# بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آبی و الکلی کلاله زعفران بر روی میکروب‌های پاتوژن دهان (استرپتوکوک موتانس، لاکتوباسیل،کاندیدا آلبیکنس)

**فرزانه بارانی کرباسکی*، حسین حسین زاده**، بی بی صدیقه فضلی بزاز***، هدی ولایتی پور****، کیارش قزوینی*****، بهجت الملوک عجمی******#**

* دستیار تخصصی گروه دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

** استاد گروه فارماکودینامیک و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

*** استاد گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، عضو مرکز تحقیقات علوم داروئی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی داروئی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

**** دندانپزشک

***** دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

****** استاد گروه دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

**تاریخ ارائه مقاله : ۹۴/۴/۳ - تاریخ پذیرش : ۹۵/۱/۲۵**

## Evaluation of Antimicrobial effects of Aqueous and Alcoholic Extracts of Saffron on Oral Pathogenic Microbes (Streptococcus Mutans, Lactobacillus, Candida Albicans)

**Farzaneh Barani Karbasaki*, Hossein Hossenzadeh**, Bibi Sedigheh Fazli Bazzaz***, Hoda Velayatipour****, Kiarash Ghazvini*****, Behjat-al-molok Ajami******#**

** Postgraduate Student, Dept of Pediatrics, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*

*** Professor of Pharmacodinami and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of medical sciences, Mashhad, Iran.*

**** Professor in Pharmaceutical Microbiology, Biotechnology Research Center, Department of Food and Drug Control, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

*****Dentist*

****** Associate Professor, Dept of Mycobacteriology, Ghaem Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

******* Professor of Pedodontics, Dep of Pediatric Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*

***Received: 11 January 2016; Accepted: 12 June 2016***

**Introduction:** Dental caries is an infectious disease and various microorganisms have a pivotal role in its onset and development. Medications used to reduce microbes are usually accompanied with side effects. Therefore, it seems necessary to search for antimicrobial agents with less side effects. In this study, we aimed to evaluate the antimicrobial effects of aqueous and alcoholic extracts of saffron on oral pathogenic microbes.

**Materials & Methods:** In total, six 9-year-old male students were selected from a primary school. Samples of dental plaque, saliva, and depth of tooth decay were obtained from the participants to evaluate Streptococcus mutans, Lactobacillus, and Candida albicans and were sent to the laboratory afterwards. After assessing the samples via broth dilution method and incubation, six samples of Lactobacillus, eight samples of Candida albicans, and six samples of Streptococcus mutans were evaluated due to difficulty in turbidity detection. Afterwards, overnight cultures were prepared and evaluated for minimal bactericidal concentration (MBC) determination. In the next stage, penicillin and nystatin positive culture tests were used to compare the effects of microbes. In this study, one-way ANOVA was used to compare all the study groups, while pairwise comparison was performed using Tukey test.

**Results:** Our findings were indicative of inhibitory effects of aqueous and alcoholic extracts of saffron on all three microbes. However, they were less effective compared to standard antibiotics (e.g., penicillin). A significant difference was observed between the effect of aqueous and alcoholic extracts of saffron and penicillin on the Streptococcus mutans ($P<0.001$). Similarly, a significant difference was found between the effects of saffron extracts and penicillin on the Lactobacillus ($P<0.0001$). Moreover, a significance difference was observed between extracts of saffron and nystatin on Candida albicans ($P<0.001$). According to the results, alcoholic extract of saffron was more successful in eliminating Candida albicans and Streptococcus Mutans, compared to aqueous extract of saffron ($P<0.001$).

**Conclusion:** According to the results, while saffron had bacteriostatic effects on Streptococcus mutans and Lactobacillus, it had antifungal activities against Candida albicans. Therefore, saffron could be recommended as a mouthwash due to its herbal origin, cost-effectiveness, and fewer side effects.

