

بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی، ضد تکثیری و محتوای فنلی و فلاونوئیدی عصاره آبی گیاه سیرموک (*Allium canadense*)

مینو اسدی، فرانک هادی*، سید حسام‌الدین حجازی و فریده آذر بانی

ایران، خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۱۰

چکیده

یکی از روش‌های درمانی متداول در طب سنتی و مدرن استفاده از گیاهان دارویی است. در این پژوهش ترکیبات فیتوشیمیایی، محتوای فنلی و فلاونوئیدی، فعالیت آنتی‌باکتریایی و سمیت سلولی عصاره آبی گیاه سیرموک برای اولین بار در دنیا مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان محتویات فنلی و فلاونوئیدی تام و شناسایی گروه‌های عاملی ترکیبات موجود در عصاره آبی گیاه با استفاده از روش فولین-سیکالتو، رنگ سنجی کلرید آلومینیوم و آنالیز طیف سنجی FTIR انجام شد. سمیت سلولی غلظت‌های مختلف عصاره ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر رده سلولی سرطان پستان MCF-7 با روش MTT سنجیده شد. خاصیت ضد باکتریایی عصاره گیاه با روش انتشار دیسک و حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی با روش براث میکروداپلوشن صورت گرفت. محتوای فنلی و فلاونوئیدی عصاره آبی گیاه به ترتیب برابر $118/06 \pm 0/02$ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره خشک و $90/16 \pm 0/03$ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره خشک محاسبه شد. طیف FTIR نیز وجود مولکول‌های زیستی حاوی گروه هیدروکسیل و حلقه‌ی آروماتیک را نشان داد. در تیمار سلول‌های سرطانی با عصاره گیاه آبی سیرموک اثرات ضد تکثیری ملاحظه شد؛ بیشترین تاثیر در ۷۲ ساعت با ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۴۸ ساعت با ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. عصاره آبی روی باکتری‌های گرم منفی تاثیر کشندگی بیشتری نشان داد و رشد *Sordomonas Atrozinosa* را بیشتر مهار نمود. تأثیر مثبت عصاره آبی سیرموک علیه سلول‌های سرطانی و باکتری‌ها ممکن است مربوط به ترکیبات مختلف نظیر فنل و فلاونوئیدی باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌باکتریایی، سمیت سلولی، *Allium canadense*، محتوای فنلی، محتوای فلاونوئیدی

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: hadi.f@lu.ac.ir

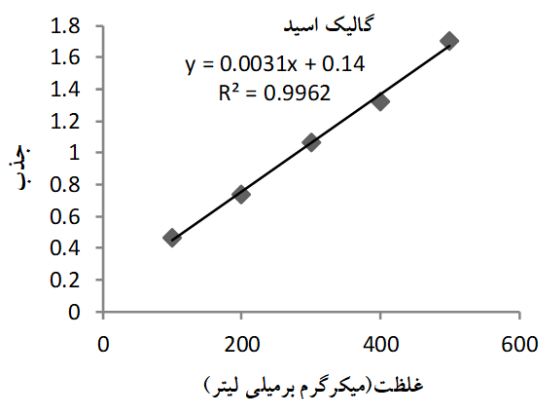
مقدمه

سیستم ایمنی هستند و همچنین برای درمان التهاب، زخم معده، عفونت ویروسی، سرطان، آگزما، دیابت و قانقاریا استفاده می‌شوند؛ این خواص درمانی این گیاهان می‌تواند به دلیل حضور ترکیباتی نظیر ویتامین‌ها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، کاروتنوئیدها، فیتواستروژن‌ها، مواد معدنی و استروئیدهای گیاهی باشد (۱۰). از میان گونه‌های جنس آلیوم، گیاه سیر (*Allium sativum*) دارای اثر ضد سرطانی بیشتری است؛ لذا، مصرف آن در رژیم غذایی محافظت شدیدی در برابر خطر ابتلا به سرطان ایجاد می‌نماید (۱۱).

گیاه سیرموک بانام علمی *Allium canadense* گیاهی است چندساله از خانواده لیلیاسه که از طریق بذر و پیاز تکثیر می‌یابد. ریشه‌ها تار مانند و رشته‌ای، ساقه‌های بلند، ایستاده، نرم و دارای بویی شبیه پیاز و برگ‌ها به صورت کشیده، باریک و نرم هست (۸). جنس آلیوم به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی قوی و محافظت‌کنندگی قوی بافتی مورد توجه صنعتگران غذا و محققین دارو قرار گرفته است (۹). در بررسی‌های مختلف، مشاهده شده است که عصاره گیاهان جنس آلیوم مسکن، تب بر و تقویت کننده

دانشکده ی علوم پایه، دانشگاه لرستان ثبت گردید. مقدار ۵ گرم از پودر خشک و آسیاب شده گیاه با مقدار ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر یونیزه مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه تا دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. پس از صاف کردن محلول به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۹۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید و مجدد محلول به دست آمده از صافی عبور داده شد.

