بررسی فعالیت‌های ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فیتوشیمیایی اسانس و عصاره‌های مختلف گیاه کاه‌مکی (*Cymbopogon olivieri* (Boiss.) Bor.) از استان سیستان و بلوچستان

امید عزیزیان شرمه[۱]*، مژگان طاهری‌زاده[۲]، محرم ولی‌زاده[۳]، علیرضا زابلی[۴]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد فیتوشیمی، مرکز پژوهشی گیاهان دارویی و زینتی دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۲. دانش‌آموختهٔ کارشناسی‌ارشد فیتوشیمی، آزمایشگاه باکتریولوژی، شرکت آب و فاضلاب روستایی سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۳. استادیار، گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۴. دانش‌آموختهٔ کارشناسی‌ارشد شیمی تجزیه، آزمایشگاه مرکزی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۱۶
تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۲۱

چکیده

اهداف در این پژوهش فعالیت‌های ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فیتوشیمیایی اسانس و عصاره‌های گیاه دارویی کاه‌مکی (*Cymbopogon olivieri* (Boiss.) Bor.) رشدیافته در استان سیستان و بلوچستان بررسی شده است.

مواد و روش‌ها برای بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی شامل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل موجود در سه عصاره (متانولی، اتانولی و آبی) و اسانس، به‌ترتیب، روش‌های معرف فولین- سیوکالتیو، روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیم و GC-MS و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف به دو روش DPPH و FRAP و فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات موجود در اسانس و عصاره‌ها علیه سه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشرشیاکلی* و دو قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و *کاندیدا آلبیکنس* به دو روش انتشار از چاهک و حداقل غلظت مهارکنندهٔ رشد میکروب (MIC) استفاده شد.

یافته‌ها نتایج نشان داد که عصارهٔ متانولی بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوییدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و در مقابل، عصارهٔ آبی حداقل میزان این ترکیبات و فعالیت را داشت. در بررسی ترکیبات موجود در اسانس، سه ترکیب پیپریتون (۸۲/۹۵ درصد) ، کارن (۲/۴۹۳ درصد) و لیمونن (۱/۰۸۶ درصد) از عمده‌ترین ترکیبات بود. بررسی نتایج حاصل از آثار ضدمیکروبی نشان داد که اسانس و عصاره‌ها اثر مهارکنندگی قابل‌ملاحظه‌ای بر همهٔ باکتری‌ها و قارچ‌های مورد استفاده نشان داد، به‌طوری که این اثر کاملاً وابسته به غلظت بوده است.

نتیجه‌گیری به‌طور کلی، این مطالعه نشان داد که این گیاه کاندیدای خوبی در درمان بیماری‌های ناشی از استرس‌های اکسایشی و بیماری‌های ناشی از میکروب‌های بیماری‌زاست. همچنین، با توجه به قدرت بالای این گیاه در از بین بردن عوامل بیماری‌زا جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌هاست.

کلیدواژه‌ها:
اسانس، ترکیبات فیتوشیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضدمیکروبی، گیاه کاه‌مکی.

مقدمه

طبیعت منبعی غنی از ترکیبات دارویی است که بخشی از آن در گیاهان نهفته است. امروزه، در کشورهای درحال‌توسعه، به‌دلیل بروز عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی، به استفاده از داروهای گیاهی در درمان انواع بیماری‌ها و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در کارخانه‌های مواد غذایی توجه زیادی شده است و تحقیقات در زمینهٔ استخراج ترکیبات فعال بیولوژیکی از گیاهان به‌سرعت در حال انجام

* **نویسندهٔ مسئول: امید عزیزیان شرمه**
نشانی: زاهدان، خیابان دانشگاه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، مرکز پژوهشی گیاهان دارویی و زینتی
تلفن: ۹۸۹۱۱۲۱۶۵۶۹۳+ **دورنگار:** ۹۸۵۴۳۱۱۳۶۳۵۴+
رایانه: omid_aziziyan@yahoo.com
شناسه ORCID: 0000-0002-3169-1532

مجلهٔ علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۵، شمارهٔ ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۷، ص ۹۹-۱۱۱
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

است [۱].

اسانس‌ها در اندام‌های مختلف گیاهان یافت می‌شود و به‌علت تبخیر در اثر مجاورت هوا، روغن‌های اسانسی نامیده می‌شود [۲]. با توجه به استفادهٔ بی‌رویه از آنتی بیوتیک‌ها و افزایش مقاومت در باکتری‌ها، یافتن جایگزین‌های مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها امری ضروری است. به‌همین دلیل، مطالعات گسترده‌ای در مورد پتانسیل استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی موجود در اسانس و عصارهٔ گیاهان در کنترل و درمان عوامل بیماری‌زا صورت گرفته است [۳]. آثار مفید آنتی‌اکسیدان‌ها بر سلامتی بشر موضوعی جدی است. به‌عبارت دیگر، آنتی‌اکسیدان مولکولی است که توانایی جلوگیری یا آهسته‌کردن واکنش اکسایشی سایر مولکول‌ها را داراست. واکنش‌های اکسایشی قادر به تولید رادیکال‌های آزاد است که طی واکنش‌های زنجیری، این مولکول‌ها به سلول‌ها آسیب جدی می‌رساند، ولی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، این واکنش‌های زنجیری را با حذف حدواسط‌های رادیکالی آزاد متوقف می‌کند و از انجام واکنش‌های اکسایشی بیشتر با اکسیدشدن خود جلوگیری به‌عمل می‌آورد [۴].

آنتی‌اکسیدان‌ها به دو صورت طبیعی و سنتزی وجود دارد [۵]. امروزه، بیشتر تحقیقات صورت‌گرفته بر استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های جدید و بی‌خطر از منابع گیاهی، حیوانی، میکروبی و غذایی تمرکز یافته است [۶]. ترکیبات فنلی از جمله فلاونوییدها دسته‌ای از ترکیبات فیتوشیمیایی است که انتشار وسیعی در گیاهان دارد و فعالیت بیولوژیکی متنوع این ترکیبات از جمله فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدالتهابی و گشادکنندگی عروق آن در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده است [۷] و نقش مهمی در نگهداری محصولات غذایی و حفظ سلامتی انسان دارد [۸].

جنس *Cymbopogon* از طایفهٔ *Andropogonae*، زیرتیرهٔ *Panicoidaea* و تیرهٔ *Poaceae* است. از این جنس در ایران دو گونهٔ *C. olivieri* و *C. parkeri* شناسایی و گزارش شده است [۹]. گونهٔ *C. olivieri* در نواحی محلی و بومی ایران نظیر استان‌های فارس، کرمان، هرمزگان، خوزستان و سیستان و بلوچستان به نام‌های کاه‌مکی، ندک و پوتار معروف است [۱۰]. تاکنون تحقیقات اندکی روی گونهٔ *C. olivieri* انجام شده است. تحقیقات نشان می‌دهد که این گیاه سرشار از ترکیبات ثانویه‌ای چون آلکالوییدها، ساپونین‌ها و روغن‌های اسانسی است [۱۱].

محققان اسانس این گیاه را در مناطق مختلف ایران بررسی کرده‌اند و پیپریتون (۵۳/۳ درصد) ، آلفا- ترپینن (۱۳/۶ درصد) و المول (۷/۷ درصد) ترکیبات اصلی آن گزارش شده است [۱۰]. در مطالعه‌ای روی اسانس گونهٔ مورد نظر رشدیافته در هند ترکیبات پولگون، میرسن، بتا-پینن و پیپریتون از ترکیبات عمده بود [۱۲].

