بررسی اثر ضدمیکروبی عصارۀاتانولی و متانولی فلفل سیاه بر باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به شکل منفرد و بیوفیلم

فاطمه معصومی[۱]، مهدی حسن‌شاهیان[۱*]، مهستی محمدی[۱]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکدۀعلوم، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۰۴

چکیده

زمینه و هدف با افزایش مقاومت باکتریایی نسبت به داروهای شیمیایی و عوارض جانبی کم داروهای گیاهی، امروزه گیاهان دارویی کانون توجه قرارگرفته‌اند. در این مطالعه اثر ضدباکتریایی عصاره‌های الکلی فلفل سیاه علیه ۶ سویۀ بالینی مقاوم به آنتی‌بیوتیک ارزیابی می‌شود.

مواد و روش‌ها استخراج عصارۀالکلی به روش ماسراسیون تغییریافته انجام شد. ۶ سویۀ باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک شامل: *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *باسیلوس سرئوس*، *آسینتوباکتر* و *کلبسیلا* انتخاب و تأثیر عصاره‌ها به روش دیسک دیفیوژن روی آنها بررسی شد.در ادامه حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به روش ماکروبراث دایلوشن تعیین شد. همچنین اثربخشی این عصاره‌ها بر تشکیل و تخریب بیوفیلم و مهار فعالیت آنزیمی باکتری‌ها انجام شد.

یافته‌ها در قسمت دیسک پلیت بیشترین و کمترین اثر مهارکنندگی مربوط به عصارۀ اتانولی به‌ترتیب روی سویه‌های *استافیلوکوکوس* و *اشریشیاکلی*است. عصارۀ متانولی با بیشترین مقدار MIC (۵۰mg/ml) کمترین اثر را روی باکتری‌*سودوموناس* و با کمترین مقدارMIC (۲۵mg/ml) بیشترین اثر مهاری را روی *اشریشیاکلی* نشان داد. بیشترین اثر کشندگی مربوط به عصارۀ اتانولی باکمترینمقدارMBC (۲۵mg/ml) بر باکتری‌های *کلبسیلا*، *سودوموناس*، *باسیلوس* و *استافیلوکوکوس* ثبت شد.

بیشترین و کمترین مهار تشکیل بیوفیلم به‌ترتیب در تیمار با عصارۀ اتانولی و متانولی با غلظت ۲۵mg/ml بر سویۀ *استافیلوکوکوس* مشاهده شد. بیشترین تخریب ساختارهای بیوفیلمی در تیمار با عصارۀ اتانولی روی باکتری *اشریشیاکلی* و کمترین تخریب مربوط به عصارۀ متانولیروی باکتری *آسینتوباکتر* گزارش شده است. بیشترین مهار فعالیت آنزیمی درتیمار با عصارۀ متانولی روی سویۀ *آسینتوباکترو* کمترین اثر مهاری در تیمار با عصارۀ اتانولی روی سویۀ *کلبسیلا* مشاهده شد.

نتیجه‌گیری اگرچه کاربرد بالینی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی به دلیل عوارض جانبی، با ارزش به نظر می‌رسد؛ اما برای کاربرد بالینی عصاره‌های الکلی فلفل سیاه باید تحقیقات بیشتری در زمینۀمکانیسم عمل ترکیبات مؤثر این گیاهان روی عوامل میکروبی انجام شود.

کلیدواژه‌ها:
آثار ضدمیکروبی، داروهای شیمیایی، عصارۀ گیاهی، فلفل سیاه

مقدمه

امروزه رویکرد جدیدی نسبت به گیاهان دارویی به منظور استفاده از آنها به عنوان مواد ضدمیکروبی شده است. مطالعات نشان داده برخی از مشتقات گیاهی می‌تواند باعث متوقف کردن سنتز پپتیدوگلیکان در باکتری شوند [۱]. برخی دیگر به ساختمان غشایی آسیب بزنند [۲] یا باعث تغییر در

* **نویسندۀ مسئول: مهدی حسن شاهیان**
نشانی: کرمان،دانشگاه شهید باهنرکرمان، دانشکدۀعلوم، گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۹۱۳۲۹۰۶۹۷۱ **دورنگار:**
رایانه: hasanshahi@gmail.com; mshahi@uk.ac.ir
شناسه ORCID:
فاطمه معصومی: 0000-0001-5158-5828
مهدی حسن‌شاهیان: 0000-0001-9899-7168

مجلۀ علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورۀ ۲۵، شمارۀ ۴، مهر و آبان ۱۳۹۷، ص
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

هیدروفوبیسیتهٔ غشاء و به‌هم زدن کوئروم سنسینگ شوند [۳]. پس از ظهور آنتی‌بیوتیک‌ها در دهه ۱۹۵۰، استفاده از مشتقات گیاهی به‌صورت عوامل ضد میکروب به‌طور واقعی وجود نداشت؛ اما با پیدایش یافته‌های اخیر دانشمندان متوجه شدندکه قدرت ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌ها محدودشده‌است [۴].

با توجه به آثار مضر آنتی‌بیوتیک‌ها که شامل حساسیت شدید، سرکوب سیستم ایمنی، واکنش‌های حساسیت و مهم‌تر از همه رشد سویه‌های میکروبی مقاوم توسعهٔ داروهای ضدمیکروبی طبیعی مثل گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌های عفونی نیاز است [۵]. شمار زیادی از گیاهان، به‌منظور درمان برخی از بیماری‌ها استفاده می‌شوند؛ زیرا که فعالیت‌های ضدمیکروبی از خود نشان داده‌اند. در حال حاضر تخمین زده می‌شود که در حدود ۸۰ درصد از جمعیت دنیا به تأثیر ترکیبات گیاهی در درمان بیماری‌ها اعتقاد دارند [۶، ۷]. هزاران سال است که جوامع مختلف از ادویه‌ها برای افزودن طعم و مزهٔ غذاها استفاده می‌کنند. آزمایش‌های علمی از اواخر قرن نوزدهم اثر ضدمیکروبی تعدادی از این ادویه‌ها را ثابت کرده است [۸].

فلفل سیاه با نام علمی *Piper nigrum* از خانوادهٔ پیپراسه[۱] است که درختچه‌ای با ساقهٔ راست داردکه بیشتر در هندوستان، نواحی گرم آمریکا و جنوب آسیا و به‌ندرت نیز در بعضی نواحی آفریقا یافت می‌شود. فلفل ادویه‌ای مصرفی است که نوعی چاشنی تند برای مواد غذایی است [۹،۱۰]. فلفل در درمان یبوست، گوش درد، بیماری قلبی، گزش حشرات، آبله دهانی، سوء هاضمه و دندان درد استفاده می‌شود [۱۱]. باکتری‌های مورد آزمون از باکتری‌هایی هستند که عمدتاً باعث مرگ و میر چشمگیری در جوامع بشری می‌شوند. در مطالعات بسیاری اثر ضدمیکروبی ادویه‌ها و گیاهان دارویی با آنتی‌بیوتیک‌ها مقایسه شده است. از زمان معرفی آنتی‌بیوتیک‌ها به جامعهٔ دارویی، سویه‌های مقاوم افزایش روز افزون داشته‌اند که به معضلی بزرگ در درمان بیماری‌ها تبدیل شده است. این امر باعث شده است که دانشمندان به‌طور جدی و مستمر در پی یافتن ترکیبات دارویی باشند تا بر این پدیده غلبه یابند.

هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف عصاره‌های اتانولی و متانولی فلفل سیاه بر فرم منفرد و بیوفیلم باکتری‌های پاتوژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک است.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

در این پژوهش، تأثیر عصاره‌های الکلی میوهٔ فلفل سیاه بر باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت مقاوم به دارو (ATCC ۱۱۸۹) *Staphylococcus aureus*، (ATCC ۱۲۹۸) *Bacillus cereus* و همچنین باکتری‌های گرم منفی مقاوم به دارو (ATCC ۲۷۸۵۳) *Pseudomonas aeruginosa*، (ATCC ۳۵۲۱۸) *Escherichia coli*، (ATCC ۱۶۱۱) *Acinetobacter* و (ATCC ۷۰۰۶۰۳) *Klebsiellapneumonia* تعیین شد. باکتری‌های بحث‌شده دراین پژوهش از دانشگاه علوم‌پزشکی کرمان و زاهدان تهیه شدند.کشت مرجع میکروارگانیسم‌های مذکور دریخچال نگهداری شده و هر ماه در نوترینت آگار تجدید کشت صورت گرفت.

جمع‌آوری نمونهٔ گیاه و عصاره‌گیری

دانهٔ گیاه مطالعه شده در این پژوهش از حومهٔ شهر کرمان جمع‌آوری و پس از شناسایی علمی، در سایه خشک و با آسیاب برقی و الک تا حد ممکن پودر شده و پودر حاصل برای تهیهٔ عصاره‌های گیاهی استفاده شد. عصاره‌گیری به روش ماسراسیون تغییریافته انجام شد. طی این فرایند پودر هرگیاه به‌ترتیب با حلال‌های آلی متانول ۹۶ درصد و اتانول ۸۰ درصد بانسبت جرمی-حجمی ۱:۱۰ مخلوط شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه مرتباً همزده شد. سپس به منظور حذف قطعات درشت گیاهی،ترکیب مذکور را از کاغذ صافی واتمن شمارهٔ ۱ عبور دادند. بعد از این مرحله محلول تغلیظ شده در انکوباتور ۴۰ درجه قرار گرفت تا پودر خشکی از عصاره به دست آید، این پودر تا زمان استفاده در ظروف شیشه‌ای تیره و در یخچال نگهداری شد [۱۲].

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های گیاه بر فرم منفرد باکتری‌های پاتوژن

تعیین میزان اثربخشی عصاره‌ها به روش انتشار دیسک

به منظور تعیین میزان اثرگذاری عصاره‌های تهیه شده بر فرم منفرد باکتری‌های مورد مطالعه از روش انتشار دیسک استفاده شد. نخست برای تهیهٔ محلول عصارهٔ مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر خشک تهیه شده در حجم مناسبی از حلال‌های مصرفی

۱. Piperacea

اتانول یا متانول کاملاً حل شـــده و به حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر رسـانده و به این ترتیب غلظت نهایی محلول ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. در هر یک از محلول عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاهان مورد آزمایش چند عدد دیسک بلانک (پادتن طب) به قطر ۶mm وارد شده و به مدت یک ساعت در آن و در دمای محیط باقی ماند. دیســک‌ها توســط پنس و در شــرایط آسـپتیک از محلول عصاره خارج و در پلیت استریل به فور ۴۰ درجهٔ سـانتی‌گراد منتقل شدند تا کاملاً خشک شوند [۱۳]. در این مطالعه دیســک‌های آغشــته به حلال‌های مصــرفی شــاهد آزمایش بودند.

به منظور انجام آزمون انتشـار دیسـک، یک لوپ ازکشـت مرجع هر باکتری به محیط نوترینتبراث منتقل شده و به مدت ۲۴ سـاعت انکوبه شد. سپس سوسپانسیون میکروبی حاصل تا رسیدن به کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند رقیق شد. در مرحلهٔ بعد به کمک سـوآپ استریلاز این سوسپانسیون نمونه برداشت شـده و در محیط مولرهینتون آگار کشـت سـفره‌ای انجام شد. درنهایت به کمک پنس اسـتریل دیسـک‌های حاوی عصـاره و حلال با فاصـــلهٔ منظم روی محیط قرار گرفته و پلیت به مدت ۲۴ ســاعت در دمای ۳۷ درجهٔ ســانتی‌گراد انکوبه شــد. قطر هاله‌های مهاری دیســـک‌های مذکور پس از انکوباســـیون و با خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شـد[۱۴]. این مرحله سـه بار تکرار و نتایج آن ثبت شد.

تعیین حــداقــل غلظــت مهارکنندگی (MIC[1]) و حداقل غلظت کشندگی (MBC[2])

پس از تأیید خاصیت ضدمیکروبی عصاره‌های اتانولی و متانولی گیـاه مورد مطـالعـه، MIC این عصـــاره‌ها با روش ماکروبراث دایلوشن و طبق پروتکل NCCLSI معین شد. نخست رقت‌های مختلف عصـاره‌های گیاه مورد مطالعه سـاخته شـد. رقت‌های مذکور شـامل ۱۰ رقت ۰/۱۹۵ mg/ml-۱۰۰ بودکه به شـیوهٔ رقیق‌سـازی متوالی و از محلول ذخیرهٔ عصاره‌ها تهیه شد. برای این منظور ۱۰ لولهٔ آزمایش اســتریل انتخاب وبه هر کدام ۱ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث استریل وارد شد. سپس به لولهٔ نخسـت ۱ میلی‌لیتر از عصـارهٔ با رقت ۱۰۰ mg/ml افزوده و به خوبی ورتکس شـــد تا غلظت نهایی این محلول ۵۰mg/ml به دسـت آید. ۱ میلی‌لیتر از این محلول در شـرایط آسـپتیک به لولهٔ دوم منتقل شـــد تا غلظت نهایی در این لوله، نصـــف لولهٔ نخســـت و برابر ۲۵ mg/ml شـــود. به همین ترتیب رقت‌های بعدی عصاره در لوله‌های سوم تا دهم ساخته شد.

