

## Phytochemical investigation, antioxidant and antibacterial activities of *Tanacetum parthenium* L. aerial parts and root ethanolic extracts at different phenological stages

Mahmood Afshin<sup>1</sup>, Majid Sharifi-Rad<sup>2\*</sup> and Saeide Saeidi<sup>3</sup>

1- M.Sc. student in Range Management, University of Zabol

2\*- Corresponding author, Department of Range and Watershed Management, Faculty of Water and Soil, University of Zabol, Zabol, Iran, Email: Majidsharifirad@uoz.ac.ir

3- Research Center of Agricultural Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran

Received: November 2022

Revised: April 2023

Accepted: April 2023

### Abstract

**Background and objectives:** The amount of secondary metabolites in medicinal plants are changed during different stages of plant growth, so in order to determine the best time to harvest each medicinal herb, it is necessary to determine the amount of active substances and their biological activities in different phenological stages. *Tanacetum parthenium* L. is one of the important species of chicory genus that has many medicinal properties. This study investigated the content of total phenols, flavonoids, alkaloids, and anthocyanins and the antioxidant and antibacterial properties of *Tanacetum parthenium* L. aerial parts and root ethanolic extracts at different phenological stages (vegetative, flowering, and seeding).

**Methodology:** For this purpose, total phenols, flavonoids, alkaloids, and anthocyanins were measured spectrophotometrically in the aerial parts and root ethanolic extracts of *T. parthenium*. The antioxidant activity of the extracts was measured using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and antibacterial activity was evaluated against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*) by disk diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC) methods.

**Results:** The maximum levels of total phenol ( $62.3 \pm 1.2$  mg gallic acid equivalents (GAE)/g dry weight), flavonoids ( $35.7 \pm 0.9$  mg quercetin equivalents (QE).g<sup>-1</sup> dry weight), alkaloids ( $73.2 \pm 0.6$  mg atropine equivalent.g<sup>-1</sup> dry weight) and total anthocyanin ( $4.2 \pm 0.3$  mg cyaniding-3glicoside equivalents.g<sup>-1</sup> dry weight) were measured in the shoot extract of the studied species at the flowering stage. Results of the antioxidant activity evaluation showed that the shoot extract at the flowering stage had the highest antioxidant activity ( $75.3 \pm 0.7$  %). The lowest antioxidant activity ( $16.5 \pm 0.9$  %) was measured for the root extract at the vegetative stage. According to the antibacterial investigation, the maximum inhibition zone ( $21 \pm 0.3$  mm) was observed for the shoot extract at the flowering stage against *Staphylococcus aureus*. The minimum inhibitory concentration ( $12.5$  mg.mL<sup>-1</sup>) and the minimum bactericidal concentration ( $25$  mg.mL<sup>-1</sup>) were recorded for shoot extracts at vegetative and flowering stages against the abovementioned bacteria. Based on the results, the studied species' extracts were more effective against gram-positive than gram-negative bacteria.

**Conclusion:** According to the results of this study, it can be concluded that the flowering stage extract of *T. parthenium* had considerable phytochemical compounds with appropriate antioxidant and antibacterial properties. It can be used as a source of natural antioxidants and antibiotic agents.

**Keywords:** Alkaloids, anthocyanin, biological activity, flavonoids, phenols, *Tanacetum parthenium*.



## بررسی فیتوشیمی، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتری عصاره اتانولی اندام‌های هوایی و ریشه *Tanacetum parthenium* L. در مراحل مختلف رشد

محمود افشین<sup>۱</sup>، مجید شریفی‌راد<sup>۲\*</sup> و سعیده سعیدی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، مدیریت مرتع، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه مرتع و آبخیزداری، دانشگاه زابل، زابل، ایران، پست الکترونیک: Majidsharifrad@uoz.ac.ir

۳- کارشناس، پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۲

اصلاح نهایی: فروردین ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۱

### چکیده

سابقه و هدف: میزان مواد مؤثره گیاهان دارویی در مراحل مختلف رشد آنها متفاوت است، بنابراین برای تعیین بهترین زمان برداشت هر یک از گونه‌های گیاهان دارویی، لازم است که میزان مواد مؤثره و فعالیت زیستی آن در مراحل مختلف رشد بررسی شود. گونه *Tanacetum parthenium* L. یکی از گونه‌های مهم جنس کاسنی می‌باشد که خواص دارویی متعددی دارد. در این مطالعه محتوای تام ترکیب‌های فنول، فلاونوئید، آلکالوئید و آنتوسیانین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی عصاره اتانولی اندام‌های هوایی و ریشه *T. parthenium* در مراحل مختلف فنولوژی (رویشی، گلدهی و بذردهی) بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: بدین منظور فنول کل، فلاونوئید کل، آلکالوئید کل و آنتوسیانین کل در عصاره اتانولی اندام‌های هوایی و ریشه گیاه بابونه گاوی به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شدند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲ دی فنیل - ۱ پیکریل هیدرازیل (DPPH) و فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ها در برابر باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس*) و باکتری‌های گرم منفی (*شریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی موربوم*) به روش‌های انتشار دیسک، حداقل غلظت مهار (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) ارزیابی شد.

نتایج: حداکثر میزان فنول کل ( $1/2 \pm 62/3$  میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک گیاه)، فلاونوئید کل ( $0/9 \pm 35/7$  میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه)، آلکالوئید کل ( $0/6 \pm 73/2$  میلی‌گرم معادل آتروپین بر گرم وزن خشک گیاه) و آنتوسیانین کل ( $0/3 \pm 4/2$  میلی‌گرم معادل سیانیدین ۳-گلوکوزید بر گرم وزن خشک گیاه) در عصاره اندام‌های هوایی گونه مورد مطالعه در مرحله گلدهی اندازه‌گیری شد. نتایج ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها نشان داد که عصاره اندام‌های هوایی در مرحله گلدهی گیاه دارای بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی ( $0/7 \pm 75/3$ ٪) است و حداقل فعالیت آنتی‌اکسیدانی ( $0/9 \pm 16/5$ ٪) برای عصاره ریشه در مرحله رویشی گیاه اندازه‌گیری گردید. براساس نتایج بررسی فعالیت ضدباکتریایی، بیشترین قطر هاله عدم رشد ( $0/3 \pm 21$  میلی‌متر) برای عصاره اندام‌های هوایی گیاه در مرحله گلدهی و در مقابل باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد و حداقل غلظت مهار ( $12/5$  میکروگرم بر میلی‌لیتر) و حداقل غلظت کشندگی ( $25$  میکروگرم بر میلی‌لیتر) در برابر باکتری مذکور و برای عصاره اندام‌های هوایی در مرحله گلدهی و رویشی ثبت شد. براساس نتایج، عصاره‌های گونه مورد مطالعه اثرگذاری بیشتری بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی داشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان بیان کرد که عصاره گیاه بابونه گاوی در مرحله گلدهی دارای میزان قابل توجهی از ترکیب‌های فیتوشیمیایی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی مناسب است و می‌توان از آن به‌عنوان منبع ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان و آنتی‌بیوتیک طبیعی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آلکالوئید، آنتوسیانین، فعالیت زیستی، فلاونوئید، فنول، بابونه گاوی.

## مقدمه

گیاهان دارویی سرشار از متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که نقش اساسی در درمان بسیاری از بیماری‌ها دارند (Omidbaigi, 2009). به‌طور کلی کمیت و کیفیت این ترکیبات متأثر از ژنتیک است ولی عوامل دیگری مانند عوامل اقلیمی (بارندگی، نور، باد و درجه حرارت)، خصوصیات خاک (بافت خاک، مقدار عناصر غذایی و اسیدیته) و عوامل جغرافیایی (ارتفاع از سطح دریا، مقدار شیب و جهت) نیز بر روی آن اثرگذار هستند (Nabavi et al., 2018). همچنین تحقیقات نشان داده است که محل رویش گیاه و مراحل رشد آن نیز می‌تواند بر کمیت و کیفیت این ترکیبها اثرگذار باشد (Khalasi Ahwazi et al., 2016); (Sharifi-Rad, 2022). متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی از نظر اکولوژیک در گیاهان دارند. این ترکیبات در سازگاری گیاهان به تنش‌های محیطی، محافظت از گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا و گیاهخواران، جذب گرده‌افشان‌ها و افزایش توان رقابتی گیاه نقش اساسی دارند (Yang et al., 2018). ظرفیت استفاده از این ترکیبات در صنایع داروسازی (تولید دارو برای درمان انواع بیماری‌ها)، صنایع غذایی (طعم‌دهنده محصولات غذایی و رنگ‌های طبیعی)، صنایع کشاورزی (سموم و علف‌کش‌های زیستی) و صنایع آرایشی و بهداشتی (انواع عطرها و محصولات پوستی) منجر به توجه بیشتر این ترکیبات گیاهی شده است (Mazid et al., 2011). فنول‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و آنتوسیانین‌ها از مهمترین متابولیت‌های ثانویه و مواد شیمیایی زیست فعال در گیاهان محسوب می‌شوند (Velu et al., 2018). ترکیب‌های فنولی به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا از جایگاه ویژه‌ای در رژیم غذایی انسان برخوردارند. براساس مطالعات اپیدمیولوژیک، رژیم غذایی غنی از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی از بروز اختلالات اکسیداتیو مانند سرطان، دیابت و بیماری‌های قلبی و عروقی جلوگیری می‌کند (Stevenson & Hurst, 2007). آنها همچنین خاصیت ضد باکتریایی بالایی دارند و می‌توانند به‌عنوان نگهدارنده مواد غذایی نیز استفاده شوند (Kumar & Goel, 2019).

