

(مقاله پژوهشی)

بررسی ترکیبات شیمیایی، خصوصیات ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی اسانس درمنه *Artemisia Khorasanica* در منطقه خراسان شمالی

مریم سردرودیان^۱، اکرم آریان فر^۱

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۰۶

چکیده

به دلیل عوارض ناخواسته آنتی اکسیدان‌ها و آنتی میکروب‌های مصنوعی، این پژوهش فعالیت آنتی اکسیدانی و برخی خواص آنتی باکتریایی اسانس اندام هوایی گیاه درمنه با نام علمی *Artemisia Khorasanica* را مورد بررسی قرار می‌دهد. در این مطالعه، فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس با آزمون‌های مهار رادیکال آزاد به کمک روش (DPPH)، و آزمون گیرندگی آهن (FRAP) بررسی و با آنتی اکسیدان سنتزی بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) مقایسه شد. اندازه‌گیری محتوای فنل کل اسانس با استفاده از معرف فولین سیو-کالچيو و اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل اسانس بر اساس روش کلریمتری آلومینیوم کلراید انجام شد. در این پژوهش، اثر ضد میکروبی اسانس گونه مورد نظر بر علیه ۴ باکتری با استفاده از روش چاهک، دیسک دیفیوژن و برات میکرودیلوژن انجام شد. نتایج نشان داد که اسانس درمنه ۲۶ ترکیب در اسانس خود دارد که در مجموع ۹۷/۳۵ درصد کل اسانس را تشکیل می‌دهند که از بین آنها ۴ ترکیب بیش از ۷۰/۵۱ درصد اسانس را تشکیل می‌داد که به ترتیب سیس-وربونل (۲۶/۷۴ درصد)، ۸۱-سینئول (۲۰/۰۵ درصد)، کامفور (۱۵/۰۶ درصد) و کریسانتینل استات (۸/۵۶ درصد) است. میزان کل ترکیبات فنلی معادل ۱۰۶/۲۷ میلی گرم گالیک اسید بر گرم اسانس و همچنین میزان فلاونوئید موجود در اسانس ۱/۵۶ میلی گرم کوئرستین بر گرم اسانس بود. در آزمون DPPH، میزان IC_{50} برای اسانس و BHT به ترتیب برابر با: ۴/۹ و ۰/۳ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. همچنین توانایی احیاکنندگی اسانس و BHT، به ترتیب برابر با: ۳۶/۷۷ و ۳۲/۲۸ میکرومول بر لیتر گزارش گردید. نتایج آزمایشات ضدباکتریایی نشان داد که حساسیت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به اسانس بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود. حداقل غلظت مهارکننده‌ی رشد اسانس درمنه بر روی استافیلوکوکوس اورئوس ۰/۷۸۱ میلی گرم بر میلی لیتر و حداقل غلظت کشنده‌ی آن‌ها ۶/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. اسانس درمنه منبع قابل ملاحظه‌ای از ترکیبات آنتی باکتریال و آنتی اکسیدانی است و احتمالاً می‌توان از آن در فرآورده‌های غذایی، دارویی و صنعتی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آنتی اکسیدان، اسانس، درمنه، سیس-وربونل، کامفور، ۸۱ سینئول

۱- مقدمه

سزکوئی ترینها هستند. بیشتر این ترکیبات در ساختار خود دارای گروه‌های فنولیک می‌باشند؛ زیرا این ترکیبات و به واسطه خاصیت ضد اکسایشی و ضد میکروبی ذاتی، نقش مهمی در سیستم‌های دفاعی گیاهان در برابر بیماری‌های میکروبی ایفا می‌کنند (۲۰). متابولیت‌های ثانویه بافت‌های گیاهی که به صورت پیش‌سازهای غیرفعال ذخیره شده‌اند شامل ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، فلاونولها، گلیکوزیدها، پلی‌استیلن‌ها و آلکالوئیدها بوده که به علت خاصیت مهارکنندگی و کشندگی مورد توجه قرار گرفته‌اند. مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها اغلب باعث مقاومت باکتری‌ها به این داروها و ایجاد عوارض جانبی در بدن انسان می‌شوند. به همین منظور استفاده از گیاهان دارویی می‌تواند موثر باشد (۸). 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 (۴۱). گیاه درمنه (*Artemisia*) از خانواده *Asteraceae* *compositae* دارای ۳۴ گونه در ایران می‌باشد (۲۵). 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، افسنتین، یوشان، برنجاسف، قیصوم و ترخون نام برده شده است و این نام‌ها امروزه نیز در اکثر مناطق متداول است (۴). بیشتر گونه‌های درمنه بو و مزه مشخصی داشته که ناشی از ترکیبات مونوتیرن و سزکوئی‌ترین‌های موجود در آنها است. از این ترکیبات می‌توان به آرتمیزینین، کومارین، کامفور، بورنیل استات و ۱ و ۸- سینئول اشاره نمود (۵۴). سینئول بعد از آلفاپینن فراوان‌ترین جزء تشکیل دهنده درمنه در ترکیبات اسانس‌ها بوده و به طور گسترده در تهیه مواد دارویی کاربرد دارد (۲۴). درمنه در طب قدیم کاربرد دارویی داشته و به عنوان مقوی، اشتها آور، محرک،

مطالعات اپیدمیولوژیکی حاکی از آن است که ترکیبات طبیعی و آنتی‌اکسیدان در میوه‌ها و سبزیجات در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها موثر است. بنابراین روند رو به رشد اهمیت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی گیاهان دارویی در جلوگیری یا کاهش آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از عملکرد رادیکال‌های آزاد و عوارض جانبی داروهای شیمیایی در بدن موثر است هستند. استرس‌های اکسیداتیو با بروز بسیاری از بیماری‌های مزمن نظیر سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی، ایدز، آرتریت، سندرم داون و ناهماهنگی‌های حرکتی مرتبط می‌باشند (۲۶). از مهمترین منابع آنتی‌اکسیدانی موجود در رژیم غذایی طبیعی، می‌توان به توکوفرول‌ها، گلوکاتایون‌ها، اسید آسکوربیک، نمک‌های آسکوربات، کاروتنوئیدهای و ترکیبات فنلی اشاره کرد. از بین ترکیبات آنتی‌اکسیدان گیاهی، ترکیبات فنلی توزیع گسترده‌ای در بسیاری گیاهان دارند. ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی عمدتاً ناشی از قدرت احیاءکنندگی و ساختار شیمیایی آنهاست که آنها را قادر به خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی و خاموش کردن مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه گانه می‌سازد. ترکیبات فنلی از طریق اهدای الکترون به رادیکال‌های آزاد، واکنش‌های اکسیداسیون چربی را مهار می‌کنند (۵۲). اسانس‌ها ترکیب‌های معطری هستند که از اندام‌های مختلف گیاهان مانند دانه، ریشه، جوانه، پوست، شاخه، غنچه و گل تهیه می‌شوند (۱۴). اسانس‌ها مخلوط پیچیده‌ای از ترکیب‌های با غلظت‌های متفاوت باشند (۴۷). معمولاً اسانس‌ها برای درمان مشکلات سلامتی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴۰). اسانس بسیاری از گیاهان باعث رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شود و بدین لحاظ گیاهان دارویی به عنوان عوامل ضد میکروبی، کاربردهای زیادی دارند. مواد تشکیل دهنده اسانس از نظر شیمیایی شامل فنیل پروپانوئید و

