Original Article

Identification of Effective Compounds and Antibacterial Effect of Alcoholic Extracts of Opuntia ficus-indica Fruit In vitro

Narges Panahi Borujeni[1], Zahra Rezayatmand[2*], Mozhgan Ghiasian[1]

[1] Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

[2] Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Corresponding Author:
Zahra Rezayatmand;
Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic AzadUniversity, Isfahan, Iran.

Email:
zrezayatmand12@yahoo.com,
rezayatmand@iaufala.ac.ir

Received: 04 Apr, 2020
Accepted: 06 Aug, 2020

Abstract

Background and Objectives: Medicinal plants are among the largest agricultural resources. This study was conducted to evaluate the antibacterial effect of *Opuntia ficus-indica* fruit extract as well as identifying its components.

Methods: To conduct the study, the extraction process was accomplished by maceration in ethanol and methanol. Moreover, the antibacterial activity of the plant was evaluated by the agar well diffusion method, and the investigation of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) was processed using the microdilution method. The gas chromatography-mass spectrometry method was also applied to identify the extracted components. The mean scores obtained by the ANOVA test were significant < 5%.

Results: Considering the antibacterial activity, both extracts at concentrations of 1000 mg/ml inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The same concentration of methanol extract was effective on *Pseudomonas aeruginosa*. The MIC value of the methanol extract was calculated at 125 mg/ml against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, and 250 mg/ml against *Escherichia coli*. The concentrations of 250 and 500 mg/ml of ethanol extract inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, however, it did not affect *Pseudomonas aeruginosa*. Furthermore, the MBC value of methanol extract was 250 mg/ml against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, and 500 mg/ml against *Escherichia coli*. It was revealed that the MBC value of 500 mg/ml of ethanol extract was against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, nevertheless, this extract did not affect *Pseudomonas aeruginosa*. In addition, butinoic acid, dihydroxypyran, ester compounds, and pentadecanetriol were detected in ethanol extracts. Acetic acid, furan-carboxaldehyde, furan dione, erythrofuranose, furfural, oxirane, thiirane, and pyrazine compounds were identified in methanol extracts.

Conclusion: It can be concluded that the methanolic extract of *Opuntia ficus-indica* and its active compounds are recommended for controlling human infections after the implementation of in virto tests.

Keywords: Antibacterial effect; Effective compounds; Ethanol extract; Methanol extract; *Opuntia ficus-indica*.

DOI: 10.29252/qums.14.6.68

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره چهاردهم، شماره ششم، شهریور ۹۹
صفحه ۶۸ الی ۷۸

مقاله پژوهشی
(Original Article)

شناسایی ترکیبات مؤثر و اثر ضدباکتریایی عصاره‌های الکلی میوه کاکتوس اپونتیا ایندیکا در شرایط برون‌تنی

نرگس پناهی بروجنی[۱]، زهرا رضایتمند[۲*]، مژگان قیاسیان[۱]

[۱] گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

[۲] گروه زیست‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: گیاهان دارویی از بزرگ‌ترین ثروت‌های کشاورزی هستند. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر ضد باکتریایی میوه اپونتیا ایندیکا (Opuntia indica) و شناسایی ترکیبات آن بود.

روش بررسی: عصاره‌گیری به روش خیساندن در اتانول و متانول و اثر ضد باکتریایی با انتشار چاهک و میکرودایلوشن با تعیین کمترین غلظت مهارکننده (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) و کمترین غلظت کشنده (MBC: Minimum Bactericidal Concentration) بررسی شد. ترکیبات عصاره‌ها با کروماتوگرافی گازی با طیف‌سنجی جرمی ارزیابی شد. میانگین‌ها با آزمون آنووا در سطح معنی‌داری کمتر از ۵ درصد مقایسه شد.

یافته‌ها: غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هر دو عصاره رشد استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلای و همین غلظت عصاره متانولی رشد سودوموناس ائروژینوزا را مهار کرد. میزان کمترین غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی علیه استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا ۱۲۵ و علیه اشرشیاکلای ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلای را مهار کرد، اما روی سودوموناس آئروژینوزا مؤثر نبود. میزان کمترین غلظت کشنده عصاره متانولی علیه استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا ۲۵۰ و علیه اشرشیاکلای ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین کمترین غلظت کشنده عصاره اتانولی علیه اشرشیاکلای و استافیلوکوکوس اورئوس ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، اما روی سودوموناس آئروژینوزا مؤثر نبود. بوتینوئیک اسید، دی‌هیدروکسی پیران، ترکیبات استری و پنتادکانتریول در عصاره اتانولی و استیک اسید، فوران کربوکسی آلدئید، فوران دی‌اون، اریتروفورانوز، فورفورال، اکسیران، تیران و ترکیبات پیرازین در عصاره متانولی شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: عصاره متانولی میوه کاکتوس اپونتیا ایندیکا و مواد مؤثر فعال آن برای کنترل عفونت‌های انسانی پس از انجام آزمایش‌های درون‌تنی پیشنهاد می‌شوند.

