



## Investigating the effect of ethanolic and methanolic extracts of *Hyssopus officinalis* L on bacteria isolated from urinary and skin infections

**Fatemeh Nooraei**<sup>1\*</sup>, Ehsan Nazifi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Faculty of Science, University of Mazandaran, Babolsar, Mazandaran province, Iran

<sup>2</sup> Department of Botany, Faculty of Science, University of Mazandaran, Babolsar, Mazandaran province, Iran

Received Date:2025.03.12 Accepted Date:2025.06.04

### Abstract

Nowadays, bacterial urinary and skin infections are highly prevalent. The emergence of antibiotic resistance in many strains involved in these infections has increased the need to explore alternative treatments. Plant extracts exhibit antibacterial effects against a wide range of bacteria and hold significant potential for the development of new drugs, making them a suitable alternative to antibiotics. The aim of this study was to investigate the antibacterial effects of methanolic and ethanolic extracts of *Hyssopus officinalis* (hyssop) against certain bacterial strains. This plant has a long history of use in traditional medicine for treating various infections. The extraction was performed using maceration in methanol and ethanol solvents for 24 hours on a shaker at 100 rpm and room temperature. The antibacterial effects of the extracts were evaluated at concentrations ranging from 256 to 1 mg/mL using the disk diffusion method, and concentrations from 50 to 0.19 mg/mL were used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against some pathogenic bacteria. The collected data were analyzed using SPSS software, one-way ANOVA, and Duncan's post-hoc test at a significance level of 0.05. The methanolic and ethanolic extracts of hyssop exhibited antibacterial effects against the tested bacteria. In most cases, the methanolic extract showed stronger antibacterial activity than the ethanolic extract. The antibacterial effect of hyssop extract was more pronounced against Gram-positive strains compared to the studied Gram-negative strains. The most sensitive bacterium to hyssop extract was *Staphylococcus aureus*, while the most resistant was *Escherichia coli*. *Hyssopus officinalis* demonstrated significant antibacterial effects against the bacteria examined in this study. However, its therapeutic application requires further research in areas such as the extract's impact on normal skin or gut flora, as well as determining safe and effective dosages for treatment.

**Keywords:** *Hyssopus officinalis*, methanolic extract, ethanolic extract, antibacterial effects

\* f.nooraei14@ uemail.umz.ac.ir

## EXTENDED ABSTRACT

### Background and Objectives:

The escalating prevalence of urinary and skin bacterial infections, coupled with the emergence of antibiotic resistance in numerous pathogenic strains, has necessitated the exploration of alternative therapeutic strategies. Traditional medicine, with its rich repository of plant-derived compounds, presents a promising avenue for combating these infections. *Hyssopus officinalis* L., a medicinal herb with a long history of use in traditional medicine, has garnered attention for its potential antimicrobial properties. This study aimed to investigate the antibacterial effects of methanolic and ethanolic extracts of *H. officinalis* against a panel of bacterial strains implicated in urinary and skin infections, thereby providing a scientific basis for its traditional applications.

### Materials and Methods:

#### Plant Material and Extraction:

The aerial parts of *H. officinalis* were collected, identified, and subjected to maceration using methanol and ethanol as solvents. This extraction technique was chosen to maximize the yield of bioactive compounds with varying polarities. The resulting extracts were concentrated and stored under controlled conditions to preserve their integrity.

#### Bacterial Strains:

The bacteria used included gram-negative strains of *S. baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*, and gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermis*, identified from clinical samples from the microbiology department of Razi Hospital in Qaemshahr city. These bacteria were confirmed using standard methods and transferred to the microbiology research laboratory.

#### Antibacterial Assays:

##### Disc Diffusion Test:

The desired extract was diluted in a series of 9 tubes, then the required number of blank discs manufactured by Padtan Teb Company were placed in each tube. After half an hour, they were removed and dried in a 37°C incubator. The concentrations of the plant extract were 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, and 1 mg/mL, respectively. The antibiotic streptomycin and dimethyl sulfoxide solution were used as positive and negative controls. These steps were performed for both ethanolic and methanolic extracts. Microbial standard suspensions made using a spectrophotometer were cultured on the surface of Mueller Hinton agar culture medium using a sterile swab. After 5 minutes, the desired discs were placed on the surface of the culture medium to absorb the relative humidity of the culture. After 18-24 hours, the diameter of the formed growth zones was measured.

##### Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC):

Mueller Hinton Broth culture medium was prepared and different concentrations of extract were prepared from 0.19-50 mg/ml (from number 1 to 9). Well 10 is the bacterial control. Well 11 is the culture medium control. Well 12 is the extract control. After the incubation time, the lowest dilution of the extract in which no bacterial growth occurred (no turbidity) was considered as the MIC. Also, to determine MBC, samples were taken from each concentration in which no turbidity was observed and cultured on the surface of BHI agar medium and after 24 hours of incubation at 37°C, bacterial growth was examined. The concentration of the extract in which 99.9% of microbial cells were reduced or no bacteria grew was considered as the minimum lethal concentration. All steps were performed for ethanolic and methanolic extracts.

### Results:

#### Antibacterial Activity:

Both methanolic and ethanolic extracts of *H. officinalis* exhibited antibacterial activity against all tested bacterial strains. The methanolic extract generally demonstrated higher antibacterial efficacy compared to the ethanolic extract, suggesting that the active compounds responsible for the antibacterial effects are more soluble in methanol. However, the ethanolic extract showed greater activity against *Pseudomonas aeruginosa*, indicating variations in the extract's efficacy against different bacterial species.

#### **Gram-Positive vs. Gram-Negative Bacteria:**

The extracts exhibited greater antibacterial activity against Gram-positive strains compared to Gram-negative strains. This observation may be attributed to differences in the cell wall structure of these bacterial groups.