تحقیقات نشان می‌دهد که اسانس گیاه کاه‌مکی روی قارچ‌های *پنسیلیوم*، *میکروسپوریوم*، *کاندیدا آلبیکنس*، *آسپرژیلوس نایجر* و باکتری‌های *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیتیس* آثار بازدارندهٔ قابل‌توجهی دارد [۱۳]. مطالعات نشان می‌دهد که این گیاه اثر ضدمالاریایی بالایی نیز دارد [۱۱]. استفاده از این گیاه در طب سنتی ایران، در درمان درد معده و آنفولانزا نیز گزارش شده است [۱۴]. از این‌رو، مطالعهٔ حاضر به بررسی ترکیبات مؤثرهٔ اسانس گونهٔ *C.olivieri* رشدیافته در استان سیستان و بلوچستان و بررسی عملکرد آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و محتوی فنولی و فلاونوییدی کل عصاره‌های آن می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و میکروارگانیسم‌های مورد استفاده

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده، با خلوص بالا تهیه شد. معرف فولین، گالیک اسید، سدیم بیکربنات، سولفات آهن، استات سدیم، سدیم سولفات، 2,4,6-tripyridyl-s- (TPTZ) triazine، اتانول، متانول و دی‌متیل سولفوکساید، از شرکت مرک و ۲،۲- دی‌فنیل- ۲- پیکریل- هیدرازیل (DPPH)، بوتیلات هیدروکسی تولوئن (BHT) و کوئرستین از شرکت سیگما-آلدریچ و میکروارگانیسم‌های استفاده‌شده شامل باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTTC 1112)، *باسیلوس سرئوس* (PTTC 1154)، *اشرشیا کلی* (PTTC 1399) و قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* (PTTC 5012) و *کاندیدا آلبیکنس* (PTTC 5027) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST) تهیه شد. برای محلول‌سازی و شستشو از آب دوبار تقطیر استفاده شد.

تهیهٔ اسانس و عصاره

برای تهیهٔ اسانس و عصاره، نمونه‌ی گیاهی مورد نظر از ارتفاعات تفتان واقع در شهرستان خاش در استان سیستان و بلوچستان در سال ۱۳۹۳ جمع‌آوری و برای شناسایی و تأیید نام، نمونهٔ هرباریومی از آن تهیه و به بخش هرباریوم مرکز پژوهشی گیاهان دارویی و زینتی دانشگاه سیستان و بلوچستان انتقال و با ارائهٔ کد هرباریومی ۶۷۳۲، شناسایی و نام‌گذاری شد. پس از آن، نمونهٔ مورد نظر در مکانی به دور از

نور آفتاب و به‌مدت یک هفته خشک شد. اسانس‌گیری به‌روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر صورت گرفت [۱۵]. بدین‌منظور، مقدار ۱۵۰ گرم از پودر خشک‌شدهٔ گیاه به بالن ۲ لیتری انتقال یافت و مقدار ۱/۵ لیتر آب دوبار تقطیر به آن اضافه شد. اسانس‌گیری به‌مدت ۶ ساعت بعد از زمان به‌جوش‌آمدن آب ادامه یافت. در انتها، به اسانس‌های به‌دست‌آمده مقدار مشخصی هگزان نرمال اضافه شد تا فاز آبی و آلی از هم جدا شود. اسانس حاصل با سدیم سولفات بدون آب رطوبت‌زدایی شد. برای استخراج عصارهٔ گیاه کاه‌مکی، عصاره‌گیری به روش ماسراسیون (خیساندن) انجام گرفت [۱۶]. بدین‌منظور مقدار ۱۰ گرم از پودر خشک آن را به ۱۰۰ میلی‌لیتر از حلال‌های مختلف (متانول، اتانول، آب دوبار تقطیر) افزوده و به‌مدت ۲۴ ساعت روی شیکر به‌هم زده شد.

نمونهٔ به‌دست‌آمده با کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف و به‌منظور حذف کامل ذرات معلق، هر کدام از عصاره‌ها با دستگاه سانترفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۳۰ دقیقه سانترفیوژ شدند. پس از حذف حلال، به‌دلیل حساسیت بالای عصاره‌های به‌دست‌آمده و اسانس گرفته‌شده به نور، حرارت و اکسیژن، درب آن‌ها بسته و تا زمان آنالیز در یخچال و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهدار شد.

شناسایی ترکیبات ثانویهٔ تشکیل‌دهندهٔ اسانس

اسانس گیاه کاه‌مکی پس از آماده‌سازی به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی تزریق شد. دستگاه کروماتوگرافی از نوع Agilent 7890B و طیف‌سنج جرمی مدل Agilent 5977A، شامل ستون HP-5MS به‌طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایهٔ داخلی ۰/۲۵ میکرومتر بود. دمای محل تزریق و دمای نهایی به‌ترتیب ۲۵۰ و ۲۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد بود. از گاز حامل هلیم با سرعت ۱ میلی‌لیتر در هر دقیقه با ولتاژی با انرژی ۷۰ ev استفاده شد. شناسایی طیف‌ها با کمک بانک اطلاعات جرمی، زمان بازداری، محاسبهٔ اندیس کواتس، مطالعهٔ طیف‌های جرمی هر یک از اجزای اسانس و مقایسه با طیف جرمی کتابخانهٔ دیجیتالی صورت گرفت. همچنین، درصد هر یک از اجزای تشکیل‌دهندهٔ اسانس تعیین شد.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌روش قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی (Radical Scavenging Capacity) به‌کمک ۲-۲ دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)ارزیابی شد [۱۷]. غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها به‌همراه ۱ میلی‌لیتر از DPPH با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار و ۱ میلی‌لیتر متانول تهیه شد. بعد از ۳۰ دقیقه قراردادن در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\%IP = (A_{control} - A_{sample} / A_{control}) \times 100$$

%IP: درصد مهار رادیکال‌های آزاد (درصد بازداری آنتی‌اکسیدان در برابر رادیکال‌های آزاد)

$A_{control}$: جذب شاهد (حاوی ۱ میلی‌لیتر از متانول در ۱ میلی‌لیتر از محلول DPPH است)

A_{Sample} : جذب نمونه (حاوی حجم‌های مختلفی از عصارهٔ گیاهی (آنتی‌اکسیدان)، متانول و محلول DPPH)

پس از محاسبهٔ درصد بازداری (%IP)، منحنی کالیبراسیونی آن بر حسب غلظت (µg/ml) رسم شد و پس از به‌دست‌آمدن معادلهٔ خط نمودار (y=ax+b)، با جایگزین‌کردن عدد ۵۰ در محور y، مقدار IC_{50} از محور x محاسبه و قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها بر اساس IC_{50} (µg/ml) گزارش شد. IC_{50} غلظتی از آنتی‌اکسیدان است که در آن قدرت بازداری عصاره‌ها ۵۰ درصد است. در این تست از بوتیلات هیدروکسی تولوئن، BHT، (آنتی‌اکسیدان سنتزی) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی به‌روش احیای یون آهن (III)، FRAP [۲]

برای اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن، روش بنزی و استرین با کمی تغییر استفاده شد [۱۸]. در لولهٔ آزمایش به ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره، مقدار ۱/۸ میلی‌لیتر از محلول تازهٔ فرپ افزوده شد (محلول تازهٔ فرپ با افزودن ۲۵ میلی‌لیتر بافر استات، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول TPTZ و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول $FeCl_3.6H_2O$ قبل از انجام آزمایش تهیه شد). مخلوط فوق ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرارگرفت. سپس، جذب محلول‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. فعالیت احیاکنندگی عصاره‌ها با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میلی‌مول یون آهن (II) بر میلی‌گرم وزن خشک نمونه محاسبه شد. در این آزمایش از بوتیلات هیدروکسی تولوئن به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

اندازه‌گیری مقدار فنول کل

محتوای فنول کل با استفاده از معرف فولین- سیوکالتیو اندازه‌گیری شد [۱۹]. به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره‌ها، ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر فولین سیوکالتیو ۱۰ درصد و پس از ۵

دقیقه، ۲ میلی‌لیتر از محلول ۵ درصد سدیم‌کربنات اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در مکانی تاریک و در دمای اتاق قرارگرفت. پس از آن جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر در دستگاه اسپکتوفوتومتر فرابنفش-مرئی در مقابل بلانک قرائت شد. گالیک اسید استاندارد رسم منحنی کالیبراسیون به‌کار رفت و میزان فنول کل بر اساس میزان معادل میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره گزارش شد.

تعیین مقدار فلاونوییدهای کل

برای سنجش میزان فلاونویید کل از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیم استفاده شد [۲۰]. ۵۰۰ میکرولیتر از هر کدام از عصاره‌های موجود به‌صورت جداگانه با ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیم (۱۰ درصد اتانولی)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم (۱ مولار) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شد. سپس محلول‌ها در دمای اتاق به‌مدت ۳۰ دقیقه قرارگرفت. جذب محلول‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی قرائت شد. از کوئرستین برای رسم منحنی استاندارد استفاده و در انتها میزان فلاونویید کل بر اساس میزان معادل میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره‌ها گزارش شد.

