

گیاهان دارویی و فعالیت ضد میکروبی

چکیده

در این مقاله، ما گذشته، حال و آینده گیاهان دارویی را به عنوان داروهای ضد میکروبی خام و همچنین منبع ترکیبات طبیعی که به عنوان عوامل ضد عفونی جدید عمل می کنند، بررسی می کنیم. در چند دهه گذشته، جستجو برای عوامل ضد عفونت جدید، بسیاری از گروه های تحقیقاتی در زمینه اتنوفارماکولوژی¹ را به خود مشغول کرده است. . هنگامی که ما تعداد مقالات منتشر شده در مورد فعالیت ضد میکروبی گیاهان دارویی در PubMed را در طول دوره بین سال های 1966 تا 1994 بررسی کردیم، 115 مورد را یافتیم، اگرچه، در دهه بعد بین سال های 1995 و 2004، این تعداد بیش از دو برابر و به 307 مورد رسید. . در مطالعات خود یک طیف وسیعی از معیارها را بررسی کرده اند. بسیاری بر تعیین فعالیت ضد میکروبی عصاره گیاهان، اسانس ها یا ترکیبات جدا شده از قبیل آلكالوئیدها، فلاونوئیدها، لاکتون های سسکوئیترنین، دیترنین ها، تریپرنین ها یا نفتوکوینونها در طب سنتی متمرکز شده اند. بعضی از این ترکیبات جداسازی شده اند یا پس از شناسایی فعالیت ضد میکروبی در قسمتی از گیاه که قبلا کشف شده بود، به دست می آیند. . دسته دوم مطالعات بر روی فلور طبیعی منطقه یا کشور تمرکز دارد؛ سومین گروه از مقالات مربوط به مطالعات خاصی از فعالیت یک گیاه یا عامل اصلی در برابر یک میکروارگانیسم پاتولوژیک بهم پیوسته است. به مطالعه فعالیت ضد میکروبی عصاره های گیاهی، اسانس ها و ترکیبات جدا شده از آنها باید توجه ویژه ای شود. اینکه پارامترهای مشترکی از قبیل مانند مواد گیاهی، تکنیک های استفاده شده، محیط رشد و میکروارگانیسم ها مورد آزمایش قرار گرفته باشد، از اهمیت ویژه ای برخوردار است. © Elsevier Ireland Ltd. All 2005

rights reserved

کلیدواژگان: فعالیت ضد میکروبی؛ گیاهان دارویی؛ آنتی باکتریال؛ ضد قارچ

¹ Ethnopharmacology

1. مقدمه

بسیار پیش از آنکه بشر وجود میکروبها را کشف کند، این ایده که گیاهان معینی توانایی شفابخشی دارند را پذیرفته بودند. در واقع هر آنچه ما در حال حاضر به عنوان اصول ضد میکروبی مشخص کرده ایم، کاملاً پذیرفته شده بود. از زمان قدیم، انسان از گیاهان برای درمان بیماری های عفونی رایج استفاده میکرد و بعضی از این داروهای سنتی هنوز هم به عنوان بخشی از درمان های معمول برای بیماری های مختلف محسوب می شوند. به عنوان مثال، استفاده از انگور خرس¹ و آب آلبالو² برای درمان عفونت های دستگاه ادراری در کتب مختلف گیاه درمانی گزارش شده است، حال آنکه که گونه های گیاهی مانند بادرنجبویه³، سیر⁴ و درخت چای⁵ به عنوان طیف وسیعی از عوامل ضد میکروبی شناخته می شوند⁶. گفته می شود که عمدتاً اسانس های این گیاهان به نسبت عصاره ی آنها بیشترین استفاده را در درمان بیماری های عفونی در سیستم تنفسی، دستگاه ادراری، دستگاه گوارش و کبدی و همچنین در بیماری های مربوط به پوست دارد. در مورد کاربرد درخت چای⁵، برای مثال استفاده از اسانس (روغن درخت چای) یک ابزار درمانی مشترک برای درمان آکنه و دیگر مشکلات عفونی پوست است⁷.

در این مقاله، گذشته، حال و آینده گیاهان دارویی را هم به عنوان داروهای ضد میکروبی خام و همچنین منبع ترکیبات طبیعی که به عنوان عوامل ضد عفونی جدید عمل می کنند، تجزیه و تحلیل می کنیم.