کلیدواژه‌ها: اثر ضد باکتریایی؛ ترکیبات مؤثر؛ عصاره اتانولی؛ عصاره متانولی؛ میوه اپونتیا ایندیکا.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
زهرا رضایتمند؛ گروه زیست‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
zrezayatmand12@yahoo.com,
rezayatmand@iaufala.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۱۶

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Panahi Borujeni N, Rezayatmand Z, Ghiasian M. Identification of Effective Compounds and Antibacterial Effect of Alcoholic Extracts of *Opuntia ficus-indica* Fruit *In vitro*. Qom Univ Med Sci J 2020;14(6):68-78. [Full Text in Persian]

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مقدمه

مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از بزرگ‌ترین چالش‌هایی است که سلامت انسان عصر مدرن را تهدید می‌کند. اخیراً مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌ها در پزشکی و حتی برای مصارف کشاورزی افزایش چشمگیری داشته است؛ بنابراین، مقاومت به آنتی‌بیوتیک، انسان و محیط زیست را تهدید می‌کند. به نظر می‌رسد لازم است به دنبال راهکارهای جایگزین استفاده از آنتی‌بیوتیک نیز باشیم. طب سنتی و درمان با داروهای گیاهی در ایران قدمتی بس دیرینه دارد. محدودکردن تجویز آنتی‌بیوتیک‌های دارای مقاومت‌های چندگانه، از ضروریات اصلی پروتکل‌های درمانی به نظر می‌رسد. کنترل بیولوژیک یکی از مؤثرترین راه‌های درمان عفونت‌هاست (۱). ترکیبات شیمیایی مانند آلکالوئیدها، گلوکوزیدها، ترپن‌ها، ساپونین‌ها، تانن‌ها و هورمون‌ها که به‌طور طبیعی در گیاهان به وجود می‌آیند، معمولاً اثرات پزشکی بیشتری نسبت به اثرات تغذیه‌ای دارند (۲).

کاکتوس‌های اپونتیا (*Opuntia*) که با نام‌های دیگری مانند کاکتوس‌های راکتی، گلابی خاردار و انجیر کاکتوس نیز شناخته می‌شوند، در مناطق گرمسیری میوه‌های خوراکی تولید می‌کنند که مصارف دارویی دارد. یک فنجان میوه این گیاه حاوی فلاونوئیدهای کامفرول (Kaempferol) و کوئرستین (Quercetin) تا ۹۹ درصد و اسیدهای آلی تا ۸۰ درصد است که خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی دارند (۳). میوه اپونتیا بیضی‌شکل است و رنگ قرمز تا بنفش دارد. گوشت این میوه، شیرین و آبدار است و دانه‌های ترد سیاه‌رنگی در بافت آن پراکنده است. میوه این گیاه سرشار از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است که به دلیل قدرت پرورش در مناطق بیابانی و خشک است. وجود این ترکیبات در میوه کاکتوس اثر سم‌زدایی قوی و ضدالتهابی دارد و از آسیب سلولی جلوگیری می‌کند که باعث سرطان و پیری می‌شود. از سوی دیگر، با تقویت سیستم دفاعی، بدن را در برابر عفونت‌ها مقاوم‌تر می‌کند (۶-۴).

یکی از ترکیبات شناسایی‌شده در میوه کاکتوس، بتالائین است. این ترکیب نوعی آلکالوئید رنگی نیتروژن‌دار است و به‌جای آنتوسیانین در میوه‌های رنگی با اسیدیته کم مانند کاکتوس نقش ایفا می‌کند و نقش آنتی‌اکسیدانی نیز برای آن مشخص شده است (۷). آسکوربیک اسید نیز ازجمله مهم‌ترین ترکیبات مؤثر میوه کاکتوس شناخته شده است که اثر آنتی‌اکسیدانی دارد (۸). پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها نیز که خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی دارند در میوه کاکتوس شناسایی شده‌اند (۷). مطالعات متعددی در زمینه اثر آنتی‌اکسیدانی میوه کاکتوس انجام شده است (۸-۴)، اما روی اثر ضدمیکروبی میوه این گیاه تحقیقات کمی انجام شده است. هدف مطالعه حاضر بررسی مواد مؤثره و اثر باکتریایی عصاره‌های اتانولی و متانولی میوه کاکتوس اپونتیا ایندیکا (*Opuntia indica*) روی سویه‌های باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی و شناسایی ترکیبات مؤثر این عصاره‌هاست.

روش بررسی

برای انجام این پژوهش، میوه کاکتوس اپونتیا ایندیکا از تولیدکنندگان گل‌خانه‌های این میوه در تهران خریداری شد. ابتدا میوه‌ها شسته و سطح آن‌ها با دستمال تمیز خشک شد. سپس به‌صورت برش‌های نازک قطعه‌قطعه شدند و تا زمان خشک‌شدن در دمای محیط نگهداری شدند. سپس قطعات خشک میوه در آسیاب برقی به‌طور کامل پودر شدند.

به‌منظور عصاره‌گیری از پودر میوه خشک از دو حلال اتانول ۷۰ درصد و متانول ۹۶ درصد (Merk، آلمان) استفاده شد. برای این منظور ۵۰ گرم از پودر میوه به ترتیب با ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد و ۵۰۰ میلی‌لیتر متانول ۹۶ درصد به‌طور جداگانه در ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری مخلوط شد. سپس مخلوط‌های تهیه‌شده برای ضدعفونی‌شدن به مدت ۳۰ دقیقه زیر نور UV در کابینت بیولوژیک (ژال تجهیز، ایران) قرار داده شد و پس‌ازآن به مدت ۷۲ ساعت روی شیکر با دور ۱۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در مرحله بعد عصاره حل‌شده در هر کدام از حلال‌ها ابتدا از دستمال نخی و سپس از کاغذ فیلتر واتمن شماره ۱ عبور داده و جمع‌آوری شد. محلول‌های به‌دست‌آمده تا زمان خشک‌شدن در پلیت‌های شیشه‌ای در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس غلظت‌های سریالی از عصاره‌ها شامل غلظت‌های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد (۹).

