Short Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 13, Number 3 (July - August)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Activity of Essential Oil of *Mentha piperita* L.

Morteza Yazdani[1], Fereshteh Jookar Kashi[2]*, Zahra Dashtizadeh[1]

1. *MSc, Department of Phytochemistry, Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, Iran*
2. *Associate Professor, Department of Cell and Molecular Biology , Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, Iran*

Article Information

Article Subject:
Antimicrobial Agents

10.30699/ijmm.13.3.210

Corresponding author:

Fereshteh Jookar Kashi,
Associate Professor, Department of Cell and Molecular Biology , Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, Iran

Email:
jookar@kashanu.ac.ir

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: Increasing drug resistance to antibiotics in most bacteria has led to the development of natural antimicrobial compounds. Peppermint (*Mentha piperita* L.) is one of the most widely used herbs that has many therapeutic effects. The purpose of this study is the evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of *Mentha piperita* L.

Materials and Methods: : In this study, after collecting and drying the leaves, essential oils of the plant was extracted using a solvent-free microwave extraction. The compounds of essential oil were identified by the GC-MS (Gas chromatography-mass spectrometry). The effect of antioxidant was determined by beta-carotene test and antimicrobial activity was carried using agar-dilution method also, the minimum inhibitory concentration (MIC) value was evaluated.

Results & Discussion: Menthofuran, Menthol, and 1S-Neomenthyl acetate were the major compounds of essential oil of *Mentha piperita* L. collected from Marivan, respectively; menthol is the main compound of essential oil. The essential oil was more effective on gram-positive bacteria (*Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) and gram negative (*Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumonia*) also had a good antioxidant activity compared to the standard BHT (butylated hydroxytoluene).Due to its relatively good antimicrobial and antioxidant properties, it can be used in the pharmaceutical and food industries.

Keywords: Antimicrobial activity, Antioxidant activity, Beta-Carotene, Essential oil, *Mentha piperita* L. , Menthol

Received: 2018/07/09 Accepted: 2019/08/14 Available online: 2019/08/14

Copyright © 2019. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

How to cite this article:

Yazdani M, Jookar kashi F, Dashti zadeh Z. Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Activity of Essential Oil of Mentha piperita L.. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (3):210-219

Download citation:
BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks
Send citation to:
Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

Mentha piperita L. with the common name "Peppermint" is one of the most important medicinal plants. This plant belongs to the family Lamiaceae, order lamiales. This plant is a natural hybrid of spearmint (*M. spicata* L.) and water mint (*M. aquatica* L.) (1). It has the following general properties: antioxidant, antimicrobial, antiviral, anti-seizure, anti-tumor, anti-allergic, anti-cancer, anticoagulant, analgesic and anti-insect (3). Its effective compounds include 1% volatile oil, resin, flavonoids, phenols, carotene, betaine and tannin (4). This study aimed to investigate the antimicrobial and antioxidant properties of *M. piperita* L. and to determine its main constituents using gas chromatography mass spectroscopy (GC-MS).

Materials and Methods

The plant was collected from Marivan area (Kurdistan Province, Iran) during summer 2017 and approved by the Faculty of Botany at Kashan University. The essential oil was extracted by microwave method (Using the Microwave Reactor, Milestone MicroSYNTH Model) without solvent. The main constituents of the plant's essential oil were identified by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) Agilent HP-6890 gas chromatography and Hewlett-Packard 6890-5972 (9). In this study, the antioxidant activity was investigated by β-carotene bleaching method (BHT standard as positive control) (10). The antioxidant activity was calculated using the "percent inhibition" formula:

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

where I% is the inhibition percentage, A_{sample} is the absorption of the sample, $A_{control}$ is the absorbance of the control and $A_{control(0)}$ is the absorbance of the control after the desired time. To investigate the antimicrobial activity, a set of microorganisms including Gram-positive and negative bacteria, fungi and yeast were used. The bacterial strains were cultured in Nutrient agar overnight at 37°C and fungi and yeast were cultured in Sabouraud Dextrose Agar overnight at 30°C.

The antimicrobial activity was determined by agar diffusion method. The microbial suspensions adjusted to 0.5 McFarland were cultured in Mueller Hinton Agar. At the end, the sample solutions were added to the wells. After 24 h, the diameter of growth inhibition zones were measured.

To obtain the minimum inhibitory concentration (MIC), microdilution broth method was used according to CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) (11). The samples were first diluted with dimethyl sulfoxide (DMSO) in sterile tubes containing Brain Heart Infusion (BHI) broth. The sample solutions, 0.5 MacFarland suspension and BHI broth were added to each well. The sample-free well was used as negative control. After 24 h, the lowest inhibitory concentration was considered as MIC. Rifampin and Gentamicin antibiotics (for bacteria) and Nystatin (for fungi) were used as positive controls.

