الفعالية التثبيطية لمستخلص نبات الكجرات على بعض الاحياء المجهرية

جاسم محمد عودة[1]، ابتهاج مصطفى حكيم[2]، هبة قاسم حميد[3]، فراس احمد صالح[4]
[1، 2، 4] قسم علوم الاغذية والنفانات الاحيائية – كلية الزراعة – جامعة بغداد
[3] قسم علوم الحياة كلية التربية ابن الهيثم – جامعة بغداد

المستخلص

اجريت الدراسة لتحديد القدرة التثبيطية لكل من المستخلص المائي والمستخلص الفلافونويدي لازهار نبات الكجرات (الكركدية) *Hibiscus Subdariffa* المجففة والمنتجة محليا وبالتراكيز 1000و 2000و 3000 جزء بالمليون تجاه عدد من الاحياء المجهرية والمتمثلة بالاجناس *Escherichia coli* و *Bacillus Subtillis* و *Saccharomyces spp* و *Kluveromyces spp.* و *Pseudomones spp.* و *Aspergillus niger* و *Candida spp* و *Trichoderma spp.* و *Pencillium spp* تبين ان للمستخلص الفلافونويدي للكجرات فعالية تثبيطية عالية اتجاه معظم الاحياء المجهرية قيد الدراسة مقارنة بالمستخلص المائي وقد اعتمدت طريقة الانتشار بالاقراص(Filter paper discs diffusion) في تقدير المقدرة التثبيطية لمستخلص الكجرات تجاه البكتريا والخمائر. كانت البكتريا *B. subtillis* اكثر تاثرا من باقي البكتريا بالمستخلص الفلافونويدي والمائي وبجميع التراكيز. تلاها بكتريا *Pseudomones spp* واخيرا بكتريا *E.coli*. اما الخمائر، فقد كانت خميرة *Kluveromyces spp* . اكثر تاثرا بالمستخلص المائي من الخميرة *Saccharomyces spp* بينما كان تثبط نمو الاخيرة بالمستخلص الفلافونويدي اعلى مما لخميرة *Kluveromyces spp* . . اما *Candida spp* . فلم يحدث لها أي تثبيط بكلا المستخلصين وبجميع التراكيز. اما الاعفان فقد اختبرت المقدرة على تثبيطها بطريقة الغذاءالمسمم Poisoned Food Technique وكان العفن *A.niger* اكثر الاعفان تاثرا وبكلا المستخلصين المائي والفلافونويدي وبجميع التراكيز تلاه عفن *Trichoderma spp* فيما كانت *Penicillium spp.* اقل الاعفان تاثرا بالمستخلص الفلافونويدي ولم يثبط نموه حتى بالتركيز الاعلى من المستخلص المائي .

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences 39 (6) : 134-141 (2008) Awda et al.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HIBISCUS SUBDARIFFA EXTRACT ON SOME MICROORGANISM.

Jasim. M. Awda[1], Ibtehaj. M. Hakkem[2], Hiba. Q. Hameed[3] Firas. A. Salih[4] .
[1,2,4] Dept. of Food. Science and Biotech. College of Agriculture / Univ. of Baghdad.
[3] Dept. of Biology. College of Education. Univ. of Baghdad.

ABSTRACT

Inhibition activity of water extract and flavonoid extract of dried and locally produced *Hibiscus subdariffa* on some microorganism was studied concentrations of 1000, 2000 and 3000 ppm was used against *Bacillus subtilis, Escharichia coli Pseudomones spp., Saccharomyces spp., Kluveromyces spp. , Candida spp. , Aspergillus niger, Trichoderma spp. and Penicillium spp.* Flavonoid extract of *Hibiscus subdariffa* showed highest Inhibition activity aganist the above mentioned microbes as compared to water extract. Filter paper disc diffusion was used to detect the inhibition activity of *Hibiscus subdariffa* extract against bacteria and yeasts. *B. subtilis* was the most sensitive to the flavonoid and water extract with all concentrations , followed by *Pseudomones spp. E.coli* was less affected by both extracts. The yeast *Kluveromyces spp,* was the most sensitive to the water extract in comparison to *Sacchromyes spp.* , while *Sacchromyces spp* was more sensitive to flavonoid extract than *Kluveromyces spp.* Both extracts had no effect on *Candidia spp.* at all concentrations. Poisoned food technique was used to detect the inhibition activity against the molds. *A. niger* was the most sensitive to both water and flavonoid extracts and at all concertrations , followed by Trichoderma spp, while *Pencillium spp.* was the least affected by flavonoid extract and its growth was not inhibited by water extract even ander higher concentration.