برای تعیین اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها از دو روش انتشار از

International License Creative Commons Attribution License 4.0

چاهک (Well diffusion) و میکرودایلوشن (Microdilution) بر روی سه سویه استاندار شامل اشرشیاکلای PTCC ۱۳۹۹، سودوموناس ائروژینوزا PTCC ۱۴۳۰ و استافیلوکوکوس اورئوس PTCC ۱۵۶۹ استفاده شد. ابتدا اثر بیشترین غلظت عصاره‌ها با روش انتشار از چاهک در سه تکرار بررسی شد. برای این منظور ابتدا از سوسپانسیون نیم مک فارلند در محیط کشت تریپتیک سوی براث (Merk، آلمان) از باکتری‌های استاندارد تهیه شد و بلافاصله روی محیط کشت مولر هینتون آگار (MHA، Merk، آلمان) در چهار جهت به‌وسیله سوآب استریل کشت چمنی داده شد. سپس با استفاده از پیپت پاستور استریل، در پلیت‌ها چاهک‌هایی با قطر ۶ میلی‌متر با رعایت فاصله از هم ایجاد و عمق چاهک‌ها با ۱۰ میکرولیتر محیط کشت MHA مذاب بسته شد. در مرحله بعد به هر چاهک ۸۰ میکرولیتر از غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هر کدام از عصاره‌ها به‌طور جداگانه اضافه شد. آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین (Merk، آلمان) با غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حجم ۸ میکرولیتر برای کنترل مثبت و ۸۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی برای کنترل منفی در نظر گرفته شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از طی‌شدن زمان انکوباسیون، قطر هاله‌های عدم رشد اطراف هر چاهک با استفاده از خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد. به‌منظور کاهش میزان خطا، آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد (۱۰). سپس کمترین غلظت بازدارنده رشد (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) با روش میکرودایلوشن در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استریل در سه تکرار اندازه‌گیری شد. برای این منظور، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌ها همراه با ۹۵ میکرولیتر محیط کشت تریپتیک سوی براث (Merk، آلمان) و ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک فارلند باکتری‌ها به خانه‌های میکروپلیت اضافه شد. آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین (Merk، آلمان) با غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای کنترل مثبت و سرم فیزیولوژی برای کنترل منفی در خانه‌های مربوط ریخته شد. جذب نوری چاهک‌های حاوی عصاره در مقایسه با جذب نوری کنترل مثبت و منفی در طول موج ۶۲۵ نانومتر در دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. کمترین غلظت از هر عصاره که جذب نوری آن برابر با صفر بود، به‌عنوان کمترین غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد. برای تعیین کمترین غلظت کشنده (MBC: Minimum Bactericidal Concentration) عصاره‌ها، خانه‌های محتوای غلظت تعیین‌شده کمترین غلظت مهارکنندگی و دو غلظت بالاتر آن در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و غلظتی که موجب ازبین‌رفتن کامل باکتری‌ها شده بود، به‌عنوان کمترین غلظت کشندگی تعیین شد (۱۰).

سنجش ترکیبات عصاره‌ها با روش کروماتوگرافی گازی با طیف‌سنجی جرمی (GC-MS)

برای سنجش مواد مؤثره میوه‌های کاکتوس از دستگاه گاز کروماتوگرافی از نوع آجیلنت ۶۸۹۰ با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع ۵BPX استفاده شد. طیف‌نگار جرمی استفاده‌شده مدل آجیلنت ۵۹۷۳ با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود. محدوده اسکن مس‌ها از ۴۰ تا ۵۰۰ نانومتر تنظیم شد. نرم‌افزار کمیسشن (Commissions) انتخاب شد. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آن‌ها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از طیف‌های جرمی استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت پذیرفت. برای محاسبه و مقایسه میانگین‌های حاصل در این تحقیق از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و آزمون آماری آنووا استفاده شد. در این آزمون‌ها $P<0/05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

جدول ۱ میانگین و انحراف‌معیار قطر هاله‌های عدم رشد بر حسب میلی‌متر در برابر غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های اتانولی و متانولی میوه خشک کاکتوس اپونتیا ایندیکا به روش انتشار از چاهک بر سه باکتری استاندارد را نشان می‌دهد. عصاره اتانولی با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین تأثیر را بر باکتری اشرشیاکلای با قطر هاله عدم رشد ۳۸ میلی‌متر داشته است. کمترین تأثیر این عصاره بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا با قطر هاله عدم رشد ۷ میلی‌متر مشاهده شده است. این عصاره روی

International License Creative Commons Attribution License 4.0

جدول شماره ۱: میانگین قطر هاله‌های عدم رشد ناشی از بیشترین غلظت عصاره‌های اتانولی و متانولی میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* روی باکتری‌های بررسی‌شده

	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)		
	عصاره اتانولی (۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	عصاره متانولی (۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین (۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)
***اشرشیاکلای* PTCC 1399**	۳۸±۲/۴	۳۸±۳	۱۶±۰/۷
***سودوموناس آئروژینوزا* PTCC 1430**	۷±۰/۴	۲۷±۰/۸	۱۳±۰/۹
***استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1569**	۳۵±۱/۲	۳۱±۱/۹	۱۹±۱/۱

داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف‌معیار هستند.

استافیلوکوکوس اورئوس نیز مؤثر بوده است. عصاره متانولی کاکتوس اپونتیا ایندیکا روی هر سه باکتری آزمایش‌شده مؤثر بوده است، اما بیشترین تأثیر این عصاره بر باکتری اشرشیاکلای با قطر هاله عدم رشد ۳۸ میلی‌متر و کمترین تأثیر آن بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا با قطر هاله عدم رشد ۲۷ میلی‌متر مشاهده شده است. برای مقایسه دوبه‌دو میان هاله‌های عدم رشد از آزمون تعقیبی من‌ویتنی با تعدیل بنفرونی استفاده شد و اختلاف میانگین‌ها با درجه اطمینان (P) ۰/۰۵ مقایسه شدند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده اختلاف معنی‌داری میان تأثیر عصاره اتانولی بر دو باکتری اشرشیاکلای و استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده نشده است، اما تأثیر این عصاره روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا با اختلاف معنی‌داری کمتر از دو باکتری دیگر بوده است. در زمینه عصاره متانولی مقایسه دوبه‌دو میان هاله‌های عدم رشد اختلاف معنی‌داری را میان هر سه باکتری نشان داد.

