# بررسی فعالیت ضداکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره متانولی برگهای نعناع دشتی

**مرتضی یزدانی[۱]، فرشته جوکار کاشی[۲*] و اکرم رحیمی مقدم[۲]**

**[۱] کاشان، دانشگاه کاشان، دانشکده شیمی، گروه فیتوشیمی**

**[۲] کاشان، دانشگاه کاشان، دانشکده شیمی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۴

## چکیده

با توجه به عوارض جانبی نامطلوب آنتی‌بیوتیک‌ها و ضداکسیدان‌های مصنوعی بر سلامتی انسان و افزایش مقاومت پاتوژن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، لازم است جایگزین طبیعی مناسبی برای این ترکیب‌ها شناسایی شود. به این منظور خواص ضدمیکروبی و ضداکسیدانی عصاره گیاه نعناع دشتی در این مطالعه بررسی گردید. عصاره‌گیری از برگ‌های گیاه نعناع دشتی با استفاده از دستگاه سوکسله و با حلال متانول انجام شد. مقدار فنل کل با استفاده از معرف فولین سیوکالتو و مقدار فلاونوئید کل با روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. فعالیت ضداکسیدانی عصاره گیاه نعناع دشتی با روش DPPH و فعالیت ضدمیکروبی آن علیه میکروارگانیسم‌های مختلف با روش انتشار در آگار و تعیین کمترین غلظت مهارکننده رشد (MIC) بررسی گردید. بازده عصاره‌گیری از برگ‌های نعناع دشتی ۲۲/۶۰ درصد و میزان کل فنل و فلاونوئید به ترتیب ۲۷۸/۵۳۷ میکروگرم گالیک اسید بر میلی‌گرم وزن خشک عصاره و ۷۵/۵۷۹ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک عصاره بود. مقدار $IC_{50}$ برای عصاره متانولی نعناع دشتی و استاندارد بوتیل هیدروکسی تولوئن، به ترتیب ۶۱/۲۴۳ و ۱۹/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. براساس نتایج روش انتشار در آگار و آزمون MIC، بیشترین اثر مهاری عصاره گیاه نعناع دشتی به ترتیب علیه باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *کلبسیلا پونومونیه* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد و علیه قارچ‌ها هیچ تأثیری نداشت. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش عصاره گیاه نعناع دشتی دارای فعالیت ضدمیکروبی و ضداکسیدانی خوبی می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی**: فعالیت ضداکسیدانی، فعالیت ضدمیکروبی، فلاونوئید، فنل، نعناع دشتی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱۵۵۹۱۳۰۴۲ ، پست الکترونیکی: jookar@kashanu.ac.ir

## مقدمه

رادیکالهای آزاد تولید شده از آلاینده‌های محیطی و فاکتورهای خارجی از قبیل داروها، سمها و استرس موجب آسیب اکسیداتیو به عملکرد و ساختار ماکرومولکولهای زیستی می‌شوند (۳۶). نقش رادیکالهای آزاد و گونه‌های واکنشگر اکسیژن در اتیولوژی (سبب شناسی) تعداد زیادی از بیماریهای مزمن از قبیل تصلب شرایین، سرطان، التهاب و بیماریهای مربوط به زوال اعصاب مثل پارکینسون و آلزایمر اثبات شده است (۱۳ و ۲۰). یکی از روشهای موثر برای حذف گونه‌های واکنشگر اکسیژن، استفاده از ترکیبهای ضداکسیدان می‌باشد. بنابراین بمنظور حفاظت سلولها از آسیبهای زیستی که توسط رادیکالهای آزاد ایجاد می‌شود، توجه افراد به استفاده از ترکیبهای ضداکسیدان معطوف شده است (۱۹ و ۲۳).

در صنایع غذایی نیز ضداکسیدانها با به تاخیر انداختن اکسیداسیون روغنها و چربیها کیفیت آنها را حفظ نموده و ماندگاری آنها را افزایش می‌دهند. بنابراین، با استفاده از ترکیبهای ضداکسیدان در فرمولاسیون مواد غذایی می‌توان

از تغییرهای نامطلوب در کیفیت غذاها که به دلیل واکنشهای اکسیداسیون رخ می‌دهد، جلوگیری نمود. اغلب ضداکسیدانها از قبیل بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) و بوتیل هیدروکسی انیزول (BHA) که به صورت تجاری مصرف می‌شوند، مصنوعی هستند. با توجه به اثرهای نامطلوب ضداکسیدانهای مصنوعی بر سلامتی انسان، لازم است منابع ایمن و جایگزین برای آنها شناسایی شود (۱۵ و ۳۲).

همچنین با توجه به مصرف بی‌رویه و خودسرانه آنتی‌بیوتیکها و افزایش مقاومت پاتوژنها نسبت به آنتی‌بیوتیکها و اثرهای جانبی نامطلوب آنها، جستجوی منابع ایمن و جایگزین برای آنتی‌بیوتیکها نیز به مسئله‌ای جدی تبدیل شده است.

در سالهای اخیر جستجو برای ضداکسیدانها و ترکیبهای ضدمیکروبی خصوصاً از گیاهان به طور چشمگیری افزایش یافته است و طی چند سال گذشته، فعالیت ضداکسیدانی و ضدمیکروبی گیاهان دارویی به طور گسترده‌ای مطالعه شده‌اند (۱، ۲، ۳، ۳۰، ۳۳ و ۳۵). اسانسها و عصاره‌های به دست آمده از گیاهان، ایمن و مقرون به صرفه هستند و در مقایسه با داروهای سنتزی گران قیمت، عوارض جانبی نامناسبی ندارند.

