ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره برگ رملیک (*Ziziphus nummularia*) در شرایط آزمایشگاهی

آسیه خلیلی[۱]، **حسن برزگر**[*۲]، بهروز علیزاده بهبهانی[۳]، محمد نوشاد[۲]

۱دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۲ دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۳ استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
*نشانی برای مکاتبه: hbarzegar@asnrukh.ac.ir

چکیده

سابقه و هدف: *امروزه با افزایش بیماری‌ها، استفاده از ترکیبات طبیعی گیاهی برای بهبود آن‌ها رو به افزایش است. بر این اساس، کاربرد گیاهان دارویی مورد توجه قرار گرفته است. گیاه رملیک به دلیل خواص منحصر به فرد، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. هدف از این پژوهش، بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره برگ رملیک بر باکتری‌های اشرشیا کلی، سودوموناس ائروژینوزا، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا و باسیلوس سرئوس بود.*

روش کار: *عصاره‌گیری از برگ رملیک، توسط روش خیساندن به مدت ۷۲ ساعت صورت پذیرفت. میزان فنل و فلاونوئید کل عصاره اندازه‌گیری شد و پس از آن فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره توسط روش‌های مهار رادیکال DPPH، ABTS و زوال رنگ محلول بتاکاروتن/ لینولئیک اسید تعیین گردید. اثر ضدمیکروبی عصاره، مطابق روش‌های ضدمیکروبی چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی بررسی شد.*

یافته‌ها: *عصاره برگ رملیک دارای مقادیر ترکیبات فنل کل و ترکیبات فلاونوئیدی به ترتیب برابر با ۴۷/۳۸ mgGAE/g و ۲۸/۵ mgQE/g و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر حسب مهار رادیکال DPPH، ABTS و زوال رنگ محلول بتاکاروتن لینولئیک اسید به ترتیب برابر با ۶۰/۳، ۵۴/۵۵ و ۵۷/۴۴ درصد بود. عصاره برگ رملیک، اثر ضدمیکروبی قابل توجهی بر میکروارگانیسم‌های مورد پژوهش از خود نشان داد. حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های میکروبی نسبت به عصاره مطابق روش چاهک آگار، به ترتیب باسیلوس سرئوس و سودوموناس ائروژینوزا بود.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی قابل توجه عصاره برگ رملیک، می‌توان از این عصاره در صنایع داروسازی و غذایی بهره برد.*

واژگان کلیدی: عصاره، رملیک، فعالیت ضدمیکروبی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

مقدمه

انسان همواره گیاهان دارویی را به عنوان یکی از منابع طبیعی بزرگ، مورد توجه قرار داده و در شناسایی کاربرد گیاهان دارویی تلاش زیادی کرده است. پیشرفت و توسعه علوم مختلف و از جمله علم شیمی در ابتدا توجه مردم را به این گونه گیاهان بالا برده و همین علوم سبب شدند که روش‌های بهتری برای بررسی دقیق اسانس و عصاره گیاهان دارویی، ترکیبات شیمیایی و خواص آن‌ها، ابداع شوند. با بروز اثرات جانبی داروهای شیمیایی از یک سو و از سوی دیگر پیدایش و کشف داروهای گیاهی جدید با اثرات نامطلوب

بسیار کم، دوباره توجه مردم به این داروها معطوف شده است. ترکیبات زیست فعال طبیعی شامل دسته وسیعی از ترکیبات آلی، با ساختارها و گروه‌های عاملی ویژه هستند که مولکول‌های بسیار متنوعی را شامل می‌شوند و برای تولید غذاهای فراسودمند، افزودنی های غذایی، داروها و مکمل‌ها استفاده می‌شوند (۱). عصاره، یکی از اشکال دارویی است و به سه شکل جامد، نیمه جامد و مایع وجود دارد. عصاره گیاهی، محلولی حاوی تمامی مواد مفید موجود در گیاه، نظیر اسانس‌ها، فلاوونوئیدها، آلکالوئیدها، موسیلاژها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، ویتامین‌ها، املاح و یا سایر مواد هستند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدقارچی و ضدباکتریایی داشته و مانع از انجام واکنش‌های ناخواسته در محیط‌های غذایی می‌شوند (۲ و ۳).

