مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره نوزدهم، شماره ۵، اردیبهشت ۱۳۹۶، صفحه ۴۶-۳۹

مقاله تحقیقی

ارزیابی اثرات مهاری و هم‌افزایی عصاره الکلی گیاه سنبله نقره‌ای (Stachys byzantina) روی سویه های استاندارد در شرایط آزمایشگاهی

رویا سفرکار (PhD)[۱]، رضا بنابی (MSc)[۲]، علیرضا مسیحا (PhD)[۳*]، مریم رضایی نظیفی (MSc)[۴]، رضا ستوده (BSc)[۵]

۱-باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آستارا
۲-گروه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل
۳-گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان
۴-گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل
۵-گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاداسلامی واحد اردبیل

دریافت: ۹۵/۱۱/۱۹، اصلاح: ۹۵/۱۲/۴، پذیرش: ۹۶/۱/۲۰

خلاصه

سابقه و هدف: گیاهان خانواده نعناع با داشتن خاصیت ضد میکروبی در درمان بیماری‌های عفونی مورد استفاده قرار می گیرند. در این مطالعه اثرات مهاری، هم‌افزایی و کاهندگی عصاره الکلی گیاه سنبله نقره‌ای بر روی پنج سویه استاندارد در شرایط آزمایشگاه ی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی گیاه سنبله نقره‌ای (*Stachys byzantina*) پس از جمع آوری، به دور از نور مستقیم و درسایه خشک شد. تهیه عصاره الکلی با استفاده از روش خیساندن انجام گرفت، تاثیر عصاره به روش دیسک دیفیوژن درغلظت های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره به مقدار ۲۰μl مورد آزمایش قرار گرفت. سویه‌های میکروبی مورد آزمایش به‌صورت لیوفیلیزه خریداری شد. برای تعیین MIC و MBC از روش میکرودایلوشن استفاده شد. همچنین اثر هم‌افزایی عصاره با آنتی‌بیوتیک بررسی شد.

یافته ها: در این بررسی، بیشترین میزان اثر عصاره روی *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* درغلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر برابر با ۱/۷±۲۳/۲ میلی‌متر مشاهده شد. درحالیکه این اثر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس برابر با۱/۸±۱۸/۴ میلی‌متر، استرپتوکوکوس گروه A برابر با ۲/۴±۱۴/۴ میلی‌متر و سودوموناس آئروجینوزا معادل ۲/۴±۱۱/۷ میلیمتر تعیین شد. همچنین با افزایش غلظت عصاره قطر هاله بازدارندگی به طور معنی‌داری ($p\leq ۰/۰۵$) افزایش یافت. فعالیت هم‌افزایی عصاره با جنتامیسین، اریترومایسین و پنی‌سیلین با سودوموناس آئروجینوزا نشان داده شد. نتایج فیتوشیمیایی حضور آلکالوئید، کربوهیدرات، تانن، ترپنوئید، استروئید، ساپونین و فلاونوئید را نشان داد.

نتیجه‌گیری: به نظر می رسد عصاره گیاه سنبله نقره‌ای می‌تواند به تنهایی یا در ترکیب با سایر عوامل ضد میکربی اثر مهارکنندگی داشته و عملکرد برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها را تقویت نماید.

کلمات کلیدی: عصاره الکلی، سنبله نقره‌ای، ترکیب فیتوشیمیایی، فعایت ضد میکروبی، اثرهم‌افزایی.

مقدمه

امروزه با افزایش استفاده از آنتی بیوتیک ها و داروهای ضد میکروبی شاهد شیوع روز افزون سویه های بیماری زای مقاوم به چندین آنتی بیوتیک هستیم(۱). به علت افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی، تحقیقات در جهت دستیابی به موادی که اثرات مفید بیشتر و اثرات جانبی کمتری را نشان دهند، گسترش یافته است (۲) در حال حاضر بخش عمده داروهای مدرن شیمیایی هستند ولی در عین حال تقریباً ۱۰۰ درصد فراورده های دارویی منشاء گیاهی دارد (۳). استفاده از گیاهان دارویی بومی که علاوه بر سازگاری های اکولوژیکی قادرند با سنتز مواد موثره ثانوی و فعال در پیشگیری و درمان بیماری ها موثر واقع شوند، در سال های اخیر جایگاه ویژه ای در علم پزشکی یافته است(۴). توجه به گیاهان دارویی با خواص ضد میکروبی می تواند مشکلات رایج در استفاده از آنتی بیوتیک ها را خصوصا به علت عوارض جانبی، مرتفع سازد(۵). گیاه سنبله نقره‌ای با نام علمی استخیس بیزانتینا (*Stachys byzantina*) (مترادف با استخیس لاناتا *S. Lanata*) یکی از گونه های دارویی این جنس است که دارای ساختار علفی، پایا، همراه با کرک های فراوان،کرکینه پوش- پشمین و تارهای بلند می باشد. این گیاه بومی ترکیه، ارمنستان و ایران است که پراکنش آن در مناطق مختلف ایران، خصوصاً در نواحی شمالی، البرز و شمال غرب کشور می باشد. (۸-۶). خانواده نعناعیان یکی از بزرگترین خانواده های گیاهی است که دارای پراکنش جهانی می باشد. این خانواده با حدود ۲۰۰ سرده و ۲ تا ۵ هزار گونه از بوته های معطر دارای خواص دارویی گسترده است. سرده (*Stachys*) سنبله ای از این تیره حدود۳۰۰ گونه را به خود اختصاص داده است. *Stachys* از واژه Chistets به معنی تمیز کننده و بهبود دهنده زخم گرفته شده است که نشانگر استفاده وسیع اسانس و یا عصاره گونه های این سرده به عنوان آنتی سپتیک

