

Investigation of Different Extraction Methods on Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Teucrium hyrcanicum* L.

Mostafa Govahi^{1*}, Hadiseh Ghorbannia Delavar², Fatemeh Sadat Mousavi Khorshidi²,
Mojtaba Ranjbar³, Somayeh Rahaiee³

¹ Dept of Nanobiotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

² Dept of Medicinal Plants, Faculty of Medicinal Plants, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

³ Dept of Microbial biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: 05 December 2020

Revised: 24 January 2021

Accepted: 11 April 2021

Published Online: 23 July 2022

* Correspondence to:

Mostafa Govahi

Dept of Nanobiotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

Email:

m.govahi@ausmt.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Medicinal plants are valuable sources of different antioxidant and antimicrobial compounds. In this study, the effects of different extraction methods with aqueous and methanolic solvents were investigated on the antioxidant and antimicrobial activities of *Teucrium hyrcanicum* L.

Material & Methods: In this basic experimental study, aqueous and methanolic extraction was carried out using three methods, including a magnetic stirrer, a Bain-Marie bath, and Shaker. The antioxidant effects were then determined using DPPH and RP methods along with the determination of total phenol and total flavonoid. The antibacterial effect of aqueous and methanolic extracts against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, and *Escherichia coli* was determined through the disk diffusion method.

(Ethic code: IR.ausmt.rec.1398.11.34)

Findings: The evaluation of antioxidant properties showed that methanolic extract had a stronger effect than aqueous extract. Moreover, it was demonstrated that the magnetic stirrer method was superior to the other two extraction methods. The same results were obtained for total phenol and total flavonoid as well. Evaluation of antibacterial properties revealed that methanolic extract had antibacterial activity, while aqueous extract did not show antibacterial activity.

Discussion & Conclusion: The results of this study showed that *Teucrium hyrcanicum* L. was more effectively extracted through the magnetic stirrer method than other extraction methods. Both aqueous and methanolic extracts had antioxidant properties, while only methanol extracts showed antibacterial properties. Therefore, this plant can have good therapeutic application in the treatment of diseases due to its antioxidant properties.

Keywords: Antioxidant, Antibacterial, Extract, *Teucrium hyrcanicum* L.

➤ How to cite this paper

Govahi M, Ghorbannia Delavar H, Mousavi Khorshidi FS, Ranjbar M, Rahaiee S. Investigation of Different Extraction Methods on Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Teucrium hyrcanicum* L. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(3): 44-54.

بررسی روش‌های مختلف عصاره‌گیری بر فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی گیاه دارویی مریم‌نخودی خزری (*Teucrium hyrcanicum L.*)

مصطفی گواهی^۱، حدیثه قربان‌نیا دلاور^۲، فاطمه‌السادات موسوی خورشیدی^۲، مجتبی رنجبر^۳، سمیه رهایی^۳

^۱ گروه نانو زیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

^۲ گروه گیاهان دارویی، دانشکده گیاهان دارویی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

^۳ گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

مقدمه: گیاهان دارویی منابع ارزشمندی از ترکیبات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی هستند. در این مطالعه، تأثیر روش‌های مختلف عصاره‌گیری با حلال‌های آبی و متانولی بر فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی گیاه مریم‌نخودی خزری بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: این تحقیق یک مطالعه پایه‌ای تجربی است. در این مطالعه آزمایشگاهی، عصاره‌گیری آبی و متانولی با سه روش مگنت، بن ماری و شیکر از نمونه خشک انجام شد؛ سپس اثر آنتی اکسیدانی با روش‌های حذف رادیکال آزاد DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) و میزان قدرت کاهندگی (Reducing power) به همراه تعیین میزان فنل تام و فلاونوئید تام تعیین گردید. بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره آبی و متانولی علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرنوس و اشریشیا کلائی به روش دیسک دیفیوژن صورت گرفت.

یافته‌ها: بررسی خواص آنتی اکسیدانی نشان داد که عصاره متانولی اثر قوی‌تری نسبت به عصاره آبی دارد. در میان روش‌های مختلف عصاره‌گیری، روش مگنت نسبت به دو روش دیگر برتری داشت. این نتایج درباره مقدار فنل تام و فلاونوئید تام نیز به همین صورت بود. بررسی خواص آنتی باکتریایی مشخص کرد که عصاره متانولی فعالیت آنتی باکتریایی داشت، درحالی‌که عصاره آبی اثر آنتی باکتریایی از خود نشان نداد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده از این بررسی نشان داد که عصاره‌گیری به روش مگنت، بالاترین کارایی را در گیاه مریم‌نخودی خزری داشت. هر دو عصاره آبی و متانولی خواص آنتی اکسیدانی داشتند، درحالی‌که تنها عصاره متانولی خواص آنتی باکتریایی از خود نشان داد؛ بنابراین می‌توان گفت عصاره متانولی به روش مگنت، بهترین خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی را دارد.

نویسنده مسئول:

مصطفی گواهی

گروه نانو زیست فناوری، دانشکده

زیست فناوری، دانشگاه تخصصی

فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

Email:

m.govahi@ausmt.ac.ir

واژه‌های کلیدی: آنتی اکسیدان، آنتی باکتریال، عصاره، مریم‌نخودی خزری

استناد: گواهی، مصطفی؛ قربان‌نیا دلاور، حدیثه؛ موسوی خورشیدی، فاطمه‌السادات؛ رنجبر، مجتبی؛ رهایی، سمیه. بررسی روش‌های مختلف عصاره‌گیری بر فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی گیاه دارویی مریم‌نخودی خزری (*Teucrium hyrcanicum L.*). مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، شهریور ۱۴۰۱؛ ۳۰(۳): ۴۴-۵۴.

