

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

نازیلا ایمنی^۱، مهدی قیامی راد^{۲*}

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 (*Calendula 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 تأیید 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 $P < 0/001$ انجام گرفت.

یافته‌ها: بیشترین حساسیت با میانگین قطر هاله عدم رشد ($13 \pm 0/45$ 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

مقدمه

مقاومت روزافزون بسیاری از باکتری‌ها به آنتی-بیوتیک‌ها و عوارض ناشی از مصرف داروهای ضد میکروبی، 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 ضد میکروبی پیشنهاد شده است (۱). داروهای گیاهی دارای اثرات مفیدی بوده و به‌دلیل همراه بودن مواد مؤثر موجود در آنها با مواد دیگر از یک تعادل بیولوژیک برخوردار است. این مواد مؤثر شامل ترکیبات فنلی، فلاونول، فلاونوئیدها، 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 ممانعت‌کنندگی 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 و Marigold pot 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 ضد میکروبی، 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 فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، کاروتنوئیدها، تریترپنوئیدها و تانن‌ها دارای فعالیت ضدباکتریایی هستند (۷). در گذشته نه‌چندان دور هم

به‌عنوان یک دارو برای درمان التهاب و زخم‌های پوستی استفاده می‌شده است. بخصوص عصاره هیدروآلکلی 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 مؤثر 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 می‌رسد در مواد غذایی و لیست دارو از GRAS به‌عنوان 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)، پروتکتاکوئیک اسید (protocatechuic acid)، لیکوپن (lycopene) و فلاوکساتین (Flavoxanthin) و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش رادیکال‌های اکسیژن‌دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشد (۱۲، ۱۳).

هدف از این تحقیق که یک مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی است، تعیین خواص ضد میکروبی عصاره اتانولی گل‌های گیاه همیشه‌بهار بر روی سویه‌های استاندارد باکتری‌های پاتوژن *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)، *انتروکوکوس فکالیس* (*Enterococcus faecalis*)، *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*) و *سودووناس 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،

لیوفیلیزه از کلکسیون میکروبی موسسه تحقیقات صنعتی ایران تهیه شدند. پس از فعال سازی باکتری ها، از هر نمونه سوسپانسیونی معادل با کدورت استاندارد نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^6$ cfu/ml) تهیه گردید.

- آزمون ضد میکروبی عصاره

روش انتشار از چاهک در آگار: از سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل استاندارد نیم مک فارلند روی محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه چاهک هایی در محیط کشت به قطر ۶ میلی متر به فاصله ۲ سانتی متر از هم ایجاد شدند. هر یک از چاهک ها با ۳۰ میکرو لیتر از رقت های ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شده ی عصاره پر شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، قطر هاله عدم رشد اطراف هر چاهک بر حسب میلی متر (mm) اندازه گیری شد. آنتی بیوتیک کلرامفنیکل ($30 \mu\text{g}$) و تتراسایکلین ($30 \mu\text{g}$) به عنوان کنترل مثبت (ایجاد هاله عدم رشد) و DMSO به عنوان کنترل منفی (بدون ایجاد هاله عدم رشد) مورد استفاده قرار گرفتند.

روش میکرو دایلوژن: در این روش از پلیت میکروتیتراسیون و احیاء معرف رزازورین (Resazurin) جهت تعیین MIC و MBC، استفاده گردید. ابتدا در گوده های شماره ۱ تا ۹ میکرو پلیت ۹۶ خانه ای ته گرد استریل، به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت مولر هیتون براث ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از رقت های مختلف عصاره، به ترتیب از بالاترین غلظت در گوده های ۱ تا ۹ میکرو پلیت اضافه گردید و در مرحله بعد از کشت ۲۴ ساعته سویه های مورد آزمایش با کدورت نیم مک فارلند، رقت ۱ به $10^6 \times 1/5$ cfu/ml) تهیه و در تمامی گوده ها به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر اضافه شد. گوده سری ۱۰، حاوی محیط کشت و سوسپانسیون باکتریایی (رشد باکتری)،

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

تهیه عصاره گیاه همیشه بهار: برای تهیه عصاره از روش ماسراسیون استفاده گردید. به این صورت که گل های 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 عصاره ی به دست آمده با استفاده از دستگاه روتاری (تقطیر در خلأ) در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد تغلیظ شد (۱۴) استوک بدست آمده در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت خشک و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی گراد در یخچال نگهداری گردید.

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

تهیه باکتری: سویه های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC ۱۱۱۲)، انتروکوکوس فکالیس (ATCC ۲۹۲۱۲)، اشرشیا کلی (ATCC ۱۲۷۰) و سودوموناس آئروژینوزا (ATCC ۲۷۸۵۳) به صورت

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 $P < 0/001$ با استفاده از نرم افزار آماری SPSS انجام گرفت.

یافته‌ها

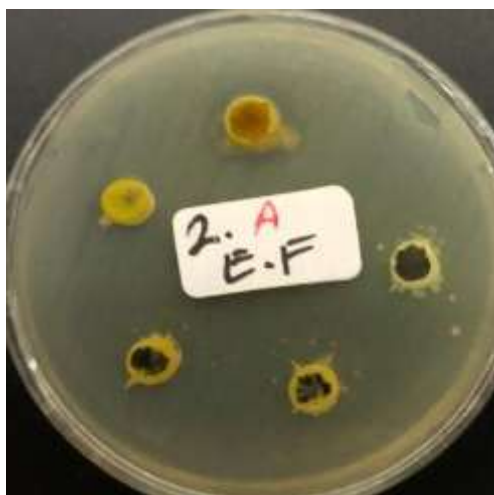
نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد سویه‌های استاندارد مورد آزمایش در غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گل‌های همیشه‌بهار در جدول ۱ آمده است. این نتایج نشان داد که در بین سویه‌های مورد آزمایش از نظر حساسیت عصاره گل‌های گیاه همیشه‌بهار اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p < 0/001$). به عبارت دیگر بیشترین حساسیت نسبت به عصاره اتانولی گل‌های گیاه همیشه‌بهار در استافیلوکوکوس اورئوس و کمترین حساسیت در مورد سودوموناس آئروژینوزا وجود داشته است (شکل ۱).

