Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2016; 18(104): 34-43

Identification of the Chemical Composition of Essential Oil and Evaluation of Antibacterial Activity of Methanolic Extracts from the Aerial Parts of *Ballota Platyloma* Rech. f.

Begher Seyedalipour[1*], Ali Hasani[2], Mohammad Ali Ebrahimzadeh[3], Mojtaba Mohseni[1]

1- Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
2- MSc, Department of Biochemistry, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran
3- Associate Professor, Department of Pharmacochemistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Received: 8 Aug 2015, Accepted: 23 Sep 2015

Abstract

Background: Lamiaceae family has about 200 genuses and 4000 species. The majority of species of the family have essence that was used for nutritional, cosmetic and pharmaceutical industry. The aim of this study was to investigate the chemical composition of essential oil from aerial parts of *Bollota platyloma* and antibacterial activity of it.

Materials and Methods: In this experimental study, study *Ballota platyloma*, belonging to lamiaceae family and entomic of iran, was collected from Versk region in Mazandaran provinc. Essential oil from aerial parts was obtained by hydro distillation method by using Clevenger apparatus. GC/MS analysis of essential oil was carried out to identify major volatile constituents. Extraction was prepared by maceration method. Antibacterial activity of methanolic extracts against *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Stapylococcus aureus*, *Escherichia coli* was investigated by disc diffusion method and minimal inhibitory concentration(MIC) method.

Results: Results showed that GC/MS analysis of the essential oil confirms the presence of 24 constituents in *Ballota platyloma*. The main constituents were Hexadecanoic Acid (40.03%), Germacrene D (26.6%) and Beta Caryophylene (4.76%). The results indicated that methanolic extract of *Ballota platyloma* possessed antibacterial activity. Among the aforementioned bacteria, the highest antibacterial activity was seen against *S. aureus* and the lowest activity against *P. aeruginosa.*

Conclusion: The findings of the present study showed that the major component of oil essential was germacrene-D and methanolic extract from the aerial parts of *Ballota platyloma* Rech. f. possess anti-bacterial effects. Thus, in order to find the underlying mechanism of this activity, further research should be carried out.

Keywords: Antibacterial activity, Ballota *platyloma* Rech. f., Essential oil, Germacrene D, Methanolic extracts

*Corresponding Author:
Address: Department of Cellular and Molecular Biology, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
Email: b.alipour81@gmail.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۸، شماره ۱۱ (شماره پیاپی ۱۰۴)، بهمن ۱۳۹۴، ۴۳-۳۴

شناسایی ترکیب شیمیایی اسانس و ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی بخش هوایی گیاه *Ballota platyloma* Rech. f

باقر سید علی پور[1*]، علی حسنی[2]، محمد علی ابراهیم زاده[3]، مجتبی محسنی[1]

۱- استادیار، گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۲- کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، سنندج، ایران
۳- دانشیار، گروه شیمی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۱

چکیده

زمینه و هدف: خانواده نعناعیان دارای حدود ۲۰۰ جنس و ۴۰۰۰ گونه می‌باشد. اکثر گونه‌های این خانواده دارای اسانس بوده که در صنایع مختلف دارویی، آرایشی و بهداشتی و غذایی کاربرد دارند. هدف از این مطالعه، بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس اندام هوایی گونه گیاهی *Ballota platyloma* و بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی گونه مذکور می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، گیاه *Ballota platyloma* متعلق به خانواده lamiaceae و بومی ایران از منطقه ورسک مازندران جمع‌آوری شد. اسانس‌گیری قسمت‌های هوایی گیاه به روش تقطیر با آب از طریق دستگاه کلونجر انجام شد. به منظور شناسایی ترکیب‌های عمده اسانس از GC/MS استفاده شد. عصاره‌گیری به روش ماسراسیون انجام شد. فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی برعلیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشرشیاکلی* و *باسیلوس سابتلیس* به روش انتشار از دیسک و حداقل غلظت بازدارندگی بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از بررسی اجزای اسانس به روش GC/MS، تعداد ۲۴ ترکیب را در اسانس *Ballota platyloma* اثبات کرد. هگزا دکانوئیک اسید (۴۰/۳۰ درصد)، جرماکرن دی (۲۶/۶ درصد) و بتاکاریوفیلن (۴/۷۴ درصد) ترکیبات عمده موجود در آن را تشکیل می‌دهند. نتایج نشان داد که عصاره متانولی *Ballota platyloma* دارای فعالیت ضد باکتریایی است. در میان باکتری‌های مذکور، بیشترین فعالیت ضد باکتریایی عصاره علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین فعالیت علیه *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که مهم‌ترین ترکیب اسانس جرما کرن دی بود و هم‌چنین عصاره متانولی دارای اثرات ضد باکتریایی می‌باشد. از این رو، به منظور پیدا کردن مکانیسم اساسی این فعالیت، تحقیقات بیشتری باید انجام شود.

