مقایسه اثر آزمایشگاهی عصاره آبی گیاهان گل سرخ، سماق، گلنار و کلرهگزیدین بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس

فاطمه قربانی [۱]، فرید عباسی [۲]، روناک بختیاری [۳]، مهدی نوروزی [۴و۵]، محمد امین بافنده [۶]، سید شجاع الدین شایق [۷]، سید محمدرضا حکیمانه [۸]*

[۱] دانشجوی دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

[۲] دانشیار، گروه بیماری های دهان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

[۳] استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

[۴] دانشیار، گروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

[۵] مرکز تحقیقات ویروس شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

[۶] دستیار تخصصی، گروه پروتزهای دندانی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

[۷] دانشیار، گروه پروتزهای دندانی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

[۸] استادیار، گروه پروتزهای دندانی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

تاریخ ارائه مقاله: ۹۹/۱/۲۶ – تاریخ پذیرش: ۹۹/۸/۱۸

Effect of Aqueous Extract Mixture of Rhus Coriaria L.-Punica Garanatum-Rosa Damanscene on Streptococcus Mutans Compared to Chlorhexidine: An In-Vitro Study

Fatemeh Ghorbani [1], Farid Abbasi [2], Ronak Bakhtiari [3], Mehdi Norouzi PHd [4,5], Mohammad Amin Bafandeh[6], Sayed Shojaedin Shayegh [7], Seyed Mohammad Reza Hakimaneh [8]*

[1] Dental Student, Faculty of Dentistry, Shahed University, Tehran, Iran
[2] Associate Professor, Department of Oral Medicine, School of Dentistry, Shahed University, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Associate Professor, Department of Virology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5] Associate Professor, Research Center for Clinical Virology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[6] Postgraduate Student, Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Shahed University, Tehran, Iran
[7] Associate Professor, Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Shahed University, Tehran, Iran
[8] Assistant Professor, Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Shahed University, Tehran, Iran

Received: 26 March 2020; Accepted: 8 November 2020

Introduction: Dental caries is a prevalent infectious disease, and *Streptococcus mutans (S. mutans*) is the most common bacteria associated with dental cavities. To control oral bacterial infections, especially *S. mutans*, different antimicrobial compounds and solutions have been used. Given the increasing side effects of these compounds, assiduous attention has also been devoted to the use of medicinal plants as an alternative. The present study aimed to evaluate the antimicrobial potential effect of a mixture of the aqueous extract of *Rhus coriaria L., Punica granatum,* and *Rosa × damascena* on *S. mutans*.

Materials and Methods: This experimental study assessed the effect of the mixture of the aqueous extract of *Rhus coriaria L., Punica granatum,* and *Rosa × damascena* on *S. mutans*. Eight different concentrations of *Rhus coriaria L., Punica granatum,* and *Rosa × damascena* extracts (0.078, 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5, and 10 mg/mL) were used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Moreover, %10 solutions of these extracts were used to determine the inhibition zone diameter using the cup-plate method. Chlorhexidine solution 2% was used as a positive control in both methods.

Results: MIC and MBC values of *Rhus coriaria L., Punica granatum,* and *Rosa × damascena* extracts against *S. mutans* were reported as 2.5 and 5 mg/mL, respectively. Furthermore, a mean inhibition zone diameter of 21±2.2 mm in the cup-plate method demonstrated that a 10% concentration of the extracts had an antimicrobial effect on *S. mutans*. Furthermore, the mean inhibition zone diameter of chlorhexidine solution 2% was obtained at 18±1.8 mm.

Conclusion: As evidenced by the obtained results, the mixture of the aqueous extract of *Rhus coriaria L., Punica granatum,* and *Rosa × damascena* had an antibacterial activity on *S. mutans*. In addition, the formulation of the studied extracts was more effective than 2% chlorhexidine against *S. mutans*.

Key words: *Streptococcus mutans,* Aqueous extract, *Rhus coriaria L., Punica granatum, Rosa damascena* mill

Corresponding Author: m.hakimaneh@shahed.ac.ir

J Mash Dent Sch 2021; 44(4): 373-83 .

---

* مولف مسؤول، نشانی: تهران، خیابان وصال شیرازی، خیابان ایتالیای غربی، دانشکده دندانپزشکی شاهد، گروه پروتز، تلفن ۰۹۱۳۱۱۴۴۳۳۹

E-mail: m.hakimaneh@shahed.ac.ir

چکیده

مقدمه: پوسیدگی دندان یک بیماری عفونی شایع است و استرپتوکوک موتانس شایعترین باکتری پوسیدگی زا در حفره های دهان است. برای کنترل عفونت های باکتریایی دهان، به ویژه استرپتوکوکوس موتانس، از ترکیبات و محلول های ضد میکروبی مختلف استفاده شده است. با توجه به افزایش عوارض جانبی آنها، علاقه زیادی به استفاده از گیاهان دارویی برای جایگزینی با داروهای شیمیایی وجود دارد. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر ضد میکروبی عصاره آبی گیاه سماق، گلنار وگل سرخ بر روی استرپتوکوکس موتانس بود.

مواد و روش ها: به عنوان یک مطالعه آزمایشگاهی، از هشت غلظت مختلف عصاره آبی سماق، گلنار وگل سرخ (۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶ و ۰/۰۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر) برای تعیین کمترین غلظت بازدارنده (MIC) و کمترین غلظت کشنده (MBC) بر علیه استرپتوکوک موتانس استفاده شد. همچنین از غلظت ۱۰ درصد این عصاره ها، برای تعیین قطر هاله عدم رشد به روش چاهک پلیت استفاده شد. از کلرهگزیدین ۲ درصد به عنوان کنترل مثبت در هر دو روش استفاده شد.

