اکوفیزیولوژی و فیتوشیمی گیاهان دارویی و معطر

تنوع خواص زیستی و میزان فنل و فلاونوئیدی کل در عصاره‌های مختلف مریم گلی تفتانی (*Salvia rhytidea* Bent.) جمع‌آوری شده در رویشگاه‌های طبیعی کرمان و سیستان و بلوچستان

امید عزیزیان شرمه[۱،۲]، علیرضا حسن آبادی[۳*]

۱- دانشجوی دکتری شیمی آلی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران (نویسنده مسئول: ar_hasanabadi@yahoo.com)

۲- دانشجوی دکتری شیمی آلی، مرکز پژوهشی گیاهان دارویی و زینتی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

۳- دانشیار، گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زاهدان، زاهدان، ایران

شناسه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: مهر ۱۴۰۱

تاریخ پذیرش مقاله: آبان ۱۴۰۱

نوع مقاله: علمی- پژوهشی

موضوع: فیتوشیمی

چکیده

مریم گلی تفتانی (***Salvia rhytidea* Bent**) متعلق به تیره نعناعیان، بومی استان سیستان و بلوچستان و کرمان می‌باشد. مطالعه حاضر به بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی فنل و فلاونوئید کل، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی سه عصاره متانولی، اتانولی و آبی مریم گلی تفتانی در رویشگاه‌های طبیعی کرمان و سیستان و بلوچستان می‌پردازد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش‌های **DPPH** و **FRAP** و فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی و قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلبیکنس سنجیده شد. نتایج نشان داد، عصاره متانولی از سیستان و بلوچستان دارای بیشترین ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنتی‌میکروبی علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با قطر هاله عدم رشد را داراست. عصاره آبی این گیاه از کرمان دارای کمترین میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنتی‌میکروبی علیه باکتری اشرشیاکلی بود. از عصاره‌های مورد مطالعه، عصاره متانولی در بین ارزیابی‌ها دارای رتبه نخست بود. همچنین، قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی این گیاه بسیار بالا و نزدیک به قدرت آنتی‌اکسیدانی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی آسکوربیک اسید در هر دو روش بود. به‌طورکلی بر اساس نتایج بدست‌آمده، گیاه مریم گلی تفتانی می‌تواند به عنوان کاندیدای خوبی جهت درمان بیماری‌های ناشی از تنش اکسیداتیوی و بیماری‌های ناشی از میکروب‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار گیرد و با توجه به قدرت بالای این گیاه در از بین بردن عوامل بیماری‌زا، می‌توانند جایگزین مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها باشند.

واژگان کلیدی: ترکیبات فیتوشیمیایی، سیستان و بلوچستان، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی-میکروبی، کرمان.

۱. مقدمه

تنوع کمیت و کیفیت مواد موثره دارویی و همچنین عملکرد آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی تحت شرایط متفاوت اکولوژیک باعث شده که گیاهان به عنوان منبعی ارزشمند و طبیعی از آنتی‌اکسیدان‌های جدید در بحث پیشگیری و درمان بیماری‌ها به‌طور جدی مورد توجه قرار گیرند. بنابراین رویکرد جهانی WHO به سمت انجام تحقیقات کاربردی برای شناسایی گونه‌های دارویی بومی، شناسایی مواد موثره ثانوی، ارزیابی عملکرد آنتی‌اکسیدانی، نیازهای اکولوژیکی و اخذ اطلاعات ارزشمند دارویی بومی با هدف تولید داروهای طبیعی و آنتی‌اکسیدان منطبق با عملکرد آن‌ها در طب سنتی می‌باشد (Mazandarani et al., 2011). واکنش‌های اکسیداسیون به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد سلامت انسان را به مخاطره می‌اندازند. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند استرس اکسیداتیو در سلول‌ها را کاهش داده و قادر به مهار رادیکال‌های آزاد، جلوگیری از اکسیداسیون، تقویت دستگاه ایمنی و دارای اثرات ضدمیکروبی، ضدسرطانی و کاهش علایم آسیب‌های مغزی، آب مروارید، شبکیه رنجوری و دیابت هستند (Mohajerani 2012). آنتی‌اکسیدان‌ها در بدن با دو سیستم دفاع آنزیمی و دفاع غیرآنزیمی به مقابله با رادیکال‌های آزاد می‌پردازند. در دفاع آنزیمی، آنزیم‌هایی مانند سلنیوم-گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکساید دیسموتاز به‌ترتیب از طریق متابولیزه کردن هیدروپراکسیدهای لیپیدی و غیر لیپیدی، پراکسید هیدروژن و رادیکال سوپراکساید، منجر به تخفیف تولید رادیکال‌های آزاد سمی می‌شوند.

آنتی‌اکسیدان‌ها به دو صورت طبیعی و سنتزی وجود دارند. در تقسیم‌بندی دیگر، آنتی‌اکسیدان‌ها در دو دسته آنزیمی و غیر آنزیمی قرار می‌گیرند. از مهمترین آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی می‌توان به سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز و غیرآنزیمی، به آسکوربیک اسید (ویتامین C)، آلفاتوکفرول (ویتامین E) گلوتامین، کاروتنوئیدها و فلاونوئیدها اشاره کرد. ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاهی غیرآنزیمی بر اساس دو مکانیزم انتقال الکترون و انتقال هیبرید، عمل احیاکنندگی را انجام می‌دهند (Mohajerani, 2012). این دو سیستم با کمک یکدیگر منجر به تخفیف انباشتگی رادیکال های ازاد اکسیژن می‌شوند. در سال‌های اخیر استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی نظیر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول (BHA)[۱]، بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن (BHT)[۲]، ترشیو بوتیل هیدروکوئینون (TBHQ)[۳] همانند سایر افزودنی‌های شیمیایی به دلیل سمیت احتمالی و سرطانزایی آن‌ها، محدود شده است.

امروزه بیشتر تحقیقات بر استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های جدید و بدون خطر از منابع گیاهی، حیوانی، میکروبی و غذایی تمرکز یافته است (Mohammadi et al.,2014; Pourreza, 2013). ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در گیاهان از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند که توان آنتی‌اکسیدانی مشابهی با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، بدون اثرات جانبی دارند (Shashi et al., 2014). ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غشای سلول‌ها را در مقابل صدمات ناشی از رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند. همچنین، این ترکیبات دارای خصوصیات ضدجهش، ضدمیکروبی، ضدویروس و ضدسرطان هستند (Einali et al., 2018). ترکیبات فنلی از جمله فلاونوئیدها دسته‌ای از ترکیبات فیتوشیمیایی هستند که انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت بیولوژیکی متنوع این ترکیبات از جمله فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدالتهاب و گشادکنندگی عروق آن‌ها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده است (Jamshidi et al., 2010). با توجه به استفاده بی رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش مقاومت در مقابل باکتری‌ها، یافتن جایگزین‌های مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها امری ضروری می‌باشد. به همین دلیل مطالعات گسترده‌ای در مورد پتانسیل استفاده از ترکیبات ضد میکروبی گیاهان برای کنترل و درمان عوامل بیماری‌زا صورت گرفته است (Mobaiyen et al., 2016). میکروب‌ها با ایجاد ژن

---

[۱] Butylated hydroxyanisole
[۲] Butylated hydroxytoluene
[۳] Tert-Butylhydroquinone

مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، این مقاومت را از نسلی به نسل دیگر و حتی به‌صورت شایع از گونه میکروبی به گونه دیگر انتقال می‌دهند که حتی با تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها در دوزهای بالا نتیجه‌ای حاصل نمی‌شود و عفونت پایدار می‌باشد. از طرف دیگر درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها همواره نگرانی عوارض جانبی دارو را به همراه دارد به‌طوریکه گزارشاتی از ایجاد سمیت و تولید سرطان منتشر شده است (Alamhulu & Nazeri 2015). ترکیبات ضدمیکروبی به‌دست آمده از گیاهان با مکانیسم‌هایی متفاوت از آنتی بیوتیک‌ها، باکتری‌ها را حذف می‌کنند که این مسئله در درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم میکروبی از نظر بالینی حائز اهمیت است. به‌طور کلی فعالیت‌های بیولوژیکی در عصاره گیاهان به‌دلیل وجود ترکیبات ثانویه چون ترپنوئیدها، فنل و فلاونوئیدها و آلکالوئیدها است (Mazarei et al., 2018). با توجه به رویکرد جهانی به استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات طبیعی در صنایع دارویی و به‌دلیل سازگاری آن‌ها با بدن انسان، تحقیقات برای تولید مواد ضدمیکروبی، ضروری به نظر می‌رسد.

