

Evaluation of antibacterial activity of ethanoloic and methanoloic extracts of *Dracocephalum kotschy* and Mazouj galls

Zarei-Yazdeli M¹, Seyed Ebrahimi SA², Alipanah H^{3*}, Noori M[†]

1- Young Researchers and Elite club, Kashan Branch, Islamic Azad University, Kashan, I.R. Iran.

2- Department of Biology, Faculty of Science, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, I.R. Iran.

3- Department of Laboratory, Shohadaye Ashayer Hospital, Lorestan University of Medical Sciences, Lorestan, I.R. Iran.

Received: 2019/05/17 | Accepted: 2020/07/20

Abstract:

Background: Infections caused by bacterial agents with antibiotic resistance are expanding so that the effectiveness of antibiotics in the treatment has reduced. So, efforts are being made to find new active herbal compounds as an appropriate alternative to antibiotics. This study aimed to evaluation of active antibacterial of ethanol and methanol extracts of *Dracocephalum kotschy* and Mazouj galls against bacteria.

Materials and Methods: This study was performed by standard strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC: 25923), *Escherichia coli* (ATCC: 25922), *Klebsiella pneumonia* (ATCC:10031), *Shigella sonnei* (ATCC: 1188), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC:1310) and *Acinetobacter baumannii* (ATCC:10654). The of ethanol and methanol extracts of *Dracocephalum kotschy* and Mazouj galls were prepared by Soxhlet apparatus. Antibacterial activities of extracts were evaluated well diffusion method. Also minimum inhibitory concentration (MIC) and MBC were assessed by microdilution method. The data obtained by new SPSS software was analyzed.

Results: The ethanol and methanol extracts of *Dracocephalum kotschy* and Mazouj galls showed antibacterial activity against bacteria. MIC results for ethanol and methanol extracts *Dracocephalum kotschy* and Mazouj galls were 125 mg/ml and 12.5 mg/ml for bacteria, respectively.

Conclusion: Ethanol and methanol extract of *Dracocephalum kotschy* and Mazouj galls had good antibacterial activity against tested bacteria. Therefore, the results of this study can be a valuable report regarding their effective role in infection control.

Keywords: Plant Extract, *Dracocephalum kotschy*, Mazouj galls, Antibacterial

*Corresponding Author:

Email: zareih77@gmail.com

Tel: 0098 937 569 4024

Fax: 0098 315 531 0859

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2020; Vol. 24, No 3, Pages 293-301

Please cite this article as: Zarei-Yazdeli M, Seyed Ebrahimi SA, Alipanah H, Noori M. Evaluation of antibacterial activity of ethanoloic and methanoloic extracts of *Dracocephalum kotschy* and Mazouj galls. *Feyz* 2020; 24(3): 293-301.

بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی و متانولی زرین گیاه (*Dracocephalum kotschy*) و گالِ مازوج (*Mazouj galls*)

محدثه زارعی یزدلی^۱، سیدعلیرضا سیدابراهیمی^۲، هانیه علی پناه^{۳*}، مریم نوری^۳

خلاصه:

سابقه و هدف: عفونت های ناشی از عوامل باکتریایی با مقاومت آنتی بیوتیکی در حال گسترش است؛ به گونه ای که کارایی آنتی بیوتیک ها در درمان را کاهش داده است. از این رو تلاش ها جهت یافتن ترکیبات فعال گیاهی جدید به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی بیوتیک ها انجام می پذیرد. این مطالعه با هدف بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی و متانولی زرین گیاه و گالِ مازوج بر روی باکتری ها انجام گرفت.

مواد و روش ها: این مطالعه تجربی، روی سویه های استاندارد باکتری های *استافیلوکوکوس آئروئوس* (ATCC: ۲۵۹۲۳)، *اشرشیا کلی* (ATCC: ۲۵۹۲۲)، *کلبسیلا نومونیه* (ATCC: ۱۰۰۳۱)، *شیگلا سونئی* (ATCC: ۱۱۸۸)، *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC: ۱۳۱۰۰) و *آسیتوباکتر بومانی* (ATCC: ۱۰۶۵۴) انجام گردید. عصاره متانولی و اتانولی به روش سوکسله تهیه شد. فعالیت ضد میکروبی عصاره ها به روش انتشار در چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین کمترین غلظت بازدارندگی (MIC) و کمترین غلظت باکتری کشی (MBC) به روش میکرو دیالوژن بررسی گردید و تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SPSS انجام شد.

نتایج: عصاره های اتانولی و متانولی زرین گیاه و گالِ مازوج، خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری ها از خود نشان دادند. نتایج حاصل از MIC عصاره اتانولی و متانولی زرین گیاه و گالِ مازوج علیه باکتری های مختلف، به ترتیب ۱۲۵ و ۱۲/۵ میلی گرم در میلی متر بود. **نتیجه گیری:** عصاره اتانولی و متانولی زرین گیاه و گالِ مازوج حاوی ترکیبات ضد میکروبی نسبت به باکتری های مورد مطالعه بود. بنابراین نتایج این تحقیق می تواند گزارش ارزشمندی در رابطه با نقش مؤثر آن ها بر کنترل عفونت باشد.

واژگان کلیدی: عصاره گیاهی، زرین گیاه، گالِ مازوج، ضدباکتریایی

دو ماه نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۳، مرداد - شهریور ۱۳۹۹، صفحات ۲۹۳-۳۰۱

مقدمه

بیش از پنجاه سال است که از مصرف آنتی بیوتیک ها برای کنترل و درمان بیماری های عفونی می گذرد، ولی استفاده نادرست و مداوم از این مواد باعث بروز پدیده مقاومت به آنتی بیوتیک و پیدایش سویه های مقاوم شده و درمان بیماری ها را با مشکل مواجه کرده است. پدیده مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها در میان باکتری های بیماری زا موضوعی است که امروزه به عنوان یک مشکل در سراسر جهان مورد توجه قرار گرفته است [۲، ۱]. مقاومت باکتری ها نسبت به عوامل ضد میکروبی مختلف به علت مکانیسم های مقاومت ذاتی و اکتسابی ایجاد می گردد.