2. گذشته

در چند دهه گذشته، جستجو برای عوامل ضد عفونت جدید، بسیاری از گروه های تحقیقاتی در زمینه اتنوفارماکولوژی را مشغول کرده است. گروهی از محققین⁸ اغلب مقالات مربوط به این موضوع را که در میان سالهای 1978 تا 1988 منتشر شده بود را مورد بررسی قرار دادند و فهرستی از 75 گونه گیاهی را تشکیل دادند که در آن نویسندگان طیف فعالیت عصاره ی گیاهی را به همراه اصولی که مسئول این فعالیت بودند را

⁷ Vanaclocha and Ca y nigueral • 2003

⁸ Recio et al. (1989a)

⁴ *Allium sativum*

⁵ *Melaleuca alternifolia*

⁶ Heinrich et al. •2004

¹ *Arctostaphylos uva-ursi*

² *Vaccinium macrocarpon*

³ *Melissa officinalis*

مورد توجه قرار داده بودند. به طور کلی، این بررسی نشان داد که فنول ها مواد شیمیایی فعال در این گیاهان هستند، و همچنین باکتری های گرم مثبت، حساس ترین میکروب ها هستند. این بررسی همچنین نشان داد که مشکل عمده این نوع تحقیق، عدم یکنواختی در معیارهای انتخاب شده برای مطالعه این نوع فعالیت است. این امر در گذشته منجر به بروز اختلافات بین نتایج حاصل تحقیقات مورد مشابه توسط گروه تحقیقاتی دیگر میگشت و حتی برای نویسندگانی که در حال بررسی نمونه هایی مشابه ولی با روش های بررسی متفاوت بودند هم صدق میکرد¹. یک گروه تحقیقاتی² برای حل این مشکل مهم، مقاله ای را در رابطه با روش های تجربی برای مطالعه فعالیت عصاره های گیاهی و اسانس ها منتشر کردند که تا به امروز مورد استفاده قرار میگیرد. آنها استفاده از روش دفیوژن را برای مطالعه ترکیبات قطبی در اندازه های مولکولی کوچک یا متوسط و تعیین طیف ضد میکروبی را پیشنهاد دادند، زیرا این روش به محققین اجازه می دهد تا ترکیبات مختلف را در برابر یک میکروارگانیسم آزمایش کنند. روش تجزیه جامد برای مطالعه مواد قطبی و غیر قطبی و همچنین انواع عصاره های پیچیده توصیه می شود. این روش مخصوصا برای تعیین قدرت نسبی عصاره ها یا اسانس ها و برای ایجاد طیف ضد میکروبی آنها بسیار مفید است، زیرا استفاده از سویه های مختلف را در برابر عصاره در یک صفحه آسان تر می کند. در نهایت، روش تجزیه مایع بهترین راه برای ایجاد قدرت واقعی یک ترکیب خالص است، اما حلالیت یک نیاز آشکار است. از آنجایی که پروتکل های پیشنهادی در چندین مقاله مشاهده شده است به این معناست که این روشها مورد پذیرش دیگر محققان قرار گرفته است. روش های پیشنهادی به طور عمده در مطالعه عصاره های گیاهی در محیط کشت و یا خارج از محیط کشت استفاده شده است. مقاله اغلب در مقالات منتشر شده در مجله اتنوفارماکولوژی³ ذکر شده است (23٪ تمام مقالات مستند) به دنبال آنها (12٪) در زیست شناسی دارویی⁴، اما تمام مواردی که ذکر شد در مجموع در 42 مجله آورده شده است که برخی از آنها بسیار مهم هستند.

برای بررسی عمیقتر مشکل کمبود معیارهای یکپارچه، ما می توانیم به طور ویژه فعالیت ضد میکروبی اسانسها را آزمایش کنیم. ویژگی های این نوع ترکیبات پیچیده و همچنین تکنیک های مورد استفاده برای

⁴ *Pharmaceutical Biology*

³ *Ethnopharmacology Journal of*

¹ Pellecuer et al., 1976

² Ríos et al. (1988)

مطالعه آنها را مورد بررسی قرار داده شد¹ و نتیجه گرفتند که مقایسه ی داده های به دست آمده، دشوار است چرا که بین روشهای آزمایش تفاوت فاحشی وجود دارد. برای جلوگیری از این مشکلات پیشمهادی مطرح شد که طی آن باید خصوصیات میکروارگانیزم های آزمایش شده، ترکیب اسانس و شرایطی که در آن به دست آمده، به عنوان بخش جدایی ناپذیری در گزارش گنجانده شود.