#### **Strain-Specific Susceptibility:**

The results of the present study showed that the sensitivity of the studied bacterial strains to hyssop extract, from highest to lowest, included *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from skin infections, and *S. baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, and *Escherichia coli*. This indicated that the bacteria causing skin infections were more sensitive than the bacteria causing urinary tract infections examined in this study.

#### **MIC and MBC Values:**

The MIC and MBC values obtained for the extracts against the tested bacterial strains provided quantitative evidence of their antibacterial potency. Also, in the present study, the antibacterial effect increased with increasing plant extract concentration. Also, with increasing duration of proximity of discs containing plant extract, the diameter of the disc's non-growth zone increased.

#### **Conclusion:**

The findings of this study provide compelling evidence for the antibacterial activity of *H. officinalis* extracts against clinically relevant bacterial pathogens. Of course, its therapeutic use requires further research on issues such as the effects of this extract on the normal flora of the skin or digestive tract, determining the appropriate and safe dose for treatment, etc.



## بررسی تأثیر عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاه زوفا بر باکتری‌های جدا شده از عفونت‌های ادراری و پوستی

فاطمه نورایی\*<sup>۱</sup>، احسان نظیفی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، مازندران، ایران

<sup>۲</sup> گروه گیاه شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، مازندران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۱۴

### چکیده

امروزه عفونت‌های باکتریایی ادراری و پوستی شیوع بالایی دارد. بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بسیاری از سویه‌های مؤثر در این عفونت‌ها، نیاز به جستجو داروهای جایگزین برای درمان این عفونت‌ها را افزایش داده است. عصاره‌های گیاهی دارای اثرات ضدباکتریایی علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها است و پتانسیل ویژه جهت توسعه داروهای جدید را دارد؛ لذا گزینه مناسبی جهت جایگزینی با آنتی‌بیوتیک‌ها به شمار می‌رود. هدف این مطالعه بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاه زوفا روی برخی سویه‌های باکتریایی است. استفاده از این گیاه در طب سنتی به منظور درمان عفونت‌های مختلفی سابقه‌ای طولانی دارد. عصاره‌گیری به روش خیساندن در حلال‌های متانول و اتانول به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه در دمای اتاق انجام شد. اثرات ضد باکتریایی عصاره‌ها در غلظت‌های ۲۵۶ تا ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به روش آزمون انتشار از دیسک و غلظت‌های ۵۰ تا ۱۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی روی برخی باکتری‌های بیماری‌زا بررسی شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ بررسی شد. عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاه زوفا دارای اثرات ضدباکتریایی نسبت به باکتری‌های مورد بررسی بودند. اثرات ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی در اکثر موارد، بیشتر از عصاره‌ی اتانولی بود. اثر ضد باکتریایی عصاره‌ی گیاه زوفا بر سویه‌های گرم مثبت نسبت به سویه‌های گرم منفی مورد مطالعه بیشتر بود. حساس‌ترین باکتری نسبت به عصاره زوفا، *استافیلوکوکوس اورئوس* و مقاوم‌ترین باکتری *شریشیا کولی* بود. گیاه زوفا دارای اثرات ضد باکتریایی مناسبی بر باکتری‌های مورد بررسی در این مطالعه بود. البته کاربرد درمانی آن نیازمند پژوهش‌های بیشتر در مواردی مانند، تأثیرات این عصاره بر فلور نرمال پوستی یا دستگاه گوارش، تعیین دوز مناسب و ایمن برای درمان است.

**کلید واژه‌ها:** زوفا، عصاره متانولی، عصاره اتانولی، اثرات ضدباکتریایی

\* f.nooraei14@uam.umz.ac.ir

## مقدمه

امروزه عفونت مجاری ادراری شیوع بالا خصوصاً در زنان، افراد مسن و نوزادان دارد (۱). این عفونت سبب طیف وسیعی از عوارض همچون اختلالات دستگاه ادراری، فشار خون، زایمان زودرس در زنان، هزینه های گزاف پزشکی و گاه‌ها نرخ بالای مرگ و میر می‌شوند (۲).

در اغلب موارد باکتری های خانواده اترئوباکتریاسه از جمله *اشرشیا کولی* سبب عفونت های ادراری می‌گردند. اعضای خانواده اترئوباکتریاسه در زیستگاه های مختلفی همچون طبیعت، دستگاه گوارش پستانداران، محصولات غذایی و سبزی های آلوده وجود دارند (۳). همچنین *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* و سایر باکتری ها مثل *کلسیلا پنومونیه*، *پروتئوس میرابیلیس* و *سودوموناس* ها نیز در مواردی نه چندان معمول و مرتبط با ناهنجاری های سیستم ادراری یا سوند ادراری سبب ایجاد عفونت های ادراری می‌شوند (۴، ۵).

درمان آنتی بیوتیکی این عفونت ها اغلب به کمک آنتی بیوتیک هایی نظیر فنازوپیریدین، تری متوپریم/سولفامتو کسازول، سفالوسپورین ها، نیتروفورانتوئین یا فلوروکینولون انجام می‌شود (۶، ۷).

همچنین از جمله عفونت های رایج، عفونت های پوستی باکتریایی با شیوع تقریبی ۱۵۵ میلیون نفر در سال است. عفونت های پوستی باکتریایی بیست و هشتمین تشخیص شایع در بیماران بستری در بیمارستان است. سلولیت، زرد زخم و فولیکولیت شایع ترین عفونت های باکتریایی پوستی هستند. باکتری های فلور نرمال پوست همچون *استافیلوکوک* ها و همچنین باکتری هایی که به تعداد کم در روده و پوست وجود دارند همچون *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان عوامل

فرصت طلب، سبب درصد بالایی از عفونت های پوستی می‌شوند (۸، ۹، ۱۰). از عمده ترین باکتری های عامل عفونت های پوستی می‌توان به *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوک* پیوتر اشاره کرد (۱۱). آنتی بیوتیک های رایج به منظور درمان این عفونت ها شامل سفالکسین، آموکسی سیلین، کلیندامایسین، داکسی سایکلین یا تری متوپریم/سولفامتو کسازول است (۱۲).

