DOI: 10.22092/VJ.2020.343100.1727
شماره ۱۳۲ پاییز ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

# بررسی تأثیر اسانس و عصاره الکلی گیاه آنیسون (*Pimipinella anisum*) بر اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس به‌صورت برون‌تنی (In vitro)

• **آرش چهاردولی**
دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
• **آزاده فروغی (نویسنده مسئول)**
گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
• **محمد ابراهیم نوریان سرور**
گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹-۰۳-۰۷ تاریخ پذیرش:۱۳۹۹-۰۵-۰۷
Email: a.foroughi@razi.ac.ir

## چکیده

**به‌رغم رشد فزآینده صنعت غذا و رعایت اصول بهداشتي در تولید و فرّآوري مواد غذايي و نیز ضوابط سختگیرانه‌اي که در کارخانجات موادغذايي و یا کشتارگاه‌ها صورت گرفته است، هنوز هم درصد قابل توجهي از ساکنین کشورهاي صنعتي و غیرصنعتي از بیماري‌هاي ناشي از میکروب‌هاي مضر غذايي متأثر می‌شوند. از این رو یافتن ترکیبات و روش‌هاي جدید براي به حداقل رساندن رشد و فعالیت میکروب‌هاي مضر غذايي کاملاً ضروري به نظر مي‌رسد. این مطالعه جهت بررسی اثرات سطوح مختلف (۹ رقت) از اسانس و عصاره الکلی آنیسون (هرکدام ۵ تکرار) بر باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس انجام پذیرفت. اسانس آنیسون در رقت ۱/۳۲ گرم در میلی‌لیتر و عصاره الکلی آن در رقت‌های ۱/۴، ۱/۸ و ۱/۱۶ گرم در میلی‌لیتر، بیشترین اثر ضدمیکروبی را روی هر دو باکتری مورد مطالعه داشت. به طورکلی در هر دو روش (چاهک و دیسک) اثر اسانس و عصاره الکلی آنیسون بر باکتری اشریشیاکلی بیشتر از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بود. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس آنیسون بر باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۱/۲۵۶ و ۱/۱۲۸ گرم در میلی‌لیتر بود. MIC عصاره برای هر دو باکتری ۱/۱۶ و MBC عصاره برای اشرشیاکلی ۱/۸ و برای استافیلوکوکوس اورئوس ۱/۴ بود. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره الکلی این گیاه دارویی و غلظت‌های بالای اسانس آن فعالیت ضدمیکروبي خوبی را از خود نشان می‌دهد.**

**کلمات کلیدی: آنیسون، اسانس، عصاره الکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی**

● Veterinary Researches & Biological Products No 132 pp: 31-39

**In vitro Effects of essential oil and alcoholic extract of Anise (*Pimipinella anisum*) on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus***

*By: Chahardoli, A., Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran. Foroughi, A., (Corresponding Author) Department of Basic Sciences and Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran. and Nooriyan-Soroor, M. E., Animal Science Department, Agriculture and Natural Resource faculty, Razi University, Kermanshah, Iran.*

**Received: 2020-05-27 Accepted: 2020-07-28**

Email: a.foroughi@razi.ac.ir

In spite of the growing of food industry and the observance of the hygienic principles in production and processing of foodstuffs, as well as the strict criteria that have been put in food factories or slaughterhouses, a significant percentage of industrial and non-industrialized countries residents are affected by foodborne diseases. Therefore, it is absolutely necessary to find new compounds and methods to minimize the growth and activity of harmful microbes transmitted by foods. This study was conducted to evaluate the effects of different levels (9 serial dilutions) of *Pimipinella anisum* essential oil and alcohol extract (5 repetitions of each) on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Disk diffusion and agar well diffusion methods were applied. Anise essential oil at dilution of 1/32 g/ml and its alcoholic extract at dilutions 1/4, 1/8 and 1/16 g/ml, had the most antimicrobial effect on both bacteria. Generally, in both methods, the effect of essential oil and alcoholic extract on *E. coli* was higher than that of *S. aureus*. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum inhibitory concentration (MBC) of Anise essential oil were 1/256 and 1/128 g/ml on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, respectively. MIC for extract were 1/16 for both bacteria and MBCs for which were of 1/8 and 1/4 for *E. coli* and *S.aureus*, respectively. The results of this study revealed that the alcoholic extract of this medicinal herb and high concentrations of its essential oil show a good antimicrobial activity.

