بررسی اثرروش استخراج با حلال‌های آب و اتانول بر بازدهٔ استخراج، ترکیبات فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصارهٔ گیاه پولک

محمد نوشاد[1*]، بهروز علیزاده بهبهانی[1]، سمیرا دهقانی[2]

1- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

2- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

(تاریخ دریافت: 98/07/20 تاریخ پذیرش: 98/09/11)

چکیده

گیاه پولک با نام علمی *Stachys schtschegleevii*در طب سنتی ایران برای درمان عفونت‌های باکتریایی، تب روماتیسمی و بیماری‌های التهابی‌استفاده می‌شود. در این پژوهش، از روش استخراج خیساندن با کمک حلال‌های اتانول و آب جهت تهیهٔ عصارهٔ گیاه پولک استفاده گردید و بازده استخراج، میزان فنول کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره‌هامورد ارزیابی قرار گرفت. عصارهٔ اتانولی گیاه پولک بازده استخراج بالاتری نسبت به عصارهٔ آبی نشان داد (0/27 ± 8/8 درصد در برابر 0/33± 6/9 درصد). میزان ترکیبات فنولی کل عصاره اتانولی نیز بالاتر از عصارهٔ آبی بود (0/28 ± 55/35 در برابر 0/62± 49/4 میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک عصاره). فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر حسب IC_{50}نشان داد که عصارهٔ اتانولی به دلیل ترکیبات فنولی بالاتر، قادر است رادیکال‌های آزاد را به طور مؤثرتری در مقایسه با عصارهٔ آبی غیرفعال و خنثی کند. نتایج آزمون‌های ضدمیکروبی (دیسک دیفیوژن آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی) نشان داد که باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا اینوکوا*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* حساسیت بیشتری نسبت به عصارهٔ اتانولی داشته و در غلظت برابر عصاره‌های آبی و اتانولی، باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوا*) نسبت به انواع باکتری‌های گرم منفی (*اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا*) حساسیت بالاتری نشان دادند. بنابراین عصارهٔ گیاه پولک غنی از ترکیبات فنولی و با فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی قابل توجه می‌تواند به عنوان افزودنی و به منظور افزایش ارزش تغذیه‌ای و عمر نگهداری محصولات غذایی استفاده شود.

کلید واژگان: گیاه پولک، عصاره، فعالیت ضدمیکروبی، نگهدارندهٔ طبیعی.

*مسئول مکاتبات: Noshad@asnrukh.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-05-22]

[DOI: 10.52547/fsct.17.100.117]

1- مقدمه

فعالیت میکروارگانیسم‌ها و واکنش‌های اکسیداسیون به عنوان عوامل اصلی در کاهش کیفیت فراورده‌های غذایی شناخته شده‌اند[1]. افزایش نگرانی‌ها در ارتباط با سلامت مواد غذایی به دلیل شیوع چشمگیر بیماری‌های ناشی از پاتوژن‌های غذایی، وجود بقایای سموم شیمیایی در مادهٔ غذایی، عدم تأثیرگذاری نگهدارنده‌های شیمیایی بر برخی از باکتری‌های آلوده‌کننده از جمله*لیستریا مونوسیتوژنز*، تمایل به استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی را افزایش داده است. کاهش نیاز به آنتی‌بیوتیک‌ها، کنترل آلودگی‌های میکروبی، افزایش زمان ماندگاری و تقویت ایمنی سلول‌ها از جمله فواید ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی با منبع گیاهی، حیوانی و میکروبی می‌باشد[2 و 3]. اسانس و عصاره‌های استخراج شده از بخش‌های مختلف گیاه علاوه‌بر ایجاد عطر و طعم، به دلیل فعالیت ضدمیکروبی سبب بهبود ایمنی مادهٔ غذایی شده[4]و فعالیت آنتی‌اکسیدانی فنول‌ها و سایر ترکیبات موجود در این ترکیبات به تثبیت اسیدهای چرب آزاد و افزایش ماندگاری مادهٔ غذایی کمک می‌کند [5].

گیاه پولک با نام علمی ***Stachys schtschegleevii*** متعلق به خانوادهٔ ***Labiatae*** با بیش از 300 گونه در جهان در مناطق شمالی و شمال غرب ایران یافت می‌شود. این گیاه در طب سنتی ایران به عنوان درمانی برای عفونت‌های باکتریایی، تب روماتیسمی و بیماری‌های االتهابی تنفسی مورد استفاده قرار گرفته [6] و خاصیت ضد درد و ضد التهاب عصارهٔ متانولی آن گزارش شده است [7]. همچنین گزارش‌های مختلفی از وجود اثر ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های استخراج شده از برخی گونه‌های مختلف این گیاه ارائه گردیده است[7، 8 و 9]. اسکالتا و همکاران (2003)، اسانس حاصل از 8 گونهٔ وحشی***Stachys***در یونان را به روش هیدرولیزاسیون استخراج و فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها را بر برخی از پاتوژن‌های غذایی از جمله*اشرشیا کلی*بررسی کردند[10].

