

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

L. Dalali Isfahani^{1*}, R. Monajemi²,
L. Amjad³

1. Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan
2&3. Azad University, Falavarjan Branch, Department
of Biology, Isfahan

(Received: Feb. 14, 2013; Accepted: Dec. 1, 2013)

Abstract

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. *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 and essential oil 12.5, 25, 50, 100 µg/ml concentration for extract and 2, 3.2, 4, 4.8, 5.6, 7.2, 16, 24, 32, 40 µg/ml concentration for essential oil on the cells were evaluated for 48 hours. Cytotoxic effects of *Achillea wilhelmsii* extract essential oil against cancer cells was measured by MTT method. The results by using SPSS. The results show that, the extracts methanolic and essential oils has cytotoxic effects on HT-29 cell line. 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, HT-29, Extract, Essential oil

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

لیلا دلالی اصفهانی^{۱*}، رامش منجمی^۲، لیلا امجد^۳

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ۲ و ۳. دانشگاه آزاد

اسلامی، واحد فلاورجان، گروه زیست‌شناسی، اصفهان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۲۶، تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۹/۱۰)

چکیده

گیاه بومادران *Achillea wilhelmsii* C.Koch، در طب سنتی به عنوان ضد التهاب، ضد اسپاسم و اختلالات گوارشی مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره متانولی و اسانس برگ این گیاه بر روی رده سلولی HT-29 بود. گیاه بومادران از اطراف شهرکرد جمع‌آوری شد. بخش‌های هوایی گیاه به مدت سه روز در دمای اتاق خشک و عصاره متانولی و اسانس از آن تهیه گردید. پس از تهیه عصاره و اسانس اثر غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ µg/ml برای عصاره و ۴۰، ۳۲ و ۲۴ و 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 سلول‌های سرطانی HT-29 توسط روش MTT ارزیابی شد. برای آنالیز از نرم‌افزار SPSS18 استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که عصاره‌های متانولی و اسانس برگ گیاه مورد نظر دارای اثرات سیتوتوکسیک بر رده سلولی HT-29 می‌باشد. یافته‌های این پژوهش نشان داد که اسانس برگ گیاه بومادران دارای اثرات سیتوتوکسیک قوی‌تری نسبت به عصاره متانولی می‌باشد 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 می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *Achillea wilhelmsii*، سیتوتوکسیک، سرطان