تعیین میزان محتویات فنلی: مقدار فنل تام عصاره گیاه با استفاده از معرف فولین-سیکالتو (FCR) مطابق با روش منتشر شده تعیین شد (۱۴). اساس کار در این روش احیاء معرف فولین توسط ترکیبات فنلی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ۷۶۵ نانومتر نشان می‌دهد (۳). بطور خلاصه، ابتدا حدود ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره با غلظت ۱mg/ml را با ۲/۵ میلی‌لیتر محلول رقیق شده FCR (با نسبت ۱ به ۱۰) مخلوط و به دنبال آن ۲ میلی‌لیتر از محلول ۷/۵ درصد کربنات سدیم (Na_2CO_3) به آن اضافه شد؛ سپس جذب نمونه بعد از ۹۰ دقیقه نگهداری در تاریکی و دمای آزمایشگاه در طول موج ۷۶۵ نانومتر با نانودراپ ریدر خوانده شد. مقدار ترکیبات فنلی موجود در عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم از نمونه خشک بیان گردید (شکل ۱) (۲۷).



شکل ۱- نمودار استاندارد اسید گالیک

هنگامی که این‌گونه‌ها به‌طور منظم به رژیم غذایی اضافه شوند به‌عنوان یک تقویت‌کننده برای دستگاه گوارش و نیز سیستم گردش خون عمل می‌کنند (۱۳). همچنین، در بررسی‌های بالینی و آزمایشگاهی نقش پیشگیری احتمالی گونه‌های آلوم در ایجاد سرطان در انسان گزارش شده است (۳۳). گیاه سیر در سراسر دنیا به‌عنوان غذا و داروی سنتی برای درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شود. این‌گونه غنی از چندین ماده سازنده گیاهی حاوی گوگرد مانند آلین، آلسین و فلاونوئیدها است که باعث فعالیت ضد باکتری، ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد سرطانی این گیاه شده است (۳۱). در بررسی‌های دیگر ترکیبات مؤثره سیر در درمان فشارخون بالا کنترل نشده همانند داروهای استاندارد مشابه عمل می‌کنند. عصاره سیر حاوی ترکیب اس-آلیل سیستین است که به‌عنوان ترکیب گوگرد فعال عمل می‌کند و با داروهای کاهنده درد اثر سینرژیک دارد (۲). تری سولفید دیالیل (DATS)، یک ترکیب ارگانوسولفید فعال زیستی موجود در سیر و سایر گونه‌های آلوم است که بر ترشحات آلفا از جمله ADAM10,17 در سلول‌های سرطانی پستان مستقل از استروژن MDA-MB-231 و وابسته به استروژن اثر مهاری دارد و همچنین DATS باعث کاهش توانایی تشکیل کلنی سلول‌های MCF-7 می‌شود (۲)؛ لذا مطالعه و ارزیابی گیاهان دارویی مختلف بومی مربوط به جنس آلوم برای یافتن داروهای مؤثرتر با عوارض جانبی کم حائز اهمیت فراوانی است. در این پژوهش برای اولین بار در دنیا خاصیت آنتی‌باکتریایی، ضد سرطانی و فیتوشیمی عصاره آبی گیاه سیرموک مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

تهیه نمونه و عصاره گیری: گیاه سیرموک در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۹ از ارتفاعات زاگرس در شهرستان بروجن، استان چهارمحال بختیاری جمع‌آوری و پس از شناسایی با کد هرباریومی LUKH11031399 در گروه زیست‌شناسی

از سود ۴ درصد به مخلوط اضافه و در آخر با آب مقطر حجم نمونه‌ها به ۵ میلی‌لیتر رسید. جذب نمونه‌ها بعد از گذشت ۱۵ دقیقه در مقابل شاهد (بلانک) تازه تهیه شده در طول موج ۵۱۰ نانومتر خوانده شد. از ترکیب فلاونوئیدی کوئرستین برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج به صورت معادل میلی‌گرم کوئرستین در گرم خشک بیان گردید (شکل ۲) (۲۷).

تعیین میزان محتویات فلاونوئیدی: میزان کل فلاونوئید های عصاره گیاه به روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم ($AlCl_3$) اندازه‌گیری شد. در این روش به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره گیاه با غلظت ۱ mg/ml به ترتیب ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۱۵ میلی‌لیتر از محلول ۱۵ درصد نیتريت سدیم ($NaNO_2$) اضافه شد. بعد از گذشت ۶ دقیقه، ۰/۱۵ میلی‌لیتر از محلول ۱۰ درصد $AlCl_3$ به نمونه اضافه گردید. بعد از ۶ دقیقه انکوبه شدن در دمای آزمایشگاه، ۲ میلی‌لیتر



شکل ۲- منحنی استاندارد کوئرستین

اورئوس (*Staphylococcus aureus* ATCC2913)، سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC1181)، اشریشیا کلای (*Escherichia coli* ATCC 2592) و کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumonia* ATCC3521) به روش انتشار دیسک ارزیابی شد (۲۷). در شرایط استریل یک لوپ از کشت ۲۴ ساعته از هر باکتری در محلول نرمال سالین ریخته تا کدورتی مشابه استاندارد نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$ CFU/ml) تهیه شود. سپس به وسیله سواب استریل بر سطح پلیت حاوی محیط کشت مولر هیلتون آگار کشت یکنواختی تهیه گردید. مقدار ۳۵ میکرولیتر نمونه عصاره با غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی دیسک بلانک قرار داده شد. سپس دیسک‌های بلانک روی سطح پلیت ثابت گردید. نرمال سالین به عنوان کنترل منفی و آمیکاسین به عنوان

طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR): طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) برای شناسایی ترکیبات آلی و گروه‌های عاملی موجود در عصاره گیاه انجام شد. بدین منظور عصاره آبی گیاه سیرموک و دانه‌های برمید پتاسیم (KBr) را با نسبت ۱ به ۱۰۰ باهم ترکیب کرده و پس از سابیدن آن‌ها مقداری از مخلوط را در قالب فلزی مخصوص ریخته و با دستگاه پرس هیدرولیک تحت فشار قرارداد تا به صورت قرصی شفاف درآمد. قرص حاصله به وسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتر FTIR در محدوده‌ی عدد موجی 4000cm^{-1} تا 400cm^{-1} مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۱۶، ۲۲).

سنجش فعالیت ضد باکتری به روش انتشار دیسک: فعالیت ضد باکتریایی نمونه در برابر استافیلوکوکوس

MCF-7 از محیط DMEM حاوی FBS10%، (PENSTREP) استفاده شد. سمیت سلولی ترکیب عصاره آبی گیاه سیرموک بر روی رده سلولی MCF-7 با آزمون MTT انجام گرفت (۲۲). در این آزمون برای آماده کردن معرف ۱ میلی‌لیتر PBS به ویال پودر MTT اضافه چند بار پیپتاژ کرده، در هر چاهک ۹۶ خانه‌ای به تعداد 10^4 سلول ریخته شد و پلیت داخل انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. پس از گذشت این زمان از انکوباتور خارج و ماده رویی به آرامی جدا و سپس دوباره به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر عصاره با محیط کشت در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه کرده و یک ردیف به‌عنوان شاهد بدون عصاره قرار می‌دهیم. میکروپلیت داخل انکوباتور برای مدت‌زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار داده شد. پس از گذشت زمان مورد نظر پلیت خارج و به آن مقدار ۱۰ میکرولیتر MTT اضافه و به مدت ۵ ساعت داخل انکوباتور قرار گرفت، سپس مایع رویی دور ریخته، به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه نموده و پس از گذشت ۱۰ دقیقه توسط دستگاه الیزا جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. در انتها درصد تکثیر سلولی به‌صورت نسبت OD نمونه به OD کنترل $\times 100$ محاسبه گردید (۱۹).

آنالیز آماری

نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد. داده‌ها پس از جمع‌آوری در نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۶ تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون تکمیلی Duncan استفاده شد. اختلاف بین گروه‌ها در سطح $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره گیاه سیرموک به ترتیب $1184/06 \pm 0/02$ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم

کنترل مثبت استفاده شد. بعد از ۲۴ ساعت نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله اندازه‌گیری گردید (۱۵).

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC): آزمایش مهارکنندگی در میکروپلیت های ۹۶ خانه‌ای استریل با روش برات میکرودایلوشن انجام گرفت؛ بدین‌صورت که ابتدا از محیط کشت مولر هینتون برات ۱۰۰ میکرولیتر داخل هرکدام از چاهک‌ها ریخته می‌شود، سپس به اولین چاهک هر ردیف مقدار ۸۰ میکرولیتر از عصاره موردنظر ریخته و بعد از مخلوط شدن با محیط کشت از خانه اول به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول برداشته و به خانه دوم و سوم اضافه به همین ترتیب تا چاهک ۱۲ رقت‌های یک‌دوم تهیه شد. در آخر به همه چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی، معادل نیم مک فارلند به محتویات قبلی چاهک‌ها اضافه گردید. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با دستگاه الیزا وجود یا عدم وجود کدورت که نشان‌دهنده رشد یا مهار رشد باکتری است مشاهده و ثبت شد. طبق تعریف غلظتی که هیچ کدورتی در آن ایجاد نشد و رشد باکتری در آن مهار شده بود، به‌عنوان MIC یا غلظت مهارکننده رشد عصاره تعیین شد (۱۵).

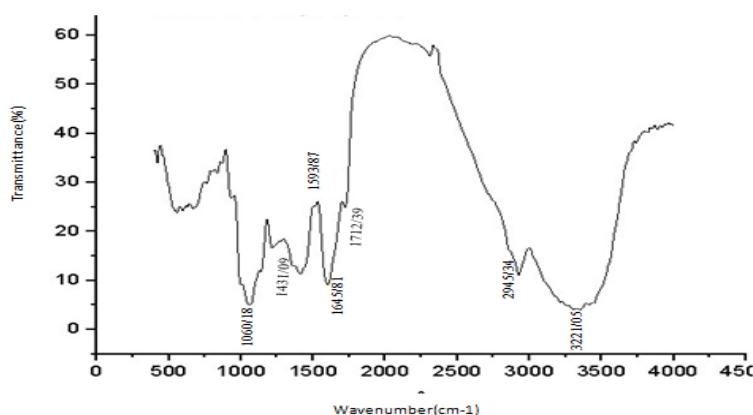
حداقل غلظت کشندگی (MBC): MBC به حداقل غلظت از ماده ضد میکروبی گفته که بتواند مانع رشد ۹۹/۹ درصد از رشد باکتری‌ها شود. برای تعیین MBC از چاهک‌های فاقد کدورت در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند و کمترین غلظتی از ماده که باعث کشته شدن حداقل ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها شد به‌عنوان MBC گزارش گردید (۱۵).