فلاونوئیدها به‌عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدانی مناسب، نقش مهمی در پیشگیری و درمان بیماری‌های مرتبط با تنش اکسیداتیو دارند (Pan et al., 2010). همچنین نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که عصاره‌های گیاهی غنی از فلاونوئیدها دارای خواص ضدباکتریایی بالایی هستند (Shamsudin et al., 2022). آنها همچنین دارای اثرهای ضدویروسی قابل توجهی هستند و این عمل را از طریق غیر فعال‌سازی آنزیم‌های مؤثر در چرخه زندگی ویروس‌ها انجام می‌دهند (Zandi et al., 2011). آلکالوئیدها در طول سال‌ها به‌عنوان ترکیب‌های گیاهی مهم با خواص زیستی جالب شناخته شده‌اند. این ترکیب‌ها در قسمت‌های مختلف گیاهان وجود دارند و دارای فعالیت‌های زیستی گوناگون مانند فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و ضدقارچی هستند (Debnath et al., 2018). بسیاری از آلکالوئیدها سمی هستند که توسط گیاهان برای محافظت از خود در برابر تهاجم سایر موجودات استفاده می‌شود. این ترکیب‌ها در غلظت‌های پایین اثرهای مناسبی در درمان برخی از بیماری‌ها دارند (Roy, 2017). آنتوسیانین‌ها رنگدانه‌های گیاهی با فعالیت‌های زیستی متنوع هستند که کاربرد گسترده‌ای در صنایع غذایی و دارویی دارند. این ترکیب‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی (Kähkönen & Heinonen, 2003)، ضدالتهابی (Dai et al., 2007) و ضدباکتریایی (Cisowska et al., 2011) بالایی هستند. آنها می‌توانند اثرهای مثبتی بر سیستم قلبی و عروقی داشته باشند (Mazza, 2007).

در اثر متابولیسم گونه‌هایی از رادیکال‌های آزاد تحت عنوان گونه‌های اکسیژن فعال در بدن موجودات زنده تولید می‌شود که منجر به آسیب اکسیداتیو در آنها می‌شود. عوامل آنتی‌اکسیدانی با خنثی کردن گونه‌های رادیکال آزاد باعث کاهش آسیب مذکور می‌شوند (Peuchant et al., 2004). نمونه‌های گوناگونی از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی وجود دارند که در صنعت استفاده می‌شوند، با این حال اعتقاد بر این است که استفاده از این آنتی‌اکسیدان‌ها دارای اثرهای جانبی نامطلوبی است و این موضوع منجر به افزایش تمایل

گونه بابونه گاوی (*Tanacetum parthenium* L.) یکی از گونه‌های مهم این جنس محسوب می‌شود. منشأ این گیاه آسیای میانه، قزاقستان و نواحی مدیترانه‌ای است و از انتشار وسیعی در آسیا، اروپا و آمریکا برخوردار است. در ایران این گونه در مناطق مرتفع و کوهستانی، نواحی شرقی و مرکزی گسترش دارد (Saharkhiz *et al.*, 2008). اثرهای درمانی آن بر پیشگیری و درمان میگرن با کاهش تورم، درد و انقباض رگ‌های خونی گزارش شده است که شیوه اثرگذاری آن از طریق ایجاد اثر بازدارندگی بر سروتونین‌ها، هیستامین‌ها و پروستاگلندین‌ها می‌باشد (Pfaffenrath *et al.*, 2002). در طب سنتی از این گیاه برای تقویت قلب، کاهش دمای بدن در هنگام تب، کاهش التهاب ریه‌ها، کاهش درد معده، دندان درد، درمان گزیدگی حشرات، ناباروری و مشکلات مربوط به قاعدگی و زایمان استفاده می‌شود (Pareek *et al.*, 2011). ترکیب‌های شیمیایی اصلی موجود در عصاره گیاه *T. parthenium* شامل سزکویی‌ترین لاکتون (پارتولیدها، کانین و آرتکانین)، گلیکوزیدهای فلاونوئیدی (لوتولین، تانتین و آپی‌ژنین)، سزکویی‌ترین‌ها و مونوترپن‌ها (کامفور، برنتول و پینن‌ها) و ترکیب‌های دیگر (پلی‌استیلن‌ها، ملاتونین و تانن‌ها) است. پارتولیدها فراوان‌ترین سزکویی‌ترین لاکتون موجود در این گیاه و فعال‌ترین ترکیب شیمیایی آن می‌باشد (Pourianezhad *et al.*, 2016). تحقیقات متعددی گزارش کرده‌اند که این گونه دارای فعالیت‌های زیستی متنوعی از جمله فعالیت ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است (Pourianezhad *et al.*, 2016; Recinella *et al.*, 2020).

از آنجایی‌که میزان مواد مؤثره گیاهان در مراحل مختلف رشد متفاوت است، ضرورت دارد که میزان مواد مؤثره گیاهان دارویی و میزان فعالیت زیستی آنها در مراحل مختلف رشد بررسی شود و بهترین زمان برداشت گونه‌ها از نظر میزان مواد مؤثره و فعالیت زیستی مشخص گردد و بر این اساس بهره‌برداری از آنها در زمان مناسب انجام شود. از این رو، این تحقیق برای اولین بار به بررسی تأثیر مراحل

برای استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به جای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی شده است (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). از آنجایی‌که گیاهان دارویی برای هزاران سال اساس طب سنتی در سرتاسر جهان بوده‌اند و در ساخت داروهای جدید نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند، بنابراین شناسایی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با منشأ گیاهی بخش مهمی از مطالعات محققان در سراسر دنیا را به خود اختصاص داده است (Loi & Matkowski, 2008; Paciolla, 2021).

افزایش روزافزون عفونت‌های باکتریایی و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها از مسائل مهم پیش روی جوامع بشری به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه است (Nabavi *et al.*, 2015). در سال‌های اخیر کاهش کارایی آنتی‌بیوتیک‌های رایج و پی بردن به اثربخشی گیاهان دارویی مختلف در برابر عفونت‌های میکروبی باعث شده است تا تحقیقات زیادی بر روی بررسی خواص ضدباکتریایی گیاهان دارویی انجام شود (Girish & Satish, 2008). ترکیب‌های گیاهی به دلیل داشتن منشأ طبیعی، اثرهای جانبی کمتر در مقایسه با داروهای شیمیایی، در دسترس و ارزان‌تر بودن دارای جایگاه ویژه‌ای در حفظ سلامت جوامع انسانی هستند. گیاهان دارویی از گذشته‌های دور در طب سنتی کشورهای گوناگون به منظور درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شده و اثرهای امیدبخشی در درمان بسیاری از بیماری‌ها و اختلالات مانند عفونت‌های باکتریایی و ویروسی، دیابت، سرطان و اختلالات گوارشی داشته‌اند (Asadi *et al.*, 2011). سازمان بهداشت جهانی گزارش کرده است که حدود ۸۰٪ از جمعیت کشورهای در حال توسعه از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند و این گیاهان می‌توانند منبع مناسبی برای تولید دامنه وسیعی از داروها و ترکیبات فعال دارویی باشند (Al Akeel *et al.*, 2014).

خانواده کاسنی از جمله خانواده‌های گیاهی دارای پراکنش وسیع در جهان و ایران است و دربرگیرنده گونه‌های دارویی و خوراکی متعددی است. این خانواده دارای ۱۶۲۰ جنس و حدود ۲۰۰۰۰ گونه است (Chevallier, 2001).

بدست آمد که تا زمان انجام آزمایش‌ها در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد (Alara et al., 2020).

#### تعیین میزان فنول کل

مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌ها از طریق رنگ‌سنجی با معرف فولین- سیوکالچو (Folin-Ciocalteu) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۱۰۰ میکرولیتر (۱ میلی‌گرم عصاره در یک میلی‌لیتر حلال آب) از محلول عصاره درون لوله آزمایش با ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین- سیوکالچو (۵۰٪) مخلوط شد. بعد از گذشت ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم (۲٪) اضافه شد. لوله‌های آزمایش به‌طور کامل تکان داده شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. پس از آن میزان جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت گردید. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف اسید گالیک استفاده شد ( $y=0.0097x-0.0161$ ,  $R^2=0.9976$ ). میزان فنول کل در نمونه‌ها به‌صورت میلی‌گرم برابر اسید گالیک در گرم وزن خشک گیاه گزارش شد (Meda et al., 2005).

#### تعیین میزان فلاونوئید کل

میزان ترکیب‌های فلاونوئید کل با روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم تعیین شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم (۱ مولار)، ۰/۱ میلی‌لیتر کلراید آلومینیوم (۱۰٪) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شده و پس از نگهداری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت گردید. از غلظت‌های مختلف کوئرستین برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد ( $y=0.0098x-0.0589$ ,  $R^2=0.9899$ ). در نهایت میزان فلاونوئید کل در نمونه‌ها به‌صورت میلی‌گرم برابر کوئرستین در گرم وزن خشک گیاه گزارش گردید (Do et al., 2014).

مختلف فنولوژی بر میزان ترکیب‌های شیمیایی و فعالیت زیستی (آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی) اندام‌های هوایی و ریشه گونه بابونه گاوی (*Tanacetum parthenium* L.) پرداخته است تا بهترین زمان و مناسب‌ترین اندام گیاه را برای برداشت مشخص کند.

#### مواد و روش‌ها

##### تهیه نمونه گیاهی

نمونه‌های مربوط به ریشه و اندام‌های هوایی گونه بابونه گاوی در سه مرحله فنولوژیک (رویشی، گلدهی و بذردهی) با چهار تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی در مراتع حوزه آبخیز مورد مطالعه در شهرستان سریشه در سال ۱۳۹۹ برداشت شدند. بدین ترتیب که در هر مرحله فنولوژیک تعداد ۴۰ پایه از گونه مورد مطالعه به صورت تصادفی انتخاب و نمونه‌برداری از ریشه و اندام‌های هوایی آنها انجام شد. ترکیب نمونه‌های مربوط به هر ۱۰ پایه به‌عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. پس از برداشت، نمونه‌ها به آزمایشگاه گروه مرتع و آبخیزداری دانشگاه زابل منتقل شدند و پس از شناسایی، کد هرباریومی ۱۱۷۹ به آن اختصاص یافت. نمونه‌ها به صورت جداگانه در محیط خشک و سایه خشک شدند. سپس نمونه‌های خشک شده به صورت جداگانه توسط دستگاه آسیاب خرد گردید و نهایتاً میزان ۳۰۰ گرم از هر نمونه آسیاب شده برای آزمایش‌های مورد نظر برداشت و به آزمایشگاه منتقل شد.

