

اثر ضد میکروبی عصاره‌های کلروفرمی، اتیل استاتی و هیدروالکلی

پیاز گیاه سنبل کوهی در شرایط آزمایشگاهی

سالار حافظ قرآن^۱، دکتر حسین میقانی^۲، دکتر پونه ابراهیمی^{۳*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی گرایش فیتوشیمی، دانشگاه گلستان، گرگان. ۲- استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان، گرگان.

۳- استادیار، شیمی تجزیه (گرایش جداسازی و کروماتوگرافی)، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان، گرگان.

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به تنوع ژنتیکی ایجاد شده در عوامل بیماری‌زای میکروبی و پیدایش سویه‌های مقاوم و همچنین عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی، جایگزین کردن آنها با داروهای ضدباکتریایی با منشأ گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره‌های کلروفرمی، اتیل استاتی و هیدروالکلی پیاز گیاه سنبل کوهی بر روی دو باکتری گرم مثبت و یک باکتری گرم منفی به روش دیسک دیفیوژن و روش رقت لوله‌ای انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه آزمایشگاهی عصاره کلروفرمی، اتیل استاتی و هیدروالکلی پیاز گیاه سنبل کوهی تهیه و خواص ضد میکروبی و نیز حداقل غلظت مهارکنندگی باکتری (MIC) و میکروب کشی (MBC)، با روش دیسک دیفیوژن (تعیین هاله عدم رشد) و نیز رقت لوله‌ای (Macro-dilution)، بر باکتری‌های اشریشیاکلی (گرم منفی)، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس (گرم مثبت) مورد سنجش قرار گرفت. از دی‌متیل سولفوکسید به‌عنوان شاهد منفی و از آمپی‌سیلین و نالیدیکسیک‌اسید به‌عنوان شاهد‌های مثبت استفاده شد.

یافته‌ها: هاله عدم رشد عصاره اتیل استاتی به ترتیب روی استافیلوکوکوس ۲۶/۳±۰/۱ میلی‌متر، اشریشیاکلی ۲۳/۷±۰/۳ میلی‌متر و باسیلوس ۱۹/۵±۰/۴ میلی‌متر تعیین شد. هاله عدم رشد عصاره کلروفرمی به ترتیب روی استافیلوکوکوس ۱۶/۴±۰/۲ میلی‌متر و باسیلوس ۱۴/۹±۰/۳ میلی‌متر مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: اثر ضد میکروبی عصاره‌های کلروفرمی و اتیل استاتی پیاز گیاه سنبل کوهی بر روی اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس و باسیلوس بیشتر از نالیدیکسیک‌اسید و مشابه آمپی‌سیلین در شرایط آزمایشگاهی بود.

کلید واژه‌ها: سنبل کوهی، حداقل غلظت مهارکنندگی، اشریشیاکلی، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس

* نویسنده مسؤول: دکتر پونه ابراهیمی، پست الکترونیکی epouneh@yahoo.com و p.ebrahimi@gu.ac.ir

نشانی: گرگان، دانشگاه گلستان، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی، کدپستی ۴۹۱۳۸۱۵۷۵۹، تلفن و نمابر ۰۱۷۱-۲۲۴۵۹۶۴

وصول مقاله: ۹۱/۳/۲۳، اصلاح نهایی: ۹۲/۲/۱۷، پذیرش مقاله: ۹۲/۵/۱۶

مقدمه

گل)، ۲ الی ۴ برگ غلافدار، گلپوش مایل به آبی با قطعات ایستاده، گل آذین خوشه‌ای، محور گل منفرد و به ندرت دوتایی است. از رویشگاه‌های این گیاه می‌توان آذربایجان غربی، خرم‌آباد، الوند، همدان، قصر شیرین، سنندج و کوه رزآب را نام برد (۱).

ترکیبات شیمیایی از قبیل هوموایزوفلاوانون‌ها (Homooisoflavanones)، آلکالوئیدها (Alkaloides)، استیلبن‌ها (Stilbenes) و گلیکوزیدهای قلبی (Cardiac Glycosides) از سنبل کوهی گزارش شده است (۷-۳). در پرتغال از Scilla در درمان تومورهای داخلی، ناراحتی ریه در چهارپایان و همچنین گشاد کردن رگ‌ها و ضد آلرژی استفاده شده و خواص ضد جهش‌زا

طی سالیان متمادی داروهای طبیعی، به خصوص گیاهان دارویی اساس و حتی در برخی موارد تنها درمان محسوب می‌شدند. در عین حال مواد اولیه موجود در این گیاهان در صنعت داروسازی با خاصیت ضد عفونی‌کنندگی مورد استفاده قرار می‌گرفتند (۱ و ۲). سنبل کوهی با نام علمی *Scilla persica* Hausskn. یک گیاه چندساله است که متعلق به خانواده لاله است. از این گیاه به‌عنوان ماده غذایی و یک داروی سنتی برای افزایش گردش خون، ضد التهاب و ضد درد استفاده می‌شود (۳). این گیاه دارای برگ‌گک کوچک، سفید و غشائی، شامل یک یا دو محور پُر گل (۱۰ تا ۱۲

