DOI: 10.22092/vj.2017.109599.1271
شماره ۱۱۸ بهار ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره آبی، عصاره اتانولی و اسانس گلپر بر روی سالمونلا تیفی‌موریوم جدا شده از طیور

• علی مقصودی (نویسنده مسئول)
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، گروه بیوانفورماتیک، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، دانشگاه زابل
• سعیده سعیدی
پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، دانشگاه زابل
• سیده راضیه موسوی
گروه گیاهان دارویی، دانشگاه زابل
تاریخ دریافت: ۲۴-۱۱-۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۲۳-۰۵-۱۳۹۶
Email: Alimaghsoudi@uoz.ac.ir

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره آبی، عصاره اتانولی و اسانس گلپر بر روی باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم *(Salmonella typhimurium)* جدا شده از طیور بود. عصاره و اسانس گیاه گلپر به ترتیب با استفاده از دستگاه خلاء از مرکز (روتاری) و کلونجر بدست آمد. تعداد ۱۲ سویه *S. typhimurium* از طیور بومی در شهرستان زابل جداسازی شد. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی، اتانولی و اسانس گیاه گلپر، با تهیه‌ی غلظت‌های مختلف از آنها به روش رقت‌سازی در چاهک و بررسی اثر غلظت‌های مختلف بر روی رشد باکتری‌ها، تعیین شد. حساسیت سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها با روش استاندارد دیسک دیفیوژن کربی- باثر مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که از بین اسانس، عصاره آبی و عصاره اتانولی گلپر، اسانس بیشترین اثر مهارکنندگی را برروی *S. typhimurium* دارد و همچنین بیشتر سویه‌های *S. typhimurium* در تمام رقت‌های اسانس گیاهی آن از بین رفته‌اند، در حالی که عصاره آبی کمترین اثر مهارکنندگی را داشته است. بیشترین غلظت مهارکننده اسانس گلپر در رقت ۵ ppm بود و عصاره اتانولی در رقت ۲۵ ppm و عصاره آبی در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ ppm مهارکننده بیشتر سویه‌ها بودند. بیشترین غلظت کشندگی نیز برای اسانس، عصاره اتانولی و آبی به ترتیب برابر با ۲۰، ۲۰۰ و ۲۰۰ ppm بود. نتایج این مطالعه بیانگر اثرات ضدمیکروبی مناسب اسانس و عصاره اتانلی گلپر بود و می‌توان از آنها به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های متداول، برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری استفاده کرد.

کلمات کلیدی: فعالیت ضدمیکروبی، گلپر، گیاهان دارویی، اسانس، طیور

Veterinary Researches & Biological Products No 118 pp: 65-73

Antimicrobial effects of aqueous extract, ethanol extract and essential oil of Golpar on *Salmonella typhimurium* isolated from poultry

By: Maghsoudi A., (Corresponding Author), Member of Sientific Board of University of Zabol; Saeedi S., Center of Agricultural Biotechnology, University of Zabol; Mousavi SR., Department of Medicinal Plants, Faculty of Agriculture, University of Zabol.

Email: Alimaghsoudi@uoz.ac.ir

Received: 2017-02-12 **Accepted: 2017-08-14**

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effects of aqueous extract, ethanol extract and essential oil of Golpar on *Salmonella typhimurium* isolates from poultry. Plant extracts and essential oils of Golpar were obtained using vacuum from the center (Rotary) and Clevenger. Total number of 12 *S. typhimurium* strains were isolated from native poultry in the city of Zabol. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of aqueous and ethanol extract and essential oil of Golpar were determined using preparation of different concentrations by dilution in wells method and determination of different concentrations on growth of bacteria. Susceptibility to several antibiotics was evaluated by the Kirby-Bauer disk diffusion standard method. The results of the present study showed that among the essential oil, aqueous extract and ethanol extract of Golpar, the essence have shown highest inhibitory effect on *S. typhimurium*, while the aqueous extracts have less inhibitory effects on most of the strains of *S. typhimurium.* The MIC of essential oil was on 5 ppm dilution but for ethanol extract was on 25 ppm and for aqueous extract was on 50 and 100 ppm. The MBC for essential oil, ethanol and aqueous extracts of Golpar were 20, 200 and 200 ppm, respectively. The results showed relevant antibacterial activity of Golpar extracts and essential oil, which can be used for treatment of infections due to the *S. typhimurium,* instead of common antibiotics.

Key words: Antibacterial activity, *Heracleum persicum,* Medicinal herbs, Essential oil, Poultry

مقدمه

در سال‌های اخیر تمایل به طب سنتی و داروهایی که در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرند به شکل چشمگیری در دنیا رواج پیدا کرده است (۱). امروزه مراکز درمانی متعددی در کشورهای توسعه‌یافته مستقر شده‌اند که بخصوص بر اساس آموزه‌های طب سنتی شرقی (چین و هند) به درمان بیماران می‌پردازند (۲ و ۳). اساس طب سنتی استفاده از ترکیبات طبیعی موجود در طبیعت ازجمله گیاهان دارویی (Medicinal Herbs) می‌باشد و از این رو به این شیوه درمان بیماری‌ها، طب گیاهی (Herbal Medicine) نیز گفته می‌شود (۴-۶). هرچند طب سنتی ایران در گذشته دارای جایگاه رفیعی بود، اما روش‌های درمانی و محصولات طب سنتی ایران هنوز به درستی عرضه نشده و در بازار جهانی جایگاه مناسبی پیدا نکرده است. با وجود این، مصرف گیاهان دارویی از دیرباز در طب سنتی ایران رایج بوده و در سال‌های اخیر نیز استفاده از آنها در داخل کشور افزایش قابل‌توجهی یافته است (۷ و ۸). مطالعات اخیر با استفاده از خواص گیاهان دارویی و آموزه‌های طب سنتی ایران نیز نتایج امیدوارکننده‌ای در درمان برخی بیماری‌ها نشان داده است. کشور ایران به دلیل شرایط جغرافیایی و تنوع اقلیمی منحصر به فرد، موطن گونه‌های گیاهان دارویی بیشماری است و در بین این خزانه غنی گیاهان دارویی، برخی از گیاهان تنها در ایران وجود داشته و از این رو می‌توانند به‌عنوان یک مزیت نسبی برای تولید انحصاری برخی داروهای گیاهی مورد توجه قرار گیرند (۹).

