

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی فلفل سیاه (*Piper nigrum*) و اسفند (*Peganum harmala*) علیه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک

سید کاظم صباغ^۱، سعیده سعیدی^۲، زهرا دهباشی^۳، مهتا مظاهری نایینی^{۴*}

^۱ استادیار بیوتکنولوژی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، زابل، ایران

^۲ کارشناس ارشد آزمایشگاه، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل، زابل، ایران

^۳ استادیار گروه زنان و زایمان دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران

^۴ استادیار ژنتیک مولکولی پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

* نشانی نویسنده مسئول: یزد، صفاییه، بلوار استاد آرام، میدان عالم، پردیس دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی

E-mail: mazaheri54@yahoo.com

وصول: ۱۳۹۴/۲/۱۳، اصلاح: ۱۳۹۴/۳/۱۷، پذیرش: ۱۳۹۴/۴/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهمترین عوامل عفونت زا برای انسان می باشد که در سال های اخیر سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک آن گزارش شده است. با افزایش مقاومت باکتریایی نسبت به داروهای شیمیایی و عوارض جانبی کم داروهای گیاهی، امروزه گیاهان دارویی مورد توجه قرار گرفته اند. در این مطالعه اثر ضد باکتریایی عصاره های الکلی فلفل سیاه و اسفند علیه سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک های رایج مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها: استخراج عصاره الکلی فلفل سیاه و اسفند با استفاده از دستگاه روتاری انجام گردید. ۱۲ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های ادراری جداسازی و خالص سازی گردید. حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره های فلفل سیاه و اسفند در شش غلظت مختلف با روش رقیق سازی در محیط مایع پرروی باکتری ها تعیین شد. حساسیت سویه ها به چند آنتی بیوتیک با روش دیسک دیفیوژن کربی-بائر مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج این تحقیق نشان داد که بالاترین و پایتترین متوسط مقاومت به ترتیب متعلق به آنتی بیوتیک های سفنازیدیم (۶/۶۶٪) و وانکومايسن (۸/۸٪) می باشد. ارزیابی مقدار MIC عصاره های گیاهی نشان داد که بیشترین اثر کشندگی فلفل و اسپند به ترتیب در غلظت های ۱۰ و ۵ میلی گرم در میلی لیتر می باشد، در حالی که کمترین غلظت بازدارندگی در غلظت ۲/۵ و ۰/۶۲ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد. بیشترین مقدار MBC به ترتیب در غلظت های ۲۰ و ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره های فلفل سیاه و اسفند می باشد.

نتیجه گیری: اگر چه کاربرد بالینی عصاره ها و اسانس های گیاهی به دلیل عوارض جانبی، با ارزش به نظر می رسد، اما جهت کاربرد بالینی عصاره های الکلی اسفند و فلفل سیاه باید تحقیقات بیشتری در زمینه مکانیسم عمل ترکیبات موثر این گیاهان بر روی عوامل میکروبی انجام شود.

واژه های کلیدی: داروهای شیمیایی، اثرات ضد میکروبی، عصاره گیاهی، فلفل سیاه، اسفند

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری گرم مثبت است که در پوست رشد و نمو می کند و در قسمت ابتدایی بینی ۲۵ تا ۳۰ درصد افراد بدون نشانه های بالینی وجود دارد و به عنوان مهمترین مخازن گسترش آلودگی شناخته می شود. عفونت های ناشی از این باکتری به صورت دائمی و مکرر در بیماران بستری شده روی می دهند (۱-۲) و علی رغم درمان آنتی بیوتیکی، عفونت های شدیدی از خود به جای می گذارند. بنابراین جلوگیری از بروز عفونت های ناشی از این باکتری و ریشه یابی کانونهای انتشار آن در بیمارستان ها از مسائل ضروری است. به نظر می رسد، انتقال باکتری به صورت ناقلین انسانی نقش مهمی در اپیدمیولوژی و پاتوژنز عفونت های آن دارد (۳). این باکتری به صورت طبیعی در انتهای بینی یافت می شود و به طوری که با درمان مناسب ضد میکروبی در ناحیه بینی و استفاده از پمادهای ضد میکروبی، باکتری از سایر نقاط بدن نیز حذف می شود (۴). اخیراً با توجه به اثرات جانبی آنتی بیوتیک های مصرفی و مقاومتی که پاتوژن هایی نظیر استافیلوکوکوس اورئوس در برابر آن ها کسب نموده اند، به عملکرد ضد میکروبی عصاره ها و ترکیبات طبیعی گونه های مختلف گیاهی توجه زیادی شده است بدین ترتیب شناسایی تعداد بیشتری گیاهان دارای خاصیت ضد میکروبی، جداسازی و خالص سازی ترکیبات موثر آن ها در درمان بیماری های عفونی می تواند یکی از راههای موثر و مفید در درمان بیماری های مقاوم به آنتی بیوتیک باشد (۵-۶). خانواده پیراسه یکی از بزرگترین خانواده گیاهان گلدار با بیش از ۱۲ جنس و حدود ۱۴۰۰ گونه در سر تا سر دنیا بوده است (۷). گیاه فلفل سیاه (*Piper nigrum*) بومی جنوب هند بوده است و به طور ممتد در این ناحیه و سایر مناطق گرمسیری کشت می شود. فلفل سیاه در درمان یبوست، گوش درد، قانقاریا، بیماری قلبی، گرفتگی سینه، سوء هاضمه، گزش حشرات، بیخوابی، درد مفاصل،