Results and Discussion

The results obtained from analysis of the essential oil compounds using GC-MS are presented in Table 1. Menthol, neomentyl acetate and menthofuran were the main constituents of *M. piperita* L. essential oil, respectively and are highlighted in Table 1. In other studies, mentol, carvone, menton, neomentol and menthol acetate have been reported by Fadaie *et al.*, (13). Mimica-Dukić *et al.*, identified menthol (14) as the main constituents of *M. piperita* L. essential oil.

In other researches (reference), menthol has been found as a major component of the essential oil which is in accordance with our findings.

The lowest growth inhibitory concentration and diameter of growth inhibition zone of rifampin, gentamicin and nystatin antibiotics against the tested microorganisms are shown in Table 2 and those regarding the essential oil are shown in Table 3. The results showed that the essential oil has good inhibitory effect against Gram-positive bacteria. İşcan et al. and Sivropoulou et al. reported that peppermint essential oil had a greater effect against gram-positive bacteria than gram-negative bacteria (21, 22), which is similar to our findings. Tsai *et al.* reported the lowest inhibitory concentration of 0.08±0.00 % (v/v) for *C. albicans* and *S. aureus* (1). Afridi *et al.* reported the growth inhibition zone of 17±0.61 mm for *S. aureus* (23).

Table 1. *M. piperita* L. essential oil constituents

Number	Compound	Retention time (min)	Kovats index	Area %
1	alpha-Pinene	6.34	939	**0.67**
2	Sabinene	7.32	975	**0.38**
3	beta-Pinene	7.43	979	**0.97**
4	1,8-Cineole	8.99	1031	**5.84**
5	trans-Sabinene hydrate	10.09	1098	**0.59**
6	L-Menthone	12.98	1152	**3.49**
7	**Menthofuran**	13.34	1164	**19.72**
8	**Menthol**	14.05	1171	**41.21**
9	Pulegone	15.74	1237	**1.23**
10	Piperitone	16.28	1252	**0.28**
11	1R-Menthyl acetate	16.71	1295	**0.99**
12	**1S-Neomenthyl acetate**	17.56	1273	**21.49**
13	Isomenthyl acetate	17.87	1305	**0.79**
14	Isocaryophyllen	20.93	1419	**0.71**
15	trans-Caryophyllene	21.35	1419	**0.82**
16	Viridiflorol	26.65	1592	**0.52**
17	Heneicosane	39.25	2100	**0.31**

Table 2. Antimicrobial effect of rifampin, gentamicin and nystatin antibiotics on Gram positive and negative bacteria

Microorganisms	Rifampin		Gentamicin		Nystatin	
Gram-positive bacteria	IZ[a] (mm)	MIC[b] (µg/mL)	IZ (mm)	MIC (µg/mL)	IZ (mm)	**MIC (µg/mL)**
S. epidermidis	40	250	35	500	*	*
B. subtilis	13	15.6	21	500	*	*
S. aureus	10	250	21	500	*	*
Gram-negative bacteria						
S. dysenteriae	8	250	18	500	*	*
K. pneumonia	7	250	22	250	*	*
P. aeruginosa	-	-	8	500	*	*
S. paratyphi-A serotype	-	-	21	500	*	*
Fungi						
A. niger	*	*	*	*	27	**31.25**
A. brasilienis	*	*	*	*	30	**31.25**
C. albicans	*	*	*	*	33	**125**

(-) antimicrobial inactivity.
(*) unusable antibiotic for the microbial strain.
a: inhibition zone.
b: minimum inhibitory concentration

Table 3: Antimicrobial effect of *Mentha piperita* L. essential oil

Microorganisms	Essential oil	
Gram-positive bacteria	IZ (mm)	**MIC (µg/mL)**
S. epidermidis	13	**31.25**
B. subtilis	10	**31.25**
S. aureus	10	**62.50**
Gram-negative bacteria		
S. dysenteriae	10	**62.50**
K. pneumonia	11	**31.25**
P. aeruginosa	-	**-**
S. paratyphi-A serotype	-	**-**
Fungi		
A. niger	-	**-**
A. brasilienis	-	**-**
C. albicans	-	**-**

(-) It means antimicrobial inactivity.

The results of the β-carotene bleaching assay showed that the inhibitory potency for inhibiting linoleic acid oxidation for BHT standard and the essential oil was 96% and 93%, respectively. Accordingly, the percentage of inhibitory potency was very high, and this result indicated high antioxidant activity of *M. piperita* L. The high antioxidant activity may be due to the presence of a major menthol in peppermint essential oil. Yadegarinia et al. **(19)** and Tabatabaei *et al.* **(26)** reported the inhibitory potency of the essential oil 50.17% and 41.3%, respectively. Comparing the results of the present and other studies in Iran, it is found that the essential oil of *M. piperita* L. extracted from Marivan county has a higher antioxidant activity compared to that from other locations investigated.

Different extents of antimicrobial and antioxidant properties as well as distinct essential oil constituents in different studies may be due to differences in geographical areas, climatic conditions, harvesting times, storage conditions and duration, method and duration of extraction, tested microbial strains and the environment of different crops, etc.