**Key words:** *Pimipinella anisum*, Essential oil, Alcoholic extract, *E. coli*, *S. aureus*

## مقدمه

به رغم رشد فزآينده صنعت غذا و رعايت اصول بهداشتي در توليد و فرّآوري مواد غذايي و نيز ضوابط سختگيرانه‌اي كه در كارخانجات موادغذايي و يا كشتارگاه‌ها صورت گرفته است، هنوز هم درصد قابل توجهي از ساكنين كشورهاي صنعتي و غيرصنعتي از بيماري‌هاي ناشي از ميكروب‌هاي مضر غذايي متأثر مي‌شوند (۱۲). از اين رو يافتن تركيبات و روش‌هاي جديدِ براي به حداقل رساندن رشد و فعاليت ميكروب‌هاي مضر غذايي كاملاً ضروري به نظر مي‌رسد. همچنين، باتوجه به عوارض جانبي داروهاي شيميايي، الزامات زيست‌محيطي و افزايش مقاومت به آنتي‌بيوتيک‌ها و اثبات فعاليت‌هاي ضدّميكروبي عصاره‌ها و اسانس‌های گياهي، استفاده از متابوليت‌های ثانويه گياهی به عنوان جايگزينی سبز برای آنها، توجه بسياری از محقّقان را در سال‌های اخير به خود جلب كرده است. يک نمونه از باكتری‌های بيماری‌زا در انسان و حيوان، اشريشياكلي (*Escherichia coli*) است كه عامل مهم عفونت‌های ادراري، بيماري اسهال مسافرتي، مننژيت نوزادان، سپتي سمي و عفونت‌هاي صفراوي است (۲-۴). گرچه اين باكتري به عنوان يك عامل بيماری‌زاي حساس به آنتي‌بيوتيك شناخته مي‌شود، اما در طي سال‌هاي اخير ايجاد مقاومت در آن سير فزاينده داشته است. استافيلوكوكوس اورئوس يا استافيلوكوكوس طلايی (*Staphylococcus aureus*) نيز عامل طيف وسيعی از عفونت‌های انسانی و حيوانی است كه شامل بيماری‌های غذايی ناشی از توليد توكسين می‌باشند (۶). در بسياری از كشورها، اين باكتری پس از سالمونلا و كلستريديوم پرفرينجنس، جزء باكتری‌های بيماری‌زايی است كه موجب شيوع مسموميت‌ها و عفونت‌های غذايی می‌گردند.

گياهان دارويی در طب سنتی و مصارف صنعتی و خوراكی كاربردهاي گسترده دارند و از آنها به عنوان چاشنی، طعم‌دهنده و حتی نگهدارنده استفاده می‌شود. جست و جو براي كشف عوامل ضدميكروبی سالم و مؤثر ادامه دارد كه می‌تواند هم از لحاظ درمانی و هم از لحاظ پيشگيري، در مورد طيف وسيعی ازعفونت‌هاي باكتريايی استفاده شود. گياهان دارويی به واسطه داشتن تركيب‌های متفاوت از زمان‌های قديم در درمان بيماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند. يكی از اين تركيب‌های مهم، اسانس‌ها يا اسانس‌های روغنی هستند كه دارای اثرات زيستی فراوان می‌باشند (۳۰). اخيراً متابوليت‌های ثانويه گياهان دارويی مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گياهی از نظر اثرات ضدميكروبی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۳۳) و مشخص شده است كه اغلب اسانس‌های گياهی استخراج شده از گياهان دارويی دارای خواص ضدقارچی، ضدانگل،

ضدباکتری و ضدویروس می‌باشند (۱۹). بنابراین اسانس‌های گیاهی در زمینه‌های فارماکولوژیکی، داروشناسی گیاهی، میکروب‌شناسی پزشکی و بالینی، آسیب‌شناسی گیاهی و نگهداری مواد غذایی، میوه‌ها و سبزی‌ها غربالگری شده و مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۰). یکی از این داروهای گیاهی، آنیسون یا بادیان رومی با نام علمی *Pimpinella anisum* است. عصاره روغنی این گیاه داراي اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی و انگلی است (۲۹ و ۲۷). از آنجایی که مطالعات اندکی در زمینه اثرات ضدباکتریایی گیاه آنیسون و اثرات ضدباکتریایی آن بر روی بیماری‌زاهای پزشکی انجام شده است، بنابراین این تحقیق جهت بررسی تأثیر گیاه دارویی آنیسون بر دو نوع باکتري بیماری‌زا و تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) این ماده بر روی این باکتری‌ها صورت گرفت.

## مواد و روش‌ها

### فعال‌سازي و تأیید خلوص باکتري‌ها

پس از فعال‌سازی سویه‌های استاندارد (*E. coli ATCC No*. 25923 و *S. aureus ATCC No*. 10536) در محیط تریپتون سویا براث (TSB) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت، از هر کدام از باکتري‌ها به محیط نوترینت آگار برده شد. در این محیط باکتري‌ها از نظر خلوص چک شدند و جهت انجام تست‌هاي ضدمیکروبی از آن‌ها استفاده شد. جهت نگهداری، سویه‌ها هر ۱۵ روز یکبار در محیط مولر هینتون آگار و دماي ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد کشت داده شدند و در دماي ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداري شدند (۳۹).

