

Short report

The Comparative Study of Antibacterial Effects of Different Hydroethanolic Extracts of *Artemisia* Species against Common Bacterial Strains in Nosocomial Infections

Ramin Abiri¹, Samira Ghasemi², Nastaran Sharei³, Masumeh Shahbazi⁴, Seyed Ahmad Emami⁵, Mahdi Mojarrab*⁶

1. Department of Microbiology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
2. Department of Plant Pathology, School of Agriculture, Kurdistan University, Sanandaj, Iran
3. Students Research Committee, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
4. Department of Pharmacognosy & Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
5. Department of Traditional Pharmacy, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
6. Pharmaceutical Sciences Research Center, Research Institute for Health, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

* Corresponding author. Tel: +988334276974, Fax: +988334276493, E-mail: mmojarrab@kums.ac.ir

Article info

Article history:

Received: Dec 18, 2023

Accepted: Mar 28, 2024

Keywords:

Artemisia

Anti-bacterial Agents

Nosocomial Infections

ABSTRACT

Background: Nosocomial infections are considered as the important parts of the treatment challenges in hospitals. The genus *Artemisia* is widely distributed in Iran. Their species produce antibacterial, antiviral, and antifungal compounds belonging to different groups including phenols, terpenoids, sterols and polyacetylenes. The purpose of the present study is to investigate the *in vitro* effects of different hydroethanolic extracts of *Artemisia* species against bacterial strains in nosocomial infection.

Methods: 12 different extracts, including 50% and 70% hydroethanolic extracts were prepared from the aerial parts of *Artemisia ciniformis*, *A. turanica*, *A. kopetdagensis*, *A. khorasanica*, *A. vulgaris*, and *A. sieberi*. The winterization of the extracts produced corresponding defatted extracts. The minimum inhibitory concentration (MIC) values of the extracts against the bacterial strains *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* were measured using the microdilution broth method. Total phenolic contents were determined by the Folin-Ciocalteu method.

Results: Among the extracts analyzed in this experiment, the lowest MIC value was observed for the 50% hydroethanolic extract of *A. turanica* (0.25 mg/ml) against *S. epidermidis*. The largest range of bacterial sensitivity (6 strains) was related to the 50% hydroethanolic extracts of *A. turanica* (defatted and non-defatted) and *A. kopetdagensis* (defatted). The growth of *S. epidermidis* was inhibited by all of the extracts. The highest total phenolic content and yield of extraction were recorded for 70% hydroethanolic extract of *A. sieberi* and 50% hydroethanolic extract of *A. ciniformis*, respectively.

Conclusion: The 50% hydroethanolic extract of *A. turanica* was superior to the other extracts in terms of the *in vitro* antibacterial spectrum and selective potency. *A. turanica* and *A. kopetdagensis* are probably suitable choices for further phytochemical and antibacterial investigations.

How to cite this article: Abiri R, Ghasemi S, Sharei N, Shahbazi M, Emami S.A, Mojarrab M. The Comparative Study of Antibacterial Effects of Different Hydroethanolic Extracts of *Artemisia* Species against Common Bacterial Strains in Nosocomial Infections. J Ardabil Univ Med Sci. 2024;24(1): 107-119.

Extended Abstract

Background: Nosocomial infections - which were absent at the time of admission- occur in patients receiving medical care in hospitals or other healthcare facilities. These infections can appear during the patient's presence in the hospital or even after his / her discharge. Increases in hospitalization, long-term disability, mortality rate, antimicrobial resistance in the patients and socio-economic problems are other consequences of hospital infections. *Artemisia* L. (Astraceae) is a large, heterogeneous and worldwide distributed genus. These species are annual, biennial and perennial plants or small shrubs. Thirty-four species of the genus *Artemisia* are found in Iran, two of which are endemic. These species produce different classes of secondary metabolites such as phenolic compounds, terpenoids, steroids and polyacetylenes. A wide range of biological activities such as antibacterial, antiviral, anti-inflammatory and cytotoxic effects of these phytochemicals have been reported. Most of the previous antibacterial studies on Iranian flora have focused on the effects of volatile oils. The purpose of the present study is to compare the *in vitro* activities of 24 different hydroethanolic extracts obtained from six *Artemisia* species against nine nosocomial bacterial strains.

Methods: The aerial parts of *Artemisia ciniformis* Krasch. & M. Pop. Ex Poljak, *A. turanica* Krasch., *A. kopetdaghensis* Krasch. M. Pop. & Lincz. ex Poljak., *A. khorasanica* Podl., *A. vulgaris* L., and *A. sieberi* Besser were collected from natural habitats in northeastern Iran. The plant materials were shade dried at room temperature, finely ground and extracted by maceration method. Two types of hydroethanolic solvents with different ratios of water: ethanol (1:1 and 3:7) was used in the extraction procedures. 50 grams of each herb were separately added to 500 mL of 50% hydroethanolic solvent and the mixtures were left at room temperature for 24 hours. Then the extracts were filtered under reduced pressure. The extraction procedure was repeated on the remaining

plant material using fresh solvent in 48 and 72 hours, respectively. The filtered 50% hydroethanolic extracts of each plant species were mixed and concentrated under reduced pressure using a rotary evaporator at 45 °C. A similar sequential maceration procedure using 50 grams of finely ground plant materials with 3×500 mL of 70% hydroethanolic solvent was used in 24, 48 and 72 hours, respectively. The filtered 70% hydroethanolic extracts of each plant species were mixed and concentrated as it was mentioned above. Then, all the concentrated 50% and 70% hydroethanolic extracts were frozen and lyophilized. The winterization of a portion (1 g) of all the hydroethanolic extracts produced corresponding defatted extracts. The extraction yield was calculated as g of dry residue per 100 g of dry plant mass. Total phenolic contents of 24 extracts were determined by the Folin-Ciocalteu's colorimetric assay and the results were expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) per one gram of each dried extract, using a standard curve. The minimum inhibitory concentration (MIC) values of the extracts against the bacterial strains *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* were separately measured using the microdilution broth method. Experiments were performed in triplicate, data analysis was done using SAS software and graphs were drawn using Excel software. Means were statistically compared using Duncan's multi-range test at the 5% probability level.

