الفعالية المايكروبية لمستخلصات ثمار نبات الفلفل الاسود المجففة

إيناس عبد الهادي
قسم علوم الحياة،كلية التربية-ابن الهيثم،جامعة بغداد

الخلاصة

استخلصت مركبات خام من ثمار نبات الفلفل الاسود الجافة *piper nigrum* بوساطة جهاز الاستخلاص وباستعمال الكحول الايثانولي 95% تارة والماء تارة اخرى مذيبا".

اختبرت فعالية المستخلصات وبتراكيز مختلفة على 32 عزلة بكتيرية جمعت من مرضى وافدين الى مستشفى ابن البلدي،شخصت على انها تعود الى ثلاثة اجناس بكتيرية هي *E coli* و *pseudomonas* spp, *proteus* spp, اعطى المستخلص الكحولي فعالية واضحة في العزلات البكتيرية، في حين لم تظهر النتائج اي فعالية للمستخلص المائي ،كما اظهرت النتائج ان جميع العزلات كانت لها حساسية عالية للمضادين Impinene , Norfloxacin ومقاومة للمضاد Amoxcillin، في حين تحسست جميع العزلات للمستخلص الايثانولي.

المقدمة

اهتم الباحثون مؤخرا" بالكثير من النباتات الطبية او الاقتصادية لما ثبت عنها من اهمية مستخلصاتها في التطبيقات الحياتية المختلفة. ومن بين تلك النباتات،الفلفل الاسود Black pepper ،اذ يتمتع باهمية طبية وعلاجية لا تقل عن اهميته الاقتصادية لانه احد النباتات الرئيسة في صناعة التوابل هذه الدراسة هدفت الى تقييم فعالية ثمار نبات الفلفل الاسود المتوافرة محليا" .

تعد الهند الموطن الاصلي للنبات، كما ينتشر في كل من فيتنام، واندنوسيا، وسنغافورة، والبرازيل، وماليزيا، وغيرها التي تعد الدول المصدرة له بصورة رئيسة (1) وتعد فيتنام حاليا" اكبر دولة في العالم منتجة ومصدرة لنبات الفلفل الاسود (2)والنبات الكامل معمر ، ومتسلق وينمو بصورة طبيعية.وتمتاز ثماره بالطعم الحاد (الحار) الذي يعزى الى مركب اسيد امبد (charine) وهو مركب قلوبدي يوجد في الثمار بنسبة اقل من 1% كما تحوي الثمار على عشرة اضعاف هذه الكمية من شبه جزيئي للمركب يعرف ب (piperine) الذي يشارك في اعطاء الثمرة الرائحة القوية الخاصة بها ،فضلا" عن احتوائها على (1-2.6 %) من الزيوت الطيارة، وتشأ بنسبة 50%، وزيوت ثابتة بنسبة اقل من 1% وعدد من المركبات الاخرى غير المعروفة (3) وقد فصل قلوبد piperine من قبل Ikan من ثمار الفلفل عام 1969 (4) (5)

ذكرت الفعالية البايولوجية لمستخلصات ثمار النبات الجافة الكاملة النمو غير الناضجة قديما" وحديثا" ،فقد وصفت في كتب الاقدمين لعلاج الكثير من الامراض الفسيولوجية او الناتجة عن مسبب مرضي معين،سواء باستعمال النبات لوحده او مع نباتات ومواد اخرى فقد وصفه العشابون القدامى منبها" وخافضا" للحرارة وكذلك لمعالجة hemorr hoids, runny nose ,diarrhea, gastric aliment,chronic indigestion, as thma وغيرها (6) (7) (8).

اما حديثا" فتشير البحوث الى اهمية piprine في ثمار الفلفل الاسود في فعاليتها المضادة مثل Antioxidant , Antideresats (9) كما ثبت استعماله كمانعا" لانتشار الخلايا السرطانية مخبريا" (10) .كما اختبرت فعالية

المستخلص الايثانولي لثمار النبات تجاه الادوار غير الكاملة لبعوض Culex quing uefosciatus واعطت نتائجا" جيدة وبتراكيز قليلة جدا" مما يثبت فعاليته كمضادا" للحشرات (antisediside) (11)

اما عن فعاليته ضد الاحياء المجهرية فقد توصل (12) الى ان ثمار النبات لها القدرة على قتل العديد من الانواع البكتيرية التي تسبب فساد الغذاء بفوق بنسبة 25% مما يسبب الثوم والبصل وغيرها من المواد التي تستعمل لحفظ الغذاء لذلك يمكن حفظ الغذاء طازجا" وصحيا".

