

بررسی ترکیب‌های تشکیل دهنده، اثرات ضد اکسایشی و ضد میکروبی اسانس درمنه *Artemisia Turanica* بر پاتوژن‌های شاخص مواد غذایی

مریم سردرودیان^{۱*}، اکرم آریان‌فر^۱

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران^۱

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۳/۰۴ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۵/۰۲)

چکیده

اسانس‌ها و عصاره‌های حاصل از گیاهان دارویی با داشتن ترکیبات ضد میکروبی، ضدسرطانی و ضد اکسایشی (ناشی از وجود عوامل حذف کننده رادیکال‌های آزاد) به عنوان ترکیبات دارویی جدید و طبیعی از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند. در مطالعه حاضر ترکیب شیمیایی، خصوصیات ضدباکتریایی و ضد اکسایشی اسانس گیاه درمنه با نام علمی *Artemisia Turanica* را مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت ضد اکسایشی اسانس با آزمون‌های مهار رادیکال آزاد به کمک روش (DPPH)، آزمون گیرندگی آهن (FRAP) بررسی و با ضد اکسایش سنتزی بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) مقایسه شد. اثر ضد میکروبی اسانس گونه مورد نظر بر علیه ۴ باکتری با استفاده از روش چاهک، دیسک دیفیوژن و براث میکرودیلوژن انجام شد. نتایج نشان داد که اسانس درمنه ۲۶ ترکیب در اسانس خود دارد که در مجموع ۹۱/۰۵ درصد کل اسانس را تشکیل می‌دهند. ترکیبات اصلی آن شامل کریسانتین (۲۱/۳۷ درصد)، ۸-اوسینئول (۱۹/۲۰ درصد)، پیریتین (۱۶/۶۱ درصد) و آلفا-پینن (۵/۵۲ درصد) است. در آزمون DPPH، میزان IC₅₀ برای اسانس و BHT به ترتیب برابر با ۴/۴ و ۰/۳ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. همچنین توانایی احیاکنندگی اسانس و BHT، به ترتیب برابر با ۳۳/۰۲ و ۳۲/۲۸ میکرومول بر لیتر گزارش گردید. نتایج آزمایشات ضدباکتریایی نشان داد، حداقل غلظت مهارکننده رشد اسانس درمنه بر روی استافیلوکوکوس اورئوس ۳/۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر و حداقل غلظت کشنده آن‌ها ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. نتایج نشان می‌دهند که اسانس درمنه از توان ضدباکتریایی و ضد اکسایشی مناسبی برخوردار بوده و بنابراین می‌توان از آن در ترکیب با سایر نگهدارنده‌ها جهت محافظت مواد غذایی بهره برد.

کلید واژگان: ضد اکسایش، آنتی باکتریال، اسانس، درمنه، ۸-اوسینئول

* مسئول مکاتبات: sardarodiyani_5@yahoo.com

۱- مقدمه

امروزه بروز مقاومت دارویی در انواع میکروارگانیسم‌های بیمارزا از یک سو و از طرف دیگر اثرات مضر نگهدارنده-های غذایی شیمیایی و سنتزی از سوی دیگر به عنوان یک چالش مهم در هر دو زمینه بهداشت و درمان انسان و دام تبدیل گردیده است؛ بنابراین یک نیاز مستمر در زمینه شناسایی ترکیبات ضدمیکروبی جدید به حداقل رسانیدن مقاومت دارویی میکروارگانیسم‌ها و استفاده از آن‌ها به عنوان جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی احساس می‌شود [۱ و ۲].

مواد غذایی خام و فرآوری شده ممکن است به آسانی به میکروارگانیسم‌های مختلف آلوده شوند و اگر شرایط حمل و نقل و نگهداری آن‌ها مناسب نباشد منجر به رشد باکتری‌های مولد فساد و بیماری‌زا می‌گردند [۳]. به منظور افزایش مدت زمان ماندگاری از مواد ضدمیکروبی و ضد اکسایش‌ها که اکثر اوقات سنتتیک هستند استفاده می‌شود [۴].

استفاده از گیاهان دارویی بومی که علاوه بر سازگاری اکولوژی قادرند با سنتز مواد موثره ثانوی و فعال در بحث پیشگیری و درمان بیماری‌ها موثر واقع شوند، در سال‌های اخیر جایگاه ویژه‌ای در علم پزشکی یافته است [۵]. اسانس‌ها و عصاره‌های حاصل از گیاهان دارویی با داشتن ترکیبات ضدمیکروبی، ضدسرطانی، ضد اکسایشی و عوامل حذف‌کننده رادیکال‌های آزاد از توان بسیار بالایی جهت به کارگیری‌شان به عنوان ترکیبات نگهدارنده طبیعی جدید در محافظت غذاهای خام و فرآوری شده برخوردار می‌باشند [۶ و ۷].

گیاه درمنه (*Artemisia*) از خانواده Asteraceae compositae دارای ۳۴ گونه در ایران می‌باشد [۸]. درمنه گیاهی علفی است که در ایران در مناطق مختلفی می‌روید. درمنه‌ها از دوران گذشته در طب سنتی دارای اهمیت و مصارف گوناگون بوده و از آنها با نام‌های درمنه، افسنتين، یوشان، برنجاسف، قيصوم و ترخون نام برده شده است و این نام‌ها امروزه نیز در اکثر مناطق متداول است [۸]. گونه‌های درمنه از گذشته به عنوان منبع روغن‌های اسانسی شناخته شده‌اند و دارای فعالیت ضدمیکروبی طبیعی بر روی تعداد زیادی از باکتری‌ها هستند [۹]. مکانیسم عملکردی اسانس‌ها در ارتباط با ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی آنها بوده، ولی در تمامی موارد از مکانیسم مشابه‌ای برخوردار

نیستند. ویژگی آب‌گریزی اسانس‌ها سبب نفوذ آنها در لیپید غشاء سلولی و افزایش نفوذپذیری آن می‌گردد، که این امر سبب اختلال در کلیه فعالیت‌های حیاتی وابسته به غشای سلولی، خروج یون‌ها، ترکیب‌های حیاتی و در نهایت مرگ سلول خواهد شد [۱۰]. درمنه دارای ماده‌ای به نام سانتونین است که تا مدت‌ها معروف‌ترین داروی ضد کرم دستگاه گوارش محسوب می‌شده است [۱۱]. برای انواع درمنه علاوه بر فعالیت ضد کرمی، فعالیت بیولوژیک فراوانی از جمله میکروب‌کشی، ضد قارچی، ویروس‌کشی، ضد انگلی و همچنین خواص ضد اکسایشی و بازکنندگی و اتساع عروق به اثبات رسیده است [۱۲]. گونه‌های مختلف درمنه در طب سنتی اروپا جهت رفع سودا و جلوگیری از خونریزی بکار می‌رفته‌اند [۱۱]. در یک مطالعه، فعالیت ضدباکتریایی و ضد اکسایشی اسانس گونه *Echegarayi Hieron* *Artemisia* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد این گیاه در مقابل تمام باکتری‌های مورد آزمون از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی*، *باسیلوس سرئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* از خود فعالیت ضدباکتریایی نشان داد و پایین‌ترین میزان MIC در باکتری *باسیلوس سرئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* برابر ۲/۴ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شد [۱۳]. در طی تحقیقاتی که روی ۲۴۰ گونه از تیره Asteraceae جهت تعیین خواص دارویی آنها انجام شده، حدود ۸۴ ترکیب دارویی در گونه‌های *Artemisia* تشخیص داده شده است [۱۴]. ولی زاده و همکاران (۲۰۱۲)، ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدباکتریایی اسانس حاصل از گیاه *Artemisia Fragrans* ارزیابی نمودند که ۸- سینئول و توجن در ترکیبات اسانس این گیاه از غلظت بالایی برخوردارند [۱۵].

