

بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی خرزهره (*Nerium oleander*)

- سمیه سبزعلی^۱، سالار بختیاری^{۲،۳}، آرمان رستم زاد^۴، کریمه حقانی^۳
- ۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.
۲- استادیار، مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران.
۳- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران.
۴- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.

یافته / دوره پانزدهم / شماره ۲ / بهار ۹۲ / ویژه نامه گیاهان دارویی

چکیده

دریافت مقاله: ۹۱۰/۱/۱۸، پذیرش مقاله: ۹۱۰/۳/۱۸

* مقدمه: در طب باستانی اعراب و چین از گیاه خرزهره برای درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود. در این تحقیق خواص ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی خرزهره بومی ایلام بر روی باکتری‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت.

* مواد و روش‌ها: گیاه مذکور از کوه‌های زاگرس شهر ایلام جمع آوری و پس از شناسایی و نامگذاری، عصاره به روش ماسراسیون تهیه شد. غلظت‌های مختلف عصاره با استفاده از روش دیسک دیفیوژن بر روی باکتری‌ها تاثیر داده شد. از آنتی بیوتیک‌های تشخیصی به عنوان کنترل مثبت و از DMSO به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. میزان MIC و MBC نیز مشخص شد.

* یافته‌ها: بیشترین تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه خرزهره در غلظت ۷۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. بیشترین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۷۶ میلی‌گرم مربوط به باکتری ۲۳۲۱ *E. faecalis* ($p < 0.05$) و کمترین قطر در همین غلظت مربوط به *P. aeruginosa* بود. نتایج نشان داد که کمترین میزان MIC مربوط به باکتری ۱۸۸۵ *S. aureus* در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده و بیشترین میزان MIC مربوط به باکتری *E. coli* و *P. aeruginosa* در غلظت ۷۶ میلی‌گرم می‌باشد ($p < 0.05$).

* بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره خرزهره حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی می‌باشند. و با توجه به قطر هاله‌های عدم رشد باکتری‌ها می‌توان عنوان کرد که عصاره هیدروالکلی خرزهره اثر باکتری کشی قابل توجه بر باکتری‌های تحت مطالعه دارد.

* واژه‌های کلیدی: عصاره هیدروالکلی، خرزهره، ضد باکتریایی.

آدرس مکاتبه: ایلام، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی

پست الکترونیک: bakhtiyaribio@gmail.com

مقدمه

مقاومت میکروبی یکی از بزرگترین مشکلات پیش روی دانشمندان می‌باشد. روش‌های درمانی متفاوتی (از جمله طب سنتی یونان) از گیاهان برای تولید دارو استفاده می‌کنند. در واقع گیاهان دارویی به عنوان یک جانشین سالم و بی‌خطر برای داروهای سنتتیک معرفی شده‌اند یافته‌های جدید نشان می‌دهند که ترکیبات غیرآنتی‌بیوتیکی مثل عصاره گیاهان و ترکیبات تشکیل دهنده‌ی آنها، فعالیت ضد باکتریایی خوبی علیه باکتری‌های پاتوژن مقاوم به دارو دارند. اهمیت و ضرورت استفاده از گیاهان در درمان بیماری‌ها بر کسی پوشیده نیست. ایران از نظر وجود گیاهان دارویی بسیار غنی است. تعداد زیادی از این داروها به صورت پودر در عطاری‌ها موجود هستند که توسط مردم در درمان بیماری‌های باکتریایی و ویروسی استفاده می‌شوند (۱-۴).

خرزهره درختچه‌ای سمی و همیشه‌سبز از راسته کوشادیان^۱، تیره خرزهرگان^۲ می‌باشد که به طور معمول در پارک‌ها برای اهداف زینتی کاشت می‌شود. این گیاه را در فارسی گیش، شبرنگ، جار، پهی و پی‌خوره نیز می‌نامند. برگ خرزهره به برگ بید شبیه است ولی از برگ بید قطورتر و بزرگ‌تر است. گل‌های سرخ و سفید دارد میوه گیاه باریک و قلمی است پوشش غلاف مانند آن حاوی تعداد زیادی دانه با موهای ابریشمی است. این گیاه در بسیاری از مناطق ایران کاشته می‌شود و در برخی نواحی نیز به صورت خود رو یافت می‌شود (۵،۶). در طب سنتی اعراب از خرزهره برای درمان برخی از بیماری‌ها از جمله سرطان و دیگر بیماری‌های تقسیم سلول و نقص ایمنی استفاده می‌شود. تمام قسمت‌های خرزهره شامل برگ، گل، ساقه، پوست، ریشه و شیره آن، سمی و حاوی گلیکوزیدهای قلبی می‌باشد به طوری که خوردن چند عدد از

آنها می‌تواند منجر به مرگ فرد شود. پس از خشک شدن و جوشاندن سمیت خرزهره حفظ می‌شود و جانوران تمایلی به خوردن آن نشان نمی‌دهند (۷،۸).