تأثیر عصاره اتانولی میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* با روش میکرودایلوشن

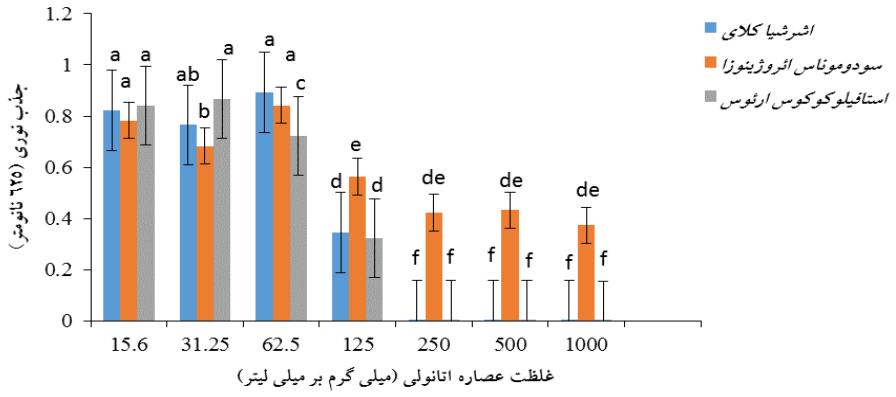
نتایج بررسی کمترین غلظت بازدارنده رشد (MIC) نشان داد غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* موجب مهار رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلای* شد. عصاره اتانولی روی *سودوموناس آئروژینوزا* مؤثر نبود. عصاره متانولی میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* در غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* را مهار کرد و در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر رشد *اشرشیاکلای* نیز اثر مهارکننده داشت.

نتایج خوانش جذب نوری چاهک‌ها تحت تأثیر عصاره اتانولی در شکل ۱-الف و جذب نوری چاهک‌ها تحت تأثیر عصاره متانولی در شکل ۱-ب مشاهده می‌شود. همچنین نتایج تعیین کمترین غلظت کشنده در شکل ۲ مشاهده می‌شود.

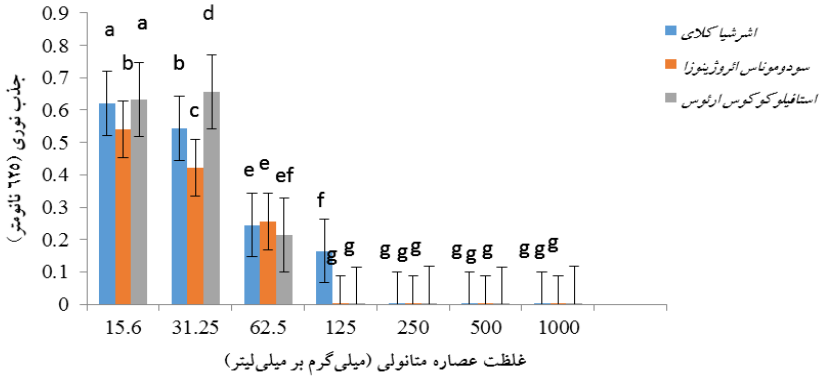
نتایج محاسبه حداقل غلظت کشنده باکتری‌ها (MBC) نشان داد پس از کشت محتویات چاهکی که به‌عنوان کمترین غلظت مهارکننده در نظر گرفته شده بود و دو غلظت بالاتر آن به‌طور جداگانه در محیط کشت MHA، غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* قادر به ازبین‌بردن باکتری‌های *اشرشیاکلای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بود، اما همان‌طور که گفته شد، عصاره اتانولی روی *سودوموناس آئروژینوزا* مؤثر نبود. نتایج تأثیر عصاره متانولی میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* نشان داد غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر این عصاره قادر به ازبین‌بردن *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* بود و غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آن موجب کشته‌شدن *اشرشیاکلای* شد.

در شکل ۲ نتایج به‌دست‌آمده از تعیین مقادیر کمترین غلظت کشنده بین دو عصاره اتانولی و متانولی روی باکتری‌های آزمایش‌شده مقایسه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود عصاره متانولی با غلظت کمتر (۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) موجب کشته‌شدن باکتری‌هایی مانند *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* شده است، درحالی‌که در غلظت بیشتر (۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) *اشرشیاکلای* را از بین برده است. مقایسه دوبه‌دو میان مقادیر کمترین غلظت کشنده با استفاده از آزمون تعقیبی من‌ویتنی با تعدیل بنفرونی نشان داد عصاره‌های اتانولی و متانولی روی *اشرشیاکلای* تأثیر مشابهی بدون اختلاف

International License Creative Commons Attribution License 4.0



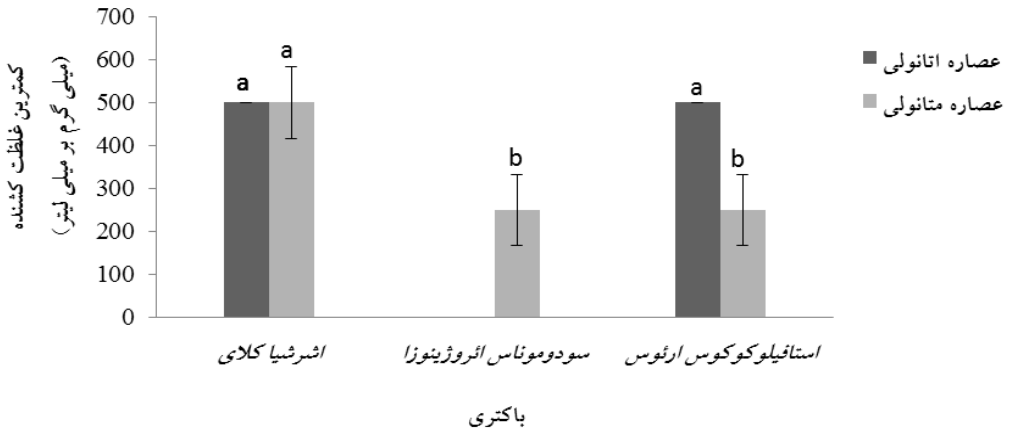
الف



ب

شکل شماره ۱: مقادیر جذب نوری غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی (الف) و متانولی (ب) میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* روی باکتری‌های استاندارد به روش میکرودایلوشن