اخیرا، با استفاده از روش های کلاسیک فعالیت های ضد باکتری و ضد قارچی اسانس ها را برای نتیجه گیری در مورد عوامل موثر بر فعالیت آزمایشگاهی آنتی باکتریال اسانسها و همچنین مکانیسم های اثر آنها مورد بررسی قرار داده اند²، از جمله ی این روش ها روش دفیوژن آگار (دیسک کاغذ و چاهک)، روش محلول (آگار و مایع سوسپانسیون) و بررسی ترمودینامیکی و ایمپدیمتریکی³ رشد میکروارگانیزم در حضور اسانس های مورد آزمایش قرار گرفته شده. علاوه بر این، آنها نظر اجمالی در رابطه با اثرات اسانس ها و ترکیباتشان بر روی حساسیت های بشر و مسمومیت های غذایی قارچی و باکتریایی داشتند. مهمترین آنها، اسانس گیاهان آویشن، مرزنگوش، نعناع، دارچین، مریم گلی و میخک میباشد که دارای خواص ضد میکروبی هستند.

3. حال

هنگامی که تعداد مقالات منتشر شده در مورد فعالیت ضد میکروبی گیاهان دارویی در PubMed در طول دوره بین سال های 1966 تا 1994 بررسی شد، 115 مورد یافت شد. با این حال، در دهه های بعد، بین سال های 1995 و 2004، این تعداد به بیش از دو برابر یعنی 307 مورد رسید. با تمرکز بر جستجو به ویژه بر فعالیت ضد میکروبی اسانس ها، 187 منبع در PubMed بین سالهای 1971 و 2005 یافت شد. با این حال، طی جست و جو در وب ISI دانش، تعداد ارجاعات برای اسانسها بسیار بالاتر بود (323 مورد بین سال های 1986 تا 2005). این ارقام نشان دهنده افزایش علاقه به تحقیق و بررسی خواص دارویی گیاهان در میان بخش هایی از جامعه علمی است. این مطالعات طیف وسیعی از معیارها را در بر میگیرد. در این بین بسیاری بر روی تعیین فعالیت ضد میکروبی عصاره های گیاهی موجود در طب سنتی و یا عامیانه⁴، اسانس ها

³ Impedimetric

⁴ Ngwendson et al., 2003

¹ Janssen et al. (1987)

² Kalemba و Kunicka (2003)

۱ و یا ترکیبات جدا شده از قبیل آلکالوئیدها^۲، فلاونوئیدها^۳، لاکتون های سسکویتترین^۴، دی ترین ها^۵، تربترین ها^۶ یا نفتوکوپنون^۷ متمرکز شده اند. بعضی از این ترکیبات از پیش جداسازی شده بودند و یا پس از شناسایی فعالیت ضد میکروبی در قسمتی از گیاه توسط جداسازی بیولوژیک به دست می آیند. این مقالات شامل حدود 65 درصد از تمامی مقالات در زمینه فعالیت میکروبی و گیاهان دارویی منتشر و گرد آوری شده توسط PubMed می باشد. اگر چه این نوع تحقیق بسیار رایج است، لکن غالباً فاقد معیار مشخصی در جهت مطالعه است به این معنا که یا انتخاب میکروارگانیسم ها دقیقاً مشخص نشده اند، دوز مورد آزمایش بسیار بالا است، کنترل مثبت ب وضوح تعریف نمی شود و یا روش ها ناکافی هستند. در واقع در بسیاری از این مقالات، فعالیت ضد میکروبی را صرفاً بخشی از یک تحقیق در نظر میگیرند به این معنا که علاقه ای به پتانسیل درمانی این خاصیت ندارند.