المقدمة

نمت الحاجة إلى استخدام مشروبات باضافات غذائية طبيعية خلال السنين الماضية تلبية لرغبات المستهلك بالابتعاد عما هو صناعي لمكونات الغذاء لما لها من تاثيرات سلبية في اغلب الاحيان على صحة المستهلك، وخصوصا عندما يكون المضاف الغذائي الطبيعي له تاثير مضاد للاحياء المجهرية أو مضاد للاكسدة (10) . واختير نبات الكجرات *Hibiscus sabdariffia* لهذه الدراسة لكونه يزرع في اغلب مناطق العراق وامكانية ادخاله في العديد من الصناعات الغذائية والدوائية.

تحوي الكجرات مختلف المركبات والعناصر كالصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم وفيتامين C وصبغة الانثوسيانين (5) ، ويستخدم كمشروب في اغلب دول العالم مثل الهند واستراليا والعراق وفي افريقيا تعتبر الكجرات المكون الرئيسي لمشروب شعبي اسمه Zobo (6). من ناحية اخرى امكن ادخاله في تصنيع اللحوم واطالة مدة حفظها (16) وفي منتجات الالبان (11) . وقد اشار pozo (18) إلى دور مركبات الانثوسيانين المستخلصة من الكجرات لتحسين اللون في الصناعات الغذائية اضافة إلى دورها كمضاد للاحياء المجهرية.

وفي معالجة امراض الكبد والكلى وتخفيض الضغط العالي للدم (4)، وكمضاد للسرطان (6) وفي مجال الطب استخدم في معالجة ضعف الذاكرة (12) ، وذكر (14) استخدام مستخلص الكجرات لمعالجة بعض امراض القلب ومسكن لعدد من الالام ومعالج لسوء الهظم وفاتح للشهية ومدرر ومعالجة مرض الاسقربوط والاسهال والتهاب الحنجرة والتهابات الفم الاخرى.

تعد الفلافونويدات (Flavonoid) من ابرز مضادات الاكسدة الطبيعية اضافة إلى دورها كمضاد للاحياء المجهرية ، وهي مركبات متعددة الفينول وتوجد في معظم النباتات (19) ، وتساهم هذه الفلافونويدات داخل النبات في حماية النبات من الاصابة المرضية وذلك لخصائصها المضادة للاحياء المجهرية .وهدف الدراسة الحالية معرفة تاثير المستخلص المائي والفلافونويدي على بعض انواع البكتريا والخمائر والاعفان، ودراسة تاثير تراكيز مختلفة من المستخلص على هذه الاحياء المجهرية.

المواد والطرائق :

1. ازهار الكجرات : تم الحصول على ازهار الكجرات المجففة من الاسواق المحلية.
2. مصادر العزلات: العزلات *Bacillus subtillis, Kluveromyces spp, Pseudomones spp, Escharichia coli, Candida spp, Saccharomyces spp* كان مصدرها قسم علوم الاغذية والتقانات الاحيائية اما *Aspergillu niger, Trichoderma spp, Pencillium spp* فكان مصدرها قسم وقاية النبات.
3. الاوساط الزراعية: استخدم وسط Nutrient Broth (N.B) و Nutrient Agar (N.A) لتنمية واختبار عزلات البكتريا اما الوسط Potato Dextrose agar (PDA) فقد استخدم لتنمية عزلات الخمائر والاعفان.
4. تحضير المستخلص الفلافونويدي: اجريت عملية الاستخلاص وفقا للطريقة المتبعة من قبل الكوري (3). وجفف المستخلص باستعمال جهاز المبخر الدوار تحت التفريغ وبدرجة 50م°.
5. تحضير المستخلص المائي: تم الاستخلاص بالماء وفقا للطريقة الموصوفة من قبل الجنابي (1) مع اجراء بعض التحوير اذ استخلص 100غم من النبات مع 300 مل من الماء المقطر بدرجة 60م° وترك مدة 30 دقيقة على المازج المغناطيسي ورشح بواسطة ورق ترشيح Whatman No1 مع التفريغ ثم جفف بالمبخر الدوار عند 50- 60 م°.
6. تحضير تراكيز من مستخلصي نبات الكجرات: حضر محلول خزين Stock solution من كل من المستخلص الفلافونويدي والمستخلص المائي لنبات الكجرات وذلك بنقل 1 غم من كل مستخلص على حدة إلى دورق سعة 100 مل واكمل الحجم إلى العلامة بالماء المقطر وعقم باستخدام مرشحات

مايكروبية دقيقة ذات مسامية 0.45 مايكروميتر. وحضرت منه تراكيز 1000، 2000، 3000 جزء بالمليون .