یافته ها: MIC و MBC عصاره سماق، گلنار و گل سرخ بر علیه استرپتو کوک موتانس به ترتیب ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و ۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. همچنین میانگین قطر هاله عدم رشد به میزان ۲/۲±۲۱ میلی متر در روش چاهک پلیت نشان داده شد. خاصیت ضد میکروبی بر علیه استرپتوکوکوس موتانس در غلظت ۱۰٪ عصاره ها دیده شد و میانگین قطرهاله عدم رشد کلرهگزیدین، ۱/۸±۱۸ میلی متر بدست آمد.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره آبی سماق، گلنار و گلسرخ، اثرات ضد میکروبی علیه استرپتوکوکوس موتانس دارد. همچنین فرمولاسیون عصاره های مورد مطالعه موثرتر از کلرهگزیدین ۲ درصد علیه استرپتوکوکوس موتانس می باشد.

کلمات کلیدی: استرپتوکوکوس موتانس، عصاره آبی، سماق، گلنار، گل سرخ

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۹ دوره ۴۴ / شماره ۴ : ۸۳-۳۷۳ .

مقدمه

پوسیدگی دندان و بیماری های پریودنتال از شایع ترین بیماری های دهان هستند که در اثر تجمع میکروارگانیسمها به دلیل بهداشت نامناسب دهان و دندان و عادت های غذایی نامناسب ایجاد می شوند.[۱و۲] یکی از گونه های اصلی باکتری که در ایجاد پلاک و پوسیدگی دندان نقش مهمی ایفا می کند، استرپتوکوک ها بالاخص استرپتوکوک موتانس می باشد.[۳و٤] برای کنترل عفونت باکتری های دهانی، از ترکیبات و محلول های ضد میکروبی مختلف از جمله تریکوزان، فلوراید، ید، کلرهگزیدین و موارد دیگر استفاده می شود.[۵] کلرهگزیدین یکی از شایع ترین دهانشویه های مورد استفاده است، اما به رغم خاصیت ضدمیکروبی زیاد، می تواند باعث تغییر رنگ سطح دندان ها شود و همچنین حس چشایی را تغییر دهد.[۶]

آنتی بیوتیک های سنتتیک در دهه های گذشته نقش مهمی را در درمان بیماری های عفونی ایفا نموده اند.[۷و۸] اما پیدایش مقاومت دارویی، گسترش مقاومت های میکروبی و اثرات جانبی مصرف آنتی‌بیوتیک ها به دنبال مصرف برخی از آنها، باعث شده است محققان به منظور دستیابی به ترکیبات ضدمیکروبی جدید، انگیزه زیادی برای جستجو و ارائه ترکیب های ضد میکروبی داشته باشند. یکی از رویکردهای جدید، استفاده از گیاهان دارویی به عنوان جایگزینی برای آنتی بیوتیک های سنتتیک می باشد.[۹] ترکیبات طبیعی مانند عصاره های گیاهی بهترین کاندید برای مهار باکتری های عفونت‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک هستند که از مزایای آن می توان به کم‌بودن هزینه تولید، عوارض جانبی کم و نداشتن مشکلات زیست محیطی اشاره کرد.

از جمله این عصاره های گیاهی می توان سماق یا Rhus از خانواده Anacardiaceae را نام برد که بیش از ۲۰۰ گونه مختلف شناخته شده است.[۱۰و۱۱] میوه های آن تک دانه به رنگ قرمز هستند و همچنین دارای ارزش غذایی و دارویی می باشند.[۱۲] این گیاه در طب سنتی جهت درمان بسیاری از بیماری ها مانند فشار خون بالا، اسهال، بیماری های

دندان و لثه، درماتیت و برخی شرایط دیگر مورد استفاده قرار گرفته است.[۱۳] همچنین، نشان داده شده است که این گیاه اثرات ضد باکتریایی، آنتی اکسیدانی و ضد قارچی دارد که از کاربردهای سنتی آن پشتیبانی می کند.[۱۳و۱۲و٤] انار از خانواده Punicaceae، با نام گیاه شناسی Punica granatum Linn، می باشد که قسمت های مختلف آن شامل میوه، ریشه، پوست و گل برای اهداف دارویی استفاده می شود.[۱] مطالعات نشان داده اند که غلظت بالای آب میوه می تواند باعث کاهش پاتوژن های دهانی و پریودنتال شود.[۱۵و۱٤] Rosa damascena Mill مهمترین گونه خانواده Rosaceae است، همچنین به نام Damask یا گل رز صورتی شناخته می شود.[۱٦] این درختچه چند ساله دارای گل های صورتی معطر است و در ایران، هند و بلغارستان کشت می شود.[۱۸و۱۷] روغن و عصاره آن برخی خصوصیات آنتی اکسیدانی را نشان داده است.[۱۹] اثرات ضدباکتریایی اجزای اصلی روغن گل سرخ از جمله Geraniol، Citronellol و Nerol توسط برخی محققان گزارش شده است.[۲۰]

دهانشویه کلرهگزیدین (CHX) بخاطر خواص ضدمیکروبی فوق العاده، امروزه به عنوان استاندارد طلایی پذیرفته شده است. کلرهگزیدین یک Bis-biguanide است که تاثیرش بر هر دو گروه باکتری گرم مثبت و منفی، قارچ ها و برخی ویروس های لیپوفیلیک اثبات شده است.[۲۲و۲۱] استفاده از غلظت های ۰/۱۲ درصد تا ۰/۲ درصد کلرهگزیدین در دهانشویه ها باعث کاهش قابل توجه شاخص های پلاک، التهاب و میزان خونریزی لثه می شود.[۲۳] استفاده بلندمدت از کلرهگزیدین (بیشتر از دو هفته) در درمان دندان پزشکی اغلب باعث تغییر رنگ دندان، زبان و ترمیم های کامپوزیتی و گلاس آینومر می شود. علاوه بر این، کلرهگزیدین می تواند باعث تحریک مخاط موکوزی و اختلالات طعم و تورم یک طرفه یا دو طرفه غده پاروتید (بصوت نادر) شود، اما این نشانه ها موقت هستند و در پی اتمام درمان محو می شوند.[۲۷-۲٤]

