

Cytotoxic Effects of Extract and Essential oil Leaves of *Achillea wilhelmsii* C.Koch on Human Colon Cancer Cells

L. Dallaliifahani^{*1}, R. Monajemi², L. Amjad²

1- Master of science, Department of Biology, Islamic Azad
University FalavarjanBranch, Isfahan, Iran

2- Assistant professor, Department of Biology, Islamic Azad
University FalavarjanBranch, Isfahan, Iran

ABSTRACT

Introduction: *Achillea wilhelmsii* C.Koch, was used in traditional medicine such as anti-inflammation, antispasmodic and gastrointestinal disorders. The aim of this study was to survey the cytotoxic effects of methanol and essential oil of leaf aerial parts of *Achillea wilhelmsii* on HT-29 cell line

Materials and Methods: *Achillea wilhelmsii* was collected from around sharekord. Dried aerial parts of the plant for 3 days at room temperature. Dried herb powder was extracted by methanol. After preparing extract essential oil and 12.5,25,50,100 ?g/ml concentration for extract and 2,3.2,4,4.8,5.6,7.2,16,24,32,40 ?g/ml concentration for essential oil on the cells were evaluated for 48 hours. Cytotoxic effects of *Achillea wilhelmsii* extract and essential oil against cancer cells was measured by MTT method. The results by using SPSS .

Results: The results shows that: the extracts methanolic and essential oils has cytotoxic effects on HT-29 cell line.

Conclusion: The findings suggest that the essential oil has a more powerful effect than the methanolic extract of leaf due to existence phenolic compounds, especially flavonoids has an inhibitory effect on the HT29 cell line but essential oil of leaf due to existence monoterpene compound such as α -Pinene and 1,8 Cineole, has a potent inhibitory on HT29 cell line.

Keywords: *Achillea wilhelmsii*, cytotoxic, colon cancer, HT-29, extract, essential oil

مجله علمی - پژوهشی زیست شناسی جانوری تجربی
سال اول، شماره سوم، زمستان ۱۳۹۱ (۲۲-۱۳)

بررسی اثر سمیت سلولی عصاره و اسانس برگ *Achillea wilhelmsii* C.Koch بر روی سلول های سرطانی کولون انسان

لیلا دلالی اصفهانی^۱، رامش منجمی^۱، لیلا امجد^۲

^۱ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان،
ایران.

^۲ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه
زیست شناسی، اصفهان، ایران.

چکیده

مقدمه و هدف: گیاه بومادران *Achillea wilhelmsii* C.Koch، در طب سنتی به عنوان ضد التهاب، ضد اسپاسم و اختلالات گوارشی مورد استفاده قرار می گیرد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره ی متانولی و اسانس برگ این گیاه بر روی رده سلولی HT-29 بود.

مواد و روش ها: گیاه بومادران از اطراف شهرکرد جمع آوری شد. بخش های هوایی گیاه به مدت سه روز در دمای اتاق خشک و عصاره ی متانولی و اسانس از آن تهیه گردید. پس از تهیه عصاره و اسانس اثر غلظت های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۴۰، ۳۲ و ۲۴، ۱۶ و ۷/۲ و ۵/۶ و ۴/۸ و ۴ و ۳/۲ و ۲ برای اسانس بر رده سلولی HT-29 به مدت ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. اثر سمیت سلولی عصاره و اسانس برگ گیاه بومادران بر ضد سلول های سرطانی HT-29 توسط روش MTT ارزیابی شد. برای آنالیز از نرم افزار SPSS18 استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که عصاره های متانولی و اسانس برگ گیاه مورد نظر دارای اثرات سیتوتوکسیک بر رده سلولی HT-29 می باشد. **بحث:** یافته های این پژوهش نشان داد که اسانس برگ گیاه بومادران دارای اثرات سیتوتوکسیک قوی تری نسبت به عصاره ی متانولی می باشد عصاره متانولی برگ این گیاه به علت وجود ترکیبات فنولی بالاخص فلاونوئیدها اثر مهاری روی رده سلولی HT-29 دارد ولی اسانس برگ به علت وجود ترکیباتی مونوترپنی همچون ۱،۸ سینئول و آلفاپینن دارای اثر مهاری قوی بر روی رده سلولی HT-29 می باشد

کلید واژه ها: *Achillea wilhelmsii*، سیتوتوکسیک، سرطان کولون، HT-29، عصاره، اسانس.

