

Research Paper

Antioxidant and Antimicrobial Properties of Ethanolic Extract of Lemon Verbena



Zahra Izadi^{1*}, Naser Mirazi²

1. Department of Horticultural Sciences and Engineering, Nahavand Higher Education Complex, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
2. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.



Citation Izadi Z, Mirazi N. [Antioxidant and Antimicrobial Properties of Ethanolic Extract of Lemon Verbena (Persian)]. *Qom Univ Med Sci J*. 2023; 16(10):816-829. <https://doi.org/10.32598/qums.16.10.2091.2>

doi <https://doi.org/10.32598/qums.16.10.2091.2>



Received: 09 May 2021

Accepted: 19 Nov 2022

Available Online: 01 Jan 2023

ABSTRACT

Background and Objectives Chemical preservatives are commonly used to prevent food from quick spoiling and oxidizing. Despite their effect in increasing shelf life of foods, these compounds can have side effects. Residues of chemical compounds in foods increase microbial resistance. This study aims to investigate the antioxidant and antimicrobial properties of lemon verbena (*Lippia citriodora* L.) ethanolic extract against some gram-positive and gram-negative bacteria.

Methods In this experimental study, The soaking method and ethanol solvent was used for extraction. Antioxidant activities of different concentrations of extract were assessed using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity test and compared with butylated hydroxyanisole (BHA) as a synthetic antioxidant. Antimicrobial effect of extract on *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* was determined by disk diffusion and well diffusion methods and measuring minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Experimental data were analyzed in SPSS software, version 20 using analysis of variance and the mean values were compared using Duncan's multiple range test.

Results The amounts of phenols and flavonoids in the ethanolic extract of were 96.47 ± 0.35 mg of gallic acid/g of extract and 31.07 ± 0.42 mg of quercetin/g of extract, respectively. The half-maximal inhibitory concentration of lemon verbena extract was 11.79 ± 0.76 µg/mL, while it was 10.16 ± 0.29 µg/mL for BHA. In both disk diffusion and well diffusion methods, with the increase of the concentration of extract, the inhibition zone diameter increased. The ethanolic extract of lemon verbena at the concentration of 12.5 mg/mL had no inhibitory effect on gram-negative bacteria growth. In both methods, the extract had the greatest effect on *S. aureus*. The MIC of ethanolic extract ranged from 8 to 128 mg/mL, depending on the type of bacteria (gram-positive or gram-negative).

Conclusion The ethanolic extract of lemon verbena has higher antimicrobial effects on gram-positive bacteria. Therefore, it can be used in food and pharmaceutical industries as a natural antimicrobial agent. Considering the increasing resistance of bacteria to chemical antibiotics, more studies on lemon verbena and its antibacterial compounds are needed for treating infections.

Keywords:

Lemon verbena,
Antioxidants,
Antibacterial agents.

* Corresponding Author:

Zahra Izadi

Address: Department of Horticultural Sciences and Engineering, Nahavand Higher Education Complex, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Tel: +98 (918) 8113211

E-Mail: z.izadi@basu.ac.ir



Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences. Published by Tehran University of Medical Sciences
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).
Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Extended Abstract

Introduction

For decades, food industries used synthetic food preservatives to prevent oxidation and microbial contamination of packed foods, but, now they intend to use natural antioxidant and antimicrobial compounds as preservatives due to the side effects of synthetic compounds on the environment and human health and the emergence of multidrug-resistant bacteria. This has led many researchers to focus more on the use of natural preservatives in food production. Lemon verbena (*Lippia citriodora* L.) is an aromatic plant belonging to Verbenaceae family with high active compounds in its leaves and with antioxidant properties. This study aims to investigate the antioxidant and antimicrobial properties of lemon verbena ethanolic extract against some gram-positive and gram-negative bacteria.

Methods

This experimental study was conducted in 2019 at Bu-Ali Sina University. Soaking method and ethanol solvent were used for ethanolic extract preparation. The phenol content of the ethanolic extract was determined by using Folin-ciocalteu reaction method. The absorption of the resulting blue color solution was measured using a UV-vis spectrophotometer at 760 nm. Total flavonoid content of each sample was measured using aluminum chloride colorimetric assay. The absorption was then measured spectrophotometrically at 415 nm. Antioxidant activities of different concentrations of extract were identified using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity and compared with butylated hydroxyanisole (BHA) as a synthetic antioxidant. Antimicrobial effect of lemon verbena extract on *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* was determined by the disk diffusion method, agar well diffusion method and measuring minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Experimental data were analyzed in SPSS software, version 20 software using analysis of variance and the mean values were compared using Duncan's multiple range test.

Results

The amount of phenols and flavonoids in the ethanolic extract of lemon verbena were 96.47 ± 0.35 mg of gallic acid/g of extract and 31.07 ± 0.42 mg of quercetin/g of extract, respectively. The half-maximal inhibitory concentration of lemon verbena extract was 11.79 ± 0.76 μ g/mL, while it was

10.16 ± 0.29 μ g/mL for BHA. The ability of lemon verbena ethanolic extract and BHA in scavenging free radicals was found in the ethanolic extract and BHA at a concentration of 1000 ppm. In both disk diffusion and agar well diffusion methods, with the increase of the concentration of lemon verbena extract, the inhibition zone diameter increased. The ethanolic extract of lemon verbena at the concentration of 12.5 mg/mL had no inhibitory effect on gram-negative bacteria growth. In both methods, lemon verbena extract had the highest and lowest effect on *S. aureus* and *P. aeruginosa*, respectively. The MIC for *S. aureus*, *L. innocua*, *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. typhimurium* were 8, 16, 64, 64, 128 and 128 mg/mL, respectively. The MIC of lemon verbena extract was higher in gram-negative bacteria than in gram-positive bacteria. The MBC of lemon verbena ethanolic extract ranged from 32 to 256 mg/mL, depending on the type of bacteria (gram-positive or gram-negative). The highest MIC and MBC were observed against *P. aeruginosa* and *S. typhimurium* bacteria, and the lowest MIC and MBC values were observed against *S. aureus*. The diameter of zone of microbial growth inhibition in the agar well diffusion method was higher than in the disk diffusion method.

Discussion

The ethanolic extract of lemon verbena has an acceptable antibacterial activity against the study microorganisms. It has higher antimicrobial activity against gram-positive bacteria compared to gram-negative bacteria. Therefore, lemon verbena extract can be used in the food and pharmaceutical industries as a natural antimicrobial agent. Considering the increasing resistance of bacteria to chemical antibiotics, more studies on this plant and its antibacterial compounds are needed for treating infections.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study has been approved by the Ethics Committee of Bu-Ali Sina University (Ethics Code: IR.BASU.REC.1398.036).

Funding

The current research has been financially supported by the Vice-Chancellery for Research and Technology Affairs of Bu-Ali Sina University.

Authors contributions

Study idea and design: Zahra Izadi, Naser Mirazi; Data collection: Zahra Izadi; Data analysis and interpretation:

Zahra Izadi; Article written by: Zahra Izadi and Naser Mirazi; Review of results and final version: Zahra Izadi, Naser Mirazi.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

We hereby express our gratitude to the the Vice-Chancellery for Research and Technology Affairs of Bu-Ali Sina University for their cooperation and supporting in conducting this research.

مقاله پژوهشی

بررسی خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره اتانولی به لیمو

* زهرا ایزدی^۱، ناصر میرازی^۲

۱. گروه علوم و مهندسی باغبانی، مجتمع آموزش عالی نهاوند، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.



Citation Izadi Z, Mirazi N. [Antioxidant and Antimicrobial Properties of Ethanolic Extract of Lemon Verbena (Persian)]. *Qom Univ Med Sci J*. 2023; 16(10):816-829. <https://doi.org/10.32598/qums.16.10.2091.2>

doi <https://doi.org/10.32598/qums.16.10.2091.2>

چکیده

زمینه و هدف: مواد نگهدارنده شیمیایی معمولاً برای جلوگیری از فساد مواد غذایی و عوامل مسمومیت از استفاده می شوند. علی رغم افزایش ماندگاری مواد غذایی، این ترکیبات می توانند دارای اثرات مضر باشند. باقی مانده های ترکیبات شیمیایی در غذاها موجب افزایش مقاومت میکروبی می شوند. هدف اصلی تحقیق حاضر بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره اتانولی به لیمو بر برخی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی از روش خیساندن و حلال اتانول جهت عمل عصاره گیری استفاده شد. محتوای فنول و فلاونوئیدی عصاره اتانولی به لیمو اندازه گیری شد. فعالیت آنتی اکسیدانی غلظت های مختلف عصاره با آزمون مهار رادیکال های آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل بررسی شد و با آنتی اکسیدان سنتزی بوتیل هیدروکسی آنیزول مقایسه شد. اثر ضد میکروبی عصاره به لیمو روی باکتری های استافیلوکوک اورئوس، لیستریا اینوکوا، باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیغیموریوم به روش های دیسک دیفیوژن، چاهک در آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی تعیین شد. داده های آزمایش با استفاده از آنالیز واریانس با نرم افزار SPSS ویرایش ۲۰ تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه میانگین ها به روش آماري چند دامنه ای دانکن انجام شد.