گلپر ایرانی *(Heracleum persicum)* گیاهی دارویی است و در زبان فارسی نام دیگر آن انگدان می‌باشد ولی عده‌ای آن را معرب کرده، انجدان نامیده‌اند. در برخی منابع به این گیاه Angelina نیز گفته می‌شود که ممکن است از اسم عربی آن گرفته شده باشد. در جنوب رشته کوه البرز به دانه گیاه اَلَرگ، گلپر گفته می‌شود (۱۰ و ۱۱). این گیاه، بومی ایران است و در قرن ۱۸ میلادی از ایران به مناطق محدودی از شبه جزیره اسکاندیناوی (نروژ) برده شده است (۱۲ و ۱۳). گلپر، گیاهی کوهستانی و پایا است. این گیاه دارای ساقه‌ای ضخیم و توخالی، منشعب و دارای شاخه‌هایی منتهی به گل آذین چتری با ارتفاع بیش از ۱۵۰ cm و برگ‌های بسیار پهن است. زیست‌گاه طبیعی این گیاه در کشور ایران مناطق مرتفع و مرطوب کوهستانی به خصوص دامنه جنوبی البرز، بخشی از دامنه

شمالی البرز، آذربایجان و فارس است. بخش دارویی گیاه گلپر، دانه آن است که در ابتدای فصل تابستان برداشت شده و قبل از استفاده خشک می‌شود.

در طب سنتی ایران از گلپر به‌عنوان داروی ضدعفونی کننده، ضددرد، ضدسوء هاضمه و ضدنفخ استفاده می‌شود. گلپر دارای اثرات ضدمیکروبی زیادی است (۱۴) و از دود حاصل از سوختن دانه خشک شده گلپر به‌همراه اسپند برای ضدعفونی کردن محیط استفاده می‌شود. دانه‌های گلپر به‌عنوان ادویه و همچنین دانه‌ها و ساقه‌های آن به‌عنوان عامل طعم‌دهنده برای تهیه خیار شور و ترشیجات مورد استفاده قرار می‌گیرد. البته استفاده بیش از حد گلپر در زنان باردار موجب سقط جنین می‌گردد.

سالمونلا یک باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه (Enterobacteriaceae) است و سالمونلوز (Salmonellosis) از جمله مهم‌ترین بیماری‌های عفونی شایع و مشترک بین انسان و حیوان می‌باشد که توسط گونه‌های مختلف باکتری سالمونلا ایجاد می‌شود (۱۵). باکتری *S. typhimurium* به همراه *S. enteritidis* گونه‌های مهم سالمونلا هستند که از ویژگی‌های مهم آنها توانایی باقی‌ماندن به شکل قابل‌تکثیر و زنده به مدت طولانی در محیط و نمونه‌های غذایی است (۱۶). این باکتری یکی از عوامل مهم زیستی است که در تاریخ به منظور خرابکاری‌های عمدی از طریق آلوده‌سازی آب و غذا از آن استفاده شده است (۱۷). باکتری سالمونلا، گسترش جغرافیایی وسیعی دارد و در اقلیم‌های متنوعی قادر به زیستن بوده و توانایی ایجاد عفونت در طیف وسیعی از موجودات زنده از جمله انسان را دارد. سبزیجات، فرآورده‌های لبنی، مواد گوشتی و به‌ویژه تخم مرغ و فرآورده‌های جانبی آن از جمله مهمترین منابع شیوع آلودگی سالمونلا به شمار می‌آیند (۱۸).

بیش از ۷۰ سال از شروع استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در خوراک دام و طیور به‌عنوان محرک رشد می‌گذرد. به ویژه در حیوانات تک‌معده‌ای، مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها با کاهش جمعیت میکروبی مضر دستگاه گوارش، موجب بهبود ضریب تبدیل خوراک (Feed Conversion Ratio) می‌شود (۱۹). از همان سال‌های ابتدایی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها به‌صورت افزودنی برای بهبود عملکرد رشد، برخی پژوهشگران در مورد خطرات ناشی از مصرف اندک و در عین حال بلند مدت آنتی‌بیوتیک‌ها هشدار داده بودند. در مورد بسیاری از عوامل آلوده‌کننده محصولات غذایی با منشاء دامی، از جمله سالمونلا، پیدایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی (Antibiotic Resistance) به یک مشکل جهانی تبدیل شده است. باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌ها از طریق مصرف مواد غذایی به انسان منتقل شده و منجر به مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در انسان می‌گردد (۲۰ و ۲۱). در سال‌های اخیر با پیشرفت علوم و توجه بیشتر به مسئله بهداشت فردی و اجتماعی، استفاده از مواد دارویی رو به افزایش است. اما با توجه به اثرات جانبی، قیمت بالا، تولید انحصاری در برخی کشورها و دشواری تولید مواد شیمیایی دارویی، استفاده از گیاهان دارویی که دارای عوارض جانبی کمتر و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر هستند، مورد توجه قرار گرفته است (۲۱). در این راستا، تحقیقات بر روی اثرات ضدمیکروبی گیاهان مختلف اهمیت خاصی یافته است و این امید وجود دارد تا دست‌کم در خوراک دام و طیور بتوان از گیاهان دارویی به‌عنوان محرک رشد و جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده نمود. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره آبی، عصاره اتانولی و اسانس دانه گیاه گلپر بر روی *S. typhimurium* جداشده از طیور منطقه سیستان است.