آزمون (Methyl thiazolyl diphenyl-tetrazolium bromide (MTT): رده سلولی MCF-7 سرطان پستان از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. برای کشت رده سلولی

فنل‌ها یا N-H آمین‌ها، ارتعاش کششی C-H در CH₃، ارتعاش کششی C=O در کربوسیل یا گروه آمید، ارتعاش کششی قوی C-C ترکیبات آروماتیک مطابقت دارند. با توجه به پیک‌های مشاهده‌شده، می‌توان نتیجه گرفت که عصاره آبی گیاه سیرموک حاوی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی بوده و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره این گیاه ممکن است وابسته به این ترکیبات است.

عصاره خشک و ۰/۰۳ ± ۹۰/۱۶ میلی‌گرم کوئرستین در گرم نمونه خشک محاسبه گردید.

طیف حاصل از آنالیز طیف‌سنجی نشان‌دهنده نوسانات (ارتعاشات) مولکولی است. این روش برای شناسایی مولکول‌های زیستی و گروه‌های عاملی ترکیبات موجود در عصاره گیاه استفاده گردید. پیک‌های اصلی عصاره آبی گیاه *Allim canadense* در محدوده ۳۵۵۲، ۲۹۹۵، ۱۶۳۱ و ۱۴۰۹ بود (شکل ۳)؛ که با ارتعاش کششی O-H الکل و



شکل ۳- طیف‌سنجی FTIR عصاره آبی گیاه سیرموک

روی باکتری‌های گرم منفی (*اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه*) تا حدود کمی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا*) است اما تفاوت چشمگیر نیست. عصاره آبی گیاه سیرموک با ایجاد هاله عدم رشد $14/25 \pm 2$ میلی‌متری بیشترین تاثیر را روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد (جدول ۱).

نتایج مطالعه آنتی‌باکتریایی نشان داد که عصاره آبی گیاه سیرموک دارای فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های مورد مطالعه است. با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله عدم رشد باکتری به صورت معنی‌دار ($P < 0/05$) افزایش یافت و بیانگر آن است که اثر ضد باکتری عصاره وابسته به غلظت است؛ گرچه تاثیر ضد باکتری عصاره آبی این گیاه

جدول ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره آبی گیاه سیرموک (mm)

کنترل (آمیکاسین)	۱۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	غلظت (μg/ml) / باکتری
۱۵/۴ ± ۴	۶/۰ ± ۶/۵	۰ ± ۸/۱	۰ ± ۱۰/۸	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>
۱۶/۰ ± ۵/۴	۰ ± ۷/۲	۱۰/۰ ± ۶۶/۸	۱۲/۰ ± ۲۲/۹	<i>اشریشیا کلی</i>
۱۶/۰ ± ۷/۱	۱۰/۰ ± ۲۲/۲	۱۲/۰ ± ۳۳/۷	۱۴/۰ ± ۲۵/۲	<i>سودوموناس آئروژینوزا</i>
۱۴/۰ ± ۳/۶	۰ ± ۶/۳	۱۰/۰ ± ۳۳/۳	۱۱/۰ ± ۲۲/۴	<i>کلبسیلا پنومونیه</i>

ولی اثر کشندگی روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی یکسان است (جدول ۲).

مطالعه اثر بازدارندگی MIC و کشندگی MBC عصاره روی باکتری‌های مورد آزمون نشان داد که اثر بازدارندگی آن روی باکتری گرم منفی نسبت به گرم مثبت بیشتر است

جدول ۲- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره آبی گیاه سیرموک

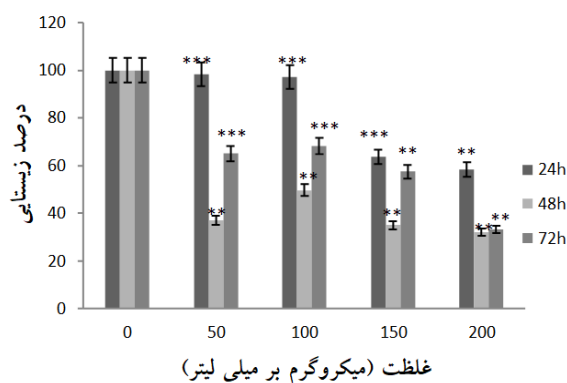
حد اقل غلظت کشندگی (µg/ml)	حد اقل غلظت مهارکنندگی (µg/ml)	باکتری
۱۲۵	۳۲/۵	سودوموناس آئروژینوزا
۲۵۰	۶۲/۵	اشریشیا کلای
۱۲۵	۱۲۵	استافیلوکوکوس اورئوس
۲۵۰	۲۵۰	کلبسیلا پنومونیه