یافته ها: مقدار فنول و فلاونوئید اندازه گیری شده عصاره اتانولی به لیمو به ترتیب برابر ۹۶/۴۷±۰/۲۵ میلی گرم اسید گالیک در گرم عصاره و ۳۱/۰۷±۰/۴۲ میلی گرم کوئرستین در هر گرم عصاره بود. میزان IC₅₀ عصاره این گیاه ۱۱/۷۹±۰/۷۶ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. در حالی که این پارامتر برای آنتی اکسیدان بوتیل هیدروکسی آنیزول ۱۰/۱۶±۰/۲۹ میکروگرم بر میلی لیتر بود. در هر ۲ روش دیسک دیفیوژن و چاهک در آگار، با افزایش غلظت عصاره به لیمو، قطر هاله عدم رشد افزایش یافت. عصاره اتانولی به لیمو در غلظت ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر هیچ اثر مهاري بر رشد باکتری های گرم منفی نداشت. در هر ۲ روش مورد بررسی عصاره به لیمو بیشترین تأثیر را بر باکتری استافیلوکوک اورئوس داشت. محدوده حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی این گیاه بین ۸ تا ۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر بسته به نوع باکتری (گرم مثبت یا گرم منفی) متفاوت بود.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد عصاره اتانولی گیاه به لیمو دارای اثر ضد میکروبی قوی تری بر باکتری های گرم مثبت بود. بنابراین می توان از عصاره به لیمو در صنایع غذایی و دارویی به عنوان یک ماده طبیعی ضد میکروبی استفاده کرد. با توجه به نتایج حاصل و افزایش روز افزون مقاومت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک های شیمیایی، پیشنهاد می شود با مطالعات بیشتر روی ترکیبات ضد میکروبی این گیاه، امکان استفاده از آن برای درمان برخی از عفونت ها فراهم شود.

تاریخ دریافت: ۱۹ اردیبهشت ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۲۸ آبان ۱۴۰۰

تاریخ انتشار: ۱۱ دی ۱۴۰۱

کلیدواژه ها:

به لیمو، لیمپیا،
آنتی اکسیدان ها، عوامل
ضد باکتریایی

* نویسنده مسئول:

زهرا ایزدی

نشانی: همدان، دانشگاه بوعلی سینا، مجتمع آموزش عالی نهاوند، گروه علوم و مهندسی باغبانی.

تلفن: ۸۱۱۳۲۱۱ (۹۱۸) +۹۸

رایانامه: z.izadi@basu.ac.ir



مقدمه

گرفته و نتایج بیانگر قدرت و توانایی این ترکیبات در ممانعت از رشد دامنه وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد است [۷].

گیاه به‌لیمو^۴ از خانواده شاهپسند^۵ بومی آمریکای جنوبی بوده و درختچه‌ای همیشه سبز و برافراشته به ارتفاع ۱/۵ تا ۲ متر با برگ‌های سرنیزه‌ای به طول ۷ تا ۱۰ سانتی‌متر است [۸]. جنس *Lippia* دارای بیش از ۲۰۰ گونه است که در این بین، گونه *citriodora* دارای اهمیت ویژه‌ای است. به‌لیمو یکی از گیاهان دارویی ارزشمند است که به‌عنوان یک گیاه معطر کشت و استفاده می‌شود. از برگ‌های این گیاه بوی خوشایند لیمو به مشام می‌رسد. برگ‌های این گیاه به‌صورت کشیده و به رنگ سبز کم‌رنگ به‌صورت دسته‌های سه‌تایی روی ساقه قرار می‌گیرند. برگ‌های به‌لیمو دارای ترکیبات فنولیک، فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و فنیل پروپانویدها هستند [۹]. همچنین گزارش شده است که عصاره به‌لیمو دارای ۲ نوع ایریدوئید^۶ به نام وربنالین^۷ و هاستاتوزید^۸ است [۱۰]. در فرهنگ گیاه‌درمانی ایران، برگ‌های این گیاه به‌صورت دم‌کردنی برای آرام‌بخشی، ضدتشنج بودن و برطرف کردن تپش قلب و سرگیجه مصرف دارد. برگ‌ها و اندام رویشی این گیاه دارای خاصیت تب‌بر، مسکن، ضدنفخ و کمک‌کننده به هضم غذاست. جای به‌لیمو فوق‌العاده آرام‌بخش و تسکین‌دهنده اعصاب است [۱۱]. همچنین گیاه به‌لیمو یک وسیله سنتی برای درمان سرماخوردگی، تب و اسهال است و برای درمان تب و درد معده نیز کاربرد دارد. عصاره این گیاه حاوی ترکیبات فنولی و دارای خواص ضدالتهابی، ضد میکروبی، ضد دردی و آنتی‌اکسیدانی است [۱۲]. به همین دلیل می‌تواند در صنایع دارویی و غذایی کاربرد زیادی داشته باشد.

باتوجه به خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی گیاه به‌لیمو و از طرفی به دلیل سهل‌الوصول و ارزان بودن این گیاه و همچنین مصرف دارویی آن از زمان‌های دور، این تحقیق می‌تواند مقدمه‌ای جهت استفاده عملی از عصاره این گیاه در صنایع دارویی و غذایی باشد. مطالعه حاضر به‌منظور ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو روی باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوک اورئوس، لیستریا اینوکوا و باسیلوس سرئوس) و گرم منفی (اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفیموریوم) در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، برگ‌های گیاه به‌لیمو در ابتدای مرحله گل‌دهی در مهر ماه ۱۳۹۸ از گلخانه آموزشی پژوهشی دانشگاه

در سال‌های اخیر رویکرد مردم اکثر کشورهای جهان به مصرف داروهای گیاهی افزایش یافته است. به نظر می‌رسد عوارض جانبی کمتر نسبت به داروهای شیمیایی، دلیل اصلی این تغییر الگوی مصرف به نفع داروهای گیاهی باشد. داروهایی که امروزه در دنیا به‌طور وسیعی برای درمان انواع بیماری‌ها اعم از عفونت‌های باکتریایی، ویروسی و قارچی تا انواع بیماری‌های متابولیک به کار می‌روند، منشأ طبیعی دارند. این ترکیبات نه تنها در درمان بیماری‌های ناشی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا نقش دارند، بلکه به‌طور هم‌زمان می‌توانند اثرات جانبی که اغلب با مصرف نگهدارنده‌های شیمیایی و سنتزی همراه هستند را نیز کاهش دهند [۱، ۲]. این مسئله به همراه عوارض جانبی بعضی آنتی‌بیوتیک‌ها موجب شده است که محققین و دانشمندان همواره به دنبال آنتی‌بیوتیک‌های جدید با اثرات جانبی کمتر باشند. به همین دلیل منابع طبیعی، به‌خصوص گیاهان دارویی دارای اسرار بی‌شماری هستند و کشف هریک از اسرار، گامی در جهت درمان و ریشه‌کن کردن بیماری‌هاست و از جایگاه خاصی برخوردار است [۳]. علاوه بر این به‌منظور حفظ کیفیت مواد غذایی و افزایش طول عمر نگهداری آن‌ها از آنتی‌اکسیدان‌ها استفاده می‌شود.

استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به دلیل کنترل رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از عمل اکسیداسیون (فساد شیمیایی) نقش بسزایی در افزایش پایداری و ماندگاری محصولات غذایی دارد. از سویی دیگر استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول^۱، بوتیل هیدروکسی تولوئن^۲، تری بوتیل هیدروکینون^۳ و پروپیل گالات در صنایع داروسازی، پزشکی و غذایی بسیار رواج یافته است [۴، ۵]. باین‌حال اثرات نامطلوب تغذیه‌ای و سمیت این آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است. به همین دلیل یافتن ترکیبات دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی با منشأ طبیعی (اسانس و عصاره گیاهی) شدیداً مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است، تعدادی از ترکیبات با خواص آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان فراورده‌های ثانویه توسط گیاهان ساخته می‌شود که از جمله آن‌ها می‌توان به ترکیبات فنولی اشاره کرد [۶]. خوشبختانه سرزمین ایران به دلیل شرایط آب‌وهوایی مختلف دارای طیف وسیعی از گیاهان دارویی است و ایرانیان از دیرباز علاقه‌مند به استفاده از ترکیبات طبیعی دارویی بوده‌اند.