7. دراسة الفعالية التثبيطية لتراكيز مختلفة من مستخلص الكجرات ضد البكتريا: نشطت العزلات البكتريا في وسط N.B بحرارة 37مْ. واعتمدت طريقة الانتشار بالاقراص الورقية (Filter Paper Discs diffusion) المذكورة من قبل Olaleye (14) وذلك بنشر 0.1 مل من بكتريا الاختبار على وسط N.A بواسطة ناشر زجاجي معقم على شكل حرف L،حضرت 4- 6 اقراص ورق ترشيح Whatman No1 معقمة في كل طبق وبقطر 4 ملم وحمل كل قرص بـ10مايكروليتر بواسطة ماصة دقيقة (Micropipette) ووضعت على الوسط الزرعي ، حضنت الاطباق في درجة حرارة 37مْ مدة 24 ساعة ثم قيس قطر منطقة التثبيط (Clear Zone) وهي الهالة المحيطة بالقرص والخالية من النمو .

8. دراسة الفعالية التثبيطية للتراكيز المختلفة من مستخلص الكجرات ضد الخمائر: نشطت الخمائر في وسط (PDB) وحضنت بدرجة حرارة 28مْ واعتمدت طريقة الانتشار بالاقراص كما جاء في الفقرة السابقة وباستخدام الوسط (PDA) وبدرجة حرارة حضن 28م ومدة 48 ساعة.

9-دراسة الفعالية التثبيطية لتراكيز مختلفة من مستخلص الكجرات ضد اعفان الاختبار

حضر محلول اساس من المستخلص المركز لنبات الكجرات بتركيز 100000 جزء في المليون وسحب منه 1، 2 و 3 مل واضيف إلى 9، 6 و7 مل من الوسّيط PDA المعقم والمبرد بحرارة 45- 50م على الترتيب.بحيث امتلك الوسط النهائي التراكيز 1000، 2000، 3000 جزء بالمليون وبالترتيب. في حين ترك وسط غذائي من دون اضافة كمقارنة ، وصبت الاوساط في اطباق بتري معقمة واختبرت فعالية مستخلص الكجرات على النمو الشعاعي لاعفان الاختبار بطريقة الغذاء المسمم (Poisoned Food Technique) وذلك بوضع قطعة قطرها 0.5 سم من المزرعة الفطرية بعمر 5 ايام في مركز الوسط الزرعي وخضت الاطباق بحرارة 25مْ ، وعند وصول قطر المزرعة الفطرية لمعاملة المقارنة إلى حافة الطبق قيست اقطار المستعمرات ، وحسبت لها نسبة التثبيط كما في المعادلة:

$$\% \text{ التثبيط} = \frac{\text{معدل القطر في عينة المقارنة} - \text{معدل القطر في عينة المعاملة}}{\text{معدل القطر في عينة المقارنة}} \times 100$$

النتائج والمناقشة

تاثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي والمستخلص الفلافونويدي لنبات الكجرات في تثبيط نمو البكتريا

يوضح جدول 1 معدلات اقطار مناطق التثبيط لنمو بكتريا الاختبار ويلاحظ ازدياد قطر مناطق التثبيط بزيادة تركيز المستخلص المائي اذ اظهر المستخلص المائي فعالية عالية اتجاه بكتريا *B.subtillus* فكانت معدلات اقطار التثبيط 9، 14 و 19 ملم عند التركيز 1000، 2000 و 3000 جزء بالمليون على التوالي في حين اظهرت بكتريا *E.coli* حساسية اقل تجاه المستخلص المائي وكانت معدلات اقطار مناطق التثبيط 0، 9 و 9.6 ملم وبتركيز 1000، 2000، 3000 جزء بالمليون وعلى التوالي واوضحت النتائج أيضاً فعالية المستخلص المائي تجاه بكتريا *Pseudomonus spp* حيث بلغت معدلات اقطار مناطق التثبيط 7، 10.2، 11.2 ملم عند التركيز 1000و 2000 و 3000 جزء بالمليون وعلى التوالي ، اي ان ازدياد اقطار مناطق التثبيط زادت بزيادة التركيز للمستخلص المائي.