جنس Salvia متعلق به تیره نعناعیان (Lamiaceae)، با بیش از ۳۱۱ گونه در سراسر جهان به‌ویژه در مناطق گرمسیری و معتدل، رویشی وسیع دارد. گیاه دارویی مریم گلی تفتانی (Salvia rhytidea Bent) از جمله گیاهان دارویی بومی استان سیستان و بلوچستان و کرمان می‌باشد. از دیرباز گونه‌های مختلف جنس مریم گلی (Salvia) دارای استفاده‌های متعدد دارویی بوده که امروزه نیز از فراورده‌های مختلف از جمله اسانس آن‌ها استفاده‌های زیادی به‌عنوان طعم‌دهنده، نگهدارنده و آنتی‌اکسیدانت در صنایع غذایی و داروسازی دارد. مریم گلی گیاهی است ضد تشنج ، تب‌بر، مسکن اعصاب و در تسکین دردهای گوارشی، مقوی حافظه، کم‌کننده فشار خون، قند خون و نیز در درمان بیماری میگرن و پارکینسون مورد استفاده قرار می‌گیرد (Amiri, 2007). به‌دلیل پراکنش قابل توجه این گیاه که به‌عنوان پوشش غالب در منطقه می‌باشد و در طب سنتی و بومی مردمان استان سیستان و بلوچستان و کرمان مورد استفاده قرار می‌گیرند و همچنین کم بودن تحقیقات بر روی آن، مطالعه حاضر به بررسی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و محتوای فنولی و فلاونوئیدی سه عصاره مختلف متانولی، اتانولی و آبی این گیاه می‌پردازد.

۲. مواد و روش‌ها

- مواد شیمیایی و میکروارگانیسم‌ها

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده با خلوص بالا تهیه شدند. ۲،۲- دی فنیل- ۲- پیکریل-هیدرازیل (DPPH)، کوئرستین و بوتیلات هیدروکسی تولوئن (BHT) از شرکت سیکما-آلدریچ، استات سدیم، آسکوربیک اسید، گالیک اسید، سدیم بیکربنات، معرف فولین، سولفات آهن، 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)، اتانول، متانول، دی متیل سولفوکساید، از شرکت مرک و میکروارگانیسم‌های مورد استفاده شامل باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس[۴] (PTTC 1112)، باسیلوس سرئوس[۵] (PTTC 1154)، اشرشیا کلی[۶] (PTTC 1399) و قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر[۷] (PTTC 5012) و کاندیدا آلبیکنس[۸] (PTTC 5027) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران (IROST) تهیه شدند. برای تمامی محلول‌سازی‌ها و شستشو از آب دو بار یون‌زدایی شده، استفاده شد.

---

[۴] *Staphylococcus aureus*
[۵] *Bacillus cereus*
[۶] *Escherichia coli*
[۷] *Aspergillus niger*
[۸] *Candida albicans*

- **جمع‌آوری گیاه و تهیه عصاره‌های گیاهی**

نمونه‌های تاره ریشه گیاه مریم گلی تفتانی در مرحله گلدهی در خردادماه ۱۳۹۸ از ارتفاعات کوه تفتان، توابع شهرستان خاش در استان سیستان و بلوچستان (در ٦٠ درجه و ٤٤ دقیقه طول شرقی و ۲۸ درجه و ۳۳ دقیقه عرض شمالی و ارتفاع ۱۳۹٤ متر بالاتر از سطح دریا) و کوهپایه استان کرمان (در طول جغرافیایی ۵۳ درجه و ۲۷ دقیقه تا ۵۹ درجه و ۲۸ درجه شرقی و عرض جغرافیایی ۲۵ درجه و ٥٦ دقیقه تا ۳۲ درجه شمالی در ارتفاع ۱۷۰۰ متر بالاتر از سطح دریا) جمع‌آوری شد. جهت تهیه عصاره، نمونه گیاهی مورد نظر پس از جمع‌آوری و انتقال به آزمایشگاه، به دور از نور مستقیم خورشید و به مدت یک هفته خشک شدند. عصاره‌گیری به روش ماسراسیون[۹] (خیساندن) انجام شد (Azizian Shermeh et al., 2018 a). بدین‌منظور پس از پودر کردن ریشه گیاه توسط آسیاب برقی آزمایشگاهی، مقدار ۱۰ گرم از آن را به ۱۰۰ میلی‌لیتر از حلال‌های مختلف (متانول خالص و مطلق (Absolute)، اتانول خالص مطلق (Absolute) و آب دوبار تقطیر) افزوده و به مدت ٢٤ ساعت بر روی شیکر به‌هم زده شدند. نمونه‌های بدست آمده توسط کاغذ صافی واتمن ٤٢، صاف و به‌منظور حذف کامل ذرات معلق، هر کدام از عصاره‌ها به‌وسیله دستگاه سانترفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از حذف کامل حلال توسط اواپراتور تحت خلا، به‌دلیل حساسیت بالای عصاره‌های به‌دست‌آمده به نور، حرارت و اکسیژن، درب آن‌ها بسته و تا زمان آنالیز در یخچال و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

- **ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH**

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی به کمک ۲-۲ دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)، مورد ارزیابی قرار گرفت. مولکول DPPH ترکیبی است بنفش رنگ که به‌دلیل حضور گروه‌های فنیل در ساختار آن به راحتی به صورت رادیکال در آمده و در واقع منبع رادیکال آزاد می‌باشد. توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط ترکیبات و عصاره‌های مختلف در این تست با میزان بی‌رنگ کردن یا کاهش میزان جذب نوری محلول بنفش DPPH در متانول مورد سنجش قرار می‌گیرد. عصاره‌ها با غلظت µg/ml ۱۰۰۰ به همراه ۱ میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار تهیه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه قرار دادن در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با DPPH در مقابل کنترل قرائت شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید و از بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن (BHT) و آسکوربیک اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

$$\%IP = (A\ Control - A\ sample / A\ Control) \times 100 \quad (۱)$$

IP%: درصد مهار رادیکال‌های آزاد (درصد بازداری آنتی‌اکسیدان در برابر رادیکال‌های آزاد)

A Control: جذب کنترل (که حاوی ۱ میلی‌لیتر از متانول در ۱ میلی‌لیتر از محلول DPPH می‌باشد)

A Sample: جذب نمونه (که حاوی حجم‌های مختلفی از عصاره گیاهی (آنتی‌اکسیدان)، متانول و محلول DPPH می‌باشد)

برای محاسبه مقدار IC_{50}، ابتدا منحنی کالیبراسیونی قدرت بازداری (IP%) بر حسب µg/ml رسم و پس از به‌دست آمدن معادله خط و جایگزین کردن عدد ۵۰ در محور افقی، مقدار IC_{50} از محود عمودی محاسبه شد (Einali et al., 2018).

[۹] Macerate method

- **اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی به روش احیاء یون آهن (III)، FRAP**

برای اندازه گیری توان آنتی‌اکسیدانی احیاء یون آهن، روش بنزی و استرین با کمی تغییر مورد استفاده قرار گرفت (Azizian-Shermeh et al., 2017 b). اساس این روش مبتنی بر کاهش کمپلکس فریک تری پیریدیل تری آزین، به فرم فروس در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها است. در لوله آزمایش به ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ها با غلظت $\mu g.ml^{-1}$ ۱۰۰۰، مقدار ۱/۸ میلی‌لیتر از محلول تازه فرپ افزوده شد. (محلول تازه فرپ با افزودن ۲۵ میلی‌لیتر بافر استات با pH= ۳/٦، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول TPTZ (۱۰ میلی‌مولار در هیدروکلریک اسید ٤۰ میلی‌مولار) و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول FeCl3.6H2O (۱ مولار) قبل از انجام آزمایش تهیه شد). مخلوط فوق ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس جذب محلول‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش-مرئی در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری شد. فعالیت احیاکنندگی عصاره‌ها با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میلی‌مول یون آهن (II) بر میلی‌گرم وزن خشک نمونه محاسبه شد. در این آزمایش از بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن (BHT) و آسکوربیک اسید به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

- **اندازه‌گیری مقدار فنل کل**

محتوای فنل کل با استفاده از معرف فولین-سیوکالتیو اندازه گیری شد (Sadeghi et al., 2015). به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره‌ها با غلظت µg/ml ۱۰۰۰، ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر فولین سیوکالتیو با غلظت ۱۰٪ حجمی-حجمی و پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر از محلول سدیم کربنات با غلظت ۵٪ وزنی-حجمی به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در یک مکان تاریک و در دمای اطاق قرار داده شد. پس از آن جذب نمونه‌ها در طول موج ۷٦۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر فرابنفش-مرئی در مقابل شاهد اندازه گیری شد. گالیک اسید به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به‌کار رفت و میزان فنل کل بر اساس میزان معادل میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره گزارش گردید.

- **تعیین مقدار فلاونوئیدهای کل**

جهت سنجش میزان فلاونوئید کل از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد (Azizian-Shermeh et al., 2017 c). هر کدام از عصاره‌های گیاهی (۰/۵ ml با غلظت µg/ml ۱۰۰۰) به‌صورت جداگانه با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم (۱۰٪ متانولی وزنی-حجمی)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم (با غلظت ۱ مولار) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شدند. سپس محلول‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. جذب محلول‌ها در طول موج ٤۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش-مرئی اندازه گیری شد. از کوئرستین جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد و در انتها میزان فلاونوئید کل بر اساس میزان معادل میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره‌ها گزارش شد.

