ORIGINAL ARTICLE

Antimicrobial Activity of Different Extracts and Fractions of Marrubium parviflorum

Somayeh Hallaj-Nezhadi[1],
Forough Mohammadi[2],
Shadi Najjar-Sadeghi[2],
Sanaz Hamedeyazdan[3]

[1] Associate Professor, Department of Pharmaceutical and Food Control, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2] Doctor of Pharmacy, Student Research Committee, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3]Associate Professor, Biotechnology Research Center, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

(Received July 27, 2022 ; Accepted October 30, 2022)

Abstract

Background and purpose: *Marrubium* plants have long been used as a traditional medicine in treatment of diseases. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effects of *Marrubium parviflorum* extracts and fractions.

Materials and methods: In this experimental study, solvent extraction from aerial parts of the plant was done by Soxhlet method. The antimicrobial effect of the extracts was evaluated on six strains of gram-positive bacteria, four strains of gram-negative bacteria, and one strain of fungus. Also, effective extracts were fractionated by various chromatographic methods and their antimicrobial effects were investigated.

Results: Chloroform extract of *M. parviflorum* was found to be effective against *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Bacillus cereus* with a growth inhibition zone diameter (DIZ) of 16.6, 14.6, and 11.6 mm, respectively, and MBC 100 mg/ml. Methanolic extract also showed considerable antimicrobial effects against *Proteus mirabilis* and *Psudomonas aeruginosa*. Among the fractions obtained, 10%, 20%, 40%, and 60% fractions of the chloroform extract and 20% and 40% fractions of the methanolic extract showed the highest antimicrobial effect. The superior values of MBC and DIZ in fractions indicate the condensation of certain antimicrobial compounds in some fractions and higher sensitivity of gram-positive bacteria compared with gram-negative bacteria.

Conclusion: Among the extracts studied, the chloroform and the methanolic extracts of *M. parviflorum* exhibited the strongest antimicrobial effect and *Micrococcus luteus* was the most sensitive microorganism.

Keywords: *Marrubium parviflorum*, extract, fraction, antimicrobial effect, minimum bactericidal concentration

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (215): 35-48 (Persian).

Corresponding Author: Sanaz Hamedeyazdan- Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. (E-mail: yazdans@tbzmed.ac.ir)

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و دوم شماره 215 آذر سال 1401 (48-35)

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها و فراکسیون‌های مختلف گیاه *Marrubium parviflorum*

سمیه حلاج نژادی[1]
فروغ محمدی[2]
شادی نجار صادقی[2]
ساناز حامدیزدان[3]

چکیده

سابقه و هدف: گیاهان جنس Marrubium از دیرباز به عنوان داروی سنتی در درمان بیماری‌ها استفاده می‌شدند. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها و فراکسیون‌های گیاه Marrubium parviflorum می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، عصاره‌گیری از اندام هوایی گیاه با روش سوکسله انجام گرفت. اثر ضدمیکروبی عصاره‌ها بر روی شش سویه باکتری گرم مثبت، چهارسویه باکتری گرم منفی و یک سویه قارچ مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌چنین عصاره‌های موثر با انواع روش‌های کروماتوگرافی فراکسیونه شدند و اثرات ضدمیکروبی آن ها نیز بررسی شد.

یافته‌ها: عصاره کلروفرمی گیاه M.parviflorum علیه باکتری‌های Micrococcus luteus، Staphylococcus epidermidis و Bacillus cereus به ترتیب با قطر هاله عدم رشد (DIZ) 16/6، 14/6 و 11/6 میلی‌متر و همگی با حداقل غلظت باکتریسیدال (MBC)100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر موثر بود. عصاره متانولی نیز علیه باکتری Proteus mirabilis و Psudomonas aeruginosa اثرات ضد میکروبی قابل توجهی نشان دادند. دربین فراکسیون‌های حاصل، فراکسیون 10، 20، 40 و 60 درصد عصاره کلروفرمی و فراکسیون‌های 20، 40 درصد عصاره متانولی بیش ترین اثر ضدمیکروبی را ایجاد کردند. مقادیر MBC و DIZ در فراکسیون‌هاای به‌دست آمده نشان‌دهنده تغلیظ ترکیبات ضدمیکروبی در برخی از فراکسیون ها و حساسیت بیش‌تر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی می‌باشد.

استنتاج: از بین تمامی عصاره‌های مطالعه شده، عصاره کلروفرمی و متانولی گیاه M.parviflorum قوی‌ترین اثر ضد میکروبی را از خود نشان دادند و حساس‌ترین میکروارگانیسم Micrococcus luteus بود.

واژه های کلیدی: Marrubium parviflorum، عصاره، فراکسیون، اثرضدمیکروبی، حداقل غلظت باکتریسیدال

مقدمه

امروزه با توجه به افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز اثرات جانبی متعدد آن‌ها، مطالعات زیادی جهت یافتن گیاهان دارای اثرات ضدمیکروبی و نیز تهیه آنتی‌بیوتیک‌های جدید از ترکیبات طبیعی در حال انجام است. اخیراً گیاهان متعددی با خواص ضدمیکروبی مناسب شناسایی شده است(1). هم‌چنین براساس مطالعات متعدد، متابولیت‌های ثانویه موجود در برخی از گیاهان اثرات ضد میکروبی مشابه آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داده‌اند(2).

مولف مسئول: ساناز حامد یزدان - تبریز : دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده داروسازی E-mail: yazdans@tbzmed.ac.ir
1. دانشیار، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
2. دکترای عمومی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
3. دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی (زیست فناوری) و دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
تاریخ دریافت : 1401/5/5 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 1401/5/30 تاریخ تصویب : 1401/8/8

هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی اثرات ضدمیکروبی گیاه *Marrubium parviflorum* می‌باشد. این گیاه از دسته گیاهان Magnoliopsida، رده Magnoliopsida و خانواده Lamiaceae می‌باشد. جنس *Marrubium* شامل 49 گونه پذیرفته شده در جهان است که یازده گونه از آن‌ها در ایران یافت می شود(5-3).

