

Antibacterial Effect of Alcoholic and Aqueous Extract of Carla on Escherichia coli and Staphylococcus aureus

Shahriar Saeidian (PhD)^{1,*} , Maryam Eslami (MSc)², Alireza Dashipor (PhD)³

¹ Assistant professor of Biochemistry, Payame Noor University, Iran

² M.S of Biochemistry, Payame Noor University, Iran

³ Assistant professor of Zahedan University of Medical Sciences, Iran

* **Corresponding Author:** Shahriar Saeidian, Payame Noor University, Iran. Email: saeedyan@pnu.ac.ir

Abstract

Received: 02/08/2019

Accepted: 09/09/2019

How to Cite this Article:

Saeidian S, Eslami M, Dashipor A. Antibacterial Effect of Alcoholic and Aqueous Extract Of Carla on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Pajouhan Scientific Journal*. 2019; 17(4): 15-24. DOI: 10.52547/psj.17.4.15

Background and Objectives: Today, with increasing resistance of bacteria to antibiotics, the use of medicinal plants has increased. The aim of this study was to investigate the antibacterial properties of Carla extract on Escherichia coli and Staphylococcus aureus to investigate the inhibitory properties and to find alternative drugs.

Materials and Methods: In this research, the antimicrobial activity of Carla in aqueous and alcoholic extraction on Escherichia coli and Staphylococcus aureus was performed by means of well diffusion method. Consequently, the inhibitory zone, MIC and MBC were determined.

Results: MIC and Mbc for Escherichia coli showed the highest sensitivity to alcoholic extract of leaf with mean of 62.5 mg/ml and 125 mg/ml and Staphylococcus aureus showed the highest susceptibility to fruit alcoholic extract with mean of 64 mg / ml and 64 mg / ml. The diameter of the inhibition zone of the alcoholic extract of the leaf for E. coli is 19 mm and the diameter of the inhibition zone of the alcoholic extract of fruit for Staphylococcus aureus is 2/26 mm, which confirms the results of MIC and Mbc. Minimum inhibitory concentration of E.coli was related to the alcoholic extract of leaf and the minimum concentration of fecundity was related to alcoholic beverage.

Conclusions: Results for Staphylococcus aureus according to the order of aqueous extract of leaf < alcoholic extract of leaf = alcoholic extract of seed = aqueous extract of fruit < alcoholic extract of the fruit. The lowest antimicrobial effect on E. coli is related to the aqueous extract of the fruit. Carla fruit and leaf alcoholic extract have an antimicrobial effect on Escherichia coli and Staphylococcus aureus and can be used as an alternative to commercial antibiotics.

Keywords: Alcoholic Extract; Antibacterial; Aqueous Extract; Carla Plant; Escherichia coli; Staphylococcus aureus

بررسی اثر آنتی باکتریال عصاره الکلی و آبی کارلا بر باکتری‌های اشیشیا کولی و استافیلوکوکوس اورئوس

شهریار سعیدیان^{۱*}، مریم اسلامی^۲، علیرضا داشی پور^۳

^۱ استادیار بیوشیمی دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

^۲ کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشگاه پیام نور، بیجار، ایران

^۳ استادیار دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، ایران

* نویسنده مسئول: شهریار سعیدیان، دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران. ایمیل: saeedyan@pnu.ac.ir

چکیده

سابقه و هدف: امروزه با افزایش مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از گیاهان دارویی مورد استقبال قرار گرفته است. هدف تحقیقتعیین خواص آنتی‌باکتریال عصاره‌ی گیاه کارلا بر روی باکتری‌اشیشیا کولی و استافیلوکوکوس اورئوس به منظور بررسی خواص بازدارندگی و یافتن داروهای جایگزین است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و الکلی گیاه کارلا روی اشیشیا کولی و استافیلوکوکوس اورئوس با استخراج عصاره گیاه به روش انتشار در چاهک انجام شده و قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری و حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی تعیین گردید.

یافته‌ها: حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اشیشیا کولی بیشترین حساسیت را به عصاره الکلی برگ با میانگین $62/5 \text{ mg/ml}$ و 125 mg/ml و استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین حساسیت را به عصاره الکلی میوه با میانگین 64 mg/ml و 64 mg/ml نشان دادند. قطر هاله عدم رشد عصاره الکلی برگ برای اشیشیا کولی 19 mm و قطر هاله عدم رشد عصاره الکلی میوه برای استافیلوکوکوس اورئوس $26/2 \text{ mm}$ می‌باشد که تاییدکننده نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی است. حداقل غلظت مهارکنندگی اشیشیاکولی مربوط به عصاره الکلی برگ و حداقل غلظت کشندگی نیز مربوط به الکلی میوه بود.

نتیجه‌گیری: نتایج برای استافیلوکوکوس از ترتیب عصاره آبی برگ > الکلی برگ = الکلی بذر = آبی میوه > الکلی میوه به لحاظ قدرت بازدارندگی رشد باکتری پیروی می‌کند. کمترین اثر ضد میکروبی بر روی اشیشیاکولی مربوط به عصاره آبی میوه است. عصاره الکلی برگ و الکلی میوه کارلا خاصیت ضد باکتریایی برای اشیشیاکولی و استافیلوکوکوس اورئوس دارند و می‌توانند به عنوان یک جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌های تجاری مطرح باشند.

