Veterinary Clinical Pathology, Vol. 14, No. 54, Summer 2020

"Research article" **DOI: 10.30495/jvcp.2020.1883526.1247**

Antibacterial effect of *Capparis spinosa* (*Capparis spinosa*) and *Pistacia atlantica* (*Pistacia atlantica*) extracts on growth of *Escherichia coli in vitro* and *in vivo*

Ansari Chaharsughi, M.S.[1], Ahmadi Dastgerdi, A.[2*], Gholami-Ahangaran, M.[3]

1- Graduate of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ardestan Branch, Islamic Azad University, Ardestan, Iran.
3- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[*]Corresponding author's email: as.ahmadi17@gmail.com
(Received: 2019/11/25 Accepted: 2020/8/15)

Abstract

Escherichia coli is the cause of many surgical wound infections. This study was designed to investigate the antibacterial effects of hydroalcoholic extract of *Capparis spinosa* and *pistacia atlantica* on *E. coli* in surgical wounds using a rat model. The antimicrobial activity of *Capparis spinosa* and *pistacia altantica* extract was first determined by paper disk diffusion method to determine Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and also Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Then, 30 male *Sprague-Dawley* rats were randomly divided into three treatment groups. A circular incision was made on the dorsal inter-scapular region of each rat. Then, rats were inoculated topically with 1.5×10^8 CFU of *E. coli* at the site of skin wounds. The extracts of *Capparis spinosa* and *Pistacia atlantica* was applied to wounds twice a day during the experiment. Animals of the control group were left untreated. The results showed that the extract of *Caparis spinosa* and *Pistacia atlantica* had antimicrobial effects against *Escherichia coli*. The antimicrobial activity of *Capparis spinosa* extract against *E. coli* was higher than the *Pistacia atlantica* extract (The MIC and MBC values). Also there was a significant difference in the rats treated with the extracts in comparison to the control group. It can be concluded that the extracts of these plants have antimicrobial properties and inhibit the growth of *Escherichia coli* in infected wounds and thus can accelerate the wound healing process.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: *Capparis spinosa*, *Escherichia coli*, Extract, *Pistacia atlantica*, Surgical wound.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/jvcp.2020.1883526.1247

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره میوه گیاهان *کاپاریس اسپینوزا* (*Capparis spinosa*) و پسته وحشی (*Pistacia atlantica*) بر رشد باکتری *اشریشیاکولای* در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی

محمد سجاد انصاری چهارسوقی[۱]، آسیه احمدی دستگردی[۲*]، مجید غلامی آهنگران[۳]

۱- دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای، دانشکده دامپزشکی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران.

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اردستان، ایران.

۳- دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات: as.ahmadi17@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۸/۹/٤ پذیرش نهایی: ۹۹/۵/۲۹)

چکیده

اشریشیاکولای **عامل بسیاری از عفونت‌های مربوط به زخم‌های جراحی می‌باشد. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی گیاهان *کاپاریس‌اسپینوزا* (*Capparis spinose*) و پسته‌وحشی (*Pistacia atlantica*) در شرایط آزمایشگاهی و در درمان زخم عفونی ناشی از *اشریشیاکولای* در مدل حیوانی انجام گرفت. ابتدا با استفاده از روش رقیق‌سازی در لوله، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (minimum inhibitory concentration; MIC) و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های مذکور (minimum bactericidal concentration; MBC) تعیین گردید. سپس تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار انتخاب و پس از تراشیدن موضع جراحی، در ناحیه پشت و بین دو کتف، برشی ایجاد و باکتری *اشریشیاکولای* با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ cfu/ml در محل زخم تلقیح گردید. سپس سطح زخم با عصاره گیاهان *کاپاریس اسپینوزا* و پسته وحشی آغشته گردید. در روزهای پنجم و دهم، از محل زخم نمونه‌برداری شد و میزان آلودگی باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره گیاهان *کاپاریس اسپینوزا* و پسته وحشی، اثرات ضدمیکروبی علیه *اشریشیاکولای* دارند. میزان MIC و MBC عصاره *کاپاریس اسپینوزا* و قطر هاله عدم رشد آن نیز بیشتر از عصاره پسته وحشی بود. همچنین نتایج حاصله تفاوت معنی‌داری را در موش‌های تیمارشده با عصاره *کاپاریس اسپینوزا* و پسته وحشی در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ($p<۰/۰۵$). می‌توان نتیجه گرفت که عصاره حاصل از این گیاهان باعث مهار رشد باکتری *اشریشیاکولای* در زخم‌های عفونی شده و از این طریق می‌توانند منجر به تسریع روند التیام زخم گردند.**

کلیدواژه‌ها: ***اشریشیاکولای*****، زخم عفونی، عصاره، *کاپاریس اسپینوزا*، پسته وحشی.**

مقدمه

امروزه استفاده از ترکیبات گیاهی مانند عصاره‌ها برای درمان بیماری‌ها و عفونت‌ها مورد توجه محققین قرار گرفته است. گیاه درمانی یکی از قدیمی‌ترین شیوه‌های درمانی است که انسان آن را گسترش داده است. استفاده از عصاره گیاهان دارویی به‌عنوان درمان‌های جایگزین سالم و موثر در درمان سوختگی‌ها و عفونت‌ها درنظر گرفته می‌شوند. تاثیر زیاد، عوارض جانبی ناچیز و قیمت نسبتا پایین آن‌ها باعث علاقه و توجه روزافزون به درمان با گیاهان دارویی شده است. داروهای گیاهی یا عصاره آن‌ها حتی در مواقعی که مکانیسم عملشان نامشخص بوده از دیرباز به‌طور گسترده کاربرد داشته‌اند. بنابراین، مطالعه روی عصاره‌های گیاهی برای پی بردن به مکانیسم عمل، کارایی و سالم بودن آن‌ها می‌تواند بسیار مفید واقع گردد (Kummar *et al*., 2007).

