Brief Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 13, Number 4 (September-October)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Antibacterial Activity of Alcoholic and Aqueous Extracts of Various Organs of *Citrus medica* on 10 Human Pathogenic in Vitro

Mohadeseh Shojaemehr[1], Mostafa Alamholo[2*]

1. *Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamadan, Iran*
2. *Department of Biology, Faculty of Science, Kobani University, Kobani, Syria*

Article Information

Article Subject:
Antimicrobial Substances

10.30699/ijmm.13.4.310

Corresponding author:
Mostafa Alamholo
Department of Biology, Faculty of Science, Kobani University, Kobani, Syria
Email:
mostafa.alamholo@yahoo.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: Medicinal herbs are used due to fewer side effects for produce of natural drugs in the pharmaceutical industry. The aim of this study was investigation of antibacterial and antioxidant activity of *Citrus medica* skin extracts against 10 human pathogenic bacterial and investigation of secondary metabolites in vitro.

Materials and Methods: Color and white Skin of *Citrus medica* under the supervision of Citrus Research Center experts were collected from Ramsar City, Mazandaran Province, Iran in 2014. Antibacterial activity by agar well diffusion method, total phenolic content by Folin-Ciocalteu method, total flavonoid by aluminum chloride and antioxidant properties by DPPH method were investigated. Phytochemical investigation of secondary metabolites was performed.

Results & Conclusion: The highest inhibitory activity was observed on methanol extract of color skin on *Bacillus cereus* bacteria. IC50 methanol extract of color, white skin and ascorbic acid were calculated 0.1505, 0.1738 and 0.1095 mg/mL respectively. The total phenolic content of color and white skin was 109.5 and 105.6 (*mgGAE/g*) and the total flavonoid content was 3.53 and 3.02 (mgQ/g), respectively. The presence of alkaloid in methanol extract of color skin and the presence of saponin and tannin in methanol extract of white skin was confirmed. Due to antibacterial properties of this medicinal plant can be used in produce antibiotics controlling of human pathogenic microorganisms.

Keywords: *Citrus medica*, Secondary metabolites, antibacterial

Received: 2019/06/29 Accepted: 2019/10/31 Available online: 2020/01/19

Copyright © 2019 Iranian Journal of Medical Microbiology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

How to cite this article:

Shojaemehr M, Alamholo M. Antibacterial Activity of Alcoholic and Aqueous Extracts of Various Organs of Citrus medica on 10 Human Pathogenic in Vitro. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (4) :310-320

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks

Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

Due to use of plant medicinal in treatment of chronic human diseases, it is believed that herbs are safer than synthetic drugs and lack side effects **(1)**. One of the herbs that have medicinal use is *Citrus medica*. Flavonoids in methanol extract of citrus bark have been identified as antimicrobial agents **(2)**. *C. medica* is used in the treatment of diabetes and Alzheimer's diseases **(3)**. Many phenolic and flavonoid compounds have antioxidant activity, such as metal chelating and free radical scavenging activity, which is created by inactivating reactive oxygen species and other free radicals produced by aerobic metabolites. The aim of this study was to evaluate the antibacterial and antioxidant activity of the skin extracts of *Citrus medica* against human pathogenic bacteria and the presence and absence of secondary metabolites in vitro.

Materials and Methods

The color and white skin of *Citrus medica* under the supervision of citrus research center experts were collected from Ramsar city, Mazandaran province, Iran in 2014. The extract was performed by soxhlet apparatus.

The bacteria such as *Streptococcus pyogenes* (PTCC-1447), *Bacillus subtilis* (PTCC-1156), *B. cereus* (PTCC-1247), *Micrococcus luteus* (ATCC 10987), *Staphyllococcus aureus* (PTCC-1189), *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Shigella boydi* (PTCC1744), *Salmonella typhi* (PTCC-1609), *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC-1181) and *Enterobacter aerogenes* (PTCC-1221) were prepared from Hamadan University of Medical Sciences, Iran.

In this study, aqueous, ethanolic (96%) and methanol (80%) extracts were prepared at concentration of 400 mg mL^{-1} of white and color skin organs. 200 microliters of the bacterial suspension was inoculated on sterile Molar Hinton Agar plates and cultured by sterile swabs. Gentamicin (10mg) and Ciprofloxacin (0.005 µg) antibiotics were used as positive control. Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration were determined by dilution method. To determination of MIC, a dilution series of 200, 100, 50, 25, 12.5, and 6.25 mg mL^{-1} of extract was prepared in the nutrient broth (Merck, Germany) medium **(6)**. The least dilution of the extract with no opacity was considered as MIC. To determine the minimum bactericidal concentration, the samples of all tubes with no growth were cultured on MHA medium. After incubation, the lowest concentration of extract with no bacterial growth was considered as MBC.

The total flavonoid content by Aluminum Chloride Colorimetric method **(7)**, total phenol content by Folin–Ciocalteu method **(8)** and free radical activity by Stojicevic *et al.* **(9)** method were performed. IC50 of samples and ascorbic acid were calculated.

The methanol extract was used to evaluate the presence and absence of alkaloids, saponins and tannins.

The experiments were performed in completely randomized design with factorial test by SPSS 16 (SPSS Inc., Chicago, IL. USA).