درمان های سنّتی از درمان های مدرن ارزانتر و مؤثرترند و مقاومت های دارویی و افزایش دوز مصرفی و به دنبال آن افزایش عوارض جانبی اثر داروها، باعث شده است تا امروزه بیشترین توجه به عواملی با پایه ی طبیعی مانند گیاهان دارویی با عوارض جانبی خفیف معطوف شود. این مسئله از آنجا اهمیت پیدا می‌کند که عوامل باکتریال به عنوان یک عامل اتیولوژیک اصلی در شروع بیماری‌های لثه و پوسیدگی دندان‌ها مطرح می‌باشند. علاوه بر دهانشویه‌های آنتی‌باکتریال شیمیایی، می‌توان از اثرات گیاهان داروئی که دارای کمترین اثرات جانبی می‌باشند نیز استفاده نمود.[۲۸] در مطالعات گذشته اثر ترکیبات مختلف گیاهی روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی شده است و نشان داده شده است که عصاره های گیاهی مختلف اثرات متفاوتی بر باکتری‌های گرم منفی و مثبت دارند. در یک مطالعه اثر اسانس عصاره محلول در آب، عصاره محلول در روغن ذرت و عصاره محلول در دی کلرومتان گیاه مورد (Myrtle) بر روی انواعی از باکتری‌ها بررسی شد و بیان شد که اسانس این موارد می‌تواند مانع رشد استافیلوکوکوس آرئوس، پسودوموناس آئروژینوزا و اشریشیاکولی گردد.[۲۹]

استفاده ترکیبی از گیاهان مختلف یک روش معمول در طب سنتی برای افزایش اثر درمانی در درمان بیماری های عفونی و مقاوم به درمان های جدید است اما می تواند اثر متضاد یا هم افزایی بر روی یکدیگر نیز داشته باشد.[۳۰] تا به امروز، تحقیقات محدودی وجود دارد که تأثیر مخلوط های گیاهی را بر روی عوامل بیماری زای دهان

بررسی کند. مقایسه خواص آنتی باکتریال این ترکیب ۳ تایی با کلرهگزیدین، که به عنوان یک داروی شیمیایی معمولی دهانشویه، آثار مثبت کاهش پلاک و التهاب لثه آن به اثبات رسیده است، می تواند نقش متفاوت یا مشابه این ترکیب سه تایی را بهتر و واضح تر نشان دهد. از این رو در پژوهش حاضر از آنجائی که محیط دهان حاوی گونه‌های باکتریال متعددی است و در ضمن استفاده از داروهای شیمیائی در حفره دهان با عوارضی از جمله تغییر در فلور طبیعی همراه است، بررسی تأثیر آنتی باکتریال ترکیب عصاره آبی گیاه Rhus coriaria L، Punica garanatum و Rosa damanscene بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع کاربردی و آزمایشگاهی بود و به منظور بررسی تاثیر ضد میکروبی عصاره آبی گل سرخ، سماق و گلنار بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس انجام شد. جامعه آماری شامل ٦ پلیت استرپتوکوکوس موتانس بود و غلظت ۱۰ درصد عصاره ها با کلرهگزیدین ۲ درصد با سه تکرار مقایسه شد.

تهیه گیاهان مورد مطالعه و استخراج عصاره ها – نمونه های گیاهی شامل میوه سماق، گلبرگ های گل سرخ و گلنار از بازار گیاهان دارویی تهران خریداری شد. ۵۰ گرم از هر یک از نمونه های گیاهی بوسیله آسیاب پودر شده و پس از مخلوط شدن به ارلن مناسب منتقل گردید. حدود ۵۰۰ سی سی آب مقطر افزوده و با استفاده از هیتر حرارت داده شد تا به نقطه جوش برسد. سپس به مدت بیست دقیقه در حالت جوش نگه داشته و سپس بوسیله پارچه و کاغذ صافی، عصاره صاف گردید. عصاره بدست آمده با کمک دستگاه روتاری کمی تغلیظ شده سپس به ظرف مناسب منتقل گردیده و در جریان هوا، زیر هود آزمایشگاه، کاملا خشک گردید. عصاره های آبی تهیه شده از گیاهان درون ظرف شیشه ای ریخته و تا بررسی اثر آنتی باکتریال در یخچال نگهداری شد.

کشت باکتری استرپتوکوکوس موتانس – سواپ آغشته به سوسپانسیون باکتری استرپتوکوکوس موتانس از آزمایشگاه میکروبی پاستور به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. سپس سواپ آغشته به باکتری به محیط کشت خون آگار انتقال و کشت داده شد. سپس محیط کشت به همراه یک گازپک در درون جار بی هوازی قرار داده شد. جار به مدت ٢٤ ساعت در درون انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از ٢٤ ساعت درب جارها را باز کرده و محیط های کشت از جار خارج شدند.

