

## تحقیقی

### اثر ضد باکتریایی عصاره‌های شاهتره، بن سرخ، شنگ، شمشاد اناری و دو گونه آویشن بومی لرستان

دکتر غلامرضا طالعی\*<sup>۱</sup>، محمد هادی مشکوه‌السادات<sup>۲</sup>، سیده زهرا موسوی<sup>۳</sup>

۱- استادیار گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی، پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی لرستان. ۲- استادیار گروه شیمی دانشکده علوم پایه دانشگاه لرستان.

۳- کارشناس آزمایشگاه مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی لرستان.

## چکیده

**زمینه و هدف:** امروزه منابع گیاهی به عنوان جانشین مواد شیمیایی در داروها و مواد غذایی مورد توجه روزافزون قرار گرفته و یافتن اثر ضد میکروبی گیاهانی که قرن‌ها به طور سنتی مصرف خوراکی و دارویی شده‌اند، از اولویت بیشتری برخوردار است. این مطالعه به منظور تعیین اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های چهار گونه گیاه خوراکی بن سرخ، شنگ، شاهتره، دو گونه آویشن و شمشاد اناری روی شش باکتری شاخص گرم مثبت و منفی انجام شد.

**روش بررسی:** این مطالعه *in vitro* در پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی لرستان طی سال ۱۳۸۴ انجام گرفت. پودر گیاهان در سایه خشک و در هگزان حل شد. پس از طی چند مرحله صاف و تبخیر نمودن ماده غلیظی به دست آمد که در بافر فسفات حل و استفاده شد. آزمایش باکتری شناسی به روش برات میکرو دایلوژن و دیسک دیفیوژن انجام گرفت و حداقل غلظت مهار کنندگی *MIC* و کشندگی *MBC* باکتریایی عصاره‌ها مشخص و با کنترل آنتی‌بیوتیک مقایسه گردید.

**یافته‌ها:** عصاره شاهتره در غلظت  $470 \mu\text{g/ml}$  از رشد اشرفیاکلی جلوگیری نمود. به روش دیسک دیفیوژن‌ها ۱۱ میلی‌متر هاله عدم رشد در اطراف دیسک شاهتره مشاهده شد. عصاره شمشاد اناری بر ضد استاف ارئوس  $MIC = 320 \mu\text{g/ml}$  اثر باکتریواستاتیکی و در غلظت  $MBC = 80 \mu\text{g/ml}$  اثر باکتریوسیدی نشان داد. عصاره آویشن الیگودرز در غلظت  $MIC = 235 \mu\text{g/ml}$  بر استاف ارئوس موثر بود. هاله عدم رشد اشرفیاکلی در اطراف دیسک این آویشن به قطر ۱۶ میلی‌متر مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که عصاره شاهتره، شمشاد اناری و آویشن دارای اثرات ضد میکروبی بوده و کاربرد آنها در صنایع دارویی، بهداشتی و غذایی توصیه می‌گردد.

**کلید واژه‌ها:** عصاره گیاهی، داروهای گیاهی، آنتی‌باکتریال، آویشن، شاهتره

\* نویسنده مسؤول: دکتر غلامرضا طالعی، پست الکترونیکی: taleireza@yahoo.com

نشانی: خرم آباد، انتهای خیابان رازی، مدیریت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

تلفن: ۰۶۶۱-۶۲۰۰۱۳۳، نمابر: ۳۲۰۴۰۰۵

وصول مقاله: ۸۶/۲/۸، اصلاح نهایی: ۸۷/۲/۱۰، پذیرش مقاله: ۸۷/۲/۱۱

## مقدمه

تجربه چنددهه اخیر نشان داده که داروهایی شیمیایی با تمام کارایی، اثرات نامطلوب فراوانی به همراه دارند و کمتر ماده خالصی وجود دارد که دارای اثرات سوء نباشد. در مقابل مواد موثر موجود در گیاهان دارویی به دلیل همراه بودن با مواد دیگر پیوسته از یک حالت تعادل بیولوژیک برخوردارند. بنابراین در بدن انباشته نشده و اثرات جانبی به بار نمی‌آورند و از این رو امتیاز و برتری قابل توجهی نسبت به داروهای شیمیایی دارند (۱). از سوی دیگر با ازدیاد سوش‌های میکروبی مقاوم در درمان مواجه هستیم که نیاز به آنتی‌بیوتیک‌های جدید را الزامی می‌نماید. عوارض جانبی و ایجاد مقاومت دارویی نسبت به داروهای شیمیایی و نیز کشف مواد جدیدی مانند ویتامین‌ها، هورمون‌ها، مواد ضد میکروبی، ضد ویروسی و ضد توموری در میان گیاهانی که به تازگی کشف شده‌اند، موجب شده که استقبال دوباره‌ای برای مصرف داروها و فرآورده‌های گیاهی طبیعی به وجود آید و طب سنتی و گیاهان دارویی منبع مناسبی برای یافتن داروهای مختلف با عوارض جانبی کمتر باشد (۲).

