

Antimicrobial Effects of Aqueous-Alcoholic Extract of Artemisia Turanica against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): An in vitro Study

Hasan Bagheri Yazdi^{1*} , Hamed Norouzi Taheri¹ 

¹. Dept Basic Sciences, Farhangian University, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:

Received: 01 July 2021
Revised: 16 November 2021
Accepted: 09 January 2022
Published Online: 23 May 2022

*** Correspondence to:**
Hasan Bagheri Yazdi
Dept Basic Sciences, Farhangian
University, Iran
Email: bagheriyazdi@cfu.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) are on the rise worldwide. Over the last few decades, new compounds of natural origins have regained interest as an alternative to antibiotics in the treatment of MRSA infections. This study aimed to investigate the antimicrobial effects of Artemisia Turanica extract, a native plant of Iran.

Material & Methods: The plant was subjected to aqueous-alcoholic extraction, and its antibacterial effects were then evaluated using the disk diffusion method. All tests were performed in triplicate, and the mean diameter of the growth inhibition zone was recorded. Finally, the minimum inhibitory concentrations and minimum bactericidal concentrations (MIC and MBC) against MRSA were determined using the micro broth dilution method.

(Ethic code: IR.MUMS.REC.1401.015)

Findings: The recorded antimicrobial activity against MRSA of the plant extract (29 ± 1.5) was higher than that of the vancomycin antibiotic (14 ± 1.4). The effect of MIC on MRSA was recorded at $98 \mu\text{g/mL}$, and the MBC was estimated at $157 \mu\text{g/mL}$. The plant extract also showed antifungal activity against the tested pathogenic fungal strains.

Discussion & Conclusion: Artemisia Turanica extract has a strong antibacterial activity against MRSA. Accordingly, the purification and identification of active compounds of this extract on an industrial scale pave the way for introducing new antimicrobial compounds.

Keywords: Antibacterial effect, Drug resistance, MRSA, Plant extract

➤ How to cite this paper

Bagheri Yazdi H, Norouzi Taheri H. Antimicrobial Effects of Aqueous-Alcoholic Extract of Artemisia Turanica against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): An in vitro Study. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(2): 1-7.



© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

بررسی آثار ضد میکروبی عصاره آبی_الکلی گیاه آرتمیزیا تورانیکا (Artemisia Turanica) علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA): یک مطالعه آزمایشگاهی

حسن باقری یزدی^{*} ، حامد نوروزی طاهری^۱

^۱. گروه علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۹

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۹

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۳/۰۲

نویسنده مسئول:

حسن باقری یزدی

گروه علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان،

ایران

Email:

bagheriyazdi@cfu.ac.ir

واژه‌های کلیدی:

اثر ضد باکتریایی، عصاره گیاه، مقاومت دارویی، MRSA

استناد: باقری یزدی، حسن؛ نوروزی طاهری، حامد. بررسی آثار ضد میکروبی عصاره آبی_الکلی گیاه آرتمیزیا تورانیکا (Artemisia Turanica) علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA): یک مطالعه آزمایشگاهی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، تیر ۱۴۰۱؛ (۳۰): ۱-۷.



مقدمه

(MRSA) است (۸-۱۰).

با توجه به موارد بالا، تحقیقات مستمر برای یافتن داروهای جدید ضد میکروبی علیه باکتری‌های مقاوم به دارو ادامه دارد. گیاهان بومی ایران یکی از منابع مهم دارو هستند که در طب غنی و سنتی ایران، به صورت تجربی از آن‌ها استفاده شده است. در کشور ما نیز مطالعات بسیاری برای جداسازی عصاره گیاهی با فعالیت ضد میکروبی از مناطق مختلف گزارش شده است؛ اما تاکنون هیچ مطالعه‌ای روی گیاه آرتیمیزیا تورانیکا با هدف بررسی آثار ضد میکروبی علیه پاتوژن‌های مقاوم به دارو صورت نگرفته است. در این تحقیق برای اولین بار، پس از جداسازی عصاره گیاه، فعالیت ضد باکتریایی علیه پاتوژن مقاوم به دارو MRSA، فعالیت ضد فارچی و کمبینه غلظت بازدارندگی رشد بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

شناسایی و جمع‌آوری گیاه: جمع‌آوری گیاه Artemisia turonica با شماره هر باریوم ۱۲۵۷۲ از روستایی به نام مزرعه شیخ از توابع شهرستان خوف انجام شد که در فاصله ۲۴۹ کیلومتری از مشهد قرار گرفته است. برگ‌ها و سرشاخه‌های نازک گیاه جدا شد و در شرایط مناسب (تاریک و خشک) نگهداری و به طور کامل خشک و پس از خشک شدن، آسیاب گردید و برای عصاره گیری استفاده شد.