تتفق هذه النتيجة مع نتائج دراسات سابقة عن الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي لهدا النبات الكجرات،فقد توصل Kamal(13) إلى ان المستخلص المائي لهدا النبات اظهر فعالية قليلة اتجاه *E.coli* ، بينما اظهر فعالية اعلى اتجاه *Pseudomonas spp* في حين وجد Sharaf and Geneidy.(20) ان للمستخلص المائي للكجرات فعالية عالية تجاه بكتريا التي تسبب مرض السل *Mycobacterium Tuberculosis*.

ويوضح جدول 2 فعالية المستخلص الفلافونويدي لنبات الكجرات تجاه البكتريا قيد الدراسة حيث اظهر هذا المستخلص فعالية عالية ايضا اتجاه *B. Subtilis* ، حيث كانت معدل اقطار مناطق التثبيط 10.0، 17.2، 20.0 ملم وتتراكيز 1000، 2000، 3000 جزء بالمليون في حين كانت معدل اقطار مناطق التثبيط لبكتريا *Pseudomonas spp* (9.3، 12.6، 17.3) ولبكتريا *E. coli* (6.9، 7.0، 10.0) ولنفس التراكيز على الترتيب .

من هذا يظهر تاثير المستخلص الفلافونويدي اتجاه *B. Subtilis* اكثر من *Pseudomonas spp* اما بكتريا *E. coli* فكانت اقل تاثرا من البكتريا الاخرى.

عموما فان المستخلص الفلافونويدي لنبات الكجرات كان اعلى قدره للتثبيط من المستخلص المائي لنبات الكجرات.يتفق هذا مع ما ذكرته حكيم (2) بان المركبات الفلافونويدية لمستخلص الشاي والسدر تظهر فعالية تثبيطية عالية اتجاه *B.Subtills* وفعالية اقل اتجاه *E. coli* و *Pseudomonas spp*.

اثبت Petin (17) ان للمركب الفلافونويدي (3,5,7,8,3,4-hexahydroxy flavor) المستخلص من نبات الكجرات فعالية تثبيطية عالية اتجاه كل من *Staphylococcus aureus, P. Aeruginosa, B. Pumpilus, B. Subtilis* , وكذلك اشار Olaleye(14) إلى وجود المركبات الفلافونويدية والكلايوكسيدية والقلوية والصابونية في مستخلص الكجرات ولهذه المركبات فعالية كثيفة اتجاه كل من *Staphylococcus aureus, Bacillus stearothermophilus Micrococcus luteus, serratia mascences, clostridium sporogenes. E. coli, Klebsiela pnumoniae, Bacillus cereus, Pseudomonas Fluorescence.*

تاثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي ومستخلص الفلافونويدية لنبات الكجرات في تثبيط نمو الخمائر

يوضح جدول 3 تاثير المستخلص المائي على كل من خميرة *Kluveromyces spp* اكثر تاثرا بالمستخلص المائي وكان معدل اقطار التثبيط 0، 6، 7.3 ملم عند التركيز 1000، 2000، 3000 جزء بالمليون على التوالي بينما لم تتاثر خميرة *Saccharomyces spp* عند التركيز 1000، 2000 اما في حالة التركيز 3000 جزء بالمليون فكان قطر التثبيط 6.7 ملم.اما خميرة *Candida spp* فلم تتاثر في جميع التراكيز للمستخلص المائي.

ويوضح جدول 4 تاثير المستخلص الفلافونويدي لنبات الكجرات على لخميرة *Kluveromyces spp* حيث كانت اقطار التثبيط 6.4، 6.9، 8.2 ملم عند التركيز 1000، 2000، 3000 جزء بالمليون اما خميرة *Sacchayomyces spp* فكانت معدلات اقطار التثبيط 6.8، 7، 10 ملم عند التراكيز نفسها على التوالي في حين لم تتاثر خميرة *Candida spp* بجميع تراكيز المستخلص الفلافونويدي.

وهذا يتفق مع ما توصل اليه Olaleye (14) بان المستخلص المائي والكحولي لنبات الكجرات ليس له تاثير اتجاه خميرة *Candida albicans*.

