

Antimicrobial Activity of Different Extracts and Fractions of *Marrubium parviflorum*

Somayeh Hallaj-Nezhadi¹,
Forough Mohammadi²,
Shadi Najjar-Sadeghi²,
Sanaz Hamedeyazdan³

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 *Pseudomonas 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)

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

سمیه حلاج نژادی¹فروغ محمدی²شادی نجار صادقی²ساناز حامدیزدان³

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 ضد میکروبی عصاره‌ها بر روی شش سویه باکتری گرم مثبت، چهار سویه باکتری گرم منفی و یک سویه قارچ مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌چنین عصاره‌های موثر با انواع روش‌های کروماتوگرافی فراکسیون‌دهی شدند و اثرات ضد میکروبی آن‌ها نیز بررسی شد.

یافته‌ها: عصاره کلروفرمی گیاه *M. parviflorum* علیه باکتری‌های *Staphylococcus epidermidis*، *Bacillus cereus* و 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 *Pseudomonas aeruginosa* اثرات ضد میکروبی قابل توجهی نشان دادند. در بین فراکسیون‌های حاصل، فراکسیون 10، 20، 40 و 60 درصد عصاره کلروفرمی و فراکسیون‌های 20، 40 درصد عصاره متانولی بیش‌ترین اثر ضد میکروبی را ایجاد کردند. مقادیر MBC و DIZ در فراکسیون‌های به‌دست آمده نشان‌دهنده تغلیظ ترکیبات ضد میکروبی در برخی از فراکسیون‌ها 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.

واژه‌های کلیدی: *Marrubium parviflorum*، عصاره، فراکسیون، اثر ضد میکروبی، 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 ضد میکروبی و نیز تهیه آنتی‌بیوتیک‌های جدید از ترکیبات طبیعی در حال انجام است. اخیراً گیاهان متعددی با خواص ضد میکروبی مناسب شناسایی شده است (1). هم‌چنین براساس مطالعات متعدد، متابولیت‌های ثانویه موجود در برخی از گیاهان اثرات ضد میکروبی مشابه آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داده‌اند (2).

E-mail: yazdans@tbzmed.ac.ir

مؤلف مسئول: ساناز حامد یزدان - تبریز: دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده داروسازی

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 ضد میکروبی گیاه *Marrubium parviflorum* می باشد. این گیاه از دسته گیاهان Magnoliopsida، رده Magnoliopsida و خانواده Lamiaceae می باشد. جنس *Marrubium* شامل 49 گونه پذیرفته شده در جهان است که یازده گونه از آن ها در ایران یافت می شود (3-5).

جنس گیاهی *Marrubium* برای درمان درد مفاصل، نقرس، درد معده و کولیک در طب سنتی ایران استفاده می شود. به طور کلی این گیاهان بوته های بزرگ سالانه یا چند ساله هستند که به طور سنتی در کشورهای مختلف برای درمان آسم، عفونت های ریوی، اختلالات دستگاه گوارش، بی خوابی و انواع مختلف درد و التهاب مانند درد مفاصل و نقرس مورد استفاده قرار می گیرند (7,6). ارزیابی فیتوشیمیایی گونه های جنس *Marrubium* نشان داده است که این گیاهان سرشار از فلاونوئیدها، فیل پروپانوئیدها، دی ترپن ها، اسیدهای آمینه و ساپونین ها هستند (8-10). مطالعات مختلفی در رابطه با اثرات گونه های مختلف جنس *Marrubium* در منابع علمی موجود می باشد. این اثرات عمدتاً شامل خواص آنتی اکسیدانی، ضد دردی، ضد التهابی، محافظت کنندگی کبد، ضد سرطان، محافظت کنندگی قلب و عروق، محافظت کنندگی زخم های گوارشی، ضد دیابتی و ضد میکروبی می باشد (11-24). 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 ضد عفونی کننده دارد (25). عصاره آبی گیاه *M. vulgare* اثرات کاهش فشارخون قابل ملاحظه ای در مقایسه با داروی آمیلودپین نشان داده است (25). هم چنین در برخی از گونه های گیاهی از قبیل *M. Vulgare* خاصیت آنتی اکسیدانی و تاثیرات مثبت بر پراکسیداسیون لیپید دیده شده است (5). در مورد گیاه *M. vulgare*، اثرات ضد دردی در دردهای نوروزنیک مشاهده شده است (5). طبق مطالعات in-vivo بر روی گیاه *M. vulgare* L. خاصیت ضد دیابتی خصوصاً برای افراد دچار دیابت

