

اثر ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و هیدروالکلی برگ و ساقه گیاه سداب بر هشت سویه باکتری بیماری‌زا

معصومه احمدی جلالی مقدم^۱، دکتر حمیدرضا هنرمند^{۲*}، صادق فلاح دلاور^۳، امین سعیدی نیا^۳

۱- کارشناس ارشد آزمایشگاه، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان. ۲- استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان.

۳- دانشجوی پزشکی، کارشناس فنی مرکز مطالعات و پژوهش‌های گیاهان دارویی بسیج دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان.

چکیده

زمینه و هدف: گیاه سداب (*Ruta graveolens*) از کهن‌ترین گیاهان مورد استفاده در طب سنتی است. این مطالعه به منظور تعیین اثر ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و هیدروالکلی برگ و ساقه گیاه سداب بر هشت سویه باکتری بیماری‌زا انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی روی سویه‌های استاندارد باکتری‌های پاتوژن شایع انسانی شامل اتروکوک فکالیس، استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمیس، استرپتوکوک پنومونیا، اشریشیا کولی، کلبسیلا پنومونیه، سالمونلا تیفی و اتروباکترکلواکه که به صورت لیوفیلیزه شده از مرکز کلکسیون باکتری و قارچ سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی خریداری شده بودند؛ انجام شد. اثر عصاره‌های آبی و هیدروالکلی گیاه سداب بر رشد سویه‌های باکتری‌های بیماری‌زا به‌طور جداگانه و با روش دیسک دیفیوژن و ماکرو دیلوژن و تعیین حداقل غلظت کشندگی (MIC) بررسی گردید. نتایج با اثر ضد میکروبی هشت آنتی‌بیوتیک رایج شامل کوتریموکسازول، اکسی‌سیکلین، ونکومایسین، اریترومایسین، فورازولیدون، تراسیکلین، آموکسی‌سیلین / کلانولانیک اسید و آمپی‌سیلین / سولباکتام مقایسه شد.

یافته‌ها: عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی گیاه سداب حتی با غلظت بالا (۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اثر ممانعت‌کنندگی رشد علیه

باکتری‌های مورد مطالعه نداشتند.

نتیجه‌گیری: عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی اندام‌های هوایی گیاه سداب فاقد اثر بازدارندگی بر باکتری‌های بیماری‌زا است.

کلید واژه‌ها: گیاه سداب، باکتری بیماری‌زا، آنتی‌بیوتیک، حداقل غلظت کشندگی

* نویسنده مسؤول: دکتر حمیدرضا هنرمند، پست الکترونیکی honarmand@gums.ac.ir

نشانی: رشت، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی، تلفن ۰۱۳۱-۶۶۹۰۸۸۴-۶۶۹۰۰۳۶، شماره ۶۶۹۰۰۳۶

وصول مقاله: ۹۲/۴/۱۵، اصلاح نهایی: ۹۲/۱۱/۱، پذیرش مقاله: ۹۲/۱۱/۱۵

مقدمه

فشارخون، ضدقارچ، ضدانگل، ضد کرم، کاهنده برخی از فعالیت‌های سیستم عصبی، ضدبارداری و سقط‌کننده جنین گزارش شده است (۷).

خواص ضدقارچی سداب توسط Oliva و همکاران بررسی شده است (۸ و ۹). عصاره آبی و ۵-متوکسی پسرالین و ۸-متوکسی پسرالین جدا شده از آن اثر ضدقارچی قوی نشان داده است (۸). همچنین ۷-متوکسی کومارین، ۷-هیدروکسی کومارین و ۴-هیدروکسی کومارین استخراج شده از گیاه سداب فعالیت ضدقارچی متوسطی نشان داده است (۹). خاصیت ضدانگلی این گیاه نیز در مطالعه Guarrera نشان داده شد (۱۰).

