علمی پژوهشی

مقایسه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در دو گیاه ریحان *(Ocimum basilicum)* و گل حنا *(Impatiens walleriana)* و بررسی خواص ضد میکروبی و ضد سرطانی آنها بر روی سرطان تخمدان

پریچهر حناچی[1*]، شقایق صالحی زاده [1]، ریحانه رمضانی [2]، خدیجه کیارستمی[3]، روشنک زرین قلمی[1]

۱- گروه بیوتکنولوژی، بخش بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۲- گروه پژوهشی بیومدیکال، بخش پژوهشکده زنان، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۳- گروه علوم گیاهی، بخش فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۸ /۱۱/۰۷ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۵/۱۱)

چکیده

سرطان تخمدان یکی از کشنده ترین سرطان ها در زنان محسوب می شود و باعث ایجاد سلول های غیرطبیعی سرطانی میشود که این سلول ها توانایی گسترش و حمله به سایر قسمت های بدن را دارا میباشد. متابولیت های ثانویه از لحاظ ساختاری و شیمیایی بسیار متنوع می باشند و نقش مهمی در درمان انواع سرطان ایفا می کنند. در این مطالعه عصاره دو گیاه تحت تأثیر سه حلال (آب، اتانول ۸۰ ٪ و متانول ۸۰ ٪) روش عصاره گیری خیساندن گرفته شد و با استفاده از روش فولین سیوکالتو، میزان ترکیبات فنلی و با روش های DPPH (دی فنیل پیکریل هیدرازیل) و FRAP (توانایی احیای آهن) فعالیت آنتی اکسیدانی دو گیاه سنجیده شد. سپس از بین حلال ها، حلال آب که دارای بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی بود جهت بررسی خواص ضد سرطانی بر روی سلول های سرطان تخمدان انتخاب گردید که کشنده ترین عصاره مربوط به عصاره آبی گیاه ریحان در ۷۲ ساعت با میزان IC50 برابر با ۰/۰۰۱ ± ۱/۱۰۵ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است. میزان ترکیبات فنلی در دو گیاه تحت تأثیر حلال متانول ۸۰ ٪ بیشترین میزان بود و بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی نیز در دو گیاه در حلال آب مشاهده شد. در بررسی خاصیت ضد میکروبی به روش انتشار دیسکی، این خاصیت فقط در عصاره های اتانولی دو گیاه دیده شد. در سنجش MIC (Minimum Inhibitory Concentration) و MBC (Minimum Bactericidal Concentration) عصاره های اتانولی و متانولی گیاه ریحان و در گل حنا در عصاره های آبی و اتانولی دارای بیشترین اثر بازدارندگی و همچنین کشندگی بودند.

کلید واژگان: ریحان، گل حنا ، خاصیت ضد سرطانی، خاصیت ضد میکروبی، خاصیت آنتی اکسیدانی

*مسئول مکاتبات: P.hanachi@alzahra.ac.ir

۱- مقدمه

سرطان تخمدان یکی از کشنده ترین و مرگبار ترین سرطان ها در خانم ها می باشد. این سرطان بیشتر در بانوان بین ٤٠ تا ٦٥ سال دیده می شود. در مراحل اولیه سرطان تخمدان علائم، مبهم و خفیف است. علائم این بیماری شامل ناراحتی در لگن یا شکم، اتساع، مشکل در غذا خوردن یا احساس سیری، افزایش اندازهٔ شکم یا تکرر ادرار می باشند. این بیماری به عنوان هفتمین سرطان رایج و هشتمین عامل مرگ و میر در بانوان شناخته شده است [۱]. بدن انسان در برابر رادیکال های آزاد که ممکن است منجر به انواع سرطان شود، دارای مکانیسم دفاعی می باشد که یکی از این مکانیسم ها استفاده از آنزیم های آنتی اکسیدان مانند سوپر اکسید دسموتاز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز می باشد. اما گاهی بدن به علت افزایش مقدار این رادیکال ها به تنهایی نمی تواند از آنها استفاده کند. عملکرد اصلی آنتی اکسیدان ها در به تاخیر انداختن اکسیداسیون مولکول های دیگر و حتی مهار شروع آن می باشد که در نهایت منجر به کاهش آسیب های اکسیداتیو ناشی از رادیکال های آزاد به بدن انسان می شود[۲،۳]. اخیرا با توجه به اثرات مفید آنتی اکسیدان ها، به ویژه آنتی اکسیدان های طبیعی، در درمان و پیشگیری از بیماری ها، علاقه ی زیادی به دستیابی به آنتی اکسیدان های طبیعی از منابع گیاهی وجود دارد. مطالعات بر روی گیاهان دارویی نشان می دهد که اکثر آنها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی هستند[٤].

گیاه دارویی ریحان *(Ocimum basilicum* L.) ، متعلق به خانواده نعناعیان و گیاهی علفی و یک ساله می باشد. معالجه نفخ شکم، برخی بیماریهای قلبی، بزرگ شدن طحال و همچنین کمک به هضم غذا، از جمله موارد استفاده گیاه ریحان است. این گیاه دارای خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی می باشد که از آن در صنایع آرایشی و بهداشتی نیز استفاده می شود. ترکیبات استخراج شده از گیاه ریحان مجموعه ای گسترده و متنوعی از ترکیبات شیمیایی را با توجه به تغییرات شیمیایی، رنگ برگ و گل، عطر و منشا گیاهان نشان می دهد؛ اجزای اصلی این ترکیبات عبارتند از: استراگول(estragol)، لینالول (linalool) و اوژنول(eugenol)؛ در طب سنتی به عنوان ضد اسپاسم معده تجویز می شوند[٥].

لازم به ذکر است که عصاره ریحان، بیشترین اثر را علیه سلول های HepG2، MCF-7 و Caco2 در مقایسه با عصاره های دیگر نشان می دهد. اثرات آنتی اکسیدانی و ضد انعقادی این گیاه و اثرات سینژستیکی احتمالی آن با داروهای شیمی درمانی معمولی مورد مطالعه قرار گرفته است[٦]. در یک مطالعه نشان داده شده است که ترکیبات موجود در ریحان به طور بالقوه منبع خوبی برای آنتی اکسیدان ها و مواد ضد سرطانی می باشد که در اینجا عصاره های ریحان را بر روی سلول های HL-60, NB4 و EACC اثر داده شد و که نتایج بیانگر این مسأله بود که عصاره ریحان دارای بیشترین اثر آنتی اکسیدانی بر روی رده های سلولی NB4 و HL-60 بود و حداقل اثر خود را روی رده سلولی EACC نشان داد[۷].

گیاه گل حنا *(Impatiens walleiana)* متعلق به خانواده Balsaminaceae می باشد که بومی شرق آفریقای گرمسیری است؛ البته در آمریکای شمالی و جنوبی، استرالیا و نیوزلند و همچنین جزایر اقیانوس آرام یافت شده است [۸]. از این گیاه برای درمان بیماری های پوستی به عنوان یک داروی موضعی استفاده شده است. گونه *Impatiens balsamina* دارای خاصیت تقویت گردش خون ، ضد قارچی ، آنتی هیستامین و ضد عفونت می باشد[۹].

ترکیبات فنلی، متابولیت ثانویه گیاهی هستند که نقش مهمی در مقاومت گیاه نسبت به محیط ایفا می کنند. ساختار شیمیایی آنها شامل یک حلقه آروماتیک متصل به یک یا چند گروه هیدروکسیل می باشد؛ این ترکیبات معمولا از اسید آمینه فنیل آلانین ساخته شده اند؛ این ترکیبات در تنظیم جوانه زنی بذر نقش دارند و در تنظیم رشد گیاهان همکاری

می کنند؛ همچنین در واکنش های دفاعی در طی عفونت، آفتاب بیش از حد، آسیب و استرس زیاد نقش دارند[۱۰].