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 (۵۸ و ۱۷). خان احمدی و همکاران (۲۰۰۹) ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدباکتریایی اسانس حاصل از *A.houssckenechti* را ارزیابی نمودند که کامفور از مهمترین ترکیبات شیمیایی شده در این گیاه می‌باشد (۳۷). شناسایی ترکیبات شیمیایی و خواص ضدباکتریایی اسانس دیگر گونه‌های درمنه نیز توسط محققین صورت گرفته است (۵۱ و ۵۵). هدف از این پژوهش، معرفی گیاه درمنه *Artemisia Khorasanica* به عنوان گیاه دارویی که در استان خراسان شمالی پراکنش دارد، بررسی میزان اسانس و شناسایی مواد تشکیل دهنده اسانس گونه مذکور می‌باشد. همچنین بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی احتمالی گیاه مورد مطالعه، که می‌تواند به عنوان جایگزین آنتی‌اکسیدان‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک معرفی شود، می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع آوری، شناسایی، نگهداری و آسیاب نمونه‌های گیاهی

بعد از جمع آوری گیاه *Artemisia Khorasanica* از رویشگاه اصلی و تایید هویت در هرباریوم مرکز تحقیقات سلامت فرآورده های طبیعی، بلافاصله پس از جمع آوری، اندام‌های هوایی گیاه جدا، قطعه قطعه شد و بر روی پارچه‌ی توری در دمای اتاق و به دور از تابش مستقیم نور خورشید، خشک و آسیاب گردید.

۲-۲- اسانس گیری اندام هوایی گیاه با کلونجر

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

ضد عفونی کننده، گشادکننده رگ‌ها و درمان دردهای روماتیسمی به کار می‌روند (۲۲). گونه‌های درمنه از گذشته به عنوان منبع روغن‌های اسانسی شناخته شده‌اند و دارای فعالیت ضد میکروبی طبیعی بر روی تعداد زیادی از باکتری‌ها هستند. مکانیسم عملکردی اسانس‌ها در ارتباط با ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی آنها بوده، ولی در تمامی موارد از مکانیسم مشابه‌ای برخوردار نیستند. ویژگی آب‌گریزی اسانس‌ها سبب نفوذ آنها در لیپید غشاء سلولی و افزایش نفوذ پذیری 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 (۵۹). درمنه دارای ماده‌ای به نام ساتونین است که تا مدت‌ها معروف‌ترین داروی ضد کرم دستگاه گوارش محسوب می‌شده است (۶۹). برای انواع درمنه علاوه بر فعالیت ضد کرمی، فعالیت بیولوژیک فراوانی از جمله میکروب‌کشی، ضد قارچی، ویروس‌کشی، ضد انگلی و همچنین خواص آنتی‌اکسیدانی و بازکنندگی و اتساع عروق به اثبات رسیده است (۲۷). گونه‌های مختلف درمنه در طب سنتی اروپا جهت رفع سودا و جلوگیری از خونریزی بکار می‌رفته‌اند (۶۹). در مطالعه‌ای بر روی گونه *Artemisia annua L.* نقش مواد موثره موجود در عصاره سرشاخه‌های هوایی این گیاه (آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و فنل‌ها) در تنظیم رشد گیاهان، مقابله با تومور و بیماری‌های باکتریایی در انسان و گیاه به اثبات رسیده است (۳۰). 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 (۷۴). تعداد زیادی از گونه‌های *Artemisia* در کشور چین به عنوان دارو، غذا (گیاهان وحشی خوراکی)، علوفه، گیاهان معطر، گیاهان شهددار و گیاهان تولید کننده اسانس مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۱). در مطالعات گذشته خواص ضدباکتریایی بعضی از گونه‌های درمنه

اسید گالیک با غلظت‌های (۰، ۳۰، ۷۰، ۱۱۰، ۱۵۰، ۱۹۰ و ۲۲۰ میلی گرم در لیتر در متانول ۸۰ درصد) به صورت میلی گرم گالیک اسید بر گرم گیاه خشک شده بیان گردید. آزمون فولین، با سه تکرار انجام شد (۲۸).

۲-۴- تعیین میزان فلاونوئید

محتوای فلاونوئید بر اساس روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید انجام شد (۱۸). طبق این روش ۱/۵ میلی لیتر متانول و ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد با ۰/۵ میلی لیتر از اسانس و ۰/۱ میلی لیتر پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیتر 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 کوئرستین ۱۰۰-۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر در متانول جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد و محتوای فلاونوئید به صورت اکی والان‌های کوئرستین بر گرم اسانس بیان شد.

۲-۵- میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH^۱

برای انجام این تست، ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس گیاه *Artemisia Khorasanica* به ۵ میلی لیتر محلول ۰/۰۰۴ 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 قرائت شد. درصد بازدارندگی رادیکال‌های آزاد از طریق زیر محاسبه می‌گردد (۶۵).

$$\%AI = \frac{(A_{control} - A_{sample})}{A_{control}} \times 100 \quad (1)$$

در این معادله:

AI: درصد مهار رادیکال آزاد

A_{Control}: جذب محلول شاهد در ۵۱۷ نانومتر

A_{Sample}: جذب محلول نمونه در ۵۱۷ نانومتر

از آب جدا کرده و جهت آبگیری از سولفات سدیم ایندر استفاده شد. اسانس آبگیری شده در ظرف تیره در بسته جمع آوری شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۳).

۲-۳- دستگاه شناسایی ترکیبات موجود در اسانس

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 ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این مدت ۵ دقیقه و دمای دستگاه ۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه افزایش یافت تا رسیدن به دمای ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد 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 طیف سنج جرمی با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد. شناسایی طیف‌های حاصل با رسم کروماتوگرام یک سری از پارافین‌های نرمال (C₅-C₃₀) تحت شرایط یکسان با تزریق اسانس‌ها انجام شد و با توجه به زمان بازداری این ترکیب‌ها اندیس کوارتز برای هر جزء موجود در کروماتوگرام اسانس محاسبه شد. این مقادیر با مقادیر اندیس کوارتز موجود در جداول استاندارد مقایسه شد و ترکیب‌های موجود در اسانس در منته بر اساس این داده‌ها و اطلاعات موجود در کتابخانه GC-MS شناسایی شد.