### انجام تست غربالگري اولیه جهت تعیین خاصیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی و اسانس گیاه مذکور

براي این منظور از روش انتشار در آگار (Agar well diffusion method) طبق پروتکل استاندارد CLSI (۲۰۰۶) استفاده شد. برای این کار رقت‌هاي سریالی ۲ برابری تا ۸ رقت از عصاره و اسانس در محیط مولرهینتون براث تهیه شد. سپس در هر پلیت حاوي مولرهینتون آگار، یک سوآپ از سوسپانسیون استاندارد میکروبی (معادل نیم مک فارلند) به صورت چمنی در سطح آگار کشت داده شد. پس ازآن، در هر پلیت ۴ چاهک حفر شده و از هر رقت ۵۰ میکرولیتر در هر چاهک ریخته شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دماي ۳۷ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط هوازي گرمخانه‌گذاری شدند. پس از آن ایجاد و یا عدم ایجاد هاله عدم رشد بررسی شده و گزارش شد (۳۶). بررسی خواص ضدمیکروبی در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

### سنجش حداقل رقت ممانعت‌کننده از رشد باکتري (Minimum inhibitory concentration- MIC)

این تست به روش لوله‌اي یا ماکروبراث دایلوشن (Macrobroth dilution - Tube dilution method) انجام شد. به لوله‌هاي حاوي رقت‌هاي متوالی دو برابري از عصاره و اسانس (لوله‌های ۹-۱)، میزان ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی رقیق شده افزوده شد. دو لوله نیز به عنوان کنترل عصاره (بدون دریافت محیط کشت) و کنترل محیط کشت (بدون دریافت عصاره) در نظرگرفته شد. تمام لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دماي ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و پس از آن، عدم وجود کدورت در هریک از لوله‌ها به منزله عدم رشد باکتري محسوب شده و اولین لوله‌ای که در آن رشد باکتري مشاهده نشد (لوله حاوي کمترین غلظت عصاره یا اسانس)، به عنوان کمترین غلظت ممانعت‌کننده از رشد باکتري(MIC) در نظر گرفته شد (۸).

### سنجش حداقل غلظت کشنده باکتري (Minimum bactericidal concentration-MBC)

براي تعیین حداقل غلظت کشندهٔ باکتري، از لولهٔ حاوي کمترین غلظت ممانعت‌کنندهٔ رشد باکتري و دو لوله قبل ازآن (دو رقت پایین‌تر) به طور جداگانه در پلیت‌هاي مولرهینتون آگار کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دماي ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از طی مدت زمان انکوباسیون، هر پلیتی که رشد باکتري در آن صورت نگرفته بود، به عنوان حداقل غلظت کشندهٔ باکتري از عصاره یا اسانس (MBC) در نظر گرفته شد (۱۷).

## نتایج

### اثر اسانس آنیسون بر مهار رشد باکتری

در جداول ۱ و ۲، میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در رقت‌های مختلف اسانس گیاه آنیسون به روش‌های چاهک و دیسک نشان داده شده است. تحلیل آماري داده‌ها با استفاده از برنامه آماري SPSS و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون دانکن انجام شد. در غلظت‌های پایین از اسانس آنیسون (غلظت‌های زیر g/ml ۰/۰۰۳)، تأثیر ممانعت‌کنندگی بر رشد باکتری‌های مورد نظر به روش چاهک مشاهده نشد و مشابه گروه کنترل منفی، قطر هاله عدم رشد مشاهده نشد. غلظت‌های ۰/۰۰۷ و ۰/۰۰۳ گرم در میلی‌لیتر اسانس آنیسون درمورد استافیلوکوکوس اورئوس و غلظت‌های ۰/۰۱۵، ۰/۰۰۷ و ۰/۰۰۳ گرم در میلی‌لیتر در مورد باکتری اشرشیاکلی تأثیر مشابهی را بر میانگین قطر هاله عدم رشد آنها داشتند. بزرگترین قطر هاله عدم رشد به روش چاهک و بیشترین اثر ضدمیکروبی برای هر دو باکتری در بالاترین سطح اسانس یعنی ۰/۰۳۱ گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد.

در روش دیسک دیفیوژن هم بیشترین هاله عدم رشد در سطوح بالای اسانس مشاهده شد و در سطوح کمتر از ۰/۰۰۳گرم در میلی لیتر، اسانس بر مهار رشد باکتری بی تأثیر بود.

### اثر اسانس آنیسون روی حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس آنیسون روی باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در جداول ۳ و ۴ نشان داده شده است. رقّت ۱/۲۵۶ (۰/۰۰۳ گرم در میلی‌لیتر) اسانس برای اشرشیاکلی و رقت ۱/۱۲۸ (۰/۰۰۷گرم در میلی‌لیتر) برای استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و نیز حداقل غلظت کشندگی (MBC) این باکتری‌ها مشخص شد.