Results and Discussion

The result of inhibitory activity of methanol, ethanol, and aqueous extracts of the colored and white skin of *C. medica* on human pathogenic bacteria has been shown in Table 1. G^- bacterium *P aeruginosa* against the colored skin extract and G^+ bacterium *Streptococus pyogenes* and G^- bacteria *P. aeruginosa* and *Shigella boydii* against white skin extract showed resistance. The G^+ bacterium *B. cereus* had the highest inhibitory diameter (24 mm) against methanol extract of colored skin. The aqueous extract didn't show inhibitory activity on *Streptococcus pyogenes.*

Nowadays, due to development of drug resistance and high cost of treatment with chemical drugs as well as the adverse effects of some antibiotics, the research is conducted to study new antibacterial compounds, especially herbal extracts to discover their effective chemical compounds have been led. According to the results of Kabra *et al.* (11), *S. aureus* and *P. aeruginosa* showed more susceptible, whereas *P. aeruginosa* showed resistance to ethanol extract in the present study. The difference in degree of susceptibility of bacteria could due to the intrinsic tolerance of

microorganisms, the type of solvent, and the nature of present compounds in plant extracts such as alkaloids, tannins, saponins, phenols, glycosides and flavonoids which have anti-microbial activity **(12)**.

The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of white and color skin extract of *C. medical* has been shown in Table 2. The minimum inhibitory dilution of methanol extract of color skin on G^+ bacteria *B. subtilis* and *B. cereus* and G^- bacteria *S. typhi* and *E. coli* was 6.25 mg mL^{-1}. Minimum inhibitory dilution of ethanol extract of white skin on G^+ bacterium *M. luteus* was 6.25 mg mL^{-1}. *P. aeruginosa* was resistance to color and white skin extracts.

DPPH free radical scavenging rate was increased by increasing of plant extract concentration. The IC_{50} content of each sample of extract and ascorbic acid was calculated (Table 3). The IC50 of methanol extract of color and white skin and ascorbic acid were calculated as 0.1505, 0.1738 and 0.1095 mg mL^{-1}, respectively. Total phenolic content of color and white skin as 109.5 and 105.6 (mgGA/g) and flavonoid content as 3.53 and 3.02 (mgQ/g) were obtained, respectively.

Table 1. Antibacterial activity of methanol, ethanol, and aqueous extracts of colored and white skin of *C. medica* in comparison to gentamicin and ciprofloxacin antibiotics

Bacteria	Color skin			White skin			Gentamicin	Ciprofloxacin
	Methanol	Ethanol	Aqueous	Methanol	Ethanol	Aqueous		
B. subtillis	21±0.57	12.67±0.88	11±0.57	20±1	13.33±0.88	11 ±0.57	29±0.57	29.5±0.33
B. cereus	24±0.57	17.33±0.66	12.33±0.33	9.67±0.33	12.67±0.88	9±0.57	19.66±0.33	28.5±0.66
S. aureus	18.67±0.88	18±0.57	14.33±0.33	11.67±0.66	15.33±1.2	10.33±0.66	20±1	28.5±0.66
S. pyogenes	10.33±0.33	10.67±0.33	0 ± 0	0±0.00	0 ±0.00	0 ± 0	20±0.57	31.5±0.33
M. luteus	14±0.57	15.67±0.33	17±0.57	10.67±0.88	13.67±0.66	13±1.15	22±0.33	30±1
S. typhi	10.67±1.33	12.33±0.67	9.67±0.33	8.33±0.88	11.67±0.33	9.33±0.66	29.5±1	33±0.57
Sh. boydi	8.33±0.67	14± 0	10.67±0.33	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	19±0.57	37.5±0.66
***P.* aeruginosa**	0 ± 0	0 ± 0	0±0	0 ± 0	0 ± 0	0±0.00	20±0.33	24.5±0.66
E. coli	19.57±0.33	12.33±0.33	11±0.57	12±0.57	12±1	11±0.57	19.5±1	24.5±0.57
En.aerogenes	14±0.57	13.67±0.33	12.33±0.33	14.33±0.66	12±0.57	10.67±0.88	11±0.33	28±0.33

Table 2.MIC and MBC (mg mL^{-1}) of color and white skin extracts of *Citrus medica* against human pathogenic bacteria

Bacteria	Extract	Color skin		White skin		Bacteria	Extract	Color skin		White skin	
		MIC	MBC	MIC	MBC			MIC	MBC	MIC	MBC
B. subtilis	M	6.25	25	12.5	12.5	*S. typhi*	M	6.25	50	50	100
	E	25	50	100	200		E	50	25	100	200
	W	50	-	50	-		W	50	-	-	-
B. cereus	M	6.25	25	-	-	*P. aeruginosa*	M	-	-	-	-
	E	100	-	50	100		E	-	-	-	-
	W	100	-	-	-		W	-	-	-	-
S. aureus	M	25	50	25	*50*	*E. coli*	M	6.25	50	50	-
	E	12.5	25	12.5	50		E	50	50	25	50
	W	50	-	100	-		W	50	200	50	-
M. luteus	M	12.5	50	12.5	50	*S. pyogenes*	M	100	-	-	-
	E	50	-	6.25	25		E	100	-	-	-
	W	100	200	50	*100*		W	-	-	-	-
En.aerogenes	M	50	-	12.5	25	*Sh. boydii*	M	50	100	-	-
	E	50	-	12.5	50		E	50	-	-	-
	W	100	-	100	-		W	-	-	-	-