واژ گان کلیدی: فعالیت ضد باکتریایی، *Ballota platyloma Rech. f.*، اسانس، جرما کرن دی، عصاره متانولی

* **نویسنده مسئول:** ایران، بابلسر، دانشگاه مازندران، گروه زیست سلولی و مولکولی
Email: b.alipour81@gmail.com

مقدمه

گیاهان دارویی به واسطه داشتن ترکیب‌های متفاوت از زمان‌های قدیم در درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با توجه به پراکندگی وسیع گیاهان دارویی در سطح کشور، مطالعه روی این گیاهان از نظر خصوصیات فیتوشیمیایی و خواص ضد میکروبی مفید می‌باشد. بنابراین، می‌توان از مواد دارویی با منشاء گیاهی و عوارض جانبی کمتر برای درمان عفونت‌های باکتریایی استفاده نمود(۱). اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دارای ترکیباتی با اثرات بیولوژیکی متفاوت از جمله خواص ضد میکروبی می‌باشند(۲). اسانس‌ها ترکیبات روغنی و معطری هستند که از اندام‌های مختلف گیاهان دارویی و معطر به دست می‌آیند و از نظر کمیت و کیفیت و هم‌چنین اجزاء و عناصر تشکیل دهنده از اندامی به اندام دیگر متفاوت می‌باشند(۳). اسانس‌ها مخلوطی از مواد مختلف با ترکیبات شیمیایی متفاوت بوده و از گروه ترپن‌ها هستند، دارای بوی بسیار قوی می‌باشند و وزن مخصوص آن‌ها غالبا کمتر از آب است، چون در دمای محیط و در مجاورت هوا تبخیر می‌شوند و به آن‌ها روغن‌های فرار، روغن‌های معطر و اسانس‌های روغنی می‌گویند. اسانس‌ها به طور گسترده برای طعم دهندگی غذا، هضم آسان غذا، دوام و پایداری غذا و در صنایع آرایشی برای تهیه عطرها و اسپری‌های خوشبو کننده و در صنایع بهداشتی به عنوان معطر کننده صابون و خمیر دندان و فرموله کردن شامپوهای طبی مورد استفاده قرار می‌گیرند(۴، ۵). اسانس‌ها در سلول‌ها و کرک‌های ترشحی منفرد یا مجتمع، غده‌های ترشحی، مجاری ترشحی موجود در قسمت‌های سطحی و درونی اندام‌های مختلف برگ‌ها، گل‌ها، میوه‌ها، جوانه‌ها و شاخه‌های گیاهان وجود دارند. مهم‌ترین گیاهان حاوی روغن‌های اسانسی به خانواده نعناع، کاسنی، چتریان یا جعفری و مرکبات تعلق دارند. طبق بررسی‌های به عمل آمده، ۴۰۰۰ گونه وتحت گونه گیاهی در تیره نعناع شناخته شده که دارای پراکندگی جغرافیایی وسیعی هستند. به طوری که در اغلب نواحی یافت می‌شوند، اما بیشترین پراکندگی را در منطقه مدیترانه دارا می‌باشند. گیاهان این تیره عموما علفی یک ساله یا پایا و دارای ساقه‌های راست یا خزنده هستند. برخی از آن‌ها ظاهر بوته مانند با ساقه‌های متعدد و چوبی شده دارند. گیاهان تیره نعناع، عموما برگ‌های متقابل و گاهی ساقه آغوش دارند. برگ‌های آن‌ها غالبا ساده است، به طوری که برگ‌های مرکب در آن‌ها دیده نشده است. گل‌های آن‌ها کامل، منظم، نر و ماده و مجتمع و به صورت دسته‌هایی واقع در محور ساقه در قسمت انتهایی آن می‌باشند. در برخی از گیاهان، گل‌ها به صورت منفرد بر روی ساقه ظاهر می‌گردند(۶). در بین گیاهان این تیره گونه‌های مفید به وفور یافت می‌شوند که از برخی از آن‌ها در داروسازی و پزشکی استفاده می‌شود. برخی از گونه‌های نعناع جهت تولید اسانس در سراسر دنیا برای مصارف دارویی کشت می‌شود. در طب سنتی نیزه به علت دارا بودن خاصیت ضد التهابی، ضد اسپاسم و محرک بودن جهت درمان تهوع، برونشیت، بی‌اشتهایی و ناراحتی کبدی کاربرد دارد(۷، ۸). فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس و عصاره بعضی از جنس *Ballota* بررسی شده است(۹، ۱۰).

جنس فراسیون آسا (*Ballota* L.) متعلق به تیره Lamiaceae می‌باشد. این جنس در ایران سه گونه گیاهی علفی چند ساله دارد که شامل *B. nigra L.* (فراسیون آسای سیاه)، *B. aucheri Boiss.* و یک گونه انحصاری ایران *B. platyloma* Rech. f. می‌باشد. *B. platyloma* Rech. f. یکی از گونه‌های اندمیک تیره نعناعیان در ایران است که در شمال ایران و دیلمان، خطیرکوه، فیروزکوه و ورسک مازندران انتشار دارد و گیاهی چند ساله، بوته‌ای، با ساقه‌هایی افراشته به ارتفاع ۴۰ تا ۶۰ سانتی‌متر، برگ‌ها قلبی شکل و پوشیده از کرک‌های نمدی است. جام گل به طول ۱۲ میلی‌متر وبه رنگ صورتی روشن است(۱).

