



Evaluation of the Antibacterial Effect of Ethanolic Extract of *Ziziphus spina-Christi* Leaves on Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Under Laboratory Conditions

Farahnaz Ziaei-pour ¹*, Gholam-Reza Sharifi ², Reza Hajimohammadi-Farimani ³, Hamid-Reza Akhavan ⁴

1. MSc. student, Department of Biotechnology Engineering, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2. Professor, Department of Biotechnology Engineering, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

4. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article history

Submitted: 2025-5-16

Revised: 2025-11-17

Accepted: 2025-12-7

KEYWORDS

Bacterial culture,
Bacterial inhibition,
Disk diffusion,
Gentamicin,
Medicinal plant

The excessive and improper use of antimicrobial agents has led to the emergence of drug-resistant strains. Therefore, It necessitates the discovery and implementation of new sources to combat microbial pathogens. This study aimed to evaluate the antibacterial effect of ethanolic extract of *Ziziphus spina-christi* leaves against four bacteria; Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, and Corynebacterium glutamicum. Initial screening of the antibacterial activity of the extract was performed using the disk diffusion method. Subsequently, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the microdilution method, and the minimum bactericidal concentration (MBC) was identified through microbial culture. According to the results, the highest antibacterial effect of the leaf extract was observed against Corynebacterium glutamicum. The microdilution test showed that the MIC for all bacteria, except Escherichia coli, was 75 mg/mL. The lowest survival rate was observed in Corynebacterium glutamicum and Staphylococcus epidermidis. The MBC for these two bacteria was determined to be 150 mg/mL, while for Escherichia coli, it was 300 mg/mL. The findings of this research demonstrated that *Ziziphus* leaf extract has notable antibacterial activity, especially against the studied Gram-positive bacteria, and could be considered a natural source for developing of new antibacterial drugs.

* Corresponding author: *Gholam-Reza Sharifi*

✉ E-mail: *sharifi@uk.ac.ir*





ارزیابی اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی برگ کنار (*Ziziphus spina-christi*) بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی

فرحناز ضیائی پور^۱، غلامرضا شریفی^{۲*}، رضا حاجی محمدی فریمانی^۳، حمیدرضا اخوان^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان

۲. استاد، بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان

۳. استادیار، بخش علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان

۴. دانشیار، بخش علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان

اطلاعات مقاله **چکیده:** استفاده بی‌رویه و غیراصولی از ترکیبات ضد میکروبی، سبب بروز سویه‌های نوپدید مقاوم به داروهای رایج شده‌اند. به همین دلیل ضروری است منابع جدیدی برای مبارزه با عوامل بیماری‌زای میکروبی، کشف و معرفی گردد. هدف این مطالعه بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی برگ کنار بر چهار باکتری اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم می‌باشد. غربال‌گری اولیه اثر ضدباکتریایی عصاره برگ کنار با روش انتشار دیسک انجام شد. در گام بعد، حداقل غلظت مهارکنندگی با استفاده از روش رقت‌سازی در میکروپلیت تعیین گردید و حداقل غلظت کشندگی نیز با کشت میکروبی مشخص شد. براساس نتایج، بیش‌ترین اثر ضدباکتریایی عصاره برگ کنار بر کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم مشاهده شد. نتایج آزمون رقت‌سازی در میکروپلیت نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی برای تمامی باکتری‌ها به جز اشریشیا کلی، غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره می‌باشد. کمترین درصد زنده‌مانی در کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مشاهده شد. حداقل غلظت کشندگی دو باکتری اشاره شده برابر با ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در مقابل، غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان حداقل غلظت کشنده اشریشیا کلی تعیین گردید. نتایج این پژوهش نشان داد عصاره اتانولی برگ کنار دارای خاصیت ضدباکتریایی قابل‌توجه به‌خصوص بر باکتری‌های گرم مثبت مورد مطالعه در این پژوهش داشت و می‌توان از عصاره اتانولی برگ کنار به‌عنوان منبع طبیعی برای توسعه داروهای ضدباکتریایی جدید استفاده کرد.

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۴۰۴-۲-۲۶
بازنگری: ۱۴۰۴-۸-۲۶
پذیرش: ۱۴۰۴-۹-۱۶

واژگان کلیدی:
 جنتامایسین، دیسک
 دیفیوژن، کشت باکتری،
 گیاه‌دارویی، مهار باکتری

*نویسنده مسئول: غلامرضا شریفی



مقدمه

آزمایشگاه باشند. ترکیبات ضد میکروبی به دست آمده از گیاهان با سازوکارهای متفاوت از آنتی بیوتیک‌ها، باکتری‌ها را حذف می‌کنند. از جمله ورود به غشای سیتوپلاسمی میکروارگانیسم‌ها و تخریب ساختمان پروتئین آن‌ها، ایجاد اختلال در چرخه تنفسی میکروارگانیسم‌ها با اختلال در انتقال الکترون، ایجاد وقفه در فسفری شدن همراه با اکسایش و فعالیت‌های مربوط به سوکسینات در میکروارگانیسم‌ها سبب ایجاد فعالیت ضدباکتریایی می‌شود (Lam, 2007; Lee, 2006; Ogbunugafor et al., 2008). مطالعات نشان داده‌اند که گونه‌های مختلف *Ziziphus* فعالیت ضدباکتریایی موثری دارند (Al-Khateeb & Abdullah, 2022). مطالعات زیادی روی گیاهان و خاصیت ضدباکتریایی آن‌ها انجام شده است، از جمله در پژوهش Temerk و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که برگ کنار از رشد و فعالیت باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و باکتری‌های تولیدکننده سم (توکسین) مانند باکتری‌های اش‌ریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا،