آنتی‌اکسیدان‌های موجود در گیاهان دارویی از یک طرف باعث کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی و سکته می‌شوند، از طرف دیگر از پیشرفت سرطان‌ها که موجب آسیب به DNA می‌شود، جلوگیری می‌کنند. علی‌رغم وجود آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در پلاسما، سیستم دفاعی بدن به تنهایی قادر به از بین بردن رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در بدن نیست، به همین جهت نیاز به تأمین آنتی‌اکسیدان از منابع خارجی شیمیایی و طبیعی دارد که از طریق منابع غذایی تأمین می‌شوند (۴). آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی باعث افزایش قدرت آنتی اکسیدان‌های پلاسما و کاهش ابتلا به بعضی بیماری‌ها مانند سرطان، بیمارهای قلبی و سکته مغزی می‌شود. بسیاری از متخصصین تغذیه، برای تأمین آنتی‌اکسیدان‌های مورد نیاز بدن، مصرف آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی را توصیه می‌نمایند، زیرا معمولا عوارض جانبی کمتر و درمان بهتری ایجاد می‌نمایند. گیاه درمانی، اعلام ممنوعیت سازمان بهداشت جهانی مبنی بر عدم استفاده از رنگ‌ها و اسانس‌های سنتتیک و عوارض جانبی داروهای مصنوعی در سال‌های اخیر باعث رونق کشت و صنعت گیاهان دارویی شده است (۵).

درختچه رملیک با نام علمی *Ziziphus nummularia* به خانواده *Rhamnaceae* تعلق دارد. جنس Ziziphus ۱۳۵ الی ۱۷۰ گونه دارد که به صورت درخت یا درختچه‌های همیشه سبز یا خزان-کننده بوده و اغلب دارای تیغه‌ای با ابعاد نامساوی می‌باشند. رملیک گونه‌ای خزان‌کننده است و به همین دلیل می‌تواند در مناطق مرتفع-تر و کمی خنک‌تر رشد یابد. این درختچه در سال دو بار گل و میوه می‌دهد. یک نوبت در اواخر زمستان و اوایل بهار و بار دیگر در اواسط تا اواخر تابستان و حتی اوایل پاییز و معمولاً در فصل زمستان در حالت خواب به سر می‌برد (۶). از ریشه، برگ و دانه‌های رملیک به صورت سنتی برای درمان برخی از بیماری‌ها ازجمله آلرژی و اگزما استفاده می‌شود. برگ‌های رملیک را می‌توان خشک و پودر کرده و جهت شستشوی بدن و مو به کار برد. برگ آن حاوی تانن، استرول‌های گیاهی مانند بتاسیتوسترول، بتاسیتوسترول گلیکوزید و ساپونین ابلین الکتیون است (۷).

فاضلی و همکاران (۱۳۹۵)، ارزیابی و مقایسه محتوای فنل، فلاونوئیدکل و عملکرد آنتی‌اکسیدانی برگ و میوه در ۴۱ ژنوتیپ مختلف گیاه رملیک در جنوب ایران را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد، عصاره هیدروالکلی برگ رملیک نسبت به میوه از خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری برخوردار بود (۸). در مطالعه دیگری، Abdallah و همکاران (۲۰۱۶)، فعالیت‌های بیولوژیکی عصاره متانولی برگ گیاه رملیک را بررسی کردند. نتایج، وجود برخی از ترکیبات فیتوشیمیایی زیست فعال مانند ساپونین، تانن، آلکالوئید، ترکیبات فنلی، ترپنوئیدها و فلاونوئیدها را نشان داد. عصاره متانولی برگ گیاه رملیک دارای فعالیت ضد باکتری و آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی بود (۹). هدف از پژوهش حاضر ارزیابی پتانسیل آنتی-اکسیدانی و فعالیت ضدمیکروبی عصاره برگ رملیک در شرایط برون‌تنی است.

مواد و روش‌ها

برگ گیاه رملیک از منطقه خائیز شهرستان بهبهان در سال ۱۳۹۹ جمع آوری شد. کلیه مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این پژوهش، از شرکت مرک آلمان با درجه خلوص آزمایشگاهی تهیه شد.