مواد و روش‌ها

تهیه دانه گیاه گلپر و عصاره‌های آبی و اتانولی

دانه گیاه گلپر در تابستان ۱۳۹۴ از نواحی جنوبی رشته کوه البرز واقع در روستای دیزان از توابع شهرستان طالقان جمع‌آوری شده و در سایه و دمای اتاق خشک گردید. برای تهیه عصاره اتانولی و آبی، مقدار ۱۰ g پودر خشک دانه گیاه به‌طور جداگانه در داخل ارلن‌هایی با حجم ۵۰۰ mL و حاوی ۱۰۰ mL اتانول ۹۶ درصد (برای تهیه عصاره اتانولی) و آب مقطر (برای تهیه عصاره آبی) قرار داده شد. محتوی ارلن‌ها به مدت ۲۴ h در دمای اتاق توسط دستگاه شیکر (Pars Azma- ایران) مخلوط شده، سپس به وسیله کاغذ واتمن شماره دو صاف گردید. جداسازی حلال از عصاره توسط دستگاه روتاری (Heidolph- آلمان) و با کمک پمپ خلاء (تقطیر در خلاء) انجام گرفت. عصاره به دست آمده وزن شده سپس در حلال DMSO حل شد. به منظور جلوگری از خاصیت میکروب‌کشی DMSO، این ماده به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق گردید. عصاره بدست آمده تا زمان استفاده در آزمایشات ضدمیکروبی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد.

تهیه اسانس

یکی از ویژگی‌های گیاه گلپر حجم قابل توجه اسانس آن می‌باشد. استخراج اسانس گیاهی گلپر با استفاده از روش تقطیر با بخار آب و به کمک دستگاه کلونجر انجام شد. برای این کار، مقدار ۶۰ g از پودر خشک گیاه در یک بالن با حجم ۲ L ریخته شد و حدود دو سوم حجم بالن آب مقطر اضافه گردید. بالن به دستگاه کلونجر متصل شد تا عمل تقطیر به مدت ۴ h انجام شود. پس از استخراج اسانس، عمل آب‌گیری انجام گردید و اسانس به دست آمده تا زمان استفاده در آزمایشات ضدمیکروبی، در یک ظرف دربسته تیره‌رنگ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری گردید.

جداسازی باکتری

نمونه‌های مدفوع طیور در سال ۱۳۹۳ از منطقه سیستان، شهرستان زابل جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها به مدت ۶ h در محیط نگه‌داری شده، سپس به محیط‌های کشت انتخابی سالمونلا شیگلا آگار و سیمون سولفیت آگار انتقال یافتند و در ادامه به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. با کمک آزمون‌های بیوشیمیایی و محیط‌های کشت افتراقی MRVP، TSI، لیزین آیرون آگار، سیمون سیترات و اوره، در مجموع ۱۲ سویه باکتری *S. typhimurium* جداسازی گردید.

تهیه سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، ابتدا ۲۴ h قبل از انجام آزمایش، باکتری از کشت ذخیره به محیط کشت شیب‌دار آگار مغذی تلقیح شد. پس از رشد کلنی‌های باکتری، سطح محیط کشت با محلول نرمال

سالین شستشو داده شد تا سوسپانسیون غلیظ میکروبی حاصل گردد. سپس مقداری از سوسپانسیون باکتری، داخل لوله استریل دربدار حاوی محلول نرمال سالین ریخته شده و کدروت آن از طریق اندازه‌گیری جذب با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Unico- آمریکا) در طول موج ۶۳۰ nm اندازه‌گیری شد و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ مک فارلند، با محلول نرمال سالین رقیق گردید. بدین ترتیب سوسپانسیون باکتری با غلظت 1×10^{8} cfu/mL تهیه گردید.

تعیین حساسیت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم

با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن کربی- بائر (Kirby-Bauer Disk Diffusion)، حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و پنی‌سیلین (پادتن طب، ایران) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، در ابتدا از تمام سویه‌های باکتری، غلظت ۰/۵ مک فارلند در محیط مایع آبگوشتی مولر هینتون (Muller-Hinton Broth, MHB) تهیه و سپس بر روی محیط آگار مولر هینتون (Muller-Hinton Agar, MHA) پخش و کشت داده شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی در فاصله مناسب از یکدیگر قرار گرفتند و پلیت‌ها به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفته و هاله‌های بازدارنده جهت ارزیابی و تعیین مقاومت و حساسیت سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر، مشخص شد. این آزمایش در سه تکرار انجام گردید.

تعیین میزان حساسیت ۱۲ سویه *S. typhimurium* نسبت به عصاره آبی، عصاره اتانولی و اسانس گلپر

تعیین حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به عصاره و اسانس گیاه گلپر با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک انجام شد. در محیط کشت جامد تعداد شش چاهک ایجاد شد و به هر چاهک مقدار ۱۰۰ µL از محیط مایع آبگوشتی مولر هینتون (MHB) اضافه شد. سپس به چاهک اول ۱۰۰ µL از محلول رقیق شده عصاره گلپر اضافه شده و پس از مخلوط کردن ۱۰۰ µL از چاهک اول برداشته به چاهک دوم اضافه کرده و بدین ترتیب تا آخرین چاهک این کار انجام شد. از چاهک آخر ۱۰۰ µL محیط کشت خارج کرده، مقدار ۱۰ µL از سوسپانسیون میکروبی حاوی 10^{8} واحد در mL معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه شده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ h قرار گرفت. اولین چاهکی که پس از قرار دادن در انکوباتور از رشد باکتری جلوگیری کرده بود، به‌عنوان حداقل غلظت مهارکننده (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) در نظر گرفته شد. برای اطمینان، از چاهک‌های شفاف ۱۰ µL برداشته به محیط مولر هینتون آگار منتقل گردید و پس از ۲۴ h اولین رقتی که توانست ۹۹/۹ درصد باکتری را از بین ببرد به‌عنوان حداقل غلظت باکتری‌کشی (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) در نظر گرفته شد. این آزمایش در سه تکرار انجام گردید.

