

The Survey on Antimicrobial Effects of Methanolic Extract of *Carum Copticum L.* on *Staphylococcus Aureus*, *Bacillus Cereus*, *Escherichia Coli* and *Pseudomonas Aeruginosa* in Laboratory Conditions

Abolfazl Jafari-Sales^{1*}, Farnaz Rasi-Bonab², Javad Sayyahi³

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

² Department of Microbiology, Marand Branch, Islamic Azad University, Marand, Iran

³ Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

Abstract

Introduction: Nowadays, the prevalence of drug resistance to synthetic drugs is increasing in many countries in the world; therefore, many efforts have been made to find new compounds as an appropriate alternative to antibiotics. This study was performed to investigate the antibacterial effect of methanolic extract of *Carum copticum L.* on some pathogenic bacteria.

Methods and Materials: In this descriptive-laboratory study, after collecting the plants and confirming its scientific name by botanists, methanolic extract of the plant was prepared by Soxhlet extractor method and different concentrations of extract were prepared. Then, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) extracts were determined on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* using well-diffusion and dilution methods.

Results: The results showed that MIC and MBC of methanol extract on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* were 12.5, 25 and 50 mg / ml, respectively.

Discussion and Conclusion: The results of this study show that *Carum copticum L.* plant can be considered in herbals groups with antibacterial properties. After evaluating their effects in vivo condition and identifying the active ingredients, it can be used as an alternative to synthetic drugs that commonly used to treat infections.

Keywords: Antimicrobial effects, Extract, *Carum copticum L.*

* (Corresponding Author) Abolfazl Jafari-Sales, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran. Email: A.jafari_1392@yahoo.com

بررسی اثرات آنتی باکتریال عصاره متانولی گیاه زنیان (*Carum copticum L.*) بر روی باکتری‌های پاتوژن استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اش‌ریشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا در شرایط آزمایشگاهی برون تنی

ابوالفضل جعفری ثالث^{۱*}، فرناز رائی بناب^۲، جواد سیاحی^۳

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

^۲ گروه میکروبیولوژی، واحد مرند، دانشگاه آزاد اسلامی، مرند، ایران

^۳ گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

چکیده

مقدمه: امروزه شیوع مقاومت دارویی نسبت به داروهای سنتتیک در بسیاری از کشورهای جهان در حال افزایش است؛ از این رو تلاش‌های بسیاری جهت یافتن ترکیبات جدید به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی بیوتیکها صورت گرفته است. این مطالعه نیز به منظور بررسی اثر ضد باکتریال عصاره متانولی گیاه زنیان (*Carum copticum L.*) بر روی برخی از باکتری‌های پاتوژن در شرایط آزمایشگاهی برون تنی (In vitro) انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی، پس از جمع‌آوری گیاهان و تایید نام علمی آن توسط گیاه‌شناسان، عصاره متانولی گیاه زنیان به روش سوکسوله، غلظت‌های مختلف از عصاره تهیه شد. سپس MIC و MBC عصاره روی استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اش‌ریشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا با روش‌های رقت در برآث و انتشار چاهکی در آگار تعیین گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که اثرات ضد باکتریایی عصاره متانولی زنیان بر علیه باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بوده به صورتی که بیشترین قطر هاله‌ی عدم رشد در استافیلوکوکوس اورئوس (۱۹ میلی متر) و باسیلوس سرئوس (۱۴ میلی متر) مشاهده شد. MIC و MBC عصاره متانولی زنیان بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اش‌ریشیاکلی به ترتیب ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ mg/ml بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که می‌توان زنیان را از گروه گیاهان دارویی با خواص آنتی باکتریال در نظر گرفت که پس از ارزیابی اثرات آنها در شرایط درون تنی (in vivo) آن را به عنوان جایگزینی برای داروهای شیمیایی معمول در درمان عفونت‌ها بکار برد.