جنس گیاهی *Marrubium* برای درمان درد مفاصل، نقرس، درد معده و کولیک در طب سنتی ایران استفاده می‌شود. به طور کلی این گیاهان بوته های بزرگ سالانه یا چند ساله هستند که به‌طور سنتی در کشورهای مختلف برای درمان آسم، عفونت‌های ریوی، اختلالات دستگاه گوارش، بی‌خوابی و انواع مختلف درد و التهاب مانند درد مفاصل و نقرس مورد استفاده قرار می گیرند(7،6). ارزیابی فیتوشیمیایی گونه‌های جنس *Marrubium* نشان داده است که این گیاهان سرشار از فلاونوئیدها، فنیل پروپانوئیدها، دی ترپن‌ها، اسیدهای آمینه و ساپونین‌ها هستند(10-8). مطالعات مختلفی در رابطه با اثرات گونه‌های مختلف جنس *Marrubium* در منابع علمی موجود می‌باشد. این اثرات عمدتا شامل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد دردی، ضد التهابی، محافظت‌کنندگی کبد، ضد سرطان، محافظت‌کنندگی قلب وعروق، محافظت کنندگی زخم‌های گوارشی، ضد دیابتی و ضدمیکروبی می‌باشد(24-11). به عنوان مثال، براساس تحقیقی که در دانشگاه اصفهان بر روی کاربردهای گونه *M.vulgare* با نام عمومی Hoarhound در طب سنتی ایران انجام گرفته، این گونه گیاهی اثرات موکولیتیک، ضد اسپاسم و ضدعفونی‌کننده دارد(25). عصاره آبی گیاه *M.vulgare* اثرات کاهش فشارخون قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با داروی آمیلودیپین نشان داده است(25). هم‌چنین در برخی از گونه‌های گیاهی از قبیل *M.Vulgare* خاصیت آنتی‌اکسیدانی و تاثیرات مثبت بر پراکسیداسیون لیپید دیده شده است(5). در مورد گیاه *M.vulgare*، اثرات ضد دردی در دردهای نوروژنیک مشاهده شده است(5). طبق مطالعات in-vivo بر روی گیاه *M.vulgare L.* خاصیت ضد دیابتی خصوصا برای افراد دچار دیابت تیپ دو بیان شده است(3). در یک مطالعه دیگر برخی از دی‌ترپنوئیدهای بخش‌های هوایی عصاره دی کلرومتانی گیاه *M. cylleneum* فعالیت ضد توموری و سمیت سلولی نشان داده اند(26). هم‌چنین در مطالعات مختلف بر روی گونه‌های مختلف جنس ماروبیوم (*M.astracanicum*، *M.vulgare*، *M.duabense*، *M.deserti*، *M.cuneatum*، *M.globosum*، *M.incanum*) اثرات ضد میکروبی علیه برخی سوش‌های میکروبی گزارش شده است(1،12،37-27). در یک پژوهش، اثرات ضدمیکروبی گیاه *M.vulgare* در برابر میکروارگانیسم‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشانگر اثرات ضد میکروبی مهم این گیاه در برابر میکروارگانیسم‌های مختلف به ویژه باکتری‌های گرم مثبت بود به‌طوری که حداقل غلظت مهاری در محدوده 2600-1120 میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمده بود. هم‌چنین اثرات مهاری علیه میکروارگانیسم Botrytis cinerea با قطر هاله عدم رشد 12/6 میلی‌متر گزارش شده است(38). اکثر اثرات ضد میکروبی و ضد باکتریایی مشاهده شده در جنس‌های گیاهی مختلف خانواده Lamiaceae به علت حضور ترکیبات فنلی در گیاهان این خانواده ذکر شده است(39). در گونه‌های مختلف جنس *Marrubium* ترکیبات متعدد فلاونوئیدی، فنلی، ترپنی و سایر موارد گزارش شده است. بعد از کشف و بررسی ترکیبات عصاره متانولی گیاه *M.globosum*، ترکیباتی با فعالیت بالای ضد میکروبی مشاهده شده است(8،40). در سال 2004 در دانشگاه تهران در یک مطالعه با هدف بررسی ترکیبات اسانس گیاهان *M.parviflorum* و *M.vulgare*، ترکیبات حاصل با روش GC-MS مشخص گردید که عمده ترکیبات هر دو گیاه، β-caryophyllene و germacrene D بودند که عمده اثر ضد میکروبی گیاهان را نیز به این ترکیبات نسبت داده‌اند(1،41،42). در یک مطالعه دیگر بر روی *M.deserti* نشان داده شد که مشتقات مونو و دی گلیکوزید apigenin دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌ژنوتوکسیکی می‌باشند(43). در یک بررسی دیگر در عصاره‌های متانولی اندام‌های هوایی گیاهان جنس *Marrubium*،

خواص بیولوژیکی مانند ضد التهابی، ضد فشارخون، ضددیابتی و آنتی‌اکسیدانی و هم‌چنین اثرات ضدقارچی بارز اشاره کرد(45،44).

گیاه *Marrubium parviflorum* گیاهی علفی است که رویشگاه طبیعی آن شمال، شمال غرب و مرکز ایران از جمله گرگان، گیلان، آذربایجان و اردبیل، سمنان و تهران می‌باشد. در این مطالعه، به ارزیابی اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها و فراکسیون‌های گیاه *M.parviflorum* پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر اصول اخلاقی مطابق دستورالعمل کمیته اخلاق کشوری با کداخلاق IR.TBZMED.VCR.REC.1397.335 رعایت شد. متانول (Duksan، کره)، اترنفت (Merck، آلمان)، کلروفرم (Romil، انگلیس)، اتیل استات (شیمی ناب، ایران)، اتانول (نوترون، ایران) و دی متیل سولفوکساید (Sigma-Aldrich، آلمان) و همچنین محیط کشت‌های نوترینت آگار (Merck، آلمان) ولر هینتون (Gibco ،اسکاتلند)، لاکتوز براث (Merck، آلمان) و نیز دیسک‌های بلانک استریل، آمیکاسین (30 میکرو گرم)، کلیندامایسین (30 میکروگرم) ساخت شرکت پادتن طب (ایران) مورد استفاده قرار گرفت. باکتری‌های مورد آزمایش شامل: *Micrococcus luteus PTCC 1110, Echerchia coli PTCC 1533, Staphylococus aureus PTCC1 112, Candida albicans PTCC5027, Psudomonas aeruginosa PTCC 1310, Bacillus cereus PTCC 1015, Staphylococus epidermidis PTCC 1114, Bacillus subtilis PTCC 1715, Proteus mirabilis ATCC7005, Listeria monocytoenes PTCC 1163,Salmonella typhi PTCC 1230* می‌باشند. دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک استاندارد مربوط به هر میکروارگانیسم در جدول شماره 1 نشان داده شده است.

تهیه نمونه گیاهی و عصاره گیری

گیاه *M. parviflorum* در تابستان سال 1396 از اطراف شهر مرند واقع در آذربایجان شرقی جمع‌آوری و نمونه هرباریومی با شماره 1202 در هرباریوم دانشکده داروسازی تبریز نگهداری شد. اندام هوایی گیاه در دمای آزمایشگاه خشک و بعد از آسیاب کردن، حدود 160 گرم از گیاه توزین شد. آن گاه به ترتیب و به صورت جداگانه ابتدا توسط حلال اترنفت به مدت 8 ساعت با دستگاه سوکسله، سپس بر روی همان گیاه با حلال کلروفرم به مدت 8 ساعت و هم‌چنین در نهایت تفاله همان گیاه توسط حلال متانول به مدت 16 ساعت توسط سوکسله مورد عصاره گیری قرار گرفت. عصاره‌های حاصل در دمای 45 درجه سانتی‌گراد در دستگاه روتاری اواپراتور، خشک شدند.