مقاومت اکتسابی در نتیجه مواجهه با عوامل ضد میکروبی به دست می آید. استفاده از خاصیت آنتی باکتریال گیاهان رویکرد جدیدی را در مقابله با مقاومت های آنتی بیوتیکی و جایگزین شدن با آن ها پیش رو نهاده است. امروزه در سراسر جهان بالغ بر چهار میلیارد نفر، از گیاهان به عنوان منبع دارویی استفاده می کنند و نیز ۲۵ درصد از داروهای تجویز شده استاندارد توسط پزشکان منشأ گیاهی دارند. گیاهان توانایی نامحدودی در سنتز ترکیبات فنلی و مشتقات آن ها و انواعی از ترکیبات آروماتیک دارند. این ترکیبات، متابولیت های ثانویه گیاهان هستند و اثرات درمانی قابل توجهی علیه ویروس ها، باکتری ها و قارچ ها دارند. بررسی ترکیبات فعال گیاهان دارویی هر منطقه جغرافیایی به منظور کشف مواد مؤثر با خاصیت ضد میکروبی ضروری است [۱۱-۳]. گونه زرین گیاه *Dracocephalum kotschy*، گیاهی چندساله و از تیره نعنائیان (Labiatae) است. زرین گیاه، گیاهی نیمه چوبی به ارتفاع ۱۰ تا ۲۰ سانتی متر و دارای ساقه های چوبی متعدد، ایستاده و محکم و برگ های دم برگ دار و تخم مرغی شکل و گل های بزرگ، سفید یا سفید متمایل به زرد می باشد. زرین گیاه، در مناطق سردسیر و سنگی با ارتفاع ۲۳۰۰ الی ۳۰۰۰ متر از سطح دریا رشد می کند [۳]. در طب سنتی از این گیاه برای درمان دردهای رماتیسمی،

۱. کارشناسی ارشد میکروپزشناسی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کاشان، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، کاشان، ایران
 ۲. کارشناسی بیوتکنولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران
 ۳. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، بیمارستان شهدای عشایر خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، لرستان، ایران
- * **نشانای نویسنده مسئول:**
دانشگاه علوم پزشکی لرستان، بیمارستان شهدای عشایر خرم آباد

دوره بیست و چهارم، شماره ۳، مرداد - شهریور ۱۳۹۹، صفحات ۲۹۳-۳۰۱

تلفن: ۰۹۳۷۵۶۹۴۰۲۴

پست الکترونیک: zareih77@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۸/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۱۱

مواد و روش‌ها

شناسایی و جمع‌آوری گیاه

این مطالعه تجربی از خردادماه تا آبان‌ماه در آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشگاه آزاد واحد کاشان انجام شد. در اردیبهشت‌ماه، برگ‌ها و سرشاخه‌های زیرین گیاه از فریدون‌شهر در ارتفاعات اصفهان جمع‌آوری شدند و پس از تأیید مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان مورد استفاده قرار گرفتند. زیرین‌گیاه در این مرکز توسط متخصصان سیستماتیک کدگذاری و کاملاً شناسایی شد. گیاه در ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد در سایه خشک و سپس پودر گردید. گال مازوج از رویشگاه درختان دارمازوج (*Quercus infectoria*)، واقع در استان لرستان جمع‌آوری شد. شناسایی و تأیید گال مازوج توسط هرباریوم گیاه‌شناسی مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان لرستان انجام شد. گال مازوج به دقت با آب و هیپوکلریت سدیم ده درصد شسته شد. خشک شدن گال در سایه و تحت شرایط استریل انجام شد. سپس این دو گیاه توسط دستگاه آسیاب برقی پودر شدند [۱۰،۹].

تهیه عصاره متانولی و اتانولی

به‌منظور استخراج عصاره متانولی و اتانولی به‌روش سوکسله از ۵۰ گرم پودر زیرین‌گیاه و گال مازوج استفاده گردید. عصاره‌گیری به‌طور جداگانه توسط ۲۵۰ میلی‌لیتر حلال اتانول ۱۰۰ درصد و متانول ۱۰۰ درصد انجام شد. پس از گذشت ۸ ساعت عصاره‌های الکلی به‌دست‌آمده در هوای آزاد در دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا الکل اضافی آن تبخیر شود و عصاره خالص به‌دست آید. سپس عصاره در ویال‌های کدر و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید [۱۲].

تهیه سوش‌های استاندارد

میکروارگانیزم‌های مورد آزمایش که شامل سویه‌های استاندارد *استافیلوکوکوس آرنوس* (ATCC: ۲۵۹۲۳)، *اشرشیا کلی* (ATCC: ۲۵۹۲۲)، *کلبسیلا نومونیه* (ATCC: ۱۰۰۳۱)، *شیگلا سونتی* (ATCC: ۱۱۸)، *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC: ۱۳۱۰) و *آسیتوباکتر بومانی* (ATCC: ۱۰۶۵۴) بودند، به‌صورت لیوفلیزه از کلکسیون میکروارگانیزم‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردیدند. هویت سویه‌های باکتریایی جهت اطمینان، در آزمایشگاه توسط تست‌های بیوشیمیایی مرسوم مربوطه کنترل شدند. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی از کشت تازه و جوان باکتری، چند کلنی به محیط کشت مولر هیتون براث (Himedia، هند) منتقل شد تا کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه‌شده مطابق با لوله شماره ۰/۵ م‌ک‌فارلند