**Key words:** Extract, saffron, antimicrobial, oral pathogenic microbes.

**# Corresponding Author: Ajamib@mums.ac.ir**

***J Mash Dent Sch 2016; 40(3): 203-12.***

---

**#مولف مسؤول، نشانی: مشهد، دانشکده دندانپزشکی، گروه پریودانتیکس، تلفن: ۱۵-۳۸۸۲۹۵۰۱-۰۵۱**

**E-mail: Ajamib@mums.ac.ir**

## چکیده

**مقدمه:** پوسیدگی دندانی یک بیماری عفونی است که میکروارگانیسم‌های مختلفی در ایجاد و پیشرفت آن نقش دارند. داروهایی که برای کاهش میکروب‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند دارای عوارض جانبی می‌باشند. بنابراین جستجو برای مواد ضدمیکروبی که حداقل عوارض جانبی را داشته باشند، ضروری است. لذا هدف از این مطالعه بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره آبی و الکلی زعفران بر میکروب‌های بیماری زا حفره دهان می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** تعداد ٦ دانش آموز پسر ۹ ساله از یک دبستان انتخاب و نمونه برداری از پلاک دندانی، بزاق و عمق پوسیدگی دندانی جهت بررسی سه میکروب استرپتوکوک موتانس، کاندیدا آلبیکانس و لاکتوباسیل انجام شد و نمونه‌ها به آزمایشگاه ارسال شدند. پس از انجام آزمایش به روش رقیق سازی متوالی و انکوباسیون و با توجه به سختی تشخیص کدورت از ٦ نمونه استرپتوکوک موتانس و ٦ نمونه لاکتوباسیل و ۸ نمونه قارچ کاندیدا آلبیکنس مورد آزمایش، کشت شبانه تهیه گردید و جهت تعیین Minimal Bactericidal Concentration (MBC) بررسی شد. جهت مقایسه اثر آنها از کشت مثبت پنی سیلین و نیستاتین استفاده شد. در این تحقیق برای مقایسه همه گروه‌ها از آزمون واریانس یک طرفه و برای مقایسه دو به دوی گروه‌ها از آزمون توکی استفاده گردید.

**یافته‌ها:** این مطالعه نشان داد که عصاره آبی و الکلی زعفران بر روی سه میکروب اثر مهاری داشته، اگر چه که قدرت آنها در مقایسه با آنتی بیوتیک (پنی‌سیلین) کمتر بود. مقایسه اثر عصاره الکلی و آبی زعفران و پنی‌سیلین بر روی استرپتوکوک موتانس تفاوت معنی‌داری نشان داد که $P<۰/۰۰۱$ بود. همچنین مقایسه اثر عصاره الکلی و آبی زعفران و پنی‌سیلین بر روی لاکتوباسیل تفاوت معنی‌داری نشان داد و $P<۰/۰۰۰۱$ بود. تفاوت معنی‌داری بین نتیجه اثر عصاره الکلی و آبی زعفران و نیستاتین بر روی کاندیدا آلبیکنس مشاهده شد، و $P<۰/۰۱$ بود.این مطالعه نشان داد که عصاره الکلی زعفران در از بین بردن کاندیدا آلبیکنس و استرپتوکوک موتانس از عصاره آبی موثرتر است ($P<۰/۰۰۱$).

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه حاکی ازآن است که زعفران دارای اثر باکتریواستاتیک بر روی استرپتوکوک موتانس و لاکتوباسیل و اثر ضدقارچی بر روی کاندیدا آلبیکنس می‌باشد. با توجه به منشا گیاهی و در نتیجه عوارض کمتر آن و بومی بودن و مقرون به صرفه‌تر بودن زعفران شاید بتوان این دارو را به عنوان دهان شویه توصیه نمود.


**کلمات کلیدی:** عصاره، زعفران، ضدمیکروبی، میکروب‌های بیماری زای دهان.

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۵ دوره ٤۰ / شماره ۳ : ۱۲-۲۰۳.

## مقدمه

با توجه به شیوع بالای پوسیدگی در جامعه، توجه خاص به روش‌های پیشگیری ضروری است. عوامل اصلی ایجادکننده پوسیدگی شامل میکروب‌ها، مواد قابل تخمیر و میزبان مستعد مثل دندان‌ها و بزاق می‌باشد. میکروب‌ها به خصوص استرپتوکوک موتانس در شروع ایجاد پوسیدگی نقش مهمی دارد، لاکتوباسیلوس‌ها و قارچ‌ها نیز در روند پوسیدگی افزایش می‌یابند. کاربرد عوامل ضدمیکروبی، آنتی بیوتیک و دهانشویه‌های آنتی میکروبیال موجود در بازار علی رغم مفید بودن عوارضی نیز دارند.[۱] لذا استفاده از یک داروی گیاهی که دارای اثرات ضدمیکروبی بوده و عارضه نیز نداشته باشد، ضروری به نظر می‌رسد. زعفران یک گیاه بومی است و به دلیل خصوصیات بیولوژیک متعدد آن در دو دهه گذشته مورد مطالعه قرار گرفته است.[۲]

استرپتوکوک موتانس که نه تنها در پوسیدگی دندانی نقش دارد، بلکه درایجاد بیماری‌های دیگری مانند شقاق گوشه لب، التهاب غده پاروتید نیز نقش دارد.[۳]

لاکتوباسیلوس‌ها نیز در ایجاد پوسیدگی نقش دارند و از عوامل میکروبی دیگر مثل میکروب‌های بیهوازی ایجادکننده بیماری لثه می‌باشند.[٤]

قارچ‌ها نیز مانند کاندیداآلبیکنس در روند پوسیدگی و بیماری لثه نقش دارند.[۵و۲]

از عوامل شیمیایی و ضدپلاک که هم در درمان و هم در پیشگیری از بیماری لثه نقش دارد می‌توان کلرهگزیدین را نام برد. کلرهگزیدین یکی از عوامل ضدمیکروبی است

و به اشکال مختلف از قبیل دهانشویه، خمیردندان و ژل عرضه می‌شود.[٦]

اثرات ضدپلاک کلرهگزیدین به دلیل طبیعت دی کاتیونی مولکول کلرهگزیدین می‌باشد، که منجر به دوام اثر ضدمیکروبی در سطح دندان به صورت باکتریسیدال و باکتریواستاتیک می‌شود. همین ماهیت کاتیونی علت بیشتر عوارض جانبی همراه با مصرف این ماده یعنی تغییر رنگ خارجی دندان می‌باشد.[۷] عوارض جانبی متعددی برای کلرهگزیدین از قبیل از دست رفتن حس چشایی، احساس سوزش مخاط دهان، خشکی دهان گزارش شده است.[۸]

بنابراین جستجو برای مواد ضدمیکروبی جدید که دارای حداقل عوارض جانبی باشند ضروری است. یکی از زمینه‌های امیدبخش برای جست و جوی اجزای فعال بیولوژیک جدید گیاهان مورد استفاده در طب سنتی از جمله زعفران می‌باشد.

