Archive of SID

فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، شماره پیاپی ۲۹، سال هشتم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹

ارزیابی فیتوشیمیایی سمیت سلولی، آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی اسانس گیاه دارویی *Melissa officinalis* L. در منطقه مریوان

مرتضی یزدانی[۱]، فرشته جوکار کاشی[۲*]، زینب طلوعی[۲]، اکرم رحیمی‌مقدم[۳]

[۱]کارشناس‌ارشد، گروه فیتوشیمی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

[۲]استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

[۳]کارشناس‌ارشد، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۱۳

چکیده

با توجه به اثرات نامطلوب آنتی‌بیوتیک‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و داروهای ضدسرطان مصنوعی بر سلامتی انسان و افزایش مقاومت پاتوژن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، لازم است منابع ایمن و جایگزین برای این ترکیب‌ها شناسایی شوند. بدین‌منظور برای اولین بار گیاه بادرنجبویه از شهرستان مریوان واقع در استان کردستان جمع‌آوری شد و فعالیت زیستی گیاه بررسی گردید. اندام‌های هوایی گیاه خودرو بادرنجبویه در مرحله گلدهی در تابستان سال ۱۳۹۵ ازمریوان در ارتفاع ۱۳۲۰ متری از سطح دریای آزاد برداشت و اسانس آن‌ها با امواج میکروویو و بدون استفاده از حلال استخراج شد. ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس با دستگاه کروماتوگرافی گازی–طیف‌سنج جرمی شناسایی شدند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با روش بی‌رنگ شدن بتاکاروتن، سمیت سلولی آن با آزمون کشندگی میگوی آب شور و فعالیت ضدمیکروبی آن علیه انواعی از سویه‌های میکروبی استاندارد و بالینی با روش انتشار در آگار و تعیین کمترین غلظت مهارکننده رشد بررسی گردید. بازده استخراج اسانس بادرنجبویه ۱/۱۸ درصد و اجزای اصلی آن ژرانیول (۳۰/۳۹ درصد) و ژرانیال (۲۶/۱۹ درصد) بودند. بر اساس نتایج آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن، مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید توسط اسانس بادرنجبویه و استاندارد بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن به‌ترتیب ۷۲/۴۸ و ۹۶/۴۸ درصد و براساس نتایج آزمون کشندگی میگوی آب شور، مقدار LC_{50} اسانس بادرنجبویه و داروی ضدسرطان وین‌کریستین‌سولفات به‌ترتیب ۶۲/۷۶ و ۰/۷۵۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. اسانس بادرنجبویه فعالیت ضدمیکروبی خوبی علیه سویه‌های میکروبی بررسی شده به‌ویژه باکتری‌های گرم مثبت داشت. اسانس بادرنجبویه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضدسرطانی خوبی است و می‌توان آن را به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌اکسیدان‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضد سرطان مصنوعی معرفی نمود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، اسانس، بادرنجبویه، سمیت سلولی، فعالیت ضدمیکروبی

*نویسنده مسئول: jookar@kashanu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تاریخچه استفاده از اسانس گیاهان به هزاران سال پیش بازمی‌گردد. انسان‌ها در زمان‌های قدیم، گیاهان معطرحاوی اسانس را به دلیل بوی مطبوع و خواص شفابخشی که داشتند، برای درمان بیماری‌ها و همچنین در مراسم مذهبی استفاده می‌کردند (Baser and Buchbauer, 2016). امروزه نیز با توجه به عوارض جانبی و اثرات نامطلوب داروهای شیمیایی مصنوعی بر سلامتی انسان، بسیاری از مردم از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری‌های خود استفاده می‌کنند. سازمان بهداشت جهانی تخمین زده که بیش از ۸۰٪ از مردم در کشورهای در حال توسعه از طب سنتی شامل داروهای گیاهی برای نیازهای روزانه خود استفاده می‌کنند و حدود ۸۵۵ داروی سنتی از عصاره‌های خام گیاهی تشکیل شده است (Miraj et al., 2017). اسانس‌ها ترکیبات شیمیایی طبیعی متنوعی دارند و می‌توانند نیازهای اولیه و مواد لازم برای درمان بیماری‌های انسان را فراهم کنند.

در میان تمام خانواده‌های گیاهی، نعناعیان دارای بیشترین گونه‌های گیاهان دارویی می‌باشند. بادرنجبویه با نام علمی *Melissa officinalis* L. و نام لاتین Lemon balam یکی از مهم‌ترین گیاهان معطر و دارویی متعلق به خانواده نعناعیان می‌باشد که عمدتا در فلور طبیعی ترکیه -مخصوصا در نواحی مدیترانه‌ای- رشد می‌کند و بومی اروپای جنوبی، آفریقای شمالی و مشرق زمین تا قفقاز و شمال ایران است (Bagdat, 2006). این گیاه در مناطقی از ایران از جمله استان های تهران، گلستان، آذربایجان، لرستان و کرمانشاه نیز بطورگسترده رشد می‌کند (Ebrahimi Hariry, 2011; Emamghoreishi and Talebianpour, 2009).

کمیت و کیفیت مواد مؤثره اسانس‌ها به منطقه جغرافیایی، میزان رطوبت، نور، دمای محیط، ارتفاع از سطح دریا، میزان بارندگی، ترکیب خاک، سن گیاه و روش استخراج بستگی دارد و عامل اصلی ایجاد تفاوت در خواص دارویی آن‌ها است. مطالعات قبلی به بررسی ترکیب‌های شیمیایی و فعالیت زیستی اسانس بادرنجبویه ارومیه، وجودینا، مشهد، الجزایر، مراکش و قم پرداخته‌اند و گزارش نموده‌اند که اسانس بادرنجبویه دارای خواص آنتی‌کسیدانی، ضدسرطانی و ضدمیکروبی است (Ehsani etal., 2017; Mimica-Dukic et al., 2004; De Sousa et al., 2004; Jafari and Mohamadi Sani, 2016; Abdellatifet al., 2014; Jalal et al., 2015; Arzhang et al., 2015). همچنین ضدنفخ و ضداسپاسم و دارای خواص آرام‌بخشی، ضدالتهابی و ضدویروسی است (Yosofi et al., 2011) و در درمان سردرد، سوءهاضمه، قولنج، عصبانیت، بیماری‌های قلبی و افسردگی استفاده می‌شود (Beloued, 2009).