بخش دوم مطالعات بر روی فلور طبیعی یک منطقه یا کشور متمرکز است. نمونه هایی از چنین مقالاتی که اخیراً منتشر شده اند عبارتند از: مطالعه گیاهان دارویی برزیل^۸، تایلند^۹، ترکیه^{۱۰}، لبنان^{۱۱}، آرژانتین^{۱۲}، کلمبیا^{۱۳}، هند^{۱۴}، مالزی^{۱۵}، غنا^{۱۶}، پرو^{۱۷}، اوگاندا^{۱۸}، کامرون^{۱۹}، قطر^{۲۰}، ساحل عاج^{۲۱} و جمهوری دموکراتیک کنگو^{۲۲}. برخی مطالعه ی یک منطقه وسیع تر را ترجیح می دهند که شامل کشورهای مختلف مانند آسیا^{۲۳} یا آفریقا^{۲۴} میشود و یا یک منطقه وسیع در یک کشور مانند سبیری^{۲۵} را مورد مطالعه قرار میدهند. این گونه مقالات دربرگیرنده ی 17٪ مقالات در مورد فعالیت میکروبی و گیاهان دارویی گردآوری شده توسط PubMed میباشد. این معیار ممکن است برای درک فعالیت گیاهان استفاده شده در طب سنتی در نقاط مختلف جهان مفید باشد، اما به نسبت معیارهای اتنوفارماکولوژیکی بسیار تصادفی تر میباشد، بنابراین معیارهای اتنوفارماکولوژیکی در اینجا مناسب تر هستند. سومین گروه مقالات مربوط به مطالعات تخصصی

19 Nkuo-Akenji et al., 2001

20 Mahasneh, 2002

21 Atindehou et al., 2002

22 Otshudi et al., 2000

23 Almas, 2001

24 Tshibangu et al., 2002

25 Kokoska et al., 2002

10 Uzun et al., 2004

11 Barbour et al., 2004

12 Salvat et al., 2004

13 Lopez et al., 2001

14 Jeevan Ram et al., 2004

15 Wiart et al., 2004

16 Konning et al., 2004

17 Rojas et al., 2003

18 Olila et al., 2001

1 Alma et al., 2003

2 Klausmeyer et al., 2004

3 Sohn et al., 2004

4 Lin et al., 2003

5 El-Seedi et al., 2002

6 Katerere et al., 2003

7 Machado et al., 2003

8 Duarte et al., 2005

9 Wannissorn et al., 2005

پیرامون فعالیت یک گیاه یا مواد اصلی جدا شده از گیاه در برابر میکروارگانسیم های بهم پیوسته ی پاتولوژیک است. این مطالعات در گذشته بر روی فعالیت علیه باکتریهایی از قبیل، کاندیدا آلبیکنز^۱، هلیکوباکتر پیلوری^۲، اشیریشیا کلای^۳، و همچنین بیماری های منتقله از راه جنسی^۴ از جمله نایسریا گونوره^۵، باکتری مقاوم به آنتی بیوتیک های شناخته شده مانند استافیلوکوک اورئوس که مقاوم به متسیلین است^۶ و یا انتروکوک مقاوم در برابر ونکومايسين^۷، و نیز فعالیت هایی بر علیه باکتری های مقاوم به چند دارو مانند سالمونلا تفی^۸، متمرکز بوده است.

در نهایت، یکی دیگر از معیارهای مطالعه ی گیاهان در جهت مورد استفاده قرار دادن آنها برای اهداف آرایشی و بهداشتی، به ویژه به عنوان مواد نگهدارنده می باشد و یا مطالعه ادویه جات به منظور توجیه استفاده از آنها به عنوان عوامل ضد میکروبی است. در حالی که ادویه ها به عنوان عوامل ضد میکروبی بر علیه باکتری ها و مخمر های بیماریزا برای انسان شناخته می شوند، هنگامی که ادویه های مختلف مورد آزمایش قرار گرفته شدند^۹، تنها سیر و میخک بودند که فعالیت ضد میکروبی نشان دادند. در واقع، برخی از باکتری ها که به یک سری از آنتی بیوتیک ها مقاومت نشان دادند، هم به عصاره ی سیر و هم میخک حساس بودند. تمام معیارهای ذکر شده به نظر می رسد مناسب برای توجیه مطالعات هستند، اما ما معتقدیم که تحقیق باید بر روی دستیابی به دانش پایدار در مورد گیاه و خواص آن متمرکز شود. برای مثال، در یکی از مطالعاتمان ما 140 گیاه دارویی مورد استفاده در منطقه مدیترانه به عنوان عوامل ضد عفونت را مورد غربالگری قرار دادیم (دو عصاره از هر گیاه)^{۱۰} و سپس یکی از آنها را با جداسازی و شناسایی اجزاء اصلی و همچنین تعیین طیف فعالیت ترکیبات جدا شده، مورد آزمایشات فراگیر قرار دادیم. گونه انتخاب شده گیاه بی مرگ^{۱۱} بود که از آن 10 ماده اصلی را جدا کردیم. اگر چه، در نهایت، تنها چهار مورد از مواد جدا شده در محدوده 25-25 گرم / میلی لیتر در برابر باکتری های گرم مثبت واکنش نشان دادند^{۱۲}.