با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در مورد تأثیر روش استخراج با حلال‌های آب و اتانول بر ویژگی‌های ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ گیاه پولک انجام نشده است و بیشتر پژوهش‌های انجام شده در ارتباط با اسانس حاصل از گونه‌های مختلف پولک و بررسی خواص آن‌ها بوده، هدف از این پژوهش تهیهٔ عصاره‌های آبی و اتانولی این گیاه و بررسی خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های به دست آمده می‌باشد.

2- مواد و روش

2-1-شناسایی گیاه

تأیید و شناسایی گیاه پولک در بخش گیاه‌شناسی (پژوهشکده علوم گیاهی)، دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت. گیاه پولک در شرایط مناسب خشک شده و برای عصاره‌گیری پودر شدند.

2-2- تهیهٔ عصاره

عصاره‌های آبی و اتانولی با استفاده از روش خیساندن تهیه شد. به این ترتیب که میزان 100 گرم از گیاه پودر شده به 500 میلی‌لیتر آب یا اتانول 96 درصد اضافه گردید. مخلوط پودر-اتانول به مدت 24 ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری و هر چند ساعت هم زده شد. مخلوط آبی به مدت 20 دقیقه با شعلهٔ کم حرارت داده شد. محلول رویی جمع‌آوری شده از هر یک از مخلوط‌ها به مدت 10 دقیقه با سرعت 3000 دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. حجم عصاره‌های به دست آمده (محلول رویی) توسط اتانول و آب به مقادیر اصلی رسیده و پس از عبور از کاغذ واتمن (0/45 میکرون) جهت انجام آزمون‌های مختلف در ظروف در بسته، دور از نور و در یخچال نگهداری شدند [11].

2-3- اندازه‌گیری وزن خشک عصاره

برای این منظور، ابتدا وزن لولهٔ خالی اندازه‌گیری و سپس 1 میلی‌لیتر از عصارهٔ آبی یا الکلی به لوله اضافه گردید و در دمای اتاق خشک شد. بعد از خشک شدن، وزن لولهٔ حاوی عصاره اندازه‌گیری و اختلاف وزن آن‌ها محاسبه شد. میانگین حاصل از 3 تکرار به عنوان وزن خشک عصاره گزارش گردید [12].

2-4- اندازه‌گیری فنول کل

به منظور اندازه‌گیری میزان کل فنول موجود در عصاره از روش فولین- سیوکالچو استفاده شد. ابتدا 50 میکرولیتر از هر عصاره (در 3 تکرار) به 2/5 میلی‌لیتر از معرف فولین- سیوکالچو (رقت 1/10) و 2 میلی‌لیتر سدیم کربنات (7/5 درصد حجمی/وزنی) اضافه و به مدت 15 دقیقه در دمای 45 درجه سانتی‌گرادگرمخانه‌گذاری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج 765 نانومتر ثبت و نتایج بر حسب میلی‌گرم گالیک‌اسید موجود در هر گرم وزن خشک گیاه پودر شده گزارش گردید [13].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-05-22]
[DOI: 10.52547/fsct.17.100.117]

2-5- فعالیت آنتی‌اکسیدانی

یک میلی‌لیتر از عصاره‌های آبی و الکلی پولک به 2 میلی‌لیتر از محلول 0/004 درصد رادیکال DPPHاضافه گردید. مخلوط هم زده شد و به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. جذب نمونه‌ها در طول موج 517 نانومتر ثبت و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی (AA%) طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$AA\% = 100 - \{[(Abs_{sample} - Abs_{blank})\times 100] / Abs_{control}\}$$

از متانول (2 میلی‌لیتر) و محلول عصاره (1 میلی‌لیتر) به عنوان شاهد(Abs_{blank})و محلول DPPH(2 میلی‌لیتر) و متانول (1 میلی‌لیتر) به عنوان کنترل ($Abs_{control}$) استفاده شد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال بر اساس میزان آنتی‌اکسیدان‌های مورد نیاز جهت کاهش جذب اولیهٔ DPPH به میزان 50 درصد بیان شد. مقدار IC_{50} برای هر نمونه با ترسیم درصد مهار رادیکالDPPH به عنوان تابعی از غلظت نمونه تعیین گردید [14].