در این مطالعه به منظور یافتن جایگزین طبیعی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و مواد ضد سرطان مصنوعی، برای اولین بار گیاه بادرنجبویه از منطقه مریوان واقع در استان کردستان شناسایی و ترکیب شیمیایی و فعالیت زیستی اسانس بخش‌های هوایی آن بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه: اندام‌های هوایی گیاه بادرنجبویه در مرحله گلدهی درتابستان سال ۱۳۹۵ ازجنوب شهر مریوان (استان کردستان) برداشت شد. مریوان در منطقه کوهستانی و در ارتفاع ۱۳۲۰ متری از سطح دریای آزاد قرار دارد و دارای آب و هوای معتدل می‌باشد و بادرنجبویه به صورت خودرو در آن‌جا می‌روید. نمونه‌ها توسط اساتید گیاه‌شناسی دانشگاه کاشان بررسی و تأیید و به مدت ٦ روز در دمای اتاق خشک و سپس آسیاب شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

استخراج اسانس: اسانس بخش‌های هوایی گیاه بادرنجبویه با امواج میکروویو و بدون استفاده از حلال استخراج شد. ابتدا ۱۰۰ گرم از گیاه در آب خیسانده و پس از یک ساعت آب‌کشی شده و در یک راکتور میکروویو (MicroSYNTH، Milestone، ایالات متحده امریکا) در معرض امواج میکروویو قرار گرفت. استخراج اسانس به مدت ٤٥ دقیقه با قدرت ۸۵۰ وات در دمای ۸۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. اسانس استخراج شده روی سدیم سولفات بدون آب (مرک، آلمان) خشک و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

شناسایی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس: شناسایی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس با دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC)[1] مدل Agilent HP-6890 مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای (FID)[2] و یک دستگاه کروماتوگرفی گازی-طیف‌سنج جرمی (GC/MS)[3] از نوع Hewlett-Packard 6890-5972 با سیستم مجهز به ستون مویینه (به طول ۳۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه‌ی داخلی ۰/۲۵ میکرومتر) انجام شد. افزایش دمای ستون از ٦۰ تا ۲٤٦ درجه‌ی سانتی‌گراد و با سرعت ۳ درجه سانتی‌گراد در دقیقه بود و در انتها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سرعت گاز حامل (هلیم)، ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه بود. طیف جرمی با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت به دست آمد. ضرایب بازداری با استفاده از زمان‌های بازداری آلکان‌های نرمال که با همان دستگاه و تحت همان شرایط تزریق شده بودند، محاسبه شدند. اجزای سازنده اسانس با مقایسه‌ی طیف‌های جرمی و ضرایب بازداری آن‌ها با طیف‌های جرمی و ضرایب بازداری نمونه‌های استاندارد، شاخص‌های موجود در منابع معتبر (Adams, 2007) و بانک اطلاعاتی موجود در دستگاه GC/MS شناسایی شدند. مقادیر نسبی اجزای سازنده اسانس توسط نرم‌افزار دستگاه و با توجه به سطح زیر منحنی آن‌ها در کروماتوگرام حاصل از GC/MS محاسبه شد.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با روش بی‌رنگ شدن بتاکاروتن ارزیابی شد (Miller, 1971). ابتدا در یک فلاسک ته‌گرد ۰/۰۲ میلی‌گرم از بتاکاروتن (سیگما آلدریچ، ایالات متحده امریکا) در ۱ میلی‌لیتر کلروفرم (مرک، آلمان) حل و سپس ۲۰ میلی‌گرم لینولئیک اسید (سیگما آلدریچ، ایالات متحده امریکا) و ۲۰۰ میلی‌گرم توئین ٤۰ (مرک، آلمان) به آن اضافه گردید. کلروفرم با روش تبخیر در خلأ و با استفاده از گاز نیتروژن خارج و ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اشباع از اکسیژن به فلاسک افزوده شد. ۵ میلی‌لیتر از امولسیون تهیه شده به لوله آزمایش حاوی ۰/۲ میلی‌لیتر از اسانس یا استاندارد بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) (سیگما آلدریچ، ایالات متحده آمریکا)، منتقل و جذب آن در زمان صفر و پس از ۳۰ دقیقه گرماگذاری نمونه‌ها در حمام آب گرم با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، در طول موج ٤۷۰ نانومتر و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV CINTRA6- GBC Scientific Equipment، ایالات متحده آمریکا) خوانده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها به صورت درصد بازدارندگی بی‌رنگ شدن بتاکاروتن با لینولئیک اسید بیان و با فرمول زیر محاسبه شد.

$$I\% = (A_{sample}-A_{control})/(A_{control(0)}-A_{control}) \times 100$$

I% درصد بازدارندگی، A_{sample} جذب نمونه بعد از زمان مورد نظر، $A_{control}$ جذب کنترل بعد از زمان موردنظر و $A_{control(0)}$ جذب کنترل در زمان صفر است.

1. Gas Chromatograph
2. Flame Ionization Detector
3. Gas Chromatography/Mass Spectrometry

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی سمیت سلولی[1]: سمیت سلولی اسانس با آزمون کشندگی میگوی آب شور (BST)[2] بررسی به‌منظور تهیه آب شور مناسب برای تبدیل تخم آرتمیا به لارو و ادامه زندگی آنها،۲۳ گرم پودرNaCl (مرک، آلمان)، ۱۱ گرم پودر $MgCl_2$ (مرک، آلمان)، ٤ گرم SO_2Na_4 (مرک، آلمان)، ۱/۳ گرم $CaCl_2$ (مرک، آلمان) و ۰/۷ گرم KCl (مرک، آلمان) در آب مقطر حل و pH آن (pH=9) تنظیم شد. آب شور به مدت چند دقیقه جوشانده شد تا استریل شود. برای تولید لارو، ۳۰۰ میلی‌لیتر از آب شور و ۰/۰۵ گرم از تخم آرتمیا به ظرف مناسبی اضافه و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و هوادهی مناسب به مدت ٤٨ ساعت نگهداری شد. مقدار ۰/۰۵ گرم از اسانس با استفاده از ۱۲۵ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکسید (مرک، آلمان) در یک بالن ژوژه ۲۵ میلی‌لیتری حل و با آب شور به حجم رسانده و محلول‌های با غلظت ۱۰، ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آن تهیه شد. جهت تهیه کنترل منفی ۵۰ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکسید به بالن ژوژه ۵ میلی‌لیتری اضافه و با آب شور به حجم رسانده شد. نمونه شاهد داروی ضدسرطانی وین‌کریستین سولفات (GedeonRichter، مجارستان) با غلظت‌های ۰/۱۵، ۰/۲۵، ۰/۳۵، ۰/٤۵، ۰/۷۵ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتربود. به هر یک از لوله‌های آزمایش حاوی محلول‌های شاهد، کنترل منفی و اسانس، با پیپت پاستور ۱۰ لارو آرتمیا اضافه و لوله‌های آزمایش به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و نور مناسب نگهداری شدند. سپس تعداد لاروهای زنده موجود در لوله‌های آزمایش شمارش و درصد کشندگی با معادله‌ی زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد کشندگی} = \frac{(\text{تعداد لارو زنده موجود در نمونه - تعداد لارو زنده موجود در شاهد})}{\text{تعداد لارو زنده موجود در شاهد}} \times ۱۰۰$$