پس از آن برای تعیین MIC، ۱ میلی‌لیتر سـوسـپانسـیون باکتری ۲۴ ساعته که در نوترینت براث رشد کرده و به کدورت ۰/۵ مک فارلند رســانده شــده بود، به هر رقت افزوده شــد. لولـه‌های شـــاهد نیز برای هر رقت عصـــاره‌های مورد مطالعه درنظرگرفته شـد. تمامی مراحل ذکرشـده در شـرایط اسـتریل انجـام و لولـه‌هـا بـه مـدت ۲۴ ســـاعـت در دمای ۳۷ درجهٔ سـانتی‌گراد انکوبه شـد. پس از این مدت میزان کدورت ایجاد شـده در لوله‌های آزمون با شـاهد عصـاره مقایسـه وکمترین غلظتی که رشـد باکتری در آن مهار شـده بود به عنوان MIC انتخاب شد. این آزمون سه بار تکرار شد.

برای محاسبهٔ حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های گیاهی از لوله‌های تیمار تسـت MIC، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بر محیط مولرهینتون آگـار فـاقـد عصـــاره قرارگرفتـه و بـه کمک میلهٔ پخش‌کننده اسـتریل در سـطح پلیت پخش شـد. پلیتی که از لوله با کمترین غلظت عصـارهٔ آلوده شده و باکتری پس از یک دوره انکوباسـیون ۲۴ سـاعته در دمای ۳۷ درجهٔ سـانتی‌گراد درآن رشد نکرد به عنوان MBC تعیین شد [۱۵].

بررســی اثر ضــد میکروبی بر ســاختارهای بیوفیلمی باکتری‌های پاتوژن

تعیین اثر مهاری عصاره‌های گیاهی برتشکیل بیوفیلم

برای تعیین اثر عصاره‌های گیاه مورد مطالعه بر تشکیل بیوفیلم بـا باکتری‌های پاتوژن در این پژوهش از روش میکروپلیت تیتر اســتفـاده شـــد. در میکروپلیـت تهیه شـــده در این آزمون چـاهـک‌هـای تیمـار حاوی مقدار برابری از رقت‌های عصـــارهٔ گیاهی، سـوسـپانسیون میکروبی و چاهک کنترل حاوی مقدار برابری از سـوسـپانسیون میکروبی و حلال در نظر گرفته شد تا میزان اثر بخشـی عصـاره‌های گیاهی در زمانی که هیچ عامل مهاری در مجاورت میکروارگانیسم‌ها وجود ندارد مقایسه شود. بـه‌علـاوه بـه منظور حـذف تأثیر جذب نوری رقت‌های مختلف عصـاره و محیط کشـت، چاهک‌های شاهدی نیز در نظر گرفته شـــد. چـاهک شـــاهد عصـــارهٔ حاوی مقدار برابری از محیط تریپتیک ســوی براث اســتریل و رقت مورد نظر ازعصـــاره و چاهک شاهد محیط کشت حاوی محیط TSB استریل بود.

برای انجام این بررســی یک لوپاز کشــت مرجع باکتری به محیط TSB منتقل و ۱۸ ساعت انکوبه شد. سـوسـپانسـیون حاصـل تا رسیدن به کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند رقیق شد. ســه رقـت متوالی ۶/۲۵-۲۵ mg/ml از عصـــاره‌هـای اتانولی

۱. Minimum Inhibitory Concentration
۲. Minimum Bactericidal Concentration

ومتانولی گیاه مورد آزمایش به شیوهٔ رقیق‌سازی متوالی که در بخش قبلی آمـد، تهیـه و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به چاهک‌های تیمار و شاهد عصارهٔ میکروپلیت ۹۶ خانه وارد شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر ازسوسپانسیون باکتریایی به چاهک‌های تیمار و شـاهد افزوده شـد. در نهایت به چاهک شـاهد محیط کشـت ۲۰۰ میکرو لیتر و به چاهک‌های شـاهد عصـارهٔ ۱۰۰ میکرولیتر محیط TSB اسـتریل اضافه شد. میکروپلیت مذکور به مدت ۲۴ سـاعت و در دمای ۳۷ درجهٔسـانتی‌گراد، بدون حرکت انکوبه شد [۱۶].

پس از گذشـت زمان انکوباسیون میکروپلیت با رنگ‌آمیزی کریسـتال ویوله بررسـی شـد. در این مرحله برای شسـت‌وشو از PBS[1] اسـتفاده شـد. به منظور تهیهٔ PBS مقادیر ۸ گرم NaCl، ۱/۱۲ گرم K_2HPO_4 و ۰/۳۴ گرم KH_2PO_4 در ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شـده و پس از رسـاندن pH محلول به ۷/۸، ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و محلول حاصل به واسطه اتوکلاو استریل شد.

در رنگ آمیزی کریسـتال ویوله، نخست چاهک‌ها به آرامی درشـرایط آسـپتیک آسـپیره و سـپس ۲ مرتبه با PBS شسته شـدند. تثبیت ساختارهای بیوفیلمی با افزودن ۱۵۰ میکرولیتر متـانول به چاهک‌ها برای زمان ۱۰ دقیقه انجام شـد. بعد از آسـپیره متانول، ۲۰۰ میکرولیتر کریسـتال ویوله ۱ درصـد به چـاهک‌ها افزوده و میکروپلیت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه انکوبه شـد. شسـت‌وشوی رنگ اضافی از چاهک‌ها باجریان آرام آب شـیر انجام شـد و پس از خشـک شـدن میکروپلیت، ۱۶۰ میکرولیتر اسـید اسـتیک گلاسیال به چاهک‌ها افزوده و جذب نوری چاهک‌ها به وسـیلهٔ دسـتگاه الایزا ریدر و درطول موج ۶۳۰ نانومترخوانده شد [۱۷]. آزمایش با ۳ تکرار انجام شد.

تعیین اثر مهـاری عصـاره‌هـای گیـاهی بر بیوفیلم‌های تشکیل شده

به منظور تعیین قابلیت عصـاره‌های گیاهی مطالعه‌شـده در حذف بیوفیلم‌های میکروبی تشـکیل شـده نیز از روش نوسترو وهمکاران استفاده شد. در این سنجش، نخست بیوفیلم تشکیل و سـپس عصـاره‌های گیاهی برآن اثر داده شـد. در میکروپلیت تهیه شده برای این بررسی محتویات چاهک‌های تیمار و شاهد همانندآنچه در بخش تشـکیل بیوفیلم آمد، است. برای تشکیل بیوفیلم، همان‌طور که در بخش تشـکیل بیوفیلم نیز شرح داده شد، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی که به مدت ۱۸ سـاعت در محیط کشـت TSB رشد کرده و به کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند رسـانده شده بود به چاهک‌های آزمون و شاهد منفی وارد و میکروپلیت مذکور بدون حرکت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجهٔ سـانتی‌گراد انکوبه شـد. در این میکروپلیت چاهک‌های شـاهد محیط کشـت و شاهد عصاره نیز حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط TSB اسـتریل بود. پس از گذشـت زمان انکوباسـیون، چاهک‌ها با احتیاط و در شـرایط آسـپتیک تخلیه شـده و به منظور حذف سلول‌های پلانکتونیک ۲ مرتبه با PBS شست‌وشو انجام شـد. سـپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصـاره‌های گیاهی مورد نظر بـه چاهک‌های تیمار و شـاهد عصـاره افزوده شـد. به چـاهـک‌هـای شـاهـد محیط کشـت ۲۰۰ میکرولیتر و بـه چاهک‌های شـاهد سـوسپانسیون ۱۰۰ میکرولیتر محیط TSB اسـتریل افزوده شـده و میکروپلیتبدون حرکت به مدت ۲۴ ساعت دردمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد [۱۸].