ضدمیکروبی سیلا پرسیکا مشاهده نشده است و این نوع بررسی صرفاً بر روی گیاه سیلا ناتالسیس انجام یافته است (۱۱). لذا این مطالعه به منظور تعیین اثر ضدباکتریایی عصاره‌های کلروفرمی، اتیل استاتی و هیدروالکلی پیاز گیاه سنبل کوهی بر سه میکروارگانسیم اشیشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی میکروارگانسیم‌های اشیشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس از دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه گردید. این مطالعه در آزمایشگاه تحقیقاتی فیتوشیمی دانشگاه گلستان در سال ۱۳۹۰ انجام شد.

گیاه سنبل کوهی در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی ساری (شماره هرباریوم ۶۳۳۴) شناسایی گردید.

برای گرفتن عصاره تام پیاز گیاه سنبل کوهی از روش خیساندن (Maceration) استفاده شد. ارلن حاوی گیاه خرد و له شده با مقدار لازم از حلال کلروفرم (شرکت Merck آلمان) پر شد و روی تکان‌دهنده قرار گرفت تا عمل استخراج مواد مؤثره به خوبی صورت پذیرد (۲۱). پس از چندبار تعویض حلال، کنترل پایان عصاره‌گیری با کلروفرم با استفاده از صفحات TLC انجام شد. سپس گیاه را خشک کرده و عمل عصاره‌گیری با حلال اتیل استات (شرکت Merck آلمان) دنبال شد. پس از اتمام عصاره‌گیری که کنترل آن با صفحات TLC انجام شد و خشک شدن گیاه، عصاره‌گیری با حلال هیدروالکلی (شرکت Merck آلمان) انجام شد. سه عصاره را با صافی کتانی و بعد با صافی کاغذی صاف کرده و با استفاده از دستگاه تقطیر در خلاء (IKA werke - ژاپن) تغلیظ نموده و عصاره خشک آن به ازای مقدار معینی از گیاه تعیین گردید. سپس مقدار یک گرم از هر نوع عصاره (کلروفرمی، اتیل استاتی و هیدروالکلی) در یک میلی‌لیتر دی‌متیل سولفو کسید حل شد و با استفاده از فیلترهای سرسرنگی میلی‌پور به قطر ۰/۲۲ میکرومتر صاف و استریل شدند. ابتدا محلول‌ها در غلظت ۱۰۰ درصد و سپس با حل کردن مقادیر مختلف، در غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ درصد (وزنی - حجمی) رقیق شدند.

با استفاده از روش انتشار دیسکی (Disk diffusion method) از طریق دیسک کاغذی، حساسیت میکروارگانسیم‌ها نسبت به مواد ضدمیکروبی بر طبق روش متداول کربی - بائر تعیین شد. ابتدا سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند بر اساس روش استاندارد تهیه شد (۲۲). سپس با استفاده از یک سوآب استریل اشباع شده از سوسپانسیون میکروبی، کشت سفره‌ای فشرده‌ای در تمام سطح پلیت مولر هینتون آگار (شرکت Merck آلمان) ایجاد

بودن این گیاه نیز به ثبت رسیده است (۸). در هندوستان پیاز Scilla در درمان آسم، سرفه، برونشیت، امراض قلبی (تنظیم ضربان قلب)، روماتیسم و پوست مورد استفاده قرار گرفته و دارای خاصیت کرم‌کشی (انگل روده)، ادرار آور، قاعده آور و نیز خلط آور است (۹). در طب سنتی چین از Scilla به عنوان پادزهر، فعال‌ساز گردش خون، درمان ورم و دمل چرکی استفاده می‌شود (۱۰). در آفریقای جنوبی بررسی‌ها نشان داد که پیاز Scilla natalensis خاصیت ضدسرطانی، آنتی‌باکتریالی، کرم‌کشی (انگل روده) و همچنین جلوگیری از تبدیل تومورهای داخلی به عوامل سرطانی دارد. از جوشانده پیاز برای درمان دمل چرکی و آگزما استفاده کرده‌اند (۱۱).

