

Evaluation of Inhibitory Effect of Methanol Extract of *Allium Sativum* in vitro on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Abolfazl Jafari Sales^{1*}, Azizeh Shadi-Dizaji²

1- Department of Microbiology School of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.

2- Department of Biotechnology, Ataturk University, Turkey.

*Corresponding Author: Abolfazl Jafari-Sales, Tel: +989147611841, Email: A.jafari_1392@yahoo.com

Received: 26 Feb 2019

Accepted: 14 Apr 2019

Abstract

Background & Aim: Today, increased use of antibiotics to treat infections has led to increased resistance to antibiotics in bacteria strains. Therefore, extensive efforts have been dedicated to finding new compounds as a suitable replacement for antibiotics. This study aimed to compare and evaluate the antibacterial effects of *Allium Sativum* methanol extract on the growth of several pathogenic bacteria.

Materials & Methods: In this empirical-laboratory research, the methanol extract of the plant was prepared after collecting and conducting pharmacognosy studies. Afterwards, the antibiotic effects of the plant were assessed at 20-400 mg/ml concentrations using the well diffusion method. Moreover, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined applying the tubular dilution method.

Results: In this research, the methanol extract of *Allium Sativum* prevented the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. At 6.25 mg/ml concentration, the methanol extract of *Allium Sativum* had the highest inhibitory effect on the growth of *Staphylococcus aureus*. Meanwhile, the concentration of 12.5 mg/ml had the most bactericidal effect.

Conclusion: According to the results of the study, *Allium Sativum* might be recognized useful when used to treat bacterial infections independently after completing additional research. Therefore, this compound might be applied as a substitute for conventional chemical drugs to treat infections.

Keywords: Antibacterial Effects, Extract, *Allium Sativum*

How to cite this article:

Jafari Sales A, Shadi-Dizaji A. Investigation on the inhibitory effect of methanolic extract of *Allium Sativum* in vitro on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Scientific Journal of Nursing, Midwifery and Paramedical Faculty*. 2019; 5 (1): 61-68.

URL: <http://sjnmp.muk.ac.ir/article-1-229-fa.html>

بررسی اثر مهاری عصاره متانولی سیر در شرایط آزمایشگاهی بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی

ابوالفضل جعفری ثالث^{۱*}، عزیزه شادی دیزجی^۲

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه آتاتورک، ترکیه.

نویسنده مسئول: ابوالفضل جعفری ثالث، تلفن: ۰۹۱۴۷۶۱۱۸۴۱، نمابر: ۰۴۱۴۲۲۷۴۷۴۶، ایمیل: A.jafari_1392@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۰۷

چکیده

زمینه و هدف: امروزه با افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌ها، باعث افزایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک شده است؛ از این رو تلاش‌های بسیاری جهت یافتن ترکیبات جدید به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها صورت گرفته است. هدف از این مطالعه، مقایسه و ارزیابی اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی سیر بر رشد تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی پس از جمع‌آوری و انجام مطالعات فارماکوکینوزی عصاره متانولی گیاه تهیه گردید و اثرات ضد میکروبی آن در غلظت‌های ۲۰ تا ۴۰۰ mg/ml با استفاده از روش انتشار چاهکی و همچنین تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد میکروب‌ها (MIC) با روش رقیق‌سازی لوله‌ای انجام شد.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان دادند که عصاره متانولی سیر از رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی جلوگیری می‌کند. عصاره گیاهی سیر در غلظت ۶/۲۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین اثر مهاری روی رشد استافیلوکوکوس اورئوس است که در این میان غلظت ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین اثر کشندگی می‌باشند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره سیر ممکن است پس از تکمیل مطالعات تکمیلی به تنهایی برای درمان عفونت‌های باکتریایی مفید باشد و آن را به عنوان جایگزینی برای داروهای شیمیایی معمول در درمان عفونت‌ها بکار برد.