آماده سازی عصاره اتانولی گیاه: عصاره گیری به روش خیسانده به شرح زیر صورت گرفت: ۱۰۰ گرم از گیاه درمنه قرمز آسیاب شده در ۱۸۰۰ میلی لیتر حلال ۷۰ درصد آبی-الکلی (۷۰ درصد اتانول ۹۶ درصد و ۳۰ درصد آب مقطر) حل گردید و به مدت ۷۲ ساعت در ظرف دربسته در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داده و به طور مرتب هم زده؛ سپس محلول به دست آمده از کاغذ صافی و اتمن عبور داده شد. مایع به دست آمده در دستگاه روتاتوری حذف حلال و تغییض گردید (۱۱، ۱۲).

سویه‌های آزمایش میکروبی: باکتری‌های استفاده شده شامل سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

گیاه درمنه با نام علمی Artemisia turonica از جمله گیاهان دارویی است که در بسیاری از مناطق ایران برای درمان برخی از بیماری‌های معده استفاده می‌شود و روی بسیاری از گونه‌های آن مطالعاتی انجام شده است. این گیاه در بسیاری از نقاط ایران با شرایط آب و هوایی گوناگون، به طور وسیعی رشد کرده و در بسیاری از مراتع گشور به ویژه مناطق خشک که رشد گیاهان مترقبه دیگر به علت شرایط آب و هوایی تا اندازه‌ای با مشکل مواجه است، پوشش غالب مراتع است. این گیاه حتی در برخی از نقاط خراسان رضوی و مرکزی ایران، دشت‌های درمنه را به وجود آورده‌اند. یکی از علل این گسترش می‌تواند توانایی بالای این گیاه در سازگاری با شرایط آب و هوایی گوناگون باشد (۳-۱).

در سال‌های اخیر، تمايل پژوهشگران برای کشف و معرفی ترکیبات ضد میکروبی با منشا گیاهی افزایش یافته است؛ زیرا گیاهان ترکیباتی با ساختمان‌های مولکولی پیچیده‌ای می‌سازند که برخی از آن‌ها خاصیت ضد میکروبی دارد. گیاهان متابولیت‌های ثانویه متعددی از جمله آلkalوئیدها، فلاونوئیدها، ایزو فلاونوئیدها، تانن‌ها، گلیکوزیدها، ترپین‌ها و ترکیبات فنلی را می‌سازند که قادرند به عنوان عوامل ضد میکروبی معرفی گردند (۴، ۵).

امروزه، با افزایش بروز مشکل مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک در بیمارستان‌ها، نیاز فوری به دستیابی به داروهای ضد باکتریایی جدید وجود دارد و ترکیبات طبیعی، به ویژه ترکیبات جدادشده از گیاهان از اهمیت و جایگاه ویژه‌ای برخوردار هستند (۶). یکی از چالش‌های سازمان بهداشت جهانی گسترش روزافرون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس است که به علت پیدایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در این باکتری و از سویی، کاهش تعداد آنتی‌بیوتیک‌های در دسترس برای درمان این عفونت‌های ناشی از آن، نیاز به ترکیبات ضد میکروبی جدید را ایجاد کرده است. تحقیقات صورت گرفته در ایران نیز نشان داده که تقریباً ۱۰ درصد سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدادشده از بیماران و کارمندان مراکز بهداشتی، سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین

تهیه شد؛ پس از آن، به صورت متوالی رقیق‌سازی دو برابر در محدوده غلظت ۵ تا $۰/۰۳۹$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محیط مایع مولر هینتون (مرک، آلمان) آماده گردید. از هر رقت ۱۸۰ میکرو‌لیتر به هر چاهک (هر رقت سه تکرار) اضافه شد و درنهایت، از سوسپانسیون باکتری‌های مقاوم (معادل نیم مک‌فارلند) ۲۰ میکرو‌لیتر به هر رقت اضافه گردید. از محیط کشت بدون باکتری به عنوان کنترل منفی و از آنتی‌بیوتیک و نکومایسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (Memmert، ساخت آمریکا) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، میزان رشد باکتری با استفاده از ترازوولیوم کلراید (TTC) بررسی گردید. ۲۰ میکرو‌لیتر از محلول ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر TTC به هر چاهک اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌ماگذاری گردید. غلظت آخرین چاهک که هیچ تغییری رنگ در آن وجود ندارد، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین کمینه غلظت کشندگی از هر کدام از رقت‌هایی که باکتری هیچ کدورتی در آن نشان نداده بود، با کمک لوب روی محیط کشت نوتریت آگار کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت، کمترین غلظتی که در آن هیچ رشد باکتری مشاهده نشد، به عنوان کمینه غلظت کشندگی گزارش گردید (۱۶-۱۸).