▣ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۲۴۱-۱۲ دانشگاه آزاد اسلامی واحد آستارا می باشد.
*مسئول مقاله: دکتر علیرضا مسیحا
آدرس: لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه بیوتکنولوژی. تلفن: ۰۱۳-۴۲۲۴۷۰۰۱
E-mail: amirmassiha@yahoo.com

(ضدعفونی کننده) و درمان کننده بیماری های پوستی می باشد (۹). گیاهان تیره نعناع با داشتن خاصیت ضد میکروبی در درمان بیماری‌های عفونی به خصوص اسهال، تب، سرماخوردگی و بهداشت دهان و دندان مورداستفاده قرار می‌گیرند (۱۱و۱۰). در منابع طب سنتی ایران و جهان نیز اثرات درمانی متعددی از جمله اثرات خواب آور، آرام بخش، پایین آورنده فشارخون، التیام زخم، توقف خون ریزی، افزایش دهنده ترشحات صفراوی، ضدسرفه و گلودرد، عفونت‌های کلیه و مسکن را به گونه های مختلف جنس *Stachys* نسبت می دهند (۱۳و۱۲)، همچنین در تحقیقات مختلف دیگر نیز به اثرات آنتی اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضدالتهابی و ضدسرطانی آنها اشاره شده که اغلب به کمیت و کیفیت مواد موثره ترپنوییدی، فنولی و فلاونوییدهای موجود در اسانس و عصاره گونه های جنس *Stachys* اشاره شده است (۱۸-۱۴).

از آنجاییکه تنوع پوشش گیاهی و کیفیت مواد موثره دارویی در گیاهان هر منطقه، متاثر از تنش های اکولوژیکی و حتی فنولوژی گونه‌های آن منطقه می باشد(۲۰و۱۹). لذا رویکرد جامعه جهانی بهداشت به سمت شناسایی نیازهای اکولوژیکی گونه ها درویشگاه های طبیعی، اتنوفارماکولوژی، استخراج مواد موثره و از همه مهمتر بررسی خواص آنتی اکسیدانی آنها با هدف احیا، کشت، استخراج مواد موثره طبیعی و تولید داروهای طبیعی و کم خطر می باشد(۲۲و۲۱). ازآنجاییکه استان گیلان به دلیل برخورداری از شرایط اکولوژیکی، رویشگاه های متنوعی ازگیاه سنبله نقره‌ای را در خود جای داده که از اهمیت بالقوه ای نیز در طب سنتی منطقه برخوردار است،

بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر مهارکنندگی و هم‌افزایی عصاره الکلی گیاه سنبله نقره‌ای (*Stachys byzantina*) جمع آوری شده از منطقه گردنه حیران بر روی سویه های استاندارد در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.

مواد و روش ها

جمع آوری گیاه و استخراج عصاره: در این مطالعه تجربی برگ‌های گیاه سنبله نقره‌ای در اردیبهشت ماه از منطقه گردنه حیران جمع آوری و در مکانی به دور از آفتاب خشک گردید. سپس برگ های خشک شده با استفاده از آسیاب مدل Waring به‌صورت پودر آماده تهیه شد. سپس به‌منظور تهیه عصاره الکلی ۱۰ گرم پودر آسیاب شده در ۵۰ میلی لیتر اتانل ۹۶ درجه (محصول شرکت مرک آلمان) ریخته شد و به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد و هر چند ساعت یک بار هم زده شد. سپس مایع رویی جدا و به روش ماسراسیون (Maceration) در خلاء تغلیظ شد(۲۳). جهت استاندارد کردن روش و تکرارپذیری و به‌منظور مقایسه و ارزیابی اثر ضد میکروبی عصاره‌های استخراج شده به‌وسیله آب مقطر و اتانول، وزن خشک عصاره ها تعیین شد. ابتدا وزن یک لوله‌آزمایش توسط ترازوی حساس دیجیتالی(۰/۰۰۰۱)تعیین شد و پس از آن ۱ میلی‌لیتر از عصاره الکلی در آن ریخته شد، سپس محتوی لوله دردمای اتاق خشک شد. سرانجام لوله‌ها مجدداً توزین و باکم کردن وزن لوله‌های خالی میانگین وزن خشک عصاره‌های آبی و اتانولی تعیین شد(۲۴) .