عصاره‌ها ترکیبات طبیعی گیاهی هستند که از دسته متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. این محصولات به سه شکل جامد، نیمه جامد و مایع وجود دارند و به صورت خوراکی، دارو و یا بخشی از یک دارو استفاده می‌شوند (Roopashree and Naik, 2019). از عصاره‌های گیاهی به دلیل طبیعی بودن، هزینه پایین تولید، سمیت کم و توانایی تجزیه‌کنندگی مواد زائد در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی بهداشتی استفاده می‌شود. مهم‌ترین دلیل استفاده از عصاره و اسانس‌های گیاهی خاصیت ضدباکتری و ضداکسایشی آن‌ها می‌باشد (Pachaiyappan et al., 2014). متابولیت‌های ثانویه گیاهی شامل ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، فلاونولها، گلیکوزیدها، پلی‌استیلن‌ها و آلکالوئیدها است که به علت خاصیت مهارکنندگی و کشندگی مورد توجه قرار گرفته‌اند. در سال‌های اخیر ترکیبات گیاهی متعددی شناخته شده‌اند که حاوی خاصیت ضدباکتریایی هستند و این دسته از ترکیبات طبیعی می‌توانند جایگزین مناسبی برای ترکیب‌های ساخته شده در

رادیکال‌های آزاد، سرطان‌ها، بیماری قلبی و جلوگیری از پیری پوست نقش ایفا می‌کند (Kumar et al., 2011). با توجه به اهمیت گیاهان دارویی به‌عنوان جایگزینی ایمن، موثر و کم هزینه برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی، این مطالعه با هدف بررسی خاصیت ضدباکتری عصاره اتانولی برگ گیاه کنار انجام شد. در این پژوهش اثر عصاره بر سه باکتری گرم مثبت (کورینه باکتریوم گلوتامیکوم، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس) و یک باکتری گرم منفی (اشریشیا کلی) ارزیابی گردید. هدف نهایی؛ سنجش توان بالقوه این عصاره در مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا و معرفی آن به‌عنوان یک گزینه طبیعی و موثر در مقابله با عفونت‌های میکروبی بود.

مواد و روش

عصاره گیری از گیاه

برگ‌های کنار از باغ‌های شهرستان فاریاب جمع‌آوری و به روش ماکروسکوپی از روی ویژگی‌های ریخت‌شناسی در دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان شناسایی شد. پس از شست‌وشو با آب مقطر، به شیوه سایه خشک در دمای

سالمونلا، پروتئوس و سودوموناس آئروژینوزا جلوگیری می‌کند (Temerk et al., 2017). در پژوهشی دیگر که توسط آلبخیت و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی اثر عصاره‌های متانولی و آبی گیاه کنار بر پروماستیگوت‌های انگل لیثمانیا ماژور انجام شد نتایج نشان داد که عصاره متانولی و آبی این گیاه دارای اثرات ضدلیثمانیایی در محیط آزمایشگاه می‌باشد. گیاه دارویی کنار با نام علمی (*Ziziphus spina-christi*) متعلق به جنس *Ziziphus* می‌باشد (Shekafandeh et al., 2017). در پژوهش‌های اخیر ترکیبات فنلی موجود در عصاره برگ گیاه کنار را با عملکرد ضدباکتریایی قوی در برابر سویه‌های بالینی بررسی کرده‌اند (Saeedi et al., 2023). برگ‌های گیاه کنار حاوی اسیدهای بتولینیک، سانوتیک، فلاونوئیدهای مختلف، ساپونین‌ها، تانن‌ها، تری‌ترپن‌ها، گلیکوزید، لیپیدها، پروتئین، قند آزاد و موسیلاژ می‌باشد (Glombitza et al., 1994). برگ و میوه کنار حاوی ترکیبات ضداکسایشی است که در حفاظت از بدن انسان در برابر آسیب‌های اکسایشی اکسیداتیو

شد. در نهایت عصاره‌های خشک شده جمع‌آوری و با هاون چینی به‌طور کامل خرد و در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Abubakar.,2020).