بهره‌گیری از روش‌های نوین، امکان شناسایی مواد مؤثره درمانگر موجود در گیاهان را فراهم کرده است. بنابراین در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای جهت بررسی و ارزیابی اثرات ضد میکروبی فراورده‌هایی با منشأ گیاهی از جمله عصاره‌ها و اسانس‌ها صورت

4. *Lippia citriodora* L
5. Verbenaceae
6. Iridoids
7. Verbenalin
8. Hastatoside

1. Butylated hydroxyanisole (BHA)
2. Butylated hydroxytoluene (BHT)
3. Tert-Butylhydroquinone (TBHQ)

شد که ابتدا محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) از عصاره آماده شدند، سپس ۰/۳ میلی‌لیتر از عصاره با ۲/۷ میلی‌لیتر از محلول متانولی ۲ و ۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل به‌شدت مخلوط شد و ۶۰ دقیقه در مکانی تاریک نگهداری شد و جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Analytik Jena AG, Jena, Germany) خوانده شد [۱۷]. از آنتی‌اکسیدان سنتزی بوتیل هیدروکسی آنیزول جهت مقایسه استفاده شد. درنهایت درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد محلول ۲ و ۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل طبق فرمول شماره ۱ محاسبه شد:

1.

$$\text{درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد} = \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100 \text{ DPPH}$$

در این رابطه A_c و A_s به ترتیب جذب شاهد و جذب نمونه است. سپس با رسم منحنی درصد مهار در مقابل غلظت‌های مختلف عصاره، مقدار IC_{50} (غلظتی از سوپسترا بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر که برای کاهش محلول ۲ و ۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل به میزان ۵۰ درصد اولیه مورد نیاز است) برای عصاره تعیین شد [۱۸].

سویه‌های میکروبی استاندارد به‌صورت آمپول لیوفیلیزه خریداری شدند. سویه‌های میکروبی شامل ۳ سویه گرم مثبت (استافیلوکوک اورئوس، لیستریا اینوکوا و باسیلوس سرئوس) و ۳ سویه گرم منفی (اشرشیاکلی، سودوموناس اثرئوزینوزا و سالمونلا تیفیموریوم) بود (جدول شماره ۱).

جهت فعال‌سازی سویه‌های میکروبی و استاندارد کردن آن‌ها جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره به‌لیمو بر آن‌ها، مطابق با استاندارد نیم مک‌فارلند اقدام شد. در این آزمایش از کشت تازه و ۲۴ ساعت از سویه‌های میکروبی استفاده شد. تک کلنی خالص از هر سویه میکروبی با دقت برداشته و در محلول رینگر ریخته شد و تا برابری جذب آن با محلول نیم مک‌فارلند عمل رقیق‌سازی انجام شد. جذب در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این حالت میزان هر سویه میکروبی برابر با $10^8 \times 1/5$ واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر است [۱۹].

اولین روش ضد میکروبی برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی به‌لیمو شامل روش دیسک دیفیوژن آگار بود. در این روش از ۵ دیسک کاغذی (ساخت پادتن طب) در اطراف و یک دیسک در مرکز پلیت به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. میزان ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی به‌لیمو به‌آرامی بر سطح دیسک‌های قرار گرفته و در سطح محیط کشت حاوی هریک از سویه‌های استاندارد ریخته شد. پس از آن پتری دیش‌های کشت شده و جهت عمل پیش‌انتشار ۱۵ دقیقه در دمای اتاق

نهبوند برداشت شد. بعد از انتقال برگ‌ها به آزمایشگاه کشاورزی، جهت رفع گرد و غبار برگ‌ها با آب سرد به‌صورت سطحی شسته شدند و سپس ۴ روز در سایه خشک شدند. برگ‌های خشک‌شده این گیاه توسط آسیاب آزمایشگاهی پودر شدند و با استفاده از حلال اتانول به نسبت ۵ به ۱ مخلوط شدند و ۷۲ ساعت در دستگاه شیکر در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. عمل تکاندن دادن به دلیل تأثیر بهتر حلال بر گیاه جهت استحصال هرچه بهتر ترکیبات گیاه بود. بعد از ۷۲ ساعت، ابتدا مخلوط حلال و گیاه از پارچه تمیز توری عبور داده شد و بقایای گیاه پس از چند مرحله فشردن و اطمینان از استخراج کامل دور ریخته شد. مخلوط عصاره و حلال از کاغذ صافی عبور داده شده و سپس ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ (Centrifugus، ایران) شد. جهت حذف حلال اتانول، مخلوط به دستگاه روتاری (Heidolph, Hei-Vap, Germany) منتقل شد و درنهایت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد در آن خشک شد. عصاره به‌لیمو توسط کاردک به‌طور دقیق تراشیده و درون ظرف شیشه‌ای تیره رنگ در یخچال نگهداری شد [۱۳].

محلول کوئرستین، معرف فولین سیوکالتو و محلول ۲ و ۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل^۱ از شرکت سیگما (آمریکا) و اتانول از شرکت صنایع شیمیایی غدیر (ایران) و بقیه مواد از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند.

مقدار ۵۰ میلی‌گرم عصاره را با ۱ میلی‌لیتر متانول مخلوط کرده و ۵۰ میکرولیتر از آن با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو ترکیب شد. محلول مذکور ۲۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت و سپس ۲/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم به آن افزوده و میزان جذب در طول موج ۷۳۵ نانومتر قرائت شد [۱۴]. منحنی استاندارد با استفاده از گالیک اسید در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام تهیه و میزان جذب آن‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت شد. سپس منحنی استاندارد رسم و استفاده شد [۱۵].

میزان محتوای فلاونوئید عصاره اتانولی به‌لیمو از طریق روش رنگ‌سنجی ارزیابی شد. برای این منظور، غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه شد و ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد و ۰/۱ میلی‌لیتر آلومنیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار و درنهایت ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر هم به آن اضافه شد و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد. کوئرستین به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد [۱۶].

اندازه‌گیری توانایی عصاره به‌لیمو در مهار رادیکال‌های آزاد محلول ۲ و ۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل به این صورت انجام

9. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

جدول ۱. میکروارگانیسم‌های موردبررسی در زی سنجی اثر ضد میکروبی عصاره به‌لیمو

نام میکروارگانیسم	کد اختصاری	نوع میکروارگانیسم
استافیلوکوک اورئوس	(ATCC ۲۵۹۲۳)	کوکوس گرم مثبت
لیستریا اینوکوا	(ATCC ۳۳۰۹۰)	باسیل گرم مثبت
باسیلوس سرئوس	(ATCC ۱۲۳۷)	باسیل گرم مثبت
اشرشیاکلی	(ATCC ۲۵۹۲۳)	باسیل گرم منفی
سودوموناس اثرئوینوزا	(ATCC ۲۷۸۵۳)	باسیل گرم منفی
سالمونلا تیفیموریوم	(ATCC ۱۹۳۰)	باسیل گرم منفی


 مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

قرار گرفتند [۲۰]. درنهایت پتری دیش‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفتند. پس از اتمام زمان انکوباسیون پتری دیش‌های میکروبی از انکوباتور خارج شده و منطقه بازدارندگی یا عدم رشد در محیط اطراف دیسک‌ها با در نظر گرفتن قطر دیسک توسط خط‌کش اندازه‌گیری و برحسب میلی‌متر گزارش شد [۲۱].

روش چاهک در آگار دومین روش به کار گرفته‌شده برای اندازه‌گیری عصاره اتانولی به‌لیمو بر سویه‌های موردبررسی بود. در این روش به‌طور خلاصه ۵ عدد چاهک به قطر ۶ میلی‌متر که شامل ۴ عدد چاهک در اطراف پتری دیش و یک عدد چاهک به‌عنوان کنترل منفی بود توسط پیپت پاستور در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار تعبیه شد.