۲-۳- اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل

مقدار کل ترکیبات فنولی در اسانس‌ها بر اساس روش فولین سیوکالچيو مورد بررسی قرار گرفت (۴۶). مقدار کل ترکیبات فنولیک از معادله خط رسم شده بر مبنای

۲-۶- قدرت احیاءکنندگی آهن اسانس

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بر اساس توانایی احیاءکنندگی آهن^۱ (FRAP) انجام شد (۱۱). به منظور سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها، به ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس به دست آمده، ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP اضافه شد. سپس جذب محلول‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر نسبت به شاهد (شامل ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر همراه با ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP)، اندازه‌گیری گردید. با قراردادن مقدار جذب نمونه‌ها در معادله مربوط به منحنی استاندارد کاتیون آهن دو ظرفیتی، توانایی احیاءکنندگی اسانس محاسبه شد. داده‌ها بر اساس معادل میلی‌مول یون آهن دو ظرفیتی تولید شده بر گرم وزن گیاه بیان گردید.

۲-۷- بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس

برای بررسی اثر ضد میکروبی اسانس گیاه *Artemisia Khorasanica* به سه روش چاهک، دیسک و میکرو برات دیلوژن در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس^۲ (PTCC۱۴۳۱)، لیستریا مونوسیژنوز^۳ (PTCC۱۲۹۸)، اشرشیاکلی^۴ (PTCC۱۳۹۹) و سالمونلاتیفی موریوم^۵ (PTCC۱۷۰۹) بررسی شد.

۲-۷-۱- 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 ضد باکتری تهیه گردید (۷۶).

۲-۷-۲- 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.

۲-۷-۳- تهیه محیط‌های کشت میکروبی

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 ۱۲۱°C و فشار ۱۵ Ib/inch اتوکلاو و استریل گردید (۹).

۲-۷-۴- تهیه محلول نیم مک فارلند

استاندارد نیم مک فارلند با فرمول زیر:

0.5 ml BaCl₂ 0.048M (1.175 w/v
BaCl₂.H₂O) +99.5 ml H₂SO₄ 0.36N
کدورتی ایجاد می‌کند که ناشی از تعداد ۱۰^۸ کلونی میکروارگانیزم 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 (۱۳).

۲-۷-۵- تهیه کشت میکروبی

برای تهیه کشت میکروبی، آمپول‌های لیوفلیزه حاوی میکروارگانیزم‌های مورد نظر را شکسته و با پیت پاستور استریل، ۰/۵ میلی‌لیتر از نرمال سالین استریل روی محتویات داخل آمپول ریخته شد. بدین ترتیب سوسپانسیون میکروبی حاصل گردید. سوسپانسیون میکروبی توسط لوپ استریل مخلوط گشته و مقداری از آن برای تهیه کشت مادر روی محیط مولر هینتون آگار

1- Ferric Reducing – Antioxidant Power

2- Staphylococcus Aureus

3- Monocytogenes Listeria

4- Escherichia Coli

5- Salmonella Typhimurium

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 ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در این مطالعه از جنتامیسین (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 باکتری‌های مورد نظر به اسانس تعیین شد (۱۹).

۲-۷-۸- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) به روش میکروبراث دایلوژن^۳ و حداقل غلظت کشندگی (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 هینتون براث) حل نموده که رقت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس بدست می‌آید. سپس در لوله هر کدام 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، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶۲، ۰/۷۸۱، ۰/۳۹۰، ۰/۱۹۵). در این روش مقدار ۲۰۰ مایکرولیتر از غلظت‌های (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۰/۷۸۱، ۰/۳۹۰، ۰/۱۹۵) میلی‌گرم در میلی‌لیتر از اسانس (تهیه شده در محیط کشت مولر هینتون براث) به خانه‌های یک پلیت ۹۶ خانه منتقل خواهد شد. سپس سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند تهیه شده را ده مرتبه رقیق ساخته تا از کدورت معادل ۱۰^۷ باکتری بدست آمده در هر میلی‌لیتر به میزان ۲۰ مایکرولیتر به هر یک از خانه‌ها اضافه گردید. به عنوان کنترل مثبت، در تعدادی از خانه‌های پلیت ۱۵۰

کشت شد. سپس محیط کشت حاصل به مدت ۲۴ ساعت برای رشد باکتری و ۴۸ ساعت برای رشد قارچ به ترتیب در گرمخانه ۳۷ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از این مدت از محیط کشت مادر کشت دیگری روی آگار تهیه شد، کشت مادر در یخچال نگهداری گردید و هر دو ماه یکبار تکرار شد (۵).

۲-۷-۶- 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 میکروارگانسیم 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 لانداز اسانس به طور جداگانه قرار داده شد سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. عملیات مذکور در مورد هر نمونه دو بار تکرار گردید، پس از آن میزان مناطق مهارتی مورد ارزیابی قرار گرفت و بر اساس میلی‌متر محاسبه گردید (۶۰).

۲-۷-۷- روش دیسک کاغذی^۱

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 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 ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. توسط سوآپ 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

2- Minimum Inhibitory Concentration

3- Microbroth Dilution

4- Minimum Bactericidal Concentration

1- Paper Disc Diffusion Assay

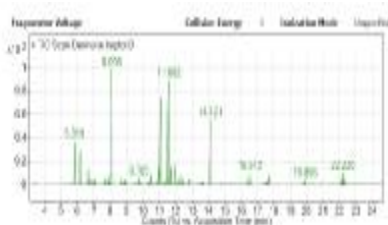
۳- نتایج و بحث

۳-۱- جداسازی و خالص سازی اسانس *Artemisia Khorasanica*

تفکیک و شناسایی ترکیبات اسانس توسط روش‌های کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی انجام شد (شکل ۱). 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). بازده متوسط تولید اسانس گیاه *Artemisia Khorasanica* در سه بار تکرار تقریباً 0.1 ± 0.2 درصد بود. اسانس رنگ زرد کهربایی و بویی کاملاً مشخص داشت. و بر اساس تحقیقات قبلی بازده اسانس‌گیری از گونه‌های دیگر *A. diffusa* ۵/۳۳ درصد، *A. spicigera* ۰/۴۶ درصد، *A. absinthinum* ۰/۹۲ درصد، *A. vulgaris* ۰/۹۲ درصد است (۱). نتایج این پژوهش نشان داد که این گونه ۲۶ ترکیب در اسانس خود دارد که در مجموع ۹۷/۳۵ درصد کل اسانس را تشکیل می‌دهند چهار ترکیب عمده در اسانس گیاه عبارتند از سیس-وربونل (۲۶/۷۴ درصد)، α -سینئول (۲۰/۰۵ درصد)، کامفور (۱۵/۰۶ درصد) و کریسانتینل استات (۸/۵۶ درصد) است. همچنین منوترین هیدروکربن (۱۱/۳۲ درصد)، مونوترین اکسیژنه (۷۳/۷۳ درصد)، سزکویی‌ترین اکسیژنه (۲/۰۲ درصد) و ترکیبات غیرترینی (۱۰/۲۸ درصد) دارا می‌باشد.

شکل ۱- نمودار کروماتوگراف حاصل از

GC-MSS گیاه *Artemisia Khorasanica*



مایکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون آگار، ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری و ۵۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین اضافه شد. از خانه‌های 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 خانه‌های هر پلیت ۵۰ میکرولیتر از معرف تری فیل 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 میکرولیتر 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 (۲۱).