فراکسیونه کردن عصاره ها

عصاره کلروفرمی به روش کروماتوگرافی مایع تحت خلاء (VLC) فراکسیونه گردید. در این روش یک قیف شیشه‌ای استوانه‌ای شکل به ارتفاع 5/5 سانتی‌متر و قطر دهانه 7 سانتی‌متر مجهز به فیلتر از جنس *Sinteredglass*، تا ارتفاع 4/5 سانتی‌متر به‌طور متراکم با سیلیکاژل پر شد. قیف شیشه‌ای و دکنتور رابط بر روی ارلن بوخنر متصل شده به پمپ خلاء واقع گردید. یک کاغذ صافی دایره‌ای با قطر معادل قطر دهانه بر روی سیلیکاژل قرار گرفت. 250 میلی‌لیتر از محلول‌های تهیه شده از 10 ، 20 ، 40 ، 60 ، 80 و 100 درصد کلروفرم در اتیل‌استات تهیه شد. در ابتدا به آهستگی 200ml متانول خالص از سیلیکاژل عبور داده شد. لازم به ذکر است که از ابتدای شروع VLC از هرگونه خشک شدن از سیلیکاژل جلوگیری شد. پس از آن‌که متانول به صورت کامل توده سیلیکاژل را آغشته نمود پمپ خلاء روشن گردید. در ادامه ستون سیلیکاژل توسط محلول اتیل استات شستشو داده شد و سپس عصاره کلروفرمی بر روی ستون انتقال داده شد. هنگامی که مقداری از این محلول در بالای سطح سیلیکاژل باقی ماند پمپ خلاء را خاموش نموده و به‌دنبال عبور محلول 10 درصد کلروفرم در اتیل استات از سیلیکاژل، به‌ترتیب

محلول‌های 10، 20، 40، 60، 80 و100 درصد (250ml) کلروفرم در اتیل استات از ستون سیلیکاژل عبور داده شدند. همچنین شایان ذکر است که بعد از عبور هر محلول از ستون پمپ خلاء موقتاً خاموش شده و فراکسیون‌های جمع‌آوری شده به‌طور جداگانه در دستگاه روتاری اواپراتور در دمای پایین تر از 45 درجه خشک گردید و پس از توزین در ویال‌های در بسته نگهداری شدند.

جهت فراکسیونه نمودن عصاره متانولی به روش عصاره‌گیری با فاز جامد (SPE) فراکسیونه شد. برای انجام این کار ابتدا 2 گرم از عصاره متانولی توزین شد و در حداقل مقدار ممکن از مخلوط آب و متانول با نسبت 10:90 مخلوط گردید. پیش از بارگیری نمونه، کارتریج ODS Sep-Pak به ترتیب با 200 میلی‌لیتر متانول و 200 میلی‌لیتر از متانول 10 درصد در آب مورد شست و شو قرار گرفت. سپس عصاره بر روی ODS Sep-Pak منتقل شد و شستشوی آن توسط مخلوط‌های 10، 20، 40، 60، 80 و 100 درصد متانول در آب به میزان 200 میلی‌لیتر از هر یک و به کمک خلاء انجام شد. فراکسیون‌های جمع‌آوری شده در دستگاه روتاری اوپراتور در دمای 45 درجه سانتی‌گراد و فشار پایین خشک و سپس توزین شدند. به منظور انحلال عصاره و فراکسیون‌های خشک از ویال‌های استریل استفاده گردید.

آزمایش‌های میکروب شناسی

مقدار مشخصی از عصاره و فراکسیونهای خشک عصاره‌ها توزین و در 1 میلی‌لیتر حلال (2 درصد توئین 80 در دی‌متیل سولفوکساید) حل گردید. برای انجام تست‌های میکروبی ابتدا از روش دیفوزیون در آگار (دیسک–پلیت) و اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد (DIZ) استفاده شد. سپس درمورد عصاره‌هایی که دارای بیش‌ترین اثر ضد میکروبی بودند، حداقل غلظت باکتریسیدال (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین عصاره‌های موثر با انواع روش‌های کروماتوگرافی فراکسیونه شده و میزان DIZ و MBC آن‌ها نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا جهت انجام تست دیفوزیون در آگار، روی هر محیط کشت علاوه بر دیسک‌های حاوی نمونه‌های مورد نظر، یک عدد دیسک برای حلال و یک عدد دیسک آنتی‌بیوتیک استاندارد (جدول شماره 1) هم قرار داده شد. سپس 60 میکرولیتر از محلول تهیه شده (200 mg/ml محلول در 2% TWEEN80 در DMSO) در 2 مرحله روی دیسک ها اضافه شد. بعد از به دست آمدن نتایج مرحله اول آزمایشات میکروبی، مشاهده شد که اثرات ضد میکروبی عصاره‌های کلروفرمی و متانولی گیاه *M. parviflorum* به مراتب بیش‌تر از عصاره اترنفتی می‌باشد و بنابراین جهت فراکسیونه کردن فقط از عصاره کلروفرمی و متانولی این گیاه استفاده شد. سری دوم بررسی اثرات ضد میکروبی برای فراکسیون‌های به دست آمده مثل مراحل بالا انجام شد و میزان DIZ و MBC آن‌ها نیز مشخص گردید.

جدول شماره 1: دیسک‌های استاندارد استفاده شده برای باکتری‌های مختلف

باکتری	دیسک استاندارد
Pseudomonas aeruginosa	آمیکاسین
Escherchia coli	آمیکاسین
Salmonella typhy	آمیکاسین
Bacillus subtilis	کلیندامایسین
Staphylococcus aureus	کلیندامایسین
Staphylococcus epidermidis	کلیندامایسین
Listeria monocytogenes	کلیندامایسین
Proteus mirabilis	آمیکاسین
Micrococcus luteus	کلیندامایسین
Bacillus subtilis	کلیندامایسین
Candida albicans	نیستاتین

تعیین حداقل غلظت باکتریسیدال (MBC)

جهت تعیین MBC با روش Broth dilution ، برای غلظتی از عصاره‌ها که در مرحله قبل اثر ضدمیکروبی قابل توجهی داشتند، رقیق‌سازی متوالی انجام گردید، تا حداقل غلظتی از عصاره‌ها که باعث از بین رفتن میکروارگانیسم‌ها می‌شود، به دست آید. برای انجام این تست از پلیت 96 خانه‌ای استفاده شد. دو چاهک به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شد. کنترل

مثبت حاوی محیط کشت، دی‌متیل‌سولفوکساید، توئین 80 و باکتری مورد آزمایش بود. کنترل منفی حاوی محیط کشت، دی متیل سولفوکساید و توئین بود. سپس پلیت به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در مرحله بعد، از هر چاهک نمونه برداشته و روی محیط کشت جامد مولر هینتون آگار کشت خطی داده شد. کم‌ترین غلظت از عصاره که میکروارگانیسم رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی میکرو ارگانیسم یا MBC در نظر گرفته شد. هر کدام از آزمایشات دو بار تکرار شدند.

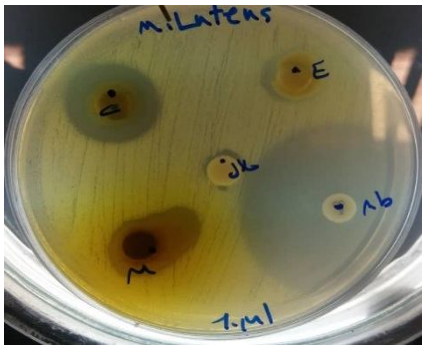
یافته‌ها

نتایج حاصل از توزین عصاره‌های به‌دست آمده از 150 گرم پودر اندام هوایی خشک گیاه به روش سوکسله توسط حلال‌های اترنفت، کلروفرم و متانول به ترتیب 1/33، 1/90 و 15/30 گرم/100 گرم گیاه بوده است. نتایج فراکسیونه کردن عصاره‌های کلروفرمی و متانولی در جدول شماره 2 آمده است. بیش‌ترین میزان عصاره به دست آمده به ترتیب توسط حلال‌های متانول و کلروفرمی استخراج شد. در مطالعات پیشین، ترکیبات فلانوئیدی از دسته فلاونون‌ها و سایر ترکیبات فنلی از عصاره بخش‌های مختلف گیاه *M. parviflorum* مانند ساقه‌ها و برگ‌ها گزارش شده است، هم‌چنین بررسی‌های صورت یافته نشانگر حضور درصد بالایی از ترکیبات سزکوئی ترپنی در اسانس این گیاه می‌باشد(45).

