مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳
DOI: 10.22034/JPR.2022.2188

تاثیر شرایط مختلف استخراج با امواج فراصوت بر خواص ضدرادیکالی و ضدمیکروبی عصاره الکلی گیاه کبر (*Capparis spinosa* L.)

محمدانور کلکلی[۱]، حمید سرحدی[۱] و فاطمه شهدادی[۲*]

[۱] **ایران، بم، دانشگاه آزاداسلامی، واحد بم، گروه علوم و صنایع غذایی**

[۲] **ایران، جیرفت، دانشگاه جیرفت، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۲۴

چکیده

برای استخراج مواد موثره گیاهی، روش‌های مختلفی از جمله سوکسله و غرقابی و یا فناوری‌های جدیدی نظیر مایکروویو و یا امواج فراصوت مورد استفاده قرار می‌گیرند. هدف از این مطالعه، بررسی کارایی استفاده از امواج فراصوت در استخراج ترکیبات فنلی، ضد میکروبی و ضدرادیکالی برگ، ریشه و میوه گیاه کبر می‌باشد. بهینه‌سازی به روش سطح پاسخ با استفاده از فاکتور زمان در سه سطح (۱۰، ۲۵ و ۴۰ دقیقه) و شدت صوت نیز در سه سطح (۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد) با حلال الکلی (اتانول ۷۶ درصد) در نظر گرفته‌شد. از نتایج آزمون‌های انجام‌شده با روش آماری سطح پاسخ، شدت صوت به عنوان اثربخش‌ترین فاکتور استخراج بدست آمد. شرایط بهینه استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی با حمام فراصوت، زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد بود. در این شرایط میزان ترکیبات فنلی کل برای برگ، ریشه و میوه به‌ترتیب ۲۵/۴۷، ۱۷/۲۴ و ۲۳/۶۳ میلی‌گرم بر گرم، میزان بهینه IC_{50} به‌ترتیب ۹/۱۳، ۴۰/۲۰ و ۴۵/۳۰ میکروگرم بر میلی‌گرم، میزان بهینه MIC باکتری *Bacillus cereus* به ترتیب ۱/۰۷، ۲/۱۵ و ۸/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و میزان بهینه MBC باکتری *Bacillus cereus* عصاره‌های برگ و ریشه به‌ترتیب ۱/۴۱ و ۸/۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MBC باکتری *Bacillus cereus* عصاره میوه گیاه ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. بطور کلی مشخص شد که عصاره‌های الکلی استخراج شده با روش فراصوت دارای ترکیبات فنولی قابل توجهی بودند و با افزایش فاکتورهای زمان و شدت صوت، استخراج ترکیبات ضد میکروبی از برگ، ریشه و میوه گیاه افزایش یافت.

واژه های کلیدی: گیاه کبر، عصاره الکلی، خواص آنتی‌اکسیدانی، خواص ضد میکروبی، امواج فراصوت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۳۴۹۵۲۰۱ ، پست الکترونیکی: fatemeh.shahdadi@gmail.com

مقدمه

امواج صوتی، امواج فشاری هستند که در یک فرکانس خاص نوسان دارند نظیر امواجی که از طریق یک رسانه منتشر می‌شوند. فراصوت (اولتراسوند) به امواج صوتی اشاره دارد که در فرکانسی فراتر از حدود مجاز شنوایی انسان نوسان دارند. فرکانس فراصوتی که برای انجام فرآوری و واکنش‌های شیمیایی استفاده شده است معمولا محدوده‌ای بین ۱۶ و ۳۰۰۰ کیلوهرتز را پوشش می‌دهد (۲۳).

استخراج به کمک امواج فراصوت از جمله مهمترین روش‌های جداسازی ترکیبات ارزشمند از منابع گیاهی محسوب می‌شود که در مقیاس‌های بزرگ و کوچک قابل اجرا می‌باشد. سامانه‌های آشکارساز و حمام دو روش رایج استفاده از امواج فراصوت هستند. در حمام فراصوت به منظور پراکندگی مواد جامد در حلال، فراصوت اندازه ذرات را به طور چشمگیری کاهش می‌دهد و باعث افزایش قابلیت انحلال پذیری آنها می‌شود. حمام فراصوت

DOI: 10.22034/JPR.2022.2188 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳

می‌تواند برای طیف گسترده‌ای از نمونه‌ها استفاده شود و قابلیت تکرارپذیری بالایی دارد (۱). روش حمام فراصوت به منظور استخراج از نمونه‌های خشک شده و پودر شده در مقیاس بزرگ و صنعتی روشی کارآمد می‌باشد (۳۵).

گیاه کبر با نام علمی *Capparis spinosa* L. از راسته میخک‌سانان و از خانواده کور یا علف مار است. کاپاریس شامل ۲۵۰ گونه است که اغلب آنها وحشی هستند و در زمین‌های خشک و نیمه‌خشک نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری پراکنده شده‌اند (۲۰). کبر یک گیاه بوته‌ای چندساله مقاوم به خشکی معمولا با سازگاری قابل توجه به محیط‌های سخت می‌باشد (۱۷). کبر دارای خواص ضددیابت و کاهنده لیپیدهای خون می‌باشد (۲۶). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که استفاده از قسمت‌های مختلف گیاه از جمله ریشه، میوه، برگ و بذر به طور معنی‌داری باعث کاهش سطح گلوکز خون، کاهش سطح تری گلیسرید و کلسترول سرم، افزایش سطح HDL و کاهش سطح LDL سرم شده‌است (۱۸ ، ۳۶).

در مطالعات متعدد ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی زیادی برای این گیاه گزارش شده است. نجفی و اسماعیل‌زاده (۱۳۹۵) استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاه کبر از استان سیستان و بلوچستان را با استفاده از حلال‌های مختلف و مایکروویو بهینه‌سازی کردند. شرایط استخراج شامل حلال، زمان، دما و توان دستگاه بود. نتایج نشان داد عصاره اتانولی با شرایط توان ۳۰۰ وات، زمان ۱۵ دقیقه و درجه حرارت ۸۵ درجه سانتی‌گراد یک تیمار بهینه برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره بود (۱۱). صفری و همکاران (۱۳۹۹) مطالعه‌ای با هدف بررسی تنوع فیتوشیمیایی و آنتی اکسیدانی میوه برخی گونه‌های کبر در استان آذربایجان غربی انجام دادند. عصاره‌گیری ازمیوه‌ها با استفاده از حلال متانول و روش فراصوت انجام گرفت. نتایج ارزیابی فیتوشیمیایی نشان داد که میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH بین ۴۱/۶۳ تا ۶۶/۲۰ درصد بود. مقدار فنول کل به ترتیب بین ۴/۹۶ تا ۱۲/۵۲ میلی گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن تر میوه بود (۶). جلالی نیا و همکاران (۱۴۰۰) میزان فنل کل،فلاونوئیدها و فعالیت آنتی اکسیدانی گل، میوه و برگ سه جمعیت ازگیاه کبر درتهران ، زابل و گرگان را که شرایط اقلیمی کاملا متفاوتی دارند بررسی نمودند. نتایج این بررسی نشان دادکه میزان فنل هاو فلاونوئیدها و فعالیت آنتی اکسیدانی در گل ها بیشتر از برگ و در برگ ها بیشتر از میوه است. همچنین به نظر میرسد میزان ترکیبات شیمیایی وفعالیت آنتی اکسیدانی جمعیت های مختلف گیاه کبر با دو عامل اقلیمی دما و رطوبت همبستگی دارد (۲). نوشاد و همکاران (۱۴۰۱) در پژوهشی، ترکیبات فنولی، فعالیت آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره اتانولی میوه گیاه کبر را بررسی نمودند و گزارش کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی میوه گیاه کبر بر پایه مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS به ترتیب ۵۲/۷۳ و ۵۸/۶۲ درصد بود. در بررسی اثرات اثر مشخص شد که باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بالاتری نسبت به انواع گرم منفی در برابر عصاره نشان دادند (۱۲).

یکی از اثرات مهم عصاره‌های گیاهی که امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته‌است، اثرات ضدمیکروبی آنها می‌باشند. در پژوهش حاضر تاثیر ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف گیاه کبر نیز مورد بررسی قرار گرفت. دوباکتری مهم پاتوژن که باعث ایجاد بیماری می‌شوند *Bacillus cereus* و *Pseudomonas aeruginosa* می‌باشند. *Bacillus cereus* یکی از انواع باکتری‌های میله‌ای شکل، گرم مثبت و هاگ‌دار است. هاگ این باکتری به صورت گسترده‌ای در طبیعت، آب و خاک پراکنده شده به طوری که می‌توان آن را از مواد غذایی گوناگون جدا نمود. این باکتری از مهم ترین باکتری‌های عامل مسمومیت غذایی در انسان می‌باشد (۲۸).*Pseudomonas aeruginosa* یک باکتریِ میله‌ای گرم منفی است که در خاک، آب و دیگر محیط‌های نمناک یافت می‌شود. این باکتری بیشتر از راه میوه‌ها، گیاهان و

DOI: 10.22034/JPR.2022.2188
مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳

سبزی‌ها، عیادت کنندگان و بیمارانی که از دیگر بخش‌ها منتقل می‌شوند وارد محیط بیمارستان می‌شود. گسترش وانتشار از بیماری به بیمار دیگر بوسیله دست‌های پرسنل بیمارستان، همچنین تماس مستقیم بیمار با منابع آلوده مانند خوردن آب و خوراک آلوده رخ می‌دهد (۳۳).

با بررسی مطالعات انجام گرفته بر روی این گیاه و با توجه به اینکه واریته‌های گیاه کبر در کشور ما و شرایط آب و هوایی سخت رشد می‌کنند و دارای خواص غذایی و دارویی فراوانی می‌باشند و نظر به اینکه تاکنون پژوهشی در مورد این گیاه در استان کرمان انجام نشده‌است، هدف این پژوهش بررسی میزان ترکیبات فنولی، فعالیت آنتی-اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره الکلی (اتانولی) برگ، میوه و ریشه گیاه کبر استخراج شده به روش فراصوت تحت تاثیر شدت‌های صوت و زمان‌های متفاوت بود.

مواد و روشها

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل اتانول ۷۶ درجه، معرف فولین سیوکالتو، اسید گالیک، اسید سولفوریک و دی متیل سولفوکسید (مرک آلمان)، معرف ۲و۲ دی فنیل پیکریل هیدرازیل (سیگما آمریکا)، محیط های کشت نوترینت آگار، محیط کشت مولر هینتون آگار، محیط کشت مولر هینتون براث (مرک آلمان) بودند.

