مجله علوم پزشکی زانکو/ دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ پاییز ۱۳۹۷/ ۶۹-۶۱

مقاله پژوهشی
(Originalpaper)

اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی گل همیشه‌بهار بر علیه سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فکالیس، اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا در شرایط آزمایشگاهی

نازیلا ایمنی[1]، مهدی قیامی راد[2*]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرند، مرند ، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، اهر، ایران

آدرس مکاتبه: m_ghiyamirad@yahoo.com

ORCID : 00000-0002-8274-4091

چکیده

زمینه و هدف: امروزه، گسترش روزافزون مقاومت‌های دارویی در میان باکتری‌ها سبب شده است از روش‌های دیگر از جمله استفاده از داروهای گیاهی برای کنترل عفونت‌های انسانی در سراسر جهان استفاده گردد. این مطالعه به منظور تعیین اثرات ضدباکتریایی عصاره‌ی اتانولی گل‌های گیاه همیشه‌بهار (*Calendual officinalis L.*) علیه برخی میکروارگانیسم‌های پاتوژن انجام شد.

مواد و روش کار: گیاه مورد آزمایش که از شهرستان مرند در استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری شده بود، توسط کارشناسان مرکز تحقیقات این استان به عنوان گیاه همیشه‌بهار مورد تائید قرار گرفت. عصاره اتانولی گل‌ها در غلظت‌های مختلف (۲۵mg/ml، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶، ۰/۷۵، ۰/۳۹ و ۰/۱۹)، به روش ماسراسیون تهیه گردید. سپس فعالیت ضدباکتریایی عصاره با روش انتشار در چاهک (Agar well diffusion) و روش ریز رقت (Micro Dilution) بر روی سویه استاندارد باکتری‌های مذکور انجام شد. تجزیه و تحلیل اطلاعات حاصل با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) در سطح $P < ۰/۰۰۱$ انجام گرفت.

یافته‌ها: بیشترین حساسیت با میانگین قطر هاله عدم رشد (۱۳±۰/۴۵ mm) ناشی از غلظت ۵۰mg/ml عصاره اتانولی گل‌های گیاه *همیشه‌بهار* مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* ارزیابی شد. حداقل غلظت مهارکنندگی، برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* ۰/۷۵mg/ml بدست آمد. همچنین حداقل غلظت کشندگی برابر با ۰/۷۵mg/ml در مقابل باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: عصاره اتانولی گل‌های *گیاه همیشه‌بهار* در شرایط آزمایشگاهی علیه هر ۴ سویه مورد آزمایش، اثر بازدارندگی قابل ملاحظه‌ای داشت. بنابراین این عصاره می‌تواند گزینه مناسبی برای مطالعات آینده در شرایط In Vivo جهت تهیه داروهای ضدباکتریایی باشد.

واژه‌های کلیدی: اثر ضدباکتریایی، گیاه همیشه‌بهار، عصاره اتانولی

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-08-21]

مقدمه

مقاومت روزافزون بسیاری از باکتری‌ها به آنتی-بیوتیک‌ها و عوارض ناشی از مصرف داروهای ضدمیکروبی، تمایل به استفاده از مواد مؤثر گیاهی و یا ترکیبات طبیعی با اثر آنتی‌بیوتیکی را افزایش داده و کاربرد گیاهان دارویی به‌عنوان جایگزین طبیعی برای داروهای سنتتیک شیمیایی، در درمان ضدمیکروبی پیشنهاد شده است (۱). داروهای گیاهی دارای اثرات مفیدی بوده و به‌دلیل همراه بودن مواد موثر موجود در آنها با مواد دیگر از یک تعادل بیولوژیک برخوردار است. این مواد مؤثر شامل ترکیبات فنلی، فلاوونول، فلاوونوئیدها، گلیکوزیدها، آلکالوئیدها و پلی استیلن می‌باشند که در بدن انباشته نشده و در مقایسه با آنتی-بیوتیک‌ها، اثرات جانبی کمتری دارند (۲). این ترکیبات، اخیراً به علت اثر ممانعت کنندگی و کشندگی میکروارگانیسم‌های پاتوژن مورد توجه قرار گرفته‌اند (۳).