- **بررسی فعالیت ضدمیکروبی**

نمونه‌های میکروبی با استفاده از محیط کشت لوریا برتانی[۱۰] و سابورد دکستروز[۱۱] و بر اساس روش‌های استاندارد احیاء گردیدند و به‌منظور سوسپانسیون میکروبی از کشت ۲٤ ساعته هر میکروارگانیسم به صورت مجزا به لوله‌های آزمایش حاوی ۳ میلی‌لیتر مولر هینتون براث تلقیح شد و سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم مک‌فارلند آماده گردید.

[۱۰] Luria broth
[۱۱] Dextrose Sabouraud

بررسی اثرات ضدباکتریایی و ضد قارچی عصاره‌های گیاه مریم گلی تفتانی، ابتدا با روش انتشار از چاهک در آگار (Azizian-Shermeh et al., 2016 d) انجام شد. بدین منظور از سوسپانسیون هر میکروب به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بر روی پلیت حاوی مولر هینتون آگار برای باکتری‌ها و سابورد دکستروز آگار برای قارچ‌ها ریخته و با سواپ استریل در سه جهت به‌صورت انبوه کشت داده شد. سپس در سطح هر یک از پلیت‌های کشت داده شده چاهک‌هایی به قطر ٦ میلی‌متر و به فاصله ۲ سانتی‌متری از هم ایجاد گردید و درون هر چاهک مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر یک از رقت‌های آماده شده نمونه‌ها با سمپلر ریخته شد. از آنتی بیوتیک‌های ضد باکتریایی آمپی سیلین و جنتامیسین و ضد قارچی کلوتریمازول به عنوان شاهد مثبت و از محلول DMSO به‌عنوان شاهد منفی استفاده گردید. پس از اتمام کار محیط‌های کشت باکتریایی در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ٢٤ ساعت و کشت‌های قارچی در انکوباتور ۲۸ درجه به مدت ٤٨ ساعت انکوبه کشت و در نهایت پس از گذشت ٤٨-٢٤ ساعت، کشت‌های میکروبی از نظر تشکیل یا عدم تشکیل هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفت و قطر هاله‌های تشکیل شده بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره‌های مورد نظر، از روش رقت لوله‌ای استفاده گردید (Azizian-Shermeh et al., 2016 e). بدین منظور از عصاره‌های آماده شده (متانولی، اتانولی و آبی) در لوله‌های آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث، سری رقت‌های آماده شده برای عصاره‌ها (١/٥٦، ٣/١٢، ٦/٢٥، ١٢/٥، ٢٥، ٥٠، ١٠٠ و ٢٠٠ µg/ml) تهیه شد. سپس به هر یک از لوله‌ها ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده تلقیح گردید. یک لوله آزمایش حاوی محیط کشت و میکروب تلقیح شده ولی فاقد عصاره‌ها و به عنوان شاهد مثبت و لوله آزمایش حاوی محیط کشت به همراه عصاره یا اسانس ولی فاقد باکتری و قارچ به عنوان شاهد منفی نیز آماده گردید و در نهایت تمامی لوله‌های آزمایش به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه برای باکتری‌ها و دمای ۲۸ درجه برای قارچ‌ها و به مدت ٤٨-٢٤ ساعت انتقال داده شدند. بعد از انکوباسیون، هر لوله از نظر کدورت حاصل از رشد میکروارگانیسم‌ها بررسی و کمترین رقتی که در آن به علت اثر مهارکنندگی عصاره‌ها کدورتی ایجاد نشده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

- **تجزیه و تحلیل آماری**

تمامی آزمایشات در سه تکرار در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی انجام شد و نتایج به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS.16، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه معنی داری میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دانه دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. همچنین جهت رسم شکل‌ها و نمودارها از نرم افزار Microsoft Excel 2010 استفاده گردید.

۳. نتایج و بحث

در مطالعه حاضر قدرت آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌میکروبی و میزان محتوای فنلی و فلاونوئیدی کل عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی گیاه دارویی مریم گلی تفتانی (Salvia rhytidea) رشد یافته در دو رویشگاه طبیعی استان های کرمان و سیستان و بلوچستان، مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفته است. به‌منظور مقایسه یکسان و همتراز، غلظت تمامی عصاره‌ها برای کلیه آزمایش‌ها، ۱۰۰۰ µg/ml انتخاب شده است. نتایج قدرت کاهندگی و احیاکنندگی رادیکال‌های پایدار DPPH و یون‌های آهن (III) توسط عصاره‌های حاصل مورد آزمایش نشان دادند که در هر دو روش DPPH و FRAP، عصاره‌های متانولی نسبت به سایر عصاره‌ها دارای بیشترین و عصاره آبی دارای کمترین قدرت آنتی‌اکسیدانی و احیاکنندگی را دارا بوده است. به‌طوریکه که می‌توان گفت عصاره متانولی در هر دو رویشگاه دارای بیشترین میزان آنتی‌اکسیدانی بوده است (رویشگاه استان سیستان و بلوچستان ۲/۱۲ µg/ml ±

IC_{50}= ۲۷/۲۸ و mM Fe^{2+}/mg sample ۱/۵۳ ± ۴۹/۱۷ و رویشگاه استان کرمان µg/ml ۱/۷۲ ± ۴۲/۱۸ =IC_{50} و mM Fe^{2+}/mg sample ۱/۱۲ ±۲۳/۲۴). در بین عصاره‌های مورد آزمایش، عصاره آبی دارای حداقل قدرت آنتی‌اکسیدانی برای هردو رویشگاه بوده است (رویشگاه استان سیستان و بلوچستان µg/ml ۵/۱۲ ± ۱۱۴/۱۱ =IC_{50} و mM Fe^{2+}/mg sample ۱/۱۸ ± ۱۱/۴۱ و رویشگاه استان کرمان µg/ml ۴/۱۶ ± ۱۷۳/۱۲ =IC_{50} و mM Fe^{2+}/mg sample ۰/۲۳ ± ۷/۶۶) (جدول ۱). در جدول ۱ مقادیر غلظتی از عصاره‌ها که ۵۰٪ مهار رادیکال‌ها را منجر می‌شوند را در مقایسه قدرت احیاکنندگی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی آسکوربیک اسید و BHT برای گیاه مریم گلی رشد یافته در هر دو رویشگاه استان کرمان و سیستان و بلوچستان آورده شده است. در روش FRAP، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس توانایی احیای یون فریک و یون فروس سنجیده شد که نتایج بر جسب میلی‌مول یون فروس به میلی‌گرم عصاره‌ها گزارش شد.

جدول ۱. نتایج قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف گیاه مریم گلی تفتانی در مقابل BHT و آسکوربیک اسید به دو روش DPPH و FRAP از دو رویشگاه طبیعی کرمان و سیستان و بلوچستان

ع.خ	رویشگاه	روش اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی	نمونه‌های مورد بررسی				
			Ascorbic acid	BHT	عصاره متانولی	عصاره اتانولی	عصاره آبی
۱	سیستان و بلوچستان	DPPH	۱۰/۷۵ ±۰/۹۸	۱۵/۲۶ ±۱/۲۰	۲۷/۲۸ ±۲/۱۲	۵۱/۸۹ ±۵/۵۱	۱۱۴/۱۱ ±۵/۱۲
		FRAP	۶۵/۷۵ ±۳/۲۵	۵۷/۹۶ ±۱/۵۳	۴۹/۱۷ ±۲/۲۱	۲۷/۲۶ ±۲/۲۸	۱۱/۴۱ ±۱/۱۸
۲	کرمان	DPPH	۱۰/۷۵ ±۰/۹۸	۱۵/۲۶ ±۱/۲۰	۴۲/۱۸ ±۱/۷۲	۹۵/۱۷ ±۲/۵۲	۱۷۳/۱۲ ±۴/۱۶
		FRAP	۶۵/۷۵ ±۳/۲۵	۵۷/۹۶ ±۱/۵۳	۲۳/۲۴ ±۱/۱۲	۱۶/۳۱ ±۱/۱۷	۷/۶۶ ±۰/۲۳

محتوای فنلی و فلاونوئیدی کل عصاره‌های مختلف گیاه مورد مطالعه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری و به‌ترتیب به روش‌های معرف فولین سیوکالتیو و رنگ سنجی کلرید آلومینیوم مورد سنجش قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده در جدول ۲، مقایسه مقادیر فنول کل و فلاونوئید کل عصاره‌های مختلف را بر حسب mg GAE/g sample و mgQUE/g sample نشان می‌دهد. یافته‌ها نشان می‌دهند که همانند نتایج حاصل از اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی، عصاره‌های متانولی در هر دو رویشگاه دارای بیشترین میزان فنول و فلاونوئید کل بوده است و همچنان ترتیب میزان فنل و فلاونوئید برای عصاره‌های مورد آزمایش، مشابه ترتیب حاصل از ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی به دو روش DPPH و FRAP بوده است. اما از بین دو رویشگاه، گیاه مریم گلی تفتانی رشد یافته در استان سیستان و بلوچستان دارای بیشترین میزان فنل و فلاونوئید کل در هر سه عصاره بوده است.