ریشه، برگ و ساقه‌ی این گیاه می‌تواند خاصیت ضد باکتریایی داشته باشد. تاکنون مطالعاتی در مورد خواص ضدباکتریایی عصاره اتانولی متانولی و کلروفرمی برگ پوست و ریشه و ساقه این گیاه انجام شده است که در همه‌ی آنها خواص ضدباکتریایی گیاه نشان داده شده است اما تاکنون مطالعه‌ای در مورد بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی برگ گیاه صورت نگرفته است. لذا در این پژوهش خواص ضدباکتریایی برگ خرزهره بومی استان ایلام مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بخش‌های هوایی گیاه خرزهره در اواخر اردیبهشت و اوایل خرداد ماه از رشته کوه‌های زاگرس در اطراف شهر ایلام جمع‌آوری شدند. پس از نامگذاری و شناسایی توسط کارشناسان گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام در دمای اتاق و در سایه خشک شدند.

برگ‌های خشک گیاه توسط آسیاب خرد شدند. مقدار ۲۰۰ گرم از پودر آسیاب شده را در یک لیتر حلال (آب مقطر- اتانول) با نسبت ۵۰-۵۰ ریخته و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و در تاریکی انکوبه شدند سپس عصاره از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ عبور داده شد مقدار ۲۴۰ میلی‌لیتر عصاره قهوه‌ای تیره با pH=۶/۱ جدا سازی شد (۹). محلول حاصل به منظور تبخیر حلال در اون ۴۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴ روز قرار داده شد.

در این مطالعه اثر عصاره گیاه خرزهره با غلظت‌های (۷۶، ۳۸، ۱۹، ۹/۵، ۵، ۲/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به

1. *Gentianales*2. *Apocynaceae*

روش کربی- بوئر (هر یک از دیسک‌ها توسط ترازوی حساس وزن شده و به مدت ۵ دقیقه درون محلول عصاره با رقت‌های مختلف قرار گرفته، پس از خشک شدن وزن دیسک‌ها تعیین شده و با توجه به اختلاف وزن و غلظت‌های تهیه شده مقدار جذب برای هر دیسک محاسبه شد.) باکتری‌های مورد آزمایش شامل استافیلوکوکوس ارئوس ATCC ۱۸۸۵، انتروکوکوس فکالیس ATCC ۲۳۲۱، پseudomonas آئروجینوزا، اشریشیاکلی، مورگانلا مورگانی، سالمونلا تیفی، کلبسیلا پنمونیه انترو باکتر آئروژنس، باسیلوس سرئوس بودند. که از بانک میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ایلام تهیه و پس از انجام تست‌های تشخیصی مورد آزمایش قرار گرفتند. به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌ی خرزهره از روش کربی- بوئر استفاده شد. باکتری‌های تحت مطالعه روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس از کلنی‌های این محیط توسط سرم فیزیولوژی رقت نیم مک‌فارلند که OD آن در طول موج ۶۲۰ نانومتر برابر با ۰/۱-۰/۰۸ است، تهیه شد. از سوسپانسیون باکتری‌ها به وسیله‌ی سواپ کتانی استریل کشت چمنی گسترده بر روی محیط مولر هینتون آگار تهیه شد، سپس دیسک‌های کاغذی که قبلاً به عصاره آغشته شده و خشک شده بودند بر روی پلیت قرار داده شدند. در این تحقیق از آنتی‌بیوتیک‌های تشخیصی کلیندامایسین، استرپتومایسین، کانامایسین، جنتامایسین، متی‌سیلین، سیپروفلوکساسین و وانکومایسین (پادتن طب) نیز برای مقایسه تاثیر عصاره استفاده شد، سپس پلیت‌ها درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله‌های عدم رشد به وسیله خط کش میلیمتری اندازه‌گیری شد (۱۰، ۱۱).