در مطالعات گذشته خواص ضدباکتریایی بعضی از گونه‌های درمنه مانند *A. turanica*، *A. oliveriana*، *A. diffusa* بر علیه تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی گزارش شده در حالیکه خواص ضدباکتریایی بعضی گونه‌های دیگر درمنه از جمله *A. scoparia*، *A. capillaries* و *A. lavandulifolia* ثابت شده است [۱۶ و ۱۷]. خان احمدی و همکاران (۲۰۰۹) ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدباکتریایی اسانس حاصل از *A. husskenectii* را

ارزیابی نمودند که کامفور از مهمترین ترکیبات شیمیایی شده در این گیاه می‌باشد [۱۸].

هدف از این پژوهش، معرفی گیاه درمنه *Artemisia Turanica* بعنوان گیاه دارویی که در استان خراسان شمالی پراکنش دارد، بررسی میزان اسانس و شناسایی مواد تشکیل دهنده اسانس گونه مذکور می‌باشد. همچنین بررسی اثرات ضد اکسایشی و ضد میکروبی احتمالی گیاه مورد مطالعه، که می‌تواند به عنوان جایگزین ضد اکسایش‌ها و آنتی بیوتیک‌های سنتتیک معرفی شود، می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد شیمیایی

متانول، معرف فولین سیوکالچو، اسید گالیک، بوتیل هیدروکسی تولوئن، استات سدیم، ۲، ۴، ۶- تری پرپیدیل-اس-تریازین، فریک کلراید، آمونیوم فرس سولفات، آلومینیوم کلراید ۶ آب، دی فنیل پیکریل هیدرازیل، سدیم کربنات، استون، محیط کشت‌های نوترینت آگار، مولر هیتون آگار و نوترینت براث از شرکت‌های مرک و سیگما خریداری گردید.

۲-۲- مواد گیاهی

گیاه درمنه *Artemisia Turanica* از استان خراسان شمالی-بجنورد- منطقه بابامان جمع‌آوری شده و با شماره هرباریومی ۲۷۵/۲ MP- در مرکز تحقیقات سلامت فرآورده‌های طبیعی خراسان شمالی تایید شد. ۲-۳-۲-۳-

۲-۳- اسانس‌گیری

به منظور استخراج اسانس گیاه مذکور، ۳۰ گرم از پودر گیاه خشک شده، اندام هوایی، در دستگاه کلونجر قرار داده شد و پس از گذشت ۳ ساعت اسانس آن جدا گردید. توسط نرمال-هگزان اسانس را از آب جدا کرده و جهت آبگیری از سولفات سدیم انیدر استفاده شد. اسانس آبگیری شده در ظرف تیره در بسته جمع‌آوری شد و در دمای 4°C نگهداری شد [۱۹].

۲-۴- آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با

استفاده از GC-MS¹

ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس به وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی شناسایی شد، مشخصات دستگاه مورد استفاده به این شرح است: کروماتوگرافی گازی مدل Shimadzu-QP2010SE مجهز به ستون Rtx-5MS (طول ستون ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت فاز ثابت ۰/۲۵ میکرومتر) که برنامه دمایی ستون به این نحو تنظیم گردید: دمای ابتدایی 50°C و توقف در این مدت ۵ دقیقه و دمای دستگاه 5°C در هر دقیقه افزایش یافت تا رسیدن به دمای 260°C و باقی ماندن در این دما به مدت ۱۰ دقیقه. از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل و با سرعت جریان ۰/۹ میلی‌لیتر بر دقیقه و طیف‌سنج جرمی با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد. شناسایی طیف‌های حاصل با رسم کروماتوگرام یک سری از پارافین‌های نرمال ($\text{C}_5\text{-C}_{30}$) تحت شرایط یکسان با تزریق اسانس‌ها انجام شد و با توجه به زمان بازداری این ترکیب‌ها اندیس کورتز برای هر جزء موجود در کروماتوگرام اسانس محاسبه شد. این مقادیر با مقادیر اندیس کواتز موجود در جداول استاندارد مقایسه شد و ترکیب‌های موجود در اسانس درمنه بر اساس این داده‌ها و اطلاعات موجود در کتابخانه GC-MS شناسایی شد.

۲-۵- ارزیابی ترکیبات فنولیک تام

مقدار کل ترکیبات فنولی در اسانس‌ها بر اساس روش فولین سیوکالچو مورد بررسی قرار گرفت [۲۰]. جهت تعیین میزان ترکیبات فنولیک، ۱۰۰ میکرولیتر اسانس را در لوله آزمایش ریخته و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده، معرف فولین سیوکالتیو را به نسبت (۱/۱۰) را اضافه گردید. بعد از فاصله زمانی ۱ دقیقه، در دمای اتاق، ۱/۵ میلی لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد افزوده شد و کاملاً مخلوط و به مدت ۲ ساعت در تاریکی نگهداری شده و سپس جذب محلول در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. آب مقطر نیز به عنوان شاهد استفاده شد. مقدار کل ترکیبات فنولیک از معادله خط رسم شده بر مبنای اسید گالیک با غلظت‌های (۰، ۳۰، ۷۰، ۱۱۰، ۱۵۰، ۱۹۰ و ۲۲۰ میلی‌گرم در لیتر در متانول ۸۰ درصد) به صورت میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم گیاه خشک شده بیان گردید. آزمون فولین، با سه تکرار انجام شد [۲۱].

۲-۶- ارزیابی ترکیبات فلاوونوئید

محتوای فلاوونوئید بر اساس روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید انجام شد [۲۲]. طبق این روش ۱/۵ میلی لیتر متانول و

1. Gas chromatography-Mass spectrometry

گرا د انکوبه شد. پس از طی این مدت، جذب محلول‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. از لوله آزمایش فاقد آمونیوم فروس سولفات به عنوان شاهد استفاده گردید. برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس، به ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس به دست آمده ۳ میلی-لیتر معرف FRAP اضافه شد و پس از انجام مراحل آزمایش مطابق محلول‌های استاندارد، جذب محلول‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر نسبت به شاهد (شامل ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر همراه با ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP)، اندازه‌گیری شد. با قراردادن مقدار جذب نمونه‌ها در معادله مربوط به منحنی استاندارد کاتیون آهن دوظرفیتی، توانایی احیاکنندگی اسانس محاسبه گردید. داده‌ها بر اساس معادل میلی‌مول یون آهن دو ظرفیتی تولید شده بر گرم وزن گیاه بیان گردید.

۲-۹-۹- بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس

۲-۹-۱- سوش‌های میکروبی

باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت و گرم منفی حائز اهمیت در ایجاد عفونت و مسمومیت‌های غذایی از قبیل *استافیلوکوکوس اورئوس*^۳ (PTCC۱۴۳۱)، *لیستریا مونوسیتوژنز*^۴ (PTCC۱۲۹۸)، *اشرشیاکلی*^۵ (PTCC۱۳۹۹) و *سالمونلاتیفی موریوم*^۶ (PTCC۱۷۰۹) در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند [۲۵].

۲-۹-۲- تهیه محلول کنترل مثبت جنتامایسین

ابتدا ۰/۰۰۵ g از پودر جنتامایسین در مقداری آب استریل حل گردید و به حجم ۱۰۰ ml رسانده شد. بدین ترتیب محلول ذخیره‌ای با غلظت ۵۰ µg/ml از جنتامایسین بدست آمد. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول مورد نظر با آب مقطر استریل به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. به این ترتیب غلظت ۱۰ µg/ml این محلول برای استفاده در تست‌های ضدباکتری تهیه گردید [۲۶].

۲-۹-۳- تهیه حلال کنترل منفی DMSO

DMSO از شرکت مرک آلمان تهیه شد. مولاریته حلال کامل ۷۸/۱۳ gr/ml بود و به صورت خالص استفاده شد.

۲-۹-۴- تهیه محیط‌های کشت میکروبی

۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد با ۰/۵ میلی‌لیتر از اسانس و ۰/۱ میلی‌لیتر پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر از آب مقطر مخلوط گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و سپس جذب آن در ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروسکوپی خوانده شد. از غلظت‌های مختلف کوثرستین ۱۰۰-۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در متانول جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد و محتوای فلاوونوئید به صورت اکی والان‌های کوثرستین بر گرم اسانس بیان شد.

