

بررسی خواص ضد میکروبی اسانس گیاه پامچال صخره‌ای (*Dionysia revolute*) بر باکتری *Staphylococcus aureus* و تعیین ترکیبات شیمیایی آن به روش GC-Mass

سارا سعادت‌مند^۱، علیرضا علاء‌الدینی^۲، مجیب صالحی^۳

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران علوم و تحقیقات. s_saadatmand@yahoo.com

۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران علوم و تحقیقات.

۳- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران علوم و تحقیقات.

تاریخ دریافت: ۸۷/۴/۱۵ تاریخ پذیرش: ۸۷/۸/۲۳

چکیده

پامچال صخره‌ای (*Dionysia revolute*) گیاهی دارویی و بومی ایران است که جهت رفع مشکلات گوارشی و درمان زخم‌های عفونی استفاده می‌گردد. هدف از این تحقیق بررسی ترکیبات شیمیایی و اثر عصاره این گیاه بر باکتری استافیلوکوکوس طلایی (*Staphylococcus aureus*) می‌باشد. در این تحقیق از ارتفاعات کوه گنو (۱۳۴۸ متری از سطح دریا) در استان هرمزگان در ماه‌های فروردین و اردیبهشت سال ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ در سه نوبت نمونه گیاهی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها ابتدا به مدت ۱۲ ساعت در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از آن بقیه مراحل خشک شدن در دمای اتاق و در سایه صورت پذیرفت. برای شناسایی ترکیبات دارویی گیاه و بررسی خاصیت ضد میکروبی آن، اسانس و عصاره‌های اتانولی، اتری و آبی گیاه تهیه و شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس گیاه به وسیله GC-Mass صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که هر سه عصاره گیاه خاصیت ضد میکروبی داشته و از این میان عصاره اتانولی اثر ضد میکروبی بیش‌تری بر رشد استافیلوکوکوس طلایی دارد، به طوری که قطر هاله عدم رشد ناشی از آن مشابه آنتی‌بیوتیک اریترومیسین و سفالکسین بود. در آنالیز ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه ۲۲ ترکیب شناسایی شد که برخی از آن‌ها دارای اثرات دارویی و ضدباکتری می‌باشند.

کلید واژه: پامچال، استافیلوکوکوس طلایی، اثرات ضد میکروبی، GC-Mass.

مقدمه

دارای ترکیبات آروماتیک از جمله زردچوبه، فلفل، دارچین، لیمو و غیره از اهمیت بسیار زیادی برخوردار هستند (۱). جنس دیونیزیا (*Dionysia fanzl*) متعلق به خانواده Primulaceae به دلیل عدد پایه کروموزومی متفاوت (n=10)، لوله کورولای طویل و دارا بودن یک کپسول پنج قسمتی از جنس پامچال (*Primula*) قابل

استفاده از محصولات گیاهی برای درمان بیماری‌ها در جوامع بشری رو به رشد می‌باشد. سازمان بهداشت جهانی (WHO) تخمین زده است که در حدود ۸۰٪ مردم جهان جهت رفع بسیاری از بیماری‌ها از گیاهان دارویی سنتی استفاده می‌نمایند. از این میان گیاهان

۸۰ درصد، دی اتیل اتر و آب ریخته و به مدت ۷۲ ساعت هر محلول را در یخچال قرار داده و سپس صاف گردید (۷).

بررسی اثر عصاره الکلی، اتری و آبی بر باکتری

۱- ابتدا سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با رقت 10^{-1} تهیه گردید. سپس در سه لوله آزمایش به صورت جداگانه به ترتیب ۲ سانتی متر مکعب عصاره اتری (لوله ۱)، ۲ سانتی متر مکعب عصاره اتانولی (لوله ۲) و ۲ سانتی متر مکعب عصاره آبی (لوله ۳) گیاه ریخته شد. سپس به هر کدام ۰/۵ سانتی متر مکعب محلول آلوده به میکروب اضافه و لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت نتایج بررسی گردید (۸).

۲- باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را بر روی محیط blood agar کشت داده و هر پلیت کشت به سه قسمت تقسیم گردید. در بخش A عصاره اتانولی، در بخش B عصاره اتری و در بخش C عصاره آبی اضافه گردید. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

۳- روش انتشار چاهکی: در محیط کشتی که کاملا آغشته به محلول استافیلوکوکوس اورئوس بود سه چاهک هم اندازه تهیه و در هر یک از چاهک ها حجم یکسانی از عصاره های اتری، اتانولی و آبی ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید (۹).