این مطالعه به منظور تعیین اثر ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و هیدروالکلی برگ و ساقه گیاه سداب بر هشت سویه باکتری

مطالعات متعددی در خصوص اثر ضدباکتریایی گیاهان علیه باکتری‌ها انجام شده است (۴-۱). گیاه سداب (*Ruta graveolens*) از کهن‌ترین گیاهان مورد استفاده در طب سنتی ایران و ملل مختلف بوده و برای درمان بسیاری از بیماری‌ها کاربرد دارد. این گیاه علفی و کوتاه در کوهپایه‌ها رشد می‌کند و بومی نواحی شمالی به خصوص استان گیلان است. سداب در زمان‌های خیلی قدیم شهرت فراوانی از نظر درمان بیماری‌های مختلف داشته است. دانشمندان قدیم اروپایی آن را داروی جمیع بیماری‌ها می‌دانستند و از آن برای موارد مختلف استفاده می‌کردند (۵ و ۶). در طب سنتی ایران نیز این گیاه و گونه‌های مختلف آن به خوبی شناخته شده و در درمان بسیاری از بیماری‌ها به کار رفته است. برای این گیاه خواص متعددی از جمله ضدتشنج، التیام‌دهنده زخم، ضدسرفه و کاهش

بیماری‌زا انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی روی سویه‌های استاندارد باکتری‌های پاتوژن شایع انسانی شامل انتروکوک فکالیس، استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمیس، استرپتوکوک پنومونیا، اشریشیا کولی، کلبسیلا پنومونیه، سالمونلا تیفی و انتروباکتر کلووا که به صورت لیوفیلیزه شده از مرکز کلکسیون باکتری و قارچ سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی خریداری شده بودند؛ انجام شد. مطالعه در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان در سال ۱۳۹۱ انجام شد.

گیاه سداب از ارتفاعات سیاهکل جمع‌آوری و در دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان شناسایی شد. اندام‌های هوایی گیاه جداسازی و در سایه خشک و خرد گردید. پودر حاصله به‌منظور تهیه عصاره‌های آبی و هیدروالکلی، به‌طور جداگانه با آب، اتانول ۷۰ درصد و متانول ۸۰ درصد خیس گردید. سپس از صافی عبور داده شد و برای تغلیظ محلول حاصله، آن را در بالون دستگاه تقطیر در خلاء (Heidolf 2 G) ریختیم و بدین ترتیب عصاره‌های گیاه به‌دست آمد. سپس عصاره‌ها را به‌طور جداگانه در انکوباتور با دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار دادیم تا خشک شدند. مقدار یک گرم از هر عصاره خشک گیاه سداب در مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و سپس از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری عبور داده شد تا میکروزدایی شود و برای انجام تست‌ها قابل استفاده باشد. ابتدا دیسک‌های بلانک با مقدار $300 \mu\text{g}$ از هر عصاره تهیه شد. این دیسک‌ها برای انجام تست حساسیت‌سنجی ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن مورد استفاده قرار گرفتند.

هریک از سویه‌های باکتری بیماری‌زا ابتدا در محیط کشت TSB ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس کشت داده شدند و پس از رشد به محیط کشت TSA منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوبه شدند. یک کلنی تک از این محیط انتخاب شد و به محیط کشت مایع مولر هینتون برات انتقال داده شد و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوبه گردید تا یک کشت انبوه از آن حاصل شد و برای انجام تست‌های حساسیت‌سنجی و تعیین حداقل غلظت کشندگی (MIC: minimum inhibitory concentration) مورد استفاده قرار گرفت.

دیسک بلانک به عنوان کنترل منفی و دیسک آنتی‌بیوتیکی به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و اثر آنها بر هر باکتری با اثر عصاره سداب مقایسه گردید. پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سپس هاله عدم رشد خانه‌های هر پلیت به‌طور جداگانه اندازه‌گیری و نتایج ثبت شد. این مراحل برای هر باکتری به‌طور جداگانه انجام گردید.