امروزه مصرف بیش از حد آنتی بیوتیک های رایج و کسب ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی توسط سویه های بیماری زا سبب ایجاد مشکل اساسی در روند درمان عفونت های مختلف باکتریایی است (۱۳). این مشکل، نیاز به شناسایی و استفاده از ترکیبات ضد میکروبی دیگر نظیر گیاهان را افزایش می‌دهد. گیاهان ترکیباتی با ساختمان های مولکولی پیچیده ای می‌سازند که برخی از آنها خاصیت ضد میکروبی دارد. این ترکیبات شامل متابولیت های ثانویه مختلف با ساختمان های مولکولی پیچیده ای هستند. این ترکیبات شامل آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها، تانن ها، گلیکوزیدها، تریپن ها و ترکیبات فنلی را هستند که با مکانیسم های مختلفی از جمله ایجاد اختلال در غشا سلولی، مهار آنزیم ها و تداخل در سنتز DNA باکتری، سبب مهار رشد یا نابودی باکتری ها می‌گردند (۱۴، ۱۵، ۱۶). از مزایای استفاده از گیاهان به منظور درمان عفونت های باکتریایی می‌توان به هزینه پایین تولید و سازگاری زیست محیطی گیاهان دارویی اشاره کرد (۱۷). همچنین گیاهان منبع آنتی اکسیدان های طبیعی هستند که این آنتی اکسیدان ها به دلیل قابلیت محافظت از ارگانیزم ها و سلول ها از آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو ارزشمندند. تقاضای فزاینده ای برای ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی عصاره های گیاهی وجود دارد و در سال های اخیر توجه به محصولات آنتی اکسیدانی از منابع طبیعی معطوف شده است (۱۸).

گیاه زوفا<sup>۱</sup> گیاهی علفی، چند ساله، خشکی دوست و از تیره نعناعیان است. این گیاه تا ۶۰ سانتی متر رشد می‌کند و

<sup>1</sup> *Hyssopus officinalis* L

شناسایی گیاه توسط گیاه‌شناس انجام شد. گل، برگ‌ها و سرشاخه‌های نازک گیاه جدا شد و در شرایط مناسب (تاریک و خشک) نگهداری و به طور کامل خشک و پس از خشک‌شدن، آسیاب شد و برای عصاره‌گیری استفاده شد.

#### تهیه عصاره اتانولی و متانولی گیاه زوفا: عصاره‌گیری

به روش خیساندن و به این شرح صورت گرفت: ۵۰ گرم از پودر گیاه زوفا خشک شده در ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال ۸۰ درصد اتانولی و متانولی به طور جداگانه خیسانده شد و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. محلول به دست آمده از کاغذ صافی عبور داده شد. مایع به دست آمده در دستگاه روتاتوری تغلیظ و سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد در آون خشک شد (۲۳).

#### سویه‌های آزمایش میکروبی: باکتری‌های استفاده شده

شامل سویه‌های گرم منفی اسنتیوباکتر بومانی<sup>۱</sup>، پروتئوس میرابیلیس<sup>۲</sup>، انتروباکتر آئروژنز<sup>۳</sup>، اشیریشیا کولی<sup>۴</sup> و سودوموناس آئروژینوزا<sup>۵</sup> و باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس<sup>۶</sup> و استافیلوکوکوس اپیدرمیس<sup>۷</sup> شناسایی شده از نمونه‌های بالینی بخش میکروبیولوژی بیمارستان رازی شهرستان قائم‌شهر بود.

#### تهیه استاندارد میکروبی با استفاده از دستگاه

اسپکتروفوتومتر: برای تهیه سوسپانسیون میکروبی از باکتری‌های کشت داده شده روی محیط کشت به کمک لوپ استریل کلنی برداشته شد و بر روی محیط کشت نوترین آگار به صورت چهارقسمتی کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس ۵-۳ کلنی، از کلنی‌های تشکیل شده به وسیله سوآپ استریل برداشته و درون لوله آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل پخش شد. برای اندازه‌گیری طول موج از دستگاه اسپکتروفوتومتر شد. مقدار ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون

عملکرد دارویی خلط‌آور و ضد عفونی کننده دارد. برگ‌های آن کوچک، خطدار، نوک‌تیز و سبزرنگ و بسیار معطر است. گل‌های آن آبی و گاهی سفیدند که در انتهای ساقه ظاهر می‌شود (۱۹). این گیاه بومی قفقاز، شمال غربی ایران، ترکیه، منطقه دریای سیاه، شمال شرقی و جنوب آناتولی است (۲۰).

بررسی‌ها نشان‌دهنده اثر ضدباکتریایی زیرگونه‌های مختلف این گیاه است. این گیاه دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است و بیشترین اجزای تشکیل‌دهنده اسانس گیاه زوفا ترپین‌ها و ترپنوئیدهایی نظیر ایزوپینوکافمن، پینوکافمن، بتاپین و پینوکارون معرفی شد (۲۱). این ترکیبات با مکانیسم‌هایی نظیر ایجاد اختلال در یکپارچگی و عملکرد غشای سلولی، مهار آنزیم‌های ضروری برای بقای باکتری، تداخل با ساختار و عملکرد DNA و RNA و تولید گونه‌های فعال اکسیژن سبب مهار رشد و یا از بین بردن باکتری‌ها می‌شوند. لازم به ذکر است زیرگونه‌های مختلف یا جمعیت‌های گیاهی با منشأ یا مورفولوژی متفاوت این گیاه، از نظر ترکیب درصدی اجزای فرار اصلی تا حدی متفاوت هستند؛ زیرا ترکیب شیمیایی اسانس و عصاره‌های آن‌ها بسته به عوامل مختلفی از جمله محل رویش، شرایط آب‌وهوایی و زمان برداشت متفاوت است (۲۲).