از پتری دیش ۸ سانتی‌متری که حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون آگار بود استفاده شد. میزان ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۱/۲، ۲/۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی به‌لیمو توسط سمپلر به‌آرامی درون ۴ چاهک ریخته شد. پس از آن پتری دیش‌های کشت‌شده ۱۵ دقیقه در دمای یخچال قرار گرفتند. درنهایت پتری دیش‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفتند. پس از اتمام زمان انکوباسیون پتری دیش‌های میکروبی از انکوباتور خارج شده و منطقه بازدارندگی یا عدم رشد در اطراف هر یک از چاهک‌ها با خط‌کش به‌طور دقیق اندازه‌گیری و برحسب میلی‌متر گزارش شد [۲۲].

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی^{۱۰} ابتدا غلظت‌های مختلفی از عصاره اتانولی به‌لیمو شامل ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شدند. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی به‌لیمو درون خانه‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. ۱۰ میکرولیتر از هر یک از سوسپانسیون میکروبی استاندارد نیز به هر خانه اضافه شد. جهت

تهیه غلظت‌های مختلف عصاره به‌لیمو میزان ۲/۵۶ گرم از عصاره اتانولی این گیاه با ۹/۵ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث و ۰/۵ میلی‌لیتر دیمتیل سولفواکسید ۰/۵ درصد مخلوط شد و غلظت ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ساخته شد. برای تهیه سایر غلظت‌ها با نصف کردن غلظت مادر، رقت‌های بعدی عصاره ساخته شد. درنهایت میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای درون انکوباتور ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت، میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای از انکوباتور خارج شد و میزان ۲۰ میکرولیتر از معرف تری فنیل تترازولیوم کلرید به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و مجدداً عمل انکوبه‌گذاری ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در اثر واکنش بین معرف رنگی تری فنیل تترازولیوم کلرید با سویه‌های میکروبی (در صورت رشد) رنگ قرمز یا ارغوانی مشاهده می‌شود. اولین چاهکی که در آن تغییر رنگ قرمز و ارغوانی مشاهده نشد غلظت آن، به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی برای سویه بیماری‌زا گزارش و ثبت شد [۲۳].

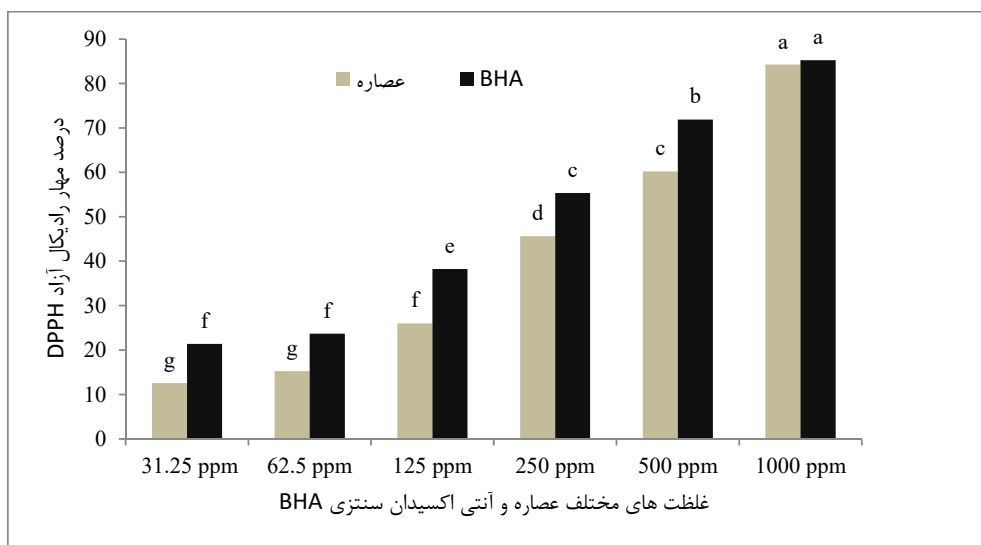
برای تعیین حداقل غلظت کشندگی^{۱۱} عصاره اتانولی به‌لیمو، از غلظت حداقل غلظت مهارکنندگی به سمت غلظت‌های بیشتر به روش پورپلیت میزان ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌ها بر محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از کشت غلظت‌های مختلف عصاره به‌لیمو، پتری دیش‌های کشت‌شده درون انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۲۴ ساعت قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت پتری دیش‌ها به‌صورت چشمی ارزیابی شدند. اولین پتری دیشی که در آن کلنی باکتری قابل مشاهده پیدا نشد، غلظت آن به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد [۲۴].

آنالیز آماری

تمامی آزمایش‌های ذکرشده ۳ بار تکرار شد و داده‌های جمع‌آوری‌شده با استفاده از آنالیز واریانس با نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۰ تجزیه و تحلیل آماری شدند. مقایسه میانگین‌ها

11. Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

10. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)



تصویر ۱. مقایسه میانگین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی بهلیمو و آنتی اکسیدان بوتیل هیدروکسی آنیزول در غلظت‌های مختلف حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن هستند

و IC_{50} برای عصاره موردنظر برابر با $11/79 \pm 0/76$ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد که در مقایسه با آنتی اکسیدان سنتزی بوتیل هیدروکسی آنیزول ($10/16 \pm 0/29$ میکروگرم بر میلی‌لیتر) ضعیف‌تر بود. همچنین فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد محلول ۲ و ۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل عصاره این گیاه در غلظت‌های مختلف (۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) تعیین شد. همان‌طور که در تصویر شماره ۱ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت عصاره بهلیمو همانند افزایش غلظت بوتیل هیدروکسی آنیزول میزان مهار رادیکال‌های آزاد نیز افزایش یافت و تفاوت آن (به غیر از غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام عصاره) با بوتیل هیدروکسی آنیزول معنی‌دار بود ($P < 0/05$). بیشترین درصد مهار رادیکال‌های آزاد در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام برابر با ۸۴/۲۵ درصد

با آزمون آماری چنددامنه‌ای دانکن انجام شد و میانگین آن‌ها به‌عنوان مقدار مورد نظر اعلام شد. داده‌ها با P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شدند. نتایج براساس میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شدند. همچنین جهت رسم نمودار از نرم‌افزار اکسل استفاده شد.

یافته‌ها

محتوای فنول و فلاونوئید اندازه‌گیری شده عصاره اتانولی بهلیمو به ترتیب برابر $96/47 \pm 0/35$ میلی گرم اسید گالیک در گرم عصاره و $31/07 \pm 0/42$ میلی گرم کوئرستین در هر گرم عصاره بود. ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره این گیاه به روش محلول ۲ و ۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل انجام شد

جدول ۲. میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر عصاره اتانولی بهلیمو بر میکروارگانیزم‌های مورد مطالعه (روش دیسک دیفیوژن (آگار)

میکروارگانیزم	غلظت عصاره (میلی گرم بر میلی لیتر)			
	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵
استافیلوکوک اورئوس	$19/10 \pm 0/95^d$	$17/50 \pm 0/73^c$	$14/60 \pm 0/33^b$	$8/20 \pm 0/47^a$
لیستریا اینوکوا	$18/60 \pm 0/51^d$	$15/30 \pm 0/55^c$	$13/40 \pm 0/33^b$	$7/70 \pm 0/35^a$
باسیلوس سرئوس	$15/30 \pm 0/66^c$	$12/90 \pm 0/25^b$	$12/00 \pm 0/65^b$	$6/20 \pm 0/50^a$
اشرشیاکلی	$13/40 \pm 0/35^b$	$11/30 \pm 0/50^a$	$11/10 \pm 0/25^a$	-**
سودوموناس آئروژینوزا	$9/60 \pm 0/45^b$	$7/90 \pm 0/70^a$	$7/60 \pm 0/45^a$	-
سالمونلا تیفی‌موریوم	$10/30 \pm 0/35^c$	$9/00 \pm 0/55^b$	$7/90 \pm 0/25^a$	-

* در هر ردیف میانگین‌های قطر هاله عدم رشد که دارای حروف مشابه هستند بر مبنای آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.
** علامت (-) نشان‌دهنده عدم وجود فعالیت ضد میکروبی است.