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس متعلق به خانواده Staphylococcaceae می باشد و یک کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که مهمترین گونه در جنس (سرده) استافیلوکوک از نظر پزشکی محسوب می‌شود. کلنی باکتری، به شکل زرد طلایی است و هنگامیکه بر روی محیط آگار خوندار رشد می‌کند، ایجاد همولیز می‌نماید. استافیلوکوکوس اورئوس، توکسین هایی مانند توکسین آلفا، توکسین بتا و توکسین گاما را تولید می‌کند که موجب تجزیه غشای بسیاری از سلول‌های بدن می‌شود. استافیلوکوک اورئوس با تولید انتروتوکسین، ایجاد مسمومیت غذایی می‌کند. باکتری ممکن است به شکل همزیست بر روی پوست وجود داشته باشد.

هنگامی که سد پوستی از بین برود، باکتری به بافت حمله می‌کند و بیماری‌هایی مانند کورک و کفگیرک را ایجاد می‌کند. استافیلوکوک اورئوس در کودکان، عفونت شدید به نام سندرم پوستی فلسی شونده استافیلوکوکی را ایجاد می‌کند. از آنتی بیوتیک‌های آمینوگلوکوزیدی مانند جنتامایسین، استرپتومایسین و کانامایسین قبلا برای درمان این بیماری های ناشی از این باکتری استفاده می کردند اما امروزه این باکتری به این آنتی بیوتیک مقاوم شده و درمان با آنها جواب نمی دهد[۱۱].

هدف از این پژوهش علاوه بر اندازه گیری میزان ترکیبات فنلی تام و ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی دو گیاه ریحان و گل حنا توسط دو روش دی فنیل پیکریل هیدرازین (DPPH) و توانایی احیای آهن (FRAP)، بررسی اثر عصاره های مختلف گیاه ریحان و گل حنا بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به سه روش متفاوت شامل انتشار دیسکی ، حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) می باشد. بررسی اثر سایتوتوکسیکی این گیاهان بر روی رده سلولی SKOV3، از عصاره ای استفاده شد که بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را با توجه به تست DPPH دارا بود و برای بررسی این اثر از روش MTT استفاده شد. در این مطالعه برای اولین بار اثر عصاره آبی گل حنا را بر روی سلول های سرطانی تخمدان بررسی شد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- تهیه و آماده سازی نمونه

اندام هوایی گیاه *Impatiens walleriana* از بازار گل شهید محلاتی و اندام هوایی گیاه *Ocimum basilicum* از باغ گیاه شناسی تهران، در فصل بهار در سال ۱۳۹۶ تهیه شدند. نمونه های مورد آزمایش ابتدا در سایه خشک و سپس توسط آسیاب خرد شدند.

۲-۲- تهیه عصاره گیاهی به روش خیساندن

به ۱۰۰ میلی گرم از نمونه ، ۱۰ میلی لیتر از حلال (آب، متانول ۸۰ ٪ و اتانول ۸۰٪) اضافه و این مخلوط به مدت یک ساعت و نیم در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد درون حمام بن ماری قرارداده شد. سپس نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گشته و در آخر روشناور به وسیله کاغذ صافی جدا گردید[۱۲].

۲-۳- اندازه گیری میزان ترکیبات فنلی تام

محتوای فنلی کل بر اساس روش رنگ سنجی Folin-ciocalteau و با استفاده از گالیک اسید به عنوان استاندارد اندازه گیری شد. روش فولین سیوکالتو از متداول ترین روش ها برای سنجش میزان ترکیبات فنلی تام می باشد. اساس کار در این روش احیاء معرف فولین سیوکالتو توسط ترکیبات فنلی در محیط قلیایی است که با ایجاد یک کمپلکس آبی رنگ همراه است که حداکثر جذب خود را در طول موج ۷۵۶ نانومتر نشان می دهد[۱۳]. ابتدا محلول های استاندارد با غلظت ۲۰۰ mg/ml -۲۵ از محلول مادر گالیک اسید در آب مقطر تهیه شد. سپس به ۰/۲ میلی لیتر از محلول استاندارد، ml ۱ معرف فولین سیوکالتو رقیق شده (V/V ۱:۱۰) اضافه گردید. بعد از ۳۰ ثانیه هم زدن ۰/۸ میلی لیتر سدیم کربنات ۷ ٪ به آن اضافه شد و بعد از نگهداری به مدت ۹۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و تاریکی، جذب آنها در طول موج ۷۵۶ نانومتر خوانده شد و منحنی استاندارد آنها رسم شد. در مورد نمونه های مجهول، مقدار ml ۰/۲ از عصاره های گیاهی را برداشته و مطابق مراحل ذکر شده برای رسم منحنی استاندارد ، محتوای فنلی آنها بر حسب mg/g DW محاسبه شد.

۲-٤-ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی به وسیله دی فنیل پیکریل هیدرازین (DPPH)

دی فنیل پیکریل هیدرازیل یک رادیکال های آزاد پایدار است. در این روش توانایی دادن اتم هیدروژن یا یا الکترون توسط عصاره های موجود، از روی میزان تغییر رنگ محلول ارغوانی به محلول زرد رنگ سنجیده شد. غلظت های مختلفی از عصاره (mg/ml ۰/۲۵ ، ۰/۵ و ۱) را با متانول مطلق به حجم ml ۲ رسانده و سپس ml ۱ از محلول DPPH ۰/۰۰٤ ٪ (که به خوبی تکان داده شده است) به نمونه ها اضافه شد و در نهایت محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و با جایگزین کردن در فرمول زیر درصد رادیکال های آزاد پاکسازی شده (RSA%) محاسبه گردید. متانول مطلق برای صفر کردن دستگاه و نمونه ی حاوی ۲ میلی لیتر متانول مطلق و ۱ میلی لیتر DPPH به عنوان کنترل در نظر گرفته شد[۱٤].

$$RSA\% = \left(\frac{Acontrol - Asample}{Acontrtol}\right) \times 100$$

A_{sample} میزان جذب نمونه ، $A_{control}$ میزان جذب شاهد در طول موج ۵۱۷ نانومتر و RSA میزان فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل است. به جهت بررسی بهتر فعالیت آنتی اکسیدانی از فاکتور IC50 استفاده شد که بیانگر غلظتی از عصاره است که قادر به کاهش غلظت رادیکال آزاد DPPH اولیه به میزان ۵۰ ٪ است و هرچه مقدار آن کمتر باشد نشان دهنده میزان فعالیت بیشتر آنتی اکسیدانی است. 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 می آید.

۲-۵- اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها توسط توانایی احیای آهن (FRAP)

در این روش توانایی عصاره ها در احیای یون فریک (Fe^{3+}) در حضور آنتی اکسیدان ها بررسی می شود . با احیای یون فریک (Fe^{3+}) به یون های فرو (Fe^{2+}) در pH اسیدی و در حضور TPTZ ، کمپلکس آبی رنگ Fe – TPTZ تشکیل می شود. سپس میزان جذب نوری نمونه در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده می شود. روش FRAP اثر جمعی آنتی اکسیدان های آنزیمی و غیرآنزیمی را اندازه گیری کرده و شاخصی را برای توانایی ذاتی یک نمونه برای ممانعت از آسیب اکسیداتیو فراهم می کند [۱٤]. برای رسم منحنی استاندارد از $FeSO_4$ استفاده شد. اندازه گیری ظرفیت تام آنتی اکسیدانی بر اساس روشی که توسط Kaushik و همکاران (۲۰۱۲)پیشنهاد شده است، انجام گرفت .مقدار ۱/۵ میلی لیتر از معرف FRAP به هریک از لوله های آزمایش افزوده شد و لوله ها به مدت ۵ دقیقه درون بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند، سپس ۰/۱ میلی لیتر از عصاره گیاهی یا استاندارد سولفات آهن با غلظت ۱ میلی مولار به لوله های مذکور اضافه شد و لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه درون بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در انتها جذب نوری لوله ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد[۱۵].