جهت مقایسه قطر هاله عدم رشد عصاره ها با آنتی بیوتیک های دیگر، از روش دیسک گذاری استفاده گردید. دیسک های آنتی بیوتیکی شامل سفالکسین، اریتروماسین، جنتامایسین، پنی سیلین، سیپروفلوکساسین، سفازولین، سفتریاکسین و فانکوماسین بود. این دیسک ها در محیط کشت باکتری قرار داده شد و بعد از ۲۴ ساعت

تمیز می باشد (۲). این گیاه جنس تپیک ایران و تورانی بوده و محدود به ناحیه فلور ایران، از جنوب غربی آنتولیا و غرب ایران تا تاجیکستان و افغانستان می باشد، ۳۰ گونه از این جنس مختص ایران است (۳). پامچال صخره ای (*Dionysia aretioides*) در ارتفاعات البرز و سایر گونه های این جنس در ارتفاعات زاگرس و در شکاف سنگ ها و اوج کوهستان به صورت بوته های کوچک همراه با برگ های گوشتی، فلس مانند و گل های زرد رنگ به عنوان پتانسیل ویژه ی گردشگری ایران در این منطقه است (۴). موسم گل دهی این گیاه اوایل فروردین تا اواسط اردیبهشت ماه می باشد. بومیان منطقه از ترکیبات این گیاه جهت درمان ناراحتی های گوارشی و زخم های عفونی استفاده می کنند (۵). باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مولد بسیاری از بیماری های پوستی، بیماری مننژیت باکتریایی، سندروم شوک توکسیک و بسیاری دیگر از بیماری ها است (۶). از آن جایی که تاکنون ترکیبات دارویی این گیاه بررسی نشده است هدف از این تحقیق شناسایی ترکیبات دارویی گیاه و بررسی تاثیر عصاره آن بر باکتری استافیلوکوکوس طلائی (*Staphylococcus aureus*) می باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه

نمونه گیاهی در سه نوبت طی دو سال، هر سال در ماه های فروردین و اردیبهشت از ارتفاعات کوه گنو (۱۳۴۸ متری از سطح دریا) در استان هرمزگان جمع آوری و به آزمایشگاه گیاه شناسی مرکز تحقیقات و منابع طبیعی و کشاورزی بندرعباس منتقل گردید. نمونه ها ابتدا به مدت ۱۲ ساعت در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت و پس از آن بقیه مراحل خشک شدن در دمای اتاق و در سایه صورت پذیرفت.

عصاره گیری

برای تهیه عصاره های مختلف این گیاه، ۵۰ گرم گیاه خشک شده را جداگانه در ۳۰۰ سانتی متر مکعب اتانول

نتایج

در هیچ کدام از لوله‌های محتوی عصاره‌های گیاهی و سوسپانسیون ۰/۵ مک‌فارلند باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با رقت 10^{-1} رشد نکرده و نتایج اسپکتروفوتومتری نیز تأییدکننده همین مساله بود (شکل ۱).

قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری و با اندازه قطر هاله عدم رشد عصاره مقایسه گردید (۱۰).