۲-۸- 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 $(P < 0.05)$ استفاده شد.

جدول ۱- درصد وزنی و اندیس کوارتز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس گیاه *Artemisia Khorasanica*

ردیف	ترکیب شناسایی شده	درصد در اسانس	اندریس بازداری کوارتز
۱	Alpha-Pinene	۳/۶۸	۹۴۰
۲	Camphene	۳	۹۶۲
۳	Sabinene	۱/۸۶	۹۷۵
۴	Phellandrene	۱/۳۲	۹۸۴
۵	Myrcene	۰/۲۹	۹۹۱
۶	alpha-Terpinene	۰/۵۳	۱۰۱۷
۷	1,8-cineole	۲۰/۰۵	۱۰۳۰
۸	Cis-beta-terpineol	۰/۳۵	۱۰۵۶
۹	.gamma-Terpinene	۰/۶۴	۱۰۹۱
۱۰	Trans-sabinene hydrate	۰/۸۹	۱۰۹۷
۱۱	chrysanthenone	۱/۲۲	۱۱۲۵
۱۲	Trans-pinocarveol	۲/۲۴	۱۱۳۸
۱۳	camphor	۱۵/۰۶	۱۱۴۴
۱۴	Terpinen-4-ol	۱/۹۲	۱۱۷۶
۱۵	Alpha-terpineol	۰/۹۸	۱۱۹۰
۱۶	myrtenol	۰/۵۷	۱۱۹۵
۱۷	verbenone	۰/۵۶	۱۲۰۷
۱۸	borneol	۲/۱۲	۱۲۳۵
۱۹	Cis-verbenol	۲۶/۷۴	۱۲۳۸
۲۰	Chrysanthenyl acetate	۸/۵۶	۱۲۹۴
۲۱	carvone	۰/۳۲	۱۳۲۸
۲۲	Terpinyl acetate	۰/۳۷	۱۳۳۰
۲۳	Alpha-naginatene	۰/۷۱	۱۳۷۵
۲۴	(E)-Jasmone	۱/۳۵	۱۳۹۵
۲۵	spathulenol	۰/۷۵	۱۵۷۸
۲۶	davanone	۱/۲۷	۱۶۴۸
	درصد کل ترکیبات	۹۷/۳۵	
	مونوترپن هیدروکربنه	۱۱/۳۲	
	مونوترپن اکسیژنه	۷۳/۷۳	
	سزکویی ترین هیدروکربنه	-	
	سزکویی ترین اکسیژنه	۲/۰۲	
	غیر ترپینی	۱۰/۲۸	

نام‌های *A. spicigera* C. Koch, *A. absinthium* L.، *A. scoparia* Waldst. and Kit, *A. annua* L.، بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد، بالاترین مقدار اسانس از گونه *A. absinthium* (۹۲ درصد) پائین‌ترین میزان از گونه *A. spicigera* (۴۶ درصد) به دست آمد. در گونه *A. annua*، آرتمیسیا کتون (*Artemisia ketone*) (۱۴/۳ درصد)، در گونه *A. scoparia* کاپیلن (*Capillene*) (۴۸/۵ درصد) در گونه *A. spicigera*، کامفور (*Camphor*) (۴۰ درصد) و در گونه *A. absinthium* آلفا-فلاندرن (*α-phellandrene*) (۲۵/۵ درصد) بالاترین مقادیر را دارا می‌باشند (۲). مطالعه‌ای که در ایران توسط وردیان و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد، نشان داد که ۳۲ جزء در اسانس گونه *A. annua* وجود دارد و کامفور (۴۸ درصد)، او-۸-سینئول (۹/۳۱ درصد)، کامفن (۶/۹۸ درصد) و اسپاتولنول (۴/۸۹ درصد) به عنوان اجزاء اصلی شناسایی شد (۷۱)

۳-۲- تعیین خاصیت ضد میکروبی اسانس درمنه

۳-۲-۱- روش چاهک

با توجه به شکل 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 معنی‌داری وجود ندارد ($P > 0.05$).

هادیان و همکاران (۲۰۰۷)، نشان دادند اسانس *Artemisia khorasanica* در مرحله گلدهی به طور عمده سزکویی‌ترین اکسیژنه وجود دارد. در این گونه داونون (۳۶/۴ درصد)، پاراسیمین (۱۶/۴ درصد)، سیترا (۸ درصد)، بتا آسکاریدول (۵/۹ درصد) و تیمول (۳/۷ درصد) به عنوان اجزاء اصلی شناسایی شدند (۲۹). کاظمی و همکاران (۲۰۱۱a)، گزارش دادند کامفور (۱۸ درصد)، به عنوان اصلی‌ترین ترکیب در اسانس گل *Artemisia deserti* شناخته شده است. او-۸-سینئول (۱۰/۴ درصد) و ترانس توجن (۱۱/۸ درصد) نیز به عنوان سایر اجزای اصلی در اسانس این گل معرفی شدند (۳۳). نعمت‌الهی و همکاران (۲۰۰۶)، گزارش کردند اسانس افسنتین *Artemisia Absinthium* از اسکاتلند درصد مونوترپن‌های اکسیژنه ۲۵ درصد، مونوترپن‌های هیدروکربنه ۶۵ درصد، سزکویی‌ترین هیدروکربنه ۴ درصد، سزکویی‌ترین اکسیژنه ۶ درصد بودند (۴۸). در تحقیقی دیگر از اسانس *A. sieberi* بیش از ۱۶۰ ترکیب شناخته شد که ۱۵ درصد مونوترپن هیدروکربنه، ۷۸ درصد مونوترپن اکسیژن‌دار، ۴ درصد سزکویی‌ترین اکسیژن دار و ۱ درصد سزکویی‌ترین هیدروکربنی بوده است (۴۹). روستائیان و همکاران (۲۰۰۰)، با بررسی مقایسه اسانس گیاه آرتمیسیا دزرتی و آرتمیسیا اولیورینا در ایران با استفاده از آنالیز ترکیبات شیمیایی با روش GC-MS نشان دادند اسانس گیاه آرتمیسیا دزرتی (جمع‌آوری شده از مناطق شمال ایران مازندران و فیروزکوه) دارای کامفور (۴۵/۵ درصد)، او-۸-سینئول (۱۶/۷ درصد)، پی‌پریتون (۸/۶ درصد)، بتاپین (۵/۷ درصد) و ایزوبورنئول (۳/۲ درصد) بوده است و اسانس گیاه آرتمیسیا اولیورینا (جمع‌آوری شده از مناطق اطراف اصفهان (دلیجان)) دارای آلفا-توجن (۶۵ درصد)، کامفور (۱۱/۵ درصد)، او-۸-سینئول (۹/۲ درصد) و پینوکاون (۸/۸ درصد) می‌باشد که دارای اثرات ضدباکتریایی است (۵۸). جلیلی و ربیعی (۱۳۸۲)، بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس ۴ گونه درمنه (شمال ایران) به