*نویسنده مسئول: لیلا دلالی اصفهانی
Email: leila_dalaliifahani@yahoo.com

مقدمه

سرطان همچنان به عنوان یکی از علل عمده مرگ و میر در سراسر جهان است و تنها پیشرفت اندکی در کاهش عوارض مرگ و میر این بیماری صورت گرفته است (Ghavami et al., 2010). این گروه از بیماریها با از دست دادن کنترل چرخه سلولی، داشتن خاصیت آنژیوژنز و متاستاز همراه است (Ghavami et al., 2010). سرطان کولون سومین سرطان شایع در هر دو جنس مرد و زن است (Shang et al., 2012). این بیماری با پولیپ های آدنومای خوش خیم شروع می شود که در صورت تشخیص در این مرحله با عمل جراحی کاملاً قابل درمان است و در صورت عدم درمان به آدنومای پیشرفته با درجه دیسپلازی بالا و سپس به شکل سرطان بدخیم تکامل می یابد (Markowitz and Bertagnolli, 2009). گیاه بومادران یا بومادران نوع کوتاه دشتی با نام علمی *Achillea wilhelmsii*

C.Koch، از تیره Asteraceae می باشد (Amjad et al., 2012). عصاره الکلی سرشاخه های گلدار این گیاه، کاهش دهنده تری گلیسیرید و چربی خون و همچنین فشار سیستولی و دیاستولی خون است (Asgary et al., 2000). عصاره آبی - الکلی آن اثر مهاری بر ترشح اسید معده از طریق مهار عصب واگ معده دارد (Niazmand et al., 2010). عصاره آبی این گیاه تحریک کننده ایمنی هومورال و سلولار می باشد (Sharififar et al., 2009). سرشاخه های گلدار این گیاه سرشار از فلاونوئید و سزکوئی ترپن لاکتون است (Azadbakht et al., 2003). های این گیاه به شدت آلرژی زا می باشد (Amjad et al., 2008). عصاره متانولی گل و برگ آن، دارای خواص ضدباکتریایی است (Amjad et al., 2011). عصاره متانولی گل این گیاه خاصیت ضدقارچی دارد (Amjad et al., 2012). تحقیقات انجام گرفته توسط فتحی و همکاران در سال ۲۰۱۱

فعالیت آنتی اکسیدانی اندام های هوایی *Achillea wilhelmsii* را نشان می دهد که مقدار آن $IC_{50} = 58/9 \pm 2/7$ g/ml می باشد که نشان دهنده وجود بالای میزان متابولیت های ثانویه در این گیاه است (Fathi et al., 2011). در مطالعاتی که بر روی گیاه *Achillea talagonica* Bioss. گرفته فعالیت سیتوتوکسیک این گیاه در برابر لارو آرتمیا سالینا تایید شده است (Saeidnia et al., 2009). قابل ذکر است که تا کنون گزارشی در خصوص اثرات سیتوتوکسیک عصاره و اسانس برگ گیاه *Achillea wilhelmsii* C.Koch مشاهده نشده است. لذا این تحقیق با هدف بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره و اسانس برگ گیاه بومادران بر روی رده سلولی HT-29 (سرطان کولون انسان) صورت گرفت.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع تجربی - آزمایشگاهی است. گیاه بومادران در اوایل خرداد ماه سال ۱۳۹۱ در ۱۰۰ کیلومتری اصفهان - شهرکرد در منطقه گردنه رخ جمع آوری گردید و توسط کارشناس گیاه شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان تایید گردید. پس از نمونه گیری، برگ های بومادران به مدت سه روز در سایه خشک شده و توسط آسیاب به صورت پودر درآمد. پودر بدست آمده تا زمان استفاده در فریزر با دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. جهت تهیه عصاره های متانولی ۲۰ گرم از پودر آماده برگ این گیاه با ۱۱۰ میلی لیتر متانول (مرک) به مدت ۶ ساعت در دستگاه سوکسله قرار داده شد. همچنین به منظور اسانس گیری از دستگاه کلونجر و روش تقطیر با آب استفاده شد. مقدار ۵۰ گرم از پودر خشک برگ بومادران در بالن یک لیتری دستگاه ریخته

