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

مریم سردرودیان[1*]، اکرم آریان‌فر[1]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران[1]

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

چکیده

اسانس‌ها و عصاره‌های حاصل از گیاهان دارویی با داشتن ترکیبات ضدمیکروبی، 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 ضدمیکروبی اسانس گونه مورد نظر بر علیه ٤ باکتری با استفاده از روش چاهک، دیسک دیفیوژن و براث میکرودیلوشن انجام شد. نتایج نشان داد که اسانس درمنه ٢٦ ترکیب در اسانس خود دارد که در مجموع ۹۱/۰۵ درصد کل اسانس را تشکیل می‌دهند. ترکیبات اصلی آن شامل کریرسانتنن (۲۱/۳۷ درصد)، ۱و۸-سینئول (۱۹/۲۰ درصد)، پیپریتنن (۱٦/٦۱درصد) و آلفا-پینن (۵/۵۲ درصد) است. در آزمون DPPH، میزان IC_{50} برای اسانس و BHT به ترتیبرابر با ٤/٤ و ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر 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 مهارکننده‌ی رشد اسانس درمنه بر روی استافیلوکوکوس اورئوس ۳/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشنده‌ی آن‌ها ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر 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، آنتی‌باکتریال، اسانس، درمنه، ۱و۸-سینئول

* مسئول مکاتبات: sardarodiyan_5@yahoo.com

۱- مقدمه

امروزه بروز مقاومت دارویی در انواع میکروارگانیسم‌های بیماریزا 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 [۱و۲].
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 می گردند [۳]. به منظور افزایش مدت زمان ماندگاری از مواد ضدمیکروبی و ضد اکسایش‌ها که اکثر اوقات سنتتیک هستند استفاده می‌شود [٤].
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]. اسانس-ها و عصاره‌های حاصل از گیاهان دارویی با داشتن ترکیبات ضدمیکروبی، ضدسرطانی، ضد اکسایشی و عوامل حذف کننده رادیکال‌های آزاد از توان بسیار بالایی جهت به کارگیری‌شان به عنوان ترکیبات نگهدارنده طبیعی جدید در محافظت غذاهای خام و فرآوری شده برخوردار می‌باشند [۷و٦].
گیاه درمنه (*Artemisia*) از خانواده Asteraceae compositae دارای ۳٤ 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، افسنطین، یوشان، برنجاسف، قیصوم 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 آب گریزی 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 ۲/٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد [۱۳]. در طی تحقیقاتی که روی ۲٤۰ گونه از تیره Asteraceae جهت تعیین خواص دارویی آنها انجام شده، حدود ۸٤ ترکیب دارویی در گونه‌های *Artemisia* تشخیص داده شده است [۱٤]. ولی زاده و همکاران (۲۰۱۲)، ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدباکتریایی اسانس حاصل از گیاه *Artemisia Fragrans* ارزیابی نمودند که۱و 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.diffusa*، *A.oliveriana*، *A.turanica* 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 [۱٦و۱۷]. خان احمدی و همکاران (۲۰۰۹) ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدباکتریایی اسانس حاصل از *A.houssckenechtii* 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 ضدمیکروبی احتمالی گیاه مورد مطالعه، که می‌تواند به عنوان جایگزین ضد اکسایش‌ها و آنتی بیوتیک-های سنتتیک معرفی شود، می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد شیمیایی

متانول، معرف فولین سیوکالچو، اسید گالیک، بوتیل هیدروکسی تولوئن، استات سدیم، ۲، ٤، ٦- تری پرپیدیل- اس- تریازین، فریک کلراید، آمونیوم فروس سولفات، آلومینیوم کلراید ٦ آبه، دی فنیل پیکریل هیدرازیل، سدیم کربنات، استون، محیط کشت‌های نوترینت آگار، مولر هینتون 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 باباامان جمع‌آوری شده و با شماره هرباریومی MP- ۲۷۵/۲ 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 جمع آوری شد و در دمای ٤ $^{\circ}C$ نگهداری شد [۱۹].