درصد) و ترانس- توجن (۱۱/۸ درصد) نیز به عنوان سایر اجزای اصلی در اسانس این گل معرفی شدند. او-۸-سینئول و کامفور از مهم‌ترین ترکیبات ضد میکروبی جدا شده از گونه‌های گیاهی مختلف هستند که می‌توانند بالقوه ضد میکروب باشند (۳۳). بنابراین، به نظر می‌رسد در تحقیق حاضر این ترکیبات، علت اصلی تاثیر ضد باکتریایی اسانس گیاه درمنه *Artemisia Khorasanica* بوده‌اند. رسولی و همکاران (۲۰۰۸)، گزارش کردند که مقدار اسانس لازم برای ایجاد هاله عدم رشد یا تاثیر مهارکنندگی و یا اثر کشندگی بر میکروارگانیسم‌ها متفاوت می‌باشد. آن‌ها این تفاوت را نشان دهنده اثر بخشی متفاوت ترکیبات مختلف شیمیایی اسانس‌ها بر میکروارگانیسم‌ها دانستند (۵۷). 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 (۴۲). محققین مختلفی اثرات متفاوت را برای اجزای درمنه ترکی گزارش نمودند. به عنوان مثال ژرانیل دارای اثر ضد باکتریایی به ویژه در مقابل سالمونلاتیفی موریوم^۱ و اثر ضدقارچی می‌باشد (۳۶). مسادا و همکاران (۲۰۱۵)، نشان دادند که اسانس *Artemisia. L.* Absinthium دارای اثرات ضد باکتریایی بالایی است (۴۳). سیلکتاز و همکاران (۲۰۰۷)، اعلام کردند اسانس‌ها اثر ضد باکتریایی 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 (۱۶). بنابراین، در تحقیق حاضر می‌توان دلیل اصلی اثر ضد میکروبی اسانس *Artemisia Khorasanica* بر باکتری‌های مورد آزمون را به این عملکرد در اسانس نسبت

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 (۱۴ و ۶۳). 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 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 مقاوم‌تر می‌سازد (۶۴). 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 (۱۴). ترین‌ها قادر هستند که به غشای سلولی صدمه بزنند و در ساختار لیپید دیواره سلولی باکتری-ها نفوذ کنند که این امر منجر به دناتوراسیون پروتئین‌ها و از هم پاشیدن ساختار سلولی و تراوش سیتوپلاسم و در نهایت مرگ سلول می‌شود (۵۰). اثر ضد میکروبی اسانس‌ها روغنی تنها ناشی از ترکیبات عمده آنها نمی‌باشد، ترکیباتی که مقادیر کمتری دارند نظیر تریپنئول و تریپین-۴-ال نیز می‌توانند در فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها سهیم باشند. تریپین-۴-ال به عنوان یک سری از ترکیبات، دارای خاصیت ضد باکتری بر علیه چندین میکروارگانیسم هستند (۱۰). آلفا-تریپنئول نیز به عنوان ضد باکتری گزارش شده است (۱۵). در حقیقت این امکان نیز وجود دارد که ترکیباتی با درصد کمتر احتمالاً دارای اثر سینرژیستی با دیگر ترکیبات موثر و فعال باشند (۴۵). خواص آنتی-باکتریال گونه‌های جنس درمنه بیشتر مربوط به ماده موثره ۱، ۸-سینئول و آلفا-توجون است (۴). او-۸-سینئول (۱۰/۴)

ضدمیکروبی آن از آنتی‌بیوتیک‌های مانند نالیدیکسیک اسید، جنتامایسین، سفالوتین، آموکسی سیلین و کلرامفنیکل بیشتر است. اسانس این گیاه دارای ترکیبات اصلی سینئول، کامفور، آرتمیزیا کتون، فراگراند و بورنتول است (۶).
 Laciar و همکاران (۲۰۰۹)، گزارش دادند اسانس گیاه آرتمیزیا که گارای‌هیرون در غلظت‌های ۷۵-۲/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر از رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد آزمون جلوگیری می‌کند و باکتری‌های گرم مثبت لیستریا مونوسیژنز و باسیلوس سرئوس، حساس‌ترین میکروارگانیسم‌ها نسبت به اسانس این گیاه می‌باشند (MIC: ۲/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر). براساس نتایج، اسانس این گونه از *Artemisia* بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی نیز اثر مهاری دارد. در این بررسی قطر هاله با ممانعت از رشد علیه این دو باکتری به ترتیب ۹ و ۱۰ میلی‌متر گزارش شد. مهم‌ترین ترکیبات موجود در اسانس گیاه آرتمیزیا که گارای‌هیرون را کامفور (۵ درصد) و ترانس-توجن (۱۰ درصد) گزارش کردند. بنابراین، به نظر می‌رسد اثرات ضدمیکروبی این دو گونه *Artemisia* به علت وجود این ترکیبات می‌باشد (۳۸). *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 ستونیکوم و آرتمیزیا ولگاریس بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، حساس‌ترین باکتری نسبت به اسانس تمامی گونه‌های آرتمیزیا می‌باشد. آرتمیزیا ستونیکوم و آرتمیزیا اسکوپاریا، بیشترین فعالیت ضدمیکروبی را علیه قارچ کانیدیدا آلینکنس از خود نشان دادند، بیشترین اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی نیز مربوط به آرتمیزیا ولگاریس، آرتمیزیا آربوسنس و آرتمیزیا ستونیکوم، بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و بیشترین اثر ضدباکتریایی آرتمیزیا ابسینتیوم بر اشرشیاکلی گزارش شد (۱۲). در یک مطالعه دیگر ترکیبات موجود در اسانس اندام‌های هوایی *Artemisia deserti* مورد بررسی قرار

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 (۳۴). 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 پنومونه 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 (۷۰). در یک مطالعه دیگر، فعالیت ضدمیکروبی و ضداکسیدانی اسانس اندام‌های هوایی گونه *A.kermanensis* در مقابل ۸ باکتری باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتیلیس، سیتروباکتر، آنتروباکتر، اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونه، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس و ۲ گونه قارچی اسپرژیلوس نایجر و کانیدیدا آلینکنس 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.kermanensis* دارای اثر ضدقارچی است. در آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس این گونه مشخص گردید ایزوبورنتول با ۲۱/۵ درصد، کامفور با ۹/۸ درصد و سیس-توجن با ۷/۶ درصد، از مهم‌ترین ترکیبات در این گیاه می‌باشند (۳۲). وندیوسفی و همکاران (۱۳۷۴)، بیان نمودند اسانس درمنه صخره‌ای *Hausknechtii* *Artemisia* از رشد انواع میکروارگانیسم‌های بیماریزا جلوگیری می‌کند به طوری که در بعضی از موارد فعالیت

اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی گلستانک البرز، برابر با $0.6 \pm 0.12/4$ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره گزارش شده است (۴۲). در مطالعه خلجی و همکاران (۲۰۱۱) نیز میزان فلاونوئید عصاره متانولی اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی مختلف آذربایجان شرقی، برابر با 0.4 تا 2.1 میکرومولار کوئرستین بر صد میکروگرم عصاره گزارش شده است (۳۵). مطالعات متعددی بر روی گونه دیگر ویتکس انجام شده است. در یک مطالعه نشان داده شد که عصاره آبی گونه درمنه *Artemisisa Afra* Jacq، باعث کاهش مالون دی‌آلدئید و افزایش سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون ردوکتاز و گلوکاتایون پراکسیداز به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی در حیوانات آزمایشگاهی دیابتی شده می‌شود (۷). در مطالعات دیگری نشان داده شده است که درمنه، دارای اثرات ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد اسپاسم، ضد التهاب و ضد مالاریا است (۵۳). میزان فلاونوئید عصاره آبی آرتمیزیا ولگاریس (*Artemisisa vulgaris*) در مصر برابر با $0.4 \pm 0.3/4$ معادل میلی‌گرم روتین بر گرم عصاره است (۶۸).