برای بررسی فعالیت آنتی‌میکروبی عصاره‌ها از روش دیسک دیفیوژن (انتشار دیسک) و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) استفاده شد و این اثر بر روی سه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیا کلی و دو قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و *کاندیدا آلبیکنس* در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، جنتامیسین و کلوتریمازول مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد، در بین عصاره‌ها، در هر دو رویشگاه‌های کرمان و سیستان و بلوچستان، عصاره‌های متانولی دارای حداکثر اثر مهارکنندگی بوده است و عصاره‌های اتانولی و آبی به‌ترتیب در مرتبه‌های دوم و سوم قرار داشتند. بررسی نتایج حاصل از اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره‌های گیاه مریم گلی تفتانی نشان داد که عصاره‌ها اثر مهارکنندگی قابل ملاحظه‌ای بر روی همه باکتری‌ها و قارچ‌های مورد استفاده دارند بطوریکه این اثر کاملا وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت عصاره‌ها بیشتر شده است. نتایج حاصل از تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی، اتانولی، آبی گیاه مریم گلی تفتانی در هر دو رویشگاه استان کرمان و سیستان و بلوچستان با روش انتشارچاهکی و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) به‌ترتیب در جداول ۳ و ٤ نشان داده شده است.

جدول ۲. مقایسه نتایج حاصل از مقادیر فنل و فلاونوئید کل عصاره‌های مختلف گیاه مریم گلی تفتانی از دو رویشگاه طبیعی کرمان و سیستان و بلوچستان

ردیف	رویشگاه	میزان فنل یا فلاونوئیدکل	عصاره های مورد استفاده		
			عصاره متانولی	عصاره اتانولی	عصاره آبی
۱	سیستان و بلوچستان	فنل‌کل	۳۵/۱۲ ±۲/۱۱	۲۸/۰۸ ±۱/۵۷	۱۳/۶۷ ±۱/۳۴
		فلاونوئیدکل	۲۹/۱۳ ±۱/۱۲	۱۶/۴۸ ±۱/۰۲	۹/۲۳ ±۰/۶۸
۲	کرمان	فنل‌کل	۳۰/۰۲ ±۱/۸۷	۲۱/۱۱ ±۱/۲۳	۱۰/۷۲ ±۱/۲۱
		فلاونوئیدکل	۱۸/۱۶ ±۱/۰۶	۱۳/۸۲ ±۱/۵۲	۶/۱۴ ±۰/۲۴

* فنل و فلاونوئید کل به‌ترتیب بر حسب mg GAE/g sample و mg QUE/g sample می‌باشد.

جدول ۳. قطر هاله عدم رشد میکروبی در غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی گیاه مریم گلی تفتانی در دو رویشگاه طبیعی سیستان و بلوچستان و کرمان با روش انتشار از چاهک (بر حسب میلی‌متر)

میکرو ارگانیسم‌ها	رویشگاه	عصاره	غلظت‌های مورد استفاده (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)								
			۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	آمپی‌سیلین	جنتامیسین	کلوتریمازول	DMSO
استافیلوکوکوس اورئوس	سیستان و بلوچستان	متانولی	۱۵±۱/۵۸	۱۷±۱/۲۸	۱۹±۱/۲۶	۲۲±۲/۲۲	۲۵±۱/۴۱	۳۰±۲/۳۵	۳۱±۱/۷۷	–	۰
		اتانولی	۱۱±۰/۳۸	۱۴±۱/۹۷	۱۶±۱/۰۰	۱۹±۰/۹۰	۱۷±۰/۹۶	۳۰±۲/۰۰	۲۹±۲/۶۴	–	۰
		آبی	۵±۱/۸۱	۱۰±۱/۰۲	۷±۱/۴۸	۹±۱/۲۵	۱۲±۱/۲۱	۲۳±۱/۵۲	۲۵±۲/۸۹	–	۰
	کرمان	متانولی	۱۲±۱/۴۵	۱۴±۱/۱۲	۱۷±۱/۱۸	۲۰±۲/۱۵	۲۳±۱/۴۸	۳۰±۲/۳۵	۳۱±۱/۷۷	–	۰
		اتانولی	۹±۰/۲۱	۱۲±۱/۱۳	۱۴±۱/۱۱	۱۷±۰/۲۱	۱۵±۰/۱۵	۳۰±۲/۰۰	۲۹±۲/۶۴	–	۰
		آبی	۵±۱/۱۲	۶±۰/۱۱	۷±۱/۱۴	۸±۱/۱۲	۱۰±۱/۱۱	۲۳±۱/۵۲	۲۵±۲/۸۹	–	۰
باسیلوس سرئوس	سیستان و بلوچستان	متانولی	۱۴±۱/۱۴	۱۶±۱/۲۱	۱۹±۱/۰۰	۲۲±۱/۵۱	۲۴±۱/۳۲	۲۹±۲/۳۹	۳۰±۲/۱۲	–	۰
		اتانولی	۱۲±۱/۳۹	۱۴±۱/۹۴	۱۷±۲/۰۰	۱۹±۱/۰۶	۱۷±۱/۲۸	۳۰±۱/۷۳	۳۰±۱/۰۰	–	۰
		آبی	۵±۱/۸۹	۱۰±۱/۶۳	۸±۱/۹۰	۱۱±۲/۳۵	۱۳±۰/۹۴	۲۵±۱/۲۴	۲۵±۲/۴۱	–	۰
	کرمان	متانولی	۱۱±۱/۱۵	۱۳±۱/۲۲	۱۶±۱/۱۲	۱۹±۱/۲۵	۲۱±۱/۲۳	۲۹±۲/۳۹	۳۰±۲/۱۲	–	۰
		اتانولی	۱۰±۱/۲۶	۱۲±۱/۱۴	۱۵±۲/۱۱	۱۷±۱/۱۴	۱۵±۱/۱۸	۳۰±۱/۷۳	۳۰±۱/۰۰	–	۰
		آبی	۵±۱/۸۹	۶±۰/۱۳	۷±۰/۱۱	۹±۰/۲۱	۱۱±۰/۲۴	۲۵±۱/۲۴	۲۵±۲/۴۱	–	۰
اشرشیا کلی	سیستان و بلوچستان	متانولی	۱۳±۱/۰۰	۱۴±۲/۰۰	۱۷±۱/۷۰	۱۹±۰/۸۵	۲۱±۲/۰۲	۲۸±۱/۹۴	۳۲±۳/۰۳	–	۰
		اتانولی	۱۰±۱/۵۰	۱۱±۱/۶۶	۱۴±۱/۵۰	۱۷±۰/۹۵	۱۴±۰/۹۵	۲۸±۰/۵۰	۳۱±۲/۰۰	–	۰
		آبی	۷±۰/۸۸	۹±۱/۵۲	۷±۱/۵۲	۸±۲/۲۷	۱۰±۰/۶۹	۲۵±۲/۹۴	۲۵±۱/۱۴	–	۰
	کرمان	متانولی	۱۰±۱/۱۱	۱۱±۲/۱۲	۱۵±۱/۲۵	۱۷±۱/۵۸	۱۹±۲/۰۱	۲۸±۱/۹۴	۳۲±۳/۰۳	-	۰
		اتانولی	۸±۱/۱۲	۹±۱/۲۱	۱۲±۱/۱۴	۱۵±۱/۱۸	۱۲±۱/۱۷	۲۸±۰/۵۰	۳۱±۲/۰۰	–	۰
		آبی	۵±۰/۲۲	۶±۱/۲۱	۷±۰/۱۲	۸±۰/۱۴	۹±۰/۱۹	۲۵±۲/۹۴	۲۵±۱/۱۴	–	۰
آسپرژیلوس نایجر	سیستان و بلوچستان	متانولی	۱۵±۲/۱۲	۱۷±۱/۰۰	۱۹±۲/۵۰	۲۰±۱/۹۷	۲۲±۲/۶۱	–	–	۳۰±۲/۱۸	۰
		اتانولی	۱۲±۱/۳۵	۱۴±۱/۱۲	۱۶±۱/۱۳	۱۸±۱/۱۵	۲۰±۰/۷۲	–	–	۳۰±۰/۵۷	۰
		آبی	۷±۱/۱۴	۸±۰/۸۹	۱۲±۱/۲۶	۱۵±۱/۶۱	۱۸±۱/۹۴	–	–	۲۶±۱/۲۴	
	کرمان	متانولی	۱۲±۲/۱۱	۱۴±۱/۱۵	۱۶±۱/۴۵	۱۷±۱/۲۷	۱۹±۱/۲۱	-	-	۳۰±۲/۱۸	
		اتانولی	۱۰±۱/۲۸	۱۲±۱/۰۲	۱۴±۱/۲۱	۱۶±۱/۴۵	۱۸±۱/۱۲	–	–	۳۰±۰/۵۷	
		آبی	۶±۱/۱۱	۸±۰/۵۸	۹±۱/۲۱	۱۱±۱/۱۱	۱۳±۱/۹۴	–	–	۲۶±۱/۲۴	
کاندیدا آلبیکنس	سیستان و بلوچستان	متانولی	۱۵±۱/۷۷	۱۶±۰/۶۰	۱۹±۱/۹۷	۲۱±۱/۹۷	۲۴±۰/۲۵	–	–	۳۳±۱/۲۴	۰
		اتانولی	۱۲±۱/۷۱	۱۳±۱/۱۱	۱۶±۰/۹۹	۱۸±۰/۸۵	۲۱±۰/۸۰	–	–	۳۳±۱/۵۲	۰
		آبی	۵±۱/۴۵	۷±۱/۱۵	۱۰±۱/۸۸	۱۴±۱/۸۰	۱۶±۱/۹۷	–	–	۲۸±۱/۳۵	۰
	کرمان	متانولی	۱۲±۱/۲۱	۱۳±۰/۱۵	۱۶±۱/۲۸	۱۸±۱/۴۵	۲۱±۱/۲۴	-	-	۳۳±۱/۲۴	۰
		اتانولی	۱۰±۱/۱۱	۱۱±۰/۱۴	۱۴±۱/۱۱	۱۶±۱/۱۴	۱۹±۱/۲۱	–	–	۳۳±۱/۵۲	۰
		آبی	۷±۰/۱۵	۹±۰/۱۲	۱۱±۰/۲۴	۱۳±۰/۲۱	۱۵±۰/۹۱	–	–	۲۸±۱/۳۵	۰