M: Methanol E: Ethanol W: Water -: Lack of bacterial growth

Table 3. The investigation of antioxidant activity (IC50) by DPPH method

Organ		The DPPH percentage for different concentrations (mg mL^{-1})					IC50
		0.2	**0.4**	**0.6**	**0.8**	**1**	
Color skin	DPPH%	66.46	74.99	80.92	86.78	91.19	**0.1505**
White skin	DPPH%	57.53	73.13	78.00	82.03	85.3	**0.738**
Ascorbic acid	DPPH%	91.3	92.43	97.41	98.56	99.67	**0.1095**

Secondary metabolites such as phenol and flavonoid have a strong potential for clearing free radicals that are present in all different plant parts such as leaf, fruit, seed, root and skin **(13)**. Ghasemi *et al.* **(15)** measured the total phenolic content of methanol extract of 13 Iranian citrus species between 66.5 and 396.8 (mgGA/g) and flavonoid content in range of 0.3 to 31.1 (mgQ/g), which was approximately similar to the results of present research. Menichini *et al.* **(16)** reported the hexane extract IC50 of *C. medica* skin about 0.147 mg mL^{-1}. Differences in antioxidant capacity of different extracts have been attributed due to differences in chemical composition and secondary metabolites with antimicrobial properties such as phenol, flavonoid, ascorbic acid and carotenoids **(17)**.

The methanol extract of color skin showed the presence of alkaloid and the absence of saponin and tannin while the methanol extract of white skin showed the presence of saponin and tannin and the absence of alkaloid.

Choudhury *et al.* **(12)** attributed the antimicrobial properties of plant extracts to phenolic compounds, tannins, terpenoids, alkaloids, flavonoids and saponins. Kabra *et al.* **(11)** showed the presence of alkaloid and the absence of saponin and tannin in skin ethanol extract of *C. medica* by phytochemical method which was similar to the results of methanol extract of color skin in the present study. Sheikhlar *et al.* **(18)** reported the presence of tannins and alkaloids and the absence of saponins in skin methanol extract of *C. limon*. The difference in the presence and absence of secondary metabolites in plants depends on the type of specie; extract type, solvent and testing methods **(19)**.

Conclusion

According to obtained results, the *C. medica* due to the presence of secondary metabolites such as alkaloids, saponins and tannins showed antibacterial and antioxidant properties. By extraction and processing of the compounds in the extract of this medicinal plant can be used as antibiotics to control human pathogens, especially bacteria and also drug production in the pharmaceutical and medical.

Acknowledgements

The authors would like to thank all those who helped them writing this paper.

Conflict of Interest

The authors declared no conflict of Interest.

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ ـ شماره ۴ ـ مهر و آبان ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

فعالیت آنتی‌باکتریایی عصاره های الکلی و آبی اندام‌های مختلف بالنگ (*Citrus medica*) روی ده پاتوژن انسانی در شرایط آزمایشگاهی

محدثه شجاعی مهر[۱]، مصطفی علم هولو[۲*]

۱. گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۲. گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه کوبانی، کوبانی، سوریه

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۴/۴

پذیرش:۱۳۹۸/۰۴/۱۲

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۱۰/۱۰

موضوع:

مواد ضدمیکروبی

IJMM1398;13(4): 310-320

نویسندهٔ مسئول:

مصطفی علم هولو، گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه کوبانی، کوبانی، سوریه

ایمیل:

mostafa.alamholo@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهدف: گیاهان دارویی به دلیل عوارض جانبی کمتر برای ساخت آنالوگ‌های سنتزی در صنعت داروسازی بکار می‌روند. هدف از این تحقیق بررسی فعالیت آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی عصاره های پوست بالنگ بر علیه ۱۰ باکتری بیماریزای انسانی و بررسی فیتوشیمیایی متابولیتهای ثانویهٔ عصاره‌ها در شرایط ازمایشگاهی بود.

مواد و روش کار: پوست رنگی و پوست سفید گیاه بالنگ (*Citrus medica*) از شهر رامسر، استان مازندران، ایران زیر نظر کارشناسان مرکز تحقیقات مرکبات در سال ۱۳۹۳ جمع آوری شدند. فعالیت آنتی باکتریایی به روش انتشار چاهک در آگار، مقدار فنول کل با روش فولین سیوکالتو، مقدار فلاونوئید کل با روش کلرید آلومینیوم و خواص آنتی اکسیدانی با روش DPPH بررسی شدند. بررسی فیتوشیمیایی متابولیتهای ثانویه انجام شد.

یافته‌ها و بحث: بیشترین اثر بازدارنگی مربوط به عصاره متانولی پوست رنگی بر روی باکتری¬ باسیلوس سرئوس مشاهده شد. IC50 عصاره متانولی پوست رنگی، سفید و آسکوربیک اسید به ترتیب ۰/۱۵۰۵ ، ۰/۱۷۳۸ و ۰/۱۰۹۵ میلی¬گرم در میلی¬لیتر محاسبه گردید. مقدار فنول کل پوست رنگی و سفید به ترتیب ۱۰۹/۵و ۱۰۵/۶(mgGAE/g) و فلاونوئید ۳/۵۳ و ۳/۰۲ (mgQ/g) بدست آمد. حضور آلکالویید در عصاره متاولی پوست رنگی و حضور ساپونین و تانن در عصاره متانولی پوست سفید تایید شد. از این گیاه دارویی به دلیل خواص آنتی باکتریایی می‌توان جهت تولید آنتی بیوتیک های کنترل کننده پاتوژنهای بیماریزای انسانی استفاده کرد.

