مقاله پژوهشی

فصلنامه علمی – پژوهشی طب مکمل، شماره۱، بهار ۱۳۹۶

بررسی مقایسه‌ای آثار ضدِمیکروبی عصاره‌ی آبی گیاه هوفاریقون و میکروامولسیون تولیدشده 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 میکروب‌شناسی 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 طبّ سنّتی به آثار ضدِافسردگی و ضدِمیکروبی آن اشاره شده است. در این تحقیق، با ارائه‌ی فرم نوینی از عصاره‌ی گیاه هوفاریقون به‌صورت میکروامولسیون، خواص ضدِمیکروبی آن در قیاس با میکروامولسیون 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 میکروامولسیونی آن با کمک ۲ نوع امولسیفایر در مقیاس نانو فراهم شد. خواص ضدِباکتریایی دو ماده‌ی فوق، با تعیین قطر هاله‌ی ممانعت از رشد به روش دیسک‌دیفیوژن و تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC) به روش میکروپلیت دایلوشن، ارزیابی شد. کدورت عصاره با دستگاه الایزاریدر تعیین شد.

یافته‌ها: عصاره‌ی هوفاریقون روی باکتری سالمونلاتیفی در غلظت ۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با قطر ۴۲ میلی‌متر بیشترین هاله را ارائه داد و میکروامولسیون 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 ۰/۰۱۵۶۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر روی سالمونلا و برای شیگلا ۰/۰۰۶۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. MIC عصاره برای اشرشیاکلی و پروتئوس ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای میکروامولسیون ۰/۰۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای هر دو باکتری بود.

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

کلیدواژه‌ها: هوفاریقون، عصاره‌ی آبی، میکروامولسیون، دیسک‌دیفیوژن، میکروپلیت دایلوشن.

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

مقدمه

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

ازجمله 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 perforatumگیاهی 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 موردِاستفاده‌ی 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، ضدِدرد، ضدِنقرس، 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،۶). در طب ّسنّتی ایران نیز هوفاریقون به‌عنوان گیاهی مدر، ضدِدرد و ضدِافسردگی، ضدعفونی‌کننده و ترمیم‌کننده‌ی زخم‌ها معرفی شده است (۱۴-۱۰).

با استفاده از روش‌های متنوع عصاره‌گیری ازجمله 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 درنتیجه ممانعت از تلف شدن عصاره‌ی گیاهی می‌شود. ازآنجاکه ساختار میکروامولسیون و ساختمان غشای سیتوپلاسمی شبیه به هم هستند می‌توانند در هم ادغام شوند و درنتیجه عصاره مستقیماً وارد سیتوپلاسم شود. ضمناً با توجه به ابعاد بسیار کوچک آن، قادر به عبور از منافذ پپتیدوگلیکان دیواره‌ی سلولی است و بدین‌ترتیب 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 موردِاستفاده شامل مورگانلامورگانی، کلبسیلاپنومونیه، سالمونلاپاراتیفی، سالمونلاتیفی، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس ولگاریس، سیتروباکتر، شیگلاسونئی، سراشیامارسسنس و۱۰ 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. پس‌ازآن 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 ۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۰۳۱۲۵ و ۰/۰۱۵۶۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه شد.

تهیه‌ی میکروامولسیون

ساختار میکروامولسیونی به دلیل توانایی در بالا بردن اثر ضدِمیکروبی، انتخاب خوبی برای وارد کردن مؤثر عصاره در سلول است. میکروامولسیون 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 میکروامولسیونی خود، عصاره را بسیار مؤثرتر به هدف خود منتقل می‌کند (۱۵، ۱۶).

انجام دیسک‌دیفوژن

به محیط کشت مولر هینتون آگار کشت تازه سویه کلینیکی در غلظت^{8}۱۰ ×۱/۵معادل رقت نیم مک فارلند کشت چمنی گسترده انجام گردید. پس از آن دیسک های بلانک روی آگار قرار داده شد . سپس روی هر دیسک ۲۰مایکرولیتر از هر کدام از غلظت ها با کمک سمپلر ریخته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد، قطرهاله عدم رشد را از پشت پلیت با خط کش میلیمتری اندازه گیری و نتایج حاصل از آنتی بیوتیک ها، با جدول (NCCLS) National Committee for Clinical Laboratory Standards مقایسه گردید (۱۷).