تقویت ماهیچه‌ها و عضلات بدن، التیام زخم‌ها، کاهش چربی خون، تنظیم سیستم ایمنی، خاصیت ضدسرطانی و اثرات ضد میکروبی استفاده می‌شود. اسانس این گیاه از نظر عطر و طعم‌دهی، کاربردهای متنوع و زیادی در بسیاری صنایع مانند آرایشی، عطرسازی، آشامیدنی، بستنی‌سازی، شیرینی‌سازی، محصولات غذایی و... دارد [۵،۴]. همچنین درخت دارمازوج (*Quercus infectoria*)، نوعی درخت بلوط از جنس *Quercus*، تیره *Fagaceae* و راسته *Fagales* می‌باشد. وسیع‌ترین رویشگاه آن جنگل‌های کردستان، کرمانشاه، آذربایجان غربی و لرستان است. در مطالعات فراوانی خواص دارویی بخش‌های مختلف این درخت، از جمله گال‌های آن مورد ارزیابی قرار گرفته است. گال مازوج در اثر فعالیت غیرجنسی زنبور *آندریکوس استیلیچتی* *Andricus stenlichti* از خانواده *Cynipidae*، زیرخانواده *Cynipinae* و طایفه *Cynipini* ایجاد می‌شود. گال، ذخیره غذایی برای میزبان خود می‌باشد و از طرفی دیگر به‌صورت یک سد، نقش حفاظتی برای آن دارد. گال‌ها به‌صورت یک انبار از ترکیبات ثانوی و فنی و دارای خواص ضد میکروبی می‌باشند. مهم‌ترین ماده مؤثره در گال مازوج تانیک اسید است که به مقدار ۵۰ تا ۷۰ درصد ترکیبات آن را تشکیل می‌دهد [۷،۶]. خواص ضد میکروبی عصاره‌های متانولی و اتانولی زیرین‌گیاه و گال مازوج بر طیف وسیعی از باکتری‌ها از مناطق جغرافیایی مختلف گزارش شده است [۹،۸]. فاتحی و همکاران در سال ۱۳۹۷ در مطالعه خود اعلام نمودند که عصاره متانولی و آبی گال مازوج در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث مهار باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* می‌گردد [۱۰]. در مطالعه نزه‌دعلی و همکاران در سال ۲۰۱۰ مشخص گردید که اسانس زیرین‌گیاه بر روی مهار رشد باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مؤثر است [۱۱]. با توجه به وجود مواد فتوشیمیایی گوناگون با پتانسیل ضدباکتریایی قابل ملاحظه در زیرین‌گیاه و گیاه گال مازوج از یک‌سو و معضل جهانی مقاومت دارویی در باکتری‌ها از سوی دیگر، لازم است تا مطالعات آزمایشگاهی در جهت تعیین کیفیت و گستره تأثیر مواد مذکور بر میکروارگانیزم‌های پاتوژن انجام پذیرد. بنابراین هدف از تحقیق حاضر تعیین تأثیر ضدباکتریایی عصاره اتانولی و متانولی زیرین‌گیاه و گال مازوج بر تعدادی از سویه‌های استاندارد باکتری‌های مختلف، شامل *اشرشیا کلی*، *کلبسیلا نومونیه*، *شیگلا سونتی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *آسیتوباکتر بومانی* و *استافیلوکوکوس آرنوس* می‌باشد.

(غلظت معادل $10^6 \times 1/5$ باکتری در هر میلی‌لیتر) تنظیم گردد. برای اطمینان، جذب سوسپانسیون باکتریایی در دستگاه اسپکتروفتومتر (UNIC-UV-2100، آمریکا) در طول موج ۶۳۰ نانومتر در محدوده ۰/۸-۰/۱ تنظیم گردید. سپس ۰/۲ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به $19/8$ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هیتون برات اضافه گردید تا به غلظتی معادل $10^6 \times 1/5$ سلول باکتری برسد [۱۳].

تهیه رقت‌های مختلف از عصاره زرین‌گیا

به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی و اتانولی زرین‌گیا، ۲ گرم عصاره متانولی و اتانولی به لوله حاوی ۴ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هیتون برات حاوی ۲۰ درصد DMSO اضافه شد و خوب شیکر گردید تا کاملاً حل شود. به این ترتیب غلظت عصاره ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. سپس غلظت‌های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ و ۱۵/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه گردید. در این تحقیق اثر ضد میکروبی عصاره متانولی و اتانولی زرین‌گیا به دو روش انتشار چاهک و میکرودايلوشن مورد بررسی قرار گرفت.

تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره گال مازوج

برای تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره‌های اتانولی و متانولی گال مازوج، ۰/۲ گرم از عصاره خشک به دقت وزن و به لوله آزمایش استریلی که حاوی ۴ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هیتون برات حاوی ۲۰ درصد DMSO بود، اضافه شد. محتویات لوله با شیکر به شدت مخلوط گردید تا کاملاً حل شود. به این ترتیب غلظت عصاره ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. سپس مطابق با روش تهیه سری رقت، غلظت‌های ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه گردید.

بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ها به روش انتشار در چاهک

در روش انتشار در چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت $10^6 \times 1/5$ cfu/ml در سطح محیط کشت مولر هیتون آگار به صورت یکنواخت گسترش داده شد. سپس در سطح پلیت توسط پیت پاستور استریل چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر و به فاصله ۲/۵ سانتی‌متر از هم ایجاد گردید. هر یک از چاهک‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های تهیه‌شده عصاره پر شد. شاهد منفی آزمایش، محلول DMSO بود و آنتی‌بیوتیک ایمپینم به منزله شاهد مثبت استفاده گردید. تمامی محیط‌های کشت تلقیح‌شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از مدت معین کشت‌های میکروبی از نظر تشکیل یا عدم تشکیل هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها مورد بررسی قرار گرفت و قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری

گردید. هر سری از آزمایش‌ها برای هر عصاره و هر یک از باکتری‌های مورد بررسی سه بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله عدم رشد محاسبه شد [۱۳].