Results: The highest yield of extraction (33.08%) was observed for the 50% hydroethanolic extract of *A. ciniformis*, followed by the 70% hydroethanolic extract of this plant species (29.64%). The least weight loss after winterization (20%) was also calculated in the latter extract of *A. ciniformis*. The lowest yield of the extraction was related to the defatted 50% hydroethanolic extract of *A. khorasanica*

(12.14%). The highest total phenolic content (136.18 ± 4.4 mg GAE/g of dried extract) was recorded for the 70% hydroethanolic extract of *A. sieberi*, while the lowest total phenolic content (76.19 ± 2.3 GAE/g of dried extract) was calculated for the 70% hydroethanolic extract of *A. ciniformis*. The results of the microdilution broth method showed that six strains of bacteria, including *Acinetobacter*, *M. luteus*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *S. pyogenes* were sensitive to at least one of the extracts in the concentration range of 0.25-2 mg/ml. The lowest MIC value (0.25 mg/ml) was observed for the 50% hydroethanolic extract of *A. turanica* against *S. epidermidis*, followed by the same extract of *A. ciniformis* (0.5 mg/ml) against *M. luteus*. The largest range of bacterial sensitivity (6 strains of *S. pyogenes*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *M. luteus*, *S. aureus* and *Acinetobacter*) was related to three extracts: the 50% hydroethanolic extracts of *A. turanica* and *A. kopetdagensis* and the defatted 50% hydroethanolic extract of *A. turanica*. The growth of *S. epidermidis* was inhibited by all of the extracts. The growth of three other bacterial strains (*E. faecalis*, *K. pneumoniae* and *E. coli*) was not inhibited by any of the 24 extracts.

Conclusion: In a general view, 50% hydroethanolic extracts had more inhibitory

effects (48 cases of MIC values recorded) against the bacteria used in this research, compared to 70% hydroethanolic extracts (40 cases of MIC values recorded). Also, in this study, 39 cases of MIC values were recorded for the extracts before winterization; while the number of recorded MIC values increased to 49 after the aforementioned procedure. Therefore, it can be concluded that the antimicrobial compounds extracted from these plant species have better solubility in more polar solvents. There are also cases that are contrary to the general trend, which are undoubtedly caused by the phytochemical content differences of these species. In the present study, the 70% hydroethanolic extract of *A. sieberi* had the highest content of total phenolics; but none of the broadest or most powerful antibacterial effects were seen in this extract. Also, the strongest effect against *Micrococcus luteus* was recorded for an extract (50% hydroethanolic extract of *A. ciniformis*) with a low phenolic content. So, the total phenolic content is not the only determining factor in the ability of the plant extracts to exert antibacterial effects. This is consistent with the reported antimicrobial effects of other phytochemicals in the previous studies.

مجله دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دوره بیست و چهارم، شماره اول، بهار ۱۴۰۳

گزارش کوتاه

بررسی مقایسه‌ای اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف هیدرواتانولی گونه‌های درمنه علیه سویه‌های شایع در عفونت‌های بیمارستانی

رامین عبیری^۱، سمیرا قاسمی^۲، نسترن شارعی^۳، مصصومه شهبازی^۴، سید احمد امامی^۵، مهدی مجرب^{۶*}

۱. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۲. گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
۳. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۴. گروه فارماکوگنوزی و زیست فناوری دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۵. گروه داروسازی سنتی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۶. مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۳۴۲۷۶۹۷۴ - فاکس: ۰۳۴۲۷۶۴۹۳. پست الکترونیک: mmojarrab@kums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: عفونت‌های بیمارستانی سهم قابل توجهی از چالش‌های درمانی بیمارستان‌ها را تشکیل می‌دهند. جنس درمنه به طور گسترده‌ای در ایران پراکنده است. گونه‌های این جنس طیفی از ترکیبات زیستی ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد التهابی و ضد قارچی متعلق به گروه‌های مختلف شامل فنول‌ها، ترپن‌وئیدها، استرون‌ها و پلی‌استیلن‌ها را تولید می‌کنند. هدف از مطالعه‌ی حاضر، مقایسه اثرات برونتی عصاره‌های مختلف هیدرواتانولی گونه‌های درمنه علیه سویه‌های باکتریایی عامل عفونت‌های بیمارستانی است.

روش کار: ۱۲ عصاره هیدرواتانولی مختلف مشتمل بر عصاره‌های ۵۰٪ و ۷۰٪ هیدرواتانولی از اندام هوایی درمنه‌های طلایی، معمولی، خراسانی، کپه داغی، دشتی و قرمز تیه شد. سرماده‌ی به عصاره‌ها منجر به چربی زدایی آن‌ها شد. کمترین مقادیر غلظت مهار کننده رشد (MIC) عصاره‌ها علیه سویه‌های باکتریایی استافافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پیوژنر، آسینتوباکتر، سودوموناس آئروژنوزا، اندروکوکوس فکالیس، استافافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، میکروکوکوس لوئوس، کلسبیلا پنومونیه و اشرشیا کلای به روش میکرودایلوشن براث تعیین گردید. محتواهای تام فنولی عصاره‌های فوق، با روش فولین سیو کالتیو تعیین شد.

یافته‌ها: از مجموع عصاره‌های بکار رفته در این آزمایش پایین‌ترین MIC برای عصاره ۵۰٪ هیدرواتانولی درمنه قرمز به میزان (mg/ml) ۰/۲۵ - علیه استافافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مشاهده شد. بزرگترین گستره‌ی حساسیت باکتریایی (شش سویه) مربوط به عصاره ۰/۵٪ (بعد و قبل از چربی زدایی) درمنه قرمز و عصاره ۰/۵٪ (بعد از چربی زدایی) درمنه کپه داغی بود. رشد استافافیلوکوکوس اپیدرمیدیس توسط تمامی عصاره‌ها مهار شد. بالاترین محتواهای تام فنولی و بیشترین بازده عصاره گیری به ترتیب برای عصاره‌های هیدرواتانولی ۰/۷٪ درمنه دشتی و ۰/۵٪ درمنه طلایی ثبت شدند.

نتیجه‌گیری: عصاره ۵۰٪ هیدرواتانولی درمنه قرمز از نظر طیف اثر ضد باکتریایی و قدرت انتخابی بر عصاره‌های دیگر برتری داشت. درمنه‌های قرمز و کپه داغی احتمالاً گزینه‌های مناسبی برای تحقیقات بیشتر فیتوژیمیایی و ضد باکتریایی هستند.