۲-۷- میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH

برای انجام این تست، ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس گیاه *A. Turanica* به ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۰۴ درصد DPPH در متانول اضافه خواهد شد. بعد از ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای اتاق جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر بر علیه بلانک خوانده شد. درصد بازدارندگی رادیکال‌های آزاد از طریق زیر محاسبه می‌گردد [۲۳].

(۱)

$$\%AI = \frac{(A_{control} - A_{sample})}{A_{control}} \times 100$$

در این معادله:

AI: درصد مهار رادیکال آزاد

A_{Control}: جذب محلول شاهد در ۵۱۷ نانومتر

A_{Sample}: جذب محلول نمونه در ۵۱۷ نانومتر

۲-۸- قدرت احیاءکنندگی آهن اسانس

اندازه‌گیری فعالیت ضد اکسایشی اسانس بر اساس توانایی احیاکنندگی آهن^۲ (FRAP) انجام شد [۲۴]. برای رسم منحنی استاندارد کاتیون آهن دوظرفیتی، محلول پایه‌ای از آمونیوم فروس سولفات ۱ میلی مولار آماده شد. سپس مقادیر ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول در لوله‌های آزمایش ریخته و حجم هریک با آب مقطر به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس به هریک از لوله‌ها مقدار ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP اضافه شد. مخلوط حاصل به خوبی ورتکس گردید و به مدت ۴ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی-

3. *Staphylococcus aureus*
4. *monocytogenes Listeria*
5. *Escherichia coli*
6. *Salmonella typhimurium*

1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
2. Ferric reducing – antioxidant power

سرم فیزیولوژی استریل کاملاً مخلوط گردید؛ سپس سوسپانسیون یکنواختی از باکتری‌های مورد آزمایش مشابه کدورت لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. توسط سوپ بر روی محیط‌های مولر هیتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد. جهت تهیه دیسک‌های حاوی اسانس ۵۰ میکرولیتر از اسانس بر روی دیسک‌های بلانک استریل اضافه و به مدت یک ساعت زمان داده شد تا اسانس کاملاً جذب دیسک‌های کاغذی شوند. سپس دیسک‌ها روی پلیت به فواصل مناسب قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در 37°C انکوبه گردید. در این مطالعه از جتتامیسین (میکروگرم در میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت و از دی متیل سولفوکساید DMSO به عنوان کنترل منفی استفاده شد و آزمون‌ها به صورت سه بار تکرار انجام گردید. با اندازه‌گیری قطره هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها حساسیت یا مقاومت باکتری-های مورد نظر به اسانس تعیین شد [۳۰].

۲-۹-۸- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC^2) به روش میکروبراث دایلوژن^۳ و حداقل غلظت کشدگی (MBC)^۴

ابتدا مقدار ۰/۲ گرم از اسانس مورد آزمایش را در دو سی‌سی (۰/۵ سی‌سی دی متیل سولفوکساید DMSO و ۱/۵ سی‌سی محیط مولر هیتون براث) حل نموده که رقت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از اسانس بدست می‌آید. سپس در لوله هرکدام حاوی یک سی‌سی محیط مولر هیتون براث رقت سازی لوله‌ای را انجام نموده که به ترتیب غلظت هر شیشه نصف غلظت شیشه قبلی گردید (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶۲، ۰/۷۸۱، ۰/۳۹۰، ۰/۱۹۵). در این روش مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶۲، ۰/۷۸۱، ۰/۳۹۰، ۰/۱۹۵) میلی گرم در میلی‌لیتر از اسانس (تهیه شده در محیط کشت مولر هیتون براث) به خانه‌های یک پلیت ۹۶ خانه منتقل خواهد شد. سپس سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند تهیه شده را در مرتبه رقیق ساخته تا از کدورت معادل 10^7 باکتری بدست آمده در هر میلی‌لیتر به میزان ۲۰ میکرولیتر به هر یک از خانه‌ها اضافه گردید. به عنوان کنترل مثبت، در تعدادی از

در این تحقیق از محیط کشت مولر هیتون آگار استفاده شد. برای تهیه محیط کشت مذکور ابتدا ۲۱ گرم از پودر آماده در یک لیتر آب مقطر حل و همراه به هم زدن به مدت ۱ دقیقه جوشانده شد تا بصورت محلول شفاف شود. تمام محیط‌های کشت بعد از حل کردن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 121°C درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ lb/inch اتوکلاو و استریل گردید [۲۲].

۲-۹-۵- تهیه محلول نیم مک فارلند

استاندارد نیم مک فارلند با فرمول زیر:
0.5 ml BaCl_2 0.048M (1.175 w/v
 $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) + 99.5 ml H_2SO_4 0.36N
کدورتی ایجاد می‌کند که ناشی از تعداد 10^8 کلونی میکروارگانیسم در یک میلی‌لیتر تلقیح است. برای تهیه این محلول، همانطور که در فرمول مشخص است، نیم میلی‌لیتر از باریم کلرید (با مشخصات ذکر شده در فرمول) با ۹۹/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۳۶ N مخلوط شد، برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی، کدورت آن با کدورت این سوسپانسیون استاندارد مقایسه شد [۲۸].

۲-۹-۶- روش چاهک

بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس به روش چاهک پلیت انجام شد. در این روش هم از پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار که آغشته به میکروارگانیسم بودند، استفاده شد. توسط یک پیپت پاستور استریل که مخصوص ایجاد چاهک است، یک حفره در محیط کشت ایجاد کرده و داخل هر چاهک با سمپلر ۵۰ لاندا از اسانس به طور جداگانه قرار داده شد سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور 37°C درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. عملیات مذکور در مورد هر نمونه دو بار تکرار گردید، پس از آن میزان مناطق مهارت مورد ارزیابی قرار گرفت و بر اساس میلی‌متر محاسبه گردید [۲۹].

۲-۹-۷- روش دیسک کاغذی^۱

برای سنجش اثر ضد باکتریایی اسانس گیاه درمته از روش انتشار دیسک کربی بائر Kirby Bauer استفاده شد. از کلنی ۲۴ ساعته هر کدام از باکتری‌های کشت شده مورد آزمایش در محیط کشت مولر هیتون آگار به کمک لوپ برداشته و در لوله آزمایش استریل حاوی ۵ میلی‌لیتر

2. Minimum Inhibitory Concentration
3. Microbroth Dilution
4. Minimum Bactricidal Concentration

1. Paper Disc Diffusion Assay

قبل از بازده اسانس گیری از گونه های دیگر *A. diffusa* ۵/۳۳ درصد، *A. spicigera* ۰/۴۶ درصد، *A. absinthium* ۰/۹۲ درصد است [۳۲].

بررسی نتایج اسانس گیری در این مطالعه نشان داد که بازده اسانس درمنه *Artemisia Turanica* ۲/۱ درصد بر اساس وزن خشک نمونه بود. اسانس درمنه رنگ زرد کهربایی و بویی کاملاً مشخص داشت. بر اساس تحقیقات قبلی بازده اسانس گیری از گونه های دیگر *A. diffusa* ۵/۳۳ درصد، *A. spicigera* ۰/۴۶ درصد، *A. absinthium* ۰/۹۲ درصد است [۳۲].

نتایج این پژوهش نشان داد که این گونه ۲۶ ترکیب در اسانس خود دارد که در مجموع ۹۱/۰۵ درصد کل اسانس را تشکیل می دهند. چهار ترکیب عمده در اسانس گیاه عبارتند از: کرپرسانتین (۲۱/۳۷ درصد)، ۸-اوسینول (۱۹/۲۰ درصد)، پیرپنتین (۱۶/۶۱ درصد) و آلفا-پینن (۵/۵۲ درصد) است. همچنین منوترپن هیدروکربن (۱۲/۱۱ درصد)، مونوترپن اکسیژنه (۷۷/۰۳ درصد)، سزکویی ترین اکسیژنه (۱/۰۳ درصد) و ترکیبات غیر ترپنی (۰/۸۸ درصد) دارا می باشد.