واژگان کلیدی: آنتی باکتریال؛ استافیلوکوکوس اورئوس؛ اشیشیا کولی؛ عصاره الکلی؛ عصاره آبی؛ کارلا

مقدمه

عنوان یک منبع بالقوه از داروهای درمانی جدید مورد توجه ویژه هستند؛ زیرا مشخص شده است که این گیاهان مواد ضد میکروبی متنوعی دارند و دارای اثر سمی کم و یا فاقد اثر سمی هستند. گیاهان طی متابولیسم ثانویه خود ترکیبات بسیاری را با ساختمان مولکولی پیچیده می‌سازند و برخی از آن‌ها خاصیت ضد میکروبی دارند. کارلا با نام علمی (*Momordica charntia*) نام یک سرده از تیره کدوییان است. دارای گل‌های زرد روشن که میوه آن بعد از رسیدن، زرد یا نارنجی رنگ می‌شود و سرشار از ویتامین C است [۳]. کارلا یکی از سبزیجات

بیماری‌های عفونی عامل مرگ‌های زودرس هستند و روزانه باعث مرگ هزاران نفر در سرتاسر جهان می‌شوند [۱]. تعداد زیادی از آنتی‌بیوتیک‌های تجاری در سرتاسر جهان برای کنترل عفونت‌ها و بیماری‌های عفونی انسان استفاده می‌شوند. استفاده طولانی مدت از این آنتی‌بیوتیک‌ها باعث ظهور باکتری‌های مقاوم به چند دارو شده و مشکلات بالینی مهمی را در درمان بیماری‌های عفونی ایجاد کرده است [۲]. بنابراین لازم است تا بر روی کشف مواد ضد میکروبی جدید از سایر منابع، مانند گیاهان و حیوانات تحقیق‌های گسترده‌ای انجام شود. گیاهان دارویی به

معروف آسیای جنوبی است که طی یک دهه گذشته در مناطقی از شمال و جنوب استان سیستان و بلوچستان کشت می‌شود. شاید به جرات بتوان گفت اصلی ترین خواص گیاه کارلا درمان دیابت و مقابله با سلول‌های سرطانی است. کارلا شامل مواد فیتوشیمیایی فعال بیولوژیکی است که حاوی ترین‌ها و استروئیدها است. میوه و بذر کارلا ضد ویروس ایدز، زخم معده، التهاب، دیابت و تومور است [۴]. گسترش رو به رشد این قبیل مقاومت‌های دارویی باعث شده است تا محققین به دنبال داروهای مناسبی باشند که علاوه بر ممانعت از رشد باکتری‌ها، اثرات سمی و عوارض جانبی کمتری داشته باشد [۴،۵]. اشریشیا کلائی (E.coli)، نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که بطور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد. برخی از سروتیپ‌های آن موجب مسمویت غذایی و اسهال می‌گردند. ایکولای شایعترین عامل عفونت دستگاه ادراری است. استافیلوکوک اورئوس، کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است. این باکتری ممکن است به شکل فلور عادی پوست یا بینی وجود داشته باشد. استافیلوکوکوس اورئوس، گستره وسیعی از عفونت‌ها از عفونت‌های ساده پوستی تا بیماری‌هایی مانند پنومونی و مننژیت را ایجاد می‌نماید. استافیلوکوک اورئوس به عنوان یکی از ۵ عامل شایع ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی به ویژه عفونت‌های زخم پس از جراحی است. با توجه به گستره وسیع بیماری‌زایی این دو باکتری در زندگی روزمره بررسی اثر آنتی‌باکتریال گیاهان دارویی می‌تواند، بسیار موثر باشد. بنابراین با توجه به اهمیت گیاه کارلا سعی بر آن داریم تا خاصیت آنتی‌باکتریال کارلا را بر استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکولی بررسی نماییم و در صورت تایید بازدارندگی میکروبی این گیاه با جایگزینی این داروهای طبیعی با داروهای شیمیایی موجود از مقاومت روز افزون باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های موجود کاسته خواهد شد. اثرات آنتی‌باکتریال گیاهان زیادی بر روی باکتری‌های مختلف بررسی شده ولی گیاه کارلا در این نوع تحقیقات برای اولین بار مورد استفاده قرار می‌گیرد [۷،۸].

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۶ آزمایشگاه کنترل غذا و دارو دانشگاه علوم پزشکی زاهدان انجام گردید. گیاه کارلا از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی زاهدان جمع‌آوری و تایید گردید. گیاه کارلا پس از جمع‌آوری از مزرعه به آزمایشگاه کنترل غذا و دارو زاهدان انتقال داده شد. قسمت‌های مختلف گیاه شامل برگ و میوه از هم جدا و میوه‌ها پس از شستشو در انکوباتور ۶۰ درجه خشک گردیدند. سپس نمونه‌ها آسیاب شده و ۵۰ گرم از آن، در ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت روی