کولون، HT-29، عصاره، اسانس

مقدمه

سرطان همچنان به عنوان یکی از علل عمده مرگ و میر در سراسر جهان است و تنها پیشرفت اندکی در کاهش عوارض مرگ‌ومیر 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 پولیپ‌های آدنومای خوش‌خیم شروع می‌شود 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 می‌یابد (Markowitz and Bertagnolli, 2009). گیاه بومادران یا بومادران نوع کوتاه دشتی با نام علمی *Achillea wilhelmsii* C.Koch از تیره Asteraceae می‌باشد (Amjad et al., 2012). عصاره الکلی سرشاخه‌های گلدار این گیاه، کاهش‌دهنده تری‌گلیسیرید و چربی خون و همچنین فشار سیستولی و دیاستولی خون است (Asgary et al., 2000). عصاره آبی - الکلی آن اثر مهباری بر ترشح اسید معده از طریق مهباز عصب واگ معده دارد (Niazmand et al., 2010). عصاره آبی این گیاه تحریک‌کننده ایمنی هومورال و سلولار می‌باشد (Sharififar et al., 2009). سرشاخه‌های گلدار این گیاه سرشار از فلاونوئید و سزکوئی‌ترین لاکتون است (Azadbakht et al., 2003) و گرده‌های این گیاه به شدت آلرژی‌زا می‌باشد (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 Fathi et al. (2011) فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام‌های هوایی *Achillea wilhelmsii* را نشان می‌دهد که مقدار آن $IC_{50} = 58.9 \pm 2.7 \mu g/ml$ می‌باشد که نشان‌دهنده وجود بالای میزان متابولیت‌های ثانویه در این گیاه است (Fathi et al., 2011). در مطالعاتی که بر روی گیاه *Achillea talagonica* Bioss. انجام گرفته فعالیت سیتوتوکسیک این گیاه در برابر لارو آرتیمیا 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 روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی - آزمایشگاهی است. گیاه بومادران در اوایل خرداد ماه سال ۱۳۹۱ در ۱۰۰ کیلومتری اصفهان - شهرکرد در منطقه گردنه رخ جمع‌آوری گردید و توسط کارشناس گیاه‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان تایید گردید. پس از نمونه‌گیری، برگ‌های 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 عصاره‌های متانولی ۲۰ گرم از پودر آماده برگ این گیاه با ۱۱۰ میلی‌لیتر متانول (مرک) به مدت ۶ ساعت در دستگاه سوکسله قرار داده شد. همچنین به منظور اسانس‌گیری از دستگاه کلونجر و روش تقطیر با آب استفاده شد. مقدار ۵۰ گرم از پودر خشک برگ بومادران در بالن یک لیتری دستگاه ریخته شد و سپس پودر مورد نظر با حداقل ۵۰۰ سی‌سی 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-پنی‌سیلین 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 آزمون‌های غربال‌گری کاربرد دارد و اصول آن بر پایه فعالیت متابولیکی سلول است. در این روش نمک زرد تترازولیوم (3-4,5 dimethylthiazol- 2,5 diphenyltetrazolium bromide) توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های زنده، به کریستال‌های ارغوانی نامحلول در آب فورامازون تبدیل می‌شود (Saravanan et al., 2003). در ادامه سوسپانسیون سلولی با غلظت 2×10^4 سلول در میلی‌لیتر تهیه شد و در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس $20 \mu l$ از دوزهای $50, 100, 25, 12.5$ از عصاره و دوزهای $40 \mu g/ml$ و 32 و 24 و 16 و 7.2 و 5.6

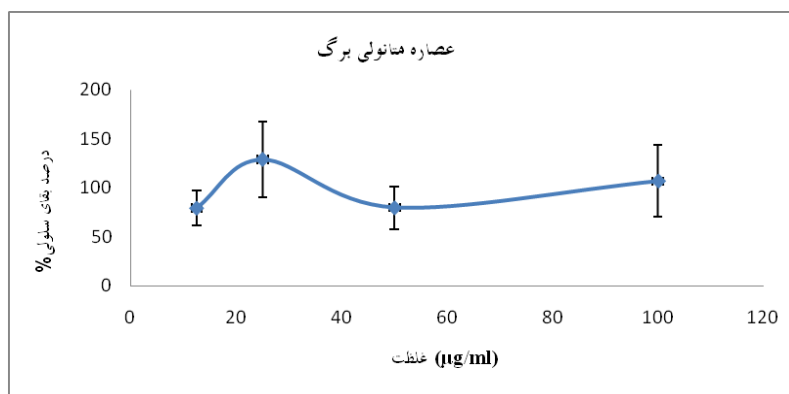
تحلیل آماری

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

نتایج

از نتایج حاصل از آزمون MTT بر سلول‌های سرطانی که در مجاورت ۴ غلظت مختلف $100, 50, 25, 12.5 \mu\text{g/ml}$ عصاره‌های متانولی برگ قرار گرفته بودند، مشخص گردید که سلول‌های سرطانی توان زیستی خود را از دست داده‌اند به طوری که در غلظت $50, 12.5 \mu\text{g/ml}$ کاهش رشد داشت، اما در کل اختلاف با گروه کنترل معنی‌دار نبود (شکل ۱).