طبیعت منبعی غنی از ترکیبات دارویی است که بخشی از آن در گیاهان نهفته است. استفاده از گیاهان دارویی از قدیمی‌ترین راه‌های بشر برای درمان بیماری‌ها بوده است. اخیراً رویکرد مردم بیشتر کشورهای جهان به مصرف داروهای گیاهی بیشتر شده است. به نظر می‌رسد عوارض جانبی کمتر نسبت به داروهای شیمیایی، علت اصلی این تغییر الگوی مصرف به نفع داروهای گیاهی باشد. داروهایی که امروزه در دنیا به‌طور وسیعی برای درمان انواع بیماری‌ها اعم از عفونت‌های باکتریایی، ویروسی و قارچی تا انواع بیماری‌های متابولیک به کار می‌روند، منشأ طبیعی دارند. این ترکیبات نه تنها در درمان بیماری‌های ناشی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مؤثرند، بلکه به‌طور هم‌زمان می‌توانند آثار جانبی‌ای را نیز کاهش دهند که اغلب با مصرف نگهدارنده‌های شیمیایی و سنتزی همراه هستند (۱).

امروزه استفاده از عصاره‌های گیاهی برای درمان کمکی عفونت‌های میکروبی، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود معطوف کرده است. تاکنون تعداد فراوانی از گیاهان عالی به‌منظور یافتن مواد ضد میکروبی بررسی شده‌اند؛ اما هیچ‌یک از ترکیبات ضد میکروبی حاصل از آن‌ها قادر به رقابت با آنتی‌بیوتیک‌های رایج نیست و جستجو برای یافتن عوامل گیاهی ضد میکروبی همچنان ادامه دارد (۲)؛ به‌عنوان مثال، مریم‌گلی یکی از معروف‌ترین گیاهان دارویی است که از دیرباز آثار ضدباکتریایی و خواص دیگر آن مورد توجه بوده است. در آزمایشی، اثر ضد میکروبی عصاره آبی سه گونه مریم‌گلی بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شریشیاکولی* و *سودوموناس آنروجینوزا* بررسی گردید که فعالیت ضدباکتریایی از خود نشان داد (۳).

مصرف داروهای صنعتی و ترکیبات شیمیایی می‌تواند به ایجاد واکنش‌های متابولسمی نامطلوب منجر شود و در اغلب اوقات، رادیکال‌های آزاد و پراکسیدها تولید کردند. آنتی‌اکسیدان‌ها یکی از مهم‌ترین و باارزش‌ترین

ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان دارویی هستند. امروزه با تغییر سبک زندگی و بالا رفتن استرس، میزان عوامل اکسیداتیو در بدن افزایش یافته است (۴). کاربرد آنتی‌اکسیدان‌ها در مواد غذایی یکی از مؤثرترین روش‌های کُند کردن اکسایش لیپیدها و محافظت اجزای سلول انسانی در برابر خطر رادیکال‌های آزاد است. کشف جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدها به‌وسیله ترکیبات فنولی موجود در گیاهان دارویی سبب استفاده از این ترکیبات به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در صنایع غذایی شد (۵).

گیاه مریم‌نخودی (*Teucrium hyrcanicum* L.) از خانواده نعنائیان است. این گیاه از معروف‌ترین گونه‌های جنس *Teucrium* و سرشار از ترکیبات فنلی است که در صنایع غذایی و دارویی به‌سبب خواص ضد میکروبی، ضد عفونی، آنتی-اکسیدانی، ضد التهابی و کاهنده قند خون استفاده می‌شود (۶). مریم‌نخودی خزری گیاهی پایا، ایستاده، به ارتفاع ۷۰-۳۰ سانتی‌متر، پوشیده از کرک‌های برهم خوابیده، برگ سبز علفی، غشایی، دارای دم‌برگ کوتاه، تخم‌مرغی، در قاعده نیمه‌قلبی، پهنک آن به ابعاد $1/5 \times 2/5 - 8$ سانتی‌متر، در حاشیه دارای دندانه‌های اره‌ای یا کنگره‌ای کوچک فراوان، گل‌آذین سنبله انتهایی طویل و متراکم به طول ۲۵-۱۰ سانتی‌متر، کاسه گل دارای دندانه‌های نابرابر، جام گل ارغوانی و میله پرچم‌ها خارج شده از جام است. میوه گیاه فندقه به طول یک میلی‌متر، تقریباً کروی، زاویه‌دار و غده‌پوش است (۷).

در یک پژوهش انجام‌شده روی موش‌های آزمایشگاهی نر نشان داده شد که گیاه مریم‌نخودی خزری آثار ضددردی و ضد التهابی دارد که علت آن می‌تواند وجود تری‌ترپنوئیدها، فلاونوئیدها و آلکالوئیدهای موجود در برگ‌های آن باشد؛ بنابراین، عصاره آن به‌صورت بالقوه می‌تواند در کنترل بیماری‌های التهابی و دردناک به کار رود (۸).

و سپس در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. به سبب حساسیت بالای عصاره‌ها، تا زمان آنالیز در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند.

تعیین میزان فنل تام: برای محاسبه فنل تام عصاره آبی و متانولی، از معرف فولین استفاده شد. مراحل اندازه‌گیری بدین صورت بود که ۳۰۰ میکرولیتر از هر نمونه را با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر، با ۱۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین یک مولار، ۱۲۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم حل شده (۲۰ درصد) ترکیب می‌کنیم و با اضافه کردن آب دیونیزه در یک لوله آزمایش، آن را به حجم نهایی ۴۰۰۰ میکرولیتر می‌رسانیم. ترکیب بالا را ورتکس می‌نماییم و به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در تاریکی قرار می‌دهیم؛ سپس جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر (T60 UV-Visible Spectrophotometer, England) در مقابل بلانک قرائت شد. استاندارد فنل با استفاده از اسید گالیک برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار رفت. میزان فنل تام بر اساس میلی گرم گالیک اسید بر گرم ماده گیاهی مشخص گردید (۱۰).