تیپ دو بیان شده است (3). در یک مطالعه دیگر برخی از دی ترپنوئیدهای بخش های هوایی عصاره دی کلرومتانی گیاه *M. cylleneum* فعالیت ضد توموری و سمیت سلولی نشان داده اند (26). هم چنین در مطالعات مختلف بر روی گونه های مختلف جنس ماروبیوم (*M. astracanicum*، *M. cuneatum*، *M. deserti*، *M. duabense*، *M. vulgare*، *M. incanum*، *M. globosum*) اثرات ضد میکروبی علیه برخی سوش های میکروبی گزارش شده است (1، 12، 27-37). در یک پژوهش، اثرات ضد میکروبی گیاه *M. vulgare* در برابر میکروارگانیسم های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشانگر اثرات ضد میکروبی مهم این گیاه در برابر میکروارگانیسم های مختلف به ویژه باکتری های گرم مثبت بود به طوری که حداقل غلظت مهاري در محدوده 1120-2600 میکروگرم در میلی لیتر به دست آمده بود. هم چنین اثرات مهاري علیه میکروارگانیسم *Botrytis cinerea* با قطر هاله عدم رشد 12/6 میلی متر گزارش شده است (38). اکثر اثرات ضد میکروبی و ضد باکتریایی مشاهده شده در جنس های گیاهی مختلف خانواده Lamiaceae به علت حضور ترکیبات فنلی در گیاهان این خانواده ذکر شده است (39). در گونه های 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 (40,8). 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 D-germacrene بودند که عمده اثر ضد میکروبی گیاهان را نیز به این ترکیبات نسبت داده اند (41,42). در یک مطالعه دیگر بر روی *M. deserti* نشان داده شد که مشتقات مونو و دی گلیکوزید apigenin دارای خواص آنتی اکسیدانی و آنتی ژنوتوکسیکی می باشند (43). در یک بررسی دیگر در عصاره های متانولی اندام های هوایی گیاهان جنس *Marrubium*

خواص بیولوژیکی مانند ضد التهابی، ضد فشارخون، ضد دیابتی و آنتی اکسیدانی و همچنین اثرات ضد قارچی 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 می باشد. در این مطالعه، به ارزیابی اثرات ضد میکروبی عصاره ها و فراکسیون های گیاه *M. parviflorum* پرداخته شده است.

مواد و روش ها

در مطالعه تجربی حاضر اصول اخلاقی مطابق دستورالعمل کمیته اخلاق کشوری با کد اخلاق 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 سولفو کساید (Sigma-Aldrich، آلمان) و همچنین محیط کشت های نوترینت آگار (Merck، آلمان) ولر هیتون (Gibco، اسکاتلند)، لاکتوز برات (Merck، آلمان) و نیز دیسک های بلانک استریل، آمیکاسین (30 میکرو گرم)، کلیندامایسین (30 میکرو گرم) ساخت شرکت پادتن طب (ایران) مورد استفاده قرار گرفت. باکتری های مورد آزمایش شامل: *Micrococcus luteus* PTCC 1110، *Echerchia coli* PTCC 1533، *Staphylococcus aureus* PTCC1 112، *Candida albicans* PTCC5027، *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1310، *Bacillus cereus* PTCC 1015، *Staphylococcus epidermidis* PTCC 1114، *Bacillus subtilis* PTCC 1715، *Proteus mirabilis* ATCC7005، *Listeria monocytogenes* PTCC 1230، *Salmonella typhi* PTCC 1163 می باشند. دیسک های حاوی آنتی بیوتیک 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 مرنند واقع در آذربایجان شرقی جمع آوری 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. عصاره های حاصل در دمای 45 درجه سانتی گراد 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 شیشه ای استوانه ای شکل به ارتفاع 5/5 سانتی متر و قطر دهانه 7 سانتی متر مجهز به فیلتر از جنس *Sintered glass*، تا ارتفاع 4/5 سانتی متر به طور متراکم با سیلیکاژل پر شد. قیف شیشه ای و دکتور رابط بر روی ارلن بوخنر متصل شده به پمپ خلاء واقع گردید. یک کاغذ صافی دایره ای با قطر معادل قطر دهانه بر روی سیلیکاژل قرار گرفت. 250 میلی لیتر از محلول های تهیه شده از 10، 20، 40، 60، 80 و 100 درصد کلروفرم در اتیل استات تهیه شد. در ابتدا به آهستگی 200ml متانول خالص از سیلیکاژل عبور داده شد. لازم به ذکر است که از ابتدای شروع VLC از هر گونه خشک شدن از سیلیکاژل جلوگیری شد. پس از آن که 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 به دنبال عبور محلول 10 درصد کلروفرم در اتیل استات از سیلیکاژل، به ترتیب

