

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 a company from 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 اشريشيا كولي و استافيلوكوس اورئوس

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

^۱ استادیار بیوشیمی دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، 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 زیست شناسی، 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 تحقیقتیغی خواص آنتی‌باکتریال عصاره‌ی گیاه کارلا بر روی باکتری‌اشريشيا كولي و استافيلوكوس اورئوس به منظور بررسی خواص بازدارندگی ویافتند داروهای جایگزین است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و الکلی گیاه کارلا روی اشريشيا كولي و استافيلوكوس اورئوس با استخراج عصاره گیاه به روش انتشار در چاهک انجام شده و قطر هاله عدم رشد اندازه گردی و حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی تعیین گردید.

یافته‌ها: حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اشريشيا كولي بیشترین حساسیت را به عصاره الکلی برگ با میانگین mg/ml ۱۲۵ و استافيلوكوس اورئوس بیشترین حساسیت را به عصاره الکلی میوه با میانگین mg/ml ۶۴ نشان دادند. قطر هاله عدم رشد عصاره الکلی برگ برای اشريشيا كولي mm ۱۹ و قطر هاله عدم رشد عصاره الکلی میوه برای استافيلوكوس اورئوس mm ۲۶/۲ می باشد که تاییدکننده نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی است. حداقل غلظت مهارکنندگی اشريشيا كولي مربوط به عصاره الکلی برگ و حداقل غلظت کشندگی نیز مربوط به الکلی میوه بود.

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

واژگان کلیدی: آنتی‌باکتریال؛ استافيلوكوس اورئوس؛ اشريشيا كولي؛ عصاره الکلی؛ عصاره آبی؛ کارلا

مقدمه

عنوان یک منبع بالقوه از داروهای درمانی جدید موردنمود 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 charantia*) 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

دستگاه شیکر ارلن در دمای ۳۷-۴۰ درجه سانتی گراد با دور ۲۰۰ دور در دقیقه به روش ماسرسیون، عصاره گیری 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 ۴٪ میکرونی (شرکت واتمن انگلستان) صاف گردید. عصاره اتانولی تحت شرایط خلا در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد با دور ۸ دور در دقیقه توسط دستگاه روتاری تغییظ و در پتری دیش‌های استریل ریخته و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد آون خشک گردید. پس از آن عصاره‌ها جمع آوری (ATCC 29737) گردید. میکروارگانیسم مورد نیاز با کد (ATCC 10536) از استافیلوکوکوس اورئوس اشريشیا کولی (ATCC 10536) از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی تهیه گردید. حساسیت این میکروارگانیسم به عصاره‌ها با استفاده از روش چاهک بررسی گردید [۹]. جهت انجام این آزمایش، مقدار مشخصی از عصاره خشک گیاهی در حلال دی متیل سولفوكسید استریل شده (مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در ۱ سی سی محلول)، حل یعنی غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره تهیه شد و سپس غلظت‌های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر در حضور آب دوبار تقطیر و با رقیق سازی 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 پاستور استریل 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 سانتی گراد انکوبه شدند. چون عصاره‌ها دارای رنگ بودند، با توجه به انتشار رنگ در محیط انتشار عصاره ردیابی شد. اندازه گیری 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 قدر نهایی ثبت شد.

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

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (حداقل غلظتی از یک عصاره است که می‌تواند از رشد باکتری در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری کند). با روش رقت لوله ای از میکرопلیت ۹۶ خانه سلولی استفاده شد. یک خانه به عنوان کنترل مشبّت (حاوی سوسپانسیون میکروبی و DMSO فاقد عصاره) به منظور بررسی اثرات