واژه‌های کلیدی: اثرات ضد میکروبی، عصاره، سیر

مقدمه

دانست که تنها بخشی از آن مورد بهره‌برداری قرار گرفته است. این مواد شیمیایی بالقوه مفید را می‌توان نه تنها به عنوان دارو بلکه به عنوان الگویی بی‌نظیر به صورت نقطه شروعی برای ساخت آنالوگ‌های دارویی به کار برد و همچنین به عنوان ابزاری جالب به منظور فهم و درک بیشتر و بهتر پدیده‌های زیست‌شناختی به کمک گرفت (۳-۶). یکی از مهم‌ترین چالش‌های درمانی، مقابله با بیماری‌های عفونی به دلیل شیوع و گسترش بالای آن‌ها است.

گیاهان دارویی یکی از قدیمی‌ترین دستاوردهای انسانی برای درمان بیماری‌ها بوده است که در خلال توسعه تمامی تمدن‌های بشری همواره ارتباطی تنگاتنگ و نزدیک میان آدمی و گیاه وجود داشته است. گرچه تا به امروز اکثر گونه‌های گیاهی شناخته شده‌اند ولی هنوز زمان زیادی مانده است تا منابع جدید و با ارزش گیاهی کشف شوند (۱، ۲). به این ترتیب گیاهان را می‌توان به عنوان منبعی از مواد شیمیایی بالقوه مفید

بر مبنای نظریه‌ها، باورها و تجربیات بومی در فرهنگ‌های مختلف است که برای حفظ سلامتی و همچنین پیشگیری، تشخیص، بهبود یا درمان بیماری‌های جسمی و روحی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در بسیاری از کشورهای درحال توسعه، بخش بزرگی از جمعیت انسانی متکی به همین گیاهان دارویی و طب سنتی هستند (۱۸). لذا این مطالعه در نظر دارد که اثرات ضد باکتریایی عصاره متانولی سیر را بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی بررسی نماید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی از عرصه‌های طبیعی از اطراف شهرستان مرند در استان آذربایجان شرقی، روستای عیش‌آباد جمع‌آوری گردیدند. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری و انتقال، تمیز شده و در فضایی بزرگ و مناسب و در شرایط دور از نور آفتاب خشک شدند. پس از خشک شدن کامل نمونه‌ها، حبه‌های سیر برای آسیاب شدن آماده شد. جهت عصاره‌گیری از روش سوکسوله استفاده شد به‌طوری‌که ۶۰ گرم پودر سیر همراه با 300 ml متانول به‌عنوان حلال به مدت ۸ ساعت در دستگاه عصاره‌گیر سوکسوله قرار داده شد این حلال در دمای 40 °C و با استفاده از دستگاه روتاری به آرامی تبخیر و عصاره تغلیظ شده از آن به دست آمد. از عصاره‌های تغلیظ شده توسط حلال ۵ درصد (Dimethylsulfoxide) DMSO، غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۵۰ و 400 mg/ml جهت استفاده در آزمایش تعیین Minimum inhibitory (MIC) (Minimum Concentration، Bactericidal Concentration) و انتشار چاهکی (Agar Well Diffusion) تهیه گردید. میکروارگانیزم‌های مطالعه در این تحقیق عبارت بودند از: استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 و