آزمون‌های آماری: نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد. آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه برای مقایسه مقادیر حاصل از غلظت‌های مختلف و مقدار احتمال ($P < 0.05$) به عنوان مبنای معنی‌داری داده‌ها قرار گرفت.

یافته‌ها

جداسازی گیاه: در این پژوهش، از هر بخش مزرعه از توابع شهرستان خواف، از گیاه نمونه‌برداری شد و ویژگی‌های مورفولوژی گیاه بررسی گردید (شکل شماره ۱). فعالیت عصاره گیاه علیه استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA): فعالیت ضدباکتریایی عصاره گیاه با استفاده از روش دیسک دیفیوژن علیه سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و ۸ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس

استاندارد (ATCC 33591) و سویه‌های شناسایی شده از نمونه‌های بالینی بخش میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد بود. این باکتری‌ها با استفاده از روش استاندارد شناسایی شد و به بخش میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انتقال یافت. این باکتری‌ها با استفاده از روش استاندارد تأیید و به بخش میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی مشهد منتقل گردید (۱۳).

آثار خصله‌باکتریایی علیه پاتوژن مقاوم به دارو: برای تعیین حساسیت سویه‌های باکتری مقاوم نسبت به عصاره آبی_الکلی گیاه، از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد، بدین ترتیب که ابتدا از سویه MRSA سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک‌فارلند $۱/۵ \times ۱0^۸$ cfu/ml-۱ تهیه گردید و کشت یکنواخت بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار داده شد. در ادامه با توجه به هدف دستیابی به آثار ارزشمند ضدمیکروبی، ۴۰ میکرو‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره گیاه ($۰/۱$ ، $۰/۲$ ، $۰/۳$ ، $۰/۴$ و $۰/۵$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر الکل-آب) تهیه شده روی دیسک کاغذی بلانک (پادتن طب) قرار داده شد. دیسک‌ها پس از خشک شدن، با فاصله معین روی پلیت‌ها قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌ماگذاری شد. درنهایت، قطر هاله عدم رشد به وسیله خط کش میلی‌متری در سه جهت اندازه‌گیری و ثبت گردید. در این آزمایش، از دیسک حاوی الکل-آب (حلال عصاره) به عنوان کنترل منفی و نکومایسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای حصول اطمینان، این آزمایش برای هر سویه باکتری سه بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله در سه بار به عنوان قطر نهایی ثبت شد (۱۴، ۱۵).

تعیین MIC و MBC: کمینه غلظت مهارکنندگی در پلیت ۹۶ خانه استریل و با روش میکروبیاث دایلوشن تعیین گردید. بدین منظور، پاتوژن مقاوم به دارو در محیط کشت نوتریت براث کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌ماگذاری شد. پس از ۲۴ ساعت، کدورت نمونه در ۶۰۰ نانومتر (OD600) با استفاده از نرمال‌سالین استریل در حدود $۰/۱۲۸$ تنظیم گردید. ابتدا از عصاره گیاه خشک شده هر جایه، یک محلول استوک با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حلal عصاره

۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره علیه ایزوله شماره یک ($31 \pm 1/5$)، MRSA ($29 \pm 1/5$) و ایزوله شماره هفت ($28 \pm 1/7$) فعالیت بهتری نسبت به آنتی بیوتیک وانکومایسین ($14 \pm 1/4$) و سایر غلظت‌ها نشان دادند (جدول شماره ۱). شکل شماره ۲ فعالیت ضدبacterیایی مناسب عصاره (قطر هاله عدم رشد) در مقایسه با آنتی بیوتیک وانکومایسین، علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین را نشان می‌دهد. نتایج همچنین نشان داد، اثر کمینه غلظت مهار کنندگی روی MRSA برابر ۹۸ میکروگرم بر میلی لیتر و کمینه غلظت کشندگی آن ۱۵۷ میکروگرم بر میلی لیتر است.