گیاه *همیشه‌بهار* با نام علمی . *Calendula officinalis L*، از خانواده کاسنیان (Asteraceae) و دارای نام‌های رایج Marigold pot و Marigold است. این گیاه، علفی، پایا، دارای گل‌های زردرنگ و ساقه-ای به طول ۲۰ تا ۵۰ سانتی‌متر بوده و بومی منطقه مدیترانه می‌باشد. گیاه *همیشه‌بهار* در ایران از جمله در بلندی‌های بالای ۲۵۰۰ متر می‌روید و به راحتی در شرایط مساعد رشد می‌کند (۴). این گیاه در طب قدیم با اثرات ضدمیکروبی، ضد التهابی، ضد ویروسی و آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌شده است (۵) و تاریخچه مصرف آن در پزشکی به قرن دوازدهم بر می‌گردد (۶). گیاه *همیشه‌بهار* به علت دارا بودن ترکیبات فیتوشیمیایی از قبیل فلاوونوئیدها، ساپونین‌ها، کاروتنوئیدها، تریترپنوئیدها و تانن‌ها دارای فعالیت ضدباکتریایی هستند (۷). در گذشته نه‌چندان دور هم به عنوان یک دارو برای درمان التهاب و زخم‌های پوستی استفاده می‌شده است. بخصوص عصاره هیدروالکلی آن (۸) در درمان ورم ملتحمه، التهاب گلو، استوماتیت، التهاب دهان و لثه، و دیگر موارد التهابی پوست و غشاهای مخاطی استفاده می‌شود (۹) همچنین در درمان تب و سرطان موثر است (۱۰). در هندوستان نیز ترکیبات گیاهی حاوی گل *همیشه‌بهار* به طور موضعی در درمان هموروئید به کار می‌رفته است (۱۱). امروزه، گیاه *همیشه‌بهار* برای استفاده از مواد غذایی در ایالات متحده امریکا تأیید شده و به نظر می-رسد در مواد غذایی و لیست دارو از GRAS به عنوان ترکیب بی‌ضرر به رسمیت شناخته شده است (۸). همچنین گزارشاتی نشان می‌دهد که عصاره این گیاه به علت داشتن برخی مواد از جمله لوپئول (lupeol)، کورستین (quercetin)، پروتکاتکوئیک اسید (protocatechuic acid)، لیکوپن (lycopene) و فلاووکساتین (Flavoxanthin) و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش رادیکال‌های اکسیژن دارای خاصیت ضدمیکروبی می‌باشد (۱۳،۱۲).

هدف از این تحقیق که یک مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی است، تعیین خواص ضدمیکروبی عصاره اتانولی گل‌های گیاه *همیشه‌بهار* بر روی سویه‌های استاندارد باکتری‌های پاتوژن *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)، *انتروکوکوس فکالیس* (*Entrococcus faecalis*)، *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*) و *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) می‌باشد.

مواد و روش کار

گیاه *همیشه‌بهار*که از مناطق طبیعی و از یک محدوده‌ی جغرافیایی در تیر ماه از شهرستان مرند در استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری شده بودند،

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-08-21]

خریداری و توسط کارشناسان علوم گیاهی مرکز تحقیقات استان آذربایجان شرقی به عنوان گیاه *همیشه-بهار* مورد تائید قرار گرفت.

تهیه عصاره گیاه *همیشه‌بهار:* برای تهیه عصاره از روش ماسراسیون استفاده گردید. به این صورت که گل‌های خرد شده، در اتانول خالص خیسانده و بمدت ۳ روز در تاریکی قرار داده شد (نسبت میزان حلال مورد استفاده به گیاه، ۲۰ به ۱ تعیین و استفاده گردید). پس از گذشت این مدت زمان، محلول حاصل با کاغذ صافی صاف گردید. سپس عصاره‌ی به دست آمده با استفاده از دستگاه روتاری (تقطیر در خلأ) در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد (۱۴) استوک بدست آمده در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت خشک و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری گردید.

توسط حلال ۵ درصد دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) به عنوان رقیق‌کننده، غلظت‌های مختلف از عصاره تهیه شد. به طوری که ابتدا با حل کردن یک گرم از استوک بدست آمده، در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مولرهینتون براث غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی-لیتر از عصاره تهیه گردید. سپس به روش تهیه سری رقت غلظت‌های ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶، ۰/۷۵، ۰/۳۹ و ۰/۱۹ میلی‌گرم در میلی لیتر آماده شد و در آزمون انتشار از چاهک و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) و حداقل غلظت‌کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه باکتری: سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC ۱۱۱۲)، *انتروکوکوس فکالیس* (ATCC ۲۹۲۱۲)، *اشرشیا کلی* (PTCC ۱۲۷۰) و *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC ۲۷۸۵۳) به صورت لیوفیلیزه از کلکسیون میکروبی موسسه تحقیقات صنعتی ایران تهیه شدند. پس از فعال‌سازی باکتری‌ها، از هر نمونه سوسپانسیونی معادل با کدروت استاندارد نیم مک‌فارلند ($۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ cfu/ml) تهیه گردید.