زرد تترازولیوم (3-MTT-2,5-dimethylthiazol-4,5-diphenyltetrazolium bromide) توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول های زنده، به کریستال های ارغوانی نامحلول در آب فورامازون تبدیل می شود (Saravanan et al., 2003). در ادامه سوسپانسیون سلولی با غلظت 2×10^4 سلول در میلی لیتر تهیه شد و در میکروپلیت های ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس $20 \mu\text{l}$ از دوزهای $100 \mu\text{g/ml}$ ، $50 \mu\text{g/ml}$ ، $25 \mu\text{g/ml}$ ، $12.5 \mu\text{g/ml}$ از عصاره و دوزهای $40 \mu\text{g/ml}$ و 32 و 24 و 16 و $7/2$ و $5/6$ و $4/8$ و 4 و $3/2$ و 2 از اسانس اضافه گردید. دوکسوروبیسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و کنترل منفی سوسپانسیون سلولی فاقد عصاره و اسانس در نظر گرفته شد. میکروپلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط یکسان انکوبه شدند سپس $20 \mu\text{l}$ محلول MTT (5 mg/ml) به هر چاهک

شد و سپس پودر مورد نظر با حداقل ۵۰۰ سی سی آب مقطر مخلوط شد (Amjad et al., 2011).

کشت سلولی

رده سلولی مورد استفاده در این تحقیق HT-29 است. سلول سرطانی مربوط به روده بزرگ انسانی که از بانک سلولی انسیتیوپاستور ایران خریداری گردید و در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی FBC و ۵٪ استرپتومایسین-پنی سیلین کشت داده شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد حاوی ۵٪ CO_2 قرار داده شد (Wang et al., 2012). برای بررسی اثر سمیت سلولی عصاره و اسانس برگ بومادران بر روی رده سلولی HT-29 از روش MTT استفاده شد. روش MTT در ارزیابی میزان بقاء سلولی و در آزمون های غربال گری کاربرد دارد و اصول آن بر پایه فعالیت متابولیکی سلول است. در این روش نمک

توان زیستی خود را از دست داده اند به طوری که در غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ ، ۵/۱۲ کاهش رشد داشت، اما در کل اختلاف با گروه کنترل معنی دار نبود (نمودار ۱).



نمودار ۱): اثرات سیتوتوکسیک عصاره متانولی برگ بومادران بر روی رده سلولی HT29 درصد بقاء سلول ها با استفاده از روش MTT به دست آمد. جذب توسط دستگاه الیزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. درصد بقا گروه کنترل ۱۰۰ در نظر گرفته شد (n=۱۲)

از نتایج حاصل از آزمون MTT بر سلول های سرطانی که در مجاورت غلظت های مختلف $40 \mu\text{g/ml}$ و 32 و 24 و 16 و $7/2$ و $5/6$ و $4/8$ و 4 و $3/2$ و ۲ اسانس برگ قرار گرفته بودند، مشخص گردید که

اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت انکوبه شد. محیط رویی را با $1\% \text{ DMSO}$ (دی متیل سولفوکساید) جایگزین کرده، کریستال های فورامازون را حل نموده ایم سپس توسط دستگاه الیزا پلیت ریدر (Stat fax 2100) در طول موج ۵۴۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت (Mosaddegh et al., 2006).

تحلیل آماری

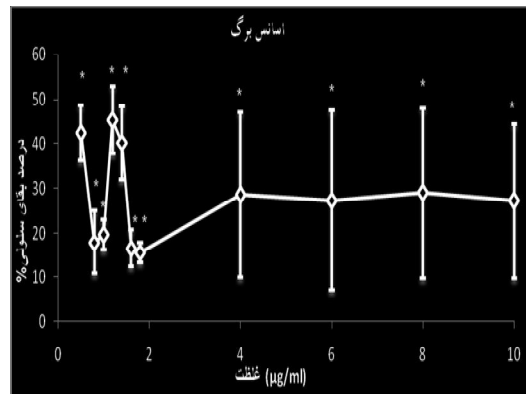
نتایج حاصل از این بررسی با استفاده از نرم افزار Excel 2007 و SPSS18 و به-کارگیری آزمون های آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون Duncan مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