برای تعیین MIC از روش رقت سریال در لوله استفاده شد و رقت‌های ۱۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مورد استفاده قرار گرفت. به تمامی لوله‌ها سوسپانسیون معادل 10^5 cfu/ml از باکتری‌های مورد آزمون اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، کدورت‌ها در مقایسه با محیط کشت تازه مولر هینتون برات و نیز با یکدیگر مقایسه شدند. کمترین رقت عصاره که مانع رشد باکتری گردید و کدورت معنی‌دار ایجاد نکرد؛ MIC در نظر گرفته شد. همه آزمون‌های فوق‌الذکر به‌طور کامل و مشابه برای تمام عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی اندام‌های هوایی (برگ و ساقه) گیاه سداب با رعایت تمام موارد ذکر شده انجام شد. نتایج حاصله با اثر ضد میکروبی هشت آنتی‌بیوتیک رایج شامل کوتریموکسازول، اکسی‌سیکلین، ونکوماسین، اریتروماسین، فورازولیدون، تراسیکلین، آموکسی‌سیلین / کلاولانیک اسید و آمپی‌سیلین / سولباکتام مقایسه شد. الگوی مقاومت و حساسیت هر باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها با روش آنتی‌بیوگرام کربی بائر تعیین گردید.

یافته‌ها

در آزمون اول دیسک‌های حاوی ۳۰۰ میکروگرم عصاره آبی و هیدروالکلی گیاه سداب در مقایسه با دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی، عدم تاثیر بر رشد باکتری‌ها را نشان دادند. در حالی که برخی از آنتی‌بیوتیک‌های مزبور اثر مانع‌کنندگی رشد بر برخی از باکتری‌ها نشان دادند. در آزمون سوم که برای تعیین MIC انجام شد؛ در تمام لوله‌ها به‌جز لوله شاهد کدورت مشهود دیده شد که حاکی از رشد بارز باکتری و عدم اثر مقادیر ذکر شده بود (جدول یک).

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی گیاه سداب اثر مانع‌کنندگی رشد علیه باکتری‌های مورد مطالعه را نشان ندادند.

Ivanova و همکاران اثر ضدباکتریایی گیاه سداب را علیه استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمیس و باسیلوس سوبتیلیس نشان دادند (۱۱). اولیا و همکاران اثر ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی آن را بر سودوموناس آئروجینوزا نشان داده‌اند (۱۲). در مطالعه Alzoreky و Nakahara (۱۳) و مطالعه Ojala و همکاران (۱۴) اثر ضدباکتریایی این گیاه بر استافیلوکوک اورئوس مشاهده شد. ترکیبات فنلی، الکلونیدها و تریپونیدهای موجود در این گیاه اثر ضدباکتریایی بر استافیلوکوک اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس نشان داده‌اند (۱۵). مطالعه Alzoreky و Nakahara نشان داد که عصاره این گیاه بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی‌ها اثر دارد (۱۳).

جدول ۱: اثر عصاره‌های آبی و هیدروالکلی برگ و ساقه گیاه سداب با غلظت بالا (۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و آنتی‌بیوتیک‌های رایج بر رشد هشت سویه باکتری بیماری‌زا با استفاده از روش کربی پاتر

انتروکوک فکالیس	استاف اورئوس	استاف ایدرمیدیس	اشرشیا کولی	کلیسیلا پنومونه	سالمونلا تیفی	انتروباکتر کلواکه	استریتوکوک پنومونه	
R	R	R	S	S	S	S	S	کوتریموکسازول
S	S	S	R	R	R	R	S	اکساسیلین
S	S	S	R	R	R	R	S	وانکوماسین
R	R	R	R	R	R	R	S	اریترومایسین
R	R	R	S	R	S	R	R	فوراژولیدین
S	S	S	S	S	S	S	S	تتراسیکلین
R	S	S	R	R	R	R	S	آموکسی سیلین / کلاونیک اسید
R	S	S	R	R	R	R	S	آمیسی سیلین / سولباکتام
R	R	R	R	R	R	R	R	آبی
R	R	R	R	R	R	R	R	اتانولی
R	R	R	R	R	R	R	R	متانولی