مشکلات کبدی، بیماری ریوی، آبله دهانی، آفتاب زدگی، فساد دندان، دندان درد استفاده می شود (۸). گونه گیاهی اسفند (*Peganum harmala*) از خانواده Nitrariaceae، بومی مناطق نیمه خشک و خشک شمال غرب هند، آفریقای جنوبی، آسیای مرکزی، عرصه های ایرانی-تورانی، سمارا-سندی، مدیترانه و اروپا-سیبری است. اسفند از زمان قدیم در ایران به عنوان یک ماده ضد عفونی کننده مورد استفاده بوده است (۹-۱۰) و همچنین اسفند برای درمان کمر درد، آسم، کولیک و زردی نیز استفاده می شود (۱۱). عصاره گیاه اسفند در بردارنده مواد ضد میکروبی فلاونوئیدی و آلکالوئیدهای بتا-کربولینی (هارمین- هارمالین ها-هارمالول، پگائین و کینازولین) می باشد که بیشتر در ریشه، دانه و کالوس گیاه یافت می شود (۱۲)، همچنین اسفند توانایی کشتن جلبک ها، باکتری ها، انگل های روده ای و قارچ ها را نیز دارد (۱۳). هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی فلفل سیاه و اسفند علیه جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک جدا شده از بیماران می باشد.

مواد و روش ها**تهیه عصاره**

گونه های مورد استفاده در این تحقیق از عطاری خریداری شده سپس خرد شده، جهت تهیه عصاره ۱۰ گرم پودر خشک گیاه در داخل ارلن های نیم لیتری حاوی ۲۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶٪ قرار داده شد. محتوی ارلن ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه شیکر (با سرعت ۱۳۰rpm) مخلوط سپس به وسیله کاغذ واتمن شماره ۲ صاف گردیدند. جداسازی حلال از عصاره توسط دستگاه روتاری و با کمک پمپ خلاء (تقطیر در خلاء) انجام گرفت. عصاره بدست آمده وزن شده سپس بر اساس واحد حجمی میلی گرم در میلی لیتر در حلال DMSO حل شده است. تا زمان استفاده در آزمایشات ضد میکروبی در دمای ۴ درجه سانتی گراد در

یخچال نگهداری شدند.

سویه های باکتری

سویه های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس مورد استفاده در این تحقیق از نمونه های ادراری بیماران شهرستان زابل جداسازی و بر روی محیط های کشت اختصاصی مانیتول سالت آگار و بلاد آگار کشت داده شدند. سویه های خالص به دست آمده بر روی محیط کشت مصنوعی با استفاده از تست های بیوشیمیایی در حد جنس شناسایی و در نهایت با انجام تست کوآگولاز به روش لوله ای و لامی و بررسی تشکیل آگلوتیناسیون، گونه استافیلوکوکوس اورئوس تعیین هویت شدند.