شکل شماره ۱. گیاه آرتیزیا تورانیکا

جدا شده از بیماران بررسی شد. نتایج نشان داد، غلظت

جدول شماره ۱. فعالیت ضدبacterیایی عصاره خام استخراج شده از گیاه علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) و استافیلوکوکوس اورئوس جدادشده از بیماران به روش دیسک دیفیوژن

باکتری‌های آزمایش شده	کنترل مثبت	کنترل منفی	غلطت ۰/۱	غلطت ۰/۲	غلطت ۰/۳	غلطت ۰/۴	غلظت ۰/۵	حاله عدم رشد بر حسب میلی‌گرم
MRSA	-	-	-	-	-	-	-	-
S.aureus 1	-	-	-	-	-	-	-	-
S.aureus 2	-	-	-	-	-	-	-	-
S.aureus 3	-	-	-	-	-	-	-	-
S.aureus 4	-	-	-	-	-	-	-	-
S.aureus 5	-	-	-	-	-	-	-	-
S.aureus 6	-	-	-	-	-	-	-	-
S.aureus 7	-	-	-	-	-	-	-	-
S.aureus 8	-	-	-	-	-	-	-	-

-: بدون اثر

کنترل منفی: دیسک حلال

کنترل مثبت: دیسک وانکومایسین

بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهد که سامانه‌های ژنتیکی در باکتری‌های بیماری‌زا قادر به برنامه‌ریزی برای مقابله با عوامل تهدید‌کننده زندگی آنها است. بر اساس این، گونه‌های مقاوم میکروبی در حال ایجاد و گسترش در سراسر جهان هستند. این موضوع باعث می‌شود بیماری‌های ایجادشده توسط سویه‌های مقاوم از حیطه درمان خارج گرددند. باکتری MRSA یکی از معضلات بهداشت عمومی است که به‌سبب افزایش مقاومت آن به عوامل ضد میکروبی اهمیت دارد. برای حل این مشکل جهانی، به ترکیبات فعال جدید نیاز است که یکی از ابزارها و منابع موجود برای تولید آنتی بیوتیک‌های جدید ترکیبات طبیعی مثل عصاره گیاهان، به‌ویژه گیاهان بومی کشور هستند. با توجه به موارد بالا، گیاه



شکل شماره ۲. هاله عدم رشد دیسک‌های آغشته به عصاره خام

استخراج شده از گیاه علیه MRSA در مقایسه با آنتی بیوتیک

وانکومایسین

(۲۴). در مطالعه روحی و همکاران در سال ۲۰۲۰ روی درمنه کوهی علیه پاتوژن مقاوم به دارو، بهترین میزان کمینه غلظت مهارکنندگی عصاره گیاه ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود (۲۵)؛ همچنین در مطالعه مشابه که شجاعی و همکاران بر عصاره گیاه درمنه کوهی علیه MRSA میکرو گرم بر میلی لیتر گزارش شد (۲۶)، در حالی که میزان میکرو گرم بر میلی لیتر گزارش شد (۲۶)، در حالی که میزان کمینه غلظت مهارکنندگی عصاره گیاه ما علیه MRSA ۹۸ میکرو گرم بر میلی لیتر به دست آمد که در مقایسه با این دو پژوهش، فعالیت ضدミکروبی بهتری نشان داد.

به طور کلی، یافته ها معرف آن هستند که در همه غلظت ها، عصاره آبی - الکلی فعالیت ضدミکروبی خوبی در مقابل باکتری های پاتوژن مدنظر ایجاد می کند؛ اما با کاهش غلظت عصاره گیاه، میزان ممانعت از رشد باکتری کم می شود.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر و با مقایسه آن با مطالعات مربوط در این زمینه می توان گفت که عصاره گیاه آرتیمیزیا تورانیکا می تواند به عنوان یک منع ترکیبات ضدミکروبی جدید علیه استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین موردمطالعه دقیق تری قرار گیرد. از آنجاکه در کشورهای مختلف، مقاومت روزافرون استافیلوکوکس اورئوس نسبت به متی سیلین و سایر آنتی بیوتیک ها دیده می شود؛ بنابراین، در مطالعات آتی پیشنهاد می گردد با خالص سازی و شناسایی متابولیت های فعال گیاه، بتوان آنتی بیوتیک های جدید و مناسب برای درمان بیماری های عفونی ناشی از میکروار گانیسم های مقاوم معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی است که بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه فرهنگیان و مدیر محترم امور پردیس های دانشگاه فرهنگیان خراسان رضوی، به سبب تأمین هزینه های مالی و پشتیبانی تجهیزات و امکانات تشکر به عمل می آید.