از نتایج حاصل از آزمون MTT بر سلول های سرطانی که در مجاورت ۴ غلظت مختلف $12/5$ ، 25 ، 50 ، $100 \mu\text{g/ml}$ عصاره های متانولی برگ قرار گرفته بودند، مشخص گردید که سلول های سرطانی

این گیاه بر روی سلول های سرطانی صورت نگرفته است. در این تحقیق پس از بررسی اثرات سیتوتوکسیک این گیاه بر رده HT-29، به این نتیجه رسیدیم که عصاره ی متانولی به علت استخراج ترکیبات فنلی و بالاحص فلاونوئیدها که حلال اختصاصی آنها متانول نیز می باشد، اثر مهاری بر روی رده سلولی HT-29 نشان داده اند (Sharma et al., 2011)، همچنین اسانس برگ این گیاه به خاطر وجود مونوترپن ها از جمله ۱، ۸، سینئول و آلفاپینن اثر قوی تری بر روی این رده سلولی داشته است (Dokhani et al., 2005). فلاونوئید ها از طریق القاء آپوپتوز باعث مهار تکثیر سلول های سرطانی می شوند (Sharma et al., 2011). آدین و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داده اند که عصاره متانولی برگ گیاه *Blumea lacera* اثرات بسیار قوی در برابر رده های سلولی HT-29 (سرطان کولون)، NIH3T3

سلول های سرطانی توان زیستی خود را از دست داده اند به طوری که در همه غلظت ها اختلاف با گروه کنترل معنی دار بود ($p < 0.05$).



نمودار ۲): اثرات سیتوتوکسیک اسانس برگ بومادران بر روی رده سلولی HT-29 درصد بقاء سلول ها با استفاده از روش MTT به دست آمد. جذب توسط دستگاه الیزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. درصد بقا گروه کنترل ۱۰۰ در نظر گرفته شد ($n = 12$ ، $p < 0.05$).

بحث و نتیجه گیری

گیاه *Achillea wilhelmsii* C.Koch یکی از گیاهان دارویی است که در طب سنتی استفاده های فراوانی داشته است (Amjad et al., 2012)، تاکنون تحقیقی در زمینه بررسی اثر سمیت سلولی

است (Azadbakht et al., 2003) و با توجه به اینکه بهترین حلال برای استخراج فلاونوئیدها متانول می باشد و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها دارای اثرات سیتوتوکسیک می باشند (Sharma et al., 2011; Duraipandiyar et al., 2006; Mary Tolulope, 2007; Nazemi et al., 2005; Ojo et al., 2007; Sokmen et al., 2004) ، لذا به نظر می رسد که خواص سیتوتوکسیک عصاره های متانولی را بتوان به طور کلی به حضور متابولیت های ثانویه به خصوص در درجه اول به فلاونوئیدها و در درجه دوم به کل ترکیبات فنلی موجود در این گیاه نسبت داد. گزارش های Mothana و همکارانش نیز تایید کننده استخراج ترکیبات فلاونوئیدی و تری ترپن ها توسط حلال متانول و در نهایت خواص ضد سرطانی آنها می باشد (Mothana et al., 2009). در اسانس برگ گیاه بومادران که توسط دخانی و همکاران در سال ۲۰۰۵ مطالعه گردید، مشخص شد که

(سرطان نرمال فیروبلاست موش)، AGS (سرطان معده)، MDA-MB-S435 (سرطان سینه) دارد، همچنین عصاره متانولی گیاه *Aegiceras corniculatum* دارای فعالیت بسیار بالا در برابر سلول های سرطانی کولون و سینه می باشد که علت سیتوتوکسیک بودن در هر دو گیاه را به وجود ترکیبات فلاونوئیدی و پلی فنلی نسبت داده اند (Uddin et al., 2009). در تحقیق دیگری که توسط الاسدی و همکارانش در سال ۲۰۱۱ انجام گرفت مشاهده گردید که عصاره های متانولی و آبی میوه رسیده گیاه *Capparis spinosa* باعث کاهش تکثیر سلولی سلول های Hep-2 شده است و اما اثر عصاره متانولی به دلیل وجود ترکیبات فنلی در آن نسبت به عصاره آبی قوی تر می باشد (AL-Asady et al., 2012). بنابر گزارش های اعلام شده گیاه بومادران سرشار از فلاونوئید و سزکوئی ترپن لاکتون