ترپن ها قادر هستند که به غشای سلولی صدمه بزنند و در ساختار لیپید دیواره سلولی باکتری ها نفوذ کنند که این امر منجر به دنا تراسیون پروتئین ها و از هم پاشیدن ساختار سلولی و تراوش سیتوپلاسم و در نهایت مرگ سلول می شود [۳۳].

اثر ضد میکروبی اسانس ها روغنی تنها ناشی از ترکیبات عمده آنها نمی باشد، ترکیباتی که مقادیر کمتری دارند نظیر- ترپینول و ترپین-۴-ال نیز می توانند در فعالیت ضد میکروبی اسانس ها سهیم باشند. ترپین-۴-ال به عنوان یک سری از ترکیبات، دارای خاصیت ضد باکتری بر علیه چندین میکروارگانیسم هستند [۳۴]. آلفا-ترپینول نیز به عنوان ضد باکتری گزارش شده است [۳۵].

در حقیقت این امکان نیز وجود دارد که ترکیباتی با درصد کمتر احتمالاً دارای اثر سینرژیستی با دیگر ترکیبات موثر و فعال باشند [۳۶]. کاظمی و همکاران (۲۰۱۱)، گزارش دادند کامفور (۱۸ درصد)، به عنوان اصلی ترین ترکیب در اسانس گل *Artemisia deserti* شناخته شده است.

خانه های پلیت ۱۵۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هیتون آگار، ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری و ۵۰ میکرولیتر آنتی بیوتیک جنتامایسین اضافه شد. از خانه های حاوی ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت و باکتری به عنوان کنترل منفی استفاده خواهد شد. پلیت ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه 37°C قرار داده خواهد شد. پس از این مدت به تمام خانه های هر پلیت ۵۰ میکرولیتر از معرف تری فنیل تترازیلوم کلراید TTC اضافه خواهد شد و مجدداً به مدت ۳ ساعت در گرمخانه قرار گرفت. پس از خروج از گرمخانه، در هر ردیف مربوط به غلظت های مختلف یک اسانس، اولین غلظتی که در آن رنگ قرمز تشکیل نشده باشد، به عنوان MIC در نظر گرفته خواهد شد. برای به دست آوردن مقادیر حداقل غلظت کشندگی (MBC) از کلیه خانه هایی که رنگ قرمز در آنها تشکیل نشده باشد، ۱۰ میکرولیتر یا یک لوپ به پلیت های حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار منتقل خواهد شد. اولین غلظتی از هر اسانس که در پلیت مربوط به آن رشد مشاهده نشود به عنوان MBC در نظر گرفته شد [۳۱].

۲-۱۰- تجزیه و تحلیل داده ها

آزمون ها در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی و به روش آزمون فاکتوریل با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ انجام شد و برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ($P < 0.05$) استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اجزاء تشکیل دهنده اسانس درمنه *A. Turanica*

تفکیک و شناسایی ترکیبات اسانس توسط روش های کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی انجام شد. شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با استفاده از شاخص های بازداري و بررسی طیف های جرمی ترکیبات و مقایسه آنها با طیف های جرمی استاندارد موجود در کتابخانه های کامپیوتری و مراجع معتبر صورت گرفت (جدول ۱). اسانس درمنه *A. Turanica* رنگ زرد کهربایی و بویی کاملاً مشخص داشت. بر اساس تحقیقات

Table 1 Essential oil composition of *Artemisia Turanica*

No.	Compound	Retention indices	Percent
1	Tricyclene	926	0.65
2	Alpha-Pinene	940	5.52
3	Camphene	962	1.2
4	Sabinene	975	0.86
5	Myrcene	991	0.55
6	Alpha-Terpinene	1017	0.65
7	p-cymene	1024	2.38
8	1,8-cineole	1030	19.20
9	gamma-Terpinene	1091	0.3
10	Filifolone	1103	3.5
11	Chrysantenone	1125	21.37
12	Trans-pinocarveol	1138	3.83
13	Alpha-terpineol	1190	0.57
14	Verbenone	1207	2.24
15	Piperitenone	1226	16.61
16	Eucarvone	1233	0.44
17	Cis-verbenol	1238	2.45
18	Terpin-4-ol	1256	0.77
19	Cis-carveol	1261	0.26
20	p-cymen-7-ol	1265	0.38
21	Myrtenal	1278	0.85
22	Isopiperitenone	1285	1.16
23	Chrysanthenyl acetate	1294	0.88
24	Spathulenol	1578	0.72
25	Davanone	1648	0.31
26	Filifolide A	1996	3.4
Total			91.05
Monoterpene hydrocarbons			12.11
Oxygenated monoterpenes			77.03
Sesquiterpene hydrocarbons			-
Oxygenated sesquiterpenes			1.03
Non-terpene			0.88

۳-۲- میزان فنل کل

معادله مربوط به منحنی استاندارد اسید گالیک برای محاسبه

میزان ترکیبات فنولی به صورت $Y = 0.0038$

$$X + 0.0044$$

($R^2 = 0.9926$) است. میزان فنل تام اندام‌های هوایی درمنه

برابر با $43/09 \pm 0/51$ میلی گرم گالیک اسید بر گرم اسانس

بود. گیاهان دارویی، منابع غنی از ضد اکسایش‌های طبیعی

هستند. اکثر ضد اکسایش‌های طبیعی قادرند، رادیکال‌های

آزاد، رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل را از طریق

انتقال الکترون‌های منفرد حذف کنند [۳۹]. ترکیبات فنلی،

متابولیت‌های ثانویه خیلی از گیاهان، به ویژه گیاهان دارویی

هستند. این ترکیبات، توان ضد اکسایش بالایی دارند و از

طرق مختلف، در حذف و جلوگیری از ایجاد رادیکال‌های

آزاد موثرند؛ به طوری که این ترکیبات، رادیکال‌های آزاد را

۱ و ۸-سینئول (۱۰/۴ درصد) و ترانس-توجن (۱۱/۸ درصد)

نیز به عنوان سایر اجزای اصلی در اسانس این گل معرفی

شدند. ۱ و ۸-سینئول و کامفور از مهم‌ترین ترکیبات

ضدمیکروبی جدا شده از گونه‌های گیاهی مختلف هستند که

می‌توانند بالقوه ضدمیکروب باشند [۳۷]. بنابراین، به نظر

می‌رسد در تحقیق حاضر این ترکیبات، علت اصلی تاثیر

ضدباکتریایی اسانس گیاه درمنه *Artemisia Turanica*

بوده‌اند. خواص آنتی‌باکتریال گونه‌های جنس درمنه بیشتر

مربوط به ماده موثره ۱، ۸-سینئول و آلفا-توجن است [۸].

هاشمی و صفوی (۲۰۱۲)، ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه

Artemisia Houssckenechtii شناسایی کردند که

کامفور (۲۹/۲۴ درصد) و ۱ و ۸-سینئول (۲۷/۶۲ درصد) به

عنوان اجزاء اصلی شناسایی شد [۳۸].

جهت مقایسه اثرات ضد اکسایش اسانس گیاه در DPPH از پارامتر دیگری به نام IC_{50} استفاده شد. IC_{50} اسانس، غلظتی از آن می باشد که باعث ۵۰ درصد مهار اکسیداسیون شود. هر چه اثر ضد اکسایش اسانس بیشتر باشد میزان IC_{50} کمتر می باشد زیرا اکسیداسیون را با غلظت کمتری مهار می نماید [۴۷]. برای محاسبه IC_{50} از برنامه نرم افزاری آنالین $bipdatafit$ استفاده شد. در مطالعه حاضر، میزان IC_{50} اسانس گیاه درمنه و BHT به ترتیب برابر با: ۴/۴ و ۰/۳ میکروگرم بر میلی لیتر بود. در یک مطالعه، میزان IC_{50} اسانس متانولی اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی مختلف آذربایجان شرقی، برابر با ۲۹/۷۴ تا ۶۴/۱۸ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شده است [۴۲]. در یک مطالعه، میزان درصد مهار رادیکال آزاد حاصل از ۲ و ۲ دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل توسط عصاره متانولی اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی شهر بابک کرمان، برابر با ۱/۷ ± ۷۱/۶ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شده است؛ در حالی که در غلظتی از ترولوکس که برابر غلظت استفاده شده از عصاره متانولی درمنه بود، میزان درصد مهار برابر با ۱/۹ ± ۴۸/۱ بود [۳۷]. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که درمنه به عنوان یک ضد اکسایش اولیه، از طریق تبادل هیدروژن و واکنش با رادیکال‌های آزاد، دارای توان بالایی در حذف رادیکال‌های آزاد است.