4. آینده

¹⁰ R'yosetal., 1987؛ Recioetal., 1989b

¹¹ *Helichrysum stoechas*

¹² R'isos et al., 1991

⁶ Machadoet al., 2003

⁷ Fukai et al., 2004

⁸ Rani and Khullar, 2004

⁹ Arora and Kaur (1999)

¹ Duarte et al., 2005

² O'Gara et al., 2000

³ Voravuthikunchai et al., 2004

⁴ Tshikalange et al., 2005

⁵ Shokeen et al., 2005

طی چند سال آینده، برای مطالعه گیاهان دارویی به عنوان عوامل ضد میکروبی باید تحقیقات در جهت شناسایی فعالیت ضد میکروبی گیاهان تخصیص داده شود و نه اینکه از آنها فقط به عنوان تحقیق مکمل یک مطالعه ی قیتوشیمیایی استفاده شود. استخراج ترکیبات فعال باید با توجه به فعالیت شناخته شده در گیاه انجام شود. از این رو زمانیکه تاثیرات اجزاء و ترکیبات به نسبت کل عصاره کمتر بود هم باید به جای غیرقابل قبول پنداشتن تمام نتایج آزمایش، خواص ضد عفونی شناخته شده ی گیاه را اثبات کرد. در 25 سال گذشته، تمایل عمده به انتشار فعالیت گیاهان یا محصولات طبیعی استخراج شده از آنها در انزوا وجود داشته است، اما ما فکر میکنیم که در 25 سال آینده باید تحقیقات به صورت عمیقتری انجام شود. در واقع طی چند سال گذشته کشف نوع فعالیت عصاره گیاهی مورد توجه بوده است، اما این فقط یک بخش از داده اولیه است و باید با شناسایی ترکیبات فعال با استفاده ی آنها در یک آزمایش بیوژنتیک کامل گردد. در نهایت، تحقیق باید در جهت به دست آوردن اطلاعاتی مهم در رابطه با ترکیبات ادامه پیدا کند که این اطلاعات شامل شامل ایجاد سمیت در سلول های حیوان یا انسان، مکانیسم های عمل، اثرات آنها در آزمایش روی موجودات زنده، فعل و انفعالات مثبت و منفی با آنتی بیوتیک های متداول و غیره میشود. در این راستا، اثر اتیل گالات¹ را بر تاثیر بتا-لاکتام² در سویه های مقاوم به متسیلین و حساس به متسیلین استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه قرار گرفت³. طی این مطالعات به اثبات رسید که اتیل گالات اثر آنتی بیوتیک را شدت می بخشد و این نوع فعالیت سینرژیک آلکیل گالات⁴ ها تنها برای آنتی بیوتیک های بتا-لاکتام تشخیص داده شد، چرا که تغییرات قابل توجهی در اثر سایر آنتی بیوتیکها مشاهده نشد. این مطالعه از امکان استفاده از این مواد همراه با آنتی بیوتیک های شناخته شده برای افزایش اثربخشی و همچنین و جلوگیری از عوارض جانبی نامطلوب حمایت می کند. در یکی دیگر از تحقیقات در رابطه با اثر یک ترکیب جدا شده از روغن چاولموگرا⁵ تحت عنوان 5'-methoxyhydnocarpin، روی فعالیت بربرین⁶ گزارش شده⁷. با این وجود که 5'-methoxyhydnocarpin به خودی خود هیچ فعالیت ضد میکروبی را نشان نداد، شدت عمل بربرین را در