فعالیت آنتی بیوتیکی

۱۲ سویه خالص از گونه استافیلوکوکوس اورئوس با روش کربی-بائر تعیین آنتی بیوگرام شده و حساسیت آن ها نسبت به آنتی بیوتیک ها مورد ارزیابی قرار گرفت. آنتی بیوتیک های مورد استفاده در این بررسی شامل سفنازیدیم (CAZ)، تری متو پریم (SXT)، وانکومایسین (V) و سفکسیم (CN) (ساخت شرکت پادتن طب) بودند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد قطر هاله های باز دارنده اندازه گیری شد و حساسیت و مقاومت سویه ها تعیین و نتایج آن با جدول استاندارد NCCLS مقایسه شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد.

آزمون ضد میکروبی عصاره

حساسیت جدایه های باکتری دارای مقاومت چند گانه نسبت به عصاره اتانولی فلفل سیاه و اسفند با استفاده از روش رقت سازی در چاهک بررسی شد. به هفت چاهک از پلیت های میکرو تیتز میزان ۱۰۰ میکرو لیتر از محیط مایع مغذی مولر هیتتون (MHB) اضافه شد. به چاهک اول ۱۰۰ میلی لیتر از محلول رقیق شده عصاره اضافه شده و پس از مخلوط کردن ۱۰۰ میکرو لیتر از چاهک اول برداشته به چاهک دوم اضافه کرده و بدین

ترتیب تا آخرین چاهک این کار انجام داده شد از چاهک آخر ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت خارج کرده مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون میکروبی حاوی ۱۰۷ واحد در میلی لیتر معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه شده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. اولین چاهکی که از رشد باکتری پس از قرار دادن در انکوباتور جلوگیری کرده است به عنوان (MIC) در نظر گرفته شده و برای اطمینان از چاهک های شفاف ۱۰ میکرو لیتر برداشته به محیط مولر هیتتون آگار منتقل کرده و پس از ۲۴ ساعت اولین رقتی که توانسته ۹۹/۹ درصد باکتری را از بین ببرد به عنوان حداقل غلظت کشنده نشان داده می شود.

یافته ها

واکنش باکتری به آنتی بیوتیک

نتایج حاصل از آنتی بیوگرام نشان داد که نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ۴ آنتی بیوتیک بوده اند به طوری که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک سفنازیدیم (۶۶/۶٪) و کمترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ونکومایسین (۸/۳٪) بوده است (جدول ۱).

بیشترین و کمترین غلظت عصاره

اثر ضد باکتریایی عصاره گیاهی فلفل سیاه به صورت جداگانه در غلظت های مختلف مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که علی رغم مقاومت نسبی اکثر سویه ها در غلظت های مورد استفاده، بیشترین حساسیت در غلظت های ۱۰mg و ۵mg می باشد. به طور تقریبی بیشترین MIC (حداقل غلظت باز دارندگی) در غلظت ۱/۲۵mg/ml عصاره اسفند می باشد، در حالی که کمترین غلظت بازدارندگی در غلظت ۰/۶۲ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است که در این غلظت دو سویه استافیلوکوکوس اورئوس مهار شده است (جدول ۲).

شکل ۱: الگوی حساسیتی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی بیوتیک ها (%)

	CN	SXT	V	CAZ
S	۵۸/۳	۵۰	۵۰	۲۵
I	۸/۳	۸/۳	۴۱/۶	۸/۳
R	۳۳/۳	۴۱/۶۶	۸/۳	۶۶/۶

CAZ= Ceftazidime, CN= cefixime, SXT= trimethoprim-sulfamethoxazol, V= Vancomycin. R: Resistant S: Sensitive I: Intermediate

جدول ۲: حساسیت آنتی بیوتیک، حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره گیاهان فلفل سیاه و اسفند

کد باکتری	عصاره اسفند (mg/ml) MIC/MBC	عصاره فلفل سیاه (mg/ml) MIC/MBC	الگوی مقاومت	کد باکتری	عصاره اسفند (mg/ml) MIC/MBC	عصاره فلفل سیاه (mg/ml) MIC/MBC	الگوی مقاومت
۱	۱۰-۲۰	۱۰-۲۰	A1, A2, A3, A4	۷	۰/۶۲-۱/۲۵	۵/۱۰	-
۲	۵-۱۰	۲/۵-۵	A1, A2, A4	۸	۰/۶۲-۱/۲۵	۵-۱۰	-
۳	۵-۱۰	۱۰-۲۰	A1, A2, A4	۹	۱/۲۵-۲/۵	۲-۵/۵	-
۴	۲/۵-۵	۵-۱۰	A4	۱۰	۵-۵	۵-۱۰	A2, A4
۵	۱/۲۵-۲/۵	۵-۱۰	A4	۱۱	۵-۱۰	۱۰-۲۰	A1, A2, A4
۶	۱/۲۵-۲/۵	۲/۵-۵	-	۱۲	۲/۵-۵	۱۰-۲۰	A4