##### تهیه عصاره

برای تهیه عصاره، ۱۰ گرم از نمونه‌های گیاهی پودر شده به یک ارلن منتقل شد و اتانول ۹۶٪ به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر به آن اضافه گردید. ترکیب حاصل به مدت ۲۴ ساعت توسط همزن مخلوط شد. پس از این مدت، عصاره‌های حاصل به‌وسیله کاغذ واتمن شماره ۱ صاف شدند. برای جداسازی عصاره از حلال از دستگاه روتاری استفاده گردید. در مرحله بعد برای حذف کامل حلال، عصاره‌ها در زیر جریان ازت قرار گرفتند. در نهایت عصاره قیری شکل

تعیین میزان آلکالوئید کل  
برای اندازه‌گیری میزان آلکالوئید کل از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. بدین صورت که ۱ میلی‌گرم از عصاره گونه مورد مطالعه در ۱ میلی‌لیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO) حل شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از اسید هیدروکلریک ۲ نرمال به آن اضافه و پس از ۳۰ دقیقه مخلوط حاصل صاف گردید. مخلوط‌های حاصل به کیف‌های جداکننده منتقل شدند. سپس، بافر فسفات (۵ میلی‌لیتر) و محلول بروموکرزول گرین (۵ میلی‌لیتر) به آنها اضافه شد. مخلوط‌ها به شدت در ترکیب با کلروفرم تکان داده شدند و فاز کلروفرمی زرد رنگ محتوی ترکیبات آلکالوئیدی در لوله‌های آزمایش جمع‌آوری گردیدند و با استفاده از کلروفرم به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسیدند. در نهایت جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری و به وسیله منحنی استاندارد مقدار آلکالوئید کل موجود در هر یک از نمونه‌ها تعیین گردید. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف آترویین استفاده شد

تعیین میزان آنتوسیانین کل  
غلظت کل آنتوسیانین براساس روش pH افتراقی اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۱۰ میلی‌لیتر از هر یک از عصاره‌ها (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با اسید کلریدریک (۱ مولار) یا هیدروکسید سدیم (۱ مولار) به صورت جداگانه مخلوط شدند تا مخلوط‌هایی با pH=۱ یا pH=۴/۵ حاصل شود. پس از گذشت مدت زمان ۳۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سیانیدین-۳-گلوکوزید به‌عنوان استاندارد استفاده شد. غلظت آنتوسیانین کل به‌عنوان میلی‌گرم برابر سیانیدین-۳-گلوکوزید در گرم وزن خشک گیاه با استفاده از معادلات زیر تعیین شد (Vega-Arroyo et al., 2017).

$$A = (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) \text{ pH } 1.0 - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) \text{ pH } 4.5$$

$A$ : مقدار جذب،  $MW$  = وزن مولکولی سیانیدین-۳-گلوکوزید (۴۴۹/۲ گرم بر مول)،  $DF$ : عامل رقت،  
1: قطر سل کوارتز (۱ سانتی‌متر)،  $\epsilon$ : جذب مولی سیانیدین-۳-گلوکوزید (۲۶۹۰۰)

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی  
فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از روش DPPH تعیین شد. برای هر نمونه ۱ میلی‌لیتر از هر یک از عصاره‌ها (۱ میلی‌گرم عصاره در یک میلی‌لیتر حلال آب) با ۴ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH (۳۰۰ میکرومولار) مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شدند و در نهایت میزان جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. از بوتیل هیدروکسی‌آنیزول (BHA) به‌عنوان آنتی‌اکسیدانی استاندارد در غلظت یکسان با عصاره‌ها برای مقایسه میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها استفاده شد. درصد مهار رادیکال آزاد

$$I (\%) = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}) \times 100$$

در این رابطه،  $I$ : مهار رادیکال آزاد DPPH،  
 $A_{\text{blank}}$ : میزان جذب نوری نمونه شاهد (آب مقطر) و  
 $A_{\text{sample}}$ : نشان دهنده جذب نوری غلظت‌های مختلف عصاره تهیه شده است.

به‌منظور بررسی دقیق‌تر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها از شاخص  $IC_{50}$  استفاده شد که بیان‌کننده غلظتی از عصاره‌ها است که قادر است غلظت رادیکال آزاد DPPH

میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته گرد و با روش میکروداپلوشن برات (Broth Microdilution) انجام شد (Sen & Batra, 2012). بدین منظور از غلظت‌های مختلفی از عصاره‌ها شامل ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ و ۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید. ۵۰ میکرولیتر از هر یک از این غلظت‌ها به خانه‌های میکروپلیت اضافه شد و پس از آن به ترتیب ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون برات و ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک‌فارلندی به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید و میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت این زمان میزان جذب آنها در طول موج ۶۲۰ نانومتر به وسیله دستگاه الیزا مدل Start fax 2100 اندازه‌گیری گردید. حداقل غلظتی از عصاره‌ها که قادر است از رشد باکتری‌ها جلوگیری کند تحت عنوان MIC بیان شد.

#### تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

برای تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی از همه چاهک‌های فاقد کدورت روی محیط کشت مولر هینتون برات کشت داده شد. محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کمترین غلظتی از عصاره‌های مورد مطالعه که مانع از رشد باکتری‌ها شده بود به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش گردید (Okoh et al., 2010).

#### تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها در این پژوهش از نرم‌افزار SPSS16 و آزمون واریانس یک‌طرفه استفاده شد. مقایسه میانگین نیز با آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد. تمامی آزمایش‌ها در چهار تکرار انجام و نتایج حاصل به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان گردید.

اولیه را به میزان ۵۰٪ کاهش دهد. البته، هر چه مقادیر IC<sub>50</sub> کمتر باشد بیانگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر است (Bekhouche et al., 2022).

#### ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی

##### روش انتشار دیسک

فعالیت ضدباکتریایی عصاره گونه مورد مطالعه در برابر باکتری‌های گرم منفی (شریشیا کلی (ATCC2359) و سالمونلا تیفی‌موریوم (ATCC 14028)) و گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 1189) و باسیلوس سرئوس (PTCC 1015)) ارزیابی گردید. برای تعیین حساسیت سویه‌های میکروبی نسبت به عصاره‌های گیاه در مراحل مختلف فنولوژی از روش انتشار دیسک استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ها با استفاده از محلول دی متیل سولفوکساید (DMSO) تهیه گردید. آنگاه دیسک‌های بلانک استریل (پادتن طب) به مدت ۵ ساعت در این عصاره‌ها غوطه‌ور شدند. پس از آن، دیسک‌ها در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. از تمام سویه‌های میکروبی غلظت معادل ۰/۵ مک‌فارلند ( $10^8 \times 1/5$  CFU/ml) تهیه شد و بعد بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به‌صورت یکنواخت کشت داده شدند. دیسک‌های حاوی عصاره‌های مختلف گونه مورد مطالعه در فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت بر روی سطح محیط کشت قرار داده شدند. دیسک حاوی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰ میکروگرم در دیسک) به‌عنوان کنترل مثبت و دیسک حاوی حلال خنثی DMSO به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از این مدت قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر توسط کولیس اندازه‌گیری شد و در نهایت میانگین قطر هاله عدم رشد گزارش گردید (Ranković et al., 2011).

#### تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC) به‌وسیله

## نتایج

## تغییرات میزان فنول کل

نتایج مربوط به تجزیه واریانس اثر مراحل مختلف فنولوژی و اندام مورد استفاده گیاه بر میزان فنول کل در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که مراحل فنولوژی و نوع اندام مورد استفاده گیاه بر میزان فنول کل اثر معنی داری دارد ( $P < 0.05$ ). براساس نتایج، بیشترین میزان

فنول کل در عصاره مربوط به اندام‌های هوایی گیاه در مرحله گلدهی ( $62/3 \pm 1/2$  میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک گیاه) و کمترین میزان آن در عصاره ریشه مربوط به مرحله رویشی گیاه ( $22/6 \pm 1$  میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک گیاه) مشاهده شد (شکل ۱).

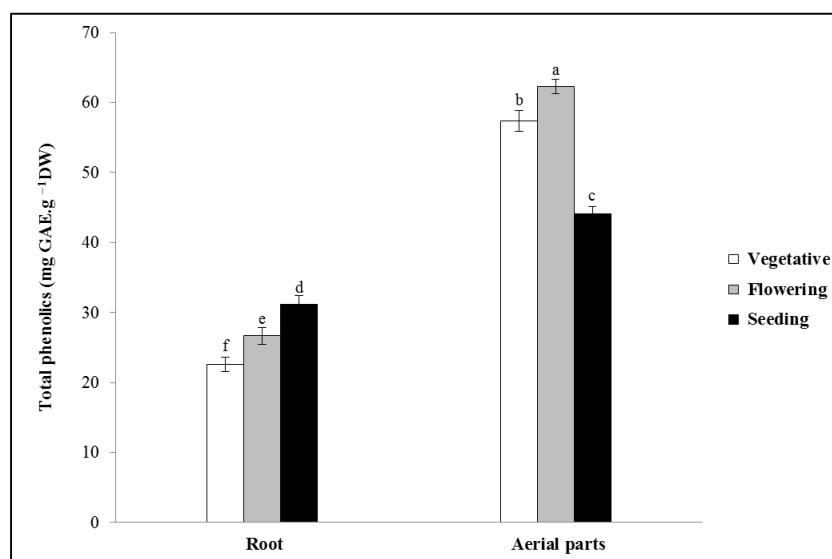
جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر مراحل فنولوژی و اندام گیاه بر میزان فنول کل، فلاونوئید کل، آلکالوئید کل، آنتوسیانین کل و

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی *Tanacetum parthenium*

**Table 1. ANOVA of phenological stages and plant organ effects on content of total phenolics, total flavonoids, total alkaloids, total anthocyanins, and antioxidant activity in *Tanacetum parthenium* ethanol extracts**

S.O.V.	d.f.	Total phenolics content	Total flavonoids content	Total alkaloids content	Total anthocyanins content	Antioxidant activity (DPPH)
Plant organ	1	3469.44*	873.62*	3112.60*	17.40*	6050.00*
Phenological stage	2	72.69*	88.34*	124.59*	0.24*	384.63*
Plant organ × Phenological stage	2	248.88*	108.62*	352.00*	1.80*	738.09*
Experimental error	12	0.22	0.07	0.06	0.05	0.08
Total	17					