کشور ایران به دلیل داشتن شرایط اقلیمی خاص یکی از غنی‌ترین منابع برای گیاهان دارویی به شمار می‌رود. گیاه کَبَر با نام علمی *کاپاریس اسپینوزا* از راسته میخک‌سانان و از خانواده کاپاریداسه، بوته‌ای طویل‌العمر و خزنده با شاخه‌هایی منشعب و کرک‌دار به طول ۱ تا ۱/۵ متر است که در اعماق خاک نفوذ می‌کند. این گیاه با نام‌های کبرو، داغ قارپوزی، خیاروک، لگجی، لیجین، لیجون و درخت اَصَف نیز شناخته می‌شود. تمامی قسمت‌های گیاه مانند میوه، برگ، پوست، ریشه، غنچه و ساقه مورد استفاده قرار می‌گیرد. ضماد خشک آن برای خشک کردن جراحت‌های بدخیم مفید بوده و دردهای مفاصل، سیاتیک، نقرص و درد لگن را هم تسکین می‌دهد. گیاه کَبَر محتوی کربوهیدرات، فیبر، چربی، پروتئین، ویتامین‌های C، A، K و E، نیاسین، ریبوفلاوین، آهن، سدیم و پتاسیم می‌باشد. همچنین این گیاه سرشار از ترکیبات فلاونوئیدی مانند روتین و کوئرستین است که هر دوی این ترکیبات خاصیت آنتی اکسیدانی دارند (Emad *et al*., 2012).

پسته وحشی یا بنه (*Pistacia atlantica*)، یکی از گیاهان خودرو متعلق به خانواده آناکاردیاسه است که در اکثر مناطق کوهستانی ایران به‌خصوص کوه دنا به وفور یافت می‌شود. این گیاه دارای خواص ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی است و به‌دلیل حضور میزان زیاد اسیدچرب غیراشباع در میوه آن، محققان مصرف آن را در کاهش بیماری‌های قلبی عروقی توصیه کرده‌اند (Benhammou *et al*., 2008).

اثرات ضدمیکروبی گیاهان *کاپاریس اسپینوزا* و پسته وحشی در تحقیقات بسیاری بررسی شده است (Magiatis *et al*., 1999; Moraghebi *et al*., 2000; Ben Douissa *et al*., 2005; Benhammou *et al*., 2008; Gourine *et al*., 2010; Hanafi *et al*., 2012). همچنین نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که پسته‌وحشی بر روی باکتری‌های *استرپتوکوکوس موتانس*، *استافیلوکوکوس‌اورئوس*، *سالمونلا انتریتیدیس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیاکولای*، هلیکوباکتر پیلوری، کپک و مخمر (*کاندیدا آلبیکانس*، *آسپرژیلوس فلاووس*، *رازیوپوس استولونیفر و فوزاریوم*) اثر کشندگی دارد (Benhammou *et al*., 2008; Hanafi *et al*., 2012). مرتضوی و همکاران در سال ۲۰۱۳ بیان کردند عصاره اتانولی پوسته و مغز هسته میوه پسته وحشی دارای اثرات ضد میکروبی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکولای* می‌باشد و بیشترین تاثیر در جلوگیری از

رشد باکتری‌ها مربوط به عصاره پوسته علیه باکتری *اشریشیاکولای* است (Mortazavi *et al*., 2013).

عفونت زخم یکی از معمول‌ترین مشکلات بیماران متعاقب جراحی می‌باشد که به‌طور مشخص می‌تواند زمان بستری شدن بیمار و هزینه‌های ناشی از آن را افزایش دهد. اگرچه از بین بردن این نوع از عفونت زخم غیر ممکن است، اما تلاش برای کاهش میزان آن می‌تواند کمک شایانی به بهبود وضعیت بیماران و در نتیجه پایین آمدن هزینه‌های درمانی نماید. *اشریشیاکولای* بعد از *استافیلوکوکوس اورئوس* معمول‌ترین عامل ایجادکننده زخم‌های عفونی متعاقب جراحی می‌باشد (Schito, 2006; Bowersox, 2007). با توجه به استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و هشدار سازمان‌های جهانی مبنی بر کاهش یا عدم استفاده از آن‌ها، مطالعه بر روی گیاهان دارویی و استفاده بالینی از ترکیبات طبیعی مذکور مورد توجه قرار گرفته است (Schito, 2006; Das *et al*., 2010). تحقیقات زیادی در مورد تاثیر گیاهان دارویی بر ترمیم زخم‌ها صورت گرفته است. ولیلو و ولیلو در سال ۲۰۱۷ پیشنهاد کردند که در درمان زخم‌های سوختگی عفونی می‌توان از عسل و مخلوط عصاره آبی دارچین و عسل نیز استفاده کرد. مشاهدات هیستوپاتولوژیکی از لحاظ ترمیم محل زخم و همچنین اندازه‌گیری قطر زخم نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تیمار و شاهد وجود دارد (Valilou and Valilou, 2017). اسانس گیاهان آویشن، اسپند و چویل نیز بر عفونت‌زایی *سودوموناس آئروژینوزا* اثر بازدارندگی دارند (Ghashghae *et al*., 2016). همچنین استفاده از عصاره گیاه دارچین به صورت موضعی و تزریقی در ترمیم زخم‌های پوستی موش‌های صحرایی دیابتی و غیر دیابتی موثر بوده است (Ahmadi and Gasemi, 2015). همچنین طبق بررسی‌های انجام شده، عصاره گیاه آلوئه‌ورا در ترمیم زخم‌های سوختگی بهتر از سیلورسولفادیازین عمل می‌کند و سرعت بهبودی با آن نیز بیشتر می‌باشد (Akhoondinasab *et al*., 2014). یادگار و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثرات التیامی گیاه *کامیفورا میرا* را در ترمیم سوختگی تجربی پوست بررسی کرده و اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد میکروبی این گیاه را تایید و بیان کردند که صمغ گیاه مذکور در مقایسه با سیلورسولفادیازین که امروزه به طور گسترده در بیماران مورد مصرف قرار می‌گیرد، دارای اثرات التیام‌بخش بهتری بر زخم‌های حاصله از سوختگی می‌باشد (Yadeghar *et al*., 2013). عصاره گیاه گلدر هم در ترمیم زخم‌های سوختگی موثر است و تاثیر مثبتی در تکثیر سلولی و ترمیم بافت پوششی دارد (Ganjali *et al*., 2013). نقش عصاره گیاه آب‌قاشقی (*Centella asiatic*) در التیام زخم‌های معمولی و سوختگی توسط محققین گزارش شده و مشخص گردیده است که عصاره گیاه مذکور، روند بهبود زخم را هم در مورد زخم برش و هم در مورد زخم سوختگی تسهیل می‌کند (Sombonwong *et al*., 2012). تحقیقاتی هم بیانگر اثرات ضدمیکروبی ترکیبات موجود در اولئورزین پسته وحشی و تاثیر آن در زخم معده می‌باشد (Tohidi *et al*., 2011; Sharifi *et al*., 2012).