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 سلطانی است. کارلا شامل مواد فیتوشیمیایی فعال بیولوژیکی است که حاوی ترپن‌ها 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 باشند [۴،۵]. اشريشيا كلاي (E.coli)، نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریا سه است که بطور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد. برخی از سروتیپ‌های آن موجب مسمویت غذایی و اسهال می‌گردد. ایکولای شایعترین عامل عفونت دستگاه ادراری است. استافیلوکوک اورئوس، کوکسی گرم مثبت و بی‌هوای اختیاری است. این باکتری ممکن است به شکل فلور عادی پوست یا بینی وجود داشته باشد. استافیلوکوکوس اورئوس، گستره وسیعی از عفونتها از عفونتها ساده پوستی تا بیماری‌هایی مانند پنومونی و منزئت را ایجاد می‌نماید. استافیلوکوک اورئوس به عنوان یکی از ۵ عامل شایع ایجاد‌کننده عفونتها بیمارستانی به ویژه عفونتها را ایجاد می‌کند. با توجه به گستره وسیع بیماری‌زایی این دو باکتری در زندگی روزمره بررسی اثر آنتی‌باکتریال گیاهان دارویی می‌تواند، سیار موثر باشد. بنابراین با توجه به اهمیت گیاه کارلا سعی برآن داریم تا خاصیت آنتی‌باکتریال کارلا را بر استافیلوکوکوس اورئوس و اشريشيا كولى 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 جمع آوری و تایید گردید. گیاه کارلا پس از جمع آوری 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 سشیشو در انکوباتور ۶۰ درجه خشک گردیدند. سپس نمونه‌ها آسیاب شده و ۵۰ گرم از آن، در ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۴۸ ساعت درصد به مدت ۸۰ درجه سانتی گراد باز مورد استفاده قرار می‌گیرد.

کشت مولر هينتون آگار انتقال داده شد. (محیط کشت مولر هينتون آگار يك محیط غير انتخابي و غير افتراقی می باشد که تقریباً تمامی ارگانیسم 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 بیوتیکها تداخل ایجاد کنند. انتشار بهتر آنتی بیوتیکها در مولر هينتون آگار منجر به ایجاد ناحیه‌ی واقعی تر مهار شدگی خواهد شد. این محیط بیشتر برای انجام تست های تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی مانند آنتی بیوگرام به روش "دیسک دیفیوژن آگار" و تست تعیین حداقل غلظت مهاری آنتی بیوتیک استفاده می گدد لذا نسبت به محیط بلاد آگار ارجحیت داده شد). سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه قرار داده شدند. پس از گذشت زمان لازم پلیت‌ها از گرمخانه خارج و نتایج آن بررسی شد. غلظتی که در آن رشدی دیده نشود، به عنوان حداقل غلظت کشنده‌ی عصاره برای میکروب در نظر گرفته می‌شود. 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 غلظت‌های مختلف عصاره با توجه به نوع باکتری یعنی اشريشاکولي یا استافيلوكوكوس اورئوس با استفاده از نرم افزار SPSS16 و از آزمون واريانس يکطرفه و آزمون چند دامنه‌اي توکي تجزيه و تحليل شدند. P<0.001 به عنوان سطح معنی داری تلقی گردید. برای رسم نمودارها نيز از نرم افزار اکسل استفاده شد. سطح معنی داری آزمون ها پنج يا يك درصد در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بر اساس نتایج حاصله برای استافيلوكوكوس اورئوس 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 استافيلوكوكوس اورئوس افزایش نشان داده و از حدود ۱/۷۵ میلی متر به $19/5$ رسیده است. بررسی عدم هاله نشان داد که در غلظت‌های بالاتر افزایش قابل توجهی در میزان بازدارندگی وجود دارد. حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره آبی برگدر غلظت 250 mg/ml و 500 mg/ml غلظت کشنده‌ی نيز در غلظت 500 mg/ml به دست آمد. نتایج حاصل از عصاره آبی میوه‌برای استافيلوكوكوس اورئوس بين غلظت‌های مختلف تفاوت معنی داری را نشان داد ($P<0.01$) (جدول ۲). با افزایش غلظت عصاره آبی میوه میانگین بازدارندگی تا غلظت 125 افزایش یافت و از $5/0$ به $16/2$ میلی متر رسیده است و در غلظت 250 به $10/25$ کاهش یافته است. حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره آبی میوه برای استافيلوكوكوس اورئوس در غلظت mg/ml 125 و حداقل