- آزمون ضدمیکروبی عصاره

روش انتشار از چاهک در آگار: از سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل استاندارد نیم مک‌فارلند روی محیط کشت مولرهینتون آگار کشت داده شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه چاهک‌هایی در محیط کشت به قطر ۶ میلی‌متر به فاصله ۲ سانتی‌متر از هم ایجاد شدند. هر یک از چاهک‌ها با ۳۰ میکرولیتر از رقت‌های ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شده‌ی عصاره پر شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد اطراف هر چاهک بر حسب میلی‌متر (mm) اندازه‌گیری شد. آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (۳۰µg) و تتراسایکلین (۳۰µg) به عنوان کنترل مثبت (ایجاد هاله عدم رشد) و DMSO به عنوان کنترل منفی (بدون ایجاد هاله عدم رشد) مورد استفاده قرار گرفتند.

روش میکرودایلوشن: در این روش از پلیت میکروتیتراسیون و احیاء معرف رزازورین (Resazurin) جهت تعیین MIC و MBC، استفاده گردید. ابتدا در گوده‌های شماره ۱ تا ۹ میکروپلیت ۹۶ خانه‌ایی ته‌گرد استریل، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولرهینتون براث ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره، به ترتیب از بالاترین غلظت در گوده‌های ۱ تا ۹ میکروپلیت اضافه گردید و در مرحله بعد از کشت ۲۴ ساعته سویه‌های مورد آزمایش با کدورت نیم مک‌فارلند، رقت ۱ به ۱۰۰ ($۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ cfu/ml) تهیه و در تمامی گوده‌ها به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. گوده سری ۱۰، حاوی محیط کشت و سوسپانسیون باکتریایی (رشد باکتری)،

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-08-21]

گوده سری ۱۱ حاوی محیط کشت استریل مولرهینتون براث (عدم رشد) و گوده سری ۱۲ حاوی محیط کشت و عصاره (عدم رشد) به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. در نهایت از معرف رزازورین به مقدار ۳۰ میکرولیتر به تمامی گودهها اضافه گردید. پس از طی زمان انکوباسیون گودهها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده و تغییر رنگ معرف رزازورین از رنگ آبی متمایل به بنفش به قرمز مورد بررسی قرار گرفتند. پایین‌ترین غلظتی که در آن کدورتی مشاهده نگردید و کاملاً شفاف بود، به عنوان MIC در نظر گرفته شد (۱۵). سپس در کنار شعله جهت تعیین MBC از محتوی لولهها که در آنها عدم رشد مشاهده شده، برداشته و روی محیط کشت مولرهینتون آگار کشت داده شد و مجدداً در داخل انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. از آن جایی که حتی داروهای باکتریسیدال نیز همیشه به طور کامل قادر به از بین بردن باکتری‌ها نمی‌باشند، لذا میزان حداقل غلظتی که مانع از رشد باکتری‌ها شده (۹۹/۹ درصد) به عنوان MBC مشخص گردید (۱۶). جهت کاهش خطای آزمایش، هر یک از آزمایشات فوق سه بار تکرار شدند. تجزیه و تحلیل اطلاعات حاصل با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و با حداقل اختلاف معنی‌دار P <۰/۰۰۱ با استفاده از نرم افزار آماری SPSS انجام گرفت.

