

اثر ضد میکروبی عصاره‌های هیدروالکلی و آبی بذر و ساقه گیاه سداب (*Ruta graveolens* L.) بر استافیلوکوکوس اورئوس

حوریه صادری^۱، پرویز اولیاء^۱ و مهسا رادمنش^۲

۱- دانشیار گروه میکروبی‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد

۲- دانش آموخته دکترای پزشکی عمومی دانشگاه شاهد

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از باکتریهای شایع در عفونتهای انسانی است. افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری سبب شده است که مصرف آنتی‌بیوتیکها روز به روز افزایش یابد و داروهای جدیدی به بازار عرضه شود. از طرفی استفاده از گیاهان دارویی با اثر ضد میکروبی جایگاه خاص خود را در طب سنتی پیدا کرده است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های هیدروالکلی و آبی بذر و ساقه سداب (*Ruta graveolens*) بر سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) بوده است. برای این منظور ابتدا از روش انتشار در آگار استفاده شد و بعد مقدار حداقل غلظت ممانعت کننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) عصاره‌های مؤثر با روش رقت در مایع تعیین گردید. در نهایت تغییرات تعداد باکتری در زمانهای مختلف در حضور عصاره با غلظت معادل MBC مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این آزمایشها نشان داد که برخلاف عصاره های آبی، عصاره‌های هیدروالکلی تهیه شده از بذر و ساقه سداب بر استافیلوکوکوس اورئوس اثر ندارند. مقدار MIC و MBC عصاره آبی ساقه سداب به ترتیب ۱۰ و ۲۰ درصد و برای عصاره آبی بذر ۱۰ و بیشتر از ۳۰ درصد بدست آمد. کاهش تعداد باکتریها در مواجهه با عصاره آبی ساقه سداب به صورت تدریجی بود. با توجه به بومی و فراوان بودن گیاه سداب در ایران و اثر ضد میکروبی آن، احتمالاً می‌توان با مطالعات بیشتر از این گیاه برای تولید فرآورده‌های دارویی جهت درمان عفونتهای ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، سداب، اثر ضد میکروبی.

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از باکتریهای بیماریزای مهم است که قادر به ایجاد طیف وسیعی از عفونتها می باشد. این عفونتها در مواردی ممکن است حیات بیمار را به خطر اندازند. این باکتری نقش مهمی در ایجاد عفونتهای بیمارستانی دارد و همچنین شایع‌ترین علت اپیدمی‌های مسمومیت غذایی در امریکا می باشد. مهمترین

مشکل در درمان عفونتهای این باکتری افزایش مقاومت به‌اغلب آنتی‌بیوتیکها می باشد (Deresiewicz & Parsonnet, 2001).

امروزه رویکرد جدیدی نسبت به استفاده از گیاهان دارویی در درمان عفونتها ایجاد شده است. عوارض جانبی کم و ارزان بودن سبب شده که کاربرد داروهای گیاهی در کشورهای جهان رو به افزایش باشد

تهیه عصاره‌ها

گیاه سداب از بخش تحقیقات گیاهان دارویی مؤسسه جنگلها و مراتع تهیه شد. برای تهیه عصاره های آبی و هیدروالکلی مقدار ۲۰ گرم از بذر و ساقه به طور جداگانه به ترتیب به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر یا ۱۰۰ میلی لیتر محلول ۵۰:۵۰ آب مقطر و اتانول ۹۶٪ اضافه شد. سوسپانسیونهای بدست آمده به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق بر روی دستگاه چرخاننده به آرامی مخلوط گردید و سپس با سانتریفوژ و عبور از صافی (کاغذ واتمن شماره ۱) صاف و در نهایت با استفاده از صافی ۰/۲۲ میکرون استریل گردید (صمصام شریعت، ۱۳۷۱).

تعیین اثر ضد میکروبی عصاره‌ها با روش انتشار در آگار

برای این منظور هر دو روش چاهک و دیسک توصیه شده توسط NCCLS (۲۰۰۳) برای مواد ضد میکروبی استفاده گردید. در روش چاهک ابتدا با انتهای پست پاستور چاهکهایی به قطر ۶ میلی لیتر روی محیط کشت مولر هیتون آگار در پلیت ایجاد شد و بعد از تلقیح باکتری توسط سواب استریل در سطح پلیت بلافاصله ۴۰ میکرولیتر از هر یک از عصاره‌ها به طور جداگانه در چاهکهای مختلف ریخته شدند. در روش دیسک بعد از تلقیح باکتری به وسیله سواب استریل در سطح پلیت، روی دیسکهای کاغذی خالی (Blank) استریل ۳۰ میکرولیتر از عصاره اضافه نموده و با پنس بر روی سطح پلیت قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری مقدار هاله عدم رشد باکتری در اطراف چاهکها و دیسکها بر حسب میلیمتر اندازه گیری گردید.

