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

سمیه سبزعلی[1]، سالار بختیاری[2و3]، آرمان رستم زاد[4]، کریمه حقانی[3]

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.

٤- 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: ۹۲/۱/۱۸ ، پذیرش مقاله: ۹۲/۳/۱۸

✱ **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 میلی-لیتر 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 قطرهاله‌های 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 (۴-۱).

خرزهره درختچه‌ای سمی و همیشه‌سبز از راسته کوشادیان[1]، تیره خرزهرگان[2] می‌باشدکه 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 ساقه ی 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

بخش های هوایی گیاه خرزهره در اواخر اردیبهشت و اوایل خرداد ماه از رشته کوه‌های زاگرس در اطراف شهر ایلام جمع آوری شدند. پس از نامگذاری و شناسایی توسط کارشناسان گیاه شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام در دمای اتاق ودر 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 غلظت های (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 ۱۸۸۵ *ATCC*، انتروکوکوس فکالیس ۲۳۲۱ *ATCC*، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ۲۴۰۵ *ATCC*، پسودوموناس 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 ضدمیکروبی عصاره‌ی خرزهره از روش کربی- بوئر استفاده شد.

باکتری‌های تحت مطالعه روی محیط مولر هینتون‌آگار 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 قبلا به عصاره آغشته شده و خشک شده بودند بر روی پلیت قرار داده شدند. در این تحقیق از آنتی‌بیوتیک‌های تشخیصی کلیندامایسین، استرپتومایسین، کانامایسین، جنتامیسین، متی‌سیلین، سیپروفلوکساسین و وانکومایسین (پادتن طب) نیز برای مقایسه تاثیر عصاره استفاده شد، سپس پلیت ها درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله‌های عدم رشد به وسیله خط کش میلیمتری اندازگیری 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 هرچاهک 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 غلظت های مختلف به روش کربی- بوئر بر باکتری‌های *S.aureus* ATCC ۱۸۸۵، *E.faecalis* ATCC ۲۳۲۱، *E.coli*، *P.aeruginosa*، *S.epidermidis* ATCC ۲۴۰۵، *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 اندازگیری حضور و یا عدم حضور هاله عدم رشد و اندازگیری 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 رشدکمتر 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 میلی‌متر به عنوان حساس در نظر گرفته شد (۱۲،۱۳).

مقایسه‌ی نتایج نشان داد کـه عصـاره خرزهـره در غلظـت ۷۶ mg/ml در بـین بـاکتری‌هـای گـرم مثبـت (جـدول ۱) بیشترین تاثیر را بر انتروکوکوس فکالیس با قطر هاله‌ی مهـاری ۱۶ mm داشته (p<۰/۰۵) وکمترین تـاثیر در همـین غلظـت مربوط به باسیلوس سرئوس بـا قطـر هالـه‌ی مهـاری ۱۴ mm بوده است. همچنین مقایسه نتایج تاثیر عصاره بـر بـاکتری‌هـای گرم منفی (جدول ۴) نشان داد که کلبسـیلا پنمونیـه بـا قطـر هاله‌ی مهاری ۱۲ mm حساس‌ترین (p<۰/۰۵) و باکتری‌هـای انترو باکتر آئروژنس و پسودوموناس آئروجینوزا بـا قطـر هالـه‌ی مهاری ۹ mm به ترتیب مقاوم‌ترین باکتری‌ها در مقابل عصـاره بودند. کمترین مقدار MIC در بین بـاکتری‌هـای گـرم مثبـت (جـدول ۲) مربـوط بـه بـاکتری اسـتافیلوکوکوس اورئـوس بـا میزان mg/ml ۵ و کمترین میزان MIC در باکتری‌های گـرم منفی (جدول شماره ۳) مربوط به مورگانلا مورگانی و انتروباکتر آئروژنس با مقدار mg/ml ۵ بود (p<۰/۰۵).

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

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

*معنی‌دار (p<۰/۰۵)

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

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

*، معنی‌دار (p<۰/۰۵).

جدول ۳. حداقل غلظت مهارکننده حداقل غلظت کشنده عصاره هیدروالکلی خرزهره برباکتری‌های گرم منفی مقادیر بر حسب میلی گرم/میلی‌لیتر می‌باشد

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

*، معنی‌دار (p<۰/۰۵).

جدول ۴. تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها وعصاره هیدروالکلی خرزهره بر باکتری‌های گرم منفی.

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

*، معنی‌دار (p<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

در سال ۲۰۰۴ در پژوهشی خواص ضدباکتریایی عصاره‌ی 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 باکتری‌ها به عصاره کلروفرمی برگ مقاوم بودند باکتری‌های *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 عصاره‌ی تهیه شده از ریشه نیز مشابه بوده و فقط باکتری *Escherichia coli* نسبت به عصاره نسبتاً مقاوم بود و سایر باکتری‌ها کاملا نسبت به عصاره کلروفرمی ریشه مقاوم بوده‌اند. باکتری‌های *Bacillus pamilus*، *Bacillus subtilis* و *Escherichia coli* 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 غلظت‌های استفاده شده نشان می‌دهد که تاثیر عصاره هیدروالکلی استفاده شده در پژوهش حاضر بیشتر از عصاره‌های استفاده شده در پژوهش‌های پیشین می‌باشد (۱۴).

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

بیشترین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۱۰۰*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 *P.aeruginosa* و *B.subtilis* به عصاره آبی بیشتر از دو عصاره دیگر حساس بودند قطر هاله عدم رشد برای ۲ باکتری اخیر در غلظت ۱۰۰mg/ml به ترتیب ۱۵ و ۱۷ میلیمتر بود. مقایسه این نتایج با قطر هاله مهاری در غلظت مشابه ۷۶mg/ml نشان می‌دهد که تاثیر عصاره هیدروالکلی تهیه شده از برگ خرزهره بومی استان ایلام از عصاره‌های استفاده شده بیشتر بوده است (۱۵). که این تفاوت می‌تواند به دلیل تفاوت در قسمت‌هایی ازگیاه 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 کـه بـا تصویب و تأمین هزینه‌های این طرح (شماره ۹۱۹۰۰۱/۱)، ما را در انجام این پروژه تحقیقاتی یاری رسانیده‌اند، سپاسگزاری می‌نماییم.

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 Ethnopharmocol. 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. Rashan 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. Exteraction method and biouautography for evallution plant antimicrobial activity. Applied Micrbiol. 2001;15:379-382.
14. Hussain HA, Gorsi MS. Antimicrobial activity of N*erium 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.