Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 24, No. 1, Spring 2024, Pages: 35-45

Original article

Evaluation of Antibacterial Activity of Aqueous, Ethanol and Methanol Extracts of *Ginkgo biloba* leaves *in vitro*

Elina Barazesh [1], Mostafa Govahi *[2], Mojtaba Ranjbar [1]

1. Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
2. Department of Nano Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of New Technologies, Amol, Iran

*** *Corresponding Author.*** Tel: +981144442136, Fax: +981144154265, E-mail: m.govahi@ausmt.ac.ir

Article info

Article history:
Received: Feb 22, 2024
Accepted: Jun 02, 2024

Keywords:
Ginkgo biloba
Anti-Bacterial
Herbal Plant

ABSTRACT

Background: *Ginkgo biloba* is a plant with many therapeutic characteristics because it's rich in polyphenolic contents. This study was done to evaluate the antibacterial activities of Ginkgo and to compare the antibacterial potential of ethanolic, methanolic and aqueous leaf extracts of *Ginkgo biloba*.

Methods: The antibacterial activity of Ginkgo extracts was evaluated using a disc diffusion method against four strains of bacteria: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis,* and *Staphylococcus aureus*. The Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the extracts were assessed.

Results: The results indicated that all extracts of Ginkgo possess distinguished antibacterial activity. Among them the methanolic extract exhibited maximum antibacterial activity and the aqueous extract showed minimum antibacterial activity. The highest MIC and MBC were determined at 3.13 and 6.25 µg/mL of aqueous extract against *Bacillus subtilis*, respectively.

Conclusion: Regarding the acquired results from this study, the leaves of *Ginkgo biloba* possess a considerable amount of antibacterial activity that can make them one of the most valuable antibacterial resources that could be used in food and therapeutic industries. Therefore, more studies should be conducted on this plant.

How to cite this article: Barazesh E, Govahi M, Ranjbar M. Evaluation of Antibacterial Activity of Aqueous, Ethanol and Methanol Extracts of *Ginkgo biloba* leaves in vitro. J Ardabil Univ Med Sci. 2024;24(1): 35-45.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.35]

Extended Abstract

Background: Antimicrobial agents are very important in reducing the global problem of infectious diseases. The emergence of antibiotic-resistant bacteria has become a major threat to public health because there are usually few or no antimicrobial agents available for infections caused by these pathogens. The multidrug resistance increases the treatment costs and death rate. Also, using high dosages of chemical pharmaceuticals can bring harmful side effects of the human body in the long- term. So, it's of high importance to study the new and alternative ways to treat infectious diseases. According to WHO, herbal plants are the best resources to attain all kinds of pharmaceuticals. Studies showed that plants possess antioxidant, antibacterial, gastro and hepatoprotective, antimutagenic, anti-diarrheal and chemo - preventive effects. *Ginkgo biloba* also known as the maidenhair tree is from the *Ginkgoceae* family and a traditional Chinese herbal plant. This plant is known as a living fossil because it existed for around 250 million years. Modern pharmacological studies showed that this plant has many biological activities such as antitumor, antioxidant, antibacterial, anti-inflammation, anti-depressant, immuno-stimulating, hepatoprotective, treatment of ischemia/reperfusion injury, retinal and neurodegenerative diseases. This study aims to investigate the antibacterial properties of *Ginkgo biloba* extracts prepared using three different solvents: ethanol, methanol, and water. Specifically, we seek to determine which of these three extract types demonstrates the highest inhibitory activity against four target bacterial strains.

Methods: Dried ginkgo leaves were powdered by a mixer and the fine powder was dissolved in water, 80% methanol and 70% ethanol to achieve ginkgo extracts. Then they were placed in the shaker for 72 hours, and then the extracts were centrifuged and filtered. The disc diffusion assay was done to study the antibacterial effects of ginkgo extracts against *Escherichia coli, Salmonella typhimurium* gram- negative and *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* gram-positive bacteria strains in four different concentrations. The antibacterial activity of each of the extracts against the studied bacteria was determined using disk diffusion method according to CLSI standard. After preparing the microbial suspension with 0.5 McFarland turbidity (10^8 cfu/ml) using a sterile swap on the surface of the Mueller Hinton Agar medium, a uniform culture was performed. In the next step, using sterile forceps, blank discs impregnated with different concentrations of ginkgo extract were placed on the surface of the culture medium and fixed on the culture medium with a little pressure. In the following, after 24 hours of incubation, the inhibition zones were measured in millimeters. To determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the extracts, first, bacterial suspensions of each strain were prepared according to 0.5 McFarland's standard in Mueller Hinton broth culture medium and distributed in sterile tubes. Then, a certain volume was prepared from twofold dilutions of the filtered plant extract (400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 and 1.56 mg/ml) and was incubated for 24 hours. At last, the MIC values were determined and the concentrations with no visible bacteria growth were cultured in Mueller Hinton Agar plates and incubated. The concentrations with no bacteria colony in their plate were considered as MBC. Data analysis was performed using a factorial experiment within a completely randomized design, and Duncan's multiple range test was used to compare the means using SPSS-25 software ($p\leq 0.05$).

