

اثرات ضد میکروبی عصاره آبی الکلی برگ و دانه گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum*) بر روی سویه های مختلف میکروبی

چکیده

زمینه و هدف: بیماریهای عفونی از عوامل مهم مرگ و میر در جهان هستند. با افزایش مقاومت باکتریها نسبت به داروهای شیمیایی و عوارض جانبی کم گیاهان دارویی، امروزه ضرورت استفاده از گیاهان برای ترکیبات ضد میکروبی مورد توجه قرار گرفته است.

روش بررسی: در این پژوهش عصاره برگ و دانه گیاه شنبلیله به روش خیساندن با اتانول ۷۰٪ تهیه شد. کمترین غلظت جلوگیری کننده از رشد (MIC) با روش رقیق سازی در محیط مایع و حساسیت میکروبی با روش انتشار دیسک تعیین شد. نتایج با آنتی بیوتیکهای جنتامیسین، سیپروفلوکسازین و فلونازول مقایسه شد. سویه های به کار رفته عبارت بودند از: سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلای، کلبسیلا نومونیه، انتروکوکوس فیسوم و کاندیدا آلبیکانس و دو سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس اثرورینوزا.

یافته ها: کمترین MIC به دست آمده از عصاره برگ شنبلیله بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فیسوم بالینی با مقدار $64\mu\text{g/ml}$ و برای عصاره دانه شنبلیله بر روی سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس با مقدار $64\mu\text{g/ml}$ بود. بیشترین قطر هاله عدم رشد ایجاد شده به وسیله عصاره برگ شنبلیله بر روی سویه استافیلوکوکوس اورئوس 23 میلی متر و در مورد عصاره دانه شنبلیله بر سویه بالینی انتروکوکوس فیسوم (18 میلی متر) بود. این عصاره ها بر مخمر اثر مهاری نشان نداد.

نتیجه گیری: با توجه به اثرات ضد میکروبی عصاره برگ و دانه گیاه شنبلیله بر باکتریهای گرم مثبت می توان این عصاره ها را در فرآورده های ضد میکروبی در صنایع داروسازی و غذایی به کار گرفت. لذا شناسایی و خالص سازی مواد ضد میکروبی عصاره ها توصیه می شود.

واژه های کلیدی: شنبلیله، ضد میکروبی، کمترین غلظت جلوگیری کننده از رشد، عصاره

هیدروالکلی

محمد باقر مجنون

داروساز، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

رامین عبیری

استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی دانشگاه پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

پیمان ملک خطابی

مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

هادی ادیبی

استادیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

نویسنده مسئول: رامین عبیری

تلفن: ۲۱-۴۲۷۴۶۱۸-۸۳۱

پست الکترونیک: rabiri@kums.ac.ir

آدرس: کرمانشاه، بلوار شهید شیرودی، خیابان دانشگاه، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی

وصول مقاله: ۸۷/۱۲/۱۸

اصلاح نهایی: ۸۸/۶/۲۴

پذیرش مقاله: ۸۸/۸/۲۷

مقدمه

مصرف گیاهان دارویی برای درمان سابقه ای به قدمت عمر انسان دارد. در سالهای اخیر کاربرد گیاهان دارویی با توجه به عوارض و هزینه کمتر و سازگاری بیماران به این داروها و به لحاظ وجود اثرات جانبی شناخته شده برای داروهای شیمیایی، افزایش یافته است. گرچه امروزه بخش عظیمی از داروهای مصرفی شیمیایی هستند، تخمین زده اند که دست کم یک سوم تمامی فراورده های دارویی منشا گیاهی داشته و یا پس از استخراج از گیاه تغییر شکل یافته اند. (۱)

بیماری های عفونی در زمره شناخته شده ترین بیماریهایی هستند که همواره گریبان گیر انسان بوده و تلاشهای زیادی برای شناخت عوامل ایجاد کننده، درمان و کنترل آنها صورت گرفته است (۱ و ۲). استفاده از آنتی بیوتیکها هسته اصلی درمان در عفونتهای باکتریایی را تشکیل می دهد ولی به دلیل افزایش روزافزون مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتریها و وجود عوارض جانبی داروها، کاربرد روشهای کمکی از جمله استفاده از گیاهان دارویی برای درمان اهمیت ویژه ای پیدا نموده است (۳).