سنجش حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره

پس از تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره، مقادیر MIC و MBC به روش میکروتیتربلیت تعیین گردید. بدین‌منظور ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت داخل چاهک ستون اول تا دهم میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل اضافه گردید (هر ستون به ترتیب مربوط به یک غلظت). سپس از سوسپانسیون میکروبی با غلظت $10^6 \times 100/5$ cfu/ml، ۱ میکرولیتر در هر چاهک اضافه شد. به ستون شماره ۱۱ به‌عنوان کنترل منفی، ۲۰۰ میکرولیتر محیط مولر هیتون برات اضافه شد. به ستون شماره ۱۲ به‌عنوان کنترل مثبت ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی و ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هیتون برات اضافه گردید. پس از تلقیح، جذب نوری چاهک‌ها توسط دستگاه خواننده الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید. میکروپلیت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت دوباره جذب نوری چاهک‌ها توسط دستگاه خواننده الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید. هر سری آزمایش ۳ بار انجام و میانگین نتایج محاسبه شد. آخرین چاهکی که شفاف بود، یعنی کمترین غلظتی از عصاره که مانع از رشد باکتری شده بود، به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد [۱۴]. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره ۲۰ میکرولیتر از خانه مربوط به MIC و چهار خانه شفاف ماقبل خانه MIC بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت کمترین غلظت از عصاره که باکتری در آن رشد نکرده بود، به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) گزارش گردید.

آنالیز آماری

مقایسه میانگین‌های حاصل از این تحقیق به کمک آزمون‌های آنالیز واریانس دوطرفه و آزمون زوجی بونفرونی با نرم‌افزار SPSS ویرایش هفدهم مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی‌دار آزمون ($P < 0/05$) جهت تفسیر داده‌ها.

نتایج

حساسیت سویه‌های استاندارد نسبت به عصاره متانولی و اتانولی گال مازوج به روش انتشار چاهک مورد بررسی قرار گرفت که نتایج مربوطه در جدول شماره یک ارائه شده است. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که عصاره‌های متانولی

و اتانولی زیرین گیاه و گال مازوج اثر مهار روی تمام باکتری‌های شده است.

مورد بررسی دارند که نتایج آن در جدول‌های شماره ۱ و ۲ ارائه

جدول شماره ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد حاصل از اثر ضد میکروبی غلظت‌های گوناگون عصاره اتانولی و متانولی گال مازوج بر روی باکتری‌ها (برحسب میلی‌متر)

P	شاهد مثبت / ایمینیم	غلظت (mg/ml)				نمونه
		۶۲/۵ $\bar{X} \pm SD$	۱۲/۵ $\bar{X} \pm SD$	۲۵ $\bar{X} \pm SD$	۵۰ $\bar{X} \pm SD$	
۰/۰۳۲	۲۵/۰۰±۲/۶۱	۹/۵۰±۱/۰۰	۱۱/۲۵±۱/۵۰	۱۶/۵۰±۱/۰۰	۱۸/۷۵±۰/۹۵	عصاره متانولی
۰/۰۲۳		۱۰/۵۰±۱/۰۰	۱۲/۲۵±۱/۵۰	۱۷/۵۰±۱/۰۰	۱۹/۷۵±۰/۹۵	عصاره اتانولی
۰/۰۱۲	۲۷/۰۰±۲/۱۲	-	۸/۰۰±۰/۰۰	۱۵/۰۰±۰/۰۰	۱۷/۷۵±۱/۵۰	عصاره متانولی
<۰/۰۰۱		-	۹/۰۰±۰/۰۰	۱۶/۰۰±۰/۰۰	۱۸/۷۵±۱/۵۰	عصاره اتانولی
۰/۰۱۶	۲۸/۰۰±۱/۸۱	-	۱۰/۰۰±۰/۰۰	۱۳/۷۵±۲/۵۰	۱۸/۵۰±۱/۹۱	عصاره متانولی
۰/۰۲۹		-	۱۱/۰۰±۰/۰۰	۱۴/۷۵±۲/۵۰	۱۹/۵۰±۱/۹۱	عصاره اتانولی
۰/۰۱۹	۲۶/۰۰±۲/۳۵	-	۱۰/۵۰±۵/۷۷	۱۷/۲۵±۰/۵۰	۱۸/۷۵±۰/۵۰	عصاره متانولی
۰/۰۳۴		-	۱۱/۵۰±۵/۷۷	۱۸/۲۵±۰/۵۰	۱۹/۷۵±۰/۵۰	عصاره اتانولی
۰/۰۲۵	۲۶/۰۰±۱/۹۴	۸/۵±۴/۰۰	۱۰/۷۵±۰/۵۰	۱۳/۵۰±۱/۰۰	۱۸/۰۰±۲/۱۶	عصاره متانولی
۰/۰۱۸		۹/۵±۴/۰۰	۱۱/۷۵±۰/۵۰	۱۴/۵۰±۱/۰۰	۱۹/۰۰±۲/۱۶	عصاره اتانولی
<۰/۰۰۱	۳۰/۰۰±۲/۱۲	۸/۵±۴/۰۰	۱۰/۰۰±۰/۰۰	۱۹/۲۵±۰/۹۵	۱۹/۵۰±۱/۰۰	عصاره متانولی
۰/۰۲۴		۹/۵±۴/۰۰	۱۱/۰۰±۰/۰۰	۲۰/۲۵±۰/۹۵	۲۰/۵۰±۱/۰۰	عصاره اتانولی

جدول شماره ۲ میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی و اتانولی زیرین گیاه از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه استفاده شد. براساس نتایج این آزمون در مورد عصاره متانولی و اتانولی زیرین گیاه، اختلاف معنی‌داری بین مقدار قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های ۶۲/۵ تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ایمینیم مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). براساس نتایج آزمون تعقیبی با تعدیل یونفرونی، قطر هاله عدم رشد در ایمینیم نسبت به غلظت‌های ۶۲/۵ تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($P < ۰/۰۵$). با توجه به آزمون یونفرونی قطر هاله عدم رشد در بین غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۶۲/۵ و همچنین غلظت‌های ۶۲/۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۲۵۰ با ۵۰۰ ($P < ۰/۰۵$) تفاوت معنی‌داری وجود داشت و از میان چهار غلظت عصاره نیز قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر غلظت‌ها بود ($P < ۰/۰۵$).