به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC)، ابتدا از باکتری‌ها کشت تازه تهیه شد، پس از تهیه‌ی نیم مک‌فارلند از باکتری‌ها در محیط مولر هینتون براث، مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده به هر یک از چاهک‌ها، که حاوی ۵۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث بودند اضافه شد، سپس به هر چاهک میزان ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های تهیه شده، عصاره اضافه شد. پلیت‌های ۹۶ خانه به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شدند، سپس با مقایسه کدورت چاهک‌های تحت تیمار با چاهک‌های کنترل میزان MIC مشخص شد. به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از باکتری‌های تحت تیمار در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه از یک رقت پایین‌تر از حداقل غلظت مهارکنندگی و دو رقت بالاتر از آن بر روی محیط مولر هینتون آگار به صورت خطی کشت داده شد و کمترین غلظتی که در آن خط رشدی بر روی محیط آگاردار دیده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد (۱۰، ۱۱).

یافته‌ها

در این مطالعه اثر عصاره گیاه خرزهره با غلظت‌های مختلف به روش کربی- بوئر بر باکتری‌های *S.aureus* ATCC ۱۸۸۵، *E.faecalis* ATCC ۲۳۲۱، *E.coli*، *P.aeruginosa*، *S.epidermidis* ATCC ۲۴۰۵ و *E.aerogenes*، *K.pneumonia*، *S.typhi*، *M.morganii* و *B.cereus* بررسی و نتایج حاصل نشان داد که گیاه مورد نظر دارای اثر ضدباکتریایی است. فعالیت ضد باکتریایی عصاره با اندازه‌گیری حضور و یا عدم حضور هاله عدم رشد و اندازه‌گیری قطر این هاله‌ها انجام شد. نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی خرزهره دارای خواص ضد باکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد. در این پژوهش قطر هاله‌ی عدم رشد کمتر از ۸ میلی‌متر به عنوان مقاوم، ۸ تا ۹ میلی‌متر نسبتاً مقاوم، بیشتر از ۱۰ تا ۱۲ میلی‌متر به عنوان

نسبتاً حساس و بیشتر از ۱۲ میلی متر به عنوان حساس در نظر گرفته شد (۱۲،۱۳).

مقایسه‌ی نتایج نشان داد که عصاره خرزهره در غلظت ۷۶ mg/ml در بین باکتری‌های گرم مثبت (جدول ۱) بیشترین تاثیر را بر انتروکوکوس فکالیس با قطر هاله‌ی مهاري ۱۶ mm داشته ($p < 0.05$) و کمترین تاثیر در همین غلظت مربوط به باسیلوس سرئوس با قطر هاله‌ی مهاري ۱۴ mm بوده است. همچنین مقایسه نتایج تاثیر عصاره بر باکتری‌های گرم منفی (جدول ۴) نشان داد که کلبسیلا پنمونیه با قطر

هاله‌ی مهاري ۱۲ mm حساس‌ترین ($p < 0.05$) و باکتری‌های انترو باکتر آئروژنس و پسودوموناس آئروجینوزا با قطر هاله‌ی مهاري ۹ mm به ترتیب مقاوم‌ترین باکتری‌ها در مقابل عصاره بودند. کمترین مقدار MIC در بین باکتری‌های گرم مثبت (جدول ۲) مربوط به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با میزان ۵ mg/ml و کمترین میزان MIC در باکتری‌های گرم منفی (جدول شماره ۳) مربوط به مورگانلا مورگانی و انتروباکتر آئروژنس با مقدار ۵ mg/ml بود ($p < 0.05$).

جدول ۱. تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها و عصاره هیدروالکلی خرزهره بر باکتری‌های گرم مثبت

۲۴۰۵S.epidermidis ATCC	B. cereus	۲۳۲۱E. faecalis ATCC	۱۸۸۵S. aureus ATCC	آنتی‌بیوتیک غلظت عصاره
۶	۶	۱۴	۶	Vancomycin
۲۷/۳۳	۲۴	۱۸/۶۶	۲۷/۶۶	Ciprofloxacin
۸/۶۶	۶	۸/۳۳	۹/۳۳	Clindamycin
۶	۱۴/۳۳	۱۷/۳۳	۱۲/۳۳	Sterptomycin
۶	۶	۶	۶	Methicillin
۱۹/۳۳	۲۴/۳۳	۲۲	۲۳	Gentamicin
۶	۱۴	۶	۲۳	Kanamycin
۱۵	۱۴	۱۶*	۱۵	۷۶
۱۳	۱۲	۱۳	۱۳	۳۸
۸	۹	۱۱	۱۰	۱۹
۷	۶	۸	۸	۹/۵
۶	۶	۷	۶	۵
۶	۶	۶	۶	۲/۵
۶	۶	۶	۶	۱/۵

*معنی‌دار ($p < 0.05$)

جدول ۲. حداقل غلظت مهارکننده حداقل غلظت کشنده عصاره هیدروالکلی خرزهره بر باکتری‌های گرم مثبت (مقادیر بر حسب میلی

گرم/میلی لیتر می‌باشد)

۱۸۸۵S. aureus ATCC	۲۳۲۱E. faecalis ATCC	B. cereus	۲۴۰۵S.epidermidis ATCC	غلظت عصاره (mg/ml)
۵*	۹/۵	۹/۵	۹/۵	۹/۵
۹/۵*	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹

*, معنی‌دار ($p < 0.05$).