جدول ۳. میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر عصاره اتانولی به‌لیمو بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه (روش چاهک در آگار)

میکروارگانیسم	غلظت عصاره (میلی گرم بر میلی لیتر)			
	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵
استافیلوکوک اورئوس	۲۳/۶۰±۰/۵۰ ^d	۲۰/۹۰±۰/۲۵ ^c	۱۷/۲۰±۰/۵۰ ^b	۱۱/۵۰±۰/۳۵ ^a
لیستریا اینوکوا	۲۲/۰۰±۰/۷۵ ^d	۱۸/۸۰±۰/۳۵ ^c	۱۶/۰۰±۰/۱۵ ^b	۱۰/۳۰±۰/۵۰ ^a
باسیلوس سرئوس	۱۹/۴۰±۰/۸۵ ^d	۱۶/۸۰±۰/۷۵ ^c	۱۴/۲۰±۰/۵۰ ^b	۹/۰۰±۰/۱۵ ^a
اشرشیاکلی	۱۴/۱۰±۰/۵۰ ^c	۱۲/۵۰±۰/۲۵ ^b	۱۱/۶۰±۰/۰۰ ^a	—**
سودوموناس آئروژینوزا	۱۰/۰۰±۰/۳۵ ^b	۸/۷۰±۰/۷۰ ^b	۷/۸۰±۰/۴۰ ^a	—
سالمونلا تیفی‌موریوم	۱۱/۷۰±۰/۶۵ ^c	۹/۵۰±۰/۱۵ ^b	۸/۲۰±۰/۰۰ ^a	—

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

* در هر ردیف میانگین‌های قطر هاله عدم رشد که دارای حروف مشابه هستند بر مبنای آزمون چنددامنه‌ای

دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

** علامت (-) نشان‌دهنده عدم وجود فعالیت ضد میکروبی است.

با افزایش غلظت عصاره به‌لیمو در تمامی باکتری‌ها، قطر هاله عدم رشد افزایش یافت. به‌طوری‌که قطر هاله مشاهده‌شده در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای تمامی سویه‌های میکروبی بیشترین بود. در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره این گیاه، بیشترین قطر هاله عدم رشد برای باکتری استافیلوکوک اورئوس با قطر ۱۹/۱۰±۰/۹۵ میلی‌متر حاصل شد. در همین غلظت کمترین قطر هاله عدم رشد نیز متعلق به باکتری سودوموناس آئروژینوزا با قطر ۹/۶۰±۰/۴۵ میلی‌متر بود. نتایج آزمون آماری و مقایسه دوتایی میان غلظت‌های مختلف عصاره به‌لیمو نشان داد به غیر از غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری‌های باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا در سایر غلظت‌های عصاره مورد بررسی اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.05$).

همان‌طور که در جدول شماره ۳ مشاهده می‌شود در روش چاهک در آگار با افزایش غلظت عصاره به‌لیمو از ۱۲/۵ به ۱۰۰

و کمترین قدرت مهارکنندگی برابر با ۱۲/۵۶ درصد، در غلظت ۳۱/۲۵ پی‌پی‌ام حاصل شد (تصویر شماره ۱).

نتایج ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو به روش دیسک دیفیوژن آگار بر باکتری‌های مورد بررسی در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد عصاره اتانولی در غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر تمامی باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوک اورئوس، لیستریا اینوکوا و باسیلوس سرئوس) کاملاً مؤثر بود، اما تأثیری بر باکتری‌های گرم منفی (اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفی‌موریوم) نداشت و نتوانست از رشد این باکتری‌ها بر روی محیط کشت جلوگیری کند (جدول شماره ۲). در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره به‌لیمو برای تمامی میکروارگانیسم‌ها هاله عدم رشد مشاهده شد. همچنین مشخص شد که قطر هاله عدم رشد مشاهده‌شده در اطراف دیسک برای باکتری‌های گرم مثبت بزرگ‌تر از باکتری‌های گرم منفی بود.

جدول ۴. حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی به‌لیمو بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

میکروارگانیسم	حداقل غلظت مهارکنندگی میلی گرم بر میلی لیتر	حداقل غلظت کشندگی میلی گرم بر میلی لیتر
استافیلوکوک اورئوس	۸	۳۲
لیستریا اینوکوا	۱۶	۶۴
باسیلوس سرئوس	۶۴	۶۴
اشرشیاکلی	۶۴	۱۲۸
سودوموناس آئروژینوزا	۱۲۸	۲۵۶
سالمونلا تیفی‌موریوم	۱۲۸	۲۵۶

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

برگ به‌لیمو را به ترتیب ۷۲/۵۵ میلی گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره و ۴۰/۵ میلی گرم کوئرستین در هر گرم عصاره گزارش کردند [۲۷] که محتوای فنولی آن به مراتب از عصاره اتانولی این گیاه کمتر و محتوای فلاونوئیدی آن بیشتر بود. کومار و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که محتوای فنولی عصاره اتانولی به‌لیمو ۵۳/۱ میلی گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره بود [۲۸]. آلدین و همکاران (۲۰۱۵) نیز بیان کردند که محتوای فلاونوئیدی عصاره آبی به‌لیمو در محدوده ۸ تا ۲ میلی گرم کوئرستین در هر گرم عصاره بود [۲۹]. تفاوت در نتایج محتوای فنول و فلاونوئید در این مطالعه با سایر تحقیقات صورت گرفته می‌تواند ناشی از نوع واریته، محل رشد گیاه (نوع خاک، دما و میزان آب)، زمان جمع‌آوری گیاه، روش خشک کردن، روش و شرایط مختلف استخراج عصاره و همچنین روش‌های مختلف اندازه‌گیری این ترکیبات باشد [۳۰، ۳۱].

آنتی‌اکسیدان‌هایی که مهارکننده رادیکال‌های آزاد هستند یکی از مهم‌ترین انواع آنتی‌اکسیدان هستند که بررسی ظرفیت آن‌ها موضوع بسیاری از تحقیقات و بحث‌های علمی است. آنتی‌اکسیدان‌های مهار از طریق مهار رادیکال آزاد قبل از حمله به مولکول‌های ضروری بدن عمل می‌کنند [۳۲]. مهار رادیکال آزاد یکی از شناخته‌شده‌ترین مکانیسم‌هایی است که به واسطه آن ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌توانند اکسیداسیون چربی‌ها را مهار کنند. اساس این روش بر مبنای احیای رادیکال آزاد محلول ۲ و ۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل به وسیله آنتی‌اکسیدان‌ها در غیاب سایر رادیکال‌های آزاد در محیط است که نتیجه این عمل باعث ایجاد رنگی در محیط می‌شود که شدت آن با دستگاه طیف‌سنجی قابل اندازه‌گیری است [۳۳].

نتایج حاصل از بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره به‌لیمو نیز دال بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن بود و با افزایش غلظت عصاره میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد افزایش یافت که به علت افزایش مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در غلظت بالاتر عصاره است. غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام عصاره این گیاه با آنتی‌اکسیدان بوتیل هیدروکسی آنیزول تفاوت معنی‌داری نداشت. قاسمی و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف اسانس به‌لیمو پرداختند، آن‌ها اعلام کردند تمامی غلظت‌های اسانس به‌لیمو دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بود [۳۴]. نوشاد و همکاران همچنین پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی و اتانولی به‌لیمو را بررسی و مشاهده کردند که عصاره به‌لیمو از فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسبی برخوردار بود و عصاره اتانولی ظرفیت مهار رادیکال آزاد بالاتری نسبت به عصاره آبی نشان داد [۲۷]. رودکی و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند عصاره گیاه به‌لیمو دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبتاً بالایی (۷۰ درصد) است [۳۵].

نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد به روش انتشار در آگار (دیسک و چاهک) نشان داد که عصاره اتانولی به‌لیمو بر

میلی گرم بر میلی‌لیتر قطر هاله عدم رشد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، به‌طوری‌که آنالیز آماری برای مقایسه دوتایی هر یک از غلظت‌های استفاده‌شده از عصاره به‌لیمو برای تمامی سویه‌های میکروبی دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P < 0.05$). در این روش نیز همانند روش دیسک دیفیوژن آگار عصاره به‌لیمو در غلظت ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر روی تمامی باکتری‌های گرم منفی بی‌تأثیر بود (جدول شماره ۳). در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر بیشترین و کمترین قطر هاله عدم رشد به ترتیب متعلق به باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا بود. مقایسه نتایج فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی به‌لیمو در روش‌های انتشار دیسک و چاهک در آگار نشان داد قطر هاله عدم رشد در روش چاهک در آگار نسبت به دیسک دیفیوژن آگار بیشتر بود.