تعیین مقدار MIC و MBC عصاره‌ها

با روش اصلاح شده رقت در مایع توصیه شده توسط NCCLS (۲۰۰۳)، مقدار MIC و MBC عصاره‌های دارای

(Cowan, 1999). یکی از این گیاهان، سداب (*Ruta graveolens*) می باشد که بومی نواحی شمالی بخصوص استان گیلان و اطراف رشت است (زرگری، ۱۳۸۱). گیاه سداب از دیر باز در طب سنتی ایران استفاده می شده است (طباطبائی، ۱۳۷۲) و خواص درمانی متعددی از جمله ضد تشنج، التیام دهنده زخم، ضد سرفه و کاهش فشار خون (طباطبائی، ۱۳۷۲)، ضد قارچ (Oliva et al., 2003) و ضد انگل و کرم (Guarrera et al., 1999) برای آن گزارش شده است. اثرات ضد باکتریایی این گیاه نیز مورد مطالعه قرار گرفته است، از جمله در یک مطالعه تاثیر عصاره های هیدروالکلی برگ سداب بر سودوموناس آئروجینوزا نشان داده شده است (اولیاء و همکاران، ۱۳۸۲). در دو مطالعه دیگر نیز تاثیر عصاره های برگ سداب بر باکتریهای مختلف از جمله استافیلوکوکوس اورئوس نشان داده شده است (Alzoreky et al., 2003; Ojala et al., 2000). هدف از انجام این مطالعه تعیین اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و هیدروالکلی ساقه و بذر سداب بر استافیلوکوکوس اورئوس با روشهای انتشار در آگار، تعیین مقدار حداقل غلظت ممانعت کننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) و همچنین تعیین تغییرات تعداد باکتری در زمانهای مختلف در حضور عصاره بوده است.

مواد و روشها

باکتری مورد مطالعه

از کشت ۲۴ ساعته سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) سوسپانسیونی با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند در سرم فیزیولوژی ۰/۸۵ درصد استریل تهیه گردید.

اثر ضد میکروبی عصاره‌های هیدروالکلی و آبی بذر و ساقه گیاه سداب (*Ruta graveolens L.*) بر استافیلوکوکوس اورئوس
استافیلوکوکوس اورئوس نداشتند و فاقد هاله عدم رشد بودند، ولی عصاره‌های آبی بذر و ساقه سداب به ترتیب هاله‌های عدم رشد باکتری به قطر ۱۱ و ۱۴ میلی‌متر ایجاد نمودند.
مقدار MIC و MBC عصاره آبی ساقه سداب به ترتیب ۱۰ و ۲۰ درصد (جدول ۱) و برای عصاره آبی بذر به ترتیب ۱۰ درصد و بیشتر از ۳۰ درصد (جدول ۲) بدست آمد. در حضور غلظت ۲۰ درصد عصاره آبی ساقه سداب، تعداد باکتریها بر حسب CFU/ml بعد از ۸ ساعت از 3×10^6 به 0.4×10^6 کاهش یافت و در ۲۴ ساعت به 0.16×10^6 رسید که نشان‌دهنده تدریجی بودن کاهش تعداد باکتریها در حضور عصاره آبی سداب می باشد (شکل ۱).

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس از پاتوژنهای واقعی است که طیف وسیعی از عفونتها را ایجاد می کند. مشکل عمده در درمان عفونتهای این باکتری، افزایش مقاومت آن در برابر عوامل ضد میکروبی از جمله آنتی‌بیوتیکها است (Parsonnet, Deresiewicz & 2001).

