

فصلنامه علمی - پژوهشی طب مکمل، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶

بررسی مقایسه‌ای آثار ضد میکروبی عصاره‌ی آبی گیاه هوفاریقون و میکرومولسیون تولید شده از آن بر سویه‌های کلینیکی گرم منفی

مریم صدرنیا^۱، محمد ارجمندزادگان^۲، قاسم حبیبی^۳

^۱ دکترای تخصصی، استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
^۲ دکترای تخصصی، دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گروه میکروبی‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک.
^۳ دانشجوی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۲۱

چکیده

مقدمه: هوفاریقون گیاهی با خاصیت دارویی است که در طب سنتی به آثار ضدافسردگی و ضد میکروبی آن اشاره شده است. در این تحقیق، با ارائه‌ی فرم نوینی از عصاره‌ی گیاه هوفاریقون به صورت میکرومولسیون، خواص ضد میکروبی آن در قیاس با میکرومولسیون بر روی سویه‌های کلینیکی گرم منفی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، از ۱۰ نوع سویه‌ی کلینیکی گرم منفی استفاده شد. ابتدا عصاره‌ی آبی گیاه هوفاریقون در دمای جوش تهیه شد و سپس ساختار میکرومولسیون آن با کمک ۲ نوع امولسیفایر در مقیاس نانو فراهم شد. خواص ضدباکتریایی دو ماده‌ی فوق، با تعیین قطر هاله‌ی ممانعت از رشد به روش دیسک‌دیفیوژن و تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC) به روش میکروپلیت دایلوژن، ارزیابی شد. کدورت عصاره با دستگاه الایزایدر تعیین شد.

یافته‌ها: عصاره‌ی هوفاریقون روی باکتری سالمونلاتیفی در غلظت ۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با قطر ۴۲ میلی‌متر بیشترین هاله را ارائه داد و میکرومولسیون آن روی همین باکتری در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هاله‌ی ۳۰ میلی‌متری تشکیل داد؛ ولی روی سودوموناس عدم تشکیل هاله مشاهده شد. بیشترین اثر عصاره با حداقل MIC به میزان ۰/۱۵۶۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر روی سالمونلا و برای شیگلا ۰/۰۶۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. MIC عصاره برای اشرشیاکلی و پروتوس ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای میکرومولسیون ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای هر دو باکتری بود.

نتیجه‌گیری: مقایسه‌ی تأثیر عصاره‌ی هوفاریقون و فرم نانوی تولید شده از آن روی باکتری‌های گرم منفی نشان داد فرم میکرومولسیونی عصاره در غلظت بسیار کمتر، اثر ضدباکتریایی معادل عصاره‌ی غلیظ داشت؛ لذا استفاده از این فرم در مطالعات بالینی داروهای گیاهی توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها: هوفاریقون، عصاره‌ی آبی، میکرومولسیون، دیسک‌دیفیوژن، میکروپلیت دایلوژن.

*نویسنده مسئول: E.mail: arjomandzadegan@arakmu.ac.ir

مقدمه

افزایش روزافزون مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر اریترومايسين و تتراسایکلین و پیدایش سویه‌های مقاوم آن‌ها در برخی کشورها در سال‌های اخیر سبب شده که تلاش مستمری برای یافتن داروهای جدید ضد میکروبی صورت گیرد. آنتی‌بیوتیک‌ها داروی اصلی در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌ها هستند، ولی به علت بروز و گسترش مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک، استفاده از گیاهان دارویی در درمان این نوع عفونت‌ها اهمیت بسزایی یافته است (۱، ۲، ۳).

از جمله عوامل دیگری که سبب افزایش مصرف گیاهان دارویی شده آثار جانبی داروهای شیمیایی و در مقابل، هزینه و عوارض کمتر داروهای گیاهی است (۱). در تحقیقات متعددی آثار آنتی‌میکروبیال بسیاری از گیاهان دارویی مشخص شده است و تخلیص مواد مؤثر این گیاهان می‌تواند راه‌حلی مناسب برای درمانگران در درمان عفونت‌ها باشد (۴، ۵).

«هوفاریقون» با نام علمی *Hypericum*

perforatum گیاهی است علفی و دائمی به ارتفاع حدود یک متر و با بوی مطبوع. اسامی دیگر هوفاریقون، «گل راعی، گل هزارچشم و علف چای» است. قسمت مورد استفاده دارویی گیاه سرشاخه‌های گل‌دار آن است (۱۱). روی برگ‌های آن نقاط روشن و تیره مشاهده می‌شود. نقاط روشن در تمام بخش‌های برگ وجود دارد و محل تجمع اسانس است. نقاط تیره در حاشیه‌ی برگ قرار دارد و محل تجمع ماده‌ی مؤثر هیپریسین است (۶، ۱۵، ۱۶، ۷).

