Food Hygiene, Vol. 12, No. 48, Winter 2023

"Research article" **DOI: 10.30495/JFH.2023.1972178.1380**

Identification of active components in the extracts of *Hypericum Perforatum L.* and *Oliveria Decumbens Vent.* and evaluation of their antioxidant and antimicrobial effects on some microorganisms

Jafarpour, M. [1], Abbasi, H.[2*], Goli, M.[3]

1. M.Sc. Graduated in Food Science and Technology, College of Agriculture and Natural Resources, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Natural Resources, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Laser and Biophotonics in Biotechnologies Research Center, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
*Corresponding author: H.Abbasi@Khuisf.ac.ir
(Received: 2022/11/18 Accepted: 2023/3/16)

Abstract

Essential oils and extracts of medicinal plants have been highly regarded as natural food additives and preservatives due to the presence of bioactive compounds and functional activities, including antioxidant and antimicrobial properties. In this research, *Hypericum perforatum* and *Oliveria decumbens* were extracted by the maceration method and ultrasonic waves. Total phenolic compounds, and antioxidant as well as antimicrobial activities were assessed by GC-MS. Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Aspergillus niger* were evaluated. The results showed that 19 main compounds, the most important of which are Thymol (24.40%), Carvacrol (23.00%), and Myristicin (9.78%), comprise 90.22% of *O. decumbens* extract. In the extract of *H. perforatum*, 20 compounds constitute 94.16% of the extract, among which Hypericin (25.92%) and Hyperforin (16.69%) are the most important effective compounds. The content of phenolic compounds of *Hypericum perforatum* and *O. decumbens* extracts were 24.0 and 9.5 mg/g of dry weight, respectively. *H. perforatum* extract shows higher antioxidant activity compared to *O. decumbens* extract (IC50 of *H. perforatum* and *O. decumbens* extracts are 0.173 and 0.470 g/ml, respectively). The extract of *H. perforatum* inhibited the activity of *S. aureus* and *E. coli*, however, did not significantly inhibit the activity of *A. niger*.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: *Hypericum perforatum*, *Oliveria decumbens*, Antioxidant, MIC, GC-MS

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2023.1972178.1380

شناسایی ترکیبات موثره موجود در عصاره گیاهان هوفاریقون (*Hypericum perforatum L.*) (و لعل کوهستان (*Oliveria decumbens Vent.*) و بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی آن‌ها بر برخی از میکروارگانیسم‌ها

شناسایی ترکیبات موثره موجود در عصاره هوفاریقون و لعل‌کوهستان

مهسا جعفرپور[۱]، هاجر عباسی[۲*]، محمد گلی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، مرکز تحقیقات لیزر و بیوفوتونیک در فناوری‌های زیستی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: H.Abbasi@Khuisf.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۸/۲۷ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۱۲/۲۵)

چکیده

اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان دارویی به‌دلیل داشتن ترکیبات زیست فعال متعدد دارای خواص فراسودمندی ازجمله خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌میکروبی هستند و به عنوان افزودنی‌ها و نگهدارنده‌های خوراکی طبیعی مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این تحقیق دو گیاه هوفاریقون (*Hypericum perforatum L.*) و لعل کوهستان (*Oliveria decumbens Vent.*) با استفاده از روش خیساندن و با کمک امواج التراسونیک عصاره‌گیری شدند و ترکیبات هر عصاره توسط GC-MS شناسایی گردید. محتوی ترکیبات فنولیک کل، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خاصیت ضدمیکروبی آن‌ها ارزیابی شد. قطر هاله عدم رشد و حداقل غلظت‌های بازدارندگی و کشندگی هر عصاره در مقابل چند میکروارگانیسم مهم در صنعت غذا ارزیابی گردید. نتایج نشان می‌دهد که ۱۹ ترکیب اصلی که مهمترین آن‌ها تیمول (۲۴/۴۰ درصد)، کارواکرول (۲۳/۰۰ درصد) و میریستیسین (۹/۷۸ درصد) هستند، ۹۰/۲۲ درصد عصاره لعل کوهستان را شامل می‌شوند. در عصاره هوفاریقون، ۲۰ ترکیب مختلف، ۹۴/۱۶ درصد از عصاره را تشکیل می‌دهد که هیپرسین (۲۵/۹۲درصد) و هایپرفورین (۱۶/۶۹درصد) مهم‌ترین ترکیبات مؤثره شناسایی شده در این عصاره هستند. محتوی ترکیبات فنولیک عصاره هوفاریقون و لعل کوهستان به ترتیب ۲۴/۰ و ۹/۵ میلی‌گرم در گرم وزن خشک ارزیابی شد. عصاره هوفاریقون فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری در مقایسه با عصاره لعل کوهستان نشان می‌دهد (IC_{50} عصاره‌های هوفاریقون و لعل کوهستان به‌ترتیب ۰/۱۷۳ و ۰/۴۷۰ گرم بر میلی‌لیتر). عصاره لعل کوهستان به‌خوبی قادر به بازدارندگی فعالیت *استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و آسپرژیلوس نایجر* است، درحالی که عصاره هوفاریقون تنها موجب محدود کردن *فعالیت استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی* می‌گردید و هیچ گونه تاثیری بر قارچ *آسپرژیلوس نایجر* نداشت.

واژه‌های کلیدی: هوفاریقون، لعل کوهستان، آنتی‌اکسیدان، حداقل غلظت بازدارنده، کروماتوگرافی گازی

مقدمه

امروزه بیماری‌هایی که از طریق غذا به انسان منتقل می‌شوند بسیار متنوع هستند. باقی ماندن برخی از مواد شیمیایی مورد استفاده بعنوان نگهدارنده سنتزی در مواد غذایی، با به وجود آوردن برخی از بیماری‌ها ازجمله سرطان ارتباط مستقیمی دارد، که این امر باعث شده است مصرف کنندگان علاقمند به مصرف مواد نگهدارنده طبیعی شوند (Tabatabaee *et al*., 2018). آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی ازجمله تترا بوتیل هیدروکینون (TBHQ)، بوتیل هیدروکسی تولوئن(BHT)، بوتیل هیدروکسی آنیسول (BHA) و پروپیل گالات از انواع افزودنی‌های پرکاربرد در صنعت غذا هستند که می‌توانند برای سلامت انسان خطرناک باشند. ازاین‌رو جستجو برای یافتن و جایگزینی ترکیبات غیرسمی، موثر و طبیعی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌میکروبی ضرورت دارد (Lobo *et al*., 2010; Kaur *et al*., 2016). مصرف این ترکیبات می‌تواند باعث حفظ سلامت انسان شود (Siddeeg *et al*., 2021).

