

Antibacterial Activity of Mespilus germanica Leaf Extract

Ali Davoodi¹,
Mohammad Ali Ebrahimzadeh²,
Fatemeh Fathalinezhad³,
Elnaz Khoshvishkaie³

¹ PhD Student in Pharmacognosy, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Pharmacy Student, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received April 2, 2016 ; Accepted February 28, 2017)

Abstract

Background and purpose: The medlar (*Mespilus germanica* L., Rosaceae) is an edible fruit and modern medicine has recognized its healing properties in treatment of some diseases. There is no scientific data in literature about its activity against some bacteria. In this study, antibacterial activity of hydro-acetonic extract of medlar's leaf was evaluated against some bacteria.

Materials and methods: In this experimental study, the leaves were collected from Sari, Iran. Materials were dried at room temperature and coarsely ground before extraction. The extraction was performed at room temperature by maceration method using acetone (70%) as solvent. Total phenols and tannins were determined by Folin-ciocalteu method and antibacterial effects were studied. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) were calculated by Broth Dilution Test.

Results: The yield of extraction was 20%. Total phenolic and tannins contents were 90±10 GAE (based on standard curve) and 10±4 /g extract, respectively. The extract showed best inhibitory and bactericidal activities against *Klebsiella pneumoniae* (MIC= 3.333 ± 0.0233 and MBC= 5.833 ± 0.065). The lowest MIC was observed against *Vibrio Cholera* (6.667±0.048) and the lowest MBC was seen against *E. coli* and *Shigella dysentia* (9.167±0.042).

Conclusion: *M. germanica* leaf extract showed good antibacterial activities. So, this plant is potentially effective in controlling dysentery.

Keywords: diarrhea, tannin, phenolic compound, MIC, *Mespilus germanica*

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26 (146): 173-178 (Persian).

بررسی فعالیت آنتی باکتریال برگ گیاه ازگیل

علی داوودی^۱

محمد علی ابراهیم زاده^۲

فاطمه فتحعلی نژاد^۳

الناز خوش ویشکایی^۳

چکیده

سابقه و هدف: ازگیل یک میوه خوراکی است که طب مدرن این گیاه را در درمان برخی بیماری‌ها موثر دانسته است. مطالعه‌ای مبنی بر فعالیت ضد باکتریایی این گیاه بر روی برخی باکتری‌ها یافت نشده است. در این تحقیق فعالیت ضد باکتری عصاره هیدرو استنی برگ گیاه ازگیل در مقابل چند باکتری بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، برگ‌های گیاه ازگیل از شهرستان ساری جمع‌آوری شد. برگ‌ها در دمای اتاق خشک شده و به قطعات ریز خرد شدند. عصاره‌گیری با محلول هیدرو استنی ۷۰ درصد به روش خیساندن انجام شد. ارزیابی میزان فنول و تانن تام موجود در آن با روش فولین سیوکالتیو صورت پذیرفت. اثر آنتی باکتریال آن نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. حداقل غلظت مهاري و حداقل غلظت باکتریسیدی با روش Broth Dilution Test بررسی شد.

یافته‌ها: بازده عصاره‌گیری ۲۰ درصد بود. محتوای تام فنلی عصاره به میزان 90 ± 10 میلی گرم معادل گالیک اسید (GAE) در گرم عصاره بر اساس منحنی استاندارد به دست آمد. میزان تانن تام نیز 4 ± 10 میلی گرم معادل تانیک اسید در گرم عصاره به دست آمد. این عصاره بیشترین اثر مهاري و باکتریسیدی را بر روی سوش کلبسیلا پنومونیه با MIC 0.233 ± 0.333 میلی گرم بر میلی لیتر و 0.065 ± 0.833 نشان داد. کمترین اثر مهاري بر روی سوش ویبریو کلرا با MIC 0.048 ± 0.667 میلی گرم بر میلی لیتر و کمترین اثر باکتریسیدی بر روی سوش‌های *اشرشیا کلی* و *شیگلا دیسانتریه* با 0.042 ± 0.167 میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد.

استنتاج: عصاره برگ گیاه ازگیل اثرات آنتی باکتریال خوبی از خود نشان داد. بر این اساس گزینه مناسبی برای بیماری اسهال خونی می‌باشد.

واژه های کلیدی: اسهال، تانن، ترکیبات فنولی، حداقل غلظت مهاري، ازگیل

مقدمه

می‌رود. این تلاش‌ها و تجربیات پیشینان است که پایه دانش بشر از گیاهان دارویی را شکل داده است. امروزه نیز جامعه پزشکی با گرایش روز افزون بیماران به استفاده از گیاهان دارویی روبه رو می‌باشد(۱).