خانواده *Labiatae* شامل حدود ۲۲۰ جنس و ۳۳۰۰ گونه است که با اهداف مختلفی در سراسر دنیا به طور گسترده استفاده می‌شود (۱۲). جنس *Mentha* یکی از اعضای مهم خانواده *Labiatae* است و شش گونه از آن در فلور ایران وجود دارد (۲۵). نعناع دشتی با نام علمی *Mentha Spicata* متعلق به جنس *Mentha* در خانواده *Labiateae* (*Lamiaceae*) می‌باشد (۳۱). این گیاه که با نام Spearmint نیز شناخته می‌شود، گیاهی چندساله، علفی، پایا با ساقه‌های چهارگوش و برگهای متقابل و دندانه‌دار و پوشیده از کرک و بدون دمبرگ می‌باشد. نعناع دشتی با پیوند *Mentha longifolia* و *Mentha rotundifolia* تولید می‌شود (۳۰).

نعناع دشتی بومی انگلستان شمالی است (۲۸) و در مناطقی با آب و هوای گرم تا معتدل از قبیل آمریکا، اروپا، چین، آفریقای جنوبی و برزیل کشت می‌شود (۱۶ و ۲۱). امروزه نعناع دشتی به طور گسترده در تمام مناطق دنیا رشد می‌کند.

از زمانهای قدیم، در فرهنگهای غربی و شرقی از نعناع دشتی به عنوان گیاهی دارویی و معطر استفاده می‌شده است (۲۷). نعناع دشتی ضدنفخ، ادرار آور و ضداسپاسم می‌باشد (۳۴) و در فرهنگ عامه، به عنوان یک داروی گیاهی برای درمان سرماخوردگی، آنفولانزا، مشکلات دستگاه تنفسی، دل درد، هموروئید و درد معده در نظر گرفته شده است (۴، ۱۸ و ۳۴).

با توجه به اهمیت روزافزون استفاده از ترکیبهای ضداکسیدانی و ضدمیکروبی طبیعی، در این مطالعه فعالیت ضداکسیدانی و ضدمیکروبی و همچنین میزان فنل و فلاونوئید عصاره متانولی برگهای گیاه نعناع دشتی مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روشها

**تهیه گیاه:** برگهای گیاه نعناع دشتی در مرحله گلدهی در تابستان سال ۱۳۹۵ از شهر مریوان واقع در استان کردستان جمع‌آوری گردید و توسط اساتید گیاه‌شناسی دانشگاه کاشان مورد تأیید قرار گرفت. پس از شستشو و جدا کردن آلودگیها و پوسیدگیها، نمونه‌های گیاه در محل آزمایشگاه، در دمای اتاق و به مدت ۶ روز خشک و سپس آسیاب شد.

**تهیه عصاره:** عصاره‌گیری از پودر گیاه نعناع دشتی با استفاده از دستگاه سوکسله (ست سوکسله، شات دوران، آلمان؛ هیتر منتل، الکتروترمال، انگلستان) و با حلال متانول (مرک، آلمان) انجام شد. ۵۰ گرم از پودر گیاه به کارتوش افزوده شد، سپس به دستگاه سوکسله منتقل و در محل مخصوص خود قرار گرفت و اجزای دستگاه به یکدیگر

متصل گردید. سپس ۴۰۰ میلی‌لیتر متانول به بالن یک لیتری دستگاه سوکسله اضافه شد و پس از اطمینان از برقراری جریان آب سرد در سردکننده دستگاه، عصاره‌گیری آغاز شده و ۸ ساعت به طول انجامید. عصاره حاصل، از طریق تبخیرکننده دوار در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و در شرایط خلأ، تغلیظ شد. عصاره تغلیظ شده به پتری‌دیش منتقل و در آون معمولی با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد تا به طور کامل خشک شود. جهت اطمینان از جدا شدن همه اجزای فرار و ناخالصیها پتری‌دیش حاوی عصاره خشک شده به مدت ۲۴ ساعت در آون خلأ قرار گرفت. عصاره خشک شده پس از آن که از پتری‌دیش جدا شد، درون ظرف مناسب و غیر قابل نفوذ ریخته و تا انجام آزمایشهای بعدی در یخچال نگهداری شد. بازده عصاره‌گیری به صورت نسبت وزنی/ وزنی (W/W) با استفاده از وزن گیاه خشک مورد استفاده در عصاره‌گیری و وزن عصاره به دست آمده، محاسبه شد که حاصل‌ضرب این نسبت در ۱۰۰، بازده عصاره‌گیری را برحسب درصد مشخص می‌کند.

**اندازه‌گیری مقدار فنل کل:** جهت اندازه‌گیری مقدار فنل کل از معرف فولین سیو کالتو (سیگما آلدریچ) استفاده گردید (۲۴). ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره نعناع دشتی یا اسید گالیک (مرک، آلمان) با ۵ میلی‌لیتر از معرف فولین سیوکالتو و ۴ میلی‌لیتر از محلول سدیم کربنات یک مولار (مرک، آلمان) مخلوط گردید. پس از ۱۵ دقیقه گرماگذاری نمونه‌ها در دمای اتاق، میزان جذب آنها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ( UV CINTRA6- GBC Scientific Equipment، ایالات متحده آمریکا) در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. آزمون اندازه‌گیری مقدار فنل کل گالیک اسید و عصاره نعناع دشتی سه بار تکرار شد. منحنی استاندارد گالیک اسید با استفاده از غلظتهای ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ (میلی‌گرم بر لیتر) از محلول اسید گالیک رسم شد. میانگین مقادیر جذب به دست آمده برای عصاره در معادله خط استاندارد گالیک اسید قرار گرفت و غلظت ترکیب‌های فنلی موجود در عصاره گیاهی معادل گالیک اسید بر حسب میکروگرم در گرم وزن خشک عصاره به دست آمد.

