بررسی آزمایشگاهی اثر ضدمیکروبی عصاره آبی الکلی برگ بارهنگ (Plantago Major) با و بدون افزودن نانوذرات اکسیدروی بر استرپتوکوک موتانس

سپیده صفری [۱]، رضا زارع محمودآبادی [۲]، محسن عارف نژاد [۳]، شکوه سادات حامدی [۴]، مریم مهرابخانی [۵]*
[۱] دستیار تخصصی گروه پروتزهای دندانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان، خوراسگان، ایران
[۲] دانشیار گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۳] استادیار میکروب شناسی پزشکی، دانشکده پرستاری کاشمر، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۴] استادیار گروه داروسازی سنتی بالینی، دانشکده طب سنتی ایرانی و مکمل، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۵] دانشیار گروه دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ ارائه مقاله: ۹۸/۱۲/۴ – تاریخ پذیرش: ۹۹/۹/۱۵

Antimicrobial Effect of Hydroalcoholic Extract of *Plantago Major* Leaves with and without Zinc Oxide Nanoparticles on *Streptococcus Mutans*: An In Vitro Study

Sepideh Safari [1], Reza Zare Mahmoudabadi [2], Mohsen Arefnezhad [3], Shokooh Hamedi [4], Maryam Mehrabkhani [5]*

[1] Postgraduate Student, Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Islamic Azad University of Khorasgan Branch, Isfahan, Iran
[2] Associate Professor, Department of Pathology, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[3] Assistant professor in Molecular Microbiology, Kashmar Center of Higher Health Education, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Clinical Persian pharmacy, School of Persian and Complementary Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[5] Associate Professor, Department of Pediatric dentistry, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Received: 23 February 2020; Accepted: 5 December 2020

Introduction: Resistance of oral pathogenic bacteria to chlorhexidine mouthwash is increasing; therefore, researchers are looking for a replacement of chlorhexidine with suitable herbal mouthwash. This study aimed to investigate the antimicrobial effect of hydroalcoholic extract of *Plantago major* (a native strain of Khorasan, Iran) with and without zinc oxide nanoparticles on *Streptococcus mutans*.

Materials and Methods: In this in vitro study, the samples were tested in two groups of hydroalcoholic extract of *Plantago major* leaves with and without zinc oxide nanoparticles. To determine the minimum bactericidal concentration and minimal inhibitory concentration, agar diffusion and broth dilution methods were applied, respectively. A concentration of 500 ppm zinc oxide nanoparticles with a 0.4 nm diameter was used continuously in all stages of the experiment. The materials used in this study consisted of a standard strain of *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), chlorhexidine 0.2% as a positive control, and distilled water as a negative control.

Results: The mean diameter of the growth inhibition zone was obtained as 15±1 mm for the hydroalcoholic extract of *Plantago major* leaves with zinc oxide nanoparticles at a concentration of 1.56 mg/ml. The same extract at the same concentration, however without zinc oxide nanoparticles, showed the mean diameter of growth inhibition zone of 7.67±0.57 mm. The results of the t-test were indicative of a significant difference between the two groups (P-value<0.001).

Conclusion: In this study, the antimicrobial effect of *Plantago major* leaves extract with or without zinc oxide nanoparticles was well established. This research is peculiar since it revealed the effectiveness of low concentrations of this plant in killing *Streptococcus mutans*.

Key words: Tooth decay, *Streptococcus mutans*, Khorasan *Plantago major* leaf, alcoholic aqueous extract, Zinc oxide nanoparticles, Chlorhexidine

Corresponding Author: mehrabkhanim@mums.ac.ir

J Mash Dent Sch 2021; 45(1): 54-62 .

---

* مولف مسؤول، نشانی: مشهد، میدان پارک، دانشکده دندانپزشکی، گروه دندانپزشکی کودکان، تلفن ۰۹۱۵۳۱۷۶۹۶۱

E-mail: mehrabkhanim@mums.ac.ir

چکیده

مقدمه: مقاومت باکتری های بیماریزای دهان نسبت به دهانشویه کلرهگزیدین در حال افزایش است و محققین به دنبال دهانشویه گیاهی جایگزین مناسب برای کلرهگزیدین می باشند. هدف این مطالعه بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره آبی الکلی برگ بارهنگ (*Plantago major*، سویه بومی خراسان) حاوی نانو ذرات اکسیدروی و بدون آن بر استرپتوکوک موتانس بود.