امروزه گیاهان دارویی، اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی به‌دلیل داشتن ترکیبات زیست فعال دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد قارچی و ضد ویروسی، به‌منظور جلوگیری از رشد پاتوژن‌های بیماری‌زا و تأخیر در رشد عوامل فساد مواد غذایی و نیز به عنوان افزودنی‌های خوراکی مورد توجه صنعت غذا و بسته‌بندی قرار گرفته‌اند (Shahidi *et al*., 2019; Baum *et al*.,2014). به همین دلیل تاکنون مطالعات گسترده‌ای در مورد استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی با منشا گیاهی در صنعت غذا صورت گرفته است (Singh *et al*., 2018). عصاره و اسانس آبی نعناع می‌توانند به عنوان منابع آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی طبیعی و بالقوه در صنایع غذایی مفید واقع شوند (Alizadeh *et al*., 2019). عصاره میوه سماق دارای اثرات ضدمیکروبی چشمگیری بوده و به لحاظ طعم‌دهندگی مناسب می‌تواند در انواع مواد غذایی مانند گوشت و فرآورده‌های گوشتی به عنوان یک نگهدارنده طبیعی مناسب جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی شود (Mahlouji *et al*., 2019). عصاره تولید شده از سه گیاه میخک، اکالیپتوس و رزماری، جایگزین خوبی برای نیتریت موجود در فرآورده گوشتی و سوسیس مرغ معرفی شد (Karimpour *et al*., 2021).

لعل کوهستان (*Oliveria decumbens Vent.*)، گیاهی علفی، یکساله و معطر از خانواده چتریان (Umbelliferae) است که در ترکیه، عراق، سوریه و مناطق غربی و جنوب غربی ایران (کرمانشاه، چهار محال و بختیاری، فارس، بوشهر و خوزستان) یافت می‌شود (Mahboobi *et al*., 2008). مواد مؤثره متفاوتی برای سرشاخه‌های گل‌دار این گیاه گزارش شده است (Eftekhari *et al*., 2019).

هوفاریقون (*Hypericum perforatum L.*) گیاهی علفی و چندساله از خانواده (*Hypericaceae*) است که دارای خواص دارویی ارزشمندی است. منشاء این گیاه بیشتر اروپا، غرب سیبری تا شمال غرب چین، آسیای صغیر، نواحی مدیترانه، شمال آفریقا، کانادا و استرالیا است. در ایران در نواحی شمال، شمال شرق و غرب، استان‌های فارس، کهگیلویه و بویراحمد و دامنه کوه‌های البرز به وفور یافت می‌شود (Zobayed *et al*.,

2005). در مطالعاتی اثرات ضد ویروسی (تب‌خال، هپاتیت، HIV) و ضد التهابی این گیاه گزارش شده است (Suntar *et al.*, 2015). این گیاه به طور سنتی با خاصیت بهبودکنندگی زخم و ضدافسردگی شناخته شده است و اخیراً به عنوان چای و مکمل غذایی استفاده میشود (Germ *et al.*, 2010).

هر دو این گیاهان بومی ایران، در دسترس و ارزان بوده و استفاده دارویی گسترده‌ای دارند. لذا بهره‌مندی از خواص متنوع آن‌ها به عنوان افزودنی و نگهدارنده طبیعی موردنظر است. در این راستا، این پژوهش با هدف بررسی و مقایسه ترکیبات موثره، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌میکروبی عصاره هیدروالکلی این گیاهان صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

گیاه دارویی لعل کوهستان از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی کازرون، استان فارس و گیاه دارویی هوفاریقون از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی اصفهان به صورت تازه تهیه گردید و در هوای آزاد خشک، آسیاب و از الک دارای مش ۴۰ عبور داده شدند. اتانول از شرکت نصر (ایران)، متانول از شرکت مجللی (ایران)، DPPH، فولین‌سیوکالتیو ،گالیک اسید، کربنات سدیم، کلرید باریوم هیدراته، اسید سولفوریک، کلرید سدیم، محیط کشت‌های مورد استفاده برای کشت میکروارگانیسم‌ها از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند.

سویه‌های میکروبی استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC ۲۵۹۲۳)، *اشرشیا کلی* (ATCC ۲۵۹۲۲) و *آسپرژیلوس نیجر* (ATCC ۹۰۲۹) از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردیدند

- استخراج عصاره‌های گیاهی

از روش خیساندن (Maceration) جهت تهیه عصاره هیدروالکلی گیاهان استفاده گردید. پودر گیاه در مخلوط حلال اتانول-آب با نسبت ۷۰ به ۳۰ خیسانده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر (Iran، NST LAB،TSHAKER-M) نگهداری شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در حمام فراصوت (Parsonic 15s، Iran) قرار گرفت و سپس با کاغذ صافی واتمن (شماره ۱)، (Whatman, England) صاف گردید. عمل جداسازی حلال از عصاره توسط دستگاه روتاری (Germany، BuchiCo Rotavapor R-100،) با کمک پمپ خلاء انجام شد. عصاره‌ها با فیلتر ۰/۴۵ میکرون، استریل و تا زمان انجام آزمایش درون ظروف استریل درب بسته در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Giacometti *et al.*, 2018).

- کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی (GC-MS)

برای شناسایی ترکیبات موجود در عصاره‌های هیدروالکلی گیاهان از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC-MS) (Varian 3400) استفاده شد. از ستون HP-5MS به طول ۳۰ متر با قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر جهت تفکیک ترکیبات استفاده شد. برنامه دمایی ستون از ۵۰ تا ۲۵۰ درجه سلسیوس با سرعت افزایش دمای ۳ درجه سلسیوس در دقیقه تنظیم شد. از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل استفاده گردید. طیف‌نگار جرمی مدل (Agilent 5973) با ولتاژ

یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سلسیوس برای شناسایی ترکیبات استفاده شد (Keskes *et al.*, 2017).

- اندازه‌گیری محتوی فنول کل

میزان فنول کل موجود در عصاره‌ها با استفاده از روش رنگ‌سنجی اندازه‌گیری شد. ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین–سیوکالتیو با ۵۰ میکرولیتر عصاره رقیق مخلوط شد. پس از ۵ دقیقه ، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد به مخلوط اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در مکان تاریک قرار گرفت. جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر (S ،Unico،Malaysia 2100 UV) در ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری و محتوی ترکیبات فنولیک نمونه‌ها بر مبنای اسید گالیک (میلی‌گرم در گرم) ارزیابی شد (Parsaei *et al.*, 2013).

- ارزیابی فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

در این آزمون پس از رقیق‌سازی عصاره به نسبت‌های مختلف (۰/۲۰، ۰/۲۵، ۰/۳۰، ۰/۳۵، ۰/۴۰، ۰/۴۵)، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ها به ۴ میلی لیتر محلول اتانولی DPPH اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه، جذب نمونه در ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری شد. درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH مطابق رابطه (۱) ارزیابی و غلظتی از عصاره (میلی‌گرم در میلی لیتر) که توانایی مهار ۵۰ درصدی رادیکال DPPH را داراست (IC_{50}) محاسبه گردید (Adel F. Ahmeda *et al.*, 2019).

رابطه(۱)

$$\text{درصد بازدارندگی رادیکال DPPH} = \frac{\text{جذب نمونه کنترل} - \text{جذب عصاره}}{\text{جذب نمونه کنترل}} \times ۱۰۰$$

در این فرمول، غلظتی از عصاره که ۵۰ درصد رادیکال DPPH را مهار می‌کند به عنوان IC_{50} گزارش گردید.

- بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌ها

- تهیه سوسپانسیون میکروبی

باکتری‌های مورد بررسی در این تحقیق، پس از انجمادزدایی، به محیط نوترینت براث انتقال و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری (INC246 ،Memmert، Germany) شدند. سپس به‌منظور بررسی کلنی‌های خالص، بر روی محیط جامد تریپتیک سوی آگار (TSA) (Merck, Germany) کشت خطی شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. *آسپرژیلوس نیجر* نیز پس از انجمادزدایی، به محیط پوتیتو دکستروز براث (PDB) (Merck Germany) وارد گردید و به‌منظور بررسی کلنی‌های خالص، بر روی محیط جامد پوتیتو دکستروز آگار (PDA) (Merck Germany) کشت خطی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. از کلنی‌های خالص هر باکتری و قارچ در آب مقطر استریل، سوسپانسیونی با کدورت معادل استاندارد نیم مک‌فارلند آماده گردید. برای اطمینان از غلظت باکتری‌ها و قارچ، توسط دستگاه اسپکتوفتومتر UV-Vis، جذب آن‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر

قرائت شد. تراکم باکتری‌ها و قارچ با غلظت $۱/۵\times ۱۰^{۸}$cfu/ml، جذبی معادل ۰/۱-۰/۰۸ را نشان می‌دهد (Pawle *et al*., 2014).

- روش انتشار از چاهک در آگار

در این روش، غلظت‌های متوالی از عصاره‌ها تهیه و جهت غربالگری اولیه فعالیت ضد میکروبی به کار گرفته شدند. بررسی اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره گیاهان مورد نظر بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *آسپرژیلوس نیجر* با روش انتشار از چاهک در آگار انجام شد. به‌منظور دستیابی به کشت فعال و تازه، باکتری‌های مورد آزمایش ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش فعال گردیدند. برای این منظور۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی استاندارد مطابق با ۰/۵ مک‌فارلند بر محیط کشت مولر هینتون آگار برای باکتری‌ها و پوتیتو دکستروز آگار برای قارچ کشت چمنی داده شد. سپس با استفاده از انتهای گرد پی‌پت پاستور استریل بر روی هر پلیت، ۳ چاهک با فاصله مناسب از یکدیگر ایجاد گردید. در مرحله بعد ۵۰ میکرولیتر از عصاره با غلظت‌های ۳۳، ۶۷ و ۱۰۰ درصد که با فیلتر ۰/۴۵ میکرون استریل شده بود در هر چاهک تلقیح شد. از آنتی‌بیوتیک‌های سفکسیم (Padtanteb, Iran) و ضد قارچی نیستاتین (Padtanteb, Iran) به مقدار ۵۰ میکرولیتر به‌عنوان کنترل مثبت و از محلول دی متیل سولفوکسید (DMSO) به مقدار ۵۰ میکرولیتر به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. سپس محیط کشت باکتری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس و محیط کشت قارچ ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. فعالیت ضدباکتری توسط اندازه گیری قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) در برابر باکتری‌های تست شده، مورد بررسی قرار گرفت (Behbahani *et al*., 2017).

- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی برای باکتری‌ها (MBC) و قارچ (MFC)

در این تحقیق با استفاده از روش رقت لوله‌ای (ماکرودایلوشن)، حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌ها و حداقل غلظت کشندگی آن‌ها تعیین گردید. برای این منظور، ابتدا یک میلی‌لیتر عصاره خالص به اولین لوله که حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث بود اضافه گردید و پس از مخلوط کردن محتویات لوله با استفاده از شیکر لوله (Behdad Iran)، این کار تا لوله چهارم ادامه یافت تا به ترتیب غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره تهیه شود. در آزمون های تکمیلی جهت ارزیابی تاثیر عصاره‌ها بر فعالیت *استافیلوکوکوس اورئوس* غلظت‌های ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ و جهت ارزیابی تاثیر عصاره ها بر *آسپرژیلوس نایجر* غلظت‌های ۱۵۰، ۱۷۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره نیز فراهم گردید. به هر کدام از رقت‌ها ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی (معادل نیم مک فارلند) اضافه شد. یک لوله به‌عنوان کنترل مثبت و یک لوله به‌عنوان کنترل منفی درنظر گرفته شد. شاهد مثبت دارای محیط کشت حاوی باکتری یا قارچ، بدون عصاره و شاهد منفی دارای محیط کشت بدون باکتری یا قارچ بودند. سپس لوله های حاوی باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و لوله های حاوی قارچ ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند و بعد از

آن کدورت و عدم کدورت در لوله‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. وجود کدورت (در مقایسه با کنترل مثبت و منفی) حاکی از رشد باکتری و شفافیت، نشان دهنده عدم رشد باکتری می‌باشد. پایین ترین غلظتی که در آن هیچ‌گونه رشد باکتری مشاهده نشد (فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری) به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تعیین شد.

جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی، محتوی لوله‌های فاقد کدورت برای باکتری‌ها در محیط مولر هینتون آگار و برای قارچ در محیط پوتیتو دکستروز آگار کشت داده شدند و در داخل انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای باکتری‌ها و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس برای قارچ قرار گرفتند. حداقل غلظتی از عصاره‌ها که عدم رشد باکتری یا قارچ در محیط کشت را موجب گردید به عنوان حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها گزارش شد (Skocibusic *et al.*, 2004).

- طرح مطالعه و تجزیه وتحلیل آماری

متغیرهای وابسته در این پژوهش با سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند و تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل توسط آنالیز واریانس یکطرفه (طرح کاملا تصادفی) با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version 26) انجام گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون تعقیبی دانکن صورت گرفت. نمودارهای حاصل شده در محیط EXCELL ترسیم شدند.

یافته‌ها

- بررسی و مقایسه ترکیبات تشکیل دهنده عصاره دو گیاه

نوع و مقدار ترکیبات شناسایی شده در عصاره استخراج شده از گیاه لعل‌کوهستان در جدول شماره (۱) نشان داده شده است. از بین ترکیبات تشکیل دهنده عصاره گیاه لعل کوهستان، ۱۹ ترکیب، ۹۰/۲۲ درصد ترکیبات عصاره را شامل می‌شود. بیشترین ترکیبات موجود در عصاره شامل: تیمول (۲۴/۴۰ درصد)، کارواکرول (۲۳/۰۰ درصد)، لینولنیک‌اسید (۱۲/۹۷ درصد)، میریستیسین (۹/۷۸ درصد)، پالمیتیک اسید (۸/۲۱ درصد) می‌باشند.