Results: The results showed that the biggest ZOI of both aqueous and ethanolic extracts were at 400 mg /ml with 28±0.04 mm and 30±0.3 mm against gram positive *Staphylococcus aureus*, respectively. The biggest ZOI of methanolic extract was at 400 mg/ml with 29.5±0.2 mm against gram - positive *Bacillus subtilis*. The ZOI of hydroalcoholic extracts was bigger than that of aqueous extracts. Among hydroalcoholic

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.35]

extracts, the methanolic extracts showed more antibacterial activity. This indicated that gram -positive strains (*Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*) were more sensitive toward ginkgo extracts while the gram-negative strains (*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*) showed more resistance. Also, the highest MIC value was at 3.13 mg/ml of aqueous extract against *Bacillus subtilis* and the highest MBC value was at 6.25 mg/ml of aqueous extract against *Bacillus subtilis*. The methanolic extract showed noticeable antibacterial activity against all four strains. But as aforementioned, the gram- positive bacteria used in this study showed more sensitivity toward ginkgo extracts which could be due to the unique structures of gram- negative outer membrane that is consisted of lipoprotein and lipopolysaccharide. The outer membrane shows selective permeability so the hydrophobic compounds have limited access to the beneath structures. This makes gram-positive bacteria more susceptible to some compounds in plant extracts. The significant antibacterial activity of ginkgo extracts could be because of their high polyphenolic compounds. Previous studies showed that ginkgolic acid is one of the polyphenols in ginkgo leaves that showed noticeable antibacterial activities. There are more compounds such as phenolic acids, flavonoids and flavonols (e.g. Isorhamnetin, Quercetin and Kaempferol) in ginkgo extracts that could also have a role in the antibacterial activity of ginkgo extracts. Phenolic acids possess the most bactericidal effect because they can inhibit the virulence parts of bacteria like toxins, enzymes, preventing the formation of biofilm, the synergy effects of these compounds together and with antibiotics. Therefore, higher antibacterial activity of hydroalcoholic extracts could be related to their high ability in extracting polyphenols so it could be concluded that according to the reported results, methanol solvent has the highest ability to extract ginkgo compounds and the highest total phenolic and flavonoid contents. With increasing in concentrations of the extracts, an increase in antibacterial activity was observed until the high concentration of 600 mg/ml which this pattern broke and a decrease of bactericidal was observed. This phenomenon could be due to the decrease in diffusion of extracts in the medium because of the high concentration of loaded extracts on blank discs, size and weight of the compounds in extracts. So, with increasing the concentration more than a certain extent, the antibacterial activities decrease.

Conclusion: The results indicated that all extracts of ginkgo possess distinguished antibacterial activity. The most antibacterial activity was observed in methanolic extracts while minimum antibacterial activity was related to aqueous extracts. The highest antibacterial activity of all three extracts was against gram- positive strains. So, it could be concluded that ginkgo leaf extracts could be a good candidate as an alternative to chemical antibiotics.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.35]

مجله دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دوره بیست و چهارم، شماره اول، بهار ۱۴۰۳

مقاله اصیل

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی گیاه ژینکو (*Ginkgo biloba*) در شرایط آزمایشگاهی

الینا برازش[۱]، مصطفی گواهی[۲]، مجتبی رنجبر[۱]*

۱. گروه زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

۲. گروه نانوزیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۱۱۴۴۴۴۲۱۳۶ فاکس: ۰۱۱۴۴۱۵۴۲۶۵ پست الکترونیک: m.govahi@ausmt.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: گیاه ژینکو (*Ginkgo biloba*)، گیاهی غنی از ترکیبات پلی‌فنلی است که این ترکیبات باعث بروز خواص چشمگیری می‌شوند. هدف از این مطالعه بررسی ویژگی‌های ضدباکتریایی ژینکو و مقایسه خواص ضدباکتریایی آن بین سه عصاره آبی، اتانولی و متانولی برگ ژینکو است.

روش کار: جهت بررسی ویژگی‌های ضدباکتریایی عصاره‌های برگ ژینکو از روش انتشار دیسک بر روی چهار سویه باکتری *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*)، *سالمونلا تیفی‌موریوم* (*Salmonella typhimurium*)، *باسیلوس سابتیلیس* (*Bacillus subtilis*) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) استفاده شد. در نهایت حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) عصاره‌ها در برابر این چهار سویه سنجیده شد.

یافته‌ها: نتایج حاکی از آن بودند که تمامی عصاره‌های ژینکو دارای خواص ضدباکتریایی هستند و در میان آن‌ها، بیشترین فعالیت ضدباکتریایی مربوط به عصاره متانولی و کم‌ترین مربوط به عصاره آبی ژینکو بود. بیشترین میزان حداقل غلظت بازدارندگی در غلظت ۳/۱۳ عصاره آبی و بر علیه باکتری *باسیلوس سابتیلیس* و بیشترین میزان حداقل غلظت کشندگی نیز در غلظت ۶/۲۵ عصاره آبی و بر روی باکتری *باسیلوس سابتیلیس* است.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش نشان از این داشتند که برگ گیاه ژینکو دارای خواص ضدباکتریایی قابل توجهی است که می‌تواند در صنایع غذایی و دارویی کاربردهای وسیعی داشته باشد. بنابراین، انجام مطالعات بیشتر بر روی این گیاه لازم است.