جدول شماره ۲ میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی و اتانولی زیرین گیاه را بر روی سویه‌های مختلف باکتری (برحسب میلی‌متر) نشان می‌دهد. همان‌گونه که آزمون آنالیز واریانس دوطرفه نشان می‌دهد اندازه قطر هاله عدم رشد با غلظت‌های مختلف عصاره تأثیر مستقیم دارد ($P < ۰/۰۵$). به عبارت دیگر با افزایش غلظت عصاره اتانولی و متانولی زیرین گیاه، فعالیت ضد میکروبی آن علیه باکتری‌ها افزایش می‌یابد و این بدین معنی است که عصاره متانولی و اتانولی زیرین گیاه دارای اثر ضدباکتریایی می‌باشد. این روند تأثیر بر روی این سویه، حکایت از این دارد که عصاره متانولی و اتانولی در غلظت‌های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ و ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای اثر ضدباکتریایی بر روی سویه‌های استاندارد می‌باشد. در غلظت‌های کمتر از ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هاله عدم رشدی مشاهده نشد. به منظور مقایسه قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های ۶۲/۵ تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در

جدول شماره ۳- حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره متانولی و اتانولی گال مازوج و زرین گیاه بر روی باکتری‌های مختلف (میلی گرم بر میلی لیتر)

عصاره متانولی و اتانولی زرین گیاه		عصاره متانولی و اتانولی گال مازوج		باکتری مورد آزمایش
MBC	MIC	MBC	MIC	
۲۵۰	۱۲۵	۲۵	۱۲/۵	سودوموناس آئروژینوزا (ATCC: ۱۳۱۰)
۲۵۰	۱۲۵	۲۵	۱۲/۵	آسیتوباکتر بومانی (ATCC: ۱۰۶۵۴)
۲۵۰	۱۲۵	۲۵	۱۲/۵	شیگلا سونتی (ATCC: ۱۱۸۸)
۲۵۰	۱۲۵	۲۵	۱۲/۵	کلبسیلا نومونیه (ATCC: ۱۰۰۳۱)
۲۵۰	۱۲۵	۲۵	۱۲/۵	اشرشیا کلی (ATCC: ۲۵۹۲۲)
۱۲۵	۶۲/۵	۱۲/۵	۶/۲۵	استافیلوکوکوس آئروس (ATCC: ۲۵۹۲۳)

عصاره متانولی و اتانولی را استافیلوکوکوس آئروس نشان داد. احتمالاً تفاوت حساسیت باکتری‌های گوناگون به مواد ضد میکروبی به علت ساختار متفاوت میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. با توجه به مطالعه‌ای که توسط McKeegan و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام گرفت، باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت در برابر عصاره‌ها مقاوم‌ترند و علت تأثیر متفاوت بر رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ممکن است به دلیل تفاوت ساختاری موجود بین دیواره این دو گروه از باکتری‌ها باشد. باکتری‌های گرم منفی واجد غشای خارجی هستند که مانند سدی از عبور مولکول‌های بزرگ و آب‌گریز جلوگیری می‌کند. به علاوه اکثر ترکیبات مؤثر موجود در عصاره‌ها آب‌گریزند، و این مواد امکان ورود و دسترسی به نقاط فعال درون باکتری‌های گرم منفی را ندارند و از طرف دیگر دارای آنزیم‌هایی در فضای پری پلاسمیک می‌باشند که قادرند مولکول‌های خارجی را تجزیه کنند [۱۵]. به همین دلیل معمولاً باکتری‌های گرم منفی مقاومت بیشتری نسبت به این ترکیبات نشان می‌دهند. در همین رابطه بررسی‌های اولیه محققان تأثیر مهاری عصاره گال مازوج را بر رشد برخی باکتری‌ها تأیید نمودند. نتایج حاصل از مطالعه ما با نتایج مطالعه فاتحی هماهنگ است. او نیز در مطالعه خود اعلام نمود که عصاره متانولی و آبی گال مازوج در غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا (ATCC: ۹۰۲۷) به ترتیب هاله عدم رشد ۱۸ و ۱۹ میلی متر ایجاد می‌کند. این نتایج گویای این نکته است که ماده مؤثره موجود در عصاره گال مازوج همانند مطالعه حاضر اثر ضد میکروبی بسیار خوبی بر روی سودوموناس آئروژینوزا دارد [۱۰]. همان گونه که ذکر شد، مهم‌ترین ماده مؤثره در گال مازوج تانیک اسید است که به مقدار ۵۰ تا ۷۰ درصد ترکیبات آن را تشکیل می‌دهد. تانن‌ها دارای خواص مختلف می‌باشند که از جمله آن‌ها می‌توان به ضدباکتریایی بودن آن‌ها اشاره کرد. مکانیسم اثر تانن‌ها بر باکتری‌ها از طریق لیز غشای سلول و همچنین اتصال با

در جدول شماره ۳ مشخص گردید که حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی و اتانولی گال مازوج برای باکتری‌های گرم منفی ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی و اتانولی زرین گیاه برای باکتری‌های گرم منفی ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود. هر دو عصاره، بیشترین تأثیر را روی باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس آئروس) داشتند.