با استفاده از نتایج به دست آمده نموداری از نسبت درصد کشندگی به غلظت رسم شد و میزان LC_{50}[3] یعنی غلظتی از نمونه با درصد کشندگی ۵۰، بر اساس میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. به‌منظور به حداقل رساندن خطاهای آزمایش واطمینان از صحت نتایج، آزمایش‌ها سه مرتبه تکرار شدند.

بررسی فعالیت ضدمیکروبی

میکروارگانیسم‌ها: در این مطالعه ۱۲ سویه میکروبی استاندارد و ٦۰ سویه بالینی بررسی شدند. سویه‌های میکروبی استاندارد شامل باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 29737)، باسیلوس سوبتیلیس (ATCC 6633) و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (ATCC 12228)، باکتری‌های گرم منفی شیگلا دیسانتریه (PTCC 1188)، کلبسیلا پنومونیه (ATCC 10031)، سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853)، سالمونلا پاراتیفی سروتیپ A (ATCC 5702)، اشرشیا کلی (ATCC 10536) و پروتئوس ولگاریس (PTCC 1182) وقارچ‌های آسپرژیلوس نایجر (ATCC 16404)، آسپرژیلوس برازیلینسیس (PTCC 5011) و کاندیدا آلبیکنس (ATCC 10231) بودند. سویه‌های میکروبی استاندارد که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفته است از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. سویه‌های بالینی شامل باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، باکتری‌های گرم منفی پروتئوس ولگاریس، آسینتوباکتر، سالمونلا، اشرشیا کلی، کلبسیلا، سودوموناس سیرینگه و مخمر کاندیدا

1. Cytotoxicity
2. Brine shrimp lethality test
3. Lethal concentration 50

www.SID.ir

Archive of SID

آلبیکنس بودند. سویه‌های بالینی در تابستان سال ۱۳۹٦ از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان شهید بهشتی کاشان جدا شدند.

باکتری‌ها در محیط کشت نوترینت آگار (مرک، آلمان) و قارچ‌ها در محیط کشت سابرو دکستروز آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند. پلیت‌های تلقیح شده با باکتری‌ها و قارچ‌ها به‌ترتیب در دمای ۳۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت یک شب در گرمخانه گرماگذاری شدند.

روش انتشار در آگار (DD)[1]: فعالیت ضدمیکروبی اسانس با روش انتشار در آگار مطابق دستور کار موسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI)[2] تعیین شد (CLSI, 2012). ابتدا محیط کشت‌های مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) برای باکتری‌ها و سابرو دکستروز آگار برای قارچ‌ها تهیه شد. اسانس نیز در دی‌متیل سولفوکسید حل و با فیلتر سرسرنگی ۰/٤٥ میکرومتر استریل شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های میکروبی با کدورت معادل نیم‌مک‌فارلند در سطح محیط کشت‌ها، کشت داده شد. چاهک‌هایی به قطر ٦ میلی‌متر و به ضخامت٤ میلی‌متر در محیط کشت‌ها ایجاد و به هر یک از آن‌ها ۱۰ میکرولیتر اسانس با غلظت نهایی ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید. پلیت ها به مدت ۲ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و سپس پلیت‌های تلقیح شده با باکتری‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پلیت‌های تلقیح شده با مخمر به مدت ٤۸ ساعت و پلیت‌های تلقیح شده با سایر قارچ‌ها به مدت ۷۲ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین و جنتامایسین (برای باکتری‌ها) (پادتن طب، ایران) و نیستاتین (برای قارچ‌ها) (پادتن طب، ایران) به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. سپس قطر هاله مهار رشد توسط خط‌کش اندازه‌گیری شد. جهت اطمینان از صحت نتایج، آزمایش‌ها سه بار تکرار و میانگین داده‌های به دست آمده به عنوان قطر هاله مهار رشد گزارش شد.

تعیین کم‌ترین غلظت مهارکننده رشد (MIC)[3] با روش رقت‌سازی در محیط کشت مایع[4]: به منظور تعیین MIC سویه‌های باکتریایی و مخمر کاندیدا آلبیکنس از پلیت ۹٦ خانه‌ای استریل و روش رقت‌سازی در محیط کشت مایع طبق دستور کار CLSI استفاده گردید (CLSI, 2012). به هر یک از خانه‌های پلیت ۹٦ خانه‌ای ۲۰۰ میکرولیتر محلول شامل ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مایع برین هارت اینفیوژن (مرک، آلمان) برای باکتری‌ها و سابرو دکستروز براث (مرک، آلمان) برای مخمر کاندیدا آلبیکنس، ۱۰۰ میکرولیتر از یکی از غلظت‌های اسانس (۰/۰۳۱۲۵، ۰/۰٦۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و ۵ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با رقت معادل نیم‌مک‌فارلند افزوده شد. در چاهک‌های مربوط به کنترل منفی به جای اسانس از محیط کشت و در چاهک‌های مربوط به کنترل مثبت به جای اسانس از آنتی‌بیوتیک استفاده شد.پودر آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین و جنتامایسین (سیگما، ایالات متحده امریکا) جهت تهیه کنترل مثبت برای باکتری‌ها و پودر آنتی‌بیوتیک نیستاتین (سیگما، ایالات متحده امریکا) جهت تهیه کنترل مثبت برای مخمر کاندیدا آلبیکنس استفاده شدند. پلیت‌های تلقیح شده با باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲٤ ساعت و پلیت‌های تلقیح شده با مخمر کاندیدا آلبیکنس در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ٤۸ ساعت در گرمخانه گرماگذاری شدند. آزمایش‌ها سه

1. Disk Diffusion
2. Clinical and Laboratory Standards Institute
3. Minimum inhibitory concentration
4. Broth microdilution

www.SID.ir

Archive of SID

بار تکرار شدند و میانگین کمترین غلظت از اسانس که مانع رشد باکتری‌ها یا مخمر کاندیدا آلبیکنس شده بود به‌عنوان MIC گزارش شد.