واژه‌های کلیدی: *ژینکو بیلوبا*، ضدباکتریایی، گیاه دارویی

دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۳ **پذیرش:** ۱۴۰۳/۳/۱۳

مقدمه

عوامل ضدمیکروبی در کاهش مشکل جهانی بیماری‌های عفونی بسیار اهمیت دارند. هرچند، پیداش و گسترش گونه‌های مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک در باکتری‌ها تبدیل به خطر سلامت عمومی بزرگی شده است، بنابراین عوامل ضدمیکروبی کم‌تر و گاهاً هیچ عامل ضدمیکروبی برای عفونت‌های ایجاد شده به وسیله باکتری‌های بیماری‌زا، در دسترس نیست [۱]. مقاومت به آنتی‌بیوتیک هزینه‌های درمان و نرخ مرگ و میر را

این مقاله تحت شرایط Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License قابل بازنشر است.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.35]

نیـز افـزایش داده اسـت؛ ضـمن آن کـه اسـتفاده از دوزهـای بـالای داروهـای شـیمیایی در طـول زمـان عوارض جانبی زیان‌آوری را برای بدن انسان به دنبـال دارد [۲]. از این‌رو، مطالعه بر روی روش‌های نـوین و جایگزین جهت درمان بیماری‌های عفونی اهمیت بالایی دارد.

بر اساس اطلاعات سازمان جهـانی بهداشـت[1] (WHO)، گیاهان دارویی بهترین منبع برای دست‌یابی بـه انـواع داروهـا هسـتند [۳]. مطالعـات اکـی از آن اسـت کـه گیاهان دارای خواص آنتـی‌اکسـیدانی، ضـد باکتریـایی، اثرات محافظت کنندگی از معده و کبـد، ضـد اسـهال، ضـد درد، غیـر جهـش‌زا و پـیش‌گیـری کننـده اثـرات شیمیایی هستند [٤]. بسیاری از گیاهان به دلیل همـین خـواص ضـد میکروبـی خـود کـه ناشـی از ترکیبـات شیمیایی سنتز شده در گیـاه در طـی متابولیسـم‌هـای ثانویه است، مورد استفاده قرار می‌گیرند. گیاهان غنی از متابولیت‌های ثانویه از جمله تانن‌ها، اجـزای فنـولی، آلکالوئیـدها و فلاوونوئیـدها هسـتند کـه در شـرایط آزمایشگاهی دارای خواص ضد میکروبی هستند [۵].

گیاه *ژینکو بیلوبا* (*Ginkgo biloba*) کـه در فارسـی بـا نـام کهـن‌دار نیـز شـناخته مـی‌شـود، از خـانواده *Ginkgoaceae* و یک گیاه دارویی سنتی شرقی اسـت با برگ‌های دو لبی که به همـین دلیـل بیلوبـا نامیـده می‌شود. گیاه ژینکو که به عنوان فسیل زنـده شـناخته می‌شود، حدود ۲۵۰ میلیـون سـال قـدمت دارد و بـه دلیل کاربردهای متعددش در حـوزه غـذا و سـلامت، امـروزه در سرتاسـر دنیـا کاشـته مـی‌شـود [۶, ۷]. مطالعـات دارویـی مـدرن نشـان داده کـه ایـن گیـاه فعالیت‌های زیستی بسیاری چون خاصیت ضد توموری، آنتـی‌اکسـیدانی، ضـد باکتریـایی، ضـد التهـابی، ضـد افسـردگی، محـرک سیسـتم ایمنـی، اثـرات محافظت‌کنندگی از کبد، درمان آسـیب خـون‌رسـانی مجدد[2] (IRI: یک آسیب بافتی که هنگام بازگشت خون بـه بافـت، بعـد از یـک دوره کمبـود اکسـیژن، ایجـاد می‌شود)، بیماری‌های مرتبط با شبکیه چشم و اخـتلالات بازسازی سلول‌های عصبی، دارد [۸]. جینکـو یـک گیـاه دارویی شامل صدها نوع از ذرات زیست‌فعال است، از جمله ترپن تری‌لاکتون‌ها، فلاونوئیدها، اسیدهای چرب، پروآنتوسیانیدین‌ها و پلی‌ساکاریدهاسـت [۱۰،۹]. ذره فعال غالب در این گیاه ترپن‌ها و فلاونوئیـدها هسـتند که فعالیت‌های نابودگری رادیکال‌های آزادِ چشم‌گیری از خود نشان داده و معمـولاً در درمـان بیمـاری‌هـای اخـتلال شـناختی و زوال عقلـی مـورد اسـتفاده قـرار می‌گیرند [۸].

مطالعـات رازنـا و همکـاران حـاکی از آن بودنـد کـه عصاره‌ی برگ گیاه ژینکو دارای خـواص ضـدباکتریایی اسـت [۱۱]. کاراکایـا و همکـاران در مطالعـه‌ای بـه ویژگی‌های عصاره‌ی بـرگ گیـاه ژینکـو از حـلال‌هـای مختلف پرداختند و فعالیت ضد میکروبـی بـالای آن را تأیید کردند [۱۲]. هدف از این تحقیق بررسـی اثـرات ضد باکتریایی عصاره گیاه ژینکو و پاسخ به ایـن سـوال که کدام یک از حلال های آبـی، اتـانولی و یـا متـانولی بیشترین اثـر مهارکننـدگی و بازدارنـدگی را بـر روی چهار سویه باکتری *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*)، *سالمونلا تیفی‌موریـوم* (*Salmonella typhimurium*)، *باسـیلوس سـابتیلیس* (*Bacillus subtilis*) و *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس* (*Staphylococcus aureus*) دارد.

