مقاله پژوهشی

# ارزیابی فعالیت آنتی‌باکتریال و تعیین میزان فنل تام عصاره هیدروالکلی گل انار فارسی *Punica granatum*

**الهه احمدی [۱و۲]، عباس عبداللهی [۱و۲*]، مهدی فصیحی رامندی [۳]، نجمه نامدار [۱و۲]، سید محمد موسوی [۱و۲]، بابک سمیع زاده [۱و۲]**

۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران
۲- آزمایشگاه گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران
۳- مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۳/۱۱

## چکیده

**زمینه و هدف:** گل‌انار فارسی در طب سنتی موارد کاربرد فراوانی دارد. هدف از این مطالعه ارزیابی فعالیت آنتی‌باکتریال و تعیین میزان فنل تام عصاره گل‌انار جهت دستیابی به داروی کمکی در درمان عفونت‌هاست.

**مواد و روش‌ها:** فعالیت ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی به روش تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد، انتشار از دیسک و چاهک گذاری، در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد، علیه سویه‌های استاندارد موردبررسی قرار گرفت. استخراج و اندازه‌گیری ترکیبات فنلی، به روش رنگ‌سنجی و با استفاده از معرف فولین سیوکالتو، انجام پذیرفت.

**نتایج:** در مقایسه با استاندارد آنتی‌بیوتیکی، در مورد *S. aureus* و *E. coli*، بیشترین قطر هاله در هر دو روش چاهک گذاری و انتشار از دیسک به ترتیب ۳۵ و ۲۹ میلی‌متر و ۲۲ و ۱۷ میلی‌متر بود. حداقل غلظت مهارکنندگی ۷/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است؛ محتوای فنلی ۵/۱±۲۳۳/۱۵ میلی‌گرم در گرم ماده خشک عصاره بود.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به فعالیت مؤثر عصاره گل‌انار علیه باکتری‌ها، مطالعه‌های وسیع‌تر ویژگی‌های ضد باکتریایی این گیاه پیشنهاد می‌گردد.

**کلمات کلیدی:** گل انار فارسی، آنتی باکتریال، ترکیبات فنلی، عصاره گیاهی

## مقدمه

طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی، بیش از ۸۰ درصد مردم جهان، برای درمان بیماری‌ها از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند (۱). تقریباً یک‌چهارم داروهای تهیه‌شده‌ی دنیا دارای منشأ گیاهی هستند که یا مستقیماً از گیاهان عصاره‌گیری شده‌اند و یا بر اساس ترکیب گیاهی، سنتز شده‌اند (۲). تحقیقات زیادی نشان می‌دهد با فرآوری صحیح گیاهان و داروهای گیاهی اثرات این داروهای طبیعی، نسبت به داروهای سنتتیک بیشتر و مقرون به‌صرفه‌تر است؛ لذا شناسایی گیاهان دارویی بکار رفته در طب سنتی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۵- ۳).

گل‌انار فارسی با نام علمی *Punica granatum* var. *pleniflora*، از خانواده Puniaceae است؛ گل‌های انار غیرمثمر به‌عنوان گیاه دارویی مهم در استان فارس و برخی از مناطق شمال ایران مورداستفاده می‌باشد. کلیه قسمت‌های درخت انار دارای تانن فراوان بوده و اثر قابض نسبتاً قوی دارد؛ لذا در طب سنتی به‌عنوان بندآورنده خون در شرایط بالینی متنوعی ازجمله هموروئید، خونریزی بینی، خونریزی زیاد رحمی و التهاب استفاده می‌شود. گل‌ها به دلیل داشتن ترکیبات فنلی در درمان برونشیت، اسهال، مشکلات گوارشی و در استعمال خارجی، به‌صورت غرغره، برای رفع ورم لوزه استفاده می‌شود (۸-۶). ترکیبات مؤثر در قسمت‌های مختلف انار شامل برگ، پوست تنه، ریشه، پوست میوه، آب انار و بذر و گل آن دارای خاصیت ضد میکروبی و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی گسترده‌ای هستند. از مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی موجود در پوست انار می‌توان به الاژیک اسید اشاره نمود که ساختار و طبیعت فنلی این ترکیب موجب فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی آن می‌شود (۹). پوست و ریشه انار محتوی مواد پلی فنول مانند