از آنجایی که تأیید اثر التیامی عصاره گیاهان *کاپاریس اسپینوزا* و پسته وحشی می‌تواند مصرف این فرآوردها را برای درمان زخم‌های عفونی قابل توجیه سازد و تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر تاثیر این گیاهان بر

زخم‌های عفونی ارائه نشده، لذا هدف از انجام مطالعه حاضر ارزیابی اثرات ضد میکروبی عصاره گیاهان *کاپاریس اسپینوزا* و پسته وحشی در شرایط آزمایشگاهی و نیز بالینی در مورد زخم جلدی عفونی شده توسط *اشریشیاکولای* در مدل حیوانی بود.

مواد و روش‌ها

- **جمع‌آوری و آماده‌سازی گیاهان مورد استفاده:** مطالعه حاضر در سال ۱۳۹٦ در مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار انجام شد. گیاه *کاپاریس اسپینوزا* از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی ورامین و گیاه پسته وحشی از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی مشهد خریداری و در هرباریوم مرکز تحقیقات گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج شناسایی شد. بخش میوه گیاهان مذکور جدا شده و بعد از خشک شدن در سایه، توسط آسیاب (Mulinex, AR 110010, Spain) پودر شده و در فریزر (٤- درجه سلسیوس) نگه‌داری شدند.

- **استخراج عصاره گیاهان مورد آزمایش:** برای استخراج عصاره هیدروالکلی پودر خشک‌شده میوه گیاهان مورد آزمایش، از روش خیساندن استفاده شد. بدین منظور ٦۰۰ گرم از پودر میوه هر یک از گیاهان مورد آزمایش با اتانول ۷۰ درجه مخلوط گردیده و در ادامه به مدت ۲٤ ساعت با استفاده از شیکر (KS500, Japan) هم‌زده می‌شد و سپس به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۱ (واتمن، انگلستان) فیلتر می‌گردید. در نهایت عصاره به‌دست آمده با استفاده از دستگاه روتاری (هیدولف، آلمان) در شرایط خلأ تغلیظ گردیده و تا زمان انجام آزمایش در یخچال (٤ درجه سلسیوس) نگه‌داری می‌شد (Mortazavi *et al*., 2013).

- **آزمون‌های میکروبی:** جهت بررسی ویژگی‌های ضدمیکروبی عصاره گیاهان *کاپاریس اسپینوزا* و پسته وحشی علیه باکتری *اشریشیاکولای*، ضمن انجام آزمایش سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک در آگار، MIC (حداقل غلظت بازدارندگی) و MBC (حداقل غلظت کشندگی) عصاره‌های مذکور هم تعیین شد (Mortazavi *et al*., 2013). بدین منظور باکتری *اشریشیاکولای* (ATCC 10536) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه گردید و برای فعال کردن آن، طبق دستورالعمل، باکتری لیوفیلیزشده در شرایط استریل رقیق‌سازی شد و در ادامه در محیط بلاد آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد تا کلنی‌های خالص باکتری تشکیل شود.

- **تهیه سوسپانسیون باکتریایی استاندارد:** جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی، چند کلنی مجزای مربوط به باکتری *اشریشیاکولای* از سطح محیط کشت بلاد آگار برداشته شد و به یک لوله حاوی نوترینت براث (مرک، آلمان) منتقل گردید. در ادامه سوسپانسیون میکروبی که کدورت آن معادل کدورت لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ cfu/ml) بود، تهیه شد (Mortazavi *et al*., 2013).