تهیه سویه‌های میکروبی: سویه‌های میکروبی مورد آزمایش در این پژوهش شامل استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۵۹۲۳، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس ۱۲۲۲۸ ATCC، استرپتوکوکوس گروه AATCC ۱۹۶۱۵، سودوموناس آئروجینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ و اشرشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۲ بودند که از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی سازمان علمی پژوهشی و صنعتی ایران تهیه گردیدند. سوسپانسیون میکروبی با استفاده از استاندارد نیم مک فارلند تهیه گردید (۲۶و۲۵).

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره: جهت بررسی اثر ضد میکروبی از روش انتشار در آگار و دیسک دیفیوژن استفاده شد. باکتری ها بر روی محیط مولر هینتون آگار به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند . سوسپانسیونی با رقت ۰/۵ مک فارلند در محیط مولر هینتون براث (محصول شرکت مرک آلمان) تهیه شد. سپس یک میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی به صورت چمنی در سطح پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت و سپس دیسک های بلانک بر روی سطح پلیت آلوده به باکتری قرار داده شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصاره های رقیق شده با غلظت های مختلف روی دیسک هاریخته شد.

قطر هاله ممانعت از رشد بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه گیری شد. رقیق سازی عصاره ها با استفاده از دی متیل سولفوکساید (DMSO) ۱۰ درصد انجام شد. در این مطالعه از غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی لیترازعصاره استفاده شد. از آنتی بیوتیک کلرامفنیکل به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۲۷). درروش انتشار در آگار دو چاهک در محیط مولر هینتون آگار به قطر ۷ میلی لیتر ایجاد شد. از سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند بر روی محیط کشت داده شد. در یکی از چاهک ها آنتی بیوتیک شاهد و در چاهک دیگر عصاره گیاهی با غلظت های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی لیتر ریخته شد. سپس پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. نتایج بر اساس اندازه گیری قطر هاله های عدم رشد توسط آنتی بیوتیک و عصاره گیاهی ثبت شد (۲۸و۲۱و۲۰).

آزمایشات حداقل ۳ بار تکرار شدند. برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری (MIC) وحداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) از روش میکرودایلوشن (Micro dilution method) استفاده گردید. بدین صورت که سوسپانسیونی با غلظت معادل لوله ۰/۵ مک فارلند از باکتری در محیط Trypticase Soy Broth (TSB) تهیه شد.

سریال های رقت معادل ۶/۲۵، ۱۲،۲۵/۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم در میلی لیتراز عصاره تهیه و ۷۰ میکرو لیتر از آن ها به میکرو پلیت های ۹۶ خانه ایی که قبلا حاوی ۷۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با کدورت نیم مک فارلند بودند اضافه گردید. سپس آزمایشات مشابه برای کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری و بدون عصاره) و کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتری) نیز انجام شد. میکروپلیت ها سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه گرم خانه گذاری گردیدند. کمترین رقت از عصاره که کدورتی در آن مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش شد. از تمام خانه هایی که رشد باکتری در آن ها کاملا متوقف شده بود، به پلیت های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرم خانه گذاری شدند . غلظت هایی که فاقد رشد باکتری بودند، به عنوان MBC گزارش گردیدند(۳۰و۲۹).

بررسی اثر ترکیبی عصاره گیاهی و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک: برای تعیین اثر ترکیبی میان عصاره الکی و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک از روش انتشار از دیسک

استفاده شد. بررسی اثرات هم‌افزایی و کاهندگی عصاره بر آنتی‌بیوتیک با استفاده از غلظت تحت مهاری (Sub-MIC) انجام شد. رقت مورد استفاده برابر با رقت ۱ به ۲ تا ۱ به ۴ MIC است. غلظت تحت مهاری عصاره با رقت ۱ به ۲ MIC به محیط مولر هینتون آگار اضافه و به‌عنوان پلیت تست استفاده شد. سوسپانسیون باکتریایی با غلظت ۱/۵×۱۰^۸ cfu/ml (معادل نیم مک فارلند) روی محیط کشت آگار حاوی غلظت‌های تحت مهاری اسانس توسط سواب به‌صورت چمنی کشت داده شد و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک روی سطح آگار قرار داده شدند.

سپس قطر هاله‌های مهاری (Inhibition Zone Diameter- IZD) دیسک‌ها پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ثبت شد. برای بررسی اثر متقابل اسانس بر آنتی‌بیوتیک از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) و اریترومایسین (۱۵ میکروگرم) محصول شرکت پادتن طب استفاده شد.