***نویسنده مسئول: عباس عبداللهی**، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران
Email: a.abdollahi360@yahoo.com

الاژیک اسید، الاژی تانن‌ها، گالیک اسید و آنتوسیانین‌ها همچنین آلکالوئیدهای پیپریدین متعددی است (۱۰-۱۱). در گل‌های درخت انار موادی نظیر اسید گالیک، اسید اورسولیک و تری ترپنوئیدهایی نظیر اسید ماسلینیک و اسید آسیاتیک و ترکیب‌های فنولیک نظیر پونیکالاژین یافت می‌شوند که همگی این مواد فنولی می‌تواند باعث فعالیت ضدمیکروبی اجزای این گیاه باشد (۱۲).

هدف از این مطالعه تجربی که در شرایط آزمایشگاهی و با تأکید بر روش‌های استاندارد انجام گردیده است (۱۳)، بررسی فعالیت آنتی‌باکتریال و میزان فنل تام عصاره هیدروالکلی گل‌انار فارسی به‌منظور دستیابی به کاربردهای نوین به‌عنوان داروی کمکی در درمان‌های آنتی‌بیوتیکی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### عصاره گیری هیدروالکلی به روش ماسراسیون

جهت عصاره گیری هیدروالکلی، ۵۰ گرم از پودر گل‌های خشک جمع‌آوری‌شده در فصل بهار و خشک‌شده در محل خشک، تاریک و خنک، با ۲۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط و به مدت ۷۲ ساعت بر روی دستگاه تکان‌دهنده در دمای اتاق (حدود ۲۲ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. تفاله‌های عصاره گیاهی توسط گاز استریل حذف گردید و عصاره به‌دست‌آمده، توسط کاغذ صافی (Watmann, 0.5mm, USA) فیلتر شده و برای حذف حلال الکلی وارد دستگاه تقطیر در خلأ چرخان (روتاری اواپوراتور) (SENCO, China) با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد گردید و حجم نهایی عصاره به ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد (۱۴ و ۱۵).

### استاندارد کردن روش آزمایش

جهت تعیین وزن خشک عصاره‌ها ابتدا یک لوله خالی توسط ترازوی دیجیتالی حساس وزن شد. سپس ۲۵ میلی‌لیتر از عصاره به لوله اضافه گردید. پس از قرار دادن ۴۸ ساعته لوله درون آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد عصاره کاملاً خشک‌شده، سپس لوله مجدداً توزین گردیده و با کم کردن وزن لوله خالی، وزن ماده خشک عصاره الکلی در میلی‌لیتر به دست آمد. پس‌ازآن مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم از عصاره خشک حاصله را به ۲۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حاوی ۵٪ دی متیل سولفوکساید اضافه نموده و به‌وسیله سرنگ با فیلترهای به قطر ۲۲ میکرون (BioFil, Taiwan) فیلتراسیون انجام گردید. عصاره حاصل، درون ظروف استریل درپوش دار تا زمان انجام آزمایش‌ها، در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۱۴ و ۱۵).

### بررسی اثرات عوامل ضدمیکروبی

در این مطالعه جهت بررسی اثرات آنتی‌باکتریال عصاره از روش‌های چاهک گذاری (Well established)، انتشار از دیسک در آگار (Disc Diffusion Method) و تهیه رقت‌های متوالی در محیط براث (Broth dilution prepared) استفاده شد. آزمایش‌ها برای سویه‌های استاندارد باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1431) و باکتری گرم منفی *اشریشیاکلی* (PTCC 1399) سه بار تکرار شد و نتایج آن به‌صورت میانگین محاسبه گردید. از دیسک حاوی پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) به‌عنوان شاهد منفی و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی استاندارد تجاری به‌عنوان شاهد مثبت استفاده گردید (۱۴ و ۱۵).