روش کار

تهیه عصاره

برگ خشک شده گیاه مورد نظـر بـه صـورت آمـاده خریداری شد. برگ‌های خشک شده پودر شدند و بـا آب، اتانول ۷۰٪ و متانول ۸۰٪ حل شده و به مدت ۷۲ سـاعت در شـیکر قـرار گرفتنـد. پـس از ۷۲ سـاعت، نمونه‌ها ۵ دقیقه در دور ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و بـا کاغـذ صـافی، صـاف شـدند. عصـاره آبـی در

[1] World Health Organization
[2] Ischemia-reperfusion Injury (IRI)

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]
[DOI: 10.61186/jarums.24.1.35]

فریزدرایر و عصاره‌های هیدروالکلی در آون خشک شده و پودر حاصله جمع‌آوری شد [١٢].

سنجش خاصیت ضدمیکروبی

میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه قرار گرفته شده، شامل باکتری‌های گرم منفی *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*) (PTCC1399) و *سالمونلا تیفی‌موریوم* (*Salmonella typhimurium*) (PTCC1709) و باکتری‌های گرم مثبت *باسیلوس سابتیلیس* (*Bacillus subtilis*) (PTCC 654) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) (PTCC 1431) بودند.

روش دیسک دیفیوژن

فعالیت ضدباکتریایی هر یک از عصاره‌ها در برابر باکتری های مورد مطالعه با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (کربی- بائر) طبق استاندارد CLSI تعیین گردید [١٣]. پس از آماده کردن سوسپانسیون میکروبی با کدورت نیم مک فارلند (10^8 cfu/ml) با استفاده از سوآپ استریل بر سطح محیط کشت مولرهینتون آگار، کشت یکنواختی انجام گرفت. در مرحله بعد با استفاده از پنس استریل دیسک های آغشته به غلظت های مختلف عصاره ژینکو در سطح محیط کشت قرار گرفت و با کمی فشار روی محیط کشت ثابت شد. در نهایت، پلیت‌های کشت به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از ٢٤ ساعت، قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه گیری شد. از دیسک‌های آنتی بیوتیک جنتامایسین (١٠ میکروگرم بر دیسک) و وانکومایسین (٣٠ میکروگرم بر دیسک) نیز به عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده گردید.

روش تعیین MIC و MBC

به منظور تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) عصاره‌ها، ابتدا سوسپانسیون‌های باکتریایی هر کدام از سویه‌ها مطابق استاندارد ٠/٥ مک فارلند در محیط کشت مولر هینتون براث تهیه و در لوله های استریل توزیع گردید. سپس حجم معین از رقت‌های دو برابری عصاره صاف شده گیاه (٤٠٠، ٢٠٠، ١٠٠، ٥٠، ٢٥، ١٢/٥، ٢٥/٦، ٣/١٢ و ١/٥٦ mg/µL) تهیه گردید. لوله‌ها در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد و به مدت ٢٤ ساعت انکوبه شدند. در پایان ٢٤ ساعت، هر لوله بررسی شد و کم‌ترین غلظت عصاره که رشد واضحی از باکتری نشان نداد به عنوان MIC در نظر گرفته شد. رقت‌هایی که هیچ‌گونه کدورتی در آن‌ها مشاهده نشد در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شده و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. غلظت‌هایی از عصاره که کلنی باکتری در پلیت آن‌ها رشد نکرد به عنوان MBC در نظر گرفته شدند [١٤]. همچنین آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین به عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری

تمامی آزمایش‌ها با سه‌بار تکرار انجام و نتایج آن‌ها گزارش شد. محاسبات داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-25 انجام شد. نتایج حاصله با استفاده از آزمون دانکن، به صورت میانگین± انحراف معیار (Mean±SD) بیان شده و سطح معنی‌داری نیز کمتر از ٠/٠٥ در نظر گرفته شد ($p<0/05$).

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی برگ گیاه ژینکو با توجه به قطر هاله عدم رشد آن‌ها در جدول ١ بر حسب میلی‌متر گزارش شده است. نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های مختلف، غلظت های مختلف عصاره و نوع حلال با یکدیگر تفاوت معنی داری را نشان دادند ($p<0/05$). توانایی ضدباکتریایی عصاره‌های ژینکو بر روی دو سویه باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سابتیلیس* و دو سویه باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* بررسی شد. بر اساس نتایج بیشترین قطر هاله عدم رشد هر دو عصاره آبی و اتانولی

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]
[DOI: 10.61186/jarums.24.1.35]

ژینکو در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب با میزان ۰/۰۴±۲۸ و ۰/۳±۳۰/۰ میلی‌متر و بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و بیشترین قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی ژینکو در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با میزان ۰/۲±۲۹/۵ میلی‌متر و بر روی باکتری *باسیلوس سابتیلیس* مشاهده شد. همچنین، به طور متوسط قطر هاله عدم رشد عصاره‌های هیدروالکلی از عصاره آبی بیشتر بود و در میان عصاره‌های هیدروالکلی، میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی بیشتر بود. جهت تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC)، عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی ژینکو بر روی باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سابتیلیس* بررسی شدند. نتایج حاصل به شرح جدول ۲ بود به طوری که بیشترین میزان حداقل غلظت بازدارندگی در غلظت ۳/۱۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی و بر علیه باکتری *باسیلوس سابتیلیس* و بیشترین میزان حداقل غلظت کشندگی نیز در غلظت ۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی و بر روی باکتری *باسیلوس سابتیلیس* مشاهده شد.