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی عصاره اتانولی به‌لیمو بر سویه‌های میکروبی در جدول شماره ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان داد حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس، لیستریا اینوکوا، باسیلوس سرئوس، اش‌رشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفی‌موریوم به ترتیب ۸، ۱۶، ۶۴، ۶۴، ۱۲۸ و ۱۲۸ میلی گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت بازدارندگی عصاره به‌لیمو در باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت بود. همچنین مشخص شد به غیر از باکتری باسیلوس سرئوس حداقل غلظت کشندگی برای تمامی سویه‌ها بزرگ‌تر از حداقل غلظت مهارکنندگی بود. به‌طوری‌که برای کشندگی سویه‌های میکروبی باید از غلظت‌های بالاتری نسبت به مهار آن استفاده کرد (جدول شماره ۴).

بحث

باتوجه به افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان نسبت به عوارض مواد شیمیایی و سنتزی در انسان‌ها، امروزه پژوهشگران صنعت غذا به استفاده از گیاهان دارویی جهت کنترل اکسیداسیون محصولات غذایی و افزایش عمر نگهداری آن‌ها علاقه‌مند شده‌اند [۲۵]. بنابراین، باتوجه به پتانسیل بالای به‌لیمو جهت ایجاد عطر و طعم در مواد غذایی و درمان بسیاری از بیماری‌ها، عصاره این گیاه دارویی استخراج و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی آن در این مطالعه بررسی شد. میزان فنول کل و فلاونوئید عصاره اتانولی به‌لیمو به ترتیب برابر با $96/47 \pm 0/35$ میلی گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره و $31/07 \pm 0/42$ میلی گرم کوئرستین در هر گرم عصاره تعیین شد. میزان محتوای فنول و فلاونوئید حاصل از این تحقیق می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره این گیاه را توجیه کند. همبستگی مثبت بین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است [۱۵، ۲۶]. نوشاد و همکاران (۲۰۲۱) محتوای فنولی و فلاونوئیدی عصاره

شد که میکروارگانیسم‌های لیستریا مونوسیتوزنز، استافیلوکوک اپیدرمایدیس، استافیلوکوک اورئوس، ساکارومایسس سروزیه و اسپرژیلوس نایجر از حساس‌ترین میکروارگانیسم‌ها و سالمونلا تیفیموریوم و اشرشیاکلی از مقاوم‌ترین باکتری‌ها به اسانس این گیاه بودند [۴۱].

در مطالعه‌ای دیگر که روی ۱۶ گیاه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف یمن انجام شد، مشخص شد که عصاره متانولی گیاه به‌لیمو بر استافیلوکوک اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و میکروکوکوس فلاووس دارای اثر ضد میکروبی است. درحالی‌که در برابر باکتری‌هایی مانند اشرشیاکلی فاقد این خاصیت بود [۴۲]. همچنین مشخص شد که فعالیت ضد میکروبی عصاره وابسته به غلظت است. با مطالعه اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی کرفس کوهی مشخص شد افزایش غلظت عصاره سبب افزایش قطر هاله عدم رشد در روش دیسک دیفیوژن می‌شود [۴۳]. سممانی و همکاران نیز بیان کردند که با افزایش غلظت عصاره‌های اتانولی، استونی و آبی به‌لیمو، اثر ضد میکروبی تمامی عصاره‌ها افزایش یافت [۴۴]. وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف را می‌توان به مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در عصاره نسبت داد. ارتباط مستقیمی بین افزایش غلظت عصاره و افزایش اثر مهارکنندگی وجود داشت. با افزایش غلظت، قطر هاله عدم رشد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. رابطه مثبت و معنی‌دار بین غلظت عصاره و ترکیبات فنولی گیاهانی چون آویشن شیرازی، بادرنجبویه، کاکوتی، رزماری، برگبو، مورد، زنیان، نعنای، اسطوخودوس، سیاه دانه و بوزیدان ثابت شده است. بنابراین با افزایش غلظت عصاره، غلظت ترکیبات فنولی به‌طور معنی‌داری افزایش یافته و به دنبال آن خاصیت ضد میکروبی آن‌ها نیز افزایش یافت [۴۵].

به‌طور کلی مقایسه نتایج بین ۲ روش دیسک دیفیوژن آگار و چاهک در آگار نشان داد قطر هاله عدم رشد در روش چاهک در آگار نسبت به دیسک دیفیوژن آگار بیشتر است. علت این امر را می‌توان نفوذ بهتر عصاره اتانولی به‌لیمو در محیط کشت و تماس مستقیم بین عصاره با سویه‌های میکروبی در روش چاهک و ناکارآمدی روش دیسک در جذب کافی عصاره و انتشار آن درون محیط کشت دانست. پژوهشگران زیادی نیز دلیل این اختلاف را ذکر کرده‌اند [۴۶]. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره این گیاه نیز نشان داد بیشترین حساسیت در برابر عصاره به‌لیمو مربوط به باکتری استافیلوکوک اورئوس بود و بیشترین مقاومت را باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفیموریوم از خود نشان دادند.

زارع (۲۰۱۸) فعالیت ضد میکروبی اسانس گیاه به‌لیمو را بر باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس، میکروکوکوس لوتئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتیلیس، اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا اکسیتوکا، اسپرژیلوس

همه میکروارگانیسم‌های مورد بررسی موثر بود و با کاهش غلظت عصاره اثر بازدارندگی آن نیز کاهش یافت. به‌طوری‌که غلظت ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر اثر کمی بر باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمون داشت، اما بر هیچ‌یک از باکتری‌های گرم منفی موثر نبود و نتوانست هاله عدم رشد ایجاد کند. براساس نتایج حاصل در هر ۲ روش مورد بررسی کمترین میانگین قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۱۲/۵ و ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. پروین و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند باکتری‌های گرم مثبت نسبت به اسانس گیاه زردچوبه حساس‌تر از سایر میکروارگانیسم‌ها بودند [۳۶]. نوشاد و همکاران نیز گزارش کردند که در غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی به‌لیمو در باکتری سالمونلا تیفی هیچ‌گونه هاله عدم رشد مشاهده نشد [۲۷].

چوپانی و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند عصاره متانولی گیاه به‌لیمو در غلظت‌های ۲۵ درصد و بالاتر از آن بر باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس و اشرشیاکلی دارای اثر ضد میکروبی است [۳۷]. باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساس‌تر بودند. در بررسی اثر روش‌های مختلف اسانس بر میزان فعالیت ضد میکروبی اسانس برگ به‌لیمو گزارش شده است که مستقل از روش استخراج، باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با انواع گرم منفی از حساسیت بیشتری برخوردار بودند [۳۸]. نوشاد و همکاران نیز گزارش کردند که سویه‌های گرم منفی (اشرشیاکلی و سالمونلا تیفی) در مقایسه با سویه‌های گرم مثبت (استافیلوکوک اورئوس و استرپتوکوک پیوژنز) دارای هاله عدم رشد کمتری بودند [۲۷]. شاید علت حساسیت کمتر باکتری‌های گرم منفی نسبت به عصاره این گیاه غشای خارجی اطراف دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی باشد که سبب محدود کردن انتشار ترکیبات ضد میکروبی به لایه لیپوپلی ساکاریدی می‌شود.

باکتری‌های گرم منفی غشا، ۲ لایه دارند که لایه پپتیدوگلیکان در فضایی بین غشای داخلی و خارجی به نام فضای پری پلاسمی قرار دارد. پری پلاسم بسیار فعال بوده و دارای آنزیم‌های مختلف تجزیه‌کننده و سم‌زداست. آنزیم‌های موجود در فضای پری پلاسمی (فسفاتاز و پروتئازها از گروه آنزیم‌های تجزیه‌ای و بتالاکتامازها) پنی سیلیناز و آنزیم‌های فسفوریله‌کننده آمینوگلیکوزید از گروه آنزیم‌های سم‌زدا قادرند مولکول‌های وارد شده را تجزیه کنند [۳۹]. درمورد باکتری‌های گرم مثبت، مواد ضد میکروبی به‌راحتی دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی را تخریب می‌کنند که به نشت سیتوپلاسم و انعقاد آن منجر می‌شود. مکانیسم دیگر توانایی ترکیبات فنولی در اتصال با پروتئین‌هاست. این ترکیبات با تخریب گیرنده‌های سطحی دیواره باکتری‌ها، در سنتز پروتئین‌ها اختلال ایجاد می‌کنند [۴۰]. در شناسایی ترکیبات شیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس به‌لیمو رشد یافته در یونان مشخص

همه نویسندگان.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه بوعلی سینا به دلیل همکاری و مساعدت در مسیر انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

نایجر و کاندیدا آلبيکانس را با روش دیسک دیفیوژن بررسی کرد. نتایج این پژوهشگر نشان داد فعالیت ضدقارچی اسانس این گیاه از فعالیت ضدباکتریایی آن بیشتر است و حساس‌ترین میکروارگانیسم نسبت به اسانس آن اسپریژیلوس نایجر گزارش شد [۴۷]. سمنانی و همکاران گزارش کردند عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی استخراج‌شده از گیاه به‌لیمو دارای فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های استرپتوکوک پیوژن، بروسلا ملی تنسیس، استافیلوکوک اپیدرمایدیس و کلبسیلا پنومونیه بودند [۴۴].