۲-٦- آماده سازی نمونه های گیاهی جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی

۱۰۰ میلی گرم از نمونه را در ۵ میلی لیتر از حلال های خود (آب مقطر ، متانول ۸۰ ٪ و اتانول ۸۰ ٪) به مدت یک ساعت درون بن ماری قرار دادیم. سپس نمونه را به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ rpm قرار داده شد و در نهایت از محلول رویی برای بررسی فعالیت ضدمیکروبی استفاده شد و عصاره های حاصل با عبور از فیلتر با قطر ۰/۲ μ m استریل شدند.

۲-۷- فعال سازی باکتری جهت انجام پژوهش

یک جنس از باکتری استافیلوکوکوس از بانک میکروبی آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه الزهرا که دارای ATCC زیر بود به صورت فریز شده تهیه شد(جدول ۱). برای انجام آزمایش ابتدا باکتری درون محیط کشت نوترینت براث فعال شد که محیط حاوی باکتری به مدت ٢٤ ساعت در دما ۳۷ درجه درون انکوباتور قرار داده شد. سپس از باکتری های فعال شده سوسپانسیونی معادل با نیم مک فارلند (در هر ۱ سی سی معادل نیم مک فارلند $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ سلول باکتری وجود دارد.) تهیه شد.

Table 1 Pathogenic bacterial profile

Name	Gram	Standard Number
Staphylococus aureus	Gram- Positive	ATCC 25923

۲-۸- آزمون حساسیت ضد میکروبی به روش انتشار دیسکی

روش انتشار دیسکی به منظور غربال کردن فعالیت ضدمیکروبی عصاره های گیاهی با استفاده از روش بیان شده توسط چاکرابورتی و میترا با اندکی تغییر انجام شد به منظور انجام آزمایش ابتدا باکتری های مورد نظر در محیط کشت نوترینت براث فعال گردید .سپس از باکتری های فعال شده سوسپانسیونی معادل با نیم مک فارلند تهیه شد (در هر ۱ سی سی معادل نیم مک فارلند $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ سلول باکتری وجود دارد.) پس از تهیه سوسپانسیون از آن بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار به طور یکنواخت پخش گردید. سپس ۵۰ μl از غلظت های مختلف عصاره ها بر روی دیسک های

کاغذی که بر روی پلیت ها قرار داده گرفته بود، ریخته شد . در پایان پلیت ها در دمای مناسب برای هر باکتری به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور گذاشته شد[۱٦].

۲-۹- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

در این پژوهش برای تعیین MIC از روش Microdilution broth با اندکی تغییر استفاده شد در این روش برای ۷ میکروتیوپ سری رقت ساخته شد. سپس به تمام میکروتیوپ ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از میکروارگانیسم اضافه شد و به مدت ۲٤ ساعت درون انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. بعد از ۲٤ ساعت به میزان ۱۰ میکرولیتر از هر میکروتیوپ را بر روی پلیت های حاوی محیط کشت برده شد[۱۷].

۲-۱۰-کشت سلولی

رده سلولی SKOV3 (سلول سرطان تخمدان) از انستیتوپاستور ایران خریداری شد. پس از دفریز کردن در فلاسکهای ۲۵ سانتیمتر مربع کشت داده شدند. پس از پر شدن حدود ۸۰ ٪ کف فلاسک، ۱ میلی لیتر تریپسین اضافه کرده و به مدت ۱ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس جهت کند کردن عملکرد آنزیم تریپسین ۲ میلی لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ ٪ FBS به سلول ها اضافه شد. سپس سلول ها به داخل فالکون منتقل و سانتریفیوژ شدند و پس از خارج کردن محلول رویی شمارش شدند. پس از شمارش میزان ۸۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹٦ خانه اضافه شد و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید[۱۸].

۲-۱۱-آزمون MTT

جهت بررسی اثر سمیت اندام هوایی ریحان و گل حنا بر رشد و تکثیر سلولهای سرطانی و فیبروبلاستی و تعیین IC50 این ترکیبات، از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. نمک MTT یک نمک تترازولیوم محلول در آب است و هنگامیکه این ترکیب در محیط کشت فاقد فنول رد یا بافر PBS حل می شود، ترکیب زرد رنگی را ایجاد می کند. اساس این سنجش شکستن نمک MTT توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلولهای زنده است. نتیجه این فعالیت ایجاد بلورهای نامحلول فورمازان ارغوانی رنگ است که توسط دی متیل سولفوکساید (DMSO) به صورت محلول در امده است .هرچه سلولها فعالتر و تعدادشان بیشتر باشد میزان رنگ ایجاد شده بیشتر خواهد بود. جذب نوری با استفاده از دستگاه Multi-Mode (Cytation™Biotek, USA) Microplate Reader خوانده شده است. رنگ ارغوانی ظاهر شده در طول موج ٥٤۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خواننده الیزا اندازه گیری شد.

پس از گذشت ۲٤ ساعت، غلظتهای مختلف عصاره آبی ریحان و گل حنا(۰/٥ mg/ml، ۱ mg/ml، ۲ mg/ml، ۳ mg/ml، ٤ mg/ml و ٥ mg/ml) را به هر چاهک افزوده و در دوره های زمانی متفاوت ۲٤ و ٤۸ و ۷۲ ساعت انکوبه گردید. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT آماده شده اضافه شد و به مدت ۲ ساعت دیگر در انکوباتور نگهداری شد. سپس محلول روئی از هر چاهک حذف و مقدار۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک افزوده شد و بلورهای فورمازان توسط سوسپانسیون به طور کامل حل شده و سرانجام جذب نوری در طول موج ٥٤۰ نانومتر توسط دستگاه خواننده الیزا اندازه گیری گردید. درصد سلولهای زنده با استفاده از کنترل از روش فرمول زیر محاسبه می گردد[۱۸].

$$\text{درصد سلول های زنده} = \frac{\text{میانگین جذب نوری سلول های تیمار شده با دارو}}{\text{میانگین جذب نوری سلول های کنترل}} \times 100$$

IC_{50} پس از رسم منحنی با به کار گیری غلظت های مختلف عصاره و درصد سلول های زنده محاسبه گردید.

۲-۱۲- تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایش های انجام شده برای سنجش ترکیبات فنلی کل و ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی در این پژوهش براساس طرح آماری بلوک های کاملا تصادفی در ۳ تکرار طراحی شده اند. بعد از انجام هر سنجش، داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲٤ در سطح احتمال $P<0/05$ تجزیه و تحلیل شدند. براساس نوع عوامل مورد آزمایش به کمک تجزیه واریانس یک طرفه برای طرح یک عامل (ANOVA) میانگین ها مقایسه و معنی دار بودن اختلاف بین میانگین ها تعیین گردید و داده ها به کمک آزمون چند دامنه ای دانکن گروه بندی شدند.

