● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌ویکم، شمارهٔ ۴، ص ۳۲۰-۳۱۳، ۱۳۹۳

مقالهٔ پژوهشی

بررسی اثرات ضد باکتریایی فراکسیون‌های مختلف عصاره برگ گیاه سمسک و بیواتوگرافی فراکسیون مؤثر

محمد حسن مصحفی[۱]، میترا مهربانی[۲]، محمد معینی[۳]، فرشته صفاری*[۴]

خلاصه

مقدمه: امروزه ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها روز به روز در حال افزایش است. بسیاری از محققین، گیاهان دارای اثرات ضد میکروبی را به عنوان جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها مورد توجه قرار داده‌اند. در این مطالعه فعالیت ضد میکروبی گیاه Ajuga chamaecistus Ging. Subsp. Scoparia (Bioss) Rech. f. با نام محلی سمسک بر روی هشت سویه باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت.

روش: عصاره برگ‌های گیاه مورد آزمایش به روش خیساندن در حلال متانولی استخراج و فراکسیون‌های پترولئوم اتری، دی‌کلرومتانی، اتیل استاتی و باقی‌مانده متانولی از عصاره تغلیظ و خشک شده تهیه شد. حداقل غلظت مهار کننده رشد (Minimum inhibitory concentration یا MIC) عصاره تام با روش رقت در آگار تعیین و فعالیت ضد میکروبی فراکسیون‌های مختلف نیز با استفاده از روش انتشار از دیسک اندازه‌گیری گردید. در ادامه، ترکیبات سازنده مؤثرترین فراکسیون به کمک سیستم حلال اتیل استات: کلروفرم: متانول (۲۸:۴۵:۲۵) به روش کروماتوگرافی لایه نازک (LC: Thin-layer chromatography) جداسازی شد. سپس کروماتوگرام‌ها با روش بیواتوگرافی تعلیقی بر روی سویه‌های باکتریایی مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: بر اساس یافته‌های حاصل از روش انتشار از دیسک، فراکسیون اتیل استاتی اثر ضد میکروبی قوی‌تری بر روی باکتری‌های مورد آزمایش داشت. بیواتوگرافی این فراکسیون، اثر ضد میکروبی علیه استافیلوکوکوس اورئوس را در محدوده R_f = ۰/۹ نشان داد. البته همه باکتری‌های مورد بررسی در محل کاشت عصاره، دارای لکه عدم رشد بودند.

نتیجه‌گیری: فعالیت ضد باکتریایی فراکسیون اتیل استاتی با حضور تمام اجزای سازنده ظاهر می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سمسک، فعالیت ضد باکتریایی، بیواتوگرافی تعلیقی

۱- استاد، گروه داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲- دانشیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۳- دکتر داروساز ۴- دانشجوی دکتری تخصصی باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: fereshtesaffari@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۳/۱۸ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۲/۷/۱۷ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۸/۲۸

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بیماری‌های عفونی علت اصلی مرگ و میر در دنیا به حساب می‌آیند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز یک مشکل جهانی است (۱). با افزایش سطح آگاهی جوامع نسبت به بروز مشکلات ناشی از تجویز بیش از حد و استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها در دهه‌های گذشته، اقبال عمومی به استفاده از گیاهان دارویی افزیش یافته است. علاوه بر این، گیاهان دارویی در صنایع داروسازی نیز به عنوان اولویت‌های ارزشمند در یافتن داروهای جدید مورد توجه قرار گرفته‌اند (۲).

از بین گیاهان دارویی، تیره نعناع اهمیت زیادی دارد و برخی از گونه‌های مفید آن در طب سنتی مورد استفاده قرار می گیرد (۳). در تحقیق حاضر اثر ضد میکروبی گیاه سمسک از خانواده نعنایان با نام علمی Ajuga chamaecistus Ging. Subsp. Scoparia (Bioss) Rech. f. بررسی شد. سمسک در طب عامه مردم رابر برای درد کلیه، کبد و گوش و به عنوان ضد تهوع کاربرد دارد. بر اساس مطالعات انجام شده، گزارش مکتوبی در زمینه اثرات ضد میکروبی این گیاه وجود ندارد، اما بررسی خصوصیات فارماکولوژیک بر روی برخی ازگونه‌های جنس Ajuga صورت گرفته است. به عنوان مثال در بررسی گیاه A.lupulina، وجود اثر ضد میکروبی در دی‌ترپن‌های استخراج شده از آن (۴) و در اسانس حاصل از برگ‌های A.bracteosa نیز خاصیت ضد میکروبی مشاهده شده است (۵).