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد در عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو ظرفیت مهارکنندگی رادیکال آزاد قابل توجه بود و اثر ضد میکروبی بر سویه‌های مورد بررسی به‌ویژه باکتری‌های گرم مثبت از خود نشان داد. نتایج نشان داد باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب بیشترین و کمترین حساسیت را در برابر عصاره گیاه به‌لیمو از خود نشان دادند. مطابق نتایج، عصاره زیست‌فعال به‌لیمو قابلیت استفاده به‌عنوان منبع طبیعی ترکیبات ضد میکروب جهت جلوگیری از ضرر اقتصادی محصولات غذایی، بروز مشکلات سلامتی ناشی از سویه‌های میکروبی و مقاومت باکتریایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را دارد. علاوه بر این، می‌توان از عصاره به‌لیمو جهت تولید غذاهای فراسودمند و به‌منظور خنثی‌سازی صدمات ناشی از رادیکال‌های آزاد در بدن استفاده کرد. اگرچه انجام آزمون‌های تکمیلی به‌منظور کاربرد بالینی عصاره به‌لیمو پیشنهاد می‌شود.

در خاتمه به‌عنوان مهم‌ترین عوامل محدودکننده این تحقیق می‌توان به کمبود دستگاه‌ها و امکانات آنالیز فیتوشیمیایی و همچنین محدودیت اعتباری برای استفاده از سایر روش‌های تعیین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه دارای مصوبه کمیته اخلاق دانشگاه بوعلی سینا با کد اخلاق IR.BASU.REC.1398.036 است.

حامی مالی

معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه بوعلی سینا حامی مالی این مقاله بوده است.

مشارکت نویسندگان

ایده و طراحی مطالعه: زهرا ایزدی و ناصر میرازی؛ جمع‌آوری داده‌ها: زهرا ایزدی؛ تحلیل و تفسیر داده‌ها: زهرا ایزدی؛ نگارش مقاله: زهرا ایزدی و ناصر میرازی؛ بررسی نتایج و نسخه نهایی:

References

- [1] Fathi A, Sahari M, Zangiabadi M, Barzegar M. [Application of *satureja hortensis* L and *zataria multiflora* boiss essential oils as two natural antioxidants in soybean oil during microwave heating (Persian)]. *J Med Plants*. 2011; 10(39):12-21. [\[Link\]](#)
- [2] Shojaee-Aliabadi S, Hosseini H, Mohammadifar MA, Mohammadi A, Ghasemlou M, Ojagh SM, et al. Characterization of antioxidant-antimicrobial K-carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. *Int J Biol Macromol*. 2013; 52:116-24. [\[DOI:10.1016/j.ijbiomac.2012.08.026\]](#) [\[PMID\]](#)
- [3] Taleb H, Maddocks SE, Morris RK, Kanekanian AD. The antibacterial activity of date syrup polyphenols against *S. aureus* and *E. coli*. *Front Microbiol*. 2016; 7:198. [\[DOI:10.3389/fmicb.2016.00198\]](#) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [4] Afshar P, Sedaghat S. Bio-synthesis of silver nanoparticles using water extract of *Satureja hortensis* L and evaluation of the antibacterial properties. *Curr Nanosci*. 2016; 12(1): 90-3. [\[DOI: 10.2174/1573413711666150529202238\]](#)
- [5] Moradi M, Hassani A, Sefidkon F, Maroofi H. Chemical composition of leaves and flowers essential oil of *origanum vulgare* ssp. *gracile* growing wild in Iran. *J Essent Oil Bear Plants*. 2015; 18(1):242-7. [\[DOI:10.1080/0972060X.2014.884780\]](#)
- [6] Cheraghali F, Mirmoghtadaie L, Shojaee-Aliabadi S, Hosseini SM. [A comparative study of antimicrobial and antioxidant properties of Walnut Green Husk aqueous extract before and after microencapsulation (Persian)]. *Iran J Nutri Sci Food Technol*. 2016; 11(2):113-24. [\[Link\]](#)
- [7] Kozłowska M, Laudy AE, Przybył J, Ziarno M, Majewska E. Chemical composition and antibacterial activity of some medicinal plants from *lamiaceae* family. *Acta Pol Pharm*. 2015; 72(4):757-67. [\[PMID\]](#)
- [8] Argyropoulou C, Akoumianaki-Ioannidou A, Christodoulakis NS, Fasseas C. Leaf anatomy and histochemistry of *Lippia citriodora* (Verbenaceae). *Aust J Bot*. 2010; 58(5):398-409. [\[DOI:10.1071/BT10072\]](#)
- [9] Bahramsoltani R, Rostamiasrabadi P, Shahpiri Z, Marques AM, Rahimi R, Farzaei MH. *Aloysia citrodora* Paláu (Lemon verbena): A review of phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*. 2018; 222:34-51. [\[DOI:10.1016/j.jep.2018.04.021\]](#) [\[PMID\]](#)
- [10] Eidi M, Ilchizadeh Kavgani A, Sasaninezhad Z, Ghahramani R, Hamidi Nomani M. [Effect of *lippia citriodora* on anxiety behaviour in adult male rats (Persian)]. *Med J Tabriz Univ Med Sci Health Serv*. 2014; 36(5):68-73. [\[Link\]](#)
- [11] Rezaie MB, Jaymand K. [Study of chemical constituents oil of *lippia citriodora* H.B. ET K (Persian)]. *Pajouhesh Sazandegi*. 2002; 53:13-5. [\[Link\]](#)
- [12] Ombito JO, Salano EN, Yegon PK, Ngetich WK, Mwangi EM. A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (verbenaceae family). *J Sci Innov Res*. 2014; 3(4):460-66. [\[DOI:10.31254/jsir.2014.3411\]](#)
- [13] Tabatabaei Yazdi F, Alizade Behbahani B, Heidari Sureshjani M. The comparison of antimicrobial effects of chevil (*ferulagoan-gulata*) extract with a variety of common therapeutic antibiotics in vitro. *J Arak Univ Med Sci*. 2014; 17(3):35-46. [\[Link\]](#)
- [14] Barrahi M, Esmail A, Elhartiti H, Chahboun N, Benali A, Amiyare R, et al. Chemical composition and evaluation of antibacterial activity of fennel (*foeniculum vulgare* mill) seed essential oil against some pathogenic bacterial strains. *Caspian J Environ Sci*. 2020; 18(4):295-307. [\[DOI: 10.22124/cjes.2020.4276\]](#)
- [15] Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi SA, Mohebbi M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (*artemisia dracunculus*) extract and chemical composition of its essential oil. *J Food Meas Character*. 2017; 11:847-63. [\[DOI:10.1007/s11694-016-9456-3\]](#)
- [16] Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*. 2002; 10(3):178-82. [\[DOI:10.38212/2224-6614.2748\]](#)
- [17] Nakajima JI, Tanaka I, Seo S, Yamazaki M, Saito K. LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. *J Biomed Biotechnol*. 2004; 2004(5):241-7. [\[DOI:10.1155/S1110724304404045\]](#) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [18] Maisuthisakul P, Suttajit M, Pongsawatmanit R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chem*. 2007; 100(4):1409-18. [\[DOI:10.1016/j.foodchem.2005.11.032\]](#)
- [19] Tabatabaei Yazdi F, Alizade Behbahani B, Mortazavi A. Investigating the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the *lavandula stoechas* L. and *rosmarinus officinalis* L. extracts on pathogen bacterias "in vitro". *J Paramed Sci*. 2014; 5(2):91-101. [\[Link\]](#)
- [20] Samani Saffari E, Jooyandeh H, Alizadeh Behbahani B. [Evaluation of reciprocal pharmaceutical effect and antimicrobial activity of Shirazi thyme essential oil against some gram-positive and gram-negative bacteria (Persian)]. *J Food Sci Technol*. 2020; 17(104):1-11. [\[DOI:10.52547/fstc.17.104.1\]](#)
- [21] Gholami A, Arabestani MR, Ahmadi M. [Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanol extracts of *allium* *Jesdianum* plant on a number of pathogenic bacteria resistant to antibiotics (Persian)]. *Pajouhan Sci J*. 2016; 14(4):18-26. [\[DOI:10.21859/psj-140418\]](#)
- [22] Barzegar H, Mehrnia MA, Alizadeh Behbahani B. [Determination of the chemical composition, antioxidant activity and the antimicrobial effect of *Heracleum lasiopetalum* on infection and food poisoning microorganisms (Persian)]. *J Appl Microbiol Food Indust*. 2018; 4(4):15-28. [\[Link\]](#)
- [23] Bajer T, Silha D, Ventura K, Bajerova P. Composition and antimicrobial activity of the essential oil, distilled aromatic water and herbal infusion from *Epilobium parviflorum* Schreb. *Ind Crops Prod*. 2017; 100:95-105. [\[DOI:10.1016/j.indcrop.2017.02.016\]](#)
- [24] Barzegar H, Alizadeh Behbahani B, Mehrnia MA. Quality retention and shelf life extension of fresh beef using *Lepidium sativum* seed mucilage-based edible coating containing *Heracleum lasiopetalum* essential oil: An experimental and modeling study. *Food Sci Biotechnol*. 2019; 29(5):717-28. [\[DOI:10.1007/s10068-019-00715-4\]](#) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)