۳- نتایج

۳-۱- مقدار کل ترکیبات فنلی

نتایج حاصل از بررسی میزان ترکیبات فنلی عصاره های حاصل از دو گیاه ریحان و گل حنا در حلال های آبی ، متانولی و اتانولی که با روش خیساندن عصاره گیری شده بودند نشان داد داد که بیشترین میزان این ترکیبات در ریحان mg / g DW ۲۸ /۹٤ ± ۲/۷٦ و تحت اثر حلال متانول و در گل حنا نیز mg / g DW ۱/۹۷ ± ۳۳/۵۸ و تحت اثر حلال متانول بود که تفاوت معنی داری را در سطح P < ۰/۰۵ نشان داد. شکل ۱ نمودار مقایسه میزان ترکیبات فنلی در دو گیاه ریحان و گل حنا را نشان می دهد.

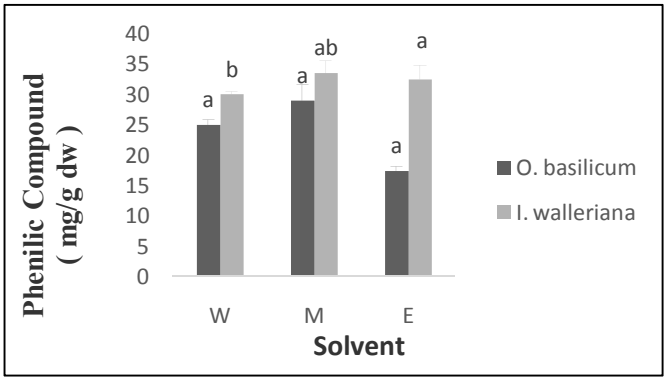

Fig 1 Phenolic content of *Ocimum basilicum* and *Impatiens walleriana* extracts (Water: W, Methanol: M, Ethanol: E) using water bath method. The values with different superscript letters in a column are significantly different (p<0.05).

۳-۲ مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها به وسیله دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)

در این بررسی باید به این نکته توجه کنیم که در این تست هرچه مقدار IC_{50} کمتر باشد میزان این فعالیت بیشتر می باشد. نتایج نشان داد که فعالیت آنتی اکسیدانی در ریحان mg/ml ۰/٦٤ ± ۱/٤۸ = IC_{50} و با حلال آب بود و در گل حنا بیشترین میزان این فعالیت نیز با حلال آب و به میزان mg/ml ۰/۰۳ ± ۱/۰۹ = IC_{50} اندازه گیری شد که تفاوت معنی داری را در سطح P < ۰/۰۵ نشان داد. درنتیجه این تست میزان فعالیت آنتی اکسیدانی ویتامین ث را mg / ml ۰/۰۸ ± ۰/۸۷ = IC_{50} اندازه گیری شد. شکل ۲ نمودار مقایسه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در دو گیاه ریحان و گل حنا را نشان می دهد.

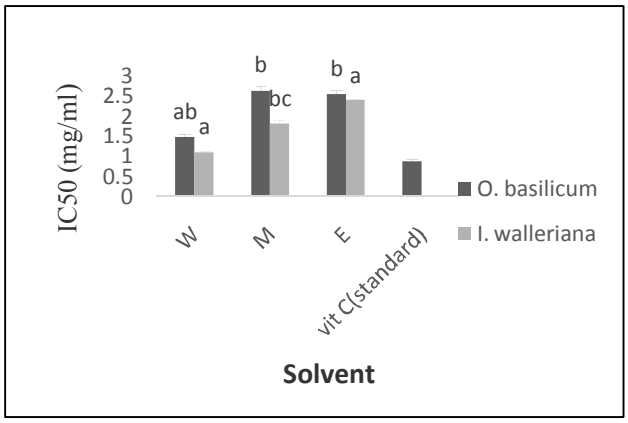

Fig 2 Antioxidant properties (IC50) of Ocimum basilicum and Impatiens walleriana extracts (Water: W, Methanol: M, Ethanol: E) using water bath method. The values with different superscript letters in a column are significantly different (p<0.05).

۳-۳ مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها به وسیله اندازه گیری توان آنتی اکسیدانی احیاء آهن (FRAP)

میزان فعالیت عصاره های حاصل از دو گیاه *Ocimum basilicum* و *Impatiens walleriana* در حلال های آب، متانولی، اتانولی، که با روش استخراج خیساندن عصاره گیری شده بودند نشان داد که بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در گیاه ریحان mM ۰/۱۱ ± ۰/۸۷۸ و در گل حنا این فعالیت برابر با mM ۰/۰۳ ± ۱/۳۰ می باشد که هر دو تحت اثر حلال آب و روش عصاره گیری خیساندن می باشد که تفاوت معنی داری را در سطح P< ۰/۰۵ نشان داد (شکل ۳).

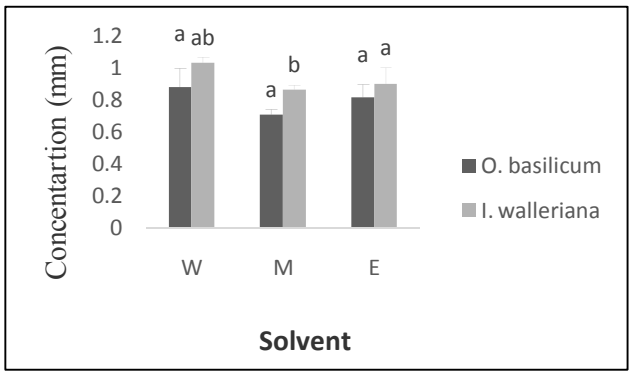

Fig 3 Antioxidant properties (FRAP) of *Ocimum basilicum* and *Impatiens walleriana* extracts (Water: W, Methanol: M, Ethanol: E) using water bath method. The values with different superscript letters in a column are significantly different (p<0.05).

۳-٤- نتایج مربوط به آزمون حساسیت ضد میکروبی

در روش انتشاردیسکی هاله ی عدم رشد در عصاره اتانولی گل حنا در غلظت mg/ml DW ۱۰ و mg/ml DW ۲۰ و در عصاره اتانولی گیاه ریحان در غلظت mg/ml DW ۲۰ مشاهده شد(جدول۲).

Table 2 Zone of inhibition (mm) of *Ocimum basilicum* and *Impatiens walleriana* extracts on *Staphylococcus aureus* (* indicates a significant difference).

5 mg/ml DW	10 mg/ml DW	20 mg/ml DW	Concentration / Solvent	Plant
-	-	-	Water	***Ocimum basilicum***
-	-	-	Methanol	
-	-	$7 \pm 0/2$ * mm	Ethanol	
-	-	-	Water	***Impatiens walleriana***
-	-	-	Methanol	
-	$3 \pm 0/3$ * mm	$9 \pm 0/3$ * mm	Ethanol	

۳-۵-نتایج مربوط به بررسی و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

در این بررسی کوچکتر بودن میزان MIC و MBC به معنی بالاتر بودن اثر آنتی باکتریال است. همانطور که در جدول شماره ۳ نشان داده شده است عصاره های اتانولی و متانولی گیاه ریحان دارای بیشترین اثر بازدارندگی و همچنین کشندگی هستند که این خاصیت در مورد گل حنا در عصاره های آبی و اتانولی دیده می شود.

