ارزیابی ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی گیاه دارویی *Hypericum perforatum* L. جمع‌آوری شده از دو رویشگاه در شمال کشور

هادی کوهساری[*1]، حمیده خرمالی[2]، عایشه خرمالی[3]

[1]استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

[2]دانش آموخته کارشناسی‌ارشد علوم وصنایع غذایی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

[3]باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۱۰

چکیده

این تحقیق به منظور ارزیابی فیتوشیمیایی و فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی گیاه دارویی گل راعی جمع‌آوری شده از دو رویشگاه استان مازندران واقع در شمال کشور انجام شد. سرشاخه‌های گلدار این گیاه از رویشگاه‌ها فرح‌آباد ساری و پاشاکلا آمل طی ماه‌های تیر تا مهرماه ۱۳۹۴ جمع‌آوری و پس از استخراج عصاره اتانولی، محتوای کل فنلی و فلاونوئیدی عصاره اتانولی این گیاه با روش رنگ سنجی و به‌ترتیب با استفاده از معرف فولین سیوکالتو و کلرید آلومینیوم تعیین شد. برای سنجش پتانسیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی از واکنش با رادیکال DPPH استفاده شد. ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی با روش چاهک و کمترین غلظت مهارکنندگی و باکتری کشی عصاره گیاه مذکور با روش میکرودایلوشن تعیین شد. نتایج نشان داد که محتوای کل فنلی و فلاونوئیدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه جمع‌آوری شده از رویشگاه فرح آباد ساری نسبت به پاشاکلا آمل بیشتر بود. کمترین غلظت مهار کنندگی عصاره گیاه گل راعی جمع‌آوری شده از رویشگاه فرح آباد ساری علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *شیگلا دیسانتری* و *اشریشیا کلی* به‌ترتیب ۱۲، ۱۲، ۱۹۰ و ۳۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد در حالی که این مقادیر برای گیاه جمع‌آوری شده از رویشگاه آمل به‌ترتیب ۲۴، ۲۴، ۷۸۰ و ۱۵۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. این نتایج در روش چاهک نیز تایید شد. با توجه به محتوای بالای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاه جمع‌آوری شده از منطقه فرح آباد، فعالیت ضدباکتریایی بیشتر این گیاه را می‌توان به وجود این ترکیبات نسبت داد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، آنتی‌باکتریال، فنل و فلاونوئید کل، گل راعی (*Hypericum perforatum* L.)، مازندران.

[*]نویسنده مسئول: hadikoohsari@yahoo.com

مقدمه

اوایل قرن بیستم پیشرفت علم شیمی وکشف سیستمهای پیچیده سنتز آلی منجر به توسعه صنعت داروسازی و جای گزینی داروهای صناعی به جای داروهای گیاهی شد. اما همزمان با پیشرفت در تولید داروهای شیمیایی جدید و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، به‌تدریج اثرات مضر این داروها ظاهر شدند و از دهه ۱۹۵۰ باکتری‌های بیماری زای متعددی به آنتی بیوتیک‌ها مقاومت نشان دادند که این مقاومت همچنان در حال گسترش است و به یکی از دغدغه‌های اساسی درعلوم زیستی و پزشکی تبدیل شده است تا جایی که میزان مقاوت برخی از این میکروارگانیسم‌ها به داروهای شیمیایی بیش از ۹۰ درصد است (Khosravi and Malecan, 2004). از سوی دیگر، طی سالیان متمادی داروهای طبیعی به خصوص گیاهان دارویی، اساس و حتی در برخی موارد تنها وسیله درمان محسوب می شدند و در عین حال مواد اولیه آنها در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می گرفت (Fabrican and Farnsworth,2001; Weckesser et al., 2007). لذا بهره‌گیری از داروهای گیاهی به عنوان جایگزین داروهای شیمیایی و آنتی بیوتیک‌ها، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود معطوف کرده است.

اگرچه تاکنون تعداد زیادی از گیاهان عالی به‌منظور یافتن مواد ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفته‌اند، اما هیچ یک از ترکیبات ضدمیکروبی حاصل از آنها قادر به رقابت با آنتی بیوتیک‌های رایج نبوده و جستجو جهت یافتن عوامل گیاهی ضدمیکروبی همچنان ادامه دارد. استفاده از گیاهان دارویی خودرو در رویشگاه‌های طبیعی که علاوه بر سازگاری اکولوژیکی قادرند با سنتز مواد موثره ثانوی و فعال تحت استرس‌های محیطی در بحث پیشگیری و درمان بیماری‌ها موثر واقع شوند، در سال‌های اخیر جایگاه ویژه‌ای در علم پزشکی یافته است. علاوه بر این گیاهان منبع آنتی اکسیدان‌های طبیعی می‌باشند و به واسطه آن می‌توانند سلول‌ها را از استرس‌های اکسیداتیو محافظت نمایند. امروزه تحقیقات وسیعی بر روی عصاره‌های گیاهی صورت می گیرد تا اینکه به فراورده‌های طبیعی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا دست یابند.

گل راعی با نام علمی *Hypericum perforatum* L. گیاه چند ساله، بی کرک و یکی از مهم‌ترین و ارزشمندترین گیاه دارویی در جهان بوده و کاربرد گسترده‌ای در درمان بسیاری از بیماری‌ها به خصوص افسردگی دارد. این گیاه دارای اثرات فارماکولوژیکی متعددی از جمله اثرات ضد درد، ضدافسردگی و ضدالتهاب، ضدتومور، ضدفراموشی، ضد اضطراب، ضد زخم معده و ضداکسیدانت است و در طب سنتی مصارف زیادی داشته است و بر این اساس نیز مطالعات زیادی روی آن انجام شده است (Mukherjee et al., 2000; Trovato et al., 2001; Wang et al., 2011; Bayramoglu et al., 2014; Cai et al., 2004; Glisic et al., 2006).