### اثر عصاره الکلی آنیسون بر مهار رشد باکتری

میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در رقت‌های مختلف عصاره الکلی گیاه آنیسون به روش‌های چاهک و دیسک به ترتیب در جداول ۵ و ۶ نشان داده شده است. در هر دو روش و برای هر دو باکتری هاله عدم رشد مشاهده گردید که نشان‌دهنده اثر ضدباکتریایی قوی عصاره حتی در رقت‌های پایین است، هرچند با کاهش رقت عصاره، میانگین قطر هاله عدم رشد هم کاهش نشان داد. در هر دو روش (چاهک و دیسک) که اثر عصاره الکلی آنیسون بر باکتری اشرشیاکلی بیشتر از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بالاتر بود.

### اثر عصاره الکلی آنیسون روی حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس آنیسون روی باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس

جدول ۱- قطر هاله عدم رشد باکتری(روش چاهک) در رقت‌های مختلف اسانس گیاه آنیسون هاله رشد.

| رقت (گرم در میلی‌لیتر) | میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) | |
|---|---|---|
| میکروارگانیسم | اشرشیاکلی | استافیلوکوکوس اورئوس |
| ۱/۳۲ (۰/۰۳۱) | ۱۵ | ۱۳ |
| ۱/۶۴ (۰/۰۱۵) | ۸ | ۱۰ |
| ۱/۱۲۸ (۰/۰۰۷) | ۸ | ۸ |
| ۱/۲۵۶ (۰/۰۰۳) | ۸ | ۸ |
| ۱/۵۱۲ (۰/۰۰۲) | ۰ | ۰ |
| ۱/۱۰۲۴ (۰/۰۰۱) | ۰ | ۰ |
| کنترل منفی (DMSO) | ۰ | ۰ |

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد باکتری(روش انتشار در دیسک) در رقت‌های مختلف اسانس گیاه آنیسون.

| رقت (گرم در میلی‌لیتر) | میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) | |
|---|---|---|
| میکروارگانیسم | اشرشیاکلی | استافیلوکوکوس اورئوس |
| کنترل مثبت | ۲۲ (پنی سیلین) | ۱۶ (سفالکسین) |
| ۱/۳۲ (۰/۰۳۱) | ۲۲ | ۲۲ |
| ۱/۶۴ (۰/۰۱۵) | ۱۷ | ۱۷ |
| ۱/۱۲۸ (۰/۰۰۷) | ۱۲ | ۱۳ |
| ۱/۲۵۶ (۰/۰۰۳) | ۸ | ۸ |
| ۱/۵۱۲ (۰/۰۰۲) | ۰ | ۰ |
| ۱/۱۰۲۴ (۰/۰۰۱) | ۰ | ۰ |
| کنترل منفی (DMSO) | ۰ | ۰ |

در جداول ۷ و ۸ نشان داده شده است. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) از عصاره الکلی آنیسون هم برای باکتری اشرشیاکلی و هم برای استافیلوکوکوس اورئوس، رقت۱/۱۶ (۰/۰۶۲گرم در میلی‌لیتر) آن بود. حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره، رقت‌های ۱/۸ (۰/۱۲۵گرم در میلی‌لیتر) و ۱/۴(۰/۲۵گرم در میلی‌لیتر) به ترتیب برای اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس مشخص شد.

## بحث

به دلیل مقاومت انواع مختلفی از باکتری‌ها به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها پژوهش‌ها و مطالعات گسترده‌ای جهت استفاده از مواد مؤثره گیاهان به صورت عصاره و اسانس علیه پاتوژن‌های انسانی و دامی صورت گرفته است. باکتری‌های مورد مطالعه در این تحقیق می‌توانند با گذشت زمان به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم گردند. مواد شیمیایی استخراجی از گیاهان به عنوان ترکیبات ضدمیکروبی جایگزین داروهای سنتتیک مطرح شده‌اند. زیرا دارای عوارض جانبی کمتری هستند (۳۷). در کشور ما نیز اهمیت مطالعه و تحقیق روی گیاهان دارویی مشخص گردیده است.

گیاهان خانواده چتریان از جمله جنس آنیسون حاوی ترکیب‌هایی هستند که فعالیت‌های بیولوژیکی متعددی از جمله خاصیت ضدمیکروبی را نشان می‌دهند (۲۳). اثرات ضدمیکروبی گیاه آنیسون در مطالعات متعددی بررسی و گزارش شده است. اخیراً مشخص شده است که

**جدول ۳- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) اسانس آنیسون روی باکتری‌های** اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس.

| میکروارگانیسم | اشرشیاکلی | استافیلوکوکوس اورئوس |
|---|---|---|
| MIC (گرم در میلی‌لیتر) | ۱/۲۵۶ (۰/۰۰۳) | ۱/۱۲۸ (۰/۰۰۷) |

**جدول ۴- حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس آنیسون روی باکتری‌**های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس.

| میکروارگانیسم | اشرشیاکلی | استافیلوکوکوس اورئوس |
|---|---|---|
| MIC (گرم در میلی‌لیتر) | ۱/۲۵۶ (۰/۰۰۳) | ۱/۱۲۸ (۰/۰۰۷) |