تعیین MIC با روش رقت‌سازی در آگار: جهت تعیین MIC سویه‌های قارچی از روش رقت‌سازی در آگار طبق دستور کار گول و همکاران استفاده گردید (Gul et al., 2002). با افزودن مقادیر مناسبی از اسانس با غلظت‌های ۰/۰۳۱۲۵، ۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به محیط کشت سابرو دکستروز آگار مذاب استریل حاوی توئین ۲۰ (٪۰/۵ حجمی/حجمی) (مرک، آلمان) ، ایجاد شد. پودر آنتی‌بیوتیک نیستاتین جهت تهیه کنترل مثبت استفاده گردید و کنترل منفی پلیت حاوی محیط کشت سابرو دکستروز آگار و توئین ۲۰ (٪۰/۵ حجمی/حجمی) و فاقد اسانس بود. محیط کشت‌ها به صورت نقطه‌ای با ۵ میکرولیتر از جدایه‌های قارچی (10^4 اسپور بر میلی‌لیتر) تلقیح شدند. پلیت‌های تلقیح شده به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند و میانگین کمترین غلظت از اسانس که مانع رشد قارچ‌ها شده بود به عنوان MIC گزارش شد.

نتایج

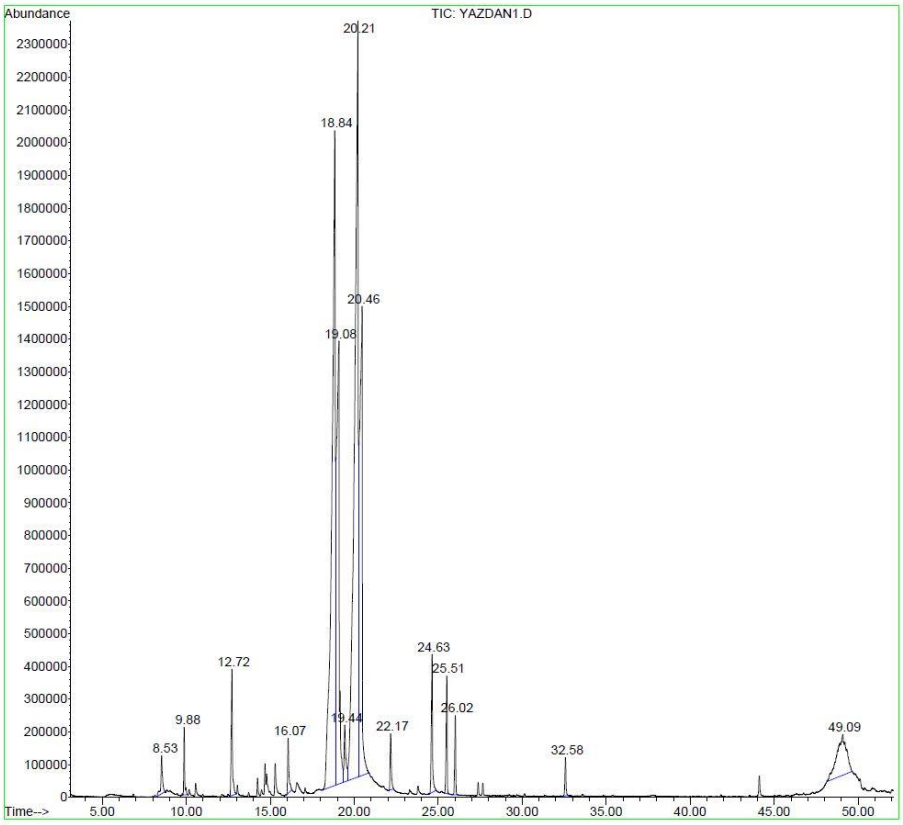
بازده و ترکیبات شیمیایی اسانس: بازده استخراج اسانس بادرنجبویه با امواج میکروویو و بدون استفاده از حلال ٪۱/۱۸ بود. شکل ۱ کروماتوگرام اسانس گیاه بادرنجبویه به‌دست آمده از دستگاه GC-MS را نشان می‌دهد. ترکیب و درصد اجزای فرار موجود در اسانس بادرنجبویه در جدول ۱ آمده است. در اسانس بادرنجبویه ۱۲ ترکیب شناسایی شد. ژرانیول (٪۳۰/۳۹)، ژرانیال (٪۲۶/۱۹)، سیترال (٪۱۵/۰۷) و نرال (٪۱۳/۳۲) اجزای اصلی و تشکیل‌دهنده ٪۸۴/۹۷ از ترکیب‌های اسانس بادرنجبویه بودند.

جدول ۱: ترکیب و درصد اجزای فرار در اسانس بخش‌های هوایی بادرنجبویه

ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری به دقیقه	شاخص بازداری	درصد ترکیب
۱	β-myrcene	۸/۵۳	۹۹۰	۰/۷۰
۲	dl-Limonene	۹/۸۸	۱۰۲۹	۰/۶۹
۳	linalool	۱۲/۷۲	۱۰۹۶	۱/۷۷
٤	unknown	۱۶/۰۶	–	۰/۷۹
۵	Geranial	۱۸/۸٤	۱۲۵۲	۲۶/۱۹
۶	Z-Citral (Neral)	۱۹/۰۸	۱۲۳۸	۱۳/۳۲
۷	Camphene	۱۹/٤٤	۹۵٤	۱/۱۶
۸	Geraniol	۲۰/۲۰	۱۲۵۲	۳۰/۳۹
۹	Citral (Granial)	۲۰/٤۶	۱۲۶۷	۱۵/۰۷
۱۰	Methyl nerolate	۲۲/۱۷	۱۲۸۲	۰/۷٤
۱۱	Geranyl acetate	۲٤/۶۳	۱۳۸۱	۱/۹۰
۱۲	unknown	۲۵/۵۱	–	۱/٤۲
۱۳	trans-Caryophyllene	۲۶/۰۲	۱٤۱۹	۰/۹۰
۱٤	Caryophyllene oxide	۳۲/۵۸	۱۵۸۳	۰/٤۷
۱۵	Unknown	٤۹/۰۸	-	٤/٤۸
۱۶	Total			۹۹/۹۹

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: کروماتوگرام اسانس گیاه بادرنجبویه به‌دست‌آمده از دستگاه GC-MS

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی: روش بی‌رنگ شدن بتاکاروتن بر اساس بی‌رنگ شدن رقابتی بتاکاروتن طی آنتی‌اکسیداسیون لینولئیک اسید در امولسیون آبی است و با کاهش جذب در ناحیه مرئی بررسی می‌شود (Miller, 1971).در غیاب ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان، لینولئیک اسید اکسید و رادیکال‌های آزاد پروکسیل تولید شده، بتاکاروتن اشباع نشده را اکسید می‌کنند و بتاکاروتن تا حدودی تجزیه شده و رنگ نارنجی خود را از دست می‌هد (Kumaran and Joel Karunakaran, 2006). حضور آنتی‌اکسیدان‌ها، اکسیداسیون بتاکاروتن با هیدروپراکسیدها را کاهش می‌دهد و هیدروپراکسیدهای تشکیل شده توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدان خنثی می‌شوند. بنابراین میزان بی‌رنگ شدن بتاکاروتن به فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیب بررسی شده بستگی دارد (Ismail et al., 2010).