تشخیص ماهیت ترکیبات آلی: برای تشخیص مواد آلی موجود در نمونه پودر خشک شده از روش خیساندن در آب استفاده شد و مواد آلی موجود در نمونه گیاهی با روش‌های استاندارد موجود مورد بررسی قرار گرفت(۳۴-۳۱).

آنالیز آماری: مقایسه میانگین قطر هاله ها و بررسی قدرت ضد میکروبی عصاره در مقایسه با یکدیگر با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۴ و آزمون های آماری واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون های تکمیلی (Tukey HSD) تجزیه و تحلیل گردید و p<۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اثر ضد میکروبی عصاره الکلی گیاه سنبله نقره‌ای وابسته به غلظت بوده و همراه با افزایش غلظت عصاره قطر هاله بازدارندگی به طور معنی‌داری (p≤۰/۰۵) افزایش می یابد. این مطالعه نشان داد که نوع باکتری وغلظت عصاره بر روی قطر هاله عدم رشد موثر است بطوریکه قطر هاله بازدارندگی در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره الکلی برای *استافیلوکوک اپیدرمایدیس* معادل ۲۳/۲±۱/۷، استافیلوکوکوس اورئوس ۱۸/۴±۱/۸، استرپتوکوکوس گروه A ۱۴/۴±۲/۴ و سودوموناس آئروجینوزا به میزان ۱۱/۷±۲/۴ میلی‌متر مشاهده شد.

کمترین میزان حساسیت در ارتباط با باکتری اشرشیاکلی معادل ۵±۲/۱ بدست آمد (جدول ۱). همچنین با افزایش غلظت عصاره فعالیت ضد باکتریایی آن علیه باکتری های مورد آزمون افزایش یافت. غلظتهای مختلف در باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *استرپتوکوکوس گروه* A در مقایسه با شاهد منفی، تفاوت معنی داری داشت (p<۰/۰۵). قطر هاله عدم رشد در خصوص *سودوموناس آئروجینوزا* از نظر آماری متفاوت از یکدیگر نبودند و خاصیت ضد باکتریال غلظت های مختلف عصاره برروی این باکتری تقریبا مشابه بود. نتایج مشابهی در خصوص *اشرشیاکلی* بدست آمد (جدول ۲).

نتایج نشان می دهد که عصاره الکلی این گیاه بیشترین اثر مهارکنندگی و کشندگی را بر روی استافیلوکوکوس اورئوس داشته است. عصاره گیاه سنبله نقره‌ای باعث افزایش اثر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، اریترومایسین و پنی‌سیلین برعلیه باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* شد. علاوه بر این عصاره همراه با آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، اریترومایسین و پنی‌سیلین خاصیت آنتاگونیستی بر رشد باکتری‌های منتخب نشان داد. تعامل عصاره به همراه آنتی‌بیوتیک جنتامایسین هیچ تأثیری بر رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان نداد. همچنین آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین به همراه عصاره بر ضد استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس واجد اثر آنتاگونیستی بود. اثر سینرجیسمی عصاره بر عملکرد پنی‌سیلین و اریترومایسین بر ضد سویه‌های استرپتوکوکوس گروه A و سودوموناس آئروژینوزا نشان داده شد. درحالی‌که این اثر بر روی اشرشیاکلی بر عملکرد آنتی‌بیوتیک‌ها بی‌تأثیر بوده است (جدول ۳). همچنین نتایج آزمایشات فیتوشـــیمیائی در جدول شماره ۴ آمده است.

جدول ۱. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های منتخب در حضور عصاره الکلی سنبله نقره‌ای برحسب میلی‌متر به روش انتشار دراگار

غلظت عصاره	mg/ml۵۰۰ Mean±SD	mg/ml۲۵۰ Mean±SD	mg/ml۱۲۵ Mean±SD	mg/ml۶۲/۵ Mean±SD	P-value
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۸/۴±۱/۸[d]	۱۴/۵±۲/۳ [c]	۱۲/۲±۱/۷[b]	۱۱±۰/۹[a]	۰/۰۴۵
استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس	۲۳/۲±۱/۷[d]	۲۱/۵±۱/۷ [c]	۲۰/۲±۱/۷[bc]	۱۸±۲/۱ [a]	۰/۰۲۵
استرپتوکوکوس گروهA	۱۴/۴±۲/۴[d]	۱۲/۵±۲/۹ [c]	۱۰/۲±۲/۷ [b]	۷/۵±۱/۹[a]	۰/۰۱۵
سودوموناس آئروجینوزا	۱۱/۷±۲/۴[d]	۱۰/۵±۲/۹[bc]	۹±۱/۸ [ab]	۸/۲±۰/۴[a]	۰/۰۵۲
اشرشیاکلی	۵±۲/۱ [c]	۳/۲±۰/۹[b]	۲/۸±۰/۵[ab]	۲±۰/۵[a]	۰/۹۶

حروف لاتین غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی داری (p≤۰/۰۵) می باشد