گیاه شنبلیله، گیاهی یک ساله و علفی از خانواده حبوبات (Fabaceae) است. این گیاه و دانه آن به دلیل داشتن ترکیبات ساپونینی و فنوگراسین می توانند دارای اثرات ضد میکروبی برجسته ای باشند (۴). از برگ شنبلیله و دانه آن در گذشته برای تسکین درد، ضد التهاب، افزایش ترشح شیر، ضد لک و تسکین سرفه استفاده می کرده اند (۵). همچنین برای دانه این گیاه اثراتی همچون ضد دیابت، (۷ و ۶) بر طرف کننده زودرس یائسگی (۸)، آنتی اکسیدانی (۹)، پیش گیری کننده از سرطان سینه (۱۰)، کاهشده گلی چربی خون، (۱۱) ضد درد و ضد التهاب (۱۲) و جلوگیری کننده از آنزیم استیل کولین استراز (۱۳) گزارش کرده اند. همچنین در دو مقاله اثرات گیاه بر قارچهای رشته ای (۱۴) و شایزونت پلاسمودیوم (۱۵) انتشار یافته اما ما به گزارشی در مورد اثرات ضد میکروبی آن دسترسی نداشته ایم. در این تحقیق به بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره آبی - الکلی برگ و دانه گیاه شنبلیله پرداخته ایم.

روش بررسی

۱) تهیه گیاه و عصاره گیری

برگ و دانه گیاه شنبلیله پس از جمع آوری از سبزی کاریهای اطراف کرمانشاه و تأیید کارشناس هرباریوم گیاهان دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه مورد استفاده قرار گرفت. برای عصاره گیری از ۱۰۰ گرم پودر برگ گیاه خشک شده و ۱۰۰ گرم از دانه آن با اتانول ۷۰٪ به روش خیساندن (Maceration) استفاده شد. عصاره ها جداگانه با کیف بوخنر و کاغذ صافی معمولی صاف و با استفاده از دستگاه تقطیر در خلا چرخان در دمای ۴۵ درجه تغلیظ و سپس برای خشک شدن کامل به کریستالیزور منتقل گردید.

۲) سویه های میکروبی

باکتریهای مورد استفاده در این پژوهش عبارت بودند از استافیلوکوکوس اورئوس استاندارد (ATCC ۲۵۹۲۲)، سودوموناس آیروژینوزا استاندارد (ATCC ۲۷۸۵۳) و سویه های بالینی اشیریشیا کلای، کلبسیلا نومونیه، انتروکوکوس فیسیوم، کاندیدا آلیکانس که از بخش عفونی بیمارستان امام خمینی کرمانشاه تهیه شده بودند. هر یک از این سوش ها بر روی محیط مولر هینتون آگار (MHA) کشت دادیم و سپس سوسپانسیونهایی با رقت ۰٫۵ مک فارلند در محیط مولر هینتون برات (MHB) تهیه کردیم.

۳) تعیین حساسیت میکروبی

برای تعیین حساسیت سویه های میکروبی نسبت به عصاره های آبی - الکلی برگ و دانه گیاه شنبلیله از روش انتشار با دیسک استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا از تمام سویه های میکروبی غلظت معادل ۰٫۵ مک فارلند در محیط مولر هینتون برات تهیه شد و سپس بر سطح محیط مولر هینتون آگار به صورت یک نواخت کشت داده شدند. آنگاه دیسک های بلانک استریل (پادتن طب) در غلظت ۱۰۰ mg/ml از عصاره غوطه ور گردید و بعد از خشک شدن در فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت بر روی سطح آگار قرار داده شدند. پلیتها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه ی سانتی گراد انکوبه شدند. از دیسکهای استاندارد آنتی بیوتیکهای جنتامیسین و سیپروفلوکسازین به منظور کنترل مثبت استفاده شد. با

قطر هاله عدم رشد بر روی انتروکوکوس فیسیوم با مقدار ۱۸ mm مشاهده شد. دانه شنبلیله تنها اثر محدودی به کاندیدا نشان داد در حالی که برگ شنبلیله در غلظتهای مورد مطالعه هیچ اثری بر روی کاندیدا آلیکانس نداشت.