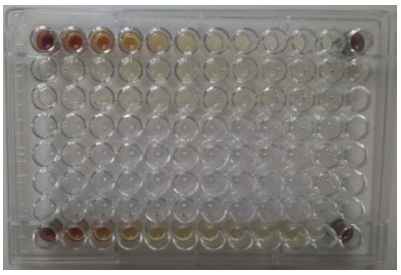
تعیین اثر آنتی باکتریایی عصاره با روش چاهک پلیت – در این مطالعه از روش چاهک پلیت جهت بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره ها استفاده شد. برای این منظور از پلیت‌های حاوی محیط کشت خون آگار که آغشته به میکروارگانیسم های مورد نظر بودند استفاده گردید. با استفاده از دستگاه پانچ استریل چاهک هایی با قطر شش میلیمتر بر روی محیط کشت خون آگار ایجاد گردید. ۱۰۰میکرولیتر از عصاره (غلظت ۱۰ درصد) درون چاهک ریخته شد. محیط‌ها برای ٢٤ ساعت درون انکوباتور قرار داده شدند و سپس قطر هاله‌هایی که اطراف هر چاهک ایجاد شده بود، اندازه گیری شد (تصویر ۱). از دمتیل سولفوکساید (DMSO) به عنوان کنترل منفی و محلول کلرهگزیدین ۲ درصد به عنوان کنترل مثبت اثر ضدمیکروبی استفاده شد.

تصویر ۱ : محیط کشت خون آگار و هاله عدم رشد باکتری

تعیین اثر آنتی باکتریایی عصاره با روش MIC (Minimum Inhibitory Concentration) – در این روش از هر ردیف میکروپلیت برای بررسی یک عصاره استفاده شد.

در ابتدا، رقت های ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/٦۲۵، ۰/۳۱۲۵، ۰/۱۵٦ و ۰/۰۷۸ درصد از عصاره های سماق، گل سرخ و گلنار تهیه شد. سپس از سوسپانسیون باکتری که در مرحله قبل ساخته شده بود و کدورت آن معادل کدورت نیم مک فارلند بود، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و در ۱۵ میلی لیتر محیط کشت مایع BHI (Brain heart infusion) ریخته شد.

جهت بررسی اثر آنتی باکتریال عصاره ها، در هر کدام از چاهک های میکروپلیت، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های مختلفی از عصاره ریخته شد. سپس در هر کدام از چاهک ها ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری ریخته شد. رقت سوسپانسیون به مقداری است که در نهایت در هر چاهک میکروپلیت، معادل $1/5\times10^5$ CFU/ml باکتری وجود داشته باشد. برای بقیه عصاره ها نیز در ردیف های جداگانه مانند روش بالا انجام شد (تصویر ۲).



تصویر ۲ : تعیین MIC در میکروپلیت

رقت نهایی عصاره (بعد از اضافه کردن سوسپانسون باکتری) چاهک ها از سمت چپ به راست به صورت زیر بود: چاهک ۱: ۱۰ درصد، چاهک ۲: ۵ درصد، چاهک ۳: ۲/۵ درصد، چاهک ٤: ۱/۲۵، چاهک ۵: ۰/٦۲۵، چاهک ٦: ۰/۳۱۲۵، چاهک ۷: ۰/۱۵٦، چاهک ۸: ۰/۰۷۸، چاهک ۹: خالی، چاهک ۱۰: خالی، چاهک ۱۱: عصاره + محیط کشت مولرهینتون براث و چاهک ۱۲: محیط کشت مولرهینتون براث. در این آزمایش از DMSO به عنوان کنترل منفی و از محلول کلرهگزیدین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

رقت نهایی کلرهگزیدین درچاهک ها از سمت چپ به راست به صورت زیر بود: چاهک ۱: ۰/۲ درصد، چاهک ۲: ۰/۱ درصد، چاهک ۳: ۰۵/ درصد، چاهک ٤: ۰۲۵/ درصد، چاهک ۵: ۰۱۲/ درصد، چاهک ٦: ۰۰٦/ درصد، چاهک ۷: ۰۰۳/ درصد

در ردیف ۱ عصاره، در ردیف ۲ کلرهگزیدین و در ردیف ۳ DMSO قرار گرفت.

درب میکروپلیت بسته و به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرارداده شد. بعد از ۲٤ ساعت چاهک های میکروپلیت برداشته و تمام چاهک ها با دقت بررسی شد. در چاهک هایی که باکتری رشد کرده بود یک نقطه سفید رنگ در ته چاهک ها تشکیل شده بود. در صورت ممانعت از رشد باکتری توسط عصاره، این نقطه سفید رنگ دیده نمی شد. غلظتی از عصاره در اولین چاهکی که باکتری در آن رشد نکرده بود، به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

تعیین MBC (Minimal Bactericidal Concentration):

۱۰۰ میکرولیتر از دو لوله قبل از MIC به دست آمده (لوله های بدون تغییر رنگ) به محیط کشت خون آگار منتقل شد. پس از ٤۸-۲٤ ساعت انکوباسیون، پلیت های

کشت داده شده از نظر وجود رشد میکروبی کنترل شد. لوله حاوی کمترین غلظت عصاره و عدم رشد باکتری، به عنوان MBC آن عصاره در نظر گرفته شد (تصویر ۳).