جدول ۲. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) وکشندگی رشد (MBC) در غلظت های مختلف عصاره الکلی سنبله نقره‌ای به روش میکرودایلوشن براث بر حسب mg/mlg

میکروارگانیسم	MBC (mg/ml)	MIC(mg/ml)
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۵	۱۲/۵
استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس	۱۰۰	۵۰
استرپتوکوکوس گروهA	۱۰۰	۵۰
سودوموناس آئروجینوزا	۱۰۰	۵۰
اشرشیاکلی	۱۰۰	۱۰۰

جدول ۳. ارزیابی اثرات هم‌افزایی و کاهندگی عصاره الکلی سنبله نقره‌ای با آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، پنی‌سیلین و جنتامایسین، روی باکتری‌های منتخب برحسب میلی‌متر

میکروارگانیسم	آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین A(AE)	جنتامایسین A(AE)	اریترومایسین A(AE)
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۵/۱۵	۱۵/۱۳	۱۵/۲۱
استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس	۱۹/۱۲	۱۹/۲۰	۱۹/۲۵
استرپتوکوکوس گروه A	۱۲/۲۰	۱۲/۱۶	۱۲/۲۰
سودوموناس آئروجینوزا	۱۱/۲۱	۱۱/۳۵	۱۱/۲۲
اشرشیاکلی	۰	۰	۰

A: قطر هاله عدم رشد برای آنتی‌بیوتیک موردنظر AE: قطر هاله عدم رشد برای آنتی‌بیوتیک به همراه عصاره

جدول ۴. ترکیب فیتوشیمیایی عصاره‌الکلی سنبله نقره ای

ترکیب آلی	
Alkaloids	+
Amino acids	–
Carbohydrates	+
Flavonoids	+
Glycosides	+
Tannins	+
Phenol	–
Terpenoids	+
Steroids	+
Saponin	+
Volatile oils	–

(+) Present, (-) absent

بحث و نتیجه گیری

بر اساس نتایج این تحقیق مشخص شد که عصاره الکلی این گیاه در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثرات ضدباکتریایی قابل توجهی روی *استافیلوکوک اپیدرمایدیس* دارد اما این عصاره در غلظت های کم اثرضدمیکروبی ندارد. وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار میانگین قطر عدم رشد غلظت‌های مختلف را می‌توان به مقدار ماده مؤثر موجود در عصاره‌ها نسبت داد و می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت، میزان قطر هاله عدم رشد نیز افزایش پیدا می‌کند. نتایج این پژوهش با گزارش Skaltsa و همکاران از لحاظ اثر مهاری عصاره بر رشد میکروارگانیسم‌ها همخوانی دارد اما از لحاظ اینکه عصاره اتانولی بر رشد باکتری سودوموناس ائروجینوزا و اشرشیاکلی، کاملاً بی‌اثر بوده است مغایرت دارد(۱۳). این امر ممکن است به علت استخراج بیشتر مواد موثردر گیاه به‌وسیله اتانول باشد. به‌طورکلی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره‌های گیاهی حساس تر از باکتری‌های گرم منفی می‌باشند (۳۵).

این پدیده ممکن است به علت تحمل ذاتی باکتری‌های گرم منفی و ماهیت و ترکیبات گیاهی باشد. مطالعات مختلف نشان داده است که دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی در مقابل بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها، ترکیبات شیمیائی ضد میکروبی (۳۶) و حتی بسیاری از داروهای گیاهی (۳۷) حساسیت زیادی دارند. با در نظر گرفتن اختلاف اثرات ضد میکروبی در میکروارگانیسم‌های تست می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت در مورد سوش های موردبررسی بسیار حائز اهمیت است.

مطالعه Dulger و همکاران نشان داد که عصاره متانولی حاصل از گونه‌های مختلف استخیس بر روی باکتری‌های اشریشاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس ولگاریس، باسیلوس سرئوس، مایکوباکتریوم اسمگ ماتیز و لیستریا مونوسیتوژن مؤثراست (۳۸) همچنین در مطالعه ای که بر روی اثرات ضد باکتری اسانس گیاهان استخیس کریسانتا (*S.chrysantha*) و استخیس کادینا(*S.cadina*) صورت گرفت، نشان داده شد که اسانس‌های مورد مطالعه اثرات ضد باکتریایی مناسبی بر روی باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوک طلایی و استرپتوکوک اپیدرمیس و گرم منفی اشرشیاکلی، کلبسیلاپنومونیه و سودوموناس آئروژینوزا دارند. مطالعات انجام شده بر روی گونه‌های مختلف جنس استخیس حاکی از اثرات آنتی باکتریال آن‌ها می‌باشد(۱۳).