پس از جمع آوری برگ، گونه گیاه توسط متخصصین گیاه‌شناسی در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تایید شد. برگ گیاه پس از خشک شدن در معرض هوا، با استفاده از دستگاه آسیاب برقی به صورت پودر در آمد و ۲۵ گرم از آن به روش خیساندن (ماسراسیون) و با آب مقطر مخلوط و در یک دوره حداقل سه روز همراه با تحریک مکرر به منظور حل شدن ماده حل‌شونده در دمای اتاق نگهداری شد. پس از گذشت سه روز، مخلوط عصاره و آب با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شد تا مواد جامد از مایع جدا شوند و در نهایت با استفاده از دستگاه تقطیر دوار خلاء، حلال اضافی تبخیر و تغلیظ شده و به کمک دستگاه فریز درایر کاملاً خشک گردید و به شکل پودر در آمد. در نهایت پودر خشک در ظرف شیشه‌ای در بسته و درون یخچال (C° ۴) نگهداری و برای تهیه غلظت‌های مختلف استفاده شد (۱۰).

در این پژوهش، به منظور اندازه‌گیری محتوای فنل کل از معرف فولین- سیوکالچو بر اساس روش عزیزیان و همکاران (۲۰۱۸)، با اندکی تغییر استفاده شد. بدین منظور، ۲۰ میکرولیتر عصاره به ۱۱۰ میکرولیتر معرف فولین- سیوکالچو تازه اضافه گردید. سپس ۷۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات به آن‌ها اضافه گردید. پس از نگهداری محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، جذب نمونه در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر ثبت و مقدار فنل کل بر حسب میلی-گرم گالیک اسید در گرم عصاره گزارش شد (۱۱).

میزان فلاونوئید نمونه‌ها به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. در این روش میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره با ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۶٪، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰٪، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید. بعد از نگهداری نمونه-ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، جذب مخلوط در ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. سپس از این محلول پایه، غلظت‌های مختلف (۲۰،۱۰، ... و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) آماده گردید و پس از انجام مراحل مختلف مطابق روش ذکر شده در بالا مقدار جذب نمونه‌ها خوانده شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون کوئرستین، با قرار دادن مقدار جذب عصاره در معادله خطی مربوط به منحنی استاندارد، مقدار فلاونوئید موجود در عصاره محاسبه شد. اصول روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید، تشکیل کمپلکس‌های اسیدی آلومینیوم‌کلرید با گروه کتو و یا هیدروکسیل فلاونوئیدها است که این ترکیبات بیشترین جذب را در طول موج ۴۱۵ نانومتر دارند (۱۱).

جهت تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ رملیک، ۱ میلی‌لیتر عصاره برگ رملیک مطابق با روش علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۹)، با ۳ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH، مخلوط و سپس به مدت۳۰ دقیقه در مکان تاریک و در دمای محیط گرمخانه‌گذاری و سپس جذب محلول در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. متانول نیز جهت تهیه نمونه شاهد مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت فعالیت مهارکنندگی بر اساس معادله ۱محاسبه گردید (۱۲).

معادله ۱ $$\text{درصد فعالیت مهارکنندگی} = [(A_{\text{شاهد}} - A_{\text{نمونه}}) / A_{\text{شاهد}}] \times 100$$

در ادامه به منظور تعیین ظرفیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS ، ابتدا یک محلول ۷ میلی‌مولار ABTS در آب تهیه شده و با نسبت ۱:۱ با محلول ۲/۴۵ میلی‌مولار پرسولفات سدیم مخلوط گردید. جهت تولید رادیکال‌های کاتیونی ABTS، محلول حاصل به مدت ۱۶ساعت در دمای محیط و تاریکی قرار داده شد. پیش از شروع آزمون محلول $ABTS^{+}$ با متانول تا جذب ۰/۷±۰/۲ در طول موج ۷۳۴ نانومتر رقیق - شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره و ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول رقیق شده ABTS با هم مخلوط شد. میزان جذب نمونه پس از گذشت ۶ دقیقه در طول موج ۷۳۴ نانومتر خوانده شد (۱۳). درصد فعالیت حذف رادیکال با استفاده از معادله ۲ محاسبه شد.