تعیین میزان فلاونوئید تام: برای محاسبه فلاونوئید عصاره آبی و متانولی از معرف کلرید آلومینیوم استفاده شد. مراحل اندازه‌گیری بدین صورت بود که ۱۵۰۰ میکرولیتر از هر نمونه با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر به ۱۵۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم (۲۰ درصد) اضافه گردید. ترکیب حاصل به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۰ درجه سانتی گراد) در تاریکی قرار گرفت و سپس جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. از کوئرسیتین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده گردید. میزان فلاونوئید عصاره به صورت میلی گرم کوئرسیتین بر گرم عصاره گیاهی مشخص شد (۱۱).

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی: آزمون رادیکال ۲،۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) و میزان قدرت کاهندگی (RP)، دو مورد از روش‌های بررسی فعالیت

با توجه به موارد بالا، هدف از این مطالعه مقایسه اثربخشی روش‌های مختلف عصاره‌گیری بر فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و تعیین محتوی فنلی و فلاونوئیدی تام عصاره‌های آبی و متانولی گیاه دارویی مریم‌نخودی خزری است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: این تحقیق یک مطالعه پایه‌ای تجربی است. اندام‌های هوایی گیاه مریم‌نخودی خزری در اواخر بهار و اوایل تابستان سال ۱۳۹۸، از ارتفاعات شهرستان بهشهر واقع در شرق مازندران جمع‌آوری شدند و به آزمایشگاه زیست‌فناوری دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل منتقل گردیدند؛ سپس به مدت ۱۵ روز به دور از نور مستقیم خورشید و در سایه خشک شد. پس از خشک شدن، به وسیله دستگاه آسیاب برقی به منظور به کارگیری مفیدتر پودر گردید.

تهیه عصاره: برای تهیه عصاره از دو حلال آبی و متانولی ۸۰ درصد به سه روش مگنت، بن‌ماری-شیکر و شیکر (Shaker, JTSL10, Iran) استفاده شد: ۱. روش مگنت: ۱۰ گرم از عصاره پودر شده و ۱۰۰ میلی لیتر حلال در ارلن ریخته؛ سپس مگنت در ارلن و به مدت یک ساعت روی هیتِر (Hot plate, Model HS6000, Iran) در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد؛ ۲. روش بن‌ماری-شیکر: ۱۰ گرم از نمونه و ۱۰۰ میلی لیتر حلال در ارلن ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در مرحله بعد، ارلن به مدت ۳ ساعت در شیکر با دور ۲۰۰ دور در دقیقه هم زده شد؛ ۳. روش شیکر: ۱۰ گرم از نمونه و ۱۰۰ میلی لیتر حلال در یک ارلن ریخته شد. پس از پوشاندن ارلن با فویل آلومینیومی، ارلن به مدت ۲۴ ساعت در شیکر با دور ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت (۹).

پس از به دست آوردن عصاره از دو حلال و با سه روش یادشده، آن‌ها به وسیله کاغذ واتمن صاف گردیدند و برای تهیه عصاره خشک، حلال به وسیله روتاری حذف

آنتی اکسیدانی است:

بررسی اثر آنتی اکسیدانی از طریق آزمون ۲۰۲ دی فنیل -۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)، ۲۰۲ دی فنیل -۱- پیکریل هیدرازیل یک ترکیب رادیکالی پایدار با رنگ بنفش است که با احیا شدن توسط عناصر الکترون دهنده یا هیدروژن (ترکیبات آنتی اکسیدانی) به دی فنیل پیکرین هیدرازیل زرد رنگ تبدیل می شود. توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط ترکیبات و عصاره های مختلف در این آزمون، با میزان بی رنگ کردن یا کاهش میزان جذب نوری محلول بنفش DPPH در متانول سنجیده می گردد (۱۲)، بدین ترتیب که ۱۰۰۰ میکرولیتر از هر نمونه با ۳۰۰۰ میکرولیتر DPPH در یک فالكون ریخته شد و ورتکس گردید تا مواد به خوبی حل شود؛ سپس فالكون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی قرار گرفت. در انتها جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد؛ همچنین از بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) به عنوان استاندارد استفاده گردید. میزان IC₅₀ به معنی غلظتی از عصاره مورد نیاز برای پاک سازی ۵۰ درصد رادیکال ها محاسبه شد. درصد میزان مهار کنندگی رادیکال DPPH از طریق فرمول زیر به دست آمد (۱۳):

$$\%RSA = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

RSA: میزان مهار کنندگی رادیکال DPPH

A_{control} : میزان جذب شاهد

A_{sample} : میزان جذب نمونه

بررسی اثر آنتی اکسیدانی از طریق میزان قدرت کاهندگی (Reducing power): در این آزمایش، اثر آنتی اکسیدانی از طریق احیای آهن فریک به فروس به عنوان توان آنتی اکسیدانی مواد موجود در نمونه در نظر گرفته شد. برای بررسی میزان قدرت احیا کنندگی آهن، ۱۰۰۰ میکرولیتر از هر نمونه با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، با ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=۶/۶) و ۱۰۰۰ میکرولیتر پتاسیم فری سیانید ۱ درصد (۱ گرم در ۱۰۰ سی سی آب) ترکیب گردید و به مدت

۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد در بن ماری گذاشته شد؛ سپس محلول به مدت چند دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت تا سرد شود. به این ترکیب ۱۰۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد (TCA ۱۰ درصد) اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دور سه هزار در دقیقه سانتریفوژ گردید. در یک تیوپ جدید، ۱۰۰۰ میکرولیتر از قسمت رویی مخلوط سانتریفوژ شده برداشته و با ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۴۰۰ میکرولیتر کلرید آهن ۰/۱ درصد (FeCl₃) ترکیب شد و در آخر جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید. هرچه جذب بیشتر باشد، قدرت احیا کنندگی نیز بیشتر است. برای نمونه شاهد نیز از ترکیب ۱۰۰۰ میکرولیتر متانول ۸۰ درصد به همراه ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۴۰۰ میکرولیتر کلرید آهن ۰/۱ درصد استفاده شد (۱۴).

میکروارگانیزم های بررسی شده: باکتری های استفاده شده در این تحقیق از آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده زیست فناوری دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل تهیه گردیدند. لیست کلی این میکروارگانیزم ها به همراه کد اختصاری آن ها در جدول شماره ۱ آورده شده است.

بررسی فعالیت آنتی باکتریایی: برای بررسی فعالیت آنتی باکتریایی عصاره گیاه مریم نخودی خزری از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، ابتدا سویه ها در محیط نوترینت براث به مدت ۱۸-۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. پس از تهیه محیط کشت مولر هیتون، باکتری ها به روش چمنی روی آن کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت، باکتری ها در محیط کشت مولر هیتون برای بررسی فعالیت

جدول شماره ۱. مشخصات باکتری های آزمایش شده

نام باکتری	کد اختصاری	مشخصات ظاهری
استافیلوکوکوس اورئوس	ATCC 65138	گرم مثبت
باسیلوس سرئوس	ATCC 11778	گرم مثبت
اشریشیا کلاهی	PTCC 1399	گرم منفی

است و میزان IC_{50} برای آنتی‌اکسیدان سنتزی (BHT) برابر با $8/35 \pm 0/03$ بود.

بررسی مقایسه میانگین آثار متقابل حلال و روش عصاره‌گیری: برای فنل تام، تیمار حلال الکلی و روش عصاره‌گیری مگنت $52/40 \pm 0/01$ ، برای فلاونوئید حلال الکلی و روش شیکر $101/75 \pm 0/10$ ، تیمار حلال آبی و روش مگنت $97/01 \pm 0/01$ برای IC_{50} و برای قدرت کاهندگی آهن، تیمار حلال الکلی و روش عصاره‌گیری مگنت $1/36 \pm 0/00$ نسبت به سایر تیمارها بالاترین مقدار را داشت؛ همچنین کمترین میزان مقایسه میانگین آثار متقابل در فنل تام به بن‌ماری-آبی با میزان $21/0 \pm 66/02$ ، در فلاونوئید به شیکر-آبی به میزان $24/0 \pm 61/02$ در IC_{50} روش بن‌ماری-آبی با میزان $76/0 \pm 70/01$ و در RP به روش بن‌ماری-آبی به میزان $0/0 \pm 47/00$ تعلق داشت.

آنتی‌باکتریایی: طبق بررسی‌های انجام‌شده در بخش آنتی‌باکتریایی مشاهده گردید که عصاره‌های آبی-شیکر هیچ اثر آنتی‌باکتریایی از خود نشان نداده است. در ادامه بررسی‌ها دیده شد که عصاره متانولی با غلظت 300 میکروگرم بر میلی‌لیتر روی هیچ‌یک از باکتری‌ها اثری نداشته است؛ اما عصاره‌های متانولی با غلظت 600 میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث مهار رشد باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* با قطر هاله $11/67 \pm 0/58$ میلی‌متر و *اشریشیا کلائی* با قطر هاله $13/67 \pm 1/53$ میلی‌متر و *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله $11/67 \pm 0/58$ میلی‌متر شده است.

میزان مهار رشد باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیا کلائی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به وسیله عصاره متانولی با غلظت 900 میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز، به ترتیب با قطر هاله $15/33 \pm 1/53$ ، $11/33 \pm 1/53$ و $20/67 \pm 0/58$ میلی‌متر مشاهده گردید. به‌طور میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری برای *سیپروفلوکساسین* (کنترل) $34/5$ میلی‌متر بود. نتایج این مطالعه در جدول‌های شماره ۲ و ۳ گزارش شده است.

آنتی‌باکتریایی، از عصاره متانولی به دست آمده از طریق روش شیکر، استوک 1 گرم عصاره خشک در 1 میلی‌لیتر حلال تهیه گردید. غلظت‌های 300 ، 600 و 900 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر عصاره آماده شد و دیسک‌های تهیه‌شده با فواصل مناسب روی این محیط کشت قرار گرفت و سپس به مقدار 30 میکرولیتر از هر غلظت به هر دیسک بلانک تزریق گردید. در این مطالعه، از آنتی‌بیوتیک *سیپروفلوکساسین* به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. در آخر پتری‌دیش‌ها در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت انکوبه گردیدند و قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر با استفاده از دستگاه کولیس اندازه‌گیری شد (۱۵).

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج حاصل از این بررسی با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS vol.25 به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین (Mean $\pm$ SD) بیان گردید و همه نمونه‌ها در سه تکرار بررسی شدند. آنالیز آزمون با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون تعقیبی دانکن (Duncan) در سطح $0/05$ صورت گرفت.

یافته‌ها

بر اساس تجزیه واریانس، اثر نوع حلال و روش‌های مختلف عصاره‌گیری برای همه مواد اندازه‌گیری‌شده معنی‌دار بود ($P < 0.01$).