نتایج MIC نشان داد عصاره اتانولی این گیاه برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، استرپتوکوکوس گروه A، سودوموناس آئروژینوزا بین ۱۲/۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، بیشترین مقاومت مربوط به باکتری گرم منفی اشرشیاکلی می باشد. در این مطالعه اثرات عصاره گیاه بر روی عملکرد چند آنتی‌بیوتیک معمول که بر روی سویه‌های استاندارد باکتری اثر داده شده بود، موردبررسی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که عصاره سنبله نقره‌ای تنها بر روی عملکرد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین بر ضد استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس واجد اثر آنتاگونیستی میباشد و بر روی عملکرد جنتامایسین بر ضد استافیلوکوکوس اورئوس اثری ندارد ولی موجب افزایش حساسیت سودوموناس آئروژینوزا به پنی‌سیلین، جنتامایسین و اریترومایسین می گردد. عصاره این گیاه تنها بر عملکرد پنی‌سیلین و اریترومایسین بر ضد سویه‌های استرپتوکوکوس گروه A و سودوموناس آئروژینوزا اثر سینرژیسمی داشت و بر عملکرد دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها در این دو سویه اثری نداشت.

ازآنجاییکه مقاومت باکتریایی در حال افزایش است و انتقال مقاومت از باکتری‌های مقاوم به باکتری‌های حساس از طرق مختلف به‌آسانی صورت می‌گیرد و موجب مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی معمول می‌گردد، لذا عصاره استخیس بیزانتینا همچون دیگر مشتقات گیاهان دارویی با خواص آنتی باکتریال می‌تواند به‌عنوان ترکیب جایگزین و یا مکمل در درمان عفونت‌های باکتریایی بکار رود (۳۹).

با توجه به مشکلات ناشی از ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در درمان عفونت‌ها، توجه خاصی برای حل این موضوع ضروری به نظر می‌رسد از سوی دیگر مواد غذایی و مکمل‌هایی که افراد مختلف و بیماران مصرف می‌نمایند می‌توانند بر عملکرد آنتی‌بیوتیک‌ها اثرات تقویتی یا بازدارنده داشته باشند و مواد تشکیل‌دهنده گیاهان دارویی می‌توانند در بازگشت حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌هایی که در شرایط فعلی به دلیل مقاومت دارویی قابلیت‌های درمانی خود را از دست داده‌اند، مؤثر باشند (۴۰).

نتایج آزمایش‌های فیتوشیمیایی نشان داد که عصاره اتانولی این گیاه دارای آلکالوئید، کربوهیدرات، تانن، ترپنوئید، استروئید، ساپونین و فلاونوئید می باشد. مطالعات صورت گرفته در سال‌های اخیر، مشخص کرده است که فلاوونوئیدها بر روی طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها خاصیت مهارکنندگی دارند این خاصیت می‌تواند به علت اتصال به پروتئین‌های خارج سلولی، اتصال به دیواره سلولی باکتری‌ها یا به علت متلاشی کردن غشای باکتری‌ها باشد (۴۱). نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره گیاهی سنبله نقره ای دارای اثرات ضد باکتریایی است و این مطالعه امکان استفاده از این گیاه را به‌عنوان یک ماده آنتی باکتریال به‌ویژه در موارد مقاومت دارویی مطرح می‌نماید. همچنین این عصاره دارای اثرات سینرژیستی با چندین آنتی‌بیوتیک ازجمله پنی‌سیلین و اریترومایسین است و می‌تواند اثر این داروها را افزایش دهد و امکان استفاده آن را به‌عنوان مکمل دارویی مطرح می‌نماید. در ادامه لازم است مطالعات بیشتر و دامنه‌داری در

شرایط محیطی invivo انجام شود تا غلظت مؤثر و ماده مؤثره این عصاره‌ها بر باکتری‌های موردنظر و سویه‌های بالینی و اثرات جانبی آنها در این غلظت‌های به‌کاررفته، مورد ارزیابی قرار گیرد تا درنهایت بتوان پس از مراحل تکمیلی، این عصاره‌ها را به‌عنوان یک داروی جدید ضد میکروبی به دنیا معرفی نمود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مدیریت و کارکنان مجتمع تحقیقاتی، تولیدی و آزمایشگاهی زیست فرآورد پارس جهت فراهم نمودن امکانات و وسایل و تجهیزات برای این تحقیق، تشکر و قدردانی می گردد.

An Evaluation of the Inhibitory and Synergistic Effects of Alcoholic Extract of Stachys Byzantina on Standard Strains under in vitro Conditions

R. Safarkar (PhD)[1], R. Bonabi (MSc)[2], A. Massiha (PhD) *[3], M. Rezaei Nazifi (MSc)[4], R. Sotoudeh (BSc)[5]

1.Young Rearchers club Astara Branch, Islamic Azad University, Astara, I.R.Iran

2.Department of Medicine, Faculty of Medicine, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, I.R.Iran

3.Department of Biotechnology, Faculty of Science, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, I.R.Iran

4.Department of biology, Faculty of Science, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, I.R.Iran

5.Department of Chemistry Faculty of Science, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(5); May 2017; PP: 39-46

Received: Feb 7th 2017, Revised: Feb 22th 2017, Accepted: Apr 9th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Plants of mint family with their antimicrobial properties are used to treat infectious diseases. This study aims to analyze the inhibitory effects as well as synergistic and antagonistic effects of alcoholic extract of Stachys byzantina on five standard strains under in vitro conditions.