بحث

استفاده از گیاهان برای کنترل پیشرفت بیماری‌ها، همواره مورد توجه دانشمندان بوده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره آبی سیرموک، خواص آنتی باکتریایی علیه باکتری‌های مختلف به‌ویژه باکتری‌های گرم منفی و اثر ضد سرطانی بر روی سلول‌های سرطان پستان MCF-7 دارد. هر دو فعالیت ضد باکتریایی و ضد سرطانی عصاره با غلظت رابطه مستقیم داشت. بر اساس نتایج بیشترین قطر هاله عدم رشد باکتریایی مربوط به باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا و $(14/25 \pm 0/2)$ میلی‌متر) بود؛ همچنین کمترین میزان حداقل غلظت بازدارندگی عصاره نیز برای همین باکتری ثبت گردید. دو گونه سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس کمترین حداقل غلظت کشندگی (۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) را داشتند.

عصاره‌های گیاهی به دلایل مختلف نظیر اثرات ضد میکروبی روی طیف گسترده‌ای از ارگاناسم‌ها، قابلیت مصرف غذایی و کمتر بودن اثرات جانبی نسبت به مواد شیمیایی رایج می‌توانند به‌عنوان کاندید مناسبی برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها معرفی شوند (۶). فعالیت آنتی باکتریایی گیاه سیرموک در دنیا تاکنون بررسی نشده؛ اما اثرات سایر گیاهان جنس آلیوم روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی مطالعه شده است. در یک مطالعه عصاره سیر غنی

نتایج بررسی سمیت سلولی در این مطالعه نشان داد که در زمان ۲۴ ساعت، غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین درصد مهار را دارد و تفاوت آن نسبت به گروه کنترل معنادار بود. همه غلظت‌ها در زمان ۴۸ ساعت، رشد سلول را نسبت به کنترل به‌طور معناداری کاهش می‌دهد و در زمان ۷۲ ساعت در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رشد سلول سرطانی کاهش یافت؛ همچنین، با افزایش غلظت عصاره گیاه سیرموک و زمان تیمار درصد مهار رشد رده سلولی MCF-7 بیشتر می‌شود (نمودار ۴).



نمودار ۴- اثر عصاره آبی گیاه سیرموک بر درصد زیستایی رده سلولی MCF-7. نتایج بر اساس میانگین \pm انحراف معیار داده‌ها در غلظت‌های (۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در سه زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داده شده است. **تفاوت معنادار با $P < 0/05$ مقایسه در زمان‌های مختلف با گروه کنترل و ***تفاوت معنادار $P < 0/05$ در غلظت‌های مختلف با گروه کنترل

استافیلوکوکوس اورئوس خاصیت ضد میکروبی خوبی نشان دادند (۱).

عصاره اتانولی نسبت وجود یک‌لایه پپتیدوگلیکان قوی به‌جای یک‌لایه چربی در باکتری‌های گرم مثبت ممکن است مانع نفوذ ترکیبات عصاره به باکتری‌های گرم مثبت شود. صفحه پپتیدوگلیکان به‌طور قابل‌توجهی در باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت نازک‌تر است و باکتری‌های گرم منفی یک‌لایه چربی اضافی دارد که در باکتری‌های گرم مثبت وجود ندارد و نفوذ ذرات لیپوفیل موجود در عصاره، آسان‌تر است (۷ و ۲۸). فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها مربوط به گروه‌های هیدروکسیل فنلی متصل به ساختارهای حلقه ای این گروه از ترکیبات است؛ بنابراین، این مواد به عنوان احیا کننده، دهنده‌های هیدروژن، خنثی کننده‌های اکسیژن منفرد، جاروب کننده‌های رادیکال سوپروکسید و حتی به عنوان کلاته کننده‌های فلزی عمل می‌کنند (۲۶، ۲۳). در گونه *Allium vineale* ترکیبات فلاونوئیدی کرایزواربول (*Chrysoeriol*) و ایزورهمنتین-۳-بتا-دی-گلوکوزید (*Isorhamnetin-3-β-D-glucoside*) دارای اثر آنتی‌اکسیدانی بالا هستند (۳۲). بطور کلی ترکیبات زیستی اصلی در آیوم شامل ارگانوسولفورها، پلی‌فنول‌ها، فیبرها و ساپونین‌ها هستند که پلی‌فنول نسبت به ارگانوسولفورها پایداری بالاتر و عملکرد آنتی‌اکسیدانی بیشتری دارند (۲۵). ترکیبات پلی‌فنل نظیر اسیدفنولیک، فلاونوئید و لیگنن در گونه‌های آیوم می‌تواند در پیشگیری از بیماری‌های مزمن در انسان از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب مزمن نقش موثری داشته باشد (۱۲)

مهار رشد سلول سرطانی MCF-7 در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان ۷۲ ساعت تا ۷۰ درصد دیده شد؛ نکته قابل‌توجه این است که درصد مهار رشد سلول سرطانی در زمان ۴۸ ساعت نیز حتی در غلظت‌های پایین‌تر چشمگیر بود و بیانگر آن است که باگذشت زمان اثر مهاری عصاره بیشتر می‌شود و حتی غلظت‌های پایین

از آلیسین و آئین، فعالیت خوبی علیه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، در مقایسه با داروهای استاندارد نشان داده است. همین‌طور روغن سیر فعالیت ضد باکتریایی قابل‌توجهی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین داشته است (۳۰). در مطالعه Durairag و همکاران اثرات آنتی‌باکتریایی عصاره سیر در غلظت‌های مختلف علیه باکتری‌های گرم منفی *اشریشیا کلای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* تأیید شد که با نتایج تحقیق ما همخوانی دارد (۱۳).