تهیه‌ی محلول استاندارد نیم مک

فارلند

جهت ارزیابی رشد باکتری باید جمعیت معینی از باکتری بررسی گردد. به‌همین دلیل غلظت نیم مک‌فارلند سولفات باریم در اسید سولفوریک که معادل با غلظت ۸ $\times 10^5$ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر است، استفاده شد. برای تهیه‌ی استاندارد نیم مک فارلند سولفات باریم ابتدا $1/175$ گرم از پودر کلرید باریم دو آب به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. هم‌چنین یک میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از اسید سولفوریک ۱٪ درون لوله ریخته شد و ۵۰ میکرولیتر از آن برداشته و ۵۰ میکرولیتر از محلول کلرید باریم به لوله اضافه شد. جذب نوری محلول با استفاده از طیف‌سنج نوری (USA/ Epoch, Biotek) در طول موج ۶۲۵ نانومتر قرائت شد. جذب نوری باید در محدوده‌ی $0/13-0/08$ باشد. محلول

اتاق و رطوبت نسبی محیط $(5 \pm 30\%)$ خشک شد. رطوبت نهایی نمونه‌ها پس از رسیدن به وزن ثابت حدود ۱۰٪ تعیین گردید. برای عمل عصاره‌گیری، برگ‌ها با کمک آسیاب برقی به‌طور کامل خرد شدند و پودر حاصل از الک با محدوده مش ۴۰-۶۰ عبور داده شد. برای عمل عصاره‌گیری، برگ‌ها با کمک آسیاب برقی به‌طور کامل خرد شدند. برای تهیه عصاره از حلال اتانول ۷۰ درصد و اختلاط برگ خرد شده با حلال با نسبت ۱ به ۲۰ استفاده شد. مخلوط گیاه و حلال جهت عصاره‌گیری درون گرم‌خانه همزن‌دار (Thermoshake, Gerhardt) با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و سرعت ۸۰ دور در دقیقه قرار گرفت و پس از مدت زمان ۱۵ ساعت، در دمای چهار درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در ادامه از کاغذ صافی عبور داده شد. عصاره در دستگاه تبخیرکننده چرخان تحت خلاء (IKA RV10, Germany) با دمای ۶۵ درجه سلسیوس و سرعت ۹۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه تغلیظ شدند. حذف کامل حلال با کمک خشک‌کن انجمادی (Zibus/ Vaco5, Germany) انجام

پیش‌تر از مراجع معتبر از جمله انستیتو پاستور ایران تهیه شده‌اند سپس دیسک حاوی آنتی بیوتیک جنتامایسین (با غلظت ۱۰ میکروگرم، شرکت پادتن طب، ایران) به صورت آماده و استریل تهیه شدند. به منظور اطمینان از عدم آلودگی، تعدادی از دیسک‌ها به عنوان کنترل منفی روی محیط کشت فاقد باکتری انکوبه گردیدند و عدم رشد میکروبی تایید گردید. دیسک‌های خالی (بلانک) با قطر پنج میلی‌لیتر روی محیط کشت قرار گرفت. روی هر دیسک خالی، به آرامی ۲۰ میکرولیتر از عصاره برگ کنار تزریق شد. پلیت‌ها درون گرمخانه با دمای ۳۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت، قطر هاله‌ی عدم رشد اندازه‌گیری شد (Heatley, 1944).

حاصل در لوله‌های درب پیچ‌دار با اندازه لوله‌ای که جهت تهیه‌ی سوسپانسیون باکتری استفاده می‌شد در تاریکی و دمای اتاق نگهداری شدند (Harborne, 1998).

بررسی اثر ضدباکتریایی به روش

دیسک دیفیوژن

از سوسپانسیون کشت جوان (۱۸ ساعته) اش‌ریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و کورینه باکتریوم گلوتامیکوم (جدول ۱) با کدورت معادل نیم مک فارلند روی محیط کشت مولر هینتون آگار با کمک سوآپ، کشت سطحی (چمنی) داده شد. سویه‌های باکتری مورد استفاده در این مطالعه از استوک‌های ذخیره شده در آزمایشگاه تامین شدند. این سویه‌ها جدول ۱. ویژگی‌های باکتری‌های مورد استفاده در مطالعه

نام باکتری	نام علمی	نوع پاتوژن	ATCC	منبع سویه	نام ایزوله
اش‌ریشیا کلی	<i>Escherichia coli</i> (E.col)	گرم منفی انسانی	25922	انستیتو پاستور ایران	ایزوله مرجع
استافیلوکوکوس اورئوس	<i>Staphylococcus aureus</i> (S.aur)	گرم منفی انسانی	25923	انستیتو پاستور ایران	ایزوله مرجع
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (S. epi)	گرم منفی انسانی	12228	انستیتو پاستور ایران	ایزوله مرجع
کورینه باکتریوم گلوتامیکوم	<i>Corynebacterium glutamicum</i> (C.glu)	گرم مثبت غیر بیماری‌زا	13032	انستیتو پاستور ایران	ایزوله صنعتی

