Evalution of Antibacterial Activity of Alcoholic Extract of *Zingiber officinale* against *Streptococcus mutans*

تقييم الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل ضد بكتريا *Sterptococcus mutans*

ازهار راقب كاظم الفتلاوي أ.م.دهيام عبد الرضا العواد
قسم علوم الحياة ، كلية التربية للعلوم الصرفة ، جامعة كربلاء ، كربلاء- العراق

بحث مستل

الخلاصة :

هدفت هذه الدراسة الى معرفة تأثير المستخلص الكحولي المثيلي لنبات الزنجبيل *Zingiber officinale* وبتراكيز مختلفة في تثبيط نمو بكتريا *Streptococcus mutans* مختبريا والمعزولة من المرضى المصابين بتسوس الاسنان والتهابات ماحول الاسنان ولتحقيق هذا الهدف فقد استخدمت طريقتين لاختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل هما:طريقة الانتشار بالحفر well diffusion وبالتراكيز التالية (12.5, 25 , 50 , 100 ,150) ملغم /مل وقد ابدى المستخلص الكحولي تأثيرا تثبيطيا ضدالعزلات البكتيرية وكانت اقطار التثبيط (7.6 , 13.3 , 15.3 , 19 , 23) ملم على التوالي اما الطريقة الثانية هي طريقة الصفائح الدقيقة Microtiter, plate 96well وبالتراكيز (, 25 , 50 , 100 , 150 6.25 , 12.5) ملغم/مل وكان التركيزالمثبط الادنى MIC (12.5) ملغم/ مل واظهرت الدراسة ان تأثير المستخلص كان اكبر من تأثير المضاد الحيوي Ampicillin 32% .

الكلمات المفتاحية : الزنجبيل ، الفعالية التثبيطية ، *Streptococcus mutans*

Summary

this study was carried out to investigate the effect of methanolic extract of *Zingiber officinale* in different concentrations in inhibition of *Streptococcus mutans* isolated from cases of dental caries and periodontitis to achieve this aim this study included two methods: well diffusion method with concentrations (12.5,25,50,100,150) mg/ml .The crude extract gave activity against the tested isolates by the inhibition zones (7.6,13.3,15.3,19,23) mm ,the second method was Microtiter plate 96well with concentrations(6.25,12.5,25,50,100,150).The MIC was (12.5) .The results showed that the *Zingiber officinale* have activity larger than the antibiotic Ampicillin 32%.

Key words:*Zingiber officinale* , antibacterial activity,*Streptococcus mutans*.

المقدمة :

تلعب النباتات الطبية دورا مهما في علاج العديد من الامراض وتكمن الفائدة الطبية لهذه النباتات في بعض مكوناتها الكيميائية والتي تؤدي دورا فسولوجيا في جسم الانسان ويعد الزنجبيل احداها[1]، ويعد العالم Linnaeus اول من وصف هذا الجنس وسماه وحسب له 85 نوع ويعد النوع *Zingiber officinale* اشهرها واكثرها استعمالا وان العالم William Roscoe وصف هذا النوع عام 1807 واعطاه الاسم الذي بات يعرف به لحد الان [2].

يعود الزنجبيل الى العائلة الزنجبيلية *Zingiberaceae* والتي سميت بأسمه نظرا لأهميته وهو نبات حولي معمر ذو ازهار خضراء مصفرة وجذور درنية وسيقان منتصبة القامة وتكثر زراعته في الصين والهند وجنوب شرق اسيا وغرب افريقيا[3]، ويختلف الزنجبيل حسب المناطق التي يزرع بها فالزنجبيل في نيجيريا غامق اللون صغير الحجم وذو طعم لاذع وزنجبيل افريقيا غامق اللون وذو طعم لاذع اكثر واقل نكهة من زنجبيل جامايكا ، ويتكاثر الزنجبيل بطريقة التبرعم حيث تقطع البراعم وتزرع في تربة طينية غزيرة السقي ويحتاج الى مناخ دافئ ورطب لنموه [4].