**جدول ۵- قطر هاله عدم رشد باکتری(روش چاهک) در رقت‌های مختلف عصاره الکلی گیاه آنیسون.**

| رقت (گرم در میلی‌لیتر) | میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) | |
|---|---|---|
| میکروارگانیسم | اشرشیاکلی | استافیلوکوکوس اورئوس |
| ۱/۴ (۰/۲۵) | ۲۰ | ۱۴ |
| ۱/۸ (۰/۱۲۵) | ۱۸ | ۱۴ |
| ۱/۱۶ (۰/۰۶۲) | ۱۵ | ۱۲ |
| ۱/۳۲ (۰/۰۳۱) | ۱۲ | ۱۰ |
| ۱/۶۴ (۰/۰۱۵) | ۱۲ | ۹ |
| ۱/۱۲۸ (۰/۰۰۱۷) | ۱۰ | ۸ |
| کنترل منفی (DMSO) | ۰ | ۰ |

عصاره‌هاي آبی و الکلی دانه‌هاي این گیاه داراي اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی هستند (۱۴).

در مطالعه حاضر هرچه از غلظت اسانس یا عصاره در محیط کشت کاسته شد از میانگین قطر هاله عدم رشد نیز کاسته شد. بر اساس مطالعهٔ Cimanga و همکارانش (۲۰۰۲) در صورتی که قطر هاله عدم رشد برابر یا بیشتر از ۱۵ میلی‌متر باشد فعالیت بالا، قطر هاله عدم ۱۵-۱۰میلی‌متر نشان‌دهنده فعالیت متوسط و قطر هاله عدم رشد کمتر از ۱۰ میلی‌متر نشان‌دهنده غیرفعال بودن عصاره است (۷). بنابراین مطالعه حاضر نشان داد که اسانس آنیسون تنها در بالاترین سطح بکار رفته فعالیت بالا دارد و در دیگر غلظت‌ها دارای فعالیت متوسط، کم یا بدون اثر ضدمیکروبی است. و درمورد عصاره در همه غلظت‌ها فعالیت ضدمیکروبی دارد به این صورت که در غلظت‌های بالاتر فعالیت بیشتر و غلظت‌های کمتر فعالیت کمتر دارد. بنظر می‌رسد هم اسانس و هم عصاره آنیسون علیه اشرشیاکلی اثر ضدمیکروبی بیشتری نسبت به استافیلوکوکوس اورئوس داشته باشد.

در مطالعات صورت‌گرفته روی اثرات ضدمیکروبی متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی نتایج متفاوتی گزارش شده است. عدم مشاهده اثرات ضدمیکروبی بسیار خوب و متفاوت در برخی مطالعات احتمالاً به دلیل تفاوت در میزان و نوع اسانس و عصاره بکار برده شده است. عوامل متعدی در اثرات ضدمیکروبی یک گیاه موثر هستند. عواملی چون

**جدول ۶- قطر هاله عدم رشد باکتری(روش دیسک) در رقت‌های مختلف عصاره الکلی گیاه آنیسون.**

| رقت (گرم در میلی‌لیتر) | میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) | |
|---|---|---|
| میکروارگانیسم | اشرشیاکلی | استافیلوکوکوس اورئوس |
| کنترل مثبت | ۲۱ (پنی سیلین) | ۲۲ (سفالکسین) |
| ۱/۴ (۰/۲۵) | ۲۲ | ۲۰ |
| ۱/۸ (۰/۱۲۵) | ۱۹ | ۱۶ |
| ۱/۱۶ (۰/۰۶۲) | ۱۷ | ۱۲ |
| ۱/۳۲ (۰/۰۳۱) | ۱۶ | ۱۰ |
| ۱/۶۴ (۰/۰۱۵) | ۱۲ | ۹ |
| ۱/۱۲۸ (۰/۰۰۱۷) | ۱۲ | ۸ |
| کنترل منفی (DMSO) | ۰ | ۰ |

**جدول ۷- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره الکلی آنیسون روی باکتری‌های** اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس.

| میکروارگانیسم | اشرشیاکلی | استافیلوکوکوس اورئوس |
|---|---|---|
| MIC (آنیسون، گرم در میلی‌لیتر) | ۱/۱۶ (۰/۰۶۲) | ۱/۱۶ (۰/۰۶۲) |

**جدول ۸- حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره الکلی آنیسون روی باکتری‌های** اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس.

| میکروارگانیسم | اشرشیاکلی | استافیلوکوکوس اورئوس |
|---|---|---|
| MBC (آنیسون، گرم در میلی‌لیتر) | ۱/۸ (۰/۱۲۵) | ۱/۴ (۰/۲۵) |