شناسایی و آماده‌سازی گیاه: گیاه کبر در اسفندماه سال ۱۳۹۷ از مزرعه تحقیقات گیاهان دارویی شهرستان عنبرآباد در استان کرمان جمع‌آوری و با همکاری هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جیرفت مورد شناسایی قرار گرفت. ریشه، برگ و میوه گیاه به ترتیب در ماه‌های اسفند، اردیبهشت و مرداد ماه جمع-آوری و در دمای اتاق و دور از نور خورشید به طور کامل خشک گردید و به منظور آماده‌سازی بخش‌های مختلف گیاه جهت استخراج عصاره توسط آسیاب آزمایشگاهی پودر و از الکی با مش ۴۰ عبور داده‌شد.

تصویر ۱- گیاه کبر

فرایند استخراج با حمام فراصوت: جهت تهیه عصاره از ریشه، برگ و میوه گیاه از روش استخراج با حمام فراصوت استفاده گردید. حلال مورد استفاده جهت عصاره‌گیری اتانول ۷۶ درصد بود. برای استخراج عصاره الکلی به روش فراصوت، ۵۰ گرم از نمونه‌های پودر شده گیاهی با ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال اتانول به نسبت ۱:۴ حجمی/وزنی مخلوط گردید و ظروف حاوی حلال و نمونه‌ها در حمام فراصوت با فرکانس ۳۵ کیلوهرتز قرار داده شد. سطوح تیماری روش فراصوت شامل سه سطح زمان (۱۰، ۲۵ و ۴۰ دقیقه) و سه سطح شدت صوت (۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد) در نظر گرفته شد. پس از اتمام تیمار فراصوت، عصاره استخراج شده با ۷۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ و سپس قسمت شفاف بالای مخلوط جدا و از صافی ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. جداسازی حلال و تغلیظ عصاره توسط تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه انجام شد. به منظور حذف باقیمانده حلال، عصاره تغلیظ شده بر روی پلیت پخش و درون آون خلاء با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا عصاره به طور کامل خشک گردد (۸).

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی: جهت انجام آزمون، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره به لوله آزمایش منتقل و ۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتیو و یک میلی‌لیتر آب مقطر

DOI: 10.22034/JPR.2022.2188 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳

به آن اضافه گردید. پس از گذشت ۱ دقیقه، ۱/۵ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد اضافه و توسط شیکر لوله به طور مناسب همگن شد. محتویات لوله آزمایش به مدت ۲ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد و سپس مقدار جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت گردید (۲۰).

مقدار کل ترکیبات فنولی از معادله خط رسم شده بر مبنای اسید گالیک و به صورت میلی گرم در گرم عصاره بیان شد (معادله ۱):

$R^2=0.996$ $Y=0.0039X+0.0315$ معادله (۱)

تعیین فعالیت آنتی‌رادیکالی: تعیین فعالیت آنتی‌رادیکالی از طریق آزمون DPPH و با استفاده از معرف ۲و۲-دی فنیل -۱- پیکریل هیدرازیل (2,2′-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)) انجام گردید. ابتدا رقت‌های ۱۰۰۰-۱۰۰ میکرولیتر بر لیتر از عصاره‌های بخش‌های مختلف گیاه تهیه شد. سپس به سه میلی‌لیتر از نمونه-ها،۱۰۰۰ میکرولیتر محلولDPPH (۱۰۰ میکرومولار در متانول)، اضافه گردید و به مدت ۳۰ ثانیه عمل همزدن انجام شد. محلول‌های بدست آمده در دمای اتاق در مکان تاریک به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری و جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (نمونه کنترل حاوی ۳ میلی‌لیتر متانول و ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول DPPH بود) (۳۲). فعالیت آنتی‌رادیکالی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (معادله ۲):

$$\% \text{ DPPH Scavenging} = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}}$$

معادله (۲)

نتایج به صورت IC_{50} گزارش شد. IC_{50}، غلظتی از عصاره است که میزان رادیکال‌های آزاد DPPH را به نصف کاهش دهد. این شاخص با استفاده از معادله خط به دست آمده از نمودار استاندارد غلظت عصاره بر حسب درصد به دام اندازی رادیکال آزاد به دست آمد (معادله ۳).

$y = 1.3534 x + 0.58$ معادله (۳)

که در این معادله y درصد حذف رادیکال آزاد و x غلظت بر حسب میکروگرم بر میلی‌گرم می‌باشد.

آزمون‌های بررسی فعالیت ضد میکروبی

۱-تهیه غلظت مادر از عصاره الکلی: غلظت مادر ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر از پودر عصاره خشک شده الکلی با استفاده از دی‌متیل‌سولفوکساید ۵٪ آماده گردید و با عبور از فیلتر میکروبی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون استریل شد (۱۰).

۲-تهیه سوسپانسیون باکتریایی نیم مک فارلند: محیط نیم مک فارلند محیطی در تست آنتی بیوگرام است که میزان کدر بودن نمونه با آن مقایسه می‌شود. این محیط حاوی $۱۰^۸$ × ۱/۵ باکتری است. برای تهیه کدورت نیم مک فارلند ۰/۵ میلی لیتر کلرید باریم ۰/۴۸ مولار در ۹۹/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۳۶نرمال مخلوط گردید (۲۵).

آمپول های لیوفیلیزه *Bacillus cereus* PTCC 1015 و *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1430 از مرکز منطقه-ای کلکسیون‌های قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران خریداری و مطابق دستورالعمل ارسالی به شرح ذیل عمل احیاء سویه ها انجام گردید:

آمپول لیوفیلیزه باکتری‌ها در شرایط استریل باز شد و حدود ۰/۵ میلی لیتر از محلول رینگر استریل به ماده خشک درون آن اضافه و با دقت جهت تهیه یک سوسپانسیون یکنواخت مخلوط گردید. کل سوسپانسیون تهیه شده باکتری های *Bacillus cereus* و *Pseudomonas*

DOI: 10.22034/JPR.2022.2188 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳

aeruginosa در سطح شیب‌دار محیط کشت لوله‌ای نوترینت آگار تلقیح و سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت رشد باکتریایی گرمخانه-گذاری گردید. به میزانی از باکتری‌های رشدیافته درون لوله‌ها به محلول رینگر استریل اضافه شد که کدروتی معادل محلول استاندارد نیم مک فارلند و با جذبی معادل ۰/۱۳-۰/۰۸ در طول موج ۶۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر حاصل شد (۲۱).

۳-تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (Minimum Inhibitory Concentration): جهت تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد به روش رقیق‌سازی میکرو (Microdilution) از غلظت مادر ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره های الکلی برگ، ریشه و میوه گیاه جهت تهیه غلظت‌های سریالی به ترتیب ذیل استفاده گردید. در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه، نخست درون چاهک های ۱۲ عددی هر ردیف، میزان ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث استریل با غلظت مضاعف اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت مادر ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های الکلی به چاهک اول منتقل و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ها تهیه گردید. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول به چاهک دوم منتقل و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ها تهیه شد. این ترتیب برای همه چاهک‌ها به جز چاهک شماره ۱۲ که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است، ادامه یافت. چاهک شماره ۱۱ به عنوان شاهد و کنترل منفی در نظر گرفته شد. در ادامه ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل کدورت استاندارد نیم مک فارلند حاوی (cfu/ml) $۱/۵\times۱۰^{۸}$ به هر یک از چاهک‌ها به جز چاهک شماره ۱۱ اضافه گردید. سپس میکروپلیت به مدت ۷ ثانیه در شیکر الایزا تکان داده شد و میزان کدورت اولیه چاهک ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر قرائت گردید. در ادامه میکروپلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد و پس از گذشت این زمان میزان جذب یا کدورت چاهک-ها مجددا توسط دستگاه الایزا قرائت و مقایسه گردید. کمترین غلظت عصاره که سبب ممانعت از رشد باکتری گردیده بود به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) در نظر گرفته شد (۲۹).

۴-تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی (Minimum Bactericidal Concentration): حداقل غلظت باکتری-کشی با توجه به مقادیر MIC برای هر عصاره تعیین گردید به طوری که میزان ۵ میکرولیتر از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آنها متوقف شده است به پلیت های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح و به طور یکنواخت پخش گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پایین‌ترین غلظت عصاره که در آن ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها رشد نکرده (فاقد رشد باکتری) بودند به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۷).

روش آماری: به منظور بررسی اثر متغیرهای ثابت مطالعه (زمان و شدت صوت) بر روی مقدار ترکیبات فنولی، قدرت گیرندگی رادیکال آزاد و همچنین بهینه‌سازی فرآیند استخراج و در نهایت خصوصیات ضد میکروبی عصاره از روش سطح پاسخ (RSM) استفاده شد و نرم افزار مورد استفاده Design Expert نسخه ۱۱ بود. مقایسات میانگین‌ها بوسیله آزمون دانکن و در سطح $\alpha=0.01$ به وسیله نرم افزار SAS 9.4 صورت گرفت.

نتایج

بررسی نتایج بدست آمده و مقایسه بین مدل‌های رگرسیونی حاکی از آن بود که در این مطالعه مدل Quadratic ، دارای اختلاف معنی‌دار با سایر مدل‌ها بوده و همچنین Lack of Fit برای آن معنی‌دار نشد. در نتیجه مدل Quadratic برای بررسی روند تغییرات پارامترهای اندازه گیری شده در این مطالعه انتخاب شد.

پس از انتخاب بهترین مدل در سطح آماری مورد نظر (۹۹٪ یا ۹۵٪)، جهت بررسی پارامترهای اثرگذار در مطالعه

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳ DOI: 10.22034/JPR.2022.2188

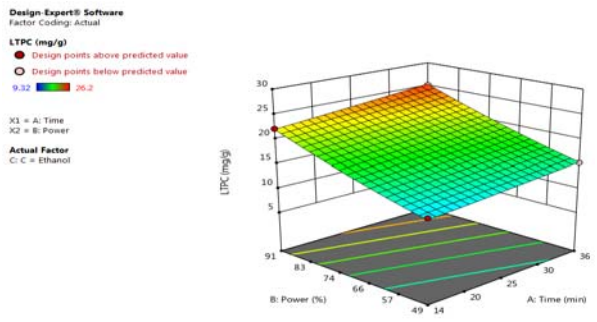
با توجه به جدول Anova، پارامتری که آزمون F برای آن معنی‌دار نباشد (P>0.01) از مدل حذف می‌شود و سایر پارامترها که دارای اختلاف معنی‌دار در سطح (۹۹٪) هستند در مدل نگهداشته می‌شوند. لازم به ذکر است در صورتی که پارامتر خطی یک متغیر در یک مدل، اثر معنی‌داری نداشته‌باشد ولی اثر متقابل آن با یکی از متغیرهای دیگر که آن متغیر دارای اثر معنی‌داری در مدل بوده، دارای اثر معنی‌دار باشد آن پارامتر در مدل نگه‌داشته می‌شود و سپس در معادله کلی با استفاده از ضرایب داده شده برای هر پارامتر حاصل می‌گردد. نهایتا در میان پارامترهای مختلف، پارامتری که بیشترین مجموع مربعات را داشته‌باشد به عنوان اثرگذارترین پارامتر و برعکس انتخاب می‌شود.

میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌های اتانولی برگ، ریشه و میوه گیاه: بر اساس طرح RSM، مدل Box-Behnken جهت کسب حداکثر اطلاعات با انجام کمترین میزان آزمایشات و بررسی ۲ متغیر (زمان و شدت صوت) در ۳ سطح، ۱۳ عصاره از هر قسمت برگ، ریشه و میوه گیاه کبر استخراج و میزان ترکیبات فنولی کل با استفاده از نمودار استاندارد رسم شده بر حسب میلی‌گرم بر گرم اسید گالیک محاسبه گردید (جدول ۱).

جدول ۱- تیمارهای طراحی شده در آزمون سطح پاسخ و مقادیر ترکیبات فنولی کل (TPC) عصاره‌های گیاه

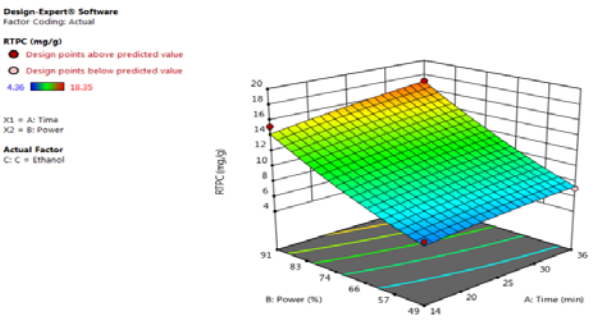
تیمار	شرایط استخراج عصاره	ترکیبات فنولی کل (میلی‌گرم/گرم معادل گالیک اسید)		
		برگ	ریشه	میوه
۱	شدت صوت ۴۹ درصد و زمان ۱۴ دقیقه	۱۳/۲۲±۱/۲^{e*}	۶/۵۸±۱/۱^{e}	۱۲/۸۲±۱/۵^{d}
۲	شدت صوت ۴۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱۲/۴۸±۱/۱^{e}	۶/۲۵±۱/۳^{e}	۱۲/۰۲±۱/۵^{d}
۳	شدت صوت ۴۹ درصد و زمان ۳۶ دقیقه	۱۵/۳۲±۱/۵^{d}	۷/۱۰±۱/۰^{e}	۱۵/۱۰±۱/۵^{c}
۴	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۱۰ دقیقه	۱۶/۴۵±۱/۱^{cd}	۸/۲۴±۱/۳^{de}	۱۶/۴۸±۱/۷^{c}
۵	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱۸/۲۸±۲/۱^{c}	۱۰/۴۶±۱/۵^{cd}	۱۹/۳۰±۱/۳^{b}
۶	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱۸/۲۲±۱/۵^{c}	۱۰/۵۲±۱/۲^{cd}	۱۹/۳۶±۱/۵^{b}
۷	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱۸/۲۵±۱/۵^{c}	۱۰/۴۰±۱/۱^{cd}	۱۹/۳۲±۱/۲^{b}
۸	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱۸/۲۷±۱/۴^{c}	۱۰/۴۴±۱/۵^{cd}	۱۹/۲۹±۱/۲^{b}
۹	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱۸/۲۰±۱/۵^{c}	۱۰/۴۸±۱/۴^{cd}	۱۹/۳۴±۱/۲^{b}
۱۰	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۴۰ دقیقه	۲۱/۱۸±۲/۰^{b}	۱۲/۳۴±۱/۴^{c}	۲۱/۱۴±۱/۵^{ab}
۱۱	شدت صوت ۹۱ درصد و زمان ۱۴ دقیقه	۲۲/۱۴±۱/۴^{b}	۱۵/۲۲±۱/۱^{ab}	۲۲/۱۶±۱/۱^{ab}
۱۲	شدت صوت ۱۰۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۲۶/۲۰±۱/۱^{a}	۱۸/۳۵±۱/۵^{a}	۲۴/۱۰±۱/۰^{a}
۱۳	شدت صوت ۹۱ درصد و زمان ۳۶ دقیقه	۲۵/±۱/۶^{a}	۱۷/۱۲±۱/۳^{a}	۲۳/۲۲±۱/۵^{a}

*در هر ستون اعداد با حروف غیرمشابه از لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار دارند ($p<0.05$).

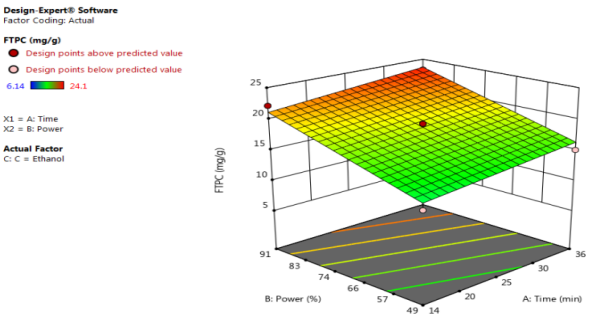


شکل ۱- نمایش نمودار سه بعدی، اثر همزمان دو متغیر زمان و شدت صوت بر میزان ترکیبات فنولی کل عصاره برگ گیاه

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳ DOI: 10.22034/JPR.2022.2188



شکل ۲- نمایش نمودار سه بعدی، اثر همزمان دو متغیر زمان و شدت صوت بر میزان ترکیبات فنولی کل عصاره ریشه گیاه



شکل ۳- نمایش نمودار سه بعدی، اثر همزمان دو متغیر زمان و شدت صوت بر میزان ترکیبات فنولی کل میوه گیاه

نتایج نشان می‌دهد بین عصاره‌های الکلی برگ و ریشه گیاه کبر، عصاره های الکلی ریشه با عصاره های الکلی برگ و میوه و همچنین عصاره‌های میوه و ریشه اختلاف معنی-داری در سطح ۹۹٪ ($P<0.01$) مشاهده گردید. در روش RSM مرحله‌ای به نام Verification وجود دارد، در این مرحله می‌توان میزان استخراج ترکیبات فنولی کل از برگ، ریشه و میوه گیاه با استفاده از حلال اتانول را در مرحله آزمایش با مقدار پیشگویی شده توسط مدل به طریق آماری مقایسه نمود. در این بررسی پس از انجام این مرحله، مقادیر مشاهده شده (Y_0) با مقادیر پیش‌بینی‌شده (Y) مقایسه گردیدند. نتایج، بیانگر همبستگی بسیار خوب بین نتایج بدست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش‌بینی‌شده با روش آماری هستند و ضریب تبیین بالای بین مقادیر واقعی و پیش‌بینی شده را نشان می‌دهند. با توجه به نمودارهای Surface (شکل‌های ۱، ۲ و ۳) با افزایش زمان و شدت صوت، میزان استخراج ترکیبات فنولی از برگ، ریشه و میوه گیاه با استفاده از حلال اتانول افزایش می‌یابد. با توجه به پارامترهای معنی‌دار در فرآیند استخراج ترکیبات فنولی کل از برگ، ریشه و میوه گیاه، معادلات کلی را می‌توان بصورت زیر گزارش کرد:

معادله ۱: معادله کلی میزان استخراج ترکیبات فنولی کل از برگ گیاه

$$Y=16.753 + 1.4862\ A + 4.677\ B + 1.63269\ C + 0.504125\ B^2$$

معادله ۲: معادله کلی میزان استخراج ترکیبات فنولی کل از ریشه گیاه

$$Y=9.895 + 1.12114\ A + 4.27744\ B + 0.888462\ C + 0.590312\ B^2$$

معادله ۳: معادله کلی میزان استخراج ترکیبات فنولی کل از میوه گیاه

$$Y=14.5031 + 1.24586\ A + 3.62534\ B + 4.23923\ C$$

که Y: میزان ترکیبات فنولی کل استخراجی بر حسب میلی-گرم بر گرم، A: زمان بر حسب دقیقه، B: شدت صوت بر حسب درصد و C: اثر حلال می باشد.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳ DOI: 10.22034/JPR.2022.2188

با توجه به معادله‌های ۱، ۲ و۳ و مقادیر مجموع مربعات برای هر پارامتر موثر در استخراج، شدت صوت (B) بعنوان موثرترین فاکتور استخراج ترکیبات فنولی کل از برگ، ریشه و میوه گیاه کبر انتخاب گردید.

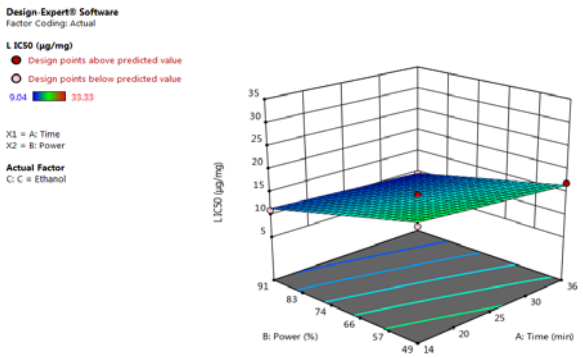
شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنولی کل از برگ گیاه با حلال اتانول به روش فراصوت در زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد حمام فراصوت به میزان ۲۵/۴۷ میلی‌گرم بر گرم، شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنولی کل از ریشه گیاه با حلال اتانول به روش فراصوت در زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد حمام فراصوت به میزان ۱۷/۲۴ میلی‌گرم بر گرم و شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنولی کل از میوه گیاه با حلال اتانول به روش فراصوت در زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد حمام فراصوت به میزان ۲۳/۶۳ میلی‌گرم بر گرم مشاهده گردید. نتایج بهینه سازی حاکی از آن است که در شرایط استخراج (دما، شدت صوت و حلال) یکسان، میزان ترکیبات فنولی کل استخراجی از برگ گیاه کبر با میزان ۲۵/۴۷ میلی‌گرم بر گرم بیشتر از قسمت های ریشه و میوه گیاه است.