اختلاف میانگین جذب نوری بین گروه‌هایی که حرف انگلیسی (a تا e) مشترک دارند، از لحاظ آماری معنی‌دار نیست (p< ۰/۰۵)



شکل شماره ۲: مقایسه نتایج تعیین مقادیر کمترین غلظت کشنده عصاره‌های اتانولی و متانولی میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* روی باکتری‌های آزمایش‌شده

اختلاف میانگین جذب نوری بین گروه‌هایی که حرف انگلیسی (a تا e) مشترک دارند، از لحاظ آماری معنی‌دار نیست (P< ۰/۰۵).

معنی‌داری داشته‌اند؛ اما تأثیر عصاره متانولی روی *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* طور معنی‌داری بیشتر از عصاره اتانولی بوده است. تأثیر عصاره متانولی روی *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اختلاف معنی‌داری نداشته است، اما تأثیر آن روی این دو باکتری با اختلاف معنی‌داری بیشتر از تأثیر آن روی *اشرشیاکلای* بوده است. همچنین

International License Creative Commons Attribution License 4.0

تأثیر عصاره اتانولی بر *اشرشیاکلای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اختلاف معنی‌داری نداشته است، اما تأثیر آن بر این دو باکتری با اختلاف معنی‌داری کمتر از تأثیر آن بر *سودوموناس آئروژینوزا* بوده است (P< ۰/۰۱). به‌طورکلی، عصاره متانولی روی بیشتر باکتری‌های مطالعه‌شده تأثیر بیشتری نسبت به عصاره اتانولی داشته است.

بررسی ترکیبات عصاره‌های میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* با روش GS-MS

اجزای اصلی که در عصاره اتانولی وجود داشتند شامل اسید آلی بوتینوئیک اسید، دی هیدروکسی پیران، ترکیبات استری، ترکیبات الکلی مانند پنتادکانتریول بودند (جدول ۲). در عصاره متانولی استیک اسید، فوران کربوکسی آلدئید، فوران دی اون، اریتروفورانوز، فورفورال، اکسیران، تیران و ترکیبات پیرازین اجزای اصلی عصاره را تشکیل می‌دادند (جدول ۳). مقایسه ترکیبات موجود در هر دو عصاره نشان می‌دهد عصاره متانولی حاوی ترکیبات ضدمیکروبی متنوع‌تری بوده است؛ ازجمله این مواد مؤثر ترکیبات آلدئیدی و ترکیبات فرّار مانند فوران دی اون، اریتروفورانوز، فورفورال و اکسیران را می‌توان نام برد که در عصاره اتانولی یافت نشدند.

جدول شماره ۲: ترکیبات یافت‌شده در عصاره اتانولی میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* با روش GS-MS

شماره پیک	زمان ماند (دقیقه)	ترکیب شیمیایی ماده	مساحت (درصد)	شماره ثبت
۱	۱۰/۱۶۳۸	1-Propyne, 3-chloro	۷/۶۹	۰۰۶۲۴-۶۵-۷
۲	۱۰/۸۸۹۲	Acetic acid, hydroxy, ethyl ester	۱/۵۱۱	۰۰۶۲۳-۵۰-۷
۳	۱۲/۱۵۰۲	d-Arabinose, cyclic 1,2-ethanediyl mercaptal, tetraacetate	۱/۶۰۰	۰۴۰۷۳۳-۱۶-۲
۴	۱۲/۵۰۵۶	3-Butynoic acid	۹۹/۰۶	۰۰۲۳۴۵-۵۱-۹
۵	۱۴/۷۶۴۶	1-Hepten-4-ol	۱/۱۰	۰۰۳۵۲۱-۹۱-۳
۶	۱۶/۲۲۰۴	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl	۲۱/۴۰	۰۲۸۵۶۴-۸۳-۲
۷	۱۷/۵۸۸۴	Thiocyanic acid, 2-propynyl ester	۵/۶۳	۰۲۴۳۰۹-۴۸-۶
۸	۱۷/۷۹۷۸	2-Butenenitrile	۷۱/۱۱	۰۰۴۷۸۶-۲۰-۳
۹	۲۱/۵۷۵۸	2-Vinyl-9-[.beta.-d-ribofuranosyl]hypoxanthine	۱/۸۹	۱۱۰۸۵۱-۵۶-۴
۱۰	۲۲/۲۴۷۷	Propanoic acid, 3-hydroxy	۳/۹۱	۰۰۰۵۰۳-۶۶-۲
۱۱	۲۳/۵۵۲۵	Ethane, 1,1,1-triethoxy	۵/۵۸	۰۰۰۰۷۸-۳۹-۷
۱۲	۲۳/۸۲۵۲	1,2,15-Pentadecanetriol	۶/۲۹	۰۵۷۲۸۹-۶۰-۸
۱۳	۲۴/۸۹۶۲	Tetradecanoic acid, 12-methyl-, methyl ester	۲/۰۱	۰۰۵۱۲۹-۶۶-۸
۱۴	۲۶/۶۴۹	9-Oxabicyclo[6.1.0]nonane, cis	۲/۰۴	۰۰۴۹۲۵-۷۱-۷