2-6- اندازه‌گیری فعالیت ضدمیکروبی

باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش شامل *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریااینوکوا*بوده که از آزمایشگاه میکروبیولوژی، گروه علوم ومهندسی صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تهیه گردید. 24 ساعت قبل از انجام آزمون‌های ضدمیکروبی، باکتری‌ها به محیط نوترینت آگار تلقیح شدند. پس از 24 ساعت، محیط کشت با محلول رینگر استریل شستشو داده شد و سوسپانسیون میکروبی تهیه گردید. سپس مقداری از سوسپانسیون در لوله‌های استریل حاوی محلول رینگر ریخته شد و کدورت آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 530 نانومتر اندازه‌گیری گردید. سوسپانسیون میکروبی تا رسیدن به استاندارد 0/5 مک فارلند ($1/5\times 10^8$Colony Forming Unit/mL) با محلول رینگر رقیق‌سازی شد [15].

2-6-1- روش دیسک دیفیوژن آگار[1]

در این روش ابتدا سطح پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار توسط هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه پوشانده شد. سپس دیسک‌های آغشته شده به غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و اتانولی (6/25، 12/5، 25 و 50 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در سطح باکتری‌ها قرار داده شدند. پس از تثبیت دیسک‌ها بر روی محیط، پلیت‌ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گرادگرمخانه‌گذاری شدند. پس از اتمام زمان گرمخانه‌گذاری قطر هاله‌ها اندازه‌گیری گردید [16].

2-6-2- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی[2]

ابتدا یک کشت تازه معادل $1/5\times 10^8$ CFU/ml (0/5 مک فارلند) تهیه گردید. رقت‌های متوالی (1/56، 3/125، 6/25، 12/5، 25، 50، 100 و 200 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از هر یک از عصاره‌های آبی و الکی با استفاده از محیط مولر هینتون براث تهیه گردید. 125 میکرولیتر از هر یک از رقت‌های تهیه شده به پلیت‌های 96 خانه‌ای حاوی سوسپانسیون میکروبی (استاندارد 0/5 مک فارلند) انتقال داده شد. پلیت‌ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. پس از گرمخانه‌گذاری، 25 میکرولیتر از معرف تری‌فنل‌تترازولیوم[3] (غلظت 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. اولین غلظتی که در آن پس از نیم ساعت تغییر رنگی مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش گردید [17].

2-6-3- تعیین حداقل غلظت کشندگی[4]

به منظور اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی رقت‌های بدون تغییر رنگ در هر یک از چاهک‌های روش حداقل غلظت مهارکنندگی به صورت جداگانه بر محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از 24 ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای 37 درجه سانتی‌گراد،غلظتی که در آن هیچگونه باکتری مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش گردید [18].

2-7- آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل نتایج این پژوهش با کمک نرم افزار (SPSS) Statistical package for social scienceنسخه 18 صورت پذیرفت. از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن در سطح اطمینان 95 درصد ($p<0.05$) جهت تشخیص معنی دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها استفاده شد. لازم به ذکر است که تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند.

1. Disk diffusion agar

2. Minimum inhibitory concentration
3. Triphenyltetrazolium chloride
4. Minimum bactericidal concentration

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-05-22]

[DOI: 10.52547/fsct.17.100.117]

3- نتایج و بحث

میزان بازده استخراج ترکیبات زیست فعال از گیاهان دارویی تحت تأثیر فرایندهای مختلف استخراج می‌باشد [19]. در این مطالعه، فرایند استخراج خیساندن ترکیبات زیست فعال از گیاه پولک به ترتیب سبب تولید عصاره‌های آبی و اتانولی با راندمان 0/33 ±6/9 درصد و 0/27±8/8 درصد شد که بیانگر تأثیر بالقوه و مؤثرتر استخراج با حلال اتانول در استخراج ترکیبات مؤثر و زیست فعال از گیاه پولک می‌باشد. این حالت ممکن است ناشی از ماهیت آبگریزی ترکیبات فنولی و زیست فعال گیاهان دارویی باشد [20] که احتمالاً دارای ضریب نفوذ بیشتری در حلال‌های آلی مانند اتانول نسبت به آب می‌باشند. بازده بالاتر استخراج با اتانول در مقایسه با استخراج با آب در مطالعات مختلف گزارش شده است [21].