باکتری‌هایی نظیر استافیلوکوکوس‌ها، اشیشیاکلی، استریتوکوکوس‌ها و باسیلوس‌ها از جمله عوامل عفونی بیماری‌زا در انسان هستند که امروزه مشکلات زیادی برای انسان به وجود آورده‌اند (۱۲). استافیلوکوکوس اورئوس باکتری گرم مثبت، فلور نرمال بینی و پوست است و سبب ایجاد عفونت‌های بیمارستانی (۱۳) و مهم‌ترین عامل عفونت‌های پوست و بافت‌های زیرین آن در انسان است (۱۴). اشیشیاکلی یک باکتری گرم منفی از خانواده آنتروباکتریاسه است و عامل عفونت در مجاری ادراری است و حدود ۹۰ درصد از باکتریوری را در زنان تشکیل می‌دهد (۱۵). باسیلوس سرئوس باسیل گرم مثبت و اسپوردار از خانواده باسیلاسه است که به صورت گسترده‌ای در طبیعت، آب و خاک پراکنده شده است. به طوری که می‌توان آن را از مواد غذایی جدا نمود. این باکتری قادر به ایجاد انتروتوکسین‌های اسهال و تهوع است (۱۶ و ۱۷). با توجه به تنوع ژنتیکی ایجاد شده در عوامل بیماری‌زای میکروبی و پیدایش سویه‌های مقاوم و همچنین عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی، جایگزین کردن داروهای ضدباکتریایی توسط داروهای ضدمیکروبی با منشأ گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و انگیزه‌ای برای تحقیقات در زمینه یافتن داروهای گیاهی بدون عوارض جانبی شده است (۱۸).

استافیلوکوکوس اورئوس به دلیل قدرت بیماری‌زایی بالقوه و مقاومت روزافزون در برابر داروهای ضد باکتریایی به یکی از مشکلات بهداشتی مهم جهان تبدیل شده است. توکسین این باکتری باعث ایجاد سرگیجه، اسهال و تهوع می‌شود (۱۹). همواره امکان آلودگی شیر خشک نوزادان به اسپور باسیلوس سرئوس وجود دارد و این باکتری قادر به ایجاد مسمومیت غذایی و حتی سپتی‌سمی و مننژیت در نوزادان است. انتروتوکسین تولید شده توسط اشیشیاکلی مسؤول مسمومیت دستگاه گوارش و بروز علائم گوارشی ناشی از آن است (۲۰).

تاکنون هیچ گزارشی مستندی دال بر انجام بررسی اثر

گلیکوزیدها: به منظور انحلال عصاره در اسید استیک گلاسیال، چند قطره کلرید آهن و چند قطره اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد. به طوری که محلول دولایه تشکیل گردید. رنگ قهوه‌ای قرمزگون در تقاطع لایه‌ها و رنگ سبز آبی‌گون در لایه بالا نشان‌دهنده وجود گلیکوزیدها بود (۲۷).

ترپنوئیدها و استروئیدها: به ۴ میلی گرم از عصاره ۰/۵ میلی لیتر ایندیریداستیک و ۰/۵ میلی لیتر کلروفوم اضافه شد. سپس اسیدسولفوریک غلیظ به آرامی افزوده شد. رنگ بنفش قرمزگون نشان‌دهنده ترپنوئید و رنگ سبز آبی‌گون نشان‌دهنده استروئیدها بود (۲۶ و ۲۷).

فلاونوئیدها: به ۴ میلی لیتر از عصاره ۱/۵ میلی لیتر متانول ۵۰ درصد اضافه شد. سپس محلول گرما داده شد و فلز منیزیم به آن اضافه گردید. به این محلول ۶-۵ قطره اسیدکلریدریک غلیظ اضافه شد. رنگ قرمز مربوط به فلاونوئیدها و رنگ نارنجی مربوط به فلاون‌ها بود (۲۶ و ۲۷).

تانن‌ها: به ۰/۵ میلی لیتر محلول عصاره یک میلی لیتر آب و ۲-۱ قطره کلرید آهن اضافه شد. رنگ آبی نشان‌دهنده گالیک تانن‌ها و رنگ سبز تیره نشان‌دهنده کاتچول تانن‌ها بود (۲۶).

آنتراکینون‌ها: ۰/۵ گرم عصاره با اسیدکلریدریک ۱۰ درصد برای چند دقیقه در حمام آب گرم جوشید و سپس صاف شد. بعد از سرد شدن هم حجم با محلول فیلتر شده کلروفوم اضافه شد. سپس چند قطره آمونیاک ۱۰ درصد به مخلوط اضافه و گرما داده شد. رنگ صورتی نشان‌دهنده وجود آنتراکینون‌ها بود (۲۶ و ۲۷).

ساپونین‌ها: حدود ۰/۲ گرم از عصاره با ۵ میلی لیتر آب مقطر تکان داده شد. سپس به محلول گرما داده شد تا به جوش آمد. تولید کف ماندگار نشان‌دهنده وجود ساپونین‌ها بود (۲۶ و ۲۷).

قندهای احیایی: به ۰/۵ میلی لیتر از محلول عصاره یک میلی لیتر آب و ۸-۵ قطره محلول فهلینگ در گرما اضافه شد. رسوب قرمز آجری نشان‌دهنده وجود قند احیایی بود (۲۷ و ۲۸).

آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار شدند و میانگین نتایج آزمایش‌ها، استانداردها و نیز میزان انحراف معیار محاسبه گردید. قطر ناحیه عدم رشد از رابطه انحراف معیار میانگین به دست آمد. انحراف معیار (SD) از رابطه زیر محاسبه شد.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{N-1}}$$

در این رابطه x قطر ناحیه عدم رشد در یکبار، \bar{x} میانگین قطر ناحیه عدم رشد و N تعداد آزمایشات است (۲۹). داده‌های جمع‌آوری شده با نرم افزار SPSS-16 و آزمون ANOVA تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

گردید. سپس دیسک‌های (شرکت پادتن طب) اشباع شده از ماده ضد میکروبی و نیز بعضی از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی نظیر آمپی‌سیلین، نالیدیکسیک اسید به منظور مقایسه با عصاره ضد میکروبی مورد آزمایش بر سطح محیط کشت باکتری قرار داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در پایان دوره انکوباسیون هاله عدم رشد در اطراف هر دیسک با یک خط کش میلی‌متری به دقت اندازه‌گیری شد (۲۳). این کار برای هر رقت و هر باکتری به‌طور جداگانه، حداقل ۳ بار انجام پذیرفت. از دیسک‌های استریل فاقد هرگونه ماده ضد میکروبی و آغشته به دی‌متیل سولفو کسید نیز به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

با استفاده از روش رقت لوله‌ای (Tube dilution method) حداقل غلظت مهارکنندگی ماده ضد میکروبی (MIC) (Minimal Inhibitory Concentration) و حداقل غلظت کشندگی ماده ضد میکروبی (Minimal Bactericidal Concentration: MBC) تعیین گردید. در این روش، از محیط کشت آبگوشی مولر هینتون (شرکت Merck آلمان) استفاده شد. ابتدا از عصاره‌ها، رقت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ و ۶/۲۵ میلی گرم در هر میلی لیتر تهیه شد و سپس به هر یک ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند افزوده شد (۲۲). این لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. آخرین لوله‌ای که فاقد کدورت بود؛ به عنوان MIC در نظر گرفته شد. ولی برای سنجش MBC، کشت مجددی از لوله‌های MIC و یک رقت پایین‌تر و بالاتر از آن بر روی محیط مولر هینتون آگار صورت گرفت. بعد از ۲۴ ساعت انکوبه کردن پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، آخرین لوله‌ای که هیچ‌گونه رشدی از باکتری بر روی پلیت مربوطه نداشت؛ به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۲۴ و ۲۵).

آزمایش‌های فیتوشیمیایی مقدماتی: عصاره به وسیله روش خیساندن از ۵۰ گرم پیاز در ۲۰۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت تهیه و با کاغذ واتمن صاف گردید و به منظور وجود یا عدم وجود متابولیت‌های ثانویه، آزمایشات فیتوشیمیایی متعددی بر روی این گیاه انجام گرفت که شامل موارد زیر بود.

آلکالوئیدها: با افزودن چند قطره واکنشگر مایر به محلول حاوی آلکالوئید، رسوب سفید زردمانندی تشکیل شد (۲۶ و ۲۷). در واقع بسیاری از آلکالوئیدها در محلول‌های خنثی یا کمی اسیدی به وسیله واکنشگر مایر رسوب می‌کنند. ابتدا حلال عصاره پرانده شد و باقی‌مانده آن با اسید کلریدریک ۲ درصد در حمام آب جوش، گرما داده شد. بعد از سرد شدن، مخلوط فیلتر شد و به آن چند قطره واکنشگر مایر اضافه گردید. کدر شدن نمونه یا تشکیل رسوب زرد رنگ نشان‌دهنده وجود آلکالوئیدها بود.

جدول ۱: نتایج حاصل از بررسی آزمایشات فیتوشیمیایی مقدماتی بر روی پیاز گیاه سنبل کوهی

نوع متابولیت ثانویه	روش بررسی	مشاهدات	نتیجه
آلکالوئیدها	تست مایر	ایجاد رسوب سفید مایل به زرد	-
آنتراکینون‌ها	واکنش بورن تراگر	عدم ایجاد رنگ زرد	-
فلاونوئیدها	تست شینودا	ایجاد محلول قرمز رنگ	+
گلیکوزیدها	تست کیلر کیلیانی	ایجاد محلول قرمز - قهوه‌ای	+
قندها	تست فهلینگ	ایجاد محلول سبز رنگ با فهلینگ A ایجاد محلول قهوه‌ای رنگ با فهلینگ B	+
سایونین‌ها	تست فورث	ایجاد کف ماندگار	+
تانن‌ها	واکنش با فریک کلرید	ایجاد محلول آبی رنگ برای گالیک تانن‌ها ایجاد محلول سبز تیره برای کاتچولیک تانن‌ها	- +
تریپنئیدها	تست لیبرمن - بوشارد	ایجاد محلول قرمز - بنفش	-
استروئیدها		ایجاد محلول سبز - آبی	-

جدول ۲: حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی و حداقل غلظت کشندگی باکتری عصاره‌های کلروفرمی و اتیل استاتی گیاه سنبل کوهی در برابر