جدول ۱. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها در حضور عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی گیاه ژینکو (میلی‌متر).

نوع حلال	میکروارگانیسم	غلظت عصاره (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)				
		۲۰۰	۴۰۰	۶۰۰	آنتی‌بیوتیک	نوع آنتی‌بیوتیک
آبی	*Escherichia coli*	^{mnop}۰/۰۵±۱۷/۵	^{lmno}۰/۰۴±۱۹/۵	^{jkl}۰/۰۷±۱۸	۰/۰±۱۸	جنتامایسین
	Staphylococcus aureus	^{nopq}۰/۰۸±۲۱	^{fgh}۰/۰۴±۲۸	^{abc}۰/۰۵±۲۲	۰/۰±۲۰	وانکومایسین
	Bacillus subtilis	^{lmno}۰/۰۷±۱۷	^{hijk}۰/۰۵±۲۰	^{ijk}۰/۰۴±۲۰/۵	۰/۰±۲۰	وانکومایسین
	Salmonella typhimurium	^{mnop}۰/۰۴±۱۸	^{klm}۰/۰۲±۲۰/۵	^{hijk}۰/۰۵±۱۹	۰/۰±۱۸	جنتامایسین
اتانولی	*Escherichia coli*	^{ef}۰/۱±۲۳	^{d}۰/۱±۲۶	^{qr}۰/۰±۱۵/۵	۰/۰±۱۸	جنتامایسین
	Staphylococcus aureus	^{ab}۰/۲±۲۸/۵	^{a}۰/۳±۳۰/۰	^{s}۰/۳±۱۳	۰/۰±۲۰	وانکومایسین
	Bacillus subtilis	^{s}۰/۳±۱۲	^{s}۰/۵±۱۲/۵	^{t}۰/۱±۱۰	۰/۰±۲۰	وانکومایسین
	Salmonella typhimurium	^{ghij}۰/۴±۲۱	^{efg}۰/۲±۲۲/۵	^{pqr}۰/۲±۱۶	۰/۰±۱۸	جنتامایسین
متانولی	*Escherichia coli*	^{ef}۰/۴±۲۳/۵	^{ab}۰/۳±۲۴	^{lmno}۰/۱±۱۸	۰/۰±۱۸	جنتامایسین
	Staphylococcus aureus	^{jkl}۰/۶±۱۹/۵	^{c}۰/۶±۲۴	^{opqr}۰/۴±۱۶/۵	۰/۰±۲۰	وانکومایسین
	Bacillus subtilis	^{jkl}۰/۴±۱۹/۵	^{ab}۰/۲±۲۹/۵	^{nopq}۰/۳±۱۷	۰/۰±۲۰	وانکومایسین
	Salmonella typhimurium	^{c}۰/۵±۲۴	^{bcd}۰/۴±۲۷/۵	^{fgh}۰/۵±۲۲	۰/۰±۱۸	جنتامایسین

جدول ۲. غلظت‌های MIC و MBC عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی ژینکو بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر.

نوع حلال		میکروارگانیسم			
		Escherichia coli	*Staphylococcus aureus*	*Bacillus subtilis*	*Salmonella typhimurium*
آبی	MIC	۶/۲۵	۶/۲۵	۳/۱۳	۵۰
	MBC	۱۲/۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۰۰
اتانولی	MIC	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۲۵
	MBC	۲۵	۵۰	۱۰۰	۵۰
متانولی	MIC	۲۵	۲۵	۲۵	۵۰
	MBC	۵۰	۵۰	۵۰	۱۰۰

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.35]

بحث

مقاومت به آنتی‌بیوتیک چالشی است که مراکز کنترل سلامتی در سراسر جهان، چه در کشورهای پیشرفته و چه در کشورهای در حال پیشرفت را درگیر خود کرده است. پیدایش و شیوع پاتوژن‌های مقاوم به چندین دارو، درمان‌های ضد باکتریایی فعلی را به طرز قابل ملاحظه‌ای مورد تهدید قرار داده است. همین موضوع تحقیق و مطالعه درباره منبع جدیدی از مواد ضد میکروبی را ضروری کرده است. منابع ضد میکروبی جدید مانند گیاهان که ترکیبات زیست‌فعال متنوعی تولید می‌کنند ویژگی‌های دارویی شناخته شده‌ای دارند [۱].