معادله ۲ $$\text{درصد جذب رادیکال} = \frac{\text{جذب نمونه اسانس} - \text{جذب نمونه شاهد}}{\text{جذب نمونه شاهد}} \times 100$$

به منظور بررسی زوال رنگ محلول بتا-کاروتن/لینولئیک اسید مطابق با روش دپکویسیوس و همکاران (۱۹۹۸)، جهت پایش زوال رنگ محلول بتا-کاروتن/لینولئیک اسید در حضور عصاره برگ رملیک، روش اسپکتروفوتومتری مورد استفاده قرار گرفت. جذب محلول پس از ۱۲۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری (A_{120}) در ۴۹۰ نانومتر در برابر نمونه کنترل در زمان صفر (C_0) و پس از ۱۲۰ دقیقه نگهداری (C_{120}) اندازه‌گیری شد (۱۴). در آخر، اثر بازدارندگی با استفاده از معادله ۳ به‌دست آمد.

در ادامه جهت انجام آزمون‌های میکروبی از سویه‌های استاندارد میکروبی موجود در کلکسیون میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی موادغذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان که شامل ۳ باکتری گرم منفی (*اشرشیا کلی*[۱] ATCC 25922، *سودوموناس ائروژینوزا*[۲] ATCC 27853 و *سالمونلا تیفی*[۳] PTCC 1609) و ۳ باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*[۴] ATCC 25923، *لیستریا اینوکوا*[۵] ATCC 33090 و *باسیلوس سرئوس*[۶] ATCC 14579) استفاده شد. به‌منظور فعال‌سازی سویه‌های میکروبی استاندارد، تهیه سوسپانسیون میکروبی و استاندارد کردن آن‌ها جهت ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره برگ رملیک، مطابق با استاندارد نیم مک‌فارلند اقدام گردید و در نهایت سوسپانسیون میکروبی حاوی $CFU^{۷}/mL$ $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ تهیه شد (۱۵).

فعالیت ضدمیکروبی عصاره رملیک مطابق روش‌های چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی تعیین گردید. در آزمون چاهک آگار، پس از آماده‌سازی محیط کشت مولر هینتون آگار، به‌کمک پی‌پت پاستور استریل، ۳ عدد چاهک به قطر ۶ میلی‌متر که یکی از آن‌ها به‌عنوان کنترل منفی بود، در سطح پتری‌دیش ایجاد شد. سوسپانسیون میکروبی تهیه شده از کشت تازه سویه‌های میکروبی بیماری‌زا مطابق با استاندارد نیم مک‌فارلند، در سطح محیط کشت پخش شد. توسط سمپلر درون ۲ تا از چاهک‌ها میزان ۲۰ میکرولیتر از عصاره ریخته شد و پتری‌دیش‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوباتورگذاری شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، ناحیه بازدارندگی یا عدم رشد در اطراف هر یک از چاهک‌های درون پتری‌دیش‌ها توسط خط‌کش به‌طور دقیق اندازه‌گیری و به‌صورت میلی‌متر نیز گزارش شد (۱۷).

جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی ، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های میکروبی (معادل استاندارد نیم مک‌فارلند) به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد.

پس از آن، ۲۰ میکرولیتر محلول تری‌فنیل‌تترازولیوم (۵ درصد) به چاهک‌ها اضافه و مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری، اولین غلظتی که در آن هیچگونه رنگ قرمزی (عدم رشد باکتری) مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش گردید (۱۸).

شکل۱- نمایی از انجام آزمون تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی.

۱- *Escherichia coli*
۲- *Pseudomonas aeruginosa*
۳- *Salmonella typhi*
۴- *Staphylococcus aureus*
۵- *Listeria innocua*
۶- *Bacillus cereus*
۷- Colony forming unit

یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمون‌های شیمیایی عصاره برگ رملیک در جدول ۱ نشان داده شده است. میزان فنل کل عصاره برگ رملیک برابر با ۴۷/۳۸±۰/۳۹ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره و میزان فلاونوئید آن برابر با ۲۸/۵۰±۰/۴۴ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره به‌دست آمد. همچنین نتایج آزمون‌های بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره مذکور نیز قابل توجه بوده و فعالیت آنتی-اکسیدانی بر حسب مهار رادیکال DPPH، ABTS و زوال رنگ محلول بتاکاروتن لینولئیک اسید به ترتیب برابر ۶۰/۳۰، ۵۴/۵۵ و ۵۷/۴۴ درصد بود.