Conclusion

The results of this study showed that the essential oil of *M. piperita* L. cultivated in Marivan has good antioxidant and antimicrobial activity. The major component of the oil is menthol. The essential oil effects could be attributed to their monoterpene compounds. The essential oil of this plant is one of the natural sources of antioxidants which could be suggested to replace the synthetic source.

Acknowledgments

We are grateful to Natural Essences Research Institute of Kashan University for supporting this work.

Conflict of Interest

The authors reported no conflict of interest.

مقاله کوتاه

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ ـ شماره ۳ ـ مرداد و شهریور ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی فعالیت ضدمیکروبی و ضداکسیدانی اسانس گیاه نعناع فلفلی

مرتضی یزدانی[۱]، فرشته جوکار کاشی[۲*]، زهرا دشتی زاده[۱]

۱. کارشناسی ارشد، فیتوشیمی، گروه فیتوشیمی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

۲. استادیار، میکروبیولوژی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۱۸

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۲۳

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۰۵/۲۳

موضوع: مواد ضد میکروبی

IJMM1398;13(3): 194-200

نویسندهٔ مسئول:

فرشته جوکار کاشی

استادیار، میکروبیولوژی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

پست الکترونیک:

jookar@kashanu.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: افزایش مقاومت دارویی علیه آنتی‌بیوتیک‌ها در اکثر باکتری‌ها منجر به توسعه ترکیب‌های ضدمیکروبی طبیعی شده است. نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* L. یکی از گیاهان دارویی پرمصرف است که اثرهای درمانی بسیاری دارد. هدف از این مطالعه، بررسی فعالیت ضدمیکروبی و ضداکسیدانی اسانس این گیاه است.

مواد و روش کار: در این بررسی پس از جمع‌آوری و خشک کردن برگ‌های گیاه، با دستگاه مایکروویو (Free microwave extraction solvent) و بدون استفاده از حلال، اسانس گیاه استخراج شده و شناسایی ترکیب‌های اسانس به کمک دستگاه GC-MS (Gas chromatography–mass spectrometry) انجام شد. بررسی اثر ضداکسیدانی با روش بتاکاروتن و سنجش اثرهای ضدمیکروبی روی سویه‌های باکتری، قارچ‌ها و مخمر به روش انتشار در آگار و کمترین غلظت مهارکننده رشد روی اسانس انجام شد.

یافته‌ها و بحث: منتول، نئومنتیل استات و منتوفوران به‌ترتیب عمده‌ترین ترکیب‌های نمونه‌ی اسانس نعناع فلفلی جمع‌آوری شده از شهر مریوان بودند؛ منتول عمده‌ترین ترکیب تشکیل دهنده‌ی اسانس بود. اسانس این گیاه روی باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس و گرم منفی شیگلا دیسانتریه و کلبسیلا پنومونیه مؤثر بود. همچنین اسانس این گیاه، فعالیت ضداکسیدانی خوبی در مقایسه با استاندارد BHT (Butylated Hydroxyl Toluene) داشت. به دلیل خواص ضدمیکروبی و ضداکسیدانی نسبتاً خوب این گیاه، می‌توان از آن در صنایع دارویی و غذایی استفاده کرد.

کلید واژه‌ها: اسانس، بتاکاروتن، فعالیت ضدمیکروبی، فعالیت ضداکسیدانی، منتول، نعناع فلفلی