کلمات کلیدی: اثرات ضد میکروبی، عصاره متانولی، زنیان، برون تنی

مقدمه

گیاه وجود داشته است (۱-۳). با این حال هنوز بیش تر گونه‌های گیاهی با خاصیت دارویی بررسی نشده و ناشناخته مانده‌اند و هنوز زمان زیادی مانده است تا منابع جدید و با ارزش گیاهی کشف شوند (۴، ۵). گیاهان دارویی یکی از منابع مهمی از عوامل ضد

استفاده از گیاهان دارویی یکی از قدیمی‌ترین دستاوردهای انسانی برای درمان اکثر بیماری‌ها بوده است به گونه‌ای که در توسعه تمامی تمدن‌های بشری همواره ارتباطی تنگاتنگ و نزدیک میان آدمی و

هوایی ساقه و برگ از ریشه‌ها، آن‌ها برای آسیاب شدن آماده شد. جهت عصاره‌گیری از روش سوکسوله استفاده شد بطوری که ۶۰ گرم پودر گیاه خشک شده همراه با ۳۰۰ ml متانول بعنوان حلال به مدت ۸ ساعت در دستگاه عصاره گیر 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 بدست آمد. از عصاره‌های تغلیظ شده توسط حلال ۵ درصد DMSO (Dimethylsulfoxide) با غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۵۰، و ۴۰۰ mg/ml جهت استفاده در آزمایش تعیین MIC (Minimum inhibitory Concentration) و Disc diffusion تهیه گردید. میکروارگانیزم‌های مطالعه در این تحقیق عبارت بودند از: استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳، باسیلوس سرئوس ATCC ۱۲۴۷، اشرشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۲ و سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ (به صورت لیوفلیزه از کلکسیون میکروبی دانشگاه تهران تهیه گردید)، که روی محیط مولر هیتون آگار کشت جداگانه‌ای بعمل آمد تا بتوان از کلنی‌های ظهور یافته برای تهیه محلولی با کدورت نیم مک فارلند ($10^6 \text{ CFU/ml} \times 1/5$) استفاده کرد. بدین منظور برای تهیه سوسپانسیون میکروبی از کشت تازه و جوان باکتری ۴-۵ کلنی به محیط کشت مولر هیتون برات منتقل شد تا کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده مطابق با لوله شماره ۵/۵ استاندارد مک فارلند تنظیم گردد. برای رسیدن به غلظت $10^6 \text{ CFU/ml} \times 1/5$ را باکتری در هر میلی لیتر، سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل لوله ۵/۵ 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 $10^6 \text{ CFU/ml} \times 1/5$ بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار انتقال یافت و بوسیله سوپ استریل در ۳ جهت کشت داده شد سپس چاهک‌هایی به قطر ۶ mm و به فاصله ۲/۵ cm از هم در سطح آگار ایجاد شد در ادامه ۱۱۰۰ 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 آنتی بیوتیک کلرامفنیکل نیز به منزله شاهد مثبت استفاده گردید

میکروبی در کشورهای مختلف هستند (۶). به گونه‌ای که حدود ۶۰ تا ۹۰ درصد جمعیت در کشورهای در حال توسعه از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند (۷). به این ترتیب گیاهان رامی توان به عنوان منبعی از مواد شیمیایی بالقوه مفید دانست که تنها بخشی از آن مورد بهره برداری قرار گرفته است. این مواد شیمیایی بالقوه مفید را می‌توان نه تنها به عنوان دارو بلکه به عنوان الگوی بی نظیر 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 زیست شناختی به کمک گرفت (۸-۱۱). گیاه زنیان (Ajwain) با نام علمی *Carum copticum* L. متعلق به خانواده گیاهان آپیاسیه (Apiaceae) است و دانه‌های آن به طور گسترده‌ای به عنوان یک افزودنی غذایی در هند استفاده می‌شود. این گیاه در مناطق خشک و نیمه خشک در مناطق مختلف مرکزی اروپا، آسیا، هند (بیشتر محصولات کشاورزی در ایالت راجستان، گجرات و بنگال غربی)، ایران (به ویژه مناطق شرقی بلوچستان)، عراق، افغانستان و پاکستان رشد می‌کند (۱۲، ۱۳). این گیاه به صورت علفی، بدون کرک معطر، افراشته و میوه‌هایی به صورت تخم مرغی شکل و زرد رنگ می‌باشد (۱۴). مهمترین ترکیبات شیمیایی آن شامل: سیمن، آلفا پینن، دی پینن، گاما پینن، میرسن و کارواکرول می‌باشد (۱۵)، (۱۶). در طب سنتی، درمان‌های مختلف درمان برای زنیان توصیف شده‌اند و در طب سنتی ایرانی برای هزاران سال استفاده می‌شوند. اثرات برونکودیلاتوری و ضد درد برای *C. copticum* نشان داده شد. اثرات درمانی این گیاه در اختلالات گوارشی مثل رفلاکس، سرفه، تومورهای شکمی، درد شکم و هلیکوباکتر پیلوری و همچنین در بیماری‌های عفونت چشم دیده شده است (۱۷). لذا هدف از این مطالعه بررسی خواص ضد میکروبی عصاره متانولی گیاه زنیان بر روی برخی از باکتری‌های پاتوژن در شرایط آزمایشگاهی برون تنی (In vitro) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی از عرصه‌های طبیعی از اطراف شهرستان مرند 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 و جدا کردن اندام‌های