گوده سری ۱۱ حاوی محیط کشت استریل مولر هینتون 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 مولر هینتون 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

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد (برحسب mm) ۴ سویه باکتری از عصاره اتانولی در غلظت‌های مختلف به روش انتشار از چاهک

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

-: بی اثر



شکل ۱: مناطق مهار رشد ایجاد شده توسط عصاره اتانولی گل های گیاه همیشه بهار بر علیه اتروکوکوس فکالیس.

اتروکوکوس فکالیس بوده و کمترین تاثیر بر سویه سودوموناس آئروژینوزا می باشد. حداقل غلظت کشندگی برابر با ۰/۷۵ mg/ml در مورد سویه استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده گردید (جدول ۲).

نتایج تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی گل های گیاه همیشه بهار نیز نشان داد بیشترین تاثیر (MIC: ۰/۷۵ mg/ml) علیه دو سویه استافیلوکوکوس اورئوس و

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

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

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

بحث و نتیجه گیری

در سال های اخیر تحقیقات فراوانی در زمینه اثرات ضد میکروبی 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 آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضد ویروسی دارد (۱۸).

متابولیکی و بیوسنتز مواد موثر در این گیاه را تحت تاثیر قرار داده و در نتیجه مواد با خاصیت ضد میکروبی 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 ضد میکروبی موثر باشد زیرا حلالیت مواد مؤثر گیاه در حلال های مختلف متفاوت می باشد.

در مطالعه حاضر، در میان چهار سویه مورد آزمایش، سویه های گرم منفی نسبت به سویه های گرم مثبت مقاومت بیشتری را نشان دادند که علت احتمالی آن حضور لیپوساکاریدهای دیواره سلولی باکتری های گرم منفی می باشد. لیپوساکاریدهای دیواره سلولی احتمالا مانع از رسیدن ترکیبات فعال عصاره به غشاء سیتوپلاسمی باکتری های گرم منفی می شوند (۲۳). اکثر عصاره های گیاهی بر باکتری های گرم مثبت اثر بازدارندگی و بر باکتری های گرم منفی تاثیر کمتری دارند. مطالعه اسلامی و همکاران نیز نشان داد اثر آنتی-باکتریال عصاره همیشه بهار بر باکتری های گرم مثبت بیش از باکتری های گرم منفی است (۲۴). به طور کلی فرآورده های گیاهی منجر به گسیختگی غشاء سیتوپلاسمی (۲۵)، غیرفعال شدن یا ممانعت از فعالیت آنزیم های درون سلولی و برون سلولی (۲۶) و متلاشی شدن دیواره سلولی می شوند (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 غلظت های عصاره، دارای اثر ضد میکروبی نمی باشد. که این ممکن است به دلیل بیشتر بودن عوامل تاثیرگذار بر نتایج روش های آگار دیفیوژن از جمله میزان نفوذ ماده ضد میکروبی در آگار باشد که به ماهیت آن ماده بستگی دارد (۲۹). همچنین عصاره هایی

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

در تحقیق های دیگر، از جمله مطالعه Altaai در سال ۲۰۱۴، فعالیت ضدباکتریایی عصاره گل همیشه-بهار بر روی باکتری های جدا شده از عفونت های دستگاه ادراری انسان شامل (شرشیا کلی، کلبسیلا، پروتئوس و سودوموناس) بررسی شد، نتایج نشان داد که عصاره الکی گل همیشه بهار دارای اثر ضد میکروبی می باشد (۱۹). در تحقیق دیگر اثرات ضد میکروبی گل همیشه بهار بر روی میکروارگانیزم های بیماری زای انسانی از جمله استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوئوس، انتروکوکوس فکالیس، کلبسیلا پنومونیه و اشیریشیا کلی به اثبات رسیده است (۲۰). همچنین در بررسی Cetin و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان داده شد، عصاره اتانولی گل های 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 گل های همیشه بهار دارای خواص ضد میکروبی 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 می شود. یکی از دلایل اصلی این است که درصد ترکیبات مختلف و از جمله مواد با خاصیت ضد میکروبی موجود در عصاره گیاهان بسته به ناحیه جغرافیایی، وارته گیاه، سن گیاه و روش عصاره گیری تفاوت های چشمگیری وجود دارد. همچنین تفاوت های بوم شناختی (طول و عرض جغرافیایی، ارتفاع، دما، رطوبت، اقلیم، خاک و غیره)، شرایط متفاوت اقلیمی و اداکی مسیره های

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 می‌نمایم.

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 ضد میکروبی مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. بنابراین استفاده از گیاه همیشه‌بهار به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی در شرایط آزمایشگاهی مستلزم تحقیقات بیشتری در زمینه

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 and their 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- Vijayasathy 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.

- 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 *Glycyrrhiza 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.

Original paper

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

Nazila Imeni¹, 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 *Calendula 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 *Calendula 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 *Calendula 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 *Calendula 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, *Calendula officinalis* L., Ethanolic extract