۳-۵- ارزیابی ۲ و ۲ دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)

جهت مقایسه اثرات آنتی‌اکسیدان اسانس گیاه در DPPH از پارامتر دیگری به نام IC_{50} استفاده شد. IC_{50} اسانس، غلظتی از آن می‌باشد که باعث ۵۰ درصد مهار اکسیداسیون شود. هر چه اثر آنتی‌اکسیدان اسانس بیشتر باشد میزان IC_{50} کمتر می‌باشد زیرا اکسیداسیون را با غلظت کمتری مهار می‌نماید (۶۵). 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: $4/9$ و 0.3 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در یک مطالعه، میزان IC_{50} اسانس متانولی اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی مختلف آذربایجان شرقی، برابر با $29/74$ تا $64/18$ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است (۳۵). در یک مطالعه، میزان درصد مهار رادیکال آزاد حاصل از ۲ و ۲ دی

گرفت (۸)، که ۸ و ۱ سینتول، کامفور و پیریتون به عنوان اجزای اصلی گزارش شدند (۳۳).

۳-۳- میزان فنل تام

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 $0.12 \pm 0.106/27$ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم اسانس بود. گیاهان دارویی، منابع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند. اکثر آنتی‌اکسیدان‌های 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 آنتی‌اکسیدان 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 (۷۲ و ۷۳). در مطالعه‌ای، میزان تام فنل اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی گلستانک البرز با $9.7 \pm 194/9$ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره گزارش شده است (۳۵). در مطالعه‌ای دیگر، میزان فنل عصاره متانولی اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی مختلف آذربایجان شرقی، برابر با $1/4$ تا $2/3$ میکروگرم بر صد میکروگرم عصاره گزارش شده است (۴۱).

۳-۴- میزان فلاونوئید تام

معادله مربوط به منحنی استاندارد کوئرستین برای محاسبه محتوا فلاونوئید کل به صورت $Y = 0.031X + 0.0109$ ($R^2 = 0.9913$) است. محتوی فلاونوئید اسانس درمنه برابر با 0.06 ± 0.151 میلی‌گرم کوئرستین بر گرم اسانس بود. در مطالعه‌ای نشان داده شد که میزان تام فلاونوئید عصاره متانولی در عصاره برگ گونه درمنه برابر با $0.17 \pm 0.13/45$ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره بود (۴۴). در مطالعه‌ای دیگر، میزان تام فلاونوئید عصاره متانولی

ارتباط مثبت بین سنجش FRAP و محتوای فنل، فلاونوئیدهای ماندکوئرتستین در این گیاه، به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان، می‌تواند یک دلیل اصلی برای قدرت احیایی بالا باشد. اکثر پلی‌فنل‌ها در بین ترکیبات فیتوشیمیایی آنتی‌اکسیدان 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 (۲۳). اسانس‌ها با محتوای فنلی بالا و خاصیت خوب آنتی‌اکسیدان می‌تواند برای اهداف تغذیه‌ای و نگهداری غذایی استفاده شود (۶۶). نسبت مثبت بین محتوای فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها و اسانس‌ها گزارش شده (۶۷) و مطالعه حاضر تایید کننده آن است.

۴- نتیجه‌گیری

این مطالعه جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی، اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌میکروبی گیاه *Artemisia Khorasanica* انجام گشت. در گیاهان ترکیبات پلی‌فنلی نقش زیادی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند. که این فعالیت به نظر مربوط به خاصیت اکسایش و کاهش آنها می‌باشد (۷۵). در این پژوهش، سطح ترکیبات پلی‌فنلی در اسانس گیاه درمنه قابل توجه بوده است. بنابراین این نتایج ارزشمند می‌تواند حاکی از نقش بیولوژیکی (زیستی) پراهمیت مواد پلی‌فنلی موجود در نمونه‌های این گیاه باشد. دانشمندان بر این باورند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها به علت قابلیت در اختیار گذاشتن هیدروژن آنها می‌باشد (۱۳). 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 بیشترین تاثیر بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشند همچنین اسانس گیاه فوق علیه لیستریا مونوسیژنوز و باکتری‌های گرم اثر ضد باکتریایی دارد و از طرفی میزان خاصیت ضد میکروبی

فنل-۱-پیکریل هیدرازیل توسط عصاره متانولی اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی شهر بابک کرمان، برابر با $1/7 \pm 71/6$ 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 $1/9 \pm 48/1$ بود (۳۳). 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 میلی‌لیتر بود (۶۸). مطالعه دیگر که بر روی عصاره اتانولی بذر آرتمیسیا (*Artemisia Pallens*) در نیجریه انجام شد، نشان داد که میزان IC_{50} برابر $1/5 \pm 150/33$ میکروگرم بر میلی‌لیتر است (۵۶). امروزه محققین، علاقه زیادی به مطالعه گیاهان دارویی و استخراج آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از آنها، برای استفاده به عنوان جانشین آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی دارند. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، سالم‌تر هستند؛ فواید بیشتری دارند و همچنین اثرات مضر جانبی کمتری دارند (۶۱).

۳-۶- اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی 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 (آنتی‌اکسیدان‌ها) 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 (۶۲). معادله مربوط به منحنی استاندارد محلول آمونیوم فروس سولفات به صورت $Y = 0.502X - 0.008$, ($R^2 = 0.988$) است. میزان توانایی احیاء کنندگی اسانس درمنه و BHT به ترتیب برابر است با $36/77 \pm 0/2$ و $32/28$ 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 آنتی‌اکسیدانی برگ و میوه‌های سنجش شده به روش FRAP، یک ارتباط خطی وجود دارد (۳۶). بنابراین با توجه به

ترخون *Artemisia dracunculus* پژوهش و سازندگی، شماره ۳۴: ۱۵-۱۷.

۲. جلیلی، ع، ربیعی، م، سفیدکن، ف. ۱۳۸۲. بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس ۴ گونه *Artemisia* در شمال ایران. پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی، ۶۱: ۵۷-۶۳.

۳. شافعی، م، شریفان، ا، آقازاده، م. ۱۳۹۰. شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس کاکوتی و بررسی اثر ضد میکروبی آن بر روی مخمر کلویرومایسس مارکسیانوس. علوم غذایی و تغذیه، ۹ (۱): ۱۰۱-۱۰۸.

