

**IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CHLOROFORM, ETHYLACETATE
AND BUTANOL EXTRACTS OF LEAVES OF CITRULLUS LANATUS VAR.
CRIMSON SWEET GROWN IN THE REGION OF OUARGLA, ALGERIA**

A. Bennouna^{1,2*}, B. Labeled² and H. Dendougui¹

¹Université de Ouargla, Faculté des mathématiques et des sciences de la matière Lab.
valorisation et promotion des ressources sahariennes (VPRS) 30 000 Ouargla, Algeria

²Ecole Normale Supérieure de Ouargla, Algeria

Received: 11 February 2019 / Accepted: 29 April 2019 / Published online: 01 May 2019

ABSTRACT

We are always trying to discover antibiotics, of natural origin, the most effective. For this purpose, our work is devoted to the evaluation of the antibacterial activity of the chloroformic, ethyl acetate and butanolic extracts of the leaves of *Citrullus lanatus* crimson sweet variety cultivated in the region of Ouargla. This activity was tested against microorganisms derived from the reference strains gram positive (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* sp) and gram negative (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*). All extracts showed a remarkable sensitivity against bacteria by giving inhibition diameters varying between 12 and 26 mm. The evaluation of the minimum concentration of inhibition (MIC) led to the values between 40 and 75 µg/ml. From the results obtained, we can conclude that the leaves of this plant have a good antibacterial activity against certain microorganisms.

Keywords: *Citrullus Lanatus* var. Crimson sweet, antibacterial activity, CMI.

Author Correspondence, e-mail: bennounaab@mail.com

doi: <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v11i2.30>



1. INTRODUCTION

La pastèque ou Dellaa est originaire de l'Afrique [1]. Elle est connue dans le monde entier [2] à cause de ses fruits riches en teneur élevée d'eau et son goût sucré. Ce qui fait d'elle le légume le plus consommé surtout en été. En plus, elle possède des propriétés bénéfiques pour la santé [3]. En effet, la médecine traditionnelle a signalé l'utilisation des différentes parties de cette plante en Asie et Moyen Orient. Les fruits sont connus comme étant diurétiques [4], ainsi elles peuvent être utilisées pour remédier les maladies des reins [4]. La chair est prescrite dans les cas d'empoisonnement alcoolique et antidiabétique [5]. La pastèque est connue sous le nom scientifique *Citrullus Lanatus*. Elle appartient à la famille des cucurbitacées [6]. Ces derniers possèdent des composés biologiquement actifs comme les cucurbitacines et les triterpènes [7].

En Algérie, la cultivation du Pastèque est en croissance ces dernières années à cause de la forte demande par les consommateurs et sa bonne rentabilité économique [8]. Par exemple, à Ouargla, la production a atteint 192 kantars dans la saison 2016-2017 [9]. Le but de ce travail est centré sur la détermination des concentrations des flavonoïdes, et des phénols totaux dans les extraits bruts des feuilles de *Citrullus Lanatus* (CL) variété Crimson sweet cultivée dans la région de Ouargla, ainsi que leur activité antibactérienne vis à vis quelques microorganismes.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1 Dosage des Phénols et flavonoïdes totaux :

La teneur des phénols et des flavonoïdes totaux est influencée par différents facteurs, parmi lesquelles on cite : la méthode de séchage [10], le solvant d'extraction, le milieu de culture et même la variété [11]. Les résultats obtenus dans ce travail montrent que les quantités des phénols et flavonoïdes contenus dans les fractions des extraits bruts des feuilles de *Citrullus Lanatus* variété crimson sweet, sont assez importantes. La quantité des phénols varient entre $0,359 \pm 0,012$ et $10,528 \pm 0,956$ mg AGE/g MS et celle des flavonoïdes est comprise entre $32,964 \pm 0,075$ et $278,771 \pm 5,763$ µg EQ/g MS (Tableau 1).