از قرن‌ها پیش اثر ضد میکروبی بعضی از گونه‌های مختلف گیاهان فوق شناخته شده است. از عصاره آویشن هم‌اکنون در شربت سینه و دهان شویه و در درمان شب ادراری کودکان و عفونت پوستی تیناوریسیکالر استفاده می‌شود (۳). آویشن از خانواده نعناع است. ۱۴ گونه آن در ایران می‌روید. ۲ گونه آزمایش شده به طور وحشی در جنگل‌های زاگرس می‌روید. در طب قدیم از این گیاه به عنوان اشتها آور - ضد کرم و ضد درد دندان استفاده می‌شده است (۵و۴). شاهتره از تیره شاهتره و از دیرباز عصاره و عرق آن بر ضد تب و سرماخوردگی مورد استفاده بوده است. به علاوه به عنوان مدر و رقیق کننده خون شناخته شده و برای کاهش فشارخون و عفونت‌های پوستی مانند تبخال و زرد زخم تجویز می‌شده است (۵و۴). در طب قدیم از شمشاد اناری در درمان تب و مالاریا استفاده شده است. همچنین ضد درد، تقویت کننده مو و ضد رماتیسم بوده و برای درمان بیماری‌های پوستی استفاده می‌شده است (۱). شنگ گیاهی علفی از تیره کاسنی است. مصرف خوراکی فراوان به صورت پخته دارد. به علاوه در

طب سنتی برای کاهش چربی خون و دفع سنگ کلیه استفاده می‌شده است (۵و۴). بن سرخ گیاهی علفی از تیره سوسنیان است. این گیاه همراه برنج یا به صورت آش پخته و مصرف خوراکی می‌شود. همچنین مسکن و ضد درد بوده و در درمان سرماخوردگی مصرف می‌شده است (۵و۴). با توجه به قرن‌ها استفاده عمومی از این گیاهان و اطمینان از سلامتی مصرف آنها یافتن اثرات ضدباکتریایی در آنها با روش‌های علمی هدف این پژوهش بود، تا تاثیر کاربردهای سنتی آنها بررسی و آشکار گردد. پیش از این نشان داده شده که اسانس ۲ گونه آویشن مورد آزمایش اثرات ضدباکتریایی داشته است (۸-۶). جستجوی این اثرات در عصاره تام آنها ضروری به نظر می‌رسید.

در این پژوهش اثرات ضدباکتریایی عصاره شنگ *Tragopon carcifolus*، عصاره آویشن خرم آباد *Thymus persicus* و الیگودرز *Thymus eriocalyx*، عصاره بن سرخ *Allium haementhoides*، عصاره شاهتره *Fumaria parviflora* Lam.، عصاره شمشاد اناری *Buxus hyreana* روی تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی انجام گرفت.

## روش بررسی

این مطالعه *in vitro* در پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی لرستان طی سال ۱۳۸۴ انجام گرفت.

## گیاهان مورد آزمایش

گیاه آویشن الیگودرز از جنگل‌های اطراف شهر الیگودرز جمع‌آوری گردید و در هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه تهران به شماره ۷۲۶/الف ثبت گردید. گیاهان آویشن خرم‌آباد شنگ و بن سرخ از اطراف خرم‌آباد جمع‌آوری گردیدند. شاهتره از اطراف شیراز و شمشاد اناری از جنگل‌های محمودآباد مازندران توسط سازمان منابع طبیعی تهیه و در همان جا به شماره B / 75 ثبت گردید. گیاهان پس از جمع‌آوری در بخش زیست‌شناسی دانشگاه لرستان مورد شناسایی و تایید علمی قرار گرفتند.

## تهیه عصاره‌های گیاهی

برای تهیه عصاره‌ها ابتدا برگ تازه گیاهان را در سایه خشک کرده، سپس پودر کردیم. به مدت ۴۸ ساعت در

(رقیق‌ترین) چاهکی که هیچ کدورتی در آن ایجاد نشده بود، معادل MIC قرار داده شد. خانه کنترل اسانس، محیط کشت و میکروب نیز جداگانه منظور شد.

#### تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

#### Minimum Bacteriocidal Concentration

برای آزمایش MBC همه چاهک‌های فاقد کدورت جداگانه بر روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت کمترین غلظتی از اسانس که باکتری در آن رشد نکرده بود را به عنوان غلظت کشندگی MBC گزارش کردیم.

#### روش دیسک دیفیوژن

به منظور آزمایش دیسک دیفیوژن (DD) باکتری‌ها را روی محیط ایزوسنسی تست آگار (Isosensitest agar) کشت دادیم. دیسک‌های عصاره ۶ میلی‌متری بودند و ۴۰ میکرولیتر عصاره به وزن خشک ۱۰۰ µg حل شده در بافر سالین از قبل روی آنها قرار گرفته بود. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک را روی آن قرار دادیم. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطرها را از پشت پلیت با خط‌کش اندازه‌گیری کرده و نتایج حاصل از آنتی‌بیوتیک‌ها را با جدول استاندارد (NCCLS) National Committee for Clinical Laboratory Standards مقایسه کردیم. دیسک ۱۰ µg جنتامیسین و ۳۰ µg کلرامفنیکل به عنوان کنترل به کار برده شدند. آزمایشات ۳ بار تکرار شد و نتایج به صورت متوسط آنها در جداول ارائه گردید.

#### یافته‌ها

نتایج ما نشان داد که MIC و MBC هیچ‌کدام از ۶ گونه گیاهی مورد بررسی بر علیه اتروکک فکالیس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس و سودوموناس اثر وژینوزا کمتر از ۱۹۰۰ µg/ml نمی‌باشد. عصاره گونه‌های بن سرخ، آویشن خرم‌آباد و شنگ روی هیچ‌کدام از ۶ باکتری مورد نظر MIC و MBC کمتر از ۱۹۰۰ µg/ml نداشتند. پایین‌ترین MIC در عصاره گیاه آویشن الیگودرز بر علیه اشرشیا کلی (۱۲۰ µg/ml) و استاف ارنوس (۲۳۵ µg/ml) مشاهده گردید (جداول ۱ و ۲).

در روش دیسک نیز عصاره شنگ و بن سرخ نتوانست از رشد هیچ‌کدام از باکتری‌های مورد مطالعه ممانعت به عمل آورد. قطر هاله عدم رشد اشرشیا کلی در اطراف دیسک

هگزان خیساندیم و با صاف کردن و تبخیر حلال در فشار کم ماده غلیظی حاصل شد که با اضافه کردن حلال جدید (DMSO) و بافر فسفات سالین (PBS) و به هم زدن شدید به مدت ۲ ساعت در دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس با خارج کردن رسوبات با سانتریفوژ و تبخیر حلال عصاره به دست آمد. برای انجام آزمایشات به میزان ۱ به ۵ با PBS رقیق شدند.

#### باکتری‌های مورد مطالعه

باکتری‌های استاندارد (ATCC) American Tissue and Culture Collection از آزمایشگاه رفرانس میکروب‌شناسی (بیمارستان بوعلی تهران) تهیه و در فریزر ذخیره شد. یک کلون از هر سوش در محیط کشت‌های زیر کشت و مورد آزمایش‌های شناسایی قرار گرفت. سوش‌های مورد استفاده عبارت بودند از استافیلوکوک ارنوس، ATCC 25923، استافیلوکوک اپیدرمیدیس ATCC 12228، اتروکک فکالیس، ATCC 29212، اشرشیا کلی ATCC 25922، سودوموناس اثر وژینوزا ATCC 27853 و باسیلوس سرئوس که از برنج جدا شده بود.

#### تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

#### Minimum Inhibitory Concentration

آزمایش MIC در پلیت ۹۶ خانه استریل و با روش برات میکرودایلوشن انجام شد (۹). ابتدا از محیط کشت مولر هیتون برات (مرک آلمان) ۱۰۰ µl داخل ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد. سپس به اولین چاهک هر ردیف ۱۰۰ µl عصاره اضافه گردید و از خانه دوم به سوم و به همین ترتیب تا خانه نهم رقیق شدند. در ردیف دیگری هم ۱۰۰ µl از آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، جنتامیسین و تراسایکلین مناسب با حساسیت باکتری مورد آزمایش اضافه شد. در آخر به همه چاهک‌ها ۱۰۰ µl سوسپانسیون میکروبی رقیق شده معادل لوله نیم مک فارلند اضافه گردید. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به وسیله پایه پلیت tray-reading stand که به همین منظور ساخته شده، کف پلیت زیر نور در آینه مشاهده شد. وجود کدورت که نشان‌دهنده رشد یا عدم رشد باکتری بود را در جدول مخصوص یادداشت می‌کردیم. طبق تعریف غلظت آخرین