گیاهان با عوامل زنده و غیرزنده بسیاری رو به رو می‌شوند که در اکوسیستم تأثیر گذارند. در این کشمکش زیستی، آن‌ها ترکیبات زیست‌فعال بسیار و متنوعی با خواص و ویژگی‌های گوناگون تولید می‌کنند. به لطف این ترکیبات، آن‌ها در برابر میکروارگانیسم‌هایی که در اکوسیستم با آن‌ها روبه‌رو می‌شوند، از خود دفاع می‌کنند. با این تفاسیر، می‌توان از گیاهان در مبارزه با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا استفاده کرد [۱۵]. در این پژوهش، فعالیت ضد باکتریایی سه عصاره آبی، اتانولی و متانولی گیاه ژینکو در برابر چهار سویه باکتری در شرایط آزمایشگاهی بررسی گردید.

با وجود مطالعات بسیار بر روی خواص ضد میکروبی گیاهان، مطالعات کمی بر روی فعالیت ضد باکتریایی گیاهان بازدانه، از جمله *ژینکو بیلوبا* صورت گرفته است [۱۶]. مطالعه حاضر نشان داد که عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی برگ گیاه *ژینکو بیلوبا* به طرز قابل توجهی از رشد باکتری‌ها جلوگیری می‌کنند. باکتری‌های گرم منفی *اشریشیا کلای* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* و باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سابتیلیس* می‌توانند ایجاد عفونت‌های پوستی، ادراری و دستگاه گوارشی کنند و با غذا در ارتباط هستند و همچنین، در گذر زمان به آنتی‌بیوتیک مقاوم شده‌اند و از این رو می‌توانند مشکلاتی جدی برای سلامتی انسان ایجاد کنند [۲۰-۱۷]. به همین دلیل یافتن ترکیبات طبیعی با ویژگی ضد میکروبی بالا اهمیت بسیاری دارد.

گیاه ژینکو از منظر دارویی دارای اهمیت فراوانی می باشد این اهمیت به این دلیل است که ژینکو حاوی ترکیبات فلاونوئیدی، پلی‌فنلی و آنتی اکسیدان‌های طبیعی است که می‌توانند از سلول‌ها در برابر صدمات استرس اکسیداتیو محافظت کنند و احتمال ابتلا به بیماری‌های مزمن را کاهش دهند [۱۶]. مطالعات گذشته نشان دادند که برگ گیاه ژینکو غنی از ترکیبات فلاونوئیدی می باشد که اثربخش ترین جزء برگ این گیاه می باشد که معمولاً شامل کوئرستین، ایزورامنتین و کمپفرول و انواع گلیکوزیدها است [۱۶]. مطالعات پیشین نشان دادند که برگ گیاه ژینکو سرشار از جینولیک اسید است که بالاترین فعالیت ضد باکتریایی را دارد. همچنین ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی این گیاه توانایی فعالیت مهار توپوایزومرازهای مختلف باکتریایی را دارند. همچنین با ایجاد تنش اکسیداتیو در سلول باکتری می توانند با مختل کردن فعالیت های سلول سبب مرگ باکتری شوند. و نیز این ترکیبات می توانند سبب مهار فاکتورهای ویرولانس باکتری از جمله آنزیم، توکسین، اتصال به دیواره و تشکیل زیست لایه شوند [۱۶].

برازش و همکاران فعالیت ضد باکتریایی عصاره های ویرولانس باکتری از جمله آنزیم، توکسین، اتصال به دیواره و تشکیل زیست لایه ژینکو را با ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی موجود در آن مرتبط دانستند [۱۶]. به طور میانگین، عصاره‌های هیدروالکلی فعالیت ضدباکتریایی بیشتری نسبت به عصاره آبی از خود نشان دادند. میان عصاره‌های هیدروالکلی متانولی و اتانولی نیز بیشترین قطر هاله عدم رشد به طور میانگین مربوط به عصاره متانولی بود به طوری که در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قطرهای هاله عدم رشد قابل توجهی بر روی باکتری‌های گرم مثبت

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.35]