کد اخلاق: IR.MUMS.REC.1401.015

References

- Mozaffarian V. Compositae (Anthemideae & Ehinopeae) no. 59. Tehran: Research Institute of Forest and Rangelands. Flora of Iran. 2008; pp. 199–261.
- Emami S, Aghazari F. Iranian endemic phanerogams. *Iran J Pharma Res* 2010; 3: 62-63.
- Ashrafpour M, Rezaei H, Sefidgar A, Baradarani M, Sharifi H. Survey of the Antibacterial

آرتیمیزیا تورانیکا بومی مناطق شرقی ایران انتخاب شد. در سال های اخیر، مطالعات در زمینه جداسازی و شناسایی ترکیبات فعال از مناطق مختلف ایران گزارش شده است. در مطالعات پیشین، اغلب آثار ضد میکروبی روی پاتوژن های غیر مقاوم صورت گرفته است. بررسی این نتایج و داده ها نشان می دهد، تاکنون مطالعه روی عصاره گیاه درمنه برای جداسازی ترکیبات فعال علیه پاتوژن های مقاوم به دارو انجام نشده است (۱۹-۲۱)؛ بنابراین، با توجه به اهمیت این گیاه در زمینه تولید ترکیبات فعال، مطالعه حاضر با هدف بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره گیاه علیه پاتوژن های مقاوم به دارو است.

تاکنون اجزای شیمیایی متنوع تولید شده توسط این گیاه مانند فلاونوئیدها، استروپن ها، مونوتربن ها، تربن و لاکتون تربن گزارش شده است (۴، ۵). در یک مطالعه، اثر عصاره متانولی بخش های هوایی گیاه در برابر استافیلوکوک اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و سودوموناس آنروژینوزا ثابت شده است (۲۲). این نتایج مشابه یافته های پژوهش حاضر، وجود ترکیبات فعال با خاصیت ضد میکروبی عصاره گیاه در غربالگری اولیه را اثبات می کند.

برای انجام مراحل بعدی کار، به جداسازی متابولیت های فعال تولید شده توسط گیاه نیاز بود. با توجه به اینکه ترکیبات ضد میکروبی ساختار آلی و در حلال های آلی قابلیت حل شدن دارند، از میان حلال های گوناگون، از حلال آبی - الکلی استفاده گردید (۲۳). نتایج فعالیت ضد میکروبی خوب عصاره خام استخراج شده با این حلال نشان دهنده تأیید این موضوع است.

روش انتخابی ما برای بررسی فعالیت ضد میکروبی روش دیسک گذاری و تعیین کمینه غلظت ممانعت کنندگی و کشنندگی با روش میکرودایلشن آزمایش و بررسی گردید. گان و همکاران در سال ۲۰۱۹ در چین، آثار ضد باکتریایی گیاه درمنه چینی را با روش دیسک دیفیوژن بررسی کردند و نشان دادند قطر هاله عدم رشد در برابر استافیلوکوکوس اورئوس ۱۳/۲۳ میلی متر است، در حالی که در این پژوهش، قطر هاله عدم رشد در برابر این باکتری ۲۷ میلی متر ثبت شد

