

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

رویا سفرکار (PhD)<sup>۱</sup>، رضا بنایی (MSc)<sup>۲</sup>، علیرضا مسیحا (PhD)<sup>۳\*</sup>، مریم رضایی نظیفی (MSc)<sup>۴</sup>، رضا ستوده (BSc)<sup>۵</sup>

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 آزاد اسلامی واحد اردبیل

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

### خلاصه

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

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی گیاه سنبله نقره‌ای (*Stachys byzantina*) پس از جمع‌آوری، به دور از نور مستقیم و در سایه خشک شد. تهیه عصاره الکلی با استفاده از روش خیساندن انجام گرفت، تاثیر عصاره به روش دیسک دیفیوژن در غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره به مقدار ۲۰۰  $\mu$ l مورد آزمایش قرار گرفت. سویه‌های میکروبی مورد آزمایش به صورت لیوفیلیزه خریداری شد. برای تعیین MIC و MBC از روش میکروداپلوشن استفاده شد. همچنین اثر هم‌افزایی عصاره با آنتی‌بیوتیک بررسی شد.

**یافته‌ها:** در این بررسی، بیشترین میزان اثر عصاره روی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر برابر با  $23/2 \pm 1/7$  میلی متر مشاهده شد. درحالی‌که این اثر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با  $18/4 \pm 1/8$  میلی متر، *استرپتوکوکوس* گروه A برابر با  $14/4 \pm 2/4$  میلی متر و *سودوموناس آنروجینوزا* معادل  $11/7 \pm 2/4$  میلی متر تعیین شد. همچنین با افزایش غلظت عصاره قطر هاله بازدارندگی به طور معنی‌داری ( $p \leq 0/05$ ) افزایش یافت. فعالیت هم‌افزایی عصاره با جنتامیسین، اریتروماکسین و پنی‌سیلین با *سودوموناس آنروجینوزا* نشان داده شد. نتایج فیتوشیمیایی حضور آلکالوئید، کربوهیدرات، تانن، ترپنوئید، استروئید، ساپونین و فلاونوئید را نشان داد.

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

**کلمات کلیدی:** عصاره الکلی، سنبله نقره‌ای، ترکیب فیتوشیمیایی، فایت ضد میکروبی، اثر هم‌افزایی.

### مقدمه

امروزه با افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای ضد میکروبی شاهد شیوع روز افزون سویه‌های بیماری‌زای مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک هستیم (۱). به علت افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، 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 فراورده‌های دارویی منشأ گیاهی دارد (۳). استفاده از گیاهان دارویی بومی که علاوه بر سازگاری‌های اکولوژیکی قادرند با سنتز مواد موثره ثانوی و فعال در پیشگیری و درمان بیماری‌ها موثر واقع شوند، در سال‌های اخیر جایگاه ویژه‌ای در علم پزشکی یافته است (۴). توجه به گیاهان دارویی با خواص ضد میکروبی می‌تواند مشکلات رایج در استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها را خصوصاً به علت عوارض جانبی، مرتفع سازد (۵). گیاه سنبله نقره‌ای با نام علمی

*استیسیس بیزانتینا* (*Stachys byzantina*) (مترادف با *استیسیس لاناتا* S. *Lanata*) یکی از گونه‌های دارویی این جنس است که دارای ساختار علفی، پایا، همراه با کرک‌های فراوان، کرکینه پوش-پشمین و تارهای بلند می‌باشد. این گیاه بومی ترکیه، ارمنستان و ایران است که پراکنش آن در مناطق مختلف ایران، خصوصاً در نواحی شمالی، البرز و شمال غرب کشور می‌باشد. (۸-۶). خانواده نعنایان یکی از بزرگترین خانواده‌های گیاهی است که دارای پراکنش جهانی می‌باشد. این خانواده با حدود ۲۰۰ سرده و ۵ هزار گونه از بوته‌های معطر دارای خواص دارویی گسترده است. سرده (*Stachys*) سنبله‌ای از این تیره حدود ۳۰۰ 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 گونه‌های این سرده به عنوان آنتی‌سپتیک

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۲۴۱-۱۲ دانشگاه آزاد اسلامی واحد آستارا می‌باشد.

\*مسئول مقاله: دکتر علیرضا مسیحا

آدرس: لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه بیوتکنولوژی. تلفن: ۰۱۳-۴۲۲۴۷۰۰۱

ATCC ۲۷۸۵۳ و اشرشیاکلی ۲۵۹۲۲ ATCC 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 (۲۵ و ۲۶).