به منظور بررسـی قابلیت هر عصـاره در حذف ساختارهای بیوفیلمی تشکیل شده از رنگ‌آمیزی کریستال ویوله و به همان روشـی استفاده شد که شرح آن دربخش تشکیل بیوفیلم آمده است.

تعیین اثر مهـاری عصـاره‌هـای گیاهی بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز سلول‌های باکتریایی در بیوفیلم

این بررسـی به منظور سـنجش میزان زنده ماندن باکتری‌های جـدا شـده از بیوفیلم در تیمار با رقت‌های مختلف عصـارک گیاهی و با کاربرد رنگ TTC انجام شد. TTC رنگی محلول در آب، قابل احیا و با پتانسیل ردوکس۰/۰۸v- است که به عنوان پـذیرندهٔ الکترون آنزیم دهیدروژناز باکتری عملکرده و طی این فرایند بهتر ی فنیل فورمازان احیا می‌شود. این واکنش با تغییر رنگ همراه بوده و به کمک تعیین جذب نوری در ۴۹۰ نانومتر بررسـی می‌شود. هرچه میزان رنگ تولیدی بیشتر باشد معرف فعـالیـت بیشـتـرآنزیم دهیـدروژناز در محیط آزمون بوده و به عبارت دیگر تعداد سـلول زندهٔ بیشـتری در این محیط وجود داشته است [۱۹].

برای تهیهٔ رنگ TTC نخسـت بافر آن سـاخته شـد که از ترکیب ۱/۲۱ گرم تریس هیدروکسی متیل آمینومتان[2] در ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به دست آمد. pH این محلول ۷/۸ تنظیم و حجم نهایی آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسـانده شـد. مقدار ۰/۲ گرم ازپودر رنگ TTC در ۸۰ میلی‌لیتر از بافر مذکور حل شـده و حجم نهایی به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسـانده شـد. از آنجا که محلول تهیه شده به نور بسیار حساس است در ظرف شیشه‌ای تیره و پوشانده شده با آلومینیوم در یخچال نگهداری شد.

۱. Phosphate buffered saline
۲. Tris (hydroxymethyi)- aminomethane

برای تعیین میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز نخست بیوفیلم‌های میکروبی به همان شیوه که در بخش قبل آمد تشکیل شده و سپس رقت‌های هر عصاره بر آن‌ها اثر داده شد. پس از گذشت زمان انکوباسیون به چاهک‌های تیمار و شاهد مقدار ۵۰ میکرولیتر از رنگ TTC افزوده و میکروپلیت به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از این مدت جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر تعیین شد [۲۰].

تحلیل آماری یافته‌ها

این پژوهش در قالب طرح فاکتوریل انجام و برای هر تیمارسه تکرار در نظرگرفته شد. داده‌های حاصل با نسخهٔ ۱۶ نرم‌افزار SPSS و با آزمون دو طرفهٔ آنالیز واریانس ANOVA بررسی و معناداری هر یک از پارامترهای مورد بررسی و همچنین اثر متقابل آنها به کمک آزمونLSD و با سطح معناداری ۰/۰۵ و ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ مقایسه شد.

نتایج

میزان قطر هالهٔ مهاری عصاره‌های اتانولی و متانولی فلفل روی باکتری‌های پاتوژن در جدول ۱ آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود بیشترین و کمترین اثر مهارکنندگی مربوط به عصارهٔ اتانولی به‌ترتیب بر سویه‌های *استافیلوکوکوس* و *اشریشیاکلی*است.

مقدار MIC و MBC عصاره‌های فلفل بر باکتری‌های پاتوژن در جدول ۲ آمده است. عصارهٔ متانولی با بیشترین مقدار MIC (۵۰mg/ml) کمترین اثر را روی باکتری *سودوموناس* و با کمترین مقدار MIC (۲۵mg/ml) بیشترین اثر مهاری را روی *اشریشیاکلی* نشان داد. بیشترین اثر کشندگی مربوط به عصارهٔ اتانولی باکمترین مقدارMBC (۲۵mg/ml) روی باکتری‌های *کلبسیلا*، *سودوموناس*، *باسیلوس* و *استافیلوکوکوس* ثبت شد.

قابلیت هریک از غلظت‌های مختلف عصاره‌های فلفل بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌های مورد بررسی در شکل ۱ مشخص شده است. بیشترین و کمترین مهار تشکیل بیوفیلم به‌ترتیب در تیمار با عصارهٔاتانولی و متانولی با غلظت ۲۵mg/ml بر سویهٔ *استافیلوکوکوس* مشاهده شد. تحلیل آماری نتایج حاصله از اثر عصاره‌های فلفل در جدول ۳ آمده است. با توجه به این جدول اثر عصارهٔ مذکور بر باکتری‌های متفاوت این پژوهش در سطح ۰/۰۵ معنادار است.

قابلیت هریک از غلظت‌های مختلف عصاره‌های فلفل در تخریب ساختارهای بیوفیلمی باکتری‌های مورد بررسی در شکل ۲ آمده است. بر این اساس بیشترین تخریب ساختارهای بیوفیلمی در تیمار با عصارهٔ اتانولی در غلظت ۱۲/۵mg/mlروی باکتری *اشریشیاکلی* (۹۳/۴ درصد) و کمترین تخریب مربوط به عصارهٔ متانولی در غلظت ۶/۲۵mg/ml روی باکتری *آسینتوباکتر* (۱۳/۹ درصد) گزارش شده‌است. تحلیل آماری نتایج حاصله از اثر عصاره‌های فلفل در جدول ۳ آمده است. با توجه به این جدول اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های مذکور بر باکتری‌های مختلف در تخریب بیوفیلم تشکیل شده معنادار است.

قابلیت هر یک از غلظت‌های مختلف عصاره‌های فلفل بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز باکتری‌های مورد بررسی درشکل ۳ و ۴ آمده است. براین اساس اثربخشی عصاره‌ها با غلظت رابطهٔ مستقیم دارد. بیشترین مهار فعالیت آنزیمی در تیمار با عصارهٔ متانولی در غلظت ۲۵mg/ml برسویهٔ *آسینتوباکتر* (OD=۰/۷) وکمترین اثر مهاری در تیمار با غلظت ۶/۲۵mg/ml عصارهٔ اتانولی برسویهٔ *کلبسیلا* (OD=۲/۱) مشاهده شد. با توجه به تحلیل آماری که در جدول ۳ آمده است اثرغلظت‌های مختلف عصاره‌ها بر باکتری‌های مختلف بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز معنادار است.