دیسک‌های عصاره گیاهی و دیسک‌های شاهد مثبت و منفی روی محیط کشت با رعایت شرایط استاندارد و فاصله معین از یکدیگر (۲/۴ سانتی‌متر) و از لبه پلیت (۱/۵ سانتی‌متر) چیده شد. ابتدا سوسپانسیون باکتریایی از باکتری‌ها، با کدورتی معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند ($1/5 \times 10^8$ cuf/ml) تهیه‌شده و سپس با استفاده از سوآب سطح پلیت‌های حاوی کشت مولر هینتون آگار (Muller Hinton Agar, Merck, Germany) با باکتری‌های موردنظر تلقیح شد. بعد از خشک شدن سطح پلیت، دیسک‌های کاغذی (ساخت پادتن طب، ایران) ۶ میلی‌متری حاوی غلظت‌های ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکروگرم از عصاره گیاهی (مطابق با غلظت‌های استاندارد آنتی‌بیوتیک) به پلیت منتقل‌شده و به مدت ۲۴ ساعت به‌طور وارونه در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داشتند و بعد از گرمخانه گذاری قطر هاله مهار رشد باکتری‌ها به‌طور دقیق با خط‌کش اندازه‌گیری شد (۱۴ و ۱۵).

در روش چاهک گذاری ابتدا به‌وسیله انتهای پیپت پاستور چاهک‌هایی در محیط مولر هینتون آگار، تعبیه گردید و به میزان ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکروگرم از عصاره گیاهان موردبررسی، در آن‌ها ریخته شد؛ با حفظ شرایط استاندارد در انجام تست‌های حساسیتی، از سوسپانسیون استاندارد ۰/۵ مک فارلند هر سویه به‌طور جداگانه به روش کشت چمنی بر روی محیط، کشت داده شد درنهایت پلیت‌های تلقیح شده به‌طور وارونه در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از ۲۴

ساعت قطر هاله‌های عدم رشد ایجاد شده در اطراف چاهک‌ها با خط‌کش اندازه‌گیری شدند (۱۴ و ۱۵).

در روش رقیق‌سازی، رقت‌های متوالی ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲ و ۷/۸ میلی‌گرم از عصاره گیاهی در هفت لوله تهیه گردید؛ مشابه با روش انتشار از دیسک و طبق استاندارد CLSI (با روش کدورت سنجی استاندارد نیم مک فارلند)، از سوسپانسیون باکتری به رقت‌های تهیه‌شده افزوده گردید. محیط‌های حاوی باکتری و عصاره گیاهی به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس‌ازآن لوله‌ها ازنظر کدورت ناشی از رشد باکتری بررسی شدند، آخرین لوله‌ای که هیچ کدورتی دیده نشد به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) تعیین گردید (۱۴ و ۱۵).

### تعیین مقدار ترکیبات فنولی تام عصاره‌ی گیاهان

جهت اندازه‌گیری ترکیبات فنلی تام به روش رنگ سنجی و از معرف فولین سیوکالتو (Folin-ciocalteu)، استفاده شد (Merck, Germany). در این سنجش از گالیک اسید به‌عنوان استاندارد استفاده گردید و منحنی استاندارد آن رسم شد. سپس با استفاده از معادله خط حاصل، محتوای فنل کل عصاره‌ها تعیین گردید (۱۶).