جدول ۴. حداقل غلظت مهارکننده رشد میکروب (MIC) در غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی گیاه مریم گلی تفتانی در دو رویشگاه طبیعی سیستان و بلوچستان و کرمان

میکروارگانیسم‌ها	رویشگاه	عصاره	غلظت‌های مورد استفاده (میلی گرم بر میلی‌لیتر)							
			۱/۵۶	۳/۱۲	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	سیستان و بلوچستان	متانولی	*+	+	**-	-	-	-	-	-
		اتانولی	+	+	+	+	-	-	-	-
		آبی	+	+	+	+	+	+	-	-
	کرمان	متانولی	+	+	+	-	-	-	-	-
		اتانولی	+	+	+	+	+	-	-	-
		آبی	+	+	+	+	+	+	+	-
اسیلوس سرئوس	سیستان و بلوچستان	متانولی	+	+	-	-	-	-	-	-
		اتانولی	+	+	+	-	-	-	-	-
		آبی	+	+	+	+	+	-	-	-
	کرمان	متانولی	+	+	+	-	-	-	-	-
		اتانولی	+	+	+	+	-	-	-	-
		آبی	+	+	+	+	+	+	-	-
اشرشیا کلی	سیستان و بلوچستان	متانولی	+	+	-	-	-	-	-	-
		اتانولی	+	+	+	-	-	-	-	-
		آبی	+	+	+	+	+	-	-	-
	کرمان	متانولی	+	+	+	-	-	-	-	-
		اتانولی	+	+	+	+	+	-	-	-
		آبی	+	+	+	+	+	+	-	-
آسپرژیلوس نایجر	سیستان و بلوچستان	متانولی	+	+	+	-	-	-	-	-
		اتانولی	+	+	+	+	-	-	-	-
		آبی	+	+	+	-	-	-	-	-
	کرمان	متانولی	+	+	+	+	-	-	-	-
		اتانولی	+	+	+	+	-	-	-	-
		آبی	+	+	+	+	-	-	-	-
کاندیدا آلبیکنس	سیستان و بلوچستان	متانولی	+	+	-	-	-	-	-	-
		اتانولی	+	+	-	-	-	-	-	-
		آبی	+	+	+	+	-	-	-	-
	کرمان	متانولی	+	+	+	-	-	-	-	-
		اتانولی	+	+	+	-	-	-	-	-
		آبی	+	+	+	+	+	-	-	-

* توانایی رشد میکروارگانیسم در حضور غلظت مشخص عصاره

** عدم توانایی رشد میکروارگانیسم در حضور غلظت مشخص عصاره

شواهد زیستی فراوان وجود دارد که نشان می‌دهد واکنش اکسیداسیون ناشی از رادیکال‌های آزاد در ایجاد بیماری‌های مختلف، تسریع پیری و فساد مواد غذایی دخالت دارد. مطالعات نشان می‌دهد که روش DPPH یکی از روش‌های ساده، ارزان و آسانی است که می‌تواند در جهت ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها خصوصاً نمونه‌های گیاهی استفاده شود (Sanchez et al., 2007)، لیکن روش FRAP، علاوه بر آسان و ساده بودن، مختص نمونه‌های خاصی نبوده و بطور وسیع در جهت تأیید سایر روش‌های ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی به کار برده می‌شود (Munteanu and Apetrei, 2021). اساس روش ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بوسیله رادیکال DPPH بر مبنای احیای رادیکال پایدار DPPH بوسیله آنتی‌اکسیدان‌ها در محیط می‌باشد که نتیجه این عمل موجب تغییر رنگ از ارغوانی به سمت زرد در محیط می‌شود که شدت آن با دستگاه طیف سنجی قابل اندازه گیری است

(Prevec et al., 2013). با احیای رادیکال DPPH توسط آنتی‌اکسیدان و مشاهده تغییر رنگ، شدت جذب رادیکال‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر کاهش می‌یابد و از روی اندازه‌گیری کاهش این شدت جذب می‌توان خصوصیات آنتی‌اکسیدانی را سنجید. در مقابل، اساس ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP، برمبنای احیای یون آهن (III) به یون آهن (II) در حضور آنتی اکسیدان‌ها است و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به توانایی احیاکنندگی آنتی‌اکسیدان‌ها بستگی دارد. زمانی که احیاکننده واکنش، الکترون خود را اهدا می‌کند ماده‌ای تولید می‌شود که رنگی بوده و به راحتی می‌توان شدت رنگ تولید شده که نشان دهنده پیشرفت واکنش و قدرت آنتی‌اکسیدانی است را اندازه گرفت. جهت انجام این واکنش از یک کمپلکس بنام TPTZ استفاده می‌شود که پس از احیای آهن (III) به آهن (II)، به آن متصل شده و محلول آبی رنگ بوجود می‌آورد که در طول موج ۵۹۵ نانومتر ماکزیمم جذب را دارد. هرچه قدرت احیا کنندگی آنتی‌اکسیدان بیشتر باشد، آهن (II) بیشتری در محیط ایجاد شده که با TPTZ واکنش داده و شدت رنگ و متقابلاً شدت جذب نیز افزایش می‌یابد. متابولیت های ثانویه مشتق از گیاهان مانند فنل‌ها و فلاونوئیدها، رابطه مستقیمی با پتانسیل لازم جهت پاکسازی رادیکال‌های آزاد و یا به عبارتی قدرت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها دارند (Qingming et al., 2010 ; Bergmeier et al., 2014) آزمون حساسیت ضد میکروبی، یکی از تکنیک‌های مهم در علم زیست شناسی مدرن است. این آزمون در پاتولوژی برای تعیین مقاومت سویه‌های میکروبی مشخص به عوامل ضدمیکروبی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد و در پژوهش‌های فارماکولوژیکی از آن برای تعیین کارایی عوامل ضدمیکروب از عصاره‌های بیولوژیکی بر علیه میکروارگانیسم‌های مختلف استفاده می‌شود. روش‌های آزمون حساسیت ضدمیکروبی مختلف توسط محققان در سراسر دنیا به‌کار می‌رود (Balouiri et al., 2016). گزارشات حاکی از آن است که روش استحصال عصاره و حلال مناسب در استخراج ترکیبات ثانویه نقش بسزایی دارند (Lezoul et al., 2020). مطالعات نشان می‌دهد که حلال‌های متانول و اتانول با نفوذ به داخل سلول‌های گیاهان، ترکیبات طبیعی ثانویه شامل فنول‌ها و فلاونوئیدهای بیشتری را استخراج می‌کند و این میزان برای حلال‌هایی نظیر آب، اتیل استات و کلروفرم کمتر است (Khorasani Esmaeili et al., 2015).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که حلال متانول، نقش مهمی در استخراج ترکیبات ثانویه فنلی و فلاونوئیدی داشته است و این ترکیبات منجر به بروز خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی میکروبی شده است به گونه‌ای که عصاره‌های متانولی نسبت به سایر عصاره‌ها، دارای بیشترین میزان فنل و فلاونوئید کل و بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌میکروبی بوده است. از عصاره‌های مورد مطالعه، عصاره متانولی در تمام ارزیابی ها دارای رتبه نخست بوده است. به‌طوریکه در تمام بررسی‌ها در مریم گلی رشد یافته در استان سیستان و بلوچستان شامل میزان فنل کل (۲/۱۱ ± ۳۵/۱۲ mg GAE/g sample)، میزان فلاونوئید کل (۱/۱۲ ± ۲۹/۱۳ mg QUE/g sample) و اثرات آنتی‌اکسیدانی در هر دو روش DPPH و FRAP (IC_{50}= ۲۷/۲۸ ± ۲/۱۲ µg/ml و ۲/۲۱ ± ٤۹/۱۷ mM Fe^{2+}/mg sample) آن بیشتر از سایر عصاره‌ها بوده است. همچنین قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی این گیاه آنقدر بالا بوده که تقریباً نزدیک به قدرت آنتی‌اکسیدانی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی آسکوربیک اسید (۰/۹۸ ± µg/ml IC_{50}= ۱۰/۷۵ و ۳/۳۵ ± ٦۵/۷۵ mM Fe^{2+}/mg sample) و BHT (۱/۲ ± µg/ml IC50= ۱۵/۲٦ و ۱/۵۳ ± ۵۷/۹٦ mM Fe^{2+}/mg sample) در هر دو روش بوده است. در مقابل، عصاره آبی دارای حداقل میزان ترکیبات ثانویه و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی بوده است. میزان فنل کل (۲/۱۱ ± ۱۳/٦۷ mg GAE/g sample) ، میزان فلاونوئید کل (۰/٦۸ ± ۹/۲۳ mg QUE/g sample) و اثرات آنتی‌اکسیدانی در هر دو روش DPPH و FRAP (۵/۱۲ ± µg/ml IC_{50}= ۱۱٤/۱ و ۱/۱۸ ± ۱۱/٤۱ mM Fe^{2+}/mg sample) آن کمتر از سایر عصاره ها بوده است. عصاره اتانولی در جایگاه دوم و مابین عصاره متانولی و آبی بوده است. به‌گونه‌ای که میزان فنل کل آن برابر با ۱/۵۷ ± ۲۸/۰۸ mg GAE/g sample، میزان فلاونوئید کل ۱/۰۲ ± ۱٦/٤۸ mg QUE/g sample و