زعفران کلاله خشک شده گیاه Crocus stivus L. می‌باشد. این گیاه به صورت رسمی در لیست داروهای چینی ثبت شده است و در طب سنتی چینی برای درمان هماتوما، منوستاز، افسردگی و تشنج به عنوان یک آرامبخش استفاده می‌شده است.[۹] مطالعات اخیر ثابت کرده‌اند که این گیاه پتانسیل کاهش ریسک بیماری‌های مختلفی را دارا می‌باشد.[۱۰] خواص دارویی متعددی برای زعفران ذکر شده است. برخی متابولیت‌های مشتق شده از کلاله زعفران به دلیل عملکرد هیپولیپیدمیک، ضدسرفه، آنتی اکسیدان، آنتی دیابت و ... آثار درمانی بسیاری از خود نشان داده‌اند. عصاره‌های آبی و الکلی زعفران، محافظت‌کننده قلب و مقابله کننده با اختلالات نورودژنراتیو هستند. خصوصیات دارویی متعدد زعفران مربوط به اجزای مختلف آن مانند Crocetin، Crocin و سایر موادی است که دارای خاصیت قوی آنتی اکسیدان و جمع آوری رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سیتوکاین‌های پیش التهابی می‌باشند.[۸]

مطالعات نشان داده ند که بیش از ۱۵۰ ماده مختلف در کلاله زعفران وجود دارد. قویترین اجزای زعفران کاروتنوئیدها و آلدهیدهای مونوترپن هستند. مطالعه بر روی ارتباط عملکرد و ساختار مولکول نشان داده است که برخی ویژگی‌های زعفران به دلیل مشتقات دگلیکوزیله آن می‌باشد، و بقیه با مشتقات گلیکوزیله مرتبط می‌باشد.[۱]

اثرات ضدمیکروبی زعفران نیز در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است.[۱] Sengul و همکارانش[۱۱] طی بررسی‌های خود عنوان می‌کنند که زعفران می‌تواند منبع غنی از عوامل آنتی اکسیدان و آنتی میکروبیال باشد.

هدف از این مطالعه بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره آبی و الکلی زعفران بر میکروب‌های بیماری زا حفره دهان از قبیل استرپتوکوکوس موتانس، لاکتوباسیل و کاندیداآلبیکانس بود.

## مواد و روش ها

در تحقیقات میکروبی حداقل ٦ سویه از هر میکروب کافی است. از طرفی به دلیل هزینه بر بودن، امکان اضافه کردن تعداد نمونه‌ها وجود ندارد، لذا جهت بررسی اثر عصاره آبی و الکلی زعفران، بر روی میکروب‌های بیماری‌زای دهان، تعداد ٦ دانش آموز ۹ ساله که هیچگونه بیماری سیستمیک نداشته از یک دبستان به طور تصادفی انتخاب گردیدند. نمونه‌ها از پلاک میکروبی، بزاق و پوسیدگی ناحیه دندان‌های مولر برداشته شد و جهت بررسی به آزمایشگاه برده شد. در هر بیمار سه میکروب استرپتوکوکوس موتانس، کاندیداآلبیکنس و لاکتوباسیل بررسی گردید، که در مجموع ۱۸ میکروب بررسی شد.

به جای کاربرد نمونه‌های استاندارد، از روش نمونه‌گیری استفاده شد. جهت نمونه گیری از پلاک

دندانی، به کمک سوند استریل از روی سمت باکال و لینگوال دندان‌های ناحیه خلفی پلاک برداشته شد و روی سواپ استریل قرار داده شد و سپس داخل لوله آزمایش حاوی ماده ترانسپورت قرار داده شد. جهت نمونه گیری از بزاق، سواپ آغشته به بزاق بیمار شد و روی پلیت حاوی محیط کشت مایع ترانسپورت به آرامی کشیده شد و به آزمایشگاه برده شد. سپس جهت نمونه گیری از پوسیدگی، با سوند پوسیدگی‌های سطحی کنار زده شد و از عمق پوسیدگی نمونه گیری انجام شد و جهت جداسازی باکتری به آزمایشگاه برده شد.

نمونه‌ها در محیط مایع ترانسپورت Modified Medium Stuart که دارای ۱۰-۵ گرم پپتون در لیتر بوده و سیستم بافری داشت، (باکتری‌ها تکثیر نیافته و از بین نمی‌روند) نگهداری شد و حداکثر ظرف یک ساعت به آزمایشگاه رسانده می‌شد.