بررسی فعالیت ضدمیکروبی

نمونه‌های میکروبی با استفاده از محیط کشت لوریا برتانی و سابورد دکستروز و بر اساس روش‌های استاندارد احیا شد و به‌منظور سوسپانسیون میکروبی از کشت ۲۴ ساعته هر میکروارگانیسم به‌صورت مجزا به لوله‌های آزمایش حاوی ۳ میلی‌لیتر مولر هینتون براث تلقیح و سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم مک‌فارلند آماده شد.

بررسی آثار ضد باکتریایی و ضد قارچی اسانس و عصاره‌های گیاه کاه‌مکی نخست با روش انتشار از چاهک در آگار [۲۱] انجام شد. بدین‌منظور، از سوسپانسیون هر میکروب به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر روی پلیت حاوی مولر هینتون آگار برای باکتری‌ها و سابورد دکستروز آگار برای قارچ‌ها ریخته و با سواپ استریل در سه جهت به‌صورت انبوه کشت داده شد. سپس، در سطح هر یک از پلیت‌های کشت داده شده چاهک‌هایی به قطر تقریباً ۶ میلی‌متر و به فاصلهٔ ۲ سانتی‌متری از هم ایجاد و درون هر چاهک مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر یک از رقت‌های آماده‌شدهٔ نمونه‌ها با سمپلر ریخته شد. از آنتی‌بیوتیک‌های ضد باکتریایی آمپی‌سیلین و جنتامیسین و ضد قارچی کلوتریمازول به‌عنوان شاهد مثبت و از محلول DMSO به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. پس از اتمام کار، محیط‌های کشت باکتریایی در انکوباتور ۳۷ درجه به‌مدت ۲۴ ساعت و کشت‌های قارچی در انکوباتور ۲۸ درجه به‌مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. در نهایت، پس از گذشت ۲۴-۴۸ ساعت، کشت‌های میکروبی از نظر تشکیل یا عدم‌تشکیل هالهٔ عدم‌رشد بررسی و قطر هاله‌های تشکیل‌شده بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و گزارش شد.

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) اسانس و عصاره‌های مورد نظر، از روش رقت لوله‌ای استفاده شد [۲۲]. بدین‌منظور از عصاره‌های آماده‌شده در لوله‌های آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث سری رقت‌های آماده‌شده برای اسانس و عصاره‌ها تهیه شد. سپس، به هر یک از لوله‌ها ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه‌شده تلقیح شد. لولهٔ آزمایشی حاوی محیط کشت و میکروب تلقیح شد ولی فاقد اسانس و عصاره‌ها و به‌عنوان شاهد مثبت و لولهٔ آزمایش حاوی محیط کشت به‌همراه عصاره یا اسانس ولی فاقد باکتری و قارچ به‌عنوان شاهد منفی نیز آماده شد. در نهایت، تمامی لوله‌های آزمایش به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه برای باکتری‌ها و دمای ۲۸ درجه برای قارچ‌ها و به‌مدت ۲۴-۴۸ ساعت انتقال داده شد. بعد از انکوباسیون، هر لوله از نظر کدورت حاصل از رشد میکروارگانیسم‌ها بررسی و کمترین رقتی که در آن به‌علت اثر مهارکنندگی اسانس و عصاره‌ها کدورتی ایجاد نشد MIC در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی انجام گرفت و نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS.16 تجزیه‌وتحلیل شد. مقایسهٔ معناداری میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دانهٔ دانکن در سطح احتمال ۵ درصد بررسی شد. همچنین، برای رسم شکل‌ها و نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 استفاده شد.

یافته‌ها

خلاصهٔ کلی نتایج حاصل از تفکیک اسانس حاصل از آن در جدول ۱ به‌همراه درصد هر ترکیب آمده است. بر اساس جدول ۱، در اسانس گیاه کاه‌مکی تعداد ۲۳ ترکیب شناسایی شد که در مجموع ۹۶/۴۷۷ درصد از وزن کل اسانس را تشکیل داد. از میان ترکیبات شناسایی‌شده، ترکیب پیپریتون با ۸۲/۹۵ درصد، ۲-کارن با ۲/۴۹۳ درصد، D- لیمونن با ۱/۰۸۶ درصد از عمده‌ترین ترکیبات بود. در اسانس این گیاه، ۶/۵۳۹ درصد

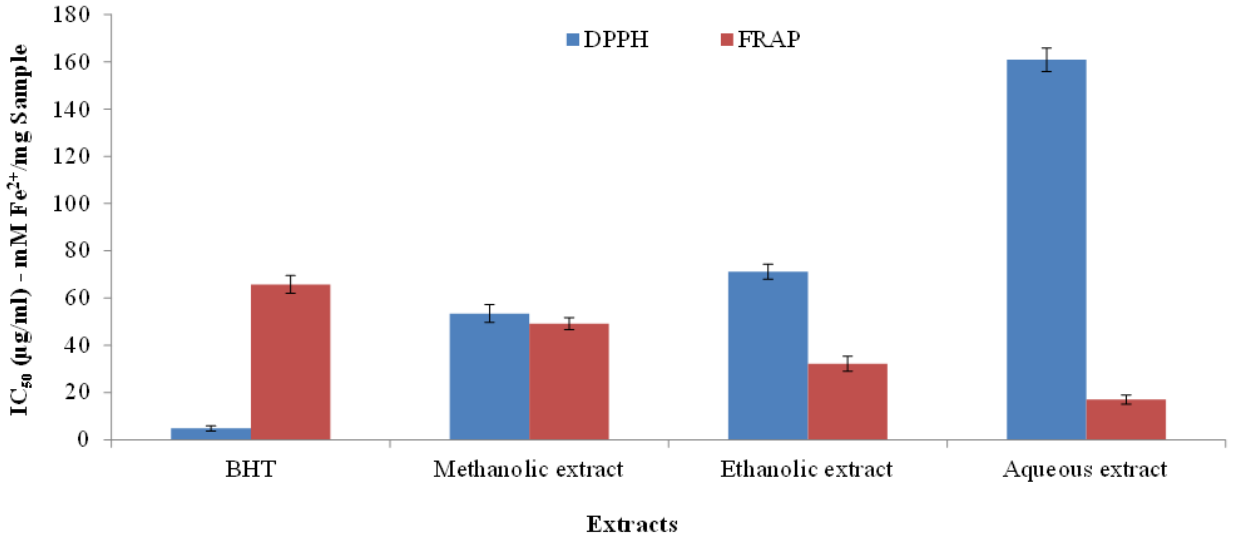
از ترکیبات مربوط به منوترپن‌های هیدروکربنه، ۸۷/۰۲۲ درصد از ترکیبات مربوط به منوترپن‌های اکسیژنه،۲/۴۷ درصد از ترکیبات مربوط به سزکوئی‌ترپن‌ها و ۳/۹۶۹ درصد از ترکیبات مربوط به ترکیبات دیگر است.

جدول ۱. ترکیبات شناسایی‌شده در اسانس گیاه کاه‌مکی

شماره	نام ترکیب	ضریب کواتس (شاخص بازداری)*	زمان بازداری/دقیقه	درصد نسبی	درصد کل
۱	β-Cymene	۹۸۸	۶/۸۲	۰/۸۹	۰/۷۳۷
۲	2,3-Dehydro-1,8-cineole	۹۹۲	۷/۳۰	۰/۲۱	۰/۱۷۵
۳	(+)-2-Carene	۱۰۰۵	۷/۵۴	۳/۰۰	۲/۴۹۳
۴	o-Cymene	۱۰۱۷	۸/۱۹	۰/۳۷	۰/۳۰۸
۵	D-Limonene	۱۰۳۱	۸/۲۶	۱/۳۱	۱/۰۸۶
۶	trans-β-Ocimene	۱۰۵۲	۸/۵۰	۰/۳۰	۰/۲۵۱
۷	Fenchon	۱۰۶۷	۹/۹۳	۰/۲۸	۰/۲۳۵
۸	Trans-P-Menth-2-en-1-ol	۱۰۹۵	۱۰/۸۰	۱/۲۷	۱/۰۵۶
۹	Cis-p-Menth-2-en-1-ol	۱۱۰۴	۱۱/۳۰	۰/۷۹	۰/۶۵۴
۱۰	Cyclohexene, 3-acetoxy-4-(1-hydroxy-1-methylethyl)-1-methyl	۱۱۱۵	۱۲/۰۷	۱/۲۲	۱/۰۱۰
۱۱	p-Cymen-8-ol	۱۱۲۳	۱۲/۵۷	۱/۱۲	۰/۹۳۰
۱۲	α-Terpineol	۱۱۶۷	۱۲/۷۴	۱/۲۶	۱/۰۴۵
۱۳	Cis-piperitol	۱۱۷۹	۱۲/۸۷	۰/۲۵	۰/۲۱۰
۱۴	Tranc-piperitol	۱۱۸۸	۱۳/۱۹	۰/۵۱	۰/۴۲۱
۱۵	Piperitone	۱۲۴۱	۱۴/۵۵	۱۰۰	۸۲/۹۵
۱۶	2-Caren-10-al	۱۲۵۵	۱۵/۰۸	۰/۲۷	۰/۲۲۶
۱۷	Thymol	۱۲۶۳	۱۵/۵۴	۰/۲۸	۰/۲۳۰
۱۸	(-)-β-Bourbonene	۱۳۶۹	۱۸/۰۱	۰/۲۳	۰/۱۸۹
۱۹	α-Eudesmol	۱۶۳۲	۲۳/۳۷	۰/۳۳	۰/۵۰
۲۰	Ledene oxide-(II)	۱۶۳۹	۲۳/۴۹	۰/۲۱	۰/۱۷۲
۲۱	Cubenol	۱۶۴۵	۲۳/۸۹	۰/۳۸	۰/۳۱۲
۲۲	T-Muurolol	۱۶۵۳	۲۴/۱۸	۰/۲۲	۰/۳۱۲
۲۳	β –Eudesmol	۱۶۶۴	۲۴/۳۹	۰/۹۲	۰/۷۶۵