نتایج

در جدول ۱، الگوی شدت بازدارندگی ۱۲ سویه باکتری *S. typhimurium* در غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی و عصاره آبی گیاه گلپر نشان داده شده است. سویه‌های ۵، ۷، ۹، ۱۰ و ۱۲، در غلیظ‌ترین عصاره آبی (۲۰۰ ppm) نیز رشد قابل توجهی نشان دادند، در حالی‌که سویه‌های ۸ و ۱۱ رشد کمی داشته و در سایر سویه‌ها رشد باکتری متوقف شده بود. این در حالی‌است که در مجاورت غلیظ‌ترین عصاره اتانولی (۲۰۰ ppm) تنها سویه‌های ۹ و ۱۰ رشد زیاد و سویه ۱۲ رشد اندکی نشان دادند. در حقیقت هیچ‌یک از عصاره‌های آبی و اتانولی بر سویه‌های ۹ و ۱۰ *S. typhimurium* اثر مهاری نشان ندادند. در رقیق‌ترین رقتِ هر دوی عصاره آبی و اتانولی (۶/۲۵ ppm)، تمامی ۱۲ سویه رشد زیادی نشان دادند. بنابراین رقیق کردن عصاره‌ها تا ۶/۲۵ ppm تاثیر مهاری بر روی باکتری ندارد. همچنین در رقت ۱۲/۵ ppm بیشتر نمونه‌های رشد قابل ملاحظه‌ای داشتند و تنها تعداد کمی از آنها (سویه‌های ۲ و ۴) در مجاورت عصاره اتانولی کاهش رشد نشان دادند.

عصاره آبی گلپر تنها در رقت‌های ۲۰۰ و ۱۰۰ ppm خاصیت باکتری‌کشی نشان داد در حالی‌که عصاره اتانولی تا رقت ۲۵ ppm نیز خاصیت ضدباکتری خود را حفظ کرده بود؛ بطوری‌که سویه‌های ۲ و ۴ باکتری، کمترین مقاومت را نسبت به خاصیت میکروب‌کشی عصاره داشتند و حتی در رقت ۲۵ ppm عصاره اتانولی نیز رشدشان متوقف شده بود. هرچند در رشد سویه‌های ۵ و ۷ باکتری در مجاورت رقت ۲۰۰ ppm عصاره آبی تغییری حاصل نشد، اما همین سویه‌ها در مجاورت رقت مشابه عصاره اتانولی کشته شدند.

برای محاسبه درصد حساسیت باکتری (MIC و MBC)، از نتایج مندرج در جدول ۱ استفاده شد. درصد MIC نشان‌دهنده میزان مهار رشد باکتری در مجاورت عصاره یا اسانس می‌باشد و درصد MBC رقتی از عصاره یا اسانس را نشان می‌دهد که در آن رشد باکتری به‌طورکامل متوقف شده است. به‌عنوان نمونه حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آبی در غلظت ۲۰۰ ppm بر *S. typhimurium*، تنها رشد دو سویه ۸ و ۱۱ کاهش یافت (مهار شد) که در جدول ۱ با علامت + نشان داده شده است. بنابراین تعداد دو سویه از مجموع ۱۲ سویه، معادل ۱۶/۷ درصد کل سویه‌ها می‌باشد که در جدول ۳ نشان داده شده است. برای حداقل غلظت کشندگی نیز از مجموع ۱۲ سویه که در معرض ۲۰۰ ppm عصاره آبی قرار گرفته بودند، رشد ۵ نمونه به‌طور کامل متوقف شد (علامت -) که معادل ۴۱/۷ درصد سویه‌ها می‌باشد. به‌طورکلی، در جداول ۲ و ۳، درصد حساسیت باکتری *S. typhimurium* به ترتیب نسبت به رقت‌های مختلف عصاره آبی و اتانولی گیاه گلپر نشان داده شده است. مهار رشد باکتری در رقت‌های ۲۰۰ (۱۶/۷ درصد)، ۱۰۰ (۱۶/۷ درصد) و ۵۰ ppm (۲۵ درصد) عصاره آبی گلپر مشاهده شد، در حالی که در رقت‌های ۲۵، ۱۲/۵ و ۶/۲۵ ppm هیچ‌گونه مهاری روی باکتری صورت نگرفت و هر ۱۲ سویه باکتری رشد کامل نشان دادند. در غلظت ۵۰ ppm عصاره آبی، مهار رشد باکتری نسبت به غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm بیشتر بود که به دلیل عدم خاصیت باکتری‌کشی عصاره آبی در غلظت ۵۰ ppm می‌باشد. در غلظت ۵۰ ppm عصاره آبی گلپر، سویه‌های ۲، ۳ و ۶ باکتری که در غلظت‌های بالاتر کشته شده بودند، تنها کاهش رشد نشان دادند. برای عصاره آبی گلپر تنها غلظت‌های ۲۰۰ و ۱۰۰ ppm خاصیت باکتری‌کشی (MBC) به ترتیب به میزان ۴۱/۷ و ۲۵ درصد نشان دادند (جدول ۲).