\*: significant at 5% probability level



شکل ۱- مقایسه میانگین میزان فنول کل در عصاره اتانولی اندام‌های هوایی و ریشه *Tanacetum parthenium* در مراحل مختلف فنولوژی

**Figure 1. Means comparison of total phenolics content in aerial parts and root ethanol extracts at different phenological stages in *Tanacetum parthenium***

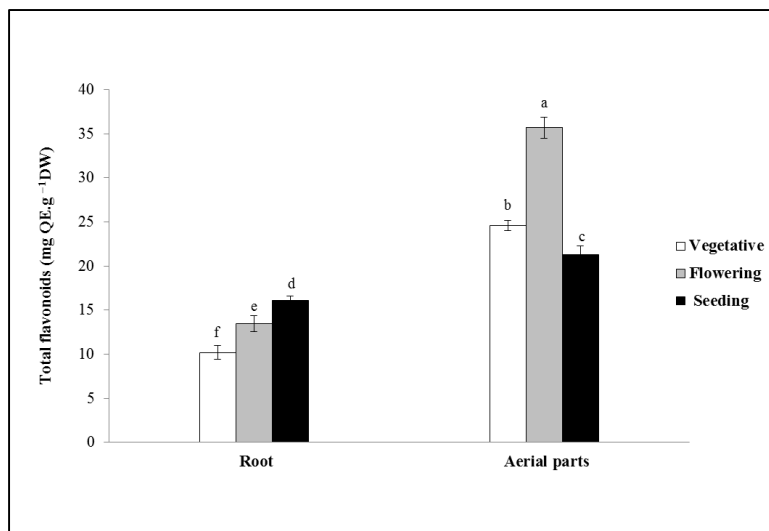
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



## تغییرات میزان فلاونوئید کل

نتایج مربوط به تجزیه واریانس اثر مراحل مختلف فنولوژی و اندام گیاه بر میزان فلاونوئید کل در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که مراحل فنولوژی و نوع اندام گیاه بر میزان فلاونوئید کل اثر معنی‌داری دارد ( $P < 0.05$ ). بیشترین میزان فلاونوئید کل در

عصاره مربوط به اندام‌های هوایی گیاه در مرحله گلدهی ( $35.7 \pm 0.9$ ) میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه) و کمترین میزان آن در عصاره ریشه مربوط به مرحله رویشی گیاه ( $10.2 \pm 0.8$ ) میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه) مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه میانگین میزان فلاونوئید کل در عصاره اتانولی اندام‌های هوایی و ریشه *Tanacetum parthenium* در مراحل مختلف فنولوژی

Figure 2. Means comparison of total flavonoids content in aerial parts and root ethanol extracts at different phenological stages in *Tanacetum parthenium*

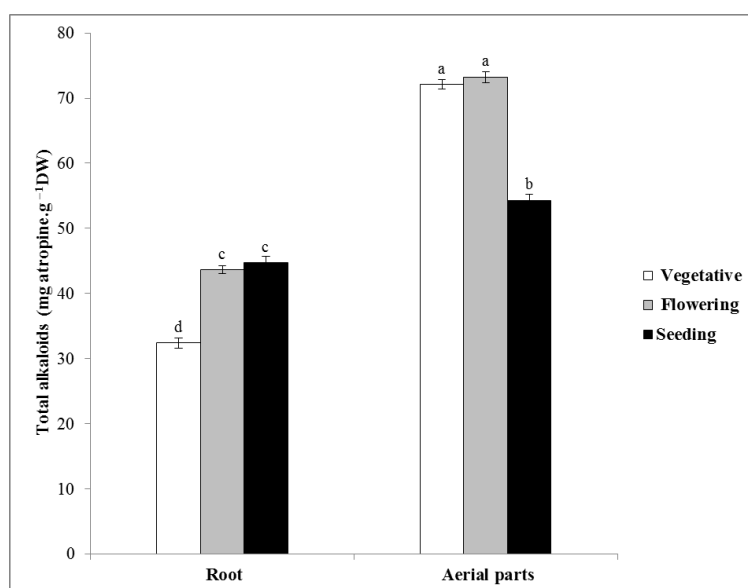
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

## تغییرات آنتوسیانین کل

نتایج تجزیه واریانس اثر مراحل مختلف فنولوژی و اندام گیاه بر میزان آنتوسیانین کل که در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد که مراحل فنولوژی و نوع اندام گیاه بر میزان آنتوسیانین کل اثر معنی‌داری دارد ( $P < 0.05$ ). بیشترین میزان آنتوسیانین کل مربوط به اندام‌های هوایی در مرحله گلدهی ( $4.2 \pm 0.3$ ) میلی‌گرم معادل سیانیدین ۳-گلوکوزید بر گرم وزن خشک گیاه) و کمترین میزان آنتوسیانین کل مربوط به ریشه در مرحله رویشی ( $1.2 \pm 0.1$ ) میلی‌گرم معادل سیانیدین ۳-گلوکوزید بر گرم وزن خشک گیاه) بود (شکل ۴).

## تغییرات میزان آلکالوئید کل

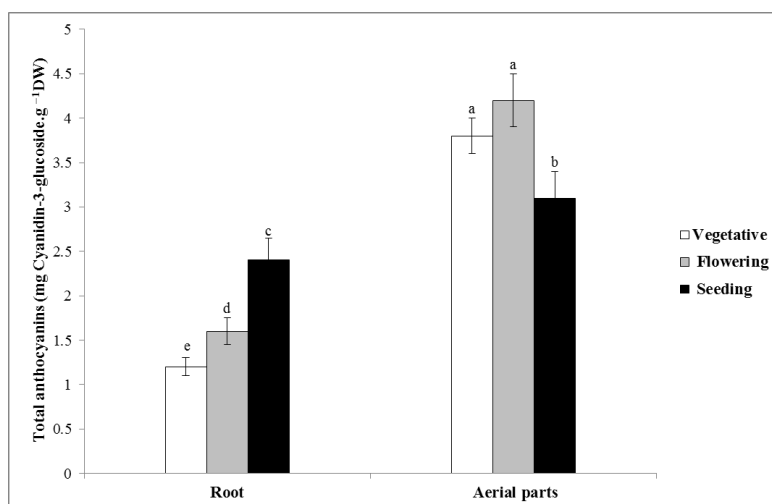
تجزیه واریانس اثر مراحل مختلف فنولوژی و اندام مورد استفاده گیاه بر میزان آلکالوئید کل (جدول ۱) نشان داد که مراحل فنولوژی و نوع اندام گیاه بر میزان آلکالوئید کل اثر معنی‌داری دارد ( $P < 0.05$ ). بیشترین میزان آلکالوئید کل در عصاره اندام‌های هوایی در مرحله گلدهی ( $73.2 \pm 0.6$ ) میلی‌گرم معادل آتروپین بر گرم وزن خشک گیاه) و کمترین میزان آلکالوئید کل در عصاره ریشه در مرحله رویشی گیاه ( $32.4 \pm 0.5$ ) میلی‌گرم معادل آتروپین بر گرم وزن خشک گیاه) اندازه‌گیری شد (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه میانگین میزان آلکالوئید کل در عصاره اتانولی اندام‌های هوایی و ریشه *Tanacetum parthenium* در مراحل مختلف فنولوژی

**Figure 3. Means comparison of total alkaloids content in aerial parts and root ethanol extracts at different phenological stages in *Tanacetum parthenium***

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۴- مقایسه میانگین میزان آنتوسیانین کل در عصاره اتانولی اندام‌های هوایی و ریشه *Tanacetum parthenium*

در مراحل مختلف فنولوژی

**Figure 4. Means comparison of total anthocyanins content in aerial parts and root ethanol extracts at different phenological stages in *Tanacetum parthenium***

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

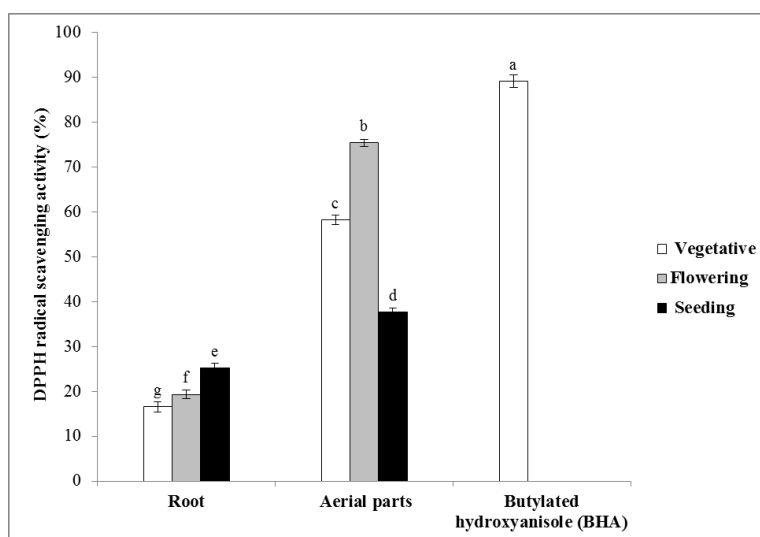
(جدول ۱) نشان داد که مراحل فنولوژی و نوع اندام گیاه بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اثر معنی‌داری دارد ( $P < 0.05$ ). در عصاره‌های اندام‌های هوایی گیاه،

فعالیت آنتی‌اکسیدانی نتایج مربوط به تجزیه واریانس اثر مراحل مختلف فنولوژی و اندام گیاه بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

گیاه (۲۷۳/۸۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد (شکل ۶). براساس نتایج، عصاره‌های اندام‌های هوایی گیاه در هر سه مرحله فنولوژی از مقادیر  $IC_{50}$  کمتری در قیاس با عصاره‌های ریشه گیاه برخوردار بودند که این موضوع نیز بیانگر توان آنتی‌اکسیدانی بالاتر عصاره‌های اندام‌های هوایی گیاه در قیاس با عصاره‌های ریشه در مراحل مختلف فنولوژی بود. با در نظر گرفتن میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی BHA (استاندارد مورد استفاده) می‌توان بیان کرد که عصاره‌های ریشه و اندام‌های هوایی گیاه مورد مطالعه از میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتری نسبت به آنتی‌اکسیدان استاندارد مورد استفاده در غلظت یکسان برخوردارند.

بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مرحله گلدهی گیاه (۷۵/۳٪) ثبت شد و پس از آن به ترتیب مراحل رویشی (۵۸/۲٪) و بذردهی (۳۷/۶٪) گیاه قرار داشتند. در عصاره‌های ریشه، بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب در مرحله بذردهی (۲۵/۲٪)، گلدهی (۱۹/۳٪) و رویشی (۱۶/۵٪) مشاهده شد (شکل ۵). با بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در اندام‌های مورد مطالعه، می‌توان مشاهده کرد که اندام‌های هوایی گیاه مورد مطالعه در تمام مراحل فنولوژی از میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری در قیاس با ریشه آن برخوردار هستند.

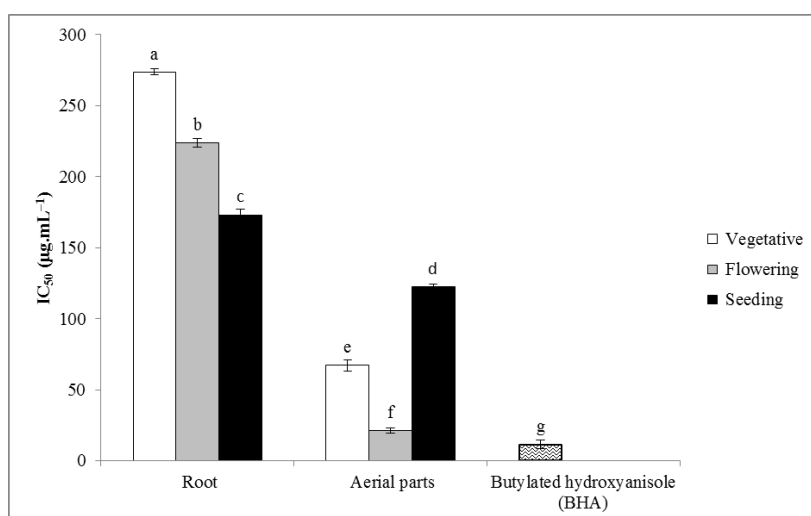
حداقل و حداکثر مقدار  $IC_{50}$  به ترتیب برای عصاره اندام‌های هوایی گیاه در مرحله گلدهی (۲۱/۳۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و عصاره ریشه در مرحله رویشی



شکل ۵- مقایسه میانگین میزان مهار رادیکال DPPH توسط عصاره اتانولی اندام‌های هوایی و ریشه *Tanacetum parthenium* در مراحل مختلف فنولوژی

**Figure 5. Means comparison of aerial parts and root ethanol extracts DPPH radical scavenging activity at different phenological stages in *Tanacetum parthenium***

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۶- مقایسه میانگین میزان IC<sub>50</sub> عصاره اتانولی اندام‌های هوایی و ریشه بابونه گاوی (*Tanacetum parthenium*) طی مراحل مختلف فنولوژی

**Figure 6. Means comparison of aerial parts and root ethanol extracts IC<sub>50</sub> at different phenological stages in *Tanacetum parthenium***

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

و نوع اندام گیاه بر میزان فعالیت ضدباکتریایی اثر معنی‌داری دارد ( $P < 0.05$ ). نتایج ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی عصاره ریشه و اندام‌های هوایی بابونه گاوی در مراحل مختلف فنولوژی به روش انتشار دیسک بر باکتری‌های مورد بررسی در جدول ۳ ارائه شده است.

فعالیت ضدباکتریایی روش انتشار دیسک

نتایج مربوط به تجزیه واریانس اثر مراحل مختلف فنولوژی و اندام گیاه بر میزان فعالیت ضدباکتریایی در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که مراحل فنولوژی

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر مراحل فنولوژی و اندام گیاه بر میزان فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی

بابونه گاوی (*Tanacetum parthenium*)

**Table 2. ANOVA of phenological stages and plant organ effects on antibacterial activity of *Tanacetum parthenium* ethanol extracts**

S.O.V.	d.f.	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
Plant organ	1	50.00*	72.00*	144.50*	162.00*
Phenological stages	2	1.50*	4.50*	3.50*	6.00*
Plant organ × Phenological stages	2	6.50*	10.50*	15.50*	18.00*
Experimental error	12	0.12	0.12	0.15	0.26
Total	17				

\*: significant at 5% probability level

ضدباکتریایی جنتامایسین (استاندارد مورد استفاده) می‌توان بیان کرد که عصاره‌های ریشه و اندام‌های هوایی گیاه مورد مطالعه از میزان فعالیت ضدباکتریایی کمتری نسبت به آنتی‌بیوتیک استاندارد مورد استفاده برخوردارند.

نتایج بررسی عصاره ریشه و اندام‌های هوایی در تمامی مراحل فنولوژی نشان داد که قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس) بیشتر از باکتری‌های گرم منفی (اشریشیا کلی و سالمونلا تیفی‌موریوم) است. با در نظر گرفتن میزان فعالیت

جدول ۳- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های مورد مطالعه تحت تأثیر عصاره‌های اتانولی مختلف بابونه گاوی (*Tanacetum parthenium*)

Table 3. Means comparison of bacteria studied inhibition zone affected by *Tanacetum parthenium* different ethanol extracts

Bacteria	Phenological stage						Gentamicin (mm)
	Vegetative		Flowering		Seeding		
	Root (mm)	Aerial parts (mm)	Root (mm)	Aerial parts (mm)	Root (mm)	Aerial parts (mm)	
<i>Escherichia coli</i>	7 ± 0.2 <sup>p</sup>	11 ± 0.3 <sup>l</sup>	7 ± 0.3 <sup>p</sup>	12 ± 0.7 <sup>k</sup>	8 ± 0.1 <sup>o</sup>	9 ± 0.2 <sup>n</sup>	14 ± 0.3 <sup>i</sup>
<i>Salmonella typhimurium</i>	8 ± 0.3 <sup>o</sup>	13 ± 0.4 <sup>l</sup>	9 ± 0.2 <sup>n</sup>	15 ± 0.5 <sup>h</sup>	10 ± 0.2 <sup>m</sup>	11 ± 0.4 <sup>l</sup>	17 ± 0.2 <sup>f</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	12 ± 0.4 <sup>k</sup>	20 ± 0.6 <sup>c</sup>	14 ± 0.4 <sup>i</sup>	21 ± 0.3 <sup>b</sup>	16 ± 0.3 <sup>g</sup>	18 ± 0.3 <sup>e</sup>	22 ± 0.1 <sup>a</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	9 ± 0.2 <sup>n</sup>	17 ± 0.4 <sup>f</sup>	11 ± 0.6 <sup>l</sup>	19 ± 0.2 <sup>d</sup>	13 ± 0.7 <sup>j</sup>	15 ± 0.7 <sup>h</sup>	21 ± 0.2 <sup>b</sup>

In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیا کلی به ترتیب برابر با ۱۲/۵، ۱۲/۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و حداقل غلظت کشندگی در برابر این باکتری‌ها به ترتیب برابر با ۲۵، ۲۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت مهارکنندگی در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیا کلی در مرحله بذردهی گیاه مربوط به عصاره اندام‌های هوایی آن و به ترتیب برابر با ۲۵، ۲۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی در برابر باکتری‌های مذکور به ترتیب برابر با ۵۰، ۵۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

نتایج آزمایش‌های حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) در جدول ۴ آورده شده است. حداقل غلظت مهارکنندگی گونه مورد مطالعه در مرحله رویشی گیاه مربوط به اندام‌های هوایی و برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیا کلی به ترتیب برابر با ۱۲/۵، ۱۲/۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود، در حالی که حداقل غلظت کشندگی در برابر این باکتری‌ها به ترتیب برابر با ۲۵، ۲۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است. حداقل غلظت مهارکنندگی در مرحله گلدهی گیاه مربوط به عصاره اندام‌های هوایی گیاه و در برابر باکتری

جدول ۴- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های اتانولی مختلف

بابونه گاوی (*Tanacetum parthenium*)

**Table 4. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) in *Tanacetum parthenium* different ethanol extracts**

Phenological stage	Plant organ	<i>Escherichia coli</i>		<i>Salmonella typhimurium</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus cereus</i>	
		MIC ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	MBC ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	MIC ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	MBC ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	MIC ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	MBC ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	MIC ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	MBC ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
Vegetative	Aerial parts	100	200	50	100	12.5	25	12.5	50
	Root	200	400	200	400	100	200	100	200
Flowering	Aerial parts	100	200	50	100	12.5	25	12.5	25
	Root	200	400	200	400	50	100	50	100
Seeding	Aerial parts	200	400	100	200	25	50	25	50
	Root	200	400	200	400	50	100	50	100

## بحث

گلدهی بابونه گاوی اندازه‌گیری شد. در توافق با یافته‌های این تحقیق، محققان بسیاری افزایش در میزان فلاونوئید طی مرحله گلدهی گیاهان را گزارش کرده‌اند که از میان آنها می‌توان به مطالعات Zribi و همکاران (۲۰۱۴) بر روی گونه *Ding, Nigella sativa* و همکاران (۲۰۱۴) بر روی گونه *Ziziphora clinopodioides* و همکاران (۲۰۱۷) بر روی گونه *Aquilaria beccariana* اشاره کرد. غلظت بالای فلاونوئیدها در مرحله گلدهی را می‌توان به این دلیل نسبت داد که فلاونوئیدها نقش عمده‌ای در رنگ میوه، رنگدانه و عطر در تولید گل دارند (Saxena et al., 2013). همزمان با اینکه گیاه برای گلدهی آماده می‌شود، احتمالاً فلاونوئیدهای بیشتری در گیاه تولید می‌شود که به‌عنوان یک سازوکار دفاعی می‌تواند از گل‌ها در برابر حملات آفات محافظت کند و این افزایش نقش مهمی در جذب گرده‌افشان‌ها دارد (Petruzza et al., 2013).