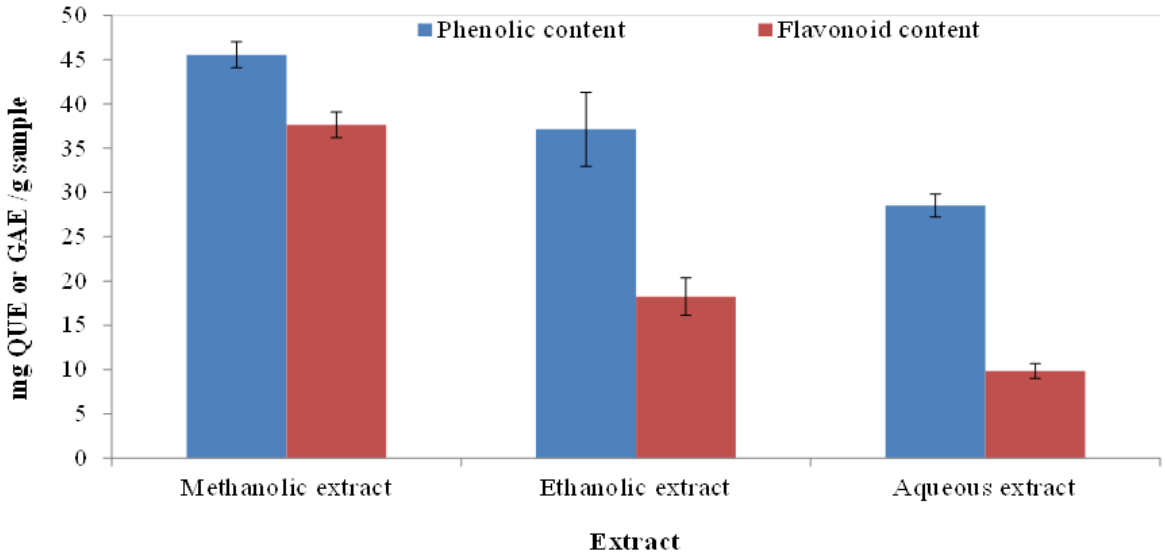
* شاخص بازداری با تزریق مخلوط هیدروکربن‌های نرمال (C_6-C_{24}) به ستون HP-5MS محاسبه شده است.

نتایج حاصل از قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف (متانولی، اتانولی و آبی) در مقایسه با بوتیلات هیدروکسی تولوئن در شکل ۱ آمده است. نتایج قدرت خنثی‌سازی رادیکال‌های پایدار DPPH و احیاکنندگی یون‌های آهن (III) نشان داد که در هر دو مورد عصارهٔ متانولی بیشترین قدرت آنتی‌اکسیدانی را نسبت به سایر عصاره‌ها دارد (IC_{50}=۵۳/۴۷±۳/۷۴ µg/ml و Sample Fe^{2+}/mg mM ۴۹/۲۱±۲/۵۴)، و کمترین اثر آنتی‌اکسیدانی مربوط به عصارهٔ آبی با مقادیر IC_{50}=۱۶۰/۸۳±۴/۹۷ µg/ml و Sample Fe^{2+}/mg mM ۱۷/۱±۱/۹۷ بوده است. این مقادیر برای عصارهٔ اتانولی IC_{50}=۷۱/۱۹±۳/۱۲ µg/ml و Sample Fe^{2+}/mg mM ۳۲/۱۹±۳/۱۶ به‌دست آمد. میزان IC_{50} بوتیلات هیدروکسی تولوئن نیز ۴/۸۵±۱/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.



شکل ۱. مقایسهٔ قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف گیاه کاه‌مکی در مقابل BHT به دو روش DPPH و FRAP

محتوای فنولی و فلاونوییدی کل عصاره‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی سنجش شد. مقایسهٔ مقادیر فنول کل و فلاونویید کل در شکل ۲ آمده است. نتایج بیانگر آن است که عصارهٔ متانولی با مقدار ۴۵/۵۶±۱/۴۵ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره، بیشترین مقدار فنول و با مقدار ۳۷/۶۳±۱/۴۶ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره بیشترین مقدار فلاونوئید را به‌خود اختصاص داده است. این مقادیر برای عصاره‌های اتانولی و آبی به‌ترتیب mgGAE/g extract ۳۷/۱۵±۴/۱۸ – mg QUE/g extract ۱۸/۲۵±۳/۱۲ و mgGAE/g extract ۲۸/۵۴±۱/۲۸ – mg QUE/g extract ۹/۸۵±۰/۸۴ بوده است. نتایج نشان داد که حلال متانول توانسته است بیشتر ترکیبات فنولی و فلاونوییدی را در خود حل کند و این مورد برای حلال آب خیلی کمتر بوده است.



شکل ۲. مقایسهٔ مقادیر فنول و فلاونویید کل موجود در عصاره‌های مختلف گیاه کاه‌مکی

بررسی نتایج حاصل از آثار ضدباکتریایی و ضدقارچی اسانس و عصاره‌های گیاه کاه‌مکی نشان داد که اسانس و عصاره‌ها اثر مهارکنندگی قابل‌ملاحظه‌ای بر همهٔ باکتری‌ها و قارچ‌های مورد استفاده دارد، به‌طوری که این اثر کاملاً وابسته به غلظت بود و با افزایش غلظت اسانس و عصاره‌ها بیشتر شده است. نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی، اتانولی، آبی و اسانس گیاه کاه‌مکی با روش انتشار چاهکی و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) به‌ترتیب در جداول ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ نشان داده شده است.

جدول ۲. قطر هالهٔ عدم‌رشد میکروبی در غلظت‌های مختلف عصارهٔ متانولی گیاه کاه‌مکی با روش انتشار از چاهک (بر حسب میلی‌متر)

میکروارگانیسم‌ها	غلظت‌های مختلف عصارهٔ متانولی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)								
	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	آمپی‌سیلین	جنتامیسین	کلوتریمازول	DMSO
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۶±۱/۹۷	۱۸±۱/۵۰	۲۰±۲/۲۶	۲۳±۲/۶۷	۲۶±۰/۴۱	۲۹±۲/۳۵	۳۰±۱/۷۷	_	۰
باسیلوس سرئوس	۱۵±۲/۱۵	۱۷±۰/۸۰	۲۰±۱/۰۰	۲۳±۱/۵۰	۲۵±۱/۲۱	۲۸±۲/۶۱	۲۹±۲/۱۱	_	۰
اشرشیا کلی	۱۴±۱/۰۰	۱۵±۲/۰۰	۱۸±۱/۷۰	۲۰±۰/۸۵	۲۲±۲/۰۲	۲۷±۱/۹۴	۳۱±۳/۰۳	_	۰
آسپرژیلوس نایجر	۱۶±۲/۱۲	۱۸±۱/۰۰	۲۰±۲/۵۰	۲۱±۱/۹۷	۲۳±۲/۶۱	_	_	۲۹±۲/۱۸	۰
کاندیدا آلبیکنس	۱۶±۱/۷۷	۱۷±۰/۶۰	۲۰±۱/۹۷	۲۲±۱/۹۷	۲۵±۰/۲۵	_	_	۳۳±۱/۹۷	۰