### بررسی تأثیرات فشار اسمزی بر باکتری‌ها

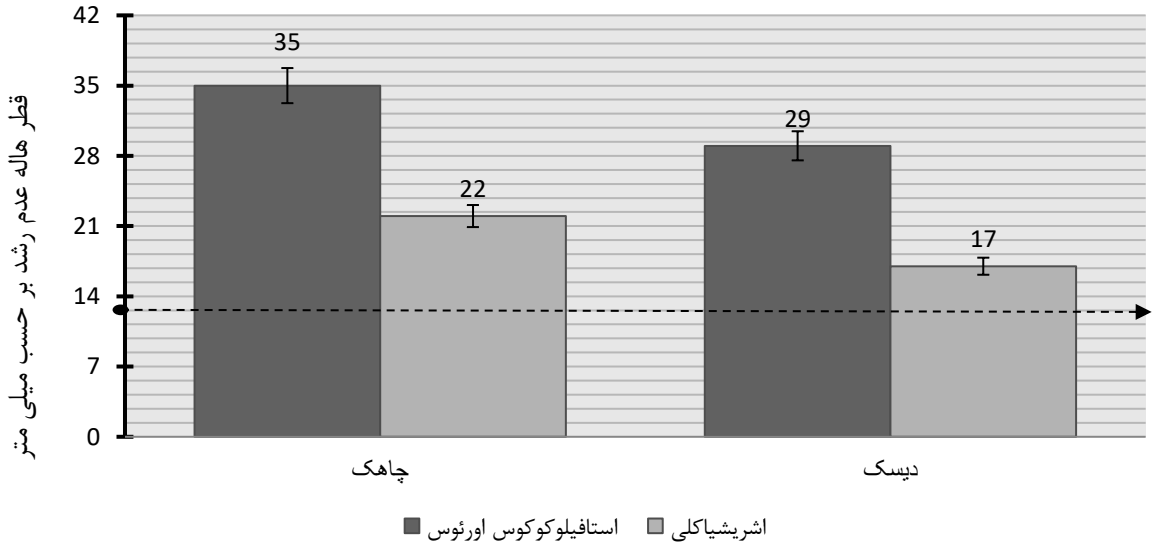
برای مشخص کردن اثرات و تغییرات اسمتیک در محیط کشت بر روی باکتری‌ها، از پودر پلی‌اتیلن گلیکول، استفاده‌شده است. این ماده به‌عنوان کنترلی جهت بررسی تغییرات اسمتیک در آزمایش‌ها، به کار می‌رود (۱۴ و ۱۵).

### آنالیز آماری

اطلاعات به‌دست‌آمده به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean ±SD) بیان‌شده و جهت آنالیز آماری داده‌های حاصله از نرم‌افزار SPSS 20 (SPSS, IBM, USA) استفاده شد.

## نتایج

با توجه به بررسی نتایج فعالیت آنتی‌باکتریال با تست‌های استاندارد میکروبی (آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد بالینی)، طبق میانگین محاسبه‌شده بر اساس جدول استاندارد آنتی بیوگرام، برای مطالعه یک فرض در نظر گرفته‌شده است (جدول۱) و مقایسه‌های انجام‌شده بر همین الگو انجام می‌شود (قطر هاله بیشتر از ۱۴ میلی‌متر، حساس؛ قطر هاله مابین ۱۲ تا ۱۴ میلی‌متر، حد واسط و قطر هاله کمتر از ۱۲ میلی‌متر، مقاوم). نتایج تأثیر عصاره گل انار فارسی بر عدم رشد دو سویه باکتری، در هر دو روش موردمطالعه در نمودار ۱ ارائه‌شده است.




**نمودار ۱**- مقایسه اثر تیمارها بر قطر هاله عدم رشد دو سویه باکتری در روش انتشار از دیسک و چاهک گذاری، خط‌چین رسم شده در نمودار نشان‌دهنده مرز تشخیص رنج حساسیت و مقاومت باکتری نسبت به عصاره گیاهان است. ستون‌های پایین خط‌چین (عدد ۱۴) باکتری نسبت به اثر آنتی‌باکتریال عصاره‌ها مقاوم و حد واسط است و بالاتر از خط‌چین باکتری نسبت به عصاره‌ها حساس است.

نتایج MIC نیز بر اساس حداقل غلظت ممانعت از رشد دلالت بر مؤثرترین اثر ضد باکتریایی عصاره گل انار فارسی، علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی*، بوده است؛ مقایسه دقیق این نتایج حاکی از میزان ۷/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از حداقل غلظت مهارکنندگی رشد در مورد هر دو باکتری دارد.

آزمون فیتوشیمیایی انجام‌گرفته بر روی عصاره‌ی گیاهان، حضور ترکیبات فنولی را در نمونه‌های عصاره تائید کردند. نتایج نشان می‌دهد که فعالیت آنتی باکتریال نمونه‌ها رابطه مستقیم با مقدار ترکیبات فنلی کل دارد؛ این مقدار معادل با میزان ۲۳۳/۱۵±۵/۱ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم نمونه است.

برای مشخص کردن اثرات و تغییرات اسمتیک در محیط کشت بر روی باکتری‌ها، از پلی‌اتیلن گلیکول استفاده شد و نتایج بررسی تأثیرات فشار اسمزی بر باکتری‌ها نشان داد که PEG، هیچ اثری بر محیط کشت نداشته است.