روش میکروپلیت دایلوشن

با کمک روش میکروپلیت دایلوشن حداقل غلظت مهارکننده (MIC) با استفاده از پلیتهای ۹۶ خانه تعیین گردید. بدین منظور ابتدا از باکتری ها، کشت ۲۴ ساعته تهیه شد. پس از تهیه نیم مک فارلند از باکتریها در محیط مولر هینتون براث، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده به هر یک از چاهک های پلیت ۹۶ خانه اضافه گردید، یعنی به همه ۹۶ خانه (از خانه ی ۱۰-۱) ۱۰۰ µl از محیط کشت حاوی باکتری اضافه شد. سپس به چاهک اول۱۰۰ µl عصاره اضافه شده و کاملا سمپلینگ گردیده، و از آن ۱۰۰ µl برداشته به چاهک بعدی اضافه شد. کار به همین ترتیب تا شماره ۹ ادامه یافته د. شماره ی ۱۱ (کنترل مثبت) حاوی ۱۰۰ µl محیط کشت دارای باکتری بود. به دلیل این که عصاره ها عموما رنگی بوده و در خواندن جذب نوری ایجاد خطا میکنند لذا شماره ۱۲ (شاهد) حاوی ۱۰۰ µl عصاره خالص برای مشاهده ی جذب نوری عصاره بود. برای شفاف شدن کامل مواد و حذف خطای ناشی از کدورت، تمامی عصاره ها و نانوهای آنها در ۹۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و سپس مورد استفاده قرار گرفتند. جذب نوری تمامی میکروپلیت ها 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 موج۵۴۵ nm دستگاه الایزا ریدرخوانده شدند. برای تعیین تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) در روش میکروپلیت دایلوشن، پس از تعیین حداقل غلظت مهار کننده، از ماده MTT استفاده

بعمل آمد. بدین ترتیب که مقدار ۱۰ میکرولیتر از رنگ MTT به هر چاهک اضافه شده و پس از دو ساعت انکوباسیون اقدام به خواندن چاهک ها گردید (۱۷و ۱۸) .

یافته‌ها

نتایج حاصل از دیسک‌دیفیوژن

نتایج بدست آمده نشان می دهند که عصاره گیاه هوفاریقون بیشترین هاله را برای باکتری سالمونلا تیفی با قطر ۴۲ میلی متر تشکیل داده است که نشان دهنده حساسیت این باکتری است ، سراشیا بعداز سالمونلا با قطر ۳۵ میلی متر حساسترین سویه و شیگلا ، سیترو باکتر و کلبسیلا به ترتیب پس از آن قرار دارند. باکتری سودوموناس هیچ هاله ای در هیچکدام از رقت ها تشکیل نداد که نشانه مقاومت کامل این باکتری به عصاره مورد بررسی است. اشرشیاکلی در غلیظ ترین فرم عصاره ، هاله ۱۳ میلی متری را تشکیل و در بقیه رقت ها هیچ گونه هاله عدم رشدی ایجاد ننمود.

با توجه به نتایج بدست آمده از جدول می توان گفت که تمامی سویه ها به جز باکتری سودوموناس به طور نسبی به عصاره گیاه هوفاریقون حساسیت نشان داده اند. حساسترین باکتری ، سراشیا مارسسنس با حداکثر قطر هاله ۳۵ میلی متری بوده است. جدول ۱ نتایج دیسک دیقیوژن برای عصاره آبی هوفاریقون را نشان می دهد.