تتلخص فوائد الزنجبيل في القدرة على تقوية الذاكرة والنظر وعلاج الصداع وبحة الصوت وتنقية الحنجرة والقصبات الهوائية وعلاج السعال وطرد البلغم وتدفئة الجسم من نزلات البرد وتخفيف التوتر العصبي وتهدئة الامعاء وازالة الامساك والتقليل من اضطرابات الجهازالهضمي [5].

كما ان للزنجبيل تأثير مضاد للعديد من الاحياء المجهرية خاصة البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام ومن ضمنها بكتريا *S.mutans* حيث اشار [6] الى تأثيره على انزيمات GTFs التي تحفز تكوين الكلوكان غير الذائب والذي يؤدي دورا مهما في التصاق بكتريا *S. mutans* على سطوح الاسنان وذلك من خلال تأثيره على حموضة السايتوبلازم وبالتالي اعاقة العمليات الفسيولوجية داخل الخلية البكتيرية.

ونظرا للفائدة الصحية للزنجبيل والتي تعود الى احتوائه لعدد من المركبات الكيميائية الفعالة منها الزيوت الطيارة ومركبات غير طيارة مثل gingerols , shoagols, paradols ، لذلك اجريت هذه الدراسة والتي تهدف الى تقييم الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل ضد بكتريا *Streptococcus mutans* المسببة لتسوس الاسنان وبالتالي استخدامه كبديل علاجي بدلا من المعاجين والغسولات الفموية ذات التأثيرات الجانبية الضارة بصحة الانسان.

طريقة العمل:

العزلات البكتيرية

تم الحصول على (18) عينة من الجرثومة السبحية *S.mutans* من (75) عينة للمرضى المصابين بمرض تسوس الاسنان والتهابات ماحول الاسنان وتم اختيار ثلاث عزلات بكتيرية بهدف اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل.

تحضير المستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل

حضر المستخلص بأذابة (200) غم من رايزومات نبات الزنجبيل في (1000) مل من كحول الميثانول بتركيز 95% لاختبار حساسية العزلات البكتيرية وكذلك تأثيره على تكوين الغشاءالحيوي (Biofilm).

نقع الزنجبيل بالميثانول لمدة 24 ساعة وفي اليوم التالي نقل المنقوع الى حاويات زجاجية معقمة ووضعت في حاضنة هزازة بدرجة حرارة الغرفة لمدة24ساعة وبمعدل 150 دورة/دقيقة ،رشح المستخلص بواسطة عدة طبقات من الشاش الطبي المعقم ثم بأوراق ترشيح Whatman No.1 وصب في اطباق زجاجية معقمة وترك بدرجة حرارة الغرفة ليجف [7]

وتم تحضير التراكيز اللازمة للكشف عن التركيز المثبط الادنى بطريقة الانتشار بالحفرwell diffusion حيث وزن 1.5 غم من مستخلص الزنجبيل (الباودر) واضيف له 10 مل من كحول الميثانول 95% فتم الحصول على 150ملغم/مل من المحلول الخزين Stock solution ثم عبئ في قناني معتمة بدرجة 4C° .

حضرت التراكيز(12.5, 25 , 50 , 100, 150) ملغم/مل من المحلول الخزين اللازمة لاختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي للزنجبيل [8] وكما يلي:

1.سحب (3ml)من المحلول الخزين لتحضير تركيز(150 mg/ml)
2.سحب (2ml)من المحلول الخزين واضيف له (1ml)من كحول الميثانول 95% لتحضير تركيز (100mg/ml).
3.سحب (1ml)من المحلول الخزين واضيف له (2ml) من كحول الميثانول 95% لتحضير تركيز (50 mg/ml).
4.سحب (0.5ml) من المحلول الخزين واضيف له (2.5ml) من كحول الميثانول 95% لتحضير تركيز(25 mg/ml).
5.سحب (0.25ml) من المحلول الخزين واضيف له (2.75ml) من كحول الميثانول 95% لتحضيرتركيز(12.5mg/ml).
6.سحب (0.125ml) من المحلول الخزين واضيف له (3ml) من كحول الميثانول 95% لتحضير تركيز (6.25mg/ml).