برخی از خواص مهم این گیاه عبارت‌اند از: مدر، تب‌بر، ضد درد، ضد نفرس، مؤثر در درمان رماتیسم و اسپاسم‌های مزمن گوارشی، درمان سیاتیک و بیماری‌های عفونی مانند سفلیس، سل، اسهال خونی و سیاه‌سرفه، دفع کرم و درمان مالاریا (۹، ۱۶). در طب سنتی ایران نیز هوفاریقون به‌عنوان گیاهی مدر، ضد درد و ضد افسردگی، ضد عفونی‌کننده و ترمیم‌کننده‌ی زخم‌ها معرفی شده است (۱۴-۱۰).

با استفاده از روش‌های متنوع عصاره‌گیری از جمله ماسراسیون (خیساندن)، پرکولاسیون، سوکسله و ... از قسمت‌های مختلف گیاه می‌توان عصاره‌هایی را با ویژگی‌های متفاوت به دست آورد.

بهره‌گیری از علم نانوتکنولوژی در کاربرد عصاره‌های گیاهی، یک ایده‌ی جدید است که هدف اصلی آن، اثر بیشتر با مصرف کمتر ماده است. یکی از روش‌های افزایش تأثیر عصاره‌ها، تهیه‌ی نانوامولسیون به روش میکروامولسیون از آن‌هاست. میکروامولسیون، عصاره‌ی گیاهی را در ساختار فسفولیپیدی بسته‌ی خود به دام می‌اندازد که این عمل باعث پراکنش یکنواخت ماده در محلول، جلوگیری از پدیده‌ی کلوخه شدن و در نتیجه ممانعت از تلف شدن عصاره‌ی گیاهی می‌شود. از آنجاکه ساختار میکروامولسیون و ساختمان غشای سیتوپلاسمی شبیه به هم هستند می‌توانند در هم ادغام شوند و در نتیجه عصاره مستقیماً وارد سیتوپلاسم شود. ضمناً با توجه به ابعاد بسیار کوچک آن، قادر به عبور از منافذ پپتیدوگلیکان دیواره‌ی سلولی است و بدین ترتیب در کمترین غلظت، بیشترین تأثیر را خواهد داشت (۱۶، ۱۵).

هدف از انجام این تحقیق، ارزیابی کارایی میکروامولسیون تولیدشده از عصاره‌ی آبی گیاه هوفاریقون در مقایسه با خود عصاره، در کنترل رشد سویه‌های کلینیکی باکتری‌های گرم منفی است.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری

سویه‌های باکتری

سویه‌های کلینیکی مورد استفاده شامل مورگانلامورگانی، کلبسیلا پنومونیه، سالمونلا پاراتیفی، سالمونلا تیفی، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس ولگاریس، سیتروباکتر، شیگلا سونتی، سراشیامارسنس و ۱۰ سویه کلینیکی اشرشیاکلی بود که از بانک میکروبی مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی دانشگاه علوم پزشکی اراک، تأمین شدند.

عصاره‌گیری:

گیاه موردنظر از مزرعه تهیه شد و پس از شست‌وشو در محلی به‌دوراز نور خورشید و در دمای حدود ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد طی ۴ روز خشک شد. پس‌از آن با دستگاه خردکننده (مولینکس ساخت آلمان) آسیاب شد و عصاره‌گیری از آن به روش تقطیر انجام شد. این دستگاه متشکل از یک بالن با حجم یک لیتر بود که به مبرد ۴۰ سانتی‌متری متصل بود. برای شروع عصاره‌گیری در ابتدا مقدار ۲۰۰ گرم از گیاه خشک و آسیاب‌شده در بالن ریخته شد و به همراه ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر در حجمی معادل ۲/۵ برابر گیاه خشک، مخلوط شد و در همان حالت ماند تا به جوش آمد. سپس در دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برای مدت ۸ ساعت ثابت نگه داشته شد. بدین‌ترتیب، عصاره‌ی گیاهی از همه‌ی اندام‌های هوفاریقون به دست آمد. برای صاف کردن عصاره‌ها و جداسازی مواد معلق ناخالص آن از سانتریفیوژ استفاده شد. درنهایت، عصاره‌ی صاف‌شده خشک شد. وزن خشک عصاره محاسبه شد و از پودر آن محلول تهیه شد و در انجام آزمایش‌های میکروبی از آن استفاده شد. برای انجام آزمایش، رقت‌های ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲، ۱۰۲۴، ۲۰۴۸، ۴۰۹۶، ۸۱۹۲، ۱۶۳۸۴ و ۳۲۷۶۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه شد.