محللول‌های 10، 20، 40، 60، 80 و 100 درصد (250ml) کلروفرم در اتیل استات از ستون سیلیکاژل عبور داده شدند. همچنین شایان ذکر است که بعد از عبور هر محللول از ستون پمپ خلاء موقتاً خاموش شده و فراکسیون‌های جمع‌آوری شده به‌طور جداگانه در دستگاه روتاری اوپراتور در دمای پایین تر از 45 درجه خشک گردید و پس از توزین در ویال‌های در بسته نگهداری شدند.

جهت فراکسیون 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 سولفو کساید) حل گردید. برای انجام تست‌های میکروبی ابتدا از روش دیفوزیون در آگار (دیسک-پلیت) و اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد (DIZ) استفاده شد. سپس در مورد 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 محللول تهیه شده (200 mg/ml محللول در 2% TWEEN80 در DMSO) در 2 مرحله روی دیسک‌ها 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 فراکسیون نمودن 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

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

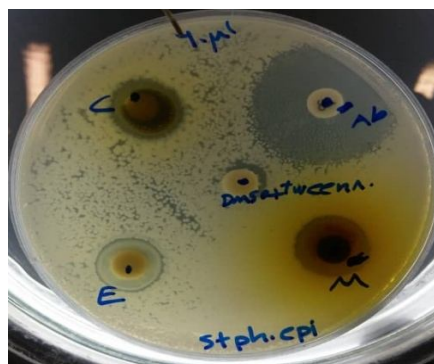
تعیین حداقل غلظت باکتری‌سیدال (MBC)

جهت تعیین MBC با روش Broth dilution، برای غلظتی از عصاره‌ها که در مرحله قبل اثر ضد میکروبی 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

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 ضد میکروبی 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 *M. luteus*



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

مثبت حاوی محیط کشت، دی‌متیل سولفوکساید، توئین 80 و باکتری مورد آزمایش بود. کنترل منفی حاوی محیط کشت، دی‌متیل 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 هیتون آگار کشت خطی داده شد. کم‌ترین غلظت از عصاره که میکروارگانیسم رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیسم 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 فراکسیون‌دهی 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 فلاونوئیدی از دسته فلاونون‌ها و سایر ترکیبات فنی از عصاره بخش‌های مختلف گیاه *M. parviflorum* مانند ساقه‌ها و برگ‌ها گزارش شده است، هم‌چنین بررسی‌های صورت یافته نشانگر حضور درصد بالایی از ترکیبات سزکوئی‌ترینی در اسانس این گیاه می‌باشد (45).