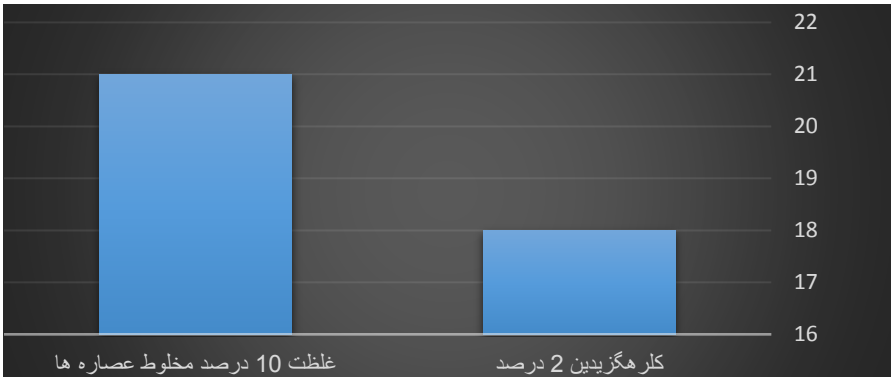
تصویر ۳ : تعیین MBC در محیط کشت خون اگار

با استفاده از نرم افزار SPSS با ویرایش ۲۵، ویژگی های توصیفی گروه های آزمایشی شامل میانگین و انحراف معیار محاسبه و مقایسه میانگین گروه های مختلف به روش آزمون تی تست انجام شد.

یافته ها

نتایج آزمون تی تست نشان داد که بین دو گروه مورد مطالعه براساس میانگین قطر عدم هاله رشد اختلاف معنی داری در سطح یک درصد وجود داشت ($P<۰/۰۰۱$)، به طوری که عصاره ها در غلظت ۱۰ درصد، از رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس جلوگیری کرده و میانگین قطر هاله عدم رشد ۰/۱۱±۲۱ میلی متری بود. میانگین قطر هاله عدم رشد برای کلرهگزیدین ۲ درصد، ۰/۰۶±۱۸ میلی متر بود. قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس، در فرمولاسیون عصاره ها بیشتر از کلرهگزیدین ۲ درصد بود که این نشان می دهد که مخلوط عصاره ها می تواند از کلرهگزیدین ۲ درصد موثرتر باشد (نمودار ۱).

در بررسی میکروپلیت مشاهده شد که در چاهک هایی که حاوی رقت های ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲ و ۰/۱۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر بودند، باکتری رشد کرده بود و عصاره خاصیت مهار کنندگی در این رقت ها را نداشت. در رقت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر رشد باکتری مشاهده نمی شد که نشان می دهد این رقت را می توان به عنوان MIC در نظر گرفت (جدول ۱). برای بدست آوردن MBC، محتوای چاهک شماره ۲ که حاوی رقت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره بود، کشت داده شد. در بررسی پلیت محیط کشت، رشد مشاهده نشد و بر همین اساس، رقت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره را می توان به عنوان MBC در نظر گرفت. فرمولاسیون عصاره ها در چاهک های ۱، ۲ و ۳ باعث عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس شد ولی کلرهگزیدین به عنوان کنترل مثبت فقط در چاهک ۱ و ۲ باعث عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس شد (جداول ۱ و ۲).



نمودار ۱ : مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد کلرهگزیدین و فرمولاسیون ۱۰ درصد از عصاره ها در روش چاهک

جدول ۱ : تعیین اثر آنتی باکتریایی عصاره گیاهی در رقت های متفاوت به روش MIC

گروه های مورد مطالعه									
(۱)	(۲)	(۳)	(٤)	(٥)	(٦)	(۷)	(۸)	(۱۱)	(۱۲)
۱۰	۰/۵	۲/۵	۱/۲۵	۰/٦۲۵	۰/۳۱۲	۰/۱٥٦	۰/۰۷۸	عصاره + محیط کشت مولرهینتون براث	محیط کشت مولرهینتون براث
-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

(+): رشد باکتری، (ـ): عدم رشد باکتری

جدول ۲ : تعیین اثر آنتی کلرهگزیدین با رقت های متفاوت به روش MIC

گروه های مورد مطالعه								
(۱)	(۲)	(۳)	(٤)	(٥)	(٦)	(۷)	(۱۱)	(۱۲)
۰/۲	۰/۱	۰/۰۵	۰/۰۲۵	۰/۰۱۲۵	۰/۰۰٦	۰/۰۰۳	عصاره+ محیط کشت مولرهینتون براث	محیط کشت مولرهینتون براث
-	-	+	+	+	+	+	+	+

(+): رشد باکتری، (ـ): عدم رشد باکتری

بحث

مطالعه حاضر به بررسی تاثیر فرمولاسیون محتوی هر سه گیاه گل سرخ، سماق و گلنار بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس پرداخت. نتایج نشان داد که این فرمولاسیون اثر آنتی باکتریال مناسبی در مقابل باکتری استرپتوکوکوس موتانس دارد.

در مورد نحوه تاثیر عصاره ها برروی میکروارگانیسمها، اختلاف نظرهای بسیاری وجود دارد. میکروبیولوژیست ها مبارزه با ارگانیسم استرپتوکوک موتانس را بر دو پایه ممانعت از رشد باکتری و جلوگیری از تولید اسید می‌دانند.[۳۱] نتایج مطالعه رادمهر و همکاران[۳۲] نشان داد از میان اجزای به دست آمده در اسانس سماق، مهم ترین جزء دارای خاصیت ضد میکروبی، احتمالاً ماده ی تانن و ترکیبات فنلی است که با دارا بودن میزان بالایی در ترکیب اسانس می تواند خواص ضد میکروبی آن را به خوبی توجیه کند. همچنین، تانن و پلی فنل ها فراوان ترین ترکیب شیمیایی موجود در میوه و گیاه انار هم می باشد.[۳۳] تأثیر ضدباکتریایی گیاه انار همیشه به فعالیت آنتی اکسیدانی آن که عمدتاً به میزان ترکیبات فنلی و تانن ها مربوط می شود، نسبت داده شده است.[۳٤] علاوه بر سماق و گلنار یکی از ترکیبات اصلی گل سرخ هم، تانن می باشد.[۳٥] باتوجه به نتایج مطالعه حاضر و تاثیر آنتی باکتریال مناسب فرمولاسیون محتوی سه عصاره بررسی شده، می توان تاثیر آنتی باکتریال این فرمولاسیون را مربوط به وجود ترکیب شیمیایی تانن و پلی فنل در این عصاره ها دانست که البته نیاز به مطالعات بیشتر می باشد.