پس از شناسایی پنی‌سیلین و گسترش استفاده از آن در درمان، هر روزه آنتی‌بیوتیک‌های جدیدی برای درمان عفونت‌ها ارائه گردید. نتیجه این امر گسترش استفاده بالینی آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی و سنتتیک در درمان عفونت‌های بالینی بود. استفاده بی‌رویه از این داروهای ضد میکروبی منجر به افزایش مقاومت‌های دارویی علیه آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت در اکثر باکتری‌ها گردید (۷، ۸). همین موضوع یکی از دلایل استفاده رو به رشد از گیاهان به عنوان مواد طبیعی کم‌خطر، در دسترس و ارزان‌قیمت، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک، در درمان عفونت‌های باکتریال بوده است. هم‌چنین این داروهای گیاهی نزد مردم دارای مقبولیت بیش‌تری در مصرف هستند (۹). این دلایل علت افزایش موج جدید مطالعات گسترده جهانی و معرفی اثرات ضد باکتری گیاهان مختلف در سال‌های اخیر بوده است (۱۰). سیر یا Garlic با نام علمی Allium Sativum از خانواده لیلیاسه و بومی آسیای میانه است. این گیاه به عنوان قدیمی‌ترین و مشهورترین گیاهان دارویی برای درمان اکثر بیماری‌ها شناخته می‌شود. جز فعال این گیاه ترکیب گوگردداری به نام آلیسین است که خاصیت ضدویروسی، قارچی، باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی دارد (۱۱، ۱۲). سیر به عنوان یک عامل ضد باکتریایی قوی شناسایی شده و خاصیت ممانعت‌کنندگی آن‌هم بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت به اثبات رسیده است (۱۳-۱۵). در طب سنتی سیر به‌عنوان یک داروی گیاهی برای درمان انواع بیماری‌ها و اختلالات از قبیل فشارخون بالا، آلزایمر، ترومبوز، تب یونجه، آسم، عفونت گوش کودکان و حتی سرطان مطرح بوده است. امروزه نیز تحقیقات متعددی تأثیر این گیاه را بر روی تنظیم کلسترول خون، قند خون و محافظت از سیستم قلبی-عروقی به اثبات رسانده‌اند (۱۶، ۱۷)؛ بنابراین طب سنتی مجموع مهارت‌ها و شیوه‌های دانش

اشرشیاکلی ATCC 25922 (به صورت لیوفلیزه از کلکسیون میکروبی دانشگاه تهران تهیه گردید) که روی محیط مولر هینتون آگار کشت جداگانه‌ای به عمل آمد تا بتوان از کلنی‌های ظهور یافته برای تهیه محلولی با کدورت نیم مک فارلند ($106 \times \text{cfu/ml}$) (5/1) استفاده کرد. بدین منظور برای تهیه سوسپانسیون میکروبی از کشت تازه و جوان باکتری ۵-۴ کلنی به محیط کشت مولر هینتون براث منتقل شد تا کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده مطابق با لوله شماره ۰/۵ استاندارد مک فارلند تنظیم گردد. برای رسیدن به غلظت $5 \times 106 \text{ cfu/ml}$ یا باکتری در هر میلی‌لیتر، سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل لوله ۰/۵ مک فارلند به نسبت ۰/۱ رقیق شد به منظور بررسی اثر ضد میکروبی عصاره متانولی ۴ غلظت ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۴۰۰ mg/ml از عصاره متانولی گیاه در حلال ۵ درصد DMSO تهیه گردید. در این تحقیق اثر ضد میکروبی عصاره متانولی به دو روش Agar Well Diffusion و Dilution Test مورد بررسی قرار گرفت. در روش انتشار چاهک ۵۰۰ ml از سوسپانسیون میکروبی $5/1 \times 106 \text{ cfu/ml}$ بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال یافت و به وسیله سواب استریل در ۳ جهت کشت داده شد سپس چاهک‌هایی به قطر ۶ mm و به فاصله ۵/۲ cm از هم در سطح آگار ایجاد شد در ادامه ۱۰۰ μl از غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۴۰۰ mg/ml از عصاره متانولی به درون هر چاهک تزریق گردید. شاهد منفی با استفاده از محلولی که برای حل کردن عصاره‌ها به کار گرفته شد (۵٪ DMSO) به دست آمد و از آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل نیز به منزله شاهد مثبت استفاده گردید.

سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شده و پس از مدت معین کشت‌های میکروبی از

نظر تشکیل یا عدم تشکیل هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید. با استفاده از روش رقت لوله‌ای، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی عصاره متانولی تعیین گردید در این روش جهت تعیین MIC از عصاره‌ی متانولی تهیه شده سریال‌های رقتی ۲۵/۶، ۱۲/۵، ۲۵/۵، ۵۰، ۱۰۰ و mg/ml ۲۰۰ در محیط مولر هینتون براث به دست آمد. سپس به هر کدام از رقت‌ها ۱ ml از سوسپانسیون باکتریایی فعال $5/1 \times 106 \text{ cfu/ml}$ اضافه شد در کنار لوله‌ها از کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری بدون عصاره) و کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتری) استفاده شد. در نهایت لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند پس از طی زمان انکوباسیون، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی شده و آخرین رقتی که در آن هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نگردید (عدم رشد) به عنوان MIC در نظر گرفته شد. پس از آن از تمامی لوله‌هایی که در آن‌ها عدم رشد باکتری مشاهده شده بود نمونه‌برداری صورت گرفت و از طریق کشت در پلیت حداقل غلظت کشنده MBC تعیین گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند لوله حاوی کمترین غلظت عصاره که در پلیت مربوط به آن عدم رشد باکتری قابل مشاهده بود، به عنوان MBC آن ماده در نظر گرفته شد. جهت کاهش خطای آزمایش هر یک از آزمایش‌ها فوق ۵ مرتبه تکرار شد. نتایج آزمایش‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

یافته‌ها

تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی سیر بر روی باکتری‌های بیماری‌زا، مشخص شد که این عصاره اثر

بازدارندگی فراوانی بر روی هر دو باکتری مورد آزمایش داشت و هر چقدر میزان غلظت عصاره متانولی افزایش می‌یافت اثر بازدارندگی نیز به صورت افزایش هاله عدم رشد بیشتر و چشمگیرتر می‌شد. این مطالعه نشان داد که اثرات مهاري عصاره متانولی سیر بر باکتری‌های گرم مثبت بیش از باکتری‌های گرم منفی بود (جدول شماره ۱). مقادیر مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره متانولی گیاه سیر علیه باکتری‌های مورد آزمایش نشان داد که غلظت کشنده

این عصاره علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشريشیاکلی به ترتیب در غلظت ۱۲/۵ و ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر است (جدول شماره ۲). این نتایج بیانگر آن است که در بین باکتری‌های مورد آزمایش از نظر حساسیت عصاره سیر اختلاف معنی داری وجود دارد ($p < 0.05$). به عبارت دیگر بیشترین حساسیت نسبت به عصاره متانولی سیر در استافیلوکوکوس اورئوس و کمترین حساسیت در مورد اشريشیاکلی وجود داشته است.

جدول ۱ - میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی گیاه سیر بر علیه باکتری‌های منتخب بر حسب میلی متر (انحراف معیار $\pm$ میانگین)

غلظت عصاره (mg/ml)	۲۰	۳۰	۵۰	۴۰۰	کنترل منفی	کنترل مثبت
سویه باکتری						
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۰/۸ $\pm$ ۱/۰۹	۱۴/۸ $\pm$ ۰/۸۳	۲۲/۶ $\pm$ ۱/۱۴	۲۵ $\pm$ ۱	-	۲۰
اشريشیاکلی	۸/۲ $\pm$ ۰/۸۳	۱۲/۴ $\pm$ ۰/۸۹	۱۵/۸ $\pm$ ۱/۳	۲۰/۸ $\pm$ ۱/۳	-	۲۶

جدول ۲: مقادیر MIC و MBC عصاره متانولی گیاه سیر (mg/ml)

MBC	MIC	غلظت عصاره (mg/ml)
		سویه باکتری
۱۲/۵	۶/۲۵	استافیلوکوکوس اورئوس
۲۵	۱۲/۵	اشريشیاکلی