مطالعه عصاره متانولی اندام هوایی گیاه A.remota، اثر ضد مایکوباکتریایی در تری‌ترپن‌ها و دی‌ترپن‌های عصاره این گیاه را گزارش کرد (۶). همچنین در بررسی انجام شده بر روی عصاره A.iva، مشاهده شد که این آنزیم سبب افزایش برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و فلزات آنتی‌اکسیدانی مثل آهن، مس، منیزیم و کلسیم می‌شود و در ضمن پراکسیداسیون لیپیدی را نیز کاهش می‌دهد (۷). با توجه به نتایج تحقیقات انجام شده، بررسی خصوصیات ضد میکروبی گیاه سمسک قابل توجیه به نظر می‌رسد. هدف از انجام تحقیق حاضر، بررسی اثر ضد میکروبی فراکسیون‌های مختلف عصاره برگ این گیاه و بیواتوگرافی فراکسیون مؤثر بود.

روش بررسی

گیاه مورد استفاده

برگ‌های گیاه سمسک پس از جمع‌آوری از شهرستان بافت (در استان کرمان) توسط گیاه‌شناس، تأیید و شناسایی گردید. گیاه جمع‌آوری شده در آون و در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک شد و سپس مورد استفاده قرار گرفت (۸).

عصاره‌گیری

- عصاره متانولی (۹)

پودر گیاهی (حدود ۱۶۰ گرم) با متانول ۸۰ درصد مخلوط و به مدت ۷۲ ساعت در دمای محیط نگهداری و در طی این مدت چندین بار به هم زده شد و سپس صاف گردید. این روش سه مرتبه و در فواصل ۴۸ ساعته تکرار شد. عصاره حاصل با استفاده از دستگاه تقطیر در خلأ چرخان در حرارت ۴۵ درجه سانتی گراد تغلیظ شد تا مرحله‌ای که در نهایت هیچ حلالی از آن جدا نشود. ماده تغلیظ شده حاصل به مدت سه روز تا خشک شدن کامل در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد (در آون) نگهداری شد (۱۰).

- تهیه فراکسیون‌های گیاه

عصاره گیاه خشک همراه با پترولئوم اتر به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه سونیکاتور (فراز طب تجهیز- ایران) قرار گرفت. به تفاله حاصل از صاف شدن عصاره، دوباره پترولئوم اتر اضافه و در سونیکاتور گذاشته شد. این مراحل تا ۵ بار تکرار و عصاره نهایی به دست آمده (فراکسیون پترولئوم اتری) به وسیله دستگاه تقطیر در خلأ چرخان (فراز طب تجهیز- ایران) در حرارت ۴۵ درجه سانتی گراد تغلیظ گردید. به منظور تهیه فراکسیون‌های دی‌کلرومتانی و اتیل استاتی، مراحل فوق بر روی تفاله باقی‌مانده از مرحله قبلی و به

Archive of SID

www.SID.ir

ترتیب با استفاده از دی‌کلرومتان و اتیل استات صورت گرفت. تفاله باقی‌مانده نهایی، فراکسیون باقی‌مانده متانولی بود.

بررسی اثرات ضد باکتریایی

- میکروارگانیسم‌های مورد استفاده

در مجموع هشت سویه استاندارد باکتریایی تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی- صنعتی ایران شامل استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC ۱۱۱۲)، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (PTCC ۱۱۱۴)، باسیلوس سابتیلیس (PTCC ۱۰۲۳)، باسیلوس لیکنی فرمیس (PTCC ۱۳۲۰)، کلبسیلا پنومونیه (PTCC ۱۰۵۳)، سودوموناس ائروژینوزا (PTCC ۱۰۷۴)، اشریشیا کلی (PTCC ۱۳۳۰) و سالمونلا تیفی (PTCC ۱۶۳۹) مورد استفاده قرار گرفت. این میکروارگانیسم‌ها که به صورت لیوفیلیزه بودند، با افزودن محیط کشت TSB (Trypticase soy broth) و ۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد فعال شدند.

- تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد (Minimum inhibitory concentration یا MIC)

جهت تعیین کمترین غلظت مهار کنندگی رشد، از روش رقت در آگار استفاده شد (۱۱). به این منظور، رقت‌های مختلف عصاره تام با محیط کشت مذاب مولر هینتون آگار (Mueller-Hinton agar) مخلوط و به پلیت‌های استریل منتقل شد. پس از جامد شدن محیط، ۵ میکرولیتر از رقت ۰/۰۱ سوسپانسیون‌های میکروبی با غلظت استاندارد McFarland، به پلیت‌ها تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. در این مرحله از دی‌متیل سولفوکسید (Dimethyl sulfoxide یا DMSO) به عنوان کمک حلال استفاده گردید. به منظور اطمینان از رشد باکتری‌ها و عدم اثر ضد باکتریایی DMSO، از همان درصد غلظت مورد استفاده به عنوان شاهد استفاده شد. در ضمن غلظت ۷/۸۱۲ میکروگرم در لیتر جنتامیسین (Gentamicin) به عنوان شاهد مثبت به کار رفت که در این غلظت اثر مهاری روی رشد باکتری‌ها داشت.

- تعیین قطر هاله عدم رشد به روش انتشار از دیسک

از هر یک از عصاره‌های تام، پترولئوم اتری، دی‌کلرومتانی، اتیل استاتی و باقی‌مانده متانولی، ۱۵ میلی‌گرم بر روی دیسک‌های کاغذی استریل بارگیری شد. این دیسک‌ها با فواصل مناسب بر روی پلیت‌های مولر هینتون آگاری که سطح آن‌ها به طور یکنواخت با غلظتی معادل استاندارد McFarland از هر یک از سویه های میکروبی پوشانده شده بود، قرار داده شدند. پس از گرماگذاری، قطر هاله عدم رشد در اطراف هر یک از دیسک ها اندازه‌گیری شد (۱۲). این آزمایش برای هر یک از سویه ها، سه بار تکرار و نتایج به صورت میانگین گزارش گردید.

- بیواتوگرافی تعلیقی

اولین مرحله، یافتن یک سیستم حلال مناسب جهت جدا کردن فراکسیون‌های موجود در عصاره اتیل استاتی بود. با در نظر گرفتن این‌که فراکسیون ذکر شده شامل فلاونوئیدها می‌باشد، سیستم‌های حلال زیر مورد بررسی قرار گرفت (۱۳).

۱. اتیل استات: اسید فرمیک: اسید استیک: آب (۱۰۰:۱۱:۱۱:۲۶)
۲. اتیل استات: اسید فرمیک: اسید استیک: اتیل متیل کتون: آب (۵۰:۷:۳:۳۰:۱۰)
۳. کلروفرم: استون: اسید فرمیک (۷۵:۱۶/۵:۸/۵)
۴. کلروفرم: اتیل استات (۶۰:۴۰)
۵. کلروفرم
۶. بنزن: پیریدین: اسید فرمیک (۷۲:۱۸:۱۰)
۷. بوتانول: اسید استیک: آب (۴۰:۱۰:۵۰)
۸. اتیل استات: کلروفرم: اسید استیک (۴۰:۵۰:۱۰)
۹. اتیل استات: کلروفرم: متانول (۳۵:۵۵:۱۰)
۱۰. اتیل استات: کلروفرم: متانول (۳۲:۵۳:۱۵)
۱۱. اتیل استات: کلروفرم: متانول (۳۰:۵۰:۲۰)
۱۲. اتیل استات: کلروفرم: متانول (۲۸:۴۵:۲۵)
۱۳. اتیل استات: تری‌فلورو استیک اسید: متانول: آب (۹:۰/۰۴:۰/۴:۱)

Archive of SID

www.SID.ir

۱۴. اتیل استات: تری‌فلورو استیک اسید: متانول: آب (۹:۰/۱:۰/۴:۰/۵)