چاهک‌هایی که فاقد رشد میکروبی بودند برای تعیین حداقل غلظت کشندگی مورد استفاده قرار گرفتند. بدین منظور میزان ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک‌هایی که رنگ قرمز در آن‌ها ظاهر نشده بود به صورت کشت سطحی روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، اولین پلیتی که کلنی در آن مشاهده نشد به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش گردید (۱۹). آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام گردید. به منظور مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

جدول۱- محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ رملیک

عصاره	فنل (mg GAE/g)	فلاونوئید (mg QE/g)	فعالیت آنتی اکسیدانی (٪)		
			مهار رادیکال DPPH	مهار رادیکال ABTS	بتاکاروتن/ لینولئیک اسید
برگ رملیک	۴۷/۳۸±۰/۳۹	۲۸/۵۰±۰/۴۴	۶۰/۳۰±۰/۵۰	۵۴/۵۵±۰/۶۲	۵۷/۴۴±۰/۲۸

جدول ۲، نتایج MIC[۸] (حداقل غلظت مهارکنندگی) و MBC[۹] (حداقل غلظت کشندگی) عصاره گیاهی رملیک بر میکروارگانیسم‌های بیماری-زای مورد مطالعه را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره برگ رملیک بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *باسیلوس سرئوس*، *سالمونلا تیفی*، *اشرشیاکلی* و *لیستریا اینوکوا* به ترتیب ۲۵، ۵۰، ۲۵، ۵۰، ۵۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. خاصیت کشندگی عصاره برگ رملیک نسبت به ممانعت‌کنندگی از رشد بیشتر بود (برای تمامی باکتری‌های مورد بررسی بزرگتر از ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود).

جدول۲- نتایج MIC (حداقل غلظت مهارکنندگی) و MBC (حداقل غلظت کشندگی) عصاره برگ رملیک بر باکتری‌های بیماریزا (بر حسب mg/ml)

	استافیلوکوکوس اورئوس	*سودوموناس ائروژینوزا*	*باسیلوس سرئوس*	*سالمونلا تیفی*	*اشرشیاکلی*	*لیستریا اینوکوا*
MIC	۲۵	۵۰	۲۵	۵۰	۵۰	۲۵
MBC	۴۰۰<	۴۰۰<	۴۰۰<	۴۰۰<	۴۰۰<	۴۰۰<

[۸] Minimum inhibitory concentration
[۹] Minimum bactericidal concentration

نتایج فعالیت ضدمیکروبی عصاره برگ رملیک به روش چاهک آگار (جدول ۳) نشان داد افزایش غلظت عصاره برگ رملیک از ۵۰ به ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث افزایش قطر هاله عدم رشد شد به طوری که در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قطر هاله عدم رشد به ترتیب در *باسیلوس سرئوس*> *استافیلوکوکوس اورئوس*> *لیستریا اینوکوا* > *سودوموناس ائروژینوزا*> *اشرشیا کلی* > *سالمونلا تیفی* بود. مقایسه آماری نتایج به دست آمده نشان داد که برای باکتری گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا*، *سالمونلا تیفی* و *اشرشیا کلی* و همچنین باکتری گرم مثبت *لیستریا اینوکوا* اختلاف معنی داری در سطح آماری ۵ درصد میان غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر وجود ندارد در حالی که این غلظت‌ها با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری داشتند (سطح آماری ۵ درصد). نتایج آماری نشان داد که میان غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر ملی‌لیتر عصاره رملیک برای باکتری‌های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده نشد در حالی که میان غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی-گرم بر میلی‌لیتر عصاره اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (سطح آماری ۵ درصد).

جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف عصاره برگ رملیک بر میانگین قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه بر حسب میلی‌متر به روش چاهک آگار

غلظت عصاره/باکتری	*باسیلوس سرئوس*	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*لیستریا اینوکوا*	*سالمونلاتیفی*	*اشرشیا کلی*	*سودوموناس ائروژینوزا*
۵۰mg/ml	۷/۱۰±۰/۳۱^{c}	۷/۲۰±۰/۱۵^{c}	–	–	–	–
۱۰۰mg/ml	۷/۵۰±۰/۲۱^{c}	۷/۷۰±۰/۴۸^{c}	۷/۲۰±۰/۶۷^{b}	۷/۰۰±۰/۳۵^{b}	۷/۰۰±۰/۵۷^{b}	۷/۱۰±۰/۵۰^{b}
۲۰۰mg/ml	۹/۲۰±۰/۱۲^{b}	۹/۳۰±۰/۲۳^{b}	۷/۹۰±۰/۱۱^{b}	۷/۵۰±۰/۱۷^{b}	۷/۶۰±۰/۲۲^{b}	۷/۷۰±۰/۱۰^{b}
۴۰۰mg/ml	۱۷/۰۰±۰/۲۳^{a}	۱۵/۳۰±۰/۲۶^{a}	۹/۴۰±۰/۱۸^{a}	۹/۰۰±۰/۱۶^{a}	۹/۳۰±۰/۱۰^{a}	۹/۵۰±۰/۱۳^{a}