گیاهان دارویی قرن‌ها است که برای پیشگیری و درمان بیماری‌ها مورد استفاده مردم قرار می‌گرفته‌اند. بخش‌های مختلف گیاهان از جمله میوه، برگ، ریشه، پوست و غیره با مقاصد دارویی و غیر دارویی به کار

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۳۱۱ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مؤلف مسئول: الناز خوش ویشکایی - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده داروسازی

۱. دانشجوی PhD فارماکولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استاد، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی ساری، دانشگاه علوم پزشکی درمانی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۱۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۱/۱۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۲/۱۰

از مهم‌ترین علل ایجاد بیماری در جوامع بشری میکروارگانسیم‌ها هستند. یکی از این دسته جانداران باکتری‌ها می‌باشند که باعث ایجاد بیماری‌های عفونی می‌شوند. اسهال عفونی یکی از این بیماری‌ها بوده که باکتری‌های *شیگلا دیسانتریه*، *اشرشیاکلی* و *سالمونلا تیفی* از مهم‌ترین علل آن است. یکی از گیاهان دارویی که مصارف سنتی فراوانی داشته است گیاه ازگیل با نام علمی *Mespilus germanica* (از خانواده گل سرخیان یا Rosaceae) می‌باشد. این گیاه که در ایران با نام کندس یا کنوس مشهور است در طب سنتی برای درمان اسهال، تقویت سیستم عصبی، خونریزی رحمی، ورم روده، زخم دهان و تورم گلو و ترشی و نفخ معده استفاده می‌شده است (۳،۲). ترکیبات موجود در میوه و برگ گیاه مانند اسیدهای چرب، ویتامین‌ها، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و تانن‌ها و اسیدهای آمینه خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی از خود نشان داده‌اند و این ویژگی آن‌ها باعث کاربرد در بیماری‌های مختلف شده است (۴). در این طرح پژوهشی با توجه به مطالعات طب سنتی در زمینه گیاه ازگیل و اثرات آن در درمان بیماری‌های عفونی هدف این بوده که خواص آنتی‌باکتریال برگ گیاه ازگیل بر روی چند سوش باکتریایی عامل عفونت‌های روده‌ای بررسی شود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، برگ ازگیل از جنگل‌های اطراف شهرستان ساری جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها توسط دکتر بهمن اسلامی (دکترای سیستماتیک گیاهی) تایید و نمونه‌ی هرباریومی آن در دانشکده داروسازی ساری نگهداری گردید (E₁-223202). برگ‌های گیاه در دمای اتاق و دور از آفتاب خشک شده و توسط آسیاب پودر شد و با روش خیساندن و با حلال استون-آب (۳۰:۷۰) عصاره‌گیری گردید (۵،۴). محتوای ترکیبات فنولی با کمک معرف فولین سیو کالتیو انجام شد (۴-۶). غلظت ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از این محلول

با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر ۰/۲ نرمال فولین سیو کالتیو مخلوط شد و پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم (۷/۵ درصد) اضافه شد. جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی-ماوراء بنفش در ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. نتایج به صورت مقادیر هم‌ارز با استاندارد اسید گالیک (GAE) بیان شد. بدین منظور میانگین جذب حاصل در معادله خط به دست آمده از ترسیم منحنی استاندارد گالیک اسید قرار داده شد و نتیجه به عنوان محتوای تام فنولی عصاره گزارش شد. برای بررسی میزان تانن تام در عصاره ابتدا با استفاده از ترکیب پلی وینیل پیرولیدون (PVP) ترکیبات تاننی از محلول عصاره حذف گردید. سپس مشابه مرحله قبل میزان فنول تام بجز تانن‌ها محاسبه شده و از مقدار فنول تام کم شد. عدد نهایی میزان تانن تام در نظر گرفته شد (۴-۶). جهت بررسی اثر آنتی‌باکتریال عصاره برگ ازگیل، تست‌ها بر روی ۶ سوش باکتریایی *اشرشیاکلی* (ATCC:25922)، *شیگلا دیسانتریه* (ATCC:13313)، *سالمونلا تیفی* (ATCC:14028)، *ویبریو کلرا* (ATCC:39315)، *کلبسیلا پنومونیه* (ATCC:10031) و *پروتئوس میرابیلیس* (ATCC:29905) که از موسسه رازی تهیه شده بود، انجام شد. برای انجام این تست سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم مک فارلند برای هر یک به صورت جداگانه تهیه گردید (۷).

