

بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی برگ گیاه ژینکو (*Ginkgo biloba*)

الینا برازش^۱، مصطفی گواهی^{۲*}، مجتبی رنجبر^۱

مقاله پژوهشی

مقدمه: گونه‌های فعال اکسیژن با آسیب به ترکیبات بدن موجب ایجاد بیماری می‌شوند. از طرف دیگر مقاومت دارویی نیز در جهان تبدیل به مشکلی جدی در درمان عفونت‌ها شده است. گیاه ژینکو (*Ginkgo biloba*) یک گیاه دارویی با خواص بسیار است. هدف از این پژوهش بررسی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی عصاره‌های برگ ژینکو موجود در ایران است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، عصاره‌های آبی، اتانولی (۷۰٪) و متانولی (۸۰٪) ژینکو تهیه شد. محتوای فنل و فلاونوئید تام با استفاده از روش‌های معرف فولین - سیوکالتیو و رنگ‌آمیزی کلرید آلومینیوم مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، توانایی عصاره‌ها در مهار رادیکال آزاد DPPH سنجدیده شد. هم‌چنین فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها در برابر دو سویه باکتری بالینی (*Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*) به روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 16 انجام شد و برای مقایسه میانگین‌های از آزمون تعقیبی چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان دادند که همه عصاره‌های مورد بررسی دارای ترکیبات فنلی و مخصوصاً فلاونوئیدی قابل توجهی بودند به طوری که عصاره متانولی دارای بیشترین ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و عصاره آبی دارای کم‌ترین مقدار این ترکیبات بود. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت ۳۰۰ mg/ml عصاره متانولی به میزان $P < 0.05$ $184/73\%$ و کم‌ترین آن در غلظت ۴۰ mg/ml عصاره آبی به میزان $P < 0.05$ $18/73\%$ بود که این نتیجه متناسب با میزان ترکیبات زیست‌فعال ارزیابی شده عصاره‌ها بود. فعالیت ضدباکتریایی نیز در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی در برابر باکتری *Enterococcus faecalis* به میزان حداکثر و در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی در برابر باکتری *Listeria monocytogenes* به میزان حداقل بود، هم‌چنین فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ها به صورت وابسته به غلظت مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها حاکی از آن بودند که برگ گیاه ژینکو غنی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی است که ممکن است عامل فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی قابل توجه آن نیز باشند. بنابراین ژینکو می‌تواند منبع طبیعی باارزشی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و دارویی باشد و لازم است تا مطالعات بیشتری بر روی خواص متنوع این گیاه انجام شود.

واژه‌های کلیدی: ژینکو، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضدباکتریایی، ترکیبات زیست‌فعال، لیستریا مونوسیتوژنز، انتروکوکوس فسالیس

ارجاع: برازش الینا، گواهی مصطفی، رنجبر مجتبی. بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی برگ گیاه ژینکو (*Ginkgo biloba*). مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۲؛ ۳۱ (۱۱): ۱۴-۲۲.

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

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

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۱۱۵۵۰۰۱۵، پست الکترونیکی: m.govahi@ausmt.ac.ir، صندوق پستی: ۴۶۱۵۶۶۴۶۱۶

استفاده از داروهای شیمیایی جهت درمان انواع بیماری‌ها، بروز عوارض جانبی آن‌ها نیز بیشتر شده است. پاتوژن‌های گرم مثبت *Listeria* و *Enterococcus faecalis* و *monocytogenes* مسئول عفونت‌های سیستم گوارشی انسان و مرتبط با مسمومیت‌های غذایی شایع در سرتاسر جهان هستند که مشکلات بسیاری را برای انسان ایجاد می‌کنند. همچنین این دو از سویه‌هایی هستند که بسیار دچار مقاومت دارویی شده و کار درمان را مشکل می‌کنند (۶،۷). همچنین، امروزه سمی بودن آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک اثبات شده و به همین جهت کاربرد آن‌ها کاهش پیدا کرده است. وجود ترکیبات زیست‌فعال و انواع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان، آن‌ها را جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی کرده است (۸،۹). گیاه ژینکو بیلوبا (*Ginkgo biloba*) که در فارسی به نام کهن‌دار شناخته می‌شود، یک فسیل زنده محسوب می‌شود و از کهن‌ترین گونه‌های درختی است. این گیاه طی ۲۰۰ سال اخیر بدون هیچ تغییری در ساختارش زنده مانده و تعدادی اجزای زیستی فعال دارد که از او در برابر حشرات، باکتری‌ها و قارچ‌ها حفاظت می‌کنند گیاه ژینکو، به‌ویژه در برگ‌ها، غنی از اجزای آنتی‌اکسیدانی که می‌توانند رادیکال‌های آزاد را به دام انداخته و نابود کنند. از این‌رو، فعالیت آنتی‌اکسیدانی که به‌طور طبیعی در ژینکو رخ می‌دهد، ممکن است در جنبه‌های متنوع پزشکی نیز تأثیرگذار باشد. با این‌حال بر اساس مطالعات پیشین، ویژگی‌های دقیق این گیاه وابسته به مکان و شرایط اکولوژی رشد آن است و این فاکتور می‌تواند تأثیرات قابل‌توجهی در میزان متابولیت‌های ثانویه ژینکو و به طبع در فعالیت‌های بیولوژیکی این گیاه بگذارد. در مطالعه‌ای، برگ‌های ژینکو از درختان در مناطق مختلف جمع‌آوری شد و ترکیبات دارویی و ویژگی ضدباکتریایی آن‌ها با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج حاصل نشان دادند که مقادیر ترکیبات دارویی موجود در برگ ژینکو و فعالیت ضدباکتریایی میان برگ‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف با یکدیگر تفاوت‌های قابل‌توجهی دارند و در نتیجه، فعالیت ضدباکتریایی برگ‌های ژینکو در مناطق