بحث و نتیجه گیری

گیاهان دارویی در سرتاسر جهان و به شدت در طب عامیانه استفاده می‌شود؛ بنابراین، غربالگری چنین گیاهان ممکن است منجر به کشف ترکیبات مؤثر جدیدی شود که قادر به مهار میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا هستند. ترکیباتی که می‌توانند رشد پاتوژن های بیماری‌زا را مهار کنند و یا آن‌ها را بدون سمیت به

سلول‌های میزبان بکشند، به عنوان نامزدی برای تولید داروهای جدید ضد میکروبی در نظر گرفته می‌شوند. در نتیجه، نیاز حیاتی برای تحقیق برای عوامل ضد میکروبی جدید با فعالیت‌های امیدوارکننده طبیعی برای ارائه جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌های رایج وجود دارد (۱۹). سیر یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی معطر و طعم دار با دامنه وسیعی از فعالیت‌های ضد میکروبی علیه انواع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا است و در عین

حال بدن را از پاتوژن ها محافظت کند (۲۰-۲۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره متانولی سیر بر روی باکتری های مورد بررسی دارای خاصیت باکتری کشی داشته به صورتی که بیشترین تأثیر استافیلوکوکوس اورئوس MBC 5/12 روی و کمترین تأثیر روی اشريشياکلی با MBC 25 است. همچنین با افزایش غلظت در انتشار چاهکی قطر هاله عدم رشد افزایش یافته و در غلظت ۴۰۰ mg/ml بیشترین تأثیر را در استافیلوکوکوس اورئوس (۲۵ میلی متر) و کمترین تأثیر را در اشريشياکلی (۲۰/۸ میلی متر) دارد. Alzowahi و همکاران (۲۰۱۳) (۲۳) و Daka و Awole (24) (2009) با بررسی تأثیر عصاره سیر بر روی باکتری اشريشياکلی مشاهده نمودند که MIC این عصاره روی باکتری مورد مطالعه به ترتیب ۱/۵۶ و ۳۰ mg/ml است. Belguith و همکاران (۲۰۱۰) تأثیر عصاره سیر را روی سرووارهای سالمونلا مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که این عصاره با محدوده MIC 10 تا ۱۲/۵ mg/ml و مقادیر MBC محدوده ۱۳ تا ۱۵ mg/ml رشد سرووارهای مورد مطالعه را متوقف می کنند (۲۱).

Gull و همکاران (۲۰۱۲) خاصیت ضد میکروبی عصاره سیر را روی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشريشياکلی مورد مطالعه قرار داده و نشان دادند که این عصاره بیشترین تأثیر را روی باکتری های گرم مثبت دارد؛ که با یافته های مطالعه حاضر مطابقت دارد (۲۵). Iwalokun (۲۰۰۴) نشان دادند که عصاره سیر بر روی سویه های مقاوم باکتری های نظیر استرپتوکوکوس پنومونیه، سودوموناس انروژینوزا، اشريشياکلی و شینگلا مؤثر بوده است (۲۶). صباحی و