حداقل غلظت مهارت‌ی رشد با روش Broth Dilution Test مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا ۵ غلظت از محلول عصاره در آب مقطر تهیه شد. سپس در ۵ لوله که هر کدام حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت برات مایع، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی و یک میلی‌لیتر از محلول عصاره به ترتیب غلظت افزوده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۸ ساعت قرار داده شد. برای تعیین حداقل غلظت باکتری‌سیدی ابتدا محیط کشت نوترینت آگار در پلیت تهیه شد و بعد از آن نمونه‌هایی از لوله‌هایی که هیچ رشدی از خود نشان ندادند به

صورت جداگانه برای هر سوش در این پلیت‌ها کشت داده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۸ ساعت قرار داده شد. در نهایت با استفاده از نرم‌افزار SPSS و تست‌های آماری ANOVA داده‌ها مورد آنالیز قرار گرفت و $p \leq 0/05$ میزان معنی‌داری در نظر گرفته شد (۸،۷). جهت بررسی حداقل غلظت باکتری‌سیدی، ابتدا محیط کشت نوترینت آگار در پلیت تهیه شد و بعد از آن نمونه‌هایی از لوله‌هایی که هیچ رشدی از خود نشان ندادند به صورت جداگانه برای هر سوش در این پلیت‌ها کشت داده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۸ ساعت قرار داده شد. این مرحله نیز برای هر سه تکرار انجام گردید. بیشترین غلظتی که هیچ رشدی از خود نشان نداد به عنوان حداقل غلظت باکتری‌سیدی معین شد (۸،۷).

یافته ها و بحث

راندمان عصاره گیری ۲۰ درصد تعیین شد. محتوای تام فنلی عصاره به میزان 10 ± 90 میلی‌گرم معادل گالیک اسید (GAE) در گرم عصاره بر اساس منحنی استاندارد به دست آمد. میزان تانن نیز 4 ± 10 میلی‌گرم معادل تانیک اسید در گرم عصاره به دست آمد. آنالیز عصاره برگ گیاه ازگیل از نظر دارا بودن خواص آنتی‌باکتریال در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول شماره ۱: حداقل غلظت مهاري و حداقل غلظت باکتری‌سیدی عصاره هیدرواستونی برگ گیاه ازگیل

تست	حداقل غلظت مهاري عصاره mg/ml	حداقل غلظت باکتری‌سیدی عصاره mg/ml
سوش باکتری		
اشرشیا کلي	$5/833 \pm 0/044$	$9/167 \pm 0/042$
شیگلا دیسانتریه	$5/833 \pm 0/037$	$9/167 \pm 0/059$
سالمونلا تیفی	$4/167 \pm 0/032$	$7/500 \pm 0/000$
کلبسیلا پنومونیه	$3/833 \pm 0/033$	$5/833 \pm 0/065$
ویبریو کلرا	$6/667 \pm 0/048$	$8/333 \pm 0/054$
پروتوس میرابیلیس	$5/000 \pm 0/000$	$6/667 \pm 0/038$

اعداد بر اساس Mean \pm SD هستند.

با توجه به نتایج تست آنتی‌باکتریال، عصاره هیدرواستونی خواص آنتی‌باکتریال از خود نشان داده است.

این فرآورده بیش‌ترین اثر مهاري و باکتری‌سیدی را بر روی سوش کلبسیلا پنومونیه با $MIC = 3/333 \pm 0/233$ mg/ml و $MBC = 5/833 \pm 0/065$ mg/ml نشان داد. کم‌ترین اثر مهاري بر روی سوش ویبریو کلرا با $MIC = 6/667 \pm 0/048$ mg/ml و کم‌ترین اثر باکتری‌سیدی بر روی سوش‌های اشرشیا کلي و شیگلا دیسانتریه با $MBC = 9/167 \pm 0/042$ mg/ml به دست آمد. امروزه مقاومت میکروبی به داروهای شیمیایی از مهم‌ترین مشکلات بوده که باعث سوق پیدا کردن تحقیقات به سمت گیاهان دارویی به عنوان دارویی بهتر برای درمان عفونت‌های میکروبی شده است (۹).

احمدی و همکاران در سال ۲۰۱۳ میزان اثربخشی عصاره متانلی و اتانلی برگ این گیاه را بر روی سوش‌های سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوک اورئوس و اشرشیا کلي جدا شده از بیمارستان با روش انتشار دیسک مورد ارزیابی قرار داده‌اند که بر اساس آن اثر بخشی خوبی از خود نشان داده است (۱۰). اسدی و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی عملکرد مهاري عصاره هیدروالکلی برگ گیاه ازگیل بر روی انگل لیشمانیای ماژور داشته‌اند اثبات کردند که بر روی این انگل موثر است (۱۱). شریعتی فر و همکاران نیز اثرات عصاره اتانلی عصاره گیاه ازگیل را بر روی لیشمانیوز جلدی مورد ارزیابی قرار داده‌اند که اثرات قابل قبولی از آن مشاهده کردند (۱۲).