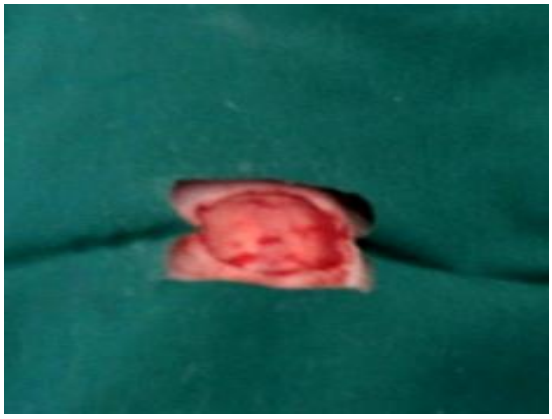
- **بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های مورد آزمایش:** با استفاده از روش رقت لوله‌ای، حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره هیدروالکلی گیاهان مورد آزمایش تعیین شد. برای تعیین MIC از ۱۱ لوله آزمایش استفاده شد به‌طوری‌که در۹ لوله اول با استفاده از ۵۰۰ میکرولیتر از هر عصاره خالص و محیط کشت نوترینت براث (مرک، آلمان)، رقت‌های سریال مختلف هر

عصاره یعنی رقت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در لوله اول تا ۰/۳۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در لوله نهم تهیه شد و در یک لوله هم به عنوان کنترل مثبت عصاره رقیق شده (رقت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در لوله اول تا ۰/۳۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در لوله نهم) به علاوه محیط کشت نوترینت براث (مرک، آلمان) ریخته شد و یک لوله نیز به عنوان کنترل منفی فقط حاوی سوسپانسیون میکروبی به علاوه محیط کشت نوترینت براث (مرک، آلمان) بود. در ادامه به تمام لوله‌ها به جز لوله شماره ۱۰ (کنترل مثبت)، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه‌شده در مرحله قبل برای *اشریشیاکولای*، انتقال داده شد. همه لوله‌های آزمایش برای ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از طی زمان گرمخانه‌گذاری، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی گردیدند و کمترین غلظتی از هر عصاره گیاهی که در آن هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشد (عدم رشد باکتری تلقیح‌شده) به عنوان MIC عصاره مذکور در نظر گرفته شد. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها (MBC)، از همه لوله‌هایی که در آنها عدم رشد باکتری مشاهده شده بود، نمونه برداری و به روش سطحی کشت داده شد. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات لوله‌هایی که عدم رشد باکتری را نشان می‌دادند بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) پخش شد. بعد از انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت، پلیت‌های کشت داده شده از نظر وجود رشد میکروبی کنترل شد. لوله‌ای که حاوی کمترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوطه عدم رشد باکتری مشاهده گردید، به عنوان MBC عصاره در نظر گرفته شد (Benhammou *et al*., 2008; Mortazavi *et al*., 2013).

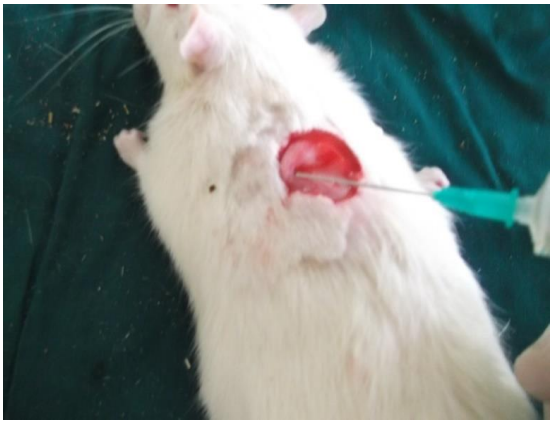
- **سنجش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری مورد آزمایش به روش انتشار دیسک در آگار:** بدین منظور از محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) استفاده گردید. در این روش، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی معادل استاندارد نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ cfu/ml) روی محیط کشت به صورت کاملاً یکنواخت به صورت خطی کشت داده شد و دیسک‌های تهیه‌شده از عصاره‌ها با غلظت‌های مختلف (۳/۱۲، ٦/۲۵، ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر روی محیط قرار داده شد (Gholami-Ahangaran *et al*., 2015) و به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. سپس قطر مناطق عدم رشد در اطراف دیسک‌ها با استفاده از کولیس تاف (مدل E141-122، فرانسه اندازه‌گیری شد. برای افزایش اعتبار داده ها هر تست آنتی‌بیوگرام در ۵ محیط کشت انجام شد و سپس میانگین قطر هاله عدم رشد برای هر غلظت عصاره گزارش شد (Mortazavi *et al*., 2013). از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (مرک، آلمان) به عنوان شاهد (استاندارد و مقایسه داده‌ها با جنتامایسین) استفاده شد.

- **ایجاد زخم عفونی در مدل حیوانی:** در این مطالعه از ۳۰ سر موش صحرایی نر سفید سالم و بالغ از نژاد ویستار با محدوده وزنی ۳۰۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. موش‌ها از بخش تکثیر و نگه‌داری حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران تهیه و در قفس‌های مخصوص نگه‌داری شدند. به منظور پرهیز از استرس و سازگار شدن حیوانات با محیط، هیچ‌گونه آزمایشی به مدت یک هفته روی موش‌ها صورت نگرفت و تمامی حیوانات تحت شرایط محیطی و تغذیه‌ای یکسان (از نظر دما، رطوبت، نور، نوع جیره غذایی و تعداد دفعات