معرف فولین- سیوکالچو به طور گسترده جهت تخمین فنول کل موجود در عصاره‌های گیاهی استفاده می‌شود[22]. میزان فنول استخراجی به نوع حلال مورد استفاده در عصاره‌گیری وابسته می‌باشد [23 و24].میزان فنول کل حاصل از عصارهٔ اتانولی و عصارهٔ آبی گیاه پولک به ترتیب 0/28± 55/35 و 0/62± 49/4 میلی‌گرم گالیک اسید در یک گرم عصارهٔ خشک بود. سطح بالای فنول عصارهٔ اتانولی در مقایسه با عصارهٔ آبیمی‌تواند به دلیل استخراج اسیدهای فنولیک محلول غیرقطبی و نیمهقطبی توسط حلال‌های آلی (مانند اتانول و متانول) در مقایسه با حلال‌های قطبی مانند آب باشد[25]. نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج حاصل از پژوهش‌های مختلف در تطابق می‌باشد. دو و همکاران(2014)، مقادیر بالای فنول موجود در عصاره‌های اتانولی گیاه لیمونفیلا آروماتیکا (*Limnophila Aromatica*)در مقایسه با عصاره‌های آبی این گیاه را به دلیل وجود ترکیبات غیرفنولی یا ترکیبات فنولی با گروه‌های فعال کمتر در عصاره‌های آبی بیان کردند [26]. همچنین پیرز و همکاران (2007)، با تأکید بر تأثیر نوع حلال بر میزان فنول استخراجی، بیشترین میزان فنول به دست آمده از عصارهٔ برگ رزماری را با استفاده از حلال‌های اتانول و متانول گزارش کردند[27]. ترکیبات فنولی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بالقوه‌ای می باشند و به همین دلیل امروزه از این ترکیبات به عنوان افزدونی‌های ایمن جهت کنترل واکنش اکسیداسیون و رشد میکروبی در محصولات غذایی مختلف استفاده می‌شود [28 و 29].

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه پولک بر اساس IC_{50} به ترتیب برابر با 0/5±298/22 میکروگرم بر میلی‌لیتر و 0/65±285/68 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. به طور کلی هرچه میزان بازدارندگی بر اساس IC_{50} کمتر باشد، ترکیب مورد نظر دارای اثر آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری می‌باشد [30]. به این ترتیب، عصارهٔ اتانولی گیاه پولک با مقدار IC_{50}کمتر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری داشته و نقش مؤثرتری در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کند. همانطور که در بخش میزان فنول کل نیز به آن اشاره گردید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی عمدتاً ناشی از ترکیبات فنولی آن‌ها می‌باشد؛ بنابراین، عصارهٔ اتانولی گیاه پولک مقدار ترکیبات فنولی بیشتری داشته و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن نیز مطابق انتظار از عصارهٔ آبی بالاتر بود که در راستای نتایج مارتینز و همکاران (2011)، می‌باشد[19]. در مطالعه‌ای که توسط نصراللهی و همکاران (2019) در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌های آبی و اتیل استات گیاه پولک صورت گرفت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (بر اساس آزمون‌های فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و جلوگیری از اکسیداسیون بتا-کاروتن) عصارهٔ اتیل استات نسبت به عصارهٔ آبی بالاتر بود[31]. رادیکال‌های آزاد، گونه‌های به شدت واکنشگری می‌باشند که با هر نوع مولکول موجود در سامانه‌های بیولوژیک مجاور خود واکنش می‌دهند. رادیکال‌های آزاد سبب تخریب پروتئین‌ها، شکسته شدن رشته‌های DNA و آغاز پراکسیداسیون ترکیبات مختلف می شوند و می‌توانااشاره کرد کهاکثر ترکیبات حیاتی سلول‌ها، مستعد تخریب توسط رادیکال‌های آزاد می‌باشند [25]. مطابق نتایج پژوهش حاضر، عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه پولک می‌توانند به عنوان منبعی غنی از ترکیبات فنولی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه جهت کنترل اکسیداسیون مواد غذایی حاوی اسیدهای چرب غیراشباع و همچنین خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد به کار گرفته شوند.

مقاومت میکروارگانیسم‌ها به آنتی‌بیوتیک یکی از مهمترین مشکلاتی است که صنایع غذایی و دارویی با آن مواجه می‌باشند. بنابراین، ترکیبات ضدمیکروب طبیعی با حداقل اثرات جانبی از بهترین انتخاب‌های موجود برای جایگزینی مواد نگهدارنده و آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی می‌باشند [32]. اثر ضدمیکروبی عصاره‌های اتانولی و آبی گیاه پولک به روش دیسک دیفیوژن آگار در جدول 1، آورده شده است. عصارهٔ آبی پولک در غلظت 6/25 میلی‌گرم در میلی‌لیتر خاصیت

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-05-22]

[DOI: 10.52547/fsct.17.100.117]