احتمالی DMSO بر رشد باکتری، يك خانه به عنوان کنترل مثبت (حاوي سوسپانسيون ميكروبي فاقد عصاره) و به عنوان کنترل برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره مورد استفاده قرار گرفتو يك لوله به عنوان کنترل منفي (دارای محیط کشت و عصاره بدون سوسپانسيون ميكروبي) در نظر گرفته شد. به هر کدام از خانه ها 100 ميكروليلتر محیط کشت نوترینت براث اضافه و به خانه اول 100 ميكروليلتر عصاره استوک با غلظت 500 ميلى گرم بر ميلى لير اضافه گردید. پس از مخلوط کردن، 100 ميكروليلتر از خانه اول به خانه دوم و سپس 100 ميكروليلتر از خانه دوم به خانه سوم، به همين ترتيب تا آخر انجام شد و سرانجام 100 ميكروليلتر از آن به بیرون ریخته شد. به تمامی خانه ها 50 ميكروليلتر از هر سوسپانسيون ميكروبي اضافه گردید. به اين ترتيب غلظت عصاره در خانه ها 50 ، 125 ، 250 ، $31/25$ و $62/5$ ميلى گرم بر ميلى لير بود. تمامی لوله ها به مدت 24 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتيگراد قرار گرفتند. پس از گذشت 24 ساعت دورت در طول موج 630 نانومتر توسط الایزا ریدر جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تهیه سوسپانسيون باكتريالي از کشت جوان باکتری، به وسیله لوب از كلني هر کدام از باکتری ها برداشته و در 9 ميلى لير از سرم فيزيولوري يا محلول نمکي ($\text{NaCl} 8.5 \text{ g/L}$) استريل در لوله آزمایش افروده و پس از مخلوط كامل سوسپانسيون کاملاً یکنواختی از باکتری مورد آزمایش حاصل شد. جهت یکسان نمودن دورت سوسپانسيون ميكروبي تهیه شده (استاندارد مک فارلن) (دورت معادل $10/5 \times 1/5$ باکتری در هر ميليليت)، جذب نوری در طول موج 630 نانومتر در محدوده $0/0/8$ تا $1/1/0$ تنظیم گردید.

و جذب نوری در 630 نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر در مقابل شاهد آب خوانده شد تا دورتی معادل $0/5$ مک فارلن حاصل شود.

كمترین میزان عدد خوانده شده توسط دستگاه به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی گزارش گردید. يعني بعد از 24 ساعت انکوبه کردن در دمای 37 درجه سلسیوس، لوله ها از نظر دورت مورد بررسی قرار گرفتند. لوله‌ای که حاوي کمترین غلظت عصاره بوده و دورتی در آن مشاهده نشد، به عنوان MIC مشخص گردید به عبارتی حداقل غلظت بازدارندگی به عنوان کمترین غلظتی از مواد که باعث کاهش 90 درصدی دورت در مقایسه با گروه کنترل شده بود در نظر گرفته شد [۱۴، ۱۵].

تعیین حداقل غلظت کشنده‌ی عصاره: به منظور تعیین حداقل غلظت کشنده‌ی (كمترین غلظتی از يك عصاره که می تواند سبب نابودی بيشترین تعداد باکتری $99/9\%$ شود از هر کدام از غلظت‌های تهیه شده، 5 ميكروليلتر بر روی محیط

میلی تا ۱۲/۹۷ متفاوت 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 کشنده نیز در غلظت ۱۲۵ mg/ml حاصل شد. نتایج حاصل از عصاره آبی میوه برای اشريشياکولي بین غلظت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.01$) (جدول ۲). با افزایش غلظت عصاره آبی میوه، ميانگين بازدارندگی تا غلظت ۲۵۰ افزایش یافت و از ۱۶/۲۵ به ۳۱/۲۵ میلی‌متر رسیده است. حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره آبی میوه برای اشريشيا کولي در غلظت ۲۵۰ mg/ml و حداقل غلظت کشنده نیز در غلظت ۵۰۰ mg/ml به دست آمد. حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره الكلی میوه برای اشريشياکولي در غلظت ۱۲۵ mg/ml وحداقل غلظت کشنده نیز در غلظت ۵۰۰ mg/ml به دست