**بررسی اثر ضد میکروبی عصاره:** جهت بررسی اثر ضد میکروبی از روش انتشار در آگار و دیسک دیفیوژن استفاده شد. باکتری‌ها بر روی محیط مولر هینتون آگار به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سوسپانسیونی با رقت ۰/۵ مک فارلند در محیط مولر هینتون برات (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 دیسک‌های بلانک بر روی سطح پلیت آلوده به باکتری قرار داده شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصاره‌های رقیق شده با غلظت‌های مختلف روی دیسک‌های ریخته شد.

قطر هاله ممانعت از رشد بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. رقیق‌سازی عصاره‌ها 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 لیتر از عصاره استفاده شد. از آنتی بیوتیک کلرامفنیکل به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۲۷). در روش 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 چاهک‌ها آنتی بیوتیک شاهد و در چاهک دیگر عصاره گیاهی با غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی لیتر ریخته شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نتایج بر اساس اندازه‌گیری قطر هاله‌های عدم رشد توسط آنتی بیوتیک و عصاره گیاهی ثبت شد (۲۸ و ۲۹).

آزمایشات حداقل ۳ بار تکرار شدند. برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) از روش میکرو‌دیلوشن (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.

سریال‌های رقت معادل ۶/۲۵، ۱۲، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره تهیه و ۷۰ میکرو لیتر از آن‌ها به میکرو پلیت‌های ۹۶ خانه ایی که قبلاً حاوی ۷۰ میکرو لیتر 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. میکروپلیت‌ها 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 خانه‌هایی که رشد باکتری در آن‌ها کاملاً متوقف شده بود، به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرم خانه گذاری شدند. غلظت‌هایی که فاقد رشد باکتری بودند، به عنوان MBC گزارش گردیدند (۳۰ و ۳۱).

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

(ضد عفونی کننده) و درمان کننده بیماری‌های 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 مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۱ و ۱۰). 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 گونه‌های مختلف جنس *Stachys* نسبت می‌دهند (۱۳ و ۱۲). همچنین در تحقیقات مختلف دیگر نیز به اثرات آنتی اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضدالتپایی و ضدسرطانی آنها اشاره شده که اغلب به کمیت و کیفیت مواد موثره ترپنوییدی، فنولی و فلاونوئیدهای موجود در اسانس و عصاره گونه‌های جنس *Stachys* اشاره شده است (۱۸-۱۴).

از آنجاییکه تنوع پوشش گیاهی و کیفیت مواد موثره دارویی در گیاهان هر منطقه، متأثر از تنش‌های اکولوژیکی و حتی فنولوژی گونه‌های آن منطقه می باشد (۲۰ و ۱۹). لذا رویکرد جامعه جهانی بهداشت به سمت شناسایی نیازهای اکولوژیکی گونه‌ها در روش‌های 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 (۲۲ و ۲۱). از آنجاییکه استان گیلان به دلیل برخورداری از شرایط اکولوژیکی، رویشگاه‌های متنوعی از گیاه سنبله نقره‌ای را در خود جای داده که از اهمیت بالقوه‌ای نیز در طب سنتی منطقه برخوردار است،

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

## مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری گیاه و استخراج عصاره:** در این مطالعه تجربی برگ‌های گیاه سنبله نقره‌ای در اردیبهشت ماه از منطقه گردنه حیران جمع‌آوری و در مکانی به دور از آفتاب خشک گردید. سپس برگ‌های خشک شده با استفاده از آسیاب مدل Waring به صورت پودر آماده تهیه شد. سپس به منظور 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 به منظور مقایسه و ارزیابی اثر ضد میکروبی عصاره‌های استخراج شده به وسیله آب مقطر و اتانول، وزن خشک عصاره‌ها تعیین شد. ابتدا وزن یک لوله آزمایش توسط ترازوی حساس دیجیتالی (۰/۰۰۰۱) تعیین شد و پس از آن ۱ میلی لیتر از عصاره الکلی در آن ریخته شد، سپس محتوی لوله در دمای 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 ۵۹۲۳ ATCC، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس ۱۲۲۲۸ ATCC، استرپتوکوکوس گروه ۱۹۶۱۵ AATCC، سودوموناس آئروجینوزا