در مطالعه حاضر با بررسی درصد حساسیت سویه‌های باکتری

جدول ۱- الگوی شدت بازدارندگی سویه‌های باکتری *S. typhimurium* در غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی (چپ) و عصاره آبی (راست) گیاه گلپر

	رقت‌های عصاره آبی/اتانولی (ppm)					
سویه باکتری	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵
S. typhimurium 1	–/–	+/–	–/++	+/++	++/++	++/++
S. typhimurium 2	–/–	–/–	–/+	–/++	+/++	++/++
S. typhimurium 3	–/–	–/–	–/+	+/++	++/++	++/++
S. typhimurium 4	–/–	–/+	–/++	–/++	+/++	++/++
S. typhimurium 5	–/++	–/++	+/++	++/++	++/++	++/++
S. typhimurium 6	–/–	–/–	–/+	+/++	++/++	++/++
S. typhimurium 7	–/++	–/++	+/++	++/++	++/++	++/++
S. typhimurium 8	–/+	+/++	++/++	++/++	++/++	++/++
S. typhimurium 9	++/++	++/++	++/++	++/++	++/++	++/++
S. typhimurium 10	++/++	++/++	++/++	++/++	++/++	++/++
S. typhimurium 11	–/+	+/++	++/++	++/++	++/++	++/++
S. typhimurium 12	+/++	++/++	++/++	++/++	++/++	++/++

++ نشان‌دهنده رشد زیاد در سویه‌های مختلف *S. typhimurium*

+ نشان‌دهنده رشد کم در سویه‌های مختلف*S. typhimurium*

- نشان‌دهنده عدم رشد در سویه‌های مختلف*S. typhimurium*

S. typhimurium n سویه‌های مختلف *S. typhimurium*جدا شده از طیور

جدول۲- الگوی حساسیت سویه‌های مختلف *S. typhimurium* نسبت به رقت‌های مختلف عصاره آبی گلپر

سری رقت (ppm)	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵
MIC (درصد)	۸/۳	۱۶/۶	۱۶/۶	۲۵	۱۶/۶	۰
MBC (درصد)	۷۵	۵۸/۳	۴۱/۷	۱۶/۷	۰	۰

S. typhimurium نسبت به رقت‌های مختلف عصاره اتانولی گلپر، نشان داده شد که عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی، در دامنه بیشتری از رقت‌ها خاصیت مهاری و کشندگی دارند (جدول ۳). رقت ۶/۲۵ ppm عصاره اتانولی خاصیت کشندگی یا مهارکنندگی نشان نداد (همه باکتری‌ها در این رقت رشد کامل داشتند). همچنین رقت ۱۲/۵ ppm عصاره اتانولی گلپر نیز خاصیت کشندگی نشان نداد. مطابق انتظار، بیشترین درصد کشندگی عصاره اتانولی گلپر در غلظت ۲۰۰ ppm عصاره بود. به دلیل مرگ ۷۵ درصد از باکتری‌ها در این غلظت درصد MIC برای غلظت ۲۰۰ ppm مقدار کمی بدست آمد (۸/۳ درصد). عصاره اتانولی گلپر در DMSO حل شد و با توجه به جدول ۳، عدم وجود خاصیت مهارکنندگی یا کشندگی عصاره و رشد کامل تمامی ۱۲ سویه *S. typhimurium* در غلظت ۶/۲۵ ppm (که حاوی DMSO نیز بود) نشان می‌دهد ماده DMSO رقیق شده در این مطالعه خاصیت باکتری‌کشی نداشت.

در جدول ۴، حساسیت ۱۲ سویه باکتری *S. typhimurium* نسبت به رقت‌های مختلف اسانس گلپر نشان داده شده است. چنانچه مشاهده می‌شود، به دلیل خواص ضدباکتریایی قوی‌تر، اسانس گلپر به میزان ۱۰ برابر رقیق‌تر از عصاره‌های آبی و اتانولی مورد استفاده قرار گرفت. بیشترین غلظت کشندگی اسانس گلپر در ppm ۲۰ بود (۵۸/۳ درصد) و در رقت‌های ۱/۲۵ و ۰/۶۳ ppm خاصیت کشندگی نشان نداد. همچنین در رقت ۵ ppm، بیشترین خاصیت مهاری اسانس گلپر دیده شد که به کشندگی نسبتاً کم اسانس در این رقت (۱۶/۶ درصد) برمی‌گردد.

بحث

اسانس‌های گیاهی به کمک روش‌های متنوعی موجب جلوگیری از رشد باکتری‌ها می‌شوند. به‌طور کلی خاصیت ضدمیکروبی اغلب اسانس‌ها به خاصیت هیدروفوبیک آنها و تاثیر آنها بر ساختار دیواره سلولی میکروب بستگی دارد. افزایش مقدار برخی یون‌ها بر روی و یا داخل غشا پلاسمایی نیز تاثیر قابل‌توجهی بر نیروی محرکه پروتون‌ها، میزان ATP درون سلولی و بطورکلی متابولیسم میکروب‌ها دارد. در اغلب مطالعاتی که بر روی مکانیسم عمل ترکیبات باکتری‌کش موجود در اسانس‌ها از جمله ترکیبات فنولیک انجام شده است، به‌طور عمده تاثیر آنها بر غشاء باکتری مورد توجه قرار گرفته است. در حقیقت ترکیبات فنولی نه تنها به ساختمان غشاء سیتوپلاسمی حمله می‌کنند، بلکه با تاثیر بر عملکرد غشاء، موجب تخریب قابلیت نفوذپذیری غشاء شده و نیز با آزاد شدن اجزای اصلی داخل سلول موجب مرگ میکروب می‌شوند. همچنین ترکیبات فنولی می‌توانند در عملکرد باکتری در انتقال الکترون، جذب مواد مغذی و سنتز DNA نیز اختلال ایجاد کنند (۲۲). با توجه به اینکه ترکیبات روغنی گیاه در حلال‌هایی آلی حل می‌شوند، به نظر می‌رسد بخش قابل توجهی از ترکیبات باکتری‌کش محلول در الکل می‌باشد و توسط اتانول شستشو داده شده و در عصاره اتانولی جمع می‌گردند. به همین دلیل در مطالعه حاضر، حساسیت سویه‌های مختلف باکتری *S. typhimurium*، وضعیت نسبتاً مشابهی بین عصاره اتانولی گلپر و اسانس این گیاه مشاهده گردید، هرچند غلظت اسانس ده برابر کمتر از غلظت عصاره بود. خاصیت کشندگی و مهاری بالاتر اسانس در حقیقت به خلوص بالاتر آن ارتباط پیدا می‌کند، زیرا حرارت دادن به پودر گیاه در محیط آبی موجب خروج ترکیبات روغنی و فرار آن می‌شود، درحالی‌که ممکن است عصاره ناخالصی هم داشته باشد.