Tableau 1. Teneur des phénols et flavonoïdes totaux dans les feuilles de (CL)

| Extraits | Phénols totaux mg AGE/g MS | Flavanoides totaux $\mu\text{g EQ/g MS}$ |
|------------------|-------------------------------|---|
| Chloroformique | $0,359 \pm 0,012$ | $56,010 \pm 1,277$ |
| Acétate d'éthyle | $1,156 \pm 0,035$ | $32,964 \pm 0,075$ |
| Butanolique | $10,528 \pm 0,956$ | $278,771 \pm 5,763$ |

2.2 Activité antibactérienne

Les bactéries sont responsables de plusieurs maladies et infections, comme la diarrhée (E.Coli), infection cutanée (Staphylococcus aureus), infection urinaire (Pseudomonas aeruginosa [12]. Les extraits testés, présentent un effet remarquable sur les différentes souches utilisées (Figures 1 et 2). Le plus grand diamètre d'inhibition a été observé pour l'extrait acétate d'éthyle (26 mm) (Tableaux 2-4). Ces résultats sont plus élevés que ceux trouvés par Cemaluk et al .,[13]

Fig.1. Zone d'inhibition**Fig.2.** Mesure de la zone d'inhibition

Tableau 2. diamètre d'inhibition de l'extrait Chloroformique

| Type de bactérie | Type de Gram | Concentration de l'extrait en mg/ml | | | | | |
|------------------------|--------------|-------------------------------------|-----|-----|----|----|----|
| | | 150 | 120 | 100 | 80 | 60 | 40 |
| Escherichia coli | - | 14 | 12 | 11 | 10 | 08 | 00 |
| Pseudomonas aeruginosa | - | 12 | 11 | 16 | 18 | 00 | 00 |
| Staphylococcus aureus | + | 20 | 17 | 15 | 14 | 12 | 00 |
| Streptococcus sp | + | 13 | 11 | 10 | 09 | 00 | 00 |
| DMSO | / | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 |

Tableau 3. diamètre d'inhibition de l'extrait Acétate d'éthyle

| Type de bactérie | Type de Gram | Concentration de l'extrait en mg/ml | | | | | |
|------------------------|--------------|-------------------------------------|-----|------|----|----|----|
| | | 150 | 120 | 100 | 80 | 60 | 40 |
| Escherichia coli | - | 23 | 20 | 18 | 15 | 11 | 00 |
| Pseudomonas aeruginosa | - | 14 | 13 | 11 | 10 | 00 | 00 |
| Staphylococcus aureus | + | 26 | 20 | 17 | 14 | 10 | 00 |
| Streptococcus sp | + | 15 | 14 | 13,5 | 12 | 00 | 00 |
| DMSO | / | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 |

Tableau 4. diamètre d'inhibition de l'extrait Butanolique

| Type de bactérie | Type de Gram | Concentration de l'extrait en mg/ml | | | | | |
|------------------------|--------------|-------------------------------------|-----|-----|----|----|----|
| | | 150 | 120 | 100 | 80 | 60 | 40 |
| Escherichia coli | - | 22 | 19 | 17 | 14 | 11 | 00 |
| Pseudomonas aeruginosa | - | 15 | 13 | 12 | 11 | 00 | 00 |
| Staphylococcus aureus | + | 25 | 20 | 16 | 12 | 10 | 00 |
| Streptococcus sp | + | 14 | 13 | 11 | 10 | 00 | 00 |
| DMSO | / | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 |

2.3 Calcul de La CMI

Les valeurs des CMI montrent que les extraits ont tous un grand effet (Figures 1 et 2). La plus grande valeur a été observée avec la souche de *Pseudomonas aeruginosa* (70-75 mg/l) (Tableau 5).

Tableau 5. Valeurs du CMI

| Souches utilisées | Valeurs du CMI en mg/l | | |
|-----------------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------|
| | Extrait chloroformique | Extrait Acetate d'Ethyle | Extrait Butanolique |
| Escherichia coli ATCC 25922 | 40 | 55 | 50 |
| Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 | 75 | 70 | 70 |
| Staphylococcus aureus ATCC 25923 | 40 | 40 | 55 |
| Streptococcus sp ATCC 49619 | 50 | 75 | 50 |

3. MATERIAUX ET METHODES

3.1 Plante utilisée

Malgré les études menées dans ce domaine [14] et qui ont étudié cette plante (*Citrullus Lanatus*), peu d'entre-eux qui se sont intéressés aux feuilles. Les feuilles de *Citrullus Lanatus* ont été récoltées le mois d'Août 2015, de la région de Hassi Ben Abdellah, Ouargla, située au sud de l'Algérie. Séchées à l'ombre à la température ambiante, les feuilles ont été tamisées afin de les rendre en petits grains.