اثرات آنتی‌اکسیدانی در هر دو روش DPPH و FRAP ۵/۵۱ ± ۵۱/۸۹ =IC_{50} µg/ml و ۲/۲۸ ± ۲۷/۲۶ mM Fe^{2+}/mg sample بوده است. در بررسی عصاره متانولی گیاه مریم گلی تفتانی رشد یافته در استان کرمان، بررسی‌ها نشان داد که میزان فنل کل (mg GAE/g sample ۱/۸۷ ± ۳۰/۰۲)، میزان فلاونوئید کل (mg QUE/g sample ۱/۰۶ ± ۱۸/۱۶) و اثرات آنتی‌اکسیدانی در هر دو روش DPPH و FRAP (µg/ml ۱/۷۲ ± ۴۲/۱۸ =IC_{50} و mM Fe^{2+}/mg sample ۱/۱ ± ۲۳/۲۴) آن بیشتر از سایر عصاره‌ها بوده است. در مقابل، عصاره آبی دارای حداقل میزان ترکیبات ثانویه و فعالیت های آنتی‌اکسیدانی بوده است. میزان فنل کل (mg GAE/g sample ۱/۲۱ ± ۱۰/۷۲)، میزان فلاونوئید کل (mg QUE/g sample ۰/۲۴ ± ۶/۱۴) و اثرات آنتی‌اکسیدانی در هر دو روش DPPH و FRAP (µg/ml ۴/۱۶ ± ۱۷۳/۱۲ =IC_{50} و mM Fe^{2+}/mg sample ۰/۲۳ ± ۷/۶۶) آن کمتر از سایر عصاره‌ها بوده است. عصاره اتانولی در جایگاه دوم و مابین عصاره متانولی و آبی بوده است. به‌گونه‌ای که میزان فنل کل آن برابر با mg GAE/g sample ۱/۲۳ ± ۲۱/۱۱، میزان فلاونوئید کل mg QUE/g sample ۱/۵۲ ± ۱۳/۸۲ و اثرات آنتی‌اکسیدانی در هر دو روش DPPH و FRAP µg/ml ۲/۵۲ ± ۹۵/۱۷ =IC_{50} و mM Fe^{2+}/mg sample ۱/۱۷ ± ۱۶/۳۱ بوده است. نتایج حاصل از سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی به هر دو روش DPPH و FRAP کاملاً یکدیگر را تصدیق و تأیید می‌کنند.

بطور کلی نتایج بررسی فیتوشیمی این دو رویشگاه نشان داد که مریم گلی تفتانی رشد یافته در استان سیستان و بلوچستان به مراتب دارای بیشترین ترکیبات فیتوشیمیایی و اثر آنتی اکسیدانی نسبت به استان کرمان بوده است. بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های گیاه مریم گلی تفتانی علیه باکتری‌ها و قارچ‌های مورد استفاده در این تحقیق نشان داد که در تمام موارد، این اثر وابسته به غلظت بوده و با افزایش آن، این اثر بیشتر شده است. همچنین این نتیجه بدست آمد که از بین سه عصاره متانولی، اتانولی و آبی در هر دو رویشگاه، عصاره متانولی اثر مهارکنندگی بیشتری بر روی باکتری‌ها و قارچ‌های مورد استفاده نسبت به دو عصاره دیگر داشته است و این اثر برای عصاره آبی به مراتب کمتر بوده است. در ارزیابی اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی مریم گلی رشد یافته در استان سیستان و بلوچستان با روش انتشار از چاهک، نتایج نشان می‌دهد که این عصاره بر تمامی باکتری‌های مورد استفاده اثر مهارکنندگی دارد اما بیشترین اثر مهارکنندگی بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با قطر هاله عدم رشد ۱/۴۱ ± ۲۵ میلی‌متر بوده است به گونه‌ای که تقریبا نزدیک به اثر مهارکنندگی آنتی بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و جنتامایسین به‌عنوان استاندارد بوده است. همچنین نتایج نشان دادند که این عصاره توانسته است هر دو قارچ مورد استفاده را مهار کند اما اثر آن با اختلاف اندک، بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس با قطر ۰/۲۵± ۲۴ میلی‌متر بیشتر بوده است. در حالی که اثر ضدقارچی کلوتریمازول به‌عنوان استاندارد ۱/۲۴ ± ۳۳ میلی‌متر بوده است. در بررسی اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره متانولی از همین رویشگاه استان سیستان و بلوچستان به روش MIC، نتایج نشان دادند که در دو باکتری باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی، و قارچ کاندیدا آلبیکنس حداقل غلظت مهار کنندگی ۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. عصاره اتانولی نیز اثر مطلوبی بر روی مهار باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری زا نشان داده‌اند. به‌گونه‌ای که این اثر مشابه عصاره متانولی بوده است. یعنی بر روی باکتری باسیلوس سرئوس و قارچ کاندیدا آلبیکنس دارای بیشترین اثر مهارکنندگی با قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۱/۰۶ ± ۱۹ و ۰/۸۰ ± ۲۱ میلی‌متر داشته است. اما بر خلاف عصاره متانولی، حداقل غلظت مهار رشد (MIC) باکتری باسیلوس سرئوس در آن ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است ولی برای قارچ کاندیدا آلبیکنس همانند عصاره متانولی یعنی ۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده‌است. نتایج حاصل از اثر ضدمیکروبی عصاره آبی کاملا با دو عصاره متانولی و اتانولی متفاوت بوده‌است. بصورتیکه عصاره آبی حداقل فعالیت ضدمیکروبی را نشان داده است. این عصاره توانسته است بیشترین اثر را بر روی باکتری باسیلوس سرئوس با قطر هاله عدم رشد ۰/۹۴ ± ۱۳ میلی‌متر و قارچ آسپرژیلوس نایجر با قطر هاله عدم رشد ۱/۹۴ ± ۱۸ میلی‌متر ایجاد نماید. نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکننده (MIC)