**اندازه‌گیری مقدار فلاونوئید کل:** جهت اندازه‌گیری مقدار فلاونوئید کل عصاره نعناع دشتی با روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید لازم است که از کوئرستین (مرک، آلمان) جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شود (۹). بمنظور تعیین مقدار فلاونوئید کل کوئرستین و رسم منحنی استاندارد آن، ۲ میلی‌گرم کوئرستین در حلال متانول حل شده و محلول کوئرستین با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. سپس غلظتهای ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آن تهیه گردید. برای هر کدام از این غلظتها یک بالن ژوژه ۵ لیتری در نظر گرفته شد. به هر بالن ژوژه، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول کوئرستین با غلظت مشخص، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات سدیم ۱ مولار (مرک، آلمان) و ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد (مرک، آلمان) اضافه و با آب مقطر به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. در نمونه شاهد به جای ۵۰۰ میکرولیتر محلول کوئرستین، ۵۰۰ میکرولیتر متانول اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. آزمون اندازه‌گیری فلاونوئید کل برای نمونه استاندارد کوئرستین سه بار تکرار و از میانگین سه جذب خوانده شده، جهت رسم منحنی استاندارد کوئرستین استفاده گردید. جهت اندازه‌گیری مقدار فلاونوئید کل عصاره گیاه نعناع دشتی، در یک بالن ژوژه ۵ لیتری، ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره حل شده در متانول با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات سدیم (۱ مولار) و ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد اضافه و با آب مقطر به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. به نمونه شاهد به جای ۵۰۰ میکرولیتر عصاره، ۵۰۰ میکرولیتر حلال متانول اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد.

آزمون اندازه‌گیری فلاونوئید کل برای نمونه استاندارد کوئرستین سه بار تکرار و میانگین جذبهای به دست آمده در معادله خط کوئرستین قرار گرفت تا در نهایت غلظت فلاونوئید موجود در نمونه گیاهی بر حسب میکرو گرم در گرم وزن خشک عصاره نسبت به استاندارد کوئرستین به دست آید.

**سنجش میزان فعالیت ضداکسیدانی:** سنجش خاصیت ضداکسیدانی عصاره متانولی نعناع دشتی با ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد ۲،۲- دی فنیل – ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) طبق روش پورمراد و همکاران انجام شد (۲۹). سنجش حذف رادیکال DPPH تکنیکی آسان و سریع برای ارزیابی فعالیت ضداکسیدانی می‌باشد. DPPH یک رادیکال آزاد پایدار به رنگ ارغوانی است که رنگ آن در فرایند دادن الکترون یا هیدروژن توسط نمونه از ارغوانی به زرد تغییر می‌کند و یک مولکول پادمغناطیس پایدار می‌شود (۷). چون ضداکسیدانها توانایی دادن الکترون و هیدروژن را دارند، مقدار بی‌رنگ شدن مخلوط، قدرت حذف رادیکال آزاد توسط ضداکسیدان را نشان می‌دهد (۶). رادیکال آزاد DPPH در ۵۱۷ نانومتر جذب دارد که از قانون بیر–لامبرت پیروی می‌کند و کاهش جذب آن با میزان ماده ضداکسیدان رابطه خطی دارد. هنگامی که ضداکسیدانها با DPPH که یک رادیکال آزاد پایدار است، واکنش می‌دهند، DPPH احیا شده و به DPPHH تبدیل و سبب کاهش جذب DPPH در ۵۱۷ نانومتر می‌شوند (۱۷). رادیکال به شکل DPPH-H متناسب با تعداد الکترون گرفته شده، منجر به بی‌رنگ (زرد رنگ) شدن می‌شود (۱۴). در این روش از محلول متانولی BHT (سیگما آلدریچ، ایالات متحده آمریکا) به عنوان شاهد استاندارد استفاده شد. ابتدا محلولهایی با غلظتهای ۰/۸، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱، $۵\times۱۰^{-۲}$، $۵\times۱۰^{-۳}$، $۵\times۱۰^{-۴}$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره متانولی نعناع دشتی و محلول متانولی BHT تهیه شد. ۱ میلی‌لیتر از هر یک از محلول‌های فوق به‌طور جداگانه در بالن ژوژه‌های تیره ریخته شد و پس از آن ۱ میلی‌لیتر از معرف DPPH ( ۹۴میکروگرم در میلی لیتر) (مرک، آلمان) به آن افزوده و همگن گردید. برای خواندن جذب نمونه‌های گیاهی و نمونه‌های BHT میزان ۱ میلی‌لیتر از متانول به ۱ میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (۹۴ میکروگرم در میلی لیتر) در بالن ۵ میلی‌لیتری تیره افزوده و همگن شد که این محلول به عنوان شاهد استفاده گردید. جذب محلولهای شاهد و نمونه پس از ۱۵ دقیقه و در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. در پایان با محاسبه درصد مهار و ترسیم منحنی درصد مهار بر حسب غلظت، $IC_{50}$ گیاه نعناع دشتی از محل تلاقی نصف درصد مهار (۵۰ درصد) با منفی لگاریتم غلظت به طور جداگانه محاسبه شد. میزان درصد مهار با معادله زیر محاسبه شده است:

$$I\% = \left[\frac{A_{Blank} - A_{Sample}}{A_{Blank}}\right] \times 100$$

در فرمول بالا، $A_{Blank}$ میزان جذب شاهد (نمونه حاوی تمام معرفها به غیر از عصاره) و $A_{Sample}$ میزان جذب نمونه در ۵۱۷ نانومتر است. به منظور به حداقل رساندن خطاهای آزمایش و اطمینان یافتن از صحت نتایج، آزمایشهای مربوط به تعیین فعالیت ضداکسیدانی عصاره و نمونه استاندارد BHT سه بار تکرار و سپس با میانگین داده‌ها، $IC_{50}$ مربوطه محاسبه شد. غلظتی از نمونه که برای مهار ۵۰ درصد رادیکال آزاد DPPH مورد نیاز می‌باشد، $IC_{50}$ نمونه نامیده می‌شود. هر چه $IC_{50}$ نمونه‌ای کمتر باشد، خاصیت ضداکسیدانی بیشتری دارد.