مواد و روش ها: این مطالعه به صورت آزمایشگاهی انجام شده است. نمونه ها در دوگروه عصاره آبی الکلی برگ بارهنگ حاوی نانو ذرات اکسیدروی و بدون آن مورد آزمایش قرار گرفتند. برای تعیین MBC از روش Agar diffusion و برای تعیین MIC از روش Broth Dilution استفاده شد. از غلظت ppm ۵۰۰ نانو ذرات اکسید روی با قطر ۰/۴ نانومتر به صورت ثابت در تمامی مراحل آزمایش استفاده گردید. در این بررسی از باکتری استرپتوکوکوس موتانس سویه استاندارد ATCC 25175، کنترل مثبت از کلرهگزیدین (۰/۲ درصد) و کنترل منفی آب مقطر استفاده شد.

یافته ها: عصاره آبی الکلی برگ بارهنگ حاوی ذرات نانو اکسیدروی در غلظت mg/ml ۱/۵۶، میانگین قطر هاله عدم رشد (۱±۱۵) میلی متر را نشان داد. در حالیکه با عصاره آبی الکلی برگ بارهنگ به تنهایی در همان غلظت، میانگین قطر هاله عدم رشد (۰/۵۷±۷/۶۷) میلی متر مشاهده گردید. آزمون آماری تی تفاوت معنی داری را بین دو گروه مورد مطالعه نشان داد ($P<0/001$).

نتیجه گیری: در این مطالعه اثر ضدمیکروبی عصاره برگ بارهنگ با و بدون ترکیب با نانو اکسیدروی، بخوبی مشخص شده است. نکته مهم این بررسی، موثر بودن غلظت پایین این گیاه در از بین بردن باکتری استرپتوکوکوس موتانس بود.

کلمات کلیدی: پوسیدگی دندان، استرپتوکوک موتانس، برگ بارهنگ خراسان، عصاره آبی الکلی، نانو ذرات اکسید روی، کلرهگزیدین

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۴۰۰ دوره ۴۵ / شماره ۱ : ۶۲-۵۴.

مقدمه

استرپتوکوک های اسیدوژنیک گروه موتانس از میکروارگانیسم های اصلی ایجاد پلاک و عامل پوسیدگی دندان محسوب می شوند.[۱و۲] در کنار روش های کنترل مکانیکی پلاک در بیماران با ریسک بالای پوسیدگی، دهانشویه های ضدمیکروبی متفاوتی به عنوان مکمل رفع این اثر پیشنهاد شده است.[۳]

امروزه دهانشویه کلرهگزیدین به دلیل اثر ضد باکتریایی مناسب، دوام نسبتاً طولانی و عدم سمیت کاربرد فراوانی دارد؛ لیکن دارای عوارض گوناگونی همچون ایجاد رنگدانه های دندانی، تغییر حس چشایی، سوزش، خشکی دهان، متفلس شدن لثه و اثرات سیستمیک منفی در صورت بلع می باشد.[۳] بدین منظور مطالعات متعددی بر روی عصاره گیاهان مختلف دارویی برای جایگزینی دهانشویه کلرهگزیدین انجام شده است تا بتوانند دهانشویه گیاهی مناسب و با عوارض جانبی کمتر بدست آورند.[۴]

مطالعات متعددی برای جایگزینی دهانشویه گیاهی بویژه با توجه به خاصیت ضدباکتری، ویروسی و قارچی انجام شده است.[۵-۱۳] از جمله مقایسه اثر گیاه چای سبز و کلرهگزیدین بر کاهش استرپتوکوک موتانس، که اثر مهاری بیشتر آن با توجه به ترکیبات مطرح شده، گزارش گردیده است. همچنین در مقایسه بین دهان شویه روغن نارگیل و کلرهگزیدین در کاهش استرپتوکوک موتانس[۶] تغییر قابل توجهی مشاهده نشد و بین این دو دهانشویه از نظر آماری تفاوت معنی داری در اثرات آنتی باکتریال وجود نداشت.[۸] دهانشویه گیاهی سیر نیز بعلت الیسین موجود در آن در کاهش تعداد باکتری موثر بود اما تفاوت معنی داری با کلرهگزیدین نداشت.[۱۱] مطالعات زیادی با هدف بررسی تاثیر ضدباکتریایی غلظت های مختلف عصاره گیاهان مختلف در مقایسه با دهانشویه کلرهگزیدین انجام شده است که هدف اکثر آنها یافتن ترکیب موثر برای ساخت دهانشویه جایگزین کلرهگزیدین بوده است.[۱۴-۱۹]