Les extraits ont été obtenus après une macération à froid dans l'éther de pétrole. Le filtrat est traité par chloroforme, acétate d'éthyle et enfin par le n-butanol successivement.

3.2 Détermination des phénols et Flavonoïdes totaux

Les quantités des phénols et des flavonoïdes, contenues dans les extraits bruts des feuilles de *citrullus lanatus* variété crimson sweet, ont été déterminées par les méthodes Folin-ciocalteau [15] et chlorure d'aluminium respectivement [16]. Les courbes d'étalonnage sont réalisées dans les mêmes conditions opératoires. (figure 3 et 4)

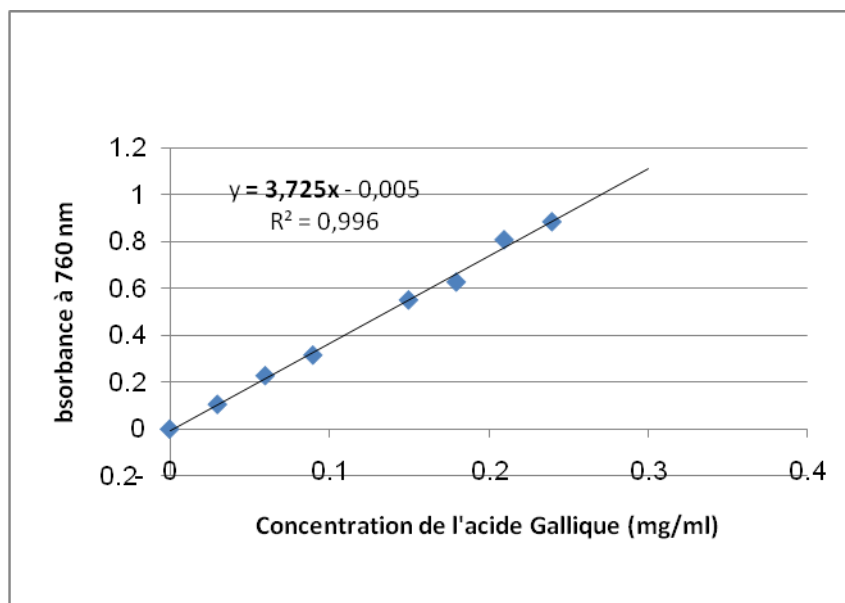


Fig.3. Courbe d'étalonnage de l'acide Gallique

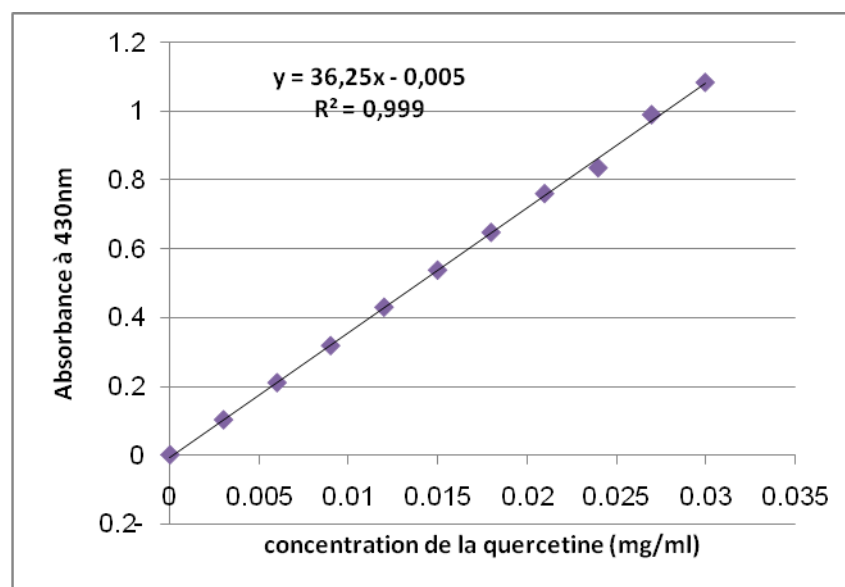


Fig.4. Courbe d'étalonnage de la quercetine

3.3 Détermination des phénols totaux

La concentration des phénols totaux a été déterminée selon le protocole de Folin- Ciocalteu [15]. Un mélange de 0,1 ml de l'extrait et 0,1 ml du réactif de Folin secoué et, après 5 min, on ajoute 2ml d'une solution de Na_2CO_3 (2%). Une lecture, après 30 minutes d'incubation à température ambiante, est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis à la longueur d'onde 760 nm. Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme d'Equivalent d'Acide

Gallique par gramme de la matière sèche (mg AGE/g MS).