بحث

گیاه شنبلیله دارای ویژگیهای فارماکولوژیک خاصی است. اثر ضد قارچی آن در مطالعات مورد توجه قرار گرفت، در بین قارچهای بررسی شده در مطالعه فوق، ریزوکتینیا سولانی حساسترین و پایتیموم افانیدرماتیوم مقاومترین گونه نسبت به این گیاه بوده اند. از سویی مطالعاتی نیز در خصوص اثر ضد میکروبی برخی از گیاهان خانواده حبوبات صورت گرفته که با نتایج به دست آمده قابل انطباق است (۱۳). ولی نتایج ما نشان داد که عصاره هیدروالکلی برگ و دانه این گیاه اثر مناسبی علیه کاندیدا آلیکانس ندارد. اثر این عصاره ها بر قارچهای رشته ای در این تحقیق مورد آزمون قرار نگرفته است که ممکن است دارای اهمیت باشد.

بر اساس نتایج بدست آمده مشخص می گردد که اثر مهارتی و ضد میکروبی عصاره های گیاه شنبلیله بر روی باکتریهای گرم مثبت به طور مشخص بیشتر از باکتریهای گرم منفی است حساسیت بیشتر باکتریهای گرم مثبت در مقابل عوامل ضد میکروبی در مطالعات مختلف مطرح و مورد تایید قرار گرفته است و این مسأله ممکن است به علت وجود دیواره سلولی غنی از پپتید و گلیکان و فقدان لایه غشا خارجی در این باکتری باشد. نتایج این تحقیق نیز یافته های قبلی را مورد تأیید قرار می دهد. با توجه به سطح MIC و نیز قطر هاله عدم رشد عصاره ها علیه باکتریهای گرم منفی و مقایسه آن با سطح MIC و قطر هاله عدم رشد داروهای مورد آزمون مثل سیپروفلاکسین و جنتامایسین مشخص می گردد که هیچ کدام از دو عصاره مورد بررسی در *In vitro* برای کنترل باسیلهای گرم منفی مناسب نمی باشد.

عدم وجود اثر مهارتی مناسب عصاره بر گونه کاندیدا آلیکانس احتمالاً حاکی از آن است که این گیاه اثر ضد قارچی مناسبی ندارد ولی عدم دسترسی به سویه استاندارد کاندیدا آلیکانس و نیز عدم مطالعه روی قارچهای رشته ای که از

اندازه گیری قطر هاله عدم رشد اطراف دیسکها به وسیله ی خط کش میلیمتری نتایج مورد بررسی قرار گرفت. (۱۶)

۴) تعیین کمترین غلظت جلوگیری کننده رشد (MIC)

برای تعیین کمترین غلظت جلوگیری کننده رشد از روش رقیق سازی در محیط مایع (Microdilution broth) در میکرو پلیتهای ۹۶ خانه استفاده شد. بدین ترتیب که $75 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون باکتری (با غلظت معادل $1/1000$ نیم مک فارلند برابر با $10^5 \times 1/5$) به چاهک حاوی $75 \mu\text{l}$ از غلظتهای مختلف عصاره در محیط کشت (در غلظتهای متوالی ۲ تا $1000 \mu\text{g/ml}$) اضافه گردید. از داروهای جنتامیسین، سیپروفلوکساسین (هر دو دارو از شرکت داروسازی اکسیر) و فلوکونازول (اهدا شده از دانشکده داروسازی کرمانشاه) برای کنترل مثبت به همین روش استفاده شد. سپس میکروپلیتها در انکوباتور 37°C درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و پس از آن نتایج بر حسب کمترین غلظتی از عصاره بدون کدورت ناشی از رشد باکتری با عنوان MIC ذکر شد (۱۶) و لازم به ذکر است که برای جلوگیری از بروز اشتباه در یافته ها هر سنجش دو بار تکرار شد که پاسخ تمامی آزمایشها یکسان به دست آمد.