دراسة تاثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي والفلافونويدي لنبات الكجرات في تثبيط نمو الاعفان

لوحظ ان الفعالية التثبيطية للمستخلصات تجاه اعفان الاختبار تزداد بزيادة التركيز اذ اظهر جدول 3 و4 ان الزيادة في نسبة التثبيط لنمو الاعفان توازي الزيادة في تركيز المستخلص المائي والفلافونويدي ابتداء من 1000 وانتهاء بـ3000 جزء بالمليون فالعلاقة طردية بين نسبة التثبيط والزيادة في التركيز وكانت اعلى نسبة تثبيط لنمو *A. Niger* تعود للمستخلص الفلافونويدي لنبات الكجرات اذ بلغت نسبة التثبيط 54، 63، 70.5% عن التركيز 1000، 2000، 3000 جزء المليون على التوالي. وكان ارتباط معدلات قطر مستعمرة الاعفان ارتباطا عكسيا مع التركيز فكلما ازداد التركيز قل معدل نمو المستعمرة.

اما المستخلص المائي فكانت نسبة تثبيطية لنمو عفن *A. Niger* 36.84، 60.50، 68.42% للتراكيز 1000، 2000، 3000 جزء بالمليون على التوالي. تلاه عفن *Trichoderma spp* والذي تثبط وبكلا المستخلصين المائي والفلافونويدي ولكن بنسب اقل من *A.Niger* اما عفن *Penicillium spp* فلم يظهر المستخلص المائي أي فعالية تثبيطية تجاهه عند أي تركيز من التراكيز الثلاثة المستخدمة بينما اظهر المستخلص الفلافونويدي فعالية

تثبيطية بنسب (33، 55.6، 62)% وللتراكيز الثلاثه وعلى التوالي.

قد اثبت باحثون مثل Garcia واخرون (8) قدرة مستخلص الكجرات لتثبيط نمو الاعفان مثل *Trichophyton rubrum* و *T.Mentagrophyles* . اشار Pozo(18) إلى قدرة المستخلص لتثبيط نمو *A.Niger*.

جدول 1 تاثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي لنبات الكجرات في تثبيط نمو البكتريا الاختبارية

معدل قطر منطقة التثبيط (ملم)			التركيز المستخدم / الكائن المجهري
3000 ppm	2000 ppm	1000 ppm	
19	14	9	*B. Subtillis*
9.6	9	0	*E.Coli*
11.2	10.2	7	*Pseudiomonas spp*

جدول 2 تاثير تراكيز مختلفة من المستخلص الفلوفونويدي لنبات الكجرات في تثبيط نمو البكتريا الاختبارية

معدل قطر منطقة التثبيط (ملم)			التركيز المستخدم / الكائن المجهري
3000 ppm	2000 ppm	1000 ppm	
20	17.2	10.0	*B. Subtillis*
10	7	6.9	*E.Coli*
17.3	12.6	9.3	*Pseudiomonas spp*

جدول 3 تاثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي لنبات الكجرات في تثبيط نمو الخمائر الاختبارية

معدل قطر منطقة التثبيط ملم			التركيز المستخدم / الكائن المجهري
3000 ppm	2000 ppm	1000 ppm	
7.3	6	0	*Kluveromyces spp*
6.7	0	0	*Sacchayomyces spp*
0	0	0	*Candida spp*

جدول 4 تاثير تراكيز مختلفة من المستخلص الفلافونويدي لنبات الكجرات في تثبيط نمو الخمائر الاختبارية

معدل قطر منطقة التثبيط ملم			التركيز المستخدم / الكائن المجهري
3000 ppm	2000 ppm	1000 ppm	
8.2	6.9	6.4	*Kluveromyces spp*
10	7	6.8	*Sacchayomyces spp*
0	0	0	*Candida spp*

جدول 5 تاثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي لنبات الكجرات في تثبيط نموبعض انواع الاعفان

نسبة التثبيط %			التركيز المستخدم / الكائن المجهري
3000 ppm	2000 ppm	1000 ppm	
68	60	36	*Aspergillus niger*
0	0	0	*Penicillium spp*
35	30	22	*Trichoderma spp*

جدول 6 تاثير تراكيز مختلفة من المستخلص الفلافونويدات لنبات الكجرات في تثبيط نموبعض انواع الاعفان

نسبة التثبيط %			التركيز المستخدم / الكائن المجهري
3000 ppm	2000 ppm	1000 ppm	
70.5	63	54	*Aspergillusniger*
62	55.6	33	*Penicillium*
67	60.5	44	*Trichoderma spp*

المصادر:

1. الجنابي، نضال محمد، 2004، تاثير بعض المستخلصات النباتية كمضادات للأحياء المجهرية ومضادات اكسدة وتطبيقها في بعض الانظمة الغذائية، اطروحة دكتوراه- علوم الاغذية والتقانات الاحيائية - كلية الزراعة- جامعة بغداد ص 34.