جدول ۳. حداقل غلظت مهارکننده حداقل غلظت کشنده عصاره هیدروالکلی خرزهره بر باکتری‌های گرم منفی (مقادیر بر حسب میلی گرم/میلی لیتر می‌باشد)

P. aeruginosa	E. coli	M. morgani	S. typhi	K. pneumonia	E. aerogenes	غلظت عصاره (mg/ml)
۱۹	۱۹	۵*	۹/۵	۹/۵	۵	MIC
۳۸	۳۸	۹/۵*	۱۹	۱۹	۹/۵	MBC

*, معنی دار (p < 0/05).

جدول ۴. تاثیر آنتی بیوتیک ها و عصاره هیدروالکلی خرزهره بر باکتری های گرم منفی.

P. aeruginosa	E. coli	M. morganii	S. typhi	K. pneumonia	E. aerogenes	آنتی بیوتیک	غلظت عصاره
۶	۶	۶	۶	۶	۱۱	Vancomycin	
۲۱	۲۶/۳۳	۲۴/۶۶	۲۷/۶۶	۲۹	۲۵	Ciprofloxacin	
۶	۶	۶	۶	۶	۶	Clindamycin	
۱۴/۳۳	۱۹/۳۳	۱۷/۳۳	۲۲/۶۶	۱۹/۶۶	۲۰/۶۶	Gentamicin	
۶	۱۲/۶۶	۱۲/۶۶	۹/۶۶	۱۴/۶۶	۱۵	Sterptomycin	
۶	۶	۶	۶	۶	۶	Methicillin	
۲۱	۱۱	۶	۱۲	۲۴	۲۰	Kanamycin	
۹	۱۱	۱۰	۱۱	۱۲*	۹	۷۶	
۸	۹	۹	۹	۱۰	۸	۳۸	
۷	۷	۷	۷	۸	۷	۱۹	غلظت عصاره (mg/ml)
۶	۶	۶	۶	۶	۶	۹/۵	
۶	۶	۶	۶	۶	۶	۵	
۶	۶	۶	۶	۶	۶	۲/۵	
۶	۶	۶	۶	۶	۶	۱/۵	

*, معنی دار (p < 0/05).

بحث و نتیجه گیری

در سال ۲۰۰۴ در پژوهشی خواص ضدباکتریایی عصاره ای اتانولی، متانولی و کلروفرمی، برگ و ریشه بررسی شد. نتایج نشان داد که عصار کلروفرمی برگ فقط تاثیر مهاری روی رشد باکتری *Escherichia coli* داشت این باکتری نسبت به عصاره کلروفرمی نسبتاً مقاوم بود ولی سایر باکتری ها به عصاره کلروفرمی برگ مقاوم بودند باکتری های *Bacillus subtilis*، *Bacillus pamilus* و *Escherichia coli* نسبت به عصاره اتانولی برگ خرزهره نسبتاً حساس و *Staphylococcus aureus* حساس گزارش شدند. عصاره متانولی نیز دارای تاثیر مهاری شبیه به عصاره اتانولی بوده است. نتایج در مورد عصاره ای تهیه شده از ریشه نیز مشابه بوده و فقط باکتری *Escherichia coli* نسبت به عصاره نسبتاً مقاوم بود و سایر باکتری ها کاملاً نسبت به عصاره کلروفرمی

ریشه مقاوم بوده اند. باکتری های *Bacillus pamilus* و *Bacillus subtilis* نسبت به عصاره اتانولی ریشه خرزهره نسبتاً حساس و *Staphylococcus aureus* حساس بوده است. باکتری *Bacillus pamilus* نسبت به عصاره متانولی ریشه نسبتاً حساس و *Bacillus subtilis* و *Escherichia coli* نسبت به عصاره نسبتاً مقاوم و *Staphylococcus aureus* نسبت به عصاره متانولی ریشه مقاوم بودند. مقایسه قطر هاله عدم رشد با توجه به غلظت های استفاده شده نشان می دهد که تاثیر عصاره هیدروالکلی استفاده شده در پژوهش حاضر بیشتر از عصاره های استفاده شده در پژوهش های پیشین می باشد (۱۴).