R: مقاوم، S: حساس

همکاران عصاره آبی بذر خشک و ساقه کمترین اثر را نشان داد و MIC آن برای استافیلوکوک اورئوس ۱۰ درصد حجمی به دست آمد (۱۶). در مطالعه اولیا و همکاران عصاره اتانولی برگ سداب اثر ضدباکتریایی بر سودوموناس آئروژینوزا نشان داد و MIC آن برای این باکتری ۱۰ درصد حجمی به دست آمد (۱۲). با توجه به تفاوت نتایج مطالعه ما با برخی از مطالعات مشابه (۱۵-۱۱)، به نظر می‌رسد باکتری‌های مطالعه شده در برابر گیاه سداب مقاوم هستند که نیازمند انجام مطالعات بیشتری است.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی اندام‌های هوایی گیاه سداب اثر بازدارندگی بر شایع‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای انسانی نداشتند که ممکن است به خاطر مقاوم بودن باکتری‌های آزموده شده و یا به دلیل عدم وجود مواد ضد میکروبی در گیاه مزبور باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره پ/۲۴۹۳/۱۳۲۳/۳) معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گیلان بود. سازمان حمایت کننده طرح، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان بود.

References

- Dadgar T, Ghaemi E, Bazueri M, Asmar M, Mazandarani M, Saifi A, et al. [The antibacterial effects of 20 herbal plants on methicillin resistant and sensitive s.aureus in Golestan province]. J Gorgan Uni Med Sci. 2007; 9(1):55-62. [Article in Persian]
- Talei G, Meshkatsadat M, Mosavi S. [Antibacterial activity native medicinal plants extracts in Lorestan, Iran]. J Gorgan Uni Med Sci. 2008; 10(1):31-35. [Article in Persian]
- Hashemi A, Shams S, Kalantar D, Taherpour A, Barati M. [Antibacterial effect of Methanolic extract of Camellia Sinensis L. on Pseudomonas aeruginosa strains producing β -lactamases]. J Gorgan Uni Med Sci. 2012; 14(1):136-42. [Article in Persian]
- Hafez Ghoran S, Mighani H, Ebrahimi P. [In-vitro anti-bacterial

در مطالعه حاضر عصاره‌های هیدروالکلی و آبی برگ و ساقه گیاه سداب حتی با غلظت بالا (۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اثر ممانعت‌کنندگی بر رشد باکتری‌های مطالعه شده در شرایط آزمایشگاه را نشان ندادند. مطالعه صادری و همکاران نشان داد که عصاره هیدروالکلی استخراج شده با اتانول بر رشد استافیلوکوک اورئوس اثر ممانعت‌کنندگی ندارد (۱۶). در مطالعه Nakahara و Alzoreky (۱۳) و مطالعه Ojala و همکاران (۱۴) عصاره متانولی استخراج شده از برگ گیاه بر استافیلوکوک اورئوس اثر ضدباکتریایی نشان داد که علت آن می‌تواند حضور مواد ضد میکروبی بیشتر در برگ نسبت به ساقه و خود استخراج با متانول باشد. در مطالعه Alzoreky و Nakahara (۱۳) از متانول بافوری (۸۰ درصد متانول و ۲۰ درصد PBS) برای عصاره‌گیری استفاده شد و مقدار MIC با آن ۲/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حاصل شد که نسبتاً بالا است. در مطالعه ما حتی غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر معادل با ۴۰ درصد حجمی نیز اثری نشان نداد. در مطالعه Ojala و همکاران عصاره متانولی سداب با روش رقت در آگار اثر ضدباکتریایی با MIC برابر با ۰/۱۲۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان داد (۱۴) و این مقدار برای استافیلوکوک اورئوس بود که تفاوت زیادی با MIC حاصله در مطالعه Alzoreky و Nakahara (۱۳) دارد. در مطالعه صادری و

- activity of chloroform, ethyl acetate and hydroalcoholic extracts of Scilla persica Hausskn]. J Gorgan Uni Med Sci. 2014; 16(1):106-13. [Article in Persian]
- Javadi H. [Effect of planting dates and nitrogen rates on yield and yield components of black cumin (Nigella Sativa L.)]. Iranian Journal of Field Crops Research. 2008; 6(1): 59-66. [Article in Persian]
- Shanazi S, Yezdani D, Ejni Y. [Study on the business of medical plants in the world and Iran]. Seminar of Medical Plants. Azad University, Sharekord, Iran. 2006; p:313. [Persian]
- Naghibi-Harat J, Kamalinejad M, Sadeghipour MR, Sadeghipour HR, Eshraghian MR. [A review on Ruta graveolens.;