۳-۵- اندازه گیری خاصیت ضد اکسایشی

اسانس درمنه به روش FRAP

در این روش توانایی اسانس گیاه درمنه برای احیاء آهن سه ظرفیتی و تبدیل آن به آهن دو ظرفیتی سنجیده می‌شود. حضور عوامل احیاء کننده (ضد اکسایش‌ها) منجر به احیاء کمپلکس‌های فری سیانید و تبدیل آنها به فرم فروس می‌گردد که بسته به ظرفیت احیاء کنندگی اسانس مورد بررسی با تغییر رنگ محلول از زرد به درجات مختلفی از رنگ‌های سبز و آبی همراه است [۴۸].

معادله مربوط به منحنی استاندارد محلول آمونیوم فروس سولفات به صورت $Y = 0.502X - (R^2 = 0.988)$ ، میزان توانایی احیا کنندگی اسانس درمنه و BHT به ترتیب برابر است با ۳۳/۰۲ ± ۰/۲۳ و ۳۲/۲۸ میکرومول بر لیتر به دست آمد. گزارشات نشان داد که در گیاهانی مانند شاه توت، تمشک و توت فرنگی بین محتوای

حذف می‌کنند و همچنین باعث رسوب عناصر اکسیدان مانند آهن می‌شوند [۴۰ و ۴۱]. در مطالعه‌ای، میزان تام فنل اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی گلستانک البرز با ۱۹۴/۹ ± ۹/۷ میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره گزارش شده است [۴۲]. در مطالعه‌ای دیگر، میزان فنل عصاره متانولی اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی مختلف آذربایجان شرقی، برابر با ۱/۴ تا ۲/۳ میکروگرم بر صد میکروگرم عصاره گزارش شده است [۴۳].

۳-۳- میزان فلاوونوئید تام

معادله مربوط به منحنی استاندارد کوئرستین برای محاسبه محتوای فلاوونوئید کل به صورت $Y = 0.031X + 0.0109$ ($R^2 = 0.9913$) است. محتوای فلاوونوئید اسانس درمنه برابر با ۰/۰۲ ± ۱/۱۱ میلی گرم کوئرستین بر گرم اسانس بود. در مطالعه‌ای نشان داده شد که میزان تام فلاوونوئید عصاره متانولی اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی گلستانک البرز، برابر با ۱۲/۴ ± ۰/۶ میلی گرم کوئرستین بر گرم عصاره گزارش شده است [۴۳]. در مطالعه خلجی و همکاران (۲۰۱۱) نیز میزان فلاوونوئید عصاره متانولی اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی مختلف آذربایجان شرقی، برابر با ۰/۴ تا ۲/۱ میکرومولار کوئرستین بر صد میکروگرم عصاره گزارش شده است [۴۲]. در مطالعات دیگری نشان داده شده است که درمنه، دارای اثرات ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد اسپاسم، ضد التهاب و ضد مالاریا است [۴۴]. مطالعه‌ای که بر روی عصاره آبی آرتمیسیا ولگاریس (*Artemisia vulgaris*) در مصر انجام شد، نشان داد که میزان IC_{50} برابر با ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر است. میزان فنل عصاره آبی آرتمیسیا ولگاریس برابر با ۷/۹۶ ± ۰/۷۶، معادل میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره است و میزان فلاوونوئید آن برابر با ۳/۴ ± ۰/۰ معادل میلی گرم روتین بر گرم عصاره است [۴۵]. مطالعه دیگر که بر روی عصاره اتانولی بذر آرتمیسیا (*Artemisia pallens*) در نیجریه انجام شد، نشان داد که میزان IC_{50} برابر با ۱۵۰/۳۳ ± ۱/۵ میکروگرم بر میلی لیتر است [۴۶].

۳-۴- ارزیابی ۲ و ۲ دی فنیل-۱-پیکریل

هیدرازیل (DPPH)

۳-۶-۱- بررسی اثر ضد میکروبی اسانس درمنه به

روش چاهک و دیسک

با توجه به جدول ۲ نتایج بدست آمده از محاسبه قطر هاله بر حسب میلی‌متر در روش چاهک نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری در چهار باکتری مورد آزمایش مشاهده گردید ($P < 0.05$). باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز نسبت به سایر باکتری‌ها در برابر اسانس مورد مطالعه، اثر ضد باکتریایی و هاله عدم رشد بیشتری را نشان داد که به دلیل مقاومت زیاد دیواره باکتری‌های گرم منفی در برابر نفوذ مواد خارجی نسبت به دیواره باکتری‌های گرم مثبت و تاثیر کمتر اسانس بر روی آنها دانست. همچنین قطر هاله‌های بدست آمده باکتری گرم مثبت در مقایسه با قطر هاله نمونه کنترل مثبت جنتامایسین تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P > 0.05$).

فنل کل و فعالیت ضد اکسایشی برگ و میوه‌های سنجش شده به روش FRAP، یک ارتباط خطی وجود دارد [۴۹]. بنابراین با توجه به ارتباط مثبت بین سنجش FRAP و محتوای فنل، فلاونوئیدهای مانند کوئرستین در این گیاه، به عنوان ترکیبات ضد اکسایش، می‌تواند یک دلیل اصلی برای قدرت احیایی بالا باشد. اکثر پلی‌فنل‌ها در بین ترکیبات فیتوشیمیایی ضد اکسایش به علت خصوصیت احیایی و عمل به دام انداختن رادیکال آزاد بسیار مهم هستند. آنها همچنین از طریق تعامل با سیستم‌های آنزیمی مختلف توانایی چلات کنندگی فلزات را دارند، علاوه بر آن این ترکیبات که در طی رشد و نمو متغیر است به علت شرکت داشتن در بو، رنگ و مزه در گیاهان نیز اهمیت دارند [۵۰].

۳-۶-۲- تعیین خاصیت ضد میکروبی اسانس

درمنه

Table 2 Antibacterial activity of the essential oil of *Artemisia Turanica*, investigated with well and with disk diffusion (Means with different letters differ significantly in $p < 0.05$)

Diameter of inhibition zones (mm), Disc- diffusion method			Diameter of inhibition zones (mm), Well diffusion method			Microorganisms
DMSO	Gentamicin	Essential oil	DMSO	Gentamicin	Essential oil	
0 ^b	33 ^a	31 ^a	0 ^b	34 ^a	33 ^a	<i>Staphylococcus aureus</i>
0 ^b	31 ^a	29 ^a	0 ^b	32 ^a	30 ^a	<i>Listeria monocytogenes</i>
0 ^c	30 ^a	11 ^b	0 ^c	30 ^a	14 ^b	<i>Escherichia coli</i>
0 ^c	30 ^a	8 ^b	0 ^c	30 ^a	11 ^b	<i>Salmonella</i>

دارا بودن ترکیبات شیمیایی، فعالیت ضد میکروبی متفاوتی را نشان می‌دهند [۵۲]. بنابراین اثر ضد میکروبی اسانس درمنه به هریک از اجزای اصلی اسانس یا هر یک از اجزای فرعی یا سینرژسم یا آنتاگونیست بین آنها مربوط می‌شود.