**سنجش میزان فعالیت ضدمیکروبی:** فعالیت ضدمیکروبی عصاره علیه میکروارگانیسمهای مختلف با روش انتشار در آگار و تعیین کمترین غلظت مهارکننده رشد (MIC) بررسی گردید.

**میکروارگانیسمها:** در این مطالعه از سه گروه از میکروارگانیسمها شامل باکتریهای گرم مثبت

*استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 29737) ، *باسیلوس سوبتیلیس* (ATCC 6633) و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (ATCC 12228)، باکتریهای گرم منفی *شیگلا دیسانتریه* (PTCC 1188)، *کلبسیلا پنومونیه* (ATCC 10031)، *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853)، *سالمونلا پاراتیفی* سروتایپ A (ATCC 5702)، *اشرشیا کلی* (ATCC 10536) و *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1182) و قارچهای *آسپرژیلوس نایجر* (ATCC 16404)، *آسپرژیلوس برازیلینسیس* (PTCC 5011) و *کاندیدا آلبیکنز* (ATCC 10231) استفاده شد. باکتریها در محیط نوترینت آگار (مرک، آلمان) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و قارچها در محیط سابرو دکستروز آگار (مرک، آلمان) و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شده و به مدت یک شب در گرمخانه گرماگذاری شدند.

جهت تهیه محیط کشت نوترینت آگار، ۲۰ گرم از این محیط کشت در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و سپس به حجم یک لیتر رسانده شد. جهت تهیه محیط کشت سابرو دکستروز آگار، ۶۵ گرم از این محیط کشت در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و سپس به حجم یک لیتر رسانده شد. به منظور حل شدن کامل محیط کشتهای نوترینت آگار و سابرو دکستروز آگار در آب مقطر، محلولها جوشانده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو استریل شدند. پس از خنک شدن محیط کشتها، توزیع آنها در پلیتها انجام شد.

**روش انتشار در آگار:** تعیین فعالیت ضدمیکروبی عصاره با روش انتشار در آگار مطابق مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) انجام شد (۱۰). برای این منظور، پلیتهای حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) برای باکتریها و سابرو دکستروز آگار برای قارچها تهیه شد. از کشت ۲۴ ساعته هر یک از سویه‌های باکتریایی و قارچی، سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم مک‌فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ واحد تشکیل کلنی (CFU) بر میلی‌لیتر) در سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردید و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیونهای باکتریایی و قارچی به صورت یکنواخت در سطح محیط کشتها، کشت داده شدند. چاهکهایی به قطر ۶ میلی‌متر و به ضخامت ۴ میلی‌متر ایجاد شد و سپس از عصاره مورد نظر که با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در دی‌متیل‌سولفوکسید (مرک، آلمان) تهیه و با فیلتر میلی‌پور ۰/۴۵ میکرومتر استریل شده بود، به هر چاهک مقدار ۱۰ میکرولیتر اضافه شد. به منظور تعیین حساسیت سویه‌ها از آنتی‌بیوتیکهای ریفامپین و جنتامایسین (برای باکتریها) و نیستاتین (برای قارچها) به عنوان کنترل مثبت و از حلال دی‌متیل‌سولفوکسید به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. محیطهای کشت به مدت ۲۴ ساعت برای باکتریها، ۴۸ ساعت برای مخمر و ۷۲ ساعت برای سایر قارچها در گرمخانه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس قطر هاله مهار رشد توسط خط‌کش اندازه‌گیری و ثبت شد. برای اطمینان از نتیجه، هر آزمایش سه بار تکرار و میانگین داده‌های به دست آمده به عنوان قطر هاله مهار رشد در نظر گرفته شد.

**تعیین کمترین غلظت مهارکننده رشد:** به منظور به دست آوردن کمترین غلظت مهار کننده رشد سویه‌های استاندارد حساس به عصاره از پلیت ۹۶ خانه‌ای استریل و روش رقت‌سازی در محیط کشت (Broth microdilution) طبق CLSI استفاده گردید (۱۰). به هر یک از خانه‌ها ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مایع BHI (مرک، آلمان)، ۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی با رقت معادل نیم مک فارلند و ۱۰۰ میکرولیتر از یکی از غلظتهای عصاره (۰/۰۳۱۲۵، ۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) افزوده شد. حجم نهایی در هر خانه ۲۰۰ میکرولیتر بود. آخرین چاهک حاوی ۱۹۵ میکرولیتر از محیط کشت و ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با رقت معادل نیم مک فارلند و بدون محلول عصاره بود و به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین از آنتی‌بیوتیکهای ریفامپین و جنتامایسین (برای باکتریها) و نیستاتین (برای

قارچها) جهت تهیه کنترل مثبت استفاده گردید. سپس پلیتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه گرماگذاری شدند. کمترین غلظت از عصاره که رشد میکروارگانیسمها را مهار کرده بود، به عنوان حداقل غلظت مهارکننده رشد در نظر گرفته شد.

## نتایج

**بازده عصاره‌گیری:** بازده عصاره‌گیری از پودر گیاه نعناع دشتی با استفاده از دستگاه سوکسله و با حلال متانول ۲۲/۶۰ درصد (۲۲۶ میلی‌گرم بر گرم) به دست آمد.