تهیه‌ی میکرومولسیون

ساختار میکرومولسیونی به دلیل توانایی در بالا بردن اثر ضد میکروبی، انتخاب خوبی برای وارد کردن مؤثر عصاره در سلول است. میکرومولسیون با استفاده از ترکیب ۲ امولسیفایر و ایجاد تلاطم با کمک استیرر و مگنت، در دمای آزمایشگاه تهیه شد. در این روش، عصاره در درون میسل به دام می‌افتد و میسل به‌دلیل ساختار میکرومولسیونی خود، عصاره را بسیار مؤثرتر به هدف خود منتقل می‌کند (۱۵، ۱۶).

انجام دیسک‌دیفوژن

به محیط کشت مولر هیتون آگار کشت تازه سویه کلینیکی در غلظت $10^8 \times 1/5$ معادل رقت نیم مک فارلند کشت چمنی گسترده انجام گردید. پس از آن دیسک‌های بلانک

روی آگار قرار داده شد. سپس روی هر دیسک ۲۰ میکرولیتر از هر کدام از غلظت‌ها با کمک سمپلر ریخته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد، قطراله عدم رشد را از پشت پلیت با خط کش میلیمتری اندازه‌گیری و نتایج حاصل از آنتی بیوتیک‌ها، با جدول (NCCLS) National Committee for Clinical Laboratory Standards مقایسه گردید (۱۷).

روش میکروپلیت دایلوژن

با کمک روش میکروپلیت دایلوژن حداقل غلظت مهارکننده (MIC) با استفاده از پلیتهای ۹۶ خانه تعیین گردید. بدین منظور ابتدا از باکتری‌ها، کشت ۲۴ ساعته تهیه شد. پس از تهیه نیم مک فارلند از باکتریها در محیط مولر هیتون برات، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه گردید، یعنی به همه ۹۶ خانه (از خانه ی ۱۰-۱) $100 \mu\text{l}$ از محیط کشت حاوی باکتری اضافه شد. سپس به چاهک اول $100 \mu\text{l}$ عصاره اضافه شده و کاملاً همپلینگ گردیده، و از آن $100 \mu\text{l}$ برداشته به چاهک بعدی اضافه شد. کار به همین ترتیب تا شماره ۹ ادامه یافته د. شماره ی ۱۱ (کنترل مثبت) حاوی $100 \mu\text{l}$ محیط کشت دارای باکتری بود. به دلیل این که عصاره‌ها عموماً رنگی بوده و در خواندن جذب نوری ایجاد خطا میکنند لذا شماره ۱۲ (شاهد) حاوی $100 \mu\text{l}$ عصاره خالص برای مشاهده ی جذب نوری عصاره بود. برای شفاف شدن کامل مواد و حذف خطای ناشی از کدورت، تمامی عصاره‌ها و نانوهای آنها در ۹۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس مورد استفاده قرار گرفتند. جذب نوری تمامی میکروپلیت‌ها یک مرتبه بدون اضافه کردن رنگ و تنها با کدورت حاصل از رشد باکتری و یک بار هم بعد از اضافه کردن رنگ MTT در طول موج ۵۴۵ nm دستگاه الیزا ریدر خوانده شدند. برای تعیین تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) در روش میکروپلیت دایلوژن، پس از تعیین حداقل غلظت مهار کننده، از ماده MTT استفاده

میلی متری در جایگاه بعدی حساسیت قرار دارد بعد از آن سالمونلا تیفی و کلبسیلا و اشرشیاکلی به ترتیب حساسیت قرار گرفته اند.

در ساختار میکرو امولسیون بکتري مورگانلا بعد از بکتري سودوموناس مقاومترین بکتري ها بوده اند.

نمودار ۱ نتایج حاصل از خوانش میکروپلیت دایلوژن عصاره آبی، با استفاده از دستگاه الیزا ریدر را نشان می دهد. همانطور که در این نمودار نشان داده شده است کلبسیلا و استافیلوکوکوس از غلظت 0.625 mg/ml ، اشرشیاکلی از غلظت 0.125 mg/ml به بعد رشد بکتري صورت گرفته است. بنابراین غلظت های مذکور به عنوان MIC یا حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد در نظر گرفته می شود.

در ادامه همین آزمایش برای میکروامولسیون عصاره آبی بر روی میکروپلیت انجام گردید که نتایج آن در نمودار شماره ۲ قابل مشاهده است. همانطور که از این نمودار ها می توان برداشت کرد رشد بکتري برای اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس از غلظت 0.025 mg/ml و برای بکتري کلبسیلا از غلظت 0.0125 mg/ml رشد بکتري شروع به افزایش کرده است که نشان دهنده مقدار MIC برای این بکتري ها است.