Table 3: MIC (minimum inhibitory concentration) and MBC (minimum bactericidal concentration) of *Ocimum basilicum* and *Impatiens walleriana* extracts against *Staphylococcus aureus*

MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	Solvent	Plant
0/562	0/281	Water	***Ocimum basilicum***
0/140	0/140	Methanol	
0/140	0/140	Ethanol	
2/25	1/125	Water	***Impatiens walleriana***
4/5	2/25	Methanol	
2/25	1/125	Ethanol	

۳-٦- نتایج به دست آمده از آزمون MTT

استفاده از روش کشت سلولی درک بهتری از تأثیر داروهای مختلف بر روی رده های سلولی سرطان های مختلف به ما می دهد. در طی این پژوهش با استفاده از میزان جذب های خوانده شده در رده های سلولی SKOV3 درصد سلول های زنده مانده (Viability) پس از اثر دهی عصاره های آبی ریحان و گل حنا و انجام تست MTT محاسبه گردید. شکل ۲ اثر سیتوتوکسیک غلظت های مختلف ریحان در زمان های مختلف را نشان می دهد و شکل ٤ بیانگر اثر سیتوتوکسیک غلظت های مختلف گل حنا در زمان های مختلف می باشد.

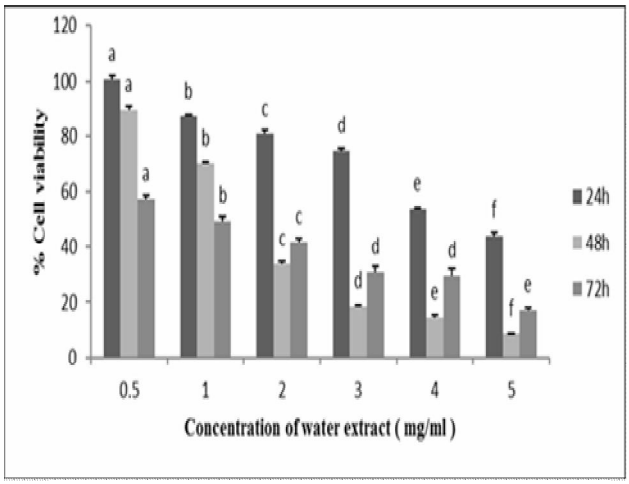

Fig 4 Cytotoxic effect of different concentrations of *Ocimum basilicum* aqueous extract at different time (24, 48 and 72 h) on SKOV3 cell line. The values with different superscript letters in a column are significantly different ($p<0.05$).

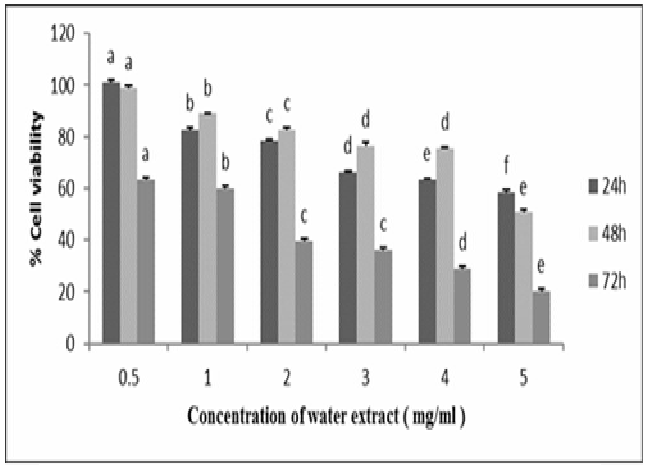

Fig 5 Cytotoxic effect of different concentrations of *Impatiens walleriana* aqueous extract at different time (24, 48 and 72 h) on SKOV3 cell line. The values with different superscript letters in a column are significantly different ($p<0.05$).

نتایج نشان داده است که عصاره آبی گیاه ریحان در مقایسه با گروه شاهد باعث کاهش معناداری در میزان درصد زنده ماندن سلول ها و IC50 سلول هاس سرطانی SKOV3 در بازه زمانی ٤٨ تا ٧٢ ساعت شده است . در بازده زمانی ٢٤ ساعت با اینکه کاهشی چشم گیری در میزان درصد سلول های زنده مانده و IC50 سلول های سرطانی SKOV3 مشاهده نشده است اما شاهد وجود تفاوت معنی داری در سطح احتمال $p < ٠/٠٥$ می باشیم. غلظت های ٠/٥mg/ml، ١ mg/ml، ٢ mg/ml، ٣ mg/ml، ٤ mg/ml و ٥ mg/ml در بازه زمانی ٧٢ ساعت و غلظت های ١ mg/ml، ٢ mg/ml، ٣ mg/ml، ٤ mg/ml و ٥ mg/ml در بازه زمانی ٤٨ ساعت باعث کاهش معناداری در درصد سلول های زنده مانده و IC50 های سرطانی SKOV3 شده اند. کمترین میزان IC50 عصاره آبی گیاه ریحان مربوط به بازه زمانی ٧٢ ساعت و برابر ١/١٠٥ ± ٠/٠٠١ mg/ml می باشد.

در مورد گیاه گل حنا، غلظت های عصاره آبی این گیاه در مقایسه با گروه شاهد باعث کاهش معناداری در میزان درصد زنده ماندن سلول ها و IC50 سلول های سرطانی SKOV3 در بازه زمانی ٤٨ تا ٧٢ ساعت شده است. در غلظت های ٠/٥ mg/ml، ١ mg/ml، ٢ mg/ml، ٣ mg/ml، ٤ mg/ml و ٥ mg/ml در بازه زمانی ٧٢ ساعت شاهد تفاوت معنی دار در درصد زنده ماندن سلول ها و IC50 در سطح احتمال $p < ٠/٠٥$ می باشیم. کمترین میزان IC50 عصاره آبی گیاه گل حنا مربوط به بازه زمانی ٧٢ ساعت و برابر ١/٦٨ ± ٠/٠٠٢ mg/ml می باشد. جدول ٤ میزان IC50 مربوط به سلول های سرطانی SKOV3 که تحت تأثیر عصاره آبی ریحان و گل حنا در بازه های زمانی متفاوت قرار گرفته اند را نشان می دهد.

Table 4 Comparison between the IC50 SKOV3 cell line *Ocimum basilicum* and *Impatiens walleriana* at different time (* are significantly different in $p < 0.05$)

72h IC_{50} mg/ml	48h IC_{50} mg/ml	24h IC_{50} mg/ml	Plant
1/105 ± 0/001*	2/752 ± 0/001*	8/754 ± 0/002*	Ocimum basilicum
1/680 ± 0/002*	5/790 ± 0/001*	9/945 ± 0/001*	Impatiens walleriana

٤- بحث

سیستم حلال متانول ٨٠ ٪ بیشترین محتوای فنولی را برای گیاه ریحان در بر داشت در صورتی که برای گل حنا بیشترین میزان ترکیبات فنولی در حلال اتانول ٨٠ ٪ مشاهده شد که می توان این نتیجه را گرفت که حلال های آلی بیشترین راندمان را در استخراج ترکیبات فنولی از گیاه ریحان و گل حنا دارد. خواص اکسیداسیون – احیا ترکیبات فنلی نقش مهمی در خنثی سازی رادیکال های آزاد و جذب آنها و همچنین مهار کردن پراکسیداز های تجزیه کننده دارد[١٩]. همان طور که نتایج به ما نشان داد، میزان ترکیبات فنلی درون حلال های آلی بیشترین مقدار را داشت و به این می تواند به این دلیل باشد که توانایی استخراج این ترکیبات توسط این حلال ها ، هنگامی که آن ها با آب ترکیب می شوند (اتانول ٨٠ ٪ و متانول ٨٠ ٪) بالا می باشد و در نهایت با ایجاد محیط قطبی توانستند این ترکیبات را که به میزان متوسط قطبی می باشند، استخراج نمایند[٢٠].