اما عن تصنيف النبات فهو وفقا" لنظام التسمية الثنائية (13) Binomenal system الى:-

Kindom : plantae
Division : Magnoliophyta
Class : Magnoliopsida
Order : piperales
Family : piperaceae
Genus : piper
Species : P. nigrum

ومن ناحية اخرى فهو يصنف طبقا" لكمية المواد الطبيعية فيه ولكل ملعقتي شاي 2.tsp اي ما يساوي (4. 28gm) ومن المواد (Iron, magnese, vitamin K, dietary fiber, calories) الى ثلاثة اصناف (ممتاز،جيد جدا"،جيد) كما في الجدول رقم (1) (14)

طريقة العمل

مصدر العينة النباتية :

أ.تم شراء 750 غم من ثمار نبات الفلفل الاسود من محل عطارية متخصص في بغداد بتاريخ 2008/3/10

ب.تم التحقق من الاسم العلمي للنبات قيد الدراسة من استاذ تصنيف متخصص وحفظ قسم من العينة في المعشب

جـ.نظفت الثمار جيدا" من الشوائب وسحقت باستخدام Blender كهربائي وحفظت بكيس نايلون لغرض الدراسة

طرائق الاستخلاص

استعملت الطرائق الاتية لاستخلاص المكونات الكيميائية لثمار النبات :-

أ.طريقة الاستخلاص الكحولي :-

حورت طريقة (sato et al.2000) (15) للاستخلاص،بوزن 20 من مسحوق ثمار النبات .وذلك بوضعها في كشتبان thumble في جهاز الاستخلاص المستمر (Soxhlet apparatus) باستعمال الكحول الاثيلي (150) مل مذيبا" استمرت عملية الاستخلاص لثلاث ساعات بدرجة حرارة (60) م° .بعدها رشح المستخلص المتجمع في دورق الاستخلاص باستخدام نظام الترشيح miliporfilter ،جفف المستخلص وجمع بأنابيب معقمة وبدرجة حرارة (37) م حفظ لحين الاستعمال.

ب.طريقة الاستخلاص المائي البارد :-

اتبعت الخطوات اعلاه بوزن 20 غم من مسحوق النبات ونقعها في (150) مل من الماء المقطر المعقم مدة (48) ساعة مع الرج المستمر واكملت الخطواتنفسها للترشيح للحصول على المستخلص .

ج.طريقة الاستخلاص المائي الحار:-

اعتمدت خطوات (أ) اعلاه،لكن باستعمال الماء المقطر المعقم (150) مل كمذيبا" بدرجة حرارة (100) م° واكملت نفس الخطوات للترشيح للحصول على المستخلص.

حفظت جميع النماذج المتجمعة من طرائق الاستخلاص بأوعية زجاجية معقمة وبدرجة حرارة (4) م° لحين الاستعمال

مصدر العينات البكتيرية

تم الحصول على 32 عزلة بكتيرية مشخصة معزولة من براز مرضى بالغين وافدين لمستشفى ابن البلدي ببغداد خلال (حزيران وتموز) لعام 2008 وبواقع 23 عزلة لبكتريا *E coli* و 6 عزلات *Proteus* spp و3 عزلات *Psuedomonas* spp اجريت بعض الاختبارات البايوكيميائية Biochemical test للتحقق من اجناس العزلات في المختبر .

اختبار فعالية المستخلصات تجاه العزلات

حضرت تراكيز قياسية من المستخلصات النباتية (الكحولية–المائية (الحارة والباردة)) وكما يأتي: –

أ. المستخلص المائي: وزن 1 غم من المستخلص واذيب في 1 مل من ماء مقطر معقم.

ب. المستخلص الكحولي: حسب طريقة (Deshmukh & Bovle 1975) (16) وزن (2) غم من المستخلص واذيب في (1.5) كحول 95 %واكمل الحجم الى (5) مل بماء مقطر معقم،اي 400 ملغم/مل

عدّت المحاليل اعلاه محاليل قياسية stock solution حضرت منها التخافيف 200ملغم/مل ،

100 غم /ملغم ، 40 ملغم/مل .