دستگاه شیکر ارلن در دمای ۴۰-۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۰۰ دور در دقیقه به روش ماسراسیون، عصاره‌گیری شد. دلیل استفاده از خیساندن، عدم آسیب مواد موجود در عصاره تهیه شده از گیاهان بوده است. در طول این فرآیند سعی شد تا با همزدن، عصاره یکنواختی حاصل شود. عصاره حاصل با کاغذ واتمن ۰/۴ میکرونی (شرکت واتمن انگلستان) صاف گردید. عصاره اتانولی تحت شرایط خلاء در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۸ دور در دقیقه توسط دستگاه روتاری تغلیظ و در پتری‌دیش‌های استریل ریخته و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد آن خشک گردید. پس از آن عصاره‌ها جمع‌آوری گردید. میکروارگانیزم مورد نیاز با کد (ATCC 29737) استافیلوکوکوس اورئوسو اشریشیا کولی (ATCC 10536) از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی تهیه گردید. حساسیت این میکروارگانیزم به عصاره‌ها با استفاده از روش چاهک بررسی گردید [۹]. جهت انجام این آزمایش، مقدار مشخصی از عصاره خشک گیاهی در حلال دی‌متیل سولفوکسید استریل شده (مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در ۱ سی سی محلول)، حل یعنی غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه شد و سپس غلظت‌های ۵۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حضور آب دوبار تقطیر و با رقیق‌سازی تهیه شدند. ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار چکانده شد و با یک سوآپ استریل روی محیط گسترش یافت. ۵ چاهک به قطر ۵ میلی‌متر برای هر عصاره به طور جداگانه توسط پیپت پاستوراستریل روی محیط کشت در زیر دستگاه لامینارفلو و در مرکز پلیت ایجاد شد و ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره‌ها با غلظت‌های مشخص درون چاهک‌ها چکانده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. چون عصاره‌ها دارای رنگ بودند، با توجه به انتشار رنگ در محیط انتشار عصاره ردیابی شد. اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد در شرایط آسپتیک با استفاده از میکرومتر ثبت شد. برای حصول اطمینان، این آزمایش برای هر سویه باکتری چهار بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله عدم رشد به عنوان قطر نهایی ثبت شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگیو حداقل غلظت کشندگی: جهت انجام آزمایش‌های کمی برای حداقل غلظت بازدارندگی از روش رشد میکروارگانیزم و برای حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیزم از روش رقت لوله‌ای استفاده شد [۱۰].

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره: برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (حداقل غلظتی از یک عصاره است که می‌تواند از رشد باکتری در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری کند)، با روش رقت لوله‌ای از میکروپلیت ۹۶ خانه سلولی استفاده شد. یک خانه به عنوان کنترل مثبت (حاوی سوسپانسیون میکروبی و DMSO فاقد عصاره) به منظور بررسی اثرات

کشت مولر هینتون آگار انتقال داده شد. (محیط کشت مولر هینتون آگار یک محیط غیر انتخابی و غیر افتراقی می باشد که تقریباً تمامی ارگانسیم هایی که بر روی آن کشت داده می شوند، رشد خواهند کرد. این محیط کشت حاوی نشاسته می باشد. نشاسته توکسین های آزاد شده از باکتری ها را جذب می کند، بنابراین آن ها نمی توانند با آنتی بیوتیک ها تداخل ایجاد کنند. انتشار بهتر آنتی بیوتیک ها در مولر هینتون آگار منجر به ایجاد ناحیه ی واقعی تر مهار شدگی خواهد شد. این محیط بیشتر برای انجام تست های تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی مانند آنتی بیوگرام به روش "دیسک دیفیوژن آگارو تست تعیین حداقل غلظت مهاری آنتی بیوتیک استفاده می گدد لذا نسبت به محیط بلاد آگار ارجحیت داده شد). سپس پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه قرار داده شدند. پس از گذشت زمان لازم پلیت ها از گرمخانه خارج و نتایج آن بررسی شد. غلظتی که در آن رشدی دیده نشود، به عنوان حداقل غلظت کشندگی عصاره برای میکروب در نظر گرفته می شود. در این پژوهش، هاله عدم رشد به روش چاهک و برای هر نمونه ۴ بار تکرار و اندازه گیری شد و اطلاعات به دست آمده، جهت مقایسه غلظت های مختلف عصاره با توجه به نوع باکتری یعنی اشربشاکولی یا استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از نرم افزار SPSS16 و از آزمون واریانس یکطرفه و آزمون چند دامنه ای توکی تجزیه و تحلیل شدند. P کمتر از ۰/۰۰۱ به عنوان سطح معنی داری تلقی گردید. برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار اکسل استفاده شد. سطح معنی داری آزمون ها پنج یا یک درصد در نظر گرفته شد.

یافته ها

بر اساس نتایج حاصله برای استافیلوکوکوس اورئوس عصاره آبی برگ بین غلظت های مختلف عصاره تفاوت معنی داری را نشان داد ($P < 0/01$) (جدول ۱). با افزایش غلظت عصاره آبی برگ میانگین بازدارندگی برای استافیلوکوکوس اورئوس افزایش نشان داده و از حدود ۱/۷۵ میلی متر به ۱۹/۵ رسیده است. بررسی عدم هاله نشان داد که در غلظت های بالاتر افزایش قابل توجهی در میزان بازدارندگی وجود دارد. حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره آبی برگ در غلظت ۲۵۰ mg/ml و حداقل غلظت کشندگی نیز در غلظت ۵۰۰ mg/ml به دست آمد. نتایج حاصل از عصاره آبی میوه برای استافیلوکوکوس اورئوس بین غلظت های مختلف تفاوت معنی داری را نشان داد ($P < 0/01$) (جدول ۲). با افزایش غلظت عصاره آبی میوه میانگین بازدارندگی تا غلظت ۱۲۵ افزایش یافت و از ۰/۵ به ۱۶/۲ میلی متر رسیده است و در غلظت ۲۵۰ به ۱۰/۲۵ کاهش یافته است. حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره آبی میوه برای استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت ۱۲۵ mg/ml و حداقل