واژه‌های کلیدی: درمنه، عوامل ضد باکتریایی، عفونت بیمارستانی

دريافت: ۱۴۰۲/۹/۲۷ پذيرش: ۱۴۰۳/۱/۹

دارد [۲۸، ۲۹]. ترکیبات شیمیایی در این جنس شامل فلانوپنییدها، کومارین‌ها، مونوتربنپنییدها، سزکوئی تربنپنییدها، دی‌ترپن‌ها، تری‌ترپن‌ها، فنیل پروپانوپنییدها و لیگنان‌ها هستند [۱۱، ۱۲].

درمنه از دوران گذشته در طب سنتی ایران دارای اهمیت و مصارف گوناگون بوده است. به عنوان مثال، *A. dracunculus* بصورت سنتی به عنوان اشتیآور، ضد اسپاسم، ضد کرم، ضد تشنج و هاضم مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۳]. *A. absinthium* به عنوان یک ملین و درمانی برای اختلالات روده‌ای ناشی از *A. kopotdagensis* انگل شناخته شده است [۱۴]. *A. sieberi* درمانی در برابر انگل‌های روده و کولیت بوده است [۱۴]. در راستای بررسی اثرات ضد باکتریایی گیاهان جنس درمنه، *Msaada* و همکاران نشان دادند که اسانس *A. absinthium* دارای اثرات ضد باکتریایی بالایی است [۱۵]. به علاوه طایفه و همکاران در یک پژوهش نشان دادند که عصاره متانولی *A. sieberi* قابلیت ضدباکتریایی بالایی دارد [۱۶]. مطالعات مشابهی به بررسی گونه‌های مختلف گیاه درمنه پرداخته‌اند که همگی در زمینه نتایج تأثیر این گیاهان بر میکروب‌ها گزارش‌های ارائه نموده‌اند [۱۷-۲۳]. بنابر آنچه ذکر شد و با توجه به گستردگی طبیعت ایران از نظر وجود گونه‌های مختلف از این گیاه و همچنین با توجه به تعداد کم مطالعات انجام شده بر روی خواص ضدباکتریایی این گیاهان، مطالعه حاضر با هدف بررسی و تعیین اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف هیدروواتانولی گونه‌های درمنه علیه سویه‌ی باکتریایی شایع در عفونت‌های بیمارستانی انجام شد.

روش کار

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی و سویه‌های باکتریایی
در این مطالعه آزمایشگاهی، باکتری‌های استافیلکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پایوژنر، آسینتوباکتر^۲، سودوموناس آئروژنیوزرا^۱

مقدمه

عفونت‌های پوست و بافت نرم (SSTI^۱) غالباً می‌توانند بیماری‌های حادی ایجاد کنند و یکی از شایع‌ترین علل عفونت در میان گروه‌های سنی مختلف هستند. ارزیابی دقیق بروز و شیوع SSTI، احتمالاً به دلیل تظاهرات متغیر و مدت کوتاه آن، دشوار است. افزایش تعداد بیماران با وضعیت سرکوب شده سیستم ایمنی (به دلیل داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی، سرطان، جراحی پیوند و HIV/AIDS)، تکنیک‌های پزشکی تهاجمی و عفونت‌های زخم جراحی، ممکن است در افزایش بروز SSTI شدید در دهه‌های گذشته نقش داشته باشد [۱، ۲]. امروزه مقاومت باکتریایی به یکی از نگرانی‌های نظام سلامت و درمان تبدیل شده است [۳]. به علاوه استفاده گسترده از داروهای صناعی موجب بروز عوارض جانبی می‌شود که در برخی از مواقع این اثرات جانبی جدی‌تر از خود بیماری هستند [۴]. از این‌رو پژوهشگران به دنبال کشف و معرفی مواد ضدباکتریایی با منشاء گیاهی هستند، چرا که گیاهان ترکیبات با ساختمانهای مولکولی پیچیده‌ای می‌سازند که برخی از آن‌ها خواص ضدباکتریایی دارند [۵]. تاکنون گیاهان مختلفی شناسایی شده‌اند که اثرات ضدباکتریایی دارند [۶].

جنس *Artemisia* حدود ۵۰۰ گونه مختلف دارد که به طور قابل توجهی در مناطق معتدل‌های شمالی کره زمین انتشار دارند [۷، ۸]. در ایران ۳۴ گونه گیاه علفی یک ساله و چندساله با نام فارسی درمنه وجود دارد که در سراسر کشور پراکنده‌اند و از دشت‌های پست ساحلی تا ارتفاعات کوهستانی می‌رویند [۱۹]. متابولیت‌های ثانویه فعال زیستی جدا شده از این جنس اثرات مختلفی از جمله فعالیت ضدمیکروبی، ضدپرورسی، ضدتوموری، تببری، ضدمالاریا، ضدخونریزی، ضدانعقاد، ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضدھپاتیت

^۱ Skin and Soft Tissue Infections

^۲ *Acinetobacter* sp.

تعیین محتوی تام فنولی

محتوای تام فنولی هر نمونه پس از انحلال در آب مقطر با روش فولین سیوکالتیو و بر اساس [۲۵] (mg GAE/g of Died Extract) تعیین شد. ۰/۲۵ mg/ml از عصاره‌های تهیه شده (غلظت ۰/۲۵ ml) با ۰/۵ ml از واکنش گرفولین سیوکالتیو (رقیق شده به صورت ۱:۱۰) مخلوط شدند. پس از پنج دقیقه ۲ ml از محلول کربنات سدیم (Na_2CO_3) ۷/۵٪ به نمونه‌ها اضافه شده و پس از هم زدن کامل آن‌ها به مدت دو ساعت در دمای محیط و تاریکی نگهداری شدند. سپس جذب نمونه‌های آماده شده در طول موج ۷۶۰ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر ثبت گردید. جهت رسم منحنی کالیبراسیون گالیک اسید، محلول‌های استاندارد گالیک اسید با غلظت‌های مشخص در آب مقطر تهیه شد. ثبت جذب هر یک از محلول‌های استاندارد گالیک اسید سه مرتبه و هر بار مطابق با روش ذکر شده در بالاترین اسپکتروفوتومتر انجام شد. سپس منحنی کالیبراسیون جذب گالیک اسید در مقابل غلظت ترسیم گردید.