از دوران گذشته، گیاهان نقش بسیار مهمی در حفظ سلامتی و بهبود وضعیت زندگی انسان‌ها داشتند. بعضی گیاهان دارای خواص دارویی مفیدی از جمله خاصیت ضدباکتریایی، ضدانگلی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی هستند. در طی دهه اخیر، گیاهان و فرآورده‌های آن‌ها از جمله متابولیت‌های ثانویه به دلیل کاربرد آسان، دسترسی راحت و اثرات جانبی کم‌تر نسبت به فرآورده‌های مصنوعی و شیمیایی بیشتر مورد استفاده در درمان انواع بیماری‌های انسانی و حتی حیوانات قرار می‌گیرند (۱). داروهای گیاهی امروزه برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌های عفونی مانند بیماری‌های باکتریایی، ویروسی و قارچی و حتی بیماری‌های متابولیکی و سرطان استفاده می‌شوند. هرچند که استفاده از مواد طبیعی و گیاهان دارویی اخیراً رواج پیدا کرده است ولی همچنان از ترکیبات و داروهای شیمیایی به وفور استفاده می‌شود (۲). ترکیبات فنلی از گیاهان مشتق می‌شوند و نقش مهمی در حفاظت بدن دارند که در قسمت‌های مختلف گیاه از جمله، میوه، برگ، دانه، ریشه و غیره مشاهده می‌شوند. ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها دارای فعالیت‌های بیولوژیک متنوعی از جمله آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضدالتهابی هستند و از همین رو در زمینه‌های داروسازی و پزشکی کاربردهای بسیاری دارند (۳). رادیکال‌های آزاد و انواع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تنها وقتی که در زمان و مکان مناسب و به مقدار مناسب تولید شوند، مفید هستند و در غیر این صورت می‌توانند بسیار مضر باشند. رادیکال‌های آزاد و ROS مسبب بیماری‌های مزمن بسیاری از جمله سرطان، پیری، دیابت، انواع بیماری‌های انزوال عصبی و ریوی و بیماری‌های قلبی و عروقی هستند. به همین دلیل وجود آنتی‌اکسیدان‌ها در بدن انسان بسیار حائز اهمیت است (۴،۵). علاوه بر این‌ها، در طی دهه‌های اخیر با استفاده بی‌رویه از داروها، باکتری‌ها دچار مقاومت دارویی شدند. با ادامه این روند و مقاوم شدن نسبتاً سریع باکتری‌ها حتی به داروهای تازه عرضه شده، درمان بیماری‌ها سخت‌تر می‌شود. از یک سو با

میکرولیتر معرف فولین یک مولار و ۱۲۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم (w/v) ترکیب شد. محلول به‌دست آمده با افزودن آب استریل به حجم ۴۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد و در آخر به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار گرفت. در نهایت جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. از گالیک اسید (میلی‌گرم اسید گالیک در گرم وزن خشک عصاره) به عنوان استاندارد جهت رسم منحنی نمودار استفاده شد. هم‌چنین از ۱۵۰۰ میکرولیتر فولین، ۱۲۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم و آب استریل به عنوان شاهد دستگاه استفاده شد (۱۳).

جهت اندازه‌گیری مقدار فلاونوئید تام از روش رنگ‌آمیزی کلرید آلومینیوم استفاده شد، به این صورت که ۱۵۰۰ میکرولیتر از هر نمونه با غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، با مقدار ۱۵۰۰ میکرولیتر از کلرید آلومینیوم ۲۰ درصد ترکیب شد و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد. در نهایت میزان جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان محتوای فلاونوئید کل عصاره با منحنی استاندارد کوئرستین (میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک عصاره) ثبت و گزارش شد (۱۴).

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با مهار رادیکال‌های آزاد DPPH: به منظور سنجش خواص آنتی‌اکسیدانی و میزان فعالیت آن در به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد از رادیکال پایدار دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده شد. ابتدا ۰/۱ گرم از عصاره با یک میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد حل شد. از محلول حاصل، چهار غلظت ۴۰، ۸۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرولیتر جدا و با دو میلی‌لیتر از محلول DPPH با غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد مخلوط شد. جذب محلول‌های حاصل پس از نیم ساعت در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{میزان مهار رادیکال‌های آزاد (\%)} = \frac{A_D - A_S}{A_D} \times 100$$