گیاه بارهنگ (Plantago major) در طب سنتی ایران جایگاه خاصی داشته و در کتاب قانون ابن سینا به عنوان از بین برنده عفونت دهان و دندان معرفی شده است.[٢٠] این گیاه پایا، ظاهراً بی کرک یا کمی کرکپوش با ریشه‌ای کوتاه است و ساقه ای به طول ٧٠-١٠ سانتی متر دارد. برگ‌های آن تیره رنگ، کوچک و تخم مرغی شکل است و از اواسط فصل بهار به بعد جمع آوری می‌شود. برگ‌های بارهنگ برای درمان سرفه و تحریک غشای مخاطی به منظور مقابله با عوارض عفونت‌های مجاری تنفسی، کاربرد دارد. Plantain یک نام هندی اروپایی به معنای "داروی زندگی" است. مطالعات نشان می دهد که عصاره متانولی بارهنگ خاصیت آنتی باکتریال در مقابل باکتری های گرم مثبت و منفی دارد.[٢١] همچنین یکی از مهمترین خواص آن خاصیت ضدالتهابی و ضدباکتریایی است که میتواند ناراحتی پوست از جمله التهاب، گزیدگی حشرات، بریدگی زخم، اگزما و شوره سر را درمان کند. برای این منظور به بررسی اثر عصاره آبی الکلی برگ گیاه بارهنگ بومی خراسان با توجه به فرهنگ بومی مصرف آن با و بدون افزودن نانوذرات اکسیدروی بر مهار رشد باکتری استرپتوکوک موتانس پرداخته شد. علت استفاده از عصاره هیدروالکلی در این مطالعه اینبود که حداکثر ترکیبات فنلی شامل تانن ها که نقش موثری در خاصیت آنتی میکروبی گیاه مذکور دارند، از گیاه بارهنگ استخراج شود.

مواد و روش ها

در این مطالعه آزمایشگاهی در ابتدا برگ بارهنگ خشک شده در آسیاب خرد شد. ٥٠٠ گرم برگ بارهنگ در محلول یک به سه آب والکل به مدت ٧٢ ساعت خیسانده و به مدت ٧٢ ساعت در اون شیکردار گذاشته و مخلوط به دست آمده از فیلتر کاغذی واتمن گذرانده شد. سپس با دستگاه حذف حلال در خلا و دمای ٤٠ درجه سانتیگراد، تغلیظ گردید. ماده تهیه شده در فریزر ٢٠- درجه تا انجام آزمایش نگهداری گردید. ١ گرم از عصاره حاصله در آب مقطر وارد و رقیق شد تا غلظت های مختلف ١٢/٥، ٦/٢٥ و ٣/١٢٥ میلی گرم بر میلی لیتر برای عصاره های آبی- الکلی بدست آید. برای انجام آزمایشات، از غلظت اولیه ١٠٠ میلی گرم در میلی لیتر عصاره آبی – الکلی برگ بارهنگ استفاده گردید. بدین نحوه که ١ گرم از این ماده با ١٠ میلی لیتر آب مقطر استریل به عنوان حلال در شرایط استریل، حل شدو به مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور شیکر دار اجازه داده شد تا انحلال کامل صورت گیرد. پس از این مدت، توسط صافی واتمن استریل صاف گردید.[٢٢]

استانداردسازی بر اساس تعیین محتوای فنول تام از روش فولین- سیکالتیو (Folin-Ciocalteu) انجام شد. به این منظور ١ میلی لیتر عصاره گیاه با ٥ میلی لیتر فولین سیکالتیو، که با آب مقطر ١٠ برابر رقیق شده بود، ترکیب شده و به مدت ١٠ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ٤ میلی لیتر محلول سدیم بیکربنات با غلظت ٧٥ گرم در لیتر به آن اضافه و به مدت ٣٠ دقیقه دور از نور، در دمای اتاق نگهداری شد. در نهایت جذب نوری این مخلوط با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٧٦٥ نانومتر اندازه گیری شد. محتوی تام فنلی عصاره گیاه بر حسب معادل میلی گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره خشک با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک محاسبه شد. بر اساس داده های بدست آمده، مقادیر فنل تام موجود در عصاره هیدروالکلی از برگ گیاه بارهنگ برابر ٤١٥/٦٦ میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره بود.[٢٣]

در این مطالعه، نمونه ها از غلظت اولیه ١٠٠ میلی گرم در میلی لیتر به شکل رقت سازی سریالی تا ١٥ رقت آزمایشگاهی، مورد بررسی قرار گرفتند. کمترین غلظت مورد استفاده در این آزمایش ٦ میکروگرم در میلی لیتر بود.