همکارانش با مطالعه روی تأثیر عصاره سیر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشريشياکلی مشخص کردند که این عصاره بر باکتری های مورد مطالعه اثر میکروب کشی دارد (۲۷). Jabar و همکارانش طی مطالعه روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشريشياکلی نشان دادند که میانگین MIC عصاره خالص سیر برای باکتری های مورد مطالعه به ترتیب ۲۲/۳۷ و ۱۹/۵۳ میلی گرم بر میلی لیتر است (۲۸). در مقابل مجنونی و همکارانش مشخص کردند که عصاره سیر مهارکننده قوی اشريشياکلی با قطر هاله مهازی ۵۱ میلی متر است (۲۹). صادقیان و قزوینی سیر را یک داروی ضد میکروبی طبیعی به عنوان جایگزینی برای درمان عفونت های معده ای-روده ای مطرح کردند (۳۰). اختلاف یافته های حاضر با مطالعات سایر محققان می تواند ناشی از تأثیر روش مختلف تهیه و استخراج عصاره باشد همچنین شدت و محدوده اثرات ضد باکتریایی عصاره سیر با محیط و شرایط اقلیمی کشت این گیاه نیز ارتباط مستقیم دارد. با توجه به ارزان و قابل دسترس بودن و همچنین اثر فراوان عصاره متانولی سیر بر روی باکتری های مورد مطالعه، می توان این عصاره را به عنوان یک آلترناتیو مناسب در تولید فراورده های گیاهی طبیعی جدید پس از بررسی های بیشتر روی حیوانات آزمایشگاهی با کمترین عوارض جانبی به دلیل غیر شیمیایی بودن، علیه باکتری فوق بکار برده شوند.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی دانشجویی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی است که در سال ۱۳۹۶ با هزینه

شخصی انجام شده است. بدین وسیله از همکاری اساتید و کارشناسان آزمایشگاه واحد اهر قدردانی می شود.

References

- 1-Digrak M, Alma MH, İlçim A. Antibacterial and antifungal activities of Turkish medicinal plants. *Pharmaceutical Biology*. 2001;39(5):346-350.
- 2- Skaltsa HD, Lazari DM, Chinou IB, Loukis AE. Composition and antibacterial activity of the essential oils of *Stachys candida* and *S.chrysantha* from southern Greece. *Planta Medica*. 1999;65(03):255-256.
- 3- Jafari-Sales A, Jafari B, Sayyahi J, Zohoori-Bonab T. Evaluation of antibacterial activity of ethanolic extract of *malva neglecta* and *althaea officinalis* l. On antibiotic-resistant strains of *staphylococcus aureus*. *J Biol Today World*. 2015;4(2):58-62.
- 4-Jafari-Sales A, Shahniani A, Fathi R, Malekzadeh P, Mobaiyen H, Bonab FR. Evaluation of Antibacterial Activity of Essential Oil of *Ziziphora clinopodioides* and *Achillea wilhelmsii* on Antibiotic-resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. *IMMINV*. 2017; 2(2):49-56.
- 5-Mobaiyen H, Jafari Sales A, Sayyahi J. Evaluating antimicrobial effects of *centaurea* plant's essential oil on pathogenic bacteria: *staphylococcus aureus*, *staphylococcus epidermidis*, and *escherichia coli* isolated from clinical specimens. *J Fasa Univ Med Sci*. 2016. 5(4): p. 479-487.
- 6-Sales AJ, Evaluation of antibacterial activity of ethanol extract of *Lavandula Stoechas* L. plant on antibiotic-resistant strains Of *Staphylococcus Aureus*. *J Curr Res Sci*. 2014. 2(6):641.
- 7- Sales AJ, Bagherizadeh Y, Malekzadeh P, Ahmadi B, Bonab FR. Evaluation of the Antimicrobial Effects of Essential Oil of *Reseda Lutea* L. on Pathogenic Bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Escherichia coli*. *Arch Clin Microbiol*, 2017;8(3): 1-6.
- 8- Sales AJ, Shadbad NN, Kaleybar VP. The Investigation of the Antibacterial effects of Ethanol extract of *Cichorium intybus* L. on Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci*. 2015; 4(4):161-164.
- 9- Qi Z. WHO Traditional Medicine Strategy. 2014-2023. Geneva: World Health Organization, 2013.
- 10- Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, 1999; 12(4):564-582.
- 11-Salama AA, et al. Inhibitory effect of allicin on the growth of *Babesia* and *Theileria equi* parasites. *J Parasitol Res*. 2014; 113(1):275-283.
- 12-Wolde T, Kuma H, Trueha K, Yabeker A. Anti-Bacterial Activity of Garlic Extract against Human Pathogenic Bacteria. *J Pharmacovigil*. 2018; 6(253):2-8.
- 13- Bakri IM, Douglas CWI. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol*. 2005;50(7):645-651.
- 14- Jazani NH, Shahabi S, Ali AA, Zarrin S, Daie NA. In vitro antibacterial activity of garlic against isolates of *Acinetobacter* sp. *J Biol Sci*. 2007;7(5):819-822.
- 15-Sivam GP. Protection against *Helicobacter pylori* and Other Bacterial Infections by Garlic. *Journal of Nutrition*. 2001;131(3):1106S-1108S.