کپی‌رایت © مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* L. و نام رایج Peppermint یکی از گیاهان دارویی مهم است که به خانواده‌ی *Lamiaceae*، راسته *Lamialse* و رده *Rosidae* تعلق دارد. این گیاه یک پیوند طبیعی از دو گیاه نعنادشتی (*Mentha spicata* L.) و نعنای آبی (*Mentha aquatica* L.) است (۱). این گیاه، بومی اروپاست ولی در ایالات متحده آمریکا، هند، چین، ایتالیا، شوروی سابق، مجارستان و فرانسه کشت و بومی شده است (۲). خواص آن به طور کلی عبارتند از: ضداکسیدان، ضدمیکروب، ضدویروس، ضدتشنج، ضدتومور، ضد حساسیت، ضدسرطان، ضدانعقاد، ضددرد و ضدحشره (۳). ترکیب‌های مؤثر آن شامل یک درصد روغن فرار، رزین، فلاونوئیدها، فنل‌ها، کاروتن، بتائین و تانن است (۴). اسانس گیاهان خانواده نعناعیان و اجزای تشکیل دهنده‌ی آن قابلیت استفاده در صنایع غذا، دارو، لوازم آرایشی و عطرسازی را دارند (۵،۶). غالباً بیشترین ترکیب تشکیل‌دهنده‌ی اسانس آن منتول است که از خانواده‌ی مونوترپن‌های اکسیژن‌دار است. از کاربردهای دارویی آن می‌توان به خنک‌کنندگی، تقویت معده، ضدتب، ضدسرفه، ضداستفراغ و ضدعفونی‌کننده در التهاب ریه اشاره کرد (۷). منتول به عنوان یک ترکیب ضدعفونی‌کننده مهم نیز شناخته می‌شود که اثرهای آنتی‌بیوتیکی قوی دارد (۸). هدف از این مطالعه، بررسی خواص ضدمیکروبی گیاه نعناع فلفلی با روش انتشار در آگار و بررسی کمترین غلظت مهارکننده رشد با روش براث میکرودایلوشن (Broth microdilution)، خواص ضداکسیدانی با روش بی‌رنگ شدن بتاکاروتن و تعیین ترکیب‌های اصلی تشکیل دهنده‌ی آن با دستگاه GC-MS است. اسانس گیاه نعناع فلفلی در منطقه کردستان برای اولین بار است که مطالعه می‌شود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی است و پژوهشکده اسانس‌های طبیعی دانشگاه کاشان حامی این پژوهش بود. مواد اولیه مصرفی از شرکت مرک آلمان خریداری شد. گیاه در تابستان ۹۶ از شهر مریوان جمع‌آوری شد و اساتید گیاه‌شناسی دانشگاه کاشان، آن را تأیید کردند. پس از شستشو، گیاه در دمای اتاق خشک و سپس پودر شد. استخراج اسانس به روش مایکروویو و بدون استفاده از حلال انجام شد. ابتدا گیاه به روش غوطه‌وری در آب خیسانده شد (این مرحله برای ایجاد رطوبت اولیه در گیاه ضروری است). سپس آب اضافی گرفته شد و اسانس‌گیری با استفاده از رآکتور مایکروویو (مدلMicroSYNTH ساخت شرکت Milestone) انجام شد. پس از استخراج، اسانس توسط سولفات سدیم بدون آب، آب‌گیری شد. نمونه اسانس با استفاده از یک دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Agilent HP-6890 مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای و یک دستگاه GC-MS از نوع Hewlett-Packard 6890-5972 با سیستم مجهز به ستون مویینه تجزیه شد. شناسایی اجزای اسانس درنتیجه‌ی مقایسه‌ی طیف جرمی آن‌ها با بانک طیفی و مقایسه‌ی ضرایب بازداری آن‌ها با مقادیر مرجع انجام شد (۹). ضرایب بازداری با استفاده از زمان‌های بازداری آلکان‌های نرمال که با همان دستگاه و تحت همان شرایط تزریق شده، محاسبه شدند. مقادیر نسبی اجزا از روی سطح کل پیک‌ها توسط نرم‌افزار دستگاه محاسبه شد. برای بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی، مقداری از بتاکاروتن در کلروفرم حل شد و محلول تهیه شده به فلاسک ته‌گردی حاوی لینولئیک اسید و توئین افزوده شد. پس از خارج شدن کلروفرم توسط گاز ازت، آب مقطر اشباع از اکسیژن به فلاسک افزوده و فلاسک برای تشکیل امولسیون به‌شدت هم زده شد. امولسیون تهیه شده به لوله آزمایش حاوی نمونه و استاندارد BHT به عنوان کنترل مثبت، اضافه شد و بلافاصله در زمان صفر جذب نمونه در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. سپس نمونه در حمام آب گرم قرار داده شد و دوباره جذب نمونه در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد (۱۰). فعالیت ضداکسیدانی با استفاده از فرمول «درصد بازدارندگی» محاسبه شد:

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

در این رابطه I% درصد بازدارندگی، A_{sample} جذب نمونه پس از زمان مورد نظر، $A_{control}$ جذب کنترل پس از زمان موردنظر و $A_{control(0)}$ جذب کنترل صفر پس از زمان مورد نظر است. برای بررسی خاصیت ضدمیکروبی، مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 29737) ، باسیلوس سوبتیلیس (ATCC 6633) و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (ATCC 12228)، باکتری‌های گرم منفی شیگلا دیسانتریه (PTCC 1188)، کلبسیلا پنومونیه (ATCC 10031)، سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853)، سالمونلا پاراتیفی سروتایپ A (ATCC 5702)، اشرشیا کلی (ATCC 10536) و پروتئوس ولگاریس (PTCC 1182) و قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر (ATCC 16404)، آسپرژیلوس برازیلینسیس(PTCC 5011) و کاندیدا آلبیکنز (ATCC 10231) استفاده شد. باکتری‌ها در محیط نوترینت آگار و قارچ‌ها و مخمر در محیط سابرو دکستروز آگار کشت داده شدند. از کشت هر یک از سویه‌های باکتری ، سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم مک‌فارلند در سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد و سپس در محیط مولرهینتون آگار (MHA or Mueller Hinton Agar) کشت داده شدند. چاهک‌هایی در محیط ایجاد شد و سپس از محلول اسانس به هر چاهک اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت، قطر هاله مهار رشد با خط‌کش اندازه‌گیری و ثبت شد. به منظور به دست آوردن حداقل غلظت مهار-کننده برای سویه‌های استاندارد حساس به اسانس از پلیت‌های ۹۶ خانه-ای استریل و روش براث میکرودایلوشن طبق CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) استفاده شد (۱۱). ابتدا سوسپانسیون هر میکروارگانیسم به کدورت استاندارد نیم مک‌فارلند تهیه شد. نمونه‌ها با محلول دی‌متیل سولفوکساید و در لوله‌های استریل حاوی محیط BHI(Brain Heart Infusion)براث برای سویه‌های باکتری و مخمر رقیق شدند. محیط کشت، سوسپانسیون نیم مک‌فارلند باکتری‌ها و محلول‌های رقیق شده نمونه داخل هر چاهک اضافه شد. آخرین چاهک که شاهد نام دارد بدون محلول نمونه است که به عنوان کنترل منفی استفاده می‌شود. پس از ۲۴ ساعت، کمترین غلظتی که مانع رشد شده به عنوان حداقل غلظت مهارکننده در نظر گرفته شد. آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین و جنتامایسین (برای باکتری‌ها) و نیستاتین (برای قارچ‌ها) به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند.