برای جداسازی .Lactobacillus spp قسمتی از نمونه در محیط کشت مایع MRS Broth کشت گردید و به مدت ٤٨ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و شرایط بی هوازی نگهداری گردید. سپس از باکتری‌های رشد کرده در محیط MRS Broth برداشته و در محیط MRS Agar کشت داده شد. کلنی‌هایی که ویژگی‌های مورد نظر را داشت به عنوان لاکتوباسیلوس در نظر گرفته شد.

جهت جداسازی استرپتوکوک موتانس، نمونه‌ها در محیط استرپتوکوک سلکتیو آگار کشت و در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ٢٤ ساعت در شرایط میکروآیروفیل گرمخانه گذاری گردید.

برای جداسازی کاندیدا، نمونه‌ها در محیط کشت سابورو دکستروز آگار و محیط کشت رنگی کروم آگار کشت داده شد و حضور کاندیداآلبیکنز با آزمون بررسی میکروسکوپی و تولید ژرم تیوب بررسی شد.

تهیه سوسپانسیون میکروبی، پس از جداسازی میکروب‌ها، از همه آن‌ها یک کشت اولیه تهیه شد و در یخچال به عنوان منبعی برای انجام سایر آزمایشات نگهداری شد. برای انجام هر آزمایش باید میکروب جدید و تازه داشت تا مطمئن باشیم میکروب‌ها زنده اند.

روز قبل از آزمایش از همه نمونه‌های میکروبی کشت ایزوله روی محیط بلاد آگار برای استرپتوکوک موتانس و لاکتوباسیل، و آگار (Soyabean casein) trypton soya agar digest agar) متعلق به شرکت (Himedia) برای کاندیدا کشت داده می‌شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در مورد لاکتوباسیل با توجه به اینکه میکروبی بی‌هوازی است، برای رشد، نیازمند محیط خاص باکتری‌های بی هوازی است. برای کشت بی هوازی باید میکروب‌ها داخل جار بی هوازی) ظرفی غیر قابل نفوذ که هیچ گونه تبادل گازی با محیط خارج ندارد و برای کشت باکتری‌های بی هوازی مورد استفاده قرار می‌گیرد (قرار داده شوند، برای ایجاد این شرایط داخل جار یک عدد گاز پک (MERCK) گذاشت، که یک کیت شیمیایی جاذب اکسیژن است، با مقدار ٦ میلی لیتر نرمال سالین خیس شد و در انکوباتور ۳۷ سانتیگراد قرار داده شد.

پس از رشد میکروب‌ها در این محیط‌های یک روزه از این میکروب‌ها سوسپانسیون تهیه شد. به این صورت که به کمک پیپت استریل، مقدار کمی نرمال سالین استریل روی پلیت حاوی میکروب ریخته شد و کمی با کلنی‌ها مخلوط گردید، سپس به یک لوله آزمایش استریل که حاوی ۹ میلی‌لیتر نرمال سالین بود از این سوسپانسیون میکروبی اضافه شد تا غلظتی معادل استاندارد نیم مک فارلند حاصل شود.

این سوسپانسیون حاوی (Colony forming unit per milliliter)، CFU/ml $۱۰^{۸}$ میکروب بود. سپس روی ویبراتور سوسپانسیون همگن شد.

۱ سی سی از این سوسپانسیون به وسیله پیپت استریل به ۹ سی سی نرمال سالین دیگر اضافه شد و سوسپانسون میکروب CFU/ml $۱۰^{۷}$ تهیه شد و به همین ترتیب سوسپانسیون CFU/ml $۱۰^{٦}$ از سوسپانسیون CFU/ml $۱۰^{۷}$ تهیه شد.

برای تهیه عصاره الکلی به ازای هر ۱۰ میلی گرم پودر زعفران، ۱۰۰µl الکل ۸۰ درجه در یک ارلن مایر ریخته شد. مدت ۷۲ ساعت ارلن روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. در پایان ۷۲، ساعت ابتدا محتویات ارلن از چند لایه پارچه تنظیف و سپس از کاغذ صافی عبور داده شد. عصاره حاصله پس از تغلیظ با دستگاه حذف حلال، در دمای ٤۰ درجه سانتیگراد داخل چند پلیت ریخته شد و سپس روی بن ماری ٤۰ درجه کاملاً خشک گردید. مقدار عصاره الکلی لازم برای رسیدن به غلظت مورد نظر روی ترازو اندازه گیری شد و در حجم مورد نظر از محیط کشت داخل لوله آزمایش حل شد. لوله آزمایش حاوی محلول عصاره الکلی روی ویبراتور ویبره شد تا به یک محلول شفاف و یکدست رسانده شود. پس از تهیه محلول با غلظت اولیه مورد نظر، سایر غلظت‌ها با نسبت ۱/۲، ۱/۲ داخل ویال‌های استریل در مجاورت شعله تهیه شد. به این صورت که ۱/۲ از غلظت اولیه برداشته می‌شد و به همین مقدار محیط کشت اضافه شد و غلظتی نصف غلظت اولیه به دست آمد و به همین صورت تا غلظت‌های پایین‌تر این کار ادامه پیدا کرد و از غلظت آخر ۱/۲ برداشته شد و دور ریخته شد.