مطالعات انجام شده روی گونه *Ballota nigra* نشان داد که در این گیاه ماده‌ای به نام ماروبی ئین، گلوکوساپونین و کولین وجود دارد. مصرف این گیاه موجب تسکین دردهای عصبی، معالجه بیماری پوستی و کچلی، خاصیت ضد سرفه و ضد تشنج می‌شود. هم‌چنین فرآورده‌های این گیاه اثر مدر دارد و از آن‌ها جهت رفع آب آوردن انساج، نقرس و رماتیسم استفاده می‌شود(۱۱).

خاصیت آنتی باکتریال *Ballota nigra* به علت حضور تعدادی از ترکیبات فنولیک و نیز تعدادی از ترکیبات فنیل پروپانوئید گزارش شده است(۱۲). سیسیلیانو و همکاران چندین متابولیت ثانویه گونه *Ballota Undulata* از خانواده Lamiaceae را گزارش کردند(۱۳).

اسانس‌ها با داشتن اثرات دارویی راه کارهای ویژه‌ای را در طب گیاهی گشوده‌اند. با پیشرفت دستگاه‌ها و روش‌های اندازه‌گیری و شناسایی ترکیبات اسانس، گستره پژوهشی آن افزایش یافته است. مطالعات انجام شده بر روی گونه‌های بومی ایران نشان داد که عصاره و اسانس گیاهان دارای فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی هستند(۱۴، ۱۵). با توجه به اهمیت گیاهان دارویی و پراکنش آن‌ها در ایران، بررسی ترکیبات موثره و اثرات گیاهان دارویی می‌تواند گامی مثبت در شناسایی و استفاده بهینه از گیاهان اندمیک ایران باشد. از این رو، با توجه به پیشینه مطالعات موجود در این خانواده و نقش تعیین کننده دارویی آن‌ها، این مطالعه با هدف شناسایی ترکیبات موجود در اسانس حاصل از اندام‌های هوایی (برگ، گل و ساقه) گونه گیاهی *B. platyloma* Rech. f. جمع‌آوری شده از منطقه ورسک مازندران و فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی اندام هوایی گیاه بر روی باکتری‌های استاندارد شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشرشیاکلی* و *باسیلوس سابتلیس* انجام گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، گیاه *B. platyloma* Rech. f. از منطقه‌ی ورسک استان مازندران جمع‌آوری و توسط متخصص گیاه شناسی شناسایی گردید. پس از خشک شدن بخش‌های هوایی گیاه (گل، برگ و ساقه) تحت شرایط سایه و مجاورت هوا، سپس با استفاده از آسیاب کاملا پودر گردید. برای اسانس‌گیری از ۱۰۰ گرم نمونه قسمت هوایی گیاه (گل، برگ و ساقه) خشک شده استفاده شد. اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب مقطر و از طریق دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت انجام گردید. پس از این مدت، روغن اسانسی بی‌رنگ به صورت لایه‌های مجزا روی آب تشکیل شد، که با سرنگ کاملاً تمیز از لوله آزمایش خارج و به شیشه مات منتقل شد. اسانس به دست آمده با استفاده از سولفات سدیم آب‌گیری شد، بازده اسانس مشخص گردید و تا شروع مراحل تزریق به دستگاه GC/MS تحت دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری گردید.

پس از تهیه اسانس، آنالیز ترکیبات شیمیایی آن توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) انجام شد. دستگاه GC از نوع Hewlett-Packard - HP6890 مجهز به ستونی به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرو متر از نوع HP-5MS بود. برنامه دمایی این ستون بدین صورت بود: دمای ابتدایی ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، سپس شیب حرارتی تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، همراه با افزایش تدریجی ۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه. سرعت گاز هلیم ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. طیف نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent 5975 با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری، زمان بازداری و محاسبه اندیس کواتس و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از منابع معتبر صورت گرفت.

برای تهیه عصاره متانولی از روش خیساندن (ماسراسیون) استفاده شد. پس از خشک شدن بخش‌های هوایی گیاه (گل، برگ و ساقه) تحت شرایط سایه و مجاورت هوا، سپس با استفاده از آسیاب برقی کاملا پودر گردید. مقدار ۱۵ گرم از نمونه پودرشده با ۲۰۰ میلی‌لیترمتانول ۸۰ درصد مخلوط شد. بعد از یک روز ماندگاری، فاز آلی جدا شد و مجدداً متانول اضافه گردید. این عمل سه بار تکرار شد. در نهایت کل عصاره جمع‌آوری گردید و از دستگاه تبخیر کننده چرخان برای حلال پراکنی استفاده شد و برای حذف کامل آب و تهیه پودر از فریز خشک کن استفاده شد. برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی

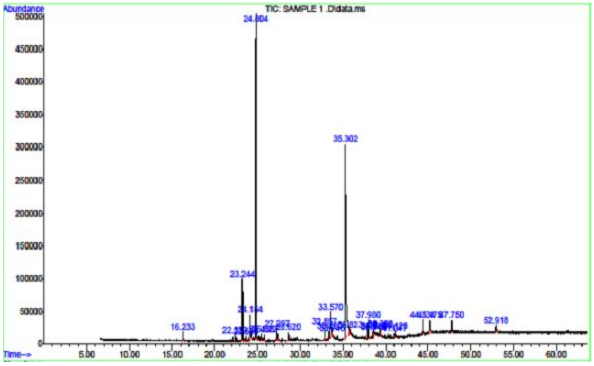
۰/۲ گرم عصاره که از روش متانولی تهیه شده بود توزین شد و با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر DMSO حل گردید. از این استوک برای تهیه غلظت‌های مختلف عصاره برای روش انتشار از دیسک و MIC استفاده شد.

فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی بخش‌های هوایی(برگ، گل و ساقه) گیاه *B. platyloma* Rech. f. به روش انتشار از دیسک بررسی شد(۱۶). میکروارگانیسم‌های استاندارد شامل دو باکتری گرم مثبت *باسیلوس سوبتیلیس* (PTCC 1156) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) و دو باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* (PTCC 1533) و *سودوموناس آئروژینوزا* (PTCC 1707) بود. باکتری‌ها در محیط کشت مایع مولر-هینتون (مِرک، آلمان) رشد داده شدند. سپس کشت متراکم و یکنواختی از باکتری‌ها به کمک سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند توسط سواپ پنبه‌ای استریل در سطح مولر-هینتون آگار (مِرک، آلمان) تهیه شد. دیسک‌های کاغذی استریل با قطر ۶ میلی‌متر (پادتن طب، ایران) و آغشته به ۳۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره متانولی حل شده در DMSO، به طور مجزا در سطح آگار قرار داده شدند. از دیسک آغشته به ۳۰ میکرولیتر حلال DMSO به عنوان شاهد منفی و دیسک آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و جنتا مایسین به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. فعالیت ضد باکتریایی عصاره گیاهی با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) سنجیده شد.

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد(۱۷)، ابتدا عصاره متانولی بخش‌های هوایی (برگ، گل و ساقه) گیاه *B. platyloma* Rech. f. با غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر در حلال DMSO تهیه شد و به کمک صافی با قطر منفذ ۰/۲۲ میکرومتر استریل شد. سپس عصاره استریل شده به محیط کشت مایع LB افزوده شد تا غلظت بین ۵ تا ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر حاصل شود. هم‌چنین فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی با آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین به عنوان شاهد مثبت و DMSO به عنوان شاهد منفی در شرایط مشابه مقایسه شد. سپس ۰/۵ درصد از کشت تازه باکتری 10^8 واحد تشکیل دهنده کلونی بر میلی لیتر به طور مجزا به هر لوله حاوی محیط کشت مایع LB و عصاره گیاهی تلقیح شد. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰ در دقیقه قرار داده شد و فعالیت ضدباکتریایی عصاره متانولی به صورت حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری‌ها سنجیده شد.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که بعد از تزریق اسانس به دستگاه GC/MS و با توجه به خروج آلکان‌های نرمال، شاخص بازداری و شاخص کواتس ترکیبات و در نهایت مقایسه آن‌ها با شاخص‌های مرجع طیف‌های مربوط به هرجسم ، ۲۴ ترکیب در اسانس اندام هوایی (گل، برگ و ساقه) گونه *B. platyloma* Rech. f. شناسایی شده که ۹۹/۱ درصد کل اسانس را تشکیل داده است. طیف کروماتوگرام در نمودار ۱ و ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده آن همراه با درصد فراوانی هر جزء و شاخص کواتس در جدول ۱ ارائه گردیده است. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، شش ترکیب شامل جرماکرن دی (۲۶/۶۴ درصد)، ترانس بتا کاریوفیلن (۴/۷۴ درصد)، پالمیتیک اسید (۴۰/۰۳ درصد)، ترانس بتا فارنس(۴/۱۹ درصد)، فیتول(۲/۰۶ درصد)، ۱، ۵ هپتا دین(۵/۵۵ درصد) و ایکوزان (۲/۴۴ درصد)، ترکیبات عمده موجود در اسانس اندام هوایی گونه *B. platyloma* Rech. f. را تشکیل دادند.



نمودار ۱. طیف GC/MS ترکیبات شیمیایی اسانس اندام هوایی(برگ،گل وساقه) گیاه *B. platyloma* Rech. f. حاصل از روش تقطیر با آب

جدول۱. درصد ترکیبات شیمیایی اسانس اندام هوایی (برگ،گل وساقه) گیاه *B. platyloma* Rech. f.