ترکیبات مختلفی از گل راعی گزارش شده که فعالیت‌های بیولوژیکی خاصی را به آن نسبت می‌دهند مانند هایپریسین، سودوهایپریسین، فلاونوییدهای مختلف مانند کوئرستین، هایپرین، فلورگلوسینول و اسانس که اثرات مختلف ضدافسردگی، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدان و فعالیت ضدالتهابی از آنها گزارش شده است (Mukherjee et al., 2000). استان مازندران در شمال ایران، با تنوع اقلیمی و جغرافیایی خاص، بستری مناسب برای رشد انواع گونه‌های دارویی بومی و خودرو از جمله گیاه گل راعی *Hypericum perforatum* L. فراهم آورده است که اغلب به‌صورت خودرو در مزارع و سواحل شور پایین دست استان مازندران رویش دارد و در فرهنگ سنتی مردم از این گیاه کاربرد گسترده‌ای در درمان برای میگرن و

سردردهای عصبی به صورت دم کرده دارد، اما برنامه ریزی صحیح در جهت کشت و شناخت ترکیبات موثره و یا امکان فراوری ترکیبات دارویی انجام نشده است. لذا با توجه به شیوع بیماری‌های سرطانی، ویروسی و باکتریایی استان پیداست که گیاهان زیادی از جمله گل راعی که در این رابطه دارای سابقه دیرینه در درمان بیماری شایع دارند بسیار مورد توجه پژوهشگران سازمان جهانی بهداشت قرار می‌گیرند (WHO, 2003; Mahboubi et al., 2012). این موارد ما را بر آن داشت که به ارزیابی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی گیاه گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) جمع‌آوری شده از رویشگاه فرح آباد ساری و پاشاکلا آمل بپردازیم.

مواد و روش‌ها

معرفی منطقه مورد مطالعه: دو رویشگاه طبیعی گل راعی در منطقه ساحل فرح آباد ساری و آمل واقع در استان مازندران در شمال کشور تعیین گردید. با انجام عملیات صحرایی و تطبیق آن رویشگاه‌ها با نقشه‌های مقدماتی، آغاز گردید. پاشاکلا نام دهستانی است در ۳۰ کیلومتری جنوب شرقی آمل و در شرق جاده هراز که در منطقه میابندی و جنگلی است ارتفاع منطقه حدود ۱۱۳۴٫۴ متر از سطح دریا و فاصله آن از مرکز شهر ۴۰ کیلومتر می‌باشد. فرح آباد در ۲۸ کیلومتری شمال شهر ساری و در ۲ کیلومتری جنوب دریای مازندران واقع شده است و ارتفاع هم سطح دریا می‌باشد.

نمونه‌برداری: سرشاخه‌های گلدار گیاه گل راعی طی ماه‌های تیر تا مهرماه ۱۳۹۴ از دو رویشگاه فرح آباد ساری و پاشاکلا آمل جمع‌آوری شده و پس از تایید بوسیله مرکز هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، خشک شده و عملیات عصاره گیری در آزمایشگاه انجام شد. همزمان با برداشت گیاه، نمونه‌برداری خاک رویشگاه برای انجام آزمایشات بافت خاک، اسیدیته، هدایت الکتریکی، مواد آلی و کربنات کلسیم و رطوبت اشباع نمونه‌های خاک انجام شد.

عصاره‌گیری

استخراج عصاره به روش خیساندن: عصاره سرشاخه‌های گیاه گل راعی با استفاده از حلال اتانول (۸۰ درصد) و با روش خیساندن استخراج شد. به این منظور سرشاخه‌های خشک شده، با آسیاب برقی به خوبی پودر و از الک شماره ۱۸ گذرانده شدند. نمونه‌های الک شده توزین شده و مقدار یک گرم از هر نمونه به ارلن ۵۰ میلی‌لیتری انتقال یافته و با ۱۰ سی‌سی حلال اتانول ۸۰ درصد مخلوط شد. پس از ۲۴ ساعت روی شیکر، عصاره حاوی نمونه با استفاده از کاغذ صافی صاف شد. سپس جداسازی حلال (اتانول) از عصاره، در روتاری تحت خلاء چرخان در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد (Mozdastan et al., 2015). این عصاره تغلیظ شده به عنوان خالص (۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در نظر گرفته می‌شود و تا انجام آزمایشات در یخچال نگهداری می‌شود.

آنالیز آماری: آزمایشات در سه تکرار انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری شدند. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون LSD انجام شد.

اندازه‌گیری میزان فنل کل: میزان فنل با استفاده از روش فولین سیکالتیو اندازه‌گیری شد. ابتدا ۲۰ میکرولیتر از عصاره برداشته شد و با ۱/۱۶ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر فولین سیوکالتیو اضافه شد و بعد از ۸-۱ دقیقه استراحت، ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم یک مولار (۱۰/۶ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به محلول افزوده شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در

حمام بخار ۴۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفت. در شاهد اتانول خالص جایگزین عصاره اتانولی گردید. سپس در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. برای رسم منحنی کالیبراسیون از غلظت‌های متفاوت گالیک اسید (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۵۰ میلی گرم بر لیتر) استفاده گردید. در معادله خطی حاصل به جای Y، عدد قرائت شده در مقابل بلانک را قرار داده شد و به این ترتیب X به‌دست آمد. این مقدار برای یک گرم در لیتر محاسبه شد و فنل کل بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در یک گرم برگ خشک بدست آمد (McDonald et al. 2001).

اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل: از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم برای تعیین مقدار فلاونوئیدها استفاده شد. هر کدام از عصاره‌های اتانولی گیاهی (۰/۵ ml از ۱:۱۰ g. ml^{-1}) به‌صورت جداگانه با ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم (۱۰ درصد اتانولی)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم (۱M) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شدند. سپس محلول‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. جذب هر ترکیب واکنشی در ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتراندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با محلول‌های کوئرستین (Quercetin, Sigma Chemical Co.) متانولی در غلظت‌های µg. ml^{-1} ۱۰۰۰-۲۵۰ تهیه شد و منحنی با نرم افزار Excel رسم گردید، سپس معادله خط y=bx+a بدست آمد. جذب‌های خوانده شده از نمونه‌ها به جای y قرار داده شد و x یا همان غلظت بدست آمد (Chang et al., 2002).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH: برای این منظور از رادیکال آزاد DPPH (2,2- Diphenyl- Picryl- Hydrazyl) استفاده شد. ابتدا عصاره‌های گیاهی در غلظت‌های متفاوت 5×10^{-2} mg/100 الی 5×10^{-6} در متانل خالص تهیه شد. سپس مخلوطی به نسبت ۱:۱ از محلول DPPH (8 mg/100) و عصاره‌های گیاهی با غلظت‌های متفاوت تهیه شد. جذب نمونه‌ها بعد از ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌ها با استفاده از رابطه زیر به‌دست آمد.

$R\% = AD - AS/AD \times 100$

R%= درصد مهار

AD: جذب DPPH در ۵۱۷ نانومتر

AS: جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر

برای مقایسه فعالیت عصاره‌ها از پارامتر IC_{50} استفاده شد. IC_{50} غلظتی از عصاره است که ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد را مهار می کند (Sun et al., 2007).

سویه‌های باکتریایی: سویه‌های باکتری‌های مورد آزمون شامل دو گونه باکتری گرم منفی یعنی *اشریشیا کولی* (PTCC 1338)، *شیگلا دیسانتری* (PTCC 1188) و دوگونه باکتری گرم مثبت شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112) و *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1154) به‌صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند و در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر در محیط BHI (عصاره قلب و مغز) و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد احیاء شدند. آزمون‌های میکروبی بر اساس انتشار در آگار و به روش چاهک انجام شد. همچنین کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کمترین غلظت باکتری کشی (MBC) هر یک از نمونه‌های عسل به روش ماکرو دایلوشن مورد آزمون قرار گرفت.

روش چاهک: برای تعیین حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به عصاره الکلی گیاهان مورد نظر بر اساس انتشار در آگار و با روش چاهک صورت پذیرفت.

بدین ترتیب که ابتدا از تمام سویه‌های باکتریایی سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند $1/5\times10^{8}$ CFU/ml تهیه شد و سپس با استفاده از سواپ استریل بر سطح محیط مولرهینتون آگار کشت یکنواخت انجام شد. با استفاده از پیپت پاستور چاهک‌هایی به قطر ۷ میلی‌متر از سطح محیط کشت حفر شد و از رقت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاه مورد نظر به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در داخل چاهک‌ها ریخته شد. پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خانه‌گذاری شد و سپس با اندازه‌گیری قطرهاله عدم رشد دراطراف چاهک‌های حاوی عصاره به‌وسیله خط کش میلی‌متری نتایج مورد بررسی قرار گرفت (Androw, 2001). قطر هاله عدم رشد کمتر از به‌عنوان مقاوم، ۹-۷ میلی‌متر نسبتاً مقاوم، ۱۲-۱۰ میلی‌متر نسبتاً حساس و بیشتر از ۱۲ میلی‌متر به‌عنوان حساس در نظر گرفته شد (Nostro et al., 2000).

تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کمترین غلظت باکتری کشی (MBC): تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی هر یک از نمونه‌ها در میکروپلیت ۹۶ چاهکی استریل و با روش براث میکرودایلوشن انجام شد. به این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف نمونه‌های عصاره (محلول ذخیره در حلال DMSO تهیه شد) در مجاورت سوسپانسیون میکروبی معادل 5×10^{5}CFU/ml از هریک از باکتری‌های پاتوژن مورد آزمون به‌مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در کنار این لوله‌ها لوله کنترل مثبت (سوسپانسیون باکتری معادل 5×10^{5}CFU/ml) و لوله کنترل منفی (مولر هینتون براث بدون باکتری) نیز قرار داده شد. پس از این مدت نتایج به صورت کدورت میکروبی قابل مشاهده و ثبت گردید.

آخرین رقتی که در آن کدورت میکروبی مشاهده نشد به‌عنوان کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) تعیین شد. به‌منظور تعیین کمترین غلظت باکتری‌کشی (MBC) از هریک از لوله فوق در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و آخرین رقتی که در آن کلنی مشاهده نشد به‌عنوان کمترین غلظت باکتری کشی تعیین شد تعیین شد (Franklin et al., 2009). کلیه مراحل آزمایش، سه بار تکرار شد و نتایج به‌صورت میانگین آنها ارائه گردید.

نتایج

بررسی‌های اقلیمی و فیزیکوشیمیایی نشان داد که گیاه گل راعی جمع‌آوری شده از دو رویشگاه فرح‌آباد ساری و پاشاکلا آمل، گیاهی چند ساله است که به‌صورت خودرو در اقلیم نیمه مرطوب با بارش متوسط سالانه ۶۸۰/۶ میلی‌متر برای فرح آباد و ۶۶۵/۸ میلی‌متر برای آمل، متوسط حرارت سالانه ۲۷/۷ درجه سانتی‌گراد برای فرح‌آباد و ۲۱/۸ درجه سانتی‌گراد برای آمل و در خاک‌هایی با بافت سیلت-لومی با اسیدیته ۷/۱۹ برای فرح‌آباد و ۶ برای آمل و هدایت‌الکتریکی ۳/۵۰ برای فرح‌آباد و ۲/۰۶ درصد برای آمل می‌روید (جدول ۱).

بررسی نتایج تست‌های فیتوشیمیایی عصاره‌های گیاه گل راعی در دو رویشگاه پس از اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر و تجزیه و تحلیل آنها با یکدیگر مقایسه شدند که نتایج آن در جداول تجزیه واریانس (جدول ۲) آمده است. با توجه به جدول تجزیه واریانس نتایج اثر رویشگاه بر میزان مواد موثره اثر مستقیم دارد در تست‌های فیتوشیمی عصاره سرشاخه‌های گیاه گل راعی برداشت شده از دو رویشگاه آمل و فرح آباد این تفاوت مشاهده شد و میزان فنل کل و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود.