علاوه بر این، MIC به دست آمده برای بکتري مورگانلا 0.125 میلی گرم بر میلی لیتر است. غلظت MIC برای بکتري شیگلا با استفاده از میکروامولسیون عصاره، 0.0625 میلی گرم بر میلی لیتر است. غلظت MIC برای بکتري سالمونلا با استفاده از عصاره ی خالص گیاه هوفاریقون، 0.156 میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. مقدار MIC برای پروتئوس میرابیلیس و نیز اشرشیاکلی با استفاده از عصاره ی آبی گیاه، 0.5 میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. با استفاده از میکروامولسیون عصاره ی گیاهی مقدار MIC این بکتري غلظت 0.025 میلی گرم بر میلی لیتر است. همین مقادیر برای کلبسیلا 0.125 میلی گرم بر میلی لیتر و برای مورگانلا و 0.125 میلی گرم بر میلی لیتر بود.

بعمل آمد. بدین ترتیب که مقدار 10 میکرولیتر از رنگ MTT به هر چاهک اضافه شده و پس از دو ساعت انکوباسیون اقدام به خواندن چاهک ها گردید (17 و 18).

یافته ها

نتایج حاصل از دیسک دیفیوژن

نتایج بدست آمده نشان می دهند که عصاره گیاه هوفاریقون بیشترین هاله را برای بکتري سالمونلا تیفی با قطر 42 میلی متر تشکیل داده است که نشان دهنده حساسیت این بکتري است، سراسیا بعداز سالمونلا با قطر 35 میلی متر حساسترین سویه و شیگلا، سیترو باکتر و کلبسیلا به ترتیب پس از آن قرار دارند. بکتري سودوموناس هیچ هاله ای در هیچکدام از رقت ها تشکیل نداد که نشانه مقاومت کامل این بکتري به عصاره مورد بررسی است. اشرشیاکلی در غلیظ ترین فرم عصاره، هاله 13 میلی متری را تشکیل و در بقیه رقت ها هیچ گونه هاله عدم رشدی ایجاد نمود.

با توجه به نتایج بدست آمده از جدول می توان گفت که تمامی سویه ها به جز بکتري سودوموناس به طور نسبی به عصاره گیاه هوفاریقون حساسیت نشان داده اند. حساسترین بکتري، سراسیا مارسنس با حداکثر قطر هاله 35 میلی متری بوده است. جدول ۱ نتایج دیسک دیفیوژن برای عصاره آبی هوفاریقون را نشان می دهد.

یافته ها

نتایج نشان داده شده در جدول شماره یک بر اساس هاله های تشکیل شده برای عصاره آبی گیاه هوفاریقون است و در مقابل نتایج نشان داده شده در جدول شماره ۲ هاله های تشکیل شده بر اساس میکرو امولسیون تشکیل شده از عصاره آبی گیاه هوفاریقون است.

همانطور که در جدول شماره ۲ مشاهده می شود بکتري سودوموناس هیچ گونه هاله عدم رشدی در معرض میکروامولسیون عصاره تشکیل نداده است. بکتري های سیتروباکتر و سالمونلا پاراتیفی با تشکیل هاله 30 میلی متری حساسترین سویه ها در برابر عصاره در فرم میکروامولسیون بوده و بکتري پروتئوس با تشکیل هاله 29

بحث

در این تحقیق اثبات شد که ساختار میکرومولسیونوی محتوی یک‌هشتادم غلظت معمول عصاره‌ی گیاه هوفاریقون، به‌خوبی توانست در غلظت کم، اثری مشابه با عصاره‌ی معمول، روی طیف وسیعی از سویه‌های کلینیکی باکتری‌های گرم منفی داشته باشد. این مسئله یک رویکرد نوین برای تحقیق در مورد عصاره‌های گیاهان داروئی محسوب می‌شود.

باید توجه کرد که استفاده از گیاهان داروئی به‌دلیل اینکه عوارض جانبی آن‌ها بسیار کمتر از داروهای شیمیایی است و نیز به‌علت عدم رخداد پدیده‌ی مقاومت داروئی در آن‌ها، گزینه‌ی بسیار مناسبی برای مبارزه با بیماری‌های عفونی است.

گیاه هوفاریقون با داشتن خواص بسیار زیاد در جایگاه ویژه‌ای قرار دارد که بررسی خواص ضد میکروبی آن هدف این تحقیق است. در مطالعات انجام‌شده در داخل و خارج کشور آثار ضد میکروبی و بعضاً ضد قارچی یک‌سری از گیاهان داروئی مثبت ارزیابی شده است.

در بررسی متون هیچ تحقیقی در زمینه‌ی تولید میکرومولسیون از هوفاریقون و تأثیر آن بر سویه‌های گرم منفی به دست نیامد.