تعیین کمترین غلظت مهارکننده رشد (MIC)^۵

کمترین غلظت مهارکننده رشد که کدورت ناشی از رشد باکتری در آن مشاهده نشده باشد با روش میکرودایلوشن براث با استفاده از پلیت ۹۶ خانمای استریل محاسبه شد. بدین منظور از تمام سویه‌ها غلظت نیم مک فارلند در محیط مولر هینتون براث تهیه شد. سری رقت سازی با اضافه کردن ۱ml ۱۰۰ عصاره به درون چاهک‌های حاوی ۱ml ۱۰۰ محیط کشت و سپس برداشتن ۱ml ۱۰۰ از مخلوط حاصل و افزودن آن به چاهک بعدی برای تهیه عصاره با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ (mg/ml) انجام شد. سپس ۱ml ۱۰۰ سوسپانسیون ۱ به ۱۰۰۰ رقیق شده نیم مک فارلند باکتری معادل $1/5 \times 10^5$ (CFU/ml) به درون هر چاهک اضافه گردید. از سوسپانسیون

/اندروکوکوس فکالیس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس^۲، میکروکوکوس لوئوس^۳، کلبسیلا پنومونیه^۴ و اشرشیا کلای از نمونه‌های ارجاعی به بخش میکروب‌شناسی آزمایشگاه بیمارستان امام رضا (ع) در شهر کرمانشاه در سال ۱۳۹۸ به دست آمدند. باکتری‌ها روی محیط کشت مولر هینتون براث (شرکت ایرسکو، ایران) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C کشت شدند. درمنه‌های طلایی و معمولی از پارک ملی تندوره (خراسان رضوی)، درمنه‌های قرمز و دشته از تربت جام، قرق سمیع آباد (خراسان رضوی)، درمنه کپه داغی از منطقه بابا امان (خراسان شمالی)، درمنه خراسانی از حدفاصل شهر آباد به سمت مراوه تپه (خراسان شمالی)، جمع‌آوری، شناسایی و با نمونه‌های هرباریومی در دانشکده داروسازی مشهد انتباخ داده شدند. برای استخراج عصاره‌های هیدروواتانولی از روش خیساندن با مخلوط آب و اتانول با نسبت‌های ۳:۷ و برابر استفاده شد. ۰/۵ g از پودر هر گیاه، به نسبت یک به ده (وزنی: حجمی) با حللاهای هیدروواتانولی مخلوط شدند. عصاره‌گیری با مخلوط حللاهای سه نوبت و به ترتیب به مدت ۲۴، ۲۴، ۲۲ ساعت در دمای آزمایشگاه انجام شد. بعد از تصفیه عصاره‌ها و حذف حللا با دستگاه روتاری، در فشار و دمای کاهش یافته، عصاره‌های خشک شده تا انجام آزمایش‌های بعدی، در دمای ۰°C-۲۰°C نگهداری شدند. به منظور چربی‌زدایی بخشی از عصاره‌های خشک شده به نسبت یک به ده (وزنی- حجمی) با متانول مخلوط شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۰°C-۲۰°C قرار گرفتند. پس از آن به وسیله کاغذ صافی و اتمان صاف و عصاره‌های چربی‌زدایی شده نیز پس از حذف حللا به روش بالا در فریزر جهت مطالعات بعدی نگهداری شد [۲۴].

¹ *Pseudomonas aeruginosa*

² *Staphylococcus epidermidis*

³ *Micrococcus luteus*

⁴ *Klebsiella pneumoniae*

⁵ Minimum Inhibition Concentration

میکروبی همراه با محیط کشت و از عصاره‌ها به تهیای (شکل ۱).

بیشترین بازده عصاره‌گیری قبل از چربی زدایی مربوط به عصاره‌های ۵۰ و ۷۰٪ درمنه طلایی (به ترتیب با میزان ۳۳/۰۸ و ۲۹/۶۴٪) و بیشترین بازده به دست آمده پس از چربی زدایی نیز مربوط به عصاره‌های ۵۰ و ۷۰٪ همین گونه (به ترتیب با میزان ۲۴/۸۹ و ۲۳/۷۱٪) بود.

نتایج تعیین MIC رشد جدایه‌های باکتریایی نشان داد که تعدادی از باکتری‌های مورد آزمایش به همه یا تعدادی از غلظت‌های حداقل یکی از عصاره‌ها در طیف غلظتی (mg/ml ۰-۲۵) حساس بودند (جدول ۲ و ۳). کوچکترین MIC مجموع عصاره‌ها مربوط به عصاره ۵۰٪ قبل از چربی زدایی درمنه قرمز به میزان ۰/۲۵ (mg/ml) علیه استافیلوکوکوس /پیدرمیدیس و در رتبه بعدی مربوط به عصاره مشابه از درمنه طلایی به میزان ۰/۵ (mg/ml) علیه میکروکوکوس لوتوس بود. بزرگترین طیف اثر ضد باکتریایی (شش سویه) نیز از عصاره ۵۰٪ قبل و بعد از چربی زدایی درمنه قرمز و عصاره ۵۰٪ بعد از چربی زدایی درمنه کپه داغی دیده شد. رشد استافیلوکوکوس /پیدرمیدیس توسط تمامی عصاره‌ها مهار شد. رشد سه سویه کلبسیلا پنومونیه، اشرشیا کلای و انترکوکوس فکالیس در غلظت‌های مورد بررسی هیچ یک از ۲۴ عصاره مهار نگردید.