جدول ۱: مهمترین شاخص‌های فیزیکو شیمیایی خاک گیاه گل راعی .*Hypericum perforatum* L (فرح آباد و آمل).

ناحیه	ویژگی بافت خاک	پتاسیم قابل جذب(ppm)	فسفر قابل جذب(ppm)	ازت کل (٪)	کربن آلی (٪)	درصد مواد خنثی شونده	اسیدیته کل	هدایت الکتریکی
فرح آباد ساری	سیلت-لومی	۱۵۶	۶/۱۵	۲/۵	۳/۳۳	۳/۵	۷/۱۹	۳/۵
پاشاکلا آمل	سیلت-لومی	۳۳۳	۹	۰/۱۹	۴/۳	۴/۵	۶	۲/۰۶

جدول ۲: تجزیه واریانس برخی از متابولیت‌های ثانویه تحت تاثیر تیمارهای اکوتیپ بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فلاونوئید کل و فنل کل

منابع تغییرات	درجه آزادی (DF)	فلاونوئید	فنل کل	ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل	درصد رادیکال آزاد
اکوتیپ	۱	۲۴۶/۶۸**	۳۳۲۳/۸۰**	۴۵۶/۱۳**	۴۰۱/۲۲**
خطا	۲	۵/۶۴	۲/۴۳	۸/۵۹	۲/۷۵

** اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪، * اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪، n.s عدم وجود اختلاف معنی‌داری

جدول ۳ : مقایسه محتوی فنل کل (TPC) و فلاونویید کل (TFC) و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه گل راعی .*H.perforatum* L در دورویشگاه طبیعی فرح آباد-آمل با استفاده از حلال (اتانول) وبا روش استخراج (ماسراسیون).

آزمون فیتوشیمیایی محل جمع‌آوری	محتوی فلاونوئید کل (mg QE/g)	محتوی فنل کل (mgGAE/g)	فعالیت آنتی اکسیدانی IC50 (mg/ mL) DPPH
فرح آباد ساری	۰/۰۵ ± ۰/۰۲	۰/۱۷ ± ۰/۰۹۵	۸۰/۲۹
پاشاکلا آمل	۰/۰۲۹ ± ۰/۰۷	۰/۱۱ ± ۰/۰۸۹	۱۱۴/۰۳

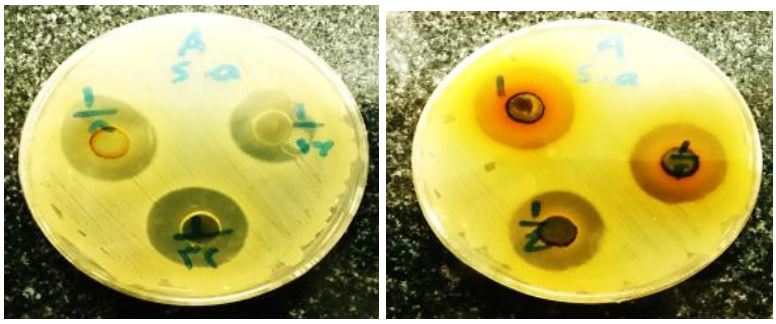
نتایج بررسی چاهک و نتایج روش میکرودایلوشن براث برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اثر ضدباکتریایی عصاره گیاه گل راعی در دو رویشگاه نشان می‌دهد که در منطقه فرح آباد نتایج بهتری دیده شد و از بین باکتری‌های مورد پژوهش، باکتری‌های گرم مثبت همچون *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* حساسیت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی مانند *اشریشیاکلی* و *شیگلا دیسانتری* نشان دادند.

جدول٤: میزان قطرهاله‌های عدم رشد عصاره گیاه گل راعی رویشگاه فرح آباد علیه باکتری‌های مورد آزمون

باکتری مورد آزمون	آزمایش	غلظت عصاره اتانولی گیاه گل راعی رویشگاه فرح آباد ساری										
		6.25 mg/ml	3.12 mg/ml	1.56 mg/ml	0.78 mg/ml	0.39 mg/ml	0.19 mg/ml	97 µg/ml	48 µg/ml	24 µg/ml	12 µg/ml	6 µg/ml
استافیلوکوکوس اورئوس	چاهک	۳۴	۳۲	۳۰	۲۸	۲۵	۲۱	۱۹	۱۷	۱۵	۱۲	۹
باسیلوس سرئوس	چاهک	۳۲	۳۰	۲۹	۲۶	۲۴	۲۲	۲۰	۱۸	۱۴	۱۱	۹
شیگلا دیسانتری	چاهک	۲۱	۱۹	۱۷	۱۴	۱۳	۱۲	۹	۰	۰	۰	۰
اشرشیا کلی	چاهک	۱۸	۱۸	۱۳	۱۲	۱۱	۹	۰	۰	۰	۰	۰

جدول۵: میزان قطرهاله‌های عدم رشد عصاره گیاه گل راعی رویشگاه پاشاکلا آمل علیه باکتری‌های مورد آزمون

باکتری مورد آزمون	آزمایش	غلظت عصاره اتانولی گیاه گل راعی رویشگاه آمل										
		6.25 mg/ml	3.12 mg/ml	1.56 mg/ml	0.78 mg/ml	0.39 mg/ml	0.19 mg/ml	97 µg/ml	48 µg/ml	24 µg/ml	12 µg/ml	6 µg/ml
استافیلوکوکوس اورئوس	چاهک	۳۰	۲۷	۲۴	۲۲	۲۰	۱۸	۱۶	۱۴	۱۲	۹	۰
باسیلوس سرئوس	چاهک	۲۹	۲۷	۲۵	۲۳	۲۱	۱۸	۱۶	۱۴	۱۲	۹	۰
شیگلا دیسانتری	چاهک	۱۸	۱۶	۱۳	۱۲	۹	۰	۰	۰	۰	۰	۰
اشرشیا کلی	چاهک	۱۶	۱۲	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰



شکل ۱: تأثیر عصاره گیاه گل راعی بر باکتری استا فیلوکوکوس اورئوس به روش چاهک

در جدول‌های ۴ و ۵ نتایج آزمون تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کمترین غلظت باکتری‌کشی (MBC) آمده است. همان‌طور که دیده می‌شود کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره تهیه شده از گیاه گل راعی در رویشگاه آمل برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *شیگلا دیسانتری* و *اشریشیا کلی* به‌ترتیب ۲۴، ۲۴، ۷۸۰ و ۱۵۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. در مورد گیاه جمع‌آوری شده از رویشگاه فرح آباد کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی استخراج شده برای باکتری نامبرده به‌ترتیب ۱۲، ۱۲، ۱۹۰ و ۳۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. این نتایج، نتایج به‌دست آمده در روش چاهک را تایید می‌کند که بیانگر این موضوع است که گیاه جمع‌آوری شده از رویشگاه فرح آباد فعالیت ضدباکتریایی بیشتری را نشان می‌دهد و باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری را نسبت به عصاره اتانولی گیاه گل راعی نشان می‌دهند.

جدول ٦: کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کمترین غلظت باکتری کشی (MBC) عصاره اتانولی گیاه گل راعی رویشگاه فرح آباد ساری علیه باکتری‌های مورد آزمون

نام باکتری مورد آزمایش	آزمایش	غلظت عصاره اتانولی گیاه گل راعی رویشگاه فرح آباد ساری										
		6.25 mg/ml	3.12 mg/ml	1.56 mg/ml	0.78 mg/ml	0.39 mg/ml	0.19 mg/ml	97 µg/ml	48 µg/ml	24 µg/ml	12 µg/ml	6 µg/ml
استا فیلوکوکوس اورئوس	MIC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-*	®+
	MBC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	€ -	©+
باسیلوس سرئوس	MIC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	MBC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
اشرشیا کلی	MIC	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	MBC	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
شیگلا دیسانتری	MIC	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	MBC	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

* :عدم کدروت ® :کدورت € :عدم تشکیل کلنی ©: تشکیل کلنی

جدول ۷: کمترین غلظت مهارکنندگی(MIC) و کمترین غلظت باکتری کشی (MBC) عصاره اتانولی گیاه گل راعی رویشگاه پاشاکلا آمل علیه باکتری‌های مورد آزمون

نام باکتری مورد آزمایش	آزمایش	غلظت عصاره اتانولی گیاه گل راعی رویشگاه پاشاکلا آمل										
		6.25 mg/ml	3.12 mg/ml	1.56 mg/ml	0.78 mg/ml	0.39 mg/ml	0.19 mg/ml	97 µg/ml	48 µg/ml	24 µg/ml	12 µg/ml	6 µg/ml
استا فیلوکوکوس اورئوس	MIC	-	-	-	-	-	-	-	-	-*	®+	+
	MBC	-	-	-	-	-	-	-	-	€ -	©+	+
باسیلوس سرئوس	MIC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	MBC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
اشرشیا کلی	MIC	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	MBC	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
شیگلا دیسانتری	MIC	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	MBC	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

* :عدم کدروت ® :کدورت € :عدم تشکیل کلنی ©: تشکیل کلنی

بحث

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، ۸۰ درصد از مردمی که در کشورهای توسعه یافته زندگی می‌کنند، کم و بیش برای درمان از گیاهان دارویی نیز استفاده می‌نمایند. این مسئله سبب می‌گردد تا بررسی دقیق‌تری در مورد اثرات درمانی و بی‌خطر بودن مصرف گیاهان دارویی انجام شود. در این میان ایجاد مقاومت میکروبی روزافزون نسبت به آنتی بیوتیک‌های موجود سبب می‌گردد در جهت یافتن ترکیبات ضدمیکروبی جدید گیاهان نیز مورد استفاده قرار گیرند. گیاهان دارای اثرات ضدمیکروبی با میکروارگانیسم‌های مختلف و حتی متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌ها رشد باکتری‌ها را مهار می‌کنند و این امر لزوم تحقیقات جامع تر در حیطه گیاهان دارویی را گوشزد می‌نماید. این مسئله افزایش روزافزون مقالات انتشار یافته در زمینه خصوصیات ضدمیکروبی گیاهان را توجیه می‌کند (Eloff, 1998).

نتایج بررسی‌های اکولوژیکی و عملیات صحرایی در این تحقیق نشان می‌دهد که رویشگاه ساحلی فرح‌آباد ساری نسبت به رویشگاه پاشاکلای آمل با اقلیم نیمه مرطوب، اسیدیته خنثی، شوری ۳/۵ دسی‌زیمنس و بافت خاک سیلتی-لومی از پتانسیل بسیار مناسب برای رشد گیاه مورد مطالعه برخوردار است و از آنجایی که در زراعت و باغبانی تنها زنده ماندن گیاهان مورد توجه نیست بلکه رشد مناسب وعملکردمطلوب مورد توجه است، بایستی با دقت وحساسیت بیشتری شوری خاک را مورد مطالعه قرار داد، اما با توجه به نوع گیاه مورد مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که این گیاه خود را با طیف گسترده‌ای از انواع شرایط خاک سازش یافته است.