به‌عنوان مثال نسیم کاشف و همکاران اثبات کردند که این عصاره می‌تواند به‌عنوان یک حساس‌گر نوری جدید و مؤثر برای فتودینامیک‌تراپی ضد میکروبی در شرایط آزمایشگاهی مطرح باشد. مطالعات بیشتری نیاز است تا اثر فتوتوکسیک این عصاره در کشت سلول، مدل حیوانی و درنهایت در بالین بررسی شود (۱۹).

محمدرضا مرشدلو ضمن بررسی اسانس‌های هوفاریقون، مشخص کرد که اسانس‌ها محتوی شمار زیادی از متابولیت‌های ثانویه فرآرند که کاربرد وسیعی در صنایع داروئی و بهداشتی یافته‌اند؛ ازجمله استفاده از اجزای اسانس‌ها در کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا. به‌عنوان مثال تأثیر آلفا و بتا - پینن در کنترل باکتری‌های گرم مثبت عامل عفونت آندوکاردیت به اثبات رسیده است.

اهمیت این مونوترپن‌های مهم در درمان و پیشگیری از بیماری‌هایی همچون بیماری عفونت آندوکاردیت به اثبات رسیده است؛ لذا می‌توان این گونه‌ی ارزشمند داروئی را به‌عنوان یک گزینه در برابر بیماری‌های عفونی در نظر گرفت (۲۰).

محمدرضا فرهپور اثر ترکیب عصاره‌ی هیدروآتانولی گیاه هوفاریقون و روغن کتان در تسریع روند التیام زخم و اثرگذاری بر سرعت التیام و کیفیت بافت التیامی نهایی را بررسی کرد. بر اساس نتایج مطالعه‌ی ایشان، روند بهبود زخم در پماددرمانی حاوی ترکیب عصاره‌ی هیدروآتانولی هوفاریقون - روغن کتان، در مقایسه با سایر گروه‌ها بسیار بهتر بوده است (۲۱).

فلاحی و همکاران، در قالب طرحی کاملاً تصادفی با ۷ تیمار و ۳ تکرار و به روش سنجش حساسیت به روش انتشار از دیسک طبق مدل استاندارد Kirby bauer، آزمایشی را بر روی آثار ضدباکتریایی عصاره‌ی چندگونه گیاه داروئی ازجمله هوفاریقون بر روی تعدادی باکتری سالمونلای جداشده از پوسته‌ی تخم‌مرغ و ۲ نمونه‌ی استاندارد سالمونلا تایفی‌موریوم (Salmonella Typhimurium) و سالمونلا اینترتیدیس (Salmonella Enteritidis) تهیه‌شده از مؤسسه‌ی رازی اجرا کردند. نتایج، نشان‌دهنده‌ی آثار بازدارندگی معنی‌دار عصاره‌ی گیاهان مذکور بر رشد باکتری سالمونلا بود (۲۲).

در تحقیق حاضر، اثر عصاره‌ی آبی گیاه هوفاریقون و میکرومولسیون تهیه‌شده از آن برای اولین بار بر سویه‌های کلینیکی گرم منفی مورد ارزیابی قرار گرفت. این ارزیابی با استفاده از روش انتشار دیسک در آگار و میکروپلیت دایلوشن انجام شد. این روش اجرا روی میکرومولسیون هوفاریقون، یک روش نوین بود و در منابع، مشابه آن مشاهده نشد.

نتایج به‌دست‌آمده از روش انتشار دیسک در آگار نشان می‌دهد که بیشتر سویه‌های موردبررسی به‌غیراز باکتری سودوموناس حساسیت نسبی به عصاره‌ی گیاهی و

میکرومولسیون در غلظتی حدود یک‌هشتادم عصاره، اثری مشابه آن را داشت.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره‌ی آبی گیاه هوفاریقون اثر ضد میکروبی بسیار خوبی علیه باکتری‌های مورد بررسی داشته به خوبی توانایی کنترل آن‌ها را دارد. میکرومولسیون تهیه شده محتوی مقادیر بسیار کم عصاره، از قدرت ضد میکروبی مشابه عصاره‌ی غلیظ برخوردار بود. پیشنهاد می‌شود از این ساختار در مقیاس نانو برای بررسی‌های کلینیکی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در دانشگاه پیام نور تصویب شد و در تمام مراحل اجرای آن، اصول و قواعد اخلاق در پژوهش‌های علوم پزشکی رعایت شد. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از کلیه همکاران کمال تشکر و قدردانی را داشته باشند.

