

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی، ترکیبات فنولی، اثر ضد میکروبی و برهمکنش اسانس زردچوبه و ریحان علیه برخی از باکتری های بیماری زا

افسانه سمیعی^۱، فریده طباطبایی یزدی^{۱*}، مصطفی مظاهری طهرانی^۱

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۲۸ تا ۱۳۹۷/۰۵/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۲۲)

چکیده

اسانس ها ترکیبات روغنی معطری هستند که از بخش های مختلف گیاهان به دست آمده و به صورت گسترده ای در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می گیرند. در مطالعه حاضر فعالیت آنتی اکسیدانی، ترکیبات فنولی، اثر ضد میکروبی و برهمکنش اسانس زردچوبه و ریحان علیه برخی از باکتری های بیماری زا مورد بررسی قرار گرفت. استخراج اسانس زردچوبه و ریحان با استفاده از روش تقطیر با آب انجام شد. با استفاده از تکنیک میکروداپلوشن براث و با استفاده از معرف تری فنیل تترازیولیم کلراید اثر ضد باکتریایی اسانس های مذکور با تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) بر باکتری های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *لیستریا اینوکوا*، *سالمونلا تیفی* و *انتروباکتر ائروژینوزا* بررسی شد. واکنش متقابل اسانس های زردچوبه و ریحان بر اساس شاخص FIC یا غلظت بازدارنده افتراقی بررسی شد. مقدار کل ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس ها با استفاده از روش فولین سیو کالتو و خاصیت مهار رادیکال DPPH اندازه گیری شد. توانایی مهار رادیکال DPPH، توسط اسانس های زردچوبه و ریحان به ترتیب برابر با ۱۸ و ۳۱/۲ بود. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی برای اسانس زردچوبه ۴/۶ تا ۷۳/۶ و برای اسانس ریحان ۲/۳ تا ۳۶/۸ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. حداقل غلظت کشندگی باکتری های مورد بررسی، برای اسانس زردچوبه ۹/۲ تا ۱۴۷/۲ و برای اسانس ریحان ۴/۶ تا ۷۳/۶ میلی گرم بر میلی لیتر بود. نتایج نشان داد اسانس ریحان به طور موثری رشد باکتری های مورد بررسی را کنترل نمود. شاخص بازدارندگی افتراقی اسانس زردچوبه و ریحان فعالیت هم افزایی بر باکتری های *لیستریا اینوکوا* و *انتروباکتر ائروژینوزا* نشان داد.

کلید واژگان: اسانس، میکروداپلوشن براث، شاخص بازدارندگی افتراقی، فعالیت آنتی اکسیدانی.

* مسئول مکاتبات: Tabatabai@um.ac.ir

۱- مقدمه

اسانس ها ترکیب های روغنی معطری هستند که از بخش های مختلف گیاهان به دست آمده و به صورت گسترده ای در صنایع مختلف از جمله، صنایع غذایی، صنایع داروسازی و .. مورد استفاده قرار می گیرند [۱ و ۲]. در صنایع غذایی از اسانس های گیاهی، علاوه بر جلوگیری از رشد باکتری ها و کپک های عامل فساد و مسمومیت مواد غذایی به منظور افزایش عمر ماندگاری غذاهای فرایند شده در سیستم های مختلف مواد غذایی نیز استفاده می گردند [۳ و ۲].

متابولیت های ثانویه به صورت پیش سازهای غیر فعال شده در بافت های مختلف گیاهی ذخیره و تولید می شوند، این پیش سازها در پاسخ به استرس و تغییرات محیطی فعال و آزاد می شوند. ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدها، فلاوونول ها، آلکالوئیدها و گلیکوزیدها از جمله مواد پیش ساز در بافت های گیاهی می باشند. با توجه به تحقیقات گسترده ای که توسط محققان و پژوهشگران در سال های اخیر انجام شده است، مشخص گردیده است که این ترکیبات دارای اثر ممانعت کنندگی و کشندگی میکروارگانیسم های بیماری زا هستند و مورد توجه قرار گرفته اند [۴]. بنابراین اسانس های گیاهی در زمینه های مختلفی از جمله فارماکولوژیکی، داروشناسی گیاهی، میکروبیولوژی مواد غذایی و و نگهدارنده های مواد غذایی مورد استفاده قرار می گیرد [۲].

آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که به طور مؤثر با کنترل رادیکال های آزاد از اکسیداسیون جلوگیری کرده و یا موجب کاهش سرعت آن می شوند [۵]. امروزه استفاده از آنتی اکسیدان های سنتزی در پزشکی، کشاورزی و صنایع دارویی بسیار رواج یافته است. اما مطالعات متعددی حاکی از سمیت این آنتی اکسیدان ها می باشد [۶]. به همین دلیل یافتن آنتی اکسیدان های طبیعی به ویژه از منابع گیاهی مورد توجه قرار گرفته است.

ریحان با نام علمی (*Ocimum basilicum*)، گیاهی از تیره نعناع است که به عنوان یک گیاه دارویی در طب سنتی ایران مورد استفاده قرار می گیرد. اسانس ریحان سرشار از ترکیبات فنیل پروپانوییدی است و در طب سنتی جهت درمان بیماری های مختلف از جمله سردرد، سرفه، انگل و دردهای کلیوی مورد

استفاده قرار گرفته است و همچنان نیز مورد استفاده می باشد. ریحان مانند سایر گیاهان خانواده نعناع منبع ترکیبات حلقوی و اسانس می باشد [۷-۹].

گیاه زردچوبه با نام علمی (*Curcuma longa*)، از خانواده زنجبیل، گیاه بومی جنوب آسیا که به عنوان یک افزودنی خوراکی در صنایع غذایی استفاده می شود. زردچوبه یک ترکیب مهم در علم پزشکی به حساب می آید که به عنوان یک ترکیب در طب سنتی جهت درمان و بهبود بیماری های کبدی مورد استفاده قرار می گیرد. زردچوبه به عنوان یک ترکیب ضد نفخ، ضد انگل نیز شناخته می شود. اثر ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی زردچوبه به دلیل رنگریزه روغنی و زرد رنگ آن با نام کورکومین می باشد. علاوه بر کورکومین ترکیبات فنولی زردچوبه که حاوی اسید فرولیک و اسید پروتوکاتکویک است، بر فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی آن مؤثر می باشد [۱۰-۱۲].

اثر ضد باکتریایی اسانس ها به روش های متفاوتی مورد بررسی قرار گرفته است. به منظور به حداقل رساندن میزان مصرف اسانس ها در صنایع غذایی و همچنین غلبه بر مقاومت باکتریایی، تعیین دقیق و همچنین بررسی وجود اثر سینرژیستی یا هم افزایی بین اسانس ها با استفاده از تکنیک میکروداپلوشن و غلظت بازدارنده افتراقی و با روش ساده شده *checkboard* مورد توجه می باشد [۲].

هدف از این پژوهش علاوه بر تعیین ترکیبات شیمیایی، فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس های ریحان و زردچوبه، بررسی اثر ضد میکروبی اسانس های زردچوبه و ریحان به پنج روش مختلف شامل دیسک دیفیوژن آگار، چاهک در آگار، میکروداپلوشن برات (MIC)، حداقل غلظت کشندگی (MBC) و برهمکنش اسانس ها به روش بازدارنده افتراقی طبق پروتکل EUCAST 2000 در شرایط آزمایشگاهی بود.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد شیمیایی و محیط کشت میکروبی

تمامی مواد شیمیایی، حلال های و محیط های کشت میکروبی شامل مولر هیتون برات و مولر هیتون آگار از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد.

زرد چوبه و ریحان با غلظت ۱۰ گرم بر لیتر، با ۲ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر از معرف Folin-Ciocalteu مخلوط شدند. بعد از ۳ دقیقه ۳۰۰ میکرولیتر از محلول Na_2CO_3 به آن ها اضافه و محلول ها به مدت ۲ ساعت تکان داده شدند. نهایتاً جذب محلول ها در ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد [۱۵].

۲-۶- روش ارزیابی میزان مهاررادیكال آزاد

استفاده از رادیكال پایدار ۲و۲- دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل DPPH به عنوان معرف جهت بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس های گیاهی، رایج می باشد. در این آزمون، رادیكال چربی دوست DPPH با آنتی اکسیدان هایی که دهنده ی هیدروژن می باشند، واکنش داده و رنگ محلول از بنفش تیره به زرد روشن تبدیل شده و در نتیجه میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر کاهش می یابد. در این روش ۳/۹ میلی لیتر از DPPH استوک ساخته شده (۰/۰۰۴ گرم DPPH در ۱۰۰ میلی لیتر متانول) را در داخل لوله آزمایش ریخته و سپس ۰/۱ میلی لیتر از اسانس های زردچوبه و ریحان به آن افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریکی قرار داده شد و میزان جذب آن در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد مهار رادیكال DPPH با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید [۱۵].