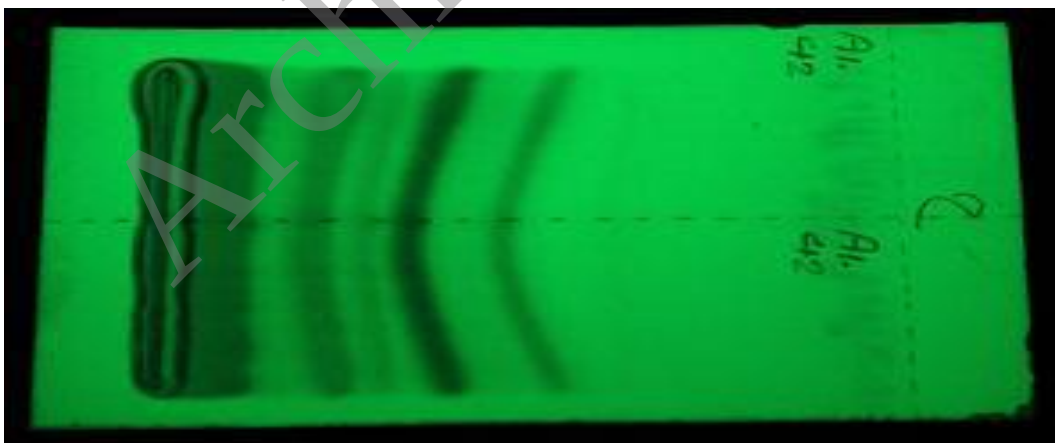
۱۵. اتیل استات: تری‌فلورو استیک اسید:آب (۱۰۰:۰/۰۵:۲۶)

۱۶. اتیل استات: تری‌فلورو استیک اسید: متانول: آب (۹:۰/۱۵:۰/۵:۰/۵)

۱۷. بوتانول: تری‌فلورو استیک اسید: آب (۴:۰/۰۴:۵)

سیستم‌های حلال ۱، ۱۲ و ۱۴ با وجود جداسازی مناسب، به دلیل خاصیت ضد میکروبی مورد استفاده قرار نگرفت. در مطالعه حاضر به دلیل اجزای بهتر، جداسازی اجزای عصاره اتیل استاتی با کمک سیستم حلال اتیل استات: کلروفرم: متانول (۲۸:۴۵:۲۵) به روش کروماتوگرافی لایه نازک (Thin-layer chromatography یا TLC) و به کمک صفحات کروماتوگرافی سیلیکاژل GF۲۵۴، (شرکت Merck، آلمان) انجام گرفت (شکل‌های ۱ و ۲)؛ به این ترتیب که کروماتوگرام در سیستم حلال مذکور قرار گرفت و محلول ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره اتیل استاتی، ۵ بار به صورت خطی کاشته شد. پس از خارج کردن کروماتوگرام از تانک کروماتوگرافی و سرد شدن و تبخیر کامل حلال، کروماتوگرام‌ها در داخل محیط مولر هینتون آگار مذاب حاوی ۰/۱ درصد توئین ۸۰ که با رقت ۱۰۰:۱ از سوسپانسیون McFarland میکروبی تلقیح شده بودند، غوطه‌ور شدند. این صفحات در داخل پتری دیش های حاوی مقداری محیط کشت جامد گذاشته شد و پس از ۴۸ ساعت نگهداری در یخچال، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند.

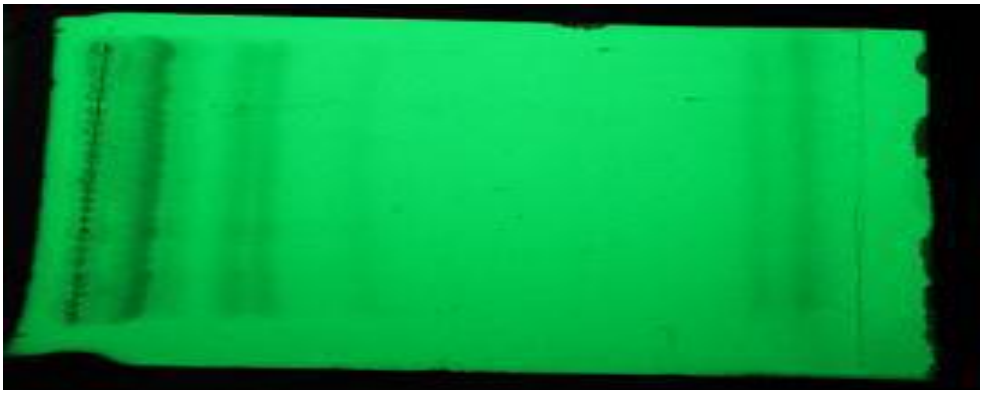
در پایان، محلول آبکی ۲ درصد معرف تترازولیوم (INT p-iodonitrotetrazolium violet) (شرکت Merck، آلمان) بر روی صفحات، اسپری و دوباره ۳ ساعت گرماگذاری شدند (۲). تشکیل هاله شفاف بر روی زمینه ارغوانی، نشانه حضور ترکیب ضد باکتریایی است. به عبارت دیگر، تولید آنزیم دهیدروژناز توسط میکروب‌های زنده و احیای معرف INT، موجب ایجاد رنگ ارغوانی می‌گردد (۲). در ادامه R_f مربوط به هر لکه با اثر ضد باکتریایی تعیین شد. R_f شاخص مهمی در تعیین مقدار حرکت یک ترکیب بر روی یک فاز ثابت توسط یک سیستم حلال است و بر اساس نسبت فاصله پیموده شده توسط ترکیب ضد باکتریایی از مبدأ به میزان حرکت حلال از مبدأ محاسبه می‌شود.