غلظت کشنده نیز در غلظت ۱۲۵mg/ml به دست آمد. حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره الكلی میوه برای استافیلوكوکوس اورئوس در غلظت ۶۴ mg/ml وحداقل غلظت کشنده نیز در غلظت ۶۴mg/ml به دست آمد که در این غلظت بيشترین ميانگين قطر هاله عدم رشد به دست آمد(جدول ۳).حداقل غلظت بازدارندگي برای عصاره الكلی برگ برای استافیلوكوکوس اورئوس در غلظت ۱۲۵ mg/ml وحداقل غلظت کشنده نیز در غلظت ۱۲۵mg/ml به دست آمد که در غلظت ۱۲۵ بيشترین ميانگين قطر هاله عدم رشد يعني ۱۳/۲ میلی‌متر حاصل آمده است(جدول ۴).بر اساس نتایج به دست آمده برای اشريشيا کولي عصاره آبی برگ بین غلظت‌های مختلف عصاره تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.01$) (جدول ۱). با افزایش غلظت عصاره آبی برگ، ميانگين بازدارندگی برای اشريشياکولي افزایش یافته و در بازه ۱/۷۵

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

P value	عصاره آبی برگ								
	استافیلوكوکوس اورئوس	اشريشيا کولي	غلظت عصاره						
۰/۰۰۱	۲	۴/۱	۱/۵	۴	۱/۷۵	۴/۰۷۵	۳۱/۲۵		
۰/۰۰۱	۱۲	۴/۳	۱۱	۴	۱۱/۳۷۵	۴/۱۲۵		۶۲/۵	
۰/۰۰۱	۱۳/۵	۱۷/۵	۱۲	۱۷	۱۲/۸۷۵	۱۷/۰۲۵		۱۲۵	
۰/۰۰۱	۲۰	۱۳/۱۰	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								
	استافیلوكوکوس اورئوس	اشريشيا کولي	غلظت عصاره						
۰/۰۰۱	۱	۱۷	۰/۰۰	۱۶	۰/۵	۱۶/۲۵		۳۱/۲۵	
۰/۰۰۱	۴/۶	۳۱	۴	۲۹	۴/۳۵	۳۰/۲۵		۶۲/۵	
۰/۰۰۱	۱۶/۴	۳۰	۱۶	۲۹	۱۶/۲	۲۹/۷۵		۱۲۵	
۰/۰۰۱	۱۱	۳۲	۱۰	۳۱/۲۵	۱۰/۲۵	۳۱/۲۵		۲۵۰	

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

P value	عصاره الكلی میوه								
	استافیلوكوکوس اورئوس	اشريشيا کولي	غلظت عصاره						
۰/۰۰۱	۳	۱/۵	۲	۱/۳	۲/۳۷۵	۱/۴۲		۳۱/۲۵	
۰/۰۰۱	۲۵	۲۷	۲۷	۲۹	۲۶/۲	۲۶/۲		۶۲/۵	
۰/۰۰۱	۱۲	۳۱	۱۰	۲۹	۱۱	۲۹/۷۵		۱۲۵	
۰/۰۰۱	۱۳	۲۳	۱۲	۲۱	۱۲/۳۷	۲۲/۲۵		۲۵۰	

ميوه اختلاف معنا داري ($P < 0.05$) را نشان داد. مطابق شكل ۲، حداقل غلظت بازدارندگی محاسبه شده نشان داد که باکتری استافيلوكوكوس اورئوس بيشترین حساسیت را به عصاره الکلی ميوه نشان داد و حساسیت آن در برابر عصاره های الکلی برگ و الکلی بذر و آبی ميوه يكسان بوده است طوری که حداقل غلظت مهارکننده عصاره الکلی ميوه نسبت به عصاره آبی برگ اختلاف معنا داري ($p = 0.03$) را نشان داد. در ارزیابی حداقل غلظت کشنده نیز همانند حداقل غلظت بازدارندگی باکتری اشريشيا کولي بيشترین حساسیت را به عصاره الکلی برگ نشان داد که حداقل غلظت کشنده برابر با 125 mg/ml به دست آمد است. حداقل غلظت کشنده عصاره الکلی برگ نسبت به عصاره آبی ميوه اختلاف معناداري ($P < 0.05$) را نشان داد (شكل ۳). بررسی