نتایج

مقایسه غلظت‌های متفاوت عصاره متانولی زنیان با روش انتشار چاهک بر روی چهار سویه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اش‌ریشیای کلی و سودوموناس آئروژینوزا نشان داد که اثرات مهارکنندگی رشد عصاره متانولی گیاه زنیان بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی می‌باشد به گونه‌ای که عصاره متانولی زنیان بیشترین تاثیر را روی دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس دارد (جدول شماره ۱). مقادیر مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره متانولی گیاه زنیان علیه چهار باکتری مورد آزمایش نشان داد که غلظت کشنده این عصاره علیه استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس به ترتیب در غلظت ۱۲/۵ و ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر می‌باشد. این نتایج بیانگر آنست که در بین باکتری‌های مورد آزمایش از نظر حساسیت عصاره گیاه زنیان اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0/05$). به عبارت دیگر بیشترین حساسیت نسبت به عصاره متانولی گیاه زنیان در استافیلوکوکوس اورئوس و کمترین حساسیت در مورد سودوموناس آئروژینوزا وجود داشته است.

جدول ۲- حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره متانولی گیاه زنیان بر باکتری‌های مورد آزمایش بر حسب (mg/ml)

سویه باکتری	غلظت عصاره (mg/ml)	
	MBC	MIC
استافیلوکوکوس آئروئوس	۱۲/۵	۶/۲۵
باسیلوس سرئوس	۲۵	۱۲/۵
اش‌ریشیای کلی	۵۰	۵۰
سودوموناس آئروژینوزا	--	--

سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°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 ۱/۲۵، ۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۴۰، ۱/۸۰، ۱/۱۶۰، ۱/۳۲۰ در محیط مولر هیتون برات به دست آمد. سپس به هر کدام از رقت‌ها ۱ ml از سوسپانسیون باکتریایی فعال $10^6 \times 1/5$ 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 37°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 نمونه برداری صورت گرفت و از طریق کشت در پلیت حداقل غلظت کشنده (MBC (Minimum bactericidal concentration) تعیین گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند لوله حاوی کمترین غلظت عصاره که در پلیت مربوط به آن عدم رشد باکتری قابل مشاهده بود، بعنوان MBC آن ماده در نظر گرفته شد. جهت کاهش خطای آزمایش هر یک از آزمایشات فوق ۵ مرتبه تکرار شد. نتایج آزمایش‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. به منظور بررسی وجود اختلاف معنی‌دار در نتایج بدست آمده از آزمون آنالیز واریانس و کای اسکور استفاده گردید و اختلاف بین گروه‌ها در سطح معنی‌داری $P < 0/05$ تعیین شد.