شکل ۱. *جداسازی اجزای عصاره اتیل استاتی به روش TLC (Thin-layer chromatography) با استفاده از سیستم حلال اتیل استات: کلروفرم: متانول*

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲. *جداسازی اجزای عصاره اتیل استاتی به روش TLC (Thin-layer chromatography) با استفاده از سیستم حلال اتیل استات: تری‌فلورو استیک اسید: متانول: آب*

نتایج

پایین‌ترین میزان MIC عصاره تام برای سودوموناس ائروژینوزا، اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و باسیلوس سابتیلیس، ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. این میزان در مورد استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و سالمونلا تیفی ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای باسیلوس لیکنی فرمیس ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. از آن‌جا که مقادیر فراکسیون‌های به دست آمده برای تعیین MIC کافی نبود؛ بنابراین از روش انتشار از دیسک جهت بررسی اثر ضد میکروبی آن‌ها استفاده گردید که نتایج آن در جدول ۱ ارایه شده است. نتایج حاصل شده از روش انتشار از دیسک نشان داد که بهترین اثر ضد میکروبی مربوط به عصاره اتیل استاتی بود. پس از انجام بیواتوگرافی این فراکسیون، منطقه عدم رشد به طور واضح در اطراف ناحیه کاشت برای کلیه میکروب‌های مورد بررسی مشاهده گردید، اما تنها در مورد استافیلوکوکوس اورئوس لکه دیگری در محدوده R_f = ۰/۹ وجود داشت (شکل ۳).

جدول ۱. *میانگین قطر هاله عدم رشد فراکسیون‌های مختلف گیاه (میلی‌متر ± انحراف معیار) بر روی سویه‌های استاندارد میکروبی پس از سه بار تکرار آزمایش به روش انتشار از دیسک*

سویه باکتری	عصاره تام	فراکسیون پترولئوم اتری	فراکسیون دی‌کلرومتانی	فراکسیون اتیل استاتی	فراکسیون باقی‌مانده متانولی
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۵ ± ۱/۰	۱۲ ± ۱/۰	۱۳ ± ۱/۲	۲۶ ± ۱/۱	۲۲ ± ۱/۱
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	–	–	۷ ± ۰/۶	۱۸ ± ۰/۶	۸ ± ۱/۰
باسیلوس سابتیلیس	۱۱ ± ۱/۰	۱۳ ± ۱/۵	۱۸ ± ۱/۵	۱۵ ± ۲/۱	۱۷ ± ۱/۷
باسیلوس لیکنی فرمیس	۱۵ ± ۲/۷	۱۵ ± ۱/۱	۱۱ ± ۱/۱	۱۷ ± ۲/۷	۲۲ ± ۲/۰
اشریشیا کلی	–	–	–	۱۶ ± ۲/۷	–
کلبسیلا پنومونیه	۷ ± ۰/۰	–	–	۱۲ ± ۲/۷	–
سودوموناس ائروژینوزا	۱۰ ± ۰/۶	–	۱۰ ± ۰/۶	۱۶ ± ۰/۶	۱۱ ± ۱/۱
سالمونلا تیفی	۱۰ ± ۰/۶	۱ ± ۰/۶	۱۱ ± ۰/۶	۲۰ ± ۲/۷	۱۵ ± ۲/۹

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۳. *مقایسه کروماتوگرام شاهد با هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس حاصل از بیواتوگرافی فراکسیون اتیل استاتی*