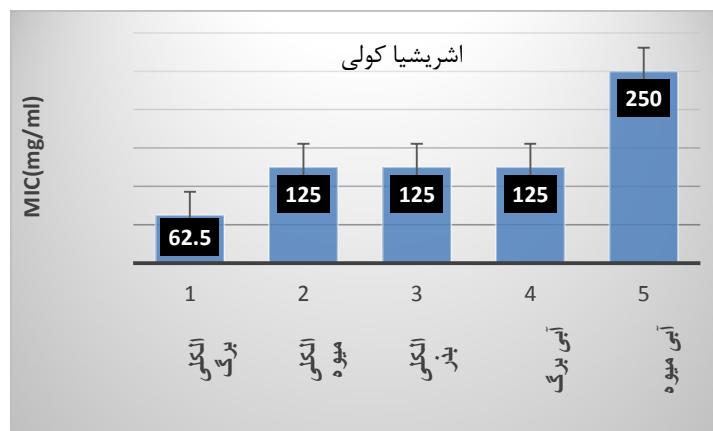
آمد که در اين غلظت بيشترین ميانگين قطر هاله عدم رشد ديده شد(جدول ۳). حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره الکلی برگ برای اشريشياکولي در غلظت 125 mg/ml به دست آمد که در غلظت کشنده نيز در غلظت 125 mg/ml به دست آمد که در غلظت بيشترین ميانگين قطر هاله عدم رشد يعني $15/1$ ميليمتر به دست آمد(جدول ۴). جدول ۵ اثر غلظت هاي مختلف عصاره الکلی بذر بر قطر هاله عدم رشد باکتری را نشان می دهد. همانطور که در شكل ۱ نشان داده شده است براساس حداقل غلظت بازدارندگی محاسبه شده، باکتری اشريشياکولي بيشترین حساسیت را به عصاره الکلی برگ نشان داده است و حساسیت آن در برابر عصاره های الکلی ميوه و الکلی بذر و آبی برگ يكسان بود. حداقل غلظت مهارکننده عصاره الکلی برگ نسبت به عصاره آبی

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

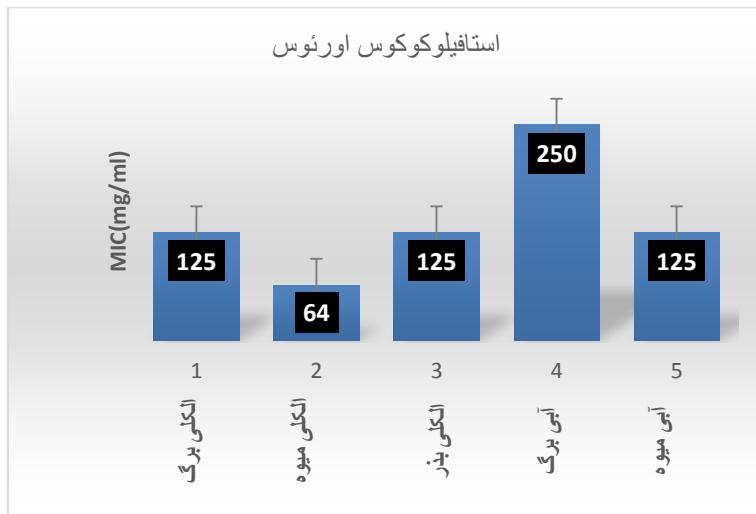
عصاره الکلی برگ								
P value	بيشترین قطر هاله حاصله		كمترین قطر هاله عدم رشد		ميانگين قطر هاله عدم رشد		غلظت عصاره	
	استافيلوكوكوس اورئوس	اشريشيا کولي	استافيلوكوكوس اورئوس	اشريشيا کولي	استافيلوكوكوس اورئوس	اشريشيا کولي	اشريشيا کولي	اشريشيا کولي
0/001	1/7	۳/۴	1/۵۷	۳/۱	1/۵۷	۳/۲۲	۳۱/۲۵	
0/001	۱۱	۱۹/۹۲	10/۶۲	18/۰۸	10/۶۳	۱۹	۶۲/۵	
0/001	۱۴	۱۰/۱۸	13/۴۲	10/۴۲	13/۴۲	10/۳۰	۱۲۵	
0/001	۱۲	15/۲۰	10/۴۲	15	11/۴۳	15/۱۰	۲۵۰	