کشورهای مختلف می‌توانند با یکدیگر متفاوت باشند (۱۱، ۱۰). هم‌چنین، حلال عصاره‌گیری نیز یکی از فاکتورهای مهم در استخراج ترکیبات شیمیایی دارویی از محصولات طبیعی است. برخی از این حلال‌ها شامل آب، الکل‌ها و ترکیبی از آن‌ها جهت استخراج ترکیبات فیتوشیمیایی از گیاهان است که هم بر بازده و هم فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن تأثیر می‌گذارد. بر اساس گزارشات پیشین، پیچیدگی خصوصیات شیمیایی حلال و ساختار و ترکیبات مواد گیاهی موجب رفتار متفاوت عصاره‌ها از یکدیگر می‌گردد. بنابراین هیچ حلالی به تنهایی نمی‌تواند تمام ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با قطبیت و حلالیت‌های متفاوت در یک گیاه را استخراج کند. بنابراین، علاوه بر تعیین آن که یک گونه گیاهی دارای ترکیبات دارویی است، پیدا کردن مناسب‌ترین حلال برای استخراج بهینه این ترکیبات شیمیایی از گیاه نیز بسیار حائز اهمیت است (۱۲). در این مطالعه، هدف بررسی و سنجش تفاوت سه حلال عصاره آبی، اتانولی و متانولی گونه ژینکو موجود در ایران در فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی و میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی آن بوده است.

روش بررسی

عصاره‌گیری: برگ‌های ژینکو بیلوبا (کد هر بار بوم ۳۷۲) از اطراف تهران جمع‌آوری شده و پس از تأیید گونه گیاهی در دانشکده گیاهان دارویی، برگ‌های آن خشک و با آسیاب برقی پودر شد. جهت تهیه عصاره، هشت گرم از پودر گیاه با ۱۰۰ میلی‌لیتر از حلال (آب، متانول ۸۰٪ و اتانول ۷۰٪) مخلوط شد و به مدت یک ساعت روی هیتر با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت ۷۲ ساعت درون شیکر انکوباتور قرار گرفت. در پایان محلول به مدت ده دقیقه درون سانتریفیوژ با دمای چهار درجه سانتی‌گراد و با دور ۶۰۰۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. در نهایت عصاره با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی، خشک شد و پودر حاصل تا زمان استفاده در یخچال در دمای ۴+ نگهداری شد (۵).

اندازه‌گیری میزان فنل و فلاونوئید تام: برای سنجش میزان فنل تام از روش فولین - سیوکالتیو استفاده شد. در این آزمون از هر نمونه یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برداشته شد و با ۱۵۰۰

برگ ژینکو که بر اساس منحنی استاندارد گالیک اسید و کوئرستین ثبت شد در (جدول ۱) نشان داده شده است. بیشترین میزان محتوای فنل و فلاونوئید تام به ترتیب $49/55 \pm 0/95$ (میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره) و $72/41 \pm 0/69$ (میلی گرم کوئرستین بر گرم عصاره) است که هر دو مربوط به عصاره‌ی متانولی می‌باشد.

نتایج سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با آزمون مهار رادیکال‌های آزاد DPPH: بر اساس مشاهدات، محلول بنفش رنگ DPPH در حضور محلول‌های ژینکو تغییر رنگ داده و رفته‌رفته به بنفش کم‌رنگ و صورتی تبدیل می‌شود. این تغییر رنگ به دلیل مهار رادیکال‌های آزاد است و توانایی آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها را نمایش می‌دهد. نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها که در (جدول ۲) آورده شده است حاکی از آن است که کم‌ترین میزان مهار در غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی به میزان ۱۸/۱۷ درصد و بیشترین میزان مهار در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی به میزان ۸۴/۷۳ درصد است. میزان IC_{50} عصاره متانولی و BHT نیز به مقدار ۸۴/۳ و ۷۵/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

نتایج آزمون دیسک دیفیوژن: فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی برگ ژینکو بر روی دو سویه باکتری بالینی *Enterococcus faecalis* و *Listeria monocytogenes* در (جدول ۳) بر حسب اندازه قطر هاله مهار (میلی‌متر) ثبت شدند. همان‌طور که از نتایج پیداست، فعالیت ضدباکتری عصاره‌های هیدروالکلی متانولی و اتانولی بیشتر از عصاره آبی است. در کل، بیشترین فعالیت ضدباکتریایی مربوط به غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی با ۲۲ میلی‌متر قطر هاله و کم‌ترین فعالیت مربوط به غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی با ۱۰.۵ میلی‌متر قطر هاله است.

که در فرمول بالا A_{D} میزان جذب نمونه کنترل و A_{S} میزان جذب نمونه عصاره است. جهت کنترل مثبت این آزمایش، از آنتی‌اکسیدان سنتزی بوتیلات هیدروکسی تولوئن، BHT، استفاده شد (۱۵).

سنجش خاصیت ضد میکروبی: میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه، شامل ۲ سویه باکتری بالینی *Enterococcus faecalis* و *Listeria monocytogenes* بودند.