$$= \frac{[(\text{Abs control} - \text{Abs sample}) / (\text{Abs control})]}{100} \times \text{درصد مهار رادیكال های آزاد}$$

۲-۷- تعیین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی از

رشد با استفاده از روش میکروداپلوشن براث

برای این منظور از گونه های باکتری های مورد مطالعه یک کشت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در محیط کشت مولر هیتون براث (مرک آلمان) تهیه شد. محلول های استوک از اسانس های زردچوبه و ریحان تهیه شدند. از پلیت ۹۶ خانه ای جهت بررسی استفاده گردید. غلظت های مختلف اسانس با رقیق سازی محلول اصلی تهیه شد. پس از آن پلیت ۹۶ خانه ای به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از طی مدت گرمخانه گذاری

۲-۲- تهیه گونه های باکتری و آماده سازی

ریزاندامگان ها

سویه های میکروبی لیستریا اینوکوا ATCC 33090، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس PTCC 1435، سالمونلا تیغی PTCC 1609 و انتروباکتر ائروژینوزا PTCC 1221 از استوک گلیسیروول از فریزر خارج و در محیط کشت مایع مولر هیتون براث (مرک آلمان) در دمای ۳۷ درجه و به مدت ۲۴ ساعت احیا گردید. سپس از آن باکتری های در محیط کشت مولر هیتون آگار (مرک آلمان) برای تهیه کلنی خالص کشت داده شد.

۲-۳- استاندارد مک فارلند

جهت استاندارد کردن غلظت تلقیح باکتری های مورد بررسی برای آزمایش تعیین حساسیت میکروبی، از استاندارد سولفات باریم (BaSO_4)، برابر با استاندارد نیم مک فارلند استفاده شد. در این روش سوسپانسیون غلیظ میکروبی با استفاده از محلول رینگر پس از رشد ریزاندامگان بر سطح شیب دار آگار آن تهیه، سپس کدورت سوسپانسیون حاصل توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه گیری شد و تا برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ محلول استاندارد مک فارلند که در این حالت سوسپانسیون میکروبی حاوی $(1/5 \times 10^8)$ (CFU) /ml می باشد، توسط محلول رینگر رقیق شد [۱۳].

۲-۴- استخراج اسانس زردچوبه و ریحان

از هر نمونه گیاهی ۵۰ گرم به طور دقیق وزن و پس از خرد کردن توسط آسیاب براساس روش توصیه فارماکوپه بریتانیا (British Pharmacopoeia) گیاهان زردچوبه و ریحان همراه با ۷۵۰ میلی لیتر آب مقطر به روش تقطیر با آب به مدت ۳ ساعت اسانس گیری شد. سپس، اسانس با سولفات سدیم بدون آب، آبگیری و در ظرف دربسته استریل تیره رنگ، دور از نور و در یخچال نگهداری شد [۱۴].

۲-۵- بررسی محتوای فنل کل (Total

Phenol)

برای اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنولی از روش Folin-Ciocalteu استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر از اسانس

این معرف افزوده شد. اولین غلظتی که در آن رشد باکتری روی نداده و رنگ قرمز تشکیل نشد به عنوان MIC گزارش گردید [۱۶].

محلول تری فنیل تترازولیوم کلراید (chloride Triphenyltetrazolium) با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شده و به هر خانه ۲۵ میکرولیتر از

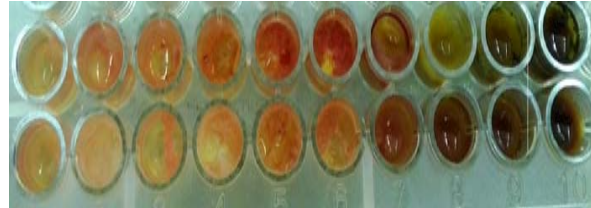


Fig 1 Determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of basil and turmeric essential oil by using 96-well plate and tetrazolium chloride indicator

A: اسانس زردچوبه B: اسانس ریحان

۲-۸- تعیین میزان حداقل غلظت کشندگی

حداقل غلظت کشندگی اسانس های زردچوبه و ریحان برای باکتری های مورد مطالعه با توجه به نتایج به دست آمده از حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد در آزمون قبل تعیین شد. میزان ۵ میکرولیتر از چاهک هایی که فاقد رشد باکتری ها بودند، به پلیت های حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرمخانه گذاری شد. پتری های که فاقد کلنی بودند به عنوان MBC گزارش شد [۱۶]. تمامی آزمایش ها در سه تکرار انجام پذیرفت.