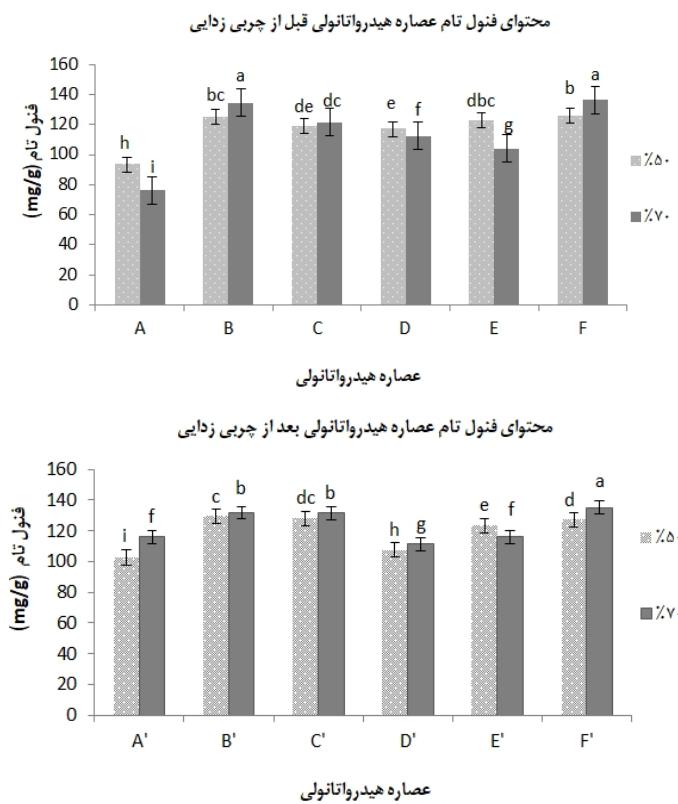
میکروبی همراه با محیط کشت و از عصاره‌ها به تهیای به عنوان شاهد استفاده گردید. میکرولیپیت‌ها در انکوباتور 37°C به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت [۲۶]. آزمایش‌ها در سه نوبت تکرار و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و رسم نمودارها توسط نرم افزار Excel انجام شد. میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ مورد مقایسه آماری قرار گرفتند. این مطالعه مطابق با کد اخلاق IR.KUMS.REC.1401.277 انجام شده است.

یافته‌ها

نتایج تجزیه واریانس محتوای فنولی عصاره‌ها نشان داد بین میزان محتوای فنولی حاصل از عصاره‌های ۵۰ و ۷۰٪ قبل از چربی زدایی ($F_{11,24} = 164/22$) و عصاره‌های بعد از چربی زدایی ($F_{11,24} = 237/96$) اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ۱). بر اساس نتایج مقایسه میانگین بیشترین مقادیر فنول تام در عصاره‌های قبل از چربی زدایی، مربوط به عصاره‌های ۷۰٪ درمنه دشتی و درمنه قرمز (به ترتیب به میزان ۱۳۶/۱۸ و ۷۶/۱۹٪ درمنه طلایی) با میزان ۱۳۴/۶۲ مربوط به عصاره ۷۰٪ درمنه طلایی (با میزان ۱۳۵/۱۲٪ درمنه قرمز) و کمترین مربوط به عصاره ۵۰٪ درمنه طلایی (به میزان ۰/۹۸٪ درمنه طلایی) می‌باشد. در عصاره‌های بعد از چربی زدایی، بیشترین مقادیر فنول تام مربوط به عصاره ۷۰٪ درمنه دشتی (به میزان ۰/۹۸٪ درمنه طلایی) و کمترین مربوط به عصاره ۵۰٪ درمنه طلایی (به میزان ۰/۹۸٪ درمنه طلایی) می‌باشد.

جدول ۱. تجزیه واریانس محتوای فنولی عصاره هیدرواتانولی قبل و بعد از چربی زدایی حاصل از گونه‌های مختلف درمنه

میانگین مربعات		درجه آزادی	منبع تغییرات
قبل از چربی زدایی	بعد از چربی زدایی		
۳۳۹/۲۴**	۸۹۱/۰۲**	۱۱	عصاره هیدرواتانولی گونه‌های درمنه
۱/۴۳	۵/۴۳	۲۴	خطا
۰/۹۸	۰/۹۸	-	ضریب تغییرات(%)



شکل ۱. محتوای تام فنولی در عصاره‌های مختلف درمنه. نتایج بصورت SEM \pm Mean سه آزمایش مستقل بیان شده است.

(A: درمنه طالبی، B: درمنه قرمز، C: درمنه کپه داغی، D: درمنه خراسانی، E: درمنه معمولی و F: درمنه دشتی)

جدول ۲. نتایج حاصل از MIC (mg/ml) عصاره‌های هیدرواتانولی ۵٪ قبل و بعد از چربی زدایی علیه سویه‌های مختلف باکتریایی عامل عفونت

سویه باکتری							کیاه
عصاره	عصاره گیری (%)	بازده	سکته‌گردانی (٪)				
بعد از چربی زدایی	۲۴/۸۹	-	۲	۲	۲	۲	درمنه طالبی
قبل از چربی زدایی	۳۳/۰۸	-	-	-	-	-	
بعد از چربی زدایی	۱۲/۹۸	-	۲	۲	۲	۲	درمنه قرمز
قبل از چربی زدایی	۲۱/۴	-	۲	۲	۲	۲	
بعد از چربی زدایی	۲۰/۸۹	-	۲	۲	۲	۲	درمنه کپه داغی
قبل از چربی زدایی	۲۸/۲۴	-	۲	۲	۲	۲	
بعد از چربی زدایی	۱۲/۱۴	-	۲	۲	۲	۲	درمنه خراسانی
قبل از چربی زدایی	۱۸/۴۰	-	۲	۲	۲	۲	
بعد از چربی زدایی	۱۸/۷۷	-	۲	۲	۲	۲	درمنه معمولی
قبل از چربی زدایی	۲۵/۲۰	-	۲	۲	۲	۲	
بعد از چربی زدایی	۱۶/۴۱	-	۲	۲	۲	۲	درمنه دشتی
قبل از چربی زدایی	۲۵/۹۶	-	۲	۲	۲	۲	

(-) نشان دهنده عدم تاثیر گذاری غلظت‌های عصاره‌های مورد آزمایش در مهار رشد باکتری

جدول ۳. نتایج حاصل از MIC (mg/ml) عصاره‌های هیدرواتانولی ۷۰٪ قبل و بعد از چربی‌زدایی علیه سویه‌های مختلف باکتریایی عامل عفونت