ضدمیکروبی روی باکتری‌های مورد مطالعه نشان نداد. اگرچه غلظت مشابه عصارهٔ اتانولی گیاه تأثیر ضدمیکروبی بر *سودوموناس ائروژینوزا* و *اشرشیا کلی* نداشت، اما برخلاف عصارهٔ آبی اثر ضدمیکروبی قابل توجهی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوا* نشان داد. علاوه بر این، غلظت 12/5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصارهٔ آبی فاقد اثر بازدارندگی در برابر رشد باکتری‌های *سودوموناس ائروژینوزا* و *اشرشیا کلی* بود. در غلظت برابر 50 میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره‌های آبی و اتانولی، بالاترین و کمترین قطر هالهٔ عدم رشد به ترتیب برای *لیستریا اینوکوا* و *اشرشیا کلی* مشاهده گردید. قطر هالهٔ عدم رشد به طور معنی داری ($p<0.05$) با افزایش غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی افزایش یافت و در غلظت مشابه، عصارهٔ اتانولی اثر بازدارندگی بالاتری نسبت به عصارهٔ آبی نشان داد. در حقیقت، ترکیبات مؤثر ضدمیکروبی در عصاره‌ها و اسانس‌های روغنی گیاهان دارویی دارای ماهیت آبگریز می‌باشند و استخراج اتانولی نیز دارای قابلیت استخراج ترکیبات غیرقطبی و نیمه قطبی می‌باشد. بنابراین انتظار می‌رود که ترکیبات ضدمیکروبی بیشتری در عصارهٔ اتانولی گیاه پولک وجود داشته باشند که در راستای مشاهدات سورشجانی و همکاران (2015)،علیزاده بهبهانی و طباطبایی یزدی (2015)، می‌باشد. این محققین گزارش کردند که عصارهٔ اتانولی گیاه مرزهٔ بختیاری و بیلهر (کندل کوهی) دارای اثر ضدمیکروبی بالاتری نسبت به عصارهٔ آبی می‌باشد[33 و 34].

Table 1 *In vitro* antibacterial effect of *Stachys schtschegleevii* ethanolic and aqueous extracts based on disk diffusion agar method

Microorganism type	Aqueous extract (mg/mL)			
	6.25	12.5	25	50
Escherichia coli	-[a]	-[a]	8.10 ± 0.53[b]	10.80 ± 0.67[c]
Pseudomonas aeruginosa	-[a]	-[a]	8.60 ± 0.71[b]	10.90 ± 0.68[c]
Listeria innocua	-[a]	8.30 ± 0.32[b]	11.10 ± 0.26[c]	14.10 ± 0.39[d]
Staphylococcus aureus	-[a]	8.00 ± 0.48[b]	10.70 ± 0.28[c]	13.30 ± 0.50[d]
	Ethanolic extract (mg/mL)			
	6.25	**12.5**	**25**	**50**
Escherichia coli	-[a]	7.00 ± 0.21[b]	9.10 ± 0.50[c]	11.40 ± 0.82[d]
Pseudomonas aeruginosa	-[a]	7.10 ± 0.59[b]	9.40 ± 0.54[c]	12.00 ± 0.77[d]
Listeria innocua	7.10 ± 0.24[a]	10.00 ± 0.32[b]	13.30 ± 0.20[c]	16.00 ± 0.41[d]
Staphylococcus aureus	6.60 ± 0.71[a]	9.90 ± 0.78[b]	12.90 ± 0.67[c]	15.10 ± 0.88[d]

Means within the same row with different small letters differ significantly ($p<0.05$).

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصارهٔ گیاه پولک در جدول 2، گزارش شده است. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه پولک در برابر *سودوموناس ائروژینوزا* برابر با 50 میلی‌گرم در میلی‌لیتر و *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با 12/5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. علاوه‌براین، عصاره‌های اتانولی و آبی حداقل غلظت کشندگی برابری در برابر *سودوموناس ائروژینوزا* (100 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (50 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نشان دادند. با اینحال، عصارهٔ اتانولی در مقایسه با عصارهٔ آبی، در غلظت مهارکنندگی و کشندگی کمتری سبب جلوگیری از رشد و عدم ظهور کلنی باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *لیستریا اینوکوا* گردید.