در مطالعه حاضر، MIC و MBC عصاره ها، ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و ۵ میلی گرم بر میلی لیتر به دست

آمد. Babpour و همکاران[۳۶] هم راستا با مطالعه حاضر، تاثیر عصاره آبی سماق روی باکتری های استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سنگوئیس را بررسی کردند که MIC را معادل ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بیان کردند. همچنین در مطالعه دستجردی و همکاران[٤]، تاثیر ضدباکتریایی عصاره آبی سماق بر روی بیوفیلم باکتری استرپتوکوکوس موتانس اثبات شد. نتایج MIC مطالعه حاضر به طور معنی داری بالاتر از MIC مطالعه دستجردی بود، در حالیکه MBC مطالعه دستجردی بالاتر از MBC مطالعه حاضر بدست آمد. مزیت مطالعه دستجردی نسبت به مطالعه حاضر، انجام تست های MIC و MBC روی گونه های دیگر استرپتوکوک دهانی مانند سوبرینوس، سانگوئینیس و سالیواریوس می باشد.

حاجی فتحی و همکاران[۱] در مطالعه ای، تاثیر عصاره الکلی گلنار را بر روی باکتری های دهان بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که عصاره الکلی گلنار مانع پرولیفراسیون باکتری می شوند و بیشترین تاثیر را با MIC و MBC ۳/۹ میلی گرم بر میلی لیتر بر روی باکتری استرپتوکوک موتانس دارد. مقادیر MIC این مطالعه نصف MIC مطالعه حاضر می باشد، اما نتایج MBC مطالعه کمتر از MBC مطالعه حاضر می باشد.

مطالعه Rosas Pinon و همکاران[۳۷]، به بررسی تاثیر عصاره گلنار بر درمان عفونت های دهانی پرداخت و نشان داد که عصاره آبی و عصاره الکلی گلنار، خاصیت آنتی باکتریال مناسبی در برابر استرپتوکوک موتانس و پورفیرومونانس جینجیوالیس دارند که این نتایج نیز با نتایج مطالعه حاضر همسو است.

Ulusoy و همکاران[۱۷]، به این نتیجه رسیدند که عصاره روغنی گل رز از عصاره آبی آن خاصیت ضد باکتریایی بیشتری دارد، در حالیکه در مطالعه حاضر به علت عدم امکان استفاده از عصاره روغنی در محیط دهان از عصاره آبی گل رز استفاده شد. Tsai و همکاران[۱٦]، تاثیر ضدمیکروبی عصاره متانولی ۱۲ گیاه مختلف بر روی سویه های استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس سوبرینوس و استرپتوکوکوس سنگوئیس را بررسی کردند و میزان MIC عصاره متانولی گل سرخ را در مورد هر سه سویه بیشتر از ۸ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش کردند که با مطالعه حاضر متفاوت بود. این تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت در خاستگاه گل سرخ باشد.[۳۸] Özkan و همکاران[۱٦]، همچنین نتیجه گرفتند که گل رز خاصیت آنتی اکسیدان و آنتی باکتریال موثری دارند و خاصیت آنتی باکتریال آن به نوع باکتری، نوع عصاره و غلظت آن بستگی دارد.

پژوهی و همکاران[۳۹] تاثیر عصاره آبی میوه سماق بر باکتری های پاتوژن در شرایط دمایی مختلف را مورد بررسی قراردادند. نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره به صورت معنی داری از رشد هر چهار باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا تایفی موریوم و اشرشیاکلای در هر دو دمای ٤ و ۲۵ درجه سانتیگراد ممانعت نمود. Ozkan و همکاران[۱٦] با بررسی تاثیر عصاره الکلی گل سرخ بر ۱۵ نوع باکتری (باسیلوس سرئوس، انتروکوک فکالیس، مایکوباکتریوم سمگماتیس، اشرشیاکولی، کلبسیلا پنومونیه، یرسینیا انتروکولیتیکا، انتروباکتر اثروژنز، سالمونلا تیفی موریوم، سالمونلا انتریتیدیس، سودوموناس فلورسنس، آئروموناس هیدروفیلا، استافیلوکوکوس اورئوس واسترپتوکوکوس موتانس) نشان دادند که عصاره گل سرخ به جز اشریشیاکولی، سایر عوامل بیماریزای فوق را مهار می کند. مردانی و همکاران[٤۰]، اثر ضد باکتریایی عصاره هیدرو الکلی گلنار (Punica granatum) و چند نوع آنتی بیوتیک را بر باکتری های

شیگلافلکسنری، آنتروکوکوس فکالیس، استریتوکوکوس پیوژنز و هموفیلوس آنفلوانزا در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. یافته ها نشان داد عصاره اتانولی گلنار در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر و وابسته به دوز بر باکتری های مورد آزمایش به استثنای باکتری آنتروکوکوس فکالیس، اثر مهاری معنی دار داشته است. باتوجه به اینکه اثرات آنتی باکتریال سماق، گلنار و گل سرخ هرکدام به تنهایی در مطالعات قبلی به اثبات رسیده، مطالعه حاضر به بررسی تاثیر فرمولاسیون محتوی هر سه این گیاهان بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس پرداخت و نتایج نشان داد که این فرمولاسیون اثر آنتی باکتریال مناسبی بر این باکتری دارد.