باکتری‌های اشریشیا کلی، استفیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس					
میکروارگانیزم		عصاره کلروفرمی (میلی گرم بر میلی لیتر)		عصاره اتیل استاتی (میلی گرم بر میلی لیتر)	
		MBC	MIC	MBC	MIC
اشریشیا کلی	۱۰۰	-	۶/۲۵	۱۲/۵	
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۵	۵۰	۶/۲۵	۶/۲۵	
باسیلوس سرئوس	۵۰	۱۰۰	۱۲/۵	۲۵	

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی آزمایش‌های فیتوشیمیایی مقدماتی با استفاده از عصاره متانولی بر روی پیاز گیاه سنبل کوهی به منظور تعیین وجود یا عدم وجود مهم‌ترین مواد تشکیل دهنده گیاهی (متابولیت ثانویه) در جدول یک آمده است. نتایج نشان دادند که این گیاه حاوی فلاونوئیدها، گلیکوزیدها، قندها، سایونین‌ها و تانن‌ها به خصوص کاتچولیک تانن‌ها است.

مقادیر مربوط به میانگین قطر هاله عدم رشد سه باکتری استفیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی و باسیلوس سرئوس در غلظت‌های مختلف عصاره‌های کلروفرمی و اتیل استاتی پیاز گیاه سنبل کوهی (۱۰۰-۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) در نمودارهای ۱ و ۲ و نیز مقادیر مربوط به مقادیر MIC و MBC سه باکتری در جدول ۲ آمده است. نتایج نشان دادند که اثر عصاره اتیل استاتی بر قطر عدم هاله رشد معنی‌دار بود ($P < 0/05$). به طوری که در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از این عصاره، بیشترین هاله عدم رشد برای سه باکتری استفیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی و باسیلوس سرئوس به ترتیب $26/3 \pm 0/1$ ، $23/7 \pm 0/3$ و $19/5 \pm 0/4$ میلی متر بود. MIC و MBC عصاره اتیل استاتی برای استفیلوکوکوس ۶/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد.

نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره کلروفرمی بر روی این باکتری‌ها نشان داد که در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین هاله عدم رشد بر روی

همچنین نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره هیدروالکلی بر روی سه باکتری نشان داد که این عصاره به جز بر روی باکتری باسیلوس سرئوس (در بالای غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر) هیچ اثری بر روی دو باکتری دیگر ندارد و میزان اثر این عصاره در حداکثر غلظت به کار رفته (غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) بر روی هاله عدم رشد باسیلوس سرئوس برابر با $9/7 \pm 0/3$ میلی متر است.

مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف عصاره کلروفرمی گیاه سنبل کوهی بر باکتری استفیلوکوکوس اورئوس نشان‌دهنده آن است که تفاوت معنی‌داری بین پنج غلظت عصاره (۱۰۰-۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) و در مورد باکتری اشریشیا کلی بین سه غلظت ۱۰۰، ۸۰ و ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر وجود دارد ($P < 0/05$). در مورد باکتری باسیلوس سرئوس بین دو غلظت ۱۰۰ و ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در

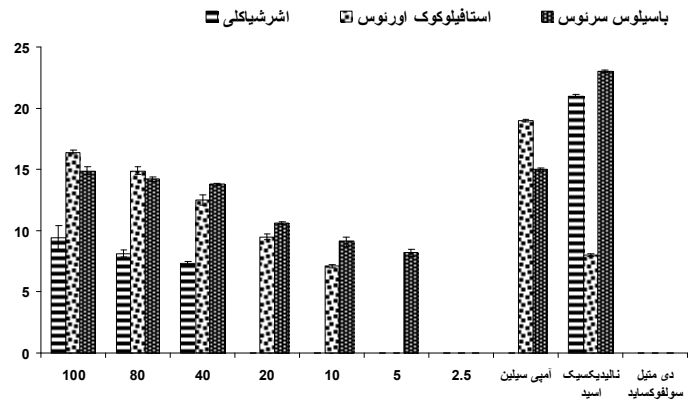
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان / بهار ۱۳۹۳ / دوره ۱۶ / شماره ۱ (پی در پی ۴۹)

نالیدیکسیک اسید موثرتر بود. در مورد غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید همچنین غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره در برابر باکتری باسیلوس سرئوس و آنتی بیوتیک آمپی سیلین نیز تفاوت معنی داری دیده نشد. عصاره کلروفومی گیاه سیلاپرسیکا بر روی باکتری گرم منفی (اشریشیاکلی) اثر خیلی کمتری نسبت به باکتری های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس) دارد و این در حالی است که عصاره اتیل‌استاتی بر روی همه باکتری‌ها اعم از گرم منفی و گرم مثبت اثر بیشتری داشت. براساس نتایج حاصله عصاره هیدروالکلی فاقد قدرت مهارکنندگی این باکتری‌ها بود.