جدول ۱- قطر هاله عدم رشد بر حسب mm چهار سویه باکتری از عصاره متانولی گیاه زنیان در غلظت‌های مختلف

سویه باکتری	غلظت عصاره (mg/ml)			
	۲۰	۳۰	۵۰	۴۰۰
استافیلوکوکوس آئروئوس	۸	۱۱	۱۶	۱۹
باسیلوس سرئوس	--	۸	۱۰	۱۶
اش‌ریشیای کلی	--	--	--	۱۰
سودوموناس آئروژینوزا	--	--	--	--

بحث و نتیجه گیری

با توجه به افزایش مقاومت باکتری‌ها به انواعی از آنتی بیوتیک‌ها، تلاش‌ها برای دست یابی و استفاده ترکیبات موجود در گیاهان و کاربردشان در درمان بیماری‌های مختلف صورت گرفته است. گیاهان از هزاران سال پیش نقش بسیار مهمی در حفظ سلامتی و بهبود کیفیت زندگی انسان‌ها داشته‌اند. گیاهان دارویی دارای خواص مفیدی هستند که از جمله می‌توان به خاصیت ضد باکتریایی، ضد انگلی، ضد قارچی و آنتی اکسیدانی اشاره کرد (۱۸). در عصاره زنیان نزدیک به ۱۶ ترکیب موثره وجود دارد که اماتیمول اصلی‌ترین و مهمترین ترکیب فنولی در این گیاه محسوب می‌شود که بیشتر از ۴۰ تا ۵۰ درصد عصاره را تشکیل می‌دهد (۱۹). از این ماده جهت درمان عفونت‌ها، نفخ شکم، سردرد و عفونت‌های قارچی استفاده می‌شود (۲۰). حقیرالسادات و همکاران طی مطالعه‌ای در استان یزد نشان دادند که گیاه زنیان بومی استان یزد دارای مواد ارزشمند دارویی و صنعتی می‌باشد که مهم‌ترین و عمده‌ترین آنها ماده ارزشمند تیمول با درصد بسیار بالایی نسبت به مطالعات پیشین بر روی دیگر مناطق ایران و جهان میباشد. همچنین گزارش نمودند که با توجه به اشتراک موادی مانند کارواکرول و گاماسیمن در اسانس فرار و عصاره هیدروالکلی زنیان میتوان این دو ماده را به عنوان عوامل احتمالی بروز اثر ضدباکتریایی این گیاه برشمرد (۲۱). باکتری‌های گرم مثبت به نسبت حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی در مقابل عصاره‌ها هستند که این امر ناشی از تفاوت در ساختار سلول باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت هستند، چرا که باکتری‌های گرم مثبت موکوپتید بیشتری در ترکیب دیواره سلولی خود دارند این در حالی است که باکتری‌های گرم منفی فقط یک لایه نازک از موکوپتید دارند بنابراین، باکتری‌های گرم منفی مقاوم‌تر هستند (۲۲). روغن زنیان یک اثر ضد باکتری قابل توجهی را در برابر استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، سالمونلا تیفی، شیگلا دیسنتریا و ویبریو کلرا دارد (۲۳). اسانس استخراج شده از دانه‌های زنیان بیشترین فعالیت ضد باکتری را نشان می‌دهند ولی عصاره استخراج شده از این گیاه دارای قدرت مهتری متغیری نسبت به باکتری‌های پاتوژن می‌باشد (۲۴، ۲۵). Singh و همکاران اثر ضد باکتریایی اسانس زنیان بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، استرپتوکوکوس همولایتیکوس، کورینه باکتریوم دیفتریا، پروتئوس