هدف کلی این پژوهش، بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی و متانولی گیاه زوفا با تمرکز بر باکتری‌های جدا شده از عفونت‌های ادراری و پوستی بود. همچنین از اهداف ویژه این پژوهش بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاه زوفا و شناسایی حلال بهینه برای استخراج عصاره گیاهی بود.

#### مواد و روش‌ها

**شناسایی و جمع‌آوری گیاه:** جمع‌آوری گیاه از مناطق کوهستانی روستا بلده واقع در شهرستان نور انجام شد.

<sup>5</sup> *Pseudomonas aeruginosa*

<sup>6</sup> *Staphylococcus aureus*

<sup>7</sup> *Staphylococcus epidermidis*

<sup>1</sup> *Acinetobacter baumannii*

<sup>2</sup> *Proteus mirabilis*

<sup>3</sup> *Enterobacter aerogenes*

<sup>4</sup> *Escherichia coli*

میکروبی را درون کووت ریخته و در دستگاه قرار داده شد و میزان جذب آن اندازه گیری شد. میزان جذب در طول موج ۶۲۵ نانومتر باید بین ۰/۱۳-۰/۰۸ باشد (۲۵).

### بررسی اثر ضد میکروبی عصاره گیاهی به روش

**انتشار از دیسک:** در یک سری لوله های ۹ تایی از عصاره مورد نظر رقت سازی شد. ۰/۵ میلی لیتر از محلول دی متیل سولفوکسید<sup>۱</sup> در همه ی لوله ها ریخته شد. سپس از عصاره مورد نظر به مقدار ۰/۵ میلی لیتر در لوله اول ریخته بعد از مخلوط کردن ۰/۵ میلی لیتر برداشته در لوله دوم ریخته از لوله دوم برداشته به سوم و الی آخر اضافه نموده و تا لوله ی ۹ ادامه داده شد و از لوله ۹ به مقدار ۰/۵ میلی لیتر خارج شد. سپس در هر لوله به تعداد نیاز از دیسک خالی<sup>۲</sup> ساخت شرکت پادتن طب قرار داده شد بعد از نیم ساعت خارج و در انکوباتور ۳۷ درجه خشک شد. غلظت های عصاره گیاهی به ترتیب شامل ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر بود. آنتی بیوتیک استریپتومایسین و محلول دی متیل سولفوکسید به عنوان شاهد مثبت و منفی استفاده شد. این مراحل برای هر دو عصاره اتانولی و متانولی انجام شد. از سوسپانسیون های استاندارد های میکروبی ساخته شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، در سطح محیط کشت مولر هیتون آگار بوسیله سوآپ استریل کشت داده و بعد از ۵ دقیقه جهت جذب رطوبت نسبی کشت، دیسک های مورد نظر در سطح محیط کشت قرار داده بعد از ۱۸-۲۴ ساعت قطر هاله های عدم رشد ایجاد شده اندازه گرفته شد (۲۶، ۲۷). تمام مراحل در سه تکرار برای عصاره های اتانولی و متانولی انجام شد.

### تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و

### حداقل غلظت کشندگی (MBC) به روش

### رقت سازی در چاهک<sup>۳</sup>: محیط کشت مولر هیتون براث

تهیه شد و غلظت های مختلف عصاره از غلظت ۵۰-۰/۱۹ میلی گرم بر میلی لیتر (از شماره ۱ تا ۹) تهیه شد. ابتدا در هر چاهک (از شماره ۲ تا ۱۲) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر محیط

کشت مولر هیتون براث به غیر از چاهک اول شد. سپس در چاهک های اول، دوم و دوازدهم ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی اضافه شد. سپس از چاهک دوم ۱۰۰ میکرولیتر برداشته به خانه سوم و از سوم به چهارم و الی ۹ ادامه داده شد. از چاهک ۹ به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر خارج شد. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون های استاندارد های میکروبی در همه چاهک ها، به غیر از چاهک ۱۱ و ۱۲ اضافه شد. چاهک ۱۰ شاهد باکتری است. چاهک ۱۱ شاهد محیط کشت است. چاهک ۱۲ شاهد عصاره است. پس از طی زمان انکوباسیون کمترین رقت از عصاره که رشد باکتری در آن صورت نگرفت (عدم کدورت) به عنوان MIC در نظر گرفته شد (۲۸، ۲۹). همچنین برای تعیین MBC از هر کدام از غلظت های که کدورتی در آن ها مشاهده نشد، نمونه برداشته و در سطح محیط کشت BHI آگار کشت داده و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رشد باکتری بررسی شد. غلظتی از عصاره که در آن ۹۹/۹ درصد از سلول های میکروبی کاهش پیدا کرده بود و یا هیچ باکتری در آن رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد (۳۰). تمام مراحل در سه تکرار برای عصاره های اتانولی و متانولی انجام شد.

### بررسی آماری

تمام آزمایش ها سه بار تکرار شده و پاسخ ها میانگین گرفته شد. داده ها به عنوان میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده است. داده های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی دانکن در سطح معنی داری ۰/۰۵ بررسی شد.

### نتایج

### نتایج بررسی اثر ضد میکروبی عصاره گیاهی به

### روش انتشار از دیسک: نتایج این بررسی نشان داد

<sup>3</sup> Microdilution broth

<sup>1</sup> Dimethyl sulfoxide (DMSO)

<sup>2</sup> Blank paper

بر میلی لیتر عصاره متانولی در طی ۲۴ ساعت، مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس و برابر با ۱۸٫۳ میلی متر و کمترین قطر هاله در این غلظت مربوط به باکتری اشرشیاکولی و برابر با ۶٫۵ میلی متر بود. همچنین ترتیب حساسیت باکتری های مورد بررسی در غلظت های مختلف عصاره های اتانولی و متانولی زوفا از زیاد به کم (جدول ۱ و جدول ۲) شامل: استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس، سودوموناس آئروژینوزا، اسنتیوباکتر بومانی، پروتئوس میرابیلیس، انتروباکتر آئروژنز و اشرشیاکولی بود.