تغذیه) نگه‌داری شدند. موش‌ها توسط اتر (Sigma Aldrich, USA) در دستگاه دسیکاتور بیهوش و پس از تراشیدن موضع جراحی در ناحیه پشت و بین دو کتف، برشی دایره‌وار به قطر ۱/۵ سانتی‌متر ایجاد شد و پوست ناحیه مذکور در شرایط استریل همراه با بافت همبند زیرین آن تا رسیدن به عضله به‌طورکامل جدا شد (شکل ۱). سپس در محل زخم ایجاد شده در مورد تمامی موش‌ها، ٦-٥ قطره از سوسپانسیون میکروبی استاندارد باکتری *اشریشیاکولای* مورد آزمایش (با غلظت $1/5\times10^{8}$ cfu/ml) تلقیح گردید (شکل ۲). سپس حیوانات به صورت تصادفی به سه گروه ۱۰ تایی و دو زیر گروه زمانی ۵ و ۱۰ روزگی (۵ تایی) تقسیم شدند. در ادامه در سه گروه درمانی (دو گروه دریافت‌کننده عصاره و یک گروه شاهد بدون درمان)، با استفاده از سوآپ استریل از محل زخم نمونه‌برداری شده و بر روی محیط کشت مک‌کانکی آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. یک روز پس از تایید اولیه عفونی‌شدن زخم با جداسازی باکتری از محل زخم، عصاره‌های مورد نظر هر ۱۲ ساعت و به مدت ۲۱ روز به میزان ۰/۳ میلی‌لیتر بر روی زخم مالیده شد (شکل ۳). گروه سوم موش‌ها نیز به عنوان گروه شاهد بدون استفاده از عصاره‌های مورد آزمایش در محل زخم آن‌ها در نظر گرفته شد (Kaboutari *et al*., 2016).



شکل ۱- ایجاد زخم



شکل ۲- عفونی نمودن زخم

شکل ۳- درمان زخم با عصاره های مورد مطالعه

- **تهیه سوآپ و شمارش باکتری‌های موجود در محل زخم حیوانات مورد آزمایش:** بدین منظور در روزهای ۵ و۱۰ پس از تلقیح باکتری مورد آزمایش، از محل زخم‌ها سوآپ تهیه شد. جهت بررسی چگونگی تأثیر عصاره گیاهان *کاپاریس اسپینوزا* و پسته وحشی بر مهار رشد باکتری *اشریشیاکولای* در مدل حیوانی، ابتدا برای جلوگیری از زجر و درد حیوان در ناحیه زخم، با انجام بی‌حسی موضعی با اسپری لیدوکائین ۱۰ درصد، از عمق زخم در محیط برین هارت اینفیوژن آگار (BHI) (شرکت مرک، آلمان) و سپس با رقت‌سازی در پلیت های حاوی محیط کشت تری کلرواستیک اسید (TCA) (شرکت مرک، آلمان) به صورت سطحی کشت داده شد (Konop *et al.*, 2020). برای تایید حضور باکتری *اشریشیاکولای* در موضع مورد آزمایش، از کشت بر روی محیط EMB (شرکت مرک، آلمان) و سپس تست‌های بیوشیمیایی IMVIC شامل تست احیا سیترات، ایندول، MR و VP (شرکت مرک، آلمان) (Gholami-Ahangaran *et al.*, 2016) استفاده شد. برای شمارش باکتری، تعداد باکتری‌ها با تهیه رقت‌های سریال (از رقت 10^{-1} تا 10^{-8}) شمارش شد (Gholami-Ahangaran *et al.*, 2019). بدین منظور از هر رقت یک میلی‌لیتر به پلیت خالی استریل ریخته شده و سپس حدود ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مک‌کانگی آگار (مرک، آلمان) ذوب شده با دمای بین ۵۰-۴۵ درجه سلسیوس به آن اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت تعداد کلنی‌های شمارش‌شده در هر پلیت، در رقت مربوطه آن ضرب و به صورت تعداد واحد تشکیل‌دهنده کلنی به ازای هرگرم نمونه استحصال شده از عمق زخم (cfu/gr) گزارش شد (Feng *et a*l., 2002).

- **تحلیل آماری داده‌ها:** برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی تفاوت آماری در بین گروه‌ها از برنامه نرم‌افزاری SPSS و روش آنالیز واریانس یکطرفه داده‌ها (One away ANOVA) استفاده شد و در صورت وجود اختلاف آماری از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. همچنین سطح اطمینان $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

- **نتایج مربوط به بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های مورد آزمایش:** مناطق عدم رشد حاصله در آزمایش آنتی‌بیوگرام (جدول ۱) مشخص کرد که عصاره گیاه *کاپاریس‌اسپینوزا* نسبت به پسته وحشی اثرات ضد میکروبی کمتری داشته و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). همچنین قطر منطقه عدم رشد مربوط به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین از هر دو عصاره بیشتر بود ($p<۰/۰۵$).

نتایج مربوط به حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره گیاهان *کاپاریس اسپینوزا* و پسته وحشی در جدول ۱ ارائه شده‌است. این نتایج نیز مشابه نتایج آزمایش آنتی‌بیوگرام در مورد *اشریشیاکولای* بود. یعنی تاثیر عصاره پسته وحشی نسبت به عصاره *کاپاریس اسپینوزا* کمتر بود.

جدول ۱- مقایسه اثرات ضد میکروبی عصاره گیاهان *کاپاریس اسپینوز* و پسته وحشی بر سویه استاندارد باکتری *اشریشیاکولای*

ترکیب مورد آزمایش	حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	حداقل غلظت باکتری‌کشی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	میانگین قطر منطقه عدم رشد (میلی‌متر)
عصاره *کاپاریس اسپینوزا* (۵۰ mg/ml)	۳/۱۲	۶/۲۵	۱۸±۰/۲۲^{c}
عصاره پسته وحشی (۵۰ mg/ml)	۱۲/۵	۲۵	۱٤ ±۰/۱۳^{b}
آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۵ mg/disc)	–	–	۲۲±۰/٤^{a}

a,b,c: حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵).

- نتایج مربوط به شمارش باکتری *اشریشیاکولای* در شرایط بالینی: جدول ۲ نتایج میانگین شمارش *اشریشیاکولای* را در گروه‌های تیمارشده با عصاره گیاهان *کاپاریس اسپینوزا* و پسته‌وحشی را در مقایسه با گروه شاهد در روز پنجم و دهم نشان می‌دهد.