برگ این گیاه دارای مقادیر بالایی آلفاپینن و ۸،۱ سینئول می باشد (Dokhani et al., 2005). در تحقیقی که توسط درمانین و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام گرفته نشان داده شد که در اسانس برگ *Ricinus communis* L. دارای سه ترکیب اصلی مونوترپن شامل کامفور، ۸،۱ سینئول و آلفا پینن و از سزکی ترپن ها، بتا کاریوفیلن است که باعث القا آپوپتوز در رده سلولی SK-MEL-28 سلول های ملانوم انسانی شده است (Darmanin et al., 2009). در واقع ترکیبات موجود در این گیاه از طریق القاء آپوپتوز به واسطه نفوذپذیری غشای میتوکندری و یا نکروزه کردن سلول باعث مهار رشد سلول های سرطانی می شوند (Zakaria et al., 2010). بنابراین می توان خاصیت سیتوکسیک قوی اسانس برگ این گیاه را به دو ترکیب ۱،۸ سینئول و آلفاپینن نسبت داد. لذا

باتوجه به تاثیر این گیاه در شرایط *In vitro* امید است در آینده اثرات ضد سرطانی گیاه بومادران را در شرایط *In vivo* سنجید و از آن به منظور درمان سرطان روده بتوان استفاده نمود.

سیاسگزاری

نتایج این مطالعه حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به شماره ۱۷۲۳۰۵۱۹۹۰۱۰۰۱ می باشد که با هزینه شخصی نویسنده مسئول انجام شده است. بدین وسیله نویسندگان این مقاله بر خود واجب و ضروری می دانند از مسئول محترم آزمایشگاه کشت سلولی دانشگاه اصفهان جناب آقای دکتر صادقی و کارشناس دلسوز آن سرکار خانم میریان نهایت سپاس و قدردانی را داشته باشند.

REFERENCES:

- AL-Asady BAA, Khalil HKh, Barwari MSS (2012) Cytotoxic and cytogenetics effects of aqueous, methanolic and secondary metabolites extracts of *Capparis spinosa* on tumor cell lines In vitro. *Jordan J Bio Scien*; 5(1):15-30.
- Amjad L, Majd A, Fallahian F, Saadatmand S. (2008) Comparative study of allergenicity of mature and immature pollen grains of *Achillea wilhelmsii*. *Arak Univer of Med Scien J*; 11(2):1-9. [Full Text In Persian]
- Amjad L, Mohammadi-kamalabadi M, Mohammadi-sichani M (2011) Studing of antibacterial activity of flower and leaf methanol extract of *Achillea wilhelmsii* C.Koch. *J Qom Univer Med Sci*; 5(3):50-57. [Full Text In Persian]
- Amjad L, Mousavideh-mourdi K, Saghazadeh M (2012) Antifungal potential of *Achillea wilhelmsii* flowers methanolic extract on different strains of *Candida albicans*. *Int J Biol Med Res*; 3(3):2107-2110.
- Asgary S, Naderi GH, Sarrafzadegan N, Mohammadifard N, Mostafavi S and Vakili R (2000) Antihypertensive and antihyperlipidemic effects of *Achillea wilhelmsii*. *Drugs Exp Clinic Reserch*; 26(3): 89-93.
- Azadbakht M, Semnani K, Khansari N (2003) The Essential oils composition of *Achillea wilhelmsii* C. Koch leaves and flowers. *J Med Plan*; 2:55-59. [Full Text In Persian]
- Darmanin S, Wismayer PS, Camilleri Podesta MT, Micallef MJ, Buhagiar JA (2009) An extract from *Ricinus communis* L. leaves possesses cytotoxic properties and induces apoptosis in SK-MEL-28 human melanoma cells. *Nat Prod Res*; 23(6):561-71.
- Dokhani Sh, Cottrell T, Khajeddin J, Mazza G (2005) Analysis of aroma and phenolic components of selected *Achillea* species. *Plant Food Hum Nutr*; 60(2):55-62.
- Duraipandiyar V, Ayyanar M, Ignacimuthu S (2006) Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC Complement Altern Med*; 6:35.
- Fathi H, Lashtoo Aghaee B, Ebrahimzadeh MA (2011) Antioxidant activity and phenolic contents of *Achillea wilhelmsii*. *Pharma online*; 2: 942-949.
- Ghavami GH, Sardari S, Shokrgozar MA (2010) Anticancerous potentials of *Achillea* species against selected cell lines. *J Med Plant Res*; 4(22): 2411-2417.
- Markowitz SD, Bertagnolli MM (2009) Molecular origins of cancer: molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*; 361(25): 2449-60.
- Mary Tolulope O (2007) Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus Sabdariffa*. *J Med Plan Res*; 1(1):9-13.
- Mosaddegh M, Ostad NS, Naghibia FH, Moghadama M (2006) Cytotoxic effects of five species of *Inula* against some tumor cell lines. *Iran J Pharma Scien*; 2(4): 203-208.
- Mothana R, Lindequist U, Geraenert R, Bednarski P (2009) Studies of the In vitro anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the Island Soqotra. *BMC Complement Altern Med*; 9:7.
- Nazemi A, Hashemi M, Khatamineghad MR, Pourshamsiyan K (2005) The effect of antimicrobial of methanol and aqueous extracts on *Heracleum persicum*. *Islamic Azad Univer of Med Scien J*; 15(2):91-94. [Full Text in Persian]