## بحث و نتیجه‌گیری

فعالیت ضدمیکروبی عصاره انار، به علت حضور طیف گسترده‌ای از ترکیبات آنتی‌بیوتیکی است؛ در بیشتر گیاهان موردبررسی، فنل‌ها و تانن‌ها به‌عنوان مهم‌ترین اجزاء فعال در این زمینه شناسایی‌شده‌اند (۱۷). در تحقیق سلاح ورزی و همکاران در سال ۱۳۸۸، ارتباط فعالیت ضد قارچی عصاره پوست میوه، برگ و بذرهای انار با محتوای فنولیکی آن موردبررسی قرار گرفت. عصاره متانولی پوست انار در غلظت ۱۵۰۰ppm، به‌صورت بهتری توانسته است از رشد میسلیوم قارچها جلوگیری نماید. مقادیر ترکیب‌های فنولیک در پوست، بذر و برگ درخت انار به ترتیب برابر ۳۰۲، ۳۲۵ و ۱۱۶ میلی-گرم بر لیتر است. عصاره به‌دست‌آمده از پوست انار با میانگین ۴۷/۶٪ و ۳۷/۷٪ به ترتیب دارای بیشترین اثر بازدارندگی بر رشد میسلیوم‌ها و جوانه‌زنی اسپور قارچها بود. این در صورتی است که عصاره برگ انار به ترتیب با میانگین ۳۵/۷٪ و ۱۸/۹٪

**جدول ۱**- نتایج فعالیت آنتی‌باکتریال با سویه‌های استاندارد میکروبی (آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد)، بر اساس دستورالعمل CLSI

| Antimicrobial agent | Disc Content | Test organisms | Zone Diameter Nearest Whole mm | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Resistance ≤ | Inter-mediate | Sensitive ≥ |
| Cephaloridine | 30 µg | *Enterobacteriaceae*<br>*Pseudomonas aeruginosa*<br>*Staphylococcus spp.* | 11 | 12-14 | 15 |
| Amoxycillin | 10 µg | All organisms | 13 | 14 | 15 |
| Tetracycline | 30 µg | *Enterobacteriaceae*<br>*Pseudomonas aeruginosa*<br>*Staphylococcus spp.* | 11 | 12-14 | 15 |
| Tobramycin | 10 µg | *Enterobacteriaceae*<br>*Pseudomonas aeruginosa*<br>*Staphylococcus spp.* | 12 | 13-14 | 15 |
| Ceftazidime | 30 µg | *Enterobacteriaceae*<br>*Pseudomonas aeruginosa*<br>*Staphylococcus spp.* | 14 | 15-17 | 18 |
| Gentamicin | 10 µg | *Enterobacteriaceae*<br>*Pseudomonas aeruginosa*<br>*Staphylococcus spp.* | 12 | 13-14 | 15 |
| Furazolidone | 100 µg | All organisms | 14 | 15-16 | 17 |
| Co-Trimoxazole | 25 µg | *Enterobacteriaceae*<br>*Pseudomonas aeruginosa*<br>*Staphylococcus spp.* | 10 | 11-15 | 16 |
| Cloxacillin | 5 µg | All organisms | 11 | 12-13 | 14 |
| Ampicillin | 20 µg | *Enterobacteriaceae*<br>*Pseudomonas aeruginosa*<br>*Staphylococcus spp* | 11 | 12-14 | 15 |
| Teicoplanin | 30 µg | *Enterobacteriaceae*<br>*Pseudomonas aeruginosa*<br>*Staphylococcus spp* | 11 | 11-13 | 14 |
| Streptomycin | 30 µg | *Enterobacteriaceae*<br>*Pseudomonas aeruginosa*<br>*Staphylococcus spp* | 11 | 12-14 | 15 |
| Doxycycline | 30 µg | *Enterobacteriaceae*<br>*Pseudomonas aeruginosa*<br>*Staphylococcus spp* | 12 | 13-14 | 15 |

اثرهای کمتری را در این زمینه نشان داد؛ نتایج این پژوهش همچنین نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست میوه انار در مقایسه با بذر و برگ آن به ترتیب ۵۴٪ و ۲۳۷٪ برابر بیشتر است (۱۸).