نتایج مقایسه میانگین: مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که در حلال الکلی، بیشترین میزان فنل تام $47/26 \pm 1/41$ ، فلاونوئید $94/37 \pm 2/99$ IC_{50} برابر با $95/18 \pm 0/21$ و قدرت کاهندگی آهن $1/25 \pm 0/03$ با مقادیر ذکرشده نسبت به حلال آبی وجود دارد. در میان روش‌های عصاره‌گیری، بالاترین میزان فنل تام $54/00 \pm 0/01$ ، فلاونوئید $67/52 \pm 0/01$ IC_{50} برابر با $96/50 \pm 0/01$ و قدرت کاهندگی آهن $1/26 \pm 0/04$ بود که مربوط به روش مگنت است و همچنین کمترین میزان همه موارد اندازه‌گیری‌شده مربوط به روش عصاره‌گیری با بن‌ماری

جدول شماره ۲. مقایسه میانگین‌های اثر نوع حلال و روش‌های مختلف عصاره‌گیری بر خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه مریم‌نخودی خزری

تیمار	محتوی RP (میلی مول / Fe^{2+} / گرم گیاه خشک)	میزان IC_{50} (میلی گرم بر میلی لیتر)	محتوی فلاونوئید کل (میلی گرم کوئرستین / گرم عصاره خشک)	محتوی فنل کل (میلی گرم گالیک اسید / گرم عصاره خشک)
حلال	**	**	**	**
آبی	0.891 ± 0.10^b	89.02 ± 3.13^b	28.76 ± 1.86^b	35.62 ± 3.61^b
متانولی	1.25 ± 0.3^a	95.18 ± 0.21^a	94.37 ± 2.99^a	47.26 ± 1.41^a
روش‌های عصاره‌گیری	**	**	**	**
مگنت	1.26 ± 0.4^a	96.50 ± 0.1^a	67.52 ± 0.1^a	49.12 ± 0.1^a
بن ماری	0.80 ± 0.14^c	85.85 ± 0.1^c	54.00 ± 0.1^c	32.19 ± 0.1^c
شیکر	1.14 ± 0.6^b	93.95 ± 0.1^b	63.18 ± 0.1^b	43.18 ± 0.1^b
روش‌های عصاره‌گیری × حلال	**	**	**	**
مگنت × آبی	1.17 ± 0.0^c	97.01 ± 0.1^a	36.19 ± 0.6^d	45.84 ± 0.1^c
بن ماری × آبی	0.48 ± 0.0^f	76.70 ± 0.1^f	25.48 ± 0.6^e	21.66 ± 0.2^f
شیکر × آبی	1.02 ± 0.0^e	93.34 ± 0.1^e	24.61 ± 0.2^f	39.37 ± 0.1^e
مگنت × الکلی	1.36 ± 0.0^a	95.98 ± 0.1^b	98.86 ± 0.1^b	52.40 ± 0.1^a
بن ماری × الکلی	1.12 ± 0.0^d	95.00 ± 0.8^c	82.51 ± 0.3^c	42.71 ± 0.1^d
شیکر × الکلی	1.27 ± 0.0^b	94.56 ± 0.1^d	101.75 ± 0.1^a	46.68 ± 0.5^b

** معنی‌داری در سطح یک درصد

حروف یکسان بیانگر نبود اختلاف معنادار میان تیمارها در سطح ۵ درصد است.

جدول شماره ۳. میانگین قطر هاله عدم رشد حلال‌های آبی و الکلی مریم‌نخودی خزری بر تعدادی از میکروارگانیسم‌ها به روش شیکر برحسب میلی متر

میکروارگانیسم	سیپروفلوکساسین 50 µl / disk	عصاره آبی (µg/ml)	عصاره متانولی (µg/ml)
	۳۰۰	۶۰۰	۹۰۰
باسیلوس سرئوس	۳۴/۵	---	---
استافیلوکوکوس اورئوس	۳۴/۵	---	---
اشریشیا کلائی	۳۴/۵	---	---

قطر هاله عدم رشد بدون مهار کنندگی (---)

بحث و نتیجه‌گیری

شناسایی و بررسی ترکیبات سازنده گیاهان دارویی یکی از مهم‌ترین مراحل مطالعه آن‌ها است. هدف از این تحقیق استخراج ترکیبات فعال زیستی از حلال‌های گوناگون با قطبیت‌های مختلف بوده است. نتایج بررسی ما بیانگر آن بود که میان میزان مواد فنلی و فلاونوئیدی در دو عصاره آبی و متانولی اختلاف معنی‌داری وجود دارد، به‌طوری‌که بیشترین میزان فنل و فلاونوئید مربوط به عصاره متانولی بود. نتایج سایر تحقیقات نشان داد که

استخراج ترکیبات فنلی تحت تأثیر قطبیت حلال قرار دارد و مقادیر پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها به علت استفاده از حلال‌های مختلف، به‌شدت متفاوت هستند (۱۶، ۱۷). متانول برای استخراج فنل کل و فلاونوئید کل، نسبت به آب مناسب‌تر است. شرایط استخراج ترکیبات فنلی مثل دما، حلال، زمان عصاره‌گیری، روش استخراج و...، عامل مهمی در تعیین ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره است (۱۸). در مطالعه‌ای روی گیاه *Stachys tmolea* و با استفاده از دو حلال آبی و متانولی برای استخراج

شد که بیشینه فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌های متانولی به‌دست آمد (۲۷).