بر اساس نتایج آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن، درصد بازدارندگی اسانس بادرنجبویه و استاندارد BHT به‌ترتیب ۷۲/۴۸ و ۹۶/۴۸ درصد به‌دست آمد که نشان می‌دهد اسانس بادرنجبویه فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی دارد.

میزان سمیت سلولی: یکی از آزمون‌های معتبر جهت تعیین سمیت سلولی مواد، آزمون BST می‌باشد که توسط مؤسسه ملی سرطان درآمریکا (NCI)[1] تأیید شده است. اساس این آزمون، توانایی نمونه در کشتن آرتمیا می‌باشد. بنابراین با محاسبه میزان کشندگی در غلظت‌های معین از نمونه اسانس و مقایسه آن با استاندارد منفی، می‌توان اثر ضد سرطانی اسانس را پیش‌بینی نمود. در این مطالعه مقدار LC_{50} اسانس بادرنجبویه و داروی ضد سرطان وین کریستین

1. National Cancer Institute

www.SID.ir

Archive of SID

سولفات به ترتیب ٦٢/٧٦ و ٠/٧٥١میکروگرم بر میلی-لیتر به دست آمد.

میزان فعالیت ضدمیکروبی: نتایج آزمون انتشار در آگار و تعیین کمترین غلظت مهارکننده رشد سویه‌های استاندارد و بالینی میکروبی توسط اسانس بادرنجبویه و آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین، جنتامایسین و نیستاتین در جدول‌های۲ و ۳ آمده است. بر اساس این نتایج اسانس بادرنجبویه فعالیت ضدمیکروبی خوبی را برعلیه میکروارگانیسم‌های بررسی شده به خصوص برعلیه باکتری‌های گرم مثبت داشت.

جدول ۲: بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس بادرنجبویه و آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین، جنتامایسین و نیستاتین برعلیه سویه‌های استاندارد میکروبی

میکروارگانیسم‌ها	اسانس بخش‌های هوایی بادرنجبویه		ریفامپین		جنتامایسین		نیستاتین	
باکتری‌های گرم مثبت	کمترین غلظت مهارکننده رشد (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)	کمترین غلظت مهارکننده رشد (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)	کمترین غلظت مهارکننده رشد (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)	کمترین غلظت مهارکننده رشد (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)
Staphylococcus epidermidis (ATCC 12228)	٣١/٢٥	١٨	٢٥٠	٤٠	٥٠٠	٣٥	*	*
Bacillus subtilis (ATCC 6633)	١٢٥	١٢	١٥/٦	١٣	٥٠٠	٢١	*	*
Staphylococcus aureus (ATCC 29737)	١٢٥	١٣	٢٥٠	١٠	٥٠٠	٢١	*	*
باکتری‌های گرم منفی								
Shigella dysenteriae (PTCC 1188)	٦٢/٥	١٣	٢٥٠	٨	٥٠٠	١٨	*	*
Klebsiella pneumonia (ATCC 10031)	٢٥٠	١٢	٢٥٠	٧	٢٥٠	٢٢	*	*
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)	–	–	–	–	٥٠٠	٨	*	*
Salmonella paratyphi-A serotype (ATCC 5702)	٢٥٠	١٢	–	–	٥٠٠	٢١	*	*
Escherichia coli (ATCC 10536)	٢٥٠	١٢	٥٠٠	١١	٥٠٠	٢١	*	*
Proteus vulgaris (PTCC 1182)	–	–	١٢٥	١٠	٥٠٠	٢٣	*	*
قارچ‌ها								
Aspergillus niger (ATCC 16404)	–	–	*	*	*	*	٢٧	٣١/٢٥
Aspergillus brasiliensis (PTCC 5011)	–	–	*	*	*	*	٣٠	٣١/٢٥
Candida albicans (ATCC 10231)	٥٠٠	١٠	*	*	*	*	٣٣	١٢٥

(–) به معنای عدم فعالیت ضدمیکروبی است.

(*) به معنای غیرقابل استفاده بودن آنتی‌بیوتیک برای سویه میکروبی است.

جدول ۳: بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس بادرنجبویه برعلیه سویه‌های بالینی میکروبی

میکروارگانیسم		اسانس بادرنجبویه	
شماره	نام میکروارگانیسم	میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)	کمترین غلظت مهارکننده رشد (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
١	*Staphylococcus epidermidis*	١٨	٣١/٢٥
٢		١٩	٣١/٢٥
٣		١٧	٣١/٢٥
٤		١٧	٣١/٢٥

www.SID.ir

Archive of SID

۵		۱۷	۳۱/۲۵
٦		۱۸	۳۱/۲۵
۷	*Candida albicans*	۱۰	۵۰۰
۸		–	–
۹		–	–
۱۰		۱۰	۵۰۰
۱۱		۱۰	۵۰۰
۱۲		۱۱	۵۰۰
۱۳		۱۰	۵۰۰
۱٤		–	–
۱۵	*Proteus vulgaris*	–	–
۱٦		–	–
۱۷		–	–
۱۸		–	–
۱۹		–	–
۲۰		–	–
۲۱		–	–
۲۲	*Enterococcus faecalis*	۱٤	۱۲۵
۲۳		۱٤	۱۲۵
۲٤	*Acinetobacter baumannii*	–	–
۲۵		–	–
۲٦		–	–
۲۷		–	–
۲۸		–	–
۲۹		–	–
۳۰		–	–
۳۱	*Staphylococcus saprophyticus*	۱۵	٦۲/۵
۳۲		۱۵	٦۲/۵
۳۳		۱۵	٦۲/۵
۳٤		۱٦	٦۲/۵
۳۵		۱۵	٦۲/۵
۳٦		۱۵	٦۲/۵
۳۷		۱۵	٦۲/۵
۳۸	*Staphylococcus aureus*	۱۳	٦۲/۵
۳۹		۱٤	٦۲/۵
٤۰		۱٤	٦۲/۵
٤۱		۱۳	۱۲۵
٤۲	*Salmonella paratyphi*	۱٤	۱۲۵
٤۳		۱٤	۱۲۵
٤٤	*Escherichia coli*	۱۱	۵۰۰
٤۵		۱۱	۵۰۰
٤٦		۱۲	۵۰۰
٤۷		۱۱	۵۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

٤٨		١١	٥٠٠
٤٩		١٣	١٢٥
٥٠		١٣	١٢٥
٥١		١٤	١٢٥
٥٢	*Klebsiella pneumonia*	١٣	١٢٥
٥٣		١٣	١٢٥
٥٤		١٣	١٢٥
٥٥		١٣	١٢٥
٥٦		-	-
٥٧		-	-
٥٨	*Pseudomonas syringae*	-	-
٥٩		-	-
٦٠		-	-

(-) به معنای عدم فعالیت ضدمیکروبی است.