METHODS: In this experimental study, after gathering, Stachys byzantina was dried in the shade far from direct light. The maceration technique was used to prepare alcoholic extract. The effect of extract was analyzed based on disk diffusion technique using concentrations of 62.5, 125, 250 and 500 mg/ml and about 20 µl of the extract was tested. The microbial strains were purchased in the form of lyophilized strains. In order to determine MIC and MBC, microdilution method was used. Moreover, the synergistic effect of the extract was analyzed with antibiotic.

FINDINGS: In this study, the greatest effect of the extract was observed to be on *Staphylococcus epidermidis* at concentration of 500 mg/ml (23±1.7 mm). However, this effect on *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus Group A* and *Pseudomonas aeruginosa* was found to be 18.4±1.8 mm, 14.4±2.4 mm and 11.7±2.4 mm, respectively. In addition, as the concentration of the extract increased, the inhibition zone diameter increased significantly ($p \leq 0.05$). Synergistic activity of the extract was shown with gentamicin, erythromycin and penicillin with *Pseudomonas aeruginosa*. The phytochemical results indicated the presence of alkaloid, carbohydrate, tannin, terpenoid, steroid, saponin and flavonoid.

CONCLUSION: It seems that the extract of Stachys byzantina has inhibitory effect, either alone or in combination with other antimicrobial agents and improves the performance of some of the antibiotics.

KEY WORDS: *Alcoholic extract, Stachys byzantina, Phytochemical compound, Antimicrobial activity, Synergistic effect.*

Please cite this article as follows:

Safarkar R, Bonabi R, Massiha A, Rezaei Nazifi M, Sotoudeh R. An Evaluation of the Inhibitory and Synergistic Effects of Alcoholic Extract of Stachys Byzantina on Standard Strains under in vitro Conditions. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(5):39-46.

*** Corresponding author: A. Massiha (PhD)**

Address: Department of Biotechnology, Faculty of Science, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, I.R.Iran

Tel: +98 13 4224 7001

Email: amirmassiha@yahoo.com

References

1.Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Med. 2006;119(6):3-10.

2.Kennedy DA, Seely D. Clinically based evidence of drug–herb interactions: a systematic review. Expert Opin Drug Saf. 2010;9(1):79-124.

3.Sharafzadeh S, Alizadeh O. Some medicinal plants cultivated in Iran. 2012;2(1):134-7.

4.Mazandarani M, and Khormali, A. Autecology, ethnopharmacology, total phenol and flavonoids and antioxidant activity of Ditrichia graveolens (L) Greuter. In different extraction from Bandargaz region. Eco phytochemical J. 2015;6(2):69-78.[In Persian].

5.van der Kooy F, Sullivan SE. The complexity of medicinal plants: The traditional Artemisia annua formulation, current status and future perspectives. J Ethnopharmacol. 2013;150(1):1-13.

6.Mazandarani M, Majidi Z, Zarghami-Moghaddam P, Abrodi M, Hemati H, Fathiazad F. Essential Oil composition, total phenol, flavonoid, anthocyanin and antioxidant activities in different parts of artemisia annua L. J Med Plant By-pro. 2012;1(1):13-21.

7.Sharifzadeh M, Sharifzadeh, K., Khanavi, M., Hadjiakhoond, A., and Shafiee, A. Anti-inflammatory activity of aerial parts of Stachys setifera and Stachys persica. Int J Pharmacol. 2005;1(2):132-7.[In Persion].

8.Maleki N, Garjani A, Nazemiyeh H, Nilfouroushan N, Sadat AE, Allameh Z, et al. Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of Stachys inflata on rats. J Ethnopharmacol. 2001;75(2):213-8.

9.Kartsev V, Stepanichenko N, Auelbekov S. Chemical composition and pharmacological properties of plants of the genus Stachys. Chem Natural Compound. 1994;30(6):645-54.

10.Norouzi-Arasi H, Yavari I, Kia-Rostami V, Jabbari R, Ghasvari-Jahromi M. Volatile constituents of Stachys inflata Benth. from Iran. Flavour Fragr. J.. 2006;21(2):262-4.

11.Santos CCdMP, Salvadori MS, Mota VG, Costa LM, de Almeida AAC, de Oliveira GAL, et al. Antinociceptive and antioxidant activities of phytol in vivo and in vitro models. Neurosci J. 2013;2013:1-9.

12.Sonboli A, Salehi P, Ebrahimi SN. Essential oil composition and antibacterial activity of the leaves of Stachys schtschegleevii from Iran. Chem Natural compound. 2005;41(2):171-4.

13.Skaltsa HD, Lazari DM, Chinou IB, Loukis AE. Composition and antibacterial activity of the essential oils of Stachys candida and S. chrysantha from southern Greece. Planta Medica. 1999;65(03):255-6. [In Persian].