یافته‌ها و بحث

داده‌های به دست آمده از آنالیز ترکیب‌های اسانس با استفاده از دستگاه GC-MS در جدول ۱ آمده است. منتول، نئومنتیل استات و منتوفوران به‌ترتیب عمده‌ترین ترکیب‌های تشکیل دهنده‌ی اسانس بودند. در مطالعه‌های Ramos da Silva و همکاران، لینالول (۱۲)، Fadaei و همکاران منتول، کاروون، منتون، نئومنتول و منتول‌استات (۱۳)، Mimica-Dukić و همکاران منتول (۱۴)، Izadi و همکاران پیپریتون‌اکسید، آلفاترپینن، منتول ، ایزومنتون و بتا کاریوفیلن (۱۵)، Tsai و همکاران منتول، منتون و ترانس کاران (۱) را ترکیب اصلی تشکیل دهنده اسانس معرفی کردند. به طور کلی در سراسر جهان ترکیبات اصلی تشکیل دهنده‌ی اسانس این گیاه در هر کشور متفاوت است. این ترکیبات در کشور صربستان منتون، منتول و منتیل استات

(۱۶)، در پاکستان منتون و منتول (۱۷)، در هند منتول، منتوفوران و منتیل استات (۱۸)، در ایران منتانول و منتون (۱۹)، در ترکیه منتون، منتول، منتیل استات و منتوفوران (۲۰)، در برزیل لینالول (۱۲) هستند. در مطالعه‌ای که İşcan و همکاران انجام دادند ترکیبات اصلی تشکیل دهنده‌ی اسانس را در چهار منطقه‌ی آدانای ترکیه، یاکیمای واشینگتن، اورگن (یکی از ایالت‌های غرب آمریکا) و هند به ترتیب منتول و منتون گزارش کردند (۲۱). در بیشتر تحقیق‌های انجام شده روی این گیاه، مشتقات از ترکیب‌های اصلی تشکیل‌دهنده اسانس است که با یافته‌های ما همخوانی دارد و در جدول شماره ۱ هایلایت شده است.

جدول ۱. ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس

شماره	نام ترکیب	زمان بازداری	شاخص بازداری	درصد
۱	alpha-Pinene	۶/۳۴	۹۳۹	۰/۶۷
۲	Sabinene	۷/۳۲	۹۷۵	۰/۳۸
۳	beta-Pinene	۷/۴۳	۹۷۹	۰/۹۷
۴	1,8-Cineole	۸/۹۹	۱۰۳۱	۵/۸۴
۵	trans-Sabinene hydrate	۱۰/۰۹	۱۰۹۸	۰/۵۹
۶	L-Menthone	۱۲/۹۸	۱۱۵۲	۳/۴۹
۷	**Menthofuran**	۱۳/۳۴	۱۱۶۴	۱۹/۷۲
۸	**Menthol**	۱۴/۰۵	۱۱۷۱	۴۱/۲۱
۹	Pulegone	۱۵/۷۴	۱۲۳۷	۱/۲۳
۱۰	Piperitone	۱۶/۲۷	۱۲۵۲	۰/۲۸
۱۱	1R-Menthyl acetate	۱۶/۷۱	۱۲۹۵	۰/۹۹
۱۲	**1S-Neomenthyl acetate**	۱۷/۵۶	۱۲۷۳	۲۱/۴۹
۱۳	Isomenthyl acetate	۱۷/۸۷	۱۳۰۵	۰/۷۹
۱۴	Isocaryophyllen	۲۰/۹۳	۱۴۱۹	۰/۷۱
۱۵	trans-Caryophyllene	۲۱/۳۵	۱۴۱۹	۰/۸۲
۱۶	Viridiflorol	۲۶/۶۵	۱۵۹۲	۰/۵۲
۱۷	Heneicosane	۳۹/۲۵	۲۱۰۰	۰/۳۱