در مطالعات مختلف اثرات آنتی باکتریال گیاهان مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. یکی از این گیاهان *Catharanthus roseus* با محدوده ۶/۲۵ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای عصاره‌های مختلف است (۱۳). در مطالعه‌ای دیگر نیز ترکیبات موجود در میوه این گیاه مورد ارزیابی قرار گرفت. ترکیبات موجود در برگ نیز مورد بررسی‌های متنوعی قرار گرفته است. از مهم‌ترین این ترکیبات، پلی‌فنول‌ها و فلاوونوئیدها هستند. ترکیبات پلی‌فنولی مخصوصاً تانن‌ها علاوه بر آن که خواص ضد میکروبی خوبی از خود نشان می‌دهند به دلیل توانایی شلات کردن ترکیبات ماکرومولکولی از جمله پروتئین‌ها و

دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به شماره ۳۱۱ می‌باشد. از دکتر حسین بخشی جویباری دستیار PhD فارماکوگنوزی بابت کمک در جمع‌آوری گیاه تشکر و قدردانی می‌شود. این کار در آزمایشگاه کنترل میکروبی دانشکده داروسازی ساری انجام شده که بدین وسیله از کارشناسان محترم آن حوزه قدردانی می‌گردد.

کربوهیدرات‌ها خواص جاذب و قابض از خود نشان داده و از طرفی اثرات آنتی باکتریال آن باعث می‌شود تا گزینه مناسبی برای درمان اسهال باشند (۱۴).

سپاسگزاری

این مقاله حاصل از طرح مصوبه کمیته تحقیقات

References

- Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B, Ehsanifar S. Antioxidant activity of Hyoscyamus squarrosus fruits. *Pharmacologyonline* 2009; 2: 644-650.
- Ghorbani A. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Turkmen Sahra, north of Iran: (Part 1): General results. *J Ethnopharmacol* 2005; 102(1): 58-68.
- Bibalani GH, Mosazadeh-Sayadmahaleh F. Medicinal benefits and usage of medlar (*Mespilus germanica*) in Gilan Province (Roudsar District), Iran. *Journal of Medicinal Plants Research* 2012; 6(7): 1155-1159.
- Nabavi SF, Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Asgarirad H. The antioxidant activity of wild medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit, stem bark and leaf. *African Journal of Biotechnology* 2011; 10(2): 283-289.
- Gruz J, Ayaz FA, Torun H, Strnad M. Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit at different stages of ripening. *Food Chemistry* 2011; 124(1): 271-277.
- Nabavi SF., Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Jafari N, Yazdanpanah S. Biological activities of freshwater algae, *Spirogyra singularis* Nordstedt. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 2013; 22(1): 58-65.
- Fathi H, Ebrahimzadeh MA, Ahanjan M. Comparison of the antimicrobial activity of Caucasian wingnut leaf extract (*Pterocarya fraxinifolia*) and Walnut (*Juglans regia* L.) plants. *Acta Biologica Indica* 2015; 4(1): 67-74.
- Tabit FT, Komolafe NT, Tshikalange TE, Nyila MA. Phytochemical constituents and antioxidant and antimicrobial activity of selected plants used traditionally as a source of food. *J Med Food* 2016; 19(3): 324-329.
- Jain S, Jacob M, Walker L, Tekwani B. Screening North American plant extracts in vitro against *Trypanosoma brucei* for discovery of new antitrypanosomal drug leads. *BMC Complement Altern Med* 2016; 16(1): 131.
- Ahmady Asbchin S, Safari M, Moradi H, Sayadi V. Antibacterial effects of methanolic and ethanolic leaf extract of Medlar (*Mespilus germanica*) against bacteria isolated from hospital environment. *Arak Medical University Journal* 2013; 16(6): 1-13 (Persian).
- Asadi M, Bahrami S, Ansari Samani R. The effect of *Stachys Lavandulifolia* Vahl. and *Mespilus Germanica* L. leaves hydroalcoholic extracts on *Leishmania Major* (MRHO/IR/75/ER) in vitro. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 2007; 5(1): 39-43.
- Shariatifar N, Rahimnia R, Jamshidi AM, Pirali Hamedani M, Shoeibi S. Effect of ethanolic extract of *Mespilus germanica* on Cutaneous Leishmaniasis in BALB/c Mice. *Journal of Medicinal Plants* 2011; 3(39): 76-81 (Persian).

13. Gaur A, Ganeshan M, Shah R, Bholay A. Determination of minimum inhibitory concentration of organic extract of *Catharanthus roseus* by a novel modified well diffusion technique. *Int J Pure App Biosci* 2016; 4(2): 177-182.
14. Nejad ASM, Kamkar A, Giri A, Pourmahmoudi AA. Ethnobotany and folk medicinal uses of major trees and shrubs in northern Iran. *Journal of Medicinal Plants Research* 2013; 7(7): 284-289.