میزان IC_{50} عصاره‌های برگ، ریشه و میوه گیاه

جدول ۲- تیمارهای طراحی شده در آزمون سطح پاسخ و مقادیر IC_{50} عصاره‌های گیاه

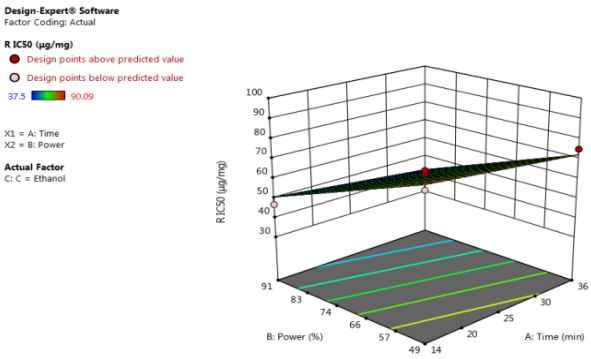
تیمار	شرایط استخراج عصاره	IC_{50} (µg/mg)		
		برگ	ریشه	میوه
۱	شدت صوت ۴۹ درصد و زمان ۱۴ دقیقه	۱۸/۷۵±۱/۵^{ab*}	۷۸/۱۲±۵/۱^{a}	۸۷/۹۲±۳/۹^{b}
۲	شدت صوت ۴۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱۹/۴۷±۲/۳^{a}	۷۹/۲۸±۴/۲^{a}	۹۰/۷۴±۴/۴^{a}
۳	شدت صوت ۴۹ درصد و زمان ۳۶ دقیقه	۱۷/۰۴±۱/۳^{bc}	۷۵/۰۰±۳/۷^{b}	۸۵/۲۲±۴/۲^{bc}
۴	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۱۰ دقیقه	۱۶/۳۱±۱/۶^{c}	۷۰/۳۶±۳/۶^{c}	۸۱/۵۲±۳/۵^{d}
۵	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱۴/۴۳±۲/۴^{d}	۶۳/۲۳±۲/۹^{de}	۶۷/۷۸±۴/۱^{e}
۶	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱۴/۴۷±۱/۴^{d}	۶۱/۸۳±۴/۴^{e}	۶۲/۵۰±۲/۵^{fg}
۷	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱۴/۴۴±۱/۱^{d}	۶۴/۳۲±۳/۶^{d}	۶۵/۴۱±۳/۴^{ef}
۸	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱۴/۴۳±۱/۳^{d}	۶۳/۹۳±۴/۹^{de}	۶۸/۶۱±۲/۶^{e}
۹	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱۴/۴۸±۱/۷^{d}	۶۲/۵۰±۳/۵^{de}	۶۳/۲۱±۴/۲^{g}
۱۰	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۴۰ دقیقه	۱۱/۷۲±۱/۵^{e}	۵۶/۲۶±۳/۳^{f}	۵۴/۳۵±۳/۳^{h}
۱۱	شدت صوت ۹۱ درصد و زمان ۱۴ دقیقه	۱۱/۰۳±۲/۲^{e}	۴۶/۸۷±۲/۸^{g}	۵۱/۶۲±۳/۶^{i}
۱۲	شدت صوت ۱۰۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۹/۰۴±۱/۸^{f}	۳۷/۵۰±۳/۵^{i}	۴۶/۸۷±۲/۸^{j}
۱۳	شدت صوت ۹۱ درصد و زمان ۳۶ دقیقه	۹/۴۳±۱/۴^{f}	۴۰/۱۹±۲/۱^{h}	۴۷/۶۷±۳/۱^{j}

*در هر ستون اعداد با حروف غیرمشابه از لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار دارند ($p<0.05$).

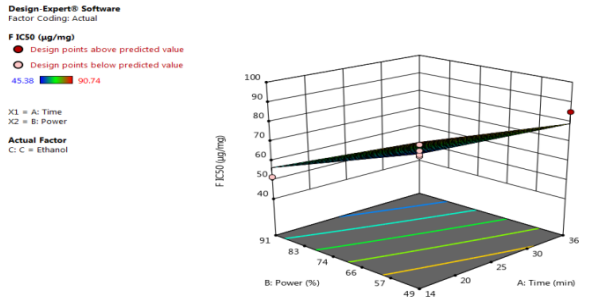


شکل ۴- نمایش نمودار سه بعدی، اثر همزمان دو متغیر زمان و شدت صوت بر میزان IC_{50} عصاره برگ گیاه

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳ DOI: 10.22034/JPR.2022.2188



شکل ۵- نمایش نمودار سه بعدی، اثر همزمان دو متغیر زمان و شدت صوت بر میزان IC_{50} عصاره ریشه گیاه



شکل ۶- نمایش نمودار سه بعدی، اثر همزمان دو متغیر زمان و شدت صوت بر میزان IC_{50} عصاره میوه گیاه

میزان IC_{50} عصاره‌های برگ، ریشه و میوه گیاه کبر با حلال اتانول به روش فراصوت به ترتیب ۱۴/۲۵±۳/۲۹، ۶۱/۴۹±۱۳/۳۶ و ۶۷/۱۹±۱۵/۱۶ میکروگرم بر میلی‌گرم بودند. نتایج حاصل از مقایسه میزان IC_{50} عصاره‌های استخراجی از برگ، ریشه و میوه گیاه کبر در مرحله آزمایش با مقدار پیشگویی شده توسط مدل بطریق آماری بیانگر همبستگی بسیار خوب بین نتایج بدست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش‌بینی‌شده با روش آماری هستند. با توجه به نمودارهای Surface (شکل‌های ۴، ۵ و ۶) با افزایش زمان و شدت صوت، میزان IC_{50} عصاره‌های استخراجی از برگ، ریشه و میوه گیاه کبر با حلال اتانول کاهش می‌یابد. با توجه به پارامترهای معنی‌دار در فرآیند استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از برگ، ریشه و میوه گیاه، معادلات کلی را می‌توان بصورت زیر گزارش کرد:

معادله ۴: معادله کلی تعیین میزان IC_{50} عصاره استخراجی از برگ گیاه

$$Y=17.9085 – 1.94444\ A – 5.87362\ B – 3.65385\ C + 0.719286\ AC + 2.06586\ BC$$

معادله ۵: معادله کلی تعیین میزان IC_{50} عصاره استخراجی از ریشه گیاه

$$Y=66.1742 – 4.15504\ A – 14.9191\ B – 4.68269\ C$$

معادله ۶: معادله کلی تعیین میزان IC_{50} عصاره استخراجی از میوه گیاه

$$Y=65/8277 - 4/55282\ A - 13/3569\ B – 3/6295\ BC$$

که Y: میزان IC_{50} عصاره استخراجی بر حسب میکروگرم بر میلی‌گرم، A: زمان بر حسب دقیقه، B: شدت صوت بر حسب درصد و C: اثر حلال می باشد.

با توجه به معادله‌های ۴، ۵ و ۶ و مقادیر مجموع مربعات برای هر پارامتر موثر در استخراج، شدت صوت (B) به عنوان موثرترین فاکتور استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی از برگ، ریشه و میوه گیاه کبر انتخاب گردید.

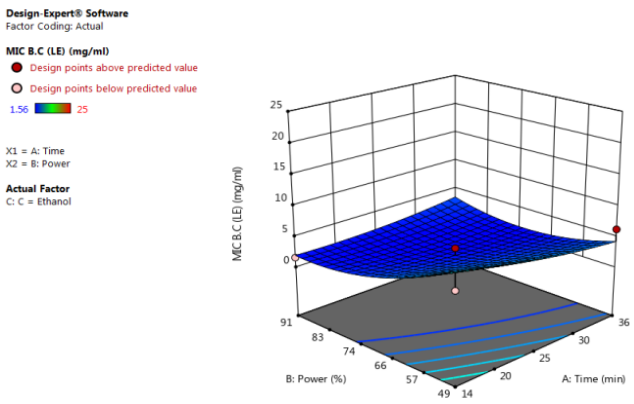
مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳ DOI: 10.22034/JPR.2022.2188

شرایط بهینه IC_{50} عصاره های استخراجی از برگ گیاه به روش فراصوت در زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد حمام فراصوت بمیزان ۹/۱۳ میکروگرم بر میلی‌گرم، شرایط بهینه IC_{50} عصاره‌های استخراجی از ریشه گیاه به روش فراصوت در زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد حمام فراصوت بمیزان ۴۰/۲۰ میکروگرم بر میلی-گرم و شرایط بهینه IC_{50} عصاره های استخراجی از میوه گیاه به روش فراصوت در زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد حمام فراصوت بمیزان ۴۵/۳۰ میکروگرم بر میلی‌گرم مشاهده گردیدند.

حداقل غلظت بازدارندگی رشد *Bacillus cereus* عصاره‌های استخراجی از برگ، ریشه و میوه گیاه کبر

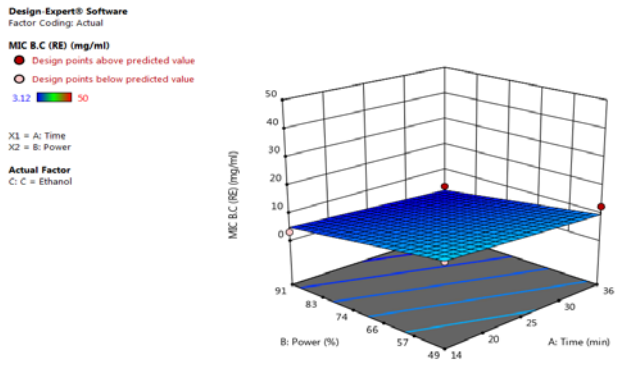
جدول ۳- تیمارهای طراحی شده در آزمون سطح پاسخ و مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی رشد *Bacillus cereus* عصاره‌ها

تیمار	شرایط استخراج عصاره	حداقل غلظت بازدارندگی (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)		
		برگ	ریشه	میوه
۱	شدت صوت ۴۹ درصد و زمان ۱۴ دقیقه	۶/۲۵	۱۲/۵	۵۰
۲	شدت صوت ۴۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۶/۲۵	۱۲/۵	۵۰
۳	شدت صوت ۴۹ درصد و زمان ۳۶ دقیقه	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵
۴	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۱۰ دقیقه	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵
۵	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۳/۱۲	۶/۲۵	۱۲/۵
۶	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۳/۱۲	۶/۲۵	۱۲/۵
۷	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۳/۱۲	۶/۲۵	۱۲/۵
۸	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۳/۱۲	۶/۲۵	۱۲/۵
۹	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۳/۱۲	۶/۲۵	۱۲/۵
۱۰	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۴۰ دقیقه	۱/۵۶	۳/۱۲	۱۲/۵
۱۱	شدت صوت ۹۱ درصد و زمان ۱۴ دقیقه	۱/۵۶	۳/۱۲	۶/۲۵
۱۲	شدت صوت ۱۰۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱/۵۶	۳/۱۲	۶/۲۵
۱۳	شدت صوت ۹۱ درصد و زمان ۳۶ دقیقه	۱/۵۶	۳/۱۲	۶/۲۵