و هم گرم منفی داشت. نکته قابل توجه، بیشتر بودن اکثر قطر هاله‌های مهار رشد باکتری عصاره‌ها به ویژه عصاره‌های هیدروالکلی نسبت به کنترل آنتی‌بیوتیک‌های جنتاماسین و وانکومایسین است. همچنین بیشترین میزان حداقل غلظت بازدارندگی در غلظت ۳/۱۳ عصاره آبی و بر علیه باکتری *باسیلوس سابتیلیس* و بیشترین میزان حداقل غلظت کشندگی نیز در غلظت ۶/۲۵ عصاره آبی و بر روی باکتری *باسیلوس سابتیلیس* مشاهده شد. به طور متوسط، فعالیت عصاره‌های هیدروالکلی بالاتر و بیشترین فعالیت ضدمیکروبی بر روی باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سابتیلیس* مشاهده شد. این نتیجه می‌تواند به دلیل آن باشد که باکتری‌های گرم منفی غشاءِ خارجی متشکل از لیپوپروتئین و لیپوساکارید دارند. غشاءِ خارجی نفوذپذیری انتخابی از خود نشان می‌دهد و از این رو دسترسی ترکیبات هیدروفوبیک به ساختارهای زیرین محدود شده و به همین دلیل به طور کلی باکتری گرم مثبت، مستعد پذیرش بیشتری نسبت به ترکیبات برخی از عصاره‌های گیاهی است [۲۱]. پژوهش‌های گذشته نشان داده بودند که گیاه ژینکو دارای ترکیبات پلی‌فنلی غنی است که خواص ضدباکتریایی آن نیز به دلیل حضور این ترکیبات می‌باشند. ژینکولیک اسید از ترکیباتی است که به مقدار زیاد در این گیاه یافت شده و بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را از خود نشان می‌دهد [۲۲]. علاوه بر ژینکولیک اسید، ترکیبات دیگری نیز در این گیاه شناسایی شدند از جمله فنلیک اسیدها، فلاونوئیدها و فلاوون‌هایی چون ایزورامنتین، کوئرستین و کمپفرول که می‌توانند در فعالیت ضدباکتریایی این گیاه نقش داشته باشند [۲۳]. فنلیک اسیدها بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را دارند که این به دلیل توانایی آن‌ها در مهار عوامل ویرولانس باکتریایی از جمله توکسین‌ها، آنزیم‌ها، سرکوب تشکیل زیست‌لایه، اتصال این مواد به غشاءِ سیتوپلاسمی و اثر هم‌افزایی آن‌ها با یکدیگر و با آنتی‌بیوتیک‌ها است. همچنین گمان می‌رود که کوئرستین و کمپفرول می‌توانند با مهار فعالیت توپوایزومرازهای مختلف باکتریایی، در نهایت منجر به مهار سنتز DNA و مرگ باکتری شوند [۲۵،۲۴]. از این‌رو، استنباط می‌شود که با افزایش غلظت عصاره، غلظت این ترکیبات نیز در عصاره افزایش می‌یابد که موجب افزایش توانایی ضدباکتریایی وابسته به غلظت می‌شود [۱۱]. بنابراین می‌توان فعالیت ضدباکتریایی قوی عصاره‌های هیدروالکلی را مربوط به توانایی آن‌ها در استخراج ترکیبات پلی‌فنلی آن‌ها دانست به طوری که حلال متانولی که بر اساس نتایج گزارش شده پیشین، بالاترین توانایی استخراج ترکیبات ژینکو و بالاترین میزان محتوای فنل و فلاونوئید را دارد، بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را نیز از خود نشان داده است. نتایج جدول ۱ نشان داد که با افزایش غلظت عصاره از ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، قطر هاله عدم رشد باکتری کاهش یافته است. این پدیده می‌تواند به دلیل کاهش میزان انتشار عصاره در محیط به دلیل غلظت ماده بارگذاری شده بر روی دیسک‌ها، اندازه و وزن ترکیبات موجود در عصاره باشد، به طوری که با افزایش غلظت عصاره به میزان ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، میزان انتشار در محیط کاهش می‌یابد و از توانایی آن در مهار رشد باکتریایی نیز کاسته می‌شود [۲۶]. نتایج به دست آمده در این پژوهش هم‌راستا با پژوهش‌های پیشین انجام شده بر روی این گیاه توسط ژانگ و همکاران [۲۷] و ساتی و همکاران [۲۲]. و ابراهیم و همکاران [۲۸] می‌باشد که در هر سه پژوهش، فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی از عصاره‌های الکلی ژینکو تحت تأثیر غلظت عصاره مشاهده شد، به طوری که با افزایش غلظت، فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها نیز افزایش یافته بود. در نهایت، استفاده از ترکیبات طبیعی به عنوان عوامل ضدمیکروبی با عوارض جانبی کم‌تری نسبت به ترکیبات شیمیایی همراه است و پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتری بر روی سایر ویژگی‌ها

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]
[DOI: 10.61186/jarums.24.1.35]

و فعالیت‌های بیولوژیکی آن با استفاده از حلال‌ها و تیمارهای مختلف صورت پذیرد. همچنین آزمایش‌های بیشتری جهت ارزیابی دقیق ساز و کارهای ضدمیکروبی این گیاه لازم است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، عصاره‌های آبی و هیدروالکلی عصاره برگ ژینکو فعالیت‌های ضدباکتریایی از خود نشان دادند که چشمگیرترین فعالیت ضدباکتریایی مربوط به عصاره متانولی بود. بیشترین فعالیت ضدباکتریایی مشاهده شده در هر سه عصاره بر روی باکتری‌های گرم مثبت بود.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دانشجو با کد رهگیری ۱۶۹۶۴۹۰ و کد اخلاق IR.AUSMT.REC.1402.009 بوده و از دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل بابت همکاری در این پروژه تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تضاد منافع

نویسندگان پژوهش حاضر اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در این مقاله وجود ندارد.