روش آزمون دیسک دیفیوژن: ابتدا باکتری‌ها با نسبت $L\mu 100$ در ۱۰ mL محیط کشت نوترینت پراث به مدت ۲۴ ساعت کشت و با همین نسبت به مدت دو ساعت واکشت داده شدند به‌صورتی که سوسپانسیون باکتریایی حاصل معادل نیم مک‌فارلند باشد. در زیر هود، $L\mu 25$ باکتری با سواب بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار پخش شد، دیسک‌های استریل روی آن قرار گرفتند. در مرحله بعد سه غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی تهیه گردید. مقدار $L\mu 40$ از هر غلظت بر روی دیسک‌ها ریخته شد. پلیت‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از ۲۴ ساعت قطر هاله مهار رشد اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر گزارش شد. جهت کنترل مثبت نیز از آنتی‌بیوتیک ونکومايسين (۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد (۱۶).

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایش‌ها با سه‌بار تکرار انجام شد. محاسبات داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 16 انجام شد. نتایج حاصله با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن، به صورت انحراف معیار \pm میانگین (Mean \pm SD) بیان شده و سطح p -value نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد ($P < 0.05$).

نتایج

نتایج اندازه‌گیری میزان فنل و فلاونوئید تام: نتایج تعیین محتوای فنل و فلاونوئید تام عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی

جدول ۱: نتایج آزمون تعیین محتوای فنل و فلاونوئید کل عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی ژینکو (میلی‌گرم بر گرم).

فلاونوئید کل	فنل کل	
۵۹/۷۴±۰/۴۸ ^c	۳۷/۷۲±۰/۷۷ ^c	عصاره آبی
۶۵/۲۵±۰/۷۳ ^b	۴۴/۱۷±۰/۸۱ ^b	عصاره اتانولی
۷۲/۴۱±۰/۶۹ ^a	۴۹/۵۵±۰/۹۵ ^a	عصاره متانولی

* میانگین‌هایی که در هر ردیف حداقل دارای یک حرف مشابه هستند، بر مبنای آزمون چند دامنه دانکن ($P < 0.05$) تفاوت معنی‌داری ندارند.

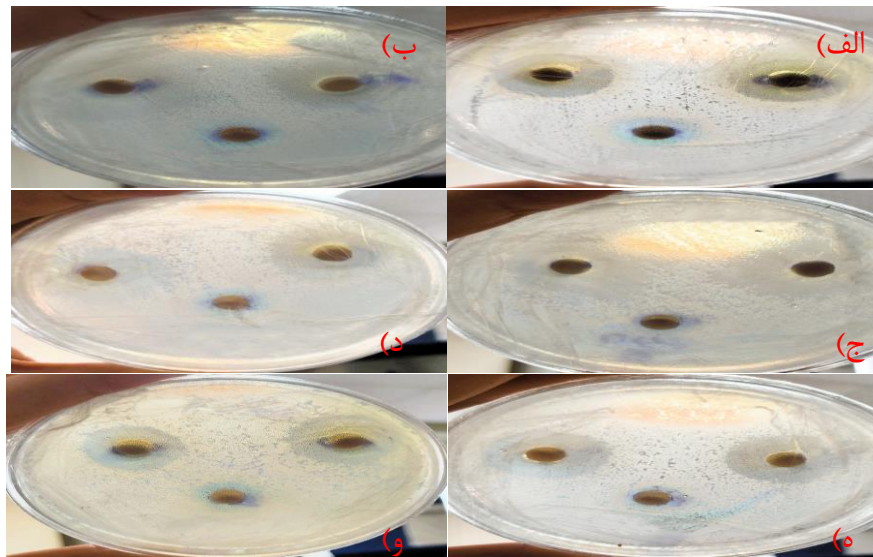
جدول ۲: درصد مهار رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی ژینکو (بر حسب درصد /).

غلظت‌های مختلف عصاره گیاه ژینکو (میکروگرم بر میلی لیتر)					
BHT	۳۰۰	۱۵۰	۸۰	۴۰	
۱۰۰	۷۹/۵۴	۵۴/۴۸	۳۵/۸۱	۱۸/۱۷	عصاره آبی
۱۰۰	۸۱/۶۳	۵۷/۴۷	۳۷/۲۶	۲۱/۱۹	عصاره اتانولی
۱۰۰	۸۴/۷۳	۶۱/۷۴	۴۰/۳۷	۲۳/۵۰	عصاره متانولی

جدول ۳: میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها در حضور عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی گیاه ژینکو (میلی متر)

نوع آنتی‌بیوتیک	غلظت عصاره (میکروگرم بر میلی‌گرم)				میکروارگانیزم	نوع حلال
	آنتی‌بیوتیک	۲۰۰	۱۰۰	۵۰		
ونکومايسين (۳۰ μg/mL)	۲۰	۲۲ ^a	۲۰ ^b	۱۷ ^e	<i>Enterococcus faecalis</i>	متانولی
ونکومايسين (۳۰ μg/mL)	۲۰	۱۸ ^{cd}	۱۴ ^h	۱۲/۵ ⁱ	<i>Listeria monocytogenes</i>	
ونکومايسين (۳۰ μg/mL)	۲۰	۱۹/۵ ^b	۱۷ ^e	۱۳ ⁱ	<i>Enterococcus faecalis</i>	اتانولی
ونکومايسين (۳۰ μg/mL)	۲۰	۲۰ ^b	۱۸/۵ ^c	۱۱ ^{jk}	<i>Listeria monocytogenes</i>	
ونکومايسين (۳۰ μg/mL)	۲۰	۱۶ ^f	۱۳ ⁱ	۱۱/۵ ^j	<i>Enterococcus faecalis</i>	آبی
ونکومايسين (۳۰ μg/mL)	۲۰	۱۷/۵ ^{de}	۱۵ ^g	۱۰/۵ ^k	<i>Listeria monocytogenes</i>	

* میانگین‌هایی که در هر ردیف حداقل دارای یک حرف مشابه هستند، بر مبنای آزمون چند دامنه دانکن ($P < 0.05$) تفاوت معنی‌داری ندارند.