وتم تحديد التركيزالمثبط الادنى MIC للكشف عن الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل ضد الجرثومة السبحية *S.mutans* بأستخدام طريقتين هما طريقة الانتشار بالحفر وهي كالتالي:

1.خففت العزلات بالمحلول الفسلجي للوصول الى عكورة انبوبة ماكفرلاند القياسية 0.5
2.نشرت بواقع(100مايكروليتر) لكل طبق بواسطة مسحات قطنية معقمة وتركت 15دقيقة لغرض الامتصاص.
3.استخدم ثاقب فليني لعمل ثقوب قطرها (6 ملم) على سطح الاكار المزروع ثم ملئت كل حفرة بواقع (50مايكروليتر) من كل تركيز من التراكيزالتالية(25,12.5 , 50 , 100 , 150) ملغم/مل وبمعدل حفرة لكل تركيز مع حفرة للمضاد الحيوي Ampicillin 32% كسيطرة موجبة وحفرة لكحول الميثانول 95% كسيطرة سالبة ولمدة 24 ساعة وحضر بمعدل ثلاث مكررات لكل تركيز.
4.حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37C° ولمدة 24 ساعة .
5.قيست مناطق التثبيط حول الحفر وقورنت مع معامل السيطرة الحاوي على كحول الميثانول 95% [9,10]

اما الطريقة الثانية فهي طريقة الصفائح الدقيقة Microtiter plate 96 well وهي كالتالي:

1- عدلت عكورة العالق البكتيري بالمقارنة مع انبوبة ماكفرلاند القياسية 0.5 بالعين المجردة.
2- حضرت التراكيز التالية من مستخلص الزنجبيل (6.25، 12.5، 25 ، 50 ، 100، 150) ملغم/مل وتم تعقيم كل منها بالمرشحات الغشائية الدقيقة بقطر 0.45 مايكرون.
3- وضع (180مايكروليتر) من Muller hinton broth في كل حفرة ثم وضع (10مايكروليتر) من المستخلص و(10 مايكروليتر) من العالق البكتيري وحضنت الصفيحة لمدة 24ساعة بدرجة حرارة 37C° وحضر بمعدل مكررين لكل تركيز بالاضافة الى استخدام المضاد الحيوي Ampicillin 32% حيث حضرت حفرة للسيطرة الموجبة تحتوي على Ampicillin وحفرة للسيطرة السالبة تحتوي على كحول الميثانول95% [11] .

النتائج والمناقشة

طريقة الانتشار بالحفرwell diffusion

يوضح الجدول (1) مناطق التثبيط للمستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل ضد الجرثومة السبحية *S.mutans* حيث اعطت السيطرة الموجبة المتمثلة بالمضاد الحيوي Ampicillin %32 منطقة تثبيط (17) ملم بينما اعطت السيطرة السالبة المتمثلة بالميثانول 95% (1.3) ملم والذي لايعد تثبيط ملحوظ كما اظهرت النتائج ان مناطق التثبيط تراوحت مابين (23-7.6) ملم مما يدل على انخفاض معنوي في اعداد البكتريا وهذا يشير الى ان جميع العزلات حساسة للمستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل.

جدول (1) اقطارمناطق التثبيط للمستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل ضد الجرثومة السبحية *S.mutans* .

التراكيز(ملغم/مل)	قطر مناطق التثبيط(ملم)
150	23
100	19
50	15.3
25	13.3
12.5	7.6
Control-	1.3
Control+	17
قيمةL.S.D (0.05)	1.7924

اعطت التراكيز(150,100,50,25,12.5) ملغم/مل مناطق تثبيط (23,19,15.3,13.3,7.6) ملم على التوالي ممايدل على ان الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي تزداد بزيادة التركيزحيث كلما زاد التركيز زادت نسبة المواد الفعالة فيه وبالتالي فأن قابلية المستخلص على تثبيط او ابادة الجراثيم تكون اكبر وهذا يتفق مع [12,13] في حين يخالف ماذكره الباحث[14] الذي لم يجد تأثير للمستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل على البكتريا الموجبة لصبغة غرام والذي عزى ذلك الى ان المستخلص فقد فعاليته بسبب استخدامه بعد شهر من تحضيره.