بحث

بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت، ۸۰ درصد مردم کشورهای توسعه یافته از گیاهان دارویی برای درمان استفاده می‌کنند (۱۴). امروزه ترکیبات موجود در گیاهان جنس Ajuga به عنوان ترکیبات آنابولیک، ضد درد، ضد میکروب، ضد التهاب، کاهش دهنده فشار خون و آنتی‌اکسیدان مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۶، ۱۵). مطالعه حاضر که بر روی برگ‌های گیاه سمسک انجام شد، نشان داد که در روش انتشار از دیسک، اثر ضد باکتریایی (میانگین قطر هاله عدم رشد) فراکسیون اتیل استاتی که ترکیبات فنولی و فلاونوئیدهای به نسبت غیر قطبی را جدا می‌کند، بیش از سایر عصاره‌ها می‌باشد. این یافته با نتایج سایر مطالعات مبنی بر این‌که مواد دارای خواص ضد میکروبی به طور عمده به صورت غیر قطبی در طبیعت موجود هستند، سازگار است (۲).

در روش انتشار از دیسک، اثر ضد میکروبی این عصاره بر روی تمام سویه‌های مورد آزمایش مشاهده شد، اما در روش بیواتوگرافی، منطقه عدم رشد به طور واضح در اطراف ناحیه کاشت فراکسیون اتیل استاتی در مورد همه میکروب‌های مورد بررسی (به جز استافیلوکوکوس اورئوس) مشاهده گردید. کم بودن غلظت ترکیب فعال و جدا شدن استافیلوکوکوس اورئوس بر روی صفحه TLC، تبخیر آن و یا اکسیداسیون نوری می‌تواند یکی از دلایل این موضوع باشد (۲). علاوه بر این، شاید بتوان چنین نتیجه‌گیری کرد که اجزای تشکیل دهنده فراکسیون اتیل استاتی در صورتی که در مجاورت یکدیگر باشند، می‌توانند روی تمام سویه‌های باکتریایی مورد بررسی مؤثر واقع شوند، اما در صورت جداسازی توسط سیستم، حلال خواهند شد (۲). در مقاله حاضر ممکن است دو یا چند ترکیب در این فراکسیون دارای اثر ضد میکروبی باشند و تنها در صورتی که در مجاورت هم باشند اثر ضد میکروبی خود را بر روی باکتری‌های مورد مطالعه (به جز استافیلوکوکوس اورئوس) اعمال می‌کنند و یا ممکن است برخی اجزای موجود در این فراکسیون که خاصیت ضد میکروبی ندارند، عبور ترکیب مؤثره را از دیواره باکتری تسهیل نمایند. در نهایت جداسازی این اجزا توسط سیستم حلال منجر به ناکارامدی آن ترکیب می‌شود. اثر هم‌افزایی اجزای موجود در فراکسیون و یا نقش برخی اجزا در نفوذ ماده مؤثر، نیازمند مطالعات بیشتری است. در ضمن بررسی اثرات سمی و عوارض جانبی احتمالی ناشی از مصرف عصاره و نیز تعیین غلظت‌های مؤثره در شرایط داخل بدن *(In vivo)* نیز نباید از نظر دور بماند.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Parekh J, Chanda SV. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. *Turk J Biol* 2007; 31(1): 53-8.
2. Suleimana MM, McGaw LJ, Naidoo V, Eloff JN. Detection of antimicrobial compounds by bioautography of different extracts of leaves of selected South African tree species. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2010; 7(1): 64-78.
3. Moshafi M, Mofidi A, Mehrabani M, Mehrabani M. Antibacterial activities of essential oil and composition of Stachys acerosa Boiss. *J Med Plants* 2010; 9(33): 108-15.
4. Chen H, Tan RX, Liu ZL, Zhang Y, Yang L. Antibacterial neoclerodane diterpenoids from Ajuga lupulina. *J Nat Prod* 1996; 59(7): 668-70.
5. Vohra A, Kaur H. Chemical investigation of medicinal plant Ajuga bracteosa. *J Nat Prod Plant Resour* 2011; 1(1): 37-45.
6. Cantrell CL, Rajab MS, Franzblau SG, Fronczek FR, Fischer NH. Antimycobacterial ergosterol-5,8-endoperoxide from Ajuga remota. *Planta Med* 1999; 65(8): 732-4.
7. Hamden K, Ayadi F, Jamoussi K, Masmoudi H, Elfeki A. Therapeutic effect of phytoecdysteroids rich extract from Ajuga iva on alloxan induced diabetic rats liver, kidney and pancreas. *Biofactors* 2008; 33(3): 165-75.
8. Ali-Shtayeh MS, Yaghmour RM, Faidi YR, Salem K, Al-Nuri MA. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *J Ethnopharmacol* 1998; 60(3): 265-71.
9. Samsam Shariat H. Extracting active ingredients of medicinal plants. 2nd ed. Isfahan, Iran: Mani Publication; 2007. p. 12-20. [In Persian].
10. Moshafi MH, Mehrabani M, Zolhasab H. Antibacterial activity studies of Salvia Mirzayanii and Salvia Atropatana against six standard gram-positive and gram-negative bacteria. *J Kerman Univ Med Sci* 2004; 11(2): 109-18. [In Persian].
11. Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS, Gritsanapan W. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J Ethnopharmacol* 2005; 101(1-3): 330-3.
12. Onyeagba R, Ugbogu O, Okeke C, Iroakasi O. Studies on the antimicrobial effects of garlic (Allium sativum Linn), ginger (Zingiber officinale Roscoe) and lime (Citrus aurantifolia Linn). *Afr J Biotechnol* 2005; 3(10): 552-4.
13. Wagner H, Blandt S. Plant drug analysis. Berlin, Germany: Springer; 1996. p. 164-8.
14. Saj OP, Roy RK, Savitha SV. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oil of Feijoa sellowiana O. Berg.(pineapple guava). *Journal of Pure and Applied Microbiology* 2008; 2(1): 227-30.
15. Gautam R, Jachak SM, Saklani A. Anti-inflammatory effect of Ajuga bracteosa Wall Ex Benth. mediated through cyclooxygenase (COX) inhibition. *J Ethnopharmacol* 2011; 133(2): 928-30.
16. Turkoglu S, Turkoglu I, Kahyaoglu M, Celik S. Determination of antimicrobial and antioxidant activities of Turkish endemic *Ajuga chamaepitys (L.) Schreber subsp. euphratica* P.H. Davis (Lamiaceae). *J Med Plant Res*. 2010; 4(13): 1260-8.