بحث

مطالعه حاضر اولین گزارش از برداشت بادرنجبویه از مریوان و بررسی ترکیب‌های شیمیایی و فعالیت زیستی اسانس بخش‌های هوایی آن می‌باشد. در این پژوهش بازده استخراج اسانس بادرنجبویه مریوان ٪۱/۱۸ بود که در مقایسه با نتایج مطالعات قبلی مقدار بیشتری داشت. بازده استخراج اسانس بادرنجبویه ارومیه، برزیل، الجزایر، مراکش و قم با دستگاه کلونجر به‌ترتیب ٪۱، ٪۰/۹۷، ٪۰/۳٤، ٪۰/٤ و ٪۰/۳٦ و بازده استخراج اسانس بادرنجبویه وجودینا، با روش تقطیر با آب، ٪۰/۲ بود (Ehsani et al., 2017; Mimica-Dukic et al., 2004; De Sousa et al., 2004; Abdellatif et al., 2014; Jalal et al., 2015; Arzhang et al., 2015).

ترکیب اصلی تشکیل‌دهنده اسانس بادرنجبویه مریوان، ژرانیول بود. ترکیب اصلی اسانس بادرنجبویه همدان و کوبا نیز ژرانیول با مقادیر ٤٤/۲۳٪ و ٤۱٪ گزارش شده است (Adinee et al., 2009; Pino et al., 1999). در مطالعات دیگر ترکیباتی غیر از ژرانیول به عنوان مهم‌ترین ترکیب تشکیل دهنده اسانس بادرنجبویه معرفی شده‌اند. سیترونلال (٪۳۷/۳۳)، تیمول (٪۱۱/۹٦) و سیترال (٪۱۰/۱۰) اجزای اصلی اسانس بادرنجبویه ارومیه را تشکیل دادند (Ehsani et al., 2017). بر اساس تحقیقی که در وجودینا انجام شد، ترکیبات اصلی اسانس بخش‌های هوایی بادرنجبویه، ژرانیال (٪۲۳/٤)، نرال (٪۱٦/۵) و سیترونلال (٪۱۳/۷) بودند (Mimica-Dukic et al., 2004). جعفری و محمدی ثانی (Jafari and Mohamadi Sani, 2016) اجزای اصلی اسانس برگ‌های بادرنجبویه برداشت شده از مشهد را D-لیمونن (٪٦۰/۷۰) و سیکلوهگزانون (٪۷/٦۷) گزارش کردند. اجزای اصلی بادرنجبویه برداشت شده از برزیل و الجزایر ژرانیال و نرال بودند ولی مقدار این ترکیبات در دو نمونه با هم تفاوت داشت (De Sousa et al., 2004; Abdellatif et al., 2014). ترکیبات اصلی اسانس برگ‌های بادرنجبویه برداشت شده از مراکش، سیترونلال (٪۱٤/٤۰)، بتا-کاریوفیلن اکسید (٪۱۱/۰۰) و ژرانیول استات (٪۱۰/۲۰) و ترکیبات اصلی اسانس بادرنجبویه برداشت شده از قم به ترتیب کاریوفیلن اکسید (٪۲۱/۱۱) و کاریوفیلن (٪۱۷/۳۳) بود (Jalal et al., 2015; Arzhang et al., 2015).

www.SID.ir

Archive of SID

تفاوت در بازده، کمیت و کیفیت ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس‌ها به دلیل تفاوت در منطقه جغرافیایی کشت بادرنجبویه، میزان رطوبت، نور، دمای محیط، ارتفاع از سطح دریا، میزان بارندگی، ترکیب خاک، سن گیاه و روش استخراج آن می‌باشد.

درصد مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید توسط اسانس بادرنجبویه مریوان و استاندارد BHT به ترتیب ٪۷۲/۴۸ و ٪۹۶/۴۸ به دست آمد. در مطالعه احسانی و همکاران (Ehsani et al., 2017)، درصد مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید توسط اسانس بادرنجبویه برداشت شده از ارومیه (غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و استاندارد BHT (غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به ترتیب ٪۵۱/۲۵ و ٪۹۹/۹۹ بود، که نشان می‌دهد فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بادرنجبویه مریوان بیشتر از فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بادرنجبویه ارومیه است. گزارش شده است که اسانس بادرنجبویه وجودینا و برزیل هم فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی دارند (Mimica-Dukic et al., 2004; De Sousa et al., 2004).

اسانس بادرنجبویه مریوان فعالیت ضد سرطانی خوبی داشت. اسانس بادرنجبویه برزیل نیز سمیت سلولی خوبی علیه رده‌های سلول‌های سرطانی انسانی شامل رده‌های سلولی A549، Caco-2، MCF-7، HL-60، K562 و یک رده سلول سرطان موش B16F10 نشان داد (De Sousa et al., 2004).