احتمالی DMSO بر رشد باکتری، یک خانه به عنوان کنترل مثبت (حاوی سوسپانسیون میکروبی فاقد عصاره) و به عنوان کنترل برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره مورد استفاده قرار گرفت. یک لوله به عنوان کنترل منفی (دارای محیط کشت و عصاره بدون سوسپانسیون میکروبی) در نظر گرفته شد. به هر کدام از خانه ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت نوترینت براث اضافه و به خانه اول ۱۰۰ میکرولیتر عصاره استوک با غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه گردید. پس از مخلوط کردن، ۱۰۰ میکرولیتر از خانه اول به خانه دوم و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از خانه دوم به خانه سوم، به همین ترتیب تا آخر انجام شد و سرانجام ۱۰۰ میکرولیتر از آن به بیرون ریخته شد. به تمامی خانه ها ۵۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون میکروبی اضافه گردید. به این ترتیب غلظت عصاره در خانه ها ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. تمامی لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت کدورت در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط الیزا ریدر جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی از کشت جوان باکتری، به وسیله لوپ از کلنی هر کدام از باکتری ها برداشته و در ۹ میلی لیتر از سرم فیزیولوژی یا محلول نمکی (NaCl 8.5 g/L) استریل در لوله آزمایش افزوده و پس از مخلوط کامل سوسپانسیون کاملاً یکنواختی از باکتری مورد آزمایش حاصل شد. جهت یکسان نمودن کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده (استاندارد مک فارلند (کدورت معادل 1.0×10^8 باکتری در هر میلیلیتر)، جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر در محدوده ۰/۰۸ تا ۰/۱ تنظیم گردید.

و جذب نوری در ۶۳۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر در مقابل شاهد آب خوانده شد تا کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند حاصل شود.

کمترین میزان عدد خوانده شده توسط دستگاه به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی گزارش گردید. یعنی بعد از ۲۴ ساعت انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، لوله ها از نظر کدورت مورد بررسی قرار گرفتند. لوله ای که حاوی کمترین غلظت عصاره بوده و کدورتی در آن مشاهده نشد، به عنوان MIC مشخص گردید به عبارتی حداقل غلظت بازدارندگی به عنوان کمترین غلظتی از مواد که باعث کاهش ۹۰ درصدی کدورت در مقایسه با گروه کنترل شده بود در نظر گرفته شد [۱۴، ۱۵].

تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره: به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی (کمترین غلظتی از یک عصاره که می تواند سبب نابودی بیشترین تعداد باکتری (۹۹/۹٪) شود از هر کدام از غلظت های تهیه شده، ۵ میکرولیتر بر روی محیط

غلظت کشندگی نیز در غلظت ۱۲۵mg/ml به دست آمد. حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره الکلی میوه برای استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت ۶۴ mg/ml و حداقل غلظت کشندگی نیز در غلظت ۶۴mg/ml به دست آمد که در این غلظت بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد به دست آمد (جدول ۳). حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره الکلی برگ برای استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت ۱۲۵ mg/ml و حداقل غلظت کشندگی نیز در غلظت ۱۲۵mg/ml به دست آمد که در غلظت ۱۲۵ بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد یعنی ۱۳/۲ میلی‌متر حاصل آمده است (جدول ۴). بر اساس نتایج به دست آمده برای اشیریشیا کولی عصاره آبی برگ بین غلظت‌های مختلف عصاره تفاوت معنی داری را نشان داد ($P < 0/01$) (جدول ۱). با افزایش غلظت عصاره آبی برگ، میانگین بازدارندگی برای اشیریشیا کولی افزایش یافته و در بازه ۱/۷۵

میلی تا ۱۲/۹۷ متغیر است. با بررسی عدم هاله، در غلظت ۱۲۵، افزایش قابل توجهی در میزان بازدارندگی دیده شد. حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره آبی برگ در غلظت ۱۲۵ mg/ml و حداقل غلظت کشندگی نیز در غلظت ۲۵۰mg/ml حاصل شد. نتایج حاصل از عصاره آبی میوه برای اشیریشیا کولی بین غلظت‌های مختلف تفاوت معنی داری را نشان داد ($P < 0/01$) (جدول ۲). با افزایش غلظت عصاره آبی میوه، میانگین بازدارندگی تا غلظت ۲۵۰ افزایش یافت و از ۱۶/۲۵ به ۳۱/۲۵ میلی‌متر رسیده است. حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره آبی میوه برای اشیریشیا کولی در غلظت ۲۵۰mg/ml و حداقل غلظت کشندگی نیز در غلظت ۵۰۰mg/ml به دست آمد. حداقل غلظت کشندگی نیز در غلظت ۱۲۵mg/ml و حداقل غلظت کشندگی نیز در غلظت ۵۰۰mg/ml به دست

جدول ۱: اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی برگ بر قطر هاله عدم رشد باکتری

P value	عصاره آبی برگ						
	بیشترین قطر هاله حاصله		کمترین قطر هاله حاصله		میانگین قطر هاله عدم رشد (mm)		
	اشیریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشیریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشیریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	
۰/۰۰۱	۴/۱	۲	۱/۵	۴	۱/۷۵	۴/۰۷۵	۳۱/۲۵
۰/۰۰۱	۴/۳	۱۲	۱۱	۴	۱۱/۳۷۵	۴/۱۲۵	۶۲/۵
۰/۰۰۱	۱۷/۵	۱۳/۵	۱۲	۱۷	۱۲/۸۷۵	۱۷/۰۲۵	۱۲۵
۰/۰۰۱	۱۳/۱۰	۲۰	۱۹	۸/۱۲	۱۹/۵	۱۲/۹۷۵	۲۵۰