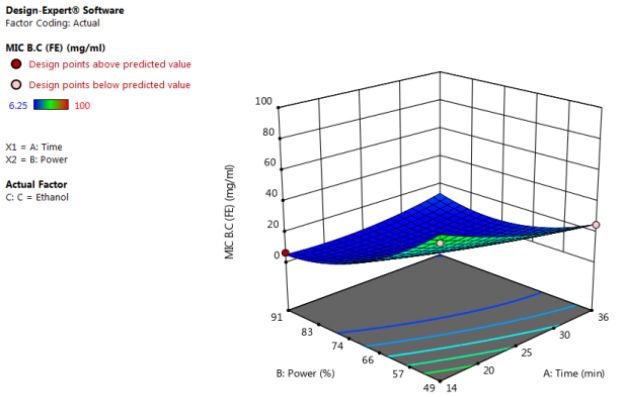


شکل ۷- نمایش نمودار سه بعدی، اثر همزمان دو متغیر زمان و شدت صوت بر میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد *Bacillus cereus* عصاره برگ گیاه

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳ DOI: 10.22034/JPR.2022.2188



شکل ۸- نمایش نمودار سه بعدی، اثر همزمان دو متغیر زمان و شدت صوت بر میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد *Bacillus cereus* عصاره ریشه گیاه



شکل ۹- نمایش نمودار سه بعدی، اثر همزمان دو متغیر زمان و شدت صوت بر میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد *Bacillus cereus* عصاره میوه گیاه

نتایج حاصل از مقایسه میزان MIC عصاره های استخراجی از برگ و میوه گیاه کبر با حلال اتانول بر باکتری *Bacillus cereus* در مرحله آزمایش با مقدار پیشگویی شده توسط مدل بطریق آماری بیانگر همبستگی بسیار خوب بین نتایج بدست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش‌بینی‌شده با روش آماری هستند. با توجه به نمودارهای Surface (شکل‌های ۷، ۸ و ۹) با افزایش زمان و شدت صوت، میزان MIC عصاره‌های الکلی برگ، ریشه و میوه گیاه کبر دربرابر باکتری *Bacillus cereus* کاهش می‌یابد. عصاره‌های الکلی استخراجی از برگ، ریشه و میوه گیاه کبر در شدت‌های صوت بالا (۹۱ و ۱۰۰ درصد) قابلیت مهار رشد باکتری *Bacillus cereus* را در غلظت های پایین بترتیب ۱/۵۶، ۳/۱۲ و ۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از خود نشان داده اند که بیانگر حساسیت زیاد باکتری *Bacillus cereus* به این عصاره‌های استخراجی می‌باشد. در شدت صوت پایین (۴۰ درصد) عصاره‌های الکلی برگ گیاه، کمترین MIC (۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را نسبت به عصاره‌های الکلی ریشه و میوه بترتیب ۱۲/۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان داده‌اند.

با توجه به پارامترهای معنی دار در فرآیند استخراج ترکیبات ضد میکروبی از برگ، ریشه و میوه گیاه، معادلات کلی را می‌توان بصورت زیر گزارش کرد:

معادله ۷: معادله کلی تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد *Bacillus cereus* عصاره استخراجی از برگ گیاه

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳ DOI: 10.22034/JPR.2022.2188

$$Y=4.685 - 2.02487\ A - 4.88848\ B - 2.765\ C + 1.5625\ AB + 1.19579\ AC + 2.8869\ BC + 2.14875\ B^2$$

معادله ۸: معادله کلی تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد *Bacillus cereus* عصاره استخراجی از ریشه گیاه با حلال اتانول

$$Y=18.0281 - 4.14365\ A - 10.0036\ B - 10.8181\ C + 6.00048\ BC$$

معادله ۹: معادله کلی تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد *Bacillus cereus* عصاره استخراجی از میوه گیاه با حلال اتانول

$$Y=18.75 - 8.00206\ A - 23.3197\ B - 9.375\ C + 9.375\ AB + 2.66735\ AC + 7.77324\ BC + 4.10156\ A^2 + 11.1328\ B^2$$

که Y: میزان MIC عصاره استخراجی بر حسب میلی‌گرم بر میلی لیتر، A: زمان بر حسب دقیقه، B: شدت صوت بر حسب درصد و C: اثر حلال می باشد.

با توجه به معادله های ۷، ۸ و ۹ و مقادیر مجموع مربعات برای هر پارامتر موثر در استخراج، شدت صوت (B) بعنوان موثرترین فاکتور استخراج ترکیبات ضد میکروبی از برگ، ریشه و میوه گیاه کبر انتخاب گردید.

شرایط بهینه حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری *Bacillus cereus* عصاره های استخراجی از برگ گیاه با حلال اتانول به روش فراصوت در زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد بمیزان ۱/۰۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، شرایط بهینه حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری *Bacillus cereus* عصاره‌های استخراجی از ریشه گیاه با حلال اتانول به روش فراصوت در زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد بمیزان ۲/۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و شرایط بهینه حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری *Bacillus cereus* عصاره‌های استخراجی از میوه گیاه با حلال اتانول به روش فراصوت در زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد بمیزان ۸/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید.

حداقل غلظت بازدارندگی از رشد *Pseudomonas aeruginosa* عصاره‌های برگ، ریشه و میوه گیاه کبر

جدول ۴- تیمارهای طراحی شده در آزمون سطح پاسخ و مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی رشد *Pseudomonas aeruginosa* عصاره های گیاه

تیمار	شرایط استخراج عصاره	حداقل غلظت بازدارندگی (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)		
		برگ	ریشه	میوه
۱	شدت صوت ۴۹ درصد و زمان ۱۴ دقیقه	۱۰۰	۱۰۰	>۱۰۰
۲	شدت صوت ۴۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱۰۰	۱۰۰	>۱۰۰
۳	شدت صوت ۴۹ درصد و زمان ۳۶ دقیقه	۵۰	۵۰	>۱۰۰
۴	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۱۰ دقیقه	۵۰	۵۰	>۱۰۰
۵	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۲۵	۲۵	۱۰۰
۶	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۲۵	۲۵	۱۰۰
۷	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۲۵	۲۵	۱۰۰
۸	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۲۵	۲۵	۱۰۰
۹	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۲۵	۲۵	۱۰۰
۱۰	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۴۰ دقیقه	۱۲/۵	۲۵	۵۰
۱۱	شدت صوت ۹۱ درصد و زمان ۱۴ دقیقه	۱۲/۵	۲۵	۵۰
۱۲	شدت صوت ۱۰۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵
۱۳	شدت صوت ۹۱ درصد و زمان ۳۶ دقیقه	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳ DOI: 10.22034/JPR.2022.2188

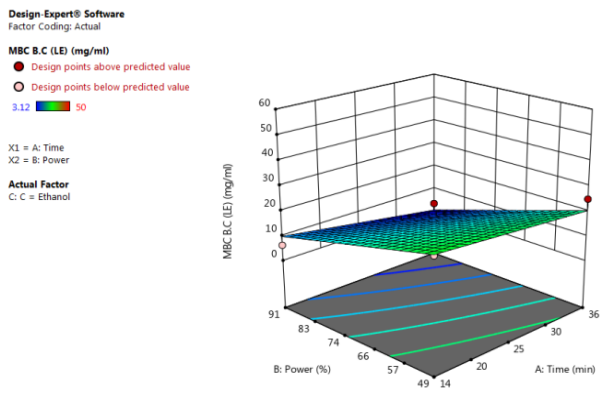
میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد عصاره‌های الکلی برگ گیاه کبر در برابر باکتری *Pseudomonas aeruginosa* بسته به شدت صوت و زمان استخراج از ۶/۲۵-۱۰۰ میلی-گرم بر میلی‌لیتر، عصاره های الکلی ریشه گیاه کبر از ۱۲/۵-۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر و عصاره های الکلی میوه گیاه کبر از ۲۵-بیشتر از ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر متغیر بود. در شدت صوت ۹۱ درصد و زمان ۳۶ دقیقه، عصاره الکلی برگ میزان MIC کمتری را نسبت به عصاره ریشه و میوه دارا می باشد. در شدت صوت پایین ۴۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه، عصاره برگ و ریشه میزان MIC یکسان ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را در برابر باکتری *Pseudomonas aeruginosa* از خود نشان داد در حالی‌که عصاره الکلی میوه هیچ بازدارندگی رشدی را در برابر باکتری *Pseudomonas aeruginosa* از خود نشان نداد. از مقایسه مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی رشد عصاره‌های استخراجی از برگ، ریشه و میوه گیاه در شدت های صوت پایین ۴۰ و ۴۹ درصد می‌توان چنین نتیجه گرفت که باکتری *Pseudomonas aeruginosa* مقاومت زیادی را از خود نشان داد. در مجموع عصاره میوه نسبت به عصاره-های برگ و ریشه حداقل غلظت بازدارندگی رشد بیشتری داشتند.

حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) *Bacillus cereus* عصاره‌های برگ، ریشه و میوه گیاه کبر

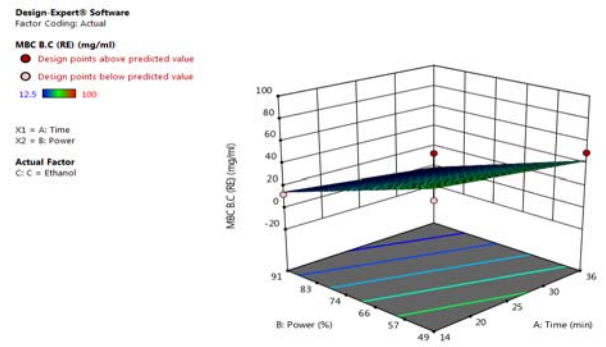
جدول ۵- تیمارهای طراحی شده در آزمون سطح پاسخ و مقادیر حداقل غلظت باکتری‌کشی *Bacillus cereus* عصاره های گیاه

تیمار	شرایط استخراج عصاره	حداقل غلظت باکتری‌کشی (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)		
		برگ	ریشه	میوه
۱	شدت صوت ۴۹ درصد و زمان ۱۴ دقیقه	۲۵	۵۰	>۱۰۰
۲	شدت صوت ۴۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۲۵	۵۰	>۱۰۰
۳	شدت صوت ۴۹ درصد و زمان ۳۶ دقیقه	۲۵	۵۰	۱۰۰
۴	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۱۰ دقیقه	۲۵	۵۰	۱۰۰
۵	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱۲/۵	۲۵	۵۰
۶	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱۲/۵	۲۵	۵۰
۷	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱۲/۵	۲۵	۵۰
۸	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱۲/۵	۲۵	۵۰
۹	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۱۲/۵	۲۵	۵۰
۱۰	شدت صوت ۷۰ درصد و زمان ۴۰ دقیقه	۶/۲۵	۱۲/۵	۵۰
۱۱	شدت صوت ۹۱ درصد و زمان ۱۴ دقیقه	۶/۲۵	۱۲/۵	۵۰
۱۲	شدت صوت ۱۰۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه	۳/۱۲	۱۲/۵	۲۵
۱۳	شدت صوت ۹۱ درصد و زمان ۳۶ دقیقه	۳/۱۲	۱۲/۵	۲۵

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳ DOI: 10.22034/JPR.2022.2188



شکل ۱۰- نمایش نمودار سه بعدی، اثر همزمان دو متغیر زمان و شدت صوت بر میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی *Bacillus cereus* عصاره برگ گیاه



شکل ۱۱- نمایش نمودار سه بعدی، اثر همزمان دو متغیر زمان و شدت صوت بر میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی *Bacillus cereus* عصاره ریشه گیاه

نتایج حاصل از مقایسه میزان MBC عصاره‌های استخراجی از برگ گیاه کبر با حلال اتانول بر باکتری *Bacillus cereus* در مرحله آزمایش با مقدار پیشگویی‌شده توسط مدل بطریق آماری بیانگر همبستگی نسبتا خوب بین نتایج بدست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش‌بینی‌شده با روش آماری هستند. با توجه به نمودارهای Surface (شکل‌های ۱۰ و ۱۱) با افزایش زمان و شدت صوت، میزان MBC عصاره‌های برگ و ریشه گیاه کبر در برابر باکتری *Bacillus cereus* کاهش یافت. عصاره‌های استخراجی از برگ، ریشه و میوه گیاه کبر در شدت صوت بالای ۹۱ درصد و زمان ۳۶ دقیقه و نیز شدت صوت ۱۰۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه قابلیت باکتری‌کشی ۹۹/۹ درصد از باکتری *Bacillus cereus* را بترتیب در غلظت ۳/۱۲، ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از خود نشان داد که بیانگر فعالیت ضد میکروبی بالای عصاره‌های استخراجی از برگ گیاه نسبت به عصاره‌های ریشه و میوه می‌باشد. این موضوع در مورد عصاره‌های الکلی استخراجی از برگ، ریشه و میوه گیاه کبر در شدت صوت پایین ۴۰ درصد و زمان ۲۵ دقیقه و نیز شدت صوت ۴۹ درصد و زمان ۱۴ دقیقه بترتیب با غلظت ۲۵، ۵۰ و بیشتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نیز صدق می‌کند و تاثیر ترکیبات فنولی از جمله روتین موجود در برگ گیاه را در فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی نسبت به اندام های ریشه و میوه گیاه نشان می‌دهد.

با توجه به پارامترهای معنی دار در فرآیند استخراج ترکیبات ضد میکروبی از برگ و ریشه گیاه، معادلات کلی را می‌توان بصورت زیر گزارش کرد:

DOI: 10.22034/JPR.2022.2188 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳

معادله ۱۰: معادله کلی تعیین میزان حداقل غلظت باکتری-کشی *Bacillus cereus* عصاره استخراجی از برگ گیاه

$$Y=20.9131 – 5.55809\ A – 13.4184\ B – 6.97154\ C + 4.4718\ BC$$

معادله ۱۱: معادله کلی تعیین میزان حداقل غلظت باکتری-کشی *Bacillus cereus* عصاره استخراجی از ریشه گیاه

$$Y=44.2308 – 8.38119\ A – 22.4437\ B – 15.3846\ C$$

که Y: میزان MBC عصاره استخراجی بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر، A: زمان بر حسب دقیقه، B: شدت صوت بر حسب درصد و C: اثر حلال می باشد.

با توجه به معادله های ۱۰ و ۱۱ مقادیر مجموع مربعات برای هر پارامتر موثر در استخراج، شدت صوت (B) بعنوان موثرترین فاکتور استخراج ترکیبات ضد میکروبی از برگ و ریشه گیاه کبر انتخاب گردید.

شرایط بهینه حداقل غلظت باکتری‌کشی *Bacillus cereus* عصاره‌های استخراجی از برگ گیاه با حلال اتانول به روش فراصوت در زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد بمیزان ۱/۴۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و شرایط بهینه حداقل غلظت باکتری‌کشی *Bacillus cereus* عصاره‌های استخراجی از ریشه گیاه با حلال اتانول به روش فراصوت در زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد بمیزان ۸/۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید. حداقل غلظت باکتری‌کشی *Bacillus cereus* عصاره استخراجی از میوه گیاه با حلال اتانول به روش فراصوت در زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد بمیزان ۲۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر حاصل گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج از این مطالعه مشخص شد که عصاره‌های اتانولی برگ، ریشه و میوه گیاه کبر دارای ترکیبات فنولی قابل توجهی بودند و با افزایش زمان و شدت صوت، میزان استخراج ترکیبات فنولی از برگ، ریشه و میوه گیاه افزایش یافت. Gu و همکاران (۲۰۰۷) در استخراج کاتکین‌ها و کافئین از چای به روش فراصوت بیان کردند که یک روند افزایشی در میزان استخراج با افزایش زمان وجود دارد. فاکتور زمان مدت انتقال جرم را افزایش می‌دهد. شدت صوت نیز با محتوای انرژی بالای امواج باعث ایجاد نیروی برشی و شکستن و متلاشی‌کردن دیواره‌های سلولی و افزایش احتمال رهایش محتویات گیاه به محیط استخراج و بهبود انتقال جرم می‌گردد (۱۹). علاوه بر این فراصوت سبب کاهش اندازه ذرات و افزایش سطح تماس گردیده و در نتیجه انتشار حلال در بافت را افزایش می‌دهد (۲۴).

راشدی و همکاران (۱۳۹۳) در مطالعه‌ای، میزان ترکیبات فنولی عصاره‌های متانولی استخراجی از برگ، ساقه و میوه گیاه علف مار (*Capparis spinosa* L) استان خوزستان را بترتیب ۲۸/۷۳، ۱۴/۴۰ و ۸/۱۴ میلی‌گرم بر گرم گزارش نمودند. آنها میزان ترکیبات فنولی برگ گیاه را بیشتر از اندام‌های دیگر گیاه گزارش کردند که با مطالعه حاضر مطابقت دارد (۴). در مطالعه‌ای، Bhoyar و همکاران (۲۰۱۱) ، میزان ترکیبات فنولی تام برگ گیاه کبر منطقه ترانس هیمالیا را بین ۲۱/۴۲ تا ۲۷/۶۲ میلی گرم بر گرم گزارش کردند که با میزان بهینه مطالعه حاضر مطابقت دارد (۱۶).

محبوبی و محبوبی (۲۰۱۴) میزان ترکیبات فنولی کل استخراجی از میوه و ریشه گیاه کبر با حلال اتانول ۷۰ درصد را بترتیب ۳۱/۷ و ۲۲/۴ میکروگرم بر گرم و ترکیبات فنولی کل عصاره اتانولی میوه را بیشتر از ریشه گیاه گزارش کردند (۲۵) که میزان بهینه ترکیبات فنولی کل استخراجی از میوه و ریشه گیاه کبر در مطالعه حاضر کمتر از این میزان بوده اما میزان ترکیبات فنولی کل بیشتر عصاره الکلی میوه نسبت به ریشه گیاه با مطالعه حاضر مطابقت دارد. در پژوهش الازاوی و همکاران (۲۰۱۸) میزان ترکیبات فنولی عصاره‌های متانولی برگ با غلظت‌های ۸، ۱۰ و ۱۲ میلی‌گرم بر لیتر برابر با ۲۱/۶۲، ۲۴/۸۱ و ۲۹/۵۴ میلی‌گرم بر گرم بود (۱۴). نوشاد و همکاران (۱۴۰۱) میزان

DOI: 10.22034/JPR.2022.2188 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳

ترکیبات فنولی عصاره اتانولی استخراج شده با حلال متانول و روش غوطه وری میوه کبر را ۲۸/۴۰ میلی‌گرم بر گرم گزارش نمودند (۱۲) که با توجه به زمان زیادی که برای استخراج این ترکیبات در مطالعه ایشان بکار رفته‌است در مقایسه با مطالعه حاضر فقط سه واحد اختلاف مشاهده می‌شود. تفاوت در میزان ترکیبات فنولی کل می‌تواند ناشی از تفاوت در شرایط محیطی محل رویش گیاه و شرایط استخراج باشد (۱۵). شرایط استخراج شامل روش استخراج (سنتی غوطه‌ور در حلال، مایکروویو، فراصوت، حلال فوق بحرانی و غیره)، دما، نوع حلال، میزان هم‌زدن و زمان می‌باشند که تغییر در هر کدام از این فاکتورها مقایسه‌کردن نتایج مطالعات مختلف را دشوار می کند (۱۹).

دهقان تنها و همکاران (۱۳۹۸) در مطالعه ای به بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولی فلفل قرمز با استفاده از حلال متانول به روش سطح پاسخ پرداختند و بیشترین میزان ترکیبات فنولی فلفل قرمز را ۴۹/۶ میلی‌گرم در صد گرم فلفل در دمای ۴۹ درجه سانتی‌گراد، زمان ۳۹ دقیقه و شدت صوت ۸۹/۸ درصد حمام فراصوت گزارش و فاکتور شدت صوت را تاثیرگذارترین پارامتر در استخراج بیان کردند (۳) که تقریبا با شرایط بهینه ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد و معرفی شدت صوت بعنوان موثرترین فاکتور در استخراج ترکیبات فنولی کل در مطالعه حاضر مطابقت دارد.