یافته‌ها

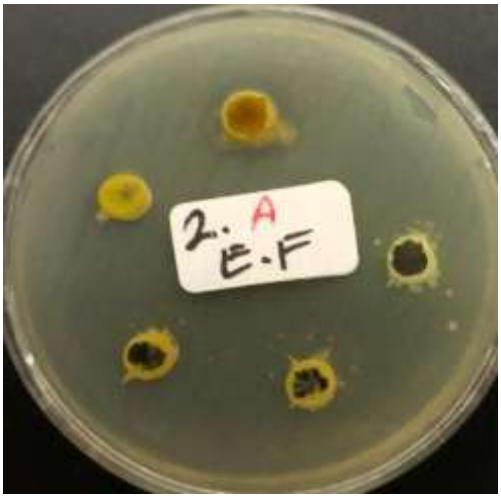
نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد سویه‌های استاندارد مورد آزمایش در غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گل‌های *همیشه‌بهار* در جدول ۱ آمده است. این نتایج نشان داد که در بین سویه‌های مورد آزمایش از نظر حساسیت عصاره گل‌های گیاه *همیشه‌بهار* اختلاف معنی‌داری وجود دارد (p<۰/۰۰۱). به عبارت دیگر بیشترین حساسیت نسبت به عصاره اتانولی گل‌های گیاه *همیشه‌بهار* در *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین حساسیت در مورد *سودوموناس آئروژینورا* وجود داشته است (شکل ۱).

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد (برحسب mm) ٤ سویه باکتری از عصاره اتانولی در غلظت‌های مختلف به روش انتشاراز چاهک

باکتری	غلظت عصاره (mg/ml)						کنترل		
	۵۰	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۳/۱۲	کلرامفنیکل (مثبت)	تتراسیکلین (مثبت)	DMSO (منفی)
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۳ ±۰/۴۵	-	-	-	-	۲۳	۱۵	-
انتروکوکوس فکالیس	۱۲/۲ ±۰/۳۴۶	-	-	-	-	۲۳	۲۶	-
اشریشیا کلی	۱۱/۱ ±۰/۶۱۱	-	-	-	-	۲۲	۳۲	-
سودوموناس آئروژینوزا	۱۰/۱۶±۰/۲۸۸	-	-	-	-	۲۰	۲۶	-

- : بی اثر

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-08-21]



شکل ۱: مناطق مهار رشد ایجاد شده توسط عصاره اتانولی گل‌های گیاه همیشه‌*بهار* بر علیه *انتروکوکوس فکالیس*.

نتایج تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت‌کشندگی عصاره اتانولی گل‌های گیاه همیشه-*بهار* نیز نشان داد بیشترین تاثیر (MIC: ۰/۷۵ mg/ml) علیه دو سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* بوده و کمترین تاثیر بر سویه *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد. حداقل غلظت کشندگی برابر با ۰/۷۵ mg/ml در مورد سویه *استافیلوکوکوس* اورئوس مشاهده گردید (جدول ۲).

جدول ۲: مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی به روش میکرودایلوشن بر باکتری‌های مورد آزمایش بر حسب (mg/ml)

باکتری	غلظت عصاره (mg/ml)	
	MIC	MBC
استافیلوکوکوس اورئوس	۰/۷۵	۰/۷۵
انتروکوکوس فکالیس	۰/۷۵	۲۵
اشریشیا کلی	۳/۱۲	۱۲/۵
سودوموناس آئروژینوزا	۶/۲۵	۲۵

بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر تحقیقات فراوانی در زمینه اثرات ضدمیکروبی گیاهان مختلف صورت گرفته است، در این تحقیقات نشان داده شد این گیاهان تاثیراتی همانند داروهای شیمیایی دارند (۱۷). گیاه همیشه*بهار*، خواص دارویی فراوانی شامل آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی دارد (۱۸).

نتایج مطالعه حاضر نیز نشان می‌دهد که در بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی با روش انتشار از چاهک در آگار در بالاترین غلظت (۵۰mg/ml)، علیه سویه‌های مورد آزمایش اثر ضدباکتریایی را دارا می-باشد. ولی در غلظت‌های پایین هیچ تاثیری بر رشد سویه‌ها ندارد. نتایج MIC نیز نشان داد که عصاره اتانولی این گیاه حتی در غلظت‌های پایین اثر ممانعت از رشد خوبی را دارا می‌باشد. بطوریکه حداقل غلظت

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-08-21]

مهارکنندگی برابر با mg/ml ۰/۷۵ بوده که در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* مشاهده شد.