جدول ۱. ترکیبات موجود در عصاره لعل کوهستان

شماره ترکیب	نوع ترکیب	درصد فراوانی	شاخص بازداری
۱	پارا-سیمین (P-Cymene)	۰/۸۲	۱۰۲۰
۲	گاما-ترپینن (Y-Terpinene)	۰/۸۳	۱۰۵۲
۳	Tبوتیل هیدروکینون (T-Buthylhydroquinonet)	۱/۳۴	۱۲۶۰
۴	تیمول (Thymol)	۲۴/۴	۱۲۸۰
۵	کارواکرول (Carvacrol)	۲۳	۱۲۸۸
۶	بیوسول (Biosol)	۰/۶۴	۱۲۹۶
۷	میریستیسین (Myristicin)	۹/۷۸	۱۵۰۷
۸	المیسین (Elemicin)	۰/۷۶	۱۵۲۹
۹	نئوفیتادی‌ان (Neophytadiene)	۰/۵	۱۸۳۳
۱۰	پالمیتیک اسید (Palmitic acid)	۸/۲۱	۱۹۵۵
۱۱	استئاریل الکل (Stearyl alcohol)	۰/۳۹	۲۰۶۸
۱۲	فیتول (Phytol)	۰/۳۹	۲۱۰۵
۱۳	لینولنیک اسید (Linolenic acid)	۱۲/۹۷	۲۱۲۲
۱۴	استئاریک اسید (Stearic acid)	۲/۲۵	۲۱۳۸
۱۵	میناسید (Minacide)	۰/۶۹	۲۳۲۰
۱۶	گلیسرول بتا-پالمیتات (Glycerol β-palmitate)	۰/۸۴	۲۴۹۱
۱۷	بیس(۲-اتیل هگزیل)فتالات (DEHP)	۰/۳۵	۲۵۲۶
۱۸	بتا-مونولینولین (β-Monolinolein)	۱/۰۱	۲۶۵۶
۱۹	گاما-سیتوسترول (γ-Sitostrol)	۱/۰۵	۳۳۳۰
	مجموع	۹۰/۲۲	

در عصاره گیاه هوفاریقون مطابق با جدول شماره (۲) ، ۲۰ ترکیب مختلف، ۹۴/۱۶ درصد از این عصاره تشکیل می‌دهد. این ترکیبات شامل هیپرسین (۲۵/۹۲درصد)، هایپرفورین (۱۶/۶۹درصد)، سیکلودکادین (۱۱/۳۸درصد)، سیکلوپروپ (۷/۰۴درصد) و فیتول (۶/۰۳درصد) هستند. مونوترپن‌ها (آلفا-پینن) و فلاونوئیدها به‌عنوان مهم-ترین اجزای این عصاره شناسایی می‌شوند.

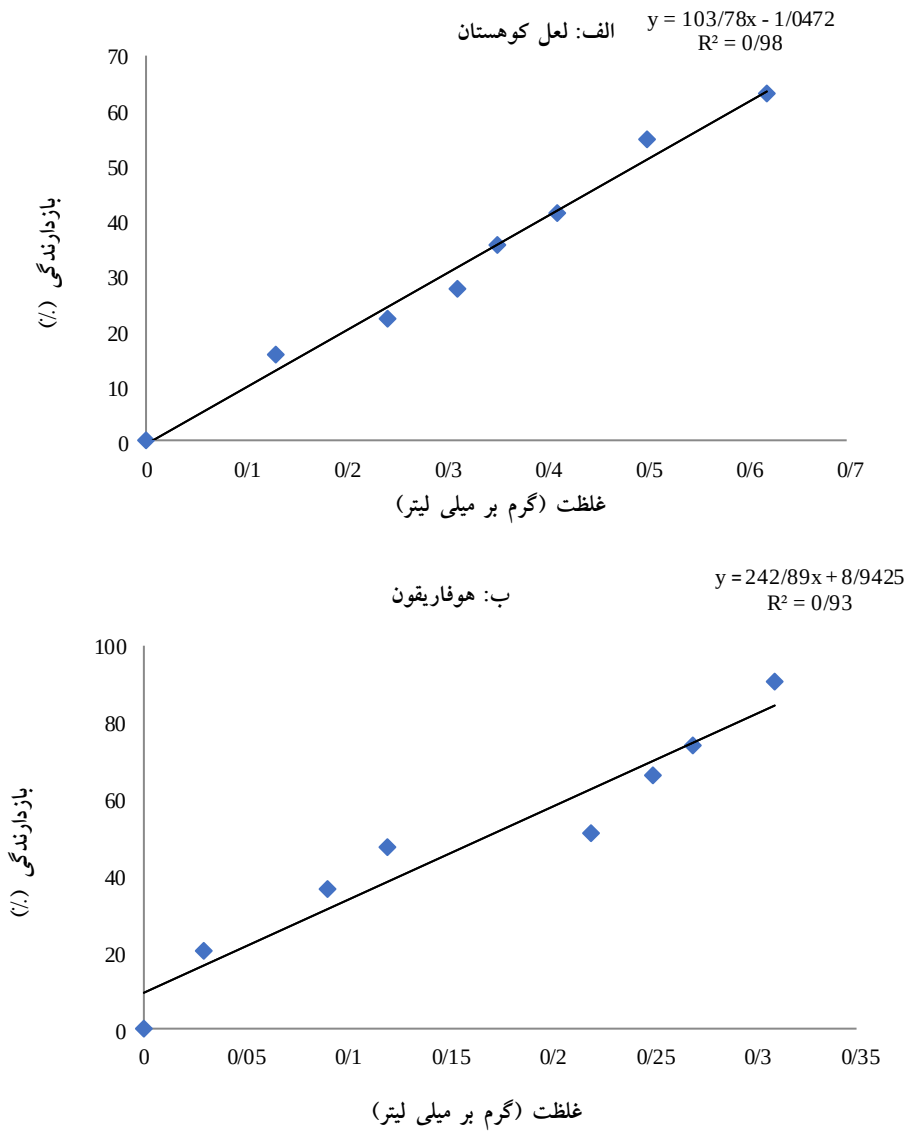
جدول ۲. ترکیبات موجود در عصاره هوفاریقون

شماره ترکیب	نوع ترکیب	درصد فراوانی	شاخص بازداری
۱	دی متیل-هپتان (Heptane,2,6-dimethyl)	۱/۰۲	۷/۷۷۴
۲	الفا-پینن (Alpha-pinene)	۰/۹۳	۱۰/۳۱۲
۳	اتیل-متیل هپتالان (3-Ethyl-5-methylheptalne)	۱/۶۵	۱۱/۶۱۱
۴	لیمونن (Limonene)	۱/۱۱	۱۳/۸۶۹
۵	دی متیل هپتان (3,4-Dimethylheptane)	۰/۹۲	۲۶/۶۸۸
۶	بتا-کاریوفیلن (Beta-caryophyllene)	۲/۶	۲۶/۷۶۱
۷	هایپرفورین (Hyperforin)	۱۶/۶۹	۲۷/۳۸
۸	سیس-بتا-فارنسن (Cis-beta-Farnesene)	۲/۵۴	۲۸/۱۹۶
۹	نفتالن (Naphtalene)	۲/۴	۲۸/۴۴۸
۱۰	هایپرسین (Hypericin)	۲۵/۹۲	۲۸/۵۰۷
۱۱	سیکلوپروپن (1H-cycloprope)	۷/۰۴	۲۸/۷۷۵
۱۲	الفا-فارنسن (Alpha-Farnesene)	۲/۳۶	۲۸/۳۳۶
۱۳	گاما-المن (Gamma-elemene)	۳/۳۶	۲۹/۳۳۸
۱۴	دلتا-کادینن (Delta-cadinene)	۱/۸۹	۳۱/۰۱
۱۵	بتا-کوپن الفا (Beta-copaen-4,alpha)	۱/۳۴	۳۱/۲۰۳
۱۶	الو اروم دندرن اپوکسید(allo-Aromadendrene epoxide)	۲/۷۱	۳۹/۴۷۴
۱۷	هگزادکانوئیک اسید (Hexadecanoic acid)	۲/۰۱	۴۲/۶۳۹
۱۸	فیتول (Phytol)	۶/۰۳	۴۲/۶۳۹
۱۹	سیکلودکادین (1,6-Cyclodecadiene)	۱۱/۳۸	۵۰
۲۰	اکتادکانوئیک اسید (9-Octadecenoic acid)	۶/۱۲	۴۲/۴۳۰
	مجموع	۹۴/۱۶	

- فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوی ترکیبات فنولیک

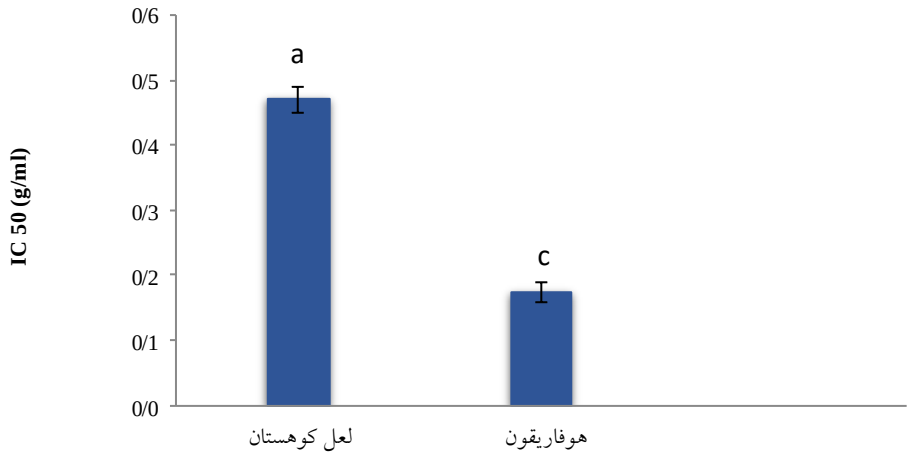
ارزیابی محتوی ترکیبات فنولیک عصاره دو گیاه لعل‌کوهستان و هوفاریقون نشان می‌دهد که ترکیبات فنولیک موجود در عصاره گیاه هوفاریقون در مقایسه با لعل‌کوهستان به طور معنی‌داری بیشتر است نمودار (۱). در نمودار (الف) و (ب) تاثیر غلظت‌های مختلف دو عصاره لعل‌کوهستان و هوفاریقون بر تخریب رادیکال‌های آزاد DPPH آورده شده است. IC_{50} عصاره‌ی هوفاریقون ۰/۱۷۳ گرم بر میلی‌لیتر و عصاره لعل کوهستان ۰/۴۷۰ ارزیابی شد که تفاوت آماری معنی‌داری میان آن‌ها مشاهده می‌شود نمودار (۲). هرچه مقدار IC_{50} کمتر باشد قدرت بازدارندگی رادیکال DPPH توسط آنتی‌اکسیدان بیشتر است.

نمودار ۱: مقایسه میانگین ± انحراف محتوی ترکیبات فنولیک عصاره‌های لعل‌کوهستان و هوفاریقون
a و b: تفاوت بین میانگین محتوای ترکیبات فنولیک دو گیاه معنی‌دار می باشد (p≤۰/۰۵).



نمودار ۲: تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها در تخریب رادیکال های آزاد DPPH

الف: لعل کوهستان، ب: هوفاریقون



نمودار ۳: مقایسه میانگین ± انحراف IC_{50} عصاره‌های لعل‌کوهستان و هوفاریقون
a و b: تفاوت بین میانگین IC_{50} عصاره‌های دو گیاه معنی‌دار می باشد (p≤۰/۰۵).

- فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها

قطر هاله عدم رشد باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس ا* و *آسپرژیلوس نایجر* در حضور غلظت‌های مختلف عصاره لعل کوهستان و هوفاریقون در جدول (۳) آورده شده است. نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که با افزایش غلظت عصاره‌ها تا ۱۰۰ درصد، عموما تاثیر آن‌ها بر کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌ها بیشتر می‌شود ولی این تاثیر برای همه میکروارگانیسم‌ها یکسان نیست. پایین‌ترین و بالاترین غلظت عصاره لعل کوهستان تفاوت معنی‌داری بر قطر هاله عدم رشد باکتری اشرشیا کلی دارند، ولی تاثیر افزایش غلظت این عصاره بر کاهش رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *آسپرژیلوس نایجر* معنی‌دار نیست. افزایش غلظت عصاره هوفاریقون نیز موجب افزایش قطر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* گردید ولی تاثیر معنی‌داری بر افزایش قطر هاله عدم رشد *اشرشیا کلی* نشان نداد. عصاره گیاه هوفاریقون بر کاهش فعالیت قارچ *آسپرژیلوس نایجر* اثر نداشت و هاله عدم رشد مشاهده نشد.

نتایج بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره این دو گیاه دارویی در جدول (۴) نشان داده شده است. هر دو عصاره هوفاریقون و لعل‌کوهستان در غلظت‌های پایین اثر بازدارندگی و کشندگی بر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان می‌دهند. عصاره لعل‌کوهستان در غلظت‌های پایین‌تر (۲۵ و ۱۲/۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و عصاره هوفاریقون در غلظت‌های بالاتر (۱۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به ترتیب اثر کشندگی و بازدارندگی بر فعالیت *اشرشیا کلی* دارند.

بنابراین عصاره لعل‌کوهستان بر این باکتری گرم منفی تاثیرپذیری بیشتری نسبت به هوفاریقون دارد. تاثیر عصاره لعل‌کوهستان بر قارچ *آسپرژیلوس نایجر* نسبت به هوفاریقون بسیار بیشتر بود. به‌نحوی که لعل‌کوهستان در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و هوفاریقون در غلظت‌های ۲۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب اثر کشندگی و بازدارندگی بر فعالیت این کپک نشان می‌دهند.

جدول ۳. مقایسه میانگین ± انحراف قطر هاله عدم رشد عصاره گیاهان لعل‌کوهستان و هوفاریقون (میلی‌متر)

میکروب	گیاه	غلظت عصاره (درصد) ۳۳/۳۳	۶۶/۶۷	۱۰۰	P value	*آنتی‌بیوتیک سفکسیم*
استافیلوکوکوس اورئوس	لعل‌کوهستان	۲۳/۰۰±۲/۶۵ ^{aA}	۲۳/۶۷±۱/۵۳ ^{aA}	۲۵/۶۷±۱/۵۳ ^{aA}	۰/۲۹۹	۳۲
	هوفاریقون	۱۵/۳۳±۰/۵۸ ^{cB}	۱۷/۶۷±۰/۵۸ ^{bB}	۲۰/۰۰±۰/۰۰ ^{aB}	۰/۰۰۰	
اشرشیا کلی	لعل‌کوهستان	۲۷/۰۰±۰/۰۰ ^{bA}	۲۸/۳۳±۰/۵۸ ^{bA}	۳۳/۰۰±۰/۰۰ ^{aA}	۰/۰۰۰	۳۰
	هوفاریقون	۲۴/۳۳±۰/۵۸ ^{aB}	۲۵/۶۷±۰/۵۸ ^{aC}	۲۵/۶۷±۱/۱۶ ^{aC}	۰/۱۴۸	
آسپرژیلوس نایجر	لعل‌کوهستان	۲۰/۶۷±۱/۱۶ ^{cA}	۲۵/۰۰±۰/۰۰ ^{bA}	۲۹/۰۰±۱/۰۰ ^{aA}	۰/۰۰۰	***آنتی‌بیوتیک نیستاتین***
	هوفاریقون	۰/۰۰±۰/۰۰ ^{B}	۰/۰۰±۰/۰۰ ^{B}	۰/۰۰±۰/۰۰ ^{B}	–	۲۴
	P vlue	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰		

a و b: در هر ردیف، میانگین‌هایی که دارای حروف کوچک متفاوت هستند، در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌دار دارند.

A و B: در هر ستون و برای هر میکروب، میانگین‌هایی که دارای حروف بزرگ متفاوت هستند، در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌دار دارند. میانگین ± انحراف معیار

جدول ۴. حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) لعل‌کوهستان و هوفاریقون

میکروارگانیسم های بیماری‌زا	لعل‌کوهستان	هوفاریقون
	حداقل غلظت بازدارندگی(mg/ml)	حداقل غلظت بازدارندگی(mg/ml)
استافیلوکوکوس اورئوس	۵/۰^{a}	۱/۲۵^{b}
اشرشیا کلی	۱۲/۵۰^{b}	۵۰/۰^{a}
آسپرژیلوس نایجر	۵۰/۰^{b}	۲۰۰/۰^{a}
	حداقل غلظت کشندگی(mg/ml)	**حداقل غلظت کشندگی(mg/ml)**
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۰/۰^{a}	۲/۵۰^{b}
اشرشیا کلی	۲۵/۰^{b}	۱۰۰/۰^{a}
آسپرژیلوس نایجر	۱۰۰/۰^{a}	۲۵۰/۰^{b}

a و b: در هر ردیف، میانگین‌هایی که دارای حروف کوچک متفاوت هستند، در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌دار دارند.

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان دادند که عصاره استخراج شده از گیاهان لعل‌کوهستان و هوفاریقون دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌میکروبی بالایی هستند. تیمول و کارواکرول از مهمترین ترکیبات شناسایی شده در عصاره لعل‌کوهستان هستند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌میکروبی بالایی دارند (Mahboobi *et al.*, 2008; Sajjadi *et al.*, 2002). میرستیسین موجود در این گیاه نیز دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی ویژه‌ای است (Pirbaluti *et al.*, 2017 ; Botelho *et al.*, 2007). تاکنون ۲۲ ترکیب در لعل-کوهستان شناسایی شده است که بیشترین آن‌ها شامل ترپینن، تیمول، کارواکرول و سایمن هستند (Vazirzadeh *et al.*, 2019). در پژوهشی دیگر، تیمول بالاترین مقدار را در میان ۱۲ ترکیب شناسایی شده در این گیاه به خود اختصاص داد (Alizadeh *et al.*, 2018). پژوهشگران دیگری نیز ۱۰ ترکیب فعال در اسانس لعل کوهستان گزارش کردند که ترکیبات اصلی با بیشترین فراوانی به ترتیب شامل γ ترپینن، میریستسین، تیمول، ρ سایمن و کارواکرول بودند (Hajimehdipour *et al.*, 2010). تفاوت در تعداد و کمیت ترکیبات شناسایی شده در این گیاه، به تفاوت‌های موجود در گونه‌های مختلف آن، شرایط کشت گیاه، شرایط نگهداری و روش استخراج ماده مؤثره از آن ها بستگی دارد (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2018) ترکیبات مشابه آنچه در این گیاه مشاهده گردید، در گیاهان دارویی دیگر گزارش شده است. در پژوهشی که جهت مقایسه خاصیت آنتی‌اکسیدانی دو گونه آویشن باغی انجام گرفت، مشاهده شد که گونه T. Broussonetti بدلیل کارواکرول و تیمول بیشتر نسبت به گونه T. Algeriensis از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری برخوردار هستند (Ouariachi *et al.*, 2014).

مهمترین ترکیبات شناسایی شده در عصاره هوفاریقون، هیپرسین و هایپرفورین می‌باشند که بسیاری از خواص این گیاه ازجمله فعالیت آنتی-اکسیدانی و جلوگیری از تجزیه هیدروپروکسیدازها به رادیکال‌های آزاد و خاصیت ضد افسردگی را به‌وجود آن‌ها نسبت می‌دهند (Schwob *et al.*, 2014; Sirvent *et al.*, 2002; Rohman *et al.*, 2010). در پژوهش دیگری نیز هیپریسین به‌عنوان یک ترکیب کینونی، مهم‌ترین ماده موثره هوفاریقون معرفی شد که در نقطه‌های سیاه رنگی که روی اندام‌های مختلف گیاه تشکیل می‌شوند وجود دارد (Walker *et al.*, 2001).

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که عصاره گیاه هوفاریقون محتوی ترکیبات فنولیک و خاصیت آنتی-اکسیدانی بیشتری نسبت به لعل‌کوهستان دارند. ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌ها قادر به انتقال هیدورژن به رادیکال‌های آزاد بوده و در نتیجه به‌عنوان آنتی‌اکسیدان مطرح می‌شوند و می‌توانند نقش مهمی در کنترل واکنش‌های اکسیداتیو در بدن انسان ایفا کنند. هرچه میزان این ترکیبات بیشتر باشد، عموما خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها افزایش می‌یابد (Tohidi *et al.*, 2017). در مطالعه دیگری نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی گیاه هوفاریقون با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بالاتر از آنتی‌اکسیدان سنتزی بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA) گزارش شد

(Guzel *et al*., 2019). عصاره هوفاریقون دارای ترکیبات فنلی زیادی از جمله فلاونوئیدها و اسیدهای فنلی است که این ترکیبات تاثیر زیادی در خاصیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره دارند (Zou *et al*., 2004; Silva *et al*., 2005). فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه لعل کوهستان بیشتر به دو ترکیب تیمول و کارواکرول موجود در آن وابسته است که با توجه به ساختار شیمیایی خود، قادر به انتقال هیدورژن به رادیکال های آزاد بوده و درنتیجه به‌عنوان آنتی‌اکسیدان مطرح می‌شوند (Ghasemi *et al*., 2017; Abou Baker *et al*., 2020).

مطابق با نتایج بدست آمده در این تحقیق، عصاره لعل‌کوهستان و هوفاریقون اثرات بازدارندگی قابل توجهی بر فعالیت میکروارگانیسم‌ها دارند. مکانیسم عمده و اصلی فعالیت ضدمیکروبی این عصاره‌های گیاهی شامل تخریب دیواره سلولی و آسیب به غشای سیتوپلاسمی و پروتئین‌های غشایی، کوآگولاسیون سیتوپلاسم و نشت محتوی درون سلولی و درنتیجه مرگ سلول باکتری توسط ترکیبات فنولی است (Salmanian *et al*., 2013). عصاره‌های اتانولی گیاه لعل کوهستان و هوفاریقون خاصیت ضدمیکروبی زیادی بر فعالیت باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و گرم منفی *اشرشیا کلی* نشان دادند. مقایسه میان دو عصاره نشان می‌دهد که لعل‌کوهستان بازدارندگی بیشتری در مقایسه با هوفاریقون برای فعالیت میکروارگانیسم‌های مورد ارزیابی دارد. وجود مقادیر نسبتا بالای تیمول و کارواکرول موجود در گیاه لعل کوهستان می‌تواند دلیل این مشاهده باشد (Botelho *et al*., 2007).