نتایج مطالعه ما نشان داد که اثر عصاره متانولی روی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* که هر دو باکتری گرم مثبت هستند، با پایین آمدن غلظت، کاهش پیدا کرد، به‌طوری‌که در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به‌طور کامل متوقف شد. این کاهش و سپس توقف اثر را می‌توان به کاهش غلظت مواد مؤثره عصاره در اثر افزایش رقت آن نسبت داد. در باکتری *اشریشیا کلائی* که یک باکتری گرم منفی است، نیز در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، هاله عدم رشد دیده نشد؛ اما در غلظت ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، هاله مهار رشد مشاهده گردید؛ اما پس از آن با افزایش غلظت، میزان اثر آنتی‌باکتریایی کاهش پیدا کرد که علت آن احتمالاً سرعت آهسته‌تر یا کمتر غلظت‌های بالاتر عصاره نسبت به غلظت‌های پایین‌تر است که سبب می‌شود هاله عدم رشد آن کوچک‌تر دیده شود. علت تأثیر متفاوت عصاره‌های متانولی بر رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ممکن است به‌سبب تفاوت ساختاری موجود میان دیواره این دو گروه از باکتری‌ها باشد. باکتری‌های گرم منفی واجد غشای خارجی هستند که مانند سدی از عبور مولکول‌های بزرگ و آب‌گریز جلوگیری می‌کند. از آنجاکه بیشتر ترکیبات مؤثر موجود در عطرمايه و عصاره‌ها ماهیت آب‌گریزی دارند؛ بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که این مواد امکان ورود و دسترسی به نقاط فعال درون باکتری‌های گرم منفی را ندارند و به همین دلیل معمولاً باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با انواع گرم مثبت، مقاومت بیشتری نسبت به این ترکیبات نشان می‌دهند (۲۸). نتایج مطالعات ما مطابق با سایر تحقیقاتی است که متانول را به‌عنوان یک حلال بهتر برای استخراج مواد ضد میکروبی از گیاهان در مقایسه با سایر حلال‌ها مانند آب، اتانول یا هگزان گزارش می‌دهند (۳۰، ۲۹). در تحقیقی، اثر ضدباکتریایی

عصاره مشاهده شد که میزان فلاونوئید کل در عصاره متانولی بیشتر از عصاره آبی است (۱۹)؛ همچنین در تحقیقی که روی گیاه *Rosmarinus eriocalyx* صورت گرفت نتایج نشان داد که میزان فلاونوئید کل در عصاره متانولی بیشتر از عصاره آبی بود (۲۰). نتایج به‌دست‌آمده از این دو مطالعه اخیر برتری عصاره متانولی را نسبت به عصاره آبی، در میزان ترکیبات فنلی نشان داد که تأییدکننده نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق ما است.

نتایج تحقیق ما خواص آنتی‌اکسیدانی را در هر دو عصاره آبی و متانولی گیاه مریم‌نخودی خزری نشان داد، این در حالی است که قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی بیشتر از عصاره آبی بود. این واقعیت که بیش از یک روش برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌شود، دلیلی بر اطمینان نداشتن از احاطه شیمیایی ترکیبات فعال زیستی است؛ بنابراین در این تحقیق، از دو روش DPPH و قدرت کاهندگی برای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شد که نتایج یکدیگر را تأیید می‌کنند. در بسیاری از گیاهان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان فنل رابطه مستقیم دارد (۲۲، ۲۱). نتایج این بررسی همانند سایر مطالعات نشان داده است که گیاهانی که ترکیب فنلی بالایی دارند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نشان می‌دهند (۲۴، ۲۳).

با توجه به اینکه در این تحقیق، میزان فنل و فلاونوئید عصاره متانولی بیشتر از عصاره آبی بود؛ به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که انتخاب نوع حلال تأثیر بسیاری بر میزان استخراج ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی دارد (۲۵). در مطالعه مجنیک و همکاران درباره فعالیت آنتی‌اکسیدانی بذر *Guarana*، بالاترین اثر مهاری مربوط به عصاره متانولی و پایین‌ترین اثر مربوط به عصاره آبی بود (۲۶)؛ همچنین بالاترین اثر آنتی‌اکسیدانی مربوط به عصاره متانولی بود که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. در تحقیقی روی گیاه *Nyctanthes arbortristis* با استفاده از دو روش عصاره‌گیری آبی و متانولی نشان داده

عصاره الکلی و آبی گیاه کارلا (*Momordica charntia*) بر باکتری‌های *اشریشیاکلای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که عصاره‌های الکلی برگ و میوه این گیاه خاصیت آنتی‌باکتریایی بالایی دارد (۳۱). نتایج تحقیقات دیگری روی گیاه *Rosmarinus eriocalyx* Jord & Fourr نشان داد که عصاره متانولی این گیاه خاصیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به عصاره آبی دارد (۲۰). در تحقیقی روی فعالیت‌های ضد میکروبی عصاره‌های آبی و متانولی گیاه Red beet نشان داده شد که عصاره‌های آبی روی هیچ کدام از گونه‌های باکتری‌های مطالعه شده تأثیری نداشتند، درحالی که عصاره متانولی این گیاه روی باکتری‌های *Bacillus Cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* اثر بازدارندگی داشت (۳۲). گلشن و همکاران در تحقیقی با عنوان بررسی آثار ضدباکتریایی عطرمایه مریم‌نخودی طناز (*Tucreum chamaedrys* L.) نشان دادند که عطرمایه گیاه اثر ضد میکروبی مناسبی به‌ویژه بر باکتری‌های گرم مثبت مثل *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد؛ اما تأثیری بر باکتری‌های گرم منفی ندارد که علت این امر بی‌ارتباط با وجود لیپید در غشای سلولی این دسته از باکتری‌ها نیست (۳۳). به‌طور کلی، باکتری‌های گرم منفی به علت داشتن لایه لیو پلی‌ساکارید، نسبت به باکتری‌های گرم مثبت، در برابر آثار ضد میکروبی عطرمایه‌های گیاهی مقاوم‌ترند. در پژوهشی که روی گیاه اسطوخودوس و رزماری انجام شد، مشاهده گردید که خاصیت ضدباکتریایی بسته به غلظت عطرمایه و جنس باکتری متفاوت است (۳۴). این نتایج در مطالعه ما نیز دیده شد؛ به‌طوری که با افزایش غلظت، میزان هاله مهار رشد بیشتری بر روی باکتری‌های گرم مثبت مشاهده گردید؛ اما بر باکتری گرم منفی این گونه نبود. تغییر خاصیت ضدباکتریایی عطرمایه‌ها در غلظت‌های مختلف می‌تواند به علت تغییر مقدار ترکیبات فلاونوئیدی یا اشکال متشکل فعال آن‌ها