نتایج بررسی ضدباکتریایی در مطالعه حاضر تاثیر قابل توجه عصاره اتانولی گل راعی را برسوش‌های بیماری‌زای اشاره شده نشان داد. اگر چه باکتری‌های به کار گرفته شده در تحقیق حاضر با سایر مطالعات تفاوت دارد لیکن اثر مهارکنندگی عصاره تام گل راعی بر آنها مشابه مطالعات فوق الذکر می‌باشد. به نظر می‌رسد بین وجود فلاونوئید در عصاره تام گل راعی مورد مطالعه و اثرات ضدمیکروبی این گیاهان ارتباط وجود داشته باشد. این مطلب در گزارش‌های متعددی آمده که اثرات ضدباکتریایی فلاونوئیدهای حاصل از گل راعی برزیلی بر باسیلوس سوبتیلیس و دیگر باکتری‌های گرم مثبت مورد بررسی قرار گرفته است که ارتباط آن به اثبات رسیده است (Fenner et al., 2006). در تحقیقی دیگر کیایی و همکاران (Kiaei et al., 2010) به بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی چند گیاه از جمله گل راعی علیه برخی از

باکتری‌های عامل عفونت‌های ادراری پرداختند. در این مطالعه، گیاه گل راعی بهترین اثر را داشته و حتی در مواردی تاثیر ضد باکتریایی آنها از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نیز بیشتر بود. در مطالعه رادولویچ و همکاران (Radulovic et al., 2007) تحت عنوان شناسایی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی ۹ گونه از گیاه دارویی گل راعی در شرایط آزمایشگاهی بیان کردند که از خواص ضدباکتریایی قوی در برابر باکتری‌ها برخوردار است. در مطالعه ای دیگر مشرقی و ممتازی (Mashreghi and Momtazi, 2012) اظهار داشتند که عصاره گیاه گل راعی مانع رشد باکتری اشرشیا کولی شده است. مور و همکاران (Moore et al., 2000) نیز نشان دادند که عصاره سه گونه از گیاه دارویی گل راعی دارای خواص ضدباکتریایی قوی است. ترکیبات مختلفی از گل راعی گزارش شده که فعالیت‌های بیولوژیکی خاصی را به آن نسبت می‌دهند مانند هایپریسین، سودو هایپریسین، فلاونو ییدهای مختلف مانند کوئرستین،هایپرین، فلورگلوسینول و اسانس، که اثرات مختلف ضدافسردگی، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدان و فعالیت ضدالتهابی از آنها گزارش شده است (Mukherjee et al., 2000).

از نتایج تحقیق حاضر حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی در برابر عصاره اتانولی گیاه گل راعی می‌باشد. مطالعات نشان داده است که دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی در مقابل بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها، ترکیبات شیمیایی، عوامل ضدمیکروبی و حتی داروهای گیاهی حساسیت بیشتری دارند این امر ممکن است به لیپوپلی ساکاریدها در غشای بیرونی و نیز فضای پری پلاسمیک باکتری‌های گرم منفی نسبت داده شود که آنها را ذاتاً به عوامل خارجی مقاوم می‌کند (Kritika, 2007; Cock, 2008; Tortora et al., 2001; Burt, 2004).

این گیاه دارای اثرات فارماکولوژیکی متعددی از جمله اثرات ضد درد، ضد افسردگی و ضد التهاب، ضد تومور، ضد فراموشی، ضد اضطراب، ضد زخم معده و ضداکسیدانت است و در طب سنتی مصارف زیادی داشته است و بر این اساس نیز مطالعات زیادی روی آن انجام شده است (Mukherjee et al., 2000; Trovato et al., 2001 ; Wang et al., 2011; Bayramoglu et al., 2014; Cai et al., 2004; Glisic et al., 2006).

نتایج قطرهاله عدم رشد عصاره گیاه در روش چاهک در هر دو رویشگاه نشان داد که در رویشگاه فرح آباد اختلاف معنی‌داری با عصاره گیاه رویشگاه منطقه آمل دارد و نتایج بهتر گیاه منطقه فرح آباد کاملاً مشهود است و میتوان دلیل این تفاوت را اختلاف معنی‌دار پارامترهای دما و ارتفاع از سطح دریا در دو منطقه فرح آباد و آمل عنوان کرد. با افزایش ارتفاع از سطح دریا، محتوای ترکیبات فنلی و آنتوسیانین در گیاهان افزایش می‌یابد، زیرا در مناطق مرتفع، تشعشعات نور ماورای بنفش بیشتر تابیده می‌شود (Galilee Marandi, 2012). این نشان می‌دهد که تغییر شرایط اکولوژیکی نقش بسیار مهمی در تغییر نوع ومیزان ترکیبات عمده عصاره داشته و در نتیجه خاصیت ضد باکتریایی گونه را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد.

نتایج نشان داد که به طبع محتوای فنل کل و فلاونوئید و فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH فعالیت ضد باکتریایی عصاره اتانولی رویشگاه فرح آباد در مقایسه با رویشگاه آمل بیشتر است.این موضوع می‌تواند توجیه کننده این مطلب باشد که گیاه رویشگاه فرح آباد تحت شرایط تنش و استرس بیشتری در مقایسه با رویشگاه آمل است. مطالعات مشابه دیگر به این موضوع اذعان دارند. مازندرانی و همکاران (Mazandarani et al., 2011) و ضرغامی مقدم همکاران (Zarghami Moghaddam et al.,

2011) تحقیقاتی مشابه در مورد گیاهان هواچوبه، گلپر، بولاغ اوتی، مورو و مامیران انجام دادند که نشان دادند با افزایش میزان ارتفاع و شدت یا تنش‌های اکولوژیکی بر میزان ترکیبات ثانوی (فنل و فلاونوئید) و همچنین عملکرد آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد و اینکه در تست‌های مختلف ارزیابی عملکرد آنتی‌اکسیدانی و شرایط مختلف رشد گونه‌ها و حتی بسته به نوع حلال‌هایی که در عصاره‌گیری گونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، میزان مواد موثره عصاره‌ها و از همه مهمتر اثر آنتی اکسیدانی در آن گیاهان نیز تغییر کرده که در تایید این موضوع قابل بحث است و این که یک رابطه مثبت میان افزایش متابولیت ثانوی با عملکرد آنتی‌اکسیدانی همسو با تنش‌های اکولوژیکی در ارتفاع مشهود است.