مطالعات نشان داده است که در گیاهان جوان محتوای آلکالوئیدها کم است و به تدریج مقدار آن تا یک دوره خاص افزایش یافته و پس از آن با افزایش سن گیاه مقدار آن کاهش می‌یابد (Waller & Nowacki, 1978). در این مطالعه نیز مقدار آلکالوئید در مرحله گلدهی به حداکثر میزان خود رسید و پس از آن در مرحله بذردهی میزان آن

علل افزایش بیوسنتز ترکیبات فنولی در اندام‌های هوایی گیاه در مرحله گلدهی را می‌توان به جذب حشرات گرده‌افشان و همچنین حفاظت کارآمدتر از قسمت‌های گل دهنده گیاه در برابر حملات عوامل بیماری‌زا نسبت داد (Farhat et al., 2015). همسو با نتایج این تحقیق، مطالعه تغییرات میزان فنول کل در اندام‌های هوایی گونه‌های مختلف از قبیل *Sida cordifolia* و *Boerhavia diffusa* (Verma & Kaseera, 2007) *Hypericum pruinatum* (Ayan et al., 2007) *Thymbra spicata* و *Satureja thymbra* (Müller-Riebau et al., 1997) نیز نشان داد که حداکثر تولید فنول در مرحله گلدهی آنها بود. تغییرات قابل توجه در غلظت ترکیب‌های فنولی طی رشد *Salvia aegyptiaca* تأثیر هر دو عامل مرحله فنولوژی و عوامل آب و هوایی را بر تولید و آزادسازی این متابولیت‌های ثانویه تأیید کرد (Sellami et al., 2009). Khalasi Ahwazi و همکاران (۲۰۱۶) نیز در مطالعه‌ای که بر روی کنگر علوفه‌ای (*Gundelia tournefortii*) در طی مراحل مختلف فنولوژی انجام داده‌اند، بیان کردند که بیشترین میزان فنول کل در عصاره مربوط به مرحله گلدهی گونه مورد مطالعه بود. بالاترین میزان فلاونوئید در این مطالعه در مرحله

مرحله گلدهی این گونه وجود دارد.

گیاهان دارویی دارای متابولیت‌های ثانویه مهمی (فنول‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، آنتوسیانین‌ها و ...) هستند که توسط گیاه برای دفاع از خود یا برای تقویت رشد در شرایط نامطلوب تولید می‌شوند ( *Tungmunnithum et al.*, 2018). فنول‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و آنتوسیانین‌ها از مهمترین ترکیب‌های فیتوشیمیایی با خواص آنتی‌اکسیدانی هستند (Andreu et al., 2018). گزارش شده است که رابطه مستقیمی بین میزان حضور این ترکیبات در گیاهان با توان آنتی‌اکسیدانی آنها وجود دارد ( *Gan et al.*, 2017؛ *Tena et al.*, 2020؛ *Yu et al.*, 2021). در این مطالعه نیز حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی همزمان با حضور حداکثری این ترکیب‌ها در عصاره گیاه مشاهده شد. با توجه به اینکه میزان این ترکیب‌ها در مراحل مختلف فنولوژی گیاهان متفاوت است، در نتیجه می‌توان بیان کرد که گیاهان در مراحل مختلف فنولوژی دارای توانایی آنتی‌اکسیدانی متفاوتی هستند. همسو با نتایج این مطالعه، مطالعات متعددی گزارش کرده‌اند که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان با توجه به مرحله فنولوژی گیاه و نوع اندام گیاهی می‌تواند متفاوت باشد. از جمله این مطالعات می‌توان به مطالعات *Jordán* و همکاران (۲۰۱۳) بر روی گونه *Rosmarinus officinalis* و همکاران (۲۰۲۰) بر روی گونه *Portulaca oleracea* و همکاران (۲۰۲۱) بر روی گونه *Cleome gynandra* اشاره کرد.

همسو با نتایج این تحقیق، مطالعات متعددی اثرگذاری بیشتر عصاره‌های گیاهی بر باکتری‌های گرم مثبت در قیاس با باکتری‌های گرم منفی را گزارش کرده‌اند. از جمله این مطالعات می‌توان به مطالعه خاصیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی گونه *Allium sativum* توسط *Yetgin* و همکاران (۲۰۱۸)، مطالعه فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی گونه‌های *Eucalyptus tereticornis* و *Nigella sativa* توسط *Rasool* و همکاران (۲۰۱۸) و بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره متانولی گونه‌های *Dracocephalum kotschyi* و *Trachyspermum ammi* به‌وسیله *Yazdeli* و همکاران (۲۰۲۱) اشاره کرد.

کاهش یافت. همسو با نتایج این تحقیق *Kasera* و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه‌ای که به منظور بررسی تغییرات میزان آلکالوئید در مراحل مختلف رشد گونه‌های *Rouwolfia serpentine* و *Catharanthus roseus* انجام دادند، بیان کردند که این گیاهان در مرحله گلدهی دارای حداکثر میزان آلکالوئید کل هستند. همچنین *Sharifi-Rad* و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه‌ای که با هدف بررسی تغییرات ترکیبات شیمیایی گونه *Teucrium polium* انجام دادند گزارش کردند که مرحله گلدهی گونه مورد مطالعه دارای حداکثر میزان ترکیب‌های آلکالوئیدی است. نتایج مشابهی در مطالعات *Cirak* و همکاران (۲۰۱۳) بر روی دو گونه جنس *Hypericum* *Towler* و *Weathers* (۲۰۱۵) بر روی گونه *Origanum vulgare* و *Baranauskiene* و همکاران (۲۰۱۳) بر روی گونه *Artemisia annua* بدست آمده است. علت افزایش این ترکیب‌ها می‌تواند به این دلیل باشد که فعالیت تولید مثلی گیاهان باعث جذب حشرات می‌شود و تماس آنها با گیاهان باعث تولید این ترکیب‌ها در گیاهان می‌گردد که تصور می‌شود بخشی از سازوکار دفاعی گیاهان است ( *Ribeiro et al.*, 2019).

مطالعات نشان داده است که میزان آنتوسیانین تا مرحله گلدهی گیاهان روند افزایشی دارد و پس از رسیدن گیاهان به بلوغ و در مرحله بذردهی مقدار آن در نتیجه تخریب مولکول‌های آنتوسیانین یا اکسیداسیون پلی‌فنول‌ها کاهش می‌یابد ( *Cabrita et al.*, 2000). همسو با نتایج این تحقیق *Salem* و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی تغییرات میزان آنتوسیانین در گونه *Borago officinalis* بیان کردند که مراحل مختلف رشد گیاه اثر معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بر میزان آنتوسیانین دارد و مرحله گلدهی گیاه دارای بالاترین میزان آنتوسیانین بود. *Sood* و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی تغییرات آنتوسیانین در دو گونه رز، بیان کردند که مرحله گلدهی کامل گیاهان دارای بالاترین محتوای آنتوسیانین است. *Chepel* و همکاران (۲۰۲۰) با مطالعه *Calluna vulgaris* در مراحل مختلف رشد گزارش کردند که میزان آنتوسیانین در این گونه بستگی به مرحله رشد آن دارد و بیشترین میزان آنتوسیانین در

از متابولیسم انرژی و مهار ساخت دیواره و غشای سلولی می‌شوند (Cushnie & Lamb, 2011). آنتوسیانین‌ها دارای چندین عملکرد هستند که از جمله آنها می‌توان به ایجاد بی‌ثباتی در غشای سلولی، مهار آنزیم‌های میکروبی خارج سلولی و اثرهای مستقیم بر متابولیسم میکروبی را نام برد (Daglia, 2012). آلکالوئیدها به‌عنوان یکی از اولین ترکیب‌های زیست فعال جدا شده از گیاهان نیز قادرند با ایجاد تداخل در ساختار DNA، ایجاد وقفه در فعالیت آنزیم‌ها و تنفس سلولی عملکرد ضدباکتریایی خود را نشان دهند (Kovacevic, 2004). براساس نتایج عصاره مربوط به اندام‌های هوایی، بابونه گاوی در تمام مراحل فنولوژی از مقادیر کمتر MIC و MBC در قیاس با عصاره‌های ریشه آن برخوردار بود که این موضوع تأیید کننده توانایی ضدباکتریایی بالاتر عصاره‌های هوایی در مقایسه با عصاره‌های ریشه آن است. همچنین نتایج حاصل از آزمایش‌های MIC و MBC نشان داد که باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس در مقایسه با باکتری‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیا کلی حساسیت بیشتری در برابر عصاره‌های گونه بابونه گاوی دارند.

در این مطالعه، عصاره‌های اندام‌های هوایی و ریشه گونه بابونه گاوی (*Tanacetum parthenium*) در مراحل مختلف فنولوژی از نظر محتوای فنولی، فلاونوئیدی، آلکالوئیدی و آنتوسیانینی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره‌های گونه مورد مطالعه سرشار از ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی، آلکالوئیدی و آنتوسیانینی هستند. همچنین تمامی عصاره‌ها دارای توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH هستند، بنابراین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسبی می‌باشند. نتایج نشان داد که رابطه مستقیمی بین محتوای فنولی، فلاونوئیدی، آلکالوئیدی و آنتوسیانینی عصاره‌ها با میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها وجود دارد. عصاره‌های هوایی مربوط به مرحله گلدهی گیاه با دارا بودن بالاترین میزان ترکیبات فیتوشیمیایی مذکور دارای بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود. نتایج بررسی فعالیت ضدباکتریایی نشان داد که عصاره‌های گونه مورد مطالعه دارای اثر بازدارندگی در برابر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت هستند. براساس نتایج،