شکل ۱: قطر هاله مهارى تست دیسک دیفیوژن. الف) عصاره متانولی ژینکو در برابر باکتری *Listeria monocytogenes* (ب) عصاره متانولی ژینکو در برابر باکتری *Enterococcus faecalis* (ج) عصاره اتانولی ژینکو در برابر باکتری *Listeria monocytogenes* (د) عصاره اتانولی ژینکو در برابر باکتری *Enterococcus faecalis* (ه) عصاره آبی ژینکو در برابر باکتری *Listeria monocytogenes* (و) عصاره آبی ژینکو در برابر باکتری *Enterococcus faecalis* همان طور که در تصاویر پیداست، هر دو باکتری حساسیت بیشتری نسبت به عصاره‌های هیدروالکلی متانولی و اتانولی ژینکو از خود نشان دادند، در صورتی که این حساسیت در برابر عصاره آبی ژینکو کم‌تر شده و باکتری‌ها مقاومت بیشتری از خود بروز دادند.

شده در (جدول ۱)، بیشترین میزان محتوای فنل و فلاونوئید تام مربوط به عصاره متانولی و کم‌ترین مقدار آن‌ها در عصاره آبی بود. این نتیجه می‌تواند به دلیل توانایی بیشتر عصاره‌های هیدروالکلی در استخراج ترکیبات موجود در گیاهان باشد. هم‌چنین، کمپلکس‌هایی در گیاهان وجود دارند که حاصل اتصال بخشی از ترکیبات فنلی با کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها هستند که نسبت به حلال‌های استفاده شده در این پژوهش، متانول توانایی بیشتری برای حل کردن این کمپلکس‌ها در خود و استخراج آن‌ها دارد. علاوه بر این‌ها، این نتیجه می‌تواند حاصل قطبیت ترکیبات پلی‌فنلی و فلاونوئیدی موجود در برگ ژینکو نیز باشد زیرا توانایی استخراج این ترکیبات در حلال‌های متانولی و اتانولی بیشتر از حلال‌هایی با قطبیت کم‌تر است (۲۰). نتایج کار ما با پژوهش‌های ساتی و همکاران (۲۰۱۹) که اعلام کردند بیشترین فعالیت زیستی و متابولیت‌های ثانویه در عصاره متانولی برگ ژینکو وجود دارد و لیو و همکاران (۲۰۱۵) که برگ این گیاه را غنی از فلاونوئیدها دانستند، هم‌خوانی دارد. آن‌ها هم‌چنین فلاونوئیدها را جزء اصلی اثربخش برگ ژینکو دانستند که معمولاً شامل

بحث

ترکیبات پلی‌فنلی و فلاونوئیدی به دلیل ساختار شیمیایی خود می‌توانند رادیکال‌های آزاد را گیر بیندازند و دارای واکنش‌پذیری بالا نسبت به گونه‌های فعال اکسیژن هستند (۱۷). گیاه ژینکو به دلیل دارا بودن ترکیباتی نظیر گلیکوزیدها، فلاونوئیدها، ترپن‌ها، اسیدهای ارگانیک، پلی‌فنل‌ها و آمینو اسیدها حاوی اهمیت فراوان از نظر دارویی است. این آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در گیاه ژینکو می‌توانند از سلول‌ها در برابر صدمات استرس اکسیداتیو محافظت کنند و احتمال ابتلا به بیماری‌های مزمن را کاهش دهند (۱۸). از این‌رو بررسی ترکیبات حاضر در بخش مورد نظر گیاه می‌تواند تا حدی به پی بردن به میزان فعالیت‌های زیستی گیاه شامل فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن، کمک کند. در مطالعات بسیاری آمده است که علاوه بر روش استخراج، نوع حلال نیز بر ماهیت و مقدار متابولیت‌های ثانویه استخراج شده تأثیر می‌گذارد (۱۹). در پژوهش حاضر، محتوای فنل و فلاونوئید تام عصاره برگ گیاه ژینکو با سه حلال، آبی، اتانولی و متانولی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج مشخص