در این تحقیق صرفا محتوای فنل کل و فلاونوئید عصاره گیاه گل راعی در هر دو رویشگاه مورد بررسی قرار گرفت. لذا تحقیقات دیگری به‌منظور تعیین این نکته که کدام ماده دقیقاً بیشترین نقش را ایفا می‌کند باید انجام گیرد و نتایج این تحقیق که برای اولین بار در استان مازندران (در دو رویشگاه فرح‌آباد و آمل) انجام گرفته وگیاه گل راعی را به‌عنوان یک منبع طبیعی برای استخراج این ترکیبات مهم معرفی می‌نماید و از آنجایی که رویکرد جامعه بهداشت جهانی امروز به سمت تولید داروهایی با منشاء طبیعی و آنتی اکسیدان‌های گیاهی است. بنابراین انجام تحقیقات بنیادین و کاربردی در بررسی‌های فیتوشیمیایی، شناسایی، استخراج و فراوری از گیاهان دارویی بومی در رویشگاهای مختلف که از سابقه دیرینه در اثرات دارویی دارند، با هدف دست یابی به رویشگاه‌های بهینه رشد گیاه، روش‌های بهینه استخراج و مهمتر از همه دست‌یابی به مواد موثره ثانوی بهینه، تولید داروهای موثر طبیعی و کم خطر در درمان بیماری‌های فوق را بیش از پیش ضروری و پر اهمیت می‌سازد.

نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر با تحقیقات پاره‌ای از محققین فوق الذکر هماهنگی‌ها و تفاوت‌هایی را نشان می‌دهد. این تفاوت‌ها را می‌توان به تاثیر فاکتورهای متعددی از جمله زمان و محل جمع‌آوری گیاه، تغییرات آب و هوایی و شرایط جغرافیایی منطقه، شرایط و امکانات آزمایشگاه و غیره نسبت داد.

همان‌گونه که یافته‌ها در بررسی حاضر نشان می‌دهد، باکتری‌های بیماری‌زا *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیاکولی* و *شیگلا دیسانتری* توسط عصاره تام گیاه گل راعی کنترل شد. مقایسه روش چاهک پلیت در دو رویشگاه نیز نشان‌دهنده این است که رویشگاه فرح‌آباد نسبت به رویشگاه پاشاکلا آمل اثر مهارکنندگی بیشتری بر رشد میکروارگانیزم‌ها دارد. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد اثرات ضدباکتریایی گیاه راعی مربوط به وجود مواد موثره موجود در گیاه می‌باشد، لذا تخلیص مواد مؤثره این گیاه ضرورت دارد و می‌تواند گام موثری در جهت عرضه فرآورده‌های دارویی که دارای خاصیت ض میکروبی است باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

با مقایسه یافته‌های این تحقیق و دیگران مشخص شده که نوع حلال، روش‌های استخراج، شرایط و استرس‌های اکولوژیکی از مهمترین عوامل تغییر در کمیت و کیفیت مواد موثره دارویی گیاه و عملکرد آنتی‌اکسیدانی و دارویی آن دارد و از جمله همسو با یافته‌های دیگران و نتایج این تحقیق می‌توان اینطور استنباط نمود که بخش مهمی از ترکیبات فنلی و فلاونوییدها تحت استرس‌های محیطی سنتز شده و مقدارشان در عصاره گیاه افزوده شده و سازش‌پذیری بیشتری به گیاه در مقابل تغییرات محیطی به گیاه می‌بخشد و متعاقب آن از پتانسیل بهتری در مهار رادیکال‌های آزاد برخوردار می‌شوند که این یافته‌ها در

تایید مصارف دارویی گیاه در منطقه به‌عنوان ضدعفونی‌کننده قوی قابل بحث است. گیاه گل راعی می‌تواند به‌عنوان گیاهی ارزش مند در جهت مقابله با بیماری‌های عفونی در نظر گرفته شود، زیرا اثرات ضد باکتریایی قابل ملاحظه‌ای، به‌خصوص بر روی باکتری‌های گرم مثبت دارد. پیشنهاد می‌شود در ادامه، مطالعات وسیع‌تری در زمینه اثر ضدمیکروبی و شناسایی ترکیبات عصاره گل راعی با استفاده از کروماتوگرافی با کارایی بالا انجام گردد تا با یافتن مواد موثره ضدمیکروبی این گیاه، استفاده از آن در ترکیبات مختلف به‌صورت خوراکی یا به شکل دارویی اقدامی در بهبود از بیماری‌های مربوط به باکتری‌های بیماری‌زا انجام شود.

اگر چه تجربه حاضر در محیط غیر زنده (*in-vitro*) و بر روی محیط‌های کشت جامد انجام شده، لیکن به دلیل نتایج قابل قبول به‌دست آمده به نظر می‌رسد این یافته‌ها زمینه بسیار مناسبی برای بررسی‌های بیشتر به‌صورت (*in-vivo*) و بر روی حیوانات آزمایشگاهی همچنین جهت تاثیر ضدمیکروبی فراکشن‌های این گیاه بر بسیاری از باکتری‌ها باشد.

لذا با توجه به اهمیت نقش تنشهای محیطی در سنتز ترکیبات ثانوی و عملکرد دارویی آنها، ضرورت انجام تحقیقات مشابه در مورد این گیاه و در سایر رویشگاه‌ها و زمان‌های مختلف رشد گیاه را بیش از پیش ضروری می‌سازد، بنابراین در طرح‌های آتی استخراج، شناسایی و مقایسه کیفیت مهمترین مواد موثره ثانوی اندام‌ها و همچنین بررسی و مقایسه اثرات ضدالتهاب، ضدعفونی کنندگی و ضد اسپاسمی آن در رویشگاه‌های مختلف به روش‌های مختلف عصاره‌گیری و با استفاده از حلال‌های مختلف، در مدل‌های حیوانی و بالینی پیشنهاد می‌گردد.