ردیف	نام ترکیب	درصد	زمان بازداری	شاخص کواتس
۱	Borneol	۰/۷۵	۱۶/۲۳	۱۰۳۰
۲	N Butylpyrole	۰/۴۵	۲۲/۲۳	۱۲۱۵
۳	Trans Beta Caryophylene	۴/۷۶	۲۳/۲۴	۱۳۷۶
۴	Trans Alpha Bergamotene	۰/۴۳	۲۳/۶۳	۱۳۶۰
۵	Trans Beta Farnesene	۴/۱۹	۲۴/۱۵	۱۳۳۹
۶	Germacrene D	۲۶/۶۴	۲۴/۸۰	۱۳۱۳
۷	Trans Alpha Bis Abolene	۰/۵۶	۲۵/۴۵	۱۴۸۶
۸	Alpha Y langene	۰/۵۱	۲۵/۸۵	۱۴۶۹
۹	Caryophyllene Oxide	۰/۹۶	۲۷/۲۹	۱۴۰۸
۱۰	H- Cyclopropa[a] Naphthalene	۱/۱۰	۲۸/۶۱	۱۵۵۰
۱۱	2,3,7-Trimethyloctanal	۱/۱۷	۳۲/۸۵	۱۶۰۰
۱۲	Dibutyl Phthalate	۰/۸۸	۳۳/۴۱	۱۷۲۱
۱۳	1,5-Heptadiene,2,5-dimethyl-3-methylene	۵/۵۵	۳۳/۵۶	۱۷۱۴
۱۴	Emersol 143	۴۰/۰۳	۳۵/۳۰	۱۸۲۶
۱۵	n- Hexadecanoic Acid	۰/۶۳	۳۵/۸۵	۱۹۹۸
۱۶	Phytol	۲/۰۹	۳۷/۹۷	۲۰۸۰
۱۷	(E)-1-(Benzyloxy)-2,3-epoxyoctane	۰/۶۳	۳۸/۵۴	۲۰۴۸
۱۸	dodecane,12-chloro-1-1-dimethoxy	۱/۰۵	۳۸/۶۱	۱۹۱۹
۱۹	Thamnolic Acid	۰/۶۶	۳۹/۳۸	۲۰۰۱
۲۰	Hydroxyamphetamine	۰/۳۶	۴۱/۰۴	۲۰۹۶
۲۱	Octadecane	۰/۵۳	۴۱/۱۲	۲۱۳۴
۲۲	Heneicosane	۱/۳۵	۴۴/۳۳	۲۴۹۷
۲۳	Bis(2-ethylhexyl)phthalate	۱/۳۹	۴۵/۱۷	۲۴۴۴
۲۴	n-Eicosane	۲/۴۴	۵۲/۹۱	۲۶۹۷

نتایج اثرات ضد باکتریایی عصاره متانولی اندام هوایی *B. platyloma* Rech. f. از طریق بررسی وجود یا عدم وجود منطقه بازداری رشد در جدول ۲ و حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) در جدول ۳ نشان داده شده است. با توجه به جدول۲، هاله عدم رشد در غلظت ۵۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس، اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب ۱/۰±۱۱/۰، ۱/۰±۹/۰، ۱/۵۲±۸/۳۳ و ۰/۰۷±۰/۶۶ مشاهده شد، در صورتی که در غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هاله عدم رشد بر روی باکتری گرم منفی مشاهده نشد. مطالعه MIC نشان داد که کمترین غلظت عصاره متانولی اندام هوایی *B. platyloma* Rech. f. جهت مهار رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس، اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب ۲۵۰،۱۵۰،۱۵۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

جدول۲. مقایسه قطر هاله عدم رشد(میلی متر) عصاره متانولی بخش هوایی *B. platyloma* Rech. f. در تیمار های مختلف میکروبی

میکرو ارگانیسم	منطقه ی عدم رشد (میلی متر)			
	کلرومفنیکل (۳۰ میکروگرم بر دیسک)	جنتامایسین (۱۰ میکروگرم بر دیسک)	غلظت عصاره متانولی (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر)	غلظت عصاره متانولی (۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر)
S.aureus ATCC 25923	۲۰/۷±۱/۵	۱۹/۶±۱/۱	۱۱/۰±۱/۰	۸/۳۳±۰/۵۷
B.subtilis PTCC 1156	NE	۱۵/۶±۰/۵	۹/۰±۱/۰	۶/۳۳±۰/۵۷
E.coli PTCC 1533	۲۱/۷±۰/۶	۲۰/۳±۱/۵	۸/۳۳±۱/۵۲	NE
P.aeruginosa PTCC 1707	۲۲/۳±۱/۲	۲۶/۰±۱/۷	۷/۶۶±۰/۰۷	NE

NE =بدون اثر
*ATCC: American Type Culture Collection
*PTTC: Persian Type Culture Collection

جدول۳. کمترین غلظت بازدارنده رشد(MIC) عصاره متانولی بخش هوایی *B. platyloma* Rech. f.