14.Sindambiwe J, Calomme M, Cos P, Totte J, Pieters L, Vlietinck A, et al. Screening of seven selected rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. J Ethnopharmacol. 1999;65(1):71-7. [In Persian].

15.Yuan R, Lin Y. Traditional Chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation. Pharmacol Therapeutics. 2000;86(2):191-8.

16.Bodeker G. Traditional health system: valuing biodiversity for human health and wellbeing. cultural and spiritual values in biodiversity, ed DA Posey. 2000:261-84.

17.Rechinger K. Nepeta. Flora Iran. 1982;150:108-216.

18.Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P. The Artemisia L. genus: a review of bioactive essential oils. Molecules. 2012;17(3):2542-66.

19.Naghsh A MSM, Amjad L. Antibacterial activity of the essential oil of artemisiadeserti flowers against some pathogenic bacteria. Qom Univ Med Sci J. 2014;8(5):57-64. [In Persian].

20.Bajpai VK, Baek K-H, Kang SC. Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. Food Res Inter. 2012;45(2):722-34.

21.Guinoiseau E, Luciani A, Rossi P, Quilichini Y, Ternengo S, Bradesi P, et al. Cellular effects induced by Inula graveolens and Santolina corsica essential oils on Staphylococcus aureus. Eur J Clin Microbiol Infec Dis. 2010;29(7):873-9.

22.Jayasena DD, Jo C. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. Trend Food Sci Technol. 2013;34(2):96-108.

23.Das K, Tiwari R, Shrivastava D. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. J Med Plant Res. 2010;4(2):104-11.

24.Sattari M, Shahbazi, A, Najarpyrayh, SH. Antibacterial effect of aqueous and alcoholic extracts of eucalyptus on Pseudomonas aeruginosa. Modares J Med Sci. 2005;8(1):19-23. [In Persian].

25.Babayi H, Kolo I, Okogun J, Ijah U. The antimicrobial activities of methanolic extracts of Eucalyptus camaldulensis and Terminalia catappa against some pathogenic microorganisms. Biokemistri. 2004;16(2):106-11.

26.Bauer A. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966;45(4):493-6.

27.Zareii B, Seyfi T, Movahedi R, Cheraghi J, Ebrahimi S. Antibacterial effects of plant extracts of Alcea digitata L, Satureja bachtiarica L and ferulago angulata L. J Babol Univ Med Sci. 2014;16(1):31-7.[In Persian].

28.Baron E, Finegold S. Methods for testing antimicrobial effectiveness, Baily & Scotts diagnostic microbiology. NewYork: Mosby. 1994.

29.(NCCLS) NCfCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically 3rd ed. Approved Standard M7- A6 NCCLS, Villanova, PA, USA. 2004

30.Madhumathi V, Deepa P, Jeyachandran S, Manoharan C, Vijayakumar S. Antimicrobial activity of cyanobacteria isolated from freshwater lake. Int J Microbiol Res. 2011;2(3):213-6.

31.Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. Phytochemical screening and extraction: a review. Inter Pharma Sci. 2011;1(1):98-106.

32.Krishnaiah D, Sarbatly R, Bono A. Phytochemical antioxidants for health and medicine a move towards nature. Biotechnol Mol Biol Rev. 2007;2(4):97-104.

33.Nurdiani R, Firdaus M, Prihanto AA. Phytochemical screening and antibacterial activity of methanol extract of mangrove plant (Rhizophora mucronata) from Porong River Estuary. J Basic Sci Technol. 2012;1(2):27-9.

34.Ghoran SH, Mighani H, Ebrahimi P. In-Vitro anti-bacterial activity of chloroform, ethyl acetate and hydroalcoholic extracts of Scilla persica Hausskn. J Gorgan Univ Med Sci. 2014;16(1):106-13. [In Persian].

35.Norajit K, Laohakunjit N, Kerdchoechuen O. Antibacterial effect of five Zingiberaceae essential oils. Molecul. 2007;12(8):2047-60.

36.McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin Microbiol Rev. 1999;12(1):147-79.

37.Schlievert P, Deringer JR, Kim MH, Projan SJ, Novick R. Effect of glycerol monolaurate on bacterial growth and toxin production. Antimicrob Agent chemother. 1992;36(3):626-31.

38.Dulger B, Ugurlu E, Aki C, Suerdem TB, Camdeviren A, Tazeler G. Evaluation of antimicrobial activity of some endemic Verbascum., Sideritis., and Stachys. species from Turkey. Pharma Biolog. 2005;43(3):270-4.

39.Khafagi IK, Dewedar A. The efficiency of random versus ethno-directed research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive compounds. J Ethnopharmacol. 2000;71(3):365-76.

40.Spratt BG. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. Sci. 1994;264(5157):388-96.

41.Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Ethnopharmacol. 1996;50(1):27-34.