*علامت (-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضدباکتری عصاره برگ رملیک می‌باشد.

**حروف غیر مشابه در یک ستون نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار میان اثر ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف عصاره برگ رملیک می‌باشد.

بحث

عوامل متعددی می‌تواند مقدار ترکیبات فنلی موجود در بافت های گیاهی را تحت تأثیر قرار دهد که از جمله می‌توان به عوامل ژنتیکی، میزان تابش نور خورشید، شرایط خاک، درجه رسیدگی در زمان برداشت، شرایط محیطی و آب و هوایی، عملیات پس از برداشت و شرایط نگهداری گیاه اشاره کرد. Dureja و Himan (۲۰۱۲)، میزان فنل و فلاونوئید میوه رملیک را به ترتیب ۵۴ mg GAE/100 g و ۵۸ QE/100 g بدست آوردند. تغییر در میزان فنل کل و خاصیت فلاونوئیدی به موقعیت جغرافیایی می‌تواند مربوط باشد همچنین میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با مطالعات پادالیا و چاندا (۲۰۲۱)، مطابقت داشت (۲۰).

مطالعات فراوان و روش‌های متنوعی برای تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شده است. این روش‌ها تحت تاثیر شرایط مختلف از قبیل نسبت حلالیت آنتی‌اکسیدان بین فازهای آبی و آلی، میزان دما، شدت نور، شرایط اکسیداسیون و ماده اکسید شونده و در روش‌های خاص نقطه پایان واکنش و مقدار اکسیداسیون، نتایج متفاوت ارائه می-دهند. لذا استفاده از یک روش برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مناسب نمی‌باشد (۲۱). اساس روش DPPH بر مبنای احیاء رادیکال آزاد به وسیله آنتی‌اکسیدان‌ها در غیاب سایر رادیکال‌های آزاد در محیط می‌باشد که نتیجه این عمل باعث ایجاد رنگ در محیط می‌شود که شدت آن با دستگاه طیف‌سنجی قابل اندازه-گیری است. رادیکال DPPH تشابه کمی به رادیکال پراکسی دارد اما به دلیل سهولت و سرعت این آزمون معمولا این روش برای بررسی مقدار آنتی‌اکسیدان در دانه گندم و پوسته ترکیبات گیاهی و یا برای دانه‌های روغنی استفاده می‌شود. واکنش رادیکال آزاد و DPPH برگشت‌پذیر بوده که این قابلیت بازگشت باعث می‌شود که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌ها معمولا کمتر از حد مشخص آن خوانده شود. یکی دیگر از شاخص‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی، مهار رادیکال کاتیونی ABTS و ارزیابی ظرفیت مهار رادیکال آزاد معادل ترولوکس است. از آنجا که آنتی‌اکسیدان‌ها، رادیکال‌های حاصل از اکسیداسیون اسید لینولئیک را مهار می‌کنند، از برهمکنش بین این رادیکال‌ها و بتاکاروتن جلوگیری کرده و در نتیجه از کاهش رنگ بتاکاروتن در اثر این واکنش، می‌کاهند. بنابراین بین قدرت آنتی‌اکسیدانی مواد شرکت‌کننده در این آزمون و میزان جلوگیری از کاهش رنگ بتاکاروتن، رابطه مستقیمی وجود دارد. در مطالعه بهجتی مقدم و همکاران (۲۰۲۰) میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۵۷/۵ درصد گزارش شد (۲۲).

فاضلی و همکاران (۱۳۹۵) در ارزیابی و مقایسه محتوای فنل، فلانوئید کل و عملکرد آنتی‌اکسیدانی برگ و میوه ژنوتیپ گیاه کنار در منطقه که از بیشترین میزان فنل کل ۲۰/۴۱۷ میلی‌گرم در گرم عصاره خشک و فلاونوئید کل ۵۲/۱۱۳ میلی‌گرم در گرم عصاره خشک برخوردار بود، مطابقت داشت (۸).