۲-٤- آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با استفاده از GC-MS[1]

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 آون $^{\circ}C$ ۵۰ و توقف در این مدت ۵ دقیقه و دمای دستگاه $^{\circ}C$ ۵ در هر دقیقه افزایش یافت تا رسیدن به دمای $^{\circ}C$ ۲٦۰ و باقی ماندن در این دما به مدت ۱۰ دقیقه. از گاز هلیم 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 (C_5-C_{30}) تحت شرایط یکسان با تزریق اسانس‌ها انجام شد و با توجه به زمان بازداری این ترکیب‌ها اندیس کوتز برای هر جزء موجود در کروماتوگرام اسانس محاسبه شد. این مقادیر با مقادیر اندیس کواتز موجود در جداول استاندارد مقایسه شد و ترکیب‌های موجود دراسانس 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 سیوکالچیو 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 ۷٦۰ نانومتر اندازه گیری 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 و۲۲۰ 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].

۲-٦- ارزیابی ترکیبات فلاوونوئید

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

1. Gas chromatography-Mass spectermetry

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 ٤١٥ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروسکوپی خوانده شد. از غلظت‌های مختلف کوئرستین ۱۰۰ -۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در متانول جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد و محتوای فلاوونوئید به صورت اکی والان‌های کوئرستین بر گرم اسانس بیان شد.

۲-۷- میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH[1]

برای انجام این تست، ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس گیاه *A. Turanica* به ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۰٤ درصد DPPH در متانول اضافه خواهد شد. بعد از ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری در دمای اتاق جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر بر علیه بلانک خوانده شد. درصد بازدارندگی رادیکال های آزاد از طریق زیر محاسبه می گردد [۲۳].

(۱)

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

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[2] (FRAP) انجام شد [٢٤]. برای رسم منحنی استاندارد کاتیون آهن دوظرفیتی، محلول پایه‌ای از آمونیوم فروس سولفات ۱ میلی مولار آماده شد. سپس مقادیر ۱۰، ۲۰، ٤٠، ٦٠، 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 ٤ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی-گراد 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 مقطرهمراه 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- 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*[3] (PTCC١٤٣١)، *لیستریا مونوسیتوژنز*[4] (PTCC١٢٩٨)، *اشرشیاکلی*[5] (PTCC١٣٩٩) و *سالمونلاتیفی موریوم*[6] (PTCC١٧٠٩) در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند [۲۵].

۲-۹-۲- تهیه محلول کنترل مثبت جنتامایسین

ابتدا g ۰/۰۰۵ از پودر جنتامایسین در مقداری آب استریل حل گردید و به حجم ml ۱۰۰ رسانده شد. بدین ترتیب محلول ذخیره‌ای با غلظت µg/ml ۵۰ 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 µg/ml ۱۰ این محلول برای استفاده در تست‌های ضدباکتری تهیه گردید [٢٦].

۲-۹-۳- تهیه حلال کنترل منفی DMSO

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

۲-۹-٤- تهیه محیط‌های کشت میکروبی

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

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

در این تحقیق از محیط کشت مولر هینتون 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 ۱۲۱درجه سانتی‌گراد و فشار Ib/inch ۱۵ اتوکلاو و استریل گردید [۲۲].

۲-۹-۵- تهیه محلول نیم مک فارلند

استاندارد نیم مک فارلند با فرمول زیر:

0.5 ml BaCl2 0.048M(1.175 w/v $BaCl_2.H_2O$)+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 N ۰/۳۶ 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 هینتون 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 ۲٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. عملیات مذکور در مورد هر نمونه دو بار تکرار گردید، پس از آن میزان مناطق مهاری مورد ارزیابی قرار گرفت و بر اساس میلی‌متر محاسبه گردید [۲۹].

۲-۹-۷- روش دیسک کاغذی [1]

برای سنجش اثر ضد باکتریایی اسانس گیاه درمنه از روش انتشار دیسک کربی بائر Kirby Bauer استفاده شد. از کلنی ۲٤ ساعته هر کدام از باکتری‌های کشت شده مورد آزمایش در محیط کشت مولر هینتون آگار به کمک لوپ برداشته و در لوله آزمایش استریل حاوی ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل کاملاً مخلوط گردید؛ سپس سوسپانسیون یکنواختی از باکتری‌های مورد آزمایش مشابه کدورت لوله استاندارد ۰/۵مک فارلند تهیه شد. توسط سواپ بر روی محیط‌های مولر هینتون 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 ۲٤ ساعت در $^{\circ}C$ ۳۷ انکوبه گردید. دراین مطالعه از جنتامیسین (میکروگرم در میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت و از دی متیل سولفوکساید DMSOبه 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 دایلوشن[3] و حداقل غلظت کشندگی(MBC) [4]