References

1. Androw, J.M. 2001. BSAC Standardized disc susceptibility testing method. Journal Antimicrobial Chemotherapy, 7 (5): 48 - 57.
2. Bayramoglu, G., Bayramoglu, A., Engur, S., Senturk, H., Ozturk, N. and Colak, S. 2014. The hepatoprotective effects of *Hypericum perforatum* L. on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. Cytotechnology, 66(3): 443-448.
3. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
4. Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sciences, 74(17) :2157-2184.
5. Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal Food Drug Analaysis, 10(3): 178-182.
6. Cock, I.E. 2008. Antibacterial activity of selected *Australian* native plant extracts. The Internet Journal of Microbiology, 4(2): 1-8.
7. Eloff, J.N. 1998. Which extraction should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. Journal Ethnopharamacol, 60(1): 1-8.
8. Fabrican, D.S. and Farnsworth, N.R. 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. Environ Health Perspect (EHP), 109(1): 69-75.
9. Fenner, R., Betti, A.H., Mentz, L.A. and Rates, S.M.K. 2006. Plants Used in Brazilian folk medicine With potential antifungal activity. . Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 2(3): 369-394.
10. Franklin, G., Conceica˜o, L.F.R., Kombrink, E. and Dias, A.C. 2009. Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. Phytochemistry, 70(1): 60–68.

11. Glisic, S., Popadic, S. and Skala, D. 2006. St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) –supercritical extraction, antimicrobial and antidepressant activity of extract and their components. Chem. Industry, 60: 61-72.

12. Khosravi, A. and Malecan, M. 2004. Effects of *Lavandula stoechas* extracts on *staphylococcus aureus* and other gram negative bacteria. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences, 7(5): 3-9.

13. Kritika, N. 2007. Antimicrobial effect of five *Zingiberaceae* Essential oils. Molecules, 12: 2047-2060.

14. Mahboubi, M., Bokaee, S., Dehdashti, H. and Feizabadi, M.M. 2012. Antimicrobial activity of *Mentha piperitae*, *Zhumeria majdae*, *Ziziphora tenuior* oils on ESBLs producing isolates of Klebsiella pneumoniae, Biharean Biologist, 6(1): 5–9.

15. Mashreghi, M. and Momtazi, F. 2012. Comparison of the antibacterial effects of various concentrations of J. Rafsanjan Univ. Med. Sci. 11(2):103-14.

16. Kiaei E, Mazandarani M, Ghaemi A.The effect of ethanol extract of 7 species of medicinal plants against bacteria isolated from patients with urinary tract infection in the city of Gorgan. J Med Plants. 2010; 9(2): 74-83.

17. Mazandarani, M., Makari, S. and Bajian, G.R. 2011. Evaluation of phytochemical and antioxidant activity in different parts of *Heracleum gorganicum Rech*.F. in *Golestan* province, North of Iran. Iranian J. plant physiology, 2(2): 381-388.

18. McDonald, S., Prenzler, P.D., Autolovich, M. and Robards, K. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chemistry, 73:73-84.

19. Moore, L.B., Goodwin, B., Jones, S.A., Wisely, G.B., Serabjit-Singh, C.J., Willson, T.M., Collins, J.L. and Kliewer, S. 2000. Induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. Proc Natl Acad Sci., 97(13): 7500–7502.

20. Mozdastan, S., Ebrahimzadeh, M.A. and Khalili, M. 2015. Comparing the impact of different extraction methods on antioxidant activities of myrtle (*Myrtus communis* L.). J. Mazandaran Univ Med Sci, 25(127): 10-24 (In Persian).

21. Mukherjee, P.K., Verpoorte, R. and Suresh, B. 2000. Evaluation of in vivo wound healing activity of *Hypericum patulum* (Family: Hypericaceae) leaf extract on different wound model in rats. J Ethnopharmacol, 70(3): 315–321.

22. Nostro, A., Germano, M.P., D'Aneglo, V., Marino, A. and Cannatelli, M.A. 2000. Extraction method and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lett. Appl. Microbiol, 30(5): 379-384.

23. Galilee Marandi, R. 2012. Post harvest physiology. Third edition. Urmia: Urmia University Jihad publication, 624.

24. Radulovic, N., Stankov -Jovanovic, V., Stojanovic, G., Smelcerovic, A. Spiteller, M. and Asakawa, Y. 2007. Screening of in vitro antimicrobial and antioxidant activity of nine Hypericum species from the Balkans. Food Chemistry, 103(1): 15-21.

25. Sun, T., Powers, J.R. and Tang, J. 2007. Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. Food Chemistry, 105(1): 101-106.

26. Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L. 2001. Microbiology: An Introduction, Benjamin Cummings, San Francisco. 12.

27. Trovato, A., Raneri, E., Kouladis, M., Tzakou, O., Taviano, M.F. and Galati, E.M. 2001. Anti inflammatory and analgesic activity of *Hypericum empetrifolium* Willd. (Guttiferae). Farmaco, 56: 455-457.

28. Wang, J., Kan, Q., Li, J., Zhang, X. and Qi, Y. 2011. Effect of neferine on liver ischemia–reperfusion injury in rats. Transplantation Proceeding, 43:2536–2539.

29. Weckesser, S., Engel, E., Simon, B., Wittmer, A., Pelz, K. and Schmepp, C.M. 2007. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and

yeast with dermatological relevance. Phytomedicine, 14(7-8): 508-16.

30. WHO report, 2003. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing Geneva, Switzerland, (WHO/CDS/TB /2003.316).

31. Zarghami Moghaddam, P., Zolfaghari, M.R., Ghaemi, E.A., Mazandarani, M., Mansourian, A.R. and Taheri, S.A., 2011. Negative performance of root extract of *Onosma dichroanthum* Boiss. on the burn wound healing in an animal model. Archives of Clinical Microbiology. Microbial, 2(5): 1-5.