گفته می شود یکی از دلایلی که باعث افزایش ترکیبات فنلی در استخراج عصاره به روش خیساندن می شود تجزیه ی پلی فنل های سنگین وزن به انواع ترکیبات با وزن مولکولی کمتر می باشد. با افزایش دمای روش استخراج و حلال، ضریب انتشار نیز افزایش می یابد و در نهایت باعث افزایش حلالیت ترکیبات فنلی خواهد شد. در سال ١٣٩٧ سمیعی و همکاران

میزان مهار کنندگی رادیکال آزاد گیاه ریحان را ۳۱/۲ ٪ گزارش کردند . همچنین اظهار داشتند که هرچه میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی یک گیاه زیاد باشد ، میزان فعالیت آنتی اکسیدانی آنها نیز زیاد خواهد بود[۲۱].

به دلیل اینکه هر گیاه ترکیبات شیمیایی متفاوتی را دارد مقایسه آنها با هم از نظر فعالیت آنتی اکسیدانی پیچیده می باشد. به همین علت در این مطالعه از دو روش جهت بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های حاصل از گیاهان استفاده شد. در تمام عصاره های حاصل از دو گیاه ریحان و گل حنا با سه حلال مختلف مشاهده شد که بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی مربوط به حلال آب بود. می توان به این موضوع اشاره کرد که افزایش درصد مهارکنندگی رادیکال های آزاد عصاره های مختلف در اثر حرارت دهی ممکن است به دلیل باز شدن ساختمان پروتئین های موجود در آنها در اثر رخ دادن دناتوراسیون جزئی باشد که باعث این امر می شود تا آمینواسید هایی که دارای گروه جانبی سولفوردار هستند مانند متیونین و یا آمینواسیدهای آروماتیک مثل: تریپتوفان که پروتون را راحت تر از سایر آمینواسید ها رها می کنند در دسترس بیشتری قرار می گیرند. فعالیت ضد رادیکالی گیاهان را می توان به وجود مونوترپن های اکسیژن داری نظیر لینالول و لینالیل استات نسبت داد به شکلی که اگر غلظت این مواد در گیاهان بالا برود میزان فعالیت مهار کنندگی نیز در آنها بالا می رود. از طرفی این ترکیبات با سایر موادی که در اسانس گیاهان وجود دارد خاصیت سینرژیستی آنتی اکسیدانی دارند. مثلا لینالول و اوژنول در کنار هم دارای خاصیت سینرژیستی آنتی اکسیدانی هستند و همچنین بر روی سایر ترکیبات فعال اثر گذاشته و فعالیت آنها را نیز افزایش می دهد که می توان قوی عمل کردن ریحان در حضور رادیکال های آزاد را به حضور این دو ماده نسبت داد [۲۲].

اصولا با افزایش ترکیبات فنلی تام خاصیت آنتی اکسیدانی آنها نیز بیشتر می شود. ترکیبات فنلی با وزن مولکولی زیاد توانایی زیادی برای پاکسازی رادیکال های آزاد را دارند و این توانایی بستگی به تعداد حلقه های آروماتیک و ماهیت گروه های جا به جا شونده هیدروکسیل دارد. نظر به این که گیاهان یکی از منابع مهم آنتی اکسیدان ها می باشند، تحقیقات در این زمینه رو به افزایش می باشد.گیاهانی که غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی بوده می توانند باعث حفاظت از سلول ها در برابر آسیب های اکسیداتیو شوند. آنتی اکسیدان های طبیعی باعث افزایش قدرت آنتی اکسیدان های پلاسما و کاهش ابتلا به بعضی بیماری ها مانند سرطان، بیمارهای قلبی و سکته مغزی می شوند. Juliani و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در ریحان بنفش بیشتر از گونه ریحان سبز می باشد همچنین این را هم گزارش کردند که میزان این فعالیت با میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی رابطه مستقیم دارد[۲۳].

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های حاصل از اندام هوایی گیاهان که با حلال های مختلف تهیه شده بود با دو روش FRAP و DPPH بررسی شد که با توجه به مطالعات سایر محققین توقع این امر می رفت که با توجه به اینکه ترکیبات فنلی در حلال متانول بیشتر بود میزان این فعالیت نیز در این حلال بیشتر باشد اما در هر دو روش و در هر دو گیاه حلال آب بهترین نتیجه را به ما داد که نارسایی روش های مورد استفاده و حل نشدن برخی از ترکیبات فنلی در آب می تواند علت این امر باشد.

در بررسی اثر و خاصیت ضد میکروبی و سنجش MIC و MBC گیاهان گل حنا و ریحان نتایج به این شکل بود که عصاره های اتانولی و متانولی گیاه ریحان دارای بیشترین اثر بازدارندگی و همچنین کشندگی هستند که این خاصیت در مورد گل حنا در عصاره های آبی و اتانولی دیده می شود. اما در روش انتشاردیسکی هاله ی عدم رشد در گیاه ریحان در غلظت mg/ml DW ۲۰ عصاره اتانولی دیده شد و در گیاه گل حنا فقط در عصاره اتانولی و در غلظت های mg/ml DW ۲۰ و mg/ml DW ۱۰ مشاهده شد. خاصیت ضدمیکروبی گیاهان عموما به دلیل وجود ترکیبات ساپونین، فنلی و فلاونوئیدی موجود در آنها است. برخی از این عوامل روی غشاء پلاسمایی یا روی مهار آنزیم های غشایی میکروارگانیسم ها موثر هستند و می تواند خاصیت ضدمیکروبی خود را اعمال نماید [۲٤].مکانیسم دقیق فعالیت ضد باکتریایی عصاره های گیاهی هنوز به طور کامل بررسی نشده است و این طور به نظر می رسد که ترکیبات فنلی گیاهان بوسیله تغییر در ساختار و عمل غشای سلولی فعالیت ضدباکتریایی خود را اعمال می کنند. مطالعات نشان می دهد که ترکیبات فنلی باعث افزایش نفوذ پذیری غشای سلولی می شوند و در نتیجه سلول متورم شده و از بین می رود. در

باکتری های گرم مثبت نظیر استافیلوکوکوس اورئوس مواد ضد میکروبی و نیز ترکیبات فنلی به راحتی دیواره سلولی باکتری و غشای آن را تخریب می کنند و باعث نشت مواد درون باکتری به محیط بیرون می شود. از دیگر فعالیت های ضد میکروبی ترکیبات فنلی توانایی آنها در شکل دهی ترکیبات محلول با پروتئین ها می باشد و باعث خراب کردن گیرنده های سطحی باکتری شده و در آخر سنتز پروتئین در باکتری را با اختلال مواجه می کند[۲۵]. نتایج حاصل از بررسی MIC نشان داد که در گیاه ریحان عصاره آبی نسبت به سایر عصاره ها و در گل حنا عصاره متانولی نسبت به سایر عصاره ها اثر ضد باکتریایی قوی تری دارند. با توجه به اینکه در عصاره متانولی گل حنا نیز بیشترین میزان ترکیبات فنلی به دست آمده است می توان این نتیجه را گرفت که در این گیاه یک وابستگی مثبت میان ترکیبات فنولی و فعالیت ضد میکروبی گیاه وجود دارد. در سال ۲۰۱۸ سمیعی و همکارانش خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی گیاه ریحان و زردچوبه را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش باکتری های گرم مثبت مقاومت کمتری نسبت به باکتری های گرم منفی نشان دادند. وجود یک غشا خارجی در باکتری های گرم منفی باعث این مقاومت شده است؛ در واقع این دیواره باعث محدود شدن انتشار ترکیبات هیدروفوبیک عصاره های گیاهی به لایه پلی ساکاریدی می شود. آنها همچنین گزارش دادند ترکیباتی که در عصاره ها وجود دارد به غشا باکتری نفوذ کرده و در نهایت باعث مرگ باکتری می شوند. همچنین در سال ۱۳۹۷ سمیعی و همکاران میزان مهار کنندگی رادیکال آزاد گیاه ریحان را ۳۱/۲ ٪ گزارش کردند و اظهار داشتند که هرچه میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی یک گیاه زیاد باشد ، میزان فعالیت آنتی اکسیدانی آنها نیز زیاد خواهد بود [۲۱]. Juliani و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در ریحان بنفش بیشتر از گونه ریحان سبز می باشد همچنین این را هم گزارش کردند که میزان این فعالیت با میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی رابطه مستقیم دارد[۲۳].