کلید واژه‌ها: بالنگ، متابولیت‌های ثانویه، آنتی باکتریایی

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

به دلیل سازگاری گیاهان دارویی و ترکیبات طبیعی با بدن انسان، تحقیقات برای تولید مواد ضدمیکروبی ضروری به نظر می‌رسد. به دلیل استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های مزمن انسانی، اغلب اعتقاد بر این است که گیاهان ایمن‌تر از داروهای سنتزی بوده و فاقد اثرات جانبی می‌باشند (۱). یکی از گیاهانی که استفاده دارویی دارد، گیاه بالنگ (*Citrus medica*) است. این گیاه، درختی کوچک یا درختچه‌ای بزرگ با خارهای کوتاه، برگ‌ها بزرگ، به طول ۱۰-۱۸ سانتیمتر، گل‌ها پانیکولی، به عرض ۲/۵سانتیمتر یا بیشتر، گلبرگ‌ها نوک کند، میوه بیضوی یا مستطیلی به طول ۱۵-۲۵ سانتیمتر است.

فلاونوئیدهای موجود در عصاره متانولی پوست مرکبات به عنوان عامل ضد میکروبی شناخته شده‌اند (۲). پوست و میوه‌ها مرکبات به عنوان ضد نفخ شکمی و همچنین دارای خواص اشتهاآوری میباشند. در هند پوست این گیاه برای درمان اسهال خونی و غلبه بر بوی بد دهان استفاده می‌شود. بالنگ در درمان دیابت و بیماری آلزایمر کاربرد دارد (۳). بسیاری از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی مانند کلاته‌کنندگی فلزات و خاصیت جاروب‌کنندگی رادیکال‌های آزاد می‌باشند که این عمل را به وسیله غیرفعال کردن گونه‌های اکسیژن فعال و دیگر رادیکال‌های آزاد تولیدشده که توسط متابولیسم‌های هوازی ایجاد می‌شود، انجام می‌دهند. این‌چنین توانایی در دفع اکسیژن‌های فعال، آن‌ها را به عاملانی برای جلوگیری از ایجاد بیماری‌های مزمن مانند سرطان تبدیل کرده‌است (۴). هدف از این تحقیق بررسی فعالیت آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی عصاره پوست بالنگ بر علیه باکتری های بیماریزای انسانی و بررسی حضور و عدم حضور متابولیت‌های ثانویه در شرایط ازمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش کار

جمع‌آوری گیاه و عصاره گیری

پوست رنگی و پوست سفید بالنگ *Citrus medica* زیر نظر سازمان تحقیقات مرکبات کشور واقع در (ایران، استان مازندران، رامسر) در ۱۳۹۳جمع‌آوری شدند. عصاره گیری با دستگاه سوکسله انجام شد. از آب (دو بار تقطیر)، متانول ۸۰ درصد و اتانول ۹۶ درصد بعنوان حلال استفاده شدند.

سویه های باکتریایی

اشریشیا کولای Escherichia coli (ATCC25922)، *شیگلا بایدی Shigella boydi* ، *سالمونلا تیفی Salmonella typhi* (PTCC1609)، *انتروباکتر آئروژنز Enterobacter aerogenes* (PTCC1221)، *میکروکوکوس لوتئوس Micrococcus luteus* (PTCC1110)، *باسیلوس سرئوس Bacillus cereus* (PTCC1247)، *باسیلوس سابتیلیس Bacillus subtilis* (PTCC1156)، *استرپتوکوکوس پیوژنز Streptococcus pyogenes* (PTCC1447)، *سودوموناس آئروژینوزا Pseudomonas aeruginosa* (PTCC1181) و *استافیلوکوکوس اوروئوس Staphyllococcus aureus* (PTCC1189) از دانشگاه علوم پزشکی استان همدان تهیه شدند.

بررسی فعالیت ضدباکتری

روش انتشار چاهک در آگار (Agar well diffusion method)

در این تحقیق عصاره‌های آبی، اتانولی (۹۶درصد) و متانولی (۸۰ درصد) با غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از اندام‌های پوست سفید و رنگی تهیه شدند. ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری روی پلیت‌های مولر هینتون آگار استریل تلقیح و با سوآپ استریل کشت داده شد. پس از پنج دقیقه که مایع جذب محیط گردید، چاهک‌هایی به قطر پنج میلی متر ایجاد و ۵۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌ها (۵) به داخل این چاهک‌ها ریخته شد. آنتی‌بیوتیک های جنتامایسین (۱۰ میلی گرم) و سیپروفلوکساسین (۰/۰۰۵ میکروگرم) به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. با استفاده از روش رقت لوله‌ای حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (Minimum Inhibitory Concentration) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration) تعیین گردید.