A1= cefixime, A2= trimethoprim-sulfamethoxazol, A3= Vancomycin, A4= Ceftazidime

تتراسایکلین (۶۱٪)، اریترومایسین (۵۶٪)، توبرامایسین (۵۳٪)، جنتامایسین (۵۲٪)، آمیکاسین و اگزاسیلین (۴۸٪) و نیتل مایسین (۲۲٪) بوده است (۱۴). در مطالعه شجری و منیری که در کاشان انجام شد نتایج نشان داد که نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس بدست آمده به ترتیب مقاوم به آنتی بیوتیک های اگزاسیلین (۹۶/۱٪)، کلوزگازاسیلین (۶۳/۲٪)، سفالوتین (۲۳/۷٪) و ونکومایسین (۱۸/۴٪) بوده است (۱۵). در همه تحقیقات بعمل آمده، نشانداده شده است که سویه های این باکتری به آنتی بیوتیکهای رایج کشور مقاوم شده اند. در این مطالعه نیز اغلب سویه ها به آنتی بیوتیک وانکومایسین مقاومت نشان دادند ولی این مقاومت در پایین ترین حد نسبت به آنتی بیوتیک های دیگر تعیین گردید (۸/۳٪). در حالی که در مطالعات قبلی پایتترین میزان متعلق به آنتی بیوتیک های دیگر بوده که این نشاندهنده تغییر پذیری سویه های باکتری به عوامل خارجی از جمله آنتی بیوتیک ها می باشد. گیاهان دارویی از دیرباز برای درمان عفونت های باکتریال استفاده شده اند. اخیرا به دلیل بروز مقاومت های دارویی، به منابع گیاهی به عنوان مخازن طبیعی توجه بیشتری شده است. میزان بیان متابولیت های موجود در اندام های مختلف گیاه برحسب شرایط اکولوژیکی

در حالی که به طور تقریبی بیشترین MBC (حداقل غلظت کشندگی) در غلظت های ۱۰، ۲۰ mg/ml عصاره فلفل اسفند می باشد (جدول ۲) و همچنین اثر ضد باکتریایی عصاره گیاهی فلفل سیاه در غلظت های مختلف نشان داد که علی رغم مقاومت نسبی اکثر سویه ها در غلظت های مورد استفاده، بیشترین حساسیت در غلظت های ۱۰ mg و ۲۰ mg می باشد، به طور تقریبی بیشترین MIC (حداقل غلظت باز دارندگی) در غلظت ۵ mg عصاره فلفل سیاه می باشد (جدول ۲). در حالی که کمترین غلظت بازدارندگی در غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است که در این غلظت سه سویه استافیلوکوکوس اورئوس مهار شده است (جدول ۲).

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سویه های استافیلوکوکوس اورئوس آزمایش شده در این تحقیق، مقاوم به آنتی بیوتیک های سفنازیدیم (۶۶/۶٪)، تری متو پریم (۴۱/۶۶٪)، سفکسیم (۳۳/۳٪) و وانکومایسین (۸/۳٪) بوده است. در یک مطالعه نتایج نشان داد که نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده به ترتیب مقاوم به آنتی بیوتیک پنی سیلین (۱۰۰٪)، کانامایسین (۶۸٪)،