جدول ۲: اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی میوه بر قطر هاله عدم رشد باکتری

P value	عصاره آبی میوه						
	بیشترین قطر هاله حاصله		کمترین قطر هاله حاصله		میانگین قطر هاله عدم رشد		
	اشیریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشیریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشیریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	
۰/۰۰۱	۱۷	۱	۰/۰۰	۱۶	۰/۵	۱۶/۲۵	۳۱/۲۵
۰/۰۰۱	۳۱	۴/۶	۴	۲۹	۴/۳۵	۳۰/۲۵	۶۲/۵
۰/۰۰۱	۳۰	۱۶/۴	۱۶	۲۹	۱۶/۲	۲۹/۷۵	۱۲۵
۰/۰۰۱	۳۲	۱۱	۱۰	۳۱/۲۵	۱۰/۲۵	۳۱/۲۵	۲۵۰

جدول ۳: اثر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی میوه بر قطر هاله عدم رشد باکتری

P value	عصاره الکلی میوه						
	بیشترین قطر هاله حاصله		کمترین قطر هاله حاصله		میانگین قطر هاله عدم رشد		
	اشیریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشیریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشیریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	
۰/۰۰۱	۱/۵	۳	۲	۱/۳	۲/۳۷۵	۱/۴۲	۳۱/۲۵
۰/۰۰۱	۲۷	۲۵	۲۷	۲۹	۲۶/۲	۲۶/۲	۶۲/۵
۰/۰۰۱	۳۱	۱۲	۱۰	۲۹	۱۱	۲۹/۷۵	۱۲۵
۰/۰۰۱	۲۳	۱۳	۱۲	۲۱	۱۲/۳۷	۲۲/۲۵	۲۵۰

میوه اختلاف معنا داری ($P < 0.05$) را نشان داد. مطابق شکل ۲، حداقل غلظت بازدارندگی محاسبه شده نشان داد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین حساسیت را به عصاره الکلی میوه نشان داده است و حساسیت آن در برابر عصاره های الکلی برگ و الکلی بذر و آبی میوه یکسان بوده است طوری که حداقل غلظت مهارکننده عصاره الکلی میوه نسبت به عصاره آبی برگ اختلاف معنا داری ($p = 0.03$) را نشان داد. در ارزیابی حداقل غلظت کشندگی نیز همانند حداقل غلظت بازدارندگی باکتری اشیریشیا کولی بیشترین حساسیت را به عصاره الکلی برگ نشان داد که حداقل غلظت کشندگی برابر با 125 mg/ml به دست آمده است. حداقل غلظت کشندگی عصاره الکلی برگ نسبت به عصاره آبی میوه اختلاف معناداری ($P < 0.05$) را نشان داد (شکل ۳). بررسی

آمد که در این غلظت بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد دیده شد (جدول ۳). حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره الکلی برگ برای اشیریشیاکولی در غلظت 62.5 mg/ml و حداقل غلظت کشندگی نیز در غلظت 125 mg/ml به دست آمد که در غلظت 125 بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد یعنی $15/1$ میلیمتر به دست آمد (جدول ۴). جدول ۵ اثر غلظت های مختلف عصاره الکلی بذر بر قطر هاله عدم رشد باکتری را نشان می دهد. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است براساس حداقل غلظت بازدارندگی محاسبه شده، باکتری اشیریشیاکولی بیشترین حساسیت را به عصاره الکلی برگ نشان داده است و حساسیت آن در برابر عصاره های الکلی میوه و الکلی بذر و آبی برگ یکسان بود. حداقل غلظت مهارکننده عصاره الکلی برگ نسبت به عصاره آبی

جدول ۴: اثر غلظت های مختلف عصاره الکلی برگ بر قطر هاله عدم رشد باکتری

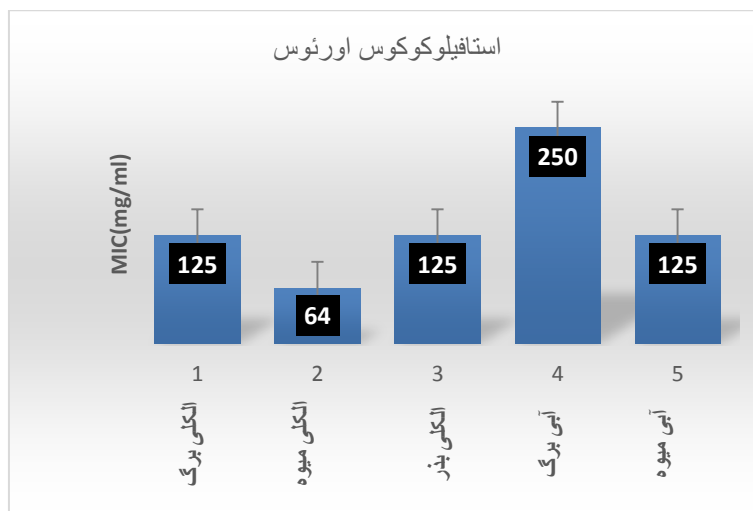
P value	عصاره الکلی برگ					
	بیشترین قطر هاله حاصله		کمترین قطر هاله حاصله		میانگین قطر هاله عدم رشد	
	اشیریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشیریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشیریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس
0.001	3/4	1/7	3/1	1/57	2/22	31/25
0.001	19/92	11	18/08	10/62	19	62/5
0.001	10/18	14	10/42	13/42	10/30	125
0.001	15/20	12	10/42	15	11/43	250