یافته ها

در این مطالعه اثر ضد میکروبی عصاره آبی - الکی گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum*) و دانه آن بر روی سویه های بالینی، اشیشیا کلای، کلبسیلا پنومونیه، انتروکوکوس فیسیوم، کاندیدا آلیکانس و همچنین دو سویه استاندارد استافیلو کوکوس اورئوس (ATCC ۲۵۹۲۲) و سودوموناس آیزوژینوزا (ATCC ۲۷۸۵۳) مورد آزمایش قرار گرفت که نتایج آن در جداول شماره ۱ و ۲ آورده شده است.

در خصوص برگ شنبلیله کمترین (MIC) بر روی سویه های بالینی، انتروکوکوس فیسیوم و سویه استاندارد استافیلو کوکوس اورئوس با مقدار $64 \mu\text{g/ml}$ ، و بیشترین قطر هاله نبود رشد نیز بر روی استافیلو کوکوس اورئوس استاندارد (۲۳ mm) بود در مورد دانه شنبلیله کمترین MIC بر روی استافیلو کوکوس اورئوس استاندارد ($64 \mu\text{g/ml}$) و بیشترین

مشکلات این تحقیق می باشد ضرورت را برای بررسی بیشتر در مورد اثر ضد قارچ این عصاره فراهم می نماید. اگر چه مقادیر MIC عصاره های مورد بررسی بسیار بالاتر از MIC دارو ها در این مطالعه است ، باید به این نکته توجه نمود که MIC های به دست آمده نتیجه عصاره تام است که دارای بسیاری از ترکیبات خنثی در برابر باکتری و یا قارچ نیز هست که در صورت جداسازی ترکیبات غیر موثر و جداسازی، شناسایی و آزمایش دوباره این گونه تغییرات قطعاً مقادیر MIC بسیار کمتر خواهند شد.

با توجه به افزایش روز افزون مقاومت میکروبی نسبت به آنتی بیوتیکهای رایج، یکی از اولویتهای کار محققان یافتن

ترکیبات جدید ضد میکروبی است و با توجه به اینکه گیاهان دارویی دارای عوارض و هزینه کمتری می باشند، می توانند یکی از منابع داروهای ضد میکروبی باشند بر طبق نتایج این مطالعه ثابت شد که برگ و دانه گیاه شنبلیله دارای اثرات ضد میکروبی قابل توجهی علیه باکتریهای گرم مثبت است و می تواند یک منبع طبیعی برای استفاده در درمان عفونتها باشد لذا جداسازی ترکیبات موثره، خالص سازی، بررسی اثرات ضد میکروبی آنها برای تهیه ی فرمولاسیون دارویی پیشنهاد می گردد.

جدول شماره ۱: کم ترین غلظت جلوگیری کننده از رشد (MIC) عصاره هیدروالکلی برگ و دانه شنبلیله بر علیه میکروارگانیسم ها بر حسب (µg/ml)

فلوکونازول	جنتامیسین	سیپروفلوکساسین	دانه شنبلیله	برگ شنبلیله	میکروارگانیسم/عصاره
-----	۲	۸	۵۱۲	۱۰۰۰	کلبسیلا پنومونیه
-----	۴	۴	۵۱۲	۵۱۲	اشریشیاکلا
-----	۴	۴	۵۱۲	۲۵۶	سودوموناس آيروژینوزا استاندارد
-----	۴	۴	۶۴	۶۴	استافیلوکوکوس اورئوس استاندارد
-----	۸	۴	۱۲۸	۶۴	انتروکوکوس فیسیوم
-----	-----	-----	۵۱۲	>۱۰۰۰	کاندیدا آلبیکنس

میزان قطر هاله نبود رشد بر حسب میلیمتر

جدول ۲: قطر هاله عدم رشد در حضور عصاره هیدروالکلی برگ و دانه شنبلیله علیه میکروارگانیسم ها

فلوکونازول	جنتامیسین	سیپروفلوکساسین	دانه شنبلیله	برگ شنبلیله	میکروارگانیسم/عصاره
.....	۲۰	۲۳	۱۰	-----	کلبسیلا پنومونیه
-----	۲۳	۱۷	۱۵	۱۴	اشریشیاکلا
-----	۲۵	۲۴	-----	-----	سودوموناس آيروژینوزا استاندارد
-----	۲۱	۲۱	۱۸	۱۵	انتروکوکوس فیسیوم
۱۶	-----	-----	۱۰	۸	کاندیدا آلبیکنس