⁷ Stermitz et al.,2000

⁴ Alkyl gallate

⁵ Chaulmoogra oil

⁶ Berberine

¹ Ethyl gallate

² β -lactam

³ Shibata et al.(2005)

برابر استافیلوکوکوس اورئوس افزایش داد. محققان مشاهده کردند که سطح تجمع بربرین در سلول ها به شدت در حضور 5'-methoxyhydnocarpin افزایش یافته است، که باعث میشود این ماده به طور مؤثر مکانیسم مقاومت باکتری ها در برابر بربرین غیر فعال کند؛ در غیر اینصورت این آلکالوئید به راحتی توسط پمپ های MDR پاتوژن انسانی از استافیلوکوکوس اورئوس دفع میشود. این مطالعه از استفاده بالقوه از یک محصول طبیعی با خاصیت ضد میکروبی ضعیف همراه با یک ترکیب دیگر برای افزایش فعالیت آن حمایت می کند. این نوع کشفیات می تواند استفاده از گیاهان دارویی، عصاره ها یا محصولات طبیعی را به تنهایی، ترکیبی و یا همراه با آنتی بیوتیک ها افزایش دهد.

5. پیشنهادات و نتیجه گیری

برخی از توجهات عمومی باید برای مطالعه فعالیت ضد میکروبی عصاره های گیاهی، اسانس ها و ترکیبات جدا شده از آنها در نظر گرفته شود. تعریف پارامترهای مشترک در آزمایش ها مانند مواد گیاهی، تکنیک های استفاده شده، محیط رشد و میکرو ارگانیسم مورد آزمایش قرار گرفته، از اهمیت زیادی برخوردار است. در انتخاب مواد گیاهی باید از معیارهای علمی استفاده شود. علاوه بر این، برای اجتناب از استفاده از معیارهای تصادفی، انتخاب گیاهان باید با توجه به اصول اتنوفاما کولوژیک صورت گیرد. تمام گونه های آزمایش شده باید کاملاً توصیف و شناسایی شوند؛ که باید دارای مشخصات جمع آوری گونه ها، شامل محل، فصل، تاریخ و زمان از روز باشد. استفاده از نمونه های تجاری باید به موارد عصاره های استاندارد شده یا گیاهان دارویی تعیین شده محدود شود. حلال و سیستم استخراج ممکن است هر دو باعث تغییر نتایج نهایی گردد. اگر چه در آزمایشگاه استفاده از متانول یا عصاره اتانول بسیار رایج است، و گاهی باعث ایجاد فاز جداگانه ی اسانس می شود، ولی مناسب ترین روش این است که در آن عصاره همان باشد که در طب عامیانه و یا فیتوتراپی استفاده می شود چرا که در غیر این صورت نتایج به صورت قابل توجهی تحت تأثیر قرار می گیرد.

به این منظور، آزمایش درون شیشه ای با گیاه سیر توسط محققان انجام شد¹، نتایج حاکی از این بود که فعالیت پودر سیر در برابر اکثر باکتری ها نسبت به گیاه یا مواد خام آن بیشتر است؛ همچنین این محققان به