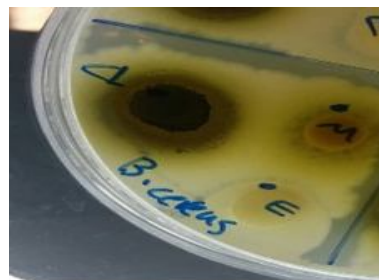
جدول شماره 2: نتایج حاصل از فراکسیون‌دهی عصاره کلروفرمی گیاه *M. parviflorum*

فراکسیون	10درصد	20درصد	40درصد	60درصد	لورصد	100درصد
وزن فراکسیون‌های عصاره کلروفرمی (میلی‌گرم)	2044	295.4	210.8	228.6	190.3	127.5
وزن فراکسیون‌های عصاره متانولی (میلی‌گرم)	994.8	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

از آن جایی که نتایج حاصل از عصاره‌های کلروفرمی و متانولی این گیاه به مراتب قابل توجه بودند اثرات ضد میکروبی 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).

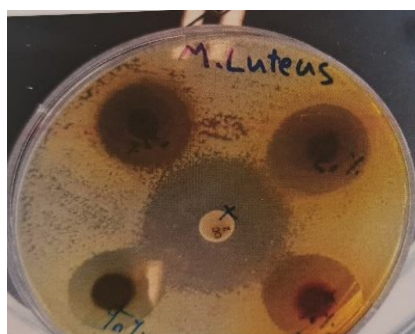
در بین فراکسیون‌های حاصل از عصاره کلروفرمی (جداول شماره 4 و 6)، فراکسیون 60 درصد با قطر هاله عدم رشد $18/2$ میلی‌متر و میزان MBC، $12/5$ mg/ml، علیه میکروکوکوس لوتئوس و در بین فراکسیون‌های حاصل از عصاره متانولی (جداول شماره 5 و 7)، فراکسیون 40 درصد با قطر هاله عدم رشد $15/2$ میلی‌متر و میزان MBC، 25 mg/ml، علیه پروتئوس میرابیلیس قوی‌ترین اثرات ضد باکتریایی را در این مطالعه از خود نشان داده‌اند.



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



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



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

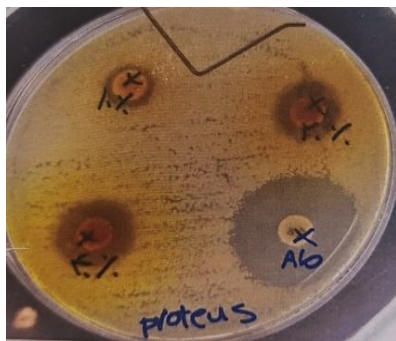


تصویر شماره 5: اثر مهاری ایجاد شده توسط عصاره کلروفرمی (c)، متانولی (M) و اترنفتی (E) گیاه *P. aeruginosa* علیه *C. luteus*

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

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

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



تصویر شماره 8: اثر مهاري فراکسیون های 20 و 40 درصد عصاره متانولي عليه *P. mirabilis*

بحث

استفاده طولانی مدت از آنتی بیوتیک ها منجر به ظهور باکتری های مقاوم به دارو و متعاقبا باعث به وجود آمدن مشکلات بالینی قابل توجهی در درمان بیماری های عفونی شده است. کاربرد منابع طبیعی از قبیل گیاهان و قارچ ها به منظور استفاده از خواص آنتی باکتریال آن ها، از گذشته رایج بوده است، به عنوان مثال، در مورد عصاره قارچ *Daedaleopsis tricolor* خواص ضد میکروبی قابل ملاحظه ای عنوان شده است (46). امروزه گیاهان دارویی به عنوان یک منبع مهم برای ترکیبات ضد میکروبی جدید مورد توجه ویژه هستند چرا که مشخص شده است، این گیاهان دارای مواد ضد میکروبی متنوع با اثرات سمی کم یا ناچیز می باشند. گیاهانی مانند زنجبیل، دارچین، زنیان، زیره سبز و زیره سیاه می توانند طی متابولیسم ثانویه ترکیبات بسیاری با ساختمان مولکولی پیچیده تولید کنند که بعضی از آن ها می توانند دارای خواص ضد میکروبی قابل توجهی باشند (47). در بعضی موارد تهیه نانوذرات نقره به روش سنتز سبز توسط گیاهان با خاصیت آنتی میکروبی مانند عصاره *Allium paradoxum* انجام می گیرد (48). در این مطالعه، اثرات ضد میکروبی عصاره ها و فراکسیون های گیاه *Marrubium parviflorum* مورد بررسی قرار گرفته است. در بررسی عصاره های مختلف گیاه *M. parviflorum*، عصاره اترنفت برخلاف سایر عصاره ها فعالیت قابل توجهی در برابر میکروب ها