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 فیتوشیمیائی 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 درآگار

| P-value | mg/ml ۲۷۵            | mg/ml ۱۷۵              | mg/ml ۷۵۰              | mg/ml ۵۰۰             | غلظت عصاره                |
|---------|----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|
|         | Mean±SD              | Mean±SD                | Mean±SD                | Mean±SD               |                           |
| ۰/۰۴۵   | ۱۱±۰/۹ <sup>a</sup>  | ۱۲/۲±۱/۷ <sup>b</sup>  | ۱۴/۵±۲/۳ <sup>c</sup>  | ۱۸/۴±۱/۸ <sup>d</sup> | استافیلوکوکوس اورئوس      |
| ۰/۰۲۵   | ۱۸±۲/۱ <sup>a</sup>  | ۲۰/۲±۱/۷ <sup>bc</sup> | ۲۱/۵±۱/۷ <sup>c</sup>  | ۲۳/۲±۱/۷ <sup>d</sup> | استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس |
| ۰/۰۱۵   | ۷/۵±۱/۹ <sup>a</sup> | ۱۰/۲±۲/۷ <sup>b</sup>  | ۱۲/۵±۲/۹ <sup>c</sup>  | ۱۴/۴±۲/۴ <sup>d</sup> | استرپتوکوکوس گروه A       |
| ۰/۰۵۲   | ۸/۲±۰/۴ <sup>a</sup> | ۹±۱/۸ <sup>ab</sup>    | ۱۰/۵±۲/۹ <sup>bc</sup> | ۱۱/۷±۲/۴ <sup>d</sup> | سودوموناس آئروژینوزا      |
| ۰/۰۹۶   | ۲±۰/۵ <sup>a</sup>   | ۲/۸±۰/۵ <sup>ab</sup>  | ۳/۲±۰/۹ <sup>b</sup>   | ۵±۲/۱ <sup>c</sup>    | اشرشیاکلی                 |

حروف لاتین غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی داری ( $P \leq 0.05$ ) می باشد

#### جدول ۲. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و کشندگی رشد (MBC)

در غلظت‌های مختلف عصاره الکلی سنبله نقره‌ای به روش میکرودايلوشن برات

بر حسب mg/ml

| MIC (mg/ml) | MBC (mg/ml) | میکروارگانيسم             |
|-------------|-------------|---------------------------|
| ۱۲/۵        | ۲۵          | استافیلوکوکوس اورئوس      |
| ۵۰          | ۱۰۰         | استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس |
| ۵۰          | ۱۰۰         | استرپتوکوکوس گروه A       |
| ۵۰          | ۱۰۰         | سودوموناس آئروژینوزا      |
| ۱۰۰         | ۱۰۰         | اشرشیاکلی                 |

#### جدول ۳. ارزیابی اثرات هم‌افزایی و کاهندگی عصاره الکلی سنبله نقره‌ای با

آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، پنی‌سیلین و جنتامایسین، روی باکتری‌های

منتخب برحسب میلی‌متر

| آنتی‌بیوتیک               | پنی‌سیلین | جنتامایسین | اریترومایسین |
|---------------------------|-----------|------------|--------------|
| A(AE)                     | A(AE)     | A(AE)      | 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 آئروژینوزا      | ۱۱/۲۱     | ۱۱/۳۵      | ۱۱/۲۲        |
| اشرشیاکلی                 | .         | .          | .            |

A: قطر هاله عدم رشد برای آنتی‌بیوتیک موردنظر AE: قطر هاله عدم رشد برای

آنتی‌بیوتیک به همراه عصاره

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 به MIC به محیط مولر هیتون آگار اضافه و به عنوان پلیت تست استفاده شد. سوسپانسیون باکتریایی با غلظت  $1 \times 10^8$  cfu/ml (معادل نیم مک فارلند) روی محیط کشت آگار حاوی غلظت‌های تحت مهاری اسانس توسط سواب به صورت 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 پود 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 هاله‌ها و بررسی قدرت ضد میکروبی عصاره در مقایسه با یکدیگر با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۴ و آزمون‌های آماری واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون‌های تکمیلی (Tukey HSD) تجزیه و تحلیل گردید و  $P < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

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 ( $P \leq 0.05$ ) افزایش می‌یابد. این مطالعه نشان داد که نوع باکتری و غلظت 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  $23 \pm 1/7$ ، استافیلوکوکوس اورئوس  $18/4 \pm 1/8$ ، استرپتوکوکوس گروه A  $14/4 \pm 2/4$  و سودوموناس آئروژینوزا به میزان  $11/7 \pm 2/4$  میلی‌متر مشاهده شد.