برای این منظور در ابتدا، ١٦ لوله به حجم ١/٥ میلی لیتری (Eppendroff, USA) انتخاب گردید. در ١٥ لوله، ٥٠٠ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد. در اولین لوله، ١ میلی لیتر (١٠٠٠ میکرولیتر) از لوله استوک ١٠٠ میلی گرم در میلی لیتر بطور خالص از استوک اولیه ریخته شد. بعد از آن، ٥٠٠ میکرولیتر از لوله استوک برداشته و در لوله شماره یک با ٥٠٠ میکرولیتر آب استریل موجود در لوله ترکیب و بخوبی یکنواخت شد. اینکار تا شانزدهمین لوله تکرار و از آخرین لوله به حجم برداشت شده، دور ریخته شد. همچنین در این مطالعه، از محلول کلوییدی نانوذرات اکسیدروی با قطر ٤ نانومتر با غلظت ٥٠٠ ppm استفاده شد.[٢٤] در کلیه مراحل انجام آزمایشات غلظت نانوذره اکسیدروی ثابت در نظر گرفته شد. نسبت محلول نانوذره اکسیدروی به محلول عصاره آبی-الکلی بارهنگ در این بررسی به نسبت مساوی ٥٠ درصد از هر دو ماده استفاده گردید. در این بررسی از باکتری Streptococcus Mutans ATCC 25175 استفاده شده است.

جهت بررسی خواص ضدباکتریائی عصاره آبی-الکلی برگ بارهنگ از دو روش Broth Dilution و Cup and plate method agar diffusion استفاده گردید. در روش Broth Dilution از حجم مساوی باکتری با کدورت ١ مک فارلند با حجم مساوی عصاره آبی-الکلی برگ بارهنگ به تنهائی استفاده شد. در لوله های ١٦ گانه با رقتهای سریالی، ١ میلی لیتر باکتری و ١ میلی لیتر عصاره آبی-الکلی برگ بارهنگ اضافه شد و لوله ها به مدت ٤٨ ساعت در جار بیهوازی با استفاده از گاز پک (Merck-Germany) و ٢٤ ساعت در شرایط هوازی در دمای ٣٥ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از این مدت، لوله ها جهت ظهور شفافیت که به معنای مهار کنندگی رشد باکتری است (MIC) مورد بررسی قرار گرفتند. برای به دست آوردن میزان کشندگی (MBC) عصاره آبی-الکلی برگ بارهنگ علیه باکتری مورد مطالعه، لوله های ١٦ گانه بر روی محیط بلاد آگار کشت شد و در شرایط ذکر شده در بالا نگهداری گردید. آزمایش های مربوط به MBC برای هر غلظت سه بار انجام شد. لازم به ذکر است آزمایش های مربوط به MIC برای هر غلظت یکبار انجام شد. آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی با قطر هاله عدم رشد صفر میلی متر، دهانشویه کلرهگزیدین ٠/٢ درصد به عنوان کنترل مثبت با قطر هاله عدم رشد ٢٠ میلی متر و نانو ذرات اکسیدروی به عنوان کنترل مثبت با قطر هاله عدم رشد ١٧ میلی متر به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

جهت بررسی تاثیر خواص ضدباکتریایی ترکیب محلول نانو ذره اکسیدروی و عصاره آبی-الکلی برگ بارهنگ تمامی اعمال آزمایشگاهی بالا عینا انجام شد.

در روش Cup and plate method agar diffusion، از محیط کشت Muller Hinton Agar (Conda ; Spain) همراه با ٥ درصد خون دفیبرینه گوسفند (انستیتو حصارک کرج) استفاده شد. در ابتدا از کدورت ١ مک فارلند باکتری مورد مطالعه به میزان ١٠٠ میکرو لیتر برداشت کرده و در سطح آگار در شرایط استریل با استفاده از Hook Steak شیشه‌ای به شکل سفره‌ای کشت صورت گرفت. با استفاده از انتهای لوله ٥ میلی متری استریل، به تعداد رقت های مورد مطالعه، گودهایی بر روی محیط کشت ایجاد شد. از رقت های سریالی تهیه شده از عصاره آبی-الکلی بارهنگ به تنهایی حجم ١٠٠ میکرو لیتر در داخل گوده ها ریخته شد. این آزمایشات سه بار انجام شد و در هر بار، آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی و دهانشویه کلرهگزیدین ٠/٢ درصد به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. پلیت ها به مدت ٤٨ ساعت در جار بیهوازی Co2 دار با استفاده از گاز پک (Merck-Germany) و ٢٤ ساعت در انکوباتور (بهداد،