جدول ۱. میانگین قطر هاله‌های مهاری عصاره‌های گیاه مورد مطالعه بر باکتری‌ها (mm).

باکتری / عصاره	عصاره اتانولی	عصاره متانولی
استافیلوکوکوسارئوس	۲۵±۰/۵	۱۵±۰/۴
باسیلوسسرئوس	۸±۰/۱	۹±۰/۳
پسودوموناس آئروژینوزا	۸±۰/۲	۱۰±۰/۱
اشرشیاکلی	۷±۰/۳	۱۲±۰/۷
کلبسیلا	۸±۰/۲	۱۱±۰/۴
آسینتوباکتر	۹±۰/۱	۱۰±۰/۳

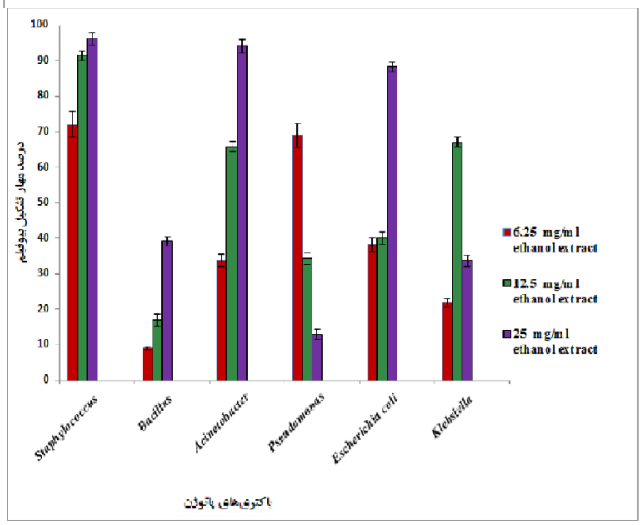
جدول ۲. مقادیر MIC و MBC باکتری‌ها (mg/ml).

عصاره / باکتری	عصاره اتانولی		عصاره متانولی	
	MBC	MIC	MBC	MIC
استافیلوکوکوسارئوس	۲۵	–	۵۰	۲۵
باسیلوسسرئوس	۲۵	–	۵۰	–
پسودو موناس آئروژینوزا	۲۵	–	–	۵۰
اشرشیاکلی	۵۰	۲۵	۵۰	–
کلبسیلا	–	۲۵	۲۵	–
آسینتوباکتر	–	۵۰	–	۵۰

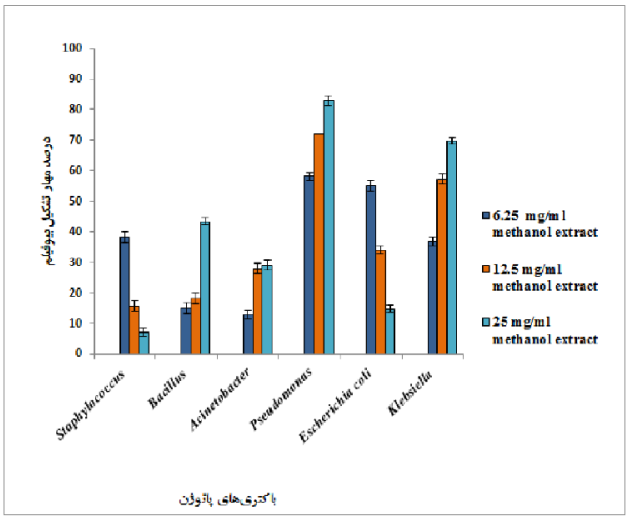
جدول ۳. تحلیل آماری یافته‌های حاصل از بررسی قابلیت مهار تشکیل و تخریب بیوفیلم و مهار فعالیت آنزیم دهیدروژناز توسط عصاره‌های فلفل.

منابع تغییر	درجه آزادی (df)			میانگین مربعات (MS)			سطح معناداری(Sig)		
	تشکیل بیوفیلم	تخریب بیوفیلم	مهار آنزیم	تشکیل بیوفیلم	تخریب بیوفیلم	مهار آنزیم	تشکیل بیوفیلم	تخریب بیوفیلم	مهار آنزیم
باکتری	۵	۵	۵	۰/۰۵۳	۰/۰۳۱	۰/۰۷۸	–	*	*
عصاره	۱	۱	۱	۰/۱۷۶	۰/۰۴۶	۰/۳۱۷	*	–	**
غلظت	۲	۲	۳	۰/۰۴۹	۰/۳۸۳	۳/۸۷۹	–	–	**
باکتری*عصاره	۵	۵	۵	۰/۱۴۴	۰/۰۵۰	۰/۰۳۸	–	**	–
عصاره*غلظت	۲	۲	۳	۰/۰۰۶	۰/۱۱۱	۰/۰۱۱	–	***	–
باکتری*غلظت	۱۰	۱۰	۱۵	۰/۰۴۶	۰/۰۰۷	۰/۰۲۴	–	–	–
کل	۲۵	۲۵	۳۲						

*: سطح معناداری ۰/۰۵ **: سطح معناداری ۰/۰۱ ***: سطح معناداری ۰/۰۰۱ -: فاقد سطح معناداری

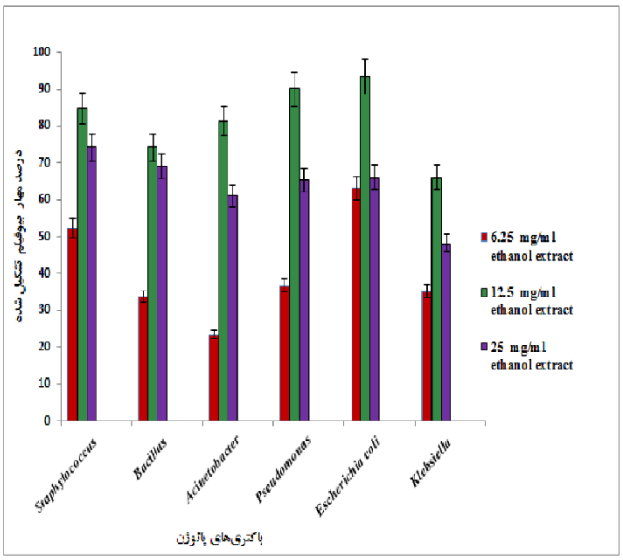


a)