جدول ۲- نتایج شمارش باکتری *اشریشیاکولای* در شرایط بالینی در گروه‌های مورد مطالعه

تعداد / گروه مورد آزمایش	موش‌های تیمارشده با *کاپاریس اسپینوزا*	موش‌های تیمارشده با پسته‌وحشی	موش‌های شاهد (بدون درمان)
روز پنجم	۲×۱۰^{۳} ±۰/۷^{a}	٤×۱۰^{۳} ±۰/۷^{a}	٥٦×۱۰^{٤} ±۲/٤^{c}
روز دهم	۱/۸×۱۰ ±۰/٤^{b}	۱/٤×۱۰ ±۰/۲^{b}	۱×۱۰^{٥} ±۰/۲^{d}

a,b,c: حروف متفاوت در هر سطر و ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که تاثیر بازدارندگی عصاره *کاپاریس اسپینوزا* در مقایسه با پسته‌وحشی علیه باکتری *اشریشیاکولای* قابل توجه می‌باشد. مقادیر MIC و MBC در مورد باکتری *اشریشیاکولای* و همچنین قطر هاله عدم رشد این مطلب را تایید کرد (Ben Douissa *et al*., 2005; Hanafi *et al*., 2012). گزارش شده است که فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی ناشی از ترکیبات اصلی و یا اثر سینرژیستی میان ترکیبات موجود در گیاه می‌باشد. بر طبق بررسی‌های به‌عمل آمده در مورد باکتری *اشریشیاکولای*، زمان تاثیر عصاره و مهاجرت ترکیبات بازدارنده عصاره به اطراف مناطق عدم رشد، فاکتورهای بازدارنده می‌باشند. فرضیه کشندگی در مورد باکتری *اشریشیاکولای* که یک باکتری گرم‌منفی است و دیواره سلولی این باکتری بیشتر لیپیدی می‌باشد، فقط به دلیل تخریب دیواره سلولی، چندان قطعی نمی‌باشد. نفوذ ترکیبات اسانس به داخل دیواره سلولی و تخریب میتوکندری از دلایل دیگر از بین‌رفتن باکتری می‌باشد (Hanafi *et al*., 2012). افشاری‌پور و همکاران در سال ۱۹۹۸ به بررسی ترکیبات شیمیایی گیاه *کاپاریس اسپینوزا* پرداختند و بیان کردند که اصلی‌ترین ترکیب این گیاه تیمول می‌باشد (Afsharypuor *et al*., 1998). درویچ و همکاران در سال ۲۰۱۰ (Derwich *et al*., 2010) و سیوروپولو و همکاران در سال ۱۹۹٦ (Sivropoulou *et al*., 1996) در مطالعات خود بیان

داشتند که تیمول دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی می‌باشد. همچنین نوسترو و همکاران در سال ۲۰۰۷ (Nostro *et al.*, 2007) و ترومبتا و همکاران در سال ۲۰۰۵ (Trombetta *et al.*, 2005) بیان کردند که تیمول دارای ماهیت آبدوستی می‌باشد و در برخورد با غشای باکتری‌ها، با لیپیدها واکنش داده و باعث از هم‌گسیختگی غشا و نشت مواد سلولی و در نهایت منجر به از بین‌رفتن باکتری می‌شود. گزارشات بسیاری هم مبنی بر این‌که گونه‌های جنس پسته‌وحشی دارای ترکیباتی مثل فنول‌ها و ترپنوئیدها هستند وجود دارد (Yalpani, and Tyman, 1983; Marner *et al.*, 1991). ترکیبات فنلی نقش مهمی در جلوگیری از رشد باکتری‌ها دارند و تفاوت در تاثیر این ترکیبات بستگی به نوع و غلظت ترکیبات فنولی و روش عصاره‌گیری دارد (Das *et al.*, 2010). بررسی‌ها نشان داده است که محل اثر ترپنوئیدها، غشای سلولی باکتری می‌باشد. این ترکیبات نفوذپذیری غشای سلول را تغییر داده و باعث افزایش سیالیت غشا می‌گردند (Cowan, 1999). قاسمی پیربلوطی و آقایی در سال ۲۰۱۱ با بررسی ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه پسته وحشی ایرانی نشان دادند که اصلی‌ترین ترکیبات این گیاه عبارتند از فلاندرن و آلفا پینن (Ghasemi Pirbalouti and Aghaee, 2011). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که آلفا پینن یک ترکیب ضد میکروبی بسیار مهم در اسانس پسته وحشی می‌باشد (Saffarzadeh *et al.*, 1999; Del Azar *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2007). کریمی‌پور فرد و همکاران در سال ۲۰۱۲ خواص آنتی‌باکتریال موجود در بنه را به حضور بتا پینن نسبت دادند (Karimi Poor fard, *et al.*, 2012).

از طرف دیگر، نتایج حاصله از مطالعه حاضر، اختلاف معنی‌داری را بین دو گروه موش صحرایی تیمارشده با عصاره گیاهان پسته وحشی و *کاپاریس اسپینوزا* در مقایسه با گروه شاهد نشان داد، به طوری‌که در گروه‌های تیمارشده کاهش معنی‌داری در میزان باکتری *اشریشیاکولای* در محل زخم مشاهده شد. این نتایج با یافته‌های به‌دست آمده از سایر تحقیقات نیز همخوانی دارد. نیکبخت و همکاران در سال ۲۰۱۶ به اثربخشی عصاره پسته وحشی در بهبود زخم پای دیابتی پرداختند و بیان کردند که استفاده از عصاره این گیاه مانع رشد باکتری‌ها در زخم پای افراد دیابتی شده و مدت زمان بهبودی و بستری را کاهش می‌دهد و این خاصیت را به مواد فنولیکی به‌خصوص فلاوونوئیدهای موجود در این گیاه نسبت دادند (Nikbakht *et al.*, 2016). مواد فنولی دارای خواص آنتی اکسیدانی و رادیکال‌های آزاد هستند که آثار مثبتی در ترمیم انواع زخم از خود نشان می‌دهند (Gomathi *et al.*, 2003).