ایران) در شرایط هوازی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. همچنین جهت بررسی تاثیر خواص ضدباکتریایی ترکیب محلول نانو ذره اکسیدروی و عصاره آبی-الکلی برگ بارهنگ تمامی اعمال آزمایشگاهی بالا عینا انجام شد. هاله های عدم رشد ایجاد شده توسط خط کش استاندارد CLSI در واحد میلی متری اندازه گیری و یادداشت گردید. عدد به دست آمده میزان کشندگی (MBC) عصاره آبی-الکلی بارهنگ به تنهائی و ترکیب محلول نانو ذره اکسیدروی و عصاره آبی-الکلی برگ بارهنگ هستند.

تحلیل داده ها با استفاده از آزمون تی مستقل انجام شد. سطح معنی داری در آزمون های آماری برابر ۰/۰۵در نظر گرفته شد.

یافته ها

این مطالعه برای بررسی و مقایسه اثر ضدمیکروبی عصاره آبی الکلی بارهنگ با و بدون افزودن نانو پارتیکل اکسید روی بر باکتری استرپتوکوک موتانس در محیط آزمایشگاهی انجام شد. میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره آبی-الکلی (MBC) برگ بارهنگ (Plantago major) با و بدون افزودن نانو ذره اکسیدروی بر حسب غلظت ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

همانطور که در جدول ۱ قابل مشاهده است بیشترین میزان میانگین هاله عدم رشد ۱۵/۳۳ مربوط به غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره آبی الکلی بارهنگ با و بدون نانوذرات اکسیدروی بود. عصاره بارهنگ با افزودن نانوذرات اکسیدروی در غلظت ۷۸۰ میکروگرم در میلی لیتر نسبت به عصاره در همین غلظت بدون افزودن نانو ذره موثرتر بوده است (P=۰/۰۰۲).

با افزودن نانو ذره اکسیدروی به عصاره آبی الکلی برگ بارهنگ خواص کشندگی باکتری تقویت شد، به طوری که قطر هاله عدم رشد با عصاره برگ بارهنگ، در غلظت ۱/۵٦ میلی گرم در میلی لیتر نیز در دو گروه تحت مطالعه تفاوت معنی داری را نشان داد (P<۰/۰۰۱).

جدول ۱ : مقایسه ی میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره آبی-الکلی برگ بارهنگ (Plantago major) با و بدون نانو ذارت اکسیدروی در مهار رشد باکتری مورد مطالعه

غلظت عصاره (µg/ml)	میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره بدون نانو ذره اکسیدروی میلی متر ± انحراف معیار	میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره با نانو ذره اکسیدروی میلی متر ± انحراف معیار	P-value
۱۰۰	۱٤/۳۳±۱/۵۲	۱٤/۳۳±۱/۵۲	۱
۵۰	۱۵/۳۳±۱/۵۲	۱۵/۳۳±۱/۵۲	۱
۲۵	۱۰/۰±۱/۰	۸/٦۷±۱/۱۵	۰/۲
۱۲/۵	٦/٦۷±۱/۵۲	۹/۳۳±۰/۵۷	۰/۷٤
٦/۲۵	۱۰/۰±۱/۰	۷/۳۳±۱/۵۲	۰/۰٦
۳/ ۱۲۵	۸/۰±۱/۰	۷/٦۷±۰/۵۷	۰/٦٤
۱/۵٦	۷/٦۷±۰/۵۷	۱۵/۰±۱/۰	۰/۰۰۱
۷۸۰	۱۰/۰±۱/۰	۱٤/۳۳±۱/۱۵	۰/۰۰۲

قطر هاله عدم رشد کلرهگزیدین (۲۰ میلی متر) بیشتر از عصاره آبی الکلی بارهنگ با و بدون نانو ذرات اکسیدروی بود.

میزان حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آبی-الکلی (MIC; Minimum Inhibitory Concentration) برگ بارهنگ (Plantago major) با و بدون افزودن نانو ذرات اکسیدروی بر حسب غلظت و شمارش کلنی باکتری استرپتوکوک موتانس در جدول ۲ نشان داده شده است.

همانطور که در جدول ۲ دیده می شود حداقل غلظت مهارکنندگی باکتری در عصاره بدون نانوذرات اکسیدروی، ۲۵ mg/ml و حداقل غلظت مهار کنندگی رشد باکتری در عصاره به همراه نانو ذرات اکسید روی ۱/۵٦ mg/ml بود.