ابتدا مقدار ۰/۲ گرم از اسانس مورد آزمایش را در دو سی‌سی (۰/۵ سی‌سی دی متیل سولفوکساید DMSO و ۱/۵ سی سی محیط مولر هینتون براث) حل نموده که رقت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از اسانس بدست می‌آید. سپس در لوله هرکدام حاوی یک سی‌سی محیط مولر هینتون براث رقت سازی لوله‌ای را انجام نموده که به ترتیب غلظت هر شیشه نصف غلظت شیشه قبلی گردید (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ٦/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵٦۲، ۰/۷۸۱، ۰/۳۹۰، ۰/۱۹۵). در این روش مقدار۲۰۰ مایکرولیتر از غلظت‌های (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ٦/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵٦۲، ۰/۷۸۱، ۰/۳۹۰، ۰/۱۹۵) میلی‌گرم در میلی‌لیتر از اسانس (تهیه شده در محیط کشت مولر هینتون براث) به خانه های یک پلیت ۹٦ خانه منتقل خواهد شد. سپس سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند تهیه شده را ده مرتبه رقیق ساخته تا از کدورت معادل 10^7 باکتری بدست آمده در هر میلی‌لیتر به میزان ۲۰ مایکرولیتر به هر یک از خانه‌ها اضافه گردید. به عنوان کنترل مثبت، در تعدادی از

1. Paper Disc Diffusion Assay

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

خانه‌های پلیت ۱۵۰ مایکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون آگار، ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری و ۵۰ مایکرولیتر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین اضافه شد. از خانه‌های حاوی ۲۰۰ مایکرولیتر از محیط کشت و باکتری به عنوان کنترل منفی استفاده خواهد شد. پلیت ۹٦ خانه به مدت ۲٤ ساعت در گرمخانه ۳۷ $^{\circ}C$ قرار داده خواهد شد. پس از این مدت به تمام خانه‌های هر پلیت۵۰ ماکرولیتر از معرف تری فنیل تترازولیوم 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 غلظت‌های 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 خانه‌هایی که رنگ قرمز در آن‌ها تشکیل نشده باشد، ۱۰ ماکرولیتر یا یک لوپ به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون 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 داده‌ها

آزمون‌ها 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 دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($P<$ ۰/۰۵) استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

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

تفکیک و شناسایی ترکیبات اسانس توسط روش‌های کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی انجام شد. شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با استفاده از شاخص‌های بازداری و بررسی طیف‌های جرمی ترکیبات و مقایسه آن‌ها با طیف‌های جرمی استاندارد موجود در کتابخانه‌های کامپیوتری و مراجع معتبر صورت گرفت (جدول ۱). اسانس درمنه *A. Turanica* 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* ۰/٤٦ درصد، *A.absinthinum* ۰/۹۲ درصد، *A.vulgaris* ۰/۹۲ درصد است [۳۲].

بررسی نتایج اسانس‌گیری 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 اسانس‌گیری از گونه‌های دیگر *A.diffusa* ۵/۳۳ درصد، *A.spicigera*٤٦/۰ درصد، *A.absinthinum* ۰/۹۲ درصد، *A.vulgaris* ۰/۹۲ درصد است [۳۲].

نتایج این پژوهش نشان داد که این گونه ۲٦ ترکیب در اسانس خود دارد که در مجموع ۹۱/۰۵ درصد کل اسانس را تشکیل می‌دهند. چهار ترکیب عمده در اسانس گیاه عبارتند از: کریرسانتنن (۲۱/۳۷ درصد)، ۱و۸-سینئول (۱۹/۲۰ درصد)، پیپریتنن (۱٦/٦۱درصد) و آلفا-پینن (۵/۵۲ درصد) است. همچنین منوترپن هیدروکربنه (۱۲/۱۱ درصد)، مونوترپن اکسیژنه (۷۷/۰۳ درصد)، سزکویی ترپن اکسیژنه (۱/۰۳ درصد) و ترکیبات غیر ترپنی (۰/۸۸ درصد) دارا می-باشد.