جدول ۱: متوسط ( $n=3$ ) غلظت *MBC* و *MIC* عصاره‌های استخراجی (برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر)

ضد کوکسی‌های گرم مثبت					
عصاره	استاف ارئوس <i>ATCC:25923</i>		استاف اپیدرمیدیس <i>ATCC:12228</i>		انتروکک فکالیس <i>ATCC:29212</i>
	<i>MIC</i>	<i>MBC</i>	<i>MIC</i>	<i>MBC</i>	
آویشن الیگودرز	>1900	235	>1900	>1900	>1900
آویشن خرم‌آباد	>1900	>1900	>1900	>1900	>1900
شمشاد اناری	80	320	>1900	>1900	>1900
بن سرخ	>1900	>1900	>1900	>1900	>1900
شاهتره	>1900	>1900	>1900	>1900	>1900
شنگ	>1900	>1900	>1900	>1900	>1900

جدول ۲: متوسط ( $n=3$ ) غلظت *MBC* و *MIC* عصاره‌های استخراجی (برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر)

ضد باسیل‌های گرم مثبت و منفی					
عصاره	اشرشیاکلی <i>ATCC:25922</i>		سودوموناس آئروژینوزا <i>ATCC:27853</i>		باسیلوس سرئوس
	<i>MIC</i>	<i>MBC</i>	<i>MIC</i>	<i>MBC</i>	
آویشن الیگودرز	470	120	>1900	>1900	>1900
آویشن خرم‌آباد	>1900	>1900	>1900	>1900	>1900
شمشاد اناری	>1900	>1900	>1900	>1900	>1900
بن سرخ	>1900	>1900	>1900	>1900	>1900
شاهتره	>1900	470	>1900	>1900	470
شنگ	>1900	>1900	>1900	>1900	>1900

یافته‌های حاصله از اسانس آویشن نشان می‌دهد که عصاره آویشن الیگودرز در غلظت بالاتری بر استاف ارئوس و اشرشیاکلی مؤثر است. عصاره آویشن خرم‌آباد در غلظت مورد آزمایش بی‌اثر بود که می‌تواند، ناشی از غلظت کم مواد مؤثره در عصاره در مقایسه با اسانس باشد و یا وجود مواد مهار کننده در آن باشد. اما اسانس این گیاه بر اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا مؤثر بوده است (۷۶).

تجزیه شیمیایی اسانس آویشن ترکیبات مختلف فنلی، هیدروکربن‌های مونوترپنی و الکل‌ها وجود دارد. اما اثر ضد میکروبی آن بیشتر به تیمول (Thymol) و کارواکرول (Carvacrol) نسبت داده می‌شود که هر دو ترکیبی فنلی و دارای خواص ضدباکتری و در عین حال محرک و سوزآور هستند (۳۱). در تجزیه شیمیایی اسانس دو آویشن الیگودرز و خرم‌آباد به ترتیب ۶۶ درصد و ۵۷ درصد تیمول ۱۰ درصد و ۲۵ درصد کارواکرول بوده است که هر دو ساختمان فنلی داشته و اثر ضدباکتریایی آنها نیز شناخته شده است (۷۶).

حاوی عصاره گیاه آویشن خرم‌آباد ۱۶ میلی‌متر، شمشاد اناری ۱۲ میلی‌متر و شاهتره ۱۱ میلی‌متر بود. تنها عصاره گیاه آویشن الیگودرز از رشد سودوموناس آئروژینوزا (قطر هاله عدم رشد ۸ میلی‌متر) ممانعت نمود. هیچ کدام از گیاهان نتوانستند قطر هاله عدم رشدی بالاتر از ۶ میلی‌متر در اطراف ۴ باکتری دیگر (استاف ارئوس، اپیدرمیدیس، انتروکک فکالیس و باسیلوس سرئوس) ایجاد نمایند.

## بحث

این مطالعه نشان داد که عصاره آویشن الیگودرز *T. eriocalyx* دارای اثرات ضدباکتریایی بر استاف ارئوس و اشرشیاکلی می‌باشد (جدول ۱ و ۲). این یافته با نتایج سایر مطالعات که نشان‌دهنده اثرات ضدباکتریایی اسانس و عصاره گونه‌های دیگر آویشن می‌باشد، مشابهت دارد (۱۰ و ۱۱).

مطالعات قبلی نشان دادند که اسانس این گیاه روی تعداد بیشتر از باکتری‌ها از جمله باسیلوس سرئوس و سودوموناس آئروژینوزا تأثیر دارد (۸-۶). مقایسه نتایج مطالعه حاضر، با

نمی‌توان در دیسک ۶ میلی‌متری موجود در بازار مقادیر بالا عصاره قرار داد. ضمن این که این روش حساسیت پایینی دارد و به عنوان روش مکمل مورد استفاده قرار گرفته است.