جدول ۵: اثر غلظت های مختلف عصاره الکلی بذر بر قطر هاله عدم رشد باکتری

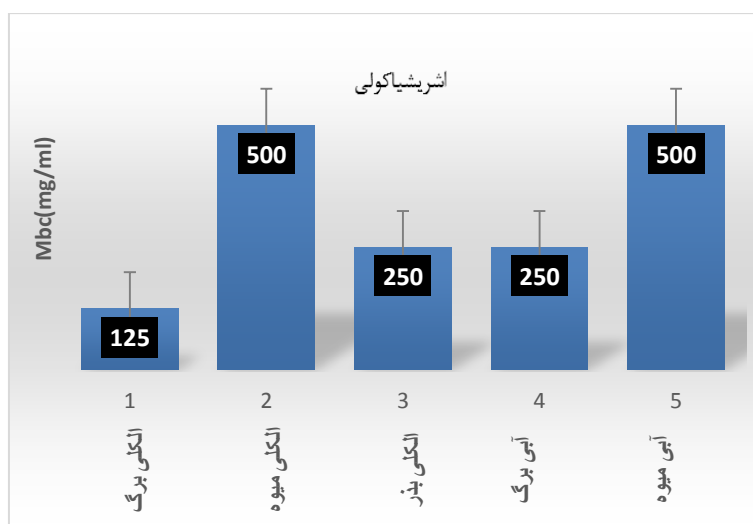
P value	عصاره الکلی بذر					
	بیشترین قطر هاله حاصله		کمترین قطر هاله حاصله		میانگین قطر هاله عدم رشد	
	اشیریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشیریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس	اشیریشیا کولی	استافیلوکوکوس اورئوس
0.001	1/3	2/5	1	1/5	2	31/25
0.001	3/5	5	3/4	4	4/75	62/5
0.001	10	11	9	10	10/25	125
0.001	9/75	19/8	8/5	8/75	9/42	250



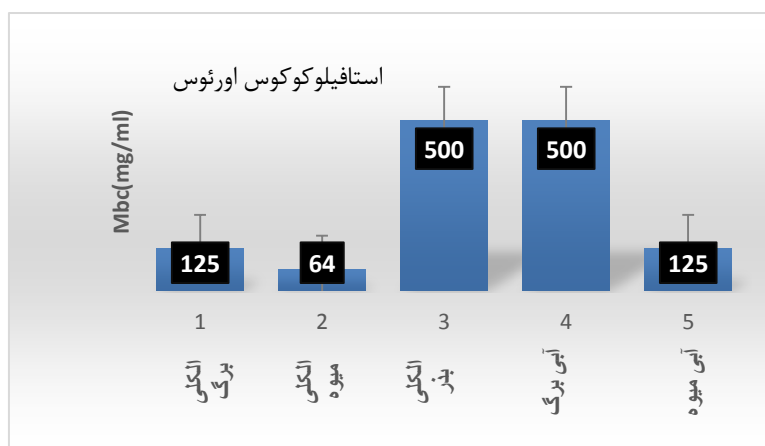
شکل ۱: حداقل غلظت بازدارندگی عصاره های الکلی و آبی کارلا بر روی اشیریشیاکولی



شکل ۲: حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های الکلی و آبی کارلابر روی استافیلوکوکوس اورئوس



شکل ۳: حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های الکلی و آبی کارلابر روی انتریشیاکولی



شکل ۴: حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های الکلی و آبی کارلابر روی استافیلوکوکوس اورئوس

غلظت کشندگی عصاره الکلی میوه نسبت به عصاره آبی برگ و الکلی بذر اختلاف معناداری ($P < 0/06$) را نشان داد (شکل ۴).

انجام شده حداقل غلظت کشندگی برای استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین حساسیت را به عصاره الکلی میوه نشان داد. حداقل

میلی‌لیتر حاصل شده است که این مقدار در عصاره های مختلف کارلا یعنی عصاره آبی میوه، عصاره آبی برگ، الکلی میوه، بذر کارلا و الکلی برگ همگی ۱۲۵ و یا کمتر به دست آمده است که نشان‌دهنده کارایی مهارکنندگی بیشتر اشیریشاکولی توسط کارلا است [۱۶]. در حال حاضر یکی از عمده مشکلاتی که در درمان عفونت‌ها و استفاده از آنتیبیوتیک‌ها وجود دارد، ایجاد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی است که توجه خاصی را برای درمان می‌طلبد و از آنجا که اثرات ضد باکتریایی عصاره کارلا در تحقیقات بر روی گونه اشیریشاکولی به اثبات رسید، استفاده از آن در درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های مقاوم قابل توصیه می‌باشد. در راستای بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی، اثرات ضد میکروبی و آنتی‌باکتریال عصاره الکلی و عصاره آبی کارلا بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس هم که یکی از باکتری‌های مهم در ایجاد عفونت‌ها است. عصاره الکلی و عصاره آبی برگ، میوه و بذر کارلا در رقت‌های مختلف بر استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شد که اثر مهارکنندگی و کشندگی نشان دادند و در تمامی غلظت‌ها دارای اختلاف معنی داری است که نشان‌دهنده اثر آنتی‌باکتریال قوی این عصاره بر روی این باکتری می‌باشد. همچنین عصاره الکلی و عصاره آبی کارلا بر استافیلوکوکوس اورئوس پاتوژن اثر باکتریوسیدال و هم باکتریواستاتیک داشت که اعداد نزدیک به هم‌حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت بازدارندگینیز نشان دهنده اثر قوی باکتریوسیدال عصاره این گیاه بر روی این باکتری است.