عصاره های اتانولی و متانولی زوفا در برخی غلظت های مورد بررسی دارای اثرات مهاری بر رشد باکتری های مورد مطالعه بود. عصاره متانولی دارای اثرات مهاری بیشتر نسبت به عصاره اتانولی بود. با افزایش غلظت عصاره گیاهی اثرات مهاری عصاره گیاهی بر رشد باکتری ها شدت یافت. همچنین با افزایش مدت زمان مجاورت دیسک های حاوی عصاره گیاهی، قطر هاله عدم رشد دیسک ها افزایش یافت. تأثیر بازدارندگی عصاره های مورد مطالعه بر باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی بیشتر بود. طوریکه بیشترین قطر هاله عدم رشد ثبت شده در غلظت ۲۵۶ میلی گرم

جدول ۱: قطر هاله عدم رشد باکتری ها بر حسب میلی متر در غلظت های مختلف عصاره متانولی زوفا به روش انتشار از دیسک (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

شاهد مثبت	شاهد منفی	۲۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر	۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر	۶۴ میلی گرم بر میلی لیتر	۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر	۱۶ میلی گرم بر میلی لیتر	باکتری / غلظت عصاره
۱۸	-	۱۸٫۳ $\pm$ ۰٫۳۵ <sup>Aa</sup>	۱۵٫۱۰ $\pm$ ۰٫۳۵ <sup>Ba</sup>	۱۲٫۲۰ $\pm$ ۰٫۱۵ <sup>Ca</sup>	۱۰٫۶۰ $\pm$ ۰٫۳۵ <sup>Da</sup>	-	استافیلوکوکوس اورئوس
۱۷	-	۱۷٫۳ $\pm$ ۰٫۳۶ <sup>Ab</sup>	۱۴٫۱۳ $\pm$ ۰٫۱۵ <sup>Bb</sup>	۱۱٫۳ $\pm$ ۰٫۱۰ <sup>Cb</sup>	۹٫۲۰ $\pm$ ۰٫۲۵ <sup>Db</sup>	-	استافیلوکوکوس اپیدرمیس
۱۰	-	۱۳٫۴ $\pm$ ۰٫۱۰ <sup>Ad</sup>	۱۰٫۱ $\pm$ ۰٫۱۵ <sup>Bd</sup>	۸٫۱ $\pm$ ۰٫۱۰ <sup>Ce</sup>	۷٫۱۷ $\pm$ ۰٫۱۲ <sup>Dd</sup>	-	اسنتیوباکتر بومانی
۱۲	-	۱۵٫۱ $\pm$ ۰٫۰۶ <sup>Af</sup>	۱۲٫۳ $\pm$ ۰٫۱۰ <sup>Bf</sup>	۹٫۲ $\pm$ ۰٫۱۰ <sup>Cc</sup>	۸٫۱۰ $\pm$ ۰٫۰۶ <sup>Dc</sup>	-	سودوموناس آئروژینوزا
۱۳	-	۱۱٫۴ $\pm$ ۰٫۳۵ <sup>Ae</sup>	۹٫۷ $\pm$ ۰٫۳۵ <sup>Be</sup>	۸٫۳ $\pm$ ۰٫۱۵ <sup>Cd</sup>	۶٫۳ $\pm$ ۰٫۱۰ <sup>De</sup>	-	پروتئوس میرابیلیس
۱۴	-	۶٫۵ $\pm$ ۰٫۱۵ <sup>Ag</sup>	۵٫۳ $\pm$ ۰٫۲۵ <sup>Bg</sup>	-	-	-	اشرشیاکولی
۱۳	-	۱۰٫۴ $\pm$ ۰٫۱۵ <sup>Af</sup>	۸٫۷ $\pm$ ۰٫۱۵ <sup>Bf</sup>	۷٫۸ $\pm$ ۰٫۱۵ <sup>Cf</sup>	۶٫۲ $\pm$ ۰٫۲۰ <sup>De</sup>	-	انتروباکتر آئروژنز

حروف بزرگ غیرمشابه در هر سطر نشان دهنده اختلاف معنی دار است ( $p < ۰/۰۵$ ). حروف کوچک غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار است ( $p < ۰/۰۵$ ).

جدول ۲: قطر هاله عدم رشد باکتری ها بر حسب میلی متر در غلظت های مختلف عصاره اتانولی زوفا به روش انتشار از دیسک (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

شاهد مثبت	شاهد منفی	۲۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر	۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر	۶۴ میلی گرم بر میلی لیتر	۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر	۱۶ میلی گرم بر میلی لیتر	باکتری / غلظت عصاره
۱۸	-	۱۷,۴ $\pm$ ۲,۰ <sup>Aa</sup>	۱۴,۹ $\pm$ ۱,۵ <sup>Ba</sup>	۱۰,۲ $\pm$ ۱,۰ <sup>Ca</sup>	۹,۳ $\pm$ ۱,۵ <sup>Da</sup>	-	استافیلوکوکوس اورئوس
۱۷	-	۱۶,۲ $\pm$ ۲,۰ <sup>Ab</sup>	۱۳,۲ $\pm$ ۲,۰ <sup>Bb</sup>	۱۰,۳ $\pm$ ۲,۰ <sup>Ca</sup>	۸,۱ $\pm$ ۱,۵ <sup>Db</sup>	-	استافیلوکوکوس اپیدرمیس
۱۰	-	۱۲,۱ $\pm$ ۲,۰ <sup>Ac</sup>	۹,۰ $\pm$ ۱,۲ <sup>Bc</sup>	۸,۰ $\pm$ ۱,۵ <sup>Cb</sup>	۶,۲ $\pm$ ۱,۲ <sup>Dc</sup>	-	اسنتیوباکتر بومانی
۱۲	-	۱۶,۲ $\pm$ ۲,۰ <sup>Ab</sup>	۱۳,۱ $\pm$ ۱,۵ <sup>Bb</sup>	۱۰,۲ $\pm$ ۲,۰ <sup>Ca</sup>	۹,۲ $\pm$ ۱,۵ <sup>Da</sup>	-	سودوموناس آئروژینوزا
۱۳	-	۱۰,۵ $\pm$ ۵,۰ <sup>Ad</sup>	۸,۰ $\pm$ ۰,۶ <sup>Bd</sup>	۷,۱ $\pm$ ۱,۵ <sup>Cc</sup>	۵,۱ $\pm$ ۱,۵ <sup>Dd</sup>	-	پروتئوس میرابیلیس
۱۴	-	۵,۷ $\pm$ ۲,۵ <sup>Ae</sup>	۳,۱ $\pm$ ۱,۰ <sup>Be</sup>	-	-	-	اشریشیا کولی
۱۳	-	۱۰,۳ $\pm$ ۳,۰ <sup>Ad</sup>	۸,۱ $\pm$ ۲,۵ <sup>Bd</sup>	۶,۱ $\pm$ ۱,۵ <sup>Cd</sup>	۴,۲ $\pm$ ۱,۷ <sup>De</sup>	-	انتروباکتر آئروژنز