ولگاریس و کلبسیلا را به روش انتشار در آگار و هاله عدم رشد باکتری اثبات کردند (۲۶). در این مطالعه بیشترین تاثیر عصاره متانولی زنیان روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و کمترین اثر روی سودوموناس آیروژنوزا بود. ذاکرین و همکارانش با بررسی فعالیت ضد میکروبی گیاه زنیان منطقه فارس نشان دادند که بزرگترین قطر هاله ممانعت از رشد عصاره زنیان در خصوص باکتری سودوموناس آیروژنوزا و اشرشیاکلی بوده است که با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت ندارد (۲۷). شفقت و همکارانش حداقل غلظت مهار کننده عصاره زنیان بر استافیلوکوک اورئوس ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر و برای اشرشیاکلی ۵ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش کردند (۲۸). امیری و همکارانش در سال ۱۳۹۵، حداقل غلظت بازدارندگی رشد عصاره زنیان بر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر، بر استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بر اشرشیاکلی ۵۰ O157H7 میلی گرم بر میلی لیتر گزارش کردند (۱۵). در مطالعه دیگر شفقت و همکاران در سال ۱۳۹۴ با توجه به روش تقطیر با آب و با دستگاه کلونجر اسانس گیاه زنیان تهیه شد و خاصیت ضدباکتریایی آن بر روی باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس مشخص شد. حداقل بازدارندگی اسانس زنیان بر باکتری گرم مثبت ۸۷/۱ mg/ml و علیه باکتری گرم منفی اشرشیاکلی ۷۵/۳ mg/ml گزارش شد (۲۹). محمدمزاده طی مطالعه‌ای مشخص کردند که عصاره اتانولی زنیان در برابر سویه سالمونلا تیفی موریوم بهترین فعالیت آنتی باکتریال را نشان می‌دهد. همچنین نشان دادند که این عصاره بر باکتری‌های گرم منفی بیشترین حساسیت را دارد. که این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت ندارد و دلیل عدم همخوانی را میتوان به منطقه جغرافیایی گیاه جمع‌آوری شده، خاک منطقه مورد مطالعه و نوع استخراج عصاره نسبت داد (۳۰). در کل، نتایج بررسی‌ها در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که عصاره استخراج شده از گیاه دارویی زنیان دارای فعالیت ضد میکروبی علیه استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی می‌باشند که می‌توان به عنوان یک آلترناتیو مناسب در تولید داروهای گیاهی جدید پس از بررسی‌های بیشتر روی حیوانات آزمایشگاهی با کمترین عوارض جانبی به دلیل غیر شیمیایی بودن، علیه باکتری فوق بکار برده شوند.