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی

(MIC) با استفاده از روش رقت‌سازی در

میکروپلیت

سوسپانسیون باکتری‌های اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و کورینه باکتریوم گلوتامیکوم در محیط کشت مولر هینتون برات معادل غلظت نیم مک فارلند تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از آن‌ها به شش چاهک میکروپلیت اضافه شد. بدین‌صورت که به هر کدام از پنج چاهک اول برای هر باکتری ۱۰۰ میکرولیتر عصاره در غلظت‌های مختلف اضافه شد. چاهک شش به‌عنوان شاهد مثبت حاوی سوسپانسیون باکتری و چاهک هفت به‌عنوان شاهد منفی فقط حاوی عصاره برگ کنار بود. این کار با سه تکرار انجام شد. پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت، میزان کدورت و رشد در چاهک‌های میکروپلیت مورد بررسی قرار گرفت و MIC عصاره برگ کنار تعیین گردید. سپس برای تایید مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی رشد MIC به‌دست‌آمده در روش میکروپلیت دایلووشن از ماده تیزولیل بلو تترازولیوم برومید (MTT) استفاده گردید. به این منظور ۱۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه و پس

از سه ساعت گرمخانه‌گذاری در تاریکی و دمای ۳۵ درجه سلسیوس مایع رویی برداشته و ۱۰۰ میکرولیتر حلال DMSO اضافه گردید. جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت گردید. با استفاده از (رابطه‌ی ۱) درصد زنده‌مانی سلول‌ها مشخص گردید (Takeuchi, Baba, & Shigeta., 1991).

۱. = درصد سلول‌های زنده

$$100 \times \frac{\text{میانگین جذب کنترل منفی} - \text{جذب MTT در غلظت‌های مختلف}}{\text{میانگین جذب کنترل مثبت}}$$

تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC)

پس از تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از محتوای تمامی چاهک‌ها در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت سطحی داده شد و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پایین‌ترین غلظتی که در آن رشد صورت نگرفته بود به‌عنوان MBC مشخص شد.

نتایج و بحث

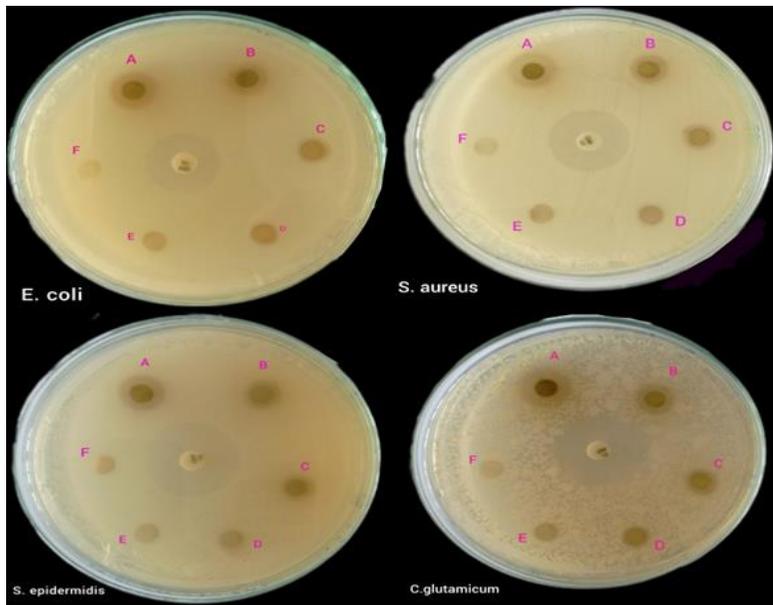
بررسی اثر ضدباکتریایی به روش دیسک

دیفیوژن

نتایج حاصل از بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی برگ کنار به روش دیسک دیفیوژن در (شکل ۱ و ۲) آورده شده است. نتایج نشان داد که نمونه شاهد جنتامایسین بیش‌ترین قطر هاله

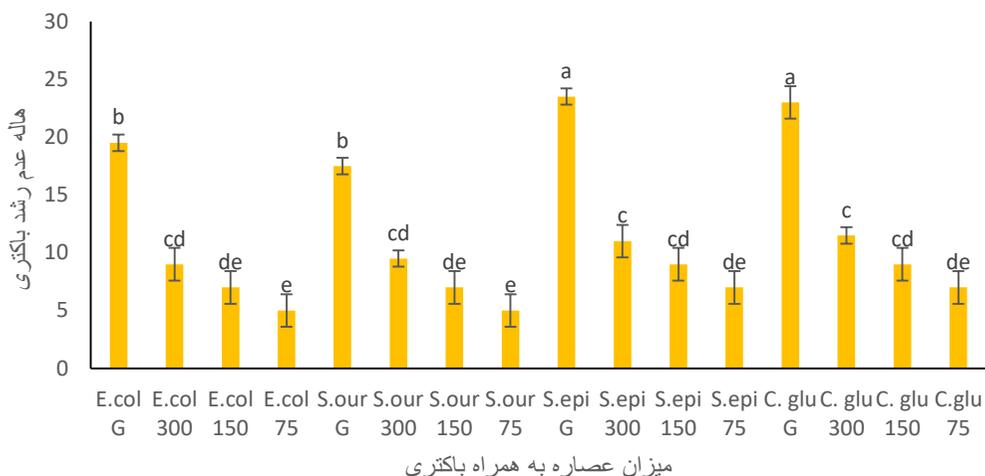
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و کورینه باکتریوم گلوتامیکوم بود. کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به غلظت ۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر در باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کلی بود.