بحث

امروزه، درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها، همواره نگرانی عوارض جانبی دارو را به همراه دارد. گیاهان دارویی با داشتن مزیت‌های متعددی از قبیل ارزان و قابل دسترس بودن، سازگاری با طبع و پذیرش بهتر توسط بیماران، برای درمان بیماری‌ها از جمله عفونت‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. در سال‌های اخیر با توجه به افزایش مقاومت میکروبی به آنتی‌بیوتیک‌ها و شناخت بیشتر عوارض جانبی ترکیبات سنتتیک شیمیایی، تمایل زیادی در مردم به استفاده از محصولات گیاهی با خواص ضد میکروبی ایجاد شده است. گیاهان دارویی شامل ۲۰۰۰ گونه گیاهی هستند که منابع باارزشی برای تهیه داروهای سالم در جهان محسوب می‌شوند. زرین گیاه و گال مازوج از جمله گیاهانی هستند که در طب سنتی کاربرد فراوانی دارند [۲، ۱]. در این پژوهش با دو روش کیفی (انتشار چاهک) و کمی (میکرودایلوشن) نشان داده شد عصاره گیاه از رشد باکتری‌های مورد آزمایش جلوگیری می‌کند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد در روش چاهک، اندازه قطر هاله عدم رشد با مقدار غلظت عصاره تأثیر مستقیم دارد ($P < 0.05$). همچنین در این روش، میانگین قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های مختلف با هم تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) و به عبارت دیگر، نوع باکتری بر قطر هاله عدم رشد مؤثر بود. بیشترین حساسیت به

سوتیلیس به ترتیب برابر ۲/۵، ۱/۲۵ و ۰/۶۲ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد [۲۰]. مطالعه ما در مقایسه با مطالعات Satirapathkul اثر ضدباکتریایی کمتری نشان می دهد. علت تفاوت در نتایج مذکور به دلیل تفاوت در جدایه باکتری مورد آزمون در درجه نخست و پس از آن تفاوت در رویشگاه گال و نوع گال مورد بررسی می باشد، چراکه تمامی این موارد بر مقدار ترکیبات مؤثره گال مؤثر هستند. همچنین در مطالعات مختلف تأثیر مهاری عصاره زرین گیاه بر رشد باکتری ها تأیید شد. در مطالعه انجام شده توسط نزهت علی در سال ۲۰۱۰ ترکیبات فعال اسانس زرین گیاه و خاصیت ضد میکروبی ریشه گیاه بررسی شد. اسانس عصاره متانولی جهت بررسی فعالیت ضدباکتری علیه دو گونه از باکتری های گرم مثبت و دو سویه از باکتری های گرم منفی با استفاده از روش انتشار در آگار استفاده شد. نتایج نشان داد که اسانس مؤثرتر از عصاره متانولی است، اسانس فعالیت قوی در برابر *استافیلوکوک اورئوس* و *اشرشیا کلی* و فعالیت متوسطی در برابر *باسیلوس سوتیلیوس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* داشت [۱۱]. مهم ترین ترکیبات موجود در زرین گیاه شامل: تیمول، کارواکرول، منتول، بتا - پین و لینالول می باشند. این ترکیبات دارای فعالیت ضدباکتری هستند، احتمالاً اثر ضدباکتری عصاره زرین گیاه در مطالعه حاضر و نزهت علی به علت وجود این مواد مؤثره می باشد. در مطالعه اشرفی و همکاران در سال ۱۳۹۵، خواص ضدباکتریایی اسانس زرین گیاه بر باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* در مقایسه با داروی ونکومایسین سنجیده شد. نکته قابل توجه در این پژوهش میزان حداقل کشندگی اسانس زرین گیاه بود که با داروی ونکومایسین برابری می کرد. اسانس موجود در زرین گیاه در غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر باعث مهار رشد *استرپتوکوکوس موتانس* شد [۲۱]. مطالعه ما در مقایسه با مطالعه اشرفی اثر ضدباکتریایی کمتری نشان می دهد. علت تفاوت در نتایج مذکور به دلیل تفاوت در نوع باکتری مورد آزمون در درجه نخست و پس از آن تفاوت در نوع عصاره و اسانس مورد بررسی می باشد. مطابق با تحقیقات انجام شده ویژگی حلال بسته به درجه خلوص و قطبیت آن، کمیت ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره های گیاهی را تحت تأثیر قرار خواهد داد [۱۶]. در مطالعه اشرفی اسانس زرین گیاه بر *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC: ۲۷۸۵۳)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC: ۱۲۶۰۰)، *اشرشیا کلی* (ATCC: ۱۱۷۷۵) و *کلبسیلا نومونیه* (ATCC: ۲۷۸۵۳) به ترتیب هاله عدم رشد ۱۰، ۲۱، ۱۵ و ۱۸ میلی متری ایجاد کرده است. حداقل غلظت مهارکننده اسانس زرین گیاه *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC: ۲۷۸۵۳) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC: ۱۲۶۰۰)،