- [25] Reyes-Jurado F, Cervantes-Rincón T, Bach H, López-Malo A, Palou E. Antimicrobial activity of Mexican oregano (*lippia berlandieri*), thyme (*thymus vulgaris*), and mustard (*brassica nigra*) essential oils in gaseous phase. *Ind Crops Prod.* 2019; 131:90-5. [DOI:10.1016/j.indcrop.2019.01.036]
- [26] Noshad M, Alizadeh Behbahani B, Dehghani S. [Evaluation of the effect of aqueous and ethanolic extraction methods on extraction yield, phenolic compounds, and antioxidant and antimicrobial activity of *Stachys schtschegleevii* extract (Persian)]. *Food Sci Technol.* 2020; 17(100):117-25. [DOI:10.52547/fsct.17.100.117]
- [27] Noshad M, Alizadeh Behbahani, B. [Evaluation of the effect of aqueous and ethanolic extraction methods on the antioxidant and antimicrobial characteristics of *Lippia citriodora* extract (Persian)]. *J Food Sci Technol.* 2021; 18(118):273-83. [DOI:10.52547/fsct.18.118.273]
- [28] Kumar NK, Kumar KS, Raman BV, Reddy IB, Ramarao M, Rajagopal SV. Antibacterial activity of *Lippia citriodora* a folklore plant. *J Pure Appl Microbiol.* 2008; 2(1):249-52. [Link]
- [29] Aldeen MGN, Mansoor R, AlJoubbeh M. Fluctuations of phenols and flavonoids in infusion of lemon verbena (*lippia citriodora*) dried leaves during growth stages. *Nutr Food Sci.* 2015; 45(5):766-73. [DOI:10.1108/NFS-04-2015-0037]
- [30] Sosani Gharibvand Z, Alizadeh Behbahani B, Noshad M, Jooyandeh H. [Investigation of the functional groups of bioactive compounds, radical scavenging potential, antimicrobial activity and cytotoxic effect of *Callistemon Citrinus* aqueous extract on cell line HT29: A laboratory study (Persian)]. *J Rafsanjan Univ Med Sci.* 19(5):463-84. [DOI:10.29252/jrums.19.5.463]
- [31] Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Vasiee A, Mortazavi SA. *Oliveria decumbens* essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. *Microb Pathog.* 2018; 114:449-52. [DOI:10.1016/j.micpath.2017.12.033] [PMID]
- [32] Huang WY, Majumder K, Wu J. Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. *Food Chem.* 2010; 123(3):635-41. [DOI:10.1016/j.foodchem.2010.04.083]
- [33] Prevc T, Segatin N, Ulrih NP, Cigić B. DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. *Talanta.* 2013; 109:13-9. [DOI:10.1016/j.talanta.2013.03.046] [PMID]
- [34] Rahmanzadeh Ishkeh S, Asghari M, Shirzad H, Alirezalu A, Ghasemi G. Lemon verbena (*Lippia citriodora*) essential oil effects on antioxidant capacity and phytochemical content of raspberry (*Rubus ulmifolius* subsp. *sanctus*). *Sci Hortic.* 2019; 248:297-304. [DOI:10.1016/j.scienta.2018.12.040]
- [35] Roidaki A, Zoumpoulakis PG, Proestos C. Comparison of extraction methods for the determination of antioxidant activity in extracts of *hippophae rham noides* l. and *lippia citriodora*. the effect of seasonal collection. *Austin J Nutri Food Sci.* 2015; 3(1):1-8. [Link]
- [36] Parveen Z, Nawaz S, Siddique S, Shahzad K. Composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of *curcuma longa* L. kasur variety. *Indian J Pharm Sci.* 2013; 75(1):117-22. [DOI:10.4103/0250-474X.113544] [PMID] [PMCID]
- [37] Choupani M, Arabshahi-Delouee S, Alami M. Antioxidant properties of various solvent extracts of lemon verbena (*lippia citriodora*) leaves. *Int J Adv Biol.* 2014; 4(2):494-500. [Link]
- [38] Golmakani MT, Ghassemi A, Eskandari MH, Niakosari M. [Effect of different microwave-extraction methods on active components and antimicrobial activities of lemon verbena essential oils (Persian)]. *Res Innov Food Sci Technol.* 2016; 5(1):105-18. [DOI:10.22101/IRIFST.2016.06.01.518]
- [39] Amjad L, Mohammadi Kamalabadi M, Mohammadi Sichani M. [Antibacterial activity of methanol extract of *achillea wilhe lmsii* C. koch flower and leaf (Persian)]. *Qom Univ Med Sci J.* 2011; 5(3):50-6. [Link]
- [40] Negi PS, Jayaprakasha GK, Jena BS. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chem.* 2003; 80(3):393-7. [DOI:10.1016/S0308-8146(02)00279-0]
- [41] Fitsiou E, Mitropoulou G, Spyridopoulou K, Vamvakias M, Bardouki H, Galanis A, et al. Chemical composition and evaluation of the biological properties of the essential oil of the dietary phytochemical *lippia citriodora*. *Molecules.* 2018; 23(1):123. [DOI:10.3390/molecules23010123] [PMID] [PMCID]
- [42] Mothana RA, Abdo SA, Hasson S, Althawab FM, Alaghbari SA, Lindequist U. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some yemeni medicinal plants. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2010; 7(3):323-30. [DOI:10.1093/ecam/nen004] [PMID] [PMCID]
- [43] Sureshjani MH, Yazdi FT, Mortazavi SA, Behbahani BA, Shahidi F. Antimicrobial effects of *Kelussia odoratissima* extracts against food borne and food spoilage bacteria in vitro. *Arch Adv Biosci.* 2014; 5(2):115-20. [DOI:10.22037/jps.v5i2.5943]
- [44] Nassiri Semnani S, Ghassempoor N. [Evaluation of the antimicrobial effect of Lemon verbena leaves extracts on *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Brucella melitensis* in vitro and animal model study (Persian)]. *J Anim Physiol Dev.* 2020; 13(4):87-98. [Link]
- [45] Ahmadi E, Abdollahi A, Najafipour S, Meshkibaf MH, Fasihi-Ramandi M, Namdar N, et al. [Surveying the effect of the phenol compounds on antibacterial activity of herbal extracts : in vitro assessment of herbal extracts in Fasa-Fars province (Persian)]. *J Fasa Univ Med Sci.* 2016; 6(2):210-20. [Link]
- [46] Alizadeh M, Kolecka A, Boekhout T, Zarrinfar H, Ghanbari Nahzag M, Badiie P, et al. Identification of candida species isolated from vulvovaginitis in Mashhad, Iran by use of MALDI-TOF MS. *Curr Med Mycol.* 2017; 3(4):21-5. [DOI:10.29252/cmm.3.4.21]
- [47] Zare Z. Essential oil composition and antimicrobial activity of arial parts of *Lippia citriodora* H.B.K from Khuzestan at two phases: Before and after blooming. *Eco phytochem J Med Plants.* 2018; 6(3):110-21. [DOI:10.30495/ejpm.2018.694520]