میکرومولسیون حاصل از آن دارند. سودوموناس در تمامی غلظت‌ها در هر دو حالت عصاره‌ی غلیظ و میکرومولسیون تهیه شده، مقاومت نشان داد و هاله تشکیل نداد. بقیه‌ی سویه‌ها حساسیت‌های متفاوتی را نسبت به عصاره‌ی آبی و میکرومولسیون حاصل از آن نشان دادند. سالمونلا با تولید هاله‌ی ۴۲ میلی‌متری برای غلیظ‌ترین رقت از عصاره بیشترین حساسیت را نشان داد و در آخرین رقت تهیه شده از این عصاره (۰/۰۱۶ mg/ml) هاله‌ی ۹ میلی‌متری تشکیل شد.

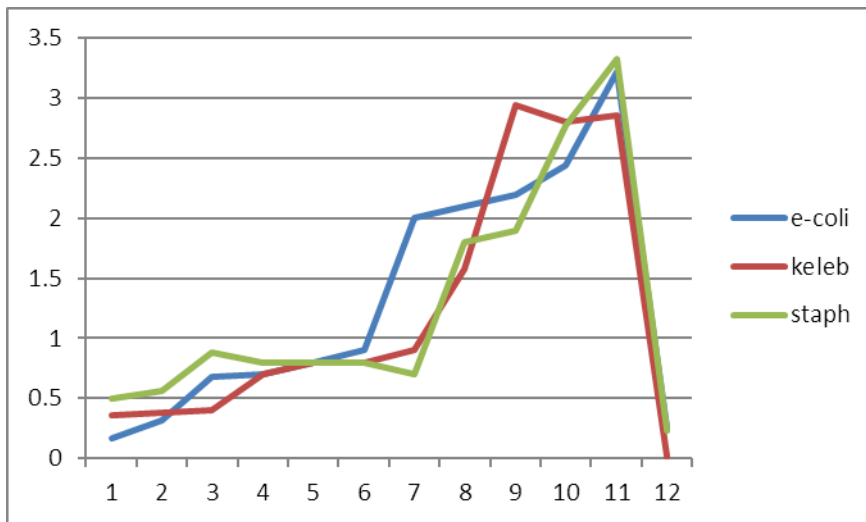
نتایج به دست آمده از روش میکروپلیت دایلوژن با دقت بیشتری میزان حساسیت باکتری‌ها را مورد بررسی قرار داد. نمودار شماره‌ی ۱ نتایج میکروپلیت برای ۳ باکتری اشرشیاکلی، کلبسیلا و استافیلوکوکوس را با عصاره‌ی غلیظ نشان داد. نمودار شماره‌ی ۲ واکنش همان باکتری‌ها را در معرض میکرومولسیون نشان می‌دهد؛ اثبات شد که

جدول شماره (۱) نتایج حاصل از دیسک‌دیفیوژن (mm) برای عصاره‌ی آبی هوفاریقون (mg/ml)

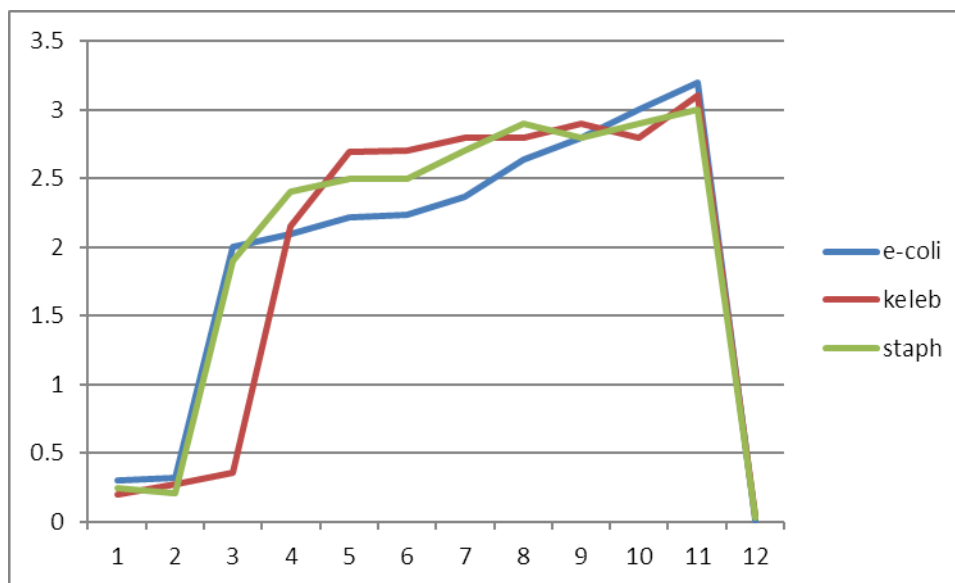
غلظت عصاره (میلی گرم بر میلی لیتر)	۰/۱۵۶	۰/۰۳۱۲	۰/۰۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸	باکتری
کلبسیلا پنومونیه	۹	۱۴	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲۵	۲۶	۲۸	۳۰	
اشرشیا کلی	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۳	
سودوموناس آئروژینوزا	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	
سالمونلاتیفی	۹	۱۲	۱۴	۱۸	۲۱	۲۴	۲۸	۲۹	۴۲	۴۲	
مورگانلامورگانی	۰	۰	۰	۰	۰	۱۳	۱۸	۲۳	۲۳	۲۷	
پروتئوس ولگاریس	۰	۰	۰	۰	۱۳	۱۷	۲۱	۲۲	۲۴	۲۹	
سیتروباکتر	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰	۱۳	۱۵	۳۳	
شیگلا سونی	۰	۰	۰	۱۰	۱۳	۱۷	۲۰	۲۴	۲۸	۳۴	
سراشیا مارسنس	۱۲	۱۵	۱۷	۲۱	۲۵	۲۶	۲۸	۳۱	۳۴	۳۵	
سالمونلا پاراتیفی	۰	۰	۰	۰	۹	۱۱	۱۵	۱۸	۲۰	۲۴	