ترکیبات سلول باکتری ها و غیرفعال سازی آنزیم ها، اتصال به ادهزین ها و ایجاد کمپلکس با دیواره سلولی عمل می باشد. تان ها همچنین می توانند سوسترای آنزیم ها را برای میکروارگانیزم ها غیرقابل دسترس کنند [۱۶]. بنابراین به نظر می رسد اثرات ضدباکتریایی گال های مازوج در تحقیق حاضر و فاتحی مرهون این ترکیبات است. در مطالعه چهارمیری در غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره آبی گال مازوج قطر هاله عدم رشد برای *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC: ۱۰۷۴۱)، *استیتوباکتر بومانی* (NCTC: ۱۳۳۰۴) و *اشرشیا کلی* (ATCC: ۱۲۷۰) به ترتیب برابر با ۲۶، ۲۴، ۲۳ میلی متر به دست آمد. حداقل غلظت مهاری برای عصاره آبی گال های مازوج بر روی تمامی باکتری ها در محدوده ۱/۰۲۴-۱/۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر بود [۱۷]. در مطالعه حاضر در غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره متانولی گال مازوج میانگین قطر هاله عدم رشد برای *سودوموناس آئروژینوزا*، *استیتوباکتر بومانی* و *اشرشیا کلی* به ترتیب ۱۸/۷۵، ۱۷/۷۵ و ۱۸ میلی متر به دست آمد. با مقایسه نتایج درمی یابیم که عصاره آبی گال مازوج در مطالعه چهارمیری دارای اثر ضدباکتریایی بهتری نسبت به مطالعه ما می باشد. این تفاوت شاید به دلیل تفاوت در نوع عصاره آبی و الکلی مورد بررسی باشد. همان گونه که اشاره شد ترکیب اصلی گال مازوج، تانیک اسید می باشد. تان ها ترکیب های فنولیک و قابل حل در آب می باشند. بنابراین به علت قابل حل بودن این ترکیبات در آب، شاهد اثر ضدباکتریایی بهتر عصاره آبی نسبت به عصاره الکلی بودیم. در مطالعه Darogha در سال ۲۰۰۹، حداقل غلظت مهاری عصاره آبی و متانولی گال *کورکوس اینفکتوریا* روی *سودوموناس آئروژینوزا* ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش گردید. در مطالعه ما حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی و اتانولی گال مازوج ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش گردید. مطالعه ما در مقایسه با مطالعه فوق اثر ضدباکتری بهتری نشان می دهد. این اختلاف ممکن است به نوع گال مورد بررسی مربوط باشد، زیرا ترکیبات موجود در گال تحت تأثیر نوع، منطقه و زنبور گالزا با هم تفاوت دارند [۱۸]. در مطالعه Vermani و همکارانش میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی و عصاره آبی گال های *کورکوس اینفکتوریا* روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۲۵ و ۲۴ میلی متر به دست آمد. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی و عصاره آبی روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۰/۰۷۶ و ۰/۱۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر بود [۱۹]. همچنین در مطالعه Satirapathkul و همکارانش حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی گال *کورکوس اینفکتوریا* بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس*

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از آزمایش‌ها انتشار چاهک و میکرودايلوشن و مقایسه این نتایج می‌توان ادعا کرد، عصاره‌های متانولی و اتانولی زرین گیاه و گال مازوج اثر مهاری بسیار مطلوبی در رشد سویه‌های استاندارد باکتری‌ها به خصوص *استافیلوکوکوس آرنوس* که در ایجاد انواع عفونت‌های مخرب و بیمارستانی مؤثر هستند، دارند؛ همچنین عصاره‌های متانولی و اتانولی زرین گیاه و گال مازوج در مقایسه با آنتی‌بیوتیک به کار رفته اثر مهاری قابل توجهی داشت. یافته مورد توجه دیگر در این مطالعه تجربی بر این صحنه می‌گذارد که عصاره متانولی و اتانولی گال مازوج مؤثرتر از زرین گیاه عمل می‌کند و می‌تواند جایگزین مناسب و مؤثرتری به عنوان ماده ضد میکروبی در مقایسه با زرین گیاه باشد. با توجه به اثرات ضدباکتریایی قابل ملاحظه عصاره‌های متانولی و اتانولی زرین گیاه و گال مازوج بر باکتری‌های بیماری‌زا پیشنهاد می‌گردد بررسی‌های وسیع‌تری در شرایط *in vitro* انجام گیرد تا غلظت مؤثر این عصاره بر باکتری‌های موردنظر و سویه‌های بالینی، اثرات جانبی و نیز فرمولاسیون دقیق آن ارزیابی شود و بررسی‌هایی در شرایط *in vivo* نیز بر روی موش‌های آزمایشگاهی انجام شود. سپس با توجه به مشخص شدن میزان خواص ضدباکتریایی عصاره گیاه پس از تأیید آزمایش‌های مربوطه و صدور مجوز، توسط وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، به خالص‌سازی ترکیبات عصاره و تولید قطره‌های گیاهی با خاصیت آنتی‌باکتریال پرداخته شود تا بتوان از آن به جای داروهای شیمیایی در درمان برخی بیماری‌ها استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشان و تمامی کسانی که در طول اجرای این پژوهش ما را یاری کردند، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود. شایان ذکر است که این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی خانم محدثه زارعی یزدلی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشان می‌باشد.

References:

- [1] Gangoue-Pieboji J, Koulla-Shiro S, Ngassam P, Adio D, Njine T, Ndumbe P. Antimicrobial activity against gram negative bacilli from Yaounde Central Hospital, Cameroon. *Afr Health Sci* 2006; 6(4): 232-5.
- [2] Zargari A. Medicinal plants. 6th ed. Tehran Univ.; 1997. p. 541. [in Persian]
- [3] Mozaffarian V. Trees and Shrubs of Iran. 3th ed. Tehran: Farhang Moaser; 2005. p. 991. [in Persian]

اشرشیا کلی (ATCC: ۱۱۷۷۵)، کلبسیلا نومونیه (ATCC: ۲۷۸۵۳) به ترتیب ۳۲۰، ۱۶۰، ۳۲۰ و ۶۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شده است که از نظر خاصیت ضد میکروبی بسیار کمتر از حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی زرین گیاه در مطالعه حاضر علیه باکتری‌ها است. علت تفاوت در نتایج مذکور به دلیل تفاوت در سویه باکتری مورد آزمون و یا تفاوت در روشگاه گیاه است، چرا که ترکیب اسانس‌های به دست آمده از یک گونه خاص گیاهی براساس جغرافیای منطقه، فصل برداشت، سن گیاه و مرحله رشد متفاوت است. همچنین ترکیب اسانس به دست آمده از بخش‌های مختلف یک گیاه خاص نیز می‌تواند به طور قابل ملاحظه‌ای متفاوت باشد [۹]. در مطالعه یعقوبی و همکاران اسانس *Drachoccephalum polychaetum* پلی‌چاتوم بر روی ۲۰ نمونه *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین هاله عدم رشد در ۴۰ درصد از نمونه‌ها کمتر از ۱۲ میلی متر بود و در ۳۵ درصد نمونه‌ها ۱۵-۱۱ میلی متر و در ۲۵ درصد موارد بیش از ۱۵ میلی متر بود [۲۲]. با مقایسه نتایج این دو مطالعه در می‌یابیم قطر هاله عدم رشد اسانس بسیار کمتر از عصاره متانولی زرین گیاه در مطالعه حاضر علیه باکتری‌هاست و این احتمالاً ناشی از تفاوت در گونه گیاهی، نوع عصاره و نوع باکتری مورد بررسی باشد. در مطالعات مختلف ذکر شده است ویژگی حلال، ترکیبات شیمیایی عصاره‌های گیاهی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. سمیت کم حلال، سهولت تبخیر در دمای کم و عدم تشکیل پیوند با ترکیبات فعال موجود در عصاره یا تخریب آن‌ها از ویژگی‌های مناسب حلال در تهیه عصاره‌های گیاهی است. بنابراین بسته به نوع هدف که ماده استخراجی قطبی یا غیرقطبی است نوع حلال نیز متفاوت خواهد بود. تقریباً همه ترکیبات ضد میکروبی شناخته شده گیاهی، آروماتیک یا ترکیبات آلی هستند و بیشتر از طریق حلال‌های اتانولی و متانولی استخراج می‌شوند. همچنین عصاره‌های تهیه شده با حلال‌های آلی، اثر ضد میکروبی پایدارتر و بیشتری دارند. زیرا بیشتر ترکیبات فعال ضد میکروبی شناخته شده، در آب نامحلول هستند و بنابراین عصاره‌های حاصل از حلال‌های آلی برای استخراج ترکیبات ضد میکروبی توانمندی بیشتری دارند.