**میزان فنل کل:** میزان ترکیبهای فنلی موجود در گیاهان معمولاً با استفاده از معرف فولین سیوکالتو سنجیده می‌شوند. مقدار کل فنل عصاره متانولی گیاه نعناع دشتی بر حسب گالیک اسید ۲۷۸/۵۳۷ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک عصاره به دست آمد.

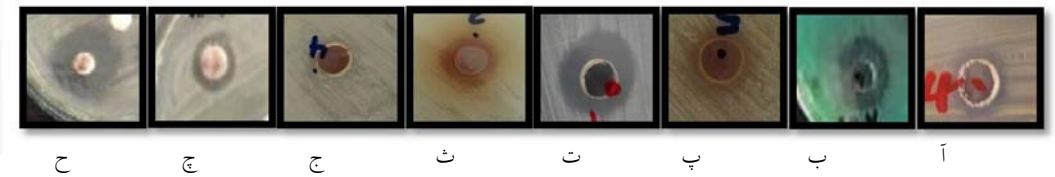
**میزان فلاونوئید کل:** میزان فلاونوئید کل عصاره متانولی گیاه نعناع دشتی ۷۵/۵۷۹ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک عصاره به دست بود.

**بررسی فعالیت ضداکسیدانی:** در این مطالعه مقدار $IC_{50}$ برای عصاره متانولی نعناع دشتی ۶۱/۲۴۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقدار $IC_{50}$ برای استاندارد BHT، ۱۹/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد که نشان می‌دهد عصاره متانولی نعناع دشتی دارای فعالیت ضداکسیدانی خوبی می‌باشد.

**بررسی فعالیت ضدمیکروبی:** نتایج بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره نعناع دشتی و کنترل مثبتها در جدول ۱ آمده است. بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره گیاه نعناع دشتی با روش انتشار در آگار و آزمون کمترین غلظت مهارکننده رشد نشان داد که اثر ضدمیکروبی این عصاره بر علیه باکتریهای گرم منفی بیشتر از باکتریهای گرم مثبت است و روی قارچها هیچ تأثیری ندارد (جدول ۱). براساس نتایج روش انتشار در آگار و آزمون کمترین غلظت مهارکننده رشد، بیشترین اثر مهاری عصاره گیاه نعناع دشتی به ترتیب بر علیه باکتریهای *اشرشیا کلی* (ATCC 10536)، *باسیلوس سوبتیلیس* (ATCC 6633)، *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853)، *کلبسیلا پونومونیه* (ATCC 10031) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 29737) بود (شکل ۱).

## بحث

در این مطالعه بازده عصاره‌گیری از پودر گیاه نعناع دشتی با استفاده از دستگاه سوکسله و با حلال متانول ۲۲/۶۰ درصد (۲۲۶ میلی‌گرم بر گرم) به دست آمد که در مقایسه با مطالعه بیمکرا (Bimakra) و همکاران که بازده استخراج عصاره نعناع دشتی با دستگاه سوکسله و حلال متانول را ۲۶۷/۳۳ میلی‌گرم بر گرم گزارش کردند (۵)، کمتر بود، ولی در مقایسه با بازده گزارش شده در مطالعه سچرر (Scherer) و همکاران بیشتر بود.




شکل ۱- اثر مهاری عصاره گیاه نعناع دشتی بر علیه باکتریهای آ- استافیلوکوکوس اورئوس ب- سودوموناس آئروژینوزا پ- کلبسیلا پونومونیه ت- اشرشیا کلی و ث- باسیلوس سوبتیلیس ج- کنترل منفی (دی‌متیل‌سولفوکسید) چ- کنترل مثبت (ریفامپین) ح- کنترل مثبت (جنتامایسین)

جدول ۱- نتایج فعالیت ضدمیکروبی عصاره نعناع دشتی و کنترل مثبتها

| میکروارگانیسم‌ها | عصاره | | ریفامپین | | جنتامایسین | | نیستاتین | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| باکتری‌های گرم مثبت | قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) | کم‌ترین غلظت مهارکننده (میکروگرم بر میلی‌لیتر) | قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) | کم‌ترین غلظت مهارکننده (میکروگرم بر میلی‌لیتر) | قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) | کم‌ترین غلظت مهارکننده (میکروگرم بر میلی‌لیتر) | قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) | کم‌ترین غلظت مهارکننده (میکروگرم بر میلی‌لیتر) |
| *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ATCC 12228 | - | - | ۴۰ | ۵۰۰ | ۳۵ | ۵۰۰ | NA | NA |
| *باسیلوس سوبتیلیس* ATCC 6633 | ۱۳ | ۳۱/۲۵ | ۱۳ | ۱۲۵ | ۲۱ | ۵۰۰ | NA | NA |
| *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29737 | ۱۰ | ۱۲۵ | ۱۰ | ۵۰۰ | ۲۱ | ۵۰۰ | NA | NA |
| باکتری‌های گرم منفی | | | | | | | | |
| *شیگلا دیسانتریه* PTCC 1188 | - | - | ۸ | ۵۰۰ | ۱۸ | ۵۰۰ | NA | NA |
| *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 10031 | ۱۰ | ۱۲۵ | ۱۱ | ۵۰۰ | ۲۰ | ۵۰۰ | NA | NA |
| *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 | ۱۲ | ۶۲/۵ | ۷ | ۵۰۰ | ۲۲ | ۲۵۰ | NA | NA |
| *سالمونلا پاراتیفی* سروتایپ A ATCC 5702 | - | - | - | - | ۲۱ | ۵۰۰ | NA | NA |
| *اشرشیا کلی* ATCC 10536 | ۱۶ | ۳۱/۲۵ | - | - | ۲۳ | ۵۰۰ | NA | NA |
| *پروتئوس ولگاریس* PTCC 1182 | - | - | ۱۰ | ۵۰۰ | ۲۳ | ۵۰۰ | NA | NA |
| قارچ‌ها | | | | | | | | |
| *آسپرژیلوس نایجر* ATCC 16404 | - | - | NA | NA | NA | NA | ۳۳ | ۱۲۵ |
| *آسپرژیلوس برازیلینسیس* PTCC 5011 | - | - | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| *کاندیدا آلبیکنز* ATCC 10231 | - | - | NA | NA | NA | NA | NA | NA |