مطالعات نشان داده است که باکتری‌های گرم منفی به دلیل نوع دیواره‌هایی که دارند از حساسیت کمتری در مقابل عوامل ضدباکتریایی برخوردارند که دلیل آن وجود ترکیب‌های لیپولی ساکاریدی در دیواره سلولی این باکتری‌ها است که مانع از ورود مولکول‌های آب‌گریز و بزرگ به داخل سلول‌ها می‌شود. با توجه به خاصیت آب‌گریزی ترکیب‌های مؤثره گیاهی می‌توان بیان کرد که ساختار دیواره باکتری‌های گرم منفی از نفوذ این ترکیبات به درون سلول جلوگیری کرده، در نتیجه باعث مقاومت بیشتر این باکتری‌ها در مقابل عصاره‌های گیاهی می‌شود (Górnjak et al., 2019). نتایج این تحقیق نشان داد که اندام‌های هوایی گیاه بابونه گاوی از فعالیت ضدباکتریایی بالاتری نسبت به ریشه آن برخوردار است و در میان عصاره‌های مربوط به اندام‌های هوایی گیاه، عصاره مرحله گلدهی آن دارای بیشترین اثرگذاری بر باکتری‌های مورد مطالعه بود. با توجه به نتایج حاصل از بررسی میزان ترکیبات فیتوشیمیایی، می‌توان ملاحظه کرد که رابطه مستقیمی بین میزان ترکیب‌های فیتوشیمیایی و میزان فعالیت ضدباکتریایی وجود دارد. مطالعات متعددی وجود این رابطه مستقیم را گزارش کرده‌اند که از جمله آنها می‌توان به مطالعات Paz و همکاران (۲۰۱۸) بر روی گونه *Tagousop Hamelia patens* و همکاران (۲۰۱۸) بر روی گونه *Graptophyllum grandulosum* Sabatini و همکاران (۲۰۲۰) بر روی گونه *Prunus spinosa* Liu و همکاران (۲۰۲۲) بر روی گونه *Macleaya cordata* اشاره کرد. مهار رشد باکتری‌ها توسط عصاره‌های گیاهی از طریق سازوکارهای مختلفی انجام می‌شود که از جمله آنها می‌توان به اختلال در عملکرد و ساختار غشاء، وقفه در سنتز و عملکرد DNA و RNA، تداخل در متابولیسم سلولی و القای انعقاد اجزای سیتوپلاسمی اشاره نمود (Coppo & Marchese, 2014; Radulovic et al., 2013). ترکیب‌های فنولی قادرند غشای سلولی را تحت تأثیر قرار دهند و با تغییر نفوذپذیری در دیواره سلولی منجر به نشست محتوای سلولی شوند و باعث اختلال در ساختار پروتئین‌های غشایی گردند (Daglia, 2012). فلاونوئیدها علاوه بر تأثیرگذاری بر غشای سلولی، باعث جلوگیری از سنتز اسید نوکلئیک، ممانعت



- Ayan, A.K., Yanar, P., Cirak, C. and Bilgener, M., 2007. Morphogenetic and diurnal variation of total phenols in some *Hypericum* species from Turkey during their phenological cycles. *Bangladesh Journal of Botany*, 36(1): 39-46.
- Baranauskienė, R., Venskutonis, P.R., Dambrauskienė, E. and Viškelis, P., 2013. Harvesting time influences the yield and oil composition of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* and ssp. *hirtum*. *Industrial Crops and Products*, 49: 43-51.
- Bekhouche, M., Benyammi, R., Slaoui, M.K., Krimat, S., Paris, C., Khelifi, L. and Morsli, A., 2022. Flavonoid profile and antioxidant properties of Algerian common yew (*Taxus baccata* L.). *Clinical Phytoscience*, 8(1): 17-28.
- Cabrita, L., Fossen, T. and Andersen, M., 2000. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food chemistry*, 68(1): 101-107.
- Chepel, V., Lisun, V. and Skrypnik, L., 2020. Changes in the content of some groups of phenolic compounds and biological activity of extracts of various parts of heather (*Calluna vulgaris* (L.) Hull) at different growth stages. *Plants*, 9(8): 926.
- Chevallier, A., 2001. *The Encyclopedia of Medicinal Plants*. Dorling Kindersley, London, 336p.
- Cirak, C., Radusiene, J., Camas, N., Caliskan, O. and Odabas, M.S., 2013. Changes in the contents of main secondary metabolites in two Turkish *Hypericum* species during plant development. *Pharmaceutical biology*, 51(3): 391-399.
- Cisowska, A., Wojnicz, D. and Hendrich, A.B., 2011. Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Natural product communications*, 6(1): 193-204.
- Coppo, E. and Marchese, A., 2014. Antibacterial activity of polyphenols. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15(4): 380-390.
- Cushnie, T.T. and Lamb, A.J., 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 38(2): 99-107.
- Daglia, M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2): 174-181.
- Dai, J., Patel, J.D., Mumper, R.J., 2007. Characterization of blackberry extract and its antiproliferative and anti-inflammatory properties. *Journal of Medicinal Food*, 10: 258-265.
- Debnath, B., Singh, W.S., Das, M., Goswami, S., Singh, M.K., Maiti, D. and Manna, K., 2018. Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Materials today chemistry*, 9: 56-72.

عصاره مرحله گلدهی گونه مورد مطالعه دارای بیشترین اثرگذاری بر باکتری‌های مورد مطالعه بود و عصاره مربوط به اندام‌های هوایی گیاه در مرحله گلدهی اثرگذارترین عصاره بر باکتری‌های مورد مطالعه بود. براساس نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان بیان کرد که گونه بابونه گاوی دارای میزان قابل توجهی از ترکیب‌های فیتوشیمیایی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی مناسب است و می‌تواند به‌عنوان یک منبع جایگزین برای آنتی‌اکسیدان‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مصنوعی مورد توجه قرار بگیرد.

### سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه زابل انجام شده است (شماره گرنت: IR-UOZ- GR- 9186). بدین وسیله از تمام دست‌اندرکاران قدردانی می‌شود.

### References

- Al Akeel, R., Al-Sheikh, Y., Mateen, A., Syed, R., Janardhan, K. and Gupta, V.C., 2014. Evaluation of antibacterial activity of crude protein extracts from seeds of six different medical plants against standard bacterial strains. *Saudi journal of biological sciences*, 21(2): 147-151.
- Alara, O.R., Abdurahman, N.H. and Olalere, O.A., 2020. Ethanolic extraction of flavonoids, phenolics and antioxidants from *Vernonia amygdalina* leaf using two-level factorial design. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1): 7-16.
- Andreu, L., Nuncio-Jáuregui, N., Carbonell-Barrachina, Á.A., Legua, P. and Hernández, F., 2018. Antioxidant properties and chemical characterization of Spanish *Opuntia ficus-indica* Mill. cladodes and fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4): 1566-1573.
- Anwar, K., Rahmanto, B., Triyasmono, L., Rizki, M.I., Halwany, W. and Lestari, F., 2017. The influence of leaf age on total phenolic, flavonoids, and free radical scavenging capacity of *Aquilaria beccariana*. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 8: 129-133.
- Asadi, S.Y., Zamiri, A., Ezzati, S., Parsaei, P., Rafeian, M. and Shirzad, H., 2011. Effect of alcoholic extract of green tea (*Camellia sinensis*) on the healing process in surgical and burn wounds in rats. *Journal of Birjand University Medical Science*, 18(1): 1-9.

- applications. *Biotechnology Reports*, 24: e00370.
- Liu, Z.H., Wang, W.M., Zhang, Z., Sun, L. and Wu, S.C., 2022. Natural antibacterial and antivirulence alkaloids from *Macleaya cordata* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in pharmacology*, 13: 813172-813172.
  - Loi, M. and Paciolla, C., 2021. Plant Antioxidants for Food Safety and Quality: Exploring New Trends of Research. *Antioxidants*, 10(6): 972.
  - Maina, S., Ryu, D.H., Bakari, G., Misinzo, G., Nho, C.W. and Kim, H.Y., 2021. Variation in phenolic compounds and antioxidant activity of various organs of African Cabbage (*Cleome gynandra* L.) accessions at different growth stages. *Antioxidants*, 10(12): 1952.
  - Matkowski, A., 2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants. A Review. *Biotechnology Advances*, 26(6): 548-560.
  - Mazid, M., Khan, T.A. and Mohammad, F., 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and medicine*, 3(2): 232-249.
  - Mazza, G., 2007. Anthocyanins and heart health. *Annali-Istituto Superiore Di Sanita*, 43(4): 369.
  - Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J. and Nacoulma, O.G., 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91: 571-577.
  - Müller-Riebau, F.J., Berger, B.M., Yegen, O. and Cakir, C., 1997. Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12): 4821-4825.
  - Nabavi, S.J., zali, S.H., Ghorbani, J. and Kazemi, S.Y., 2018. Effects of some ecological factors on extract of *Juniperus communis* L. in Mountainous Rangelands of Hezarjarib- Behshahr. *Journal of Plant Process and Function*, 6(19): 367-374.
  - Nabavi, S.M., Marchese, A., Izadi, M., Curti, V., Daglia, M. and Nabavi, S.F., 2015. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chemistry*, 173: 339-347.
  - Okoh, O.O., Sadimenko, A.P. and Afolayan, A.J., 2010. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food chemistry*, 120(1): 308-312.
  - Omidbaigi, R., 2009. Production and Processing of Medicinal Plant. Razavi Ghods Astan Publication, Mashhad, 400p.
  - Ding, W., Yang, T., Liu, F. and Tian, S., 2014. Effect of different growth stages of *Ziziphora clinopodioides* Lam. on its chemical composition. *Pharmacognosy Magazine*, 10(Suppl 1): S1.
  - 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.
  - Farhat, M.B., Jordán, M.J., Chaouch-Hamada, R., Landoulsi, A. and Sotomayor, J.A., 2015. Changes in phenolic profiling and antioxidant capacity of *Salvia aegyptiaca* L. by-products during three phenological stages. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1): 791-797.
  - Gan, J., Feng, Y., He, Z., Li, X. and Zhang, H., 2017. Correlations between antioxidant activity and alkaloids and phenols of Maca (*Lepidium meyenii*). *Journal of Food Quality*, 2017: 1-10.
  - Girish, H.V. and Satish, S., 2008. Antibacterial Activity of Important Medicinal Plants on Human Pathogenic Bacteria-a Comparative Analysis. *World Applied Science Journal*, 5(3): 267-271.
  - Górniak, I., Bartoszewski, R. and Króliczewski, J., 2019. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 18(1): 241-272.
  - Jordán, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S. and Sotomayor, J.A., 2013. Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its polyphenolic extract. *Industrial crops and products*, 48: 144-152.
  - Kähkönen, M.P. and Heinonen, M., 2003. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 628-633.
  - Kasera, P.K., Soni, A., Daiya, K. and Sagar, A., 2018. Evaluation of phytochemical variations in medicinal plants of Rajasthan. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 5(1): 12-21.
  - Khalasi Ahwazi, L., Heshmati, G.A., Zofan, P. and Akbarlou, M., 2016. Total phenol, flavonoid contents and antioxidant activity of *Gundelia tournefortii* L. in different phenological stage and habitats of North East of khozestan province. *Ecophytochemical Journal of medicinal plants*, 4(1): 33-46.
  - Kovacevic, N., 2004. Basis of Pharmacognosy. 3rd ed. Belgrade, Serbian School Book, 409p.
  - Kumar, N. and Goel, N., 2019. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic

- effects induced by *Tanacetum parthenium* water extract: Results from in silico, in vitro and ex vivo studies. *Molecules*, 26(1): 22.
- Ribeiro, D.A., de Macêdo, D.G., Boligon, A.A., Menezes, I.R.A., de Almeida Souza, M.M. and da Costa, J.G.M., 2019. Influence of seasonality on the phenolic composition of *Secondatia floribunda* A. DC (Apocynaceae) during its phenological cycle. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(12): 1-16.
  - Roy, A., 2017. A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants. *International Journal of Plant Biotechnology*, 3(2): 1-9.
  - Sabatini, L., Fraternali, D., Di Giacomo, B., Mari, M., Albertini, M.C., Gordillo, B., Rocchi, M.B.L., Sisti, D., Coppari, S., Semprucci, F. and Guidi, L., 2020. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activity of *Prunus spinosa* L. fruit ethanol extract. *Journal of Functional Foods*, 67: 103885.
  - Saffaryazdi, A., Ganjeali, A., Farhoosh, R. and Cheniany, M., 2020. Variation in phenolic compounds,  $\alpha$ -linolenic acid and linoleic acid contents and antioxidant activity of purslane (*Portulaca oleracea* L.) during phenological growth stages. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(7): 1519-1529.
  - Saharkhiz, M., Sattari, M., Goodarzi, G.H. and Omidbaigi, R., 2008. Assessment of antibacterial properties of *Tanacetum parthenium* L. essential oil. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 24(1): 47-55.
  - Salem, N., Msaada, K., Hammami, M., Limam, F., Vasapollo, G. and Marzouk, B., 2014. Variation in anthocyanin and essential oil composition and their antioxidant potentialities during flower development of Borage (*Borago officinalis* L.). *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 148(3): 444-459.
  - Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D. and Gupta, A., 2013. Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 1(6): 123-135.
  - Sellami, I.H., Maamouri, E., Chahed, T., Wannes, W.A., Kchouk, M.E. and Marzouk, B., 2009. Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Industrial Crops and Products*, 30(3): 395-402.
  - Sen, A. and Batra, A., 2012. Determination of antimicrobial potentialities of different solvent extracts of the medicinal plant: *Phyllanthus amarus* Schum. and Thonn. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, 6(1): 1-10.
  - Pan, M.H., Lai, C.S. and Ho, C.T., 2010. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food & Function*, 1(1): 15-31.
  - Pareek, A., Suthar, M., Rathore, G.S. and Bansal, V., 2011. Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): A systematic review. *Pharmacognosy reviews*, 5(9): 103.
  - Paz, J.E.W., Contreras, C.R., Munguía, A.R., Aguilar, C.N. and Inungaray, M.L.C., 2018. Phenolic content and antibacterial activity of extracts of *Hamelia patens* obtained by different extraction methods. *Brazilian journal of microbiology*, 49: 656-661.
  - Petrusa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S. and Vianello, A., 2013. Plant flavonoids biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *International journal of molecular sciences*, 14(7): 14950-14973.
  - Peuchant, E., Brun, J., Rigalleau, V., Dubourg, L., Thomas, M. and Daniel, J., 2004. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 Diabetes. *Clinical Biochemistry*, 37: 293-298.
  - Pfaffenrath, V., Diener, H.C., Fischer, M., Friede, M. and Henneicke-von Zepelin, H.H., 2002. The efficacy and safety of *Tanacetum parthenium* (feverfew) in migraine prophylaxis- a double-blind, multicentre, randomized placebo-controlled dose-response study. *Cephalalgia*, 22(7): 523-532.
  - Pourianezhad, F., Tahmasebi, S., Abdusi, V., Nikfar, S. and Mirhoseini, M., 2016. Review on feverfew, a valuable medicinal plant. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 5(2): 45-49.
  - Radulovic, N.S., Blagojevic, P.D., Stojanovic-Radic, Z.Z. and Stojanovic, N.M., 2013. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Current medicinal chemistry*, 20(7): 932-952.
  - Ranković, B.R., Kosanić, M.M. and Stanojković, T.P., 2011. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. *BMC complementary and alternative medicine*, 11(1): 1-8.
  - Rasool, M., Malik, A., Alam, M.Z., Afzal, M., Alam, R., Arsalan, H.M., Azam, M., Achakzai, W.M., Saddozai, S., Haque, A. and Alam, Q., 2018. Optimization of antibacterial activity of ethanolic extracts of *Eucalyptus tereticornis* and *Nigella sativa*: Response surface methodology. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 31(4): 26-39.
  - Recinella, L., Chiavaroli, A., di Giacomo, V., Antolini, M.D., Acquaviva, A., Leone, S., Brunetti, L., Menghini, L., Ak, G., Zengin, G. and Di Simone, S.C., 2020. Anti-Inflammatory and neuromodulatory

- Medicines, 5(3): 93.
- Vega-Arroy, D.J., Ruiz-Espinosa, H., Luna-Guevara, J.J., Luna-Guevara, M.L., Hernández-Carranza, P., Ávila-Sosa, R. and Ochoa-Velasco, C.E., 2017. Effect of solvents and extraction methods on total anthocyanins, phenolic compounds and antioxidant capacity of *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas peel. Czech Journal of Food Sciences, 35(5): 456-465.
  - Velu, G., Palanichamy, V. and Rajan, A.P., 2018. Phytochemical and pharmacological importance of plant secondary metabolites in modern medicine. In: Roopan, S.M., Madhumitha, G., editors. Bioorganic Phase in Natural Food: An Overview. 1 ed. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature Springer, Cham, 135-156.
  - Verma, V. and Kasera, P.K., 2007. Variations in secondary metabolites in some arid zone medicinal plants in relation to season and plant growth. Indian Journal of Plant Physiology, 12(2): 203.
  - Waller, G.R. and Nowacki, E.K., 1978. The role of alkaloids in plants. 143-181, In: Waller, G. (Ed.), Alkaloid Biology and Metabolism in Plants. Springer, Boston, MA, 294p.
  - Yang, L., Wen, K.S., Ruan, X., Zhao, Y.X., Wei, F. and Wang, Q., 2018. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. Molecules, 23(4): 762.
  - Yazdeli, M.Z., Ghazaei, C., Maraghi, E.T., Bakhshi, A. and Shukohifar, M., 2021. Evaluation of antibacterial synergism of methanolic extract of *Dracocephalum kotschyi* and *Trachyspermum ammi*. The Malaysian Journal of Medical Sciences, 28(6): 64-76.
  - Yetgin, A., Canli, K. and Altuner, E.M., 2018. Comparison of antimicrobial activity of *Allium sativum* cloves from China and Taşköprü, Turkey. Advances in pharmacological sciences, 2018: 9302840.
  - Yu, M., Gouvinhas, I., Rocha, J. and Barros, A.I., 2021. Phytochemical and antioxidant analysis of medicinal and food plants towards bioactive food and pharmaceutical resources. Scientific reports, 11(1): 1-14.
  - Zandi, K., Teoh, B.T., Sam, S.S., Wong, P.F., Mustafa, M.R. and AbuBakar, S., 2011. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. Virology Journal, 8(1): 1-11.
  - Zribi, I., Omezzine, F. and Haouala, R., 2014. Variation in phytochemical constituents and allelopathic potential of *Nigella sativa* with developmental stages. South African Journal of Botany, 94: 255-262.
  - Shahidi, F. and Ambigaipalan, P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects- A review. Journal of Functional Foods, 18: 820-897.
  - Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R. and Verdian-rizi, M., 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences, 32(1): 17-20.
  - Shamsudin, N.F., Ahmed, Q.U., Mahmood, S., Ali Shah, S.A., Khatib, A., Mukhtar, S., Alsharif, M.A., Parveen, H. and Zakaria, Z.A., 2022. Antibacterial effects of flavonoids and their structure-activity relationship study: a comparative interpretation. Molecules, 27(4): 1149.
  - Sharifi-Rad, M., 2022. Evaluation of phytochemical, antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory properties of Moshgak (*Ducrosia anethifolia* (DC.) Boiss.) at different phenological stages. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 37(6): 971-988.
  - Sharifi-Rad, M., Pohl, P., Epifano, F., Zengin, G., Jaradat, N. and Messaoudi, M., 2022. *Teucrium polium* (L.): phytochemical screening and biological activities at different phenological stages. Molecules, 27(5): 1561.
  - Sood, S., Vyas, D. and Nagar, P.K., 2006. Physiological and biochemical studies during flower development in two rose species. Scientia Horticulturae, 108(4): 390-396.
  - Stevenson, D. and Hurst, R., 2007. Polyphenolic phytochemicals-just antioxidants or much more?. Cellular and Molecular Life Sciences, 64(22): 2900-2916.
  - Tagousop, C.N., Tamokou, J.D.D., Ekom, S.E., Ngnokam, D. and Voutquenne-Nazabadioko, L., 2018. Antimicrobial activities of flavonoid glycosides from *Graptophyllum grandulosum* and their mechanism of antibacterial action. BMC complementary and alternative medicine, 18(1): 1-10.
  - Tena, N., Martín, J. and Asuero, A.G., 2020. State of the art of anthocyanins: Antioxidant activity, sources, bioavailability, and therapeutic effect in human health. Antioxidants, 9(5): 451.
  - Towler, M.J. and Weathers, P.J., 2015. Variations in key artemisinin and other metabolites throughout plant development in *Artemisia annua* L. for potential therapeutic use. Industrial crops and products, 67: 185-191.
  - Tungmunthum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A. and Yangsabai, A., 2018. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview.