مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره دوازدهم، شهریور ۱۳۹۲ ، ۴۷۴-۴۶۱

اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی ختمی‌دارویی (*Althaea Officinalis*) علیه استرپتوکوکوس پیوژنز در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های رایج در شرایط آزمایشگاهی

الهام دهقان[۱]، حسین دشتی[۲]، امین باقی‌زاده[۳]

دریافت مقاله: ۹۱/۵/۳۱ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۱/۷/۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۱/۱۲/۱۲ پذیرش مقاله: ۹۲/۲/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز عامل شایع‌ترین آماس باکتریایی گلو، مخملک و زرد زخم در انسان می‌باشد. گیاه ختمی دارویی (*Althaea officinalis*) یکی از گیاهان مورد استفاده در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مذکور می‌باشد. به دلیل بروز مشکلات درمانی با آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله ایجاد مقاومت دارویی و عود مجدد آلودگی، این تحقیق جهت بررسی اثر ضد میکروبی عصاره ریشه ختمی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، که در سال ۱۳۹۰ انجام شد ریشه ختمی از مناطق قم، تهران، یزد، انار، زرند، اصفهان، اراک، نایین، ماهان و بافت جمع‌آوری، و بعد از عصاره‌گیری به روش خیساندن با اتانول، اثر غلظت‌های مختلف عصاره مناطق بر رشد باکتری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و دو طرفه مورد مقایسه قرار گرفت و آزمون دانکن برای مقایسه زوج میانگین‌ها انجام شد. در نهایت حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری Minimum Inhibitory][(MIC) Concentration] هر عصاره تعیین گردید.

یافته‌ها: عصاره اتانولی ریشه ختمی دارای خاصیت ضد باکتری بوده و میزان ممانعت‌کنندگی از رشد عصاره با افزایش غلظت، رابطه لگاریتمی داشت. غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره دارای بیشترین اثر ممانعت‌کنندگی و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر منطقه یزد اثری معادل پنی‌سیلین داشت. عصاره منطقه یزد با کمترین MIC دارای بیشترین اثر ممانعت‌کنندگی بود. عصاره منطقه تهران دارای کمترین اثر و عصاره منطقه اراک روی رشد باکتری بی‌تأثیر بود.

نتیجه‌گیری: نتایج بیانگر تأثیر منطقه رویش گیاه و غلظت عصاره بر رشد باکتری است. بنابراین، باید در هنگام استفاده از ختمی‌دارویی، برای رسیدن به بهترین اثر درمانی، به این موارد نیز توجه شود.

واژه‌های کلیدی: طب سنتی، ریشه ختمی، عصاره اتانولی، MIC، آنتی‌بیوتیک، استرپتوکوکوس پیوژنز

۱- کارشناس ارشد، گروه آموزشی بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی کرمان، کرمان، ایران
تلفن: ۰۳۹۱-۳۲۰۲۱۰۵، دورنگار: ۰۳۹۱-۳۲۰۲۰۴۲، پست الکترونیکی: elham_dehghan51@yahoo.com
۲- دانشیار گروه آموزشی زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه ولی عصر(عج)، رفسنجان، رفسنجان، ایران
۳- استادیار گروه آموزشی زراعت و اصلاح نباتات، مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، کرمان، کرمان، ایران

مقدمه

فلوروکینولون‌ها استرپتوکوکوس پیوژنز جزء گروه A استرپتوکوک‌های بتا همولیتیک است که گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری می‌باشد. استرپتوکوک‌های گروه A در گلو و پوست مستقر می‌شوند و عامل ایجاد انواع عفونت‌های چرکی و پیامدهای غیر چرکی هستند [۱]. این باکتری در انسان، مسئول شایع‌ترین آماس باکتریایی گلو [۲]، مخملک و زرد زخم [۳] می‌باشد. آنچه در مورد این باکتری حائز اهمیت است مسئله درمان به موقع و کامل بیماری‌های ناشی از آن است، چون در غیر این صورت، پیامدهای پس از عفونت‌های استرپتوکوکی گروه A از جمله تب روماتیسمی‌حاد [۴] و روماتیسم قلبی می‌تواند موجب ناتوانی و مرگ مبتلایان خصوصاً در کودکان شود. آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، اریترومایسین و نیز تتراسایکلین برای درمان تمام استرپتوکوک‌های بتا همولیتیک گروه A پیشنهاد می‌شوند، اما در بیشتر مواقع درمان کامل بیماری به علت مقاومت‌های دارویی با مشکلاتی مواجه شده و عود مجدد بیماری دیده می‌شود [۵]. بنابراین، لزوم مطالعات برای معرفی داروهای جدید با قدرت بالا، عوارض جانبی کم و حداقل مقاومت ضروری به نظر می‌رسد.

با توجه به رویکرد جهانی به استفاده از گیاهان دارویی و ترکیب‌های طبیعی در صنایع دارویی و به دلیل سازگاری آن‌ها با بدن انسان، تحقیقات برای تولید مواد ضد میکروبی گیاهی ضروری به نظر می‌رسد. در این راستا، تحقیقاتی که صورت گرفته نشان داده که مصرف چای سیاه و سبز در غلظت‌های بالا یا مکمل پلی‌فنل‌های حاصل از آن می‌تواند به عنوان درمان کمکی در بیماران آلوده به استرپتوکوکوس پیوژنز تحت درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها مفید باشد [۶]. ختمی دارویی *Althaea officinalis* (*Althaea*) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی لعاب دار و از خانواده پنیرکیان (*Malvaceae*) است که گیاهی علفی پایا به ارتفاع ۰/۵ تا ۱/۵ متر و ساقه بلند افراشته با برگ‌های متناوب می‌باشد. برگ‌ها در قسمت فوقانی ساقه کم ولی در قسمت‌های پایینی ساقه بیشتر و قلبی شکل هستند. همه قسمت‌های گیاه دارای کرک‌های نرم بوده و از کنار برگ‌ها، خوشه‌های گل سفید یا صورتی ظاهر می‌شوند [۷]. از ریزوم، ریشه‌ای مخروطی شکل با انشعاب کم به طول ۳۰- ۲۰ سانتی‌متر و به ضخامت ۳-۲ سانتی‌متر خارج می‌شود. همه قسمت‌های این گیاه (برگ، گل، ریشه) خواص دارویی دارد. این گیاه با خواص دارویی شگفت‌انگیز خود از سال‌ها پیش در طب سنتی کاربرد داشته است [۸].

در سال‌های اخیر فرم دارویی جدیدی بنام آلتادین به صورت ترکیبی از این گیاه و گیاه آویشن برای رفع التهابات تنفسی و سرفه‌های تحریکی، تب و برونشیت در داخل کشور ساخته شده است. این گیاه در مناطق مختلف ایران به خصوص در اطراف تهران، نواحی مرکزی و جنوبی ایران می‌روید. محصول جمع‌آوری شده از این مناطق به صورت گیاه خشک به طور سنتی برای درمان التهابات دستگاه تنفس [۹]، سرفه‌های تحریکی [۱۰] و در استعمال خارجی، جوشانده ریشه ختمی و برگ آن به صورت غرغره برای رفع التهاب اعضای مختلف مانند ورم مخاط دهان، آبسه لثه‌ها، خشکی گلو، تب [۱۱] و همچنین، برای شستن زرد زخم به کار می‌رود. شستن زرد زخم با دمکرده ختمی بسیار مفید است به طوری که هیچ یک از داروهای گران قیمت امروزی جای آن را نگرفته است [۱۲]. این گیاه برای درمان بیماری‌های دندان و زخم معده نیز مؤثر است [۱۳] همچنین، در برابر باکتری‌های

بی‌هوازی و بی‌هوازی اختیاری دندان فعالیت ضد باکتری دارد و پیشنهاد شده است که از عصاره الکلی این گیاه برای پیشگیری از بیماری‌های دندان به عنوان داروی موضعی استفاده شود [۱۴].

عصاره ختمی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی شدیدی است و در آزمایشات مختلف مربوط به آنتی‌اکسیدانت نشان داده شده است [۱۵]. پلی‌ساکاریدهای یافت شده در این گیاه خاصیت آنتی‌اکسیدانت دارند [۱۶]. ۶۹٪ از فعالیت آنتی‌اکسیدانت این گیاه مربوط به ترکیب آلفا-توکوفرال (α-Tocopheral)آن می‌باشد [۱۷]. ریشه گیاه ختمی‌دارای دو فلاونوئید می‌باشد. اسیدهای فنولیک و کومارین توسط کروماتوگرافی شناسایی شده‌اند [۱۸]. فلاونوئیدها گروهی از ترکیبات پلفنولیک (polphenolic) می‌باشند که در سال‌های اخیر اثرات فارماکولوژی این ترکیبات روی بیماری آلزایمر مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. آلومینیوم ماده‌ای نوروتوکسیک است و باعث تحریک بیماری‌هایی مثل آلزایمر و پارکینسون می‌شود [۱۹]. بیشتر فلاونوئیدها می‌توانند به آلومینیوم باند شده و سبب کاهش آن در بدن شوند [۱۹]. فلاونوئیدها از تجمع پلاکت‌ها جلوگیری می‌کنند. همچنین خاصیت ضدالتهابی، ضد باکتری و اثر ضد توموری دارند[۲۰] و به عنوان یک فیلتر محافظتی از اشعه اولترا ویوله (Ultraviolet) عمل می‌کند [۲۱].

تحقیقاتی که بر روی گیاهان دارویی رویش یافته در مناطق مختلف ایران صورت گرفته، نشان داده شده است که میزان مواد مؤثره موجود در گیاه جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های مختلف تفاوت چشم‌گیری با یکدیگر دارند [۲۲]. با توجه به‌این امر، ممکن است اثر گیاهان مناطق مختلف جهت درمان بیماری‌ها با یکدیگر تفاوت داشته باشد. این تحقیق به منظور مقایسه اثر عصاره ریشه ختمی و تعیین میزان حداقل غلظت عصاره اتانولی ریشه ختمی بر مهار کردن فعالیت باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز و همچنین، بررسی اثر مناطق جغرافیایی رویشگاه‌های این گیاه بر روی مهار کنندگی عصاره ریشه گیاه در مقابل رشد باکتری در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های رایج (پنی‌سیلین، اریترومایسین، آموکسی سیلین)، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه: این بررسی آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۰ به منظور بررسی خاصیت ضد باکتری عصاره اتانولی ریشه ختمی دارویی بر علیه باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز انجام گرفت. برای این منظور با استفاده از اطلاعات موجود در وزارت کشاورزی در مورد محل‌های رویش گیاهان، مناطق رویش گیاه ختمی دارویی در ارتفاعات و شرایط اقلیمی‌مختلف شناسایی شده و جمع‌آوری گیاه بر این اساس از مناطق تهران، اصفهان، یزد، کرمان، ماهان، بافت، زرند، نایین، قم و اراک انجام شد. نمونه‌ها به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان انتقال یافت. پس از مراحل شستشو و خشک کردن، عصاره‌گیری به روش زیر انجام شد و به آزمایشگاه تشخیص طبی دکتر رهنما جهت بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌ها منتقل گردید.

عصاره‌گیری از گیاه: در این مطالعه برای عصاره‌گیری از روش خیساندن (Maceration) و حلال اتانول استفاده شد. بدین منظور، مقدار ۲۰ گرم از پودر ریشه گیاه هر منطقه را با دقت وزن کرده و هر کدام را جداگانه در داخل یک ارلن بزرگ ریخته، و به هر کدام از ده ارلن مقدار ۴۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ اضافه گردید. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۵۰ درجه سانتی‌گراد، از کاغذ صافی واتمن

۴۲ عبور داده و تفاله را فشرده تا کاملاً تخلیه شد. به تفاله مجدداً اتانول افزوده و مراحل قبل تکرار شد. سپس با استفاده از دستگاه تقطیر در خلاء (Heizbad WB، آلمان) در درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد، عصاره‌ها از حلال جداسازی و تغلیظ شد و حجم آن‌ها به ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد [۶]. عصاره‌های تغلیظ شده هر یک به پنج هاون جدا منتقل و در ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از اینکه عصاره‌ها کاملاً خشک شدند، با کاردک تراشیده شده سپس در هاون سائیده شدند. عصاره‌های خشک شده به وسیله اشعه UV استریل شده و استریل بودن آن‌ها توسط کشت دادن عصاره‌های گیاه بر روی محیط کشت نوترینت آگار بررسی شد [۲۴-۲۳]. سپس، مقدار یک گرم از هر عصاره خشک توزین شده و با استفاده از مقادیر مختلف از محلول DMSO (دی متیل‌سولفوکساید) حل گردید و بدین ترتیب غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و تمام محلول‌های تهیه شده در زیر هود لامینار با فیلترهای ۰/۴۵ میکرونی استریل گردید. سپس به لوله‌های استریل منتقل شدند.

تهیه باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز: به منظور کشت باکتری سویه خالص باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز (Persian Type Culture, Collection PTCC: 1447) به صورت آمپول لیوفیلیزه، از مؤسسه پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده بیوتکنولوژی مرکز قارچ و باکتری‌های ایران تهیه شد. برای کشت باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز روی بلاد آگار از جار شمع‌دار به منظور تأمین CO2 استفاده شد. مشاهده همولیز کامل (همولیز بتا) پس از ۲۴ ساعت و دیدن کوکوس‌های گرم مثبت تکی، دوتایی و زنجیره‌ای در لام رنگ‌آمیزی شده در زیر میکروسکوپ تأیید کننده سویه استرپتوکوک بود. سپس از کلنی ۲۴ ساعته باکتری کشت شده در بلاد آگار، به کمک یک لوپ برداشته و در یک لوله آزمایش استریل حاوی ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل کاملاً مخلوط کرده تا سوسپانسیون یکنواختی از باکتری به دست آمد. این لوله به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد تا کدورتی مشابه لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند یا (10^7 CFU/ml) ایجاد نماید. این سوسپانسیون دارای 10^8 × ۱/۵ باکتری در هر میلی‌لیتر است [۲۵]. برای تهیه آگار خون دار (بلاد آگار) ۴۰ گرم از محیط کشت پایه بلاد آگار (ساخت کارخانه Merck آلمان) در یک لیتر آب دیونیزه، مخلوط و با استفاده از مایکروفر حل شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد و پس از رسیدن به دمای ۵۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط کاملاً استریل، خون دفیبرینه گوسفندی افزوده و پس از مخلوط کردن در پلیت‌های پتری تقسیم شده و در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر از کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شده از باکتری به هر پلیت تلقیح گردید.

بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌ها: به منظور بررسی اثر ضد باکتریایی گیاه ختمی سه آزمایش در سه مرحله انجام شد. در آزمایش اول، غلظت‌های مختلف (۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره ریشه ختمی‌از مناطق ده گانه تهیه و در یک آزمایش فاکتوریل دو عاملی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار مورد مقایسه قرار گرفتند و اثر متقابل منطقه و غلظت عصاره نیز مطالعه گردید. در آزمایش دوم، غلظت‌های مختلف عصاره (۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از هر منطقه به همراه سه آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، آموکسی‌سیلین و

اریترو مایسین (جمعاً ۷ تیمار) در طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار مقایسه شدند. در این آزمایش‌ها کمیت مورد اندازه‌گیری جهت میزان ممانعت‌کنندگی عصاره در مقابل رشد باکتری، قطر هاله عدم رشد بود که به روش دیسک دیفیوژن به شرح زیر اندازه‌گیری شد.

روش دیسک دیفیوژن: دیسک‌های بلانک استریل کاغذی (قطر ۶ میلی‌متر ساخت شرکت پادتن طب ایران) به تعداد مورد نیاز به مدت ۲۴ ساعت در غلظت‌های تهیه شده از عصاره‌های مناطق مختلف قرار داده شدند تا کاملاً عصاره‌ها جذب دیسک‌ها گردید. سپس، دیسک‌های حاوی عصاره با غلظت‌های مختلف برای هر منطقه به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک شوند. از دیسک‌های حاوی حلال بدون عصاره به عنوان شاهد منفی استفاده شد. سپس، این دیسک‌ها روی پلیت‌های حاوی باکتری کشت داده شده به همراه دیسک‌های استاندارد حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین ۱۰ میکروگرم بر دیسک، آموکسی‌سیلین ۲۵ میکروگرم بر دیسک و اریترو مایسین ۱۵ میکروگرم بر دیسک (شرکت پادتن طب) به فواصل مناسب قرار داده شدند. در مرحله بعد، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا هر یک از عصاره‌ها از جهت خاصیت ضد باکتری مورد بررسی قرار گیرند. میزان ممانعت‌کنندگی به صورت قطر هاله‌های عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزارهای Minitab نسخه ۱۴ و MSTAT-C نسخه ۱/۴۲ انجام شد.

در آزمایش سوم، برای تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی رشد (MIC) از روش رقیق‌سازی میکروپلیت استفاده شد. از روش رقیق‌سازی میکروپلیت استفاده شد. برای این منظور ابتدا با استفاده از حلال DMSO۱۰٪ در آب محلول استوک ۵/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر یک از عصاره‌ها تهیه شد. سپس، به وسیله سرنگ میلی‌پور با فیلترهای به قطر ۰/۲۲ میکرون، فیلتر و استریل گردید. در مرحله بعدی سوسپانسیون میکروبی از باکتری تهیه شد. بدین ترتیب که به کمک لوپ از محیط کشت باکتری برداشته و کدورتی معادل نیم مک فارلند در سرم فیزیولوژی تهیه کرده و سپس این محلول به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شد تا تعداد نهایی باکتری به 10^7 CFU/ml برسد. رقت اخیر سپس در لوله آزمایش حاوی آبگوشت مولر هینتون حاوی ۵٪ خون لیز شده اسب تلقیح گردید. سپس، برای این سوسپانسیون میکروبی شش چاهک در میکروپلیت در نظر گرفته و به ترتیب به چاهک اول ۲۰۰ میکرولیتر و در چاهک‌های بعدی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی ریخته شد. سپس، ۲۰ میکرولیتر عصاره گیاهی به چاهک اول اضافه شد در ادامه به ترتیب از چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر برداشته به چاهک دوم و از چاهک دوم نیز ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به چاهک سوم افزوده شد و این مراحل تا چاهک ششم ادامه یافت و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک ششم دور ریخته شد. با اجرای این مراحل غلظت‌های ppm ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ و ۱۵/۶۲۵ از عصاره در چاهک‌ها به دست آمد. سپس، این میکروپلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شده و کم ترین غلظتی از عصاره که از رشد مریی باکتری جلوگیری کرده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

نتایج

آزمایش اول: تجزیه واریانس آزمایش اول نشان داد که تفاوت بین مکان‌های جمع‌آوری گیاه از نظر

ممانعت‌کنندگی روی رشد باکتری معنی‌دار است (p<۰/۰۰۱)، همچنین، اثر غلظت‌های مورد استفاده یکسان نیست (p<۰/۰۰۱) و اثر متقابل بین مکان و غلظت معنی‌دار است (p<۰/۰۰۱) (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس دو عاملی مربوط به مطالعه اثر غلظت‌ها، مناطق و اثر متقابل آن‌ها (آزمایش اول)

منابع تغییر	قبل از حذف منطقه اراک*			بعد از حذف منطقه اراک		
	میانگین مربعات	مقدار F	P-value	میانگین مربعات	مقدار F	P-value
مکان	۱۳۱/۰۷	۲۰۱/۶۴	<۰/۰۰۱	۵۷/۸۵	۸۱/۴۱	<۰/۰۰۱
عصاره	۳۱۲/۲	۴۸۰/۳۰	<۰/۰۰۱	۳۳۸/۲۴	۴۷۵/۹	<۰/۰۰۱
مکان × عصاره	۳/۵۱	۵/۴	<۰/۰۰۱	۰/۶۳۲	۰/۸۹	۰/۶۱۲
خطای آزمایش	۰/۶۵			۰/۷۱		
CV%**	۱۲			۱۱/۴۴		

: قبل از حذف منطقه اراک تعداد مکان ۱۰ و غلظت‌ها (mg/ml ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰) و بعد از حذف منطقه اراک تعداد مکان ۹ با غلظت‌های مذکور بوده است.

****: Coefficient of Variabiliy. ضریب تغییرات آزمایش که در مطالعات آزمایشگاهی حداکثر تا ۱۵٪ و در مطالعات مزرعه حداکثر تا ۲۵٪ قابل قبول است.***

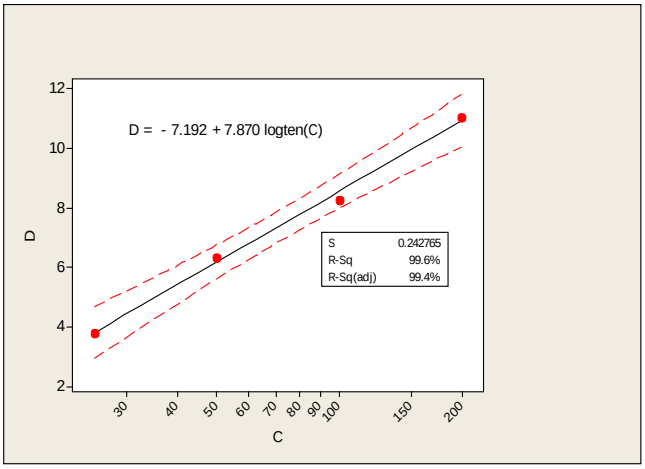
معنی‌دار بودن اثر متقابل نشان‌دهنده آن است که روند تأثیر غلظت‌های متفاوت بر روی باکتری در مکان‌های مختلف متفاوت است، لذا رگرسیون قطرهاله عدم رشد روی لگاریتم غلظت برای هر مکان جداگانه بررسی شد. روند عکس العمل رشد باکتری نسبت به افزایش غلظت عصاره در تمام مناطق بجز منطقه اراک تقریباً یکسان است لذا به نظر رسید آنچه باعث معنی‌دار شدن اثر متقابل شده، نتایج بدست آمده از منطقه اراک است که عصاره این منطقه هیچ اثری از خود نشان نداده است. بنابراین منطقه اراک حذف و آنالیز واریانس مجدد نشان داد که اثر متقابل معنی‌دار نیست (جدول ۱). مقایسات زوجی غلظت‌ها و مکان‌های مختلف نشان داد غلظت۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین و غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای کمترین اثر مهاری است. از سوی دیگر یزد بیشترین (۱۰/۷۵ میلی‌متر) و بافت (۵/۷۵ میلی‌متر) کمترین تأثیر را در کنترل رشد باکتری داشته‌اند (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین مناطق و غلظت‌های مختلف برای اثر مهاری رشد باکتری استرپتوکوک پیوژنز عصاره اتانولی ریشه ختمی بر حسب میلی‌متر

غلظت میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	منطقه								میانگین
	ماهان	تهران	اصفهان	یزد	انار	قم	زرند	نایین	بافت
۲۰۰	۱۰/۵	۸	۱۱	۱۴/۵	۱۳/۵	۱۳	۱۰	۱۰	۹	۱۱/۰۵±۰/۳۱[a]
۱۰۰	۷/۵	۶	۷/۵	۱۱/۷۵	۹/۷۵	۱۰	۷	۸	۷	۸/۲۷ ±۰/۳۱[b]
۵۰	۶	۴	۵/۵	۹/۷۵	۷/۵	۷/۵	۶	۵/۷۵	۵	۶/۳۳ ±۰/۳۰[c]
۲۵	۳	۱	۳/۵	۷	۵/۷۵	۶	۳	۳	۲	۳/۸۰ ±۰/۳۳[d]
میانگین	۶/۷۵± ۰/۷۲[c]	۴/۷۵±۰/۷۰ [e]	۶/۸۸± ۰/۷۴[c]	۱۰/۷۵± ۰/۷۳[a]	۹/۱۳±۰/۷۶[b]	۹/۱۳±۰/۷۰[b]	۶/۵±۰/۶۷[c]	۶/۶۹±۰/۶۹ [c]	۵/۷۵±۰/۶۹[d]	

میانگین‌های با حروف انگلیسی مشابه در سطح معنی داری ۰/۰۵، اختلاف معنی‌دار ندارند.

برای به دست آوردن رابطه بین اثر مهاری (قطرهاله عدم رشد) و غلظت عصاره، رگرسیون خطی میانگین قطرهاله عدم رشد (روی کل مناطق) بر روی لگاریتم غلظت رسم گردید که شیب بسیار معنی‌داری را نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱ - رگرسیون میانگین قطرهاله عدم رشد (D) بر روی لگاریتم میانگین غلظت عصاره مناطق مختلف و حدود اطمینان ۹۵٪ پیشگویی آن

آزمایش دوم: نتایج تجزیه واریانس برای غلظت‌های مختلف عصاره ختمی و آنتی‌بیوتیک‌ها در هر منطقه نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارها وجود دارد (جدول ۳).

جدول ۳- آنالیز واریانس مربوط به عصاره ختمی در غلظت‌های مختلف همراه با آنتی‌بیوتیک‌های اریتروومایسین، آموکسی سیلین، پنی‌سیلین در مناطق مختلف

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات								
		ماهان	تهران	اصفهان	یزد	انار	قم	زرند	نایین	بافت
تیمار	۶	۳۲/۲***	۳۲/۲***	۳۰/۲***	۵۱/۳***	۳۹/۴***	۳۸/۴***	۲۴/۸***	۲۴/۸***	۲۸ ***
خطا	۲۱	۰/۸۹	۰/۶۴	۰/۷۳	۰/۸۲	۰/۶۱	۰/۵۴	۰/۷۳	۰/۷۳	۰/۶۹

****: معنی‌دار در سطح احتمال (p=۰/۰۰۱)*

مقایسه میانگین تیمارها در هر منطقه نشان داد اولاً پنی‌سیلین در بین آنتی‌بیوتیک‌ها در تمام مناطق، از دو آنتی‌بیوتیک دیگر اثر بیشتری داشته است و اریترومایسین ضعیف‌ترین آنتی‌بیوتیک بوده است (جدول ۴). از بین مناطق، عصاره یزد بیشترین اثر ممانعت‌کنندگی را بر روی باکتری نشان داده که با نتیجه آزمایش اول مطابقت داشت. عصاره یزد حتی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پنی‌سیلین که قوی‌ترین آنتی‌بیوتیک بوده

برتری داشته و در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با پنی‌سیلین برابری کرده است. در سایر مناطق نظیر ماهان، اصفهان، زرند، نایین و بافت فقط در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با پنی‌سیلین برابری داشته‌اند و انار و قم در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با پنی‌سیلین برابری دارند. منطقه تهران در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر کمتری از پنی‌سیلین داشته ولی در این غلظت اثرش از دو آنتی‌بیوتیک دیگر بیشتر بوده است (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر عصاره ختمی‌در غلظت‌های مختلف و آنتی‌بیوتیک‌ها در مناطق مختلف بر باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز در سطح (α =۰/۰۵) با آزمون مقایسات زوجی دانکن

تیمار	ماهان	تهران	اصفهان	یزد	انار	قم	زرند	نایین	بافت
۲۰۰	۱۰/۵±۰/۶۴^{a}	۸±۰/۴۱^{b}	۱۱ ±۰/۴۱^{a}	۱۴/۵±۰/۶۴^{a}	۱۳/۵±۰/۲۸^{a}	۱۳±۰/۴۰^{a}	۱۰±۰/۴۰^{a}	۱۰ ±۰/۴۰^{a}	۹±۰/۴۱^{a}
۱۰۰	۷/۵±۰/۲۹^{b}	۶±۰/۴۰^{c}	۷/۵ ±۰/۲۸^{b}	۱۱/۷۵±۰/۴۷^{b}	۹/۷۵±۰/۴۷^{b}	۱۰±۰/۴۱^{b}	۷±۰/۵۷^{b}	۸ ±۰/۴۱^{b}	۷±۰/۴۰^{b}
۵۰	۶ ±۰/۴۱^{c}	۴±۰/۴۰^{d}	۵/۵ ±۰/۶۴^{c}	۹/۷۵±۰/۲۵^{c}	۷/۵±۰/۲۸^{c}	۷/۵±۰/۲۹^{c}	۶±۰/۴۱^{bc}	۵/۷۵ ±۰/۴۸^{c}	۵±۰/۴۲^{c}
۲۵	۳ ±۰/۴۱^{d}	۱±۰/۴۱^{e}	۳/۵ ±۰/۲۸^{b}	۷±۰/۴۱^{d}	۵/۷۵±۰/۴۷^{d}	۶/۲۵±۰/۲۵^{d}	۳±۰/۴۱^{d}	۳ ±۰/۴۲^{d}	۲±۰/۴۲^{d}
اریترومایسین (۱۵ میکروگرم در دسی‌لیتر)	۴ ±۰/۴۱^{d}	۴/۲۵±۰/۲۵^{d}	۴/۷۵ ±۰/۲۵^{cd}	۴/۲۵±۰/۴۷^{e}	۴±۰/۴۱^{e}	۴ ±۰/۴۱^{e}	۵±۰/۴۲^{c}	۴ ±۰/۴۰^{d}	۴/۲۵±۰/۲۵^{c}
آموکسی‌سیلین (۲۵ میکروگرم در دسی‌لیتر)	۵/۷۵±۰/۶۲^{c}	۶±۰/۴۰^{c}	۵/۵ ±۰/۵۰^{c}	۵/۵±۰/۵۰^{e}	۶/۷۵±۰/۲۵^{cd}	۵/۵±۰/۵۰^{d}	۶/۷۵±۰/۲۵^{b}	۵/۵ ±۰/۵۰^{c}	۷/۲۵±۰/۲۵^{b}
پنی‌سیلین (۱۰ میکروگرم در دسی‌لیتر)	۱۰±۰/۴۱^{a}	۹/۷±۰/۴۷^{a}	۹/۷۵±۰/۴۷^{a}	۸/۵±۰/۲۹^{c}	۹/۷۵±۰/۴۷^{b}	۹/۷۵±۰/۴۷ ^{b}	۹/۷۵±۰/۴۸^{a}	۹/۲۵±۰/۲۵^{a}	۸/۷۵±۰/۴۷^{a}

در داخل هر منطقه میانگین‌های با حروف انگلیسی مشابه در سطح معنی‌داری ۰/۰۵اختلاف معنی‌دار ندارند.

به طور کلی، عصاره تمامی مناطق به جز تهران حتی در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نسبت به دو آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و آموکسی‌سیلین برتری داشته و یا حداقل اثر یکسانی را داشته‌اند و همچنین، تهران، ضعیف‌ترین اثر و یزد قوی‌ترین اثر را داشت که آزمایش اول نیز این نتیجه را نشان داد.

آزمایش سوم: نتایج حاصل از تعیین MIC عصاره اتانولی ریشه ختمی‌در مناطق مختلف ایران، (همانطوری که در آزمایشات اول و دوم مشاهده شد)، نشان داد که تقریباً تمامی عصاره‌های جمع‌آوری شده بر روی باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز مؤثر بودند به جز نمونه اراک (جدول ۵).

جدول ۵- MIC عصاره اتانولی ختمی‌دارویی جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های مختلف ایران علیه باکتری استرپتوک پیوژنز

	منطقه								
	ماهان	تهران	اصفهان	یزد	انار	قم	زرند	نایین	بافت	اراک
ارتفاع ازسطح دریا*	۱۸۹۳	۱۱۹۰	۱۵۹۰	۱۲۳۰	۱۵۰۰	۹۳۰	۱۵۵۵	۱۸۰۰	۲۲۵۰	۱۷۵۰
(ppm) MIC**	۱۲۵	۵۰۰	۱۲۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۶۲/۵	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰	>۵۰۰

Altitude depending on meter
**** Minimum Inhibitory Concentration***

در این میان، عصاره جمع‌آوری شده از منطقه یزد، کمترین MIC (۳۱/۲۵ ppm) و بیشترین اثر را علیه باکتری از خود نشان داده است. همچنین، بعد از گیاه منطقه یزد گیاه مناطق انار و قم دارای کمترین MIC (۶۲/۵) و بیشترین اثر روی باکتری بودند و نمونه منطقه اراک اثری نشان نداد. در این تحقیق مشاهده شد تأثیر نهایی عصاره‌ها روی باکتری مورد بررسی وابسته به میزان غلظت عصاره و منطقه می‌باشد. یعنی با کاهش میزان غلظت عصاره اثر ضد باکتری کاهش می‌یابد.

بحث

با توجه به تحقیقات فراوان در مورد اثرات ضد میکروبی گیاهان دارویی و مطالعه مکانیسم مهارکنندگی از رشد باکتری‌ها مشخص شده که بیشتر گیاهان دارویی دارای تأثیراتی در حد داروهای سنتزی شیمیایی و یا بیشتر از آن‌ها هستند [۲۶]. تحقیقاتی که در ایران پیرامون نقش عصاره‌های گیاهی بر ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز انجام شده است عصاره‌های خرما در غلظت‌های مختلف [۲۷]، چای سیاه و سبز به عنوان مهار کننده‌های رشد باکتری گزارش شده است [۲۸]. در این تحقیق، اثرات ضد باکتریایی انواع چای به ترکیبات پلی‌فنلی آن‌ها نسبت داده شده است همچنین، اثرات مهاری پلی‌فنل‌های سیب و برخی از گیاهان دیگر نیز گزارش شده است [۲۹]. خاصیت ضد میکروبی عصاره هگزانی ریشه و گل ختمی‌دارویی جمع آوری شده از مناطق شمال غربی ایران نیز روی تعدادی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت (اشرشیاکلی، سودوموناس ائروژنز، کلبسیلا پنومونیه، باسیلوس سوبتلیس، انتروکوکوس فکالیس، استافیلوکوکوس ارئوس و استافیلوکوکس اپی درمیس) و نیز سه قارچ (آسپرژیلوس نایجر، کاندیدیا آلبیکانس و ساکارومایسس سرویزیه) نشان داده شده است [۳۰]. در مطالعه دیگری در پاکستان روی ریشه، گل و برگ ختمی‌دارویی، خاصیت ضد میکروبی این گیاه روی باکتری‌های گرم منفی اشرشیاکلی، سودوموناس ائروژنز و باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس ارئوس نشان داده شد و مشخص شد که بیشترین خاصیت ضد باکتری عصاره‌های ختمی‌دارویی روی باکتری استافیلوکوکوس ارئوس می‌باشد و نیز مشخص شد که باکتری‌های گرم مثبت دارای حساسیت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی در مقابل اثر عصاره‌های گیاهی هستند [۳۱].

این شرایط ممکن است به دلیل تفاوت ترکیبات موجود در دیواره سلولی آن‌ها باشد [۳۲]. احتمال دارد اثر ضد باکتری عصاره اتانولی ریشه ختمی استرپتوکوک پیوژنز، به علت اتصال آن به N- استیل گلوکز آمین موجود در دیواره سلولی باکتری باشد [۳۳]. استفاده از اتانول باعث انحلال بهتر عصاره در آن و استخراج بالاتری از مواد مؤثره گیاه شده و غلظت ماده در تأثیر ضد میکروبی آن مؤثر بود که با تغییر قطرهاله عدم رشد باکتری با افزایش غلظت عصاره به خوبی مطابقت داشت. آنتی‌اکسیدآن‌ها قادرند رادیکالهای آزاد را غیر فعال کنند و فعالیت محافظتی آن‌ها برای بدن ضروری می‌باشد [۳۴]. فلاونوئیدها نیز همراه با آنتی‌اکسیدآن‌ها نقش ضد التهابی، ضد حساسیتی، ضدباکتریایی و ضد ویروسی آن‌ها تائید شده دارند [۳۵]. پلی‌فنل‌های گیاهی با تولید پراکسید هیدروژن، اثرات مهاری خود را بر رشد باکتری اعمال می‌کنند [۳۶]. بنابراین، خاصیت ضدباکتریایی ختمی‌دارویی را می‌توان به وجود این ترکیبات در آن نسبت داد. از آنجا که ختمی‌دارویی گیاهی غنی از آنتی‌اکسیدآن‌ها به شمار

می‌آید و مصرف آنتی‌اکسیدآن‌های سنتتیک می‌تواند باعث ایجاد مسمومیت و سرطان شود [۳۷]، لذا، مصرف این گیاه به دلیل وجود آنتی‌اکسیدآن‌های طبیعی در آن برای مصارف پزشکی توصیه می‌شود.

مهم‌ترین عوامل مؤثر در رشد گیاهان، عوامل اقلیمی هستند و تغییرات اقلیمی تأثیر مهمی بر تولید و میزان ماده مؤثره گیاهان دارویی می گذارد و موجب کمبود یا افزایش این مواد می‌گردد [۳۸]. بیوسنتز فلاونوئیدها، تحت تأثیر عوامل زیست محیطی مانند نور، دما، رطوبت و عناصر غذایی می‌باشد [۳۹]. عوامل خاکی نیز برای گیاهان دارویی اهمیت زیادی دارند. در بین عوامل مربوط به خاک، نقش عناصر غذایی از اهمیت بیشتری برخوردار است، زیرا عناصر غذایی نه تنها در افزایش میزان محصول گیاهان دارویی همانند بقیه گیاهان مؤثرند، بلکه کیفیت محصول تولیدی را نیز تغییر می‌دهند. نتیجه بسیاری از مطالعات تأثیر معنی‌دار تغذیه عناصر روی ساخت فلاونوئید را نشان داده است [۴۰]. شهرستان اراک به لحاظ برخورداری از عوامل آب و هوایی (مانند مجاورت با کویر میقان، وجود ارتفاعات و غیره) دارای نوسانات اقلیمی‌است. بنابراین می‌توان پایین بودن کیفیت ماده مؤثره گیاه را به شرایط اقلیمیو ویژگی خاک آن منطقه نسبت داد. همچنین به نظر می‌رسد که شرایط اقلیمی و نوع خاک مناسب مناطق یزد، انار و قم باعث افزایش کیفیت مواد مؤثره و نیز خاصیت ضد باکتری آن شده است. بنابراین می‌توان از عصاره ریشه ختمی این مناطق در غلظت‌های مناسب در صنایع داروسازی به عنوان یک داروی مهارکننده از رشد باکتری استرپتوکوک پیوژنز، به عنوان جایگزینی مناسب برای داروهای آنتی‌بیوتیکی و سنتزی رایج استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

با توجه به اثرات چشمگیری که در این مطالعه برای عصاره گیاه ختمی‌دارویی مشاهده گردید پیشنهاد می‌شود بررسی‌های جامع‌تری در زمینه اثرات این گیاه دارویی بر سایر میکرو ارگانیزم‌های پاتوژن صورت گیرد. از نتایج به دست آمده نتیجه‌گیری می‌شود که با توجه به تنوع آب و هوایی کشور ایران و رویش گیاهان در مناطق مختلف آن، جهت مصرف گیاهان در پیشگیری و درمان بیماری‌ها باید توجه بیشتری به شناخت بهترین گونه و میزان مواد مؤثره موجود در آن‌ها در مورد هر بیماری نمود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقای دکتر رهنما به دلیل در اختیار قرار دادن فضای پژوهشی مناسب و خانم دره کردی به خاطر حمایت‌های تکنیکی خود تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

[1] Cunnigham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 470-511.

[2] Fox JW, Marcon MJ, Bonsu BK. Diagnosis of streptococcal pharyngitis by detection of streptococcus pyogenes in posterior pharyngeal versus oral cavity specimens. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2593-4.

[3] Feeney KT, Dowse GK, Kiel AD, MacKay C, McClellan D. Epidemiological features and control of an outbreak of scarlet fever in a Perth primary school. *Commune Dis Intel* 2005; 29: 386-90.

[4] Guilherme L, Kalil J, Cunningham M. Molecular mimicry in the autoimmune pathogenesis of rheumatic heart disease. *Autoimmuneity* 2006; 39: 31-9.

[5] Adamek RJ, Suerbaum S, Pfaffenbach B, Opferkuch W. Primary and acquired *Helicobacter pylori* to clarithromycin, metronidazole and amoxicillin-influence on treatment outcome. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(3): 386-9.

[6] Niestani T, Khalaji N. Effect of Black tea on *Streptococcus Pyogenes* and compare with Green tea. *Iranian J Food Sci Technoly* 2007; 1: 41-7.

[7] GençlerÖzkan AM, Uzunhisarcıklı E. Stem and Leaf Anatomy of *Althaea* L. (*Malvaceae*) Species Growing in Turkey. Hacettepe University. *Journal Faculty Pharmacy* 2009; 28.

[8] Plants in Traditional and herbal medicine. Available from http://www.plant-talk.org/Pages/Pfacts10.html.

[9] Beaune A. Anti-inflammatory experimental properties of marshmallow: it's potentiating action on the local effects of corticoids. *Therapies* 1966; 21: 341.

[10] Hoffman D. The New Holistic Herbal. Element Books. 1990.

[11] Zargari A. Plant Medicine. Publication of Tehran University. 1998; pp: 6: 97-682.

[12] Jazaieri GH. Plant treatment.Janzadeh publication. 1999.

[13] Sutovska M, Nosalova G, Sutovsky J, Franova S, Prisenznakova L, Capek P. Possible mechanisms of dose-dependent cough suppressive effect of *Althaea officinalis* rhamnogalacturonan in guinea pigs test system. *International J Biological Macromolecules* 2009; 45: 27-32.

[14] Iauk L, Lo Bue AM, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. *Phytother Res* 2003; 17(6): 599-604.

[15] Elmastas M, Ozturk L, Gokce I, Erenler R, Aboul-Enein Hy. Detremination of antioxidant activity of Marshmallow flower *(Althaea officinalis). Anal Leh* 2004; 37: 1859-69.

[16] Kardosov¨¢ A, Machov¨¢ E. Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides. *Fitoterapia* 2006; 77(5): 73-367.

[17] Kardosava A, Machova E. Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides. *Fitoterapia* 2006; 77: 367-73.

[18] Gudej J. Flavonoids, Phenolic Acids and Coumarins from the Roots of Althaea officinalis. *Planta Med* 1991; 57(3): 284.

[19] Tian QL, Liao SH, Lu Ping, Liu LJ. Spectroscopic study on the interaction of Al^{3+} with flavonoids and BSA. *Chinese J Chem* 2006; 24: 1388-90.

[20] Craig WJ. Health prompting properties of common herbs. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 491-9.

[21] Mlodzinska E. Survey of plant pigments: Molecular and environmental determinants of plant colors. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 2009; 51: 7-16.

[22] Hajimehdipoor H, Amanzadeh Y, Hasanloo T, Shekarchi M, Abedi Z, Pirali Hamedani M. Investigation on the quality of wild licorice roots collected from different regions of Iran. *J Med Plants* 2008; 7(27): 106-14.

[23] Karaman I, Sahin F, Gullule M. Antimicrobial activity of Aqueous and methanol extracts of Juniperus Oxycedrus L. *J Ethanopharmacol* 2003; 85: 231-5.

[24] Okeke MI, Iroegbu GU, Eze EN. Evaluation of extracts of the root of Landolphia Owerrience for antibacterial activity. *J Ethanopharmacol* 2001; 78: 119-27.

[25] Komeili Zadeh H, Hakemi Vala M, Kamali Nejad M, Neshat Ashofteh S. Anti bacterial effect of extract of *Triticum sativum Lam* on $G^+$and G^- Bacteria. *Med Plants* 2008; 28.

[26] Nakhaie Moghadam M, Ramazani M, Khajeh Karam Aldini M, Malak Zadeh F. Antibacterial effect of Methanol extract of Cuminum cyminum L. and Artemisia dracunculus L. on *Helicobacter pylori*. *Iranian J Basic Med Sci*. 2006; 9(3): 193-200.