- Niazmand S, Khooshnood E, Derakhshan M (2010) Effects of *Achillea wilhelmsii* on rat's gastric acid output at basal, vagotomized, and vagal-stimulated conditions. *Pharmacog Mag*;6(24): 282-285. [Full Text In Persian]
- Ojo OO, Ajayi AO, Anibijuwon II (2007) Antibacterial potency of methanol extracts of lower plants. *J Zhejiang Univ Sci B*;8(3):189-191.
- Saeidnia S, Moradi-Afrapoli F, Gohari AR, Malmir M (2009) Cytotoxic flavonoid from *Achillea talagonica* Bioss. *J Med Plant*; 8(5):52-57.
- Saravanan BC, Sreekumar C, Bansal GC, Ray D, Rao JR, Mishra AK (2003) A rapid MTT colorimetric assay to assess the proliferative index of two Indian strains of *Theileria annulata*. *Vete Parasit*; 113: 211–216.
- Shang LH, Li CM, Yang ZY, Che DH, Cao JY, Yu Y (2012) *Luffa echinata* Roxb. induces human colon cancer cell (HT-29) death by triggering the mitochondrial apoptosis pathway. *Molecules*;17: 5780-57
- Sharififar F, Pournourmohammadi SH, Arabnejad M (2009) Immunomodulatory activity of extract aqueous of *Achillea wilhelmsii* C.Koch in mice. *Ind J Exp Biol* ; 47:668-671.
- Sharma H, Parihar L, Parihar P (2011) Review on cancer and anticancerous properties of some medicinal plants. *J Med Plan Res*;5(10):1818-1835 .
- Sokmen A, Sokmen M, Daferera D, Polissiou M, Candan F, Unlu M, Akpulat HA (2004) The In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea biebersteini* Afan. (Asteraceae). *Phytother Res*;18(6):451-6.
- Uddin ShJ, Grice ID, Tiralongo E (2009) Cytotoxic effects of Bangladeshi medicinal plant extracts. *J Evid-Bas Comple Alter Med*;111: 1-7.
- Wang W, Li N, Luo M, Zu Y, Efferth T (2012) Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules*; 17: 2704-2713.
- Zakaria ZA, Mohamed AM, Mohd Jamil NS, Rofiee MS, Somchit MN, Zuraini A, et al (2010) In vitro cytotoxic and antioxidant properties of the aqueous, chloroform and methanol extracts of *Dicranopteris linearis* leaves. *American J Bot*;10 (2):273-282.