جدول شماره 2: نتایج حاصل از فراکسیونه کردن عصاره کلروفرمی گیاه *M. parviflorum*

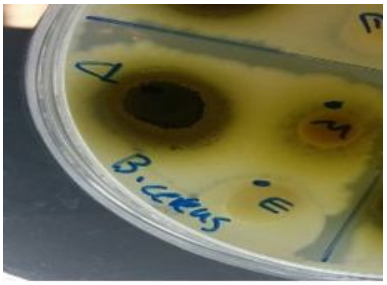
فراکسیون	10درصد	20درصد	0درصد	60درصد	0درصد	100درصد
وزن فراکسیون‌های عصاره کلروفرمی(میلی گرم)	204/4	295,4	210,8	228,6	190,3	127,5
وزن فراکسیون‌های عصاره متانولی (میلی گرم)	984,8	99,8	489,6	146,5	67,2	48,1

به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های اترنفتی، کلروفرمی و متانولی گیاه ابتدا عصاره‌های تام براساس روش دیفوزیون در آگار و با استفاده از غلیظ‌ترین رقتی (200mg/ml) که قابل حل در حلال مورد نظر (2% TWEEN80 در DMSO) بود مورد ارزیابی قرار گرفت. طبق نتایج برای برخی از عصاره‌ها در برابر برخی از باکتری‌ها اثرات ضد میکروبی مشاهده شد، که در بین آن‌ها، عصاره متانولی گیاه *M.parviflorum* به ترتیب با DIZ ، 11/3 میلی‌متر و MBC ، 100 mg/ml علیه باکتری*P.mirabilis* و با DIZ ، 10/2 میلی‌متر و MBC ، 100 mg/ml علیه باکتری *P.aeruginosa* و عصاره کلروفرمی این گیاه با DIZ ، 16/6 میلی‌متر و MBC ، 100 mg/ml علیه باکتری *M.luteus*، با DIZ ، 14/6 میلی‌متر و MBC ، 100 mg/ml علیه باکتری *S.epidermidis* و با DIZ ، 11/6 میلی‌متر و MBC ، 100 mg/ml علیه باکتری *B.*cereus اثرات ضدمیکروبی قابل توجهی نشان دادند (جدول شماره 3 و تصاویر شماره 1 تا 5).

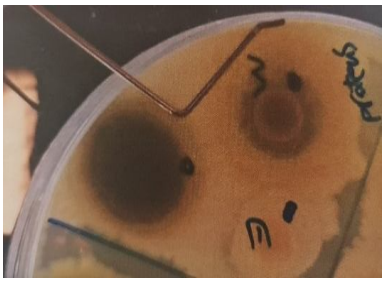


تصویر شماره 1: اثر مهاری ایجاد شده توسط عصاره کلروفرمی(c)، متانولی (M) و اترنفتی (E) گیاه علیه M. luteus

تصویر شماره 2: اثر مهاری ایجاد شده توسط عصاره کلروفرمی(c)، متانولی (M) و اترنفتی (E) گیاه علیه S. epidermidis



تصویر شماره 3: اثر مهاری ایجاد شده توسط عصاره کلروفرمی(c)، متانولی (M) و اترنفتی (E) گیاه علیه B. Cereus

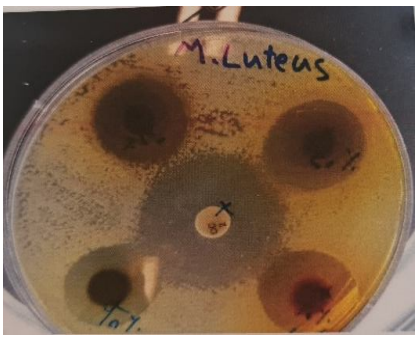


تصویر شماره 4: اثر مهاری ایجاد شده توسط عصاره کلروفرمی(c)، متانولی (M) و اترنفتی (E) گیاه علیه P. mirabilis

تصویر شماره 5: اثر مهاری ایجاد شده توسط عصاره کلروفرمی(c)، متانولی (M) و اترنفتی (E) گیاه علیه P. aeruginosa

از آن‌جایی‌که نتایج حاصل از عصاره‌های کلروفرمی و متانولی این گیاه به مراتب قابل توجه بودند اثرات ضدمیکروبی فراکسیون‌های حاصل از این دو عصاره بر روی همان سویه‌هایی که موثر بودند نیز مورد مطالعه قرار گرفت (جداول شماره 4 تا 7 و تصاویر شماره 6 تا 8).

در بین فراکسیون‌های حاصل از عصاره کلروفرمی (جداول شماره 4و 6)، فراکسیون 60 درصد با قطر هاله عدم رشد 18/2میلی‌متر و میزان MBC ، 12/5 mg/ml علیه میکروکوکوس لوتئوس و در بین فراکسیون‌های حاصل از عصاره متانولی (جداول شماره 5و7)، فراکسیون 40 درصد با قطر هاله عدم رشد 15/2 میلی‌متر و میزان MBC ، 25 mg/ml علیه پروتئوس میرابیلیس قوی‌ترین اثرات ضد باکتریایی را در این مطالعه از خود نشان داده‌اند.



تصویر شماره 6: اثر مهاری فراکسیون‌های 40 و 60 درصد عصاره کلروفرمی گیاه علیه M. luteus

جدول شماره 3: میانگین قطر هاله‌های عدم رشد حاصل از بررسی عصاره‌های کلروفرمی، اترنفتی و متانولی گیاه *M. parviflorum*

باکتری	میانگین DIZ عصاره اترنفتی (میلی متر)±SD	میانگین DIZ عصاره کلروفرمی (میلی متر)±SD	میانگین DIZ عصاره متانولی (میلی متر)±SD	میانگین DIZ دیسک استاندارد (میلی متر)±SD
Micrococcus luteus	11/3±0/5	16/6±0/3	10/3±0/5	29±0/1
Staphylococcus epidermidis	11/5±0/3	14/6±0/3	ND	28±0/2
Bacillus cereus	9/3±0/5	11/6±0/4	ND	29±0/1
Proteus mirabilis	*ND	7/3±0/5	11/3±0/2	25±0/1
Psudomonas aeroginosa	ND	ND	10/2±0/2	28±0/1
Staphylococcus aureus	ND	ND	ND	34±0/1
Salmonella typhi	ND	ND	ND	34±0/1
Listeria monocytogenes	ND	ND	ND	35±0/1
E.coli	ND	ND	ND	31±0/1
Bacillus subtilis	ND	ND	ND	35±0/1
Candida albicans	ND	ND	ND	32±0/1

* ND =not detectable: قطر هاله عدم رشد نداشتند.