یافته‌ها

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 باکتری سودوموناس هیچ گونه هاله عدم رشدی در معرض میکروامولسیون عصاره تشکیل نداده است. باکتری های سیتروباکتر و سالمونلا پاراتیفی با تشکیل هاله ۳۰ میلی متری حساسترین سویه ها در برابر عصاره در فرم میکروامولسیون بوده و باکتری پروتئوس با تشکیل هاله ۲۹ میلی متری در جایگاه بعدی حساسیت قرار دارد بعد از ان سالمونلا تیفی و کلبسیلا و اشرشیاکلی به ترتیب حساسیت قرار گرفته اند.

در ساختار میکرو امولسیونی باکتری مورگانلا بعد از باکتری سودوموناس مقاومترین باکتری ها بوده اند.

نمودار ۱ نتایج حاصل از خوانش میکروپلیت دایلوشن عصاره آبی، با استفاده از دستگاه الایزا ریدر را نشان می دهد. همانطور که در این نمودار نشان داده شده است کلبسیلا و استافیلوکوکوس از غلظت ۰/۶۲۵ mg/ml ، اشرشیاکلی از غلظت ۰/۱۲۵ mg/ml به بعد رشد باکتری 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 باکتری برای اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس از غلظت ۰.۰۲۵ mg/ml و برای باکتری کلبسیلا از غلظت ۰.۰۱۲۵ mg/ml رشد باکتری شروع به افزایش کرده است که نشان دهنده مقدار MIC برای این باکتری ها است.

علاوه بر این، MIC به‌دست‌آمده برای باکتری مورگانلا ۰/۰۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است. غلظت MICبرای باکتری شیگلا با استفاده از میکروامولسیون عصاره، ۰/۰۰۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است. غلظت MICبرای باکتری سالمونلا با استفاده از عصاره‌ی خالص گیاه هوفاریقون، ۰/۰۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. مقدار MICبرای پروتئوس میرابیلیس و نیز اشرشیاکلی با استفاده از عصاره‌ی آبی گیاه، ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. با استفاده از میکروامولسیون عصاره‌ی گیاهی مقدار MICاین باکتری غلظت ۰/۰۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است. همین مقادیر برای کلبسیلا ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای مورگانلا و ۰/۰۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

بحث

در این تحقیق اثبات شد که ساختار میکروامولسیونی 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 دارویی 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 ضدِمیکروبی آن هدف این تحقیق است. در مطالعات انجام‌شده در داخل و خارج کشور آثار ضدِمیکروبی و بعضاً ضدِقارچی یک‌سری از گیاهان دارویی مثبت ارزیابی شده است.

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

به‌عنوان‌مثال نسیم کاشف و همکاران اثبات کردند که این عصاره می‌تواند به‌عنوان یک حساس‌گر نوری جدید و مؤثر برای فتودینامیک‌تراپی ضدِمیکروبی 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 فرّارند که کاربرد وسیعی در صنایع دارویی و بهداشتی یافته‌اند؛ ازجمله استفاده از اجزای اسانس‌ها در کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا. به‌عنوان‌مثال تأثیر آلفا و بتا – پینن در کنترل باکتری‌های گرم مثبتِ عامل عفونت آندوکاردیت به اثبات رسیده است. اهمّیت این مونوترپن‌های مهم در درمان و پیشگیری از بیماری‌هایی همچون بیماری عفونت آندوکاردیت به اثبات رسیده است؛ لذا می‌توان این گونه‌ی ارزشمند دارویی را به‌عنوان یک گزینه در برابر بیماری‌های عفونی در نظر گرفت (۲۰).