اعتمدت طريقة (Miles and Amyes ,1996) (17) لاختبار فعالية المستخلصات اعلاه وذلك بنشر (100) مايكروليتر من المزروع البكتيري (1-5x16cful/ml) نمى مدة (18) ساعة وزعت اقراص ترشيح معقمة ومغمسة بالتراكيز للمستخلصات اعلاه، مع عمل سيطرة control تتضمن محاليل الاذابة .

تركت الاطباق في الثلاجة مدة نصف ساعة لضمان انتشار المستخلص في الوسط الزرعي حضنت في 37 م لمدة 18 ساعة حسبت اقطار مناطق التثبيط بطرح (المعاملة–السيطرة)اجرينا التجربة وبواقع ثلاثة مكررات ثم حللت النتائج احصائيا".

*اختبار حساسية العزلات البكتيرية تجاه المضادات الاحيائية .

اعتمدت طريقة (WHO,1991) (18) في الفحص واجراء الاختبار لحساسية العزلات البكتيرية المستعملة تجاه المضادات :

Rifampin 5 mcg, Piperacillin 100mcg, Imipenen 10mcg,
Gentamycin 10mcg ,Amoxcillin 25mcg, Norfloxacin 10mcg ,chloramphenicol 30mcg,

حسبت اقطار مناطق التثبيط لغرض المقارنة مع المستخلصات وحللت النتائج احصائيا".

النتائج والمناقشة

تشير النتائج الى فعالية المستخلص الكحولي لنبات الفلفل الاسود ضد جميع العزلات البكتيرية المستعملة قيد الدراسة والبالغ عددها 32 عزلة بكتيرية كما هو مبين في جدول (2)،اذ اظهرت فعالية المستخلص الكحولي الخزين stock solution ضد جميع العزلات البكتيرية اي تركيز 400 ملغم /مل، وتركيز 200 ملغم/مل و100 ملغم/مل، 40 ملغم/مل كما هو موضح في الشكل (2) هذه النتائج تتسجم مع ما توصل اليه (12),(19),(20) من وجود فعالية بايولوجية للمستخلص الكحولي لنبات الفلفل الاسود ضد البكتريا والخمائر والفطريات كذلك تتسجم مع ما توصل اليه (21) من فعاليته ضد 6 انواع من البكتريا المسببة لتلف وفساد الاغذية .

من جهة اخرى لم يظهر المستخلص المائي لنبات الفلفل الاسود اي فعالية ضد العزلات المستعملة تتسجم هذه النتيجة مع ما ذكره (22) الا ان (23) اكد وجود فعالية للمستخلص المائي لهذا النبات ضد عزلة *S.aureus* المقاومة

للبنسلين G ،كذلك ضد عزلة *Bacillus subtilis, Bacillus cerus* كما ذكر(24) ويعزى هذا التباين في النتيجة الى اختلاف طرائق الاستخلاص للمواد الفعالة في النبات واختلاف نوعية الفلفل الاسود المستعمل كما موضح في جدول

رقم (1) ومدة خزن النبات تؤثر في نوعيته (25) علما" ان كثير من المواد في الاسواق المحلية لا تخضع الى الرقابة الغذائية في مركز التقييس والسيطرة النوعية حاليا".

اما عن حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الاحيائية Antibiotics فقد اظهرت حساسيتها لـ 6 انواع منها من اصل 7 انواع مستعملة في بحثنا هذا كما هو موضح في جدول (3) والشكل (3)،اذ سجل كل من المضاد Impineine , Norfloxacin اعلى تحسسا" ثم المضاد الاحيائي chloramphenicol ويتسجم ذلك مع ما توصلت اليه دراسة محلية حديثة لعزلات مرضية من العيون (26) يليها في التاثير Gentamycin,pipercillin ثم Rifampcin في حين لم تظهر العزلات البكتيرية اي تحسس تجاه المضاد الاحيائي amoxicillin . ان هذه النتيجة تشجع على استعمال المستخلص الكحولي لنبات الفلفل الاسود بدلا" من المضادات الاحيائية،ويعزى الباحثون فعاليته الى وجود مركب piperine حيث ان له فعالية بايولوجية تعزى له فعالية التوابل (4),(5),(12),(19),(20),(21),(23),(27) وكما ذكرنا ان ذلك يشجع على استخلاصه وتنقيته واستعماله في مجالات الطب البديل عن المضادات الاحيائية Antibiotics التي اكتسبت العديد من العزلات البكتيرية صفة المقاومة لها .

المصادر

1-Jones,F.A.(1996) Herbs-useful plants .their role in History and today. Europan of Gastroen terology and Hepatology 8: 1227-1231.