جدول شماره 4: میانگین قطر هاله‌های عدم رشد (میلی‌متر) فراکسیون‌های عصاره کلروفرمی حاصل از *M. parviflorum*

سویه میکروبی	میانگین قطر هاله های عدم رشد (میلی متر) ±انحراف معیار					
	فراکسیون 10درصد	فراکسیون 20درصد	فراکسیون 40درصد	فراکسیون 60درصد	فراکسیون 80درصد	فراکسیون 100درصد
M. luteus	11/3±0/3	10/3± 0/4	17/2±0/3	18/2±0/3	9/4±0/5	11/2±0/3
S. epidermidis	16/3±0/3	16/2±0/3	15/3±0/4	15/3±0/4	*ND	14/2±0/3
B. cereus	12/2±0/4	13/2±0/3	14/1±0/3	11/2±0/5	ND	ND

* ND =not detectable: قطر هاله عدم رشد نداشتند.

جدول شماره 5: میانگین قطر هاله‌های عدم رشد (میلی‌متر) فراکسیون‌های عصاره متانولی حاصل از *M. parviflorum*

سویه میکروبی	فراکسیون 10درصد	فراکسیون 20درصد	فراکسیون 40درصد	فراکسیون 60درصد	فراکسیون 80درصد	فراکسیون 100درصد
P. mirabilis	9/2±0/5	11/2±0/3	15/2±0/3	10/2±0/3	13/2±0/4	*ND
P. aeroginosa	ND	11/4±0/4	9/2±0/5	ND	ND	ND

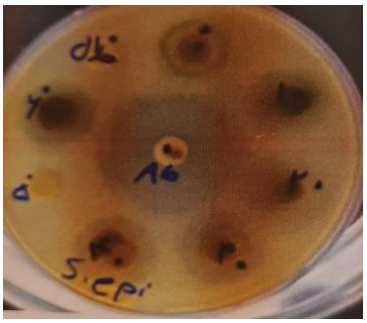
* ND =not detectable: قطر هاله عدم رشد نداشتند.

جدول شماره 6: بررسی MBC حاصل از عصاره تام کلروفرمی و فراکسیون‌های حاصل از *M. parviflorum*

نمونه	*M.luteus*	*S. epidermidis*	*B. cereus*
عصاره تام کلروفرمی	100	100	100
فراکسیون 10درصد	-	25	100
فراکسیون 20درصد	-	50	100
فراکسیون 40درصد	12/5	100	25
فراکسیون 60درصد	12/5	100	100
فراکسیون 80درصد	-	-	-
فراکسیون 100درصد	-	-	-

جدول شماره 7: بررسی MBC عصاره تام متانولی و فراکسیون‌های حاصل از گیاه *M. parviflorum*

نمونه	*P. mirabilis*	*P. aeroginosa*
عصاره تام متانولی	100	100
فراکسیون 10درصد	-	-
فراکسیون 20درصد	-	50
فراکسیون 40درصد	25	-
فراکسیون 60درصد	-	-
فراکسیون 80درصد	-	-
فراکسیون 100درصد	-	-



تصویر شماره 7: اثر مهاری فراکسیون‌های 10، 20، 40، 60، 80، 100 درصد (به‌ترتیب شماره‌های 1 تا 6 در تصویر) عصاره کلروفرمی علیه S. epidermidis

تصویر شماره 8: اثر مهاری فراکسیون‌های 20 و 40 درصد عصاره متانولی علیه P. mirabilis

بحث

استفاده طولانی مدت از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به ظهور باکتری‌های مقاوم به دارو و متعاقبا باعث به وجود آمدن مشکلات بالینی قابل توجهی در درمان بیماری‌های عفونی شده است. کاربرد منابع طبیعی از قبیل گیاهان و قارچ‌ها به منظور استفاده از خواص آنتی‌باکتریال آن‌ها، از گذشته رایج بوده است، به‌عنوان مثال، در مورد عصاره قارچ *Daedaleopsis tricolor* خواص ضدمیکروبی قابل ملاحظه‌ای عنوان شده است(46). امروزه گیاهان دارویی به عنوان یک منبع مهم برای ترکیبات ضدمیکروبی جدید مورد توجه ویژه هستند چرا که مشخص شده است، این گیاهان دارای مواد ضد میکروبی متنوع با اثرات سمی کم یا ناچیز می‌باشند. گیاهانی مانند زنجبیل، دارچین، زنیان، زیره سبز و زیره سیاه می‌توانند طی متابولیسم ثانویه ترکیبات بسیاری با ساختمان مولکولی پیچیده تولید کنند که بعضی از آن‌ها می‌توانند دارای خواص ضد میکروبی قابل توجهی باشند(47). در بعضی موارد تهیه نانوذرات نقره به روش سنتز سبز توسط گیاهان با خاصیت آنتی‌میکروبی مانند عصاره *Allium paradoxum* انجام می‌گیرد(48). در این مطالعه، اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها و فراکسیون‌های گیاه *Marrubium parviflorum* مورد بررسی قرار گرفته است. در بررسی عصاره‌های مختلف گیاه *M.parviflorum*، عصاره اترنفت برخلاف سایر عصاره‌ها فعالیت قابل توجهی در برابر میکروب‌ها

نشان نداد. نتایج مطالعه (جدول شماره 3) نشان می‌دهد که عصاره متانولی این گیاه علیه برخی باکتری‌های مورد مطالعه موثر بوده است و در بین آن‌ها بیش‌ترین اثر مهاری بر روی باکتری‌های گرم منفی *P.mirabilis* و *P.aeroginosa* مشاهده شد. هم‌چنین رشد این دو باکتری در برابر عصاره‌های اترنفتی و کلروفرمی به میزان اندکی مهار شده است.

عصاره کلروفرمی گیاه *M. parviflorum* نیز علیه سویه‌های گرم مثبت مطالعه شده در این مطالعه اثر مهاری از خود نشان داده است، که در بین آن‌ها بر روی باکتری‌های *S. epidermidis*، *M. luteus* و *B. cereus* بیش‌ترین اثر مهاری را ایجاد کرده است (جدول شماره 3).