زمان زیادی از اثبات فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی سپری شده است اما در سال‌های اخیر افزایش علاقه‌مندی‌ها به توسعه‌ی فرآیند سبزگرایی سبب از سرگیری پژوهش‌ها و بررسی-های علمی در ارتباط با این مواد شده است. در این بررسی، اثر مهاری عصاره برگ رملیک بر رشد تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی ثابت شده است. بنابراین می‌توان از آن به عنوان ترکیب گیاهی در جهت بازدارندگی از رشد باکتری‌های بیماری‌زا استفاده کرد. گیاه رملیک منبعی غنی از ویتامین‌ها و کاروتنوئیدها که دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی هستند، بوده و همچنین دارای فلاونوئید و ترکیبات فنلی می‌باشد. اختلاف در میزان بازدارندگی عصاره بر رشد باکتری‌های مختلف را می‌توان به مکانیسم‌های متفاوت میکروارگانیسم‌ها در برابر عوامل محدودکننده رشد نسبت داد. آزمایش‌های صورت گرفته در این پژوهش نشان داد که عصاره برگ رملیک اثر ضدباکتریایی مطلوبی دارد. این نکته بیان‌کننده حضور ترکیبات آنتی‌باکتریایی بیشتر یا موثرتر در برگ این گیاه است. از آن-جا که گروهی از ترکیبات با فعالیت ضدباکتریایی ماهیت فنلی یا فلاونوئیدی دارند، می‌توان گفت که آزمایش‌های صورت گرفته روی فنل و فلاونوئید کل روی این بافت نیز تا حدی این مطلب را تایید می‌کند. این نتایج نشان می‌دهد که اختلاف در مورد سویه‌های مورد بررسی بسیار حائز اهمیت است، زیرا تفاوتی که در مورد ساختار باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی وجود دارد باعث شده که اثر ضدمیکروبی در مورد عصاره‌های گیاه رملیک معنی‌دار باشد. پژوهش‌های مشابه در مورد اثر ضدمیکروبی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهان دارویی که روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نیز انجام پذیرفته است مطلب فوق را تایید می‌کند. مطالعه حاضر با پژوهش‌های علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۱) (۲۳) و یگانگی و همکاران (۲۰۱۸) (۲۴) مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری

اخیرا کاربرد گیاهان دارویی مورد توجه قابل ملاحظه‌ای قرار گرفته است. در این میان، گیاه رملیک به دلیل خواص منحصر به فرد خود توجه زیادی را جلب کرده است. گیاه رملیک عضوی از خانواده عنابیان می‌باشد. عصاره این گیاه دارای انواع فلاونوییدها از جمله کورستین، کامفرول و مشتقات فلورتین می‌باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عصاره برگ رملیک دارای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی می‌باشد، همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره نیز به اثبات رسید. نتایج فعالیت ضدمیکروبی عصاره برگ رملیک نشان داد که این عصاره می‌تواند از رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری نماید. با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدمیکروبی قابل توجه عصاره برگ رملیک، می‌توان از این عصاره در صنایع داروسازی و غذایی بهره برد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند بدین وسیله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان برای تامین هزینه‌های انجام این پایان نامه که مقاله حاضر بخشی از نتایج آن بود تشکر و قدردانی نمایند.

REFERENCE

1. Tungunnithum D, Thongboonyou A, Pholboon A, Yangsabi A. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. Medicines, 2018; 5**,** 93.

2. Jadoun S, Arif R, Jangid N K, Meena R K. Green synthesis of nanoparticles using plant extracts: A review. Environmental Chemistry Letters, 2021; 19(1):355-74.

3. Veiga M, Costa E M, Silva S, Pintado M. Impact of plant extracts upon human health: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020; 60(5):873-86.

4. Ginter E, Simko V, Panakova V. Antioxidants in health and disease. Bratislavske lekarske listy, 2014; 115: 603-606.

5. Toghueo RMK. Boyom FF. Endophytes from ethno-pharmacological plants: Sources of novel antioxidants-A systematic review. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019; 22: 101430.