2-Jaffee, steven (2004) Delivering Taking the heat:Indian spices.

3-Harbon ,J.B.(1976). Phyto chemical method. Aguide to modern techniques of plant analysis, Halsted press, John wiley and sons.New york 278pp.

4-Harbone,J.B. (1973) phyto chemical methods. Chaphan and all Itd. London-New yorkpp.192.

5-Ikan,R.(1969). Natural products,A.Lab.guide,pp.178-260,Academic press, London.

6-Dorman HJ,Deans SG. (2000).J.App.Micro. Feb; 88 (2) : 308-160 PMID :1639

7-Ravindran PN . (2000) Black pepper : piper nigrum . Series: Medicinal and Aromatic plants-Industrial profiles . ISBN-I stock CRCpress, pp . 1-526.

8-Aop, Hus and Zhao AL (1998) . L.Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 23 (1): 42-3, 63.

9- Jiro retz, L.; Buch bauer, G.; Ngassoum M.B.; Geissler, M. (2002) , App. Micro biology 34,477-480

10- Hood, J.R.,Wilkin, J.M.; Cavangh, M.A. (2003),J.M.M. 15: 423-433

11- Mehdi, N.S. (2005) :. Tikrit J. of pure science , 10 , 2 .

12- Pino ,J.A.;Marbot, R.; Rosado , A.; Bastista , A.,(2004) J. Agric .. Food chem. .16 (3): 186-188

13-الموسوي،علي حسين عيسى (1987) علم تصنيف النبات ،كلية العلوم-جامعة بغداد الطبعة الاولى ،وزارة التعليم العالي والبحث العلمي-جامعة بغداد .

14- Calucci, L.Pinzino, C. Zandomeneghi,M . (2003) ,J. chem. Feb 12; 51 (4): 927-34 .

15- Sato, J. ; Goto .K; Nanjo, F.; Kowai; S. Murata K. (2000) J.Biosci. Bioeng, 90 (4): 442-446.

16- Deshmkh,S.D.,Borle,M.N. (1975).J.Ent., 37 (1): 11-18 .

17-Miles,R.S. and Amyes,S.G.B. (1996) . Labrotory control of antimicrob. Therapy .151-176 In practical Medical Micro-bioagy edit by J.G, college , A.G. Feaser , B.p Marmion and

A.Simmons .14th ed . Internation al student Edition Mackie and Mccaartney, Churchill living stone.
18- WHO, (1991) . Basic Laboratory procedures In clinica Bacteriology .Geneva.
19- Dorman HJD and Deans SG (2000).J. Applied Microbio logy 88 (2) :308

20- Chaudhry, NAZIA MASOOD AHMED ¥ Perween Tariq (2006) Bactenicdal activity of black pepper, Bayleaf,aniseed ¥ coviander against oral isolates, Depart. Of Micro . Univer. Of Karachi ,Karachi-75270 . Pakistan.
21-QutaraB, Simard RE,Holley RA, Piette GJP and Begin A (1997) .International Journal of Food Microbiology, 37 : 155-162 .
22- Madabhushi, Anirudh G. (2005) Project N.J 1321 California state acience Fair .
23-Pere, Z. C. and Anesini, C. (1994) . Antibacterial activity of Alimentary plants against Staphlococcus aureus grwth. Am. J.chin . Med., 22: 169-174.
24-Singh G, Marimuthu P, Murali Hsand Bawa AS (2005).. J. of food Safety. 25 (2) : 130
25-Shama, Arun,S.Gautam and S.S.Judhar (2000) spice
26-A-JIbrahim,S.A.M.AL-Hadaria and M.A.Fayidh (2008) Bacterial Contamination of Eduction-Ibn AL-Haitham, University of Baghdad. Department of Biology,college of Education Ibn-AL-Haitham.
27-Khajuria, A.; Thusu, N. and Zutshi, U. (2002) ,phytomedicine, 9 (3): 224-31

جدول (1): تصنيف نبات الفلفل الاسود حسب المواد الطبيعية المتوافرة فيه

Black pepper **2.00 tsp** **4.28 grams** **10.88 calories**						
Nutrient	**Amount**	**DV (%)**		**Nutrient Density**		**Worlds Healthiest Foods Rating**
manganese	0.24 mg	12.0		19.9		Excellent
Vitamin K	6.88 mg	8.6		14.2		Very good
iron	1.24 mg	6.9		11.4		Very good
Dietary fiber	1.12 mg	4.5		7.4		Good