تهیه عصاره گیاهی جهت GC-Mass

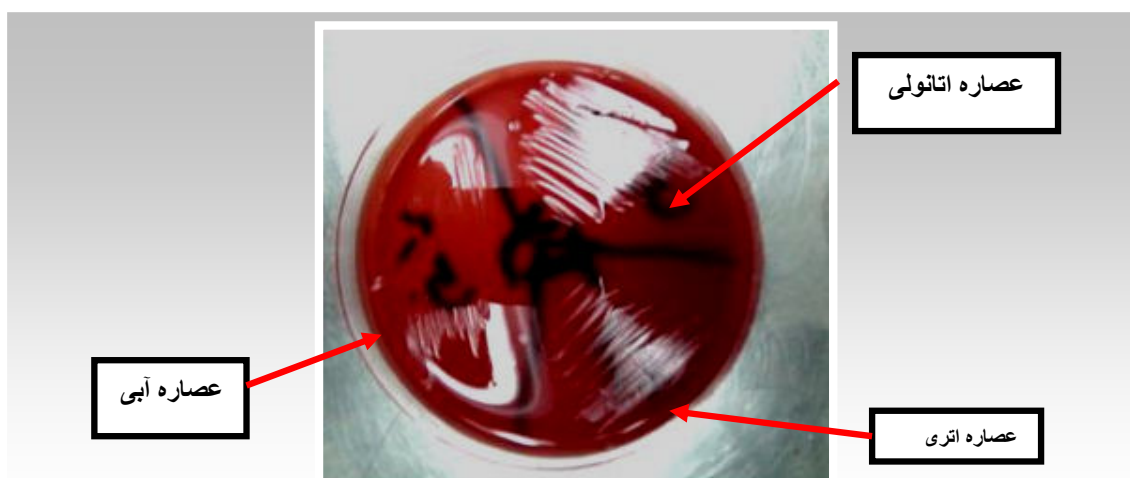
مقدار ۱۰۰ گرم پودر بخش‌های هوایی گیاه با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دستگاه کلونجر به روش تقطیر در آب اسانس‌گیری شد. اسانس حاصل به کمک دستگاه GC-Mass تجزیه و نتایج آن مورد بررسی قرار گرفت (۵).



شکل ۱- استافیلوکوکوس اورئوس با رقت 10^{-1}

استافیلوکوکوس اورئوس گردیده است (شکل ۲).

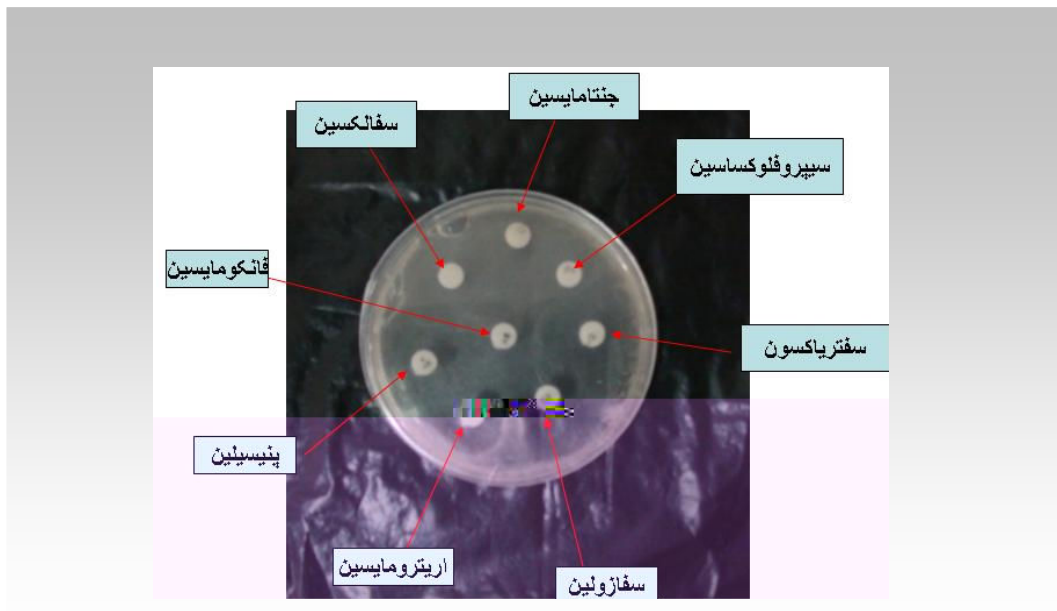
در نتایج کشت تقسیمی مشاهده شد که عصاره‌های مختلف گیاهی موجب عدم رشد باکتری



شکل ۲- تأثیر عصاره‌های گیاهی مختلف بر باکتری *Staphylococcus aureus* در محیط Blood agar.

می‌باشد جدول (۱) و شکل (۳). هم چنین قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی در مقایسه با عصاره آبی و اتری مقدار بیش تری می‌باشد (شکل ۴).

با مقایسه قطر هاله عدم رشد (MIC) آنتی‌بیوتیک‌ها با عصاره آبی، اتری و اتانولی مشاهده گردید، قطر هاله عدم رشد در عصاره اتانولی گیاه هم‌سنگ دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفالکسین و اریترومايسين مورد استفاده



شکل ۳- اثر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر قطر هاله عدم رشد باکتری.