برای تهیه عصاره آبی به ازای هر ۱۰ میلی گرم پودر زعفران، ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استفاده شد و حل گردید. سپس برای ٢٤ ساعت بر روی شیکر انکوباتور قرار گرفت و مواد از چند لایه پارچه تنظیف رد شدند. سپس عصاره‌ها در بالن ته گرد ریخته شدند و در فریزر منفی ۸۰ درجه قرار گرفتند. پس از یخ زدن، عصاره‌ها در دستگاه فریز درای قرار داده شدند. (در خلا حذف حلال صورت گرفت (پس از تهیه غلظت اولیه مثل عصاره الکلی رقیق سازی سریالی با نسبت ۱/۲، ۱/۲ داخل ویال‌های استریل انجام شد و از غلظت انتهایی، ۱/۲ دور ریخته شد.

جهت مقایسه تأثیر عصاره آبی و الکلی زعفران بر روی میکروب‌های مورد آزمایش، از آنتی بیوتیک ضدباکتری استاندارد یعنی پنی‌سیلین (شرکت لقمان) و یک ضد قارچ مؤثر بر کاندیداآلبیکنس یعنی نیستاتین( شرکت جابربن حنان – تهران – ایران) استفاده شد. برای بررسی اثر آنتی بیوتیک بر این سه میکروب، غلظت‌هایی از پنی‌سیلین و نیستاتین به همان روش رقیق سازی سریالی و در محیط کشت‌های مناسب میکروب مورد نظر تهیه شد. پودر این داروها روی ترازو اندازه گیری شد و در محیط کشت داخل لوله آزمایش به کمک ویبراتور حل شد و با نسبت با نسبت ۱/۲، ۱/۲ سایر غلظت‌ها نیز تهیه شد.

روش آزمایش به صورت رقیق سازی متوالی (Serial Dilution) درون پلیت ۹٦ خانه بود. عصاره آبی و الکلی باید داخل محیط کشت مایع حل شده و غلظت‌های مختلف از آن‌ها تهیه شود که این محیط کشت برای میکروب‌های مختلف متفاوت است.محیط کشت برای استرپتوکوک موتانس (Brain Heart Infusion Broth) B.H.I.B، کاندیدا (Muller Hinton Broth) M.H.B و لاکتوباسیل (Brain Heart Infusion) B.H.I می‌باشد. همه محیط کشت‌ها متعلق به شرکت Himedia هندوستان بودند.

جهت انجام آزمایش از پلیت ۹٦ خانه استفاده شد. مقدار µl ۲۰۰ از هر غلظت از ماده مورد آزمایش (عصاره

آبی یا الکلی) و همین طور µl ۲۰۰ از غلظت‌های مختلف پنی‌سیلین و یا نیستاتین جهت مقایسه اثر آنها با تأثیر عصاره آبی و الکلی داخل چاهک‌ها ریخته شد. و در چاهک‌های کنترل مثبت و منفی نیز همین مقدار از محیط کشت ریخته شد. سپس به همه چاهک‌ها به جز چاهک کنترل منفی مقدار µl ۲۰ از سوسپانسیون میکروبی اضافه شد. هر آزمایش برای هر میکروب سه بار تکرار شد. برای میکروب بی هوازی لاکتوباسیل پلیت‌ها داخل جار بی هوازی حاوی گازپک قرار داده شد. پس از ریختن مقدار لازم از هر غلظت پلیت‌ها به مدت یک شب داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. در این مدت از رسیدن رطوبت به میکروب‌ها جلوگیری شد.

برای بررسی نتایج و اینکه مشخص شود در کدام چاهک‌ها میکروب رشد کرده است، مقدار کدورت چاهک‌ها تعیین شد. به دلیل رنگی بودن مواد مورد آزمایش، تشخیص کدورت ناشی از رشد میکروب با چشم مشکل بود لذا، از غلظت‌های مشکوک، کشت ایزوله تهیه شد. به این صورت که در مجاورت شعله یک لوپ که روی شعله حرارت دید وارد چاهک‌های مورد نظر شد و روی محیط کشت آگار کشیده شد. آن گاه این محیط کشت‌ها، ۲٤ ساعت داخل انکوباتور قرار داده شدند، روز بعد هر پلیتی که در آن رشد میکروب نداشت، یعنی کلنی هیچ باکتری در آن دیده نمی‌شد، غلظت MBC محاسبه می‌شد. تمامی مراحل بررسی و ثبت نتایج توسط نویسنده انجام شد.