. حروف بزرگ غیر مشابه در هر سطر نشان دهنده اختلاف معنی دار است ( $p < 0/05$ ). حروف کوچک غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار است ( $p < 0/05$ ).

بیشترین میزان مربوط به باکتری اشریشیا کولی و کمترین میزان مربوط به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بود. کمترین و بیشترین میزان حداقل غلظت کشندگی نیز شامل ۱۲,۵ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود (جدول ۳).

**نتایج تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به روش رقت سازی در چاهک (Microdilution broth):** میزان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد عصاره های متانولی و اتانولی زوفا برای باکتری های مختلف مورد مطالعه، متفاوت و بین ۲۵ تا ۶,۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود که

جدول ۳: اثر ضد میکروبی عصاره زوفا علیه هفت سویه باکتری بیماری زا و مقادیر MIC/MBC بر حسب میلی گرم بر میلی متر

باکتری	MIC		MBC	
	عصاره متانولی	عصاره اتانولی	عصاره متانولی	عصاره اتانولی
استافیلوکوکوس اورئوس	۶,۲۵	۶,۲۵	۱۲,۵	۱۲,۵
استافیلوکوکوس اپیدرمیس	۶,۲۵	۱۲,۵	۱۲,۵	۵۰
اسنتیوباکتر بومانی	۱۲,۵	۱۲,۵	۲۵	۲۵
سودوموناس آئروژینوزا	۱۲,۵	۲۵	۲۵	۵۰
پروتئوس میرابیلیس	۱۲,۵	۱۲,۵	۲۵	۲۵
اشریشیا کولی	۲۵	۲۵	۵۰	۵۰
انتروباکتر آئروژنز	۱۲,۵	۲۵	۲۵	۵۰

بررسی، نسبت به اثرات ضدباکتریایی عصاره گیاه زوفا حساس تر هستند که با نتایج بررسی حاضر مطابقت داشت (۳۴). همچنین بررسی طباطبایی و همکاران روی اثر ضد میکروبی عصاره گیاه ازگیل بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشرشیاکولی* نشان‌دهنده تأثیر ضد میکروبی بیشتر این عصاره بر سویه‌های گرم مثبت مورد مطالعه بود (۳۵).

مطالعه مشابهی که توسط حسن‌شاهیان و همکاران انجام گرفت نشان داد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره زوفا داشتند که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (۳۶). مطالعه مشابهی که توسط خالد<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شد نشان‌دهنده خاصیت ضدباکتریایی در عصاره زوفا بود؛ ولی باکتری *اشرشیاکولی* نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* حساسیت بیشتری نشان داد که این مورد با نتیجه مطالعه اخیر متفاوت است که از دلایل احتمالی این تفاوت می‌توان به تفاوت سویه‌های باکتریایی مورد بررسی در این دو پژوهش اشاره کرد. همچنین این مغایرت ممکن است به دلیل تفاوت منطقه جغرافیایی نمونه گیاهی جمع آوری شده اشاره کرد. زیرا گیاهان، متابولیت‌های ثانویه را به منظور سازگار شدن به شرایط مختلف اکولوژیکی اطراف و حفظ خود و نسل‌های آینده تولید می‌کنند. لذا قرارگیری گیاه در شرایط اکولوژیکی مختلف سبب تغییر کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه گیاه می‌شود. بنابراین جمعیت‌های یک گونه گیاهی که در شرایط اکولوژیکی مختلف روییده‌اند از نظر کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه متنوع‌اند. این تنوع منجر به تفاوت در دامنه فعالیت دارویی و بیولوژیک نیز می‌شود (۳۷).

در مطالعه حاضر اثرات ضدباکتریایی عصاره متانولی گیاه زوفا در همه موارد ( $p < 0.05$ ) به جز *سودوموناس آئروژینوزا*، بیشتر از عصاره اتانولی بود که گمان می‌شود به دلیل استخراج بیشتر ترکیبات ضدباکتریایی گیاه زوفا توسط

## بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه اثر ضدباکتریایی عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاه زوفا بر روی هفت باکتری بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت. آزمون‌های انجام شده تأییدکننده خواص ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاه زوفا روی سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه هستند. حضور متابولیت‌های ثانویه مثل تریپنئیدها، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها در عصاره زوفا سبب ایجاد این خواص ضد میکروبی می‌گردد (۳۱). اثر ضدباکتری عصاره بر باکتری‌های مورد مطالعه در محیط مایع مورد بررسی (تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و بازدارندگی رشد در محیط مولر هیتون براث) بیشتر از محیط جامد مورد بررسی (آزمون‌های انتشار از دیسک در محیط مولر هیتون آگار) بود که دلیل این امر انتشار ضعیف‌تر عصاره گیاهی در محیط کشت جامد نسبت به محیط مایع است.