جدول ۱- قطر هاله عدم رشد برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها بر باکتری

Staphylococcus aureus

قطر هاله بر حسب میلی‌متر	آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده	ردیف
۲۵	سفالکسین	۱
۲۵	اریترومايسين	۲
۲۴	جنتامایسین	۳
۲۲	فانکومايسين	۴
۱۸	پنی سیلین	۵
۱۵	سفازولین	۶
۲۷	سیپروفلوکساسین	۷
۲۳	سفتریاکسین	۸
۲۵	عصاره اتانولی گیاه	۹



شکل ۴- اثر عصاره‌های الکلی، اتانولی و اتری بر قطر هاله عدم رشد باکتری.

قطر هاله عدم رشد در عصاره اتانولی گیاه *revoluta Dionysia* تقریباً هم سطح دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفالکسین و اریترومايسين می‌باشد (شکل ۵).

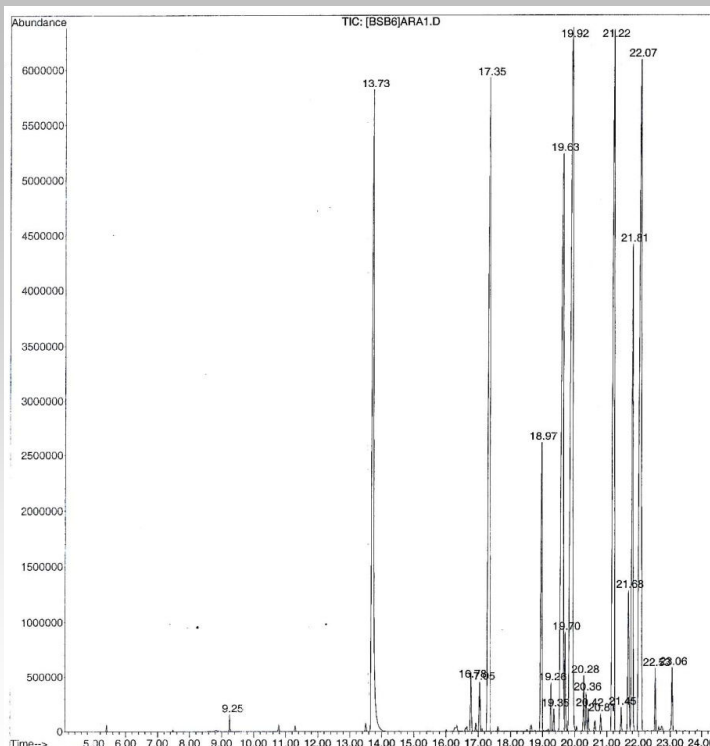


شکل ۵- مقایسه هاله عدم رشد باکتری عصاره اتانولی، اریترومايسين، سپیروفلوکساسین، سفالکسین.

بحث

با زمان بازداری ۱۷/۳۵ دقیقه و سطح زیر منحنی ۱۱/۵۸٪ می‌باشد، ترکیبی است که از شکست و تجزیه دوپامین در مغز ممانعت می‌نماید. سطوح پایین این ماده در ایجاد بیماری پارکینسون دخیل می‌باشد (۱۱ و ۷). بیزابولول که سیزدهمین پیک کروماتوگرام با زمان بازداری ۲۰/۳۶ دقیقه می‌باشد، یک الکل سزکوئی‌ترپنوئیدی حلقوی است که رایحه ضعیف و شیرین بسیاری از گل‌ها از جمله بابونه مربوط به این ترکیب می‌باشد. بیزابولول یک ماده غیر قابل حل در آب و گلیسرین بوده که در اتانول به خوبی حل می‌گردد. این ترکیب دارای خاصیت التیام دهنده‌گی و ضد باکتری می‌باشد (۸). کوئینولین هشتمین پیک کروماتوگرام است و یک ماده آلی آروماتیک و معطر می‌باشد که پیش‌ساز برخی از ترکیبات از جمله عده‌ای از آفت‌کش‌ها می‌باشد. این ترکیب در آب سرد قابل حل بوده اما در آب گرم غیر قابل حل می‌باشد (۱۲ و ۴). تیمول ترکیب دیگر این گیاه می‌باشد که دومین پیک در کروماتوگرام است. تیمول