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

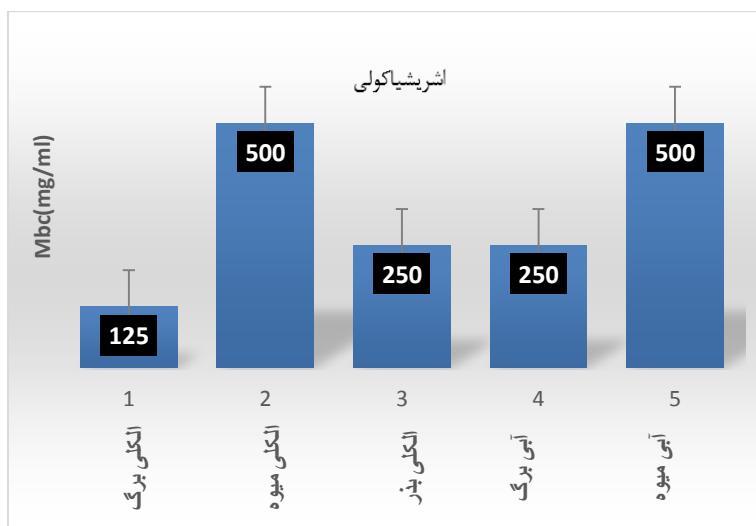
عصاره الکلی بذر								
P value	بيشترین قطر هاله حاصله		كمترین قطر هاله عدم رشد		ميانگين قطر هاله عدم رشد		غلظت عصاره	
	استافيلوكوكوس اورئوس	اشريشيا کولي	استافيلوكوكوس اورئوس	اشريشيا کولي	استافيلوكوكوس اورئوس	اشريشيا کولي	اشريشيا کولي	اشريشيا کولي
0/001	2/۵	1/۳	1/۵	۱	۲	1/۰۷۵	۳۱/۲۵	
0/001	۵	۳/۵	۴	۳/۴	۴/۷۵	۳/۴۷۵	۶۲/۵	
0/001	۱۱	۱۰	۱۰	۹	10/۲۵	9/۳۷	۱۲۵	
0/001	19/۸	9/۷۵	8/۷۵	8/۵	9/۴۲	8/۷۵	۲۵۰	



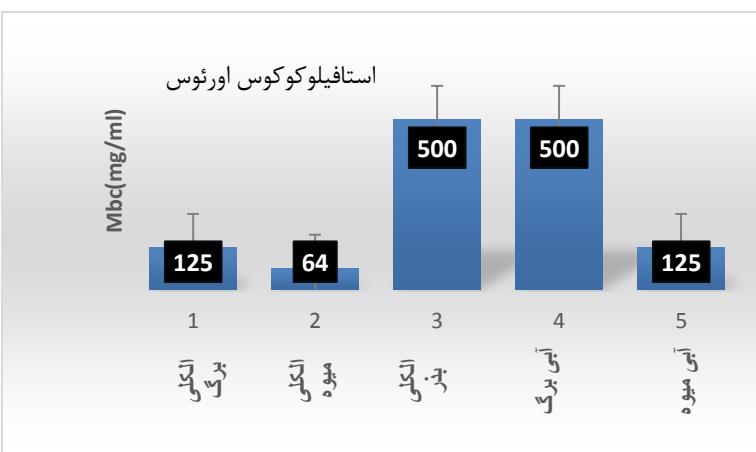
شكل ۱: حداقل غلظت بازدارندگی عصاره های الکلی و آبی کارلا بر روی اشريشياکولي