میانگین قطر هاله عدم رشد (جدول شماره 4) حاصل از فراکسیون 40 درصد (0/3±17/2 میلی‌متر) و 60 درصد (0/3±18/2 میلی‌متر) عصاره کلروفرمی این گیاه در برابر باکتری *M. luteus*، بیش از نصف قطر هاله ایجاد شده (جدول شماره 3) توسط دیسک استاندارد (0/1±29 میلی‌متر) می‌باشد. هم‌چنین میانگین قطر هاله عدم رشد (جدول شماره 4) حاصل از فراکسیون 10 تا 40 درصد علیه باکتری *S.epidermidis* بین 15/3 و 16/3 میلی‌متر به‌دست آمد. در ارتباط با میزان MBC (جدول شماره 6)، بهترین اثر ضد باکتریایی برای فراکسیون‌های کلروفرمی 40 و 60 درصد با MBC معادل 12/5 mg/ml علیه باکتری *M. luteus*، فراکسیون‌های 10 و 20 درصد به ترتیب با MBCهای 25 mg/ml و 50 mg/ml علیه باکتری *S.epidermidis* و فراکسیون 40 درصد با MBC 25 mg/ml علیه باکتری *B. cereus* مشاهده شد. بنابراین *M. luteus* نسبت به فراکسیون کلروفرمی‌های 40 و 60 درصد حساسیت بیش‌تری دارد و باکتری‌های *S.epidermnidis* و *B.cereus* نیز به‌ترتیب نسبت به فراکسیون‌های کلروفرمی 10 و 40 درصد حساسیت بیش‌تری دارند. باکتری‌های *S.epidermidis*، *M.luteus* و *B. cereus* با MBC، 100mg/mL در برابر عصاره تام کلروفرمی مقاوم ترند. در کل با در نظر گرفتن نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد و MBC فراکسیون‌های حاصل از عصاره کلروفرمی، فراکسیون‌های 10، 20 و 40 و 60 درصد اثر ضد میکروبی بارزتری نسبت به عصاره تام نشان دادند که مشخص می‌کند تغلیظ مواد موثر علیه باکتری‌ها در این فراکسیون‌ها می‌باشد.

عصاره متانولی این گیاه با قطر هاله عدم رشد 11/3 میلی‌متر و میزان MBC، 100 mg/ml بیش‌ترین اثر ضدباکتریایی را علیه باکتری *P. Mirabilis* ایجاد کرده است (جدول شماره 3). در بین فراکسیون‌های حاصل از این عصاره (جدول شماره 5)، فراکسیون 40 درصد با قطر هاله عدم رشد 15/2میلی‌متر و میزان MBC، 25 mg/ml (جدول شماره 7)، قوی‌ترین اثر ضد باکتریایی را در بین فراکسیون‌های مختلف عصاره متانولی نشان داده است. همچنین، عصاره متانولی این گیاه با قطر هاله عدم رشد 10/2 میلی‌متر و میزان MBC، 100 mg/ml اثر ضد باکتریایی علیه *P.aeroginosa* ایجاد کرده است. در بین فراکسیون‌های حاصل از این عصاره، فراکسیون 20 درصد با قطر هاله عدم رشد 11/4 میلی‌متر و میزان MBC، 50 mg/ml، توانسته اثر ضد باکتریایی علیه باکتری *P. aeroginosa* نشان می‌دهد. بنابراین، طبق نتایج حاصل از این مطالعه،عصاره متانولی گیاه *M.parviflorum* روی باکتری‌های گرم منفی *P.mirabilis* و *P.aeruginosa*اثر ضدمیکروبی نشان داده است.

سنجش اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های کلروفرمی و متانولی گیاه *M. parviflorum* نشان داد که باکتری‌های *M.luteus*، *S. epidermidis*، *B. cereus*، *P. mirabilis* و *P. aeroginosa* در غلظت‌های بالاتری از عصاره‌ها مهار می‌شوند، اما به دلیل تغلیظ مواد مؤثر موجود در فراکسیون‌های کلروفرمی و متانولی باکتری‌ها حساسیت بیش‌تری در مقابل فراکسیون‌ها نشان دادند. در کل با در نظر گرفتن تمام نتایج مربوط به میانگین‌های قطر هاله عدم رشد و MBC حاصل در این مطالعه، بیش‌ترین اثر ضدمیکروبی این گیاه مربوط به باکتری‌های گرم مثبت، میکروکوکوس لوتئوس (فراکسیون‌های 40 و 60 درصد

حاصل از عصاره کلروفرمی) و استافیلوکوک اپیدرمیدیس (فراکسیون‌های10 و20 درصد حاصل ازعصاره کلروفرمی) می‌باشد. بنابراین اثر ضدمیکروبی گیاه موردنظر ما بیش‌تر بر روی باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد که با توجه به دیواره‌ی نفوذپذیر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی، این یافته قابل توجیه است(49).

در باکتری‌های گرم منفی، وجود یک غشای خارجی حاوی لیپوپروتئین‌ها و لیپوپلی ساکاریدها با خاصیت نفوذپذیری انتخابی مانند سدی از عبور مولکول‌های بزرگ و آب گریز ممانعت می‌کند و از عوامل مهم در مقاومت آن‌ها نسبت به ترکیبات ضدمیکروبی محسوب می‌شود(50). با مطالعه روی ترکیبات احتمالی که می‌توانند مسئول اثرات ضدمیکروبی باشند، می‌توان به ترکیبات فلاونوئیدی، فنلی و ترپنی اشاره کرد که حضور آن‌ها در گونه‌های مختلف جنس Marrubium و نیز اثرات ضدمیکروبی آن‌ها قبلا به اثبات رسیده است.

طبق مطالعات انجام شده توسط Bouterfas و همکاران، قطر هاله عدم رشد گیاه *M. vulgare* بین 7/5 - 34/3 میلی‌متر است که غالباً بیش تر از اثرات مواد ضد باکتری استاندارد (کلرامفنیکل، جنتامایسین، آزترونام، نالیدکسیک اسید، سفتازیدیم و ایمی‌پنم) است. هم‌چنین حداقل غلظت مهارکننده بین 25 تا 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر است که نشان‌دهنده مهار ضدباکتریایی قوی می‌باشد. غربالگری فیتوشیمیایی حضور فلاوان‌ها و فلاوانول‌های استخراج شده در عصاره حاصل از برگ این گیاه را نشان داد، که ممکن است مسئول این فعالیت ضد میکروبی باشند(36).

در مطالعه ای دیگر حداقل غلظت مهاری عصاره متانولی *M. deserti* در محدوده 25-3/25 mg/ml گزارش شد. براساس نتایج، *B.subtilis* به‌عنوان حساس‌ترین سویه در برابر عصاره متانول یافت شد. عصاره دارای فعالیت کمی در رشد *M.luteus*، *S.mutans* و *S.epidermidis* است که فقط در غلظت‌های بالا (MIC 25 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مهار شدند(33).

بررسی‌های انجام شده توسط *Radojević* و همکارانش نشان داد که بیش‌ترین فعالیت ضدباکتریایی گیاه *M. peregrinum* مربوط به عصاره متانولی، عصاره اتیل‌استاتی و سپس عصاره استونی گیاه می‌باشد(42). حساس‌ترین باکتری‌ها *S. aureus*، *P.aeruginosa* بوده و بیش‌ترین حساسیت مربوط به عصاره اتیل استاتی گیاه مذکور روی باکتری *B.subtilis* با MIC، 0/0781*mg/ml* می‌باشد. بهترین اثر ضدقارچی را عصاره متانولی این گیاه روی *Aspergillus niger* و با *MIC*، 0/625*mg/ml* نشان داده است(34).

براساس مطالعه انجام شده توسط گلمکانی و همکاران(11) در استان خراسان شمالی(ایران)، سنجش اثرات ضد باکتریایی عصاره گیاه *M.duabense Murata* نشان می‌دهد که تنها *Clostridium perfringens* گرم مثبت و بی‌هوازی به وسیله غلظت بالاتری تحت تأثیر قرار گرفته است، در حالی که *S.aureus*، *Salmonella pullorum* و *E.coli* هیچ مهار رشد قابل توجهی ندارند. گمان می‌رود که این موضوع با محتوای بالای ترکیبات اکسیژن‌دار(02/ 33 درصد) همراه باشد. نویسندگان *M.duabense* را به‌عنوان گیاه دارویی در برابر باکتری‌های بی‌هوازی پیشنهاد می‌کنند. هم‌چنین محققان متعددی از مونو ترپن و سس کوئی‌ترپن‌ها به‌عنوان ترکیبات اصلی اسانس گیاه که دارای خاصیت فنولی هستند گزارش کرده‌اند(28،27) بنابراین منطقی است که فرض کنیم فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها ممکن است به فراوانی این ترکیبات مربوط باشد(11).