ترپن‌ها قادر هستند که به غشای سلولی صدمه بزنند و در ساختار لیپید دیواره سلولی باکتری‌ها نفوذ کنند که این امر منجر به دناتوراسیون پروتئین‌ها و از هم پاشیدن ساختار سلولی و تراوش سیتوپلاسم و در نهایت مرگ سلول می‌شود [۳۳].

اثر ضد میکروبی اسانس‌ها روغنی تنها ناشی از ترکیبات عمده آنها نمی‌باشد، ترکیباتی که مقادیر کمتری دارند نظیر-ترپینئول و ترپینن-٤-ال نیز می‌توانند در فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها سهیم باشند. ترپینن-٤-ال به عنوان یک سری از ترکیبات، دارای خاصیت ضدباکتری بر علیه چندین میکروارگانیسم هستند [۳٤]. آلفا-ترپینئول نیز به عنوان ضدباکتری 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 [۳٦]. کاظمی و همکاران (a ۲۰۱۱)، گزارش دادند کامفور (۱۸ درصد)، به عنوان اصلی‌ترین ترکیب در اسانس گل *Artemisia deserti* شناخته شده است.

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

۱و ۸-سینئول (۱۰/٤ درصد) و ترانس-توجن (۱۱/۸ درصد) نیز به عنوان سایر اجزای اصلی در اسانس این گل معرفی شدند. ۱و۸-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-توجون است [۸]. هاشمی و صفوی (۲۰۱۲)، ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه *Artemisia Housscknechtii* شناسایی کردند که کامفور (۲۹/۲٤ درصد) و ۱و۸-سینئول (۲۷/٦۲ درصد) به عنوان اجزاء اصلی شناسایی شد [۳۸].

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 ۰/۵۱± ٤۳/۰۹ 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

حذف می‌کنند و همچنین باعث رسوب عناصر اکسیدان مانند آهن می‌شوند [٤٠و٤١]. در مطالعه‌ای، میزان تام فنل اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی گلستانک البرز با ٩/٧±١٩٤/٩ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره گزارش شده است [٤٢]. در مطالعه‌ای دیگر، میزان فنل عصاره متانولی اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی مختلف آذربایجان شرقی، برابر با ١/٤ تا ٢/٣ میکروگرم بر صد میکروگرم عصاره گزارش شده است [٤٣].

٣-٣- 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. محتوی فلاوونوئید اسانس درمنه برابر با ٠/٠٢ ±١/١١ میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم اسانس بود. در مطالعه‌ای نشان داده شد که میزان تام فلاونووئید عصاره متانولی اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی گلستانک البرز، برابر با ٠/٦±١٢/٤ میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم عصاره گزارش شده است [٤٣]. در مطالعه خلجی و همکاران (٢٠١١) نیز میزان فلاوونوئید عصاره متانولی اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی مختلف آذربایجان شرقی، برابر با ٠/٤ تا ٢/١ میکرومولار کوئرسیتین بر صد میکروگرم عصاره گزارش شده است [٤٢]. در مطالعات دیگری نشان داده شده است که درمنه، دارای اثرات ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد اسپاسم، ضد التهاب و ضد مالاریا است [٤٤]. مطالعه‌ای که بر روی عصاره آبی *آرتمیزیا ولگاریس* (*Artemisisa vulgaris*) در مصر انجام شد، نشان داد که میزان IC_{50}، برابر با ١٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. میزان فنل عصاره آبی *آرتمیزیا ولگاریس* برابر با ٠/٧٦±٧/٩٦ ، معادل میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره است و میزان فلاوونوئید آن برابر با ٠/٠±٣/٤ معادل میلی‌گرم روتین بر گرم عصاره است [٤٥]. مطالعه دیگر که بر روی عصاره اتانولی بذر *آرتمیزیا* (*Artemisisa pallens*) در نیجریه انجام شد، نشان داد که میزان IC_{50}، برابر ١/٥±١٥٠/٣٣ میکروگرم بر میلی‌لیتر است [٤٦].