میزان اسانس گیاه، روش عصاره‌گیری و نوع حلال مورد استفاده، نوع محیط کشت و مواد موجود در آن و غلظت عصاره می‌تواند بر اثرات ضدمیکروبی گیاه اثر بگذارد (۹، ۲۵ و ۲۸). بر اساس نتایج مطالعات انجام شده در ایران، ترکیه و تونس بر روی اثرات ضدمیکروبی اسانس‌های برخی از اعضای خانواده چتریان، این اثر تأیید گردیده است (۱، ۱۱ و ۳۱). عامل دیگری که ممکن است اثرات ضدمیکروبی عصاره یک گیاه را تحت تأثیر قرار دهد، روش عصاره‌گیری و نوع حلال مورد استفاده می‌باشد. عصاره‌هایی که با روش‌ها و حلال‌های متفاوت از یک گیاه استخراج می‌شوند، می‌توانند اثرات ضدمیکروبی متفاوتی بر روی گونه‌های خاص میکروارگانیسم‌ها از خود نشان دهند (۲۲). برخی دانشمندان نشان دادند که عصاره اتانولی برگ‌های گیاه *Cassia alata* اثر ضدقارچی برعلیه چهار گونه قارچی دارد، اما بر روی مخمرها و گونه‌های باکتریایی بی‌تأثیر است (۱۶). اما اثرات ضدباکتریایی عصاره متانولی این گیاه توسط Khan و همکاران ثابت گردید (۱۸). در مطالعات دیگری نیز محققین به تفاوت اثر عصاره‌های مختلف مهر تایید زده‌اند. به عنوان مثال Penna و همکاران گزارش کرده‌اند که تنها عصاره کلروفرمی گیاه *Myrcianthes cisplatensis* بر روی باسیلوس سوبتیلیس اثر مهارکننده دارد و عصاره‌های هیدروالکلی، متانولی و آبی بی‌اثر است. احتمالاً تفاوت حساسیت میکروارگانیسم‌های گوناگون به مواد ضدمیکروبی به علت ساختار متفاوت میکرارگانیسم‌ها می‌باشد (۲۴).

غلظت‌های متفاوت عصاره نیز در تأثیر اثر ضدمیکروبی مؤثر است و همانند تحقیق حاضر در مطالعات متعددی با تغییر میزان غلظت عصاره، اثرات ضدمیکروبی گیاه تغییرکرده است. محیط کشت‌های مورد استفاده در آزمون‌های ضدمیکروبی نیز تأثیر به‌سزایی در خواص ضدمیکروبی عصاره‌ها دارد. تأثیر اسانس‌های گیاهی هنگام استفاده در محیط‌های درون تنی (In vivo) کاهش می‌یابد که این به دلیل محتوای بالای چربی و پروتئین در این محیط‌ها (مانند گوشت) می‌باشد که سبب کاهش تأثیر این ترکیبات ضدمیکروبی می‌گردد. البته شرایط محیطی نیز تأثیرگذار می‌باشد (۱۵).

استفاده از اندام‌های مختلف گیاه نیز در اثر ضدمیکروبی عصاره تأثیر دارد. Kudi و همکاران بخوبی اثرات متفاوت ضدمیکروبی پوست و برگ برخی از گیاهان را نشان داده‌اند (۲۰).

در مطالعه انجام شده توسط Singh و همکاران، اثرات حداقل غلظت ممانعت‌کننده MIC (Minimum Inhibitory Concentration) سینرژیستیک عصاره آلی سیر و نیسین (Nisin) بر روی شش سویه لیستریا مونوسایتوژنز در یک محیط کشت Triptose Phosphate Broth مورد بررسی قرار گرفت و تاثیرات سینرژیستیک ضدباکتریایی بر روی سویه‌های لیستریا در هنگام استفاده از این دو ماده با هم مشاهده شد، علاوه بر این، تاثیر سایر فاکتورهای رشد از قبیل pH و درجات حرارتی ۲۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که افزایش pH باعث کاهش تاثیر هر دو ماده (نیسین و عصاره آلی سیر) گردید. در ضمن تاثیر هر دو ماده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بیشتر از دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بود (۲۸).

نتایج حاصل از مطالعات صورت‌گرفته نشان می‌دهد که بالا بودن ترکیبات فنلی دلیل عمده بالا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی بعضی از عصاره‌ها از جمله عصاره‌هاي متانولی و اتانولی باشد. زیرا بر اساس شواهد موجود ارتباط مثبتی بین میزان ترکیبات فنلی و قدرت آنتی‌اکسیدانی گیاهان وجود دارد. از طرف دیگر به نظر می‌رسد که ترکیبات فنلی که به صورت گسترده در گیاهان یافت می‌شوند و قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند، بیشتر از طریق عصاره‌هاي گیاهی در مقایسه با اسانس آن‌ها قابل استخراج باشد (۱۳، ۲۱، ۲۶، ۳۲، ۳۵ و ۳۸). برکات و همکاران نشان دادند که اثرات ضدباکتریایی این ترکیبات به دلیل ایجاد تورم، تغییرشکل قسمتی از دیواره باکتری، ایجاد سوراخ در دیواره مذکور و در نتیجه ممانعت از رشد این باکتری‌ها می‌باشد. در باکتری سالمونلا تیفی موریوم مواد فنلی موجود در اسانس آویشن شیرازی در اثر واکنش با غشاء خارجی باکتری سبب تغییر در ساختمان غشاء شده و منجر به اختلال در عمل نفوذپذیری غشاء می‌گردد و در نتیجه آن نفوذ نیسین تسهیل می‌گردد (۵).