۲-۹- برهم کنش اسانس های زردچوبه و ریحان

در فعالیت ضد باکتریایی

بررسی برهم کنش های ضد میکروبی به شکل یکی از چهار حالت احتمالی هم افزایی (Synergistic)، افزایشی (Additive)، عدم تأثیر (Indifferent) و یا کاهش اثر (Antagonistic) می باشد. با توجه به اینکه در طب سنتی ایران گیاهان دارویی به صورت مخلوط نیز مورد استفاده قرار می گیرند، واکنش متقابل اسانس های زردچوبه و ریحان با استفاده از رابطه زیر و براساس شاخص FIC یا غلظت بازدارنده افتراقی و با استفاده از روش Checkboard انجام شد. طبق پروتکل EUCAST 2000، تفسیر آن به ۴ حالت امکان پذیر است چنانچه $(FIC < 0.5)$ حالت هم افزایی، $(0.5 \leq FIC \leq 1)$ حالت افزایشی، $(1 < FIC \leq 4)$ حالت عدم تأثیر و درنهایت $(FIC > 4)$ حالت کاهش اثر می باشد [۱۷].

$$FICAB = (MICA \text{ combination} / MICA \text{ alone}) + (MICB \text{ combination} / MICB \text{ alone})$$

۲-۱۰- آنالیز آماری

تمامی آزمایش ها در سه تکرار انجام پذیرفت، برای تجزیه و تحلیل آماری داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ و آنالیز یک طرفه آنووا استفاده شد.

نتایج و بحث

با توجه به مطالعات فراوانی که در سال های اخیر توسط پژوهشگران مختلف در سرتاسر دنیا انجام شده است، مشخص گردیده که مصرف برخی از منابع غذایی گیاهی بر سلامت انسان ها موثر می باشد. این موثر واقع شدن منابع غذایی را می توان مرتبط با فعالیت آنتی اکسیدانی و ضدرادیکالی ترکیبات فیتوشیمیایی گیاهی به ویژه ترکیبات فنولی دانست. این ترکیبات می توانند در پیشگیری بسیاری از بیماری ها همانند بیماری های قلبی-عروقی و سرطان مؤثر واقع باشند [۱۸].

مقدار فنول تام موجود در اسانس های زردچوبه و ریحان برحسب گالیک اسید که یک ترکیب فنولی خالص می باشد، از روی منحنی استاندارد آن به روش فولین سیوکالچو محاسبه و در جدول شماره ۱، آورده شده است. توانایی مهار رادیکال آزاد توسط آزمایش DPPH در جدول ۱، آورده شده است. همانگونه که مشاهده می شود توانایی مهار رادیکال های آزاد توسط اسانس های زردچوبه و ریحان به ترتیب برابر با ۱۸ و ۳۱/۲ بود.

طبق بررسی های انجام شده و مقایسه نتایج این مطالعه با سایر مطالعات مشخص گردید که تفاوت هایی در میزان ترکیبات

فعالیت آنتی اکسیدانی آن نیز ۵۱/۱ گزارش شد [۲۰]، نتایج این مطالعه با پژوهش حاضر تا حدودی همخوانی داشت.

مطالعات نشان می دهد که بالا بودن ترکیبات فنلی دلیل عمده بالا بودن فعالیت آنتی اکسیدانی بعضی از عصاره ها و اسانس ها می باشد. نتایج مطالعات پیشین نشان می دهد که ارتباط مثبتی بین میزان ترکیبات فنلی و قدرت آنتی اکسیدانی گیاهان وجود دارد. نقش کلیدی ترکیب های فنلی به عنوان حذف کننده های رادیکال های آزاد در چندین مقاله گزارش شده است. لازم به ذکر است که ترکیبات فنلی به صورت موثری به عنوان دهنده هیدروژن عمل نموده لذا به عنوان یک آنتی اکسیدان موثر عمل می کنند [۲۱].