- [4] Golshani S, Karamkhani F, Monsef-Esfehani HR, Abdollahi M. Antinociceptive effects of the essential oil of *Dracocephalum kotschy* in the mouse writhing test. *J Pharm Pharm Sci* 2004; 7(1): 76-9.
- [5] Saeidniaa S, Goharia AR, Itob M, Kiuchic F, Hondab G. Bioactive constituents from *Dracocephalum subcapitatum* (O. Kuntze). *Z Naturforsch C* 2005; 60(1-2): 22-4.

- [6] Sadeghi S, Melika G, Pujade-Villar J, Penzes Z, Acs Z, Bechtold M, et al. Oak cynipid gall inquilines of Iran (Hym.: Cynipidae: Synergini), with description of new species. *J Entomol Society Iran* 2006; 25(2):15-50.
- Taherpour A, Hashemi A, Erfanimanesh S, Taki E. Efficacy of methanolic extract of green and black teas against extended-spectrum beta-Lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Pak J Pharm Sci* 2016; 29(4):1257-61.
- [8] Rao N, Mittal S, Sudhan S, Menghani E. In vitro Phytochemical screening, antioxidant & antimicrobial activity of the methanolic extract of *Quercus infectoria* L. *Int J Pharm Sci* 2013;5(2):273-7.
- [9] Ashrafi B, Ramak P, Ezatpour B, Talei GH. Investigation on Chemical Composition, Antimicrobial, Antioxidant, And Cytotoxic Properties of Essential Oil from *Dracocephalum kotschy* Boiss. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2017; 14(3): 209-17.
- [10] Fatehi S, Mohammadi-Sichani M, Tavakoli M. Evaluation of Antimicrobial and Anti-Quorum Sensing Activity of Mazouj and Ghalghaf Galls Extracts of Oak against *Pseudomonas aeruginosa*. *Qom Univ Med Sci J* 2018; 12(10): 36-45. [in Persian]
- [11] Nezhadali A, Khazaeifar A, Akbarpour M, Masrournia M. Chemical Composition of Essential Oil and Antibacterial Activity of *Dracocephalum subcapitatum*. *J Essent Oil Bear Pl* 2010; 13(1): 112-17.
- [12] Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* 2016; 6(2): 71-9.
- [13] Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 2008; 3(2): 163-75.
- [14] Fazel H, Ahmad N, Ullah I, Inayat H, Khan L, Heidar B. Antibacterial potential in parthenium hysterophorus, stevia rebaudiana and *Ginkgo biloba*. *Pakistan J Bot* 2011; 3(2): 1307-13.
- [15] McKeegan KS, Borges-Walmsley MI, Walmsley AR. Microbial and viral drug resistance mechanisms. *Trends Microbiol* 2002; 10(10): S8-14.
- [16] Dholwani K, Saluja AK, Gupta AR, Shah DR. A review on plant-derived natural products and their analogs with anti-tumor activity. *Indian J Pharmacol* 2008; 40: 49- 58.
- [17] Chaharmiri Dokhaharani S, Karbasizadeh, Mohammadi-Sichani M, Tavakoli M. Antibacterial activity of aqueous extracts of Mazuj and Ghalghaf galls of *Quercus infectoria* in Lorestan forests. *Yafteh* 2013; 15(2): 43-51. [in Persian]
- [18] Darogha SN. Antibacterial activity of *Quercus infectoria* extracts against bacterial isolated from wound infection. *J Kirkak Uni* 2009; 4(1): 20-30.
- [19] Vermani A, Navneet, Prabhat. Screening of *Quercus infectoria* gall extracts as antibacterial agents against dental pathogens. *Indian J Dent Res* 2009; 20(3): 337-9.
- [20] Satirapathkul T. Leela. Growth inhibition of pathogenic bacteria by extract of *Quercus Infectoria* galls. *Int J Biosci Biochem* 2011; 1(1): 26-31.
- [21] Ashrafi B, Ramak P. Evaluation of the Effect of Essential Oil *Dracocephalum kotschy* Herbs on *Streptococcus Mutans* in Comparison with Vancomycin. *The 3th National Congress on Biology and Natural Sciences of Iran*, 2017, Tehran, Iran.
- Available at: https://www.civilica.com/Paper-BSCONF03-BSCONF03_170.html. [in Persian]
- [22] Yaghoobi MM, Khaleghi M, Rezanejad H, Parsia P. Antibiofilm Activity of *Dracocephalum polychaetum* Extract on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Avicenna J Clin Microb Infec* 2018; 5(1): e61772.