۳-۶-۲- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و

حداقل غلظت کشندگی (MBC)

در جدول ۳، مقایسه نتایج اثر مهارکنندگی (MIC) باکتری-های مورد مطالعه نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($P < 0.05$). اسانس درمنه در غلظت ۳/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (MIC) تنها بر روی باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس*) تاثیر داشته و غلظت ۶/۲۵ بر روی باکتری‌های گرم منفی (*شریشیاکلی* و *سالمونلاتیفی موربوم*) اثر داشته که می‌توان این اختلاف را به مقاومت دیواره باکتری‌های گرم منفی نسبت به نفوذ مواد خارجی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت دانست.

محبوبی و بیدگلی (۲۰۰۹)، در پژوهشی بیان داشتند که خاصیت ضد میکروبی اسانس درمنه کوهی با افزایش غلظت افزایش می‌یابد. همچنین اسانس حاصل از اندام هوایی گیاه، اثر ضدقارچی بسیار خوبی دارد. اثر ضد قارچی اسانس از اثر ضد باکتریایی بیشتر و باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت مقاوم‌تر هستند [۵۱]. محققین مختلفی اثرات متفاوت را برای اجزای درمنه ترکی گزارش نمودند. به عنوان مثال ژرانیل دارای اثر ضدباکتریایی به ویژه در مقابل *سالمونلاتیفی موربوم* و اثر ضدقارچی می‌باشد [۴۹].

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، میانگین قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های مختلف با هم تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). به عبارت دیگر، نوع باکتری بر قطر هاله عدم رشد موثر بود. همچنین قطر هاله‌های بدست آمده باکتری گرم مثبت در مقایسه با قطر هاله نمونه کنترل مثبت جنتامایسین تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P > 0.05$). بر اساس نظر Recio و همکاران (۲۰۰۵)، اسانس‌ها به واسطه

Table 3 Minimum inhibitory concentrations (MIC, mg/ml) and Minimum bactericidal concentrations (MBC, mg/ml) of the the essential oil of *Artemisia Turanica*

MBC	MIC	Microorganisms
12.5 ^c	3.125 ^b	<i>Staphylococcus aureus</i>
50 ^b	3.125 ^b	<i>Listeria monocytogenes</i>
100 ^a	6.25 ^a	<i>Escherichia coli</i>
100 ^a	6.25 ^a	<i>Salmonella</i>

(Means with different letters differ significantly in $p < 0.05$)

ترکیبات افزایش می‌یابد و از طرفی، نفوذ اجزای اسانس در غشاء منجر به متورم شدن آن می‌گردد و فعالیت آن را نیز کاهش داده که در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود [۵۵]. بنابراین، در تحقیق حاضر می‌توان دلیل اصلی اثر ضد میکروبی اسانس *Artemisia Turanica* بر باکتری‌های مورد آزمون را به این عملکرد در اسانس نسبت داد.

کاظمی و همکاران (b ۲۰۱۱)، نشان دادند اسانس یک گونه اندمیک از گیاه *Artemisia* به نام *A. kermanensis* دارای فعالیت ضدباکتریایی است. براساس نتایج؛ استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا با MIC ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر، حساس ترین میکروارگانیسم‌ها نسبت به اسانس بودند [۵۶]. در یک مطالعه، فعالیت ضدباکتریایی اسانس گونه *A. fragrans* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تست ضدباکتریایی اسانس این گیاه نشان داد این اسانس دارای فعالیت ضدباکتریایی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت مانند استرپتوکوکوس آگلانتیه، آئروکوکوس فکالیز و استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشند، اما بر روی باکتری‌های گرم منفی مانند اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه اثری ندارد. همچنین ترکیبات اسانس این گونه از گیاه *Artemisia* با روش کروماتوگرافی جرمی بررسی و مشخص گردید، او ۸- سینئول و توجن در ترکیبات اسانس این گیاه از غلظت بالایی برخوردارند [۵۷]. در یک مطالعه دیگر، فعالیت ضد میکروبی و ضد اکسیدانی اسانس اندام‌های هوایی گونه *A. kermanensis* در مقابل ۸ باکتری باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتیلیس، سیتروباکتر، آنتروباکتر، اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس و ۲ گونه قارچی آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلیکنس مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد باسیلوس سوبتیلیس، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، اختلاف معنی‌داری در باکتری‌های مورد بررسی مشاهده شد ($P < 0.05$). در روش میکروبراث دایلوشن، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت پایین ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر اثر کشندگی (MBC) بهتری نسبت به سایر باکتری‌های مورد آزمایش نشان داد. در مورد باکتری‌های گرم منفی، اثر کشندگی در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

بر اساس نتایج این تحقیق باکتری‌های گرم مثبت دارای حساسیت بیشتری در برابر اسانس گیاه مورد نظر می‌باشند که این نتیجه با نتایج تحقیقات پیشین در مورد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی یکسان است [۲۵ و ۵۳]. علت حساس تر بودن باکتری‌های گرم مثبت نسبت به مواد شیمیایی و اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی، اختلاف ساختمان دیواری می‌باشد. باکتری‌های گرم مثبت در دیواره سلولی خود دارای موکوپتید بوده، در حالیکه باکتری‌های گرم منفی فقط لایه‌ی نازکی از موکوپتید دارند و قسمت اعظم ساختمان دیواره در آنها لیپوپروتئین و لیپوپلی ساکارید است. در حقیقت باکتری‌های گرم منفی یک غشاء خارجی در اطراف دیواره سلولی خود دارند که به همین دلیل آنها را در برابر مواد ضد باکتریایی مقاوم تر می‌سازد [۵۴]. تخریب دیواره سلولی منجر به نشت محتویات سلولی به بیرون و در نتیجه مرگ سلول می‌شود. میزان اثر این ترکیبات به دوز و زمان اثر آنها بستگی دارد. غلظت بالاتر منجر به افزایش سرعت نابودی میکروارگانیسم‌ها می‌شود در نتیجه برای ایجاد اثر ضد باکتریایی مشابه در دوزهای پایین از زمان بیشتری استفاده کرد [۲۵].

سیلکناز و همکاران (۲۰۰۷)، اعلام کردند اسانس‌ها اثر ضدباکتریایی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشای سلولی اعمال می‌کنند، که نتیجه بررسی در رابطه با نحوه عملکرد اسانس نشان داد نفوذپذیری غشا از طریق این

اسانس را تشکیل دادند که عبارت بودند از کریسانتین (۲۱/۳۷ درصد)، او-۸-سینتول (۱۹/۲۰ درصد)، پیریتین (۱۶/۶۱ درصد) و آلفا-پینن (۵/۵۲ درصد) است، که ۶۲/۷ درصد از اسانس گیاه را تشکیل می‌دهند. در ادامه اثر ضد اکسایش اسانس درمنه به روش DPPH و FRAP نشان داد، اثر اسانس مذکور بیشتر از ضد اکسایش شناخته شده‌ی BHT بود. بررسی خواص ضد میکروبی نشان داد که مهار باکتری‌های گرم منفی توسط اسانس حاصل از اندام‌های هوایی گیاه بیشتر از انواع گرم مثبت می‌باشد و از طرفی میزان خاصیت آنتی باکتریال اسانس این گیاه می‌تواند با جنتامایسین قابل مقایسه باشد. در نتیجه می‌توان گفت به واسطه داشتن مقادیر زیادی از ترکیبات فنلی و ترپنی اسانس *A. Turanica* دارای پتانسیل ضد اکسایشی و ضد میکروبی بالایی می‌باشد، می‌توان این گیاه را به عنوان یک موضوع با ارزش جهت پژوهش‌های بیشتر، توصیه نمود. ۵- تشکر و

قدردانی

این مقاله حاصل از طرح پژوهشی بوده که توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان حمایت مالی شده است. بدین وسیله از پژوهشکده علوم و صنایع غذایی که امکانات آزمایشگاهی جهت انجام این طرح را فراهم نمودند کمال تشکر را داریم.