باشد (۳۵). بر اساس مطالعه سیمنگا و همکاران، قطر هاله مهار رشد برابر یا بیش از ۱۵ میلی‌متر نشان‌دهنده فعالیت بسیار و قطر هاله عدم رشد بین ۱۰ تا ۱۵ میلی‌متر نشان‌دهنده فعالیت متوسط و قطر هاله عدم رشد کمتر از ۱۰ میلی‌متر نشان‌دهنده غیرفعال بودن عصاره است (۳۶). بر اساس این، گیاه مریم‌نخودی خزری در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بر باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* که باکتری‌های گرم مثبت هستند، اثر متوسط و در غلظت ۹۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر فراوانی نشان داده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان استنباط کرد که امکان استفاده از عصاره متانولی گیاه مریم‌نخودی خزری به‌عنوان ماده ضدباکتریایی در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* وجود دارد.

در این مطالعه، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی گیاه مریم‌نخودی خزری بررسی شد. عصاره متانولی خواص آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به عصاره آبی داشت؛ همچنین عصاره‌های آبی هیچ گونه اثر بازدارندگی روی باکتری‌های مطالعه شده نداشتند، درحالی که عصاره متانولی گیاه مریم‌نخودی خزری اثر آنتی‌باکتریایی مناسبی به‌ویژه بر باکتری‌های گرم مثبت داشت. اگرچه آب قطبی‌تر از متانول است، اما ترکیبات موجود در عصاره‌های متانولی شبیه ترکیبات موجود در عصاره‌های آبی است، با این مزیت که مرحله تبخیر حلال درباره متانول آسان‌تر انجام می‌شود؛ بنابراین پیشنهاد می‌گردد که متانول برای استخراج مواد ضد میکروبی نسبت به آب حلال مناسب‌تری است. در میان روش‌های عصاره‌گیری نیز، روش عصاره‌گیری مگنت نسبت به روش‌های بن‌ماری و شیکر، عملکرد بهتری از خود نشان داد. با توجه به اینکه شرایط اقلیمی و نوع عصاره بر نتیجه آزمایش تأثیرگذار است؛ بنابراین جمع‌آوری سایر اکوتیپ‌های گیاه یادشده و عصاره‌گیری به روش‌های مختلف امری ضروری و

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد
منفعی در پژوهش حاضر وجود ندارد..

کد اخلاق: IR.ausmt.rec.1398.11.34

کارآمد به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه
تخصصی فناوری‌های نوین آمل می‌باشد.

References

- Izadi Z, AghaAlikhani M, Mirazi N. Identification of chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil. *Razi J Med Sci* 2020;27:35-48.
- Hamburger M, Hosttemann K. The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 1991; 30:38-84.
- Mosleh-Arany A, Nemati N, Naderi M. The antibacterial activity of the water extracts of three species of *Salvia* on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Nova Biologica Rep* 2019; 6: 446-453. doi: 10.29252/nbr.6.4.446
- Idris M, Abbas RZ, Masood S, Rehman T, Farooq U, Babar, W, et al. The potential of antioxidant rich essential oils against avian coccidiosis. *Worlds Poult Sci J* 2016; 73: 89-104. doi: 10.1017/S0043933916000787
- Baschieri A, Ajvazi MD, Tonfack JLF, Valgimigli L, Amorati R. Explaining the antioxidant activity of some common non-phenolic components of essential oils. *Food Chem* 2017; 232: 656-63. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.04.036
- Roghayeh M, Sepehri Z, Jahantigh M, Javadian, F. Antimicrobial Activities of *Teucrium Polium* Against *Salmonella Typhimurium*. *Int J Adv Biol* 2015; 3: 149-52.
- Rechinger KH. *Flora Iranica*. Akademische Druck and Verlagsanstalt Press. Graz, Austria. 1982.
- Farshchi A, Ghiasi G, Abdollahi-Asl A. Antinociceptive and antiinflammatory effects of *Teucrium hyrcanicum* aqueous extract in male mice and rats. *Physiol Pharmacol* 2010; 14: 78-84.
- Govahi M, Ghorbani F, Ranjbar M, Rahaiee S, Azizi H. Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activity, and Determination of Phenolic and Flavonoid Content of Aqueous and Methanolic Extracts of *Scutellaria pekinensis*. *J Ilam Uni Med Sci* 2019; 27: 91-100. doi: 10.29252/sjimu.27.3.91
- Hayouni EA, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem* 2007; 105:1126-34. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.02.010
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chen JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 2002; 10: 178-82. doi: 10.38212/2224-6614.2748
- Mazarie A, Mousavi-Nik M, Fahmideh L. Assessments of phenolic, flavonoid and antioxidant activity of aqueous, alcoholic, methanol and acetone extracts of thirteen medicinal plants. *NBR* 2018; 4: 299-309. doi: 10.29252/nbr.4.4.299
- Singh HP, Mittal S, Kaur S, Batish DR, Kohli RK. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of *Artemisia scoparia*. *Food Chem* 2009;114:642-5. Doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.101
- Soares AA, Souza CG, Daniel FM, Ferrari GP, Costa SM, Peralta RM. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* in two stages of maturity. *Food Chem* 2009; 112:775-81. doi:10.1016/j.foodchem.2008.05.117
- Gupta M, Tomar RS, Kaushik S, Sharma D, Mishra, R K. Effective antimicrobial activity of green ZnO nano particles of *Catharanthus roseus*. *Front Microbiol* 2018; 9, 2030. doi: 10.3389/fmicb.2018.02030.
- Dorta E, Lobo MG, Gonzalez M. Reutilization of Mango byproducts: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *J Food Sci* 2012; 77: C80–C88. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02477.x
- Ben-Yakoub AR, Abdehedi O, Jridi M, Elfalleh W, Nasri M, Ferchichi A. Flavonoids, phenols, antioxidant, and antimicrobial activities in various extracts from Tossa jute leave (*Corchorus olitorus* L.). *Ind Crops Prod* 2018; 118: 206–13. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.03.047
- Vilkha K, Mawson R, Simons L, Bates D. Application and opportunities for ultrasound assisted extraction in food industry; a review. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2008; 9: 161-69. doi: 10.1016/j.ifset.2007.04.014
- Elfalleh W, Kirkan B, Sarikurkcü C. Antioxidant potential and phenolic composition of extracts from *Stachys tmolea*: An endemic plant from Turkey. *Ind Crops Prod* 2019; 127: 212-16. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.10.078
- Wafa N, Sofiane G. Antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of aqueous and methanolic extract of *Rosmarinus eriocalyx* Jord. & Fourr. *Int J Biol Chem Sci* 2020; 14: 254-62. doi: 10.4314/ijbcs.v14i1.21
- Cheung S, TAI J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Oncol Rep* 2007;17: 1525 - 31.
- Yesil-Celiktas O, Girgin G, Orhan H, Wichers, HJ, Bedir E, Vardar-Sukan F. Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times. *Eur Food*