اسانس بادرنجبویه مریوان فعالیت ضدمیکروبی خوبی را برعلیه میکروارگانیسم‌های بررسی شده، به خصوص باکتری‌های گرم مثبت داشت که با نتایج برخی از مطالعات دیگر نیز همخوانی دارد (Ehsani et al., 2017; Jafari and Mohamadi Sani, 2016). بر اساس گزارش احسانی و همکاران (Ehsani et al., 2017) اسانس بادرنجبویه ارومیه فعالیت ضدمیکروبی خوبی علیه اشرشیا کلی (PTCC 1533) و استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1015) نشان داد. جعفری و محمدی ثانی (Jafari and Mohamadi Sani, 2016) نیز نشان دادند که اسانس بادرنجبویه برداشت شده از مشهد فعالیت ضدمیکروبی خوبی علیه استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1431) و اشرشیا کلی (PTCC 1399) دارد. در یک مطالعه دیگر رشد سویه‌های استاندارد سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853)، اشرشیاکلی (ATCC35218)، اشرشیا کلی (ATCC25922)، باسیلوس سوبتیلیس (ATCC10707)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC6583) و سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیا کلی و کاندیدا آلبیکنس به میزان قابل توجهی توسط اسانس بادرنجبویه برداشت شده از وجودینا مهار شد (Mimica-Dukic et al., 2004). عبدالطیف و همکاران نیز فعالیت ضدمیکروبی قابل توجهی را برای اسانس بادرنجبویه برداشت شده از الجزایر علیه باسیلوس سوبتیلیس (ATCC 6633)، استافیلوکوکوس اورئوس (CIP 7625)، سودوموناس آئروژینوزا (CIP A22)، اشرشیا کلی (ATCC 10536)، کلبسیلا پنومونیه (CIP 8291) و کاندیدا آلبیکنس (IPA200) گزارش کردند (Abdellatif et al., 2014). در مطالعه جلال و همکاران (Jalal et al., 2015) نیز سویه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس توسط اسانس بادرنجبویه برداشت شده از مراکش مهار شدند. کاتیون‌های دوظرفیتی و بخش پلی‌ساکاریدی لیپوپلی‌ساکارید در غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی خاصیت آبدوستی به دست می‌آورند که از تماس عناصر آب‌گریز (اسانس) با سلول باکتری جلوگیری نموده و منجر به مقاومت بیشتر باکتری گرم منفی نسبت به اسانس می‌شوند (Akhondzadeh-Basti et al., 2014; Burt, 2004; Hashemi et al., 2013; Shojaii and Abdollahi-

www.SID.ir

Archive of SID

Fard, 2012; Moradi et al., 2014). تفاوت در فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و ضدمیکروبی اسانس بادرنجبویه در مطالعات مختلف به دلیل تفاوت در ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس‌ها و روش‌های اسانس‌گیری می‌باشد. تفاوت درغلظت اسانس و سویه‌های میکروبی بررسی شده نیز می‌تواند سبب ایجاد تفاوت در فعالیت ضدمیکروبی شود. به نظر می‌رسد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضد سرطانی مشاهده شده در اسانس بادرنجبویه مریوان به دلیل حضور مونوترپن‌های اکسیژنه شامل ژرانیول، ژرانیال، سیترال و نرال به خصوص ژرانیول –جزء اصلی اسانس بادرنجبویه مریوان– باشد. در برخی مطالعات دیگر نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بادرنجبویه به حضور ژرانیول، ژرانیال، سیترال و نرال نسبت داده شده است (Mimica-Dukic et al., 2004; Venskutionis et al., 1995). گزارش شده است که ژرانیول، تکثیر سلول‌های سرطانی روده بزرگ انسان را در شرایط آزمایشگاهی (Carnesecchi et al., 2001) و رشد تومورهای پانکراس (Burke et al., 1997)، کبد و پوست (Yu et al., 1995) را در شرایط آزمایشگاهی و در بدن موجود زنده مهار می‌کند. مونوترپن‌های اکسیژنه چربی‌دوست هستند و با ایفای نقش خود در غشای سلولی، سبب تغییر نفوذپذیری غشا و آزاد شدن محتویات سلولی می‌شوند (Moosavy et al., 2008) و به همین دلیل می‌توانند خاصیت ضدمیکروبی و سمیت سلولی بالایی را نشان دهند. در مطالعه عبدالطیف و همکاران (Abdellatif et al., 2014) فعالیت ضدمیکروبی سیترال، سیترونلال و کاریوفیلن اکسید تأیید و فعالیت ضدمیکروبی اسانس بادرنجبویه الجزایر به حضور آن‌ها نسبت داده شد.

نتیجه‌گیری نهایی

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، اسانس بادرنجبویه مریوان دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضد سرطانی خوبی است و می‌توان آن را به عنوان جایگزینی برای آنتی‌اکسیدان‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضدسرطان مصنوعی معرفی نمود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از پژوهشکده اسانس دانشگاه کاشان که مواد، وسایل و امکانات لازم جهت انجام این پژوهش را فراهم کردند، کمال تشکر و قدردانی را داریم. لازم به ذکر است که این پژوهش با کد اخلاق ۱۳۹٤۷۰۸در دانشگاه کاشان به ثبت رسیده است.

References

1. Abdellatif, F., Boudjella, H., Zitouni, A. and Hassani, A. 2014. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L. EXCLI Journal, 13: 772-781.
2. Adams, R.P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadruple mass spectroscopy. Allured Publishing Cropration, Carol Stream IL, 804 p.
3. Adinee, J., Piri, K. and Karami, O. 2009. Essential oil composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) Leaves grown in Hamadan province, Iran. Medicinal and aromatic plant science and biotechnology, 3: 58-60.
4. Akhondzadeh-Basti, A., Aminzare, M., Razavi-Rohani, S.M., Khanjari, A., Noori, N., Jebelli Javan, A., Taheri Mirghaed, A., Raeisi, M., Naghili, H. and Mohammadkhan, F. 2014. The combined effect of lysozyme and *Zataria Multiflora* essential oil on *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Medicinal Plants, 2: 27-34. [Full Text in Persian]