پژوهشگران دیگری نیز اثر قارچ‌کشی بالای عصاره اندام هوایی لعل‌کوهستان را به درصد بالای تیمول موجود در آن نسبت می‌دهد (Zambonelli *et al*., 2004). وجود مقادیر بالای ترکیبات فنولیک نیز در افزایش خواص ضدمیکروبی عصاره گیاهان دارویی مؤثر است (Burt *et al*., 2004). بررسی تاثیر لعل‌کوهستان بر فعالیت دیگر میکروارگانیسم‌ها نیز نشان داد که این گیاه فعالیت ضدمیکروبی و ضد قارچی خوبی در برابر میکروارگانیسم‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *اشرشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* از خود نشان می‌دهد. با افزایش غلظت عصاره از ۸ تا ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، فعالیت بازداری عصاره افزایش می‌یابد، به‌نحوی که غلظت-های بالاتر این عصاره در مقایسه با جنتامایسین و نالیدیکسیک اسید اثر مهارکنندگی بیشتری نشان دادند (Hojjati *et al*., 2019). فعالیت ضدمیکروبی بالای اسانس لعل کوهستان بر باکتری *کاندیدا آلبیکانس* و عدم تأثیرپذیری آن بر *سودوموناس آئروجینوزا* نیز گزارش شده است (Hajimehdipour *et al*., 2019). بررسی منابع نشان می‌دهد که گیاه هوفاریقون اثر ضدباکتریایی قابل توجهی بر برخی باکتری‌های گرم مثبت و منفی دارد. حداقل غلظت کشندگی ماده مؤثره این گیاه برای هر باکتری متفاوت و بستگی به نوع باکتری مورد بررسی دارد. هیپرسین و هایپرفورین مهم‌ترین مواد موثره دارای خاصیت ضدمیکروبی و ضد ویروسی عصاره گیاه هوفاریقون معرفی می‌شوند و کاهش خاصیت ضدمیکروبی ماده استخراج شده از این گیاه بالاخص با کاهش میزان هیپریسین در

نمونه‌های مورد بررسی مرتبط است (Cirak *et al*., 2007; García *et al*., 2015).

نتایج این پژوهش نشان داد که در عصاره دو گیاه هوفاریقون و لعل کوهستان ترکیبات مؤثره و مفید متعددی شناسایی می‌شود. با مقایسه عصاره استخراج شده از این دو گیاه مشخص شد که هوفاریقون دارای محتوی ترکیبات فنولیک و خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری است. با بررسی خواص آنتی‌میکروبی نمونه‌ها مشخص شد که عصاره لعل کوهستان به‌خوبی قادر به بازدارندگی فعالیت *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی* و *آسپرژیلوس نایجر* است، درحالی که عصاره هوفاریقون تنها موجب محدود کردن فعالیت *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی* می‌گردید و هیچ گونه تاثیری بر قارچ *آسپرژیلوس نایجر* نداشت. با توجه به ویژگی‌های کیفی و آنتی‌میکروبی عصاره گیاهان مورد مطالعه در این پژوهش، امکان استفاده از آنها در صنعت غذا به‌عنوان نگهدارنده یا آنتی‌اکسیدان وجود دارد. البته کمیت و کیفیت مصرف آنها، بسته به نوع محصول، خصوصیات کیفی ویژگی‌های فرایند تولید و نگهداری آن متفاوت است و در هر مورد نیازمند پژوهش‌های تکمیلی است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچگونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Abou Baker, D.H., Moghazy, M. and ElSayed, A.A.A. (2020). The in vitro cytotoxicity, antioxidant and antibacterial potential of Satureja hortensis L. essential oil cultivated in Egypt. Bioorganic Chemistry, DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103559.
- Adel, F,. Ahmeda, B., Fatma, A.K. Attiac, D., Liua, C., Changqin Li, A, C. *et al*., (2019). Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (Ocimum basilicum L.) plants. Food Science and Human Wellness, 8(3): 299-305.
- Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Vasiee, A. and Mortazavi, S.A. (2018). Oliveria decumbens essential oil: chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. Microbial Pathogenesis, 114: 449-452. [In Persian]
- Alizadeh, Z., Mehdizadeh, T. and Tajik. H. (2019). Comparison of antimicrobial and antioxidant properties of Mentha aquatica ethanolic extract and essential oil. Studies in Medical Sciences, 31(11): 863-873. [In Persian]
- Baum, M., Schantz, M., Leick, S., Berg, S., Betz, M., Frank, K., *et al*., (2014). Is the antioxidative effectiveness of a bilberry extract influenced by encapsulation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 94: 2301-2307.
- Behbahani, B.A., Shahidi, F., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A. and Mohebbi, M. (2017). Use of Plantago major seed mucilage as a novel edible coating incorporated with Anethum graveolens essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. International Journal of Biological Macromolecules, 94: 515-526. [In Persian]

- Botelho, M.A., Nogueira, N.A.P., Bastos, G.M., Fonseca, S.G.C., Lemos, T.L.G., Matos, F.J.A. *et al*., (2007). Antimicrobial activity of the essential oil from Lippia sidoides, Carvacrol and thymol against oral pathogens. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 40: 349-356.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiology, 94(3): 223-253.
- Cirak, C., Radusiene, J., Karabuk, B. and Vand Ivanauskas, L. (2007). Variation of bioactive compounds in Hypericum perforatum growing in Turkey during its phenological cycle. Journal of Integrative Plant Biology, 49: 615-20.
- Eftekhari, M., Ardekani Sham, M.R., Amin, M., Attar, F., Akbarzadeh, T., Safavi, M., *et al*. (2019). Oliveria decumbens, a bioactive essential oil: Chemical composition and biological activities. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 18(1): 412-21. [In Persian]
- Garcia, I., Ballesta, S., Gilaberte, Y., Rezusta, A. and Pascual, Á. (2015). Antimicrobial photodynamic activity of hypericin against methicillin-susceptible and resistant Staphylococcus aureus biofilms. Future Microbiol, 10(3): 347-56.
- Germ, M., Stibilj, V., Kreft, S., Gaberscik, A. and Kreft, I. (2010). Flavonoid, tannin and hypericin concentrations in the leaves of St. John's wort (Hypericum perforatum L.) are affected by UV-B radiation levels. Food Chemistry, 122: 471-474.
- Ghasemi, S., Jafari, S.M., Assad pour, E. and Khomeiri, M. (2017). Production of pectin-whey protein nano-complexes as carriers of orange peel oil. Carbohydrate Polymers, 177: 369-377. [In Persian]
- Giacometti, J., Zauhar, G. and Zuvic, M. (2018). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Major Phenolic Compounds from Olive Leaves (Olea europaea L.) Using Response Surface Methodology. Foods, 7(9): 149.
- Guzel, A., Akyuz, M. and Sanda. (2019). Determination of Antioxidant activity of Hypericum perforatum. Journal of Integrative and Anatolian Medicine, 1(1): 9-18.
- Haji mehdi pour, M.H., Samadi, N., Mozafarian, V., Rahimi fard, N., Shoeybi, S. and Pirali, H.M. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of Oliveria decumbens volatile oil from West of Iran. Journal of Medicinal Plants, 9(6): 39-44. [In Persian]
- Haji mahdi pour, H., Hamedani, P., Abedi, Z., Shekrachi, M. and Khanavi. (2019). Investigation of the Best Method for Extraction of Phenolic Compounds from Echinaceae purpurea L. Journal of Medicinal Plants, 8(32): 145-152. [In Persian]
- Hojjati, M. (2019). Chemical compositions and antimicrobial effects of Oliveria decumbens Vent essential oil. Journal of Medicinal Plants, 9: 39-44 [In Persian]
- Karim pour, K., Mehrgan, A., Fallah, F. and Asayishtalab, H. (2021). Preparation of natural preservative from Clove, Eucalyptus and Rosemary extracts as the substitute of nitrite in chicken sausage. Iranian Journal of Food Science and Technology, 18(119): 217-229. [In Persian]
- Kaur, G., Kathariya, R., Bansal, Sh. and Singh, A. (2016). Dietary antioxidants and their indispensable role in periodontal health. Food and Drug Analysis, 24(2): 239-246.
- Keskes, H., Belhadj, S., Jlail, L., El Feki, A., Damak, M., Sayadi, S. *et al*. (2017). LC-MS–MS and GC-MS analyses of biologically active extracts and fractions from Tunisian Juniperus phoenice leaves. Pharmaceutical Biology, 55(1): 88-95.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. and Chandra, N. (2010). Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health. Pharmacognosy Reviews, 4(8): 118-26.
- Mahboobi, M. (2008). study of the antimicrobial properties and chemical composition of the essential oil of LalKohistan (Oliveria decumbens Vent). Scientific Quarterly-Iran Aromatic and Medicinal Plants Research, 24(1): 56-65. [In Persian]
- Mahlouji, M., Ahmadi, A., Dastgerdi. and Sharafati, R. (2019). An Investigation of the Antibacterial Effect of Sumac Extract in Minced beef Contaminated with Multidrug Resistance E. coli. Scientific-Research Quarterly of Lorestan University of Medical Sciences, 22(1): 69-83. [In Persian]