References

- 1- Jafari-Sales A, Jafari B, Sayyahi J, Zohoori-Bonab TJJBW. Evaluation of antibacterial activity of ethanolic extract of malva neglecta and althaea officinalis L. On antibiotic-resistant strains of staphylococcus aureus. 2015;4(2):58-62.
- 2- Jafari-Sales A, Shahniani A, Fathi R, Malekzadeh P, Mobaiyen H, Bonab FRJIM, et al. Evaluation of Antibacterial Activity of Essential Oil of Ziziphora clinopodioides and Achillea wilhelmsii on Antibiotic-resistant Strains of Staphylococcus aureus. 2017;2(2):49-56.
- 3- Mobaiyen H, Jafari Sales A, Sayyahi JJJoFUoMS. Evaluating Antimicrobial Effects of Centaurea Plant's Essential Oil on Pathogenic Bacteria: Staphylococcus Aureus, Staphylococcus Epidermidis, and Escherichia Coli Isolated from Clinical Specimens. 2016;5(4):479-87.
- 4- Sales Ajjiocris. Evaluation Of Antibacterial Activity Of Ethanol Extract Of Lavandula Stoechas L. Plant On Antibiotic-Resistant Strains Of Staphylococcus Aureus. 2014;2(6):641.
- 5- Skaltsa HD, Lazari DM, Chinou IB, Loukis AEJPM. Composition and antibacterial activity of the essential oils of Stachys candida and S. chrysantha from southern Greece. 1999;65(03):255-6.
- 6- Alviano D, Alviano CJCPb. Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. 2009;10(1):106-21.
- 7- Malini M, Abirami G, Hemalatha V, Annadurai GJJJoRiP, Microbiology A. Antimicrobial activity of ethanolic and aqueous extracts of medicinal plants against waste water pathogens. 2013;3(2):40-2.
- 8- Digrak M, Alma MH, İlçim AJPB. Antibacterial and antifungal activities of Turkish medicinal plants. 2001;39(5):346-50.
- 9- Sales A, Bagherizadeh Y, Malekzadeh PJACM. Evaluation of the Antimicrobial Effects of Essential Oil of Reseda Lutea L. on Pathogenic Bacteria: Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, and Escherichia coli. 2017;8(3).
- 10- Sales AJ, Shadbad NN, Kaleybar VPJBEPLS. The Investigation of the Antibacterial effects of Ethanol extract of Cichorium intybus L. on Antibiotic-resistant Staphylococcus aureus strains. 2015;4:161-4.
- 11- Skaltsa HD, Demetzos C, Lazari D, Sokovic MJP. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight Stachys species from Greece. 2003;64(3):743-52.
- 12- Lim TK. Edible medicinal and non-medicinal plants: Springer; 2012.
- 13- Ranjan B, Manmohan S, Singh SR, Singh RBJTPR. Medicinal uses of Trachyspermum ammi: a review. 2011;5(2):247-58.
- 14- Kazemi Oskuee R, Behravan J, Ramezani MJAJOP. Chemical composition, antimicrobial activity and antiviral activity of essential oil of Carum copticum from Iran. 2011;1(2):83-90.
- 15- Amiri A, Jomehpour N. Evaluation the Effect of Anti bacterial of Ferula assa-foetida L, Carum copticum, Mentha piperita L Hydroalcoholic Extract on Standard Sensitive and Methicillin- Resistant Staphylococcus aureus, Escherichia coli O157H7 and Salmonella typhimurium %J journal of ilam university of medical sciences. 2016;24(2):72-9.
- 16- Oroojalian F, Kasra-Kermanshahi R, Azizi M, Bassami MJJoM, Plants A. Synergistic antibacterial activity of the essential oils from three medicinal plants against some important food-borne pathogens by microdilution method. 2010;26(2):133-46.
- 17- Zarshenas MM, Moein M, Samani SM, Petramfar PJJonr. An overview on ajwain (Trachyspermum ammi) pharmacological effects; modern and traditional. 2013;14(1):98-105.
- 18- Sattari M, Shahbazi N, Najar Peeryeh SJPR. An assessment of antibacterial effect of alcoholic and aquatic extracts of Eucalyptus leaves on Pseudomonas aeruginosa. 2006;8(1):19-23.
- 19- Gersbach P, Reddy NJAob. Non-invasive localization of thymol accumulation in Carum copticum (Apiaceae) fruits by chemical shift selective magnetic resonance imaging. 2002;90(2):253-7.
- 20- Usha M, Ragini S, Naqvi SJIRJBS. Antibacterial activity of acetone and ethanol extracts of Cinnamon (Cinnamomum zeylanicum) and Ajowan (Trachyspermum ammi) on four food spoilage bacteria. 2012;1(4):7-11.
- 21- Haghroalsadat B, Vahidi A, Azimzadeh M, Kalantar S, Bernard F, HOKM EF. CHEMICAL ASSESSMENT OF ACTIVE INGREDIENTS AND ANTI-OXIDANT EFFECTS OF TRACHYSPERMUM COPTICUM'S SEEDS HARVESTED IN YAZD PROVINCE. 2012.
- 22- Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim J-H, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. 2007;3(1):95-101.
- 23- Syed M, Sabir A, Chaudhary F, Bhatti MJPSIR. Antimicrobial activity of essential oils of umbelliferae part II- Trachyspermum ammi, Daucus carota, Anethum graveolens and Apium graveolens. 1986;29(3):189-92.
- 24- Mayaud L, Carricajo A, Zhiri A, Aubert GJLiam. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. 2008;47(3):167-73.
- 25- Patel JD, Patel DK, Shrivastava A, Kumar VJSW. Screening of plant extracts used in traditional anti-diarrhoeal medicines against pathogenic Escherichia coli. 2008;6(6):63-7.
- 26- Singh G, Kapoor I, Pandey S, Singh U, Singh RJPRAJIDtP, Derivatives TEoNP. Studies on essential oils: part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices. 2002;16(7):680-2.
- 27- Zakerin A, Ahmadi E, Fasihi-Ramandi M, Abdollahi S, Molazadeh A, Jafari S, et al. The Effects of Ecologic Condition on Antimicrobial Activity of Endemic Herbal Extracts in Fars

Province. 2015;5(1):111-9.

28- Shafeghat M, Sharifi-Mood B, Metanat M, Saeidi S, Sepehri-Rad N. The Antibacterial Activity of the Ajowan Extract. IJIDTM Journal. 2014;19(67):37-40.

29- Shafeghat m, najafi s, razavi-zadeh r. Essential oil composition and antimicrobial activity of oil, from ajowan

(*carum copticum*) grown in sistan- iran. ijidtm journal. 2015;20(68):37-40.

30- Mohammadzadeh A. In Vitro Antibacterial Activity of Essential oil and Ethanolic Extract of Ajowan (*Carum Copticum*) against some Food-Borne Pathogens. journal of Global Pharma Technology. 2017;9(4):20-5.