بر اساس نتایج به دست آمده از اثر کارلا بر استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره الکلی میوه کارلا بود و حداقل غلظت بازدارندگی بدست آمده نیز مربوط به عصاره الکلی میوه حاصل شد. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت عصاره الکلی میوه بهترین کارایی را برای مهار و ممانعت از رشد استافیلوکوکوس اورئوس از خود نشان داده است. در نتایج اثر باکتریوسیدال حداقل غلظت کشندگی برای عصاره الکلی بذر، آبی برگ، الکلی برگ، الکلی میوه و آبی میوه به ترتیب ۵۰۰، ۵۰۰، ۱۲۵، ۶۴ و ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد نتیجه اینکه عصاره الکلی میوه بهترین کارایی باکتریوسیدالی را برای استافیلوکوکوس اورئوس از خود نشان داده است. در پژوهش انجام شده توسط Talei و همکاران (۲۰۰۳) حداقل غلظت بازدارندگی سماق، گیاه همیشه سبز و درمنه بر روی استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۱۵۰، ۶۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حاصل شده است که این مقدار در عصاره های مختلف کارلا یعنی عصاره آبی میوه، الکلی میوه،

هر روزه مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها بیشتر می‌شود. تحقیق در مورد کشف مواد جدید با خواص ضد میکروبی قوی‌تر همپای افزایش مقاومت در باکتری‌ها رو به گسترش است و از آنجا که اسانس‌ها و عصاره گیاهی از دیر باز در درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفتند، لذا به عنوان یک انتخاب مناسب برای این نوع تحقیقات به شمار می‌روند. گیاهان از هزاران سال پیش نقش بسیار مهمی در حفظ سلامتی و بهبود کیفیت زندگی انسان‌ها داشته‌اند. گیاهان دارویی دارای خواص مفیدی هستند که از جمله می‌توان به خاصیت ضد باکتریایی، ضد انگلی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد [۱۱]. اسانس‌های گیاهی با اثرات ضد میکروبی بر روی طیف گسترده‌ای از ارگانسیم‌ها و همچنین قابلیت مصارف غذایی آنها در برخی موارد و کمتر بودن اثرات جانبی آنها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج می‌توانند در نهایت جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها شوند. در راستای بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی، اثرات ضد میکروبی و آنتی‌باکتریال عصاره الکلی و عصاره آبی کارلا بر باکتری اشیریشاکولی هم که یکی از باکتری‌های مهم در ایجاد عفونت‌ها است مورد ارزیابی قرار گرفت. به این صورت که عصاره الکلی و عصاره آبی برگ، میوه و بذر کارلا در رقت‌های مختلف بر باکتری اشیریشاکولی پاتوژن بررسی شد که اثر مهارکنندگی و کشندگی نشان دادند و در تمامی غلظت‌ها دارای اختلاف معنی داری است که نشان‌دهنده اثر آنتی‌باکتریال قوی این عصاره بر روی این باکتری می‌باشد. همچنین عصاره الکلی و عصاره آبی کارلا بر باکتری اشیریشاکولی اثر باکتریوسیدال و هم باکتریواستاتیک داشت که اعداد نزدیک به هم حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت بازدارندگی نیز نشان دهنده اثر قوی باکتریوسیدال عصاره این گیاه بر روی این باکتری است. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره آبی میوه و الکلی میوه کارلا بر روی باکتری اشیریشاکولی بود و حداقل غلظت بازدارندگی بدست آمده نیز مربوط به عصاره الکلی میوه و الکلی برگ بود. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت عصاره الکلی میوه بهترین کارایی را برای مهار و ممانعت از رشد اشیریشاکولی از خود نشان داده است. در نتایج اثر باکتریوسیدال حداقل غلظت کشندگی برای عصاره الکلی بذر، آبی برگ، الکلی برگ، الکلی میوه و آبی میوه به ترتیب ۲۵۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۵۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. نتیجه اینکه عصاره الکلی برگ بهترین کارایی باکتریوسیدالی را برای اشیریشاکولی از خود نشان داده است. در پژوهش انجام شده توسط Talei و همکاران (۲۰۰۳) حداقل غلظت بازدارندگی سماق، گیاه همیشه سبز و درمنه بر روی اشیریشاکولی به ترتیب ۱۲۵، ۶۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر

عصاره ها نشان داد که این رقت بهینه برای تمام عصاره ها رقت ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر است.

نتیجه گیری

با توجه به اثر بالای خاصیت آنتی باکتریال عصاره های الکلی برگ و میوه بر روی استافیلوکوکوساورئوس و اشیریشیا کولی و با نتایج حاصل می توان از این گیاه به عنوان یک دارو در درمان بیماری های ناشی از اثر این باکتری ها استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه ثبت شده در دانشگاه پیام نور می باشد. مؤلفین این اثر از تمامی اعضای دخیل در دانشگاه علوم پزشکی زاهدان و دانشگاه پیام نور کردستان سپاسگزاری می نمایند.

تضاد منافع

این مطالعه برای نویسندگان هیچ گونه تضاد منافی نداشته است.

ملاحظات اخلاقی

پژوهش حاضر در کمیته اخلاق پیام نور مورد تایید قرار گرفته است.

سهم نویسندگان

شهریار سعیدیان، مریم اسلامی، علیرضا دوشی پور در جمع آوری داده ها و نگارش علمی مقاله نقش داشته اند.

حمایت مالی

پژوهش حاضر با حمایت مالی دانشگاه پیام نور انجام شده است.