عدم رشد را به ترتیب در باکتری‌های کورینه باکتریوم گلوتامیکوم، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، اشیریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس داشت. بعد از آن در غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر مربوط به باکتری‌های



شکل ۱. بررسی تاثیر عصاره برگ کنار با غلظت‌های مختلف (A=300، B=150 و C=75 (میلی گرم بر میلی لیتر)) در مهار رشد باکتری‌های اشیریشیا کلی،

استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و کورینه باکتریوم گلوتامیکوم



شکل ۲. مقایسه میانگین هاله عدم رشد باکتری‌های اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و کورینه باکتریوم گلوتامیکوم در غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برگ کنار و شاهد جنتامایسین با روش انتشار دیسک؛ حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار ($p \leq 0/05$).

اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس با یک‌دیگر وجود ندارد. اما تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف در دو باکتری کورینه باکتریوم گلوتامیکوم و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس با دو باکتری اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس وجود دارد ($P \leq 0/05$).

نتایج به‌دست‌آمده از آزمون مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برگ کنار بر باکتری‌های مورد بررسی در این آزمایش نشان دهنده آن بود که تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف در رفتار کورینه باکتریوم گلوتامیکوم و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس با یک‌دیگر و هم‌چنین باکتری‌های

(جدول ۲). نتایج تشخیص درصد زنده‌مانی با رنگ MTT نشان‌دهنده این بود که غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره در باکتری‌های کورینه باکتریوم گلوتامیکوم، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۰/۴۰۷٪، ۰/۴۲٪، ۰/۵۶۴٪ و ۰/۵۷٪

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ کنار در (شکل ۳) آمده است. نتایج حاصل از بررسی کدورت نشان داد که در سه باکتری به جز اشریشیا کلی در غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کدورتی مشاهده نشد

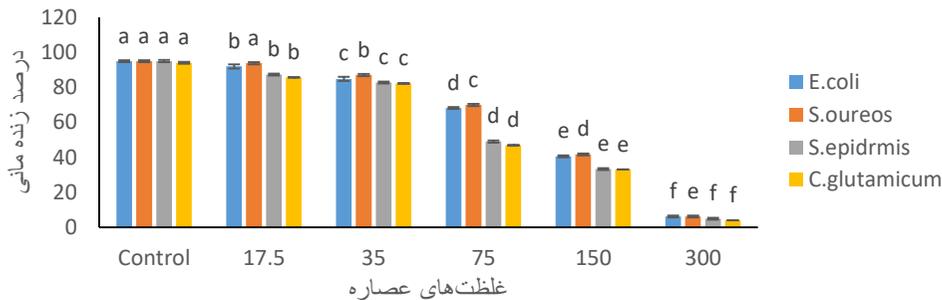
اورئوس و اشیریشیا کلی با ۹۳/۲۰٪ و ۹۰/۹۱٪ می باشد.

می باشد. کمترین درصد زندهمانی در غلظت ۱۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و بیشترین درصد زندهمانی مربوط به باکتری های استافیلوکوکوس

جدول ۲. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC)

شاهد	غلظت عصاره (mg/ml)					سویه باکتری
	۳۰۰	۱۵۰	۷۵	۳۵	۱۷/۵	
-	-	-	+	+	+	اشیریشیا کلی
-	-	-	-	+	+	استافیلوکوکوس اورئوس
-	-	-	-	+	+	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس
-	-	-	-	+	+	کورینه باکتریوم گلوتامیکوم

(-) و (+) به ترتیب نشان دهنده عدم وجود و وجود کدورت رشد باکتری می باشند.



شکل ۳. درصد زندهمانی کورینه باکتریوم گلوتامیکوم، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، اشیریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس به روش میکرو دایلوژن (MTT)

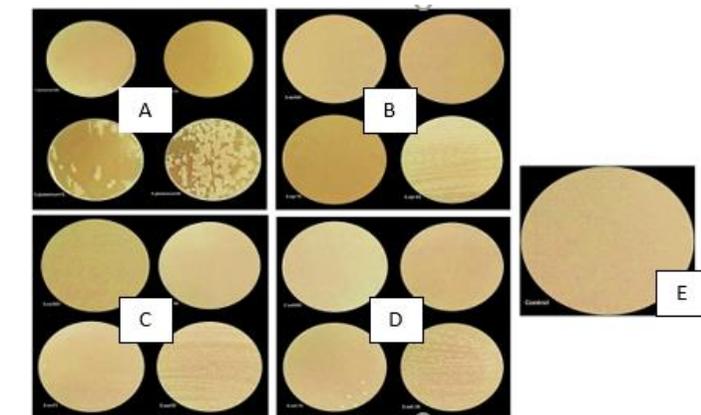
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، اشیریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس با یکدیگر وجود دارد ($P \leq 0/05$).

تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC)

نتایج به دست آمده از آزمون مقایسه میانگین درصد غلظت مهارتی عصاره اتانولی برگ کنار بر باکتری های مورد استفاده در این آزمایش نشان دهنده آن بود که تفاوت معنی داری بین غلظت های مختلف در باکتری های کورینه باکتریوم گلوتامیکوم و

نتایج (شکل ۴) و (جدول ۳) حاصل از MBC نشان داد که حداقل غلظتی از عصاره برگ کنار که باکتری را از بین می برد غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر در سه کلی می باشد.