از آن‌جایی که قسمت اعظم ماده مؤثره موجود در اسانس میوه آنیسون، آنتول می‌باشد (۳۴) و با توجه به اینکه در ترکیب گیاه آنیسون فلاونوییدها و فنیل پروپانوییدها و بعضی ترپن‌ها به مقدار ناچیز وجود دارد، با وجود این خاصیت آنتی‌اکسیدانی ثابت شده در این دسته از مواد محسوس نیست و شاید اثرات ضدمیکروبی کم اسانس به ویژه در سطوح پایین آنیسون در این مطالعه به همین علت باشد.

بطورکلی محققین متعددی اعلام کرده‌اند که گاهی مقایسه نتایج حاصل از آزمایش عصاره‌های گیاهی با نتایج انتشاریافته بسیار مشکل است، زیرا چندین متغیر نتایج را تحت تأثیر قرار می‌دهند. متغیرهایی مانند شرایط محیطی و آب‌وهوایی منطقه‌ای که گیاه در آن رشد می‌کند، انتخاب نوع عصارهٔ گیاه، روش عصاره‌گیری، روش انجام تست ضدمیکروبی و میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش. بنابراین، استانداردکردن روش‌های عصاره‌گیری و آزمایشات برون تنی (In vitro) برای جستجوی داروهای ضدمیکروبی جدید از گیاهان بسیار مفید خواهد بود تا نتایج به صورت سیستماتیک‌تر و تفسیر آن‌ها ساده‌تر و صحیح‌تر صورت گیرد.

## نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره الکلی این گیاه دارویی و غلظت‌های بالای اسانس آن فعالیت ضدمیکروبي خوبی را از خود نشان می‌دهد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از دانشگاه رازی کرمانشاه در فراهم آوردن امکان انجام این تحقیق اعلام می‌دارند.

## منابع مورد استفاده

1.Abdelwahed, A., Hayder, N., Kilani, S., Mahmoud, A., Chibani, J., Hammami, M., et al., 2006. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian Pituranthos toruosus (Coss). *Flavour and Fragrance Journal*, 21: 120-133.

2. Ahmadi, E., K. Mardani and A. Amiri. 2020. Molecular Detection and Antimicrobial Resistance Patterns of Shiga Toxigenic Escherichia coli Isolated from Bovine Subclinical Mastitis Milk Samples in Kurdistan, Iran. *Archives of Razi Institute*. 75: 169-177.

3.Amini, A. and Farahmand, S.H., 2001. Bactereal diseases, Harrison principles of internal medicine.-. Arjmand publication. First edition. pp: 328- 494.

4. Bakhteyari, H., R. Jahangiri, N. Nazifi, A. Kakanezhadifard, Z. Soleimani, A. Forouharmehr, S. Azadi Chegeni and A. Jaydari. 2019. Cloning and Expression of Com1 and OmpH Genes of Coxiella burnetii in Periplasmic Compartment of Escherichia coli with the Aim of Recombinant Subunit Vaccine Production. *Archives of Razi Institute*. 74: 341-347.

5.Barakat, S.M., Mahmoud, K., Yamazaki, K., Miyashita, S.H., Suzuki, T., 2006. A new technology for fish preservation by combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds. *Journal of Food Chemistry*. 99: 656-662.

6.Blackburn, C.W. and Peter, J.M. 2002 Foodborne pathogens, hazard, risk analyses and control. - CRC press. pp: 385-390.

7.Cimanga, K., Kambu, K., Tonal, A.S., De Bruyne, T., Hermans, N., et al., 2002. Correloation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharnacology*. 79: 213-220.

8.Clinical and laboratory standards institute (CLSI). 2006. M7-A7. 26(2).

9.Cosentino, S., Tuberoso, C.L.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Araedi, E., Planas, F., 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. 29: 130-135.

10.Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G., 2000. GC–MS Analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on Penicillium digitatum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 2576-2581.

11.Erdurak, C.S., Coskun, M., Demirci, B., Baser, K.H.C., 2006. Composition of the essential oil of fruits and roots of Ferulago isaurica Pesmen and F. syriaca Boiss. (Umbelliferae) from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*. 21: 118-121.

12.Fazeli, M.R., Amin, G.H., Ahmadian A., Attari, M.M., Ashtiani, H., Jamalifar, H., Samadi, N., 2007. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-eshirazi (Zataria multiflora) against some food-borne bacteria. *Journal of Food Control*. 18: 646-649.