در مطالعه Jalalvand و همکاران که به بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره اتانولی *Allium saralicum* پرداختند و ملاحظه نمودند که عصاره اتانولی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، امیکاسین، آمپی‌سیلین و ... خاصیت ضد باکتریایی قوی‌تری دارد؛ همچنین اثر ضد باکتریایی بر باکتری گرم منفی نسبت به گرم مثبت بیشتر است که با نتایج ما برابری دارد (۲۰). بکایان و همکاران اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی سیر *Allium sativum* را علیه ۱۷ نمونه از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از نواحی حلق و بینی بیماران بیمارستان‌های زابل و افراد غیر بیمارستانی بررسی نمودند؛ نتایج حاصل نشان داد که *استافیلوکوکوس* جدا شده مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، اریترومایسین، تری‌متوپیریم و آمیکاسین بودند؛ همچنین عصاره گیاهی سیر در غلظت ۲۵/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین اثر مهاری بر روی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* را داشت. در این میان غلظت‌های بکار رفته ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین اثر کشندگی را نشان داد که با نتایج ما همخوانی داشت (۴). الماسی و همکاران فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره متانولی سه گونه از جنس *Centaurea* بر چهار گونه باکتری گرم مثبت و منفی را ارزیابی نمودند و هیچ‌کدام از عصاره‌ها بر گونه‌های گرم منفی *سراشیا مارسنس* و *انتروباکتر آنروژنز* موثر نبود ولی تمام عصاره‌ها علیه

آبی سیر بر رشد سلول‌های سرطان حنجره نوع SCC(HEP-2) و سلول‌های غیر سرطانی L929 مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های مختلفی از عصاره آبی سیر در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت روی سلول‌ها اثر داده شد؛ نتایج نشان داد که غلظت‌های بالاتر عصاره پس از ۲۴ ساعت موجب تغییرات مورفولوژی در هر دو رده سلولی می‌شود و این تغییرات پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت تشدید می‌گردد؛ که با نتایج ما برابری می‌کند. هم‌زمان نتایج آزمون MTT نشان داد که همه غلظت‌های عصاره باگذشت زمان موجب کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌های زنده Hep-2 و L929 می‌گردد (۵). در مطالعه Isbilen بررسی فعالیت ضد تکثیری و سیتوتوکسیک *Allium autumnale P.H* روی رده سلولی سرطان پستان MCF-7 و MAD.MB.231 نشان داد که در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اثرات ضد تکثیری قابل توجهی بر هر دو رده داشت و همچنین در غلظت‌های بالاتر درصد مهار بیشتر می‌شود که با نتایج ما برابری می‌کند (۱۸). در مطالعه Bhandari فعالیت ضد سرطانی گیاه *Allium wallichii* روی سه رده سلولی سرطان پروستات، سرطان پستان MCF-7 و سرطان دهانه رحم Hela ارزیابی شد و IC_{50} آن در رده‌های سلولی بالا به ترتیب ۶۹/۶۹، ۲۹/۵۵ و ۴۶/۵۱ محاسبه گردید؛ لذا، می‌تواند یک کاندید مناسب برای استفاده به‌عنوان یک ضد سرطان باشد (۱۰).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش مشاهده شد که عصاره آبی گیاه سیرموک دارای خواص آنتی‌باکتریایی بر گونه‌های گرم منفی و ضد تکثیری بر رده سلولی سرطان پستان MCF-7 دارد که این فعالیت‌ها می‌تواند به دلیل ترکیباتی شیمیایی مختلف موجود در آن نظیر فنل‌ها و فلاونوئیدها است.

سپاسگزاری

مقاله حاضر برگرفته از پایان‌نامه مینو اسدی دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشگاه لرستان است. بدین

نیز رشد سلول‌های سرطانی را در زمان‌های بالاتر بهتر مهار می‌نماید. بسیاری از شواهد حاکی از آن است که گونه‌های *Allium* دارای اثرات ضد سرطانی است که این امر به دلیل قابلیت سرکوب کردن تومور در داخل بدن است. عصاره آبی گیاه سیرموک حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، فلاونوئیدی و ترکیبات ضد سرطانی بنابراین به طور قابل توجهی می‌تواند رشد سلول‌های سرطانی را مهار کند (۱۷).