با توجه به ایجاد سویه‌های مقاوم به داروهای مختلف شیمیایی و با توجه به اثرات مفید گیاهان دارویی در درمان بیماریها و اجتناب از عوارض جانبی داروهای شیمیایی، تجویز و کاربرد داروهای گیاهی در کشورهای جهان رو به افزایش است (Cowan, 1999). سرزمین ایران از بزرگترین گنجینه‌های گیاهان دارویی در دنیاست و گیاه سداب (*Ruta graveolens*) نیز از قرن‌ها پیش در ایران شناخته شده است (امین، ۱۳۷۰). در مطالعه حاضر اثر عصاره‌های آبی بذر خشک و ساقه سداب در ممانعت از رشد باکتری و حتی کشتن آن نشان داده شد. عصاره آبی ساقه سداب تاثیر بیشتری روی باکتری مورد مطالعه داشت (مقدار MIC و MBC به

هاله عدم رشد باکتری تعیین گردید. ابتدا غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درصد از هر یک از عصاره‌ها به طور جداگانه در لوله های حاوی محیط مولر هیتون برات تهیه شد. به‌عنوان شاهد از یک لوله بدون عصاره نیز استفاده شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به هر یک از لوله‌ها اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه قرار گرفتند. تعداد سلول باکتری در یک میلی‌لیتر بر حسب CFU/ml در سوسپانسیون اولیه باکتری و همچنین در تمامی لوله‌ها بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری تعیین گردید. برای این منظور رقت‌های متوالی ده تایی از هر یک از لوله‌ها در سرم فیزیولوژی ۰/۸۵ درصد استریل تهیه و ۵۰ میکرولیتر از هر رقت در پلیت‌های جداگانه کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت تعداد کلنی‌های باکتری شمارش گردید. کمترین غلظتی از هر عصاره که در آن تعداد باکتریها ثابت می‌ماند به عنوان مقدار MIC و کمترین غلظتی از عصاره که سبب کاهش تعداد باکتریها به مقدار کمتر از یک هزارم تعداد اولیه باکتریها می‌گردید به عنوان مقدار MBC عصاره در نظر گرفته شد.

تعیین تغییرات تعداد باکتریها در زمانهای مختلف در حضور عصاره

تغییرات تعداد باکتریها در حضور عصاره آبی ساقه سداب در زمانهای ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت با شمارش تعداد باکتریها با روش رقت‌های متوالی و کشت تعیین گردید. برای اطمینان از صحت نتایج، تمامی آزمایشهای فوق ۳ بار تکرار شدند.

نتایج

در آزمایش انتشار در آگار، هیچ کدام از عصاره‌های هیدروالکلی سداب اثری روی سویه استاندارد

سوتیلیس به روش انتشار در آگار با روش دیسک و رقت در آگار مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه جهت عصاره‌گیری از برگ سداب از متانول بافری شده (۸۰٪ متانول و ۲۰٪ PBS) استفاده شد و مقدار MIC عصاره سداب برای استافیلوکوکوس اورئوس $2/6 \text{ mg/ml}$ بدست آمد که نسبتاً بالا می باشد بنابراین اثر سداب بر این باکتری نسبتاً پایین گزارش شده است. همچنین در این مطالعه مقدار MIC نیز تعیین نشده است. در مطالعه Ojala و همکارانش اثر ضد میکروبی عصاره متانولی برگ گیاه سداب بر باکتریها و قارچهای مختلف با روش رقت در آگار مورد آزمایش قرار گرفت. در این مطالعه عصاره سداب در غلظت $0/126 \text{ mg/ml}$ بر استافیلوکوکوس اورئوس و نیز استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، سودوموناس آئروجینوزا، باسیلوس سوتیلیس و برخی قارچها مؤثر بود. در مطالعه اولیاء و همکارانش اثر عصاره اتانولی تهیه شده از برگ سداب بر سودوموناس آئروجینوزا نشان داده شد که در آن مقدار MIC و MBC هر دو غلظت ۱۰ در صد عصاره بود. این مطالعات هر چند اندک می باشند، ولی نشان می دهند که می توان با مطالعات بیشتر از گیاه سداب فرآورده های ضد میکروبی موثر بر باکتریهای بیماریزای مهم از جمله استافیلوکوکوس اورئوس تهیه نمود. بررسی اثر اسانس و انواع عصاره های این گیاه بر استافیلوکوکوس اورئوس، بررسی اثرات سایتوتوکسیسیتیه آن و در نهایت بررسی اثرات درمانی آن در مدل های حیوانی توصیه می شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری آقای صادق منصوری، کارشناس محترم آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد تشکر می شود.