جدول ۲ : غلظت های متفاوت ترکیب عصاره آبی-الکلی برگ بارهنگ با و بدون نانو ذرات اکسید روی و شمارش کلنی باکتری استرپتوکوک موتانس

ردیف	غلظت عصاره	نتیجه کشت باکتری (CFU/mL) بارهنگ بدون نانو ذرات روی	نتیجه کشت باکتری (CFU/mL) بارهنگ همراه نانو ذرات روی
۰	۱۰۰ mg/ml	۰	۰
۱	۵۰mg/ml	۰	۰
۲	۲۵ mg/ml	۱/۵ ×۱۰ ^۸	۱/۵ × ۱۰ ^۸
۳	۱۲/۵ mg/ml	۱/۰ × ۱۰ ^۸	۰/۵ × ۱۰ ^۸
٤	٦/۲۵mg/ml	۱/۰ × ۱۰ ^۸	۱/۰ × ۱۰ ^۸
٥	۳/۱۲۵ mg/ml	۱/۰ × ۱۰ ^۸	۱/٤ × ۱۰ ^۸
٦	۱/٥٦mg/ml	۰/۵ × ۱۰ ^۸	۱/۵ × ۱۰ ^۸
۷	۷۸۰ µg/ml	۱/٤ × ۱۰ ^۸	۱/۵ × ۱۰ ^۸
۸	۳۹۰ µg/ml	۱/۸ × ۱۰ ^۸	۱/۸ × ۱۰ ^۸
۹	۱۹۵ µg/ml	۱/۹ × ۱۰ ^۸	۱/۹ × ۱۰ ^۸
۱۰	۹۷/۵µg/ml	۲/۰× ۱۰ ^۸	۲/۰ × ۱۰ ^۸
۱۱	٤۸/۷۵ µg/ml	۲/۰ × ۱۰ ^۸	۲/۰ × ۱۰ ^۸
۱۲	۲٤/٤ µg/ml	۲/۰ × ۱۰ ^۸	۲/۰ × ۱۰ ^۸
۱۳	۱۲/۲ µg/ml	۲/۰ × ۱۰ ^۸	۲/۰ × ۱۰ ^۸
۱٤	٦ µg/ml	۲/۵ × ۱۰ ^۸	۲/۵ × ۱۰ ^۸
۱۵	۳ µg/ml	۲/۵ × ۱۰ ^۸	۲/۵ × ۱۰ ^۸
۱٦	۱/۵ µg/ml	۲/۵.× ۱۰ ^۸	۲/۵ × ۱۰ ^۸

بحث

این مطالعه جهت بررسی و مقایسه اثر ضدمیکروبی عصاره آبی الکلی بارهنگ با و بدون افزودن نانو پارتیکل اکسید روی بر باکتری استرپتوکوک موتانس در محیط آزمایشگاهی انجام شد. عصاره آبی الکلی برگ بارهنگ در غلظت های ۱۰۰ و۵۰ میلی گرم در میلی لیتر، کشنده و مهارکننده رشد باکتری بود و میانگین قطر هاله عدم رشد نزدیک به کنترل مثبت (کلرهگزیدین) بود.

یافته های مطالعه حاضر، اثر مهاری گیاه بارهنگ در از بین بردن باکتری استرپتوکوک موتانس که یک باکتری گرم مثبت است را نشان می دهد. شاید بتوان اثر کشندگی و مهارکنندگی رشد استرپتوکوک موتانس را به ترکیبات فنلی موجود در برگ بارهنگ مرتبط دانست.[۲۵] Chiang و همکاران[۲۶] تعدادی از گیاهان دارویی از جمله گیاه بارهنگ را بر روی تعدادی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی مورد آزمایش قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین حساسیت را به عصاره اتانولی گیاه بارهنگ دارد و کم ترین هاله بازدارندگی مربوط به باکتری سودوموناسآائروژینوزا می باشد. با توجه به اینکه باکتری های گرم مثبت بعلت داشتن لایه خارجی آبگریز در برابر عصاره و اسانس ها ی گیاهی حساس تر از باکتری های گرم منفی می باشند، با افزودن نانو ذره اکسیدروی به عصاره آبی الکلی برگ بارهنگ خواص کشندگی باکتری تقویت شد، به طوری که عصاره برگ بارهنگ در غلظت ۱/۵۶ میلی گرم در میلی لیتر قطر هاله عدم رشد نزدیک به کنترل مثبت (کلرهگزیدین) را نشان داد.