سویه باکتری	بازده عصاره							عصاره	گیاه
	کافئولکینیک اسید / mg/g								
بعد از چربی‌زدایی	۲۳/۷۱	-	-	-	-	-	-	درمنه طلایی	درمنه طلایی
قبل از چربی‌زدایی	۲۹/۶۴	-	-	-	-	-	-		
بعد از چربی‌زدایی	۱۲/۵۵	-	-	-	-	-	-	درمنه قرمز	درمنه قرمز
قبل از چربی‌زدایی	۲۰/۱۵	-	-	-	-	-	-		
بعد از چربی‌زدایی	۴۰/۷۶	-	-	-	-	-	-	درمنه کپه داغی	درمنه کپه داغی
قبل از چربی‌زدایی	۲۷/۶۸	-	-	-	-	-	-		
بعد از چربی‌زدایی	۱۲/۸۰	-	-	-	-	-	-	درمنه خراسانی	درمنه خراسانی
قبل از چربی‌زدایی	۱۷/۰۰	-	-	-	-	-	-		
بعد از چربی‌زدایی	۱۶/۶۱	-	-	-	-	-	-	درمنه معمولی	درمنه معمولی
قبل از چربی‌زدایی	۲۴/۲۰	-	-	-	-	-	-		
بعد از چربی‌زدایی	۱۸/۴۵	-	-	-	-	-	-	درمنه دشتی	درمنه دشتی
قبل از چربی‌زدایی	۲۴/۲۸	-	-	-	-	-	-		

(-) نشان دهنده عدم تأثیر گذاری غلظت‌های عصاره‌های مورد آزمایش در مهار رشد باکتری

که در مناطق بیابانی می‌روید و اثرات ضد میکروبی، ضد سرطانی، ضد التهابی آن در منابع مختلف گزارش شده است [۱۷]. همسو با مطالعات ما، در صد بالایی از محتوای فنولی و ترکیبات آنتی اکسیدانی در روغن فرار این گیاه گزارش شده است [۳۰]. نظر به اینکه هیچ یک از گسترده‌ترین یا نیرومندترین اثرات ضد باکتریایی در عصاره هیدرواتانولی درمنه دشتی که دارای بالاترین محتوای فنولی بود دیده نشد به نظر می‌رسد این گروه از ترکیبات تنها عامل تعیین کننده اثرات ضد میکروبی از سایر دستجات ترکیبات شیمیایی گیاهان انطباق دارد [۳۱].

در مطالعه کنونی، نتایج تست ضد میکروبی (MIC) علیه نه سویه باکتری نشان داد، گسترده‌ترین حساسیت باکتریایی (شش جدایه) مربوط به عصاره‌های هیدرواتانولی ۰.۵٪ درمنه قرمز قبل و بعد از چربی‌زدایی و درمنه کپه داغی بعد از چربی‌زدایی

بحث

در مطالعه حاضر، محتوای فنول تام گونه‌های مختلف درمنه با حلال هیدرواتانولی در طیف متفاوتی (mg GAE/g of Died Extract) ۱۳۶/۱۸ تا ۷۶/۱۹ از محاسبه گردید. اولنیکوف^۱ و همکاران محتوای فنولی گونه‌های مختلف جنس درمنه را مورد بررسی قرار دادند، این محققین ۱۱۲ ترکیبات فنولی را از نه گونه درمنه شناسایی کردند که ترکیب غالب در بین تمامی گونه‌های مورد آزمایش اسیدهای کافئوئیل کینیک^۲ بودند [۲۷]. در مطالعات فیتوشیمیابی دو گونه مورد بررسی در پژوهش کنونی (درمنه‌های طلایی و قرمز) نیز همین نوع ترکیبات شناسایی شده‌اند [۲۸-۲۹].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد عصاره هیدرواتانولی ۰.۷٪ درمنه دشتی قبل و بعد از چربی‌زدایی بیشترین مقدار فنول تام را دارد (شکل ۱). درمنه دشتی گیاهی است

¹ Olennikov

² Caffeoylquinic Acid

/پیدرمیدیس باکتری گرم مثبت و از گروه بیماری‌زای خطرناک انسانی است که مقاومت زیادی به متی‌سیلین (MRSA)^۱ نشان داده است [۳۳]. با توجه به مقاومت ذاتی این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها اثر گذاری عصاره درمنه در کاهش رشد این باکتری در پژوهش حاضر قابل توجه می‌باشد. حساسیت بیشتر سه باکتری گرم مثبت یاد شده با گزارش‌های پیشین اثرات ضد میکروبی از جنس درمنه همخوانی داشت. اثرات ضد میکروبی گیاه درمنه از منابع دیگر نیز گزارش شده است. عصاره‌های اتر نفتی و متانولی درمنه خزری همراه شده با آنتی‌بیوتیک‌های ضد فارچی و ضد باکتریایی، چهار تا ده مرتبه نسبت به کاربرد آنتی‌بیوتیک‌ها به تنهایی، دارای اثرات ضد میکروبی قوی‌تری علیه میکرووارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها همچون استافیلوکوکوس اورئوس، ساکارومایسیس سرویزیه، اشرشیاکلی و کاندیدا آلبیکانز هستند [۳۴]. علاوه بر عصاره ترکیبات موجود در انسان این گیاه نیز دارای اثرات ضد میکروبی است. بطوری که انسان درمنه دشتنی قابلیت ضد باکتریایی بالایی علیه استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکانز دارد [۹].

سردرودیان و آریان فر به بررسی ترکیبات شیمیایی، خصوصیات ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی انسان درمنه خراسانی پرداختند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که حساسیت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به انسان، بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است [۳۵]. نصیرپور و همکاران گزارش نمودند عصاره‌های آبی درمنه کوهی و درمنه دشتنی اثر ضدباکتریایی قوی‌تری علیه باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی‌ها دارند. بر مبنای این مطالعه باکتری لیستریا مونوسيتوژنر حساس‌ترین و اشرشیاکلی مقاوم‌ترین باکتری بوده است [۳۶]. در مطالعه کنونی

بود. در نگاه کلی، عصاره‌های هیدرواتanolی ۵۰٪ نسبت به ۷۰٪ طیف اثرات بازدارندگی بیشتری را علیه باکتری‌های به کار رفته در این پژوهش (۴۸ مورد ثبت MIC برای عصاره‌های ۵۰٪ در برابر ۴۰ مورد برای عصاره‌های ۷۰٪) نشان دادند. همچنین در این بررسی ۳۹ مورد MIC برای عصاره‌ها قبل از چربی‌زدایی ثبت شد. در حالی که تعداد موارد ثبت شده MIC برای همین عصاره‌ها پس از چربی‌زدایی به ۴۹ مورد افزایش یافت. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت ترکیبات ضد میکروبی استحصال شده از این گیاهان در حلال قطبی‌تر انحلال بیشتری داشته‌اند. در صورت بررسی مجزای اثرات ضدمیکروبی برخی از گیاهان مطالعه شده، مواردی در خلاف جهت رویه کلی نیز دیده می‌شود که بدون تردید ناشی از تفاوت‌های طبیعی فیتوشیمیایی این گونه‌هاست.