شاخص IC_{50} به غلظتی از عصاره اختصاص دارد که توانایی مهار ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH را داشته باشد. بدیهی است عصاره‌هایی که در غلظت‌های پایین‌تر توانایی مهار ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH را داشته باشند دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری هستند. در شرایط بهینه، کارایی عصاره اتانولی برگ گیاه کبر در جمع آوری رادیکال‌های DPPH خیلی بیشتر از عصاره‌های اتانولی ریشه و میوه بود که با میزان ترکیبات فنولی موجود در برگ گیاه رابطه مستقیم دارد. با توجه به اینکه میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در برگ گیاه بیشتر از اندام‌های دیگر است و نظر به اینکه ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از عوامل اصلی آنتی‌اکسیدان هستند از اینرو بالا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی در برگ را می‌توان به بالا بودن میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نسبت داد. از جمله ترکیبات آنتی‌اکسیدان برگ گیاه کبر می‌توان به روتین اشاره کرد (۲۵). نتایج پژوهش هدایتی و همکاران (۱۴۰۱) نشان داد بین میزان ترکیبات فنولی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های موئین بذرالبنج (*Hyoscyamus reticulatus*) رابطه مستقیمی وجود دارد (۱۳). همچنین صادقی و زارعی (۱۳۹۹) نشان دادند که عصاره هگزانی گل گیاه خاکشیر و برگ گیاه شاه‌تره حاوی مقدار بالایی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بودند و بهمین دلیل قدرت مهار رادیکال آزاد بیشتری داشتند (۵).

راشدی و همکاران (۱۳۹۳) در مطالعه‌ای ، میزان IC_{50} عصاره‌های متانولی برگ، ساقه و میوه گیاه را بترتیب ۴/۸۳، ۶/۸۶ و ۶/۱۱ میکروگرم بر میلی‌گرم و میزان IC_{50} برگ گیاه کبر منطقه خوزستان را کمتر از اندام‌های دیگر این گیاه گزارش کردند (۴) که با مطالعه حاضر مطابقت دارد. Rajhi و همکاران (۲۰۲۱) فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی برگ گیاه کبر را بر حسب حذف رادیکال-های آزاد DPPH ، ۸۴/۶ درصد گزارش کردند (۳۱). Aliyazicioglu و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای به بررسی ترکیبات فنولیک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنالیز مواد معدنی گیاه *Capparis spinosa* L. پرداختند. مطالعه بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نشان داد که میانگین ترکیبات گیاه دارای غلظت بازدارنده‌ای معادل ۰/۳۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر می‌باشند (۱۵) که در مقایسه با نتایج مطالعه حاضر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتری را نشان می‌دهد و می‌تواند ناشی از تفاوت در شرایط محیطی محل رویش گیاه باشد.

DOI: 10.22034/JPR.2022.2188 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳

محبوبی و محبوبی (۲۰۱۴) در مطالعه ای، میزان IC_{50} عصاره های اتانولی ریشه و میوه گیاه کبر را بترتیب ۸۸ و ۵۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی ریشه را بیشتر از میوه گزارش کردند (۲۵) که در مقایسه با مطالعه حاضر فعالیت آنتی اکسیدانی کمتری دارند اما میزان IC_{50} کمتر عصاره اتانولی ریشه نسبت به عصاره اتانولی میوه با مطالعه حاضر مطابقت دارد.

شرایط بهینه حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری *Bacillus cereus* عصاره های استخراجی از برگ، ریشه و میوه گیاه به روش فراصوت در زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد بترتیب میزان ۱/۰۷ ، ۲/۱۵ و ۸/۰۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر بود. محبوبی و محبوبی (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد عصاره-های اتانولی ریشه و میوه گیاه کبر در برابر باکتری *Bacillus cereus* را بترتیب ۳/۲ و ۶/۴ میلی‌گرم بر میلی لیتر گزارش کردند که در مقایسه با میزان بهینه مطالعه حاضر عصاره‌های اتانولی ریشه میزان MIC بیشتر و عصاره‌های اتانولی میوه میزان MIC کمتری دارند (۲۵) اما میزان MIC کمتر عصاره الکلی ریشه نسبت به میوه با مطالعه حاضر مطابقت دارد. Kalpana و Prakash (۲۰۱۵)، عصاره‌های اتانولی برگ و میوه های گیاه *Capparis sepiaria* L. را بمنظور بررسی فعالیت ضد میکروبی در برابر شش باکتری *Bacillus subtilis* ، *Escherichia coli*، *Enterococcus faecalis*، *Klebsiella pneumoniae*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* مورد بررسی قرار دادند و بطور مقایسه‌ای، عصاره های اتانولی میوه را دارای فعالیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به عصاره‌های اتانولی برگ گیاه گزارش کردند (۲۲) که در شرایط بهینه مطالعه حاضر، فعالیت ضد میکروبی عصاره-های الکلی برگ بیشتر از میوه می‌باشد.

نتایج پژوهش حاضر نشان که باکتری *Pseudomonas aeruginosa* در برابر عصاره میوه مقاومت زیادی را از خود نشان داد. در مجموع عصاره‌های میوه نسبت به عصاره‌های الکلی برگ و ریشه حداقل غلظت بازدارندگی رشد بیشتری داشتند. محبوبی امین (۱۳۹۳) در مطالعه‌ای، MIC عصاره تام متانولی حاصل از بخش‌های هوایی گیاه *Capparis cartilaginea* را در برابر *Pseudomonas aeruginosa* ۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر گزارش کرد (۹) که در مقایسه با میزان MIC مطالعه حاضر دارای حداقل غلظت بازدارندگی رشد کمتری دربرابر باکتری *Pseudomonas aeruginosa* بود.

رحیمی فرد و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه ای، حداقل غلظت بازدارندگی رشد عصاره تام متانولی حاصل از بخش هوایی گیاه *Capparis cartilaginea* در برابر باکتری *Pseudomonas aeruginosa* را ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی-لیتر گزارش کردند (۳۰) که در مقایسه با میزان MIC مطالعه حاضر کمتر بود. آنها همچنین عصاره تام متانولی حاصل از بخش‌های هوایی گیاه *Capparis mucronifolia* را با MIC بیشتر از ۱۰۰۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فاقد قابلیت مهار باکتری *Pseudomonas aeruginosa* گزارش کردند.

الازاوی و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی برگ گیاه کبر در برابر سویه‌های بیماری‌زا مانند *Staphylococcus aureus*، *Klebsiella pneumoniae*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* نشان دادند که عصاره متانولی در برابر بیشتر گونه‌های مورد مطالعه در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر مهاری داشت در حالی که *Pseudomonas aeruginosa* در برابر عصاره مقاومت نشان داد (۱۴).

محبوبی و محبوبی (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای، میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی عصاره‌های اتانولی ریشه و میوه گیاه کبر در برابر باکتری *Bacillus cereus* را بترتیب ۱۲/۸ و ۵۱/۲ میلی‌گرم بر میلی لیتر گزارش کردند که نسبت بمیزان بهینه MBC عصاره الکلی ریشه و کمترین میزان حداقل غلظت باکتری‌کشی عصاره الکلی میوه گیاه در مطالعه

DOI: 10.22034/JPR.2022.2188 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳

حاضر بیشتر بود و از این‌رو عصاره‌های ضعیف‌تری می‌باشند (۲۵).

پلی‌فنول‌ها بدلیل فعالیت بیولوژیکی بالای خود که توسط ترکیب منحصربفرد آن‌ها تعیین می‌شود، شناخته شده‌اند. گزارش شده که فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره‌های گیاه کبر ناشی از ترکیبات فنولی شامل فنول‌های ساده، اسیدهای فنولی، آنتوسیانین‌ها، مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید، فلاوونوئیدها و غیره می‌باشد (۳۴). با توجه به این مطلب می‌توان نتیجه گرفت که عصاره الکلی برگ کبر با دارا بودن ترکیبات فنولی بیشتر، فعالیت آنتی‌رادیکالی و ضدمیکروبی بالاتری نسبت به عصاره‌های ریشه و میوه نشان داد (۱۳).

بطور کلی، با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه مشخص شد بهترین مدل تجزیه و تحلیل آماری Quadratic بود که با ضریب تبیین بالایی داده‌ها را مورد برازش قرارداد. در بررسی نتایج آزمون‌های انجام شده با روش آماری سطح پاسخ، شدت صوت به عنوان تاثیر گذارترین فاکتور انتخاب شد و با افزایش فاکتورهای زمان و شدت صوت، استخراج ترکیبات ضد میکروبی از برگ، ریشه و میوه گیاه افزایش یافت. شرایط بهینه استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی با حمام فراصوت، زمان ۳۶ دقیقه و شدت صوت ۹۱ درصد انتخاب گردید. میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌های الکلی برگ و میوه گیاه کبر به روش استخراج فراصوت بترتیب با میزان ۱۸/۷۲ و ۱۸/۷۴ میلی‌گرم بر گرم تقریبا معادل یکدیگر و بیشتر از عصاره‌های ریشه گیاه با میزان ۱۱/۰۴ میلی‌گرم بر گرم بودند. عصاره برگ گیاه کبر دارای بیشترین ترکیبات فنولی و قابلیت حذف رادیکال‌های آزاد بود.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر گرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد محمدانور کلکلی با کد ۹۷۳۴۵۶ می‌باشد. بدین وسیله از حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بم و همکاری آزمایشگاه این دانشگاه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

۱- ابونجمی، م.، قربانی، م. و قربانی جاوید، م. ۱۳۹۴. امواج فراصوتی روشی نوین در استخراج ترکیب‌های گیاهی. نشریه علمی ترویجی صوت و ارتعاش، ۴(۸): ۹۹-۸۵

۲- جلالی نیا، ا.ع.، دهقانی، م. و اسمعیل زاده بهابادی، ص.۱۴۰۰. بررسی رابطه شرایط اقلیمی با میزان ترکیبات فیتوشیمیایی و خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه کبر (*Capparis spinosa* L.) در زابل، گرگان و تهران، کنفرانس ملی رویین تن سازی سیستان، زابل.

۳- دهقان تنها، ر.، مهدیان، ا.، امینی فرد، م.ح.، بیات، ح. و گاراژیان، ر. ۱۳۹۸. بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات فنلی فلفل قرمز با استفاده از امواج فراصوت به روش سطح پاسخ. نشریه نوآوری در علوم و فناوری غذایی، ۱۱(۱): ۹۵-۸۵

۴- راشدی، ه.، امیری، ح. و قارزی، ا. ۱۳۹۳. بررسی فیتوشیمیایی و خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه علف مار استان خوزستان. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، ۱۸(۶): ۱۷-۱۱

۵-صادقی، م. و زارعی، م.ع. ۱۳۹۹. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تعیین میزان فنل و فلاونوئید عصاره هگزانی اندام‌های هوایی گیاهان خاکشیر (*Descurainia sophia*) و شاه‌تره (*Fumaria vaillantii*). مجله پژوهش‌های گیاهی، ۳۳(۲): ۳۶۵,-۳۷۳

۶- صفری منگودی، س.، علیرضالو، ا.، نیکزاد، ب. و بهادری، م.ب. ۱۳۹۹. بررسی تنوع فیتوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی برخی نوتیپ‌های کبر (*Capparis spinosa*) در استان آذربایجان غربی. اولین همایش ملی چالش های فراروی تکمیل زنجیره‌ی ارزش گیاهان دارویی و معطر،ارومیه.