www.SID.ir

Archive of SID

5. Arzhang, M., Dakhili, M. and Farahani, F. 2015. Investigation of chemical compounds and anti-microbial activity of essential oil of *Melissa officinalis* L. Qom University of Medical Sciences Journal, 9: 7-13. (In Persian)
6. Bagdat, R.B. 2006. The essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), its components and using fields. Journal of the Faculty of Agriculture, 21: 116-121.
7. Baser, K.H.C. and Buchbauer, G. 2016. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. CRC Press, United States, 1128 p.
8. Beloued, A. 2009. Plantes médicinales d'Algérie. Office des Publications Universitaires, Alger, 277 p.
9. Burke, Y.D., Stark, M.J., Roach, S.L., Sen, S.E. and Crowell, P.L. 1997. Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. Lipids, 32: 151-156.
10. Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
11. Carnesecchi, S., Schneider, Y., Ceraline, J., Duranton, B., Gosse, F., Seiler, N., Raul, F. 2001. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 298: 197-200.
12. CLSI. Clinical and Laboratory Standard Institute. 2012. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: Approved standard: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 29: 1-76.
13. De Sousa, A.C., Alviano, D.S., Blank, A.F., Alves, P.B., Alviano, C.S. and Gattass, C.R. 2004. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. Journaal of pharmacy and pharmacology, 56: 677-681.
14. Ebrahimi Hariry, R. 2011. Anticonvulsant effects of hydroalcoholic extract of *Melissa officinalis* on pentylenetetrazole (PTZ) model of convulsion in mice. Journal of medicinal plant research, 5: 3803-3809.
15. Ehsani, A., Alizadeh, O., Hashemi, M., Afshari, A. and Aminzare, M. 2017. Phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of *Melissa officinalis* and *Dracocephalum moldavica* essential oils. Veterinary Research Forum, 8: 223-229.
16. Emamghoreishi, M. and Talebianpour, M.S. 2009. Antidepressant effect of *Melissa officinalis* in the forced swimming test. Daru Journal of Faculty of Pharmacy, 17: 42-47.
17. Gul, H.I., Ojanen, T. and Hänninen, O. 2002. Antifungal evaluation of bis Mannich bases derived from acetophenones and their corresponding piperidinols and stability studies. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 25: 1307-1310.
18. Hashemi, M., Ehsani, A., Jazani, N.H., Aliakbarlu, J. and Mahmoudi, R. 2013. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of essential oil and methanol extract of *Echinophora platyloba* DC against some of food-borne pathogenic bacteria. Veterinary Research Forum, 4: 123-127.
19. Ismail, M., Mariod, A., Bagalkotkar, G. and Ling, H.S. 2010. Fatty acid composition and antioxidant activity of oils from two cultivars of Cantaloupe extracted by supercritical fluid extraction. Grasas y Aceites, 61: 37-44.
20. Jafari, N.K. and Mohamadi Sani, A. 2016. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from *Melissa officinalis* leaves. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science, 11: 367-372.
21. Jalal, Z., Atki, Y.E., Lyoussi, B. and Abdellaoui, A. 2015. Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 5: 458-461.
22. Kumaran, A. and Joel Karunakaran, R. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. Food Chemistry, 97: 109-114.

www.SID.ir

Archive of SID

23. Miller, H.E. 1971. A simplified method for evaluation of antioxidant. Journal of the American Oil Chemists Society, 48: 91.
24. Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M. and Simin, N. 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 2485-2489.
25. Miraj, S., Rafieian-Kopaei, and Kiani, S. 2017. *Melissa officinalis* L: A review study with an antioxidant prospective. Journal of Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine, 22: 385-394.
26. Moosavy, M.H., Akhondzadeh Basti, A, Misaghi, A., Zahraei Salehi, T., Abbasifar, R., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Alipour, M., Emami Razavi, N., Gandomi, H. and Noori, N. 2008. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacteria cell membranes. Food Research International, 41: 1050-1057.
27. Moradi, M., Hassani, A., Ehsani, A., Hashemi, M., Raeisi, M. and Naghibi, S.S. 2014. Phytochemical and antibacterial properties of *Origanum vulgare* ssp. gracile growing wild in Kurdistan province of Iran. Journal of Food Quality and Hazards Control, 1: 120-124.
28. Pino, J.A., Rosado, A. and Fuentes, V. 1999. Composition of the essential oil *Melissa officinalis* L. From Cuba. Journal of Essential Oil Research, 11: 363-364.
29. Shojaii, A. and Abdollahi-Fard, M. 2012. Review of pharmacological properties and chemical constituents of *Pimpinella anisum*. International Scholarly Research Network: Pharmaceutics, 2012: 510795.
30. Venskutionis, P.R., Dapkevicius, A. and Baranuauskiene, M. 1995. Flavour composition of some lemon-like aroma herbs from Lithuania. Developments in Food Science, 37: 833-847.
31. Yosofi, M., Hojjati, M.R., Moshtaghi, E., Rahimiyan, R., Dawodiyan-Dehkordi, A. and Rafieian Kopaei, M. 2011. The effect of hydro-alcoholic extract of *Melissa officinalis* on learning and spatial memory in Balb/c mice. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences, 13: 51-59. [Full Text in Persian]
32. Yu, S.G., Hildebrandt, L.A. and Elson, C.E. 1995. Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice. The Journal of Nutrition, 125: 2763-2767.

www.SID.ir

Archive of SID

Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 8th Year, Volume One, Spring 2020

Evaluation of phytochemical, cytotoxic, antioxidant and antibacterial activity of of *Melissa officinalis* L. from Marivan region

Yazdani, M.[1], Jookar Kashi, F.[2*], Toluei, Z.[2], Rahimi-Moghaddam, A.[3]

[1]M.Sc., Department of Phytochemistry, Faculty of Chemistry, university of Kashan, Kashan, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, Iran
[3]M.Sc., Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, Iran

Received: 2018-12-17; Accepted: 2019-6-3

Abstract

Considering the adverse effects of synthetic antioxidants, antibiotics, and anti-cancer drugs on human health and increasing the antibiotic resistance of pathogens, it is a necessity to find safe alternative sources for these compounds. For this purpose, *Melissa officinalis* L. was collected from Marivan, Kurdestan province, and its chemical compositions and bioactivities were determined. Aerial parts of self-sowing *M. officinalis* were harvested during the flowering stage at 1320 meters above the sea level in 2016 summer. Using solvent-free microwave extraction methodessential oil of *M. Officinalis* was obtained and their component was identified by gas chromatography/mass spectrometry. The antioxidant and cytotoxicity activity of the essential oil were determined via β–carotene bleaching assay and brine shrimp lethality test, respectively. The antibacterial activity of the essential oil was evaluated by agar well diffusion method and minimum inhibitory concentrationdetermination against various types of standard and clinical microbial strains.Extraction yield of the essential oil was 1.18%, and the main componentswere geraniol (30.39%) and geranial (26.19%).Based on the results of β–carotene bleaching assay, inhibition of linoleic acid oxidation by the essential oil and BHT were 72.48% and 96.48%, respectively.Using the brine shrimp lethality test, LC_{50} of theessential oil and vincristine sulfate were obtained 62.76 µg/ml and 0.751 µg/ml, respectively.Thus, this study revealed that essential oil of *M. officinalis* had good antimicrobial activity against testedmicroorganisms, especially Gram-positive bacteria.In addition, it showed significant antioxidant, antibacterial and anticancer activities, so it seems that essential oil of *M. officinalis* may have potential use as an alternative to synthetic antioxidants, antibiotics and anticancer drugs.

Keywords: Antimicrobial, Antioxidant, Cytotoxicity, Essential oil, *Melissa officinalis* L.

[*]Corresponding author; jookar@kashanu.ac.ir

www.SID.ir