میکرو ارگانیسم	حداقل غلظت بازدارنده رشد (میکروگرم بر میلی لیتر)	
	تتراسایکلین	عصاره متانولی
S.aureus ATCC 25923	۱۰	۱۵۰
B.subtilis PTCC 1156	۲۵	۱۵۰
E.coli PTCC 1533	۲۵	۲۵۰
P.aeruginosa PTCC 1707	۵۰	۲۵۰

بحث

بررسی‌های پژوهشگران درباره ترکیباتی که در اسانس گیاهان وجود دارد نشان می‌دهد که این ترکیبات به طور جداگانه فعالیت بیولوژیکی نسبتاً خوبی از خود بروز می‌دهند. حدودا ۹۹/۱ درصد ترکیبات موجود در اسانس اندام هوایی گیاه *B. platyloma* Rech. f. شناسایی شده‌اند که مهم‌ترین آن‌ها جرماکرن دی (۲۶/۶۴ درصد) یک سزکوئی ترپن تک حلقه‌ای، یک ترکیب ضد سرطانی و ضد عفونی کننده است و در تهیه ویتامین هم مورد استفاده قرار می‌گیرد. ترانس بتا کاریوفیلن(۴/۷۵ درصد) یک سزکوئی‌ترپن دو حلقه‌ای است که در صنایع عطر سازی، صابون سازی و آرایشی و بهداشتی به کار می‌رود. ترانس بتا فارنسن(۴/۱۹ درصد) یک سزکوئی ترپن خطی است که در صنایع عطر سازی و غذایی به کار می‌رود. پالمیتیک اسید(۴۰/۰۳ درصد) یکی از مهم‌ترین اسیدهای چرب اشباع شده در گیاهان و جانوران می‌باشد. کاریوفیلن اکسید(۰/۹۶ درصد) این سزکوئی ترپن دو حلقه‌ای دارای خاصیت آفت کشی می‌باشد. فیتول(۲/۰۹ درصد) یک دی ترپن خطی الکلی و از خانواده فیتان می‌باشد که در تهیه صنعتی ویتامین به کار می‌رود. این ماده در شناساگرها، صابون‌ها، محصولات زیبایی مورد استفاده می‌باشد. کولادیس و همکاران از طریق تجزیه اسانس گیاه *Ballota pseudodictamnus* با استفاده از GC/MS نشان دادند که ۴۱/۷۴ درصد اسانس این گیاه را سزکوئی ترپن تشکیل می‌دهد که مهم‌ترین آن‌ها کاریوفیلن(۱۰/۷ درصد) و گاما مورلن(۱۱/۴ درصد) می‌باشند، در این تحقیق کاریوفیلن اکسید(۲۲/۴ درصد) و فیتول(۱۱/۹ درصد) نیز گزارش شدند(۱۸). درصد ترکیبات عمده‌ای که هم در یافته‌های این تحقیق و هم تحقیق ما یافت شد متفاوت بود، این تفاوت در گاما مورولن بود که در مطالعه ما مشاهده نشد.

بادر و همکاران گزارش کردند که ترکیب شیمیایی عمده اسانس گونه *B.undula* ، جرما کرن دی (۱۹/۱ درصد) و بی سیکلو جرما کرن(۱۱/۶ درصد) است و ترکیب عمده اسانس گونه *B. nigra ssp. Foetida* را جرما کرن دی (۲۴/۲ درصد)، بتا کاریوفیلن(۲۵/۱ درصد) و کاریوفیلن اکسید (۴/۲ درصد) تشکیل می‌دهند. هم‌چنین بادر و همکاران با آنالیز GC/MS نشان دادند که مهم‌ترین ترکیب اسانس گونه *B. saxatilis* کاریوفیلن اکسید (۱۱ درصد)، بتا کاریوفیلن(۷/۹ درصد) و جرما کرن دی (۷/۶

درصد) است(۱۹). بر طبق یافته‌های مطالعه‌ی بادر و همکاران، ترکیب عمده مشترک اسانس گیاه *B. platyloma* Rech. f. جرما کرن دی (۲۶/۶۴ درصد)، ترانس بتا کاریوفیلن(۴/۷۶ درصد) و کاریوفیلن اکسید (۰/۹۶ درصد) می‌باشد.