با توجه به اطلاعات به‌دست آمده از فاکتورهای مختلف در این تحقیق، مشخص شد که عصاره‌های هیدروالکلی گیاهان *کاپاریس اسپینوزا* و پسته وحشی، دارای خاصیت مهارکنندگی روی باکتری *اشریشیاکولای* در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی می‌باشند، اما عصاره پسته وحشی دارای اثرات ضدمیکروبی کمتری نسبت به عصاره *کاپاریس اسپینوزا* است. بنابراین می‌توان بیان داشت که عصاره حاصله از این گیاهان باعث مهار رشد باکتری *اشریشیاکولای* در زخم‌های عفونی شده و از این طریق منجر به تسریع روند التیام

زخم می‌گردد. البته مطالعات بیشتری جهت تعیین دوز مطلوب و ایده‌آل و تهیه شکل دارویی مناسب از عصاره این گیاهان و همچنین انجام مطالعات هیستوپاتولوژیکی هم پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود واجب می‌دانند از کارشناسان بخش میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار کمال تشکر و قدردانی را بنمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Afsharypuor, S., Jeira,n K. and Jazy, A.A. (1998). First investigation of the flavor profiles of leaf, ripe fruit and root of *capparis spinosa* var. mucronifolia from Iran. Pharmaceutica Acta Helvetiae, 72(1): 307-309.
- Ahmadi, R. and Gasemi, N. (2015). Comparative study of effect Cinnamon extract used local and injection in diabetic and nondiabetic male rats. Journal of Medical Science of Islamic Azad University, 25(1): 27-32. [In Persian]
- Akhoondinasab, M.R., Akhoondinasab, M. and Saberi, M. (2014). Comparison of healing effect of Aloe vera extract and Silver sulfadiazine in burn injuries in experimental rat model. World Journal of Plastic Surgery, 3(1): 29-34.
- Ben Douissa, F., Hayder, N., Chekir-Ghedira, L., Hammami, M., Ghedria, K. and Mariotte, A.M. (2005). New study of the essential oil from leaves of Pistacia lentiscus L. Anacardiaceae from Tunisia. Flavour and Fragrance Journal, 20(10): 410-414.
- Benhammou, N., Bekkara, F.A. and Panovska, T.K. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2(2): 22-28.
- Bowersox, J. (2007). Experimental Staph vaccine broadly protective in animal studies. NIH.
- Cowan, M.M. (1999). Plants products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12(4): 564-582.
- Das, K., Tiwari, R.K.S. and Shrivastava, D.K., (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. Journal of Medicinal Plants Research, 4(2): 104-111.
- Del Azar, A., Nazemyieh, H., Modaresi, M. and Afshar, J. (2003). Study on essential oil obtained from oleoresin of *Pistacia atlantica* var mutica. Pharmaceutical Sciences, 2(1): 27-38.
- Derwich, E., Benziane, Z., Manar, A., Boukir, A. and Taouil R. (2010). Phytochemical analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Oreganum vulgare* from morocco. American-Eurasian Journal of Scientific Research, 5(2): 120-129.
- Emad, M., Gheibi, F., Rasool, S.M., Khangazade, R. and Jozani, S. (2012). *Capparis spinosa*. Headquarters for Research and Application of Iranian Medicinal Plants and Medicine. Office of Forest Resources Affairs. [In Persian]