مطابق نتایج آزمون‌های ضدمیکروبی دیسک دیفیوژن آگار و حداقل غلظت مهارکنندگی/کشندگی، به طور کلی عصاره‌های آبی و اتانولی دارای اثر ضدمیکروبی بالاتری در برابر باکتری‌های گرم مثبت *لیستریا اینوکوا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به باکتری‌های گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا* و *اشرشیا کلی* بود، که این حالت به تفاوت در غشا و دیوارهٔ سلولی این باکتری‌ها نسبت داده می‌شود. باکتری‌های گرم مثبت دارای موکوپپتید بیشتری در دیوارهٔ سلولی خود می‌باشند، درحالی‌که لایهٔنازکی از موکوپپتید در باکتری‌های گرم منفی مشاهده می‌شود و اغلب ساختار سلولی آنها متشکل از لیپوپروتئین و لیپوپلی‌ساکارید می‌باشد که سبب مقاومت بیشتر باکتری نسبت به ترکیبات ضدمیکروبی آبگریز می‌گردد[33].

در راستای نتایج این مطالعه، تأثیر ضدباکتریایی عصارهٔ متانولی و آبی برگ گیاه پولک بر باکتری‌های مولد عفونت ادراری (*استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروباکتر ائروژنز*، *کلبسیلا پنومونیه* و *پروتئوس میرابیلیس*) توسط بیات و شاهانی پور (2015)،بررسی گردید. باکتری‌های *کلبسیلا پنومونیه*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروباکتر ائروژنز* نسبت به

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-05-22]

[DOI: 10.52547/fsct.17.100.117]

غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی و آبی پولک حساسیت نشان دادند و باکتری‌های *پروتئوس میرابیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب مقاوم‌ترین و حساس‌ترین باکتری‌ها نسبت به عصارهٔ گیاه پولک بودند[35]. در مطالعه‌ای دیگر، مشخص گردید که عصارهٔ متانولی گیاه پولک دارای اثر ضدباکتریایی قوی‌تری نسبت عصارهٔ آبی در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس پیوژنز* می‌باشد و عصاره‌های متانولی و آبی فعالیت ضدمیکروبی نسبت به باکتری‌های گرم منفی *سودوموناسائروژینوزا* و *اشرشیا کلی* نشان ندادند [36].

Table 2:*In vitro* antibacterial effect of *Stachys schtschegleevii* ethanolic and aqueous extracts based on minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration methods

	Minimum inhibitory concentration (mg/mL)		Minimum bactericidal concentration (mg/mL)	
	Aqueous extract	Ethanolic extract	Aqueous extract	Ethanolic extract
Escherichia coli	50	25	200	100
Pseudomonas aeruginosa	50	50	100	100
Listeria innocua	12.5	6.25	50	25
Staphylococcus aureus	12.5	12.5	50	50

4- نتیجه گیری

در مطالعهٔ حاضر، عصارهٔ گیاه پولک با استفاده از روش خیساندن در آب (عصارهٔ آبی) و اتانول (عصارهٔ اتانولی) به دست آمد و میزان ترکیبات فنولی کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی عصاره‌های تولیدی بررسی گردید. عصارهٔ اتانولی گیاه پولک مقدار ترکیبات فنولی کل و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به عصارهٔ آبی نشان داد. علاوه‌براین، باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *لیستریا اینوکوا* نسبت به عصارهٔ اتانولی حساسیت بیشتری نشان دادند و غلظت کمتری از این عصاره جهت جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه نیاز بود. بنابراین، می‌توان از عصاره‌های اتانولی و آبی گیاه پولک به عنوان منابع غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان و ضدمیکروب جهت افزایش ویژگی‌های تغذیه‌ای و نگهداری مواد غذایی بهره برد.

5- تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

6- منابع

[1] Victoria, F.N., Radatz, C.S., Sachini, M., Jacob, R.G., Alves, D., Savegnago, L., Perin, G., Motta, A.S., Silva, W.P. and Lenardão, E.J. 2012. Further analysis of the antimicrobial activity of α-phenylseleno citronellal and α-phenylseleno citronellol. Food Control. 23(1), pp.95-99.

[2] Arqués, J.L., Rodríguez, E., Nuñez, M. and Medina, M. 2008. Inactivation of Gram-negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system. European Food Research and Technology. 227(1): 77-82.

[3] Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food control. 21(9): 1199-1218.

[4] Weerakkody, N.S., Caffin, N., Turner, M.S. and Dykes, G.A. 2010. In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. Food Control. 21(10): 1408-1414.

[5] Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A. and Akpulat, H.A. 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of Achillea millefolium subsp. millefolium Afan.(Asteraceae). Journal of ethnopharmacology. 87(2-3): 215-220.

[6] Abichandani, M., Nahar, L., Singh, P.O.O.N.A.M., Chitnis, R., Nazemiyeh, H.,

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-05-22]

[DOI: 10.52547/fsct.17.100.117]

Delazar, A. and Sarker, S.D. 2010. Antibacterial and free-radical-scavenging properties of Stachys schtschegleevii (Lamiaceae). Archives of Biological Sciences. 62(4): 941-945.