کمترین میزان MIC با غلظت ۲۵۰ (μg/ml) مربوط به عصاره هیدرواتanolی ۵۰٪ درمنه قرمز قبل از چربی‌زدایی بود که بر سویه استافیلوکوکوس /پیدرمیدیس اثر گذاشت. باکتری استافیلوکوکوس /پیدرمیدیس گسترده‌ترین حساسیت را به عصاره‌های هیدرواتanolی گونه‌های درمنه مورد مطالعه نشان داد که همخوانی کاملی با نتایج مطالعه پیشین بر روی انواع عصاره‌های آبی همین گونه‌ها داشت [۳۲]. میکروکوکوس لوئوس با نشان دادن حساسیت و ثبت MIC در برابر ۲۱ عصاره استرپتوکوکوس پیوژنر با نشان دادن حساسیت و ثبت MIC در برابر ۱۶ عصاره در جایگاه‌های بعدی قرار گرفتند. این دو سویه باکتریایی به برخی عصاره‌های آبی از همین گونه‌ها نیز حساسیت نشان داده بودند. در مقایسه با نتایج به دست آمده از مطالعه پیشین بر روی انواع عصاره‌های آبی همین گونه‌های گیاهی (۱۵ مورد ثبت MIC علیه چهار سویه باکتریایی)، تفاوت‌هایی در طیف اثر ضدباکتریایی مشاهده شد که برتری با عصاره‌های هیدرواتanolی (۸۸ مورد ثبت MIC علیه شش سویه باکتریایی) بود [۳۱]. باکتری استافیلوکوکوس

¹ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

ایزوله‌های استاندارد لازم است تعداد بیشتری ایزوله‌های کلینیکی برای هر باکتری به کار رود.

نتیجه‌گیری

عصاره هیدرواتانولی درمنه‌های قرمز و کپه داغی از دید گستردگی و قدرت اثر انتخابی ضد میکروبی نسبت به سایر عصاره‌ها برتری داشتند. این عصاره‌ها ارزش بالایی به عنوان منابع ترکیبات ضد میکروبی در برابر طیف گسترده‌ای از باکتری‌های عامل عفونت دارند. به نظر می‌رسد ترکیبات غیرفنولی نیز در بروز اثرات ضد باکتریایی آنها نقش داشته باشند. این گونه‌های گیاهی گزینه‌های مناسبی برای بررسی‌های بیشتر فیتوشیمیایی و ضد باکتریایی هستند.

تشکر و قدردانی

این مقاله، از نتایج پایان نامه خانم نسترن شارعی (شماره طرح: ۴۰۱۴۶۵) برای اخذ درجه دکتری حرفه‌ای در رشته داروسازی از دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه می‌باشد.

تعارض منافع

نویسنده‌گان مقاله اعلام می‌دارند هیچ گونه تصاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

نیز اشرشیا کلی مقاومت کاملی به ۲۴ عصاره مورد بررسی نشان داد.

لازم به ذکر است برتری نسبی اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های هیدروالکلی به دست آمده از گونه‌های گیاهی در مقایسه با عصاره‌های آبی آن‌ها در مقالات متعددی گزارش شده است که ناشی از قابلیت استخراج بالاتر تر کیبات موثره گیاهی توسط حللاهای هیدروالکلی در مقایسه با آب می‌باشد [۳۷].

در مطالعه کنونی، عصاره هیدرواتانولی ۷۰٪ قبیل و بعد از چربی‌زدایی درمنه دشتی بیشترین مقدار فنول تام را داشت؛ اما عصاره‌های یاد شده، گسترده‌ترین یا نیرومندترین اثرات ضد باکتریایی را نداشتند. همچنین قویترین اثر علیه میکروکوکوس لوئوس توسط عصاره‌ای با محتوای پایین فنولی (عصاره هیدرواتانولی ۵٪ درمنه طلایی) به ثبت رسید. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت ترکیبات فنولی تنها عامل تعیین کننده در قدرت عصاره‌های گیاهی مورد بررسی برای اعمال اثرات ضد باکتریایی نیستند. این موضوع با گزارش اثرات ضد میکروبی از سایر دستجات ترکیبات شیمیایی گیاهان منطبق است [۳۰].

لازم به ذکر است برای امکان مقایسه نتایج با سایر پژوهش‌های مشابه و افزایش تکرار پذیری بهتر است از سوبه‌های استاندارد میکروبی نیز استفاده گردد. همچنین برای مقایسه اثر ترکیبات مختلف در کنار

References

- 1- Sukumaran V, Senanayake S. Bacterial infections of the skin and soft tissues. Aust Prescr. 2016; 39(5): 159–163.
- 2- Breneman DL. Bacterial infections of the skin and soft tissues and their treatment. Curr Opin Infect Dis. 1993; 6 (5): 678-82.
- 3- Ahameethunisa AR, Hopper W. In vitro antimicrobial activity on clinical microbial strains and antioxidant properties of *Artemisia parviflora*. Ann clin microbiol antimicrob. 2012; 11(1):30.
- 4- Hancock RE. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. Lancet Infect Dis. 2005; 5(4): 209-18.
- 5- Juteau F, Masotti V, Bessiere JM, Dherbomez M, Viano J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. Fitoterapia. 2002; 73(6): 532-535.
- 6- Rawani A, Pal S, Chandra G. Evaluation of antimicrobial properties of four plant extracts against human pathogens. Asian Pac J Trop Biomed. 2011; 1(1): S71-S5.