طبق مطالعه نصر و همکاران، قسمت‌های مختلف انار مانند پوست میوه و برگ‌های آن حاوی مواد فنولیکی مختلفی است که باعث خاصیت ضدمیکروبی عصاره انار می‌شود (۱۹). درواقع مواد فنولیک به همراه پروتئین‌هایی با وزن مولکولی زیاد، کمپلکس‌های پیچیده‌ای را تشکیل می‌دهند و بدین ترتیب پس از جذب می‌توانند با آنزیم‌های سلولی (اکسیدوردوکتاز) موجود در سیتوپلاسم و دیواره سلولی واکنش دهند؛ از طرف دیگر این مواد می‌توانند از دسترسی گیرنده‌های سطح سلولی در برابر میکروارگانیسم‌ها نیز جلوگیری نمایند (۲۰).

محققان اثر سینرژیک از عصاره متانولی میوه *Punica granatum* با پنج آنتی‌بیوتیک (کلرامفنیکل، جنتامایسین، آمپی‌سیلین، تتراسیکلین و اگزاسیلین) در ۳۰ نمونه بالینی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین (MRSA) و *استافیلوکوک اورئوس* حساس به متیسیلین را موردبررسی قراردادند؛ اگرچه فعالیت هم‌افزایی بین عصاره انار و هر پنج آنتی‌بیوتیک در نمونه‌های *استاف اورئوس* قابل اشاره است اما هم‌افزایی با آمپی‌سیلین بارزتر بود (۲۱). بر اساس مطالعات انجام‌شده، مشخص‌شده است تانن‌ها و پونیکالاجین، ماده تشکیل‌دهنده اصلی با تأثیرات آنتی‌باکتریال میوه انار هستند (۲۲). همچنین مطالعات نشان می‌دهد، تأثیر ترکیب عصاره‌های بخش‌های مختلف انار نسبت به اثر عصاره یک قسمت از گیاه، به‌تنهایی، بیشتر است (۲۳ و ۲۴).

با توجه به نتایج قابل‌قبول اثرات آنتی‌باکتریال عصاره گل انار فارسی و مقایسه قطر هاله عدم رشد باکتری عصاره مذکور نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که این عصاره می‌تواند داروی کمکی مناسبی برای بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها باشد؛ البته اثرات گل انار در برابر پاتوژن‌های باکتریایی در حال حاضر در شرایط آزمایشگاهی مورد آزمایش قرارگرفته است، بااین‌حال، نیاز به آزمایش‌های انسانی برای رد و یا اثبات هر اثر بالینی الزامی است.

## تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام ننموده اند.

## References

1. Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. Medicinal plants in therapy. Bull WHO. 1995; 63(3):965–981.
2. Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. Life Sciences. 2005; 78(5):431–441.
3. Kunle OF, Egharevba HO, Ahmadu PO. Standardization of herbal medicines - A review. Int J of Biodiversity and Conservation. 2012; 4(3):101-112.
4. Fabricant DS, Farnsworth NR. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. Environment Health Persp. 2001; 109(1):69-75.
5. Kinghorn AD. Pharmacognosy in the 21st century. J of Pharmacy and Pharmacology. 2001; 53(2):135–148.
6. Gavanji S, Larki B, Bakhtari A. The effect of extract of Punicagranatum var. pleniflora for treatment of minor recurrent aphthous stomatitis. Integr Med Res. 2014; 3(2):83–90.
7. Cushnie TPT, Lamb AJ. Review antibacterial activity of flavonoids. Int J Antimicrobial Agents. 2005; 26(5):343-356.
8. Zargari A. Medicinal Plants. 7th Edition. Tehran: Tehran University;2012, 372.
9. Salahvarzi Y, TehranifarA, Jahanbakhsh V. Relation of antioxidant and antifungal activity of different parts of Pomegranate (*Punica granatum* L.) extracts with its phenolic content. Iranian J Med Aromatic Plants. 2011; 27(1):47-56. [article in Persian]
10. Tanaka T, Nonaka G, Nishioka I. Tannins and related compounds, Revision of the structures of punicalin and punicalagin, and isolation and characterization of 2-O-galloylpunicalin from the bark of *Punica granatum* L. Chem Pharm Bull. 1986; 34(1):650-655.