اثر ضدباکتریایی عصاره گیاه زوفا بر سویه‌های گرم مثبت نسبت به سویه‌های گرم منفی مورد مطالعه بیشتر بود. طوری که حساس‌ترین سویه نسبت به عصاره زوفا باکتری گرم مثبت، *استافیلوکوکوس اورئوس* بود و مقاوم‌ترین سویه باکتری گرم منفی، *اشرشیاکولی* بود. از علل این امر، تفاوت در ساختار دیواره سلولی این دو نوع باکتری است. دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت شامل پپتیدوگلیکان و مقدار کمی پروتئین است، درحالی‌که دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی پیچیده‌تر بوده و شامل پپتیدوگلیکان، پلی‌ساکاریدهای مختلف، پروتئین‌ها و لیپیدها است. همچنین دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی دارای غشای خارجی است. این عوامل سبب افزایش مقاومت باکتری‌های گرم منفی به اثرات مهاری عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت می‌شود (۳۲، ۳۳). بررسی مشابهی (۱۳۹۴) که توسط نصیرپور و همکاران انجام شد، نشان داد باکتری‌های گرم مثبت از باکتری‌های گرم منفی مورد

<sup>1</sup> Khaled-Khodja

اشریشیا کولی جدا شده از عفونت ها ادراری بود که نشان دهنده حساسیت بیشتر باکتری های عامل عفونت های پوستی نسبت به باکتری های مؤثر در ایجاد عفونت های ادراری بررسی شده در این مطالعه بود. همچنین انحراف معیار پایین ( $p < 0.05$ ) در بیشتر موارد نشان دهنده تکرارپذیری خوب آزمایش هاست.

در مطالعه اخیر، فعالیت ضدباکتریایی عصاره زوفا تأیید شد. عصاره این گیاه می تواند در برابر عفونت های باکتریایی پوست و ادراری، خصوصاً به منظور درمان عفونت های باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک ها، مورد استفاده قرار گیرد. البته کاربرد درمانی آن مستلزم پژوهش های بیشتر در مواردی همچون تأثیرات این عصاره بر فلور نرمال پوستی یا دستگاه گوارش، تعیین دوز مناسب و ایمن برای درمان است.

### تشکر و قدردانی

از زحمات آقای طالبی (بیمارستان رازی قائم شهر) برای جمع آوری نمونه های بالینی تشکر و قدردانی می شود.

### تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

هلال متانول باشد. مطالعه ای که توسط رویین تن به منظور بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره های آبی، متانولی و اتانولی برگ گیاه ریحان گرمسیری انجام شد نشان داد عصاره متانولی این گیاه دارای بیشترین اثرات ضدباکتریایی نسبت به سایر حلال های مورد بررسی داشت که با نتیجه مطالعه حاضر مطابقت داشت (۳۸). همچنین در مطالعه ای که توسط ساداتی و همکاران به منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره های آبی، اتانولی و متانولی گیاه اسطوخودوس انجام شد، مشخص شد عصاره متانولی این گیاه سبب استخراج بیشتر ترکیبات ضدباکتریایی نظیر رزماری یک اسید و کافئیک اسید و لذا دارای بیشترین اثرات ضدباکتریایی بود که با نتیجه مطالعه حاضر مطابقت دارد (۳۹).

همچنین در مطالعه حاضر با افزایش غلظت عصاره گیاهی، اثر ضدباکتریایی به طور معنی داری ( $p < 0.05$ ) افزایش یافت. در مطالعات مشابه بسیاری همانند مطالعه سیاحی و همکاران و نصیرپور و همکاران نیز با افزایش غلظت عصاره گیاهی، اثر ضدباکتریایی عصاره نیز افزایش یافت (۳۴، ۴۰). طبق نتایج مطالعه حاضر حساسیت سویه های باکتریایی مورد مطالعه نسبت به عصاره گیاه زوفا از زیاد به کم به ترتیب شامل استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس و سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از عفونت های پوستی و اسنتوباکتر بومانی، پروتئوس میرابیلیس، انتروباکتر آئروژنز و