- Res Technol 2007; 224: 443 - 51. doi: 10.1007/s00217-006-0306-0
23. Damien-Dorman HJ, Koşar M, Kahlos K, Holm Y, Hiltunen R. Antioxidant Properties and Composition of Aqueous Extracts from *Mentha* Species, Hybrids, Varieties, and Cultivars. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 4563 – 9. doi: 10.1021/jf034108k
 24. Arumugam P, Ramamurthy P, Ramesh A. Antioxidant and Cytotoxic Activities of Lipophilic and Hydrophilic Fractions of *Mentha Spicata* L. (Lamiaceae). *Int J Food Prop* 2010; 13: 23– 31. doi: 10.1080/10942910802144329
 25. Gharehkhani M, Ghorbani M, Ebrahimzadeh MA, Gafari SM, Sadeghimahonak AR. Comparison of different methods of extraction of phenolic compounds and flavonoids of *Urtica dioica* L. *Scie Res Med Aromat Plants* 2012; 26: 389-405.
 26. Majhenic L, Skerget M, Ken Z. Antioxidan and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chem* 2007; 104: 997-1005. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.01.074
 27. Vidhate B, Dubey SR, Ghag A, Gaikwad M. Comparative Evaluation of Antioxidant Activity of Aqueous and Methanolic Extract of *Nyctanthes arbortris-tis* Linn. by Using DPPH Assay. *IJRnDESM* 2020; 3:68-70.
 28. Mohammadi-Sichani M, Amjad L, Mohammadi-Kamalabadi M. Antibacterial activity of methanol extract and essential oil of *Achillea wilhelmsii* against pathogenic bacteria. *Zahedan. J Res Med Sci* 2011; 13: 9-14.
 29. Eloff JN. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *J Ethnopharmacol* 1998; 60:1-8. doi: 10.1016/S0378-8741(97)00123-2
 30. Karaman I, Şahin F, Güllüce M, Ögütçü H, Şengül M, Adıgüzel A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol* 2003; 85:231-35. doi: 10.1016/S0378-8741(03)00006-0
 31. Saeidian S, Eslami M, Dashipoor A. Antibacterial effect of alcoholic and aqueous Extract of *Carla* on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *PSJ* 2019; 17:15-24. doi: 10.29252/psj.17.4.15
 32. Ahmadi S, Soleimanian-Zad S, Zaeim D. Antibacterial and Antifungal Activity of the Aqueous and Methanolic Extracts and Essential Oils of Red Beets *Beta vulgaris* Leaves. *Zahedan J Res Med Sci* 2020; 22: e83725. doi: 10.5812/zjrms.83725
 33. Golshan A, Khakshour A, Nematollahi A, Yadollahi A. Chemical Composition and Antibacterial Properties of the Essential Oil of *Tucreum Chamaedrys* L. Grown in North Khorasan Province. *J North Khorasan Univ Med Sci* 2012; 4: 79-85. doi: 10.29252/jnkums.4.5.S5.79
 34. Ahmady-Asbchin S, Mostafapour MJ. Antibacterial interactions Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and essential oils of lavender (*Lavandula stoechas*) on two Grampositive and three Gram- negative bacteria in vitro. *J Mol Biol Res* 2018; 31:177-87.
 35. Jawetz E, Melnick JL. *Medical microbiology*. 1991; 19th ed.
 36. Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De-Bruyne T, Hermans N and et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol* 2002; 79:213-20. doi: 10.1016/S0378-8741(01)00384-1