جدول شماره ۳: ترکیبات یافت‌شده در عصاره متانولی میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* با روش GS-MS

شماره پیک	زمان ماند (دقیقه)	ترکیب شیمیایی ماده	مساحت (درصد)	شماره ثبت
۱	۷/۴۸۶۱	L-Talose, 6-deoxy-3-C-methyl-2-O-methyl	۱۶/۱۱	۰۲۷۲۰۸-۹۸-۶
۲	۷/۹۶۸۱	L-Talose, 6-deoxy-3-C-methyl-2-O-methyl	۵۲/۹۷	۰۲۷۲۰۸-۹۸-۶
۳	۹/۰۵۸۷	L-Talose, 6-deoxy-3-C-methyl-2-O-methyl	۴/۶۰	۰۲۷۲۰۸-۹۸-۶
۴	۹/۵۰۱۷	Acetic acid, ethoxyhydroxy-, ethyl ester	۴۵/۲۲	۰۴۹۶۵۳-۱۷-۰
۵	۱۰/۰۹۰۸	2-furan-carboxaldehyde	۴۷/۷۰	۰۰۰۰۹۸-۰۱-۱
۶	۱۱/۸۶۷۹	2-Aminopyrimidine-1-oxide	۱۳/۷۱	۰۳۵۰۳۴-۱۵-۲
۷	۱۲/۴۸۱۳	3-METHYLENEDIHYDRO-2,5-FURANDIONE	۱۰/۹۰	۰۰۲۱۷۰-۰۳-۸
۸	۱۳/۴۹۴	1,3-Dihydroxyacetone dimer	۲۷/۰۷	۰۶۲۱۴۷-۴۹-۳
۹	۱۴/۲۰۴۸	exo-1,2-O-Ethylidene-.alpha.-d-erythrofuranose	۵/۵۷	۰۷۷۴۸۹-۴۳-۱
۱۰	۱۴/۶۶۷۳	Oxirane, [(1-methylethoxy)methyl]	۲/۶۲	۰۰۴۰۱۶-۱۴-۲
۱۱	۱۴/۹۷۸۹	2(1H)-Pyridinone	۳/۹۲	۰۰۰۱۴۲-۰۸-۵

International License Creative Commons Attribution License 4.0

ادامه جدول شماره ۳.

۱۲	۱۵/۳۹۷۶	Cyclopropanecarboxylic acid	۶/۰۲	۰۰۱۷۵۹-۵۳-۱
۱۳	۱۵/۷۰۴۳	Butanenitrile, 2,3-dioxo-, dioxime, O,O'-diacetyl	۲۴/۰۹	۳۳۹۲۴۶-۶۲-۷
۱۴	۱۶/۰۸۴۱	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl	۴۶/۸۹	۰۲۸۵۶۴-۸۳-۲
۱۵	۱۷/۱۸۴۴	1-Methyl-3-nitro-1H-pyridin-2-one	۱۰/۹۷	۰۳۲۸۹۶-۹۱-۶
۱۶	۱۷/۹۸۷۷	5-Hydroxymethylfurfural	۶۷/۸۰	۰۰۰۰۶۷-۴۷-۰
۱۷	۱۹/۱۶۵۹	3-Cyano-2,5-dimethylpyrazine	۱۸/۳۱	۰۰۲۴۳۵-۴۷-۴
۱۸	۲۱/۶۸۳۰	d-Glycero-d-galacto-heptose	۴/۵۲	۰۷۷۷۷۰-۵۱-۵
۱۹	۲۲/۲۴۷۸	.beta.-D-Glucopyranose, 1,6-anhydro	۵۲/۵۴	۰۰۰۴۹۸-۰۷-۷
۲۰	۲۳/۶۸۴۰	D-erythro-Pentose, 2-deoxy	۴۲/۴۱	۰۰۰۵۳۳-۶۷-۵
۲۱	۲۴/۷۹۴۱	Thiirane, methyl	۵/۳۷	۰۰۱۰۷۲-۴۳-۱
۲۲	۲۶/۵۴۱۹	3(2H)-Pyridazinone, 6-methyl	۲۷/۸۷	۰۱۳۳۲۷-۲۷-۰
۲۳	۲۹/۷۹۴۲	3-Ethyl-5-methyl-4-[3-(thiophen-3-yl)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazol-6-yl]-1,2-oxazole	۱/۰۳	۱۰۰۰۳۸۷-۱۱-۳
۲۴	۳۰/۵۹۲۶	2-Vinyl-9-[.beta.-d-ribofuranosyl]hypoxanthine	۱/۱۳	۱۱۰۸۵۱-۵۶-۴

بحث

نتایج روش انتشار از چاهک نشان داد عصاره‌های اتانولی و متانولی میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین تأثیر را روی *اشرشیاکلای* با قطر هاله عدم رشد ۳۸ میلی‌متر نشان دادند. عصاره اتانولی روی *سودوموناس ائروژینوزا* مؤثر نبود، اما عصاره متانولی رشد این باکتری را با ایجاد هاله عدم رشد ۲۷ میلی‌متری مهار کرد. عصاره‌های اتانولی و متانولی روی *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله‌های عدم رشد به ترتیب ۳۵ و ۳۱ میلی‌متر مؤثر بودند. نتایج اولیه نشان داد عصاره متانولی رشد طیف وسیع‌تری از باکتری‌ها را مهار کرد.