با توجه به اینکه ترکیبات مهم و دارویی که وارد اسانس می‌شوند فرار می‌باشند، باید اسانس‌گیری از گیاه تازه انجام گردد. چنانچه در مطالعه حاضر حدود ۵۰ mL اسانس از هر کیلوگرم دانه آسیاب شده گلپر بدست آمد که در دانه‌هایی که تازه برداشت نشده بودند، این مقدار به نصف کاهش یافت. در مطالعه ترکیب شیمیایی و خواص باکتریایی اسانس

جدول ۳- الگوی حساسیت سویه‌های مختلف *S. typhimurium* نسبت به رقت‌های مختلف عصاره اتانولی گلپر

سری رقت (ppm)	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵
MIC (درصد)	۸/۳	۱۶/۶	۱۶/۶	۲۵	۱۶/۶	۰
MBC (درصد)	۷۵	۵۸/۳	۴۱/۷	۱۶/۷	۰	۰

جدول ۴- الگوی حساسیت سویه‌های مختلف *S. typhimurium* نسبت به رقت‌های مختلف اسانس گلپر

سری رقت (ppm)	۲۰	۱۰	۵	۲/۵	۱/۲۵	۰/۶۳
MIC (درصد)	۱۶/۶	۱۶/۶	۵۰	۸/۳	۸/۳	۰
MBC (درصد)	۵۸/۳	۴۱/۷	۱۶/۶	۸/۳	۰	۰

حاصل از بخش‌های هوایی گلپر، نتایج حاصل از آنالیز فیتوشیمیایی نشان داد که ۴۶ ترکیب مختلف در بخش هوایی گیاه گلپر وجود دارند، که اُکتیل بوتانوات (۳۶/۸۲ درصد)، هگزیل بوتانوات (۱۶/۰۸ درصد)، ۱-اُکتانول (۱۳/۶۲ درصد) و اُکتیل هگزانوات (۸/۱۰ درصد) اجزای اصلی اسانس گلپر بوده و از گروه استرهای آلیفاتیک می‌باشند (۲۳). ممکن است در برخی گیاهان تنها امکان استحصال عصاره وجود داشته باشد و اسانس آن‌ها قابل استخراج نباشد یا به‌طورکلی اسانسی نداشته باشند. گلپر از جمله گیاهانی است که هم عصاره و هم اسانس قابل توجهی دارد و امکان مقایسه خواص ضدباکتریایی آنها مطابق مطالعه حاضر وجود دارد.

مطالعات متعددی برای یافتن گیاهان دارویی موثر و بررسی مکانیسم اثر آنها بر باکتری سالمونلا انجام گرفته است (۲۴ و ۲۵). در یک مطالعه خواص ضدباکتریایی عصاره گیاه خوشالیزه *(Echinophora platyloba)* علیه سویه‌های مختلف سالمونلا بررسی شد (۲۶). در مطالعه مزبور، خواص کشندگی و مهارکنندگی عصاره گیاه خوشالیزه بر روی سویه *S. typhimurium* کمتر از *S. enteritidis* و بیشتر از *S. choleraesuis* بود. البته این امکان نیز وجود دارد که مطابق با یافته‌های مطالعه حاضر، مواد موثره موجود در گیاهان دارویی بر روی سویه‌های مختلف یک گونه نیز تاثیر مشابهی نداشته باشند. لذا با توجه به اینکه معمولاً بیش از یک سویه از باکتری موجب ایجاد عفونت در انسان و دام می‌گردد، به نظر می‌رسد برای یافتن مناسب‌ترین دز اسانس یا عصاره گیاه دارویی علیه باکتری‌های بیماری‌زا، باید طیف وسیع‌تری از باکتری‌های بیماری‌زا به‌طور همزمان مورد مطالعه قرار گیرند (۲۶).

مطالعات متعددی در تایید خواص ضدباکتریایی اسانس بخش هوایی و بخصوص دانه گیاه گلپر منتشر شده است. در بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس بخش هوایی یکی از گونه‌های گیاه گلپر *(H. sibiricum)* بر روی باکتری‌های بیماری‌زا در انسان، نشان داده شد که اسانس مزبور بر روی باکتری‌های گرم مثبت تاثیر باکتری‌کشی بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی دارد؛ همچنین نشان داده شد که رقت اسانس گلپر در دامنه ۲۴۳۱/۲ تا ۹۷۳۴/۸ µg/mL دارای خواص مهاری (MIC) و کشندگی (MBC) علیه سویه‌های مختلف باکتری‌هاست، در حالی که رقت ۰/۵ تا ۱۶/۰ µg/mL تاثیری بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ندارد (۲۳). نتایج مطالعه نائینی و همکاران (۱۳۹۰) نیز نشان داد که قطر هاله مهاری عصاره اتانولی و اسانس گلپر در برابر باکتری *Candida albicans* به‌ترتیب برابر با ۱۸ و ۲۲ mm بود (۲۷)، که نشان‌دهنده تأثیر مهاری بیشتر اسانس نسبت به عصاره گلپر می‌باشد و با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. در مطالعه دیگری که بر روی خواص ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی گلپر ایرانی *(H. persicum)* بر روی گونه کاندیدیا (Candida) صورت گرفت، نشان داد که مجاورت باکتری با عصاره به مدت ۲۴ و ۴۸ h موجب از دست رفتن قابلیت رشد بخش قابل توجهی از باکتری‌ها می‌گردد (۲۸). مقایسه نتایج مطالعه اخیر و مطالعه حاضر نشان می‌دهد که عصاره یا اسانس حاصل از گیاه گلپر نمی‌تواند به‌طور کامل موجب توقف رشد یا مرگ باکتری‌های بیماری‌زا شود و ممکن است استفاده توأم آن با اسانس یا عصاره سایر گیاهان دارویی دیگر که خواص ضد باکتریایی دارند یا به عنوان یک مکمل در درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها مفید باشد.

در بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس حاصل از هفت گیاه بومی ایران درجات مختلفی از خاصیت باکتری‌کشی علیه باکتری‌های دهان انسان گزارش شده است (۲۹)، که علت فعالیت ضدباکتریایی آنها وجود ترکیبات فنولی و مونوترپن‌های الکلی عنوان شده است. در بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره‌های اتانولی و متانولی فلفل بتل (Piper betle) بر سویه‌های مختلفی از باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت و گرم منفی، دامنه MIC از ۱۹ تا ۶۲۵ µg/mL و MBC از ۱۹ تا ۱۲۵۰ µg/mL گزارش شد. هرچه مقدار MBC بیشتر باشد نشان‌دهنده حساسیت بیشتر باکتری نسبت به عصاره می‌باشد و مقادیر کم MBC مقاومت باکتری را در مقابل خاصیت ضدباکتریایی عصاره نشان می‌دهد (۳۰).

همانطور که داروهای شیمیایی اغلب ترکیبی از چند ماده شیمیایی می‌باشند، در طب سنتی نیز برای درمان بسیاری از بیماری‌ها ترکیبی از چند گیاه دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به عنوان نمونه در طب سنتی کشور کامرون، برخی گیاهان دارویی بصورت ترکیبی در درمان حصبه (Typhoid Fever) مورد استفاده قرار می‌گیرند و استفاده از این ترکیبات گیاهی درجات مختلفی از خاصیت ضدمیکروبی را بر روی سویه‌های مختلف سالمونلا نیز نشان داده است (۲۵). بنابراین به عنوان یک راه حل در انتخاب گیاهان مناسب به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها، می‌توان با مراجعه به سایر مطالعات، گیاهان موثر بر یک سویه باکتریایی را بر روی سایر سویه‌ها و گونه‌ها آزمود و به جای استفاده از یک گیاه دارویی ترکیبی از آنها را مورد استفاده قرار داد.

نتیجه‌گیری

با توجه به مقاومت دارویی در حال گسترش، به‌ویژه در طیور صنعتی کشور و همچنین در مصرف‌کنندگان محصولات طیور و با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر، پیشنهاد می‌شود که عصاره یا اسانس دانه گیاه گلپر حداقل به‌عنوان یک درمان و یا یک مکمل غذایی دارویی در تغذیه پرندگان مورد استفاده قرار گیرد. این کار موجب کاهش هزینه‌ها و عوارض ناشی از مصرف خوراکی داروها می‌شود. هرچند پیشنهاد می‌شود از اسانس گلپر به عنوان ماده دارویی استفاده شود، اما برای یافتن مناسب‌ترین دز علیه باکتری‌های بیماری‌زا، پیشنهاد می‌شود اسانس این گیاه علیه طیف وسیع‌تری از باکتری‌های بیماری‌زا و همچنین همراه با سایر گیاهانی که خواص ضدباکتریایی دارند با رقت‌های مختلف مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین باتوجه به عدم تاثیر عصاره‌های آبی و اتانولی بر دو سویه از باکتری *S. typhimurium* در مطالعه حاضر و از طرفی دز کمتر مورد نیاز برای فعالیت ضدباکتریایی اسانس گلپر، به نظر می‌رسد استفاده از اسانس نسبت به عصاره اولویت داشته باشد.

سپاسگزاری

این طرح با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه زابل انجام شده است. شماره طرح: IRUOZ 95-19.

منابع مورد استفاده

1. Ginovyan, M., M. Petrosyan, and A. Trchounian. 2017. Antimicrobial activity of some plant materials used in Armenian traditional medicine. *BMC Complementary and Alternative Medicine*,