روش براث ماکرودیلوشن

جهت تعیین MIC سری‌های رقت۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵و ۶/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره در محیط نوترینت براث (مرک، آلمان) تهیه شد(۶). بعد از تهیه سری رقت‌ها، ۱۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک‌فارلند به همه لوله‌ها به جزء کنترل مثبت(محیط+ عصاره) اضافه شد. در نهایت لوله‌های تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردیدند. کمترین رقتی از عصاره که در آن کدورتی مشاهده نگردید، بعنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی نمونه‌هایی از تمامی لوله‌هایی که در آنها عدم رشد مشاهده شده بود، در سطح محیط کشت مولرهینتون‌آگار کشت داده شد. محیط‌کشت‌های تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از انکوباسیون کمترین غلظتی از عصاره که در آن رشد باکتری مشاهده نگردید به عنوان MBC در نظر گرفته شد. محیط کشت نوترینت براث همراه با عصاره فاقد باکتری به عنوان (کنترل مثبت) و محیط کشت بدون عصاره حاوی باکتری (کنترل منفی) استفاده گردید.آزمایشات در دو تکرار صورت گرفت.

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید، فنول و DPPH

برای اندازه گیری میزان فلاونوئید کل از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم (۷) و فنول کل از واکنش‌گر فولین سیوکالتو استفاده شد (۸). مقدار فلاونوئید کل به صورت معادل میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک (mgQ/g) عصاره و فنول کل معادل میلی‌گرم اسید گالیک برگرم وزن خشک *(mgGAE/g)* عصاره محاسبه شد. فعالیت رادیکال آزاد با استفاده از روش Stojicevic و همکاران (۹) و از معرف ۲،۲-دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده گردید IC_{50} نمونه ها و اسید آسکوربیک محاسبه شد. آنالیز داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گردید.

بررسی فیتوشیمیایی متابولیتهای ثانویه (آلکالویید، تانن و ساپونین)

از عصاره متانولی برای بررسی حضور و عدم حضور آلکالوئید، ساپونین و تانن استفاده گردید. رسوب یا کدورت نشان‌دهنده‌ی حضور آلکالوئید، مشاهده رنگ سیاه مایل به سبز نشان‌دهنده حضور تانن وکف باثبات روی محلول نشان‌دهنده حضور ساپونین می‌باشد (۱۰).

آنالیز آماری

نتایج این پژوهش در قالب آزمون فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی و با کمک نرم افزار SPSS ۱۶ انجام شد.

تحلیل داده‌ها

برای بررسی آماریِ وجود ارتباط بین داده‌های به دست آمده در مراحل مختلف این تحقیق، اطلاعات مربوط به داده‌ها وارد

نرم‌افزار آماری SPSS نسخهٔ ۲۱(SPSS Inc., Chicago, IL., USA) شدند و معنی‌داری داده‌ها با آزمون آماری کای-دو تحلیل شد.

یافته‌ها و بحث

نتایج اثر بازدارندگی عصاره های متانولی، اتانولی و آبی پوست رنگی و سفید بالنگ بر علیه باکتریهای بیماریزای انسانی در جدول ۱ نشان داده شده است. بعد از انکوباسیون قطر هاله بازدارندگی اطراف چاهک ها اندازه گیری شد. باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* در برابر عصاره پوست رنگی و باکتری گرم مثبت *استرپتوکوکوس پیوژنز* و گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* و *شیگلا بوئیدی* در برابر عصاره پوست سفید مقاومت نشان دادند. باکتری گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* بر علیه عصاره متانولی پوست رنگی بیش‌ترین قطر هاله بازدارندگی (۲۴ میلی‌متر) داشت. عصاره آبی پوست اثر بازدارندگی بر روی باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* نشان نداد. عصاره متانولی پوست رنگی بر روی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *انتروباکتر آئروژنز* و عصاره اتانولی بر روی باکتری *انتروباکتر آئروژنز* و همچنین عصاره‌های متانولی و اتانولی پوست سفید بر روی باکتری *انتروباکتر آئروژنز* بهتر از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین اثر بازدارندگی نشان دادند.

جدول۱ . فعالیت ضدباکتریایی عصاره متانولی، اتانولی و آبی پوست رنگی و سفید بالنگ در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین و سیپروفلوکساسین