جدول ۳. حداقل غلظت مهارکنندهٔ رشد میکروب (MIC) در غلظت‌های مختلف عصارهٔ متانولی گیاه کاه‌مکی (بر حسب میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)

میکروارگانیسم‌ها	غلظت‌های مختلف عصارهٔ متانولی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)							
	۱/۵۶	۳/۱۲	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	-	-	-	-	-	-
باسیلوس سرئوس	+	+	-	-	-	-	-	-
اشرشیا کلی	+	+	-	-	-	-	-	-
آسپرژیلوس نایجر	+	+	+	-	-	-	-	-
کاندیدا آلبیکنس	+	+	-	-	-	-	-	-

جدول ۴. قطر هالهٔ عدم‌رشد میکروبی در غلظت‌های مختلف عصارهٔ اتانولی گیاه کاه‌مکی با روش انتشار از چاهک (بر حسب میلی‌متر)

میکروارگانیسم‌ها	غلظت‌های مختلف عصارهٔ اتانولی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)								
	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	آمپی‌سیلین	جنتامیسین	کلوتریمازول	DMSO
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۲±۰/۳۸	۱۵±۱/۹۷	۱۷±۱/۰۰	۲۰±۰/۹۰	۱۸±۰/۹۶	۲۹±۲/۰۰	۳۰±۲/۶۴	_	۰
باسیلوس سرئوس	۱۳±۱/۳۹	۱۵±۱/۹۴	۱۸±۲/۰۰	۲۰±۱/۰۶	۱۸±۱/۲۸	۲۸±۱/۷۳	۲۹±۱/۰۰	_	۰
اشرشیا کلی	۱۱±۱/۵۰	۱۲±۱/۶۶	۱۵±۱/۵۰	۱۸±۰/۹۵	۱۵±۰/۹۵	۲۷±۰/۵۰	۳۱±۳/۰۰	_	۰
آسپرژیلوس نایجر	۱۳±۱/۳۵	۱۵±۱/۱۲	۱۷±۱/۱۳	۱۹±۱/۱۵	۲۱±۰/۷۲	_	_	۲۹±۰/۵۷	۰
کاندیدا آلبیکنس	۱۳±۱/۷۱	۱۴±۱/۱۱	۱۷±۰/۹۹	۱۹±۰/۸۵	۲۲±۰/۸۰	_	_	۳۳±۱/۵۰	۰

جدول ۵. حداقل غلظت مهارکنندهٔ رشد میکروب (MIC) در غلظت‌های مختلف عصارهٔ اتانولی گیاه کاه‌مکی (بر حسب میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)

میکروارگانیسم‌ها	غلظت‌های مختلف عصارهٔ اتانولی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)							
	۱/۵۶	۳/۱۲	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	+	+	-	-	-	-
باسیلوس سرئوس	+	+	+	–	-	-	-	-
اشرشیا کلی	+	+	+	–	–	-	-	-
آسپرژیلوس نایجر	+	+	+	+	-	-	-	-
کاندیدا آلبیکنس	+	+	-	-	-	-	-	-

جدول ۶. قطر هالهٔ عدم‌رشد میکروبی در غلظت‌های مختلف عصارهٔ آبی گیاه کاه‌مکی با روش انتشار از چاهک (بر حسب میلی‌متر)

میکروارگانیسم‌ها	غلظت‌های مختلف عصارهٔ آبی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)								
	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	آمپی‌سیلین	جنتامیسین	کلوتریمازول	DMSO
استافیلوکوکوس اورئوس	۵±۱/۱۱	۱۱±۱/۰۲	۸±۱/۴۸	۱۰±۱/۲۵	۱۳±۱/۲۱	۲۳±۱/۹۰	۲۶±۲/۰۲	_	۰
باسیلوس سرئوس	۷±۱/۸۹	۱۱±۱/۶۳	۹±۱/۹۰	۱۲±۲/۳۵	۱۴±۰/۹۴	۲۵±۱/۲۷	۲۵±۲/۹۷	_	۰
اشرشیا کلی	۸±۰/۸۸	۱۰±۱/۵۲	۷±۱/۶۱	۹±۲/۲۷	۱۱±۰/۶۹	۲۴±۲/۹۴	۲۵±۱/۸۸	_	۰
آسپرژیلوس نایجر	۸±۱/۱۴	۹±۰/۸۹	۱۳±۱/۲۶	۱۶±۱/۶۱	۱۹±۱/۹۴	_	_	۲۵±۱/۲۴	۰
کاندیدا آلبیکنس	۵±۱/۶۶	۸±۱/۱۵	۱۱±۱/۸۸	۱۵±۱/۸۰	۱۷±۱/۹۷	_	_	۲۷±۲/۳۵	۰

جدول ۷. حداقل غلظت مهارکنندهٔ رشد میکروب (MIC) در غلظت‌های مختلف عصارهٔ آبی گیاه کاه‌مکی (بر حسب میلی‌گرم/میلی‌لیتر)

میکروارگانیسم‌ها	غلظت‌های مختلف عصارهٔ آبی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)							
	۱/۵۶	۳/۱۲	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	+	+	+	+	-	-
باسیلوس سرئوس	+	+	+	+	+	-	-	-
اشرشیا کلی	+	+	+	+	+	-	-	-
آسپرژیلوس نایجر	+	+	+	–	-	-	-	-
کاندیدا آلبیکنس	+	+	+	+	-	-	-	-

جدول ۸. قطر هالهٔ عدم‌رشد میکروبی در غلظت‌های مختلف اسانس گیاه کاه‌مکی با روش انتشار از چاهک (بر حسب میلی‌متر)

میکروارگانیسم‌ها	غلظت‌های مختلف اسانس (٪)										
	٪۱	٪۵	٪۱۰	٪۲۵	٪۵۰	٪۷۵	٪۱۰۰	آمپی‌سیلین	جنتامیسین	کلوتریمازول	DMSO
استافیلوکوکوس اورئوس	۶±۱/۴۱	۹±۱/۱۱	۱۱±۱/۰۰	۱۴±۱/۷۹	۱۷±۲/۰۳	۲۰±۲/۹۱	۲۳±۱/۴۴	۳۰±۰/۷۴	۳۱±۳/۰۴	_	۰
باسیلوس سرئوس	۶±۰/۷۴	۷±۱/۷۱	۹±۱/۰۰	۱۱±۱/۴۶	۱۴±۲/۳۷	۱۸±۱/۹۷	۲۱±۲/۳۹	۲۷±۲/۰۱	۲۹±۳/۶۱	_	۰
اشرشیا کلی	۵±۰/۹۴	۶±۱/۵۰	۶±۱/۲۷	۹±۱/۴۶	۱۲±۲/۴۸	۱۷±۱/۴۰	۲۰±۱/۴۸	۲۸±۱/۴۸	۳۰±۳/۲۶	_	۰
آسپرژیلوس نایجر	۳±۰/۴۹	۵±۰/۶۳	۷±۱/۹۰	۸±۱/۷۷	۱۱±۱/۷۹	۱۵±۱/۷۹	۱۸±۱/۳۵	_	_	۲۸±۲/۰۲	۰
کاندیدا آلبیکنس	۳±۰/۲۵	۵±۰/۶۱	۴±۱/۲۳	۸±۱/۱۱	۱۰±۱/۰۲	۱۲±۰/۹۹	۱۷±۱/۹۴	_	_	۳۲±۲/۶۱	۰

جدول ۹. حداقل غلظت مهارکنندهٔ رشد میکروب (MIC) در غلظت‌های مختلف اسانس گیاه کاه‌مکی (بر حسب درصد)

میکروارگانیسم‌ها	غلظت‌های مختلف اسانس (٪)						
	٪۱/۵۶	٪۳/۱۲	٪۶/۲۵	٪۱۲/۵	٪۲۵	٪۵۰	٪۱۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	+	-	-	-	-
باسیلوس سرئوس	+	+	+	+	-	-	-
اشرشیا کلی	+	+	+	+	+	-	-
آسپرژیلوس نایجر	+	+	+	+	-	-	-
کاندیدا آلبیکنس	+	+	+	+	+	-	-

بحث

در این تحقیق نشان داده شد که عصاره‌ها و اسانس گیاه دارویی کاه‌مکی، با دارابودن ترکیبات فنولی، فلاونوییدی و ترپنوییدی، دارای اثر مهارکنندگی بالایی علیه رادیکال‌های آزاد و پاتوژن‌های بیماری‌زا (باکتری‌ها و قارچ‌ها)ست.