جدول شماره (۲) نتایج حاصل از دیسک‌دیفیوژن (mm) برای میکرومولسیون عصاره‌ی آبی هوفاریقون (mg/ml)

غلظت عصاره (میلی گرم بر میلی لیتر)	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۷۸	۰/۰۰۱۶	۰/۰۰۳۱	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۱۲۵	۰/۰۲۵	۰/۰۵	۰/۱	باکتری
کلبسیلا پنومونیه	۰	۰	۰	۱۲	۱۷	۲۰	۲۰	۲۳	۲۵	۲۵	
اشرشیا کلی	۰	۰	۰	۰	۱۷	۱۹	۲۲	۲۳	۱۸	۲۵	
سودوموناس آئروژینوزا	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	
سالمونلاتیفی	۰	۰	۰	۰	۱۴	۱۶	۱۸	۲۰	۲۳	۲۷	
مورگانلامورگانی	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۶	۱۷	
پروتئوس ولگاریس	۰	۰	۹	۱۲	۱۴	۱۷	۲۱	۲۴	۲۲	۲۹	
سیتروباکتر	۱۰	۱۲	۱۴	۱۷	۲۰	۲۵	۲۵	۲۵	۲۸	۳۰	
شیگلا سونی	۰	۰	۰	۰	۰	۱۲	۱۵	۲۰	۲۱	۲۳	
سراشیا مارسنس	۰	۰	۰	۰	۱۰	۱۲	۱۵	۱۸	۲۰	۲۳	
سالمونلا پاراتیفی	۰	۰	۰	۱۱	۱۴	۱۸	۲۱	۲۵	۲۸	۳۰	



نمودار شماری (۱) نتایج حاصل از انجام روش میکروپلیت دایلوژن بر روی عصاره‌ی آبی



نمودار شماری (۲) نتایج حاصل از میکروپلیت دایلوژن با استفاده از میکرومولسیون عصاره‌ی آبی

References:

- Berahou A, Auhmani A, Fdil N, Benharref A, Jana M, Gadhi C. Antibacterial activity of *Quercus ilex* bark's extracts. *Journal of ethnopharmacology*. 2007;112(3):426-9.
- Crompton C, Hall I, Jensen K, Hildebrand P. The biology of Canadian weeds. 83. *Hypericum perforatum* L. *Canadian Journal of Plant Science*. 1988;68(1):149-62.
- Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia N, Corrente M, Parisi A, et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 2007;115(3):290-6.
- Sirvent TM, Walker L, Vance N, Gibson DM. Variation in Hypericins from Wild Populations of *Hypericum perforatum* L. in the Pacific Northwest of the USA. *Economic Botany*. 2002;56(1):41-8.
- Faid M, Bakhy K, Anchad M, Tantaoui-Elaraki A. Almond paste: physicochemical and microbiological characterization and preservation with sorbic acid and cinnamon. *Journal of Food Protection*. 1995;58(5):547-50.
- Gerard J. *The Herbal*. Revised and enlarged by T. Johnson. reprint by Dover publications In: Hobbs Ch. *St John's wort*. *Herbalgram*. 1996; 35: 18-32.
- Curtis J, Lersten N. Internal secretory structures in *Hypericum* (Clusiaceae): *H. perforatum* L. and *H. balearicum* L. *New Phytologist*. 1990;114(4):571-80.
- Campbell M. Germination, emergence and seedling growth of *Hypericum perforatum* L. *Weed Research*. 1985;25(4):259-66.
- Rezazadeh S, Pirali Hamedani M, Hadjiakhoondi A, Yazdani D, Jamshidi A, Taghizadeh M. Chemical composition of the essential oils of *Stachys athorecalyx* C. Koch. collected from Arasbaran prospected region. *Journal of Medicinal Plants*. 2006;2(18):56-62.
- Azadbakht M, Ziaiye H, Abdollahi F, Shabankhani B. Effect of Methanolic essence and extract of *Myrtus Communis* on