در تحقیقی Motlagh و همکاران نشان دادند که عصاره گونه *Allium ascalonicum* اثرات ضد تکثیری و ضد رشدی بر سلول‌های تومور دارد؛ عصاره این‌گونه از آلیوم همچنین اثر سمیت کمی بر سلول‌های نرمال داشت (۲۴). نتایج تأثیر عصاره آبی سیر روی رده سلولی سرطان MCF7 نشان داد که بیشترین میزان مرگ سلولی در زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار با عصاره آبی سیر حاصل می‌شود که با نتایج ما همسانی دارد؛ یعنی هرچه زمان تیمار و غلظت افزایش یابد درصد مهار رشد سلولی بیشتر می‌شود (۲۹). چندین مکانیسم برای تفسیر اثرات ضد سرطانی سبزیجات تیره *Allium* و ترکیبات ارگانوسولفور موجود در آن‌ها شناخته شده است. این مکانیسم‌ها شامل مهار جهش از طریق مهار متابولیسم، مهار تشکیل تجمعات DNA، حذف رادیکال‌های آزاد، کاهش تکثیر سلولی و رشد تومور است. اگرچه شواهد زیادی برای تأیید انجام این مکانیسم‌ها توسط ترکیبات ارگانوسولفور سیر وجود دارد، با این وجود تحقیقات بیشتری برای یافتن ارتباط بین این مکانیسم‌ها با خاصیت ضد سرطانی این ترکیبات در حیوانات آزمایشگاهی لازم است (۱۸). Karasaki و همکاران گزارش نمودند که بعد از تیمار سلول‌های لنفومای هیستوکیستیک (U937) با دوزهای مختلف لکتین سیر به مدت 72 ساعت، نزدیک به ۳۰٪ سلول‌ها دچار آپوپتوز می‌شوند. حدس آن‌ها این بود که لکتین با اتصال به غشاء سلول‌های سرطانی اثرات سمی خود را اعمال می‌کند (۲۱). در تحقیق حاجی‌زاده و همکاران، اثر مهاری عصاره

فراهم نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

وسيله از دانشگاه لرستان که امکان انجام این تحقیق را

منابع

- ۱- الماسی، ن. کریمی، ف. کریمیان، ر. (۱۳۹۴). ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدان و ضد باکتریایی عصاره متانولی سه گونه از جنس *Centaurea L* از ایران. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۲۸(۲)، ۳۴-۴۱.
- ۲- امینیان، رقیه. دادودنیا، بهنام. مردانی، محسن. (۱۳۹۷). بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی باهنگ و ناخنک بر تعدادی باکتری گرم مثبت و گرم منفی. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۳۱(۳)، ۹۵۶-۹۶۷.
- ۳- بکائیان، محمد. فرازمنند، راضیه. کیتبادی، سمانه. سعیدی، سعید. (۱۳۹۴). بررسی اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی سیر *Allium sativum* بر روی سویه‌های استافیلوکوکس اورئوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۸(۱)، ۲۲۴-۲۳۴.
- ۴- حاج زاده، موسی الرضا. توکل افشاری، جلیل. قربانی، احمد. شاکری محمد تقی. (۱۳۸۵). بررسی اثر مهاری عصاره آبی سیر
- 7- Aissani N, Coroneo V, Fattouch S, Caboni P. Inhibitory effect of carob (*Ceratonia siliqua*) leaves methanolic extract on *Listeria monocytogenes*. *Agric food chem.* 2012; 10;60(40): 9954-8
- 8-Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infec.* 1999;1(2):125-9.
- 9- Benkeblia N, Lanzotti V. *Allium thiosulfonates*: chemistry, biological properties and their potential utilization in food preservation. *Food.* 2007;1(2):193-201. 3
- 10- Bhandari J, Muhammad B, Thapa P, Shrestha BG. Study of phytochemical, anti-microbial, anti-oxidant, and anti-cancer properties of *Allium wallichii*. *Complement Altern Med.* 2017;17(1):102.
- 11- Britton NL, Brown A. *An Illustrated Flora of the Northern United States: Canada and the British Possessions from Newfoundland to the Parallel of the Southern Boundary of Virginia, and from the Atlantic Ocean Westward to the 102d Meridian*: C. Scribner's sons; 1913. 10
- 12- Dammini K, Woo-Do L, Soo-Ki K. *Allium flavonols*: health benefits molecular targets and bioavailability. *Antioxidant.* 2020;9(9):888
- 13- Durairaj S, Srinivasan S, Lakshmanaperumalsamy P. In vitro antibacterial activity and stability of garlic extract at different pH and temperature. *Electron j biol.* 2009;5(1):5-10
- 14- El-Saber Batiha G, Magdy Beshbishy A, G Wasef L, Elewa YH, A Al-Sagan A, El-Hack A, et al. Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (*Allium sativum L.*): A review. *Nutrients.* 2020;12(3):872
- 15- Engelkirk P, Duben-Engelkirk J. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases Essentials of Diagnostic Microbiology.* 2008, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- 16- Gallagher W. FTIR analysis of protein structure. *Course manual Chem.* 2009 455.
- 17- Han MH, Lee WS, Jung JH, Jeong J.H, Park C, Kim HJ, Kim G, Jung JM, Kwon TK, Kim GY. Polyphenols isolated from *Allium cepa L.* induces apoptosis by suppressing IAP-1 through inhibiting PI3K/Akt signaling pathways in human leukemic cells. *Food Chem Toxicol.* 2013; 62, 382-389.
- 18- Isbilen O, Rizaner N, Volkan E. Anti-proliferative and cytotoxic activities of *Allium autumnale PH*) on human breast cancer cell