- 7- Hussain A, Hayat MQ, Sahreen S, Ain QU, Bokhari SA. Pharmacological promises of genus *Artemisia* (Asteraceae): a review. Proceedings of the Pakistan academy of sciences: B Life Environ Sci. 2017; 54(4): 265-87.
- 8- Baradaran M, Jalali A. A review on Antibacterial effects of Iranian herbal medicine on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Jundishapur J Chronic Dis Care. 2019; 8(4): e96058.
- 9- Mahboubi M, Bidgoli FG. Biological activity of essential oil from aerial parts of *Artemisia aucheri* Boiss. from Iran. Herba Pol. 2009; 55(4): 96-104.
- 10- Ki V, Rotstein C. Bacterial skin and soft tissue infections in adults: a review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2008; 19(2): 173-84.
- 11- Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P. The *Artemisia* L. genus: a review of bioactive essential oils. Molecules. 2012; 17(3): 2542-66.
- 12- Bora KS, Sharma A. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. Pharm Biol. 2011; 49(1): 101-9.
- 13- Miraldi E, Ferri S, Mostaghimi V. Botanical drugs and preparations in the traditional medicine of West Azerbaijan (Iran). J Ethnopharmacol. 2001; 75(2-3): 77-87.
- 14- Ghorbani A. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Turkmen Sahra, north of Iran:(Part 1): General results. J Ethnopharmacol. 2005; 102(1): 58-68.
- 15- Msada K, Salem N, Bachrouch O, Bousselmi S, Tammar S, Alfaify A, et al. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oils and phenolics. J Chem. 2015; 12(2): 44-48.
- 16- Tayefeh HE, Sefidkon F, Yousefi M, Teimouri M. Essential oil composition and antimicrobial activities of oil, alcoholic extract of *Artemisia sieberi* from Firoozkooh region. Iran J Biol. 2012; 25(3): 445-455. [Full text in Persian]
- 17- Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli M, Yan T, Ishii S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications. J Appl Microbiol. 2017; 123(3): 570-581.
- 18- Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S. *Pseudomonas aeruginosa*, in: Tang Y W, Liu D, Sussman M, Poxton I, Schwartzman J. (Eds.) Molecular Medical Microbiology, Academic Press, Cambridge: pp. 753–767.
- 19- Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs Context. 2018; 7: 212527.
- 20- Wagner S, Sommer R, Hinsberger S, Lu C, Hartmann RW, Empting M, et al. Novel strategies for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Med Chem. 2016; 59(13): 5929-69.
- 21- Calfee DP. Recent advances in the understanding and management of *Klebsiella pneumoniae*. F1000Res. 2017;6:1760.
- 22- Effah CY, Sun T, Liu S, Wu Y. *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health .Ann clin microbiol antimicrob. 2020; 19(1): 1-9.
- 23- Percival SL, Williams DW. Acinetobacter. In: Percival SL, Yates MV, Williams DW, Chalmers RM, Gray NF. Microbiology of Waterborne Diseases, 2nd ed. London: Academic Press, 2014: 35-48.
- 24- Hosseinzadeh L, Soheili S, Ghiasvand N, Ahmadi F, Shokoohinia Y. Fatty acid mixtures from *Nigella sativa* protects pc12 cells from oxidative stress and apoptosis induced by doxorubicin. Pharm Sci. 2018; 24(1): 15-22.
- 25- Hatami T, Emami SA, Miraghaee SS, Mojarrab M. Total phenolic contents and antioxidant activities of different extracts and fractions from the aerial parts of *Artemisia biennis* Willd. Iran J Pharm Res. 2014; 13(2): 551-559.
- 26- Clinical and laboratory standards institute (CLSI) *performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 28th ed. clinical and laboratory standards institute; Wayne, PA, USA: 2018; CLSI Supplement M100.Available from: https://clsi.org/media/1930/m100ed28_sample.pdf
- 27- Olennikov DN, Kashchenko NI, Chirikova NK, Vasil'eva AG, Gadimli AI, Isaev JI, et al. Caffeoylquinic acids and flavonoids of fringed sagewort (*Artemisia frigida* Willd.): HPLC-DAD-ESI-QQQ-MS profile, HPLC-DAD quantification, in vitro digestion stability, and antioxidant capacity. Antioxidants. 2019; 8(8): 307.

- 28- Moradi-Afrapoli F, Saremi G, Nasseri S, Emami SA, Mojarrab M. Isolation of two isochlorogenic acid isomers from phenolic rich fraction of *Artemisia turanica* Krasch. Iran J Pharm Res. 2020; 19(4): 59–66.
- 29- Nasseri S, Emami SA, Mojarrab M. Dicaffeoylquinic acids from the aerial parts of *Artemisia cinaformis* Krasch. & Popov ex Poljakov. Pharm Sci. 2019; 25(2): 171-5.
- 30- Ghasemi G, Alirezalu A, Ishkeh SR, Ghosta Y. Phytochemical properties of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser (Iranian accession) and its antioxidant and antifungal activities. Nat Prod Res. 2021; 35(21): 4154–4158.
- 31- Silva NC, Fernandes Júnior AJ. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2010; 16(3): 402-413.
- 32- Abiri R, Ghasemi S, Bagheri M, Shahbazi M, Emami SA, Mojarrab M. The comparative study on *in vitro* antibacterial effects of different aqueous extracts of *Artemisia* species. J Ardabil Univ Med Sci. 2023; 23(3): 309-319. [Full text in Persian]
- 33- Lee AS, De Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nat Rev Dis Primers. 2018; 31(1): 1-23.
- 34- Rolta R, Sharma A, Sourirajan A, Mallikarjunan PK, Dev K. Combination between antibacterial and antifungal antibiotics with phytocompounds of *Artemisia annua* L: A strategy to control drug resistance pathogens. J Ethnopharmacol. 2021; 266: 113420.
- 35- Sardarodiyani M, Arian Far A. Investigation of chemical components, antibacterial and antioxidant properties of Essential Oil *Artemisia Khorasanica* in north Khorasan area. Innovation Food Sci Technol. 2019; 11(1): 39-57.
- 36- Nasirpour M, Yavarmanesh M, Mohhamadi Sani A, Mohamdzade Moghadam M. Antibacterial effect of aqueous extract of *Artemisia aucheri*, *Artemisia sieberi* and *Hyssopus officinalis* L. on the food borne pathogenic bacteria. FSCT. 2015; 12(46): 73-84. [Full text in Persian]
- 37- Haji Ghasemi M, Govahi M, Ranjbar M. Evaluation of antibacterial activity of aqueous and hydroalcoholic extracts of *Physalis alkekengi* fruit against four standard strains in vitro. J Ardabil Univ Med Sci. 2023; 22(4): 323-332. [Full text in Persian]