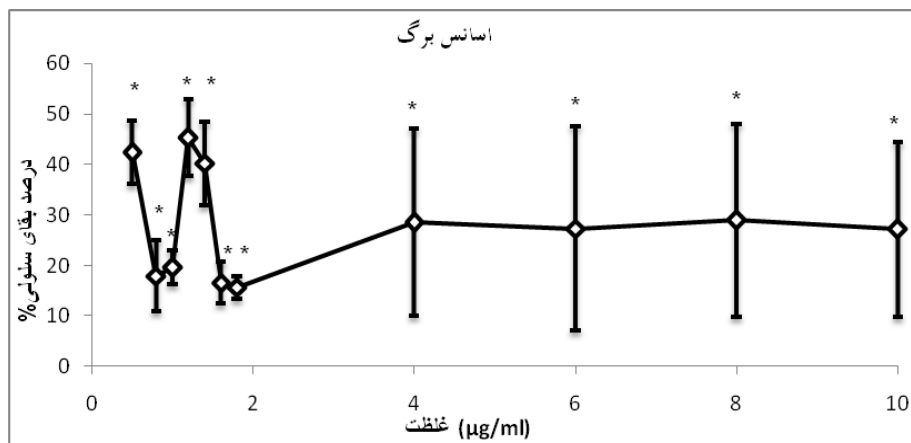
و $4/8$ و 4 و $3/2$ و 2 از اسانس اضافه گردید. دوکسوروبیسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و کنترل منفی سوسپانسیون سلولی فاقد عصاره و اسانس در نظر گرفته شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط یکسان انکوبه شدند سپس $20 \mu\text{l}$ محلول MTT (5 mg/ml) به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت انکوبه شد. محیط رویی را با $150 \mu\text{l}$ DMSO (دی‌متیل سولفوکساید) جایگزین کرده، کریستال‌های فورامازون را حل نموده‌ایم سپس توسط دستگاه الایزا پلیت ریدر (Stat fax 2100) در طول موج ۵۴۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت (Mosaddegh *et al.*, 2006).



شکل ۱. اثرات سیتوتوکسیک عصاره متانولی برگ بومادران بر روی رده سلولی HT-29 درصد بقاء سلول‌ها با استفاده از روش MTT به دست آمد. جذب توسط دستگاه الایزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد بقا گروه کنترل ۱۰۰ در نظر گرفته شد ($n=12$).

گرفته بودند، مشخص گردید که سلول‌های سرطانی توان زیستی خود را از دست داده‌اند به طوری که در همه غلظت‌ها اختلاف با گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

از نتایج حاصل از آزمون MTT بر سلول‌های سرطانی که در مجاورت غلظت‌های مختلف $40, 32, 24$ و 16 و $7/2$ و $5/6$ و $4/8$ و 4 و $3/2$ و 2 اسانس برگ قرار



شکل ۲. اثرات سیتوتوکسیک اسانس برگ بومادران بر روی رده سلولی HT-29 درصد بقاء سلول‌ها با استفاده از روش MTT به دست آمد. جذب توسط دستگاه الایزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد بقا گروه کنترل ۱۰۰ در نظر گرفته شد ($n=12, P < 0.05$).

نتایج و بحث

(*al.*, 2004; Sokmen *et al.*, 2004) لذا به نظر می‌رسد که خواص سیتوتوکسیک عصاره‌های متانولی را بتوان به طور کلی به حضور متابولیت‌های ثانویه به خصوص در درجه اول به فلاونوئیدها و در درجه دوم به کل ترکیبات فنلی موجود در این گیاه نسبت داد. گزارش‌های (*Mothana et al.* 2009) نیز تاییدکننده استخراج ترکیبات فلاونوئیدی و تری‌ترین‌ها توسط حلال متانول و در نهایت خواص ضد سرطانی آنها می‌باشد (*Monthana et al.*, 2009). در اسانس برگ گیاه بومادران که توسط (*Dokhani et al.* 2005) مطالعه گردید، مشخص شد که برگ این گیاه دارای مقادیر بالایی آلفاپینن و ۱، ۸ سینئول می‌باشد (*Dokhani et al.*, 2005). در تحقیقی که توسط (*Darmanin et al.* 2009) انجام گرفته نشان داده شد که در اسانس برگ *Ricinus communis* L. دارای سه ترکیب اصلی مونوترپن شامل کامفور، ۱، ۸ سینئول و آلفا پینن و از سزکی‌ترین‌ها، بتا کاربوفیلین است که باعث القا آپوپتوز در رده سلولی SK-MEL-28 سلول‌های 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 سلول‌های سرطانی می‌شوند (*Zakaria et al.*, 2010). بنابراین می‌توان خاصیت سیتوتوکسیک قوی اسانس برگ این گیاه را به دو ترکیب ۱، ۸ سینئول و آلفاپینن نسبت داد. لذا با توجه به تاثیر این گیاه در شرایط *In vitro* امید است در آینده اثرات ضد سرطانی گیاه بومادران را در شرایط *In vivo* سنجد و از آن به منظور درمان سرطان روده بتوان استفاده نمود.