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس و غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر در باکتری اشیریشیا کلی می باشد.



شکل ۴. کشت سطحی جهت تعیین MBC به ترتیب از بالا سمت چپ در باکتری های (A) کورینه باکتریوم گلوتامیکوم، (B) استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، (C) استافیلوکوکوس اورئوس و (D) اشیریشیا کلی و نمونه (E) شاهد در سمت راست

جدول ۳. حداقل غلظت کشندگی عصاره برگ کنار (MBC)

سویه باکتری	غلظت عصاره (mg/ml)					
	شاهد	۳۰۰	۱۵۰	۷۵	۳۵	۱۷/۵
اشیریشیا کلی	-	-	+	+	+	+
استافیلوکوکوس اورئوس	-	-	-	+	+	+
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	-	-	-	+	+	+
کورینه باکتریوم گلوتامیکوم	-	-	-	-	+	+

(-) و (+) به ترتیب نشان دهنده عدم رشد و رشد باکتری می باشد.

گیاهان حاوی ترکیبات با ارزش از جمله پلی فنل ها، تانن ها، فلاونوئیدها و ترکیبات دیگری هستند که دارای چندین ویژگی مانند فعالیت ضد میکروبی می باشند

استخراج مواد مؤثره می‌باشد. تقریباً همه ترکیبات ضد میکروبی بیشتر با حلال‌های اتانولی و متانولی استخراج می‌شوند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که عصاره‌های استخراج شده با حلال‌های آلی معمولاً اثر ضد میکروبی پایدارتر و بیشتری نسبت به عصاره‌های استخراج شده با حلال‌های آبی دارند، زیرا بسیاری از ترکیبات فعال ضد میکروبی در آب نامحلول هستند (Giner et al., 2000; Safavi et al., 2013). در این پژوهش نمونه‌ای با استخراج تنها با آب خالص تهیه نشده است و برای استخراج از اتانول رقیق استفاده گردیده تا از حل شدن بیش از حد ترکیبات قطبی جلوگیری شده و سمیت احتمالی کاهش یابد. به منظور تایید نقش حلال و بررسی اثر عصاره‌های آبی، انجام مطالعات آینده با تهیه نمونه شاهد استخراج آبی توصیه می‌شود. در پژوهشی که توسط شرافتی و همکاران انجام شد نتایج نشان داد که در گیاه میمونی سازویی هاله عدم رشد توسط هیچ کدام از عصاره‌های کلروفومی مشاهده نشد، اما میانگین قطر هاله‌های به دست آمده از عصاره متانولی، نشان دهنده تاثیر عصاره این گیاه بر مهار رشد باکتری‌های مورد مطالعه بود (Sharafati-

Balasundram et al., 2006). بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش عصاره اتانولی برگ کنار در برابر سویه‌های باکتریایی آزمایش اثر ضدباکتریایی بالقوه‌ای را دارا می‌باشد. فعالیت ضدباکتریایی مشاهده شده در اسانس‌ها و عصاره‌ها ممکن است ناشی از وجود ترکیبات فنلی باشد، زیرا پلی‌فنل‌ها می‌توانند بر نفوذپذیری غشای سلولی تاثیر بگذارند و آنزیم‌های خاص را مهار کنند. با این حال، برای تایید نقش پلی‌فنل‌ها نیاز به بررسی میزان ترکیبات فنلی کل و فعالیت ضداکسایشی عصاره‌ها می‌باشد (Rizk et al., 1993). عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی به دلیل داشتن ترکیبات فنلی فعالیت ضداکسایشی بالایی دارند. فعالیت ضداکسایشی این ترکیبات باعث جلوگیری از ایجاد رادیکال‌های آزاد و در نهایت سبب آسیب در چرخه زندگی باکتری‌ها می‌شود (Jafari et al., 2021). تحقیقات انجام شده روی عصاره هسته انبه نشان داد که ترکیبات حاصل از این عصاره در برابر برخی از باکتری‌ها خاصیت ضد میکروبی دارد و در غلظت ۳۰۰۰ ppm باعث مهار رشد باکتری *اشریشیا کلی* می‌شود (Bevilacqua et al., 2010). یکی از عوامل مؤثر در خواص ضد میکروبی گیاهان، انتخاب حلال برای

سیمنگا و همکاران، قطر هاله‌ی مهار رشد برابر یا بیش از ۱۵ میلی‌متر نشان دهنده‌ی فعالیت بسیار و قطر هاله‌ی عدم رشد بین ۱۰ تا ۱۵ میلی‌متر نشان دهنده‌ی فعالیت متوسط و قطر هاله‌ی عدم رشد کمتر از ۱۰ میلی‌متر نشان دهنده‌ی غیرفعال بودن عصاره است (Cimanga, et al., 2002).
براین اساس، گیاه کنار در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* و *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* که باکتری‌های گرم مثبت هستند، اثر بالا و در باکتری *اشریشیا کلی* که باکتری گرم منفی بود با قطر هاله ۹/۵ میلی‌متر تقریباً اثر غیر فعال نشان داده است. در همین راستا باکتری‌های گرم منفی به علت داشتن لایه‌ی لیپوپلی‌ساکارید، نسبت به باکتری‌های گرم مثبت، در برابر آثار ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی مقاومتر هستند. در پژوهشی که توسط کومار و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد آنالیزهای فیتوشیمیایی عصاره برگ کنار نشان داد که این عصاره حاوی ترکیباتی از جمله فنل‌ها، تانن‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و ساپونین‌ها می‌باشد. این ترکیبات به دلیل داشتن گروه‌های OH فراوان، عوامل کاهنده قوی هستند و