Worlds Healthiest Foods Rating	**Rule**					
excellent	Dv >=75%	OR	Density >=7.6	AND	Dv >=10%	
Very good	Dv >=50%	OR	Density >=4.3	AND	Dv >=5%	
good	Dv >=25%	OR	Density >=1.5	AND	Dv >=2.5%	

Diaty value =DV

جدول (2): عدد ونسب البكتريا المعزولة

Bacterial isolates	No.of isolates	Percentage %
E coli	23	71.8
Proteus spp .	6	18.7
Pseadomonas spp	3	9.3
Total no.isolates	32	%100

جدول (3) حساسية البكتريا المعزولة للمضادات الاحيائية

Antimicrobial Agents	E coli 23*	Proteus spp. 6*	Pseudomonas spp 3*
Imipenem	100 (23)	100 (6)	100 (3)
Piperacillin	2.07 (9)	33.3 (2)	100 (3)
Rifampin	0 (0)	0 (0)	100 (3)
Chloramphenicol	60.8 (14)	33.3 (2)	100 (3)
Norfloxacin	100 (23)	100 (6)	100 (3)
Amoxicillin	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Gentamycin	52.1 (12)	33.3 (2)	33.3 (1)

*Total number of bacterial isolates .
** percentage of Sensitivity isolates from total number

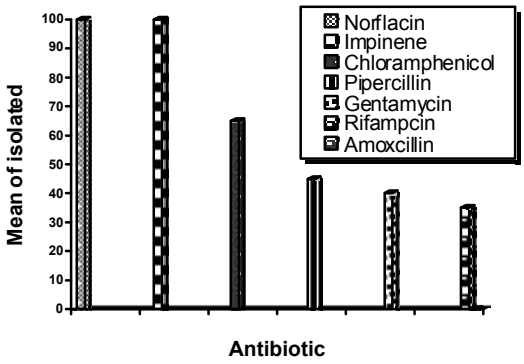

Fig.3: Comparison between low & high percentage for antimicrobial sensitivity of negative bacterial isolated

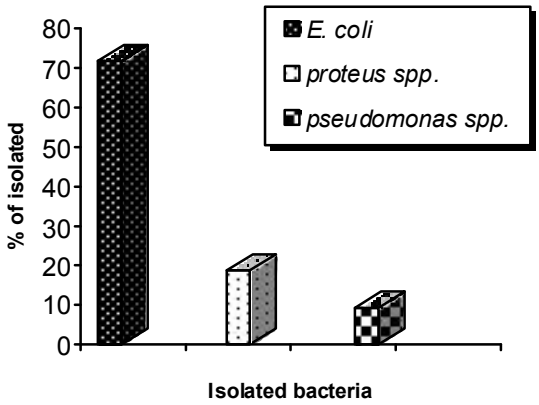

Fig.1:Precentage of bacterial isolates

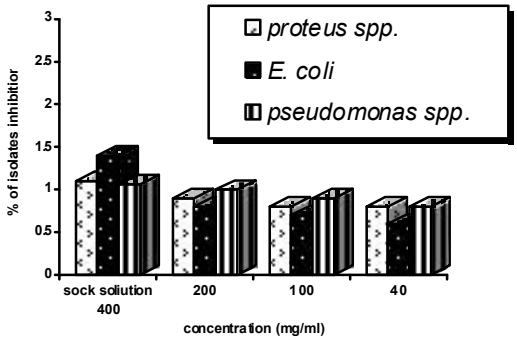

Fig.2:Comparison between low & high concentration of Peper nigrum alcohol extract

IBN AL- HAITHAM J. FOR PURE & APPL. SCI VOL.22 (2) 2009

Antibacterial Activity of *Piper Nigrum* Dried Fruit Extract

E. A. Hussen
Department of Biology, College of Education Ibn Al-Haitham
University of Baghdad

Abstract

Crade extract of dried fruit *piper nigrum* was made by useing sexhdet for three hours.The dried material was extracted with 95% ethanol and water as solvent.

A test was made to the extract effect in certain concentration to 32 Gram of negative bacterial isolates , collected from patient admitted to Ibn-AL-balade hospital . Ethanolic extract showed antibacterial activity against bacterial isolates and water extract reveled effectivnes.Such isolates showed highly sensitive to Norfacin and Impinene and less sensitve to Amoxicillin .