کوئرستین، ایزورامنتین و کمپفرول و انواع گلیکوزیدها است (۲۱،۲۲). تفاوت حاصل در مقادیر به دست آمده در پژوهش حاضر و پژوهش‌های پیشین می‌تواند به دلیل فاکتورهای تأثیرگذار در محیط رشد گیاه باشد. جهت اندازه‌گیری میزان توانایی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی برگ ژینکو در مهار و به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد، توانایی آن‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل (جدول ۲)، بیشترین میزان مهار رادیکال آزاد در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی و کم‌ترین فعالیت در غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی برگ ژینکو مشاهده شد. در کل، میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد عصاره‌های هیدروالکلی از عصاره آبی بیشتر بود. این نتیجه می‌تواند به دلیل تفاوت در میزان ترکیبات پلی‌فنلی و فلاونوئیدی حاضر در عصاره‌ها باشد، زیرا همان‌طور که قبلاً اشاره شد این ترکیبات دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی هستند. ترکیبات فنلی به دلیل وجود گروه‌های هیدروکسیل فنلی در ساختار خود مایل به اهدای یک اتم هیدروژن یا یک الکترون به یک رادیکال آزاد و داشتن سیستم آروماتیک مزدوج توسعه یافته (extended conjugated aromatic system) جهت گرفتن یک الکترون هستند (۲۳). نتایج پژوهش ما با نتایج توارلی و همکاران (۲۰۱۷) و رازنا و همکاران (۲۰۲۰) بر روی توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره‌های برگ ژینکو در یک راستا بودند به طوری که عصاره‌های برگ ژینکو قدرت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی از خود نشان دادند که به صورت وابسته به غلظت مشاهده شد. بر اساس نتایج این مطالعات و مطالعه حاضر، رابطه مثبتی میان محتوای فنل و فلاونوئید عصاره و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن وجود دارد (۱۰،۱۸). فعالیت ضدباکتری عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی برگ ژینکو نیز با استفاده از روش دیسک دیفیوژن و برعلیه دو باکتری گرم مثبت *Listeria monocytogenes* و *Enterococcus faecalis* سنجیده شد. بر اساس مطالعات پیشین، باکتری‌های نام برده جزء باکتری‌هایی هستند که در برابر طیف قابل توجهی از

آنتی‌بیوتیک‌ها از خود مقاومت دارویی نشان دادند (۲۴). بنابراین یافتن ترکیبات ضدباکتریایی مناسب آن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. بر اساس نتایج نمایش داده شده در (جدول ۳)، تمام عصاره‌های برگ ژینکو فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی نسبت به هر دو سویه باکتری در مقایسه با کنترل مثبت، آنتی‌بیوتیک و نکوماپسین، از خود نشان دادند. این می‌تواند به دلیل ساختار دیواره باکتری‌های گرم مثبت (عدم وجود لیپوساکارید و دسترسی راحت‌تر ترکیبات هیدروفوبیک به لایه‌های زیرین دیواره) باشد که آن‌ها را مستعد پذیرش ترکیبات برخی از عصاره‌های گیاهی می‌کند. همچنین بر اساس قطر هاله‌های مهاری به دست آمده، فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های هیدروالکلی متانولی و اتانولی ژینکو بیشتر از عصاره آبی بود. همچنین با افزایش غلظت در عصاره‌ها شاهد افزایش قطر هاله مهار رشد باکتری و در نتیجه افزایش فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها نیز بودیم. این نتیجه را می‌توان به تأثیر وجود میزان متابولیت‌های ثانویه در عصاره‌ها نسبت داد که با نتایج حاصل از تست‌های دیگر این پژوهش و پژوهش‌های پیشین هم‌خوانی دارد. بر اساس مطالعات پیشین، برگ گیاه ژینکو غنی از ژینکولیک اسید که بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را دارد. ترکیبات ضدباکتریایی دیگری نیز در این گیاه مشاهده شدند که می‌توانند در فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های حاضر نقش داشته باشند، از جمله فنلیک اسیدها، فلاون‌ها و فلاونوئیدها. همچنین، گمان می‌رود که فلاون‌هایی چون کمپفرول و کوئرستین توانایی مهار فعالیت توپوایزومرازهای مختلف باکتریایی را دارند که در نهایت به مرگ باکتری می‌انجامد. همچنین این ترکیبات با ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول باکتری نیز می‌توانند فعالیت‌های سلول را مختل کرده و در نهایت موجب مرگ باکتری شوند. بر اساس مطالعات، ترکیبات پلی‌فنلی و فلاونوئیدی توانایی مهار فاکتورهای ویروانس باکتری از جمله آنزیم، توکسین، اتصال به دیواره و تشکیل زیست‌لایه را دارند (۲۵،۲۶). بنابراین فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های ژینکو را می‌توان با ترکیبات پلی‌فنلی و فلاونوئیدی موجود در آن‌ها متناسب دانست. در دو

استخراج متابولیت‌های ثانویه برگ ژینکو مناسب‌تر دانست. همچنین می‌توان برگ ژینکو را منبع طبیعی ارزشمندی جهت جایگزینی با آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی در آینده به حساب آورد.

سپاس‌گزاری

مقاله در دست، حاصل از پایان‌نامه دانشجوی با کد رهگیری ۱۶۹۶۴۹۰ بوده و از دانشگاه فناوری‌های نوین آمل جهت همکاری در این پروژه، قدردانی می‌شود.