پترسون و همکاران (۲۰۰۱) فعالیت آنتی اکسیدانی را با دو روش DPPH و بی رنگ شدن بتا کاروتن اندازه گیری کردند و میزان ترکیبات فنولیک کل عصاره را تعیین کردند. این محققین نشان دادند بین میزان ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی اکسیدانی اندازه گیری شده ارتباط خوبی وجود دارد [۲۲].

Table 1 Antioxidant activities of *Curcuma longa* and *Ocimum basilicum* antioxidants using DPPH radical-scavenging activity and Total Phenolic Content (TPC, mg GAE/g dry sample)

Sample	DPPH	TPC
<i>Curcuma longa</i>	18±0.52	8.40±0.50
<i>Ocimum basilicum</i>	31.20±0.28	16.70±0.50

از میان باکتری های مورد بررسی در پژوهش حاضر، بیشترین مقاومت نسبت به هر دو اسانس مربوط به باکتری گرم منفی *اِتروباکتر/اِتروژینوزا* بوده و کمترین مقاومت را باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس* نشان داد.

از ویژگی های مهم اسانس ها و اجزاء تشکیل دهنده آن ها خاصیت آبریزی آن ها می باشد که موجب نفوذ این مواد به لیبیدهای غشاء سلول باکتری و میتوکندری ها می شود و سبب اختلال در ساختمان های آن ها و ایجاد نفوذپذیری بیشتر می گردد که در اثر آن یون ها و دیگر محتویات سلولی خارج می شود. هرچند فعالیت ضد باکتریایی اسانس ها بسیار واضح است، اما سازوکار عمل آن به طور کامل درک نشده است. بررسی های صورت گرفته در خصوص سازوکار عمل اسانس ها اثبات نموده که این ترکیب ها نفوذپذیری غشاء را افزایش می دهند. اجزاء اسانس با نفوذ به غشاء منجر به متورم شدن غشاء

فنولی و همچنین خواص آنتی اکسیدانی وجود دارد. برخی از گیاهان که غنی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی می باشند، دارای فعالیت آنتی اکسیدان قوی بوده و برخی دیگر که دارای ترکیبات مؤثر کمتری می باشند، در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی پایین تری دارند. علاوه بر آن، به عوامل بسیاری در توجیه تفاوت ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی می توان اشاره نمود. شرایط اقلیمی از جمله آب، هوا، خاک و ارتفاع از عوامل مؤثر بر رشد گیاهان دارویی بوده که می تواند در نهایت بر درصد و انواع ترکیبات شیمیایی آن ها مؤثر باشد. روش های متنوع اندازه گیری ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی اکسیدانی نیز یکی دیگر از عوامل توجیه کننده اختلاف در نتایج مطالعات می باشد [۱۹].

چالشتری و همکاران (۲۰۱۵)، فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی ریحان را مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران فعالیت آنتی اکسیدانی را با استفاده از روش رنگبری بتا کاروتن لینولیک اسید مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب فنولی اسانس ریحان ۱۸/۱ میلی گرم گالیک اسید و

در این پژوهش اثر ضد میکروبی اسانس زردچوبه و ریحان در شرایط برون تنی بر تعدادی از باکتری های بیماری زای مواد غذایی با استفاده از روش میکروآیلولوشن براث و معرف تری فنل تترازیلیوم مورد بررسی قرار گرفت. اثر ضد میکروبی اسانس های مورد بررسی همراه با تعیین مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی در جدول ۲، آورده شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که بین اسانس های مورد بررسی از نظر فعالیت ضد میکروبی اختلاف وجود دارد. حداقل غلظت مهارکنندگی برای اسانس زردچوبه ۴/۶ تا ۷۳/۶ و برای اسانس ریحان ۲/۳ تا ۳۶/۸ به دست آمد. این در حالی بود که حداقل غلظت کشندگی برای باکتری های مورد بررسی برای اسانس زردچوبه ۹/۲ تا ۱۴۷/۲ و برای اسانس ریحان ۴/۶ تا ۷۳/۶ به دست آمد. براساس نتایج فوق اثر ضد باکتریایی اسانس زردچوبه نسبت به اسانس ریحان تا حدودی کمتر بود.