۴. مظفریان، و. ۱۳۷۵. فرهنگ نام‌های گیاهان ایران، انتشارات فرهنگ معاصر، تهران، ۷۵۰.

۵. معظمی، ن. ۱۳۶۸. کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران. چاپ سوم، سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران، تهران.

۶. وندیوسفی، ج، نصیراحمدی، ا، و جاسبی، ا. ر. ۱۳۷۴. فعالیت بیولوژیکی اسانس گیاه *Artemisia haussknechtii* پژوهش و سازندگی، ۲۹: ۲۸-۳۰.

7. Afolayan, A.J. and Sunmonu, T.O. 2011. *Artemisia afra* Jacq. Amelirates Oxidative Stress in the pancreas of streptozocin-induced diabetic wistar rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75(11): 2083-6.
8. Ahmadi, L. and Mirza, M. 2001. Chemical composition of essential oils from two Iranian species of *Artemisia*. *J Essent Oil Res*, 13:30.
9. Anonymus. 1988. *Culture Media Handbook*. Darmstadt: Federal Republic of Germany, 123, 124, 137
10. 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.
11. Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids

اسانس این گیاه می‌تواند با جنتامایسین قابل مقایسه باشد. نتایج به دست آمده از روش‌های چاهک، دیسک و میکروبراث دایلوژن نتایج فوق را نیز تایید نمود و 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 می‌باشد. در آنالیز اسانس مجموعاً ۲۶ ترکیب در اسانس گیاه 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 سیس-وربونل (۲۶/۷۴ درصد)، او-۸-سینئول (۲۰/۰۵ درصد)، کامفور (۱۵/۰۶ درصد) و کریسانتینل استات (۸/۵۶ درصد) است، که ۷۰/۵۱ درصد از اسانس گیاه را تشکیل می‌دهند. در ادامه اثر آنتی‌اکسیدان اسانس به روش DPPH و FRAP نشان داد، اثر اسانس مذکور بیشتر از آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌ی BHT بود. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که درمنه به عنوان یک آنتی‌اکسیدان اولیه، از طریق تبادل هیدروژن و واکنش با رادیکال‌های آزاد، دارای توان بالایی در حذف رادیکال‌های آزاد است. در نتیجه می‌توان گفت به واسطه داشتن مقادیر زیادی از ترکیبات فنلی و ترپنی دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بالایی می‌باشد، می‌توان این گیاه را به عنوان یک موضوع با ارزش جهت پژوهش‌های بیشتر، توصیه نمود.

۵- سپاسگزاری

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.

۶- منابع

۱. سفیدکن، ف، احمدی، ل، میرزا، م. ۱۳۷۶. بررسی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس

- studies on the extract and essential oils of *Artemisia dracunculus* L. (Tarragon). *Afr J Plant Sci*, 8(1): 72-75.
21. Duffy, C. f. and Power, R.F, 2001, Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts, *Internat. J. Antimicro. Age*, 17, 527-529.
 22. 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.
 23. Deepa, N., Kaura, Ch., Georgea, B., Singhb, B. and Kapoor, H. C. 2007. Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annum* L.) genotypes during maturity. *LWT Food Science and Technology* 40: 121-129.
 24. Farzaneh, M., Ahmadzadeh, M., Hadian, J. and Tehrani, A.S. 2005. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of *Artemisia* on some soil borne phytopathogens. *Commun Agricul Appl Biol Sci*, 71(3):1327-1333.
 25. Gordanian, B., Behbahani, M., Carapetian, J. and Fazilatim, M. 2013. Evaluation of Cytotoxicity of Sagebrush Plain Extract on Human Breast Cancer MCF7 Cells. *Armaghane Danesh*, 18(3): 241-251 (Persian).
 26. Hamad, I., Erol-Dayi, O., Pekmez, M., Onay- Ucar, E. and Arda, N. 2010. Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Aphanes arvensis* Extracts. *Plant Food for Human Nutrition*, 65, 44-49.
 27. Hakimi Maybodi, M.H., Afkhami Aghdaee M. and Mijalili, B.F. 2003. An investigation into biological activities of *Artemisia Persia's* essential oil. Pajooheh and Sazandegi,
 28. Hayouni, E. A. Abedrabba, M., Bouix, M. and Hamdi, M. 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. *fruit extracts*, 105: 1126- 1134.
 - and modified version for simultaneous of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymology*. 299: 15-27.
 12. 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.
 13. Baumann, J., Wurn, G. and Bruchlausen, F.V. 1979. Prostaglandin synthetase inhibiting O-2 radical scavenging properties of some flavonoids and related phenolic compounds, *Arch Pharmacol*, 307, 1-77.
 14. Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. *International Journal of Food Microbiology*. 94(3): 223-253.
 15. 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.
 16. 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.
 17. Cha, J., Jeong, M., Jeong, S., Moon, S., Kim, J., Kil, B. and Song, Y. 2005. Chemical composition and antimicrobioal activity of the essential oils of *Artemisia scoparia* and *A. capillaries*. *Planta Med*, 71: 186 – 90.
 18. 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.
 19. Daneshmandi, S., Soleimani, N., Sattari, M. and Pourfathollah, A.A. 2010. Evaluation of the drug synergistic and antibacterial effects of *cuminumcuminum* essential oil, Arak Medical University *Journal (AMUJ)*, 13(2):78-82.
 20. Dar, J.S., Rauf Tak, I., A Ganai, B., Dawood, M. 2014. Phytochemical

37. Khanahmadi, M., Rezazadeh, Sh., Shahrezaei, F. and Taran, M. 2009. Study on Chemical Composition of Essential oil and anti-oxidant and antimicrobial Properties of Artemisia haussknechtii. *Journal of Medicinal Plants*, 8 (31): 132-141.
38. Laciari, A., Vacaruiz, M.L., Carrizoflores, R., et al. 2009. Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of Artemisia Echeagarayi Hieron. (Asteraceae). *Rev Argent Microbiol*, 41:226-31.
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. Mardafkan, N., Iranmanesh, M., Larijani, K., Mahasti, P., Nazari, F. and Zojaji, M. 2015. Chemical components and antibacterial activities of essential oils obtained from iranian local Lavandula officinalis and Thymus vulgaris against pathogenic bacteria Isolated from human. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 1: 31-36.
41. 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.
42. 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.
43. Msaada, K., Salem, N., Bachrouh, O., Bousselmi, S., Tammar, S., Alfaify, A., et al. 2015. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of wormwood (Artemisia absinthium L.) Essential oils and phenolics. *Journal of Chemistry*, 1-12.
44. Mikkonen, T.P., Määttä, K.R., Hukkanen, A.T., Kokko, H.I.,
29. Hadian, J., Ramak-Masoumi, T., Farzaneh, M., Mirjalili, Samad, M.H., Nejad-Ebrahimi, S. and Ghorbani, M. 2007. Chemical Compositions of Essential Oil of Artemisia khorasanica Podl. and its Antifungal Activity on Soil-Born Phytopathogens. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 10 (1): 53-59.
30. Heywood, V.H., Harborn, J.B. and Turner, B.L. 1997. The biology and chemistry of the composited. Academic Press, London, 868.
31. Huang, Y.P. and Ling, Y.R. 1996. In D.J.N. Hind and H.J. Beentje (eds.), Compositae: Systematics, proceedings of the International Compositae Conference, Royal Botanic Gardens, Kew, 36: 431-451.
32. 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.
33. 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.
34. Kazemi, M., Dakhili, M., Dadkhah, A., Yasrebifar, Z. and Larijani, K. 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.
35. 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.
36. Kim, J.M., Marshall, M.R., Cornell, J.A., J.F., P.R and WEI, C.I. 1995. Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against Salmonella typhimurium in culture medium and fish cubes. *J Food Sci*, 60(6):1364-1368.