٣-٤- ارزیابی ٢ و ٢ دی‌فنیل-١-پیکریل هیدرازیل (DPPH)

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 ٥٠ درصد مهار اکسیداسیون شود. هر چه اثر ضد اکسایش اسانس بیشتر باشد میزان IC_{50} کمتر می‌باشد زیرا اکسیداسیون را با غلظت کمتری مهار می-نماید [٤٧]. برای محاسبه IC_{50} از برنامه نرم افزاری آنلاین bipdatafit استفاه شد. در مطالعه حاضر، میزان IC_{50} اسانس گیاه درمنه و BHT به ترتیب برابر با: ٤/٤ و ٠/٣ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در یک مطالعه، میزان IC_{50} اسانس متانولی اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی مختلف آذربایجان شرقی، برابر با ٢٩/٧٤ تا ٦٤/١٨ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شده است [٤٢]. در یک مطالعه، میزان درصد مهار رادیکال آزاد حاصل از ٢ و ٢ دی فنیل-١-پیکریل هیدرازیل توسط عصاره متانولی اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی شهر بابک کرمان، برابر با ١/٧ ±٧١/٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر 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 ١/٩ ± ٤٨/١ بود [٣٧]. 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.

٣-٥- 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 می-گردد 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 [٤٨].

معادله مربوط به منحنی استاندارد محلول آمونیوم فروس سولفات به صورت Y= 0.502X- 0.008, (R^2=0.988) است. میزان توانایی احیاکنندگی اسانس درمنه و BHT به ترتیب برابر است با ٠/٢٣ ±٣٣/٠٢ و ٣٢/٢٨ میکرومول بر لیتر به دست آمد. گزارشات نشان داد که در گیاهانی مانند شاه توت، تمشک و توت فرنگی بین محتوای

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، فلاوونوئیدهای 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- تعیین خاصیت ضد میکروبی اسانس درمنه

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<۰/۰۵). 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>۰/۰۵).

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			
DMSO	Gentamicin	Essential oil	DMSO	Gentamicin	Essential oil	Microorganisms
0^{b}	33^{a}	31^{a}	0^{b}	34^{a}	33^{a}	*Staphylococcus aureus*
0^{b}	31^{a}	29^{a}	0^{b}	32^{a}	30^{a}	*Listeria monocytogenes*
0^{c}	30^{a}	11^{b}	0^{c}	30^{a}	14^{b}	*Escherichia coli*
0^{c}	30^{a}	8^{b}	0^{c}	30^{a}	11^{b}	*Salmonella*

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 موریوم* 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<۰/۰۵). 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>۰/۰۵). بر اساس نظر Recio و همکاران (۲۰۰۵)، اسانس‌ها به واسطه دارا بودن ترکیبات شیمیایی، فعالیت ضدمیکروبی متفاوتی را نشان می‌دهند [۵۲]. بنابراین اثر ضد میکروبی اسانس درمنه به هریک از اجزای اصلی اسانس یا هر یک از اجزای فرعی یا سینرژیسم 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<۰/۰۵). 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 (*اشریشیاکلی و سالمونلاتیفی موریوم*) اثر داشته که می‌توان این اختلاف را به مقاومت دیواره باکتری‌های گرم منفی نسبت به نفوذ مواد خارجی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت دانست.

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]	*Staphylococcus aureus*
50 [b]	3.125 [b]	*Listeria monocytogenes*
100 [a]	6.25 [a]	*Escherichia coli*
100 [a]	6.25 [a]	*Salmonella*

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

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، اختلاف معنی‌داری در باکتری‌های مورد بررسی مشاهده شد (P<۰/۰۵). در روش میکروبراث دایلوشن، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت پایین ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر کشندگی (MBC) بهتری نسبت به سایر باکتری‌های مورد آزمایش نشان داد. در مورد باکتری‌های گرم منفی، اثر کشندگی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

بر اساس نتایج این تحقیق باکتری‌های گرم مثبت دارای حساسیت بیشتری در برابر اسانس گیاه مورد نظر می باشند که این نتیجه با نتایج تحقیقات پیشین در مورد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی یکسان است [۲۵و ۵۳]. علت حساس‌تر 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 موکوپپتید بوده، در حالیکه باکتری‌های گرم منفی فقط لایه‌ی نازکی از موکوپپتید دارند و قسمت اعظم ساختمان دیواره در آنها لیپوپروتئین و لیپوپلی‌ساکارید است. در حقیقت باکتری-های گرم منفی یک غشاء خارجی در اطراف دیواره سلولی خود دارند که به همین دلیل آنها را در برابر مواد ضد باکتریایی مقاوم‌تر می‌سازد [٥٤]. 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].