۵- منابع

- [1] Celiktas, O.Y., Kocabas, E.E.H., Bedir, E., Sukan, F.V., Ozek, T. and Baser, K.H.C. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*. 100: 553-559.
- [2] Gragg, G.M., Newman, D.J. and Sander, K.M. 1997. Natural products in drug discovery and development. *Journal Natural Product*. 60: 52-60.
- [3] Morsy, M.K., Khalaf, H.H., Sharoba, A.M., El-Tanahi, H.H. and Cutter, C.N. 2014. Incorporation of essential oils and nanoparticles in pullulan films to control foodborne pathogens on meat and poultry products. *J. Food Sci*. 79, M675-M684.
- [4] Umaraw, P. and Verma, A.K. 2015. Comprehensive Review on Application of Edible Film on Meat and Meat Products:

اورئوس با MIC ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، حساس‌ترین میکروارگانیسم‌ها نسبت به اسانس بوده و اسانس *A. kermanensis* دارای اثر ضدقارچی است. در آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس این گونه مشخص گردید ایزوبورنئول با ۲۱/۵ درصد، کامفور با ۹/۸ درصد و سیس-توجن با ۷/۶ درصد، از مهم‌ترین ترکیبات در این گیاه می‌باشند [۵۶].

Baykan و همکاران (۲۰۱۲)، در مطالعه خود با بررسی اثر ضد میکروبی و ضد اکسیدانی اسانس و عصاره متانولی چندین گونه آرتمیزیای شامل: آرتمیزیای اسیسیتیوم، آرتمیزیای آربورنس، آرتمیزیای کمپسترینس، آرتمیزیای اسکوپاریا، آرتمیزیای سنتونیکوم و آرتمیزیای ولگاریس بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، حساس‌ترین باکتری نسبت به اسانس تمامی گونه‌های آرتمیزیای می‌باشد. آرتمیزیای سنتونیکوم و آرتمیزیای اسکوپاریا، بیشترین فعالیت ضد میکروبی را علیه قارچ کاندیدا آلبیکنس از خود نشان دادند، بیشترین اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی نیز مربوط به آرتمیزیای ولگاریس، آرتمیزیای آربورنس و آرتمیزیای سنتونیکوم، بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و بیشترین اثر ضد باکتریایی آرتمیزیای اسیسیتیوم بر اشرشیاکلی گزارش شد [۵۸]. در مطالعه حاضر بررسی نتایج تاثیر اسانس *Artemisia Turanica* نشان داد اسانس این گیاه، دارای بیشترین تاثیر بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشند. همچنین اسانس گیاه فوق علیه لیستریا مونوسیژنوز و باکتری‌های گرم اثر ضد باکتریایی دارد. نتایج به دست آمده از روش‌های چاهک، دیسک و میکروبراث دایلوژن نتایج فوق را نیز تایید نمود. با توجه به قطر هاله‌ی عدم رشد و مقایسه آن با سایر گونه‌های *Artemisia* می‌توان نتیجه گرفت اسانس گیاه فوق دارای خاصیت ضد باکتریایی بالقوه‌ای نسبت به سایر گونه‌ها می‌باشد.

۴- نتیجه گیری

این مطالعه جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی، اندازه‌گیری قدرت ضد اکسایشی و آنتی میکروبی اسانس *A. Turanica* انجام شد. در آنالیز اسانس مجموعاً ۲۶ ترکیب شناسایی شد که عمده‌ترین ترکیبات آن مربوط به ترکیبات مونوترپن اکسیژنه بوده و چهار ترکیب، عمده‌ترین ترکیبات

- [14] Wright, C.W. 2002. *Artemisia*. medicinal and aromatic plants - Industrial Profiles, Chapter 1, 10, 22.
- [15] Valizade, E., Jafari, B. and Dolgari-SHaraf, J., et al. 2012. Evaluating antibacterial activity from essential oil of *Artemisia fragrans* Willd. In North-Western of Iran. *Afr J Microbiol Res.* 6(4):834-7.
- [16] Ramezania, M., Fazli-Bazzaza, B.S., Saghafi- Khademb, F. and Dabaghiana, A. 2004. Antimicrobial activity of four *Artemisia* species of Iran. *Fitoterapia.* 75: 201- 3.
- [17] Cha, J., Jeong, M., Jeong, S., Moon, S., Kim, J., Kil, B. and Song, Y. 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Artemisia scoparia* and *A. capillaries*. *Planta Med.* 71: 186 – 90.
- [18] Khanahmadi, M., Rezazadeh ,Sh., Shahrezaei, F. and Taran, M. 2009. Study on Chemical Composition of Essential oil and anti-oxidant and anti- microbial Properties of *Artemisia haussknechtii*. *Journal of Medicinal Plans.* 8 (31): 132-141.
- [19] Shafei, M., Sharifan, A. and AghazadeMeshki, M. 2012. Composition of Essential Oil of *Ziziphora clinopodioides* and Its Antimicrobial Activity on *Kluyveromyces marxianus*, *Food Technology and Nutrition.* 9(1): 101-108.
- [20] Mo Ku, K. and Juvik John, A. 2013. Environmental Stress and Methyl Jasmonate-mediated Changes in Flavonoid Concentrations and Antioxidant Activity in Broccoli Florets and Kale Leaf Tissues. *Hortscience.* 48(8):996–1002.
- [21] Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M. and Hamdi, M. 2007. The effects of solvents and extraction methods on the phenolic contents and biological activities of the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of Biotechnology.* 3(12): 706-720.
- [22] Chang, C., Yang, M., Wen, H., and Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis.* 10: 178-182.
- [23] Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M. and Polissiou, M., et al. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control.* 15: 549-57.
- An Eco-friendly Approach. *Crit. Rev. Food Sci Nutr.* 57(6):1270-1279.
- [5] Mazandarani, M. and Khormali, A. 2015. Autecology, ethnopharmacology, total phenol and flavonoids and antioxidant activity of *Ditrichia graveolens* (L.) Greuter. In different extraction from Bandargaz region. *Ecophytochemical Journal.* 6 (2):69-78.
- [6] Hussain, A.I., Anwar, F., Sherazi, S.T.H. and Przybylski, R. 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry.* 108: 986-995.
- [7] Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N. and Anackov, G. 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 54: 1822-1828.
- [8] Rustaiyan, A., and Masoudi, S. 2011. Chemical composition and biological activities of Iranian *Artemisia* species. *Phytochem. Lett.* 4: 440-447.
- [9] Dinani, N.J., Asgary, A., Madani, H., Naderi, G. and Mahzoni, P. 2010. Hypo cholesterolemic and antiatherosclerotic effect of *Artemisia aucheri* in hyper cholesterolemic rabbits. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences.* 23(3): 321-325.
- [10] Sereshti, H. and Samadi, S. 2007. Comparison of hydrodistillation-headspace liquid phase microextraction techniques with hydrodistillation in determination of essential oils in *Artemisia Haussknechtii* Boiss. *JSUT.* 33 (2): 7-17.
- [11] Teissier, M., Silva, A. 2004. Monitoring the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of Biotechnology.* 3(12): 706-720.
- [12] Hakimi Maybodi, M, H., Afkhami Aghdaee, M. and Mijalili, B.F. 2003. An investigation into biological activities of *Artemisia Persia's* essential oil. *Pajoohesh and Sazandegi.* 16 (61): 2-5.
- [13] Laciari, A., Vacaruiz, M.L., Carrizoflores, R., et al. 2009. Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia echegarayi* Hieron. (Asteraceae). *Rev Argent Microbiol.* 41:226-31.