کمترین میزان حساسیت در ارتباط با باکتری اشرشیاکلی معادل  $5 \pm 2/1$  بدست آمد (جدول ۱). همچنین با افزایش غلظت عصاره فعالیت ضد باکتریایی آن علیه باکتری‌های مورد آزمون افزایش یافت. غلظت‌های مختلف در باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس و استرپتوکوکوس گروه A در مقایسه با شاهد منفی، تفاوت معنی داری داشت ( $P < 0.05$ ). قطر هاله عدم رشد در خصوص سودوموناس آئروژینوزا از نظر آماری متفاوت از یکدیگر نبودند و خاصیت ضد باکتریال غلظت‌های مختلف عصاره بر روی این باکتری تقریباً مشابه بود. نتایج مشابهی در خصوص اشرشیاکلی بدست آمد (جدول ۲).

نتایج نشان می‌دهد 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 بر علیه باکتری سودوموناس آئروژینوزا شد. علاوه بر این عصاره همراه با آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، اریترومایسین و پنی‌سیلین خاصیت آنتاگونیستی بر

جدول ۴. ترکیب فیتوشیمیایی عصاره الکلی سنبله نقره ای

| ترکیب آلی               |   |
|-------------------------|---|
| Alkaloids               | + |
| Amino acids             | - |
| Carbohydrates           | + |
| Flavonoids              | + |
| Glycosides              | + |
| Tannins                 | + |
| Phenol                  | - |
| Terpenoids              | + |
| Steroids                | + |
| Saponin                 | + |
| Volatile oils           | - |
| (+) Present, (-) absent |   |

منفی اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه 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 اپیدرمیدیس، استرپتوکوکوس گروه A، سودوموناس آئروژینوزا بین ۱۲/۵ تا ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، بیشترین مقاومت مربوط به باکتری گرم منفی اشرشیاکلی می‌باشد. در این مطالعه اثرات عصاره گیاه بر روی عملکرد چند آنتی‌بیوتیک معمول که بر روی سویه‌های استاندارد باکتری اثر داده شده بود، مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که عصاره سنبله نقره‌ای تنها بر روی عملکرد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین بر ضد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس 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 می‌گردد. عصاره این گیاه تنها بر عملکرد پنی‌سیلین و اریترومایسین بر ضد سویه‌های استرپتوکوکوس گروه A و سودوموناس آئروژینوزا اثر سینرژسمی داشت و بر عملکرد دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها در این دو سویه اثری نداشت.

از آنجاییکه مقاومت باکتریایی در حال افزایش است و انتقال مقاومت از باکتری‌های مقاوم به باکتری‌های حساس از طرق مختلف به آسانی 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 به عنوان 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 می‌باشد. مطالعات صورت گرفته در سال‌های اخیر، مشخص کرده است که فلاونوئیدها 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 تلاشی 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 به عنوان یک ماده آنتی باکتریال به‌ویژه در موارد مقاومت دارویی مطرح می‌نماید. همچنین این عصاره دارای اثرات سینرژسمی با چندین آنتی‌بیوتیک از جمله پنی‌سیلین و اریترومایسین است و می‌تواند اثر این داروها را افزایش دهد و امکان استفاده آن را به عنوان مکمل دارویی مطرح می‌نماید. در ادامه لازم است مطالعات بیشتر و دامنه‌داری در

## بحث و نتیجه گیری

بر اساس نتایج این تحقیق مشخص شد که عصاره الکلی این گیاه در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر اثرات ضدباکتریایی قابل توجهی روی استافیلوکوک / اپیدرمیدیس دارد اما این عصاره در غلظت‌های کم اثر ضد میکروبی 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 آئروژینوزا و اشرشیاکلی، کاملاً بی‌اثر بوده است مغایرت دارد (۱۳). این امر ممکن است به علت استخراج بیشتر مواد مؤثر در گیاه به وسیله اتانول باشد. به‌طور کلی 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 شیمیایی 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 سوش‌های مورد بررسی بسیار حائز اهمیت است.

مطالعه Dulger و همکاران نشان داد که عصاره متانولی حاصل از گونه‌های مختلف استخیس بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس و لگاریس، باسیلوس سرئوس، مایکوباکتریوم اسمگ ماتیز و لیستریا مونوسیتوزن مؤثر است (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

### 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.

شرایط محیطی *in vivo* 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.

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

R. Safarkar (PhD)<sup>1</sup>, R. Bonabi (MSc)<sup>2</sup>, A. Massiha (PhD) <sup>\*3</sup>, M. Rezaei Nazifi (MSc)<sup>4</sup>, R. Sotoudeh (BSc)<sup>5</sup>

1.Young Researchers 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 7<sup>th</sup> 2017, Revised: Feb 22<sup>th</sup> 2017, Accepted: Apr 9<sup>th</sup> 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≤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 Persian].
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, Najarpayrah, 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. New York: 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.