- European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 629-642.
52. 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.
 53. Prabhakaran, J. and Maharaj, S. 2013. Allelopathic potential of *Cissus quadrangularis* L. on growth of floral millet (*Pennisetum typhoides* ST. and HUB). *International Journal of Research in Biological Sciences*, 3 (1): 18-21.
 54. Rather, M. A., Dar, B.A., Shah, W.A., Prabhakar, A., Bindu, K., Bandy, J.A., Qurishi, M.A. 2017. Comprehensive GC-FID, GC-MS and FT-IR spectroscopic analysis of the volatile aroma constituents of *Artemisia indica* and *Artemisia vestita* essential oils. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3798-S3803.
 55. 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.
 56. Rasooli, I., Gachkar, L., Yadegarinia, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Fakour, M., et al. 2008. Relation of antioxidative property and free radical scavenging capacity to the antimicrobial characteristics of essential oils from *Mentha spicata* L. and *Chenopodium ambrosioides* L. *Iran J Med Aromatic Plants*, 23(4):492-503.
 57. Ramezania, M., Fazli-Bazzaza, B.S., Saghafi- Khademb, F., Dabaghiana, A. 2004. Antimicrobial activity of four *Artemisia* species of Iran. *Fitoterapia*, 75: 201- 3.
 58. 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.
 59. Saeidnia, S., Yassa, N., Rezaeipoor, R. and Shafiee, A. 2004. Comparative investigation of the essential oils of Törrönen, A.R., Kärenlampi, S.O., et al. 2001. Flavonol content varies among black currant cultivars. *J Agric Food Chem*, 49 (7): 3274-7.
 - 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.
 45. 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.
 46. Naeini, A., Khosravi. A., Chitsaz. M., Shokri, H. and Kamlnejad, M. 2009. Anti- *Candida albicans* activity of some Iranian plants used in traditional medicine. *Journal mycologic medicale*, 19:168-172.
 47. Nematollahi, F., Rustaiyan, A., Larijani, K., Nadimi, M. and Masoudi, S., 2006. Essential oil composition of *Artemisia biennis* Willd. and *Publicaria undulate* (L.) C.A. Mey., two Compositae herbs growing wild in Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 18: 101-105
 48. Orav, A., Raalb, A., Arakb, E., Müüriseppa, M. and Kailasa, T. 2006. Composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* L. of different geographical origin. *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem*, 55, 3, 155-165.
 49. 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.
 50. Pandey, B.P., Thapa, R., Upreti, A. 2017. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oil and methanol extract of *Artemisia vulgaris* and *Gaultheria fragrantissima* collected from Nepal. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(10): 952-959.
 51. Pokorny, J. 2007. Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidant components?

67. 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.
68. Teixeira da Silva, J.A. 2004. Mining the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of Biotechnology*, 3(12): 706-720.
69. Valizade, E., Jafari, B., 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.
70. 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.
71. Williams, R.J., Spencer, J.P. and Rice-Evans, C. 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med*, 36(7): 838-49.
72. 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.
73. Wright, C.W. 2002. *Artemisia*: medicinal and aromatic plants - Industrial Profiles, 1: 10- 22.
74. Zheng, W. and Wang, S.Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, *J Agr Food Chem*, 49, 5165-5170.
75. 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.
- Achilleatalagonica Boiss. and *A. millefolium*, chemical composition and immunological studies. *Journal of Essential Oil Research*, 16 (3):262-265.
60. Singal, P.K., Khaper, N., Palace, V. and Kumar, D. 1998. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Res*, 40(3): 426-32.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., 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.
65. Thippeswamy, N.B. and Naidu, K.A. 2005. Antioxidant potency of cumin varieties-cumin, black cumin and bitter cumin-on antioxidant systems. *Eur Food Res Technol*, 220: 472-6.
66. Tsai, T.H., Chien, Y.C., Lee, C.W. and Tsai, P.J. 2008. In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. *Food Chem*, 110(4): 859-64.

(Original Research Paper)
Investigation of Chemical Components, Antibacterial and Antioxidant Properties of Essential Oil *Artemisia Khorasanica* in North Khorasan area

Maryam Sardarodiyani^{1*}, Akram Arian Far²

1-Young researchers Club, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

Received:27/05/2017

Accepted:05/03/2018

Abstract

Mainly due to increased unintentional side-effects of synthetic antioxidants and antimicrobials, this study evaluated the antioxidant and some antibacterial properties of *Artemisia Khorasanica* aerial parts' essential oil. Analysis and identification of chemical composition in essential oil of *Artemisia Khorasanica* was applied a GC-MS instruments. In this 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. The total phenolic content was measured using the Folin-Ciocalteu's reagent. The total flavonoid content was assessed by a colorimetric method based on Aluminum Chloride, has been associated with some changes. This study conducted in order to evaluate antimicrobial effect of *Artemisia Khorasanica* essential oil on growth of four bacterial pathogens by well diffusion, disk diffusion and broth microdilution methods. According to Retention volume, Retention time, Kovats retention index and comparison these parameters with standard components, The results showed that the essential oil of this species has 26 components (97.35% of all components), among them was the combination of essential oil percent, respectively: *Cis-verbenol* (26.74%), *1,8-Cineole* (20.05%), *Camphor* (15.06%), and *Chrysanthenyl acetate* (8.56%). The phenolic content of essential oil was obtained 106.27 mg Gallic acid/gr oil and the total flavonoid content of essential oil 1.56 mg quercetin/gr oil. The IC₅₀ values of oil and BHT in DPPH assay were 4.9 and 0.3 mg/ml, respectively. In addition the reducing power of oil and BHT were 36.77 and 32.28 μm/l, respectively. Antibacterial test results were showed that gram-positive bacteria were more sensitive to the essential oil to gram-negative bacteria. The minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration against *Staphylococcus aureus* were 0.781 mg/mL and 6.25 mg/ mL. The current study showed that *Artemisia Khorasanica* essential oil is an easily accessible source of natural antimicrobial and antioxidants which can be suitable to be included in foods, pharmaceutical and industrial applications.

Keywords: Antioxidant, Essential oil, *Artemisia Khorasanica*, *Cis-verbenol*, *Camphor*, *1,8-Cineole*.

*Corresponding Author: sardarodiyani_5@yahoo.com