در مطالعه ما، قوی‌ترین اثرات ضد باکتریایی مربوط به فراکسیون 60 درصد عصاره کلروفرمی علیه میکروارگانیسم *Micrococcus Luteus* بود که بیش‌ترین DIZ (18/2میلی‌متر) و کم‌ترین MBC، 12/5 mg/ml را نشان داد.

به‌طور کلی، در بین عصاره‌های گیاهی به دست آمده از *M. parviflorum*، عصاره‌های کلروفرمی و متانولی این گیاه اثرات ضدمیکروبی بارزتری از خود

نشان دادند. بررسی فعالیت ضدمیکروبی فراکسیون‌های حاصل از عصاره کلروفرمی و متانولی گیاه فوق در برابر برخی از باکتری‌های مورد مطالعه نشان دهنده تغلیظ ترکیبات ضدمیکروبی در برخی از فراکسیون‌های به دست آمده می‌باشد. مقادیر MBC وDIZ در فراکسیون‌های بدست آمده از عصاره کلروفرمی و متانولی نشان‌دهنده حساسیت بیش‌تر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که احتمالاً مربوط به تفاوت دیواره سلولی آن‌ها است. حساس‌ترین میکروارگانیسم *Micrococcus Luteus* بود که بیش‌ترین DIZ و کم‌ترین MBC را نشان داد. به‌طور کلی، به نظر می‌رسد اثرات ضدمیکروبی مشاهده شده از عصاره‌ها و فراکسیون‌های ذکر شده مربوط به ترکیبات دی ترپنی و فلاونوئیدی موجود در عصاره‌های به دست آمده از این گیاه باشند.

References

1. Grassia A, Senatore F, Arnold NA, Bruno M, Piozzi F, Rigano D, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from aerial parts of two Marrubium sp.(Lamiaceae) growing wild in Lebanon. Polish Journal of Chemistry 2006; 80(4): 623-628.
2. Terencio MC, Giner RM, Sanz MJ, Manez S, Rios JL. On the occurrence of caffeoyltartronic acid and other phenolics in Chondrilla juncea. Zeitschrift für Naturforschung C 1993; 48(5-6): 417-419.
3. Boudjelal A, Henchiri C, Siracusa L, Sari M, Ruberto G. Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian Marrubium vulgare L. infusion. Fitoterapia 2012; 83(2): 286-292.
4. Ghahreman A. plant systematics cormophytes of Iran. Iran University Press.
5. Meyre-Silva C, Yunes RA, Schlemper V, Campos-Buzzi F, Cechinel-Filho V. Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in Marrubium vulgare (Lamiaceae). Farmaco 2005; 60(4): 321-326.
6. Assadi M. Flora of Iran. Iran Nature 2019; 4(2): 29-41.
7. Mahdizadeh S, Khaleghi Ghadiri M, Gorji A. Avicenna's Canon of Medicine: a review of analgesics and anti-inflammatory substances. Avicenna J phytomed 2015; 5(3): 182-202.
8. Rigano D, Formisano C, Basile A, Lavitola A, Senatore F, Rosselli S, et al. Antibacterial activity of flavonoids and phenylpropanoids from Marrubium globosum ssp. libanoticum. Phytotherapy Research 2007; 21(40): 395-397.
9. Hayet E, Samia A, Patrick G, Ali MM, Maha M, Laurent G, et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of Marrubium alysson and Retama raetam grown in Tunisia. Pak J Biol Sci 2007; 10(10): 1759-1762.
10. Kurbatova NV, Muzychkina R, Mukhitdinov N, Parshina GN. Comparative phytochemical investigation of the composition and content of biologically active substances in Marrubium vulgare and M. alternidens. Chemistry of Natural Compounds 2003; 39(5): 501-502.
11. Golmakani H, Rabbani Nasab H, Sharifan M, Kamali H, Yadollahi A. The essential oil composition and antibacterial activity of marrubium duabense murata from north khorassan province, iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants 2016; 19(4): 963-971.
12. Kunduhoglu B, Pilatin S, Caliskan F. Antimicrobial screening of some medicinal plants collected from Eskisehir, Turkey. Fresenius Environmental Bulletin 2011; 20(4): 945-952.

13. Fathiazad F, Rameshrad M, Asghari S, Hamedeyazdan S, Garjani A, Maleki-Dizaji N. Phytochemical screening and anti-inflammatory effect of Marrubium vulgare L. Methanol extract on carrageenan-induced paw inflammation in rats. Pharmaceutical Sciences 2016; 23(1): 3-11.
14. Moussaid M, Elamrani A, Berahal C, Moussaid H, Bourhime N, Benaissa M. Evaluation of the antioxidant potential of some Morocco medicinal plants. Global Journal of Pharmacology 2011; 5(3): 153-158.
15. Kahkeshani N, Gharedaghi M, Hadjiakhoondi A, Sharifzadeh M, Khanavi M. Antinociceptive effect of extracts of Marrubium astracanicum Jacq. aerial parts. Avicenna J Phytomed 2017; 7(1): 73-79.
16. Khanavi M, Delnavazi M-r, Nikoui V, Ostadhadi S, Bakhtiarian A. Evaluation of analgesic effects of hydroalcoholic extract of Marrubium parviflorum by formalin test in mice. Asian Journal of Plant Sciences 2012; 11(2): 96-99.
17. Saad S, Ouafi S, Chabane D. Anti-inflammatory and acute toxicity evaluation of aqueous infusion extract obtained from aerial parts of Marrubium deserti De Noé growing in Algeria. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 2016; 13(1): 71-75.
18. Essawy SS, Abo-Elmatty DM, Ghazy NM, Badr JM, Sterner O. Antioxidant and anti-inflammatory effects of Marrubium alysson extracts in high cholesterol-fed rabbits. Saudi pharmaceutical Journal 2014; 22(5): 472-482.
19. Hamedeyazdan S, Fathiazad F, Sharifi S, Nazemiyeh H. Antiproliferative activity of Marrubium persicum extract in the MCF-7 human breast cancer cell line. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2012; 13(11): 5843-5848.
20. Yamaguchi K, Liggett JL, Kim N-C, Baek SJ. Anti-proliferative effect of horehound leaf and wild cherry bark extracts on human colorectal cancer cells. Oncology Reports 2006; 15(1): 275-281.
21. Elberry AA ,Harraz FM, Ghareib SA, Gabr SA, Nagy AA, Abdel-Sattar E. Methanolic extract of Marrubium vulgare ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. International journal of Diabetes Mellitus 2015; 3(1): 37-44.
22. Paula de Oliveira A, Santin JR, Lemos M, Klein Júnior LC, Couto AG, Meyre da Silva Bittencourt C, et al. Gastroprotective activity of methanol extract and marrubiin obtained from leaves of Marrubium vulgare L. (Lamiaceae). The Journal of pharmacy and pharmacology 2011; 63(9): 1230-1237.
23. Abd El-Mohsen MM, Rabeh MA, Abou-Setta L, El-Rashedy A, Hussein A. Marrubiin: a potent α-glucosidase inhibitor from Marrubium alysson. International Journal of Applied Research in Natural Products 2014; 7(1): 21-27.
24. Kiliç Ö, Özdemir FA .Composition and Antimicrobial Activities of Marrubium astracanicum Jacq. subsp. astracanicum Essential Oil. Journal of Essential Oil Bearing Plants 2017; 20(5): 1400-1406.
25. El Bardai S, Lyoussi B, Wibo M, Morel N. Comparative study of the antihypertensive activity of Marrubium vulgare and of the dihydropyridine calcium antagonist amlodipine in spontaneously hypertensive rat. Clinical and Experimental Hypertension 2004; 26(6): 465-474.
26. Karioti A, Skopeliti M, Tsitsilonis O, Heilmann J, Skaltsa H. Cytotoxicity and immunomodulating characteristics of labdane diterpenes from Marrubium cylleneum and