6. Alihouri M. Investigating the possibility of using saline waters for ber (Ziziphus nummularia) irrigation with determination of water salinity- dry matter yield production function in vegetative growth period. Irrigation & Water Engineering, 2019; 8(3): 224-236.

7. Fazeli-Nasab B, Mirzaei N. Evaluation Of Total Phenol And Flavonoid Content In A Wide Variety Of Native And Imported Plants. Scientific Journal Of Ilam University Of Medical Sciences, 2018; 26(2):141-54. [Full Text in Persian].

8. Fazeli Nasab B, Sirus Mehr N, Mirazaee N, Soleimani M. Evaluation and comparison of phenol content, phallonoidol and antioxidant function of leaves and fruits in 41 different genotypes of L. mauritiana Ziziphus in southern Iran. Journal of Ecophytochemistry of Medicinal Plants, 2016; 4 (16): 1-14. [Full Text in Persian].

9. Abdallah EM, Elsharkawy ER, Ed-Dra A. Biological activities of methanolic leaf extract of Ziziphus mauritiana. Pharm. Commun. Biosci. Biotech. Res. Comm. 2016; 9(4): 605-614.

10. Fallahian F, Mahdavi N, Haeri M. The Cytotoxic Effect Of Hyssop Extract On Breast Cancer Cell Line. Qom University Of Medical Sciences Journal, 2019; 13(7):22-28.

11. Azizian Shermeh O, Taherizadeh M, Valizadeh M, Qasemi A. Robial And Antioxidant Activities And Determining Phenolic And Flavonoid Contents Of The Extracts Of Five Species From Different Families Of The Medicinal Plants Grown In Sistan And Baluchestan Province. Journal Of Fasa University Of Medical Sciences, 2018; 7(4):465-79.

12. Alizadeh Behbahani BA, Noshad M, Falah F. Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of Syzygium aromaticum essential oil on foodborne pathogens. Potravinarstvo, 2019; 13(1): 875-883.

13. Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005; 53(20):7749-59.

14. Dapkevicius A, Venskutonis R, Van Beek TA, Linssen JP. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998; 77(1):140-6.

15. Tabatabaei Yazdi F, Alizade Behbahani B, Heidari Sureshjani M. The Comparison Of Antimicrobial Effects Of Chevil (Ferulago Angulata) Extract With A Variety Of Common Therapeutic Antibiotics In Vitro. Journal Of Arak University Of Medical Sciences, 2014;17(3):35-46.

16. Barzegar H, Alizadeh Behbahani B, Mehrnia MA, Tanavar H. Functional groups and antimicrobial activity of Zizyphus Spina-Christi leaf aqueous extract on Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus and Listeria inocua .Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2020, 25(90): 9-17. [Full Text in Persian].

17. 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. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 2020; 19(5): 463-484.

18. Rahmati-Joneidabad M, Alizadeh behbahani B. Investigation of the antifungal effect of Myrtus communis essential oil on Penicillium digitatum and Penicillium italicum (the green and blue fungi of orange). Journal of Food Science and Technology (Iran). 2021; 17 (109) :1-8. [Full Text in Persian].

19. Barzegar H, Mehrnia MA, Alizadeh Behbahani B. Determination of the chemical composition, antioxidant activity and the antimicrobial effect of Heracleum Lasiopetalum on infection and food poisoning microorganisms. Journal of Applied Microbiology in Food Industry. 2019; 4(4):15-28. [Full Text in Persian].

20. Padalia H, Chanda S. Antioxidant and Anticancer Activities of Gold Nanoparticles Synthesized Using Aqueous Leaf Extract of Ziziphus nummularia. BioNanoScience, 2021; 11(2): 281-94.

21. Siahpoosh A, Amraee F. Antioxidant capacity of various extracts of Asteragalus morinus Boiss aerial parts. SSU_Journals, 2011; 19(4):437-44.

22. Behjati-Moghaddam M, Neamati A, Yousefirad H. Evaluation of antioxidant, antibacterial and anticancer effects of the Zinc oxide nanoparticles biosynthesized by Amaranthus cruentus L. Kaums Journal (FEYZ), 2020; 24(2):133-41.

23. Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Vasiee, A., & Tabatabaee Yazdi, F. Control of microbial growth and lipid oxidation in beef using a Lepidium perfoliatum seed mucilage edible coating incorporated with chicory essential oil. Food Science & Nutrition, 2021; 9(5): 2458-2467.