سپاسگزاری

نتایج این مطالعه حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به شماره ۱۷۲۳۰۵۱۹۹۰۱۰۰۱ می‌باشد که با هزینه شخصی نویسنده مسئول انجام شده است. بدین وسیله نویسندگان این مقاله بر خود واجب و ضروری می‌دانند 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.

گیاه *Achillea wilhelmsii* C.Koch یکی از گیاهان دارویی است که در طب سنتی استفاده‌های فراوانی داشته است (*Amjad et al.*, 2012). تاکنون تحقیقی در زمینه بررسی اثر سمیت سلولی این گیاه بر روی سلول‌های سرطانی صورت نگرفته است. در این تحقیق پس از بررسی اثرات سیتوتوکسیک این گیاه بر رده HT-29، به این نتیجه رسیدیم که عصاره متانولی به علت استخراج ترکیبات فنلی و بالاخص فلاونوئیدها که حلال اختصاصی آنها متانول نیز می‌باشد، اثر مهاری بر روی رده سلولی HT-29 نشان داده‌اند (*Sharma et al.*, 2011). همچنین اسانس برگ این گیاه به خاطر وجود مونوترپن‌ها از جمله ۱، ۸ سینئول و آلفاپینن اثر قوی تری بر روی این رده سلولی داشته است (*Dokhani et al.*, 2005). فلاونوئیدها از طریق القاء آپوپتوز باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شوند (*Sharma et al.*, 2011). *Uddin et al.* (2009) نشان داده‌اند که عصاره متانولی برگ گیاه *Blumea lacera* اثرات بسیار قوی در برابر رده‌های سلولی HT-29 (سرطان کولون)، NIH3T3 (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 سلول‌های سرطانی کولون و سینه می‌باشد که علت سیتوتوکسیک بودن در هر دو گیاه را به وجود ترکیبات فلاونوئیدی و پلی‌فنلی نسبت داده‌اند (*Uddin et al.*, 2009). در تحقیق دیگری که توسط *AL-Asady et al.* (2001) انجام گرفت مشاهده گردید که عصاره‌های متانولی و آبی میوه رسیده گیاه *Capparis spinosa* باعث کاهش تکثیر سلولی سلول‌های Hep-2 شده است و اما اثر عصاره متانولی به دلیل وجود ترکیبات فنلی در آن نسبت به عصاره آبی قوی‌تر می‌باشد (*AL-Asady et al.*, 2011). بنابر گزارش‌های اعلام شده گیاه بومادران سرشار از فلاونوئید و سزکوئی‌ترین لاکتون است (*Azadbakht et al.*, 2003) و با توجه به اینکه بهترین حلال برای استخراج فلاونوئیدها متانول می‌باشد و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها دارای اثرات سیتوتوکسیک می‌باشند (*Sharma et al.*, 2011; *Duraipandiyani et al.*, 2006; *Mary Touloupe*, 2007; *Nazemi et al.*, 2005; *Ojo et*

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.
- Duraipandiyan 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: 5780-5794.
- 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.