Thomas و همکاران[۸] در بررسی دهان شویه عصاره چای سبز دریافتند، شستشوی دهان با چای سبز به طور قابل توجهی بهتر از شستشوی دهان با کلرهگزیدین در مهار و رشد باکتری استرپتوکوک موتانس عمل می کند ولی در مهار لاکتوباسیل و مخمر کاندیدا آلبیکانس تفاوت معناداری از خود نشان نداد. این مطالعه ناهمسو با مطالعه حاضر می باشد که علت آن می تواند مربوط به Catechins چای سبز باشد که باعث تثبیت ph پلاک دندانی و کاهش عملکرد باکتری در دهان می گردد. همچنین مطالعه آنها به صورت Invivo انجام شده است. درحالی که مطالعه حاضر بصورت Invitro صورت گرفته است.

Haghgoo و همکاران[۵] نیز نشان دادند که دهانشویه عصاره ریشه گیاه Althaea officinalis در مقایسه با دهانشویه کلرهگزیدین حاوی پنی سیلین، اثر کمتری در مهار استرپتوکوک موتانس و لاکتوباسیل اسیدو فیلوس دارد. البته اثر ضدباکتریایی عصاره با افزایش غلظت ترکیبات پلی فنول های گیاهی آن افزایش یافته بود که با مطالعه حاضر و سایر مطالعات[۲۵-۵] همخوانی دارد.

داوری و همکاران[۲۷] نشان دادند که نانوذرات اکسیدمس و روی در غلظت های ۰/۱ و ۰/۵ درصد در زمان های ۱۵ و ۳۰ روز در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش معنی دار تعداد باکتریها شد. تحقیق حاضر نیز حاکی از افزایش خاصیت ضدباکتریایی عصاره برگ بارهنگ پس از افزودن نانو اکسیدروی بود.

Peedikayil و همکاران[۶] نشان دادند روغن نارگیل به اندازه کلرهگزیدین در مقابله با استرپتوکوک موتانس موثر است. لایه روغنی تشکیل شده بر روی سطح دندان می تواند چسبندگی پلاک و تجمع باکتری را کاهش دهد. روغن نارگیل یکی از رایج ترین روغن ها در ساخت صابون ها است. مواد قلیایی موجود در بزاق همچنین می توانند با روغن منجر به صابون سازی و تشکیل ماده ای صابون مانند شوند که منجر به کاهش چسبندگی پلاک می شود. این مطالعه با مطالعه حاضر، بعلت اثر ترکیبی امولسیون، صابونی سازی و اثرات ضدمیکروبی

تری گلیسیریدهای زنجیره متوسط در روغن نارگیل ناهمسو می باشد. Chavan و همکاران[۱۱] نشان دادند که عصاره سیر در مقایسه با کلرهگزیدین تفاوت معناداری در این خصوص داشته و نسبت به کاهش باکتری موثرتر است. نتایج Chavan و همکاران[۱۱] با مطالعه حاضر ناهمسو بوده که علت آن بسته به ترکیبات موجود در گیاه از جمله آلیسین می باشد که مقدار آن در بارهنگ بسیار ناچیز است. باید خاطر نشان کرد که در مطالعه Chiang و همکاران[۲۶]چهار ترکیب فنولی به نام‌های کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، فرولیک اسید و P-coumaric موجود در بارهنگ دارای فعالیت ضدآدنوویرال هستند و در درمان عفونت های ادنو ویروس حایز اهمیت می باشد.

نتیجه گیری

در این مطالعه اثر ضدمیکروبی عصاره برگ بارهنگ با و بدون ترکیب نانو اکسیدروی، بخوبی مشخص شده است. نکته مهم این بررسی، موثر بودن غلظت پائین این گیاه در از بین بردن باکتری استرپتوکوکوس موتانس می باشد، که در کودکان حایز اهمیت است. از آنجا که بلعیدن دهانشویه همیشه یکی از علل محدودیت مصرف آن در کودکان است تهیه دهانشویه های ضدمیکروبی با استفاده از عصاره های گیاهی بی خطر بسیار حائز اهمیت است.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه با شماره ۲۸۷۵ (با کد اخلاق شماره IR.mums.sd.REC ۱۳۹٤۲۲۳) و با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شده است. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشکده دندانپزشکی مشهد، مرکز تحقیقات مواد دندانی دانشکده دندانپزشکی مشهد، سرکار خانم دکتر موحد استادیار محترم دندانپزشکی کودکان و سرکار خانم دکتر تاج زاده استادیار محترم میکروب شناسی که نهایت همکاری و مساعدت را در انجام این تحقیق داشته اند، سپاسگزاری می شود.