Marrubium velutinum. Phytochemistry 2007; 68(11): 1587-1594.

27. Oyedeji OA, Afolayan AJ, Eloff JN. Comparative study of the essential oil composition and antimicrobial activity of Leonotis leonurus and L. ocymifolia in the Eastern Cape, South Africa. South African Journal of Botany 2005; 71(1): 114-116.
28. Cakir A, Kordali S, Zengin H, Izumi S, Hirata T. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from Hypericum hyssopifolium and Hypericum heterophyllum. Flavour and Fragrance Journal 2004; 19(1): 62-68.
29. Khaje H, Bazi S, Amini-Borojeni N, Niazi A A, Bokaeian M, Saboori E, et al. Phytochemical analysis, antibacterial activity of Marrubium vulgare L against Staphylococcus aureus in vitro. Zahedan J Res Med Sci 2014; 16(10): 60-64.
30. Krimat S, Tahar D, Lynda L, Saida B, Chabane C, Hafidha M. Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from. Journal of Coastal Life Medicine 2014; 2(6): 478-483.
31. Abadi A, Abdellatif F. Antibacterial and antioxidant activities of Marrubium vulgare essential oil cultivated in Eastern Algeria. Int J Chem Stud. 2013; 1(2): 32-38.
32. Enomoto S, Okada Y, Güvenc A, Erdurak CS, Coşkun M, Okuyama T. Inhibitory effect of traditional Turkish folk medicines on aldose reductase (AR) and hematological activity, and on AR inhibitory activity of quercetin-3-O-methyl ether isolated from Cistus laurifolius L. Biol Pharm Bull 2004; 27(7): 1140-1143.
33. Tlili N, Elfalleh W, Hannachi H, Yahia Y, Khaldi A, Ferchichi A, et al. Screening of natural antioxidants from selected medicinal plants. International Journal of Food Properties 2013; 16(5): 1117-1126.
34. Laouer H, Yabrir B, Djeridane A, Yousfi M, Beldovini N, Lamamra M. Composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of Marrubium deserti. Natural product communications 2009; 4(8): 1133-1138.
35. Petrović S, Pavlović M, Maksimović Z, Milenković M, Couladis M, Tzakou O, et al. Composition and antimicrobial activity of marrubium incanum desr.(lamiaceae) essential oil. Nat Prod Commun 2009; 4(3): 431-434.
36. Bouterfas K, Mehdadi Z, Elaoufi MM, Aouad L, Latreche A, Benchiha W. In vitro antibacterial activity of flavonoids extracts from three Algerian horehound (Marrubium vulgare L.) leaves. Oriental Pharmacy and Experimental Medicine 2018; 18(1): 59-66.
37. Chemsa AE, Zellagui A, Öztürk M, Erol E, Ceylan O, Duru ME, et al. Antibiofilm formation ,antioxidant and anticholinesterase activities of essential oil and methanol extract of Marrubium deserti de Noé. J Mater Env Sci 2016; 7(3): 993-1000.
38. Zarai Z, Kadri A, Chobba IB, Mansour RB, Bekir A, Mejdoub H, et al. The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of Marrubium vulgare L. essential oil grown in Tunisia. Lipids Health Dis 2011; 10: 161.
39. Marino M, Bersani C, Comi G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. International Journal of Food Microbiology 2001; 67(3): 187-195.
40. Haratym W, Weryszko-Chmielewska E. Ultrastructural and histochemical analysis of glandular trichomes of Marrubium vulgare L.(Lamiaceae). Flora 2017; 231: 11-20.

41. Dendougui H, Seghir S, Belloum Z, Benayache F, Leon F, Brouard I, et al. A new labdane diterpene and other constituents from Marrubium deserti Noe ex coss. Rec Nat Prod 2011; 5(4): 300-3004.
42. Radojević I, Stanković M, Stefanović O, Čomić L, Topuzović M, Vasić S, et al. Exploring antimicrobial activity of horehound, Marrubium peregrinum L. extracts. Kragujevac J Sci 2013; 35: 99-106.
43. Zaabat N, Hay A-E, Michalet S, Darbour N, Bayet C, Skandrani I, et al. Antioxidant and antigenotoxic properties of compounds isolated from Marrubium deserti de Noé. Food Chem Toxicol 2011; 49(12): 3328-3335.
44. Meyre-Silva C, Cechinel-Filho V. A review of the chemical and pharmacological aspects of the genus marrubium. Curr pharm Des 2010; 16(31): 3503-3518.
45. Sarikurkcu C, Ozer MS, Calli N, Popović-Djordjević J. Essential oil composition and antioxidant activity of endemic Marrubium parviflorum subsp. oligodon. Industrial Crops and Products 2018; 119: 209-213.
46. Arab Firozjae A, Azadbakht M, Habibi E. Purification and Identification of Chemical Constituents of Basidiomycete Daedaleopsis tricolor Collected from Mazandaran Province, Iran. J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 31(205): 89-94 (Persian).
47. Tarhriz V, Yari Khosroushahi A, Ebrahimi Ghasor L, Elyasifar B, Dilmaghani A. Effect of Essential Oils of Zingiber officinale, Cinnamomum verum, Trachyspermum ammi, Cuminum cyminum, and Carum carvi on Bacteria Inducing Clonal Dysbiosis In Vitro. J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31(201): 16-27 (Persian).
48. Ranjbar T, Hashemi z, Sadeghian F, Goli HR, Ahanjan M, Ebrahimzadeh MA. Green Synthesis of Silver Nanoparticles with Allium paradoxum Extract and Evaluation of their Antibacterial Activities. J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 29(182): 1-11 (Persian).
49. Termentzi A, Fokialakis N, Leandros Skaltsounis A. Natural resins and bioactive natural products thereof as potential anitimicrobial agents. Curr Pharm Des 2011; 17(13): 1267-1290 (Persian).
50. Ramkumar KM, Rajaguru P, Ananthan R. Antimicrobial properties and phytochemical constituents of an antidiabetic plant Gymnema montanum. Advances in Biological Research 2007; 1(1-2): 67-71.