Archive of SID

www.SID.ir

Study of Antibacterial Effects of Different Fractions of Leaves Extract of Ajuga Chamaecistus Ging. Subsp. Scoparia (Bioss) Rech. f. and Bioautography of Effective Fraction

Moshefi M.H., Ph.D.[1], Mehrabani M., Ph.D.[2], Moeini M., Pharm. D.,[3], Saffari F., M.Sc.[4*]

1. Professor, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Kerman University of Medial Sciences, Kerman, Iran
2. Associate Professor, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
3. Pharmacist
4. Ph.D. Candidate of Medical Bacteriology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

* Corresponding author; E-mail: fereshtesaffari@yahoo.com

(Received: 8 June 2013 Accepted: 19 Nov. 2013)

Abstract

Background & Aims: Today, the emergence of antimicrobial resistance against conventional antibiotics is increasing. Many researchers consider plants with antimicrobial properties as a good alternative. In this study, the antimicrobial activity of Ajuga chamaecistus Ging. Subsp. Scoparia (Bioss) Rech. f. on 8 bacterial strains was investigated.

Methods: The leaf extract was prepared by methanolic maceration. The concentrated, dried extract was fractionated by different solvents including petroleum ether, dichloro methane, and ethyl acetate. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of crude extract was performed using agar dilution method. Disk diffusion method was used for antimicrobial assay of different fractions. Then, the chemical constituents of the most effective fraction were separated on thin-layer chromatography (TLC) plates. Then, the prepared chromatograms were analyzed using immersion bioautography.

Results: According to disk diffusion method, ethyl acetate fraction had stronger antibacterial activity against all tested bacteria. Bioautography of this fraction showed antibacterial activity against Staphylococcus aureus in $R_f = 0.9$. However, all tested bacteria had inhibition spots in the site of fraction loading.

Conclusion: Antibacterial activity of ethyl acetate fraction will appear if all components are used together.

Keywords: Ajuga chamaecistus, Antibacterial activity, Immersion bioautography

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2014; 21(4): 313-320

Archive of SID

www.SID.ir