- Feng, P., Weagant, S. and Grant, M. (2002). Bacteriological Analytical Manual. 8th ed., US FDA center for food safety and applied nutrition publishing, USA.
- Ganjali, A., Sotoudeh, A., Jahanshahi, A., Ashrafzadeh, M., Bazzazan, A., Roodbari, N., *et al*. (2013). *Ototegia persica* extraction on healing process of burn wounds. Acta Cirurgica Brasileira, 28(6): 407-411.
- Ghasemi Pirbalouti, A. and Aghaee, K. (2011). Chemical Composition of Essential Oil of *Pistacia khinjuk* Stocks Grown in Bakhtiari Zagross Mountains, Iran. Electronic Journal of Biology, 7(4): 67-69.
- Ghashghae, F., Jafari, A. and Moazamian, E. (2016). Survey effect of *Peganum harmala*, *Thymus daenensis*, *Frulago angulata* on wound infection caused by *Pseudomonas aeuroginosa* exotoxin A-producing in laboratory mice. Iranian Journal of Medical Microbiology, 10(1): 82-87.
- Gholami-Ahangaran, M., Ghasemi Pirbalouti, A., Farasat, M. and Fasihi, K. (2015). Antimicrobial effect of *Zataria multiflora*, *Thymus daenensis*, *Althea officinalis*, and *Urtica dioica* on growth of *Escherichia coli* isolated from poultry colibacillosis. Iranian Journal of Veterinary Microbiology, 1: 1-10.
- Gholami-Ahangaran, M., Shahzamani, S. and Yazdkhasti, M. (2016). Comparison of Virkon S (r) and Formaldehyde on hatchability and survival rate of chicks in disinfection of fertile eggs. Revue Médecine Vétérinaire, 167(1-2): 45-49.
- Gholami-Ahangaran, M., Peimani, N. and Dastgerdi, A.A. (2019). The effect of thyme (Thymus daenensis) supplement on growth and hygienic parameters of broilers meat. Iraqi Journal of Veterinary Sciences, 33(1): 87-92.
- Gomathi, K., Gopinath, D., Rafiuddin, A.M. and Jayakumar, R. (2003). Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rats. Biomaterials, 24(16): 2767-72.
- Gourine, N., Yousfi, M., Bombarda, I., Nadjemi, B., Stocker, P. and Gaydou, E.M. (2010). Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria. Industrial Crops and Products, 31(2): 203-208.
- Hanafi, G.M., Darvishi, S., Darvishi, N., Sayedin-ardabili, S.M. and Mir-ahmadi, F. (2012). Antibacterial effect of essential oil of mastic resin on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Clostridium sporogenes*. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 17(1):1-10. [In Persian]
- Leite, A.M, Lima, E.O., Souza, E.L., Trajano, V.N. and Medeiros, I.A. (2007). Inhibitory effect of β-pinene, α-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 43(1): 121-126.
- Konop, M., Czuwara, J., Kłodzińska, E., Laskowska, A. K., Sulejczak, D., Damps, T. and Schwartz, R. A. (2020). Evaluation of keratin biomaterial containing silver nanoparticles as a potential wound dressing in full-thickness skin wound model in diabetic mice. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 14(2): 334-346.
- Karimi Poor fard, M., Mirzaei, A., Kargar, M., Khosravani, S. and Mohamadi R. (2012). Antibacterial Activities of *Thymus denaensis*, Jaft and Hydro-Alcoholic Extract of Green hull *Pistacia atlantica* on *Listeria monocytogenes*. Armaghane danesh, 17(1): 68-77. [In Persian]
- Kummar, B., Vijayakumar, M., Govindarajan, R. and Pushpangadan, P. (2007). Ethnopharmacological approaches to wound healing–exploring medicinal plants of India. Journal of Ethnopharmacology, 114(1): 103-130.
- Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounid, A.L., Chinou, I.B. and Mitaku, S. (1999). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. Chia Plant Medicinal, 65(8): 749-752.
- Marner, F.J. Freyer, A. and Lex, J. (1991). Triterpenoids from gum mastic, the resin of *Pistacia lentiscus*. Phytochemistry, 30(11): 3709-3721.

- Moraghebi, F., Teymoori, M., Khoshnevis, M., Karvari, S., Matinzade, M. and Salehi, P. (2000). Antimicrobial activity of different extracts of *Pistacia atlantica* leaf. Ministry of Agriculture. Institute of Forests and Rangelands Research. Khorramabad, Iran. [In Persian]
- Mortazavi. S.M., Azadmard Damirchi S., Sowti M., Mahmudi, R., Safaeean, F. and Moradi Azad S. (2013). Antimicrobial Effects of ethanolic extract of the hull and the core of *Pistacia khinjuk* stocks. Journal of Innovative Food Technologies, 1(4): 81-88. [In Persian]
- Nikbakht, M.R., Soleimani, Z., Moravveji, S.A. and Esalatmanesh, K. (2016). Evaluating the effectiveness of *Pistacia atlantica* in the improvement of diabetic foot. Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, 20(4): 347-351. [In Persian]
- Nostro, A., Roccaro, A., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M.A., Pizzimenti, F.C., *et al*. (2007.) Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Journal of Medical Microbiology, 56(4): 519-523.
- Saffarzadeh, A., Vincze, L. and Csapo, J. (1999). Determination of the chemical composition of acorn (*Quercus brantii*), *Pistacia atlantica* and *Pistacia khinjuk* seeds as non-convetional feedstuffs. Acta Agraria Kaposváriensis, 3(3): 59-69.
- Sharifi, M.S., Ebrahimi, D., Hibbert, D.B., Hook, J. and Hazell, S.L. (2012). Bio-Activity of Natural Polymers from the Genus Pistacia: A Validated Model for Their Antimicrobial Action, Glob. Journal of Health Science, 4(1): 149-161.
- Schito, G.C. (2006). Importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Infection, 12(1): 3-8.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T. and Arsenakis, M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 44(5): 1202-1205.
- Sombonwong, J., Kankarisre, M., Tantisira, B. and Tantisira, M.H. (2012). Wound healing activities of different extracts of *Centella asiatica* in incision and burn wound models: an experimental animal study. BMC Complementary and Alternative Medicine, 12(1): 103.
- Tohidi, M., Khayami, M., Nejati, V. and Meftahizade, H. (2011). Evaluation of antibacterial activity and wound healing of *Pistacia atlantica* and *Pistacia khinjuk*. Journal of Medicinal Plants Research, 5(17): 4310-4314.
- Trombetta, D., Occhiuto, F., Perri, D., Puglia, C. and Santagati, N.A. (2005). Antihistaminic effect of two extracts of *Capparis spinosa* flowering buds. Phytotherapy Research, 19(1): 29-33.
- Valilou, M. and Valilou, S. (2017). A comparative study of histopathological effects of aqueous extract of cinnamon and honey with sulfadiazine on skin burn wound healing in rats infected with *Pseudomonas aeuroginosa*. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 11(43): 285-295.
- Yalpani, M. and Tyman, J.U.P. (1983). The phenolic acids of *Pistachia vera*. Phytochemistry, 22(10): 2263-2266.
- Yadeghar, O., Asghari, A. and Hesaraki, S. (2013). Evaluation of wound healing activity of *Commiphora myrrha* extract compared with silver sulfadiazine on experimental skin burn healing in rat. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 7(27): 173-182.