اثر مهار کنندگی در غلظت ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است. غلظت ۳۰۰ میکرو لیتر از عصاره اسفند جمع آوری شده از فسا، سپیدان و شیراز قطر هاله های مهاری ۱۴، ۱۵ و ۱۵ میلی متر در برابر باکتری *E. coli* ATCC25922 ایجاد کرده است (۱۷). حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره های بوتانول، اتیل استات و کلروفرم *E. coli* ATCC25299 در برابر باکتری های *E. coli* HEGP402، *K. pneumoniae* HEGP 8326، *cloacae* HEGP4102 و *S. marcescens* HEGP1002 و *Acintobacter baumannii* HEGP1003 برابر با ۵ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شده است (۱۸). در مطالعه مازندرانی و همکاران نتایج حاصل از دیسک دیفیوژن و چاهک عصاره ریشه و دانه اسفند نشان دادن که باکتری *Bacillus licheniformis* (۵۸/۴ درصد) دارای بیشترین حساسیت و باکتری های *Staphylococcus aureus*، *Staphylococcus epidermis*، *Micrococcus loteus*، *Salmonella typhimorium*، *Shigella dysentria* هر یک با ۵۰ درصد حساسیت و حساسیت نسبی، از حساس ترین باکتری ها مورد مطالعه و همچنین باکتری های *Pseudomonas aeruginosa*، *Proteus mirabilis* هر یک با ۹۱/۷ درصد مقاومت، از مقاوم ترین باکتری های مورد مطالعه بودند (۱۹). اثر بازدارندگی رشد باکتری ها و قارچ ها بوسیله عصاره اتانولی اسفند به خاطر وجود آلکالوئیدهای هارمین و هارمالین ذکر شده است و نشان داده شده است که قارچ ها از حساسیت بیشتری نسبت به باکتری ها برخوردار هستند (۲۰). عصاره اتانولی اسفند دارای خاصیت ضد باکتری و ضد قارچی می باشد و به صورت موضعی در التیام زخم های پوستی و درمانیت استفاده می شود. در یک مطالعه عصاره دانه های اسفند اثر مهاری بر باکتری های گرم مثبت (*S. aureus*، *S. epidermidis*) داشته، ولی بر باکتری های *E. coli* و *P. aeruginosa* اثر مهاری نداشته است (۲۱) و لی در مطالعه ای دیگر نشان داده شد که عصاره دانه های اسفند در شرایط آزمایشگاهی علیه باکتری گرم منفی *E. coli* اثر

متفاوت است. بر این اساس ارزیابی مواد موثر گیاهان دارویی بر حسب مناطق جغرافیایی تحت کشت آن ها ضروری به نظر می رسد. نتایج حاصل از بررسی عصاره الکلی فلفل سیاه حاکی از این است که عصاره الکلی این گیاه روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک دارای اثر قابل ملاحظه ای می باشد. به طوری که بیشترین اثر مهار کنندگی در غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است. اثر تند فلفل بعلت وجود ماده پیپریدین در پوست و میوه آن می باشد. اثر بازدارندگی این ماده در غلظت های مختلف بر روی مجموعه ای از قارچها و باکتری ها نشان داده شده است (۷). همچنین نشان داده شده است که عصاره گیاهی فلفل سیاه دارای اثر ضد میکروبی علیه *Staphylococcus aureus* با قطر هاله مهاری 15 ± 2 میلی متر بوده است و در رقت $1/4$ باعث مهار رشد و مرگ *S. aureus* شده است (۸). همچنین اثر بازدارندگی عصاره استونی فلفل سیاه در برابر باکتری های *S. aureus*، *B. cereus*، *S. faecalis*، *P. aeruginosa*، *E. coli*، *K. pneumoniae* و *S. typhi* نشان داده شده است که این عصاره به ترتیب با غلظت های ۱/۲۵، ۲/۵۰، ۰/۵، ۶/۲۵، ۱/۲۵، ۱/۲۵ و ۲/۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین هاله بازدارنده را نشان دادند (۷). بیشترین مقدار غلظت عصاره ۲۵۰ میکرو لیتر بر میلی لیتر بوده است که با نتایج تحقیق ما که ۱/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر می باشد نزدیک می باشد در مطالعه دیگری نتایج نشان داد که غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره اتانولی فلفل سیاه هاله های مهاری 16 ± 2 ، $8/5 \pm 0/25$ ، $12 \pm 1/50$ ، 9 ± 1 ، $6 \pm 0/5$ ، $15/5 \pm 2/25$ میلی متر در برابر باکتری های *C. albicans*، *E. coli*، *K. pneumoniae*، *P. vulgaris*، *aeruginosa* و *S. aureus* ایجاد کرده است (۱۶). نتایج حاصل از بررسی عصاره الکلی اسفند حاکی از این است که عصاره الکلی این گیاه روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک دارای اثر قابل ملاحظه ای می باشد. به طوری که بیشترین

برروی بیماران بعد از مصرف عصاره گیاهی فلفل سیاه جهت تایید این داده ها توصیه می شود تا در نهایت بتوان آن را در رده داروهای گیاهی فرموله شده در داروخانه در دسترس بیماران قرار داد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل انجام شد که در اینجا لازم است از زحمات آقای دکتر سید کاظم صباغ، رییس پژوهشکده و کارشناسان محترم این واحد تقدیر و تشکر بعمل آید.