بر اساس گزارشی که سازمان جهانی بهداشت منتشر کرده است حدود ۸۰ ٪ از جمعیت جهان از دارو و روش های سنتی برای درمان بیماری های خود استفاده می کنند. ۷۸ ٪ از موادی که دارای خاصیت ضد با کتری هستند و ۷٤ ٪ از موادی که دارای ترکیبات و خواص ضد سرطانی هستند، مواد طبیعی هستند و یا از آنها مشتق شدند. برخی از داروهای ضد سرطانی که از گیاهان تهیه شدند شامل: وینکریستین، آیرینوتکان و اتوپوزاید می باشند. از گیاهان دارویی به عنوان ترکیبات راهنما در سنتز داروها و یا به شکل مستقیم استفاده می شوند. در آسیا ٦۲ – ٤۰ درصد از افرادی که به بیماری سرطان مبتلا هستند به استفاده از داروهای گیاهی به شکل عصاره تمایل دارند که این امر به این علت است که طی تحقیقاتی که بر روی این بیماران انجام دادند مزایای استفاده از این داروهای گیاهی به مراتب بیشتر از معایب آنها می باشد [۲٦].

Kehkashan Arshad و همکارانش (۲۰۱۰) توانستند بر روی سلول های سرطانی سینه رده MCF – 7 مطالعه ای انجام دهند و اثر ضد سرطانی ریحان را بررسی کنند. آنها در نتیجه ی تحقیقات خود به این موضوع پی بردند که عصاره متانولی ریحان دارای خاصیت ضد سرطانی بوده و توانسته سلول های سرطانی سینه را مهار کند. از سویی دیگر این حلال با قطبیت بالا توانسته میزان بالایی از ترکیبات فنولی را استخراج کند که این بخش از تحقیقات آنها با نتایج ما مشابه بود؛ به این شکل که حلال متانول برای ریحان و اتانول برای گل حنا بیشترین میزان ترکیبات فنولی را در بر داشتند [۲۷].

در مطالعه Zarlaha و همکاران (۲۰۱٤) بر روی سلول های سرطانی HeLa و SKOV3 ، خاصیت ضد سرطانی و کشندگی عصاره اتانولی گیاه ریحان را بررسی کردند . در این مطالعه اثر برخی ترکیبات موجود در ریحان بر رو ی این سلول ها بررسی شد و به این نتیجه رسیدند که رزمارینیک اسید ، لینالول و کافئیک اسید موجود در گیاه ریحان بر روی سلول های سرطانی تخمدان اثر گذاشته و در یک بررسی مولکولی به این موضوع پی بردند که کافئیک اسید بیشترین خاصیت ضد سرطانی داشته و نیز دارای خاصیت مهاری بر روی سنتز DNA دارد که اثر آن بر سلول های سرطان تخمدان بیشتر از سلول های HeLa می باشد[۲۸].

تحقیقات صادقی و همکارانش در سال 2015 نشان داده است گیاهان تیره نعنا بهخصوص گونه های متفاوت ریحان به دلیل اینکه غنی از ترکیبات ثانویه با فعالیت آنتیاکسیدانی (ترکیبات فن، فلاونوئیدی، تریپنوئید ها و آنتوسیانین ها) می باشند دارای خواص ضد التهابی و ضد سرطانی هستند و اثر ضد سرطانی آنها بر روی سرطان سینه (MCF7) و سرطان کولون (Caco-2) تأیید شده است [۲۹].

۵- نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از این پژوهش بیانگر این امر است که حلال های مورد استفاده که دارای قطبیت و ترکیبات شمیایی متفاوتی هستند در میزان فعالیت آنتی اکسیدانی آنها اثر می گذارند. نتایج مربوط به بررسی اثر ضد سرطانی عصاره آبی ریحان و گل حنا نشان دهنده ی این امر است که این گیاهان در غلظت های بالاتر دارای خاصیت ضد سرطانی هستند و در مدت زمان طولانی تری اثر خود را می گذارند . مزیت این امر این است که می توان مطمئن بود که خاصیت کشندگی مربوط به متابولیت های گیاه است نه ترکیب شیمیایی حلال چرا که حلال های الکلی در غلظت های بالا توان آسیب زدن و حتی کشتن سلول های سالم را دارا می باشند. نظر به این که گیاهان یکی از منابع مهم آنتی اکسیدان ها می باشند، تحقیقات در این زمینه رو به افزایش می باشد .گیاهانی که غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی بوده می توانند باعث حفاظت از سلول ها در برابر آسیب های اکسیداتیو شوند. آنتی اکسیدان های طبیعی باعث افزایش قدرت آنتی اکسیدان های پلاسما و کاهش ابتلا به بعضی بیماری ها مانند سرطان ، بیمارهای قلبی و سکته مغزی می شوند. پیشنهاد می شود که از این گیاهان به عنوان یک داروی گیاهی استفاده شود چرا که داروهای شیمیایی دارای اثرات جانبی و همچنین هزینه بر می باشند.

٦- منابع

[1] Noori-Daloii, M. R., & Rashvand, Z. 2010. Molecular genetics and gene therapy in ovarian cancer Ofogh-e-Danesh. GMUHS Journal. 16(3) : 5 – 20

[2] Sholiche W. (20170 . Phytochemical screening and antioxidant activity of ethanolic extract and ethyl acetate fraction from basil leaf (*Ocimum basilicum* L.) by DPPH radical scavenging method . Material science and Engineering . 1 – 11 .

[3] Hanachi P, Zarringhalami R, Tamijani RR. Investigation of Antioxidant Properties of *Polygonatum orientale* Desf and *Tilia dasystyla* Extracts by Different Methods and Solvents. Hormozgan Medical Journal. 2018 Dec 31;22(4).

[4] Chirag, P., Tyagi, S., Halligudi, N., Yadav, J., Pathak, S., Singh, S. P. and Shankar, P. 2013.Antioxidant activity of herbal plants: a recent review .Journal of Drug Discovery and Therapeutics. 1(8) : 1 – 8 .

[5] Abou El-soud n. , Deabes M. , Abou El-Kassem L. and Khall M. (2015). Chemical composition and antifungal activity of *Ocimum basilicum* L. essential oil. Medical Sciences Journal. 3(3): 374-379.

[6] Mahmoud GI. Biological effects, antioxidant and anticancer activities of marigold and basil essential oils. Journal of Medicinal Plants Research. 2013 Mar 10;7(10):561-72.

[7] Fitsiou E, Mitropoulou G, Spyridopoulou K, Tiptiri-Kourpeti A, Vamvakias M, Bardouki H, Panayiotidis MI, Galanis A, Kourkoutas Y, Chlichlia K, Pappa A. Phytochemical profile and evaluation of the biological activities of essential oils derived from the Greek aromatic plant species *Ocimum basilicum*, *Mentha spicata*, *Pimpinella anisum* and *Fortunella margarita*. Molecules. 2016 Aug;21(8):1069.