ان تأثير المستخلص قد يعود سببه الى التركيب البنائي لجدار البكتريا الموجبة لصبغة غرام اذ تفتقر الى طبقة من الاغشية الخارجية تجعل نفاذية المواد الى داخل الخلية اكبر، ومن خلال النتائج يعد النبات فعال ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام وهذا مايتفق مع الباحثين [15]و [16] وذلك بتثبيط تكوين جدارخلية الكائن المجهري اوتثبيط تخليق بعض البروتينات الاساسية فيه وتكوين معقدات مع الجدار الخلوي تعيق انتظام النفاذية وتثبيط بعض الانزيمات ذات الدور الايضي المهم في النمو والتكاثر وتمزيق الاغشية الخلوية اوتغيير وظيفتها.

2- طريقة الصفائح الدقيقة Microtiter plate 96 well

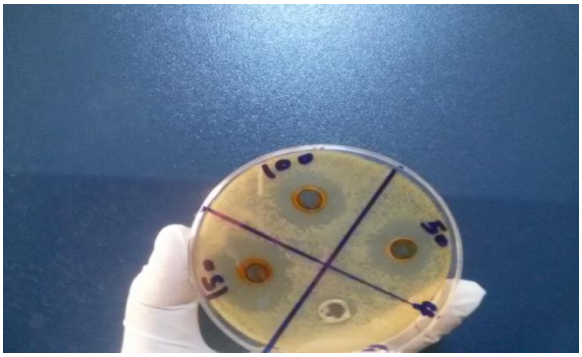
استخدمت مجموعة التراكيز(150,100,50,25,12.5,6.25) ملغم/مل في اختبارMIC بطريقة Microtiter plate 96 well واوضح الاختبار ان التركيز المثبط الادنى كان عند التركيز (12.5) ملغم/مل حيث لم يلاحظ نمو للجرثومة السبحية *S.mutans*. (جدول 4-5)

جدول (4-5) التركيز المثبط الادنى بطريقة Microtiter plate

التركيز(ملغم/مل)	النمو
150	-
100	-
50	-
25	-
12.5	-
6.25	+
Control+	-
Control-	+

من المعروف ان نوعية المذيب تؤثر على درجة الفعالية التثبيطية للمستخلص وبما ان الميثانول مذيب عضوي لذلك فهومذيب كفؤ في اذابة المركبات العضوية الموجودة في النبات الطبي وبالتالي فأنه يركز المواد الفعالة المطلوبة لأبادة الجراثيم [17]، من المواد الفعالة في نبات الزنجبيل Zingerone،gingerols،shogaoles،volite sesquiterpenes،monoterpenoids والتي تعد هي المسؤولة عن ابادة الجراثيم [18] ، حيث ان gingerols وهو احد المركبات الفينولية يعمل على خفض الشد السطحي لجدار الخلية البكتيرية لذلك فأن gingerols وبقية المركبات الفينولية الاخرى تمزق الجدار الخارجي للخلية ونتيجة لذلك يحدث فقدان الخاصية التنافذية للغشاء وبالتالي فقدان السيطرة على التنافذ وتسرب محتويات السايتوبلازم بما في ذلك الاحماض النووية ونواتج الايض والايونات ، بالاضافة الى ان التربينات مسؤولة عن تمزيق الغشاء البلازمي وتلف محتويات الخلية وكذلك تأثير حامض الخليك في خفض الاس الهيدروجيني داخل الخلية مما يسبب

تحلل البروتينات وفقدان الطاقة وترسيب محتويات الخلية [19] وهذا يتفق مع ماتوصل اليه [20] الذي اشار الى امتلاك المستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل فعالية عالية في تثبيط البكتريا الموجبة لصبغة غرام.