در تحقیق‌های دیگر، از جمله مطالعه Altaai در سال ۲۰۱۴، فعالیت ضدباکتریایی عصاره گل *همیشه-بهار* بر روی باکتری‌های جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری انسان شامل (*اشرشیا کلی*، *کلبسیلا*، *پروتئوس* و *سودوموناس*) بررسی شد، نتایج نشان داد که عصاره الکلی گل *همیشه‌بهار* دارای اثر ضدمیکروبی می‌باشد (۱۹). در تحقیق دیگر اثرات ضدمیکروبی گل *همیشه‌بهار* بر روی میکروارگانیسم-های بیماری‌زای انسانی از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوئوس*، *انتروکوکوس فکالیس*، *کلبسیلا پنومونیه* و *اشریشیا کلی* به اثبات رسیده است (۲۰). همچنین در بررسی Cetin و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان داده شد، عصاره اتانولی گل‌های این گیاه بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* خاصیت مهارکنندگی دارد (۲۱). در بررسی دیگری، Efstratiou و همکاران اثر عصاره اتانولی را بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* مشاهده نمودند (۲۲). از این نظر که در مطالعه ما نیز عصاره گل‌های *همیشه‌بهار* دارای خواص ضدمیکروبی بود با نتایج تحقیقات انجام شده همخوانی دارد. ولی از نظر میزان MIC گزارش شده توسط این محققین با هم و با تحقیق حاضر تفاوت مشاهده می‌شود. یکی از دلایل اصلی این است که درصد ترکیبات مختلف و از جمله مواد با خاصیت ضدمیکروبی موجود در عصاره‌گیاهان بسته به ناحیه جغرافیایی، واریته گیاه، سن‌گیاه و روش عصاره‌گیری تفاوت‌های چشمگیری وجود دارد. همچنین تفاوت های بوم شناختی (طول و عرض جغرافیایی، ارتفاع، دما، رطوبت، اقلیم، خاک و غیره)، شرایط متفاوت اقلیمی و ادافیکی مسیرهای متابولیکی و بیوسنتز مواد موثر در این گیاه را تحت تاثیر قرار داده و در نتیجه مواد با خاصیت ضدمیکروبی متفاوت تحت شرایط محیطی متفاوت سنتز می شود که می تواند دلیلی بر تفاوت در مقدار متغیر MIC باشد. از طرفی در تحقیق حاضر از الکل اتانول برای تهیه عصاره استفاده گردید. که ممکن است نوع الکل نیز بر روی خواص ضدمیکروبی موثر باشد زیرا حلالیت مواد مؤثر گیاه در حلال‌های مختلف متفاوت می‌باشد.

در مطالعه حاضر، در میان چهار سویه مورد آزمایش، سویه‌های گرم‌منفی نسبت به سویه‌های گرم-مثبت مقاومت بیشتری را نشان دادند که علت احتمالی آن حضور لیپوساکاریدهای دیواره سلولی باکتری‌های گرم‌منفی می‌باشد. لیپوساکاریدهای دیواره سلولی احتمالا مانع از رسیدن ترکیبات فعال عصاره به غشاء سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم‌منفی می‌شوند (۲۳). اکثر عصاره‌های گیاهی بر باکتری‌های گرم‌مثبت اثر بازدارندگی و بر باکتری‌های گرم‌منفی تاثیر کمتری دارند. مطالعه اسلامی و همکاران نیز نشان داد اثر آنتی-باکتریال عصاره *همیشه‌بهار* بر باکتری‌های گرم‌مثبت بیش از باکتری‌های گرم‌منفی است (۲۴). به طور کلی فرآورده‌های گیاهی منجر به گسیختگی غشاء سیتوپلاسمی (۲۵)، غیرفعال شدن یا ممانعت از فعالیت آنزیم‌های درون سلولی و برون سلولی (۲۶) و متلاشی شدن دیواره سلولی می‌شوند (۲۷). که این نتایج توسط محققان از جمله مطالعه Mothana و همکاران در سال ۲۰۰۹ به اثبات رسیده است (۲۸). نتایج مطالعه حاضر نشان داد، در روش Agar Well Diffusion در همه غلظت‌های عصاره، دارای اثر ضدمیکروبی نمی‌باشد. که این ممکن است به دلیل بیشتر بودن عوامل تاثیرگذار بر نتایج روش‌های آگار دیفیوژن از جمله میزان نفوذ ماده ضدمیکروبی در آگار باشد که به ماهیت آن ماده بستگی دارد (۲۹). همچنین عصاره‌هایی

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-08-21]

که با روش‌ها و حلال‌های متفاوتی از یک گیاه گرفته شده، می‌تواند اثرات ضدباکتریایی متفاوتی بر روی یک باکتری خاص از خود نشان دهند.