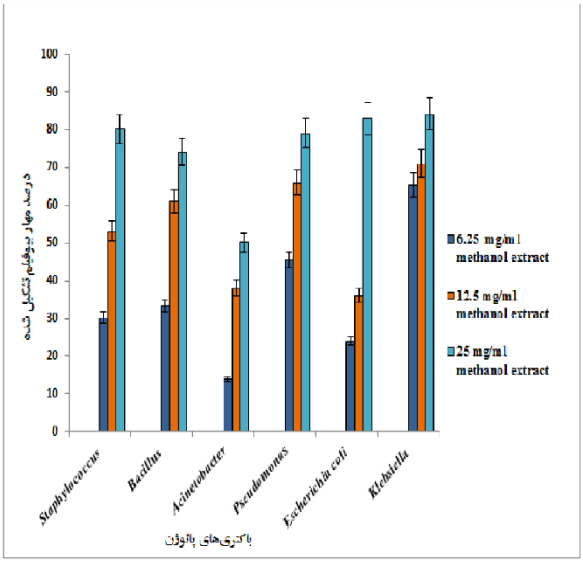


b)

شکل۱. a) مقایسهٔ تأثیر عصارهٔ اتانولی فلفل سیاه بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها b) مقایسهٔ تأثیرعصارهٔ متانولی فلفل سیاه بر بیوفیلم تشکیل شدهٔ باکتری‌ها

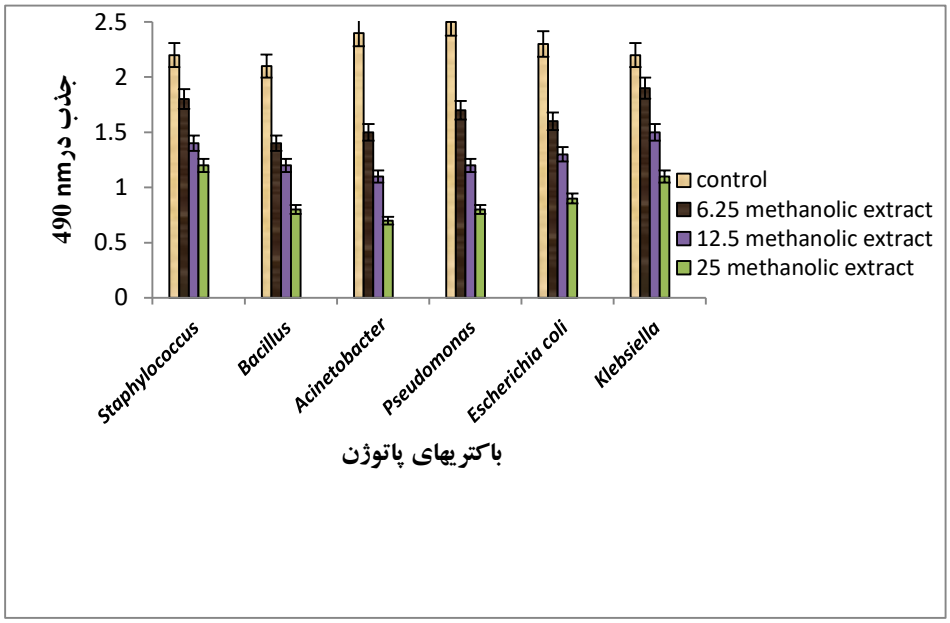


1)

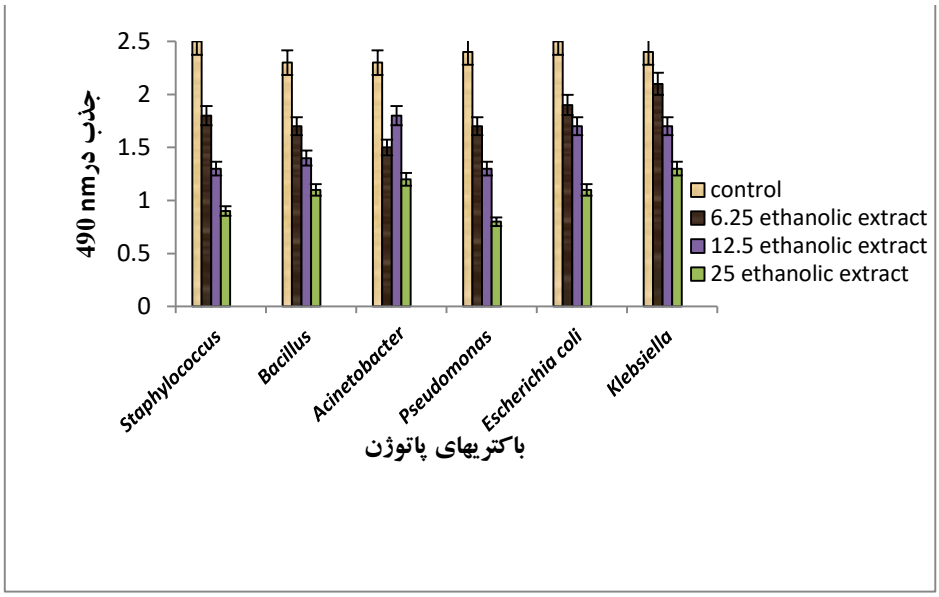


2)

شکل ۲ (۱ مقایسه تأثیر عصارهٔ اتانولی فلفل سیاه بر بیوفیلمت شکیل شده باکتری‌ها (۲ مقایسه تأثیرعصارهٔ متانولی فلفل سیاه بر بیوفیلم تشکیل شده باکتری ها



شکل ۳. مقایسهٔ تأثیر عصارهٔ متانولی فلفل بر آنزیم دهیدروژناز باکتری‌های پاتوژن



شکل ۴. مقایسهٔ تأثیر عصارهٔ اتانولی فلفل بر آنزیم دهیدروژناز باکتری‌های پاتوژن

بحث

در آزمون انتشار دیسک پلیت بیشترین اثر مهاری مربوط به عصارهٔ اتانولی بر باکتری *استافیلوکوکوس* و کمترین اثر مهاری مربوط به همین عصاره بر *اشریشیاکلی* مشاهده شد.

مقادیر MIC و MBC برای *P.nigrum* بر باکتری‌های مورد مطالعه در محدودهٔ غلظتی ۲۵-۵۰mg/ml به‌دست آمد. MIC عصارهٔ اتانولی جز بر باکتری *اشریشیاکلی* بر دیگر باکتری‌ها مشاهده نشد. همچنین MBC عصارهٔ متانولی بر دو باکتری *سودوموناس* و *کلبسیلا* وجود نداشت.

در محیط مایع به کاررفته در آزمون MIC عصاره‌های *P. nigrum* در غلظتی بسیار کمتر (۱۲/۵-۲۵میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) از غلظت به کاررفته در تهیهٔ دیسک (۱۰۰میلی‌گرم / میلی‌لیتر) رشد باکتری‌های مورد بررسی را مهار کردند و از این‌رو قابلیت مهاری عصاره‌های گیاه فلفل سیاه در محیط مایع چندین برابر

محیط جامد است. بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری کردکه ترکیبات مؤثر عصاره‌های *P. nigrum* همانند بسیاری از عصاره‌های گیاهی دیگر قابلیت انتشاری اندکی در محیط جامد داشته و بر این اساس برای اثرگذاری مطلوب در این محیط به غلظتی بسیار بیشتر از غلظت مؤثر در محیط مایع نیاز است. در مقابله با ساختارهای بیوفیلمی نیز عصاره‌های *P. Nigrum* بسیار کارآمد بوده و اثر مهاری هر عصاره به غلظت و نوع حلال آن و همچنین نوع باکتری مورد بررسی وابسته است.