17(1): 50.
2. Kong, D. G., Y. Zhao, G. H. Li, B. J. Chen, X. N. Wang, H. L. Zhou, H. X. Lou, D. M. Ren, and T. Shen. 2015. The genus Litsea in traditional Chinese medicine: an ethnomedical, phytochemical and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 164: 256-264.
3. Mani, J., S. Kumar, G. J. Dobos, and A. Haferkamp. 2012. Aspects of traditional Indian medicine (Ayurveda) in urology. *Urologe A*, 51(12): 1663-1673.
4. Dehdari, S. and H. Hajimehdipoor. 2016. Herbal medicines for leucorrhea according to Iranian traditional medicine. *Iranian Journal of Medical Sciences,* 41(3): S36.
5. DiPasquale, R. 2008. Effective use of herbal medicine in urinary tract infections. *Journal of Dietary Supplements*, 5(3): 219-228.
6. Na-Bangchang, K. and J. Karbwang. 2014. Traditional herbal medicine for the control of tropical diseases. *Tropical Medicine and Health,* 42(2): 3-13.
7. Moradi, M. T., M. Rafieian-Kopaei, and A. Karimi. 2016. A review study on the effect of Iranian herbal medicines against in vitro replication of herpes simplex virus. *Avicenna Journal of Phytomedicine,* 6(5): 506-515.
8. Ebrahimie, M., M. Bahmani, H. Shirzad, M. Rafieian-Kopaei, and K. Saki. 2015. A review study on the effect of Iranian herbal medicines on opioid withdrawal syndrome. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine,* 20(4): 302-309.
9. Amirghofran, Z. 2010. Medicinal plants as immunosuppressive agents in traditional Iranian medicine. *Iranian Journal of Immunology*, 7(2): 65-73.
10. Hemati, A., M. Azarnia, M. Nabiuni, G. Mirabolghasemi, and S. Irian. 2012. Effect of the hydroalcoholic extract of *Heracleum persicum* (Golpar) on folliculogenesis in female Wistar rats. *Cell Journal*, 14(1): 47-52.
11. Taghizabet, N., E. Mangoli, F. Anbari, S. A. Masoodi, A. R. Talebi, and M. Mazrooei. 2016. The effect of *Heracleum persicum* (Golpar) oil and alcoholic extracts on sperm parameters and chromatin quality in mice. *International Journal of Reproduction Biomedicine,* 14(6): 365-370.
12. Sayyah, M., S. Moaied, and M. Kamalinejad. 2005. Anticonvulsant activity of *Heracleum persicum* seed. J*ournal of Ethnopharmacology*, 98(1-2): 209-211.
13. Rijal, D. P., T. Alm, S. Jahodova, H. K. Stenoien, and I. G. Alsos. 2015. Reconstructing the invasion history of *Heracleum persicum* (Apiaceae) into Europe. *Molecular Ecology*, 24(22): 5522-5543.
14. Shokri, H., A. Sharifzadeh, and I. Ashrafi Tamai. 2012. Anti-Candida zeylanoides activity of some Iranian plants used in traditional medicine. *Journal de Mycologie Médicale*, 22(3): 211-216.
15. Schikora, A., I. Virlogeux-Payant, E. Bueso, A.V. Garcia, T. Nilau, A. Charrier, S. Pelletier, P. Menanteau, M. Baccarini, P. Velge, and H. Hirt. 2011. Conservation of Salmonella infection mechanisms in plants and animals. *PLoS One,* 6(9): e24112.
16. Zhang, G., E. Thau, E. W. Brown, and T. S. Hammack. 2013. Comparison of a novel strategy for the detection and isolation of Salmonella in shell eggs with the food and drug administration bacteriological analytical manual method. *Poultry Science*, 92(12): 3266-3274.
17. Skjolaas, K. A., T. E. Burkey, S. S. Dritz, and J. E. Minton. 2006. Effects of *Salmonella enterica* Serovars Typhimurium (ST) and Choleraesuis (SC) on chemokine and cytokine expression in swine ileum and jejunal epithelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 111(4): 199-209.
18. Fardsanei, F., M. M. Soltan Dallal, M. Douraghi, T. Zahraei Salehi, M. Mahmoodi, H. Memariani, and F. Nikkhahi. 2017. Genetic diversity and virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies enterica serotype Enteritidis isolated from meats and eggs. *Microbial Pathogenesis*, 107: 451-456.
19. Kang, S. N., G. M. Chu, Y. M. Song, S. K. Jin, I. H. Hwang, and I. S. Kim. 2012. The effects of replacement of antibiotics with by-products of oriental medicinal plants on growth performance and meat qualities in fattening pigs. *Animal Science Journal*, 83(3): 245-251.
20. Rankin, S. C. 1998. Multiple antibiotic resistance in Salmonella. *Veterinary Record,* 143(25): 698-699.
21. Berge, A. C., E. L. Dueger, and W. M. Sischo. 2006. Comparison of *Salmonella enterica* serovar distribution and antibiotic resistance patterns in wastewater at municipal water treatment plants in two California cities. *Journal of Applied Microbiology,* 101(6): 1309-1316.
22. Santos, U. P., J. F. Campos, H. F. Torquato, E. J. Paredes-Gamero, C. A. Carollo, L. M. Estevinho, K. de Picoli Souza, and E. L. Dos Santos. 2016. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties as well as the phenolic content of the extract from *Hancornia speciosa* gomes. *PLoS One*, 11(12): e0167531.
23. Miladinovic, D. L., B. S. Ilic, T. M. Mihajilov-Krstev, D. M. Nikolic, O. G. Cvetkovic, M. S. Markovic, and L. C. Miladinovic. 2013. Antibacterial activity of the essential oil of *Heracleum sibiricum.* Natral Product Communication, 8(9): 1309-1311.
24. Nkuo-Akenji, T., R. Ndip, A. McThomas, and E. C. Fru. 2001. Anti-Salmonella activity of medicinal plants from Cameroon. *The Central African Journal of Medicine*, 47(6): 155-158.

25. Akinyemi, K. O., U. E. Mendie, S. T. Smith, A. O. Oyefolu, and A. O. Coker. 2005. Screening of some medicinal plants used in south-west Nigerian traditional medicine for anti-*Salmonella typhi* activity. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 5(1): 45-60.
26. Ranjbar, R. and S. Babaie. 2016. Evaluation the antibacterial effects of Echinophora platyloba extracts against some Salmonella species. *Electron Physician,* 8(2): 1943-1948.
27. Naeini, A., M. Naseri, M. Kamal Nejad, F. Khosh Zaban, T. Rajabian, H. Esmaeil Zadeh Nami, S. Mansouri, and D. Zavieh. 2011. *In vitro* evaliation of essential oils and extracts of 50 Iranian medicinal plants on standard strains of *Candida albicans*. *Medicinal Plants,* 38(2): 163-172 (in Farsi).
28. Sadeghi Nejad, B., M. Rajabi, A. Zarei Mamoudabadi, and M. Zarrin. 2014. *In vitro* anti-candida activity of the hydroalcoholic extracts of *Heracleum persicum* fruit against phatogenic candida species. *Jundishapur Journal of Microbiol*, 7(1): e8703.
29. Zomorodian, K., P. Ghadiri, M. J. Saharkhiz, M. R. Moein, P. Mehriar, F. Bahrani, T. Golzar, K. Pakshir, and M. M. Fani. 2015. Antimicrobial activity of seven essential oils from Iranian aromatic plants against common causes of oral infections. *Jundishapur Journal of Microbiology,* 8(2): e17766.
30. Valle, D. L., Jr., E. C. Cabrera, J. J. Puzon, and W. L. Rivera. 2016. Antimicrobial activities of methanol, ethanol and supercritical CO_2 extracts of philippine *Piper betle* L. on clinical isolates of gram positive and gram negative bacteria with transferable multiple drug resistance. *PLoS One*, 11(1): e0146349.