¹ Ross et al. 2001

اثبات رسانند که روغن سیر دارای پتانسیل درمانی بالاتری است. در گروهی از تحقیقات^۱ نشان داده شد که پودر دارویی حاصله از گونه هایی از جمله گل جاوید ایتالیایی^۲ یا سرخاب کولی^۳ که از طریق سوسپانسیون آبی عصاره دی اتیل به دست آمده بود اثر متوسطی بر روی باکتری اشیریشیا کلای نشان دادند، اما زمانی که از عصاره ها و یا عناصر حاصل از استخراج متوالی با استفاده از پترولیوم اتر^۴، دی کلرو متان- متانول (9: 1) و متانول استفاده شد هیچگونه اثری مشاهده نشد. با این وجود، تمامی عصاره ها در برابر باکتریهای پروپنیوباکتریوم آکنه^۵ فعال بودند. pH ترکیبات موجود در رقیق سازی نیز باعث تغییر در نتایج میگردد، این اثر را گاهی اوقات زمانی که که ترکیبات فنولی یا کربوکسیلیک در عصاره وجود دارد، می تواند مشاهده کرد. ترکیبات با قابلیت یونیزه شدن نه تنها فعالیت را تغییر می دهند بلکه بر اثر های مختلف، اثرات متفاوتی از اسانسهای خنثی گزارش شده است. برای مثال، روغن بادیان رومی^۶ در 4.8 بیشترین اثر ضد قارچی را نسبت به 6.8 PH نشان داد، در حالی که روغن درخت سدر مقدس^۷ بیشترین اثر را در pH 9 داشت^۸. روش شناسی و یا همان متودولوژی آزمایش ها مساله ی دیگری است که نیازمند توجه بیشتر و عمیق تری میباشد. با وجود اینکه بیشترین آزمایشات انجام شده بر روی عصاره های غیرقطبی طبق گزارشات منتشر شده نشان دهنده ی استفاده از روش دفیوژن است با این حال این روش، روش مناسبی بنظر نمیرسد. بر اساس تجربه ی شخصی ما روش های دایلوژن جامد^۹ را برای تحقیق بر روی عصاره های گیاهی و ترکیبات قطبی پیشنهاد میدهیم. تنها زمانی که مقدار کمی از نمونه در دسترس است، استفاده از روشهای دفیوژن ممکن است مناسب تر باشد. ترکیبات محیط رشد هم میتواند فعالیت عصاره ها و ترکیبات مورد آزمایش را تحت تاثیر قرار دهد. بدین منظور در بررسی تاثیر پودر سیر و روغن سیر مشاهده شد که فعالیت ضد میکروبی روغن سیر در ظروفی که فاقد تریپتون^{۱۰} یا سیستئین^{۱۱} بودند، بیشتر شد^{۱۲}، که منجر به ایجاد اینفرضیه شد که این اثرات ممکن است ناشی از واکنش پذیری سولفیدریل^{۱۳} باشد. همانطور که قبلا توسط Janssen و همکاران اشاره شد. (1987)، تعداد میکروارگانیسم های مورد آزمایش باید مناسب و کافی باشد و همچنین به سویه های میکروارگانیسم

¹¹ cysteine

¹² Ross et al. (2001)

¹³ sulfhydryl

⁶ Anise oil

⁷ *Cedrus deudora*

⁸ Janssen et al., 1987

⁹ Solid dilution

¹⁰ tryptone

¹ Nostro et al. 2000

² *Helichrysum italicum*

³ *Phytolacca dodecandra*

⁴ Petroleum ether

⁵ *Propionibacterium acnes*

نیز باید اشاره گردد چرا که ممکن است آزمایش بر روی سویه های مختلف انجام شود اما این امکان نیز وجود دارد که اثر عصاره ها و ترکیبات مورد آزمایش بر روی برخی سویه ها بیشتر مورد توجه قرار گیرد. با این حال، یک اشتباه رایج در بسیاری از مقالات، این است که با این حال، یک اشتباه رایج در بسیاری از مقالات این است که واکنش مثبت را در غلظتهای بسیار کم یا بسیار بالا مطرح میکنند. برای مثال با توجه به اینکه نتایج جالب توجهی در غلظت های زیر $100\mu\text{g/ml}$ برای عصاره ها و $10\mu\text{g/ml}$ برای ترکیبات جدا شده به دست می آید، با این حال باید از آزمایشات با غلظت های بیش از 1mg/ml بر روی عصاره ها و یا 0.1mg/ml برای ترکیبات جدا شده باید اجتناب شود. به طور خلاصه، اعتقاد ما این است که مطالعه گیاهان دارویی به عنوان عوامل ضد میکروبی برای درک بهتر داروهای گیاهی و ارزش واقعی آنها ضروری است، اما استفاده از روش استاندارد برای تحقیق ضروری است. به همین ترتیب، غلظت یا رقت های مورد استفاده باید مناسب باشد. علاوه بر این، تحقیق در این زمینه باید تا زمانی که عامل مسئول فعالیت مشخص شود، ادامه پیدا کند، به عنوان مثال ممکن است اجزاء فعال یا عصاره های فعال کشف شود. در نهایت، مطالعات مختلف در مورد مکانیزم های عمل، تعامل با آنتی بیوتیک ها و یا سایر گیاهان یا ترکیبات دارویی و مزایای فارماکوکینتیک عصاره ها باید در اولویت قرار گرفته شود.