کمترین غلظت مهارکننده رشد و قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین، جنتامایسین و نیستاتین در برابر میکروارگانیسم‌های مورد آزمون در جدول ۲ و اسانس در جدول ۳ نشان داده شده است. قطر هاله عدم رشد برای باکتری گرم مثبت *S. epidermidis* نسبت به بقیه بیشتر بود. همچنین اسانس روی مخمر *C. albicans* و دو قارچ *A. brasilienis* و *A. niger* هیچ تأثیری نداشت. براساس یافته‌های آزمون کمترین غلظت مهارکننده رشد، باکتری‌های گرم مثبت *S. epidermidis* و *B. subtilis* و گرم منفی *K. pneumonia* نسبت به سایرین اثر مهارکنندگی بیشتری داشتند. یافته‌ها نشان می‌دهد اسانس دارای اثر مهاری نسبتاً خوبی به‌ویژه روی باکتری‌های گرم مثبت است. İşcan و همکاران و Sivropoulou و همکاران گزارش کردند که اسانس نعناع تأثیر بیشتری بر روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی دارد (۲۱،۲۲) که این نظریه با یافته‌های ما همخوانی دارد. Tsai و همکاران کمترین غلظت مهارکننده را برای مخمر *C. albicans* و باکتری *S. aureus* ۰/۰۰±۰/۰۸ درصد حجمی گزارش دادند (۱). Afridi و همکاران هاله‌ی عدم رشد را برای باکتری *S. aureus* ۰±۱۷/۶۱ میلی‌متر گزارش کردند (۲۳). Gharenaghadeh و همکاران حداقل غلظت مهارکننده را برای باکتری *S. Aureus* ۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند (۲۴). Ramos da Silva و همکاران نیز هاله‌ی عدم رشد را برای باکتری *S. aureus* ۷/۶ ±۰/۵۷ میلی‌متر در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس گزارش کردند (۱۲). Singh و همکاران هاله‌ی عدم رشد گیاه نعناع فلفلی جمع‌آوری‌شده از کشور لیبی را برای باکتری *S. aureus* و *K. pneumonia* به ترتیب ۱۷/۲±۰/۹ و ۱۲/۰±۴/۷ میلی‌متر و کمترین غلظت مهارکننده‌ی رشد را به ترتیب ۰/۰±۰۳/۵ و ۰/۰۲±۰/۴ درصد حجمی گزارشکردند (۲۵). در مطالعه‌ای که İşcan و همکاران انجام دادند کمترین غلظت مهارکننده‌ی رشد اسانس چهار منطقه‌ی آدانای ترکیه، یاکیمای

واشینگتن، اورگن (یکی از ایالت‌های غرب آمریکا) و هند برای باکتری‌های *S. aureus* به ترتیب ۰/۶۲۵، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵ و ۲/۵، *P. aeruginosa* به ترتیب ۲/۵، ۲/۵، ۵/۰ و ۲/۵، *K. pneumonia* به ترتیب ۲/۵، ۲/۵، ۲/۵ و ۲/۵، *S. epidermidis* به ترتیب ۰/۶۲۵، ۲/۵، ۰/۶۲۵ و ۱/۲۵ و *C. albicans* به ترتیب ۰/۶۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲ و ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند (۲۱).

جدول ۲. بررسی اثر ضدمیکروبی آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین، جنتامایسین و نیستاتین

میکروارگانیسم‌ها	ریفامپین		جنتامایسین		نیستاتین	
باکتری‌های گرم مثبت	IZ [b] (mm)	MIC [a] (µg/ml)	IZ (mm)	MIC (µg/ml)	IZ (mm)	MIC (µg/ml)
S. epidermidis	۴۰	۲۵۰	۳۵	۵۰۰	*	*
B. subtilis	۱۳	۱۵/۶	۲۱	۵۰۰	*	*
S. aureus	۱۰	۲۵۰	۲۱	۵۰۰	*	*
باکتری‌های گرم منفی						
S. dysenteriae	۸	۲۵۰	۱۸	۵۰۰	*	*
K. pneumonia	۷	۲۵۰	۲۲	۲۵۰	*	*
P. aeruginosa	-	-	۸	۵۰۰	*	*
S. paratyphi-A serotype	-	-	۲۱	۵۰۰	*	*
قارچ‌ها						
A. niger	*	*	*	*	۲۷	۳۱/۲۵
A. brasilienis	*	*	*	*	۳۰	۳۱/۲۵
C. albicans	*	*	*	*	۳۳	۱۲۵

(-) به معنای عدم فعالیت ضدمیکروبی است.