روستائیان و همکاران اجزای اصلی اسانس گونه *B.aucheri* را آلفا کادینول(۲۱ درصد) ودهیدرو آروما دندران (۱۱/۸ درصد) معرفی کردند که این نتایج با مطالعه ما هم‌خوانی نداشت(۲۰). مطالعات انجام شده توسط مازوجی و همکاران برروی اسانس گونه *B. Nigra* ssp. anatolica جمع‌آوری شده از جمعیت منطقه فیروزکوه به پل سفید حاکی از ۲۰ ترکیب بود که ترانس بتا فارنسن، بتا بیسابولن و کاریوفیلن اکسید و جرما کرن دی به عنوان اجزای اصلی اسانس شناسایی شدند(۲۱). در این تحقیق، از مقایسه ترکیبات فوق با ترکیبات اصلی شناسایی شده در اسانس گونه *B. platyloma* Rech. f. مشخص شد که بعضی ترکیبات مشابه ترکیبات اصلی گونه مورد مطالعه ما می‌باشند. هم‌چنین، کاظم زاده و همکاران با مطالعه برروی گونه *Ballota nigra L.* ssp. anatolica P. H. Davis در منطقه کجور مازندران تعداد ۱۲ ترکیب را شناسایی کردند که مهم‌ترین آن‌ها جرماکرین دی (۱۸/۱ درصد)، بتاکاریوفیلن (۱۰/۵ درصد)، نرولیدول اپوکسی استات (۱۵/۴ درصد)، اسکرول اکسید (۱۲/۱ درصد) و لینالیل استات (۱۱/۵ درصد) بودند(۲۲). تفاوت کمی و کیفی در ترکیب اسانس دو جمعیت ناشی از تفاوت در ویژگی‌های اکولوژیک مناطق رویشی به ویژه بافت خاک بود. مقایسه نتایج این تحقیق با نتایج محققان دیگر در ارتباط با جنس فراسیون آسا (*Ballota* L.) متعلق به تیره Lamiaccae نشان داد که اگر چه مقادیر اجزای مهم اسانس با توجه به مناطق مختلف تغییر می‌کند، ولی در این گونه ترکیبات مهم موجود در اسانس تقریبا مشترک است.

نتایج بررسی ما نشان داد که عصاره متانولی اندام هوایی گیاه *B. platyloma Rech. f.* درای اثر ضد باکتریایی موثری بر علیه باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* می‌باشد. به طوری که بیشترین تاثیر عصاره متانولی مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* (گرم مثبت) است و کمترین تاثیر مربوط به *سودوموناس آئروژینوزا* (گرم منفی) می‌باشد. همان‌گونه که در نتایج مطالعه حاضر مشاهده شد، عصاره متانولی این گیاه اثرات قابل توجهی بر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* در غلظت۵۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر داشت و فعالیت ضد باکتریایی عصاره بر باکترهای گرم منفی ضعیف‌تر بود، به طوری که *سودوموناس آئروژینوزا* بیشترین مقاومت را نشان داد. بر اساس تحقیقات صورت گرفته، باکتری‌های گرم منفی نسبت به عصاره مقاوم‌تر از باکتری‌های گرم مثبت هستند. این مقاومت احتمالا به حضور لیپوپلی‌ساکاریدها در دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی مربوط می‌شود و مانع از رسیدن ترکیبات فعال عصاره به غشاء سیتوپلاسمی باکتری گرم منفی می‌شود(۲۳). دولکر و همکاران نشان دادند که عصاره متانولی برگ *Ballota acetabulosa* اثر ضد باکتریایی قوی علیه *اشریشیا کلی* و اثرضد باکتریایی ضعیفی علیه *سودوموناس آئروژینوزا* و *کلبسیلا پنومونیا* دارد که با مطالعات ما هم‌خونی ندارد(۱۰). تحقیقات پریسیلا و همکاران نشان داد که باکتری‌های گرم منفی نسبت به عوامل شیمیایی مقاوم‌تر از انواع گرم مثبت‌ها هستند(۲۴). این نتایج با نتایج بعضی محققان در ارتباط با عدم تاثیر عصاره گیاهی یا تاثیر کمتر برخی گیاهان بر رشد باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* مطابقت دارد(۲۵، ۲۶). مطالعه انجام شده به روش انتشار از دیسک و نیز میزان MIC به دست آمده نشان داد که فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی این گیاه در مقایسه با گونه‌های دیگر بر روی سوش‌های آزمایش شده بهتر عمل کرده است.

نتیجه گیری

نتایج تست‌های ضد باکتریایی عصاره متانولی اندام هوایی گیاه *B.platyloma* Rech. F. نشان داد که گیاه حاضر هر چند در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های قوی مانند

تتراسایکلین ضعیف بود، اما در مقایسه با گونه‌ها و جنس‌های هم خانواده این گیاه فعالیت ضد باکتریایی بهتری نشان داد. نتایج حاصل از این تحقیق منجر به شناسایی ۲۴ ترکیب شد که عمده آن‌ها جرماکرن D، ترانس بتا کاریوفیلن و پالمیتیک اسید بودند. با توجه به ترکیبات مفید شناسایی شده در اسانس و هم‌چنین نقش ضد باکتریایی عصاره، پیشنهاد می‌شود عمل خالص‌سازی ترکیبات موثره موجود در قسمت هوایی اسانس *B.platyloma* Rech. F صورت گیرد و هم‌چنین فعالیت ضد میکروبی ترکیبات جدا شده به شکل مجزا بررسی گردد تا عامل اصلی ایجاد کننده اثر ضد میکروبی شناسایی شود. بنابراین، با تعیین ساختمان مولکولی، این ترکیبات شاید بتواند به عنوان یک داروی ضدمیکروبی مقرون به صرفه و با عوارض جانبی کمتر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر بهمن اسلامی که در جمع‌آوری و شناسایی نمونه همکاری نمودند و هم‌چنین از کارشناس آزمایشگاه سرکار خانم عظیمی که در کارهای آزمایشگاهی ما را یاری نمودند تشکر و سپاس‌گذاری می‌نماییم.