بذر کارلا و الکلی برگ همگی ۱۲۵ و یا کمتر به دست آمده است که نشان دهنده کارایی مهارکنندگی بیشتر اشیریشیاکولی توسط کارلا است [۱۶].

درحال حاضر یکی از عمده مشکلاتی که در درمان عفونت ها استفاده از آنتی بیوتیک ها وجود دارد، ایجاد مقاومت های آنتیبیوتیکی است که توجه خاصی را برای درمان می طلبد و از آنجا که اثرات ضد باکتریایی عصاره کارلا در تحقیقات بر روی گونه استافیلوکوکوس اورئوس به اثبات رسید که استفاده از آن در درمان عفونت های ایجاد شده توسط باکتری های مقاوم قابل توصیه می باشد. در مطالعات مختلف و مشابه نیز اثر ضد باکتریایی گیاهان مختلف نیز از جمله گزنه بر باکتری استافیلوکوکوس به خوبی نشان داده شده است. Kiaei و همکاران (۲۰۱۱)، تأثیر عصاره اتانولی گزنه را بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند این گیاه دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می باشد [۱۲]. Janssen و همکاران در سال ۱۹۸۵ عصاره گزنه را بر روی رشد باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس و استرپتوکوکوس پیوژنز مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند عصاره گزنه قادر به ایجاد هاله عدم رشد بر روی محیط کشت باکتری های مذکور می باشد [۱۳]. نتایج اخیر تاییدی بر نتایج حاصله در این پژوهش است. با مقایسه بین فعالیت عصاره های مختلف کارلا بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کولی، بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به عصاره الکلی میوه بود و از طرف دیگر عصاره آبی برگ و الکلی بذر کمترین اثر را روی اشیریشیا کولی نشان می دهند. کمترین اثر ضد میکروبی روی اشیریشیا کولی مربوط به عصاره الکلی بذر است که کمترین قطر هاله عدم رشد را نشان می دهد و کمترین اثر ضد میکروبی روی استافیلوکوکوس اورئوس نیز مربوط به عصاره الکلی بذر است که کمترین قطر هاله عدم رشد را نشان می دهد. بهترین رقت به دست آمده برای

REFERENCES

- Naghavi M, Faridi A, Pormalak F, Jaafari N, Lake Moradi M, Eshtrati B, Mahdavi N, Kazemini H, Hashemi Bani Tehrani A, Shoaie SH. The rate of diseases and injuries of Iran in the year of 2003. IJE. 2003; 4(1): 1-19. (Persian)
- Joshi B, Lekhak S, Sharma A. Antibacterial property of different medicinal plant *Ocimum sanctum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Xanthoxylum armatum* and *Origanum majorana*. Kathmandu University. JSET, 2009.
- Yadollahi P, Asgharipour MR, Bagheri A, Jabbari B, Sheikhpour S. Effects of sodium nitroprusside and arsenic on quantitative traits of bitter squash (*Momordica charantia*L.) medicinal plant. IJCS, 2013;(5)3:215-225. (Persian)
- Shibib BA, Khan LA, Rahman R. Hypoglycemic activity of *Coccoloba indica* and *Momordica charantia* in diabetic rats: depression of the hepatic gluconeogenic enzymes glucose-6-phosphatase and fructose-1,6 bisphosphatase and elevation of both liver and red-cell shunt enzymeglucose-6-phosphate dehydrogenase. Biochemistry Journal. 1993; 15: 267-270.
- Rojhan MS. Drug and Medicinal plants. Alavi publication. 2000; 32-47. (Persian)
- Moaveni P. Medicinal plants. Azad university publication. Shahre ghods unit. 2008; 110-123. (Persian)
- Yano Y, Satomi M, Oikawa H. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. Int J Food Microbiol. 2006;111(1):6-11.
- Chaudhry NMA, Tariq P. Anti-microbial activity of *Cinnamomum Cassia* against diverse microbial flora with its nutritional and medicinal impacts. Pak J Bot. 2006; 38(1):169-74.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Tenth Edition. 2015.

10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standards. NCCLS Document M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne. 2001.
11. Zargari A. Medicinal plants. Tehran university publication. 2001; 25-36. (Persian)
12. Kiaei A, Mazandarani M, Ghaemi A. Effect of ethanolic extract of 7 species of medicinal plant against isolated bacteria Of Patients with Urinary Tract Infection in Gorgan. 2011; 9(34): 74-83. (Persian)
13. Tasdelen FN, Tanriverdi CY, Coban AY, Ozatli D, Tanyel E, Durupinar B, Tulek N. Antimicrobial activity of plant extracts Ankaferd Blood Stopper. *Fitoterapia*, 2009;80(1): 48-50.
14. Skočibušić M, Bezić N, Dunkić V and Radonić A. Antibacterial activity of *Achillea clavennae* essential oil against respiratory tract pathogens. *Fitoterapia*. 2004; 75(7):733-736.
15. Sökmen A, Vardar-Ünlü G, Polissiou M, Daferera D, Sökmen M and Dönmez E. Antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea sintenisii* Hub. Mor.(Asteraceae). *Phytotherapy Research*. 2003; 17(9):1005-1010.
16. Talei G, Meshkatosadat MH, Delfan B. Antibacterial activity of fruit, leaves extracts of *Artemisia Persica* Boiss ,*Rhus Coriaria*, *Ephedra Intermedia* and *Daphne Mucronata* Royle of Lorestan. *yafte*. 2004; 5(3):19-24.