ترتیب ۱۰ و ۲۰ درصد) در حالی که عصاره آبی بذر خشک سداب دارای کمترین تاثیر بود (مقدار MIC و MBC به ترتیب ۱۰ و بیشتر از ۳۰ درصد). نکته ذکر شده از چند جهت مهم است، اول اینکه وقتی مقدار MIC و MBC بالاست تولید فرآورده دارویی مقرون به صرفه نیست. دوم اینکه با بالا رفتن غلظت عصاره در فرآورده، طعم و بوی فرآورده دارویی کمتر قابل تحمل می گردد و سوم این که اگر فرآورده گیاهی دارای عوارض جانبی باشد قابلیت استفاده از آن را در دوزهای بالا کاهش می دهد. بنابراین پیشنهاد می گردد تا مطالعات بعدی برای تهیه ماده ضد میکروبی موثر بر استافیلوکوکوس اورئوس از سداب بر روی عصاره آبی ساقه سداب انجام گیرد.

در این مطالعه هیچ کدام از عصاره های هیدروالکلی تهیه شده از سداب تاثیری روی استافیلوکوکوس اورئوس نداشتند که شاید دلیل آن عدم استخراج مواد موثر گیاه با این روش عصاره گیری بوده است. در این مطالعه از اتانول استفاده گردید در حالی که گزارشهایی وجود دارد که نشان می دهد متانول نسبت به اتانول بهتر می تواند مواد ضد میکروبی را از گیاه عصاره گیری نماید (Ojala et al., 2000; Eloff et al., 1998). در دو مطالعه دیگر موثر بودن عصاره های متانولی تهیه شده از برگ سداب بر استافیلوکوکوس اورئوس نشان داده شده است که علت آن می تواند حضور مواد ضد میکروبی بیشتر در برگ سداب نسبت به ساقه و یا بکار گیری متانول برای عصاره گیری باشد. (Alzoreky et al., 2003; Ojala et al., 2000).

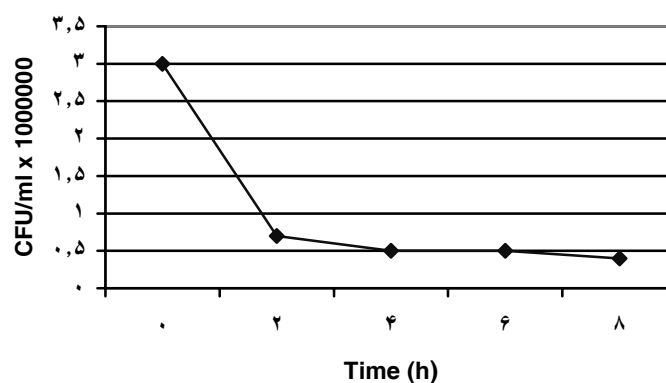
مطالعات اندکی در مورد اثرات ضد میکروبی گیاه سداب وجود دارد. در مطالعه Alzoreky و همکارانش اثر ضد میکروبی عصاره های ۲۶ گونه گیاهی از جمله سداب روی استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسایتوزنز و باسیلوس

جدول ۱- تعداد باکتریها بعد از قرارگیری به مدت ۲۴ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف عصاره آبی ساقه سداب. تعداد اولیه باکتریها در بار اول $1/4 \times 10^6$ ، بار دوم $0/5 \times 10^6$ و بار سوم 3×10^6 بود.

تعداد باکتریها (CFU/ml) بعد از ۲۴ ساعت			غلظت عصاره (%)
بار سوم	بار دوم	بار اول	
$>10^8$	$>10^8$	$>10^8$	صفر (لوله شاهد)
$>10^8$	$>10^8$	$>10^8$	۵
$1/8 \times 10^6$	$0/7 \times 10^6$	$1/4 \times 10^6$	۱۰
$1/6 \times 10^5$	$0/7 \times 10^5$	$1/6 \times 10^4$	۱۵
4×10^3	.	2×10^3	۲۰
.	.	.	۲۵
.	.	.	۳۰

جدول ۲- تعداد باکتریها بعد از قرارگیری به مدت ۲۴ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف عصاره آبی بذر سداب. تعداد اولیه باکتریها در بار اول $1/4 \times 10^6$ ، بار دوم $0/5 \times 10^6$ و بار سوم $1/1 \times 10^6$ بود.