داشته است و چنین استدلالی شده است که این اثر بازدارندگی به دلیل وجود آلکالوئیدهای موجود در دانه اسپند می باشد (۲۲). در مجموع، نتایج حاصل از این پژوهش چنین نشان می دهد که پایین ترین غلظت از عصاره فلفل سیاه و اسفند مورد مطالعه می تواند از بالاترین دوز مصرفی دارو ارجحیت داشته باشد. به هر حال با توجه به ایجاد مقاومت سویه های باکتری به آنتی بیوتیک های رایج مصرفی لازم است دوز مصرف هر یک از آن ها برای بیماران، در حد پایین تری تجویز شود و به همراه مصرف دارو، جوشانده فلفل سیاه و یا گیاهان دارویی مشابه نیز توصیه شود تا از مقاومت بیشتر سویه ها به داروهای شیمیایی جلوگیری شود. آزمایشات کلینیکی

References

1. Marjolein F, Yzerman F, Alex V, Helene A, Boelens M. Follow-Up Staphylococcus aureus Nasal Carriage after 8 Years: Redefining the Persistent Carrier State. *J Clin Microbiol*, 1999; 37(10): 3133-40.
2. Saeedi S, Sabbagh SK, Sabouri E. Antibacterial effect of Eucalyptus globules against Resistance Staphylococcus aureus. *Rostamineh*. 2013; 3:21-32.
3. Peacock S J, De Silva F, FD L. What determines nasal carriage of S. aureus? *Trends Microbiol*. 2001; 9:605-10.
4. Kotilainen P, Routamaa M, Peltonen R, Oksi J, Rintala E. Elimination of epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus from a university hospital and district institutions, Finland. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9(2):169-75.
5. Nascimento GG, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazi J Microbiol*, 2000; 31(4):247-56.
6. Saeedi S, Mazaheri Naeeni M, Sabbagh SK, Bazi B. Evaluation of antibacterial effects of Aqueous extracts of Achillea millefolium and Teucrium polium plants on ten human pathogenic bacteria. *J Med Sci Sabzevar University*. 2014; 21(4): 596-603.
7. Karsha PV, Lakshmi OB. Antibacterial activity of black pepper (Piper nigrum Linn.) with special reference to its mode of action on bacteria. *Indian J Nat Prod Resour*. 2010; 1(2):213-15.
8. Dorman H, Deans S. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*, 2000; 88(2): 308-16.
9. Arshad N, Neubauer C, Hasnain S HM. Peganum harmala can minimize Escherichia coli infection in poultry, but long-term feeding may induce side effects. *Poult Sci*. 2008; 87:240-9.
10. Nenaah G. Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of Peganum harmala (L) seeds and their combination effects. *Fitoterapia*. 2010; 81(7):779-82.
11. Bukhari N, Choi JH, Jeon C, Park MA. K. Phytochemical studies of the alkaloids from Peganum harmala. *Appl Chem*. 2008; 12:101-4.
12. Kartal M, Altun M, Kurucu S. HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmaline in the seeds of Peganum harmala L. *J Pharmac Biomed Anal*, 2003; 31(2):263-9.
13. Sarpeleh A, Sharifi K, Sonbolkar A. Evidence of antifungal activity of wild rue (Peganum harmala L.) on phytopathogenic fungi. *J Plant Dis Protect*, 2009; 116(5): 208-215
14. Hasani A, Sheikhalizadeh V, Hasani A, Naghili B, Valizadeh V, Nikoonijad AR. Methicillin resistant and susceptible Staphylococcus aureus: Appraising therapeutic approaches in the Northwest of Iran. *Iran j Microbiol*, 2013; 5(1):56-63.
15. Shajari G, Moniri R. Investigation of resistans and sensivity pattern of Staphylococcus aureus strains isolated from refered samples to central laboratory of Kashan. *J Feiz*. 2004; 1:31-6.
16. Darabpour E, Motamedi H, Seyyed Nejad SM. Antimicrobial properties of Teucrium polium against some