نتایج بررسی‌ها در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که عصاره اتانولی گل‌های *همیشه‌بهار* فعالیت ضدباکتریایی مناسبی بر روی باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی دارد و در بین سویه‌های بررسی شده در این پژوهش بیشترین فعالیت ضدمیکروبی مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. بنابراین استفاده از گیاه *همیشه‌بهار* به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی در شرایط آزمایشگاهی مستلزم تحقیقات بیشتری در زمینه مکانیسم عمل مواد موثر این گیاه بر روی میکروارگانیسم‌ها و مطالعات فارماکولوژیکی در شرایط In Vitro و نیز پژوهش‌هایی در شرایط In Vivo می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از کلیه کسانی که در به سرانجام رساندن این تحقیق یاری نموده‌اند صمیمانه و صادقانه سپاسگزاری می‌نماییم.

References

1- Adwan G, Abu-Shanab B, Adwan K. Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa strains. Asian Pac J Trop Dis. 2010; 3(4): 266-69.
2- Chandurkar P, Murab T, Ahakey N, Tripathi N, Choudhary A. Antimicrobial activity of aqueous, acetone and methanol extracts of Calendula officinalis L. (Marigold) flower. Int J Pure App Biosci. 2015; 3(2): 386-8.
3- Hosein Farzaei M, Abbasabadi Z, Reza Shams-Ardekani M, Abdollahi M, Rahimi R. A comprehensive review of plants andtheir active constituents with wound healing activity in traditional Iranian medicine. Wounds. 2014; 26(7): 197-206.
4- Ashwlayan DV, Kumar A, Verma M, Garg VP, Gupta SK. Therapeutic Potential of Calendula officinalis. Pharmacy & Pharmacology Int J. 2018; 6(2): 149-155.
5- Asadi-Samani M, Kafash-Farkhad N, Azimi N, Fasihi A, Alinia-Ahandani E, Rafieian-Kopaei M. Medicinal plants with hepatoprotective activity in Iranian folk medicine. Asian Pac J Trop Biomed. 2015; 5(2): 146-157.
6- J Kathi MD, MPH Kemper. Calendula (Calendula officinalis). 1999; 1-13.
7- Pazhohideh Z, Mohammadi S, Bahrami N, Mojab F, Abedi P, Maraghi E. The effect of Calendula officinalis versus metronidazole on bacterial vaginosis in women: A double-blind randomized controlled trial. J Adv Pharm Technol Res. 2018; 9(1): 15–19.
8- Dorman HJD, and SG Deans. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol.. 2000; 88(2): 308-16.
9- Mozherenkov VP, Shubina LF. Treatment of chronic conjunctivitis with Calendula. Med Sestra. 1976; 35: 33-34.
10- Krag K. Plants used as contraceptives by the North American Indians: an ethnobotanical study. Botanical Museum Cambridge MA; Harvard University. 1976:1177.
11- Vijayasarathy V, sharma L, Prakash A. Indigenous drug treatment for hemorrhoids. Probe .1981; 20: 285-287.
12- Nelofer J, Khurshid IA, Riffat J. Calendula officinalis - An Important Medicinal Plant with Potential Biological Properties. Proc Indian Natn Sci Acad. 2017; 83 (4): 769-87.
13- Jimenez Medina E, Garcia-Lora A, Paco L, Algarra I, Collado A, Garrido F. A new extract of the plant Calendula officinalis produces a dual in vitro effect: cytotoxic antitumor activity and lymphocyte activation. BMC Cancer. 2006; 6: 119.

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-08-21]