محمدرضا فرهپور اثر ترکیب عصاره‌ی هیدرواتانولی 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 پمادرمانی حاوی ترکیب عصاره‌ی هیدرواتانولی 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 ضدِباکتریایی عصاره‌ی چندگونه گیاه دارویی ازجمله هوفاریقون بر روی تعدادی باکتری سالمونلای جداشده از پوسته‌ی تخم‌مرغ و ۲ نمونه‌ی استاندارد سالمونلا تایفی‌موریوم (Salmonella Typhimurium) و سالمونلا اینترتیدیس (Salmonella Entertidis) 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 میکروامولسیون 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 میکروامولسیون 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 موردِبررسی به‌غیراز باکتری سودوموناس حسّاسیت نسبی به عصاره‌ی گیاهی و

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

نتایج به‌دست‌آمده از روش میکروپلیت دایلوشن با دقت بیشتری میزان حساسیت باکتری‌ها را موردِبررسی 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 میکروامولسیون نشان می‌دهد؛ اثبات شد که میکروامولسیون در غلظتی حدود یک‌هشتادم عصاره، اثری مشابه آن را داشت.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره‌ی آبی گیاه هوفاریقون اثر ضدِمیکروبی بسیار خوبی علیه باکتری‌های موردِبررسی داشته به‌خوبی توانایی کنترل آن‌ها را دارد. میکروامولسیون تهیه‌شده محتوی مقادیر بسیار کم عصاره، از قدرت ضدِمیکروبی مشابه عصاره‌ی غلیظ برخوردار بود. پیشنهاد می‌شود از این ساختار در مقیاس نانو برای بررسی‌های کلینیکی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

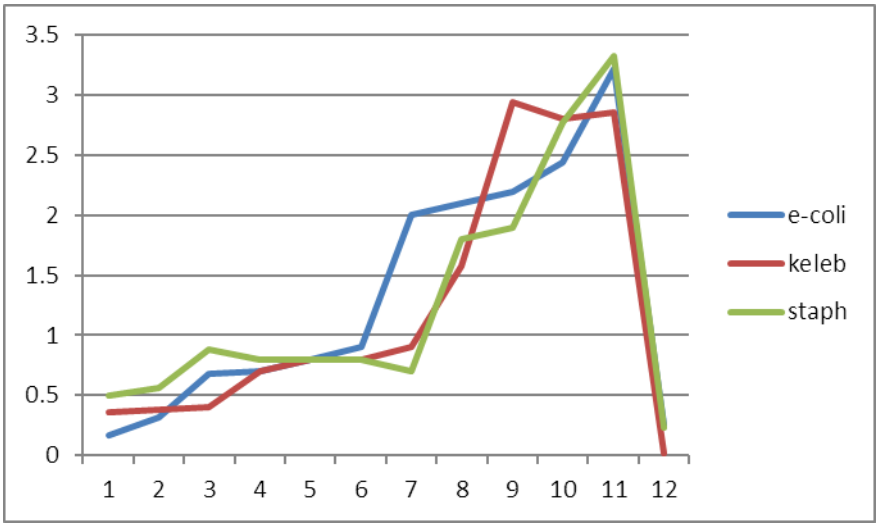
این تحقیق در دانشگاه پیام نور تصویب شد و در تمام مراحل اجرای آن، اصول و قواعد اخلاق در پژوهش‌های علوم پزشکی رعایت شد. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از کلیه‌ی همکاران کمال تشکر و قدردانی را داشته باشند.