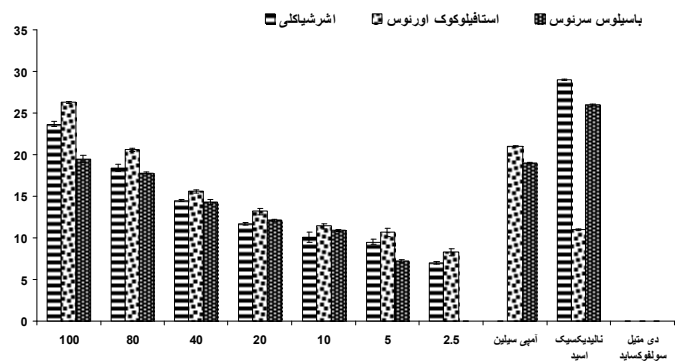
بحث

مقایسه بین شاهدهای مثبت (نالیدیکسیک اسید و آمپی سیلین) و سه نوع عصاره بر روی میکروارگانیسم‌های مطالعه شده نشان داد که عصاره اتیل‌استاتی با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و باسیلوس سرئوس به ترتیب دارای هاله عدم رشدی معادل ۲۶، ۲۳ و ۱۹ میلی متر است. در حالی که نالیدیکسیک اسید دارای هاله عدم رشدی برابر ۱۱، ۲۹ و ۲۶ بود. بنابراین، عصاره‌های اتیل‌استاتی و کلروفومی نسبت به نالیدیکسیک اسید بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تقریباً به میزان دو برابر یا بیشتر مؤثرتر بودند. همچنین نتایج نشان دادند که عصاره کلروفومی و اتیل‌استاتی با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر با داشتن هاله عدم رشدی بر باسیلوس به میزان تقریباً ۱۵ و ۱۹/۵ میلی متر دارای اثر مشابهی با آمپی سیلین (هاله عدم رشد ۱۵ و ۱۹ میلی متر) هستند. Sparg و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش نمودند که عصاره هگزان نرمال گیاه *Scilla natalensis* قدرت مهارکنندگی باکتری‌ها را ندارد ($12/5 \text{ mg/ml} >$)؛ در حالی که عصاره‌های دی کلرومتانی و آبی دارای قدرت مهارکنندگی ضعیف ($6/3 \text{ mg/ml} \approx$) و عصاره اتانولی این گیاه دارای قدرت مهارکنندگی بالا ($1/6 \text{ mg/ml}$) است (۳۰).

همچنین در مطالعه حاضر، نتایج مطالعات فیتوشیمیایی مقدماتی بر روی این گیاه، وجود مقادیر قابل ملاحظه‌ای از فلاونوئید، گلیکوزید، تانن و ساپونین را نشان داد که احتمالاً فلاونوئیدها مسؤول اثر ضدباکتریایی در این گیاه هستند. اثبات اثر ضد میکروبی فلاونوئیدها نتیجه تحقیقاتی است که Harsh و Nag بر روی این گروه از ترکیبات طبیعی انجام داده‌اند (۳۱). باتوجه به این که در این مطالعه، عمل عصاره گیری به صورت پی در پی و به روش خیساندن انجام شد؛ قاعدتاً بایستی کلروفرم ترکیباتی از قبیل تریونوئیدها، استروئیدها و ایزوفلاون‌ها را استخراج نماید. لذا می توان خاصیت ضدباکتریایی این عصاره را تا حدی به وجود ایزوفلاون‌ها



نمودار ۱: میانگین قطر هاله ایجاد شده علیه سه باکتری اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس توسط غلظت‌های مختلف عصاره کلروفومی گیاه سنبل کوهی در مقایسه با دو آنتی بیوتیک آمپی سیلین و نالیدیکسیک اسید به روش دیسک دیفیوژن



نمودار ۲: میانگین قطر هاله ایجاد شده علیه سه باکتری اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس توسط غلظت‌های مختلف عصاره اتیل‌استاتی گیاه سنبل کوهی در مقایسه با دو آنتی بیوتیک آمپی سیلین و نالیدیکسیک اسید به روش دیسک دیفیوژن

صورتی که بین این دو غلظت و سایر غلظت‌ها (۲۰-۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) تفاوت معنی داری مشاهده شد ($P < 0/05$). نتایج این بررسی در مورد غلظت‌های مختلف عصاره اتیل‌استاتی بر هر سه باکتری مورد مطالعه نیز نشان‌دهنده تفاوت معنی دار در مورد هاله غلظت مورد مطالعه بود ($P < 0/05$). در مورد عصاره اتیل‌استاتی، بیشترین اثر مهار روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد که از این میان غلظت ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره اتیل‌استاتی در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین تفاوت معنی داری نشان داد ($P < 0/05$) و نسبت به آن موثرتر بود. بین غلظت ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آمپی سیلین تفاوت معنی داری دیده نشد. غلظت‌های ۱۰۰-۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره نیز در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به

استافیلوکوکوس اورئوس و اثرات کمتر بر روی باسیلوس سرئوس به نظر می‌رسد، پس از بررسی‌های گسترده و آزمایشات لازم از نظر بالینی، استفاده از آنها به صورت یک فرآورده دارویی می‌تواند برای درمان عفونت‌ها و زخم‌های چرکی و برخی از بیماری‌های عفونی نظیر اسهال و همچنین جلوگیری از مسمومیت‌های دستگاه گوارشی حائز اهمیت و قابل توجه باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، اثر ضد میکروبی عصاره‌های کلروفومی و اتیل استاتی پیاز گیاه سنبل کوهی بر روی اشیشیاکلی، استافیلوکوکوس و باسیلوس بیشتر از نالیدیکسیک اسید و مشابه آمپی‌سیلین بود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از گروه زیست‌شناسی دانشگاه گلستان، خانم منیژه میان‌آبادی و گروه صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به خاطر همکاری در انجام مطالعه قدردانی و سپاسگزاری می‌گردد.