در سایر مطالعات نیز به دلیل کارایی بیشتر از عصاره متانولی میوه کاکتوس استفاده شده است (۹). Hayek و Ibrahim (۲۰۱۲) از میوه کاکتوس *اپونتیا ماتودا* (*Opuntia matudae*) عصاره آبی تهیه کردند و تأثیر آن را بر *اشرشیاکلای* سویه O157:H7 بررسی کردند. غلظت ۳۰ درصد (حجمی/حجمی) این عصاره در روش انتشار از چاهک تأثیر محدودی بر رشد باکتری داشت، به‌طوری‌که قطر هاله عدم رشد ۹/۴ تا ۱۰/۹ میلی‌متری ایجاد کرد (۱۱). یاسمین و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲ عصاره چند گیاه ازجمله عصاره آبی *اپونتیا ایندیکا* را روی باکتری‌های مولد اوره‌آز مانند *پروتئوس میرابیلیس* با روش ماکرودایلوشن بررسی کردند. غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی تأثیر ضعیفی روی مهار رشد باکتری داشت (۱۲). این تأثیر کم در مقایسه با نتایج مطالعه حاضر می‌تواند به دلیل نوع روش عصاره‌گیری و غلظت کم عصاره استفاده‌شده باشد (۱۳).

Sánchez و همکاران (۲۰۱۰) اثر عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* را روی باکتری *ویبریو کلرا* بررسی کردند. عصاره متانولی بیشترین تأثیر را روی باکتری مطالعه‌شده داشت، به‌طوری‌که غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آن موجب کشته‌شدن باکتری شد. بررسی سلول باکتری با روش فلوروژنیک نشان داد پس از تأثیر عصاره نفوذپذیری غشای باکتری افزایش یافته بود و کاهش زیادی در pH سیتوپلاسمی، قطبیت غشا و غلظت ATP در سلول مشاهده شد (۱۴). تفاوت نتایج کمترین غلظت کشنده در مطالعه حاضر و تحقیق Sánchez و همکاران (۲۰۱۰) می‌تواند به دلیل حساسیت زیاد باکتری *ویبریو کلرا* نسبت به عوامل ضدمیکروبی در مقایسه با باکتری‌های بررسی‌شده در پژوهش حاضر باشد (۱۵).

نتایج محاسبه مقادیر کمترین غلظت کشنده عصاره‌های اتانولی و متانولی میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* روی باکتری‌های مطالعه حاضر نشان داد عصاره متانولی روی *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اختلاف معنی‌داری نداشته است، اما تأثیر آن روی این دو باکتری با اختلاف معنی‌داری بیشتر از تأثیر آن روی *اشرشیاکلای* بوده است. همچنین عصاره اتانولی روی *اشرشیاکلای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بدون اختلاف معنی‌دار مؤثر بوده است، اما تأثیر آن روی این دو باکتری با اختلاف

International License Creative Commons Attribution License 4.0

معنی‌داری کمتر از تأثیر آن بر *سودوموناس آئروژینوزا* بوده است (P< ۰/۰۱).

در نتیجه‌گیری کلی، عصاره متانولی روی بیشتر باکتری‌های بررسی‌شده تأثیر بیشتری نسبت به عصاره اتانولی داشته است. به‌طورکلی، باکتری‌های گرم منفی در مطالعات مختلف مقاومت بیشتری را به عصاره‌های گیاهی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت نشان داده‌اند (۱۶). این تفاوت احتمالاً به اختلاف ساختمانی در این دو گروه از باکتری‌ها، ازجمله مقدار کم پپتیدوگلایکان و وجود غشای خارجی در باکتری‌های گرم منفی و همچنین تفاوت در حضور گیرنده‌ها و ماهیت پیوندهای عرضی در پپتیدوگلایکان این باکتری‌ها مربوط باشد (۱۷). اثر ضدباکتریایی عصاره‌های بررسی‌شده در مطالعه حاضر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مؤثر بودند که به‌عنوان یکی از جنبه‌های مثبت تحقیق در نظر گرفته می‌شود. همچنین عصاره متانولی میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* روی *سودوموناس ائروژینوزا* مؤثر بود که یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های انسانی است و مقاومت زیادی به آنتی‌بیوتیک‌ها نیز نشان داده است (۱۷).

ترکیبات شناسایی‌شده در عصاره میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* در تحقیق حاضر شامل بعضی عوامل ضدمیکروبی با خواص اثبات‌شده هستند. یکی از این ترکیبات، اسیدهای آلی مانند استیک اسید، بوتینوئیک اسید و مشتقات آن‌هاست که در عصاره‌های اتانولی و متانولی یافت شد. اسیدهای آلی در پزشکی به‌صورت پماد برای درمان بیماری‌های پوستی با منشأ قارچی مانند کچلی و زخم پای ورزشکاران استفاده شده است (۱۸). همچنین این مواد اوایل قرن بیستم به‌عنوان ضدعفونی‌کننده موضعی و داروی استنشاقی برای بازکردن مجاری تنفسی به کار می‌رفته است (۱۹). فوران دی اون، اریتروفورانوز، فورفورال و هیدروکسی متیل فورفورال نیز از ترکیبات مؤثر شناسایی‌شده در عصاره متانولی میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* در تحقیق حاضر بود. این ترکیبات که از مشتقات اژنول (Egonol) هستند، در مواد غذایی طبیعی شیرین مانند عسل هم یافت می‌شوند و در اثر دهیدراتاسیون قندهای خاصی هنگام حرارت‌دیدن یا پخته‌شدن تولید می‌شوند. این ترکیبات به‌عنوان افزودنی و طعم‌دهنده به غذا اضافه می‌شوند. اثر ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی اژنول اثبات شده است (۲۰،۲۱).

Nafea و همکاران (۲۰۱۱) هیدروکسی متیل فورفورال را با نسبت‌های مختلف به عسل اضافه کردند و اثر ضدباکتریایی عسل حاصل را روی باکتری‌ها بررسی کردند. نتایج ایشان نشان داد افزودن مقدار ۹۰/۲۴ میلی‌گرم در کیلوگرم از این ماده به عسل، ۱۵ تا ۲۰ درصد موجب مهار رشد *اشرشیاکلای* در شرایط آزمایشگاهی شد (۲۲). وجود اکسیران (اتیلن اکسید) نیز در عصاره متانولی میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* مشاهده شد. این ماده نوعی اتر حلقوی آلی نیتروژن‌دار است که در گیاهانی مانند تیره استبرقیان یافت شده است و اثر ضدمیکروبی روی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و قارچ‌ها دارد (۲۳).