2. حكيم، ابتهاج مصطفى، 2006، استعمال مستخلصات الشاي والسدر كمضادات اكسدة لتحسين قابلية حفظ الجبن. رسالة ماجستير، علوم الاغذية والتقانات الاحيائية- كلية الزراعة- جامعة بغداد ص1.

3. الكوري، طلال عبد الرزاق، 2000، استخلاص بعض المركبات الفلافونويدية من اوراق نبات السدر واستعمالها كمضاد اكسدة، اطروحة دكتوراه- علوم الاغذية والتقانات الاحيائية- كلية الزراعة- جامعة بغداد ص42.

4. Ajagbonna, O. 2001, Antibacterial properties of calyx stem bark and root of *Hibiscus sabdariffia*. Nig. J. Nat Prod and Med. 5: 54-55.

5. Ali, B. and N. Wabel. 2005. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffia*. Phytother Res. 19: 369- 375.

6. Chang, Y. and H, Huang. 2005. Hibiscus anthocyanins rich extract induluced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cell. Toxicol Appl Pharmacol 15: 201- 212.

7. Frank, T. M, Janssen. And M, Strass. 2005 Pharmacokinetics of arthocyanidin- 3-glycosides following consumption of hibiscus sabdariffa. J. Clin Pharmacol 45: 203- 210.

8. Garcia, M. R. Gabriela and G, Zepeda. 2006. antifungal and antibacterial activity of four selected Mexican medicinal plants. Pharm. Biology 44: 297- 300.

9. Gossy, P. 2002. Antibacterial activity of gossypetin isolated from hibiscus sabdariffo. The Antiseptic 99: 81-82. (abstract).

10. Hirunpanich, V. A, Utaipat and N, Movales. 2006. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffia* in hypercholesterolemic rats. J. Ethnophaymocoli 16: 252-260 (abstract).

11. Iwalokun, B. and M, Shittu. 2007. Effect of *Hibiscus sabdariffia* extract on biochemical and organoleptic properties of yogurt. Pakistan J of Nutrition.6: 172- 182.

12. Joshi, Hard P. Milind. 2006. Nootropic activity of calyces of hibiscus sabdariffa linn. J. of pharm. And Thera. 5: 15-20.

13. Kamali, H. 2006. Antibacterial activity of *Hibiscus sabdariffia*. J of Medical Science. 1: 121- 126.

14. Olaleye, M. T. 2007. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffia*. J of Medicinal Plant 1: 09-13.

15. omemu, A.M, Edema. A, Atayese. and O, Obadina. 2005. A survey of the microflora of *Hibiscus sabdariffia* and the resulting Zobo juice, African J. of Biot. 5(3) 254-259.

16. Onibi, G. and I, Osho. 2007, Oxidative stability and bacteriological assessment of meat from broiler chickens fed diets containing

19. Ramanathan, R. C, Tan and N. Das. 1992 cytotoxic effect of plant polyphenols and fat soluble vitamins on malignant human cultured cell. Capcerltt. 62: 217- 224.

20. Sharaf, D. and A., Geneidy. 1967. The effect of acolouring matter separated from *Hibiscus sabdariffia* on *mycobacterium tuberculosis* as compared to that of its watery extract. J Plant Food For Human Nutrition. 15: 117- 122. (abstract).

Hibiscus sabdariffia. African J. of Biot. 6(23): 2721-2726.

17. Petin, G. 2002, Antibacterial activity of gossypetin isolated from *Hibiscus sabdariffia*. The Antiseptic. 99(3): 81- 83. (abstract).

18. Pozo, D. C, Brenes and T., Talcott. 2003, Antioxidant and antimicrobial properties of hibiscus sabdariffa as affected by the presence of naturally occurring cofactors J. Phayma. 43: 179- 183. (abstract).