- Journal of Ethnopharmacology. 33: 187–191.
- [35] Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. and Palmas, F. 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. Letters in Applied Microbiology. 29: 130–135.
- [36] Marino, M., Bersani, C. and Comi, G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from lamiaceae and compositae. International Journal of Food Microbiology. 67: 187–195.
- [37] Kazemi, M., Shafizade, S. and Larijani, K. 2011 a. Comparison of essential oils composition of stem, leaf and flower from *Artemisia deserti* Kracsh. J Appl Chem Res. 18:29-34.
- [38] Hashemi, S.M., and Safavi S.A. 2012. Control of Three Stored-Product Beetles with *Artemisia haussknechtii* (Boiss) (Asteraceae) Essential Oil. Ecologia Balkanica. 4(2): 85-92.
- [39] Lloyd, D.R. and Phillips, D.H. 1999. Oxidative DNA damage mediated by copper (II), iron (II) and nickel (II) fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. Mutat Res. 424(1-2): 23-36.
- [40] Williams, R.J., Spencer, J.P. and Rice-Evans, C. 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? Free Radic Biol Med. 36(7): 838-49.
- [41] Wong, C.C., Li, H.B., Cheng, K.W. and Chen, F. 2006. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. Food Chem. 97(4): 705-11.
- [42] Khalaji, S., Zaghari, M., Hatami, K., Hedari-Dastjerdi, S., Lotfi, L. and Nazarian, H. 2011. Black cumin seeds, *Artemisia sieberi*, and *Camellia L.* plant extract as phytogetic products in broiler diets and their effects on performance, blood constituents, immunity, and cecal microbial population. Poult Sci. 90(11): 2500-10.
- [43] Mahboubi, M.O. and Bidgoli Q. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of *Artemisia aucheri* Boiss.
- [24] Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. 1999. Ferric reducing / antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymology. 299: 15-27.
- [25] Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods. International Journal of Food Microbiology. 94: 223-253.
- [26] Zgoda, J.R. and Porter, J.R. 2001. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. Pharma. Biol., 39:221-225.
- [27] Anonymus. 1988. Culture Media Handbook. Darmstadt: Federal Republic of Germany. 123, 124, 137
- [28] Baron. J.E. and Finegold, S.M. 1990. Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology. 8th ed. Toronto: The C.V. Mosby Company. 172-184, 238-282.
- [29] Saeidnia, S., Yassa, N., Rezaeipoor, R. and Shafiee, A. 2004. Comparative investigation of the essential oils of *Achillea latifolia* Boiss. and *A. millefolium*, chemical composition and immunological studies. Journal of Essential Oil Research. 16 (3):262-265.
- [30] Daneshmandi, S., Soleimani, N., Sattari, M. and Pourfathollah, A.A. 2010. Evaluation of the drug synergistic and antibacterial effects of *cuminum cuminum* essential oil, Arak Medical University Journal (AMUJ). 13(2):78-82.
- [31] Duffy, C. f. and Power, R.F, 2001, Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts, Internat. J. Antimicro. Age. 17, 527-529.
- [32] Sefidkon, F., Ahmadi, L. and Mirza, M. 2002. The investigation of chemical components in essential oil of *Artemisia dracunculus*. Pajouhesh and Sazandgi. 34: 15-17.
- [33] Oussalah, M., Caillet, S. and Lacroix, M. 2006. Mechanism of action of *Spanish oregano*, Chinese cinnamon, and savory oils against cell membrane and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection. 69(5): 1046-1055.
- [34] Barel, S., Segal, R. and Yashphe, J. 1991. The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*.

- [51] Mahmoudi, M., Ebrahimzadeh, M.A., Ansaroudi, F., Nabavi, S.F. and Nabavi, S.M. 2009. Antidepressant and antioxidant activities of *Artemisia absinthium* L. at flowering stage. *Afr J Biotech.* 8 (24): 7170-5.
- [52] Rios, J.L. and Recio, M.C. 2005. Medicinal plant and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* 100(1-2): 80-84.
- [53] Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K. and Nychas, G.-J.E. 2001. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Italian Journal of Food Science.* 13(1): 65-75.
- [54] Soltani Nezhad, Sh., Mokhtari Sataeei, T. and Soltani Nezhad, M. 2010. Evaluation of antibacterial activity of eucalyptus leaf extract against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Streptococcus pyogenes* in vitro. *Journal of Islamic Azad University of Microbial Biotechnology.* 4: 21-28.
- [55] Celiktaş, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., et al. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oil of *Rosmarinus officinalis* depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* 100:553-9.
- [56] Kazemi, M., Dakhili, M., Dadkhah, A., et al. 2011 b. Composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia Kermanensis* Podl. An endemic species from Iran. *J Med Plants Res.* 5(18): 4481-6.
- [57] Verdian-rizi, M.R., Sadat-Ibrahimi, E., Hadjiakhoondi, A., et al. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of *Artemisia annua* L. essential Oil from Iran. *J Med Plants.* 7: 59-62.
- [58] Baykan Erel, S., Reznicek, G., Gokhan Senol, S., et al. 2012. Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. Species from western Anatolia. *Turk J Biol.* 36:75-84.
- Essential oil. *Iran J Med Aromatic Plants.* 25(3):429-440.
- [44] Poiată, A., Tuchiluş, C., Ivănescu, B., Ionescu, A. and Lazăr, M.I. 2009. Antibacterial activity of some *Artemisia* species extract. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 113(3): 911-4.
- [45] Temraz, A. and El-Tantawy, W.H. 2008. Characterization of antioxidant activity of extract from *Artemisia vulgaris*. *Pak J Pharm Sci.* 21(4): 321-6.
- [46] Rashid, S., Rather, M.A., Shah, W.A. and Bhat, B.A. 2013. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd. *Food Chem.* 138 (1):693-700.
- [47] Saha, K., Lajis, N.H., Israf, D.A., Hamzah, A.S., Khozirah, S., Khamis, S. and Syahida, A. 2004. Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plant. *J. Ethnopharmacol.* 92: 263-267.
- [48] Soares, A.A., Souza, C.G.M., Daniel, F.M., Ferrari, G.P., Costa, S.M.G. and Peralta, R.M. 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murr.il) in two stages of maturity. *Food Chemistry.* 112: 775-781.
- [49] Kim, D. O., Padilla-Zakour, O. I. and Griffiths, P. D. 2004. Flavonoids and antioxidant capacity of various cabbage genotypes at juvenile stage. *Journal of Food Science.* 69: 685-689.
- [50] Deepa, N., Kaura, Ch., Georgea, B., Singhb, B. and Kapoor, H. C. 2007. Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. *LWT Food Science and Technology.* 40: 121-129.

Essential oil composition, Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Artemisia Turanica* on typical food-borne pathogens

Sardarodiyani, M.^{1*}, Arianfar, A.¹

1. Young Researchers and Elite Club, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, (IRAN)

(Received: 2017/05/11 Accepted:2017/09/03)

Essential oils and herbal extracts from medicinal plants as a source of natural antioxidants, antimicrobial, anticancer and biologically active compounds have attracted a great deal of interesting applications in fresh and processed food preservation, pharmaceutical, alternative medicine and natural-based therapies. In the present study, phytochemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Artemisia Turanica* essential oil have been evaluated. In the study, to evaluate the antioxidant activity were measured by two methods: DPPH free radical scavenging and FRAP assay. Butylated Hydroxy Toluene (BHT) was used as positive control for comparison.

This study conducted in order to evaluate antimicrobial effect of *A. turanica* essential oil on growth of four bacterial pathogens by well diffusion, disk diffusion and broth microdilution methods. The results showed that the essential oil of this species has 26 components (91.05% of all components), among them was the combination of essential oil percent, respectively: Chrysantenone (21.37%), 1,8-Cineole (19.20%), Piperitenone (16.61%), and Alpha-Terpinene (5.52%). The IC₅₀ value of oil and BHT in DPPH assay were 4.4 and 0.3 mg/ml, respectively. In addition the reducing power of oil and BHT were 33.02 and 32.28 µm/l, respectively. Antibacterial test results were showed that the minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration against *Staphylococcus* were 3.125 mg/mL and 12.5 mg/mL. These results indicate that this essential oil has a high potential of antioxidant and antibacterial properties. Therefore, it can be suggested to combine this essential oil with other agents for the preservation of foods against pathogenic and toxigenic microorganisms.

Keywords: Antioxidant, Antibacterial, Essential oil, *Artemisia Turanica*, 1,8-cineole.

* Corresponding Author E-Mail Address: : sardarodiyani_5@yahoo.com