چندین روش برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. به‌کارگیری حداقل دو روش برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی صحت نتایج را تأیید می‌کند. در تحقیق حاضر، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن (FRAP) سنجش شد. در ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌روش DPPH، اندازه‌گیری بر اساس کاهش در جذب رادیکال‌های پایدار DPPH همراه با تغییر رنگ نمونه از ارغوانی به زرد صورت می‌گیرد [۲۳]. در این روش، رادیکال‌های ارغوانی و پایدار DPPH با حداکثر جذب نوری در طول موج ۵۱۷ نانومتر، پس از پذیرفتن عامل احیاکنندگی (الکترون یا هیدروژن)، به مولکول زرد رنگ $DPPH_2$ تبدیل می‌شود [۲۴].

در ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی به‌روش FRAP، به توانایی مواد در احیای یون Fe^{+3} به Fe^{+2} توجه شده است که از نظر اسپکتروفوتومتری با تعیین کمپلکس رنگی‌شدهٔ آن با کمپلکس آهن‌داری به‌نام 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) اندازه‌گیری می‌شود، که همراه با تغییر رنگ به سمت آبی است. این روش یکی از ارزان‌ترین و ساده‌ترین روش‌های ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌هاست.

نتایج آزمون FRAP، به‌شدت به زمان آنالیز بستگی دارد [۲۵]. بنابراین، بعضی محققان این امر را صحیح نمی‌دانند که واکنش FRAP سریعاً انجام می‌شود و حداکثر زمان ۶-۴ دقیقه لازم دارد، زیرا برخی پلی‌فنول‌های گیاهی با سرعت کمتری وارد واکنش می‌شود و به زمان بالاتری مانند زمان ۳۰ دقیقه نیاز دارد [۲۶]. متابولیت‌های ثانویهٔ مشتق از گیاهان مانند فنل‌ها و فلاونوییدها، با پتانسیل لازم برای پاکسازی رادیکال‌های آزاد یا به‌عبارتی قدرت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها، رابطهٔ مستقیمی دارد [۲۷]. به‌طور کلی، روش و حلال مناسب، در استخراج ترکیبات ثانویه نقش بسزایی دارد [۲۸].

مطالعات نشان می‌دهد که حلال‌های متانول و اتانول با نفوذ بر داخل سلول‌های گیاهان، ترکیبات طبیعی ثانویه شامل فنول‌ها و فلاونوییدهای بیشتری استخراج می‌کند و این میزان برای حلال‌هایی نظیر آب، اتیل استات و کلروفرم کمتر است [۲۹]. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که در این الگوی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان فنل و فلاونوییدکل از بیشترین به کمترین به‌صورت عصارهٔ متانولی> عصارهٔ اتانولی >عصارهٔ آبی بوده است که کاملا با سایر مطالعات مطابقت دارد [۳۰]. عصارهٔ متانولی با دارابودن مقادیر فنول و فلاونوییدکل بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی در هر دو روش DPPH و FRAP را داراست، در صورتی که عصارهٔ آبی دارای حداقل مقادیر فنول و فلاونوییدکل و خاصیت آنتی‌اکسیدانی است.

از آنجا که حلال اتانول از نظر قطبیت و حلالیت ترکیبات مؤثره نسبت به حلال متانول کمتر و نسبت به آب بیشتر است، در نتیجه مقادیر فنول و فلاونوییدکل و قدرت آنتی‌اکسیدانی در هر دو روش DPPH و FRAP در آن بین عصاره‌های متانولی و آبی بوده است. مطالعات نشان می‌دهد که گیاه کاه‌مکی دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی در روش‌های DPPH (۰/۱۲۵ mg/ml) و FRAP (۱۲/۵ mg/ml) بوده و توانسته است در ساعات نخست، اثر مثبتی روی بتا-کاروتن داشته باشد [۳۱]. در مقابل، اسانس گیاه کاه‌مکی اثر آنتی‌اکسیدانی قوی ندارد.

در مطالعه‌ای دیگر، اسانس گیاه اثر مهارکنندگی نسبتاً قوی در مقابل رادیکال‌های پایدار DPPH نداشته (۳۵ mg/ml)

و اثر آن از BHT کمتر بوده است [۳۲]. جدول ۱ نشان می‌دهد که اسانس گیاه کاه‌مکی شامل ۶ هیدروکربن منوترپنی (۶/۵۳۹)، ۹ منوترپن اکسیژن‌دار (۸۷/۰۲۲)، و ۸ هیدروکربن سزکوئی‌ترپنی (۲/۴۷) است. بدین ترتیب، بیشترین درصد اسانس متعلق به منوترپن‌های اکسیژن‌دار است. اگرچه روغن‌های اسانسی، بخش کوچکی از ترکیب گیاهان را تشکیل می‌دهد، به میزان قابل‌توجهی در صنعت داروسازی، غذایی و آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود [۳۳]. همان‌گونه که نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد، ترکیبات پیپریتون با ۸۲/۹۵ درصد، کارن با ۲/۴۹۳ درصد، لیمونن با ۱/۰۸۶ درصد ترکیبات عمده در اسانس گیاه کاه‌مکی است. مطالعات نشان می‌دهد که اسانس این گیاه، علاوه‌بر دارا بودن ترکیبات ذکرشده، دارای ترکیب آلفا-ادسمول با ۱۳/۳۳ درصد نیز بوده است که خاصیت ضدمالاریایی و فعالیت بالایی علیه لاروای آنوفل از خود بروز داده است [۱۱].

مطالعات نشان می‌دهد که مکان جغرافیایی رشد گیاه کاه‌مکی بر نوع و درصد ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در آن تأثیر چشمگیری دارد. مطالعه‌ای روی گیاه کاه‌مکی رشدیافته در کرمان نشان داد که بتا-کاریوفیلن با ۱۴/۴ درصد در کنار پیپریتون با ۶۱ درصد از عمده ترکیبات موجود در اسانس آن بوده است [۳۴]، در صورتی که در گزارشی دیگر روی گونهٔ *C. olivieri* رشدیافته در کاشان مشاهده شد که در کنار سایر ترکیبات نامبرده، ترکیب بتا-هیماکالن با ۷/۶ درصد نیز عمده‌ترین ترکیبات بوده است [۳۲].

گزارش‌ها حکایت از آن دارد که ترکیبات ترپنی و فنولی موجود در اسانس و عصارهٔ گیاهان، با گروه‌های آمین و هیدروکسیل‌آمین غشای میکروارگانیسم‌ها (باکتری و قارچ) پیوند دارد و با تخریب ساختار دیواره و رهاسازی لیپیدها به داخل سیتوپلاسم، سبب نفوذپذیری بیشتر سلول باکتری و قارچ و در نتیجه مرگ آن می‌شود [۳۵].

بررسی آثار ضدمیکروبی اسانس و عصاره‌های گونهٔ *C. olivieri* علیه باکتری‌ها و قارچ‌های مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از دو روش انتشار از چاهک و حداقل غلظت مهار رشد میکروب (MIC)، نشان داد که در تمام موارد، این اثر وابسته به غلظت است و با افزایش آن، این اثر بیشتر شده است. همچنین، این نتیجه به‌دست آمد که از بین سه عصارهٔ متانولی، اتانولی و آبی، عصارهٔ متانولی اثر مهارکنندگی بیشتری بر باکتری‌ها و قارچ‌های مورد استفاده نسبت به دو عصاره دیگر داشته است و این اثر برای عصارهٔ آبی به‌مراتب کمتر است.

ارزیابی اثر ضدباکتریایی عصارهٔ متانولی با روش انتشار از چاهک نشان می‌دهد که این عصاره بر تمامی باکتری‌های مورد استفاده اثر مهارکنندگی دارد، اما بیشترین اثر مهارکنندگی روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هالهٔ عدم رشد ۲۶±۰/۴۱ میلی‌متر بوده است، به‌گونه‌ای که تقریباً با اثر مهارکنندگی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و جنتامایسین به‌عنوان استاندارد برابر بوده است. همچنین، نتایج نشان داد که این عصاره توانسته است هر دو قارچ مورد استفاده را مهار کند، اما اثر آن با اختلاف اندک، روی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* با قطر ۲۵±۰/۲۵ میلی‌متر بیشتر بوده است، در حالی که اثر ضدقارچی کلوتریمازول به‌عنوان استاندارد ۳۳±۱/۹۷ میلی‌متر بوده است.