[8] Mandle L. , Warren D. , Hoffmann N. , Peterson D. , Schmitt A. and Wettberg E. (2010). conclusions about niche expansion in introduced *Impatiens walleriana* populations depend on method of analysis.

[9] Kang, S.-N., Goo, Y.-M., Yang, M.-R., Hag Ibrahim, R., Cho, J.-H., Kim, I.-S., and Lee, O.-H. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extract from the stem and leaf of *Impatiens balsamina* L. (*Balsaminaceae*) at different harvest times . Journal of Molecules.18(6) : 6356 – 6365 .

[10] Kumar S. and Pandey A. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. The ScientificWorld Journal.

[11] Oliveira, J. L. T. M. d., M. d. F. M. Diniz, E. d. O. Lima, E. L. d. Souza, V. N. Trajano and B. H. C. Santos .(2009) . Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. Brazilian Archives of Biology and Technology .52(1): 45-50 .

[12] Motalleb G., Hanachi P., Kua SH., Fauziah O. and Asmah R. (2005). Evaluation of phenolic content and total antioxidant activity in *Berberis vulgaris* fruit extract. Journal of Biological Science. 5(5): 648-653.

and interaction of the essential oils of *Curcuma longa* and *Ocimum basilicum* on some pathogenic bacteria. Food Science and Technology journal.15(74) : 99 – 107.

[22] Tooryan , F., & Azizkhani, M. (2017). Antioxidant effect of the aerial parts of basil (*Ocimum basilicum*) and clary sage (*Salvia sclarea*) essential oils in Iranian white cheese Iranian Food Science and Technology Journal.13(2) : 346 – 362 .

[23] Juliani H.R. and Simon J.E. 2002 . Antioxidant Activity of Basil . Trends in new crops and new uses. 575 – 579 .

[24] Morrissey, J. P. and A. E. Osbourn (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63(3): 708-724.

[25] Shekouh Saremi E. , Habibi Najafi M.B. , Hadad Khodaparast M.H. and Baheini M. (2018) .Effect of extraction methods on phenolic content and antimicrobial properties of *Pimpinella affinis* leaf . Research Journal .14(1) : 59 – 68 .

[26] Dorosti, N., Zarabi, S., Ahmadi, S., Rostami, R., & Rashidi Pour, M. (2017). " Anticancer activity evaluation of methanolic extract of *Allium Jesdianum* and *Nectaroscordeum Coelzi* against HeLa and K562 cell lines". Journal of Yafteh.1(71) : 31 – 41.

[27] Kehkashan Arshad, Q., Ahsana , D., Bina S. , S., Nurul, K., Huma, A., Shakil, A., Sabira, B. 2010. Anticancer activity of *Ocimum basilicum* and the effect of ursolic acid on the cytoskeleton of MCF-7 human breast cancer cells.Journal of Letters in Drug Design & Discovery. 7(10) : 726 – 736 .

[28] Zarlaha, A., Koupkoumelis, N., & Stanojkovik, T. 2014. Cytotoxic activity of essential oil and extract of *Ocimum basilicum* against human carcinoma cells. Molecular docking study of isoeugenol as a potent cox and lox inhibitor. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures . 9(3) : 907 – 917

[29] Sadeghi, Z., Valizadeh, J., Azizian Shermeh, O. and Akaberi, M.)2015(. "Antioxidant activity and total phenolic content of *Boerhavia elegans* (choisy) grown in Baluchistan, Iran" . Avicenna Journal of Phytomededicine. 5(1): 1 – 9.

[13] Biju, J., Suliaman, C., Satheesh, G.and Reddy, V. (2014). Total phenolics and flavonoids in selected medicinal plants from Kerala. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 14(1) : 406 – 408 .

[14] Safafar H. , Wagene J. , Moller P. and Jacson C. (20150 . Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on IndustrialWastewater . Mrine drugs journal . 13(12): 7339 – 7356 .

[15] Kaushik, A., Jijta, C., Kaushik, J. J., Zeray, R., Ambesajir, A.and Beyene, L. (2012). FRAP (Feric reducing ability of plasma) aasay and effect of *Dilazium esculentum* (Retz) Sw.

[16] Chakraborty, M. and A. Mitra .(2008). The antioxidant and antimicrobial properties of the methanolic .extract from *Cocos nucifera mesocarp*. Food Chemistry 107(3): 994-999.

[17] Mazzola, P. G., A. F. Jozala, L. C. d. L. Novaes, P. Moriel and T. C. V. Penna .(2009). Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 45(2): 241-248.

[18] Hanachi P. , Kua S.H. , Asmah R. , Motalleb G. and Fauziah O. 2006 . Cytotoxic effect of Berberis vulgaris fruit extract on the proliferation of human liver cancer cell line (HepG2) and its antioxidant properties. International journal of cancer research . 2(1) : 1 – 9 .

[19] Abdkhani S. and solooki M. (2016) . Changes in phenolic compounds, anthocyanins and antioxidant enzymes in different stages of *Ocimum basilicum* growth under the influence of growth reguators . Medicinal plants J . 15 (2): 164 – 175 .

[20] Chirinos R. , Rogez H. , Campos D. , Pedreschi R. and LarondelleY. (2007) . Optimization of extract conditions of antioxidant phenolic compound from mashua(*Tropaeolum tuberosum Ruiz* and *Pavon*) tubers.Separation and purification technology . 55(2):217 – 225.

[21] Sameie A. , Tabatabie-Yazdi F. and Mazaheri Tehrani M.(2018) . An investigation into the antioxidant activity, phenolic compounds, antimicrobial effect

Comparison of antioxidant and anti-bacterial activities of *Ocimum basilicum* and *Impatiens walleriana* and their anticancer properties on SKOV-3 cancer cell line

Hanachi, P. [1*], Salehizadeh, Sh.[1], Ramezani, R. [2], Kiarostami, Kh.[3], Zarringhalami, R.[1]

1. Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, IRAN
2. Biomedical Research group, Women's Research Center, Alzahra University, Tehran, IRAN
3. Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, IRAN

(Received: 2020/01/27 Accepted: 2020/08/01)

Ovarian cancer is one of the deadliest cancer in women causing abnormal cancerous cells that can spread and metastasize to other parts of the body. Secondary metabolites are highly variable in terms of structural and chemical properties and they are very important for plants survival. In this study, the extracts of *Ocimum basilicum* and *Impatiens walleriana* using three different solvents (water, ethanol 80% and methanol 80%) and water bath extraction method were obtained. phenolic compounds of extracts were determined by Folin Sioculto method. DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) and FRAP (Ferric reducing ability of plasma) methods were performed for determination of antioxidant properties. The amount of phenolic compounds in two plants was higher in 80% methanol solvent and the most antioxidant activities were observed in water solvent of extracts. Water solvent had the highest antioxidant activity and was selected to investigate the anti-cancer properties of extracts on ovarian cancer cell line. Water extract of *Ocimum basilicum* within72 hours had the highest cytotoxic effect with an IC50 value of 1.105 ± 0.001 mg / ml. In current study, antimicrobial activities of extracts were determined on *staphylococcus aureus* by disc diffusion method. The highest antibacterial properties was observed only in ethanol extracts of two plants. In the measurement of MIC and MBC, ethanol and methanol extracts of *Ocimum basilicum* and water and ethanol extracts in *Imatiens walleriana* had the most inhibitory and bactericide effects.

Key words: *Ocimum basilicum* , *Impatiens walleriana* , Anticancer, Antimicrobial, Antioxidant

[*] Corresponding Author E-Mail Address: P.hanachi@alzahra.ac.ir