حامی مالی: این پژوهش با هزینه نویسندگان و معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام شد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این مطالعه، توسط کمیته اخلاق دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل مورد تایید قرار گرفته است (IR.AUSMT.REC.1402.009)

مشارکت نویسندگان

الینا برازش و مصطفی گواهی در ارائه ایده و طراحی مطالعه، الینا برازش در جمع‌آوری داده‌ها، مصطفی گواهی و مجتبی رنجبر در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

پژوهش ابراهیم و همکاران (۲۰۱۶) و ژانگ و همکاران (۲۰۱۸) فعالیت ضدباکتریایی چشمگیری از عصاره‌های هیدروالکی ژینکو گزارش شد که در مدت زمان ثابت، وابسته به غلظت بودند به طوری که با افزایش غلظت فعالیت ضدباکتریایی نیز افزایش یافته بود که با نتایج مطالعات در دست هم‌خوانی مناسبی داشتند (۲۷،۲۸). در نهایت می‌توان گفت که گونه ژینکو بیلوبا موجود در ایران نیز دارای فعالیت‌های بیولوژیکی قابل توجهی است و می‌تواند منبع دارویی و آنتی‌اکسیدانی باارزشی در آینده محسوب شود و لازم است تا آزمایشات بیشتری جهت بررسی بیشتر فعالیت‌های زیستی و سازوکارهای مؤثر در این فعالیت‌های زیستی صورت بگیرد. پیشنهاد می‌شود تا آزمایشات بیشتری با حلال‌ها و روش‌های استخراجی متنوع دیگر صورت گرفته و فعالیت‌های زیستی هر کدام در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی بررسی شوند.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، هر سه عصاره آبی، اتانولی و متانولی برگ ژینکو دارای مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی بودند و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی قابل توجهی را به نمایش گذاشتند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های هیدروالکلی در برابر دو سویه باکتری بالینی بیشتر از عصاره آبی ارزیابی شد. بنابراین می‌توان حلال‌های قطبی مانند اتانول و متانول را جهت تهیه عصاره و

References:

- 1-Fazeli-Nasab B, Rahnema M, Mazarei A. *Correlation between Antioxidant Activity and Antibacterial Activity of Nine Medicinal Plant Extracts*. J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27(149): 63-78.
- 2-Govahi M, Ghorbani F, Ranjbar M, Rahaiee S, Azizi H. *Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activity, and Determination of Phenolic and Flavonoid Content of Aqueous and Methanolic*

- Extracts of Scutellaria Pekinensis*. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences 2019; 27(3): 91-100.
- 3-Amorati R, Valgimigli L. *Methods to Measure the Antioxidant Activity of Phytochemicals and Plant Extracts*. J Agric Food Chem 2018; 66(13): 3324-9.
- 4-Mozdastan S, Ebrahimzadeh MA, Khalili M. *Comparing the Impact of Different Extraction*

- Methods on Antioxidant Activities of Myrtle (Myrtus Communis L.)*. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2015; 25(127): 10-24.
- 5-Kamkar A. *The Study of Antioxidant Activity of Essential Oil and Extract of Iranian Anethum Graveloens*. Internal Medicine Today 2009; 15(2): 11-6.
- 6-Kayaoglu G, Erten H, Alaçam T, Ørstavik D. *Short-Term Antibacterial Activity of Root Canal Sealers Towards Enterococcus Faecalis*. Int Endod J 2005; 38(7): 483-8.
- 7-Liu G, Ren G, Zhao L, Cheng L, Wang C, Sun B. *Antibacterial Activity and Mechanism of Bifidocin a Against Listeria Monocytogenes*. Food Control 2017; 73: 854-61.
- 8-Annegowda HV, Mordi MN, Ramanathan S, Hamdan MR, Mansor SM. *Effect of Extraction Techniques on Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Bauhinia Purpurea: HPTLC Determination of Antioxidants*. Food analytical methods 2012; 5(2): 226-33.
- 9-Eloff JN. *It is Possible to Use Herbarium Specimens to Screen for Antibacterial Components in Some Plants*. J Ethnopharmacol 1999; 67(3): 355-60.
- 10-Ražná K, Sawinska Z, Ivanišová E, Vukovic N, Terentjeva M, Stričik M, et al. *Properties of Ginkgo Biloba L.: Antioxidant Characterization, Antimicrobial Activities, and Genomic Microrna Based Marker Fingerprints*. International Journal of Molecular Sciences 2020; 21(9): 3087.
- 11-Fermino BL, Milanez MC, Freitas B, Nunes da Silva W, Pereira R, Rocha J, et al. *Ginkgo Biloba L; Phytochemical Components and Antioxidant Activity*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2015; 9(38): 950-5.
- 12-Adaramola B, Onigbinde A. *Effect of Extraction Solvent on the Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Capacity of Clove Bud*. IOSR J Pharm Biol Sci 2016; 11(3): 33-8.
- 13-Vorobyova V, Vasylyev G, Skiba M. *Eco-Friendly "Green" Synthesis of Silver Nanoparticles with the Black Currant Pomace Extract and its Antibacterial, Electrochemical, and Antioxidant Activity*. Applied Nanoscience 2020; 10(12): 4523-34.
- 14-Sharifi-Rad M, Pohl P, Epifano F, Álvarez-Suarez JM. *Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Astragalus Tribuloides Delile. Root Extract: Characterization, Antioxidant, Antibacterial, and Anti-Inflammatory Activities*. Nanomaterials (Basel) 2020; 10(12): 2383.
- 15-Baba SA, Malik AH, Wani ZA, Mohiuddin T, Shah Z, Abbas N, et al. *Phytochemical Analysis and Antioxidant Activity of Different Tissue Types of Crocus Sativus and Oxidative Stress Alleviating Potential of Saffron Extract in Plants, Bacteria, and Yeast*. South African Journal of Botany 2015; 99: 80-7.
- 16-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): 3221-7.
- 17-Csepregi K, Neugart S, Schreiner M, Hideg É. *Comparative Evaluation of Total Antioxidant Capacities of Plant Polyphenols*. Molecules 2016; 21(2): 208.
- 18-Tewari LM, Upreti BM, Tewari G, Singh MK, Nailwal T. *Comparative in Vitro Antioxidant Activity of Extracts of Aerial Parts of Ginkgo Biloba L. From Kumaun Himalaya*. World J Pharm Res 2017; 6(13): 654-66.