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

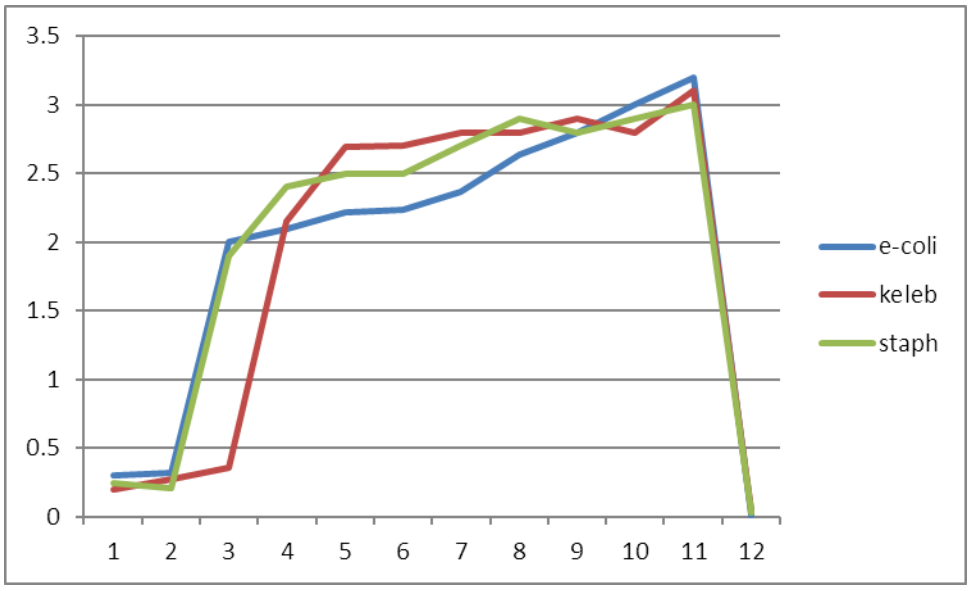
غلظت عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) / باکتری	۰/۰۱۵۶	۰/۰۳۱۲	۰/۰۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸
کلبسیلاپنومونیه	۹	۱۴	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲۵	۲۶	۲۸	۳۰
اشرشیاکلی	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۳
سودوموناس آئروژینوزا	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
سالمونلاتیفی	۹	۱۲	۱۴	۱۸	۲۱	۲۴	۲۸	۲۹	۴۲	۴۲
مورگانلامورگانی	۰	۰	۰	۰	۰	۱۳	۱۸	۲۳	۲۳	۲۷
پروتئوس ولگاریس	۰	۰	۰	۰	۱۳	۱۷	۲۱	۲۲	۲۴	۲۹
سیتروباکتر	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰	۱۳	۱۵	۳۳
شیگلاسونی	۰	۰	۰	۱۰	۱۳	۱۷	۲۰	۲۴	۲۸	۳۴
سراشیا مارسسنس	۱۲	۱۵	۱۷	۲۱	۲۵	۲۶	۲۸	۳۱	۳۴	۳۵
سالمونلاپاراتیفی	۰	۰	۰	۰	۹	۱۱	۱۵	۱۸	۲۰	۲۴

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

غلظت عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) / باکتری	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۷۸	۰/۰۰۱۶	۰/۰۰۳۱	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۱۲۵	۰/۰۲۵	۰/۰۵	۰/۱
کلبسیلاپنومونیه	۰	۰	۰	۱۲	۱۷	۲۰	۲۰	۲۳	۲۵	۲۵
اشرشیاکلی	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
پروتئوس‌ولگاریس	۰	۰	۹	۱۲	۱۴	۱۷	۲۱	۲۴	۲۲	۲۹
سیتروباکتر	۱۰	۱۲	۱۴	۱۷	۲۰	۲۵	۲۵	۲۵	۲۸	۳۰
شیگلاسونی	۰	۰	۰	۰	۰	۱۲	۱۵	۲۰	۲۱	۲۳
سراشیامارسسنس	۰	۰	۰	۰	۱۰	۱۲	۱۵	۱۸	۲۰	۲۳
سالمونلاپاراتیفی	۰	۰	۰	۱۱	۱۴	۱۸	۲۱	۲۵	۲۸	۳۰



نمودار شماره‌ی (۱) نتایج حاصل از انجام روش میکروپلیت دایلوشن بر روی عصاره‌ی آبی



نمودار شماره‌ی (۲) نتایج حاصل از میکروپلیت دایلوشن با استفاده از میکروامولسیون عصاره‌ی آبی

References:

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Curtis J, Lersten N. Internal secretory structures in Hypericum (Clusiaceae): H. perforatum L. and H. balearicum L. New Phytologist. 1990;114(4):571-80.
8. Campbell M. Germination, emergence and seedling growth of Hypericum perforatum L. Weed Research. 1985;25(4):259-66.
9. 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.
10. 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]

Original Article

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

Sadrnia M[1], Arjomandzadegan M[*2], Habibi Gh[3]

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 perfuratum* 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