3.4 Détermination des flavonoïdes totaux

En suivant le protocole de la méthode calorimétrique de trichlorure d'aluminium, la teneur des flavonoïdes a été évaluée [16]. Le mélange de 1,5 ml de l'extrait et 1,5 ml de $AlCl_3$ (2 % dans le méthanol) est conservé à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. L'absorbance est lue à 430 nm. Le calcul de la concentration des flavonoïdes; est déterminé par rapport à la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (figure 4). Elle est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par gramme de la matière sèche (μg EQ/g MS).

3.5 Activité antibactérienne

On cherche souvent, dans les plantes à trouver des antibiotiques naturels de compositions chimiques différentes pour battre les bactéries qui ne cessent pas à résister aux antibiotiques utilisés [17]. La méthode utilisée pour l'évaluation du taux de l'activité antibactérienne des différents extraits est celle qui adopte la diffusion dans un milieu gélose sec [18]. De même elle a été utilisée pour tester la sensibilité et la détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI) [19-20]. Les souches de référence utilisées sont de différents gram. Elles sont originaires de American Type Culture Collection (ATTC), USA obtenus de l'Hôpital de Slimane Amirat de Touggourt.

La culture de souches bactériennes a été préparée avant 18 - 24 h et les suspensions ont été ajustées à $0,5 \times 10^8$ Mc Ferland à 570 nm avec un spectrophotomètre UV-Vis. Des boîtes de Pétri ont été préparées avec 20 ml d'agar Mueller Hinton (MH); les inoculums ont été étalés sur le milieu solidifié et laissés à sécher pendant 60 min. Les disques stériles (6 mm de diamètre) imprégnés dans l'extrait brut dissout dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) ont été ensuite déposés dans les boîtes de Pétri. Les plaques ont été laissées pendant 30 minutes à température ambiante pour permettre la diffusion de l'extrait avant incubation à 37°C pendant 24 heures. Le contrôle négatif a été préparé sur des disques imprégnés dans le DMSO et déposés dans les mêmes boîtes. En cas d'inhibition bactérienne, on remarque une zone autour du disque que l'on appelle la zone d'inhibition. Le diamètre du halo est évalué en millimètre. Cette expérience a été répétée pour des différentes concentrations de chaque extrait.

3.6 Détermination de la Concentration Minimale d'Inhibition (CMI)

La CMI est définie comme étant la concentration minimale de l'antibiotique inhibant toute

croissance visible du micro-organisme après une incubation de 24 h. La dilution des extraits bruts dans un milieu gélosé (MH) nous permet l'évaluation des CMI. On note ainsi la plus petite concentration qui ne correspond à aucun trouble observable à l'œil nu.

4. CONCLUSION

Les résultats de dosage des phénols et flavanoïdes contenus dans les feuilles de *Citrullus Lanatus* montrent que cette plante est riche en composés phénoliques, ce qui est en accord avec les tests antibactériens.

En effet, les extrais testés vis-à-vis des microorganismes ont montré un très bon effet en comparaison avec des travaux antérieures [13], où le meilleur diamètre d'inhibition a été observé pour l'extrait de l'acétate d'éthyle avec une valeur de 26 mm.

Finalement, les résultats obtenus lors de cette étude confirment bien l'utilisation des feuilles de la plante (*Citrullus Lanatus*) dans la médecine traditionnelle.