MIC (Minimal Inhibitory Concentration)، کمترین میزان غلظت یک عامل ضدمیکروبی که از رشد میکروارگانیسم جلوگیری می‌کند، به عنوان MIC شناخته می‌شود. تست MIC ممکن است روی آگار و یا یک مایع واسط انجام شود. روش معمول تعیین MIC، تکنیک رقیق سازی متوالی است.[۱۱]

MBC (Minimal Bactericidal Concentration)، کمترین غلظت عامل ضد میکروبی که اکثر (۹۹/۹ درصد) جمعیت میکروبی تلقیح شده را از بین می‌برد، و در این آزمایش غلظت اولین چاهکی که در کشت ایزوله آن هیچ میکروبی رشد نیافت غلظت MBC تعیین می شد.

داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش گردید. در این تحقیق برای مقایسه سه گروه از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و برای مقایسه دوبه‌دوی گروه‌ها از آزمون توکی استفاده گردید. سطح معنی داری در آزمون ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

در این مطالعه اثر ضدمیکروبی عصاره آبی و الکلی زعفران، بر روی سه میکروب بیماری‌زای دهان (استرپتوکوک موتانس، لاکتوباسیلوس و کاندیداآلبیکنس) مورد بررسی قرار گرفت. میانگین MBC به دست آمده برای عصاره الکلی و آبی زعفران، پنی‌سیلین و نیستاتین بر حسب mg/ml در ٦ نمونه استرپتوکوک موتانس و لاکتوباسیل و هشت نمونه کاندیداآلبیکنس در جداول ۱ تا ۳ آمده است.

آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد میانگین غلظت MBC روی استرپتوکوک موتانس سه گروه تفاوت معنی‌داری دارند (جدول ۱) آزمون توکی برای مقایسه دوبه‌دوی گروه‌ها حاکی از تفاوت بین هر سه گروه با یکدیگر بود ($P<۰/۰۰۱$).

آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد سه گروه از نظر میانگین MBC روی لاکتوباسیل تفاوت معنی‌داری دارند (جدول ۲) آزمون توکی برای مقایسه دوبه‌دوی گروه‌ها حاکی از تفاوت بین عصاره آبی با پنی‌سیلین و همچنین

**عصاره الکلی با پنی‌سیلین بود. (P<۰/۰۰۱) ولی عصاره آبی با الکلی تفاوت معنی‌داری با هم نداشت (P=۰/۵۸).**

**آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد میانگین MBC روی کاندیداآلبیکانس در سه گروه تفاوت معنی‌داری دارند (جدول ۳). آزمون توکی برای مقایسه دوبه‌دوی گروه‌ها حاکی از تفاوت بین عصاره آبی با نیستاتین (P=۰/۰۰۷) بود و همچنین عضاره الکلی با نیستاتین و عصاره آبی با الکلی نیز تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱).**

**جدول ۱ :** میانگین و انحراف معیار غلظت (MBC mg/m) عصاره ی آبی و الکلی زعفران و پنی‌سیلین روی استرپتوکوک موتانس

| | میانگین | انحراف معیار | حداقل | حداکثر |
|---|---|---|---|---|
| عصاره آبی | ۱۳۳/۳ | ۲۵/۸۲ | ۱۰۰ | ۱۵۰ |
| عصاره الکلی | ۳۹/۶ | ۱۶/۶۱ | ۱۲/۵ | ۵۰ |
| پنی‌سیلین | ۰/۰۵ | ۰ | ۰/۰۵ | ۰/۰۵ |
| نتیجه آزمون | | P<۰/۰۰۱ | F=۱۱۲/۱ | |

**جدول ۲ :** میانگین و انحراف معیار غلظت (MBC mg/m) عصاره آبی و الکلی زعفران و پنی‌سیلین روی لاکتوباسیل

| | میانگین ± انحراف معیار | حداقل | حداکثر |
|---|---|---|---|
| عصاره آبی | ۶۸۳/۳±۷۵/۲۸ | ۶۰۰ | ۷۰۰ |
| عصاره الکلی | ۷۸۳±۱۲۱/۳۳ | ۶۰۰ | ۱۰۰۰ |
| پنی‌سیلین | ۰/۰۵±۰ | ۰/۰۵ | ۰/۰۵ |
| نتیجه آزمون | P<۰/۰۰۱ | F=۹۴/۲ | |

**جدول ۳ :** میانگین و انحراف معیار غلظت (MBC mg/m) عصاره آبی و الکلی زعفران و نیستاتین روی کاندیداآلبیکنس

| | میانگین ± انحراف معیار | حداقل | حداکثر |
|---|---|---|---|
| عصاره آبی | ۶۲/۵±۲۱/۶۵ | ۵۰ | ۱۰۰ |
| عصاره الکلی | ۳۳۷/۵±۵۱/۷۵ | ۳۰۰ | ۴۰۰ |
| پنی‌سیلین | ۲/۶±۰/۰۵۵ | ۱/۲۵ | ۵ |
| نتیجه آزمون | P<۰/۰۰۱ | F=۲۵۹/۳ | |

**بحث**

این مطالعه نشان داد که عصاره‌های آبی و الکلی زعفران بر روی سه میکروب بیماری زای دهان، استرپتوکوک موتانس، کاندیداآلبیکنس و لاکتوباسیل دارای اثر ضدمیکروبی بود و بر روی هر سه میکروب اثر مهاری دارد.