سیلکتاز 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 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 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، حساس‌ترین میکروارگانیسم‌ها نسبت به اسانس بودند [٥٦]. 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 آگالاکتیه*، *آنتروکوکوس فکالیس* 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، ۱و ۸- سینئول و توجن در ترکیبات اسانس این گیاه از غلظت بالایی برخوردارند [۵۷]. در یک مطالعه دیگر، فعالیت ضدمیکروبی و ضداکسیدانی اسانس اندام‌های هوایی گونه *A.kermanensis* در مقابل ۸ باکتری *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتلیس*، *سیتروباکتر*، *آنتروباکتر*، *اشرشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و ۲ گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* و *کاندیدا آلبیکنس* مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد *باسیلوس سوبتیلیس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس*

اورئوس با MIC ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، حساس‌ترین میکروارگانیسم‌ها نسبت به اسانس بوده و اسانس *A.kermanesis* 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 ۷/٦ درصد، از مهم‌ترین ترکیبات در این گیاه می-باشند [٥٦].

Baykan و همکاران (۲۰۱۲)، در مطالعه خود با بررسی اثر ضدمیکروبی و ضداکسیدانی اسانس و عصاره متانولی چندین گونه *آرتمیزیا* شامل: *آرتمیزیا ابسینتیوم*، *آرتمیزیا آربوسنس*، *آرتمیزیا کمپستریس*، *آرتمیزیا اسکوپاریا*، *آرتمیزیا سنتونیکوم* و *آرتمیزیا ولگاریس* بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، حساس‌ترین باکتری نسبت به اسانس تمامی گونه-های *آرتمیزیا* می‌باشد. *آرتمیزیا سنتونیکوم* و *آرتمیزیا اسکوپاریاز*، بیشترین فعالیت ضدمیکروبی را علیه قارچ *کاندیدا آلبیکنس* از خود نشان دادند، بیشترین اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی نیز مربوط به *آرتمیزیا ولگاریس*، *آرتمیزیا آربورسنس* و *آرتمیزیا سنتونیکوم*، بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و بیشترین اثر ضدباکتریایی *آرتمیزیا ابسینتیوم* 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 مونوسیتوژنز* و باکتری‌های گرم اثر ضد باکتریایی دارد. نتایج به دست آمده از روش‌های چاهک، دیسک و میکروبراث دایلوشن 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 ضدباکتریایی بالقوه‌ای نسبت به سایر گونه‌ها می-باشد.

٤- نتیجه‌گیری

این مطالعه جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی، اندازه‌گیری قدرت ضد اکسایشی و آنتی‌میکروبی اسانس *A. Turanica*انجام شد. در آنالیز اسانس مجموعاً ٢٦ ترکیب شناسایی شد که عمده‌ترین ترکیبات آن مربوط به ترکیبات مونوترپن اکسیژنه بوده و چهار ترکیب، عمده‌ترین ترکیبات اسانس را تشکیل دادند که عبارت بودند از کریرسانتنن (۲۱/۳۷ درصد)، ۱و۸-سینئول (۱۹/۲۰ درصد)، پیپریتنن (۱٦/٦۱درصد) و آلفا-پینن (۵/۵۲ درصد) است، که ٦۲/۷ 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 پتاسیل ضد اکسایشی و ضدمیکروبی 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:

[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 antimicroboial 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 method on the phenolic contents and biological activit

[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 andflavonoids 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] Teixeira da Silva, J.A. 2004. Mining 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] Laciar, 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.

[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 Diagonostic 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 Achilleatalagonica 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 cuminumcyminum 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*. 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 lamiaceace 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 leaves (Artemisia sieberi), and Camellia L. plant extract as phytogenic 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.

[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] Celiktas, 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 activitiea 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 ofArtemisia 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.) genotyps 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

Sardarodiyan, 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 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 IC_{50} 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 ASddress: : sardarodiyan_5@yahoo.com