- Trichomonas Vaginalis. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2004;12(48):8-13. [Persian]
11. Kraft K, Hobbs C. Pocket guide to herbal medicine: Georg Thieme Verlag; 2004:115-119.
 12. Peron AP, Mariucci RG, de Almeida IV, Düsman E, Mantovani MS, Vicentini VEP. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of a natural antidepressant, *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort), on vegetal and animal test systems. BMC complementary and alternative medicine. 2013;13(1):97.
 13. Abdelwahed A, Hayder N, Kilani S, Mahmoud A, Chibani J, Hammami M, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Pituranthos tortuosus* (Coss.) Maire. Flavour and fragrance journal. 2006;21(1):129-33.
 14. Lin C-C, Lin H-Y, Chi M-H, Shen C-M, Chen H-W, Yang W-J, et al. Preparation of curcumin microemulsions with food-grade soybean oil/lecithin and their cytotoxicity on the HepG2 cell line. Food chemistry. 2014;154:282-90.
 15. Sintov AC. Transdermal delivery of curcumin via microemulsion. International journal of pharmaceutics. 2015;481(1):97-103.
 16. Wikler MA, Cockerill FR, Craig WA, Dudley MN, Hecht DW. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth informational supplement: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006;26(1):7-12
 17. Garcia LS. Clinical microbiology procedures handbook: American Society for Microbiology Press; 2010.
 18. Kashef N, Sadat Borghei Y. Phototoxic Effect of *Hypericum Perforatum* L. Extract on *Enterococcus Faecalis*, *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli*. Medical Laser in Medicine. 2013;21(2):8-12. [Persian]
 19. Morshedloo M, Ebadi A, Fatahi Moghaddam M, Yazdani D. Evaluation of Essential Oil Composition in Three Species of *Hypericum* from Iran. Journal of

Medicinal Plants. 2012;2(42):23-31. [Persian]

20. Farahpour MR. EVALUATION OF THE COMBINED EFFECT OF ST JOHN'S WORT HYDROETHANOLIC FLOWER EXTRACT AND FLAXSEED OIL ON SKIN WOUND HEALING IN RATS. QUARTERLY VETERINARY

CLINICAL PATHOLOGY.2014;8(29):417-26. [Persian]

21. Fallahi J, Ebadi M, Rezvani Moghaddam P. Effect of six medicinal plant essential oils to control salmonella in comparison to the antibiotic streptomycin. Iranian Veterinary Journal. 2010;6(26):25-33. [Persian]

Comparison of the antibacterial activity of aqueous extract Hypericom and its microemulsion form on Gram-negative clinical strains

Sadrnia M¹, Arjomandzadegan M^{*2}, Habibi Gh³

1. Ph.D .Department of Biology, Payame noor University, IR. Iran
2. Infectious Diseases Research Center (IDRC), Department of Microbiology, School of Medicine ,Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
3. medical student .Infectious Diseases Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 21 June, 2017 :Accepted: 11 March, 2017

Abstract

Introduction: *Hypercom perforatum* has medicinal properties in traditional medicine with antidepressant and anti-microbial effects. In this study, a new form of aqueous extract of *Hypercom* was prepared as a micro emulsion form, and its antimicrobial properties was investigated in comparison with ordinary aqueous extract on clinical strains of gram-negative bacteria.

Methods: Ten types of clinical strains were investigated in this work. Hypericum extract was prepared by water in boiling temperature and micro emulsion with the help of two types of emulsifiers. Antibacterial properties of the two materials were performed by determining the inhibition zone in a disk diffusion method and the measurement of minimum inhibitory concentrations (MIC) by the microplate dilution and a ELISA reader device.

Results: *Salmonella typhi* has the highest zone of inhibition around 42 mm at a concentration of 8 mg/ml for extract and 30 mm in 0.1mg/ml micro emulsion but *Pseudomonas* had no zone. The MIC with microplate for *Salmonella* had greatest effect on the amount of 0.01563 mg/ml for *Shigella* concentration of 0.00625 mg/ml respectively. MIC for *E. coli* and *Proteus* extract 0.5 mg/ml and the microemulsion 0.025 mg/ml for both bacteria.

Conclusion: Comparison of Hypercom extract and its microemulsion form on gram negative bacteria confirmed that microemulsion in lower concentrations had the antibacterial effect equal to aqueous extract. The use of microemulsion of the extract was recommended in clinical study of herbal medicines.

Keywords: Hypericum, Aqueous extract, Microemulsion, Disk diffusion, Microplate dilution.

*Corresponding author: E.mail: arjomandzadegan@arakmu.ac.ir