1. Nwanze PI, Nwaru LM, Oranusi S, Dimkpa U, Okwu MU, Babatunde BB, Anake TA, Jatto W, Asagwara CE. Urinary tract infection in Okada village: Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern. *Scientific Research and Essays*. 2007 Apr 1;2(4):112-116.
2. Raeispour M, Ranjbar R. Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2018 Dec;7:1-9.
3. Petty LA, Henig O, Patel TS, Pogue JM, Kaye KS. Overview of meropenem-vaborbactam and newer antimicrobial agents for the treatment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Infection and Drug Resistance*. 2018 Sep 9:1461-1472.
4. Nicolle LE. Uncomplicated urinary tract infection in adults including uncomplicated pyelonephritis. *Urologic Clinics of North America*. 2008 Feb 1;35(1):1-12.
5. Salvatore S, Salvatore S, Cattoni E, Siesto G, Serati M, Sorice P, Torella M. Urinary tract infections in women. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2011 Jun 1;156(2):131-136.
6. Gaines KK. Phenazopyridine hydrochloride: the use and abuse of an old standby for UTI. *Urologic Nursing*. 2004 Jun 1;24(3).
7. Colgan R, Williams M. Diagnosis and treatment of acute uncomplicated cystitis. *American family Physician*. 2011 Oct 1;84(7):771-776.
8. Jawetz A, Melenick B A, Adelberg F. (2001). Medical Microbiology, 22th edition. USA: *Mc Graw-Hill companies*; 229-232.
9. Kaneda T, Lemura J, Oka H, Inoue T, Zhang ZW, Matsumoto T, Onoe M, Otaki M, Oku H, Ishigami N, Aoshima M. Treatment of deep infection following thoracic aorta graft replacement without graft removal. *Annals of Vascular Surgery*. 2001 Jul 1;15(4):430-434.
10. Stulberg DL, Penrod MA, Blatny RA. Common bacterial skin infections. *American family Physician*. 2002 Jul 1;66(1):119-125.
11. Vary JC, O'Connor KM. Common dermatologic conditions. *Medical Clinics*. 2014 May 1;98(3):445-485.
12. Mistry RD. Skin and soft tissue infections. *Pediatric Clinics*. 2013 Oct 1;60(5):1063-1082.
13. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*. 2015 Apr;40(4):277.
14. Tan RX, Tang HQ, Hu J, Shuai B. Lignans and sesquiterpene lactones from *Artemisia sieversiana* and *Inula racemosa*. *Phytochem*. 1998 Sep 3;49(1):157-161.
15. Bora KS, Sharma A. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. *Pharmaceutical Biology*. 2011 Jan 1;49(1):101-109.
16. Álvarez-Martínez FJ, Barrajón-Catalán E, Herranz-López M, Micol V. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine*. 2021 Sep 1;90:153626.
17. Ghilisi Z, Sayari N, Kallel R, Bougatef A, Sahnoun Z. Antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory and wound healing effects of *Artemisia campestris* aqueous extract in rat. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016 Dec 1;84:115-122.
18. Vlase L, Benedec D, Hanganu D, Damian G, Csillag I, Sevastre B, Mot AC, Silaghi-Dumitrescu R, Tilea I. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and phenolic profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. *Molecules*. 2014 Apr 28;19(5):5490-5507.
19. Pérez Maté, P. (2002). *Especies aromáticas y medicinales* (in Spanish). Buenos Aires: INTA.
20. Kazazi H, Rezaei K, Ghotb-Sharif SJ, Emam-Djomeh Z, Yamini Y. Supercritical fluid extraction of flavors and fragrances from *Hyssopus officinalis* L. cultivated in Iran. *Food Chemistry*. 2007 Jan 1;105(2):805-811.
21. Najafpour N M, Mirza M. Comparative study on the essential oil composition of the leaves of *Hyssopus officinalis* L. in field and wild growing. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 2003; 18(1): 43-51. [in Persian].
22. KIZIL S, HAŞİMİ N, Tolan V, Kilinc E, KARATAŞ H. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) essential oil. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2010 Dec 5;38(3):99-103.
23. Dulger B, Gonuz A. Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. *Asian Journal of Plant Sciences*. ۲۰۰۴; 3: 104-107.
24. Murphy Cowan M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* . ۱۹۹۹; 12(4):564-582.

25. Bauer AW. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology* .1996;45:149-158.
26. Chohan ZH, Scozzafava A, Supuran CT. Synthesis of biologically active Co (II), Cu (II), Ni (II) and Zn (II) complexes of symmetrically 1, 1'-disubstituted ferrocene-derived compounds. *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry*. 2003 Jan 6;33(2):241-257.
27. Selvamohan T, Ramadas V and Shibila Selva Kishore S. Antimicrobial activity of selected medicinal plants against some selected human pathogenic bacteria. *Advances in Applied Science Research*.2012; 3(5): 3374-3381.
28. Mohammad E A, Shayegh J and Moharrami fard M. Comparison of Antibacterial Effect of Malva Sylvestris L. (Aerial and Root Organs) by MIC. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*.2014; 21(6): 816-822 [in Persian].
29. Zahraei S T, Vajgani M, Bayat M, Torshizi H and Akhondzadeh A. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Extract of Zataria, multiflora, against the clinical isolates of *Streptococcus agalactia*, *Staphylococcus aureus*, and *E. coli*. *Journal of Veterinary Research* .2005; 60(2): 107- 110 [in Persian].
30. Duffy C F, Power R F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extract. *International Journal of Food Microbiology* .2001; 17, 527-529.
31. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999 Oct 1;12(4):564-582.
32. Pranoto Y, Salokhe VM, Rakshit SK. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *International Food Research Journal*. J 2005 Apr 1;38(3):267-272.
33. Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013 Dec;6(12):1451-1474.
34. Nasirpour M, Yavarmanesh M, Mohhamadi Sani A, Mohamdzade M M, Antibacterial effect of aqueous extract of *Artemisia aucheri*, *Artemisia sieberi* and *Hyssopus officinalis* L. on the food borne pathogenic bacteria. *Journal of Food Science and Technology*.2014; 12(46):53.
35. Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Alghooneh A, Zanganeh H. Optimization of extraction of *Mespilus germanica* by mixture design and investigation of its effect on Infectious Microorganisms “invitro”. *Journal of Food Science and Technology* .2016;13(52):133-147. [in Persian]
36. Hassanshahiyan M, Saadatfar A, Masoumi F. Antimicrobial properties of *Hyssopus officinalis* extract against antibiotic-resistant bacteria in planktonic and biofilm form *Biological Journal of Microorganism* .2018 Dec 22;7(28):91-101.
37. Khaled-Khodja N, Boulekbache-MakhloufL., Madani K. Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products*. 2014; 61: 41-48.
38. Roeintan A. Evaluation of Antibacterial and antifungal effects of aqueous, methanolic and ethanolic extracts of *Ocimum basilicum*. *Pars Journal of Medical Sciences* .2018; 16(2): 1-7 [in Persian]
39. Sadaty SZ, Ghorbanpour M, Salehjarjmand H, Niknejad Naeij Abad Y. Comparison of Antimicrobial Effects of Ethanolic and Methanolic Extracts of Lavender (*Lavandula stoechas* L.) with Antibiotics on some Common Nosocomial Bacteria. *Research in Medicine*. 2022; 46(3):25-40 [in Persian].
40. Sayyahi J, Mobayen H , Jafari B, Jafari-Sales A. Antibacterial Effects of Ethanolic Extracts of *Ziziphus jujuba*, *Medicago sativa*, *Reum ribes* and *Hyssopus officinalis* on Some Standard Gram-Positive and GramNegative Bacteria in Vitro. *Yasuj University of Medical Sciences Journal*. 2021; 26(3): 338-350 [in Persian].