جدول شماره 4: میانگین قطر هاله های عدم رشد (میلی متر) فراکسیون های عصاره کلروفرمی حاصل از *M. parviflorum*

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

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

جدول شماره 5: میانگین قطر هاله های عدم رشد (میلی متر) فراکسیون های عصاره متانولي حاصل از *M. parviflorum*

سویه میکروبی	فراکسیون 10 درصد	فراکسیون 20 درصد	فراکسیون 40 درصد	فراکسیون 60 درصد	فراکسیون 80 درصد	فراکسیون 100 درصد
<i>P. mirabilis</i>	9/2 $\pm$ 0/5	11/2 $\pm$ 0/3	15/2 $\pm$ 0/3	10/2 $\pm$ 0/3	13/2 $\pm$ 0/4	*ND
<i>P. aeruginosa</i>	ND	11/4 $\pm$ 0/4	9/2 $\pm$ 0/5	ND	ND	ND

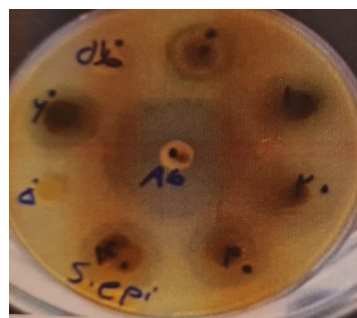
* ND = not detectable: قطر هاله عدم رشد نداشتند.

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

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

جدول شماره 7: بررسی MBC عصاره تام متانولي و فراکسیون های حاصل از گیاه *M. parviflorum*

نمونه	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
عصاره تام متانولي	100	100
فراکسیون 10 درصد	-	-
فراکسیون 20 درصد	-	50
فراکسیون 40 درصد	25	-
فراکسیون 60 درصد	-	-
فراکسیون 80 درصد	-	-
فراکسیون 100 درصد	-	-



تصویر شماره 7: اثر مهاري فراکسیون های 10، 20، 40، 60، 80، 100 درصد (به ترتیب شماره های 1 تا 6 در تصویر) عصاره کلروفرمی عليه *S. epidermidis*

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 مهار بر روی باکتری‌های گرم منفی *P. aeruginosa* و *P. mirabilis* 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 ($17/2 \pm 0/3$ میلی‌متر) و 60 درصد ($18/2 \pm 0/3$ میلی‌متر) عصاره کلروفرمی این گیاه در برابر باکتری *M. luteus*، بیش از نصف قطر هاله ایجاد شده (جدول شماره 3) توسط دیسک استاندارد ($29 \pm 0/1$ 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 به دست 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. epidermidis* و *B. cereus* نیز به ترتیب نسبت به فراکسیون‌های کلروفرمی 10 و 40 درصد حساسیت بیش‌تری دارند. باکتری‌های *S. epidermidis*، *M. luteus* و *B. cereus* با MBC، 100 mg/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 $15/2$ میلی‌متر 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. aeruginosa* 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. aeruginosa* نشان می‌دهد. بنابراین، طبق نتایج حاصل از این مطالعه، عصاره متانولی گیاه *M. parviflorum* روی باکتری‌های گرم منفی *P. mirabilis* و *P. aeruginosa* اثر ضد میکروبی نشان داده است.