- clinical pathogens. *Asia Pac J Trop Med*, 2010; 3(2): 124-7.
17. Abdollahi A, Fasihi-Ramandi M, Kouhpayeh S, Najafipour S, Meshkibaf M, Naghdi M. Antimicrobial effect of 15 medicinal plant species and their dependency on climatic conditions of growth in different geographical and ecological areas of fars province. *Zahedan J Res Med Sci*, 2012; 14(5): 34-7.
 18. Hayet E, Maha M, Mighri Z, Laurent G, Mahjoub A. Biological activities of *Peganum harmala* leaves. *Afric J Biotechnol*, 2010; 9(48): 8199-205.
 19. Mazandarani M, Ghaemi E, Ghaffari F. Evaluation of antibacterial activity of medicinal plant extracts from different organs of March (*Peganum harmala* L) in the North East province (Incheh Brown). *Plant Res J*, 2010; 3(4): 23-33.
 20. Shinwari ZK, Gilani SS. Sustainable harvest of medicinal plants at Bulashbar Nullah, Astore (Northern Pakistan). *J Ethnopharmacolo*, 2003; 84(2): 289-98.
 21. Derakhshanfar A, Oloumi M, Mirzaie M. Study on the effect of *Peganum harmala* extract on experimental skin wound healing in rat: pathological and biomechanical findings. *Comp Clin Pathol*, 2010; 19(2): 169-72.
 22. Arshad N, Zitterl-Eglseer K, Hasnain S, Hess M. Effect of *Peganum harmala* or its β -carboline alkaloids on certain antibiotic resistant strains of bacteria and protozoa from poultry. *Phytotherapy Res*, 2008; 22(11): 1533-8.

Antimicrobial Activity of Ethanolic Extract of Black pepper (*Piper nigrum*) and March (*Peganum harmala*) Against Antibiotic-resistant of *Staphylococcus aureus* Strains

Seyed Kazem Sabbagh,

Assistant Professor of Plant Biotechnology, Department of Plant Protection and Institute of Plant Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran

Saeedach Saeedi,

Laboratory experts, Institute of Plant Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran.

Zahra Dehbashi,

Assistant Professor of Gynecology, Faculty of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran.

***Mahta Mazaheri Naeeni,**

Assistant Professor of Medical Molecular Genetics, Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, ShahidSadoughiUniversityof Medical Sciences, Yazd, Iran.

Received: 20/01/2014, Revised: 21/04/2014, Accepted: 05/06/2014

Corresponding Author:

Mahta Mazaheri Naeeni,
Yazd, Safaeie, Ostad Aram
Bulvard, Aalam Square, Medical
Science University of Yazd,
School of Medicine, Department
of Medical Genetics.
E-mail: mazaheri54@yahoo.com

Abstract

Background and aim: *Staphylococcus aureus* is one of the most infectious agents to humans. In recent years, resistance strain to different antibiotic has been reported. With increasing of bacterial resistance to chemical drugs and effects of plant medicines, herbal medicines have been considered as alternative medicaments. The purpose of this study was to investigate the antimicrobial activity of alcoholic extract of Black pepper and March against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* resistant to commonly used antibiotics.

Materials and Methods: Alcoholic plant extraction was done using a rotary apparatus. Twelve, *Staphylococcus aureus* strains from urine samples was isolated and then purified. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the plant extracts at six different concentrations was determined in broth medium using dilution method. Susceptibility of strains to multiple antibiotics was evaluated using Kirby-Bauer disk diffusion method.

Result: The results of this study showed that higher and lower average resistance to tested antibiotic is belonged to Ceftazidime (66/66%) and vancomycin (8/1%) antibiotic, respectively. MIC assay of plant extracts showed that the highest effect of Pepper and March was determined at concentrations of 10 and 5 mg/ml, respectively. Whereas, the lowest MIC effect for Pepper and March was recorded at concentration of 2/5 and 0/62 mg/mL, respectively. The maximum MBC of plant extracts was recorded at concentration of 20 and 10 mg/mL for Pepper and March, respectively.

Conclusion: Although the clinical application of plant extracts and essential oils due to fewer side effects, seems valuable, However, to clinical application of the alcoholic extract of black pepper and march more researches on mode of action of effective compounds of plants on microbial agents have to be done.

Keywords: Chemical drugs, Antibacterial effect, Plant extract, *Piper nigrum*, *Peganum harmala*.