MBC برای استرپتوکوک موتانس، لاکتوباسیل و کاندیداآلبیکنس محاسبه گردید. در این غلظت عصاره الکلی و آبی با پنی‌سیلین مقایسه شد و اثر عصاره الکلی و آبی ضعیف‌تر از اثر پنی‌سیلین بود و تفاوت آنها معنی‌دار بود.

کاندیداآلبیکنس جزء فلور نرمال بدن است و در حفره دهان بیش از نیمی از افراد، یافت می‌شود و تنها در شرایطی خاص علایم بیماری را ایجاد می‌کند.[۱۲] این مطالعه نشان دادکه عصاره‌های آبی و الکلی زعفران توانایی از بین بردن کاندیداآلبیکنس را دارند و این اثر ضعیف‌تر از نیستاتین بود و تفاوت معنی‌داری بین نتیجه عصاره الکلی و آبی و بر روی کاندیداآلبیکنس وجود داشت.

Bathaie و همکارش[۲] بیان کردند آنالیزهای شیمیایی بیش از ۱۵۰ ماده مختلف را در کلاله زعفران نشان داده است قوی‌ترین اجزای زعفران، کاروتنوئیدها و آلدهیدهای مونوترپن هستند.

اثر قوی آنتی‌اکسیدانی در مقابل انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سیتوکاین‌های پیش التهابی از خصوصیات دارویی متعدد زعفران بوده که مربوط به اجزای مختلف آن مانند Crocin و Crocetin می‌باشد.[۱۰]

مطالعه Vahidi و همکارانش[۱۳] فعالیت ضدمیکروبی قوی تمام بخش‌های گیاه به جز برگ‌ها در مقابل باکتری‌ها و قارچ‌ها را نشان داد و بیان کرد که فعالیت عصاره اتیل استات کلاله زعفران، خاصیت ضدقارچ بیشتر و عصاره اتیل استات پرچم‌ها، خاصیت ضدباکتریایی بیشتری دارند.

Zheng و همکارانش[۱٤] نیز در مطالعه ای، به بررسی اجزای فعال از نظر زیستی گیاه زعفران پرداخته و نشان دادند که علاوه بر کلاله زعفران، اجزای دیگر آن مانند پوشش گل، پرچم‌ها، و ساقه پیازمانند گیاه دارای اثرات مفیدی می‌باشند. در این مطالعه اثرات ضدقارچی، سیتوتوکسیک، و آنتی اکسیدان پرچم، کلاله، و پوشش گل زعفران و ترکیبات شیمیایی موجود در این اجزا تعیین شدند. پرچم‌ها قوی ترین اثر ضدقارچی و سیتوتوکسیک را نشان دادند. هر دو قسمت پرچم و پوشش گل دارای اثرات آنتی اکسیدان قابل توجه بودند. این یافته‌ها بیان می‌کنند که پرچم و پوشش گل زعفران مانند کلاله دارای اثرات ضدقارچ، سیتوتوکسیک و آنتی اکسیدان هستند ولی این اثر در کلاله بیشتر از اجزای دیگر است.

Moghadam[۱۵] اثر ضدمیکروبی زعفران را بر روی هلیکوباکترپلوری و Pintado و همکارانش[۱٦] اثر باکتریسیدال زعفران را بر روی سالمونلا آنتریکا به اثبات رساندند.

تمامی این مطالعات موید این مطلب هستند که زعفران دارای اثرات ضدباکتریایی و قارچی است، که به دفعات ثابت شده اند. بنابراین با توجه به نتایج تحقیق حاضر شاید بتوان گفت که زعفران دارای اثر ضدمیکروبی بر روی میکروب‌های دهان نیز هست. پس زعفران می‌تواند بر روی قارچ‌های دهان نیز اثرگذار باشد. از آنجائی که کلرهگزیدین که امروزه به عنوان دهانشویه به کار می‌رود، می‌تواند باعث تغییر رنگ دندانی و بهم خوردن تعادل میکروبی شود، همچنین استفاده از آموکسی سیلین به عنوان آنتی بیوتیک انتخابی در مورد میکروب‌های دهانی سبب مقاومت میکروبی می‌شود، لذا استفاده از ماده دیگری که

این عوارض را نداشته باشد توصیه می‌شود، که با تحقیقات بیشتری که انجام شده شاید بتوانیم از زعفران استفاده کنیم. نکته ای که در این مطالعه باید به آن توجه نمود این است که مقدار مؤثر عصاره آبی و الکلی بر ضد این میکروب‌ها در شرایط آزمایشگاهی به دست آمده است و ممکن است این غلظت در شرایط کلینیکی چنین اثری نداشته باشند. علت این امر تفاوت محیط دهان و محیط آزمایشگاه است. در محیط دهان ماتریکس بین سلولی پلاک از تأثیر مواد ضدمیکروبی موضعی روی میکروارگانیسم‌های پلاک جلوگیری می‌کند. نقش بزاق از لحاظ تغییر pH دهان و رقیق کردن ماده نیز قابل ذکر است. از طرفی حرارت دهان با درجه حرارت انکوباتور متفاوت است و وجود خون در محیط و توان اکسیداسیون و احیای متفاوت در نقاط مختلف حفره دهان نیز می‌تواند روی نتایج تأثیرگذار باشد.[۱۷]