گیاه دیونیزیا بومی ایران و از جمله گیاهان دارای ترکیبات آروماتیکی می‌باشد که به جز بررسی‌های سیستماتیکی مطالعه دیگری در مورد آن صورت نگرفته است. نتایج به دست آمده از آزمون‌های میکروبی و کروماتوگرام GC-Mass نشان می‌دهد، گیاه دارای اثرات ضد میکروبی است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد عصاره آبی، اتری و اتانولی گیاه دیونیزیا نشان می‌دهد که تمامی این عصاره‌ها تاثیر ضد باکتری بر روی استافیلوکوکوس اورئوس داشته و از این میان عصاره اتانولی موثرتر بوده است. MIC به دست آمده از عصاره اتانولی گیاه دیونیزیا تقریباً هم اندازه MIC آنتی‌بیوتیک‌هایی از جمله سفالکسین و اریترومايسین می‌باشد. نتایج بدست آمده از تجزیه اسانس گیاه نیز توسط GC-Mass این یافته را تایید می‌نماید. تعدادی از ترکیبات موثر گیاه عبارتند از: ترکیب سلجیلین (Selegiline) که پنجمین پیک کروماتوگرام



شکل ۶- کروماتوگرام اسانس گیاه *Dionysia revolute*

ضدباکتریایی دارد. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که استفاده مردم بومی ناحیه بندر عباس از این گیاه جهت التیام زخم‌ها و رفع مشکلات معده با یافته‌های ما هم‌خوانی داشته و با مطالعه بیشتر بر روی این گیاه می‌توان در تهیه دارو از آن استفاده نمود.

یک فنول مونوترین است که ایزومر کارواکرول (Carvacrol) می‌باشد. این ماده در روغن آویشن (Thyme) وجود داشته و دارای عطر مطبوعی است. در آب به سختی حل می‌گردد و در حلال‌های آلی مانند اتانول به راحتی قابل حل است. تیمول خاصیت ضدعفونی‌کنندگی داشته و اثرات ضد قارچی و

منابع

1. Mohd I A, Mahmud A W, Azizol A K. (2008) Planting of medical and aromatic plants in oil *Palm plantation*. Medical and Aromatic Plants Online.
2. Beatri, S. (2001) Bisabolol. *Acta Biochem.* 13: 91.
3. Magnus L. (2007) The genus *Dionysia* (Primulaceae), a synopsis and five new species. *Wildenowia.* 37: 37-61.
4. Aromatic plants online database. (2008).
5. In-Sook RIM and Cha-Ho JEE. (2006) Acaricidal effects of herb essential oils against *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari:Pyroglyphidae) and qualitative analysis of a herb *Mentha pulegium* (pennyroyal). *Korean Journal of Parasitology.* 44 (2): 133-138.
6. Parkinsone Drogos online.
7. Motalleb G , Hanachi P. (2005) Evaluation of Phenolic content and total antioxidant activity in *Berberis vulgaris* fruit extracts. *J.Biol.Sci.* 648-653.
8. Wendelbo P. (1961) Studies in Primulaceae I. A monograph of genus *Dionysia*. Aarbo Univ.Bergen, Mat. Naturvitensk.Ser. (3).
9. Gaudereau C, Gilbert H. (1997) Comparison of disc diffusion and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 39:707-712.
10. National committee for clinical laboratory standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. (2004) Fourteenth informational supplement, M100-S14, Wayne, PA: NCCLS.
11. Wikipedia Selegine online.
12. Perry L M, Metzger J C. (1996) Trade in medicinal and aromatic plants in Malaysia. *Frim reports.* No.71.

Abstract

Dionysia revuluta is an endemic plant in Iran that is used for gastric disease prevention and also infectious wounds healing. In this study, the biochemical component of *Dionysia revuluta* and its antibacterial effects against *Staphylococcus aureus* were examined. The plant samples were harvested from Geno Mountain of Hormozgan Province in April and March of 2006 and 2007 for three times. Initially, the shoots of sample plants dried by oven in 60°C and then transferred to the shade. In order for determination of biochemical component and also antibacterial effects examination, the ethanol, ether, and methanol essence of the plant was extracted and biochemical component of extracts was determined by GC-Mass. The results showed that all three extracts had antibacterial effects and among them the ethanol extraction had higher antibacterial effect on the growth of *Staphylococcus aureus* in such a way that the MIC of plant extractions was equal with Erythromycin and Cephalexin. The results of GC-Mass showed that *Dionysia* have 22 biochemical compounds that the some of these compounds have antibacterial and medical effects

Key words: *Dionysia revuluta*, *Staphylococcus aureus*, antibacterial effect, GC-Mass.