- its usage in traditional medicine and modern research data]. *J Med Plants*. 2009; 2(30):1-19. [Article in Persian]
8. Oliva A, Lahoz E, Contillo R, Aliotta G. Fungistatic activity of *Ruta graveolens* extracted and its allelochemicals. *J Chem Ecology*. 1999; 25 (3): 519-26.
9. Oliva A, Meepagala KM, Wedge DE, Harries D, Hale AL, Aliotta G, et al. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *J Agric Food Chem*. 2003 Feb; 51(4):890-6.
10. Guarrera PM. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *J Ethnopharmacol*. 1999 Dec; 68(1-3):183-92.
11. Ivanova A, Mikhova B, Najdenski H, Tsvetkova I, Kostova I. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*. *Fitoterapia*. 2005 Jun;76(3-4):344-7.
12. Owlia P, Saderi H, Tabaei Nezhad SA, Naseri M, Rezaee MB. [Comparison of antimicrobial effect of *Ruta graveolens* and gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*]. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 2004; 20(2): 171-80. [Article in Persian]
13. Alzoreky NS, Nakahara K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Int J Food Microbiol*. 2003 Feb;80(3):223-30.
14. Ojala T, Remes S, Haansuu P, Vuorela H, Hiltunen R, Hahtela K, et al. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *J Ethnopharmacol*. 2000 Nov;73(1-2):299-305.
15. Al-Bakri AG, Afifi FU. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *J Microbiol Methods*. 2007 Jan;68(1):19-25.
16. Saderi H, Owlia P, Radmanesh M. [Antimicrobial effect of hydro-alcoholic and aqueous extracts of *Ruta graveolens* L. Against *Staphylococcus aureus*]. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 2007 ;22(4) : 366-372. [Article in Persian]

Short Communication

Antimicrobial effect of *Ruta graveolens* extract on pathogenic bacteria

Ahmadi Jalali Moghadam M (M.Sc)¹, Honarmand HR (Ph.D)*²
Falah-Delavar S (M.D)³, Saeidinia A (M.D)³

¹Lab Technical Staff, Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran. ²Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran. ³Medical Student, Technical Staff, Medical Plants Research Center of Student Basij, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

Abstract

Background and Objective: *Ruta graveolens* is a plant used in traditional medicine with variety of therapeutic effects. This study was done to evaluate the antimicrobial effect of hydro and alcoholic extracts of *Ruta graveolens* on 8 species of pathogenic bacteria.

Methods: In this descriptive study, standard strains of *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Strptococcus pneumonia*, *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella typhi* and *Enterobacter Cloace* were obtained from Iranian institute of scientific and industrial research center. The effect of hydro and hydroalcoholic extracts of *Ruta graveolens* on the growth of bacteria was determined by disc diffusion and serial macro dilution methods. Minimum inhibitory concentration (MIC) for each extract was determined and the findings were compared with 8 common antibiotics including Co-trimoxazole, Oxycycline, Vancomycin, Erythromycin, Furazolidon, Tetracycline, amoxicillin / clavulanic acid and Ampicillin/sulbactam.

Results: Hydro and hydroalcoholic extracts of *Ruta graveolens* did not show any inhibitory effect on growth of the pathogenic bacteria even in the presence of high concentration (3mg/ml).

Conclusion: The extracts of arial organs of *Ruta graveolens* had no inhibitory effect on growth of the common human pathogenic bacteria.

Keywords: *Ruta graveolens*, Pathogenic bacteria, Antibiotic, Minimum inhibitory concentration

* Corresponding Author: Honarmand HR (Ph.D), E-mail: honarmand@gums.ac.ir

Received 6 Jul 2013

Revised 21 Jan 2014

Accepted 4 Feb 2014