در بررسی اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی عصارهٔ متانولی به‌روش MIC، نتایج نشان داد که در دو باکتری *باسیلوس سرئوس* و *اشرشیاکلی*، و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* حداقل غلظت مهار کنندگی ۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. عصارهٔ اتانولی نیز اثر مطلوبی بر مهار باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا نشان داد، به‌گونه‌ای که این اثر مشابه عصارهٔ متانولی بوده است؛ یعنی روی باکتری *باسیلوس سرئوس* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* بیشترین اثر مهارکنندگی با قطر هالهٔ عدم‌رشد به‌ترتیب ۲۰±۱/۰۶ و ۲۲±۰/۸۰ میلی‌متر را داشته است. اما، برخلاف عصارهٔ متانولی، حداقل غلظت مهار رشد (MIC) باکتری *باسیلوس سرئوس* در آن ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است، ولی برای قارچ *کاندیدا آلبیکنس* همانند عصارهٔ متانولی، یعنی ۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بوده است.

نتایج حاصل از اثر ضدمیکروبی عصارهٔ آبی کاملاً با دو عصاره متانولی و اتانولی متفاوت بوده است، به‌طوری که عصارهٔ آبی حداقل فعالیت ضدمیکروبی را نشان داده است. این عصاره توانسته است بیشترین اثر را بر باکتری *باسیلوس سرئوس* با قطر هالهٔ عدم‌رشد ۱۴±۰/۹۴ میلی‌متر و قارچ *آسپرژیلوس نایجر* با قطر هالهٔ عدم‌رشد ۱۹±۱/۹۴ میلی‌متر داشته باشد. نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکننده (MIC) در عصارهٔ آبی نشان داد که در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توانسته است به‌ترتیب باکتری *باسیلوس سرئوس* و قارچ *آسپرژیلوس نایجر* را مهار کند. اسانس حاصل از گیاه کاه‌مکی نیز اثر میکروب‌کشی مطلوبی بر باکتری‌ها و قارچ‌های منتخب نشان داده است. این اثر کاملاً وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت، اثر آن بیشتر شده است، به‌گونه‌ای که بیشترین اثر مهارکنندگی را بر باکتری *استافیلوکوکوس سرئوس* با قطر هالهٔ عدم‌رشد ۲۳±۱/۴۴

میلی‌متر و قارچ *آسپرژیلوس نایجر* با قطر هالهٔ عدم‌رشد ۱۸±۱/۳۵ میلی‌متر داشته است. اما، این اثر با اختلافی جزئی، کمتر از عصارهٔ متانولی بوده است. اسانس گیاه مذکور توانسته است با حداقل غلظت ۱۲/۵ درصد و ۲۵ درصد، باکتری *استافیلوکوکوس سرئوس* و قارچ *آسپرژیلوس نایجر* را مهار کند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که ترکیبات فنولی و ترپنی موجود در عصاره و اسانس گیاه کاه‌مکی، مسئول بروز فعالیت بالای ضدمیکروبی آن شده است. گزارش‌ها حاکی از آن است که این گیاه علاوه‌بر داشتن اثر ضدقارچی [۳۶]،اثر ضدعفونی‌کنندگی و ضد میکروبی قوی نیز دارد [۱۱].

در مطالعهٔ اثر ضدمیکروبی گیاه *C. olivieri* روی ۴ باکتری گرم مثبت و ۳ باکتری گرم منفی و ۳ قارچ، بیشترین حساسیت را باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* از خود نشان داد، به‌گونه‌ای که باکتری‌های گرم منفی مقاوم‌تر بودند. در مقابل، باکتری *کلبسیلا پنومونیه* دارای کمترین حساسیت بود [۳۶]. در مطالعه‌ای مشابه، نتایج نشان داد که این گیاه اثر مهارکنندگی خوبی در مقابل باکتری *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* با قطر هالهٔ عدم‌رشد ۱۸ میلی‌متر داشته است و حساسیت باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* نسبت به سایر باکتری‌ها (قطر هالهٔ عدم‌رشد ۱۱ میلی‌متر) کمتر بوده است [۱۳].

از دیرباز استفاده از گیاهان دارویی برای درمان انواع بیماری‌ها در نقاط مختلف رایج بوده است تا اندازه‌ای که اساس طب سنتی را تشکیل می‌داده است. با توسعهٔ سریع داروهای سنتزی در سال‌های اخیر، استفاده از گیاهان کمتر شده است، ولی به‌دلیل ظهور عوارض جانبی نامطلوب ترکیبات سنتزی و نبود سازگاری آن‌ها با طبیعت، بار دیگر محققان به گیاهان و مواد مؤثرهٔ موجود در آن‌ها توجه کردند تا حدی که دانش شیمی گیاهی ایجاد شد. استان سیستان و بلوچستان ذخیره‌گاه ژنتیکی و گنجینهٔ گران‌بهایی از گونه‌های متنوع گیاهان دارویی و بعضاً با خواص منحصربه‌فرد شناخته شده است. در طب سنتی این استان، از گیاه دارویی کاه‌مکی در درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود. نتایج حاصل از این مطالعه به قدرت بالای این گیاه در مهار رادیکال‌های آزاد و میکروب‌های بیماری‌زا اذهان دارد. عصاره و اسانس این گیاه سرشار از ترکیبات فنولی، فلاونوییدی و ترپنوییدهاست که به بروز خاصیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن انجامیده است. در نتیجه این گیاه کاندیدای خوبی در درمان بیماری‌های ناشی از استرس‌های اکسایشی و بیماری‌های ناشی از میکروب‌های بیماری‌زاست. همچنین، با توجه به قدرت بالای این گیاه در ازبین‌بردن عوامل بیماری‌زا، جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌هاست.

تشکر و قدردانی

پژوهشگران بر خود لازم می‌دانند، مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به همکاران محترم آزمایشگاه تحصیلات تکمیلی فیتوشیمی و مرکز پژوهشی گیاهان دارویی و زینتی دانشگاه سیستان و بلوچستان به‌دلیل همکاری صمیمانه در اجرا و اتمام این پژوهش اعلام دارند.

References

[1]. Akhgar MR, Pourmirzaie A, Moradalizadeh M, Salarkarimi T. Chemical composition of the essential oil from aerial parts of Neogaillonia eriantha (Jaub. & Spach) Lincz. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 2013; 29(3): 561-567. [in Persian]
[2]. Lahluo M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phytotherapy Research. 2004; 18: 435-8.
[3]. Panacek A, Kvitek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, Sharma VK, Nevecna T, Zboril R. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. The Journal of Physical Chemistry B. 2006; 110(33): 16248-53.
[4]. Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Hafezi S. Antioxidant activities of Iranian corn silk. Turkish Journal of Biology. 2008; 32: 43-49.
[5]. Mohammadi M, Kazemitabar K, Asili J, Kamali H. Study of the antioxidant and antibacterial activity in methanolic, dichloromethan and hexane extracts of aerial parts of Cyperus longos. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. 2014; 6(1): 161-167. [in Persian]
[6]. Salmanian Sh, Sadeghi Mahoonak AR, Alami M, Ghorbani M. Determination of antiradical and antioxidant activities and flavonoid content in hawthorn fruit (Crataegus elbursensis). Iranian Journal of Nutrrition Sciences and Food Technology. 2013; 8(1): 177-185. [in Persian]
[7]. Jamshidi M, Ahmadi HR, Rezazadeh S, Fathi F, Mazanderani M. Study on phenolic and antioxidant activity of some selected plant of Mazandaran province. Journal of Medicinal Plants. 2010; 9(34): 177-183. [in Persian]
[8]. Shariatifar N, Kamkar A, Shams Ardakani MR, Misaghi A, Jamshidi AH, Jaed Khaniki GR. Quantitative and qualitative study of phenolic compounds and antioxidant activity of plant Pulicaria Gnaphalodes. Ofogh-e- Danesh Journal. 2012; 18(1); 35-41. [in Persian]
[9]. Rao BRR, Rajput DK, Patel RP. Essential oil profiles of different parts of Palmarosa (Cymbopogon martini) (Roxb.) Wats var. motia Burk. Journal of Essential Oil Research. 2009; 21(6): 519-521.
[10]. Norouzi-Arasi H, Yavari I, Ghaffarzadeh F, Mortazavi MS. Volatile constituents of Cymbopogon olivieri (Boiss.) Bor. from Iran. Flavour and Fragrance Journal. 2002; 17: 272-4.
[11]. Hajiakhoondi A, Vatandoost H, Jamshidi AH, Amiri EB. Chemical constituents and efficacy of Cymbopogon olivieri (Boiss) Bar essential oil against Malaria vector, Anopheles stepensi. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. 2003; 11(3): 125-128.