تعداد باکتریها (CFU/ml) بعد از ۲۴ ساعت			غلظت عصاره (%)
بار سوم	بار دوم	بار اول	
$>10^8$	$>10^8$	$>10^8$	صفر (لوله شاهد)
$>10^8$	$>10^8$	$>10^8$	۵
$0/7 \times 10^6$	$0/16 \times 10^6$	$0/16 \times 10^6$	۱۰
$0/4 \times 10^5$	$0/7 \times 10^6$	$0/9 \times 10^5$	۱۵
2×10^4	$0/3 \times 10^3$	$0/9 \times 10^5$	۲۰
1×10^4	$0/2 \times 10^6$	$0/64 \times 10^5$	۲۵
$1/2 \times 10^4$	$0/2 \times 10^6$	$0/16 \times 10^5$	۳۰



شکل ۱- تغییرات تعداد باکتریها در زمانهای مختلف در حضور غلظت ۲۰ درصد عصاره آبی ساقه سداب

- Alzoreky, N.S. and Nakahara, K., 2003. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, 80: 223-230.
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 564-582.
- Guarrera, P.M., 1999. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in central Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 68(1-3): 183-192.
- NCCLS., 2003. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 8th ed. Approved standard M2-A8. Wayne, Pennsylvania.
- NCCLS., 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6th ed. Approved standard M7-A6. Wayne, Pennsylvania.
- Ojala, T., Remes, S., Haansuu, P., Vuorela, H., Hiltunen, R., Haahtela, K. and Vuorela P., 2000. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of Ethnopharmacology*, 73: 299-305.
- Oliva, A., Meepagala, K.M., Wedge, D.E., Harries, D., Hale, A.L., Aliotta, G. and Duke, S.O., 2003. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 51(4): 890-896.
- Parsonnet, J. and Deresiewicz, R.L., 2001. Staphylococcal infections. 889-901. In: Branwald, E. & Fauci, A.S. (eds). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Vol 1, 15th ed. McGraw – Hill Book Co. New York, 1442 p.

مورد استفاده

- امین، غ.، ۱۳۷۰. گیاهان دارویی سنتی ایران، جلد اول. چاپ اول. معاونت پژوهشی وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ۲۳۰ صفحه.
- اولیاء، پ.، صادری، ح.، طباطبائی نژاد، ا.، ناصری، م. و رضائی، م.ب.، ۱۳۸۳. مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره *Ruta graveolens* و جتتامایسین بر پ سودوموناس آئروجینوزا. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۰(۲): ۱۸۰-۱۷۱.
- زرگری، ع.، ۱۳۸۱. گیاهان دارویی، جلد اول. چاپ ششم. مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، تهران، ۹۴۷ صفحه.
- صمصام شریعت، ه.، ۱۳۷۱. عصاره گیری و استخراج مواد موثره گیاهان دارویی و روش های شناسائی و ارزشیابی آنها، چاپ اول، انتشارات مانی، تهران، ۱۱۰ صفحه.
- طباطبایی، م.، ۱۳۷۲. در ترجمه الحاوی، رازی محمدبن زکریا. جلد ۲۲. چاپ اول. انتشارات شرکت داروسازی الحاوی، تهران، ۶۹۶ صفحه.

Antimicrobial Effect of Hydro-Alcoholic and Aqueous Extracts of *Ruta graveolens* L. Against *Staphylococcus aureus*

H. Sadari¹, P. Owlia¹ and M. Radmanesh²

1- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.

2- Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the common bacteria in human infection. Increasing antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* lead to vast usage of antibiotics and releasing new drugs to market. In this respect, medical herbs with antimicrobial effect have had important role in traditional medicine. The purpose of this study was evaluating antimicrobial effect of hydroalcoholic and aqueous extracts of seed and stem of *Ruta graveolens* plant on *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Agar diffusion method was used and relative MIC and MBC of effective extracts were determined with macro dilution method. The change of number of bacteria in the presence of extract with concentration equal to MBC was also determined for different period of times. The results showed that unlike aqueous extract, the hydroalcoholic extracts of *Ruta graveolens* have no effect on *Staphylococcus aureus*. MIC and MBC of aqueous extract of stem were 10% and 20%, whereas, aqueous extract of seed were measured 10% and >30%, respectively. In the presence of aqueous extract of stem of *Ruta graveolens*, bacterial population was reduced gradually. Since *Ruta graveolens* is a native and abundant plant species in Iran; it is likely to produce drugs against *Staphylococcus aureus* infection which require further research.

Key words: *Staphylococcus aureus*, *Ruta graveolens*, antimicrobial effect.