[7] Rezazadeh, S., Kebryaeezadeh, A., Pirali-Hamedani, M., Shafiee, A. and Isfahani, S.G. 2005. Anti-inflammatory and analgesic activity of methanolic extracts of aerial parts of stachys schtschegleevii sosn. and stachys balansae boiss. and kotschy ex boiss in rats. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. 13(4): 165-169.

[8] Sonboli, A., Salehi, P. and Ebrahimi, S.N. 2005. Essential oil composition and antibacterial activity of the leaves of Stachys schtschegleevii from Iran. Chemistry of natural compounds. 41(2): 171-174.

[9] Grujic‐Jovanovic, S., Skaltsa, H.D., Marin, P. and Sokovic, M. 2004. Composition and antibacterial activity of the essential oil of six Stachys species from Serbia. Flavour and Fragrance Journal. 19(2): 139-144.

[10] Skaltsa, H.D., Demetzos, C., Lazari, D. and Sokovic, M. 2003. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight Stachys species from Greece. Phytochemistry. 64(3): 743-752.

[11] Behbahani, B.A., Yazdi, F.T., Mortazavi, A., Zendeboodi, F., Gholian, M.M., and Vasiee, A. 2013. Effect of aqueous and ethanolic extract of Eucalyptus camaldulensis L. on food infection and intoxication microorganisms "in vitro". Journal of Paramedical Sciences. 4(3): 89-99.

[12] Sattari, M., Shahbazi, N. and Najjar, S. 2005. The antibacterial activity of methanolic extract of Eucalyptus against Pseudomonas aeroginosa. Persian J Tarbiat Modarres, 8(1): 19-23.

[13] Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E. and Vivanco, J.M. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. Food chemistry. 83(4): 547-550.

[14] Brighente, I.M.C., Dias, M., Verdi, L.G. and Pizzolatti, M.G. 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. Pharmaceutical Biology. 45(2): 156-161.

[15] Yazdi, F.T., Mortazavi, A., Koocheki, A., Afsharian, S. and Behbahani, B.A. 2013. Antimicrobial properties of plant extracts of Thymus vulgaris L., Ziziphora tenuior L. and Mentha Spicata L., against important foodborne pathogens in vitro. Scientific Journal of Microbiology. 2(2): 23-30.

[16] Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American journal of clinical pathology. 45(4_ts): 493-496.

[17] Behbahani, B.A., Shahidi, F., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A. and Mohebbi, M. 2017. Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (Artemisia dracunculus) extract and chemical composition of its essential oil. Journal of Food Measurement and Characterization. 11(2): 847-863.

[18]Behbahani, B.A., Shahidi, F., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A. and Mohebbi, M. 2017. Use of Plantago major seed mucilage as a novel edible coating incorporated with Anethum graveolens essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. International journal of biological macromolecules. 94: 515-526.

[19] Martinez-Correa, H.A., Magalhães, P.M., Queiroga, C.L., Peixoto, C.A., Oliveira, A.L. and Cabral, F.A. 2011. Extracts from pitanga (Eugenia uniflora L.) leaves: influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. The Journal of Supercritical Fluids. 55(3): 998-1006.

[20] Ait-Ouazzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Lorán, S., Rota, C. and Pagán, R. 2011. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 12(3): 320-329.

[21]Vasiee, A., Tabatabaei, Y.F. and Mortazavi, S.A. 2016. The antibacterial activity of coriander (coriandeum sativum) on pathogenic microorganisms "in vitro".Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 20(71): 59-66.

[22] Sopee, M.S.M., Azlan, A. and Khoo, H.E. 2019. Comparison of antioxidants content and activity of Nephelium mutabile rind extracted using ethanol and water. Journal of Food Measurement and Characterization. 1-6.

[23] Sun, T. and Ho, C.T. 2005. Antioxidant activities of buckwheat extracts. Food chemistry. 90(4): 743-749.

[24] Azlim Almey, A.A., Ahmed Jalal Khan,

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-05-22]

[DOI: 10.52547/fsct.17.100.117]

[31]Nasrollahi, S., Ghoreishi, S.M., Ebrahimabadi, A.H. and Khoobi, A. 2019. Gas chromatography-mass spectrometry analysis and antimicrobial, antioxidant and anti-cancer activities of essential oils and extracts of Stachys schtschegleevii plant as biological macromolecules. International journal of biological macromolecules. 128: 718-723.

[32] Behbahani, B.A., Yazdi, F.T., Shahidi, F., Noorbakhsh, H., Vasiee, A. and Alghooneh, A. 2018. Phytochemical analysis and antibacterial activities extracts of mangrove leaf against the growth of some pathogenic bacteria. Microbial pathogenesis. 114: 225-232.