باکتری	عصاره	پوست رنگی	پوست سفید	جنتامایسین	سیپروفلوکساسین
B. subtilis	متانول	۲۱±۰/۵۷	۱ ±۲۰	۲۹± ۰/۵۷	۲۹/۵± ۰/۳۳
	اتانول	۱۲/۶۷±۰/۸۸	۱۳/۳۳±۰/۸۸		
	آبی	۱۱±۰/۵۷	۱۱± ۰/۵۷		
B. cereus	متانول	۲۴± ۰/۵۷	۹/۶۷± ۰/۳۳	۱۹/۶۶± ۰/۳۳	۲۸/۵± ۰/۶۶
	اتانول	۱۷/۳۳±۰/۶۶	۱۲/۶۷±۰/۸۸		
	آبی	۱۲/۳۳±۰/۳۳	۹± ۰/۵۷		
S. aureus	متانول	۱۸/۶۷±۰/۸۸	۱۱/۶۷± ۰/۶۶	۲۰±۱	۲۸/۵± ۰/۶۶
	اتانول	۱۸± ۰/۵۷	۱۵/۳۳± ۱/۲		
	آبی	۱۴/۳۳± ۰/۳۳	۱۰/۳۳±۰/۶۶		
M. luteus	متانول	۱۴± ۰/۵۷	۱۰/۶۷±۰/۸۸	۲۲± ۰/۳۳	۳۰±۱
	اتانول	۱۵/۶۷± ۰/۳۳	۱۳/۶۷± ۰/۶۶		
	آبی	۱۷± ۰/۵۷	۱۳± ۱/۱۵		
En.aerogenes	متانول	۱۴± ۰/۵۷	۱۴/۳۳±۰/۶۶	۱۱± ۰/۳۳	۲۸± ۰/۳۳
	اتانول	۱۳/۶۷± ۰/۳۳	۱۲± ۰/۵۷		
	آبی	۱۲/۳۳± ۰/۳۳	۱۰/۶۷±۰/۸۸		
S. typhi	متانول	۱۰/۶۷± ۱/۳۳	۸/۳۳± ۰/۸۸	۲۹/۵±۱	۳۳±۰/۵۷
	اتانول	۱۲/۳۳± ۰/۶۷	۱۱/۶۷± ۰/۳۳		
	آبی	۹/۶۷± ۰/۳۳	۹/۳۳± ۰/۶۶		
P. aeruginosa	متانول	۰±۰	۰±۰	۲۰±۰/۳۳	۲۴/۵± ۰/۶۶
	اتانول	۰±۰	۰±۰		
	آبی	۰±۰	۰±۰		

باکتری	عصاره	پوست رنگی	پوست سفید	جنتامایسین	سیپروفلوکساسین
E. coli	متانول	۱۹± ۰/۵۷	۱۲±۰/۵۷	۱۹/۵±۱	۲۴/۵± ۰/۵۷
	اتانول	۱۲/۳۳± ۰/۳۳	۱۲± ۱		
	آبی	۱۱± ۰/۵۷	۱۱± ۰/۵۷		
S. pyogenes	متانول	۱۰/۳۳± ۰/۳۳	۰±۰	۲۰±۰/۵۷	۳۱/۵± ۰/۳۳
	اتانول	۱۰/۶۷± ۰/۳۳	۰±۰		
	آبی	۰±۰	۰±۰		
Sh. boydii	متانول	۸/۳۳± ۰/۶۷	۰±۰	۱۹±۰/۵۷	۳۷/۵±۰/۶۶
	اتانول	۱۴± ۰	۰±۰		
	آبی	۱۰/۶۷± ۰/۳۳	۰±۰		

جدول ۲. مقادیر MIC وMBC (میلی‌گرم بر میلی لیتر) عصاره پوست رنگی و سفید بالنگ علیه باکتری‌های بیماری‌زای انسانی

باکتری	عصاره	پوست رنگی		پوست سفید		باکتری	عصاره	پوست رنگی		پوست سفید	
		MIC	MBC	MIC	MBC			MIC	MBC	MIC	MBC
B. subtilis	M	۶/۲۵	۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵	*S. typhi*	M	۶/۲۵	۵۰	۵۰	۱۰۰
	E	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰		E	۵۰	۲۵	۱۰۰	۲۰۰
	W	۵۰	–	۵۰	–		W	۵۰	–	–	-
B. cereus	M	۶/۲۵	۲۵	–	-	*P.aeruginosa*	M	-	-	-	-
	E	۱۰۰	–	۵۰	۱۰۰		E	-	-	-	-
	W	۱۰۰	–	–	–		W	-	-	-	-
S.aureus	M	۲۵	۵۰	۲۵	۵۰	*E. coli*	M	۶/۲۵	۵۰	۵۰	–
	E	۱۲/۵	۲۵	۱۲/۵	۵۰		E	۵۰	۵۰	۲۵	۵۰
	W	۵۰	–	۱۰۰	–		W	۵۰	۲۰۰	۵۰	–
M.luteus	M	۱۲/۵	۵۰	۱۲/۵	۵۰	*S. pyogenes*	M	۱۰۰	–	-	-
	E	۵۰	–	۶/۲۵	۲۵		E	۱۰۰	–	-	-
	W	۱۰۰	۲۰۰	۵۰	۱۰۰		W	–	–	-	-
En.aerogenes	M	۵۰	–	۱۲/۵	۲۵	*Sh. boydii*	M	۵۰	۱۰۰	-	-
	E	۵۰	–	۱۲/۵	۵۰		E	۵۰	–	-	-
	W	۱۰۰	–	۱۰۰	–		W	–	-	-	-

جدول ۳. بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH

نمونه		درصد DPPH برای هر غلظت (mg/ml)					IC50
		۰/۲	۰/۴	۰/۶	۰/۸	۱	
پوست رنگی	DPPH%	۶۶/۴۶	۷۴/۹۹	۸۰/۹۲	۸۶/۷۸	۹۱/۱۹	۰/۱۵۰۵
پوست سفید	DPPH%	۵۷/۵۳	۷۳/۱۳	۷۸/۰۰	۸۲/۰۳	۸۵/۳۰	۰/۷۳۸
آسکوربیک اسید	DPPH%	۹۱/۳۰	۹۲/۴۳	۹۷/۴۱	۹۸/۵۶	۹۹/۶۷	۰/۱۰۹۵