[12]. Rajendrudu G, Rama Das VS. Interspecific differences in the constituents of essential oils of Cymbopogon. Proc. Indian Acady of Sciences Plant Science. 2010; 92(4): 331-334.
[13]. Sonboli A, Mirjalili MH, Yousefzadi M. Antimicrobial Activity and Composition of theEssential Oil of Cymbopogon Olivieri (Boiss.) Bor from Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2006; 1: 65-68.
[14]. Farzaneh A, Ghani A, Azizi M. The effect of water stress on morphological characteristics and essential oil content of improved sweet basil (Osimum basilicum L.). Journal of Plant Production. 2010; 17(1): 103-111. [in Persian]
[15]. Maghsoodlou MT, Valizadeh J, Ebrahimian Chevoshlou S, Mohammadi Bolban Abad M, Rahneshan N. Investigation of effective components and antioxidant activity of *Alyssum maritimum* and *Achillea wilhelmsii* in Sistan and Baluchestan province. Eco-Phytochemical Journal of Medicinal Plants. 2015; 2(3): 1-9. [in Persian]
[16]. Trusheva B, Trunkova D, Bankova V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. Chemistry Central Journal. 2007; 1(13): 1-4.
[17]. Sadeghi Z, Valizadeh J, Aziziam Shermeh O. Study of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of Baneh (Pistacia atlantica) Gum, from Saravan region, Sistan and Baluchestan province. Eco-Phytochemical Journal of Medicinal Plants. 2015; 3(2): 18-27. [in Persian]
[18]. Sadeghi Z, Valizadeh J, Azizian Shermeh O. Antioxidant activity and total phenolic content of some date varieties from Saravan Region, Baluchistan, Iran. Journal of a Medicinal Plants Research. 2015; 9(4): 78-83.
[19]. Sadeghi Z, Valizadeh J, Azizian Shermeh O, Akaberi M. Antioxidant activity and total phenolic content of Boerhavia elegans (choisy) grown in Baluchistan, Iran. Avicenna Journal of Phytomedicine. 2015; 5(1): 1-9.
[20]. Einali A, Azizian Shermeh O, Ghasemi A. Phytochemical screening and antimicrobial activities of *Periploca aphylla* Decne, Persian walnut (*Juglans regia* L.) and oleander (*Nerium indicum* Mill.) Leaf extracts. Journal of Food Measurement and Characterization. 2018; 12(2): 1350-1359.
[21]. Azizian Shermeh O, Valizadeh J, Noroozifar M, Ghasemi A, Valizadeh M. Optimization, characterization and anti microbial activity of gold nano particles biosynthesized using aqueous extract of *Sambucus ebulus* L. Eco-Phytochemical Journal of Medicinal Plants. 2016; 4(1): 1-18. [in Persian]
[22]. Azizian Shermeh O, Valizadeh J, Noroozifar M, Qasemi A. Investigation the antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesis by aqueous extract of *Sambucus ebulus* L. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2016; 25(4): 92-108. [in Persian]
[23]. Prevec T, Segatin N, Poklarulrih N, Cigic B. DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. Talanta. 2013; 109: 13-19.
[24]. Hseu YC, Chang WH, Chen CS, Liao JW, Huang CJ., Lu FL, Chia YC, Hsu HK, Wu JJ, Yang HL. Antioxidant activities of Toona Sinensis leaves extracts using different antioxidant models. Food and Chemical Toxicology. 2008; 46(1): 105-114.
[25]. Wootton-Beard P, Moran A, Ryan L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. Food Research International. 2011; 44: 217-224.
[26]. Alarcon CL, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. Analytica Chimica Acta. 2013; 763: 1-10.
[27]. Qingming Y, Xianhui P, Weibao K, Hong Y, Yidan S, Zhang L, Yanan Z, Yuling Y, Lan D, Guoan L. Antioxidant activities of malt extract from barley (*Hordeumvulgare* L.) toward various oxidative stress invitroand invivo. Food Chemistry. 2010; 118(1): 84-89.
[28]. Moure A, Cruz JM, Franco D, Dominguez JM, Sineiro J, Dominguez H, Nunez MJ, Parajo JC. Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry. 2001; 72(2): 145-171.
[29]. Khorasani Esmaeili A, Taha RM, Mohajer S, Banisalam, B. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of various solvent extracts from *in vivo* and *in vitro* grown *Trifolium pratense* L. (Red Clover). BioMed Research International. 2015: 1-11.
[30]. Sahreen S, Khan M R, Khan RA. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of Carissa opaca fruits. Food Chemistry. 2010; 122(4): 1205-1211.
[31]. Lawrence K, Lawrence R, Parihar D, Srivastava R, Charan R. Anioxidant activity of palmarosa essential oil (Cymbopogon martini) grown in north indian plains. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2012; 2(2): 765-768.
[32]. Mahboubi M, Kazempour N. Biochemical activities of Iranian cymbopogon olivieri (Boiss) Bor. Essential Oil. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012; 74(4): 356-60.
[33]. Alibakhshi M, Mahdavi S Kh, Mahmoudi J, Ghalijnia H. Phytochemical investigation of essential oil of Stachys inflate in different habitats of Mazandaran province. Eco-Phytochemical Journal of Medicinal Plants. 2014; 2(2): 58-68. [in Persian]
[34]. Juven BJ., Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. Journal of Applied Bacteriolog. 1994; 76: 626-631.
[35]. Hadjiakhoondi A, Aghel N, Etemadi R. Chemical and biological study of essential oil of Ferulago macrocarpa (Fenzi) Boiss. Hamdard Medicus. 2002; 45(2): 35-38.
[36]. Chalabian F, Norouzi Arasi H, Moosavi S. A study of growth inhibitory effect of essential oils of seven species from different families on some kinds of microbes. Journal of Medicinal Plants. 2003; 3(7): 37-42. [in Persian]

.

Investigation of antioxidant and antimicrobial activities and phytochemical compounds of essential oil and different extracts of *Cymbopogon olivieri* (Boiss.) Bor. from Sistan and Baluchestan province

Omid Azizian Shermeh[1 *], Mozhgan Taherizadeh [2], Moharam Valizadeh [3], Alireza Zaboli [4]

1. M.Sc. Graduated of Phytochemistry, Medicinal and Ornamental Plant Research Center, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
2. M.Sc. Graduated of Phytochemistry, Bacteriological Laboratory, Rural Water and Sewage Company of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
3. Assistant Professor, Department of Medicinal Plants, Faculty of Agriculture, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
4. M.Sc. Graduated of Analytical Chemistry, Central Laboratory, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

Abstract

In this study antimicrobial activities, antioxidant activities and phytochemical compounds in the essential oil and extracts of *Cumbopogon olivieri* were studied.

For investigation of phytochemical compounds such as total phenolic and total flavonoid contents in three extracts (Methanolic, ethanolic and aqueous) and essential oil by Folin-Ciocaltiu, Aluminum Chloride colorimetric and GC-MS methods and antioxidant activities of extracts by two methods (DPPH and FRAP) and antimicrobial activities of essential oil and extracts of *Cumbopogon olivieri* against three bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and two fungi such as *Candida albicans* and *Aspergillus niger* by two methods (well diffusion and Minimal Inhibitory Concentration (MIC)) respectively.

The results showed that the methanolic extract had maximum total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity and aqueous extract had minimum value of this compounds and activity. In investigation of essential oil, three compounds such as piperitone (82.95%), carene (2.493%) and limonene were the major constituents. The results of antimicrobial activity showed that the essential oil and extracts had good inhibition effect on all of bacteria and fungi and this inhibition depends to concentration.

Overall, based on the results obtained, the plant can be a good candidate for the treatment of diseases caused by oxidative stress, and diseases caused by pathogenic microbes. Also, due to power up the plant in the elimination of pathogens, could be a viable alternative to antibiotics.

Received: 2017-3-6
Accepted: 2017-8-12

Keywords: antimicrobial activity, antioxidant activity, essential oil, phytochemical compounds, *Cymbopogon olivieri* (Boiss.).