منابع

1. Jalali M, Abedi D, Ghasemi DN, Chaharmahali A. Evaluation of antibacterial activity of ethanol extracts of some medicinal plants against Listeria monocytogenes. 2006; 8 (3): 25 - 33.
2. De Rodrıguez DJ, Hernández-Castillo D, Rodrıguez-Garcıa R, Angulo-Sánchez J. Antifungal activity in vitro of Aloe vera pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. Industrial Crops and Products. 2005; 21(1): 81-7.
3. Omidbaigi R. Production and processing of medicinal plants. Astan Godesa Razavei Publication. 2005;1:346-7.
4. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International journal of food microbiology. 2004;94(3):223-53.
5. Kordali S, Kotan R, Mavi A, Cakir A, Ala A, Yildirim A. 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. 2005;53(24):9452-8.
6. Jamzad Z. Flora of Iran. Lamiaceae. Research Institute of Forests and Rangelands.Tehran.2012.p. 76-1066.
7. Iscan G, KIrimer N, Kürkcüoglu Mn, Baser HC, DEMIrci F. Antimicrobial screening of Mentha piperita essential oils. Journal of agricultural and food chemistry. 2002;50(14):3943-6.
8. Moreno L, Bello R, Primo-Yúfera E, Esplugues J. Pharmacological properties of the methanol extract from Mentha suaveolens Ehrh. Phytotherapy Research. 2002;16(S1):10-3.
9. Erdoğan EA, Everest A, Kaplan E. Antimicrobial activities of aqueous extracts and essential oils of two endemic species from Turkey. Indian Journal of Traditional Knowledge. 2013;12(2):221-4.
10. Dulger B, Dulger G. Antimicrobial activity of the leaves of Ballota acetabulosa on microorganisms isolated from urinary tract infections. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012;9(3):257-62.
11. Zargari A. Medicinal plants .university of Tehran press. 2011.p.104-7.
12. Didry N, Seidel V, Dubreuil L, Tillequin F, Bailleul F. Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from Ballota nigra. Journal of ethnopharmacology. 1999;67(2):197-202.
13. Siciliano T, Bader A, Vassallo A, Braca A, Morelli I, Pizza C, et al. Secondary metabolites from Ballota undulata (Lamiaceae). Biochemical systematics and ecology. 2005; 33(4): 341-51.
14. Ahmadi Z, Sattari M, Tabaraee B, Bigdeli M. Identification of the constituents of Achillea santolina essential oil and evaluation of the anti-microbial effects of its extract and essential oil. Univ J. 2011;14(56):1-10.

15. Daneshmandi S, Soleimani N, Pourfathollah AA, Sattari M. Evaluation of the drug synergistic and antibacterial effects of cuminum cyminum essential oil. Arak Medical University Journal. 2010;13(2):75-82.
16. Boyle VJ, Fancher ME, Ross RW. Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high-concentration antimicrobial disks. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1973; 3(3): 418-24.
17. Iwalokun B, Ogunledun A, Ogbolu D, Bamiro S, Jimi-Omojola J. In vitro antimicrobial properties of aqueous garlic extract against multidrug-resistant bacteria and Candida species from Nigeria. Journal of medicinal food. 2004;7(3):327-33.
18. Couladis M, Chinou I, Tzakou O, Loukis A. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Ballota pseudodictamnus L. Bentham. Phytotherapy Research. 2002; 16(8): 723-6.
19. Bader A, Caponi C, Cioni PL, Flamini G, Morelli I. Composition of the essential oil of Ballota undulata, B. nigra ssp. foetida and B. saxatilis. Flavour and fragrance journal. 2003; 18(6):502-4.
20. Rustaiyan A, Masoudi S, Ameri N, Samiee K, Monfared A. Volatile constituents of Ballota aucheri Boiss., Stachys benthamiana Boiss. and Perovskia abrotanoides Karel. growing wild in Iran. Journal of Essential Oil Research. 2006; 18(2): 218-21.
21. Mazoji A, Mahmoudi A, Akondi S. The Quantitative Comparison of Volatile Oil Composition of Ballota nigra L. subsp. anatolica P.H. Davis vs. a previous studied population. Journal of investigation and application of medical plants.2009; 2(3): 23-7.[Persian]
22. Kazemizadeh Z, Amini T, Nazari F, Habibi Z. Volatile constituents of Ballota nigra subsp. anatolica from Iran. Chemistry of natural compounds. 2009;45(5):737-8.
23. Olaleye MT. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of Hibiscus sabdariffa. Journal of Medicinal Plants Research. 2007;1(1):9-13.
24. Mazzola P, Martins A, Penna T. Chemical resistance of the gram-negative bacteria to different sanitizers in a water purification system. BMC infectious diseases. 2006; 6(1): 131-2.
25. Duraipandiyan V, Ayyanar M, Ignacimuthu S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. BMC complementary and alternative medicine. 2006;6(1):35-6.
26. Mothana RA, Lindequist U, Gruenert R, Bednarski PJ. Studies of the in vitro anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqotra. BMC complementary and alternative medicine. 2009; 9(1):7-8.