References

1- Manandhar S, Luitel S, Dahal RK. In vitro antimicrobial activity of some medicinal plants against human pathogenic bacteria. J Trop Med. 2019; 2019 (1):1895340.
2- Anyanwu MU, Okoye RC. Antimicrobial activity of Nigerian medicinal plants. J Intercult Ethnopharmacol. 2017; 6(2):240.
3- Guilbert JJ. The world health report 2002 - reducing risks, promoting healthy life. Educ Health (Abingdon). 2003;16(2):230.
4- Chikkanna MM, Neelagund SE, Rajashekarappa KK. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) and their biological activity. SN Appl Sci. 2019; 1(1):1-10.
5- Djeussi DE, Noumedem JA, Seukep JA, Fankam AG, Voukeng IK, Tankeo SB, et al. Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. BMC Complement Altern Med. 2013; 13(1):1-8.
6- Hatano K-i, Miyakawa T, Sawano Y, Tanokura M. Antifungal and lipid transfer proteins from Ginkgo (*Ginkgo biloba*) Seeds. Nuts Seeds Health Disease Prev. 2011: 527-34.
7- Omidkhoda SF, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Protective effects of *Ginkgo biloba* L. against natural toxins, chemical toxicities, and radiation: A comprehensive review. Phytother Res. 2019; 33(11):2821-40.
8- Fang J, Wang Z ,Wang P, Wang M. Extraction, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Ginkgo biloba*: A review. Int J Biol Macromol. 2020; 162: 1897-905.
9- Beck S, Stengel J. Mass spectrometric imaging of flavonoid glycosides and biflavonoids in *Ginkgo biloba* L. Phytochem. 2016; 130: 201-6.
10- Ma G-L, Xiong J, Yang G-X, Pan L-L, Hu C-L, Wang W, et al. Biginkgosides A–I, unexpected minor dimeric flavonol diglycosidic truxinate and truxillate esters from *Ginkgo biloba* leaves and their antineuroinflammatory and neuroprotective activities. J Nat Prod. 2016; 79(5):1354-64.
11- Ražná K, Sawinska Z, Ivanišová E, Vukovic N, Terentjeva M, Stričík M, et al. Properties of *Ginkgo biloba* L.: antioxidant characterization, antimicrobial activities, and genomic microRNA based marker fingerprints. Int J Mol Sci. 2020; 21(9):3087.
12- Karakaya F, Şahin B, Bülbül AS, Ceylan Y, Kurt E, Tarakçı MF. Investigation of antimicrobial and antibiofilm effects of *Ginkgo biloba* L. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi. 2020; 13(2):28-36.
13- Hemeg HA, Moussa IM, Ibrahim S, Dawoud TM, Alhaji JH, Mubarak AS, et al. Antimicrobial effect of different herbal plant extracts against different microbial population. Saudi J Biol Sci. 2020; 27(12):3221-27.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.35]

14- Vidhya E, Vijayakumar S, Rajalakshmi S, Kalaiselvi S, Pandiyan P. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Ocimum americanum* L extracts against pathogenic microorganisms. Acta Ecol Sin. 2020; 40(3):214-20.
15- Mohammed FS, Kına E, Uysal İ, Mencik K, Dogan M, Pehlivan M, et al. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Ethanol Extract of *Lepidium spinosum*. TURJAF. 2022; 10(6): 1116-19.
16- Sati S, Joshi S. Antibacterial activities of *Ginkgo biloba* L. leaf extracts. Sci World J. 2011; 11(1):2237-42.
17- Jun H, Kim J, Bang J, Kim H, Beuchat LR, Ryu J-H. Combined effects of plant extracts in inhibiting the growth of *Bacillus cereus* in reconstituted infant rice cereal. Int J Food Microbiol. 2013; 160(3):260-6.
18- Snowden R, Harrington H, Morrill K, Jeane L, Garrity J, Orian M, et al. A comparison of the anti-*Staphylococcus aureus* activity of extracts from commonly used medicinal plants. J Altern Complement Med. 2014; 20(5):375-82.
19- Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. Lancet. 2005; 365(9464):1073-86.
20- Wu Y, Park KC, Choi BG, Park JH, Yoon KS. The antibiofilm effect of *Ginkgo biloba* extract against *Salmonella* and *Listeria* isolates from poultry. Foodborne Pathog Dis. 2016; 13(5):229-238.
21- Cui N, Zhang L, Quan M, Xu J. Profile of the main bioactive compounds and in vitro biological activity of different solvent extracts from *Ginkgo biloba* exocarp. RSC Adv. 2020; 10(73):45105-111.
22- van Beek TA, Montoro P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. J Chromatogr A. 2009; 1216(11):2002-32.
23- Sati P, Dhyani P, Bhatt ID, Pandey A. *Ginkgo biloba* flavonoid glycosides in antimicrobial perspective with reference to extraction method. J Tradit Complement Med. 2019; 9(1):15-23.
24- Barbieri R, Coppo E, Marchese A, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, Nabavi SF, et al. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. Microbiol Res. 2017; 196:44-68.
25- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. Angew Chem Int Ed. 2011; 50(3):586-621.
26- Horváth G, Bencsik T, Ács K, Kocsis B. Sensitivity of ESBL-producing gram-negative bacteria to essential oils, plant extracts, and their isolated compounds. Antibiotic Resistance. 2016:239-69.
27- Zhang N, Lan W, Wang Q, Sun X, Xie J. Antibacterial mechanism of *Ginkgo biloba* leaf extract when applied to *Shewanella putrefaciens* and *Saprophytic staphylococcus*. Aquac Fish. 2018; 3(4):163-169.
28- Ibrahim MP, Nuhu A. Phytochemical screening and antibacterial/antifungal activities of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. J Pharm Biol Sci. 2016; 11(1):43-49.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.61186/jarums.24.1.35]