References

- Amin Gh. [Traditional pharmaceutical plants of Iran]. 1st. Tehran: Farhang Edition. 1991; pp:1-3, 105-20. [Persian]
- Volak J, Stodola J. [Pharmaceutical Plants. Culturing and taking methods and explanation of 256 plant color slides]. Translated by: Saed Z. 2nd. Tehran: Ghoghhus Publication. 1995; pp: 4-10. [Persian]
- Crouch NR, Bangani V, Mulholland DA. Homoisoflavanones from three South African: Scilla species. *Phytochemistry*. 1999 Aug; 51(7): 943-6.
- Bangani V, Crouch NR, Mulholland DA. Homoisoflavanones and stilbenoids from Scilla nervosa. *Phytochemistry*. 1999 Aug; 51(7): 947-51.
- Kato A, Kato N, Adachi I, Hollinshead J, Fleet GW, Kuriyama C, et al. Isolation of glycosidase-inhibiting hyacinthacines and related alkaloids from Scilla socialis. *J Nat Prod*. 2007 Jun;70(6):993-7.
- Nishida Y, Eto M, Miyashita H, Ikeda T, Yamaguchi K, Yoshimitsu H, et al. A new homostilbene and two new homoisoflavones from the bulbs of Scilla scilloides. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2008 Jul;56(7):1022-5.
- Silayo A, Ngadjui BT, Abegaz BM. Homoisoflavonoids and stilbenes from the bulbs of Scilla nervosa subsp. Rigidifolia. *Phytochemistry*. 1999; 52(5): 947-55.
- Dias C, Borralho Graça JA, Lurdes Gonçalves M. Scilla maderensis, TLC screening and positive inotropic effect of bulb extracts. *J Ethnopharmacol*. 2000 Aug;71(3):487-92.
- Tripathi YB, Singh AV, Dubey GP. Antioxidant property of the bulb of Scilla indica. *Current Science*. 2001 May; 80(10): 1267-9.
- Winnicka K, Bielawski K, Bielawska A. Cardiac glycosides in cancer research and cancer therapy. *Acta Pol Pharm*. 2006 Mar-Apr;63(2):109-15.
- Koorbanally C, Sewjee S, Mulholland DA, Crouch NR, Dold A. Homoisoflavanones from Pseudoprospero firmifolium of the

نسبت داد. همان‌طور که از تست‌های فیتوشیمیایی مقدماتی مشخص گردید؛ گیاه فاقد ترپنوئید و استروئید است. همچنین عصاره اتیل استاتی به دلیل مقادیر بالای از فلاونوئیدها و ترکیبات نسبتاً قطبی، دارای خاصیت قوی ضدباکتریایی است که در این صورت می‌توان گفت که فلاونوئیدها مسؤول اثر ضدباکتریایی در این گیاه هستند.

خاصیت دارویی گلیکوزیدها، مربوط به قسمت غیرقندی مولکول است و هیدرولیز این ماده (گلیکوزیدها) به وسیله آنزیم‌ها، اسیدهای رقیق، قلیاها (تحت تاثیر حرارت) منجر به آزاد شدن ترکیبات قندی می‌گردد (۳۲). از نتایج به دست آمده می‌توان چنین استنباط کرد که عصاره‌های اتیل استاتی و کلروفومی این گیاه فقط دارای خاصیت ضد میکروبی هستند و عصاره متانولی به دلیل وجود گلیکوزیدها، خاصیت ضد میکروبی ندارد. به نظر می‌رسد با انجام هیدرولیز بر روی این دسته از ترکیبات، خواص ضد میکروبی آگلیکون‌ها مشاهده می‌گردد.

با توجه به اثرات قابل ملاحظه عصاره‌های کلروفومی و اتیل استاتی سنبل کوهی بر روی باکتری‌های اشیشیاکلی،