در عصاره آبی نشان داده که در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توانسته است به ترتیب باکتری باسیلوس سرئوس و قارچ آسپرژیلوس نایجر را مهار کند. درحالیکه این اثر برای این گیاه از رویشگاه استان کرمان به مراتب کمتر بوده است. مطالعات متعددی بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریایی و محتوای فنلی و فلاونوئیدی گونه‌های مختلف گیاه مریم گلی صورت گرفته است. لیکن بر روی گونه مریم گلی تفتانی مطالعه گسترده ای صورت نگرفته است. در مطالعه‌ای که بر روی عصاره‌های متانولی و اتانولی و آبی گیاه مریم گلی تفتانی صورت گرفته بود، عصاره متانولی دارای بیشترین میزان فنل، فلاونوئید، فعالیت های آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی داشته است که کاملا با نتایج حاصل از مطالعه ما مطابقت و همخوانی دارد (AzizianShermeh et al., 2018 f). در مطالعه بررسی فعالیت ضد قارچ عصاره استاندارد گیاه مریم گلی تفتانی علیه جدایه‌های مختلف قارچ کاندیدا، نتایج نشان داد که عصاره متانولی به‌علت داشتن ترکیبات سرشار از تانن ها و فلاونوئیدها، اثر مهارکنندکی بسیار خوبی داشته است (Salari et al., 2016). به‌طور کلی رابطه مستقیمی بین فعالیت مهار رادیکال آزاد با میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در گیاهان وجود دارد. به طوری که با افزایش میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در عصاره ها، میزان عملکرد آنتی اکسیدانی عصاره ها افزایش می‌یابد. در غلظت‌های بالاتر عصاره میزان ترکیبات فنولی به دلیل افزایش گروه های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهدای هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره‌ها نیز افزایش می‌یابد. طبق گزارش Mazaraie و همکاران (۲۰۱۸)، ترکیبات فنلی تقریبا در تمام بخش های گیاه وجود دارد و از مهمترین خصوصیات گیاهی که به این گروه نسبت می‌دهند، خاصیت آنتی اکسیدانی بوده که با آن ها امکان از دست دادن هیدروژن و به دام انداختن رادیکال آزاد را می‌دهد. در مطالعه‌ای مشابه، میزان فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه مریم گلی (*Salvia officinalis* L.) به ترتیب ۱۹/۳۲ ، ۱۳۷/۶۱ و ۷۰/۱۵ بوده است، در این پژوهش با افزایش میزان غلظت عصاره، اثر مهارکنندگی و عدم رشد علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی بیشتر شده است (Mazaraie et al., 2018). نتایج مطالعه Yazdi Nezhad and Malekzadeh (2014)، بر روی گونه مریم گلی (Salvia viridis)، نشان داد که میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و IC_{50} به ترتیب ۲۷۲/۲ (میلی‌گرم گالیک اسید در گرم نمونه خشک)، ۱۸۷/۳ (میلی‌گرم کوئرستین در گرم نمونه خشک) و ۱/٤٥ ± ۳۵/۷ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بوده است. بررسی‌های انجام شده بر روی فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره‌های مختلف بسیاری از گونه‌های مریم گلی (Salvia) صورت گرفته نشان می‌دهد که در اغلب موارد این گونه‌ها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی هستند (Kelen and Tepe, 2008). گزارشات نشان می‌دهد که فعالیت آنتی اکسیدانی با خاصیت ضدمیکروبی هم بستگی مثبتی دارد (Amzad Hossain & Dawood Shah, 2015). در تحقیق حاضر عصاره متانولی مریم گلی تفتانی بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و متعاقب آن بیشترین میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت ضدمیکروبی بوده است که با نتایج ارائه شده از سایر پژوهش‌ها مطابقت دارد. نتایج سایر پژوهشگران نیز نشان می‌دهد که وجود مقادیر بالای ترکیبات فنلی در عصاره، با ظرفیت آنتی اکسیدانی بالای آن مرتبط است (Thi and Hwang, 2014). اثر وسیع آنتی باکتریال و ضد قارچ مریم گلی بر طیف وسیعی از باکتری‌ها مانند سودوموناس و آسپرژیلوس و کاندیدا گزارش شده است (Arami et al.,2011). تحقیقات نشان می‌دهد گیاه مریم گلی تفتانی نیز دارای خاصیت ضدمیکروبی مطلوبی است (Azizian-Shermeh et al., 2018 f). در پژوهش‌های جداگانه‌ای، اثر ضدمیکروبی عصاره مریم گلی بر باکتری استافیلوکوکوس (Morello et al., 2004) و اسانس آن بر باکتری اشرشیاکلی (Salimpour et al., 2013) مورد بررسی قرار گرفته است و گزارش شده که عصاره و اسانس مریم گلی بر میکروارگانیسم‌های مورد نظر موثر بوده که کاملا منطبق با نتایج در پژوهش حاضر است. در گزارشی دیگر، که بر روی مریم گلی (*Salvia officinalis* L.) انجام شده است، میزان فنل کل در اسانس گیاه مریم گلی ۱/۸

میلی‌گرم گالیک اسید بر هر میلی لیتر اسانس بوده است و درصد مهار و جذب رادیکال‌های آزاد DPPH، ۹۹/٤۸ درصد بوده است که نشان از فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی این گیاه دارد (Vakili shahrebabaki, 2016). در مطالعه سمیت سلولی و فعالیت ضد میکروبی گل‌های *Salvia officinalis* L.، نتایج نشان داد، فعالیت‌های ضد باکتریایی عصاره متانولی ۷۰٪ در برابر استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس استاروترموفیلوس، میکروکوکوس لوتئوس، اشرشیا کلی و باسیلوس سرئوس قوی‌تر از عصاره آبی است (Elmageed and Hussein, 2008). در تحقیقی مشابه که بر روی فعالیت ضد قارچی بخشهای مختلف گیاه مریم گلی تفتانی به عنوان یک گیاه دارویی با ارزش در برابر گونه‌های مختلف کاندیدا در استان کرمان انجان شد، نتایج حاکی از آن بود که، عصاره متانولی دارای بیشتر حساسیت علیه گونه‌های مختلف قارچ کاندیدا بوده است (Fallah Zahabi et al., 2020). تحقیقات نشان می‌دهد که عصاره اتیل استات در مقابل عصاره هگزان و متانولی، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان فنلی را داشته است. در روش FRAP، عصاره اتیل استات با مقدار (۱۰/۵ ± ۲۳۰/٤) در مقابل عصاره‌های متانولی و هگزانی به ترتیب (۸/۳ ± ۲۱۱/٤ و ۱۲/۰٤ ± ۱٤۳/٤) دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده است. میزان فنل کل در سه عصاره هگزان، اتیل استات و متانولی به ترتیب (۰/۳ ± ۱۳/۸ و ۰/۰۵ ± ۵۸/۲۵ و ۰/۳۸ ± ٤۳/٤۸ میلی‌گرم گالیک‌اسید در ۱۰۰ گرم عصاره خشک) بوده است (Salimikia et al., 2016). طبق تحقیقات به عمل آمده، گیاه مریم گلی نیز به خاطر دارا بودن درصد بالای ترکیبات فنل و فلاونوییدی به عنوان ترکیبات ضدالتهاب، ضدتشنج و آنتی‌اکسیدان، شناخته شده است. این یافته‌ها در تأیید مصارف سنتی این گیاه نیز به‌عنوان ضدالتهاب، آنتی‌اکسیدان، مسکن، مرهم، ضدعفونی زخم و رفع التهابات مفصلی قابل بحث است (Moldovan et al., 2011).

۴. نتیجه گیری

در این تحقیق نشان داده شد که رویشگاه‌های مختلف تأثیر بسزایی در میزان ترکیبات فیتوشیمایی و اثرات بیولوژیکی دارند. همچنین حلال نقش مهم و اساسی در استخراج ترکیبات ثانویه چون فنل ها و فلاونوئیدهای موجود در گیاه دارد و متعاقب آن موجب بروز خاصیت‌های مهم آنتی‌اکسیدانی و آنتی میکروبی آن‌ها می‌شود. نتایج نشان دادند که عصاره‌های متانولی در هر دو رویشگاه دارای بیشترین ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و بیشترین اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی میکروبی بوده‌اند. اما میزان این ترکیبات و اثرات در رویشگاه استان سیستان و بلوچستان بیشتر بوده است. با توجه به اثبات وجود این ترکیبات و خواص مورد بحث، کاربرد هرچه بیشتر این گیاه در زمینه‌های مختلف برای پیشگیری و درمان بیماری‌های ناشی از استرس‌های اکسیداتیوی و رفع و درمان آلودگی‌ها و انتشار بیشتر عوامل عفونت پیشنهاد می‌شود و در جهت مصارف پزشکی و داروسازی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. همچنین با توجه به قدرت مهارکنندگی بالای عصاره‌های مورد استفاده این گیاه علیه میکروارگانیسم‌های مورد استفاده و اثر میکروب‌کشی نزدیک آن‌ها با آنتی بیوتیک‌های مورد آزمایش، گیاه مریم گلی تفتانی می‌تواند جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشند.

۵. منابع

Alamhulu, M. and Nazeri, S. 2015. Investigation of antibacterial and antioxidant activities of alcoholic extracts of flower and root of dendrostellera lesserti on some human pathogenic bacteria. *Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences*, 21(4):277-285. (In Persian)

Amiri, H. 2007. Quantitative and qualitative changes of essential oil of Salvia bracteata Bank et Sol. in different growth stages. *DARU-Journal of Faculty of Pharmacy*, 15(2): 79-82.