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

a: کمترین غلظت مهار کننده رشد

b: قطر هاله عدم رشد

جدول ۳. بررسی اثر ضد میکروبی اسانس بر روی میکروارگانیسم‌های منتخب

میکروارگانیسم‌ها	اسانس	
باکتری‌های گرم مثبت	IZ (mm)	MIC (µg/ml)
S. epidermidis	۱۳	۳۱/۲۵
B. subtilis	۱۰	۳۱/۲۵
S. aureus	۱۰	۶۲/۵۰
باکتری‌های گرم منفی		
S. dysenteriae	۱۰	۶۲/۵۰
K. pneumonia	۱۱	۳۱/۲۵
P. aeruginosa	-	-
S. paratyphi-A serotype	-	-
قارچ‌ها		
A. niger	-	-
A. brasilienis	-	-
C. albicans	-	-

(-) به معنای عدم فعالیت ضدمیکروبی است.

یافته‌های حاصل از این آزمون نشان داد قدرت مهاری در ممانعت از اکسیداسیون لینولئیک‌اسید در سیستم بتاکاروتن-لینولئیک‌اسید برای استاندارد BHT ۹۶ درصد و برای نمونه‌ی اسانس ۹۳ درصد است که براین اساس، درصد قدرت مهاری برای استاندارد و نمونه‌ی اسانس نزدیک به هم و بسیار بالا است که نشان دهنده‌ی خاصیت ضداکسیدانی بالا است. در این آزمون هر چه درصد بی‌رنگ شدن بتاکاروتن بیشتر باشد، خواص ضداکسیدانی بالاتر است. بالا بودن خاصیت ضداکسیدانی می‌تواند به علت وجود ترکیب عمده‌ی منتول در اسانس نعناع فلفلی مطالعه حاضر باشد. در مطالعه‌ی Yadegarinia و همکاران (۱۹) و Tabatabaei و همکاران (۲۶) قدرت مهاری برای نمونه‌ی اسانس به ترتیب ۵۰/۱۷ درصد و ۴۱/۳ درصد گزارش شد. در مطالعه‌ی Singh و همکاران قدرت مهاری برای اسانس به روش مهار رادیکال آزاد DPPH ۹۲/۶ ± ۶/۸ درصد گزارش شد (۲۵). با مقایسه‌ی این یافته‌ها با مطالعه‌ی حاضر درمی‌یابیم قدرت مهاری و درنتیجه خاصیت ضداکسیدانی اسانس مورد مطالعه ما بیشتر است. متفاوت بودن خاصیت ضدمیکروبی، ضداکسیدانی و ترکیبات تشکیل دهنده اسانس در مطالعه‌های مختلف ممکن است به علت تفاوت در مناطق جغرافیایی، شرایط آب و هوایی، زمان‌های برداشت، شرایط و مدت زمان نگهداری، روش و مدت زمان استخراج، سویه‌ها و محیط کشت‌های مختلف و ... باشد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان از قدرت مهارکنندگی و ضداکسیدانی بالا و ضدمیکروبی نسبتا خوب اسانس گیاه نعناع فلفلی کشت شده در شرایط اکولوژیکی مریوان دارد. اثر اسانس این گیاه را می‌توان به ترکیب‌های مونوترپنی و مقدار آن‌ها در اسانس نسبت داد که منتول شاخص‌ترین آن‌ها است. بنابراین اسانس این گیاه یکی از ضداکسیدان‌های طبیعی پیشنهادی برای جایگزینی انواع سنتتیک آن است که می‌توان مطالعه‌ها و تحقیق‌های بیشتری روی آن انجام داد. همچنین به دلیل تنوع گیاهان هم از نظر گونه و هم ترکیب‌های شیمیایی سازنده آن‌ها در منطقه‌ی مریوان، پیشنهاد می‌شود تحقیق-های بیشتری برروی گیاهان این منطقه صورت بگیرد.

سپاسگزاری

این کار در پژوهشکده اسانس‌های طبیعی دانشگاه کاشان انجام شد. بدین وسیله از کارشناسان آزمایشگاه که در این پژوهش همکاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌کنیم.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Tsai ML, Wu CT, Lin TF, Lin WC, Huang YC, Yang CH. Chemical composition and biological properties of essential oils of two mint species. Trop J Pharm Res. 2013; 12(4):577-82. [DOI:10.4314/tjpr.v12i4.20]
2. Fatemi F, Dini S, Rezaei MB, Dadkhah A, Dabbagh R, Naij S. The effect of γ-irradiation on the chemical composition and antioxidant activities of peppermint essential oil and extract. J Essent Oil Res. 2014; 26(2):97-104. [DOI:10.1080/10412905.2013.871670]
3. Trevisan SCC, Menezes APP, Barbalho SM, Guiguer ÉL. Properties of mentha piperita: a brief review. World J Pharm Med Res. 2017; 3(1):309-13.
4. Hoffmann BG, Lunder LT. Flavonoids from Mentha piperita leaves. Planta Med. 1984; 50(4):361-369. [DOI:10.1055/s-2007-969736] [PMID]
5. Farnad N, Heidari R, Aslanipour B. Phenolic composition and comparison of antioxidant activity of alcoholic extracts of Peppermint (Mentha piperita). J Food Me:as char:act. 2010; 8(2):113-121. [DOI:10.1007/s11694-014-9171-x]
6. Rahmani F, Rezaeian-Doloei R, Alimoradi L. Evaluation of Phytochemical Composition of Mentha pulegium L. Essential Oil and Its Antibacterial Activity against Several Pathogenic Bacteria. Iran J Med Microbiol. 2018; 11 (6) :167-177
7. Clark GS. An aroma chemical profile. Menthol. Perfum Flavor. 1998; 23:33-46
8. Ernestt E, Pittler MH. The efficacy and safety peppermint (Mentha piperita L.): an update of a systemic review. Public Health Nutr. 2001; 3(4):509-14.
9. Adams R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. J Am Soc Mass Spectrom. 1997; 6:671-82. [DOI:10.1016/S1044-0305(97)00026-3]
10. Moure A, Franco D, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ, Lema JM. Evaluation of extracts from Gevuina avellana hulls as antioxidants. J Agric Food Chem. 2000; 48(9):3890-7. [DOI:10.1021/jf000048w] [PMID]
11. Watts JL, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from