- Milosevic, T. and Solujic,T. (2006). Antimicrobial activity of the Hypercum perforatum l. plant. Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia, 25(2): 127-130.
- Ouariachi, E.M.E., Hamdani, I., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Majidi, L., Costa, J. *et al*., (2014). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of Thymus broussonetii Boiss. and Thymus algeriensis Boiss. from Morocco. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 4(4): 281-286.
- Parsaei, P., Karimi, M., Asadi, S.Y. and Rafieian Kopaei, M. (2013). Bioactive components and preventive effect of green tea (Camellia sinensis) extract on post-laparotomy intra-abdominal adhesion in rats. International Journal of Surgery, 11: 811-815. [In Persian]
- Pawle, G. and Singh, S. (2014). Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical analysis of an endophytic species of Nigrospora isolated from living fossil Ginkgo biloba. Current Research in Environmental & Applied Mycology, 4(1): 1-9.
- Rohman, A., Riyanto, S., Yuniarti, N., Saputra, W.R., Utami, R. and Mulatsih, W. (2010). Antioxidant activity,total phenolic, and total flavaonoid of extracts andfractions of red fruit (Pandanus conoideus Lam). International Food Research Journal, 17: 97-106.
- Sajjadi, S.E. and Hoseini, S.A. (2002). Essential oil constituents of Oliveria decumbens Vent. Journal of Essential Oil Research, 14(3): 220-221. [In Persian]
- Salmanian, S.H., Sadeghi Mahoonak, A.R., Alami, M. and Ghorbani, M. (2013). Evaluation of total phenolic, flavonoid, anthocyanin compounds, antibacterial and antioxidant activity of hawthorn (Crataegus elbursensis) fruit acetonic extract. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 13(1): 53-66. [In Persian]
- Schwob, I., Bessiere, J.M., Masotti, V.R. and Viano, J. (2004). Changes in essential oil composition in SaintJohn'swort (Hypericum perforatum L.)aerialparts during its phenological cycle. Biochemical Systematics and Ecology, 32: 735-745.
- Shahidi, F., Tabatabaei Yazdi, F., Roshanak, S., Alizadeh Behbahani, B., Vasiee, A. and Norouz N. (2019). Antimicrobial activity of Taraxacum pseudo calocephalum leaves extract on pathogenic microorganisms and comparison with common therapeutic antibiotics in vitro. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine, 23(83): 37-46. [In Persian]
- Siddeeg, A., AlKehayez, N.M., AbuHiamed, H.A., Al-Sanea, E.A. and ALFarga, A.M. (2021). Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. Saudi Journal of Biological Sciences, 28(3): 1633-1644.
- Silva, B.A., Ferreres, F., Malva, J.O., Dias, A.C.P. (2005). Phytochemical and antioxidant characterization of Hypericum perforatum alcoholic extracts. Food Chemistry, 90: 157- 67.
- Singh, P., Garg, A., Pandit, S., Mokkapati, V.R.S.S. and Mijakovic, D. (2018). Antimicrobial effects of biogenic Nanoparticles. nanomaterials, 8(12): 1009.
- Sirvent, T.M., Walker, L., Vance, N. and Gibson, D.M. (2002). Variation in hypericins from wild populations of Hypericum perforatum L. In the Pacific Northwest of the U.S.A. Economic Botany, 56: 41- 48.
- Skocibusic, M., Bezic, N., Dunkic, V. and Radonic, A. (2004). Antibacterial activity of Achillea clavennae essential oil against respiratory tract pathogens. Fitoterapia, 75(7): 733-736.
- Suntar, I., Oyardı, O., Kupeli, E., Akkol and Ozçelik, B. (2015). Antimicrobial effect of the extracts from Hypericum perforatum against oral bacteria and biofilm formation. Pharmaceutical Biology, 54(6): 65-70.
- Tohidi, B., Rahim Malek, M. and Arzani, A. (2017). Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of Thymus species collected from different regions of Iran. Food Chemistry, 220: 153-161. [In Persian]
- Vazirzadeh, A., Jalali, S. and Farhadi, A. (2019). Antibacterial activity of Oliveria decumbens against Streptococcus iniae in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) and its effects on serum and mucosal immunity and antioxidant status. Fish and Shellfish Immunology, 94: 407-416. [In Persian]

- Walker, L., Sirvent, T., Gibson, D. and Vance, N. (2001). Regional differences in hypericin and pseudohypericin concentrations and five morphological traits among Hypericum perforatum plants in the northwestern United States. Canadian Journal of Botany, 79: 1248-1255.
- Zambonelli, A., D'Aulerio, A.Z., Severi, A., Benvenuti, S., Maggi, L. and Bianchi, A. (2004). Chemical composition and Fungicidal activity of commercial essential oils of Thymus vulgaris L. Journal of Essential Oil Research, 16(1): 69-74.
- Zobayed, SMA., Afreen, F. and Kozai, T. (2005). Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John'swort. Plant Physiol Biochem, 43: 977-984.
- Zou, Y., Lu. Y. and Wei, D. (2004). Antioxidant Activity of a Flavonoid-Rich Extract of Hypericum perforatum L.in Vitro. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 5032-5039.