نتیجه‌گیری

با توجه به تأثیر ضدباکتریایی قابل توجه عصاره متانولی میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* که در این مطالعه مشاهده شد، این عصاره به‌عنوان یک عامل ضدباکتریایی برای کنترل عفونت‌های انسانی پس از انجام آزمایش‌های درون‌تنی پیشنهاد می‌شود. نتیجه قابل ملاحظه به‌دست‌آمده در بررسی حاضر، اثبات وجود انواع ترکیبات ضدمیکروبی مؤثر در عصاره‌های اتانولی و متانولی میوه کاکتوس *اپونتیا ایندیکا* بود که می‌توان در صورت امکان مواد مؤثره فعال با خواص ضدمیکروبی موجود در آن را استخراج و اثرات ضدباکتریایی آن‌ها را در شرایط *In vivo* و بالینی بررسی کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه دانشجویی گرفته شده است. نویسندگان این مقاله از حوزه پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به دلیل در اختیار قراردادن امکانات آزمایشگاهی کمال تشکر و امتنان را دارند.

International License Creative Commons Attribution License 4.0

References:

1. Cassone M, Giordano A. Resistance genes traveling the microbial internet: down the drain, up the food chain? Expert Rev Anti Infect Ther 2009;7(6):637-9. PMID: 19681690

2. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson D, Lightfoot D. Phytochemicals: extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. Plants 2017;6(4):42-65. PMID: 28937585

3. El-Mostafa K, Kharrassi YE, Badreddin A, Andreoletti P, Vamecq J, Kebbaj MS, et al. Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. Molecules 2014;19(9):14879-901. PMID: 25232708

4. Feugang JM, Konarski P, Zou D, Stintzing FC, Zou C. Nutritional and medicinal use of *Cactus pear* (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. Front Biosci 2006;11(1):2574-89. PMID: 16720335

5. Liu W, Fu YJ, Zu YG, Tong MH, Wu N, Liu XL, et al. Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from *Opuntia dillenii* Haw. and its antioxidant activity. Food Chem 2009;114(1):334-9. Link

6. Zito P, Sajeva M, Bruno M, Rosselli S, Maggio A, Senatore F. Essential oils composition of two Sicilian cultivars of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (*Cactaceae*) fruits (prickly pear). Nat Prod Res 2013;27(14):1305-31. PMID: 23167758

7. Fernández-López JA, Almela L. Application of high-performance liquid chromatography to the characterization of the betalain pigments in prickly pear fruits. J Chromatogr A 2001;913(1-2):415-20. PMID: 11355839

8. Piga A. Cactus pear: a fruit of nutraceutical and functional importance. J Prof Assoc Cactus Dev 2004;6:9-22. Link

9. Shivabasavaiah ST. Reversible antifertility effect of *Opuntia elatior* Mill. fruit extract. Int J Reprod Contracept Obstetr Gynecol 2015;4(2):392-7. Link

10. Bohlooli Khiavi R. A review on antimicrobial activity in laboratory. J Med Lab Diagn 2017;9(35):43-53. Link

11. Hayek SA, Ibrahim SA. Antimicrobial activity of Xoconostle pears (*Opuntia matudae*) against *Escherichia coli* O157: H7 in laboratory medium. Int J Microbiol 2012;2012:368472. PMID: 22934117

12. Yasmeen R, Hashmi AS, Anjum AA, Saeed S, Muhammad K. Antibacterial activity of indigenous herbal extracts against urease producing bacteria. J Anim Plant Sci 2012;22(2):416-9. Link

13. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. J Pharm Anal 2016;6(2):71-9. PMID: 29403965

14. Sánchez E, García S, Heredia N. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. Appl Environ Microbiol 2010;76(20):6888-94. PMID: 20802077

15. Shrestha SD, Malla S, Adhikari BR, Shakya G, Basnyat SR, Sharma S. Antibiotic susceptibility patterns of *Vibrio cholerae* isolates. J Nepal Med Assoc 2010;49(179):232-6. PMID: 22049830

16. 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):164-72. PMID: 23837916

17. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawets Melnick and Adelbergs medical microbiology. New York: McGraw-Hill Companies; 2013. P. 245-9. Link

18. Beale JM, Block JH. Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. P. 180-239. Link

19. Lillard B. Practical druggist and pharmaceutical review of reviews. California: Lillard & Company; 1904. P. 128-40. Link

20. Öztürk SE, Akgül Y, Anil H. Synthesis and antibacterial activity of egonol derivatives. Bioorg Med Chem 2008;16(8):4431-7. PMID: 18321718

International License Creative Commons Attribution License 4.0

21. Abraham K, Gürtler R, Berg K, Heinemeyer G, Lampen A, Appel KE. Toxicology and risk assessment of 5-Hydroxymethylfurfural in food. Mol Nutr Food Res 2011;55(5):667-78. PMID: 21462333

22. Nafea EA, Moselhy WA, Fawzy A. Does the HMF value affect the antibacterial activity of the bee honey? Egypt Acad J Biol Sci 2011;4:13-9. Link

23. Musa AM, Ibrahim MA, Aliyu AB, Abdullahi MS, Tajuddeen N, Ibrahim H, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of hexane leaf extract of *Anisopus mannii* (Asclepiadaceae). J Intercult Ethnopharmacol 2015;4(2):129-33. PMID: 26401399

International License Creative Commons Attribution License 4.0