همچنین بررسی خواص ضدباکتریایی ۳ عصاره پترولومی، اتانولی و آبی ساقه خرزهره بر ۴ باکتری *B. subtilis*، *S. aureus*، *M. luteus* و *P. aeruginosa* نشان داد که

(۱۵). که این تفاوت می‌تواند به دلیل تفاوت در قسمت‌هایی از گیاه که برای عصاره‌گیری استفاده شده یا تفاوت روش عصاره‌گیری و همچنین تفاوت در ترکیبات گیاه به دلیل تفاوت شرایط جغرافیایی و یا اقلیمی باشد. خرزهره همچنین دارای خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی بر روی بیماری‌زاهای انسانی و گیاهی است (۱۶).

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایلام که با تصویب و تأمین هزینه‌های این طرح (شماره ۹۱۹۰۰۱/۱)، ما را در انجام این پروژه تحقیقاتی یاری رسانیده‌اند، سپاسگزاری می‌نماییم.

بیشترین قطر هاله عدم رشد در غلظت 100 mg/ml دیده شد. نتایج نشان داد که تاثیر عصاره اتانولی بر ۲ باکتری *S.aureus* و *M.lutens* به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۱۸ و ۱۴ میلی‌متر بیشتر از سایر باکتری‌ها بود. همچنین ۲ باکتری *B.subtilis* و *P.aeruginosa* به عصاره آبی بیشتر از دو عصاره دیگر حساس بودند قطر هاله عدم رشد برای ۲ باکتری اخیر در غلظت 100 mg/ml به ترتیب ۱۵ و ۱۷ میلی‌متر بود. مقایسه این نتایج با قطر هاله مهاری در غلظت مشابه 76 mg/ml نشان می‌دهد که تاثیر عصاره هیدروالکلی تهیه شده از برگ خرزهره بومی استان ایلام از عصاره‌های استفاده شده بیشتر بوده است

References

1. Sonboli A, Babakhani B, Mehrabian AR. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2006;61:160-164.
2. Chavan MJ, Shinde DB, Nirmal SA. Major volatile constituents of *Annona squamosa* L. bark *Nat Prod Res*. 2006;20:754-757.
3. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol*. 1999;12:564-582.
4. Ahmad A, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45. Indian medicinal plants against multi- drug resistant human pathogens. *J Ethnopharmacol*. 2001;74:113-123.
5. Begum S, Razika S, Siddiqui SB. Triterpenoides from the leaves of *Nerium oleander*. *Phytochemistry*. 1998;44(2),329-332.
6. Kirtikar KR, Bassu BD. Indian medicinal plants, India: International book distributors Dehradun, 1999.
7. Pearn J, Oleander poisoning. In-Toxic plants & Animals, A guide For Australia, Brisbane, Queensland. *J Museum*. 1987:37-41.
8. Baytar IA. *An Encyclopaedia of Medicine and Nutrition*, Lebanon: Dar Al-Kutub, 1992.
9. Rshan LJ, Franke K, Myint Khine M, Kelter G, Fiebig HH, Neumann J, et al. Characterization of the anticancer properties of monoglycosidic cardenolides isolated from *Nerium oleander* and *Streptocaulon tomentosum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;134:781-788.
10. Baron E.J, gold F, Sydney M. *diagnostic Microbiology*. 8th Ed: Mosby company; 1990.
11. Murray P, Baron R, P fauer E.J, Tenoyer M, Yolken F.C, Robert H. *Manual of clinical Microbiology*. 7th Ed: American society for microbiology; 1999.
12. Androw, J.M.; BSAC Standardized disc susceptibility testing method. *J Antimicrobial Chemotherapy*. 2001;7(5): 48-50.
13. Nastro A, Ger MP, Angelo VD, Cannatelli MAC. Extraction method and bioautography for evaluation plant antimicrobial activity. *Applied Microbiol*. 2001;15:379-382.
14. Hussain HA, Gorski MS. Antimicrobial activity of *Nerium oleander* Linn. *Asian Journal of Plant Sciences*. 2004;3(2):177-180.
15. Tannu A, Garima R, Gupta AK, Suresh K, Kuldeep S. Anti-microbial activity of *Nerium oleander* stem extract. *International Journal of Pharma Professional's Research Article*. 2011;2(1):210-211.
16. Mostaqul Huq M, Jabbar A, Rashid MA, Hasan CMA. Novel antibacterial and cardiac steroid from the roots of *Nerium oleander*. *Fitoterapia*. 1999;70(1):5-8.