- lines MCF-7 and MDA-MB-231. *BMC Complement Altern Med.* 2018;18(1):30.
- 19- Iselt M, Holtei W, Hilgard P. The tetrazolium dye assay for rapid in vitro assessment of cytotoxicity. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.* 1989;39(7):747-9.
- 20- Jalalvand AR, Zhaleh M, Goorani S, Zangeneh MM, Seydi N, Zangeneh A, et al. Chemical characterization and antioxidant, cytotoxic, antibacterial, and antifungal properties of ethanolic extract of *Allium Saralicum* RM Fritsch leaves rich in linolenic acid, methyl ester. *J Photochem Photobiol B.* 2019; 192:103-12. 10
- 21- Karasaki Y, Tsukamoto S, Mizusaki K, Sugiura T, Gotoh S. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. *Food Res Int.* 2001;34(1):7-13.
- 22- Li Z, Lee D, Sheng X, Cohen RE, Rubner M.F. Two-Level Antibacterial Coating with Both Release-Killing and Contact-Killing Capabilities. *Langmuir.* 2006; 22: 9820-9823
- 23- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews.* 2010; 4(8): 118
- 24- Motlagh HR, Mostafaie A, Mansouri K. Anticancer and anti-inflammatory activities of shallot (*Allium ascalonicum*) extract. *Arch Med Sci.* 2011;7(1):38-44
- 25- Putnik, P.; Gabrić, D.; Roohinejad, S.; Barba, F.J.; Granato, D.; Mallikarjunan, K.; Lorenzo, J.M.; Kovačević, D.B. An overview of organosulfur compounds from *Allium* spp.: From processing and preservation to evaluation of their bioavailability, antimicrobial, and anti-inflammatory properties. *Food Chem.* 2019; 276, 680-691
- 26- Rao PS, Kalva S, Yerramilli A, Mamidi S. Free radicals and tissue damage: Role of antioxidants. *Free radicals and antioxidants.* 2011; 1(4): 2-7.
- 27- Riaz T, et al. FTIR analysis of natural and synthetic collagen. *Appl Spectrosc Rev.* 2018; 53(9): 703-746.
- 28- Satyavani K, Ramanathan T, Gurudeeban S. Green synthesis of silver nanoparticles by using stem derived callus extract of bitter apple (*Citrullus colocynthis*). *Dig J Nanomater. Biostruct.* 2011; 6:1019-1024
- 29- Shareef M, Ashraf MA, Sarfraz M. Natural cures for breast cancer treatment. *Saudi Pharm J.* 2016;24(3):233-40
- 30- Škrinjar MM, Nemet N T. Antimicrobial effects of spices and herbs essential oils. *Acta periodica technologica.* 2009; 40: 195-209
- 31- Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Viticult.* 1977; 28(1):49-55
- 32- Tunay K, Faik G, Ramaazan E. Theoretical study on flavonoids isolated from *Allium vineale*. 2018; 39(1):66-70
- 33- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 1999; 64(4):555-559

Antibacterial, anti-proliferative properties and phenol and flavonoid content analysis of aqueous extract of Sirmouk (*Allium canadense*)

Asadi M., Hadi F., Hejazi S.H. and Azarbani F.

Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University, Khorramabad, I.R. of Iran

Abstract

The use of medicinal plants is one of the most common treatments in traditional and modern medicine due to their various potential properties. In this study, phytochemical compounds, antibacterial, and anticancer activity of aqueous extract of *Allium canadense* were evaluated for the first time in the world. Total phenolic and flavonoid contents and functional groups of compounds were assessed using Folin-Sicalto, aluminum chloride colorimetric, and FTIR spectroscopy, respectively. Cytotoxicity effect of the different concentrations of extract 50, 100, 150 and 200 µg/ml at 24, 48, and 72 hours against the MCF-7 breast cancer cell line was determined based on MTT assay. Also, the antibacterial properties of the plant extract were evaluated by disk diffusion method, and minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by broth microdilution method. Phenolic and flavonoid contents of aqueous extract of the plant were $118/06 \pm 0/02$ mg/g of dried extract and $90/16 \pm 0/03$ mg/g quercetin per gram of dry extract, respectively. FTIR spectral analysis also showed the existence of biomolecules containing a hydroxyl group and aromatic ring. Treatment of breast cancer cells with different concentrations of Sirmouk extract showed anti-proliferation effects, which had the highest effect at 72 hours with 200 µg/ml and at 48 hours with 200 and 150 µg/ml. The aqueous extract had a more bactericidal effect on gram-negative which inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa* more than others. The positive effect of aqueous extract of Sirmouk against cancer cells and bacteria may be due to the presence of different compounds, like as phenol and flavonoid in the extract.

Key words: Antibacterial, Cytotoxicity, phenol content, flavonoid content, *Allium canadense*