- 16-Benavides GA, et al. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(46):17977-17982.
- 17-Karuppiyah P, Rajaram S. Antibacterial effect of *Allium sativum* cloves and *Zingiber officinale* rhizomes against multiple-drug resistant clinical pathogens. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012;2(8):597-601.
- 18- Onyeagba RA, Ugbohu OC, Okeke CU, Iroakasi O. Studies on the antimicrobial effects of garlic (*Allium sativum* Linn), ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and lime (*Citrus aurantifolia* Linn). *Afr J Biotechnol.* 2004; 3(10):552-554.
- 19- Jafari-Sales A, Bolouri P. Evaluation of the antimicrobial effects of *Glycyrrhiza glabra* L. on some gram positive and gram negative pathogenic bacteria in laboratory conditions. *Jorjani Biomed J.* 2018;6(4):78-84.
- 20- Alorainy MS. Evaluation of antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*) against *E. coli* O157: H7. *J Agr Vet Sci.* 2011;4:149-157.
- 21- Belguith H, Kthiri F, Chati A, Sofah AA, Hamida JB, Landoulsi A. Study of the effect of aqueous garlic extract (*Allium sativum*) on some *Salmonella* serovars isolates. *Emir. J. Food Agric,* 2010;22(3): 189-93.
- 22- Zhang, X. Three supplementary methods for analyzing cytotoxicity of *Escherichia coli* O157: H7. *J Microbiol Meth.* 2016;120:34-40.
- 23- Alzowahi FA, Abu-Taleb A, As-Suhbani A, Kadam TA. The inhibitory effects of garlic extract and its fractions against some *Enterobacteriaceae* spp. isolated from sprouted Mung bean. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2013;2(7):104-115.
- 24- Daka D, Awole M, Assessment of the antibacterial effect of crude preparation of garlic (*Allium sativum*) on diarrhea causing bacteria: an In vitro, study. *Asian J Med Sci.* 2009;1(1):12-14.
- 25- Gull I, Saeed M, Shaukat H, Aslam SM, Samra ZQ, Athar AM. Inhibitory effect of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria. *Ann Clin Microb Anti.* 2012;11(1):8.
- 26-Iwalokun BA, Ogunledun A, Ogbolu, DO, Bamiro SB, Jimi-Omojola J. In vitro antimicrobial properties of aqueous garlic extract against multidrug-resistant bacteria and *Candida* species from Nigeria. *J Med Food.* 2004; 7(3):327-333.
- 27-Sabahi M, esmaeili R, dastan D, Alikhani M Y. Antibacterial Activity of Aqueous and Alcoholic Extracts of Garlic and Aloe Vera Against Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *E.coli* . *Iran J Med Microbiol.* 2018;12(4):288-293.
- 28- Jabar MA, Al-Mossawi A. Susceptibility of some multiple resistant bacteria to garlic extract. *Afr J Biotechnol.* 2007;6(6):771-776.
- 29- Majnooni MB, Abiri R, Afnazade NS, Malek Khatabi P. Study of antibacterial effects of hydro-alcoholic extract of 8 medicinal herbs against vancomycin resistant *staphylococcus aureus*. *JMP.* 2012;1(41):103-110.
- 30-Sadeghian A, Ghazvini K, Antimicrobial activity of garlic extract against *Shigella*. *IJBMS.* 2015;27(3):142-144.