شكل (2) يوضح تثبيط المستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل ضد بكتريا *S.mutans* وبتراكيز مختلفة لفحص MIC

المصادر:

1. **Kumar**,G.;Kathie,L. and Rao,K.V.B.(2011).Areview on pharmacological and phtochimical properties of *Zingiber officinale* Roscoe (*Zingiberaceae*),*J. of pharma. Res.*, 4(9):2963-2966.
2. **Foster**,S.(2000).Ginger your food is your medicine.Steven Foster group
3. **McGee** and Harold.(2004).On Food And Cooking:The Science And Lore Of Kitchen ,2nd.Edn.,Scribner:425-426.
4. **Ali**,M.(1998).Text Book Of Pharmacognocy,2nd.Edn.CBS publishers and distributors:258-262.
5. http://fashion.azyya.com/639.HTML.
6. **Sadaf**,H.;Mohd,D. and Asad,U.K. (2015).Inhibitory effect of *Zingiber officinale* towards *Streptococcus mutans* virulence and caries development:*in vitro* and *in vivo* studies. *BMC Microbiol*.15:1.
7. **Nelson**,C.A.and Reginald,A.O.(2007).Antimicrobial properties of extracts of *Allium cepa* (Onions) and *Zingiber officinale* (ginger) on *Escherichia coli* ,*Salmonella typhi* and *Bacillus subtilis* .*The int. j. of trop. med.*3(2).
8. **الدعمي**، علاء عبد الحسين (2014) تنقية وتوصيف حامض الكوجيك المنتج من عزلتين محليتين (Aspergillus fumigates) و (Aspergillus flavus) اطروحة دكتوراه ،كلية التربية ،جامعة القادسية
9. **Perez**,C.;Pauli,M.and Bazerque,P.(1990).An antibiotic assay by the agar-well diffusion method .Acta Biologiae et Medicine Experimentalis ,15:113-115
10. **Chessbrough**,M.(2000).District laboratory practice in tropical countries .Part 2ed.Cambridge university press,United kingdom,222.
11. **Christenfen**,G.D.; Simpson,W.A.; Younger,J.A.; Baddour,L.M.; Barrecc,F.F.and Melton,D.M.(1985).Adherence of coagulase negative Staphylococci to plastic tissue culture plate:quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical dvices.J.Clin.Microbiol.22:996-1006.
12. **Al-bayati**,F.A. and Sulaiman,K.D.(2008).*In vitro* antimicrobial activity of salvadora persical against some isolated oral pathogens in Iraq.*Turk.J.Bi* 32:57-62.
13. **Eid**,M.A;Selim,H.A.and Al-Shammery,A.R.(1990).The relationship between chewing sticks(Miswak) and periodontal health.Part.I.Review of the literature and profile of the subjects.*Quintessence.Int.* 21:013-917.
14. **Almas**,K.(2001).The antimicrobial effect of seven different types of Asian chewing sticks .*Odonto-Stomatologie Tropicale* 96:17-20.
15. **Cowan**,M.M.(1999).Plant products as antimicrobial agents.Clin.microbiol.Rev.,12(4):564-582.
16. **Tyler**,V.E.;Lynn,R.B.andJames,E.R.(1988).Pharmacognosy.9th ed.Lea and Febiger,Philadelpha.
17. **Ekwenye**,U.N.and Elegalam,N.N.(2005).Antibacteria activity of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) and garlic(*Allium sativum* L.)extracts on *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* .*J. of molec. and med. and advance. Scien.* ,1(4):411-416.
18. **Bensky**,D.and Gamble,A.(1993).Chinese Herbal Medicine Materica Medica.Eastland Press Inc,Seattle.
19. **Oonmetta-Aree**,J.;Tomoko,S.;Piyawan,G.and Griangsak,E.(2006).Antimicrobial properties and action of Galangal(Alpinia Galanga Linn) on *Staphylococcus aureus*.LWT-Food Sci.Technol.,39:1214-1220.
20. **Masniari** ,P.(2011).The effect of red ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extract on the growth of mastitis causing bacterial isolates .Indonesian research center for Veterinary Science .