بررسی‌های دورمن و همکارانش در سال ۲۰۰۰ بر عصاره تعدادی ازگیاهان دارویی از جمله فلفل سیاه نشان داد که عصارهٔ این گیاه اثر بازدارندگی روی *سودوموناسآئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد [۲۱].

در سال ۲۰۱۳ رنی و همکارانش با استفاده از روش چاهک پلیت آگار به بررسی فعالیت ضد باکتریایی فلفل سیاه پرداختند و نشان دادند که حداکثر قطر هاله مهاری بر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوک* (۱۸mm) و حداقل قطر هاله بر باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* (۸mm) است [۲۲].

مهرا و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که عصارهٔ ایزوپروپانولی فلفل سیاه فعالیت ضد میکروبی بسیاری علیه باکتری‌های *انتروباکترآئروژنز*[۱] و *باسیلوسبرویس*[۲] دارد که به عنوان مادهٔ ضدمیکروب طبیعی برای محصولات غذایی و مکمل غذایی از آن استفاده می‌شود[۲۳].

به‌طور کلی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره‌های گیاهی حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی هستند که ممکن است به علت تحمل ذاتی باکتری‌های گرم منفی و ترکیبات عصارهٔگیاه باشد [۲۴].

درآزمون تشکیل بیوفیلم عصاره‌ها تأثیرات متفاوتی روی باکتری‌ها نشان دادند. البته باید متذکر شد که برای مهار پدیدهٔ مذکور در باکتری‌های *استافیلوکوکوس*، *اشریشیاکلی* و *آسینتوباکتر* عصارهٔ اتانولی و در باکتری‌های *سودوموناس*، *کلبسیلا* و *باسیلوس* عصارهٔ متانولی کارآمدتر است. بیشترین اثر مهاری مربوط به عصارهٔ اتانولی بر *استافیلوکوکوس* بود. عصاره‌ها در سطح ۵ درصد بر باکتری‌های مختلف دارای اختلاف معنادار هستند.

در تخریب ساختارهایب یوفیلمی کارایی عصاره‌های *P.nigrum* بر اکثر باکتری‌ها، بیشتر از قابلیت آن‌ها در مهار پدیدهٔ تشکیل بیوفیلم است. دراین آزمون خاصیت تخریب‌کنندگی عصاره‌ها در رابطه با بیوفیلم‌های تشکیل شده دارای آثار متفاوتی است. *اشریشیاکلی* حساس‌ترین بیوفیلم را نسبت به عصاره‌های *P.nigrum* در غلظت ۲۵mg/ml تشکیل می‌دهد و این در حالی است که در غلظت ۶/۲۵mg/ml عصارهٔ اتانولی بر *کلبسیلا* دارای کمترین اثر مهاری است.

در مطالعهٔ میزان تأثیر عصاره‌ها بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز باکتریایی مشخص شدکه نوع اتانولی عصارهٔ *P.nigrum* در نابودی سلول‌های جدا شده از ساختمان بیوفیلم روی اکثر باکتری‌ها موثرتر ازنوع متانولی است. بیشترین مهار فعالیت آنزیمی در غلظت ۶/۲۵mg/ml مربوط به عصارهٔ متانولی بر *آسینتوباکتر* مشاهده شد و عصارهٔ اتانولی این گیاه در همین غلظت بر *کلبسیلا* دارای کمترین اثر بود. غلظت‌های مختلف عصاره‌ها بر باکتری‌های مختلف در پدیدهٔتخریب بیوفیلم و مهار فعالیت آنزیمی دارای اختلاف معنادار است.

در دیگر پژوهش‌ها به خواص ضد بیوفیلمی گیاه فلفل سیاه توجه کمتری شده است. برای مثال لی و همکارانش در سال ۲۰۱۴ قابلیت ضد بیوفیلمی و ضد همولیزی چندین عصارهٔ گیاهی از جمله فلفل سیاه را بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تأیید کردند. آنها نشان دادند که این عصاره ها بیش از ۷۵ درصد از تشکیل بیوفیلم این باکتری جلوگیری می‌کنند [۲۵، ۲۶، ۲۷]

از این‌رو می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌های فلفل سیاه قابلیت مناسبی در مهار پدیدهٔ تشکیل بیوفیلم پسودوموناس آئروژینوزا دارند که این امر در پژوهش پیش‌رو نیز تأیید شد [۲۸، ۲۹، ۳۰].

References

[1]. Ogunlana EO, Hoeglund S, Onawunmi G, Skoeld O. Effects of lemongrass oil on the morphological characteristics and peptidoglycan synthesis of *Escherichiacoli* cells. Microbios. 1987; 50:43-59.

[2]. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR. The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleucaalternifolia (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology.2000; 88:170-175.

[3]. Turi M, Turi E, Koljalg S, Mikelsaar M. Influence of aqueous extracts of medicinal plants on surface hydrophobicity of Escherichia coli strains of different origin. ActaPathologica, Microbiologica, etImmunologica Scandinavica.1997; 105:956-962.

[4]. Saeidi S, AminiBoroujeni N, Ahmadi H, Hassanshahian M. Antibacterial Activity of Some Plant Extracts Against Extended- Spectrum Beta-Lactamase Producing Escherichia coli Isolates. Jundishapur Journal of Microbiol. 2015; 38(2):e15434. doi: 10.5812/jjm.15434.

[5]. Berahou A, Auhmani A, Fdil N, Benharref A, Jana M, Gadhi CA. Antibacterial activity of quercus ilex bark's extracts . Journal Ethnopharmacol. 2007; 112(3): 426-429.