References

- 1- Buhner S H: *Herbal Antibiotics Natural Alternatives for treating Drug-Resistant Bacteria*. 1th ed. Vermont, Store Books 1999 ;8-20
- 2- 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; 1(6): 45-52
- 3- Abbasi N, Azizi Jalilian F, Abdi M, Saifmanesh M. *A Comparative Study of the Antimicrobial Effect of Scrophularia striata Boiss. Extract and Selective Antibiotics Against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa* Journal of Medicinal Plants.2007; 1(6): 10-18
- 4- Witchl M. *Herbal Drugs and Phytopharmaceutical* Stuttgart.: Medpharm Scientific publisher, 1994:203-5
- ۵- کمیته تدوین فارماکوپه ایران، فارماکوپه ی گیاهای ایران، شنبلله، قنادی علیرضا، وزارت بهداشت درمان آموزش پزشکی معاونت غذا و دارو ، اسفند ۱۳۸۱، جلد ۱، صفحات: ۴۹۷-۵۰۵
- 6- Suresh Kumar G., Shetty A.K., Sambaiah K., Salimat P.V. *Antidiabetic property of fenugreek seed mucilage and spent turmeric in streptozotocin-induced diabetic rat*. Nutrition Research .2005, 25:1021–1028
- 7- Srichamroen A, Field C J, Thomson A, Basu A. *The modifying effects of Galactomannan from Canadian-Grown Fenugreek (Trigonella foenum-graecum L.) on the Glycemic and Lipidemic Status in Rats*. J.Clin.Biochem.Nutr. 2008; 43. 167-174
- 8- Hakimi S, Mohammad Alizadeh S, Delazar A, Abbasalizadeh F, Bamdad Mogaddam R, Siiahi MR.etal *Probable Effects of Fenugreek Seed on Hot Flash in Menopausal Women*. Journal of Medicinal Plants 2006;19(5): 9-14
- 9- S Kaviarasan S., Naik G.H., Gangabhairathi R., Anuradha C.V. , Priyadarsini K.I. *Priyadarsini b, in vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (Trigonella foenum graecum) seeds*. Food Chemistry; 2007, 103:31–37
- 10- Amr Amin , Aysha Alkaabi , Shamaa Al-Falasi , Sayel A. *Daoud Chemopreventive activities of Trigonella foenum graecum (Fenugreek) against breast cancer*. Cell Biology International. 2005; 29:687-694
- 11- Roghani M, Baluch Nejad Mojarad T, Roghani Dehkordi F. *Hypolipidemic effect of aqueous leaf extract of Trigonella Foenum-Graecum in diabetic rats*.Iranian Journal of Endocrinolgy & Metabolism.2005;26(7): 171-167
- 12- Ahmadiani A. , Javan M., Semnanian S., Barat E., Kamalinejad M. *Anti-inflammatory and antipyretic effects of Trigonella foenum-graecum leaves extract in the rat* Ethnopharmacology. 2001, 75:283–286
- 13- Satheeshkumar N, Mukherjee PK, Bhadra S, Saha BP. *Acetylcholinesterase enzyme inhibitory potential of standardized extract of Trigonella foenum graecum L and its constituents*. Phytomedicine. 2009 ; 17, 3: 292-295
- 14- Haouala R, Hawala S, El-Ayeb A, Khanfir R, Boughanmi N. *Aqueous and organic extracts of Trigonella foenum-graecum L. inhibit the mycelia growth of fungi*. J Environ Sci (China). 2008; 20(12):1453-7
- 15- Palaniswamy M, Pradeep B V, Sathya R, and Angayarkann J: *In vitro anti-plasmodial activity of Trigonella foenum-graecum L*. eCAM 2008; 1 -5.
- 16-Wikler M A, Low D E, Cockerill F R, Sheehan D J, Craig W A, Tenover F C. et al. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*; Approved Standard.9 th ed. 2006. 26 (1) CSLI Standards