با توجه به نتایج این مطالعه، از آنجایی که ترکیبات فنلی موجود در اسانس ریحان بالاتر از اسانس زردچوبه بود لذا بالاتر بودن اثر ضد میکروبی اسانس ریحان نیز نسبت به اسانس زردچوبه منطقی و مطابق با سایر پژوهش های محققان می باشد. چالشتری و همکاران (۲۰۱۵)، فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی ریحان را مورد بررسی قرار دادند. این محققان بیان کردند که اسانس ریحان بر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* موثر می باشد [۲۰]. جایا پراکاشا و همکاران (۲۰۰۱)، فعالیت ضد قارچی روغن زردچوبه را بر روی تعدادی از قارچ های بیماری زا مورد بررسی قرار دادند، نتایج این محققان نشان داد که روغن زردچوبه داری اثر ضد قارچی بر *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و *پنی سیلیوم دیجیتاتوم* و *آسپرژیلوس فلاوروس* می باشد [۲۴]. نتایج این محققان با یافته های این پژوهش مطابقت داشت.

گردیده و فعالیت آن را کاهش داده و در نهایت منجر به مرگ سلول می شود. اثر اسانس های گیاهی بر روی باکتری های گرم مثبت کمی بیشتر از تاثیر آن ها بر روی باکتری های گرم منفی است. به عبارت دیگر گرم مثبت ها نسبت به اثر آنتی باکتریال اسانس ها حساس ترند. علت حساسیت کمتر گرم منفی ها شاید به علت وجود غشاء خارجی در باکتری های گرم منفی باشد که سبب محدود شدن انتشار اجزاء هیدروفوبیک اسانس به لایه لیپولی ساکارید می باشد. به طور کلی هر چه مقادیر ترکیبات فنلی در اسانس مورد بررسی بیشتر باشد، انتظار می رود که فعالیت ضد میکروبی آن نیز بر روی سوش های بیماری زا بیشتر باشد. احتمالاً سازکار و اثر این ترکیبات موجود در اسانس ها به علت اختلال و بر هم زدن نیروی حرکت پروتونی و جریان الکتریکی یا اختلال در غشاء سیتوپلاسمی می باشد [۲۳ و ۱].

Table 2 The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of essential oils using 96 well plates.

Bacteria	(Turmeric) MIC	(Turmeric) MBC	(Basil) MIC	(Basil) MBC
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4.6	9.2	2.3	4.6
<i>listeria innocua</i>	18.4	18.4	4.6	9.2
<i>Salmonella typhi</i>	36.8	73.6	18.4	36.8
<i>Enterobacter aerogenes</i>	73.6	147.2	36.8	73.6

ترکیب اسانس زردچوبه و ریحان حالت آنتاگونیسمی مشاهده نشد.

مطالعات پیرامون بررسی برهمکنش های ترکیبات مختلف در بازدارندگی از رشد ریزاندامگان محدود می باشد. در مورد ترکیبات طبیعی، بیشتر محققان به بررسی وجود اثرات هم افزایی این ترکیبات با آنتی بیوتیک های متداول پرداخته اند، به عنوان مثال، زائو و همکاران (۲۰۰۱) اثر هم افزایی چای سبز و پنی سیلین بر *استافیلوکوکوس اورئوس* را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند [۲۵]. با این وجود در مورد اسانس زردچوبه و ریحان مطالعات مختلفی وجود داشته است که به بررسی اثر ضد میکروبی هریک به تنهایی پرداخته است که قبلاً به آن ها اشاره شد، اما تحقیقی پیرامون اثر کاربرد هم زمان آن ها بر ریزاندامگان مختلف یافت نشد تا با نتایج این پژوهش مورد مقایسه قرار گیرد.

یافته های مربوط به بر هم کنش های مواد ضد میکروبی و اثرات نهایی این بر هم کنش ها بر ریزاندامگان بیماری زا در جدول شماره ۳، آورده شده است. بررسی برهم کنش های ضد میکروبی به شکل یکی از چهار حالت احتمالی هم افزایی (Synergistic)، افزایشی (Additive)، عدم تأثیر (Indifferent) و یا کاهش اثر (Antagonistic) می باشد [۱۷].