- Properties of Aqueous Ethanolic and Methanolic Extraction of *Artemisia Annua* Around the City of Babol. J Ilam Uni Med Sci 2016; 23:129-141
4. Tan RX, Tang HQ, Hu J, Shuai B. Lignans and sesquiterpene lactones from *Artemisia sieversiana* and *Inula racemosa*. *Phytochemistry* 1998; 49:157-161. doi: 10.1016/s0031-9422(97)00889-3.
 5. Bora KS, Sharma A. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. *Pharm Biol* 2011; 49:101-9. doi: 10.3109/13880209.2010.497815
 6. Ellis MD, Baxendale FP. Toxicity of seven monoterpenoids to tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) and their honey bee (Hymenoptera: Apidae) hosts when applied as fumigants. *J Econ Entomol* 1997; 90:1087-91. doi:10.1093/jee/90.5.1087.
 7. Al-Haj NA, Mashan NI, Shamsudin MN, Mohamad H, Vairappan CS, Sekawi Z. Antibacterial activity in marine algae Eucheumad enticulatum against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *Res J Biol Sci* 2009;4: 519-24. doi: rjbsci.2009.519.524.
 8. Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2001;7: 323-6. doi: 10.3201/eid0702.010236.
 9. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997;10: 505-20. doi: 10.1128/CMR.10.3.505.
 10. Bataineh S, Tarazi YH, Ahmad WA. Antibacterial efficacy of some medicinal plants on multidrug resistance bacteria and their toxicity on Eukaryotic cells. *Appl Sci* 2021;11, 8479. doi.org/10.3390/app11188479
 11. Dulger B, Gonuz A. Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. *Asian J Plant Sci* 2004; 3: 104-7. doi:10.3923/ajps.2004.104.107
 12. Murphy Cowan M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:564-82. doi: 10.1128/CMR.12.4.564
 13. Norouzi H, Rabbani khorasgani M, Danesh A. Anti-MRSA activity of a bioactive compound produced by a marine Streptomyces and its optimization using statistical experimental design. *Iran J Basic Med Sci* 2019; 22:1073-1084. doi: 10.22038/ijbms.2019.33880.8058
 14. Andrews J. for the BSAC Working Party on Susceptibility Testing, BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 7). *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:256-78. doi: 10.1093/jac/dkn194
 15. Nostro A, Ger MP, Angelo VD, Cannatelli MAC. Extraction methods and bioautography for evaluation plant antimicrobial activity. *Applied Microbiol* 2000; 15:379-85. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00731.x.
 16. Salar Bashi D, Attaran Dowom S, Fazly Bazzaz BS, Khanzadeh F, Soheili V, Mohammadpour A. Evaluation, prediction and optimization the ultrasound-assisted extraction method using response surface methodology: antioxidant and biological properties of *Stachys Parviflora* L. *Iran J Basic Med Sci* 2016; 19(5): 529-41.
 17. 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; 12:73-84.
 18. Soheili V, Khedmatgozar Oghaz N, Sabeti Z, Fazly Bazzaz BS. The novel effect of cis-2-decenoic acid on biofilm producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res* 2016; 6: 1. doi: .org/10.4081/mr.2015.6158
 19. Boyle VJ, Fancher ME, Ross RW. Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high concentration antimicrobial disks. *Antimicrob Agents Chemother* 1973; 3: 418-24. doi: 10.1128/aac.3.3.418
 20. Ashrafpour M, Rezaei H, Sefidgar A, Baradaran M, Sharifi H. Survey of the antibacterial properties of aqueous ethanolic and methanolic extraction of *Artemisia annua* around the city of Babol. *J Ilam Uni Med Sci* 2015;23: 129-41.
 21. Gholampourazizi E, Rouhi S, Nouri B, Hassanzadeh Miandasteh SH. In vitro study of antifungal effect of walnut (*Juglans regia* L.) leaf extract on the *Malassezia furfur* fungus. *SJKUMS* 2015;20: 30-9. 22.
 22. Ramezani M, Fazli-Bazzaz BS, Saghafi-Khadem F, Dabaghian A. Antimicrobial activity of four *Artemisia* species of Iran *Fitoterapia*. 2004; 75:201-3. doi: 10.1016/j.fitote.2003.11.006
 23. Ashrafpour M, Rezaei H, sefidgar A, Baradaran M, Sharifi H. Survey of the Antibacterial Properties of Aqueous Ethanolic and Methanolic Extraction of *Artemisia Annua* Around the City of Babol. *J Ilam Uni Med Sci* 2015; 23:129-41.
 24. Guan X, Ge D, Li S, Huang K, Liu J, Li F. Chemical composition and antimicrobial activities of *Artemisia argyi* Lévl. et Vant essential oils extracted by simultaneous distillation-extraction, subcritical extraction and hydrodistillation. *Molecules* 2019; 24:483.doi: 10.3390/ molecules 24030483
 25. Rouhi S, Ramazanzadeh R, Mohammadi Sh, Abodollahi A, Hakib P, Mohammadi B, et al. Antibacterial effects of *Artemisa aucheri* leaf and *Spirulina Blue-Green algae* aqueous and alcoholic extracts on the multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from the patients with pneumonia. *SJKU* 2020; 25:124-39.
 26. Shojaei Baghini G, Akhavan Sepahi A, Rafie Tabatabaei R, Tahvildari K. The combined effects of ethanolic extract of *Artemisia aucheri* and *Artemisia oliveriana* on biofilm genes expression of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Iran J Med Microbiol* 2018;10:417–23.