[27] Hammed M, Sallal AK. Effect of date extract on growth and hemolytic activity of *Streptococcus Pyogenes. New microbial*. 2002; 25(4): 495-97.

[28] Niestani T, Khalagi N. Evaluation of effect of *Camellia sinensis* on *Streptococcus Pyogenes* compare on Green tea in Vitro. *J Food sci Iran* 2007; 2(1): 41-7.

[29] Yanagida A, kanda T, Tanabe M, Matsudaira F, Oliveira Cordeiro JG. Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of mutants *streptococci*. *J Agri Food Chem* 2000; 48: 5666-71.

[30] Valiei M, Shafaghat A, Salimi F. Chemical composition and antimicrobial activity of the flower and root hexane extracts of *Althaea Officinalis* in Northwest Iran. *J Med Plants Res* 2011; 5(32).

[31] Walter C, Shinwari Z, Afzali I, Malik R. Antibacterial activity in herbal products used in Pakistan. *Pak J Bot* 2011; 43: 155-62.

[32] Ahmad I, Beg ZA. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multiresistant human pathogens. *J Ethnopharmacol* 2001; 74: 113-23.

[33] Sadeghi G. Determination of antibacterial affects of *Glycyrrhiza glabra* on *E.coli*, Salmonella *typhi*, *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei.* Thesis No (1249) University of pharmacology sciences of Islamic Azad University. 2003; 11: 91-9.

[34] Atoui AK, Abdelhak M, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions : Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry* 2005; 89: 27-36.

[35] Sathishkumar T, Baskar R, Shanmugam S, Rajeskaran P, Manikandan V. Optimization of flavonoids extraction from the leaves of *Tobernaemotana heyneana* wall using L16 orthogonal design. *Nature Sci*. 2008; 6: 10-21.

[36] Tagashira M, Uchiyama K, Yoshimura T, Shirota M, Uemitsu N. Inhibition by hop bract polyphenols of cellular adherence and water-insoluble glucan synthesis of mutans *streptococci*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; 61: 332-5.

[37] Ashwini P, Krishnamoorthy M. Antioxidant activity of ethanolic extract of Cassi Tora. *International J Rese in Ayurveda &Pharmacy* 2011; 2: 250-2.

[38] Koocheki A, Hoseini M. Agricultural Ecology. *Firdosi Univ Mashad* 2005; 164.

[39] Chatterjee SK, Nandi RP, Bharati P, Yonjan B, Yonzon MK. Improvement studies on some alkaloid yielding medicinal plants. *Med Arom Spice Plants* 1988; 39-46.

[40] Gorinova NI, Atanassov AI. Influence of chemical composition of soils on the galanthamine content in Leucojum aestivum. *J Plant Nutr* 1993; 16: 1631-6.

[41] Yun Ch, Ming-Liang L, Kai L, Lian-Shun F, Su-Jie L, Lan-Ying S, Shuo W, Hui-Yuan G. Synthesis and in vitro antibacterial activity of a series of novel gatifloxacin derivatives. *Euro J Med Chem* 2011; 46: 4267-73.

[42] Sahu SK, Pandeya SN, Pathak AK. Synthesis and antimicrobial evaluations of N-substituted piperazinyl Schiff bases of Gatifloxacin. *Med Chem Drug Dis* 2012; 3(1) 1-10.

[43] Jazayeri SS, Moshafi MH, Firoozpour L, Rajabalian S, Haddad M, et al. Synthesis and antibacterial activity of nitroaryl thiadiazole–gatifloxacin hybrids. *European J Med Chem* 2009; 44: 1205-9.

Antibacterial Effect of Ethanol Extract (*Althaea Officinalis*) on *Streptococcus Pyogenes* Compared with Prevalent Antibiotics In-Vitro

E. Dehghan[1], H. Dashti[2], A. Baghizadeh[3]

Received: 21/08/2012 Sent for Revision: 29/09/2012 Received Revised Manuscript: 02/03/2013 Accepted: 13/05/2013

Background and Objectives: *Streptococcus Pyogene*s causes Impetigo, Scarlet fever and Angina. Marsh mallow (*Althaea officinalis*) is one of medicinal plants in old medicine that has been used for curing the above diseases. Due to health problems related to antibiotics such as drug resistance and disease relapse, this study was conducted to investigate antibacterial activity of ethanol marshmallow root extracts collected from different regions of Iran.

Materials and Methods: In a laboratory study that was conducted in 2012, Roots of *Althaea officinalis* collected from regions Qom, Tehran, Yazd, Anar, Zarand, Esfahan, Arak, Naien, Mahan and Baft and then Extraction procedure was carried out by Maceration method with ethanol then Effect of Different extract concentrations and regions on bacterial growth were compared with one and two-way analysis of variance. Paired means comparison was performed using Duncan's method and MIC of extracts was determined.

Results: Ethanol root extracts had antibacterial activity and inhibition zone had logarithmic response with increase of extract concentration.The highest inhibition zone was in concentration of 200 mg/ml and concentration of 50 mg/ml of yazd extract had same as Penicillin effect.The extract from Yazd region had Minimum of MIC with maximum of antibacterial activity and the extract of Tehran region had Minimum antibacterial activity and there wasn’t any activity from Arak extract.

Conclusion: Results show the effect of extract concentration and region of plant growth on bacterial growth. Therefore, to achieve the best therapeutic effect these issues should be considered.

Key words: Old medicine, Root of *Althaea officinalis*, Ethanol extract, MIC, Antibiotic, Streptococcus Pyogenes.

Funding: This research was funded by International Center for Science, High Technology & Environmental Sciences of Kerman.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of International Center for Science, High Technology & Environmental Sciences of Kerman approved the study.

How to cite this article: Dehghan E, Dashti H, Baghizadeh A. Antibacterial Effect of Ethanol Extract (*Althaea Officinalis*) on *Streptococcus Pyogenes* Compared with Prevalent Antibiotics In-Vitro. *J Rafsanjan Univ Med Scie* 2013; 12(6): 461-74. [Farsi]

1- Master of Agricultural Biotechnology, Kerman graduate University of Technology, Kerman, Iren
(Corresponding Author) Tel: (0391) 5202105, Fax: (0391) 5228497, E- mail: Elhem Dehghan50@yahoo.com
2- Associate Prof., Faculty of Agriculture, Vali-e- ASR Universit ofy, Rafsanjan, Rafsanjan,.Iran
3- Assistant Prof., International Center For Science, High Technology & Environmental Science, Kerman, Iren