Ustrell-Borràs و همکاران[۴۱] در مطالعه ای، به این نتیجه رسیدند که استفاده از دهانشویه حاوی الکل یک ریسک فاکتور مستقل برای پیشرفت سرطان سر و گردن نیست. با این حال، خطر سرطان سر و گردن را در ارتباط با سایر ریسک فاکتورهای سرطان زا افزایش می دهد. Satpathy و همکاران[۴۲]، همچنین نتیجه گرفتند که استفاده از دهانشویه با الکل زیاد با شروع درد زودرس و شدت درد بیشتر همراه بوده است. بعلاوه، مدت زمان درد در افراد استفاده کننده از دهانشویه با الکل زیاد، طولانی تر بود. لازم به ذکر است، در مطالعه حاضر به منظور تهیه رقت های مختلف از عصاره سماق، گلنار و گل سرخ، از الکل استفاده نشد و لذا، در صورت ساخت دهانشویه با استفاده از روش این مطالعه، آثار سوء محلول‌های مشابه با حلال الکل در حفره دهان بروز نمی‌کند.

از محدودیت های مطالعه حاضر می توان به این نکته اشاره کرد که فقط عصاره گیاهان برداشت شده در یک زمان و مکان مشخص مورد ارزیابی قرار گرفته است. همچنین، میکروارگانیسم های جمع آوری شده از حفره دهان مورد ارزیابی قرار نگرفته و از سویه های میکروبی استاندارد استفاده شد. مطالعات آینده برای تأیید نتایج در محیط طبیعی بیولوژیکی (حفره دهان) مورد نیاز است. پیشنهاد می شود مطالعات بیشتری در راستای تعیین بهترین دوز موثر و بدون عارضه و همین‌طور ماده موثره صورت پذیرد.

نتیجه گیری

عصاره آبی سماق، گلنار وگل سرخ دارای خواص آنتی‌باکتریال علیه استرپتوکوکوس موتانس می‌باشد. فرمولاسیون عصاره های مورد مطالعه، تاثیر آنتی باکتریال بیشتری روی استرپتوکوکوس موتانس نسبت به کلرهگزیدین ۲ درصد نشان دادند. طبق نتایج آزمایشات، MIC عصاره ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MBC آن ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. فرمولاسیون این عصاره ها در ساخت ترکیبات پیشگیری از پوسیدگی پیشنهاد می شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه به شماره ۵۷۲ دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد می باشد.

منابع

1. Hajifattahi F, Moravej-Salehi E, Taheri M, Mahboubi A, Kamalinejad M. Antibacterial effect of hydroalcoholic extract of punica granatum linn. Petal on common oral microorganisms. Int J Biomater 2016; 2016:8098943.
2. Dziedzic A, Kubina R, Wojtyczka RD, Kabala-Dzik A, Tanasiewicz M, Morawiec T. The antibacterial effect of ethanol extract of polish propolis on mutans streptococci and lactobacilli isolated from saliva. Evid Based Complement Alternat Med 2013; 2013:681891.
3. Hillman JD, Socransky SS, Shivers M. The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. Arch Oral Biol 1985; 30(11-12):791-5.

4. Vahid-Dastjerdi E, Sarmast Z, Abdolazimi Z, Mahboubi A, Amdjadi P, Kamalinejad M. Effect of Rhus coriaria L. water extract on five common oral bacteria and bacterial biofilm formation on orthodontic wire. Iran J Microbiol 2014; 6(4):269-75.

5. Gulube Z, Patel M. Effect of Punica granatum on the virulence factors of cariogenic bacteria Streptococcus mutans. Microb Pathog 2016; 98:45-9.

6. Gunsolley JC. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. J Dent 2010; 38(Suppl 1):S6-10.

7. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. Int J Food Microbiol 2004; 94(3):223-53.

8. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999; 12(4):564-82.

9. Taheri JB, Azimi S, Rafieian N, Zanjani HA. Herbs in dentistry. Int Dent J 2011; 61(6):287-96.

10. Giovanelli S, Giusti G, Cioni PL, Minissale P, Ciccarelli D, Pistelli L. Aroma profile and essential oil composition of Rhus coriaria fruits from four Sicilian sites of collection. Ind Crops Prod 2017; 97:166-74.

11. Gehrke IT, Neto AT, Pedroso M, Mostardeiro CP, Da Cruz IB, Silva UF, et al. Antimicrobial activity of Schinus lentiscifolius (Anacardiaceae). J Ethnopharmacol 2013; 148(2):486-491.

12. Shabbir A. Rhus coriaria linn, a plant of medicinal, nutritional and industrial importance: a review. J Anim Plant Sci 2012; 22(2):505-12.

13. Abu-Reidah IM, Ali-Shtayeh MS, Jamous RM, Arráez-Román D, Segura-Carretero A. HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from Rhus coriaria L. (Sumac) fruits. Food Chem 2015; 166:179-91.

14. Bhadbhade SJ, Acharya AB, Rodrigues SV, Thakur SL. The antiplaque efficacy of pomegranate mouthrinse. Quintessence Int 2011; 42(1):29-36.

15. Menezes SM, Cordeiro LN, Viana GS. Punica granatum (pomegranate) extract is active against dental plaque. J Herbal Pharmacother 2006; 6(2):79-92.

16. Özkan G, Sagdic O, Baydar N, Baydar H. Note: antioxidant and antibacterial activities of Rosa damascena flower extracts. Rev Agaroq Tecnol Alimen 2004; 10(4):277-81.

17. Ulusoy S, Boşgelmez-Tınaz G, Seçilmiş-Canbay H. Tocopherol, carotene, phenolic contents and antibacterial properties of rose essential oil, hydrosol and absolute. Curr Microbiol 2009; 59(5):554-8.