13.Fluchiger, R. and Winter Halter, K.H., 1978. Biochemical and clinical aspects of hemoglobin 1 aspects of hemoglobin abnormalities. - New York: Academic Pres. pp: 208- 210.

14.Gülcin, I., Oktay, M., Kirecci, E., Küfrevioglu, O.I., 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (Pimpinella anisum L.) seed extracts. *Food Chemistry*. 83: 371-382.

15.Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*. 124: 91–97.

16.Ibrahim, D. and Osman, H., 1995. Antimicrobial activity of Cassia alata from Malaysia. *Journal of Ethnopyarmacology*. 45: 151-156.

17.Jaberian, H., Piri, K.H., Nazari, J., 2013. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. *Food chemistry*. 136: 237-244.

18.Khan, M.R., Kihara, M., Omoloso, A.D., 2001. Antimicrobial activity of Cassia alata. *Fitoterapia*. 75: 561-564

19.Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., Yildirim, A., 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of Artemisia dracunculus and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish Artemisia absinthium, A. dracunculus, Artemisia santonicum, and Artemisia spicigera essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 9452–9458.

20.Kudi, A.C., Umoh, J.U., Eduvio, L.O., Gefu, J., 1999. Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 67: 225-228.

21.List PH, Schmidt PC. Phytopharma ceutical technility. London: Heyden and Son Co. 1989; 214.

22.Nostro, A., Gernano, M.P., Angelo, V.A., Marino, A., Cannatelli, M.A., 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*. 30: 379-384.

23.Pae, H.O., Oh, H., Yun, Y.G., Oh, G.S., Jang, S.I., Hwang, K.M., Kwon, T.O., Lee, H.S., Chung, H.T., 2002. Imperatorin, a furanocoumarin from Angelica dahurica (Umbelliferae), induces cytochrome c-dependent apoptosis in human promyelocytic leukaemia, HL-60 cells. *Journal of Pharmacology and Toxicology*. 91: 40-48.

24.Penna, C., Marino, S., Virot, E., Cruanes, M.C., Munoz, J., Cruanes, J., et al., 2001. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from Sebastiania brasiliensis. *Journal of Ethnopharmacology*. 77: 37- 40.

25.Rasodi, I. and Mirmostafa, S.A., 2003. Bacterial susceptibility to and chemical composition of Thymus persiscu. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 2200-2205.

26.Regnstrom, J., Nilsson, J., Tornvall, P., Landon, C., Hamsten, A., 1992. Susceptibility to low- density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet*. 339: 1183-1184.

27.Singh, G., Kapoor, I.P.S., Pandey, S.K., Singh, U.K., Singh,

R.K., 2002. Studies of essential oils. Part 10. Antibacterial activity of volatile oils of some spices. *Phytotherapy Research*. 16: 680-682.

28.Singh, A., Singh, R.K., Bhunia, A.K., Singh, N., 2003. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against, Listeria monocytogenes in hotdogs. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*. 36: 787-799.

29.Soliman, K.M. and Badeaa, R.I., 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*. 40: 1669-1675.

30.Soltanipour, M.A., 2003. Comparison of essential oil composition of Zhumeria majdae leaves from different regions of Hormozgan province at different stages of growth and investigation of allelopathic potential and antimicrobial properties of extracted essential oils. MSc thesis, Faculty of Science [In Persian].

31.Sonboli, A., Azzizin, D., Yousefzadi, M., Kanani, M.R., Mehrabian, A.R., 2007. Volatile constituents and antimicrobial activity of Tetrataenium lasiopetalum (Apiaceae) from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*. 22:119-122.

32.Steven, P. and Gieses, H., 1994. Low density lipoprotein is saturable by pro-oxidant copper. *FEBS Letters*. 343: 188-194.

33.Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., 2004. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of Salvia cryptantha (montbretet aucher ex benth.) and Salvia multicaulis (vahl). *Food Chemistry*. 84:519–525.

34.Teissedre, P.L. and Water House, A.L., 2000. Inhibition of oxidation of human low-density poprotein by phenolic substance in different essential oils varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 3801-3805.

35.Tringali, C., 2001. Bioactive compounds from natural sources. Taylor and Francis. pp: 363- 365.

36.Valgas, C., Machado de Souza, S., Smania, E.F.A., Smania, J.A., 2007. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38: 369-380.

37.Vanden, D.A., Vlietinck, A.J., Dey, P.M., Harborne, J.B., 1991. Methods in plant biochemistry: Screening medthods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. Academic press, London. pp: 47-69.

38.Van Kampen, E.J. and Zijlstra, W.G., 1965. Determination of hemoglobin and its derivatives. *Advances in Clinical Chemistry*. 8: 1414.

38.Yousuf, M., Aslam, K.H., Wani, B.A., Aslam, N., Dar, N.A., Nawchoo, I.A., 2012. In vitro antibacterial activity and phytochemical studies of methanolic extract of leaves of Hypericum perforatum L. growing wild in Kashmir Himalaya. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 2: 414-420.