animals: approved standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2008.

12. da Silva Ramos R, Rodrigues ABL, Farias ALF, Simões RC, Pinheiro MT, Ferreira RMdA, et al. Chemical Composition and In Vitro Antioxidant, Cytotoxic, Antimicrobial, and Larvicidal Activities of the Essential Oil of Mentha piperita L.(Lamiaceae). Sci World J. 2017; 2017:1-8. [DOI:10.1155/2017/4927214] [PMID] [PMCID]
13. Fadaei S, Aberoomand AP, Sharifan A, Larijani K. Comparison of Antibacterial Activity and Chemical Composition of Essential Oil Extracted from Mentha piperita L. Herb by Microwave and Hydrodistillation Methods. Food Technol Nutr. 2011; 8(3):28-36. (Persian)
14. Mimica-Dukić N, Božin B, Soković M, Mihajlović B, Matavulj M. Antimicrobial and antioxidant activities of three Mentha species essential oils. Planta med. 2003; 69(5):413-9. [DOI:10.1055/s-2003-39704] [PMID]
15. Izadi Z, Esna-Ashari M, Ahmadvand G, Davoodi P, Piri K. Chemical composition and antibacterial activity of the essence oil of peppermint (Mentha piperita L). Armaghane danesh. 2009; 14(3):45-54.
16. Soković MD, Vukojević J, Marin PD, Brkić DD, Vajs V, Van Griensven LJ. Chemical composition of essential oilsof thymus and mentha speciesand their antifungal activities. Molecules. 2009; 14(1):238-49. [DOI:10.3390/molecules14010238] [PMID] [PMCID]
17. Kanza S, Imran P, Hina B, Butt MS, Tayyaba I, Ushnah SU. Compositional profiling of Mentha piperita. Pakistan J Food Sci. 2014; 24(3):151-6.
18. Alankar S. A review on peppermint oil. Asian J Pharm Clin Res. 2009; 2(2):27-33.
19. Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. Biochemical activities of Iranian Mentha piperita L. and Myrtus communis L. essential oils. Phytochemistry. 2006; 67(12):1249-55. [DOI:10.1016/j.phytochem.2006.04.025] [PMID]
20. Başer K, Kürkçüoğlu M, Demirci B, Özek T, Tarımcılar G. Essential oils of Mentha species from Marmara region of Turkey. J Essent Oil Res. 2012; 24(3):265-72. [DOI:10.1080/10412905.2012.676775]
21. İşcan G, Kirimer N, Kürkcüoğlu Mn, Başer HC, DEMIrci F. Antimicrobial screening of Mentha piperita essential oils. J Agric Food Chem. 2002; 50(14):3943-6. [DOI:10.1021/jf011476k] [PMID]
22. Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. J agric Food Chem. 1996; 44(5):1202-5. [DOI:10.1021/jf950540t]
23. Afridi MS, Ali J, Abbas S, Rehman SU, Khan FA, Khan MA, et al. Essential oil composition of Mentha piperita L. and its antimicrobial effects against common human pathogenic bacterial and fungal strains. Pharmacol Online. 2016; 3:90-7.
24. Gharenaghadeh S, Forghani S, Gharehnaghadeh S, Sowti M. Evaluation of Antimicrobial Properties of Methanolic Extract, Essential Oil and Nanolipozom of Mentha piperita. J Food Sci Technol. 2017; 14(68):93-102. (Persian)
25. Singh R, Shushni MA, Belkheir A. Antibacterial and antioxidant activities of Mentha piperita L. Arab J Chem. 2015; 8(3):322-8. [DOI:10.1016/j.arabjc.2011.01.019]
26. Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Vasiee AR, Mortazavi SA, Shahidi F. Evaluation antioxidant activity, phytochemical constituents and antimicrobial of Mentha Piperita essential oil on some infectious and poisonous microorganisms. J Food Sci Technol. 2018; 15(76):67-76.