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



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



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

میلی لیتر 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 نشان دهنده کارابی مهارکنندگی بیشتر اشريشياکولي توسط کارلا است [۱۶]. در حال حاضر یکی از عمده مشکلاتی که در درمان عفونت ها و استفاده از آنتی بیوتیکی آنتی بیوتیکها وجود دارد، ایجاد مقاومت های آنتی بیوتیکی است که توجه خاصی را برای درمان می طلبد و از آنجا که اثرات ضد باکتریایی عصاره کارلا در تحقیقات بروی گونه اشريشياکولي به اثبات رسید، استفاده از آن در درمان عفونت های ایجاد شده توسط باکتری های مقاوم قابل توصیه می باشد. در راستای بررسی اثرات ضد میکروبی انسان های گیاهی، اثرات ضد میکروبی و آنتی باکتریال عصاره الکلی و عصاره آبی کارلا بر باکتری استافيلوكوكوس اورئوس هم که یکی از باکتری های مهم در ایجاد عفونت ها است. عصاره الکلی و عصاره آبی برگ، میوه و بذر کارلا در رقت های مختلف بر استافيلوكوكوس اورئوس بررسی شد که اثر مهارکنندگی و کشنندگی نشان دادند و در تمامی غلظت ها دارای اختلاف معنی داری است که نشان دهنده اثر آنتی باکتریال قوی این عصاره بر روی این باکتری می باشد. همچنین عصاره الکلی و عصاره آبی کارلا بر استافيلوكوكوس اورئوس پاتوژن اثر باکتریوسیدال وهم باکتریو استاتیک داشت که اعداد نزدیک به همحداقل غلظت کشنندگی و حداقل غلظت بازدارندگی نیز نشان دهنده اثر قوی باکتریوسیدال عصاره این گیاه بروی این باکتری است.

بر اساس نتایج به دست آمده از اثر کارلا بر استافيلوكوكوس اورئوس بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره الکلی میوه کارلا بودو حداقل غلظت بازدارندگی بدست آمده نیز مربوط به عصاره الکلی میوه حاصل شد. بر این اساس می توان نتیجه گرفت عصاره الکلی میوه بهترین کارابی را برای مهار و ممانعت از رشد استافيلوكوكوس اورئوس از خود نشان داده است. در نتایج اثر باکتریوسیدال حداقل غلظت کشنندگی برای عصاره الکلی میوه و آبی میوه به ترتیب ۵۰۰، ۵۰۰، ۵۰۰، ۱۲۵ و ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد نتیجه اینکه عصاره الکلی میوه بهترین کارابی باکتریوسیدال را برای استافيلوكوكوس 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 استافيلوكوكوس اورئوس به ترتیب ۱۵۰، ۶۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر حاصل شده است که این مقدار در عصاره های مختلف کارلا یعنی عصاره آبی میوه، الکلی میوه،