14- Manna A, Abalaka ME. Preliminary screening of the various extracts of Physalis angulata (L.) for antimicrobial activities. J Spectrum .2000; 7(2):119-25.
15- Sindambiwe JB, Calomme M, Cos P, Totte J, Pieters L , AVlietinck , et al. editors .Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. J Ethnopharmacol. 1999; 65(1): 71-7.
16- Skocibusic M, Bezic N, Dunkic V, Radonic A. Antibacterial activity of Achillea clavennae essential oil against respiratory tract pathogens. Fitoterapia. 2004; 75(7): 733-6.
17- Sadeghi G. Determination of Antibacterial Effect of Glycyrrhica Glabra on E. Coli, Salmonella Typhi, Shigella Flexneri and Shigella Sonnei. Thesis No (1249): Islamic Azad Univer Pharmacol Scien. 2002-2003. 10-99. [Persian] .
18- Preethi KC, Kuttan G, Kuttan R. Antioxidant potential of Calendula officinalis flowers in vitro and in vivo. Pharmaceutical Biol. 2006; 44(9): 691-697.
19- . Noor A. , Altaai A .The inhibitory effect of Calendula Officinalis and Salvia Officinalis on growth of some bacterial isolates from urinary tract infections.IJAR. 2014; 2(4): 316-22.
20- Goyal M, Mathur R. Antimicrobial effects of Calendula officinalis against human pathogenic microorganisms. J Herbal Med Tox .2011; 5(1):97-101.
21- Cetin B, Kalyoncu F, Kurtulus B. Antibacterial activities of Calendula officinalis callus extract. Int. J. Sec. Metabolite. 2017; 4(3): 257-63.
22- Efstratiou E, , Hussain AI, Nigam PS, Moore JE, Ayub MA, Rao JR.. Antimicrobial activity of Calendula officinalis petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. Complementary Therapies in Clinical Practice. 2012; 18(3): 173-6.
23- Mckeegan KS, Borges Walmsley MI, Walmsley AR. Microbial and Viral Drug Resistance Mechanisms. Tends Microbiol. 2002; 10(10): 8-14.
24- Eslami G, Taheri S, Fallah F, Godarzi H, Ayatollahi SA, Zare Mahzabieh M. Comparison of the effect of Calendula officinalis with cephalosporins on bacteria isolated from Patients with cellulite. Journal of Research in School of Medicine. 2010; 34(4): 214-8. [Persian].
25- Jurven BJ, Kanner J, Sched F, Weisslowics H. Factors that Interact with the Antibacterial of Thyme and Essential Oil and Its Active Constituents. J Appl Microbiol. 1994; 76(6): 626-31.
26- Brull S, Coote P. Preservative Agents in Foods Mode of Action and Microbial Resistance Mechanisms. Inter J Food Microbiol. 1999; 50(2): 1-17.
27- Kraft K, Hobbs C. Pocket Guide to Herbal Medicine. New York: Thieme Stuttgart, 2004; 61-62.
28- Mothana R, Lindequist U, Geraenert R, Bednarski Pj. Studies of the in Vitro Anticancer, Antimicrobial and Antioxidant Potentials of Selected Yemeni Medicinial Plants from the Island Soqotra. BMC Complement Altern Med. 2009; 9(7):1-11.
29- Ncube NS, Afolayan AJ, Okoh AI. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. African J Biotechnol. 2008; 7(12): 1797-806.

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-08-21]

Original paper

Antimicrobial Effect of Ethanolic Extract of *Calendual officinalis L.* against of *Staphylococcus Aureus*, *Enterococcus Faecalis*, *Escherichia Coli* and *Pseudomonas Aeruginosa* Sstrains In vitro

Nazila Imeni[1], Mehdi Ghiami Rad[2*]
1. Young Researchers and Elite Clube, Marand Branch, Islamic Azad University, Marand, Iran
2. Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

Abstract

Background and Aim: Nowadays, the increasing spread of drug resistance among bacteria has led to the use of other methods including herbal medicines to control human infections worldwide. This study was conducted to determine the antibacterial effects of ethanolic extract of flowering plants Calendual officinalis L. against some pathogen microorganisms.

Material and Method: The studied plant was collected from Marand city in East Azerbaijan, Iran and were confirmed as Calendual officinalis L. by botanists of East research center. Ethanolic extract of flowers was prepared in different concentrations (0/19, 0/39, 0/75, 1/56, 3/12, 6/25, 12/5 and 25 mg/ml) by meceration. Antibacterial activity of the extract was conducted with agar well diffusion and micro dilution method on the abovementioned standard strains. Data analysis was performed by one-way ANOVA analysis at $P<0.001$.

Results: The maximum sensitivity with average diameter of the inhibition zone (13±0/45 mm) was assessed risen from the concentration of 50 mg/ml ethanolic extract of the plant Calendual officinalis L. flowers of Staphylococcus aureus. Also, the minimum inhibitory concentration for Staphylococcus aureus and Enterococcus faecalis was 0.75 mg/ml. Also, the minimum lethal concentration was 0.75 mg/ml against Staphylococcus aureus bacteria.

Conclusion: The ethanolic extract of flowering plants Calendual officinalis L. in springtime under laboratory conditions has inhibitory effect against all four strains tested. Therefore, this extract can be a good alternative for future studies in in vivo to provide antibacterial drugs.

Keywords: Antibacterial effect, Calendual officinalis L., Ethanolic extract

[Downloaded from zanko.muk.ac.ir on 2025-08-21]