18. Yassa N, Masoomi F, Rankouhi SR, Hadjiakhoondi A. Chemical composition and antioxidant activity of the extract and essential oil of Rosa damascena from Iran, population of Guilan. DARU J Pharm Sci 2015; 17(3):175-80.

19. Tofighi Z, Molazem M, Doostdar B, Taban P, Shahverdi AR, Samadi N, et al. Antimicrobial activities of three medicinal plants and investigation of flavonoids of Tripleurospermum disciforme. Iran J Pharm Res 2015; 14(1):225-31.

20. Andoğan BC, Baydar H, Kaya S, Demirci M, Özbaşar D, Mumcu E. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. Arch Pharm Res 2002; 25(6):860-4.

21. Westfelt E, Nyman S, Lindhe J, Socransky S. Use of chlorhexidine as a plaque control measure following surgical treatment of periodontal disease. J Clin Periodontol 1983; 10(1):22-36.

22. Stratul SI, Sculean A, Rusu D, Didilescu A, Kasaj A, Jentsch H. Effect of smoking on the results of a chlorhexidine digluconate treatment extended up to 3 months after scaling and root planing-a pilot study. Quintessence Int 2011; 42(7):555-63.

23. Berchier CE, Slot DE, Van der Weijden GA. The efficacy of 0.12% chlorhexidine mouthrinse compared with 0.2% on plaque accumulation and periodontal parameters: a systematic review. J Clin Periodontol 2010; 37(9):829-39.

24. Lorenz K, Bruhn G, Heumann C, Netuschil L, Brecx M, Hoffmann T. Effect of two new chlorhexidine mouthrinses on the development of dental plaque, gingivitis, and discolouration. A randomized, investigator-blind, placebo-controlled, 3-week experimental gingivitis study. J Clin Periodontol 2006; 33(8):561-7.

25. Van Strydonck DA, Slot DE, Van der Velden U, Van der Weijden F. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. J Clin Periodontol 2012; 39(11):1042-55.

26. Brown AT, Largent BA, Ferretti GA, Lillich TT. Chemical control of plaque-dependent oral diseases: the use of chlorhexidine. Compendium 1986; 7(10):719-20.

27. Ali Mohammadi I, Nasr Esfahani M, Hakimaneh SM, Talei D, Bafandeh MA. Comparison of the effect of herbal mouthwashes and chlorhexidine on gingival healing after crown lengthening surgery (a clinical trial). J Mashhad Dent Sch 2020; 44(3):248-58.

28. Houshmand B, Mortazavi H, Alikhani Y, Abdolsamadi H, AhmadiMotemayel F, ZareMahmoudabadi R. In vitro evaluation of antibacterial effect of myrtus extract with different concentrations on some oral bacteria. J Mashhad Dent Sch 2011; 35(2):123-30.
29. Masoumipour F, Hassanshahian M, Sasan H, Jafarinasab T. Antimicrobial effect of combined extract of three plants camellia sinensis, teucrium polium and piper nigrum on antibiotic resistant pathogenic bacteria. Iran J Med Microbiol 2019; 13(2):114-24.
30. Butassi E, Svetaz LA, Ivancovich JJ, Feresin GE, Tapia A, Zacchino SA. Synergistic mutual potentiation of antifungal activity of Zuccagnia punctata Cav. and Larrea nitida Cav. extracts in clinical isolates of *Candida albicans* and Candida glabrata. Phytomedicine 2015; 22(6):666-78.
31. Loo CY, Corliss DA, GaneshkumarN. Streptococcus gordonii biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. J Bacteriol 2000; 182(5):1374-82.
32. Radmehr B, Khamda K, Rajabi khorami A. Sumac (Rhus Coriaria L.) essential oil composition and its antimicrobial effect on *salmonella typhimurium*. J Food Hyg 2011; 2:1-9.
33. Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (Punica granatum L.): a review. Altern Med Rev 2008; 13(2):128-44.
34. Duman AD, Ozgen M, Dayisoylu KS, Erbil N, Durgac C. Antimicrobial activity of six pomegranate (Punica granatum L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. Molecules 2009; 14(5):1808-17.
35. Zarghami M, Farzin D, Bagheri K. Anti depressant effects of Rosa Damascena on laboratory rats (A controlled experimental blind study. J Mazandaran Univ Med Sci 2001; 11(33):27-33.
36. Angaji EB, Angaji SM. Antimicrobial effects of four medicinal plants on dental plaque. J Med Plants Res 2009; 3(3):132-7.
37. Rosas-Piñón Y, Mejía A, Díaz-Ruiz G, Aguilar MI, Sánchez-Nieto S, Rivero-Cruz JF. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. J Ethnopharmacol 2012; 141(3):860-5.
38. Tsai TH, Tsai TH, Chien YC, Lee CW, Tsai PJ. In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: a comparative study of green tea versus different herbs. Food Chem 2008; 110(4):859-64.
39. Pajohi AM, Yadollahi BM, Bazargani GB. The effect of water extract of Rhus coriaria l. on the pathogenic bacteria at different temperatures. J Babol Univ Med Sci 2016; 18(2):41-7.
40. Mardani M. Investigate the antimicrobial extract (Punica granatum) and several types of antibiotics over a few species of bacteria in vitro. International Conference on Applied Res in Agriculture, Tehran, Iran; 2019.
41. Ustrell-Borràs M, Traboulsi-Garet B, Gay-Escoda C. Alcohol-based mouthwash as a risk factor of oral cancer: a systematic review. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2020; 25(1):e1-12.
42. Satpathy A, Ravindra S, Porwal A, Das AC, Kumar M, Mukhopadhyay I. Effect of alcohol consumption status and alcohol concentration on oral pain induced by alcohol-containing mouthwash. J Oral Sci 2013; 55(2):99-105.