هر روزه مقاومت باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک ها بیشتر می شود. تحقیق در مورد کشف مواد جدید با خواص ضد میکروبی قوی تر همپای افزایش مقاومت در باکتری ها رو به گسترش است و از آنجا که انسان ها و عصاره گیاهی از دیر باز در درمان بیماری ها مورد استفاده قرار می گرفتند، لذا به عنوان یک انتخاب مناسب برای این نوع تحقیقات به شمار می روند. گیاهان از هزاران سال پیش نقش بسیار مهمی در حفظ سلامتی و بهبود کیفیت زندگی انسان ها داشته اند. گیاهان دارویی دارای خواص مفیدی هستند که از جمله می توان به خاصیت ضد باکتریایی، ضد انگلی، ضد قارچی و آنتی اکسیدانی اشاره کرد [۱۱]. انسان های گیاهی با اثرات ضد میکروبی بر روی طیف گسترده ای از ارگانیسم ها و همچنین قابلیت مصارف غذایی آنها در برخی موارد وکمتر بودن اثرات جانبی آنها نسبت به آنتی بیوتیک های رایج می توانند درنهایت جایگزین آنتی بیوتیک ها شوند. در راستای بررسی اثرات ضد میکروبی انسان های گیاهی، اثرات ضد میکروبی و آنتی باکتریال عصاره الکلی و عصاره آبی کارلا بر باکتری اشريشياکولي هم که یکی از باکتری های مهم در ایجاد عفونت ها است مورد ارزیابی قرار گرفت. به این صورت که عصاره الکلی و عصاره آبی برگ، میوه و بذر کارلا در رقت های مختلف بر باکتری اشريشيا کلی پاتوژن بررسی شد که اثر مهارکنندگی و کشنندگی نشان دادند و در تمامی غلظت ها دارای اختلاف معنی داری است که نشان دهنده اثر آنتی باکتریال قوی این عصاره بروی این باکتری می باشد. همچنین عصاره الکلی و عصاره آبی کارلا بر باکتری اشريشيا کلی اثر باکتریوسیدال وهم باکتریو استاتیک داشت که اعداد نزدیک به هم حداقل غلظت کشنندگی و حداقل غلظت بازدارندگی نیز نشان دهنده اثر قوی باکتریوسیدال عصاره این گیاه بروی 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 اشريشيا کلی بود و حداقل غلظت بازدارندگی بدست آمده نیز مربوط به عصاره الکلی میوه و الکلی برگ بود. بر این اساس می توان نتیجه گرفت عصاره الکلی میوه بهترین کارابی را برای مهار و ممانعت از رشد اشريشيا کولي از خود نشان داده است. در نتایج اثر باکتریوسیدال حداقل غلظت کشنندگی برای عصاره الکلی بذر، آبی برگ، الکلی میوه و آبی میوه به ترتیب ۲۵۰، ۲۵۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. نتیجه اینکه عصاره الکلی برگ بهترین کارابی باکتریوسیدال را برای اشريشيا کولي 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 اشريشيا کولي به ترتیب ۱۲۵، ۱۲۵ و ۶۰۰ میلی گرم 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 الكلی برگ و میوه بر روی استافیلوکوکوساورئوس و اشريشیا 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 نویسندها هیچ گونه تضاد منافعی نداشته است.

ملاحظات اخلاقی

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

سهم نویسندها

شهریار سعیدیان، مریم اسلامی، علیرضا داشی 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.

REFERENCES

- Naghavi M, Faridi A, Pormalak F, Jaafari N, Lake Moradi M, Eshrat B, Mahdavi N, Kazemeni H, Hashemi Bani Tehrani A, Shoaei 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):215-225. (Persian)
- Shibib BA, Khan LA, Rahman R. Hypoglycemic activity of *Coccinia indica* and *Momordica charantia* in diabetic rats: depression of the hepatic gluconeogenic enzymes

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

در حال حاضر یکی از عمدۀ مشکلاتی که در درمان عفونت ها واستفاده از آنتی بیوتیک ها وجود دارد، ایجاد مقاومت های آنتی بیوتیکی است که توجه خاصی را برای درمان می طلبد و از آنجا که اثرات ضد باکتریایی عصاره کارلا در تحقیقات بروی 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 /پیدر میس و استرپتوکوکوس پایوزن 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 اشريشیا کولی، بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به عصاره الكلی میوه بود و از طرف دیگر عصاره آبی برگ و الكلی بذر کمترین اثر را روی اشريشیا کولی نشان می دهد. کمترین اثر ضد میکروبی روی اشريشیا کولی مربوط به عصاره الكلی میوه بود و از طرف دیگر عصاره آبی برگ و الكلی بذر است که کمترین قطر هاله عدم رشد را نشان می دهد و کمترین اثر ضد میکروبی روی استافیلوکوکوس اورئوس نیز مربوط به عصاره الكلی بذر است که کمترین قطر هاله عدم رشد را نشان می دهد. بهترین رقت به دست آمده برای

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 Foo 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 testsfor 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. Skoćibušić 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.