پایین ترین کمیت های مربوط به حداقل غلظت ممانعت کننده ی اسانس زردچوبه در مؤثرترین حالت ترکیبی (مشترک) با ریحان بر باکتری های *لیستریا اینوکوا* و *انتروباکتر ائروژینوزا* بود. با توجه به میزان حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد (مشترک) محاسبه شده برای ترکیب اسانس زردچوبه و ریحان، بیشترین اثر هم افزایی بر باکتری گرم منفی *انتروباکتر ائروژینوزا* مشاهده شد. نتایج سایر ریزاندامگان به شکل افزایشی یا بی تفاوت بود و در

Table 3 Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of antimicrobial combinations and Fractional Inhibitory Concentration Indices (FICIs) of Turmeric in combination with Basil, against test organisms
Syn: synergy, Add: addition, Ind: indifference, Ant: antagonism

(A + B) interaction	FICI (A + B)	FIC (BA/B)	FIC (AB/A)	MIC _B	MIC _A	Bacteria
Gram (+)						
Ind.	3	2	1	4.6	4.6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Add	0.75	0.50	0.25	2.3	4.6	<i>listeria innocua</i>
Gram (-)						
Ind.	1.25	1	0.25	4.6	9.2	<i>Salmonella typhi</i>
Add.	0.50	0.25	0.25	9.2	18.4	<i>Enterobacter aerogenes</i>

Synergistic antibacterial activity of the essential oils from three medicinal plants against some important food-borne pathogens by microdilution method. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 26(2), 133-146.

- [3] Kalembe, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current medicinal chemistry, 10(10), 813-829.
- [4] Ahmadi, F., Kadivar, M., & Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff in model and food systems. Food Chemistry. 105: 57-64.
- [5] Leong, L. P., & Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. Food chemistry, 76(1), 69-75.
- [6] Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., & Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. Food and Chemical Toxicology, 33(7), 601-617.
- [7] Kothari, S. K., Bhattacharya, A. K., & Ramesh, S. (2004). Essential oil yield and quality of methyl eugenol rich *Ocimum tenuiflorum* Lf (syn. *O. sanctum* L.) grown in south India as influenced by method of harvest. Journal of Chromatography A, 1054(1), 67-72.
- [8] Labra, M., Miele, M., Ledda, B., Grassi, F., Mazzei, M., & Sala, F. (2004). Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. Plant Science, 167(4), 725-731.
- [9] Tahsili, J., Sharifi, M., Behmanesh, M., & Ziaei, M. (2010). gene expression of eugenol o-methyl transferase and components of

۳- نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که اسانس های زردچوبه و ریحان دارای فعالیت آنتی اکسیدانی مناسبی می باشند. این پژوهش اثبات نمود که دو اسانس مورد بررسی دارای فعالیت ضد باکتریایی قابل توجه بوده و قابلیت استفاده در صنایع غذایی و صنایع داروسازی را دارند. این مشاهده ها همچنین روشن نمود که اسانس ریحان اثر ضد باکتریایی قوی تری نسبت به اسانس زردچوبه دارد که با توجه به ترکیبات بیشتر فنلی موجود در اسانس ریحان منطقی به نظر می آید. اسانس ریحان و زردچوبه بیشترین اثر ضد میکروبی را بر باکتری گرم مثبت /استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس داشتند، درحالی که کم ترین اثر ضد میکروبی بر باکتری گرم منفی /انتروباکتر ائروژینوزا مشاهده شد. بسیاری از اسانس ها و عصاره های گیاهی اثر سودمند خود را به صورت سینرژیستی یا افزایشی بر یک یا چند محل هدف نشان می دهند. در مطالعه اخیر برهمکنش اسانس ها بر روی باکتری های لیستریا اینوکوا و انتروباکتر ائروژینوزا بیشترین اثر را دارا بود. نتایج این مطالعه مبنای علمی اثر ضد باکتریایی گیاهان مورد استفاده در طب سنتی به خصوص استفاده همزمان دو یا چند اسانس را نشان داد.

۴- منابع

- [1] Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International journal of food microbiology, 94(3), 223-253.
- [2] Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi, R., Azizi, M. A. J. I. D., & Bassami, M. R. (2010).