11. Neuhofer H, Witte L, Gorunovic M. Alkaloids in the bark of *Punica granatum* L. (pomegranate) from Yugoslavia. Pharmazie. 1993; 48(3):89-391.
12. Jurenka J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. Altern Med Rev. 2008; 13(2):128-144.
13. Abdollahi A, Ahmadi E, Zakerin AR. The importance of Standardization in evaluation of herbal antimicrobial effect methods. JFUMS. 2014; 2(4):141-142. [Article in Persian]
14. Meshkibaf MH, Abdollahi A, Fsihi Ramandi M, Adnani Sadati SJ, Moravvej A. Antibacterial effects of hydro-alcoholic extracts of Ziziphora tenuior, Teucrium polium, Barberis corcorde and Stachys inflate. Koomesh. 2011; 11(4):240-245. [Article in Persian]
15. Zakerin AR, Ahmadi E, Fasihi Ramandi M, Abdollahi S, Molazadeh AR, Jafari S, et al. The Effects of Ecologic Condition on Antimicrobial Activity of Endemic Herbal Extracts in Fars Province. JFUMS. 2015;5(1):111-119. [Article in Persian]
16. Seevers PM, Daly JM. Studies on wheat stem rust resistance control at sr6 locus. 1- The role of phenolic compounds. Phytopathology. 1970; 6(60):1322-1328.
17. Seeram NP, Schulman RN, Heber D. Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine. Medicinal and Aromatic Plants, Industrial Profiles 43. 1st ed. New York: CRC Pres, Taylor & Francis Group; 2006. P:244-250.
18. Salahvarzi Y, Tehranifar A, Jahanbakhsh V. Relation of antioxidant and antifungal activity of different parts of Pomegranate *(Punica granatum* L.) extracts with its phenolic content. Iran J of Medicinal and Aromatic Plants. 2011; 27(1):47-56.
19. Nasr CB, Ayed N, Metche M. Quantitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel. Z Lebensm Unters Forsch. 1996; 203(4):374-378.
20. Cowan M. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microb Rev. 1999; 12(4):564- 572.
21. Braga LC, Leite AA, Xavier KG. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. Can J Microbiol. 2005; 51(7):541-547.
22. Machado TB, Leal IC, Amaral AC. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. J Braz Chem Soc. 2002; 13(5):606-610.
23. Albrecht M, Jiang W, Kumi-Diaka J. Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. J Med Food. 2004; 7(3):274-283.
24. Lansky EP, Jiang W, Mo H. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. Invest New Drugs. 2005; 23(1):11-20.

Original Article

# Evaluation of Antibacterial Activity and Total Phenol Compounds of *Punica granatum* Hydro-Alcoholic Extract

**Ahmadi E[1, 2], Abdollahi A[1, 2*], Fasihi-Ramandi M[3], Namdar N[1, 2], Mousavi SM[1, 2], SamiZadeh B[1, 2]**

**1-** Department of Microbiology, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran
2- Herbal Plants Laboratory, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran
3- Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 14 Feb 2015 Accepted: 31 May 2016

## Abstract

**Background & Objectives:** *Punica granatum* is a non-productive form of a plant and is used for the treatment of diseases in traditional medicine. In this study, we evaluate the antibacterial activity and the total phenol compounds of *Punica granatum.*

**Materials & Methods:** Disk and well diffusion methods and MIC were used to evaluate the antibacterial activity of hydro-alcoholic extract on *S. aureus* and *E. coli* compared to standard commercial antibiotic disks. Measurement of phenol compounds were performed by Seevers and Daly colorimetric methods (Folin-ciocalteu indicator).

**Results:** 35 and 29 mm inhibition zones in *S. aureus* and 22 and 17 mm inhibition zones in *E. coli* were shown by disk and well diffusion method, respectively. Also, 7.8 mg/ml concentration of extract showed the MIC points for two bacteria. Phenol compound of extract was 233.15±5.1 mg/g of extraction.

**Conclusion:** Antibacterial effect of *Punica granatum* compared to antibiotics indicates the strong activity against examined bacteria. Extensive antibacterial study of *Punica granatum* is suggested.

**Keywords:** Punica granatum, Antibacterial, Phenol compounds, Herbal extract

***Corresponding author: Abbas Abdollahi,** Department of Microbiology, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran
Email: a.abdollahi360@yahoo.com

Journal of Fasa University of Medical Sciences 6 (2016): 319-325