- 19-Dirar AI, Alsaadi DH, Wada M, Mohamed MA, Watanabe T, Devkota HP. *Effects of Extraction Solvents on Total Phenolic and Flavonoid Contents and Biological Activities of Extracts from Sudanese Medicinal Plants*. South African Journal of Botany 2019; 120: 261-7.
- 20-Khorasani Esmaeili A, Mat Taha R, Mohajer S, Banisalam B. *Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Content of Various Solvent Extracts from in Vivo and in Vitro Grown Trifolium Pratense L.(Red Clover)*. Biomed Res Int 2015; 2015: 643285.
- 21-Liu XG, Wu SQ, Li P, Yang H. *Advancement in the Chemical Analysis and Quality Control of Flavonoid in Ginkgo Biloba*. J Pharm Biomed Anal 2015; 113: 212-25.
- 22-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.
- 23-Stankovic MS, Niciforovic N, Mihailovic V, Topuzovic M, Solujic S. *Antioxidant Activity, Total Phenolic Content and Flavonoid Concentrations of Different Plant Parts of Teucrium Polium L. Subsp. Polium*. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 2012; 81(2).
- 24-Adzitey F, Ekli R, Aduah M. *Incidence and Antibiotic Susceptibility of Staphylococcus Aureus Isolated from Ready-To-Eat Meats in the Environs of Bolgatanga Municipality of Ghana*. Cogent Environmental Science 2020; 6(1): 1791463.
- 25-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.
- 26-Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. *Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis*. Angew Chem Int Ed Engl 2011; 50(3): 586-621.
- 27-Ibrahim MP, Nuhu A. *Phytochemical Screening and Antibacterial/Antifungal Activities of Ginkgo Biloba Extract Egb 761*. J Pharm Biol Sci(JOSR-JPBS) 2016; 11(1): 43-9.
- 28- 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*. Aquaculture and Fisheries 2018; 3(4): 163-9.

Evaluating of Antioxidant and Antibacterial Characteristics *Ginkgo Biloba* Leaves

Elina Barazesh¹, Mostafa Govahi^{*2}, Mojtaba Ranjbar¹

Original Article

Introduction: Reactive oxygen species cause disease by damaging the chemical compounds in our body. On the other hand, drug resistance is becoming a serious issue in infection treatment, globally. *Ginkgo biloba* has many therapeutically features. The objective of this study was to evaluate antioxidant and antibacterial activity of Iranian *Ginkgo*'s leaf extracts.

Methods: In this experimental study, aqueous, ethanolic (%70) and methanolic (%80) extracts were made using *Ginkgo*. Total Phenolic and Flavonoids Content were measured by folin–ciocalteu reagent and Chloride Aluminum color assays. The extracts' antioxidant activity was assessed by their potential in scavenging DPPH free radicals. Disc Diffusion assay was carried out to test antibacterial potency against two strains of bacteria (*Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*). Data analysis was performed using factorial experiment within a completely randomized design. SPSS version 16 software and Duncan's multiple range tests were used to compare the means.

Results: Based on results, all three extracts contained extensive amount of phenolic and especially flavonoid compounds with methanolic extract being the richest in phenolic and flavonoids while aqueous extract having the least of these compounds. The most antioxidant activity was found in methanolic extract of 300 mg/mL concentration with %84.73 (P<0.05) and the least was in aqueous extract of 40 mg/mL with %18.17 (P<0.05) ROS scavenging rate, this result was proportional to the measured bioactive components of the extracts. Antibacterial activity in 200 mg/mL concentration of methanolic extract was maximum against *Enterococcus faecalis* while it was minimum at 50 mg/μl concentration of aqueous extract against *Listeria monocytogenes* strain. Antibacterial activity of all three extracts was found out to be concentration dependent.

Conclusion: The results indicated that *Ginkgo* leaves are rich in phenolic and flavonoids contents that may be reason behind their notable antioxidant and antibacterial activity. Thus, *Ginkgo* could be a treasure trove of antioxidants and therapeutic compounds. However, more studies are required in regard to *Ginkgo*'s various characteristics.

Keywords: *Ginkgo biloba*, Antioxidant activity, Antibacterial activity, Bioactive compounds, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*.

Citation: Barazesh E, Govahi M, Ranjbar M. Evaluating of Antioxidant and Antibacterial Characteristics *Ginkgo Biloba* Leaves. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2024; 31(11): 7204-14.

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

²Department of Nanotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of New Technologies, Amol, Iran.

*Corresponding author: Tel: 09111550015, email: m.govahi@ausmt.ac.ir