سنجش اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های کلروفرمی و متانولی گیاه *M. parviflorum* نشان داد که باکتری‌های *P. mirabilis*، *B. cereus*، *S. epidermidis*، *M. luteus* و *P. aeruginosa* 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 ضد میکروبی این گیاه مربوط به باکتری‌های گرم مثبت، میکروکوکوس لوتئوس (فراکسیون‌های 40 و 60 درصد

حاصل از عصاره کلروفرمی) و استافیلوکوک اپیدرمیدیس (فراکسیون‌های 10 و 20 درصد حاصل از عصاره کلروفرمی) می‌باشد. بنابراین اثر ضد میکروبی گیاه مورد نظر ما بیش تر 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 لیپوبلی 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 ضد میکروبی محسوب می‌شود (50). با مطالعه روی ترکیبات احتمالی که می‌توانند مسئول اثرات ضد میکروبی باشند، می‌توان به ترکیبات فلاونوئیدی، فنی و ترپنی اشاره کرد که حضور آن‌ها در گونه‌های مختلف جنس *Marrubium* و نیز اثرات ضد میکروبی آن‌ها قبلاً به اثبات رسیده است.

طبق مطالعات انجام شده توسط Bouterfas و همکاران، قطر هاله عدم رشد گیاه *M. vulgare* بین 7/5 - 34/3 میلی متر است که غالباً بیش تر از اثرات مواد ضد باکتری استاندارد (کلرامفنیکل، جنتامایسین، آزترونام، نالیدکسیک اسید، سفتازیدیم و ایمپینم) است. هم چنین حداقل غلظت مهارکننده بین 25 تا 100 میکروگرم بر میلی لیتر است که نشان دهنده مهار ضد باکتریایی 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 مهار عصاره متانولی *M. deserti* در محدوده 25-32/5 mg/ml گزارش شد. براساس نتایج، *B. subtilis* به عنوان حساس ترین 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 میلی گرم در میلی لیتر) مهار شدند (33).

بررسی‌های انجام شده توسط *Radojević* و همکارانش نشان داد که بیش ترین فعالیت ضد باکتریایی گیاه *M. peregrinum* مربوط به عصاره متانولی، عصاره اتیل استاتی و سپس عصاره استونی گیاه می‌باشد (42). حساس ترین باکتری‌ها *S. aureus*، *P. aeruginosa* بوده و بیش ترین حساسیت مربوط به عصاره اتیل استاتی گیاه مذکور روی باکتری *B. subtilis* با MIC 0/0781 mg/ml می‌باشد. بهترین اثر ضد قارچی را عصاره متانولی این گیاه روی *Aspergillus niger* 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 (33/02 درصد) همراه باشد. نویسندگان *M. duabense* را به عنوان گیاه دارویی در برابر باکتری‌های بی‌هوازی پیشنهاد می‌کنند. هم چنین محققان متعددی از مونو ترین و سس کوئی ترین‌ها به عنوان ترکیبات اصلی اسانس گیاه که دارای خاصیت فنولی هستند گزارش کرده‌اند (28، 27). بنابراین منطقی است که فرض کنیم فعالیت ضد میکروبی آن‌ها ممکن است به فراوانی این ترکیبات مربوط باشد (11).

در مطالعه ما، قوی ترین اثرات ضد باکتریایی مربوط به فراکسیون 60 درصد عصاره کلروفرمی علیه میکروارگانیسم *Micrococcus luteus* بود که بیش ترین DIZ (18/2 میلی متر) و کم ترین MBC، 12/5 mg/ml را نشان داد.

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

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، به‌نظر می‌رسد اثرات ضد میکروبی مشاهده شده از عصاره‌ها و فراکسیون‌های ذکر شده مربوط به ترکیبات دی‌ترپنی و فلاونوئیدی موجود در عصاره‌های به دست آمده از این گیاه باشند.

نشان دادند. بررسی فعالیت ضد میکروبی فراکسیون‌های حاصل از عصاره کلروفرمی و متانولی گیاه فوق در برابر برخی از باکتری‌های مورد مطالعه نشان دهنده تغلیظ ترکیبات ضد میکروبی در برخی از فراکسیون‌های به دست آمده می‌باشد. مقادیر MBC و DIZ در فراکسیون‌های بدست آمده از عصاره کلروفرمی و متانولی نشان دهنده حساسیت بیش‌تر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به

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, Manes 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, Muzychkin 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. ocyimifolia* 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. Krmat 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* descr.(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. Chems A E, 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. Sarikurkcü 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 anitmicrobial 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.