5. REFERENCES

- [1] Paris, H. S., Origin and emergence of the sweet dessert watermelon, *Citrullus lanatus*. *Annals of botany*, 2015, 116(2), 133-148.
- [2] Prohens-Tomás, J., and Nuez, F. *Vegetables I: Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae* (Vol. 1): Springer Science & Business Media., 2007, pp. 381-418.
- [3] Kumawat G ,Goyal M, Math ur K, Yadav S K, *Citrullus lanatus: An Overview on Pharmacological Activities*, *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* 2017; 8 (1), 6 – 9
- [4] Siddiqui, W. A., Shahzad, M., Shabbir, A., and Ahmad, A. Evaluation of anti-urolithiatic and diuretic activities of watermelon (*Citrullus lanatus*) using in vivo and in vitro experiments. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018. 97, 1212-1221.
- [5] Erhirhie, E., and Ekene, N.. Medicinal values on *Citrullus lanatus* (watermelon): pharmacological review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2013, 4(4), 1305-1312.

-
- [6] Saboo, S. S., Thorat, P. K., Tapadiya, G. G., and Khadabadi S., Ancient and recent medicinal uses of cucurbitaceae family, *International Journal of Therapeutic Applications*, 2013, 9, 11-19.
- [7] Biu, A. A., Buratai, L. B., Luka, J., Konto, M., Onwuatogwu, J., and Agada, N. O.. In vitro assessment of trypanocidal activity of aqueous extract of *Citrullus lanatus* (Cucurbitaceae)(Thunb) leaf and its effects on the haematological parameters of *Trypanosoma brucei* infected Albino rats. *Biokemistri*, 2013, 25(3), 127-132.
- [8] Quezel P. and Santa S., *Nouvelle flore de l'Algerie et des régions désertiques méridionales*, Vol. II, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 1963, pp. 894-895
- [9] <http://www.dknews-dz.com/pdf/voir.html?id=1775> ; consulté le 02/12/2018
- [10] Ho, L.-H., Ramli, N. F., Tan, T.-C., Muhamad, N., and Haron, M. N., Effect of Extraction Solvents and Drying Conditions on Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Watermelon Rind Powder. *Sains Malaysiana*, 2018, 47(1), 99-107
- [11] Tlili, I., Hdider, C., Lenucci, M. S., Riadh, I., Jebari, H., and Dalessandro, G. Bioactive compounds and antioxidant activities of different watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansfeld) cultivars as affected by fruit sampling area. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2011, 24(3), 307-314.
- [12] Cowan, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 1999 12(4), 564-582.
- [13] Cemaluk, C. E. A., Comparative investigation of the antibacterial and antifungal potentials of the extracts of watermelon (*Citrullus lanatus*) rind and seed. *EJMP*, 2015, 9(4). 1-7.
- [14] Rahman, H., Priyanka, P., Lavanya, P., Srilakshmi, N., & Kumar, P. R., A review on ethno botany, phytochemistry and pharmacology of *Citrullus lanatus* L. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 2013., 3(2), 77-81.
- [15] Chang S.-T., Wu J.-H., Wang S.-Y., Kang P.-L., Yang N.-S., and Shyur L.-F., *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49 (7), 3420–3424, DOI: 10.1021/jf0100907
- [16] Wang H.; Gao X. D.; Zhou G. C.; Cai, L.; Yao W. B., *Food Chemistry* 2008, 106,

888-895, doi :10.1016/j.foodchem.2007.05.068

[17] Toty, A. A., Guessennd, N., Bahi, C., KRA, A. K. M., Tokore, D. A., & Dosso, M. Évaluation in-vitro de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 2013, 82, 12-21

[18] Abdel-Wahab S. I., Abdul A. B., Zhew K., and Fong, S. Antimicrobial and Free Radical Scavenging activities of the dichloromethane extract of *Goniothalamus umbrosus*. Int. J. Trop. Med, 2009, 4(1), 32-36

[19] Réseau Algérien de Sureillance de la Résistace des Bactéries aux Antibiotiques, Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) Document édité avec la collaboration de l'OMS, 6ème Edition, 2011

[20] Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J. C., and Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. clin. Pathol.*, 1966, 45(4), 493-496.

How to cite this article:

Bennouna A, Labed B and Dendouguie H. In vitro antibacterial activity of chloroform, ethyl acetate and butanol extracts of leaves of *Citrullus lanatus* var. crimson sweet grown in the region of ouargla, Algeria. *J. Fundam. Appl. Sci.*, 2019, 11(2), 1023-1032.