[6]. Indu MN, Hatha AAM. Antimicrobial activity of some of south – Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*,

۱. Enterobacteraerogenes

۲. Bacillus brevis

Salmonella, Listeria monocytogenes and Aeromonashydrophila . Braz.J.Microbiol.2006; 37(2)sao Paulo.
[7]. Mohsenipour Z, Hassanshahian M. The inhibitory effect of Thymus vulgaris extracts on the planktonic form and biofilm structures of six human pathogenic bacteria. Avicenna journal of phytomedicine. 2015; 5 (4): 309-317.
[8]. Snyder O. Peter. Antimicrobial effects of spices and herbs .page: 1-3,Hospitality Institute of Technology and Management. 1997; St.Paul, Minnesota .http://www.hi-tm.com/
[9]. Hou CY, Zhang J Q, Zhang Y M, Liu Y L. Studies on the chemical constituents of piper macropodum. Yao Hsueh HsuehPao. 1989; 24(10): 789-92.
[10]. Chevqller H A. The Encylopediat of medicinal plants. Doling Kinder Sicy Publish. 1996; 35, 112-118.
[11]. Mohsenipour Z, Hassanshahian M. Antibacterial Activity of Euphorbia hebecarpa Alcoholic Extracts against Six Human Pathogenic Bacteria in Planktonic and Biofilm Forms. Jundishapur Journal of Microbiology. 2016; 9(6):e34701.
[12]. Yoshida H, Katsuzaki H, Ohta R, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T , Suzuki A. Antimicrobial activity of the thiosulfinates isolated from oil-macerated garlic extract. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.1999; 63(3): 591-594.
[13]. Androw, JM. Standardized disc suceptibility testing method. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2001; 25:48-57.
[14]. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Truck N. Antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology.1966; 45:493-496.
[15]. Baron EJ, Finegold SM. Methods for testing antimicrobial effectiveness. Baily and Scott`s diagnostic microbiology. Mosby Company.1994; 171-174.
[16]. Sadeghian I, Hassanshahian M, Sadeghian S, Jamali S. Antimicrobial Effects of *QuercusBrantii* Fruits on Bacterial Pathogens. Jundishapur Journal of Microbiology. 2012; 5(3): 465-469. DOI: 10.5812/jjm.3376.
[17]. Masoumipour F, Hassanshahian M. Antimicrobial Activity of Five Medicinal Plants on Candida Albicans. Iranian Journal of Toxicology. 2016; 10(6): 65-77.
[18]. Nostro A, Bisignano G, Cannatelli MA, Crisafi G, Germano MP and Alonzo V. Effects of helichrysumitalicum extract on growth and enzymatic activity of Staphylococcus aureus. International Journal of Antimicrobial Agents. 2001; 17(6): 517-520.
[19]. Lazarova V, Manem J. Biofilm characterization and activity analysis in water and waste water treatment. Water Research.1995; 29(10): 2227-2245.
[20]. Lazarova V, Pierzo V, Fontvielle D, Manem, J. Integrated approach for biofilm characterisation and biomass activity control. Water Science and Technology.1994; 29(7): 345-354.
[21]. Dorman HJD, Deanc SG. Antimicrobial agents from plants: Antimicrobial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology. 2000; 88:308-314.
[22]. Shiva Rani SK, Neeti S, Udaysree. Antimicrobial activity of black pepper (Piper nigrum L.). Global Journal of Pharmacology. 2013; 7 (1): 87-90.
[23]. Mehra S, Dubey A, Mathew J, Mehra M. Comparative assessment of antimicrobial activity of five extract of P. longum and P. nigrum against B. brevis, P.thailandensis, E. aerogenes and B. anthracis. Journal of Agri-Food and Applied Sciences. 2015; 3(1): 14-21.
[24]. Norajit K. Antimicrobial effect of five Zingiberaceae Essential oils. Molecules. 2007; 12: 2047-2060.
[25]. Lee k, Lee J-H, Kim S, ChoM.H, Lee J. Anti-biofilm, anti-hemolysis, and anti virulence activities of black pepper, cananga, myrrh oils, and nerolidol against Staphylococcus aureus. Environmental Biotechnology. 2014; 712-749.
[26]. Hassanshahian M, Khosravi F. Study the antimicrobial effects of artemisiasantonica extract on some pathogenic bacteria. Advanced Herbal Medicine. 2015; 1(4): 43-46.
[27]. Mohsenipour Z, Hassanshahian M. Antibacterial activity of Espand (Peganumharmala) alcoholic extracts against six pathogenic bacteria in planktonic and biofilm forms. Biological Journal of Microorganisms. 2016; 4(16): 47-57.
[28]. Javadian F, Sepehri Z, Saeedi S, Hassanshahian M. Antifungal effects of the extract of the Withaniasomnifera on Candida albicans. Advanced Herbal Medicine. 2016; 2(1): 32-43.
[29]. Sepehri Z, Javadian F, Khammari D, Hassanshahian M. Antifungal effects of the aqueous and ethanolic leaf extracts of Echinophoraplatyloba and Rosmarinusofficinalis. Current Medical Mycology. 2016; 2(1): 16-25.
[30]. Hamaveli H, Shoshtari A, Hassanshahian M, Askari M. Study the antimicrobial activity of six marine sponges and three parts of sea anemone on Candida Albicans. Journal of Coastal Life Medicine. 2016; 4(8): 122-129.

.

The antimicrobial effect of *Piper nigrum* ethanolic and methanolic extracts against antibiotic resistance bacteria in planktonic and biofilm form

Fatemeh Masomi[1], Mehdi Hassanshahian[1*], Mahasti mohammadi[1]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Abstract

Background and Aim Recently, herbs take more attention because bacterial resistance was increased and herbs drugs have less side effects. In this study, the antimicrobial effect of alcoholic extracts of *Piper nigrum* was evaluated against six antibiotic resistance pathogenic bacteria.

Materials & Methods The ethanolic extracts were prepared by modified maceration method. The antibacterial effects of extracts were assayed against six antibiotic resistant bacteria include: *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aerouginosa, Acinetobacter* and *Klebsiella* by disc diffusion method. Also, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of each extracts was determined by macro-broth dilution method. The antibacterial effect of these extracts was analyzed on biofilm formation, destruction and inhibition of enzyme activity of bacteria.

Results In disc diffusion assay the maximum and minimum inhibitory effects of extracts was related to *S. aureus* and *E. coli*, respectively. The methanolic extract with maximum MIC (50 mg/ml) had the lowest effect against *P. aeruginosa*. This extract with minimum MIC (25 mg/ml) had the maximum inhibition against *E. coli*. The maximum bactericidal effect related to ethanolic extract with MBC value (25 mg/ml) against *K. pneumonia, P. aeruginosa, B. cereus* and *S. aureus.* The maximum and minimum inhibitory effect on biofilm formation related to methanolic and ethanolic extracts at concentration (25 mg/ml) against *S. aureus*. The highest destruction of biofilm structures was observed in treatment of ethanolic extract against *E. coli* and the lowest destruction of biofilm was recorded for *Acinetobacter*. The maximum enzyme inhibition activity was observed in treatment with methanolic extract against *Acinetobacter* and the minimum effect of enzyme inhibition activity recorded for ethanolic extract against *Klebsiella*.

Conclusion Medical application of extracts and essential oil of medicinal plants for low side effects is valuable. But, for application of *P. nigrum* extracts more researches must be done and mechanism of efficient material of these extracts must be determine on pathogens.

Received: 2017/10/03
Accepted: 2017/09/26

Keywords: antimicrobial effects, chemical drugs, *Piper nigrum,* plant extract.