[33] Heidari-Sureshjani, M., Tabatabaei-Yazdi, F., Alizadeh-Behbahani, B. and Mortazavi, A. 2015. Antimicrobial effect of aqueous, ethanol, methanol and glycerin extracts of Satureja bachtiarica on Streptococcus pyogenes, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 17(7): e1011.

[34] Alizadeh, B.B. and Tabatabaei, Y.F. 2015. In vitro study of antibacterial activity of mangle negro extracts against selected pathogens from *Enterobacteriaceae* and *Bacillaceae* families.Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 17(12): e5202.

[35] Bayat, A. and Shahanipour, K. 2015. Theantibacterialeffectof methanolic and aqueous extracts of stachys schtschegleevii (poulk) leave on bacteria causing urinary infection. Qom University of Medical Sciences Journal. 9(10): 33-39.

[36] Chitsaz, M., Mohamadi, H., Naseri, M. and Kamalinejad, M. 2006. Study the anti-bacterial of stachys schtschegleevii in in-vitro condition. *Daneshvar.14*(67): 1-8.

C., Syed Zahir, I., Mustapha Suleiman, K., Aisyah, M.R. and Kamarul Rahim, K. 2010. Total phenolic content and primary antioxidant activity of methanolic and ethanolic extracts of aromatic plants' leaves. International Food Research Journal. 17(4): 1077-1084.

[25] Thippeswamy, N.B. and Naidu, K.A. 2005. Antioxidant potency of cumin varieties—cumin, black cumin and bitter cumin—on antioxidant systems. European food research and technology. 220(5-6): 472-476.

[26] Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S. and Ju, Y.H. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica. Journal of food and drug analysis. 22(3): 296-302.

[27] Pérez, M.B., Calderon, N.L. and Croci, C.A. 2007. Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (Rosmarinus officinalis L.). Food chemistry. 104(2): 585-592.

[28] Weng, C.J. and Yen, G.C. 2015. Natural plant extracts as antioxidants for food preservation. In *Handbook* of Antioxidants for Food Preservation (pp. 235-249). Woodhead Publishing.

[29] Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A. and Ricke, S.C. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems–A review. Food Control. 54: 111-119.

[30] Bulbul, I.J., Zulfiker, A.H.M., Hamid, K., Khatun, M.H. and Begum, Y. 2011. Comparative study of in vitro antioxidant, antibacterial and cytotoxic activity of two Bangladeshi medicinal plants-Luffa cylindrica L. and Luffa acutangula. Pharmacognosy Journal. 3(23): 59-66.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-05-22]

[DOI: 10.52547/fsct.17.100.117]

Evaluation of the effect of aqueous and ethanolic extraction methods on extraction yield, phenolic compounds, and antioxidant and antimicrobial activity of *Stachys schtschegleevii* extract

Noshad, M. [1*], Alizadeh Behbahani, B. [1], Dehghani, S. [2]

1. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
2. M.Sc. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

(Received: 2019/10/12 Accepted:2019/12/02)

The plant *Stachys schtschegleevii* is used in the Iranian traditional medicine for the treatment of bacterial infections, rheumatism fever, and inflammatory diseases. In this study, the maceration extraction method with ethanol and water was used to obtain *S. schtschegleevii* extract, and extraction yield, total phenol content, and antioxidant and antimicrobial activity of the obtained extracts were evaluated. The extraction yield of *S. schtschegleevii* ethanolic extract was higher than that of aqueous extract (8.8±0.27 *vs.* 6.9±0.33%), and its total phenol content was also higher compared to the aqueous one (55.35±0.28 *vs.* 49.4±0.62 mg gallic acid/g dried extract). Antioxidant activity based on IC50 showed that the ethanolic extract, due to its higher total phenol content, has the ability to deactive and neutralize free radicals more efficiently in comparison to the aqueous extract. Antimicrobial results (disk diffusion agar, minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration) indicated that bacteria *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*and *Pseudomonas aeruginosa* were more sensitive to the ethanolic extract, and at the same concentration of ethanolic and aqueous extracts, gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Listeria innocua*) had higher sensitivity than the gram-negative ones (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*). Thus, *S. schtschegleevii* extract rich in phenolic compounds with appreciable antimicrobial and antioxidant activity could be used as an ingredient to increase nutritional value and shelf-life of food products.

Keywords: *Stachys schtschegleevii*, Extract, Antimicrobial activity, Natural preservative.

* Corresponding Author E-Mail Address: Noshad@asnrukh.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-05-22]

[DOI: 10.52547/fsct.17.100.117]