Amzad Hossain, M. and Dawood Shah, M.A. 2015. Study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant Merremia borneensis. *Arabian Journal of Chemistry*, 8: 66-71. DOI: https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.01.007

Arami, S., Kermanshah, H., Hashemi, S.S., Mersalehyan, A., Kamalinazhad, M., Karimi, M. and Jabal Ameli, F. 2011. Antibacterial effect of hydroalcoholic extract of Saliva Officinalisand Menta Longifolia on three bacteria causing dental caries under laboratory conditions. *Journal of Dental School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences*, 28(4): 232-237. (In Persian)

Azizian Shermeh, O., Taherizadeh, M., Valizadeh, M. and Zaboli, A. 2018 a. Investigation of antioxidant and antimicrobial activities and phytochemical Compounds of essential oil and different extracts of *Cymbopogon olivieri* (Boiss.) Bor. from Sistan and Baluchestan province. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*, 25(2): 279-292. (In Persian)

Azizian Shermeh, O., Valizadeh, M., Valizadeh, J., Taherizadeh, M. and Beigomi, M.P. 2017 b. Phytochemical investigation and phytosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of Capparis spinosa L. *Biotechnology*, 8(1): 80-90 (In Persian)

Azizian Shermeh, O., Valizadeh, M., Qasemi, A., Mehraban, A. and Kamali deljoo, A. 2017c. Phytochemical, antioxidant and antibacterial activities in Pulicaria gnaphalodes (Vent.) Boiss, *Rhazya stricta* L., *Salvadora persica* L., *Teucrium polium* L., *Hibiscus sabdariffa* L. from Sistan and Baluchestan province. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 5(2): 49-68. (In Persian)

Azizian Shermeh, O, Valizadeh, J., Noroozifar, M., Ghasemi, A. and Valizadeh, M. 2016 d. Optimization, characterization and anti microbial activity of gold nano particles biosynthesized using aqueous extract of *Sambucus ebulus* L. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 4(1): 1-18. (In Persian)

Azizian Shermeh, O., Valizadeh, J., Noroozifar, M. and Qasemi, A. 2016 e. Investigation the antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesis by aqueous extract of *Sambucus ebulus* L. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 25(4): 92-108. (In Persian)

Azizian Shermeh, O., Taherizadeh, M., Valizadeh, M. and Qasemi, A. 2018 f. Robial and antioxidant activities and determining phenolic and flavonoid contents of the extracts of five species from different families of the medicinal plants grown in Sistan and Baluchestan Province. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, 7(4): 465-479. (In Persian)

Balouiri, M., Sadiki, M. and Koraichi Ibnsouda, S. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Pharmaceutical Analysis*, 6(2): 71-79. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005

Bergmeier, D., Berres, P.H.D., Filippi, D., Bilibio, D., Bettiol, V.R. and Priamo, W.L. 2014. Extraction of total polyphenols from Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) and wax weed/'sete-sangrias'(Cuphea carthagenensis) and evaluation of their antioxidant potential. *Acta Scientiarum Technology*, 36: 545-51. DOI: https://doi.org /10.4025/actascitechnol.v36i3.19093

Einali, A., Azizian-Shermeh, O. and Ghasemi, A. 2018. Phytochemical screening and antimicrobial activities of Periploca aphylla Decne, Persian walnut (*Juglans regia* L.) and oleander (*Nerium indicum* Mill.) Leaf extracts. *Food Measure*, 12: 1350-1359. DOI: https://doi.org/10.1007/s11694-018-9749-9

Elmageed, M.A., Hussein, B. 2008. Cytotoxicity and antimicrobial activity of Salvia officinalis L. flowers, Sudan. *Medical Sciences*, 3(2): 127-132. DOI: https://doi.org/10.4314/sjms.v3i2.38526

Fallah, Zahabi, Z., Sharififar, F., Almani, P.G.N. and Salari, S. 2020. Antifungal activity of different fractions of Salvia rhytidea Benth as a valuable medicinal plant against various species of Candida in Kerman Province, southeast Iran. *Gene Reports*, DOI: https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100624

Jamshidi, M., Ahmadi. H.R., Rezazadeh, S., Fathi, F. and Mazanderani, M. 2010. Study on phenolic and antioxidant activity of some selected plant of Mazandaran province. *Medicinal Plants*, 9(34): 177-183. (In Persian)

Kelen, M. and Tepe, B. 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three Salvia species from Turkish flora. *Biotechnology Pharmacal*, 99(10): 4096-4104. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.002

Khorasani Esmaeili, A., Taha, R.M., Mohajer, S. and Banisalam, B. 2015. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of various solvent extracts from In Vivo and In Vitro grown *Trifolium pratense* L. (Red Clover). *BioMed Research International*, 1-11. DOI: https://doi.org/10.1155/2015/643285

Lezoul, N.E.H., Belkadi, M., Habibi, F. and Guillén, F. 2020. Extraction processes with several solvents on total bioactive compounds in diferent organs of three medicinal plants. *Molecules*, 25(20): 4672. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules25204672

Mazaraie, A., Mousavi-Nik, S.M. and Fahmideh, L. 2018. Assessments of phenolic, flavonoid and antioxidant activity of aqueous, alcoholic, methanol and acetone extracts of thirteen medicinal plants. *Nova Biologica Reperta*, 4(4): 299-309. (In Persian). DOI: http://doi.org/10.29252/nbr.4.4.299

Mazandarani, M., Makari, S., Baijan, G.R., Zarghami Moghadam, P. and Abrudi, M. 2011. Evaluation of phytochemical and antioxidant activity in different parts of Heracleum gorganicum Rech. F. in Golestan province, North of Iran. *Iranian Journal of plant physiology*, 2(2): 381-388. DOI: http://doi.org/10.22034 /ijpp.2012.540771

Mobaiyen, H., Jafari Sales, A. and Sayyahi, J. 2016. Evaluating antimicrobial effects of centaurea plant's essential oil on pathogenic bacteria: *Staphylococcus Aureus*, *Staphylococcus Epidermidis*, and *Escherichia Coli* Isolated from Clinical Specimens. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, 5(4): 479-487. (In Persian)

Mohajerani, M. 2012. Antioxidant activity and total phenolic content of *Nerium oleander* L. grown in north of Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(4):1121-1126.

Mohammadi, M., Kazemi tabar, K., Asili, J. and Kamali, H. 2014. Study of the antioxidant and antibacterial activity in methanolic, dichloromethan and hexane extracts of aerial parts of *Cyperus longos*. *North Khorasan University of Medical Sciences*, 6(1):168. DOI: http://doi.org/10.29252/jnkums.6.1.161

Morello, J.R., Motilva, M.J., Tovar, M.J. and Romero, M.P. 2004. Changes in commercial virgin olive oil during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food chemistry*, 85: 357-364. DOI: https://doi.org/10. 1016/j.foodchem.2003.07.012

Pourreza, N. 2013. Phenolic Compounds as Potential Antioxidant. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 8(4): 149-50. DOI: http://doi.org/10.17795/jjnpp-15380

Prevec, T., Segatin, N., Poklarulrih, N. and Cigic, B., 2013. DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. *Talanta*, 109, 13–19. DOI: http://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.046

Qingming, Y., Xianhui, P., Weibao, K., Hong, Y., Yidan, S., Zhang, L., Yanan, Z., Yuling, Y., Lan, D. and Guoan, L. 2010. Antioxidant activities of malt extract from barley (*Hordeum vulgare* L.) toward various oxidative stress invitroand invivo. *Food Chemistry*, 118(1): 84-89. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009. 04.094

Sadeghi, Z., Valizadeh, J. and Aziziam Shermeh, O. 2015. Study of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of Baneh (*Pistacia atlantica*) Gum, from Saravan region, Sistan and Baluchestan province. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal plants*, 3(2): 18-27. (In Persian).

Salari, S., Bakhshi, T., Sharififar, F., Naseri, A. and Ghaseminejad Alami, P. 2016. Evaluation of antifungal activity of standardized extract of Salvia rhytidea Benth. (Lamiaceae) against various Candida isolates. *De Mycologie Médicale*, 26(4):323-330. http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.06.003

Salimikia, I., Reza Monsef-Esfahani, H., Gohari, A.R. and Salek, M. 2016. Phytochemical analysis and antioxidant activity of Salvia chloroleuca aerial extracts. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 18(8), 1-5. DOI: http://doi.org/10.5812/ircmj.24836

Salimpour, F., Mazoji, A., Mazhar, S.F. and Barzen, G. 2013. Comparison of antibacterial properties of essential oils of four species of medicinal plants sage. *Faculty of Medicine*, 37(4): 205-210. (In Persian)

Sanchez, S.C., Gonzalez, G.A.M., Garcia-Parrilla, M.C., Granados, Q.J.J., Serrana, H.L.G. and Martinez, L.M.C. 2007. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*, 593(1): 103–107. DOI: https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.04.037

Shashi, A., Sanjay, K.J., Amita, V., Mayank, K., Alok, M. and Monika, S. 2014. Herbal antioxidant in clinical practice: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(1):78-84. DOI: https://doi.org/10.1016/ S2221-1691(14)60213-6

Thi, N.D. and Hwang, E.S. 2014. Bioactive compound contents and antioxidant activity in Aronia (*Aronia melanocarpa*) leaves collected at different growth stages. *Neutral Food Science*, 19: 204-212, DOI:https:// doi.org/10.3746/pnf.2014.19.3.204

Vakili Shahrebabaki, S.M.A. 2016. Essential oil composition and antioxidant activity of *Salvia officinalis* L. and *Achillea millefoliom* L. from Kerman province. *Ecophytochemistry Journal of Medicinal Plants*, 4(2): 33-43. (In Persian)

Yazdi Nezhad, A.R. and Malekzadeh. M. 2014. Effect of antioxidant properties, total phenolic content, anthocyanins and flavonoids methanol extract of Sage (Salvia viridis) collected from Zanjan. *Zanjan University of Medical Sciences*, 23(96): 100-108. (In Persian).