistone A*, *6,7-dimethyl-5,7-dihydroxy-4'-methoxy flavone*، *eucalyptin*، *catechin*، *quercetin*، *astragaline* و *demethyleucalyptin* در ساقه و برگ گیاه شیشه‌شور شناسایی شده‌اند [۳۷]. از دیگر ترکیبات فنولی شناسایی شده در گیاه شیشه‌شور می‌توان به *n-blumenol A*، *methyl gallate*، *gallic acid*، *tetratriacontanol*، *protocatechuic acid*،  $\beta$ -*sitosterol* و *2,6,10-bisabolatriene* اشاره نمود [۳۸]. محتوای فنول و فلاوونوئید 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 الکلی خشک برگ شیشه‌شور در مطالعه Saad و همکاران گزارش شده است [۳۹]. در مطالعه‌ای دیگر، مشخص گردید که عصاره متانولی شیشه‌شور دارای میزان فنول کل (۲۲۵/۱۱) در برابر ۱۰۹/۶۴ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره) و فلاوونوئید کل (۶/۸۸) در برابر

۳/۶۸ میلی‌گرم روتین بر گرم عصاره) بالاتری نسبت به عصاره اتیل استات است که دلیل این امر به اثر حلال بر محتوای ترکیبات فنولی هنگام استخراج نسبت داده شد [۴۰]. میزان فنول کل حدود ۱۰۰ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم و فلاوونوئید کل حدود ۲۵ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره آبی برگ شیشه‌شور در مطالعه Ahmed و Rahman گزارش گردید [۴۱]. تفاوت در میزان فنول و فلاوونوئید 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 فلاوونوئیدی عصاره آبی شیشه‌شور توسط روش‌های تجزیه‌ای دقیق‌تر از قبیل کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا پیشنهاد می‌گردد.

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

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 اسانس‌های گیاهی استفاده گردند. دو آزمون آنتی‌اکسیدانی استفاده شده در این مطالعه بر پایه اهداء هیدروژن از عصاره آبی شیشه‌شور به رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS استوار می‌باشند و بنابراین پیشنهاد می‌شود که از سایر روش‌های آنتی‌اکسیدانی بر پایه اهداء الکترون (مانند قدرت کاهندگی) و شلاته‌کنندگی (شلاته کردن فلزات واسطه) جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی شیشه‌شور استفاده شود.

ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی 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 اسانس 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 اسانس گل و برگ بود و بالاترین فعالیت سمیت سلولی در برابر سلول‌های A594 و C-6 مشاهده شد. اما اثرات اسانس 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 اسانس به‌دست آمد [۴۴]. با مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی 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 به‌دست آمد و درصد مهارکنندگی رادیکال عصاره متانولی 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 متانول شیشه‌شور مورد بررسی قرار گرفت. نتایج پتانسیل آنتی‌اکسیدانی نشان داد که  $IC_{50}$  عصاره اتیل‌استات  $0.25 \pm 2.41$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) کمتر از عصاره متانولی  $0.24 \pm 1.33$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در روش DPPH بود. هم‌چنین در روش ABTS نیز  $IC_{50}$  عصاره اتیل‌استات و متانولی به ترتیب  $0.36 \pm 0.80$  و  $0.52 \pm 0.52$  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 [۴۸-۴۶]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی گیاه شیشه‌شور عمدتاً ناشی از ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی 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

### نتیجه گیری

نتایج فعالیت ضد باکتریایی عصاره آبی برگ شیشه شور 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 برهم کنش عصاره با آنتی بیوتیک‌های کلرامفنیکل و جنتامایسین و افزایش اثر ضد میکروبی (اثر سینرژیستی) به ویژه بر باکتری‌های گرم منفی پیشنهاد می شود به طور هم‌زمان از ترکیب آنتی بیوتیک و عصاره آبی شیشه شور استفاده شود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عصاره آبی برگ شیشه شور از پتانسیل آنتی اکسیدانی بالایی برخوردار است. با توجه به نتایج فعالیت آنتی اکسیدانی و فنول کل عصاره و همچنین اثر سمیت سلولی عصاره بر رده سلولی HT29 به نظر می آید بتوان از پتانسیل بالقوه این گیاه در پیش گیری و درمان بیماری استفاده نمود. هرچند لازم است در ادامه پژوهش‌های بیشتر در شرایط مختلف (آزمایشگاهی و مدل حیوانی) انجام گیرد.

### تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد می باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

سلولی قابل توجه عصاره های الکلی و آبی برگ شیشه شور در برابر سلول های سرطانی در مطالعه Saad و همکاران نیز گزارش شده است [۳۹]. علاوه بر این، غلظت پایین متیل اوژنول (ترکیب زیست فعال گیاه شیشه شور) دارای اثر ضد توموری در برابر سرطان سینه است، اما غلظت های بالای آن منجر به ایجاد جهش در دزوکسی ریبونوکلیک اسید و متعاقباً افزایش حساسیت به سرطان کبد می شود [۴۴]. بنابراین، گیاه شیشه شور حاوی ترکیبات زیست فعالی است که در غلظت های مشخص قادر به ایجاد فعالیت ضدسرطانی می باشند. در حقیقت، ترکیبات فنولی اثر ضدسرطانی خود را از طریق جلوگیری از آنزیم های متابولیک دخیل در فعال سازی عوامل سرطان زا و یا توقف سیکل سلول سرطانی بروز می دهند [۴۴]. لازم به ذکر است که در آزمون MTT، ترکیب تترازولیوم توسط آنزیم دهیدروژناز میتوکندری سلول زنده به فورمازان ارغوانی رنگ احیاء می شود که مقدار فورمازان تولیدی با اندازه گیری جذب محلول در ۵۷۰ نانومتر تعیین می گردد [۵۰]. بنابراین، ترکیبات احیاء کننده مانند پلی فنول ها قادر به احیاء کردن تترازولیوم به فورمازان و تداخل در این آزمون می باشند. در این راستا، پیشنهاد می شود که از آزمون های تکمیلی از قبیل زنده مانی سلول بر پایه ATP (Adenosine triphosphate) و ارزیابی ریزساختار سلول توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی جهت تأیید فعالیت ضدسرطانی عصاره های 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] Majnoui 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, Ramezani 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 *Quercus 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] Seyyidnejad SM, Niknejad M, Darabpoor I, Motamedi H. Antibacterial activity of hydroalcoholic extract of *Callistemon citrinus* and *Albizia lebeck*. *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 Slovak 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] Oyedeji OO, Lawal OA, Shode FO, Oyedeji 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] Hosseinimehr SJ, Pourmorad F, Shahabimajd N, Shahrbandy K, and Hosseinzadeh R. In vitro antioxidant activity of *Polygonium 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, Duc 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 comboyensis* 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, Beighabaei 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 Gharibvand<sup>1</sup>, B. Alizadeh Behbahani<sup>۲</sup>, M. Noshad<sup>۳</sup>, H. Jooyandeh<sup>۴</sup>

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