امروزه به علت توسعه مسئله مقاومت دارویی و هزینه بالای درمان با داروهای شیمیایی و همچنین مشاهده عوارض جانبی ناخواسته در مورد برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها، تحقیقات به سمت مطالعه بر روی مواد ضد باکتری جدید به ویژه عصاره‌های گیاهی به منظور کشف ترکیبات شیمیایی موثر آن‌ها سوق یافته است. بر اساس نتایج Kabra و همکاران (۱۱)، باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* حساسیت بیشتری را از خود نشان دادند، در حالی که باکتری *سودوموناس آئروژنزا* در مقابل عصاره اتانولی در تحقیق حاضر مقاومت نشان داد. تفاوت در درجه حساسیت باکتری‌ها می‌تواند به علت تحمل ذاتی میکروارگانیسم ها، نوع حلال و ماهیت ترکیبات حاضر در عصاره‌های گیاهی مانند آلکالوئیدها، تانن ،ساپونین، فنول، گلیکوزیدها و فلاونوئیدها باشد که دارای فعالیت ضد میکروبی شناخته شده ای هستند (۱۲).

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره پوست رنگی و سفید بالنگ در جدول۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده حداقل رقت بازدارندگی ۶/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره متانولی پوست رنگی در کشت باکتریهای گرم مثبت *باسیلوس سابتیلیس* و *باسیلوس سرئوس* و باکتریهای گرم منفی *سالمونلا تیفی* و *اشریشیا کلی* مشاهده شد. حداقل رقت بازدارندگی ۶/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی پوست سفید بر روی باکتری گرم مثبت *میکروکوکوس لوتئوس* دیده شد. باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در مقابل عصاره های پوست رنگی و سفید مقاومت نشان داد.

فعالیت آنتی رادیکالی به روش DPPH و سنجش میزان فنول و فلاونوئید کل

میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با افزایش غلظت عصاره گیاهی افزایش یافت. میزان IC_{50} هر نمونه عصاره و آسکوربیک اسید محاسبه گردید (جدول۳). IC50 عصاره متانولی پوست رنگی، پوست سفید و آسکوربیک اسید به ترتیب ۰/۱۵۰۵ ، ۰/۱۷۳۸ و ۰/۱۰۹۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. مقدار فنول کل پوست رنگی و پوست سفید به ترتیب ۱۰۹/۵و ۱۰۵/۶(*mgGA/g*) و فلاونوئید ۳/۵۳و ۳/۰۲ (*mgQ/g*) بدست آمد.

متابولیت‌های ثانویه مانند فنل و فلاونوئید دارای پتانسیل قوی برای پاکسازی رادیکال‌های آزاد می‌باشند که در تمام قسمت-های مختلف گیاهی مانند برگ، میوه، دانه، ریشه و پوست وجود دارند (۱۳). این ترکیبات باعث حفاظت بدن در مقابل بیماری‌های مزمنی چون سرطان و عارضه‌های قلبی و عروقی می‌شوند (۱۴). Ghasemi و همکاران (۱۵)، میزان فنل کل عصاره متانولی پوست ۱۳ گونه از مرکبات ایران را بین ۶۶/۵ تا ۳۹۶/۸ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم عصاره خشک و میزان فلاونوئید را در محدوده ۰/۳تا۳۱/۱ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره خشک گزارش کردند که با نتایج تحقیق حاضر تقریبا مشابهت داشت. این گروه همچنین، میزان IC_{50} عصاره متانولی پوست گونه های ذکر شده را در محدوده ۰/۶تا ۲/۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند. Menichini و همکاران (۱۶)، میزان IC_{50} عصاره هگزانی پوست *C.medica* را حدود ۰/۱۴۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند که تقریباً با نتایج ما مشابهت داشت. تغییرات در ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف به دلیل تفاوت در ترکیبات شیمیایی و متابولیتهای ثانویه با خواص آنتی میکروبی مانند فنل، فلاونویید، اسید آسکوربیک و کاروتنوئید نسبت داده شده است (۱۷).

شناسایی فیتوشیمیایی متابولیت‌های ثانویه

بر اساس نتایج فیتوشیمیایی، عصاره متاولی پوست رنگی حضور آلکالویید و عدم حضور ساپونین و تانن در حالی که عصاره متانولی پوست سفید حضور ساپونین و تانن و عدم حضور آلکالویید را نشان داد.

از عصاره متانولی برای بررسی حضور و عدم حضور آلکالوئید، ساپونین و تانن استفاده گردید. Choudhury و همکاران (۱۲)، خواص ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی را به ترکیبات فنولی، تانن ها، ترپنوئیدها، آلکالوئید ها، فلاونوئیدها و ساپونین نسبت دادند. Kabra و همکاران (۱۱)، حضور آلکالوییدو عدم حضور ساپونین و تانن را در عصاره اتانولی پوست *C.medica* با استفاده از روش فیتوشیمیایی نشان دادند که مشابه نتایج عصاره متانولی پوست رنگی در پژوهش حاضر بود. Sheikhlar و همکاران (۱۸)، با استفاده از روش شیمیایی حضور تانن و آلکالوئید و عدم حضور ساپونین در عصاره متانولی پوست *C.limon* گزارش کردند. تفاوت در حضور و عدم حضور متابولیتهای ثانویه در گیاهان به دلیل تفاوت در نوع گونه، نوع عصاره، حلال و روش آزمایش بستگی دارد (۱۹).