### نتیجه‌گیری

با توجه به اثراتی که عصاره آویشن الیگودرز، عصاره شاهتره و شمشاد اناری روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی داشته‌اند، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که از این گیاهان می‌توان استفاده‌های زیادی در صنایع دارویی یا غذایی، آرایشی و بهداشتی نمود.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت مالی معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان تشکر می‌گردد. در تهیه این مقاله از پایان‌نامه‌های خانم دکتر فاطمه فتح‌اللهی و آقایان دکتر حسن شاهرخی و دکتر وحید الماسی استفاده شده، که بدین وسیله از همکاری آنها نیز سپاسگزاری می‌شود.

## References

- 1) Velag J, Studlla G. The Medicinal Plants. Persian Translation by Zaman S. Sixth Ed. Tehran. Naghsh Iran publication. 2005; pp:9-10.
- 2) Akhondzadeh Basti A. Iranian Medicinal Plants Encyclopedia. First Ed. Tehran. Arjmand Publication. 2000; pp: 64, 561-6.
- 3) Naghdi Badi H, Makizadeh Tafti M. A review on Thymus species. *Journal of Medicinal Plants*. 2007; 7: 1-13. [Persian]
- 4) Zargari A. Medicinal Plants. Sixth Ed. Vol 1. Tehran. Tehran University Press. 1990; pp: 72-166.
- 5) Shafizadeh F. Popular Medicinal Plants of Lorestan. Tehran. Hayan Publication. 2002; p: 128.
- 6) Talei GR, Meshkatsadat MH, Mosavi Z. Antibacterial Activity and Chemical Composition of Essential oils From four medicinal plants of Lorestan, Iran. *Journal of Medicinal Plants*. 2007; 6(supplement 1): 45-52. [Persian]
- 7) Talei GR, Meshkatsadat MH. Antibacterial Activity and Chemical Constitutions of Essential Oils of Thymus persicus and Thymus ericalyx from West of Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2007;10(21):3923-3926.
- 8) Almasi V. Antibacterial activity and chemical analysis of

باتوجه به بالا بودن غلظت تیمول و پایین بودن غلظت کارواکرول در اسانس آویشن الیگودرز از طرف دیگر می‌توان از این اسانس در هنگامی که از اثر سوزاننده و التهابی کارواکرول پرهیز می‌شود، استفاده نمود (۷).

همچنین مقایسه عصاره برگ شمشاد اناری در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ منتشر شده، نشان داد که این عصاره بر استافارثوس موثر بوده است (۱۲). این نتیجه با نتایج مطالعه ما مطابقت دارد. از گیاه شاهتره اثر ضدتب و ضدباکتری لیستریامنوسیتوزنز گزارش شده است (۱۳)، که می‌تواند با اثر ضدباکتریایی یافت شده در این پژوهش هماهنگ باشد. گزارشی منتشر شده از اثر ضد میکروبی بن سرخ و شنگک یافت نشد و در این پژوهش نیز اثر ضدباکتریایی در این گیاهان مشاهده نگردید. به طور کلی غلظت‌های آزمایش شده در این پژوهش پایین بود. در حالی که عصاره‌های گیاهی معمولاً در غلظت‌های بالا اثر می‌کنند. در روش دیسک دیفیوژن به علاوه

- essential oils from Crocus sativus (Safran) leaf and two variant of Thymus species from Lorestan. Medical Doctorate thesis No 339. Lorestan University of Medical Sciences Medical School. 2006; p: 27. [Persian]
- 9) Koletar SL. Concepts in Antimicrobial Therapy. In: Mahon CR, Manoselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology. Chapter 3. Second Ed. Philadelphia. W.B Saunders Company. 2000; pp: 62-95.
- 10) Rasooli I, Mirmostafa SA. Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from Thymus kotschyanus and Thymus persicus. *J Agric Food Chem*. 2003;51(8):2200-5.
- 11) De Feo V, Bruno M, Tahiri B, Napolitano F, Senatore F. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Thymus spinulosus Ten. (Lamiaceae). *J Agric Food Chem*. 2003; 51(13):3849-53.
- 12) Mothana RA, Lindequist U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqatra. *J Ethnopharmacol*. 2005; 96(1-2):177-81.
- 13) Khattak SG, Gilani SN, Ikram M. Antipyretic studies on some indigenous Pakistani medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 1985; 14(1):45-51.