- : عدم فعالیت ضدمیکروبی

NA (Not Applicable): غیر قابل کاربرد. برخی از آنتی‌بیوتیکهای استفاده شده دارای خاصیت ضدباکتریایی هستند و برای قارچها کاربرد ندارند و برخی از آنتی‌بیوتیکهای استفاده شده دارای خاصیت ضدقارچی هستند و برای باکتریها کاربرد ندارند.

سچرر و همکاران بازده استخراج عصاره نعناع دشتی با استفاده از حلال متانول را ۲۷/۶ میلی‌گرم بر گرم گزارش کردند (۳۳). تفاوت در بازده استخراج عصاره از نعناع دشتی در مطالعه‌های مختلف ممکن است به دلیل تفاوت در منطقه جغرافیایی کشت نعناع دشتی، سن گیاه و روش استخراج آن باشد. در این پژوهش مقدار کل فنل عصاره متانولی گیاه نعناع دشتی بر حسب گالیک اسید ۲۷۸/۵۳۷ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک عصاره و میزان فلاونوئید کل عصاره متانولی گیاه نعناع دشتی ۷۵/۵۷۹ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک عصاره به دست آمد. در مطالعه رامشوار (Rameshwar) و همکاران آنالیزهای فیتوشیمیایی حضور قند، آلکالوئیدها، فنلها و فلاونوئیدها را در عصاره خام متانولی نعناع دشتی نشان داد (۳۰). طبق مطالعات آنها مقدار کل فنل عصاره خام متانولی نعناع دشتی بر حسب گالیک اسید ۲۷/۲۶ میلی‌گرم بر گرم عصاره بود (۳۰). درمان (Dorman) و همکاران نیز گزارش

کردند که مقدار کل فنل در واریته‌های نعناع (*Mentha*) بر حسب گالیک اسید حدود ۲۳۰–۱۲۸ میلی‌گرم بر گرم عصاره می‌باشد و ترکیبهای فنلی اصلی یافت شده در عصاره‌های نعناع دشتی اریوسیترین، لوتئولین، رزمارینیک اسید و کافئیک اسید هستند (۱۱). در یک مطالعه دیگر سچرر و همکاران گزارش کردند که مقدار کل فنل عصاره متانولی نعناع دشتی بر حسب گالیک اسید ۷۶/۳ میلی‌گرم بر گرم عصاره خشک می‌باشد (۳۳). به نظر می‌رسد که تفاوت در مقادیر فنل و فلاونوئید عصاره نعناع دشتی در مطالعات مختلف به دلیل تفاوت در منطقه جغرافیایی کشت گیاه، میزان رطوبت، نور، دمای محیط، ارتفاع از سطح دریا، میزان بارندگی، ترکیب خاک، سن گیاه و روش استخراج عصاره باشد.

در این مطالعه مقدار $IC_{50}$ برای عصاره متانولی نعناع دشتی و استاندارد BHT بترتیب ۶۱/۲۴۳ و ۱۹/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. سچرر و همکاران مقدار $IC_{50}$ برای عصاره متانولی نعناع دشتی و استاندارد BHT را به ترتیب ۱۷/۹۹ و ۹/۳۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند (۳۳). در مطالعه رامشوار و همکاران مقدار $IC_{50}$ برای عصاره خام متانولی نعناع دشتی ۲۵/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای استاندارد ویتامین C، ۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۳۰). در پژوهش حاضر، با افزایش غلظت عصاره و افزایش مقدار فنل و فلاونوئید آن فعالیت ضداکسیدانی افزایش یافت، بنابراین بین مقدار فنل و فلاونوئید عصاره و فعالیت ضداکسیدانی آن رابطه خطی وجود دارد و می‌توان فعالیت ضداکسیدانی عصاره را به فنل و فلاونوئید موجود در آن نسبت داد که این نتایج با نتایج مطالعه‌های قبلی همخوانی دارد (۵، ۱۸، ۲۶، ۳۰، ۳۳). در میان ترکیبهای طبیعی، ترکیبهای فنلی یکی از مهم‌ترین ترکیبهای گیاهی هستند که به عنوان ضداکسیدان و حذف‌کننده رادیکالها عمل می‌کنند (۸ و ۲۲). ویژگیهای ضداکسیدانی ترکیبهای فنلی از قبیل فلاونوئیدها، آنتوسیانیدها، آنتراکوئینون‌ها و زانتون‌ها عمدتاً به دلیل ویژگیهای اکسایشی و کاهشی آنهاست. آنها به عنوان فرمینیتورهای (Ferminator) رادیکالهای آزاد، دهنده هیدروژن و شلاتور فلزها عمل می‌کنند (۳۷).

فعالیت ضدمیکروبی عصاره نعناع دشتی برداشت شده از مریوان بر علیه باکتریهای گرم منفی بیشتر از باکتریهای گرم مثبت بود و روی قارچها هیچ تأثیری نداشت. کمترین غلظت عصاره متانولی نعناع دشتی برداشت شده از ملکاند (Malakand)، مردان (Mardan)، چارسادا (Charsada) و سوابی (Swabi) در پاکستان جهت مهار رشد *اشرشیا کلی* به ترتیب ۵۰۰، ۲۵۰، ۲۵۰ و ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۳۵) در حالی که در این مطالعه این مقدار ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. کمترین غلظت عصاره متانولی نعناع دشتی برداشت شده از ملکاند، مردان، چارسادا و سوابی در پاکستان جهت مهار رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۲۵۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۳۵)، اما در این پژوهش کمترین غلظت عصاره متانولی نعناع دشتی جهت مهار رشد *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. در مطالعه سچرر و همکاران عصاره متانولی نعناع دشتی فعالیت ضدمیکروبی بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) و *اشرشیا کلی* (ATCC 8739) نشان نداد (۳۳). در پژوهش حاضر، کمترین غلظت عصاره متانولی نعناع دشتی جهت مهار رشد *باسیلوس سوبتیلیس*، ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد ولی در مطالعه آلاه (Ullah) و همکاران در پاکستان، کمترین غلظت عصاره متانولی نعناع دشتی برداشت شده از ملکاند، مردان، چارسادا و سوابی جهت مهار رشد باکتری ذکر شده به ترتیب ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۷۵۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۳۵). کمترین غلظت عصاره متانولی نعناع دشتی برداشت شده از ملکاند، مردان، چارسادا و سوابی در پاکستان جهت مهار رشد *سودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب ۲۵۰، ۱۲۰، ۷۵۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۳۵)، در حالی که در این مطالعه این مقدار ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. در این مطالعه عصاره متانولی نعناع دشتی هیچ

گونه فعالیت ضدمیکروبی بر علیه قارچهای بررسی شده نشان نداد ولی در مطالعه آلاه و همکاران کمترین غلظت عصاره متانولی برداشت شده از ملکاند، مردان، چارسادا و سوابی در پاکستان جهت مهار رشد *کاندیدا آلبیکنز* بترتیب ۷۵۰، ۵۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۳۵).

فعالیت ضدمیکروبی عصاره را می‌توان به ترکیبهای فنلی موجود در آن نسبت داد. اختلاف در فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های متانولی نعناع دشتی در مطالعه‌های مختلف می-تواند به دلیل تفاوت در کمیت و کیفیت مواد موثره عصاره‌ها باشد که به محیط جغرافیایی ، سن گیاه، روشهای مختلف جداسازی عصاره، ترکیبهای خاک، آب و هوا و ... بستگی دارد.

## نتیجه‌گیری

عصاره نعناع دشتی حاوی مقدار قابل توجهی فنل و فلاونوئید می‌باشد و خاصیت ضداکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره را می‌توان به ترکیبهای فنلی موجود در آن نسبت داد. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش عصاره گیاه نعناع دشتی دارای فعالیت ضدمیکروبی و ضداکسیدانی خوبی می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پژوهشکده اسانس دانشگاه کاشان که مواد، وسایل و امکانات لازم جهت انجام این پژوهش را فراهم کردند، تشکر و قدردانی می گردد.

## منابع

۱. احمدی اسب چین، س.، مصطفی پور، م.ج. ۱۳۹۷. اثرات متقابل ضد باکتریایی اسانس رزماری و اسانس اسطوخودوس روی دو باکتری گرم مثبت و سه باکتری گرم منفی در محیط آزمایشگاهی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۳۱ (۲): ۱۷۷-۱۸۷.

۲. افشار محمدیان، م.، کردی، ش.، مشهدی نژاد، ا. ۱۳۹۵. بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره کلاله و گلبرگ گونه‌های مختلف زعفران (*Crocus Spp.*). مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۲۹ (۳): ۲۶۵-۲۷۳.

۳. منتشلو، ج.، دلجو، ع.، پیری، خ. ۱۳۹۶. بررسی میزان فنول و فلاونوئیدها و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های اتانولی، متانولی،کلروفرمی و اتیل استاتی پوست تنه و شاخه درخت بید (*Salix alba.* L.). مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۳۰ (۳): ۳۸۱-۳۹۱.

4. Asekun, O.T., Grierson, D.S., and Afolayan, A.J. 2007. Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis*. Food Chemistry. 101(3): 995-998.
5. Bimakra, M., Abdul Rahmana, R., Taipa, F.S., Ganjloob, A., Salleha, L.M., Selamatc, J., Hamidc, A., Zaidul, I.S.M. 2011. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. Food and Bioproducts Processing. 89(1): 67–72.
6. Braca, A., De Tommasi, N., Di Bari, L., Pizza, C., Politi, M., and Morelli, I. 2001. Antioxidant principles from Bauhinia tarapotensis. Journal of Natural Products. 64(7): 892–895.
7. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology. 28(1): 25–30.
8. Capecka, E., Mareczek, A., and Leja, M. 2005. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. Food Chemistry. 93(2): 223-226.
9. Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., and Chern, J.C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis. 10(3): 178-182.
10. CLSI. 2012. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: Approved standard: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 29: 1–76.
11. Dorman, H.J., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y., Hiltunen, R. 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from Mentha species, hybrids, varieties,and cultivars. J Agric Food Chemistry. 51(16): 4563–4569.

12. Evans, W.C. 1996. Trease and Evans Pharmacognosy. 14th ed. London. WB Saunders Company Ltd.

13. Gálvez, M., Martín-Cordero, C., Houghton, P.J., and Ayuso, M.J. 2005. Antioxidant activity of methanol extracts obtained from Plantago species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(6): 1927-1933.

14. Ghosh, M.N. 1998. Fundamentals of Experimental Pharmacology. 2nd ed. Calcutta. Scientific Book Agency.

15. Goli, A., Barzegar, M., and Sahari, M. 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. Food Chemistry. 92(3):521-525.