۷- علیزاده بهبهانی، ب.، شهیدی، ف.، طباطبایی یزدی، ف.، مرتضوی، س.ع. و محبی، م. ۱۳۹۵. اثر ضد میکروبی و برهمکنش عصاره های آبی و اتانولی بارهنگ کبیر بر *استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* در شرایط برون تنی. فصلنامه بیماری های عفونی و گرمسیری وابسته به

DOI: 10.22034/JPR.2022.2188 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳

انجمن متخصصین بیماری های عفونی و گرمسیری، ۲۱(۷۵): ۸-۱.

۸- قربانی، م.، ابونجمی، م.، قربانی جاوید، م. و عرب حسینی، ا. ۱۳۹۶. تاثیر شرایط عصاره‌گیری با امواج فراصوت بر عملکرد و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه رازیانه. مجله علوم و صنایع غذایی، ۱۴(۶۷): ۷۳-۶۳.

۹- محبوبی امین، م. ۱۳۹۳. بررسی اثر ضد میکروبی عصاره تام و فراکسیون های اتردوپترولی، کلروفرمی، اتیل استاتی، متانولی و آبی حاصل از بخش هوایی *Capparis cartilaginea* decne علیه ۶ سوش باکتریایی. پایان نامه دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی.

۱۰- مهربان، ا. ۱۳۹۳. بررسی اثر ضد میکروبی عصاره های آبی، اتانولی و هیدروالکلی گیاه *Salvia chorassanica* بر برخی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا با منشا غذایی در شرایط آزمایشگاهی. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۱۱- نجفی، ش. و اسمعیل زاده بهابادی، ص. ۱۳۹۵. بررسی فیتوشیمیایی، آنتی اکسیدانی و بهینه سازی استخراج مواد موثره میوه گیاه *Capparis spinosa* L. در منطقه سیستان. اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۴(۳): ۴۵-۳۶.

۱۲-نوشاد، م.، علیزاده بهبهانی، ب. و رحمتی جنیدآباد، م. ۱۴۰۱. عصاره اتانولی کور (*Capparis spinosa*) فنل، فلاونوئید، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدباکتریایی آن بر *انتروباکتر آئروژنز، اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز*. مجله علوم و صنایع غذایی ایران، ۱۹(۱۲۴): ۲۱۶-۲۰۷.

۱۳-هدایتی، ا.، حسینی، ب.، ملکی، ر. و پالازون، خ. ۱۴۰۱. تاثیر نانو ذرات سیلیسیم دی اکسید (SiO_2 NPs) بر میزان ترکیبات پلی فنولی و ظرفیت آنتی اکسیدانی ریشه‌های موئین بذرالبنج مشبک و کوتاه. مجله پژوهش‌های گیاهی،۳۵(۱): ۹۸-۸۴.

14- Al-Azawi, A., Ghaima, K. And Salih, H. 2018. Phytochemical, antibacterial and antioxidant activities of *Capparis spinosa* L. Cultivated in Iraq. Bioscience Research, 15 (3): 2611-2618

15-Aliyazicioglu, R., Eyupoglu, O.E., Sahin, H., Yildiz, O. and Baltas N. 2013. Phenolic components, antioxidant activity, and mineral analysis of *Capparis spinosa* L. *African Journal of Biotechnology*, 12(47): 6643-6649.

16- Bhoyar, M.S., Mishra, G.P., Naik, P.K. and Srivastava, R.B. 2011. Estimation of Antioxidant Activity and Total Phenolics Among Natural Populations of Caper (*Capparis spinosa*) Leaves Collected from Cold Arid Desert of Trans-Himalayas. *Australian Journal of Crop Science*, 5(7): 912-919.

17-Chedraoui, S., Abi-Rizk, A., El-Beyrouthy, M., Chalak, L., Ouaini, N. and Rajjou, L. 2017. *Capparis spinosa* L. in a systematic review: A xerophilous species of multi values and promising potentialities for agrosystems under the threat of global warming. *Frontiers in Plant Science*, 8: 18-35.

18-Eddouks, M., Maghrani, M., Lemhadri, A., Ouahidi, M.L. and Jouad, H. 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *Journal of Ethnopharmacology*, 82(2-3): 97-103.

19-Gu, X., Cai, J., Zhang, Z. and Su, Q. 2007. Dynamic Ultrasound□Assisted Extraction of Catechins and Caffeine in Some Tea Samples. *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 97(5- 6): 321-330.

20-Jiménez-López, J., Ruiz-Medina, A., Ortega-Barrales, P. and Llorent-Martínez, E. 2018. Phytochemical profile and antioxidant activity of caper berries (*Capparis spinosa* L.): Evaluation of the influence of the fermentation process. *Food chemistry*, 250: 54-59.

21-Jokar, M., Rahmani, R.A., Ibrahimi, N.A., Abdullah, L.C. and Tan, C.P. 2012. Melt production and antimicrobial efficiency of low-density polyethylene (LDPE)-silver nanocomposite film. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2): 719-728.

22-Kalpana, B. and Prakash, M. 2015. Antibacterial Activity of *Capparis sepiaria* L. (Capparidaceae) Leaves and Fruits. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(1): 1007-1012.

23-Leong, T.S.H., Manickam, S., Martin, G.J., Li, W. nd Ashokkumar, M. 2018. Ultrasonic Production of Nano-emulsions for Bioactive Delivery in Drug and Food Applications. Springer. 2018; pages: 55-61.

24-Li, J.W., Ding, S.D. and Ding, X.L. 2007. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus*

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳ DOI: 10.22034/JPR.2022.2188

jujuba cv. *jinsixiaozao*. *Journal of Food Engineering*, 80(1): 176-183.

25-Mahboubi, M. and Mahboubi, A. 2014. Antimicrobial activity of Capparis spinosa as its usages in traditional medicine. *Herba Polonica Journal*, 60(1): 39-48.

26-Mollica, A. 2017. Anti-diabetic and anti-hyperlipidemic properties of Capparis spinosa L.: In vivo and in vitro evaluation of its nutraceutical potential. *Journal of Functional Foods*, 35: 32-42.

27-Moufid, A., Farid, O. and Eddouks, M. 2015. Pharmacological Properties of Capparis spinosa Linn. *International Journal of Diabetes and Vascular Disease Research:*, 3(5): 99-104.

28- Ombui, J., Gitahi, N. and Gicheru, M. 2008. Direct detection of Bacillus cereus enterotoxin genes in food by multiplex Polymerase Chain Reaction. International Journal of Integrative Biology, 2(3): 77-83

29-Ozturk, S. and Ercisli, S. 2007. Antibacterial activity and chemical constitutions of Ziziphora clinopodioides. *Food control*, 18(5): 535-540.

30-Rahimifard, N., Shojaii, A., Mahbobi, M., Hafezan, G., Bagheri, F. and Asgarpanah, J. 2015. Evaluation of Antibacterial Activity and Flavonoid Content of Two Capparis Species from Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 3(55): 89-94.

31- Rajhi, I., Hernandez Ramos, F., Abderrabba, M., Ben Dhia,M.T., Ayadi, S. and Labidi, J. 2021.Antioxidant,Antifungal and Phytochemical Investigations of Capparis spinosa L. Agriculture, 11: 1-16.

32-Sharififar, F., Moshafi, M., Mansouri, S., Khodashenas, M. and Khoshnoodi, M. 2007. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food control*, 18(7): 800-805.

33- Slekovec, C., Plantin, J., Cholley, P., Thouverez, M., Talon, D., Bertrand, X. and Hocque, D. 2017. Tracking down antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates in a wastewater network. PLoS One, 7(12):49-57.

34- Tlili, N., Khaldi, A., Triki, S. and Munné-Bosch, S. 2010. Phenolic compounds and vitamin antioxidants of caper (*Capparis spinosa*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(2):260–265.

35-Wu, Y., Cui, S.W., Tang, J. and Gu, X. 2007. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds by response surface methodology. *Food chemistry*, 105(4): 1599-1605.

36-Yang, T., Liu, Y., Wang, C. and Wang, Z. 2008. Advances on investigation of chemical constituents, pharmacological activities and clinical applications of *Capparis spinosa*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 33(21): 2453-2458.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۰۶-۹۳ DOI: 10.22034/JPR.2022.2188

Effect of different extraction conditions with ultrasound on antiradical and antimicrobial properties of caper (*Capparis spinosa*) alcoholic extract

Kalkali M.A.[1], Sarhadi H.[1] and Shahdadi F.[2*]

[1] Dept. of Food Science & Technology, Bam Branch, Islamic Azad University, Bam, I.R. of Iran

[2] Dept. of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, I.R. of Iran.

Abstract

To extract active ingredients of herbal, several methods including soxhlet and maceration or new technologies such as microwave and ultrasound are being used. The aim of this study was to evaluate the efficiency of ultrasound in extraction of phenolic, antimicrobial and antradical compounds of leaf, root and fruit of *Capparis spinosa* L. Optimization by response surface method was considered using time factor (10, 25 and 40 minutes) and sound intensity (40, 70 and 100%) with alcoholic solvent (ethanol 76%) was considered. The results showed ultrasound power was more effective factor than time. By increasing of ultrasound power and the time of extraction yield increased. The optimum conditions for alcoholic extraction of antioxidant and antimicrobial compounds were extraction time of 36 min and ultrasound power of 91 percent. In these condition, total phenolic content was obtained 25.47, 17.24 and 23.63 mg/g in leaf, root and fruit, respectively and IC_{50} was 9.13, 40.20 and 45.30 µg/mg in leaf, root and fruit, respectively. The minimum inhibitory concentration for *Bacillus cereus* was obtained 1.07, 2.15 and 8.02 mg/ml in leaf, root and fruit, respectively and minimum bactericidal concentration was 1.41 and 8.62 mg/ml in leaf and root. Minimum bactericidal concentration for *Bacillus cereus* was obtained 12.5 mg/ml in fruit. In general, it was found that alcoholic extracts obtained by ultrasound method had significant phenolic compounds and with increasing time factors and sound intensity, the extraction of antimicrobial compounds from leaves, roots and fruits of plants increased.

Key words: Alcoholic extracts, Antiradical properties, Antimicrobial activity, *Capparis spinosa*, Ultrasound.