بر اساس نتایج بدست آمده، بالنگ به دلیل حضور متابولیتهای ثانویه مانند آلکالوئید، ساپونین و تانن دارای خواص آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی میباشد. با استخراج و فراوری ترکیبات موجود در عصاره این گیاه دارویی میتوان بعنوان آنتی بیوتیک جهت کنترل پاتوژنهای بیماریزای انسانی مخصوصا باکتریها و تولید دارو در داروسازی و پزشکی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی بوعلی سینا همدان میباشد. نویسندگان مقاله از اساتید و مسئول آزمایشگاه گروه بیوتکنولوژی گیاهی به دلیل همکاری در این پروژه علمی تشکر ویژه دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

Referance

1. Alamhulu M, Nazeri S. Investigation antibacterial and antioxidant activities of alcoholic extracts of flower and root Dendrostellera lesserti on some human pathogenic bacteria. Sci J Hamdan Univ Med Sci. 2015; .21(4): 277-285.
2. Ahonkhai I, Ba A, Edogun O, Mu U. Antimicrobial activities of the volatile oils of Ocimum bacilicum L. and Ocimum gratissimum L. (Lamiaceae) against some aerobic dental isolates. Pak J Pharm Sci. 2009; 22:405-9.
3. Adedeji GB, Fagade, Oyelade AA. Prevalence of Pseudomonas aeruginosa in clinical samples and its sensitivity to citrus extract. Afr J Biomed Res. 2007; 2(10):183-187. [DOI:10.4314/ajbr.v10i2.50625]
4. Changqing W, Chen F, Wang X, Kim HJ, He GQ, Haley-Zitlin V, Huang G. Antioxidant constituents in feverfew (Tanacetum parthenium) extract and their chromatographic quantification. Food Chem. 2006; 96:220-227. [DOI:10.1016/j.foodchem.2005.02.024]
5. Alamhulu M, Nazeri S. The in vitro antibacterial activity of different organs hydroalcoholic extract of Dendrostellera lesserti. Journal of Plant Researches. 2016; 29(3): 534-542.
6. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat Protoc 2008; 3(2): 163-175. [DOI:10.1038/nprot.2007.521] [PMID]
7. Chang WC, Sei CK, Soon SH, Bong KC, Hye JA, Min YL, Sang HP, Soo, K.K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. Plant Science. 2002; 163:1161-1168. [DOI:10.1016/S0168-9452(02)00332-1]
8. Pourmorad F, Hosseinimehr S, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected iranian medicinal plants. African J Biotechnol. 2006; 5(11):1142-1145.
9. Stojicevic SS, Stanisiavljevic IT, Velickovic DT, Veljkovic VB, Lazic M.L. Comparative screening of the anti-oxidant and antimicrobial activities of Sempervivum marmoreum L. extracts obtained by various extraction techniques. J Serb Chem Soc. 2008; 73(6): 597-60. [DOI:10.2298/JSC0806597S]
10. Harborne J B. Phytochemical methods. 3th ed. A guide to modern techniques of plant analysis. London. UK .P: 5-7; 1998.
11. Kabra AO, Bairagi GB, Mahamuni AS, Wanare RS. In Vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of the peels of Citrus medica L. Int J Res Pharm Biomed Sci. 2012; 3(1):34-37.
12. Choudhury S, Datta S, Talukdar AD, Choudhury MD. Phytochemistry of the Family Bignoniaceae- A review. AUJSAT. 2011; 7(1):145-150.
13. Mouly PP, Arzouyan CR, Gaydou EM, Estienne JM. Differentiation of citrus juices by factorial

discriminant analysis using liquid chromatography of flavonone glycosides . J Agric Food Chem. 1994; 42: 70-79. [DOI:10.1021/jf00037a011]

14. Abeysinghe DC, Li X, Sun CD, Zhang WS, Zhou CH, Chen KS. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. Food Chemistry. 2007; 104: 1338-1344. [DOI:10.1016/j.foodchem.2007.01.047]
15. Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. Pak J Pharm Sci. 2009; 22: 277-281.
16. Menichini F, Loizzo MR, Tundis R, Bonesi M, Conforti F, Marrelli M, Statti G, Menichinim F. Comparative chemical composition, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition of Citrus medica and Citrus bergamia. Planta Med. 2007; 73: 468. [DOI:10.1055/s-2007-987248]
17. Jayap raksha GK , patil B. in vitro evaiuation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange . Food chem. 2007; 101:410-418. [DOI:10.1016/j.foodchem.2005.12.038]
18. Sheikhlar AR, Alimon HM, Daud Saad CR, Shanagi H. Screening of Morus alba, Citrus limon and Trigonella foenum-graecum extracts for antimicrobial properties and phytochemical compounds. Journal of Biological Sciences. 2013; 13: 386-392. [DOI:10.3923/jbs.2013.386.392]
19. Kumar S, Marwaha N, Singh D, umar V. Evaluation the antibacterial activity of plant extracts against bacterial pathogenes. JDDT. 2012; 2(4):182-185. [DOI:10.22270/jddt.v2i4.244]