- monotypic tribe Pseudoprosperae (Hyacinthaceae: Hyacinthoideae). *Phytochemistry*. 2007 Nov-Dec;68(22-24):2753-6.
- Davies J, Webb V. Antibiotic resistance in bacteria. In: Krause RM, ed. *Emerging Infections*. Chap 8. San Diego: Academic Press. 1998; pp:229-72.
 - Rohde H, Kalitzky M, Kröger N, Scherpe S, Horstkotte MA, Knobloch JK, et al. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal Staphylococcus epidermidis strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol*. 2004 Dec;42(12):5614-9.
 - Monniri R, Mosayebi Z, Movahedian AH, Mossavi GhA. Increasing Trend of Antimicrobial Drug Resistance in Pseudomonas aeruginosa Causing Septicemia. *Iran J Public Health*. 2006; 35(1): 58-62.
 - Pollack M. Pseudomonas aerogina. In: Mandell CL, Bennett JE, Dolin R. *Principals and practice of infectious Diseases*. 5th. New York: Churchill livingstone. 2000; pp: 231-70.
 - Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 11th. St. Louis: Mosby. 2002; p: 351.
 - Murray PR, Rosental KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 4th. St. Louis: Mosby. 2002; pp: 202-16.
 - Feyzi MT. [Introduction of the Stureja bakhtiarica and its ecological characteristic in Esfahan province]. *Proceeding of National Iranian Congress of Medical Plants*, Tehran, Iran. 2002; p:179.
 - Orrett FA, Land M. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus prevalence: current susceptibility patterns in Trinidad. *BMC Infect Dis*. 2006 May 5;6:83.
 - Kotze M, Eloff JN. Extraction of antibacterial compounds from Combretum microphyllum (Combretaceae). *S Afr J Bot*. 2002; 68(1): 62-7.
 - Sarker SD, Latif Z, Gray AI. *Natural Products Isolation*. 2nd.

New Jersey: Humana Press Inc. 2006; pp: 7,32,328.

22. Baron EJ, Finegold SM. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 8th. St Louis: Mosby. 1990; pp: 508-28.

23. Block JH, Beale JM. Wilson and Gisvold's Textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. 11st. Baltimor: Lippincott Williams & Wilkins. 2004; pp: 663-57.

24. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemother. 2001 Jul; 48 (Suppl 1): 5-16.

25. Rahman M, Kühn I, Rahman M, Olsson-Liljequist B, Möllby R. Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria. Appl Environ Microbiol. 2004 Apr;70(4):2398-403.

26. Harborne JB. Phytochemical Methods. 3rd. London: Chapman and Hall Ltd. 1973; pp:135-203.

27. Iyengar MA. Study of Crude Drugs. 8th. Manipal, India: Power Press. 1995; p:2.

28. Siddiqui AA, Ali M. Practical Pharmaceutical Chemistry. 1st. New Delhi: CBS Publisher and Distributors. 1997; pp: 126-131.

29. Maxwell EA. Introduction to statistical thinking. New Jersey: Prentice-Hall. 1993; pp: 397.

30. Sparg SG, van Staden J, Jäger AK. Pharmacological and phytochemical screening of two Hyacinthaceae species: Scilla natalensis and Ledebouria ovatifolia. J Ethnopharmacol. 2002 Apr;80(1):95-101.

31. Harsh ML, Nag TN. Antimicrobial principles from in vitro tissue culture of Peganum harmala. J Nat Prod. 1984 Mar-Apr;47(2):365-7.

32. Martin AR. Antibiotics. In: Doerge RF. Wilson and Gisvold's text book of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. 8th. Toronto: JB Lippincott Co. 1982; p: 225.

Original Paper

In-Vitro anti-bacterial activity of chloroform, ethyl acetate and hydroalcoholic extracts of *Scilla persica* Hausskn.

Hafez Ghoran S (M.Sc)¹, Mighani H (Ph.D)², Ebrahimi P (Ph.D)*²

¹MSc in Phytochemistry, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Golestan University, Gorgan, Iran.

²Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Golestan University, Gorgan, Iran.

Abstract

Background and Objective: The generated genetic diversity in the microbial pathogens and drug resistant led to a growing interest to use herbal medicine. This study was carried out to determine the in vitro anti-bacterial activity of chloroform, ethyl acetate and hydroalcoholic extracts of *Scilla persica* Hausskn.

Methods: In this laboratory study, chloroform, ethyl acetate and hydroalcoholic extracts were obtained from bulb of *Scilla persica*. The anti-microbial activity, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of the extracts were evaluated on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* using the disk diffusion (growth inhibition zone) and macro-dilution methods. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as a negative control while nalidixic acid and ampicillin were used as positive control.

Results: The maximum inhibition zone for ethyl acetate extract was 26.3±0.1 milimetre, 23.7±0.3 milimetre and 19.5±0.4 milimetre for *Staphylococcus*, *Escherichia coli* and *Bacillus*, respectively. The maximum inhibition zone of chloroform extract was found to be 16.4±0.2 milimetre and 14.9±0.3 milimetre for *Staphylococcus* and *Bacillus*, respectively.

Conclusion: Antimicrobial activity of the chloroform and ethyl acetate extracts of bulb of *Scilla persica* on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* are more effective compared to nalidixic acid and it is similar to ampicillin in in-vitro condition.

Keywords: *Scilla persica* Hausskn, MIC, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*

* Corresponding Author: Ebrahimi P (Ph.D), E-mail: epouneh@yahoo.com , p.ebrahimi@gu.ac.ir

Received 12 June 2012

Revised 7 May 2013

Accepted 7 August 2013