- [18] Alami, M., & Ghorbani, M. (2014). Evaluation of total phenolic, flavonoid, anthocyanin compounds, antibacterial and antioxidant activity of hawthorn (*Crataegus Elbursensis*) fruit acetonic extract. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 13(1), 53-66.
- [19] Cao, G., & Prior, R. L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical chemistry*, 44(6), 1309-1315.
- [20] Sharafati Chaleshtori, R., Rokni, N., Rafeian-Kopaei, M., Drees, F., & Salehi, E. (2015). Antioxidant and antibacterial activity of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil in beef burger. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17(4), 817-826.
- [21] Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoğlu, Ş., Ulusoy, E., Baltacı, C., & Candan, F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100(2), 526-534.
- [22] Peterson, D. M., Emmons, C. L., & Hibbs, A. H. (2001). Phenolic antioxidants and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. *Journal of Cereal Science*, 33(1), 97-103.
- [23] Zarali, M., Hojjati, M., Didehban, S. T., & Jooineh, H. (2016). Evaluation of chemical composition and antibacterial activities of *Echinophora cinerea* Boiss and *Stachys lavandulifolia* Vahl essential oils in vitro. *Journal of Food Science & Technology* (2008-8787), 13(52).
- [24] Jayaprakasha, Guddadarangavvanahally K., et al. "Chemical composition of turmeric oil-A byproduct from turmeric oleoresin industry and its inhibitory activity against different fungi." *Zeitschrift für Naturforschung C* 56.1-2 (2001): 40-44.
- [25] Zhao, W. H., Hu, Z. Q., Okubo, S., Hara, Y., & Shimamura, T. (2001). Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(6), 1737-1742.
- essential oils in (*Ocimum basilicum* L.) at different stages of growth.
- [10] Srimal, R. C. (1997). Turmeric: a brief review of medicinal properties. *Fitoterapia*, 68(6), 483-493.
- [11] Kumar, G. S., Nayaka, H., Dharmesh, S. M., & Salimath, P. V. (2006). Free and bound phenolic antioxidants in amla (*Emblica officinalis*) and turmeric (*Curcuma longa*). *Journal of food composition and analysis*, 19(5), 446-452.
- [12] Pezeshk, S., Rezaei, M., Rashedi, H., & Hosseini, H. (2012). Investigation of antibacterial and antioxidant activity of turmeric extract (*Curcuma Longa*) on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in vitro.
- [13] Mirzaee, M., Gharib, A., & Owlia, P. (2008). Comparison of antimicrobial effect of free and liposomal amikacin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 2(2), 43-48.
- [14] Zandi-Sohani, N., Hojjati, M., & Carbonell-Barrachina, A.A. 2013. Insecticidal and Repellent Activities of the Essential Oil of *Callistemon citrinus* (Myrtaceae) against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Neotropical Entomology*, 42: 89-94.
- [15] Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food chemistry*.
- [16] Marand, S. K., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Babaei, A. B. (2016). Inhibitory and Bactericidal Effects of Artichoke (*Cynara scolymus*) on Pathogenic Strains and Their Comparison with Antibiotics In Vitro. *Qom Univ Med Sci J*, 10(2), 31-42.
- [17] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2000). Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST Definitive Document E. Def 1.2. *Clinical microbiology and infection*, 6, 503-8.

An investigation into the antioxidant activity, phenolic compounds, antimicrobial effect and interaction of the essential oils of *Curcuma longa* and *Ocimum basilicum* on some pathogenic bacteria

Samiei, A.¹, Tabatabaei-Yazdi, F.^{1*}, Mazaheri Tehrani, M.¹

1. Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM)

(Received: 2016/07/18 Accepted:2017/09/13)

Essential oils are aromatic compounds that come from different parts of the plant and is widely used in the food industry. In the present study, it is evaluated the antioxidant activity, phenolic compounds, antimicrobial effect and interaction of the essential oils of *Curcuma longa* and *Ocimum basilicum* on some pathogenic bacteria. The essential oil was extracted through the hydrodistillation method. The antibacterial effects Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the essential oils were assessed on pathogenic bacteria, *listeria innocua*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi* and *Enterobacter aerogenes* by microdilution technique using chloride Triphenyltetrazolium. Interaction of basil and turmeric essential oils were also studied by fractional inhibitory concentration (FIC). Total phenolic content (TPC) and antioxidant capacity of essential oils were evaluated using the Folin–Ciocalteu method and DPPH assay. The DPPH of the basil and turmeric essential oil were equal to 31.2 and 18, respectively. The results showed that the ranges of minimum inhibitory concentration of the oils were 4.6-73.6 and 2.3-36.8 mg/ml, respectively, for *Curcuma longa* and *Ocimum basilicum*. the ranges of minimum bactericidal concentration of the oils were 9.2-147.2 and 4.6-73.6 mg/ml, respectively. Basil essential oil is effective to control the growth of bacteria. Moreover, the combination of basil and turmeric essential oils confirmed additive activities against the *listeria innocua* and *Enterobacter aerogenes*.

Key words: Essential oil, Microdilution broth, Fractional inhibitory concentration, Antioxidant activity

* Corresponding Author E-Mail Address: Tabatabai@um.ac.ir