(Chaleshtori et al., 2010). متخصصین عفونی به دلیل داشتن عوارض کمتر داروهای گیاهی در برابر داروهای شیمیایی برای درمان عفونت‌ها تمایل زیادی به استفاده از داروها با منشا گیاهی دارند (Al-Haj et al., 2010). نتایج حاصل از بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی برگ کنار نشان داد که بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد به ترتیب در باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس*، *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MIC و MBC به ترتیب در *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر غلظت ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در باکتری *اشریشیا کلی* غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. کم‌ترین درصد زنده‌مانی در باکتری‌های *باکتریوم گلوتامیکوم* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* با ۴/۰۷٪ و ۴۲/۴۲٪ بود. در پژوهش حسن و یوسف (۲۰۲۴) بر بررسی‌های مقایسه‌ای خانواده‌ی *Rhamnaceae* نتایج به دست آمده از MIC و MBC نتایج مشابه‌ای با این پژوهش گرفتند (Hassan & Youssef, 2024). براساس مطالعه‌ی

تاننها، ساپونینها و آلکالوئیدها باشد. این یافته‌ها می‌تواند بیانگر ظرفیت موثر برگ کنار به‌عنوان یک منبع طبیعی در تولید داروهای ضدباکتریایی جایگزین یا مکمل آنتی‌بیوتیک‌های رایج باشد. نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های الخطیب و عبدالله (۲۰۲۲) و سعیدی و همکاران (۲۰۲۳) به‌ویژه در نشان دادن اثربخشی عصاره‌های برگ کنار در مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت در یک راستا می‌باشد (Al-Khateeb & Abdullah, 2022; Saeedi et al., 2023). توجه به اثربخشی عصاره برگ کنار، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، از روش‌های پیشرفته‌تری مانند تعیین ساختار ترکیبات فعال به روش کروماتوگرافی و طیف‌سنجی استفاده شود و همچنین اثرات سمی، فارماکولوژیک و مکانیسم عملکرد این عصاره در مدل‌های بالینی مورد بررسی دقیق‌تری قرار بگیرد.

فعالیت‌های ضدباکتریایی و ضداسپاسمی قابل‌توجهی از خود نشان می‌دهند (Kumar et al., 2011). در پژوهشی که روی گیاه اسطوخودوس و رزماری انجام شد، مشاهده گردید که خاصیت ضدباکتریایی بسته به غلظت اسانس و جنس باکتری متفاوت است (Ahmady & Mostafapour, 2018). در مطالعه‌ای که توسط ال‌کمالی و محجوب (۲۰۰۹) انجام شد، نشان داد که عصاره اتانولی و متانولی کنار بر باکتری‌های گرم مثبت و منفی آزمایش موثر بوده است و قطر هاله‌های عدم رشد بین ۲۰ تا ۳۰ میلی‌متر می‌باشد (El-Kamali & Mahjoub, 2009). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره اتانولی برگ کنار دارای اثرات ضدباکتریایی قابل‌توجهی بر برخی از سویه‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد. این فعالیت بازدارندگی می‌تواند به‌دلیل وجود ترکیبات فیتوشیمیایی موثر مانند فلاونوئیدها،

Pharmacy & Bioallied Sciences, 12(2), 1–7. DOI: N/A
Ahmady, A. S., & Mostafapour, M. J. (2018). Anti-bacterial interactions Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and essential oils of lavender (*Lavandula stoechas*) on two

منابع

Abubakar, A. R., Yesuf, N., & Hassan, H. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of*

- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., & Vlietinck, A. J. (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of ethnopharmacology*, 79(2), 213-220. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00384-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00384-1)
- El-Kamali, H. H., & Mahjoub, S. A. T. (2009). Antibacterial activity of *Francoeuria crispa*, *Pulicaria undulata*, *Ziziphus spina-christi* and *Cucurbita pepo* against seven standard pathogenic bacteria. *Ethnobotanical Leaflets*, 2009(6), 6. DOI: N/A
- Giner, R.M., Villalba, M.L., Recio, M.C., Mañez, S., Cerdá Nicolás, M. & Ríos, J.L. 2000. Anti-inflammatory glycoterpenoids from *Scrophularia auriculata*. *Eur. J. Pharmacol.* 389: 243 - 52. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00055-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00055-7)
- Glombitza, K. W., Mahran, G. H., Mirhom, Y. W., Michel, K. G., & Motawi, T. K. (1994). Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of *Zizyphus spina-christi* in rats. *Planta medica*, 60(03), 244-247. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959451>
- Hassan, L., & Youssef, H. (2024). Comparative study of antimicrobial effects of Rhamnaceae family plant extracts including *Zizyphus spina-christi*. Grampositive and three Gram-negative bacteria in vitro.: 177-187. DOI: N/A
- Albakhit S, khademvatan S, Douidi M. The evaluation of Methanolic and aqueous extracts effect of *Zizyphus spina-christi* against *Leishmania major* (MHOM/IR/75/ER) promastigotes using MTT assay. *Iran J Med Microbiol.* 2016; 10 (3):54-60. DOI: N/A
- AL-Haj, N.A., Mashan, M.N., Shamsudin, H., Vairappan, C.S. & Sekawi (2010) Antibacterial activity of marine source extracts against multidrug resistance organisms. *Am. J. Pharm. Toxicol.* 5, 195-102. DOI: N/A
- Al-Khateeb, R., & Abdullah, R. (2022). Antimicrobial properties of *Zizyphus* species: A systematic overview. *Phytotherapy Research*, 36(4), 1024–1036. <https://doi.org/10.1002/ptr.735>
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1): 191 - 20. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Bevilacqua, A., Ficelo, S., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2010). Bioactivity of grapefruit seed extract against *Pseudomonas* spp. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34(3), 495 -507. <https://doi.org/10>

- screening of *Ritchea longipedicellata* in *Plasmodium berghei*. *Biokemistri*. 20 (1), 23-27. DOI: N/A
- Pachaiyappan, A., Muthuvel, A., Sadhasivam, G., Sankar, V. J. V., Sridhar, N., & Kumar, M. (2014). In vitro antioxidant activity of different gastropods, bivalves and echinoderm by solvent extraction method. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(6), 2539. DOI: N/A
- Rizk, A.M., Hammouda, F.M., Ismail, S.I. & Hussiney, H.A. (1993) Constituents of plants growing in Qatar Xxiii. Flavonoids of *F. Crispa*. Qater University. *Sci J*. 13 (1), 51-52. DOI: N/A
- Roopashree, K. M., & Naik, D. (2019). Advanced method of secondary metabolite extraction and quality analysis. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 1829-1842. DOI: N/A
- Saeedi, M., Ahmadi, F., & Hosseini, S. (2023). Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Ziziphus* leaf extracts against clinical isolates. *Journal of Ethnopharmacology*, 299, 115202. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115202>
- Safavi, F., Ebrahimi, P. & Mighani, H. 2013. In vitro anti-bacterial activity of root and aerial parts of *Scrophularia striata* on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. – *YUMSJ* 18: 603-614. DOI: N/A
- BMC Complementary Medicine and Therapies, 24, 78. <https://doi.org/10.1186/s12906-024-043651>
- Harborne, A. J. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. springer science & business media.
- Heatley, N. G. (1944). A method for the assay of penicillin. *Biochemical Journal*, 38(1), 61. <https://doi.org/10.1042/bj0380061>
- Jafari, A., Esmaili, M., Amiri, S., & Heidari, R. (2021). Rheological, antioxidant, physicochemical, and biochemical characterization of Iranian monofloral honeys. *Journal of Food and Bioprocess Engineering*, 4(1), 43 -52. DOI: N/A
- Kumar, G., Sangita, M., Bappadity, M. and Kiran, M. (2011) Phytochemical Evaluation of Methanolic Extract of *Zizyphus xylopyrus*. *International Journal of Drug Discovery and Herbal Research*, 1, 231-233. DOI: N/A
- Lam, K.S. (2007) New aspects of natural products in drug discovery, *Trends Microbiology*, 15 (6), 279-289. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.04.001>
- Lee, C.P. (2006) Who's in the business of saving lives? *J.Med. Philos.* 31, 465-482. <https://doi.org/10.1080/03605310600873917>
- Ogbunugafor, H.A., Okochi, V.I., Okpuzor, J. & Emeka, P. (2008) Tolerance and antiplasmodial

Sharafati -chaleshtori, R., Sharafati -chaleshtori, F., Sharafati -chaleshtori, A. & Ashrafi, K. 2010. Antimicrobial effects and evaluation of total phenols, flavonoids and flavonols contents of ethanolic extracts of *Scrophularia striata*. – J. Shahrekord Univ. Medl. Sci. 11: 32-37. DOI: N/A

Shekafandeh, A., & Takhti, S. (2017). Effect of putrescine and sodium chloride on morphological and physiological characteristics of wild 'Konar' (*Ziziphus spinachristi* L.). Iranian Journal of Horticultural Science, 47(4), 669. DOI: N/A

Takeuchi, H., Baba, M., & Shigeta, S. (1991). An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. Journal of virological methods, 33(1-2), 61-71. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(91\)90031-Z](https://doi.org/10.1016/0166-0934(91)90031-Z)

Temerk, H., Salem, W., Sayed, W., & Hassan, F. S. (2017). Antibacterial effect of phytochemical extracts from *Ziziphus-spina christi* against some pathogenic bacteria. Egyptian Journal of Botany, 57(3), 595-604. DOI: N/A