مسئله قابل توجه دیگر این است که در لوله‌ها و پلیت‌های حاوی محیط کشت، ماده ضدمیکروبی به طور مداوم در تماس با میکروب است ولی در استفاده از مواد ضدمیکروبی به صورت موضعی در دهان و دهانشویه‌ها، معمولاً پس از چند ثانیه غرغره کردن، ماده از محیط دهان حذف شده و عوامل موجود در دهان اثر آن را خنثی می‌کنند. در مطالعه حاضر عصاره‌های زعفران به صورت خالص استفاده شده‌اند و به صورت فرمولاسیون یک دهانشویه - که حاوی مواد متعدد دیگری است - به کار گرفته نشده است.

## نتیجه گیری

ننایج حاصل از این مطالعه نشان داد که زعفران چه به صورت عصاره الکلی و چه به صورت عصاره آبی می‌تواند بر روی میکروب‌های بررسی شده (استرپتوکوک موتانس، لاکتوباسیل و کاندیداآلبیکنس) اثر مهارکنندگی و کشندگی داشته باشد.

لذا با توجه به گیاهی بودن منشا این دارو و بومی بودن و در نتیجه عوارض کمتر آن و مقرون به صرفه‌تر بودن این ماده در مقایسه با کلرهگزیدین و سایر ترکیبات آنتی باکتریال، شاید بتوان از این گیاه به صورت دهانشویه استفاده نمود، که نیاز به مطالعات بیشتری در قالب مطالعات مداخله‌ای می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان نامه دانشجویی به شماره ۲۶۲۵ می‌باشد که در معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به تصویب رسیده است. بدینوسیله مراتب تشکر و تقدیر خود را از این معاونت داشته، همچنین از سرکار خانم ثابتی کارشناس محترم آزمایشگاه میکروبی دانشکده داروسازی کمال تشکر را داریم.

## منابع

1. Kandil O, Radwan NM, Hassan AB, Amer AM, el-Banna HA, Amer WM. Extracts and fractions of Thymus capitatus exhibit antimicrobial activities. J Ethnopharmacol 1994; 44(1): 19-24.
2. Bathaie SZ, Mousavi SZ. New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. Crit Rev Food Sci Nutr 2010; 50(8): 761-86.
3. Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of Staphylococcus species in the oral cavity. J Med Microbiol 2001; 50(11): 940-6.
4. Dal Bello F, Hertel C. Oral cavity as natural reservoir for intestinal lactobacilli. Syst Appl Microbiol 2006; 29(1): 9-76.
5. Scully C, el-Kabir M, Samaranayake LP. Candida and oral candidosis: A review: An official publication of the American Association of Oral Biologists. Crit Rev Oral Biol Med 1994; 5(2): 125-57.

6. Fløtra L. Different modes of chlorhexidine application and related local side effects. J Periodontal Res 1973; 8: 41-4.
7. Jones CG. Chlorhexidine: Is it still the gold standard? Periodontol 2000. 1997; 15: 55-62.
8. Hepso HU, Bjornland T, Skoglund LA. Side-effects and patient acceptance of 0.2% versus 0.1% chlorhexidine used as post-operative prophylactic mouthwash. Int J Oral Maxillofac Surg 1988; 17(1): 17-20.
9. Tang W, Eisenbrand G. Chinese drugs of plant origin chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine. 1st ed. Springer Berlin Heidelberg; 1992. P. 395-8.
10. Poma A, Fontecchio G, Carlucci G, Chichiricco G. Anti-inflammatory properties of drugs from saffron crocus. Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem 2012; 11(1): 37-51.
11. Sengul M, Yildiz H, Gungor N, Cetin B, Eser Z, Ercisli S. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. Pak J Pharm Sci 2009; 22(1): 102-6.
12. Miller CH, Palenik CJ. Infection Control and Management of Hazardous Materials for the Dental Team. 2nd ed. Elsevier Health Sciences 1998. P. 21.
13. Vahidi H, Kamalinejad M, Sedaghati N. Antimicrobial Properties of Croccus sativus L. Iran J Pharm Res 2002: 33-5.
14. Zheng CJ, Li L, Ma WH, Han T, Qin LP. Chemical constituents and bioactivities of the liposoluble fraction from different medicinal parts of Crocus sativus. Pharm Biol 2011; 49(7): 756-63.
15. Moghaddam MN. *In vitro* antibacterial activity of saffron (Crocus sativus L.) extract and its two major constituents against Helicobacter pylori. Planta Med 2010; 76(12): P. 496.
16. Pintado C, de Miguel A, Acevedo O, Nozal L, Novella JL, Rotger R. Bactericidal effect of saffron (Crocus sativus L.) on Salmonella enterica during storage. Food Control 2011; 22(3): 638-42.
17. Newman MG, Takei HH,Carrenza FA. Carranza's Clinical Periodontology. 10th ed. Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA, editors. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2006. P. 42.