16. Hajlaoui, H., Trabelsi, N., Noumi, E., Snoussi, M., Fallah, H., Ksouri, R., and Bakhrouf, A. 2009. Biological activities of the essential oils and methanol extract of tow cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 25(12): 2227-2238.

17. Harborne, J.B. 1998. Phytochemical methods- A guide to modern techniques of plant analysis. 3rd ed. New delhi. Springer (India) Pvt. Ltd.

18. Kanatt, S.R., Chander, R., and Sharma, A. 2007. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. Food Chemistry. 100(2): 451-458.

19. Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., Gerova, D., Galunska, B., and Yankova, T. 2006. Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. Phytotherapy Research. 20(11): 961-965.

20. Kukić, J., Petrović, S., and Niketić, M. 2006. Antioxidant activity of four endemic *Stachys* taxa. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 29(4): 725-729.

21. Lawrence, B.M. 2007. Mint: The Genus Mentha. Boca Raton, FL. CRC Press.

22. Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J., and Lee, C.Y. 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51(25): 7292-7295.

23. Mathew, S., and Abraham, T.E. 2006. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodological. Food and Chemical Toxicology. 44(2): 198-206.

24. McDonald, S., Prenzler, P.D., Autolovich, M., and Robards, K. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chemistry. 73(1):73-84.

25. Mozaffarian, V. 1996. A Dictionary of Iranian Plant Names. Tehran. Farhang Moaser.

26. Palmer, M.V., and Ting, S.S.T. 1995. Applications for supercritical fluid technology in food processing. Food Chemistry. 52(4): 345-352.

27. Park, K.J., Vohnikova, Z., and Brod, F.P.R. 2002. Evaluation of drying parameters and desorption isotherms of garden mint leaves (*Mentha crispa* L.). *Journal of Food Engineering*. 51(3): 193-199.

28. Peter, K.V. 2006. Handbook of herbs and spices. Boca Raton Boston New York Washington, DC. Woodhead publishing. CRC Press.

29. Pourmorad, F.S., Hosseinimehr, S.J., and Shahabimajd, N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of. Biotechnology. 5(11):1142-1145.

30. Rameshwar Naidu, J., Ismail, R.B., Chen, Yeng, Sasidharan, S., and Kumar, P. 2012. Chemical composition and antioxidant activity of the crude methanolic extracts of *Mentha spicata*. Journal of phytology. 4(1): 13-18.

31. Reverchon, E., and Marco, I.D. 2006. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. The Journal of Supercritical Fluids. 38(2): 146-166.

32. Sasidharan, S., Ibrahim, D., Jain, M., and Kassim, N.M. 2007. Free radical scavenging activity and total phenolic compounds of *Gracilaria changii*. The International Journal of Engineering Science. 1 (3): 115-117.

33. Scherer, R., Lemos, M.F., Lemos, M.F., Martinelli, G.C., Martins, J.D.L., Silva, A.G.D. 2013. Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). Industrial Crops and Products. 50: 408– 413.

34. Tetik, F., Civelek, S., and Cakilcioglu, U. 2013. Traditional uses of some medicinal plants in Malatya (Turkey). *Journal of Food Engineering*. 146(1): 331-346.

35. Ullah, N., Khurram, M., Afridi, H.H., Khan, F.A., Umar Khayam, S.M., Ullah, S., Najeeb, U., Hussain, J., and Asif Khan, M. 2011. Comparison of Phytochemical constituents and

antimicrobial activities of *Mentha spicata* from four northern districts of Khyber pakhtunkhwa. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 1: 72-76.

36. Wickens, AP. 2001. Ageing and the free radical theory. Respiration Physiology. 128(3): 379–391.

37. Yener, Z., Celik, I., Ilhan, F., and Bal, R. 2009. Effects of Urtica dioica L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. Food and Chemical Toxicology. 47(2): 418-424.

# Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of methanolic extract of *Mentha Spicata* leaves

**Yazdani M.[1], Jookar kashi F.[2] and Rahimi-Moghaddam A.[2]**

**[1] Dept. of Phytochemistry, Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, I.R. of Iran**

**[2] Dept. of Cell and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, University of Kashan, I.R. of Iran**

## Abstract

Considering the undesirable side effects of synthetic antioxidants and antibiotics on human health and increasing the antibiotic resistance of pathogens, it is necessary to identify safe alternative sources for these compounds. For this purpose, in this study antioxidant and antimicrobial activity of *Mentha spicata* methanolic extract were evaluated. The extract of *M. spicata* leaves was prepared using soxhlet apparatus and methanol as solvent. The total phenol and flavonoid content were determined by folin-ciocalteu reagent and Aluminum chloride colorimetric method, respectively. The antioxidant activity of *M. spicata* was determined via DPPH method and the antimicrobial activity was evaluated by the agar well diffusion method and by determination of minimum inhibitory concentration (MIC) against various types of microorganisms. The extraction yield of *M. spicata* leaves was 22.60% and the total phenol and flavonoid content were 278.537µg/mg dry weight of the extract in gallic acid equivalent and 75.579µg/mg dry weight of the extract, respectively. The $IC_{50}$ of the methanolic extract of *M. spicata* leaves and Butylated hydroxytoluene were 61.243µg/ml and 19.8µg/ml, respectively. Based on the results of the agar well diffusion method and MIC, the most inhibitory effect of *M. spicata* extract was observed against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* and *Staphylococcus aureus*, respectively and had no effect on fungi. According to the results of this study, *M. spicata* extract has desired antioxidant and antimicrobial activity.

**Key words:** Antioxidant activity, Antimicrobial activity, Flavonoid, *Mentha spicata*, Phenol