منابع

1. Cassamassimo S, Fields W, McTigue DJ, Nowak J. Pediatric dentistry: infancy through adolescence. 5th ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2013.
2. Ryan KJ, Ray CG. Medical microbiology. 4th ed. New York: McGraw Hill; 2004.
3. Perry DA. Plaque control for the periodontal patient. In: Newman MG, Takei HH, Klokkervold PR, Arranza FA, editors. Carranza's clinical periodontology. 10th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2006.
4. Haffajee AD, Yaskell T, Socransky SS. Antimicrobial effectiveness of an herbal mouth rinse compared with an essential oil and a chlorhexidine mouth rinse. J Am Dent Assoc 2008; 139(5):606-11.
5. Haghgoo R, Mehran M, Afshari E, Zadeh HF, Ahmadvand M. Antibacterial effects of different concentrations of althaea officinalis root extract versus 0.2% chlorhexidine and penicillin on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* (In vitro). J Int Soc Prev Community Dent 2017; 7(4):180-5.
6. Peedikayil FC, Remy V, John S, Chandru TP, Sreenivasan P, Bijapur GA. Comparison of antibacterial efficacy of coconut oil and chlorhexidine on *Streptococcus mutans*: an in vivo study. J Int Soc Prev Community Dent 2016; 6(5):447-52.
7. Motamedifar M, Khosropanah H, Dabiri S. Antimicrobial activity of *Peganum Harmala L*. on *Streptococcus mutans* compared to 0.2% chlorhexidine. J Dent (Shiraz) 2016; 17(3):213-8.
8. Thomas A, Thakur SR, Shetty SB. Anti-microbial efficacy of green tea and chlorhexidine mouth rinses against *Streptococcus mutans*, *Lactobacilli spp*. and *Candida albicans* in children with severe early childhood caries: a randomized clinical study. J Indian Soc Pedod Prev Dent 2016; 34(1):65-70.
9. Ajagannanavar SL, Battur H, Shamarao S, Sivakumar V, Patil PU, Shanavas P. Effect of aqueous and *alcoholic licorice (glycyrrhiza glabra*) root extract against *streptococcus mutan*s and *lactobacillus acidophilus* in comparison to chlorhexidine: an in vitro study. J Int Oral Health 2014; 6(4):29-34.

10. Mehta S, Pesapathy S, Joseph M, Tiwari PK, Chawla S. Comparative evaluation of a herbal mouthwash (Freshol) with chlorhexidine on plaque accumulation, gingival inflammation, and salivary *Streptococcus mutans* growth. J Int Soc Prev Community Dent 2013; 3(1):25-8.
11. Chavan SD, Shetty NL, Kanuri M. Comparative evaluation of garlic extract mouthwash and chlorhexidine mouthwash on salivary *Streptococcus mutans* count - an in vitro study. Oral Health Prev Dent 2010; 8(4):369-74.
12. Kankariya AR, Patel AR, Kunte SS. The effect of different concentrations of water soluble azadirachtin (neem metabolite) on Streptococcus mutans compared with chlorhexidine. J Indian Soc Pedod Prev Dent 2016; 34(2):105-10.
13. Shah S, Bargale S, Dave BH, Deshpande A, Kariya PB, Karri A. Comparison of antimicrobial efficacy of (between) 0.2% chlorhexidine and herbal mouthwash on salivary *Streptococcus mutans*: a randomized controlled pilot study. Contemp Clin Dent 2018; 9(3):440-5.
14. 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.
15. Khoramian Tusi S, Manzari Tavakoli Z, Bahram Abadi Nejhad R, Zeynali B. Evaluation of teucrium polium mouthwash effect on salivary *Streptococcus mutans* count. J Mashhad Dent Sch 2014; 38(4):321-30.
16. Ranjbar F, Eslami G, Ghahremanloo A, Taheri S, Ayatollahi M, Eslami S. Antibacterial effect of green tea extract on *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis* isolated from dental plaque. J Mashhad Dent Sch 2015; 39(4):335-42.
17. Barani Karbasaki F, Hossenzadeh H, Fazli Bazzaz BS, Hoda V, Ghazvini K. Evaluation of antimicrobial effects of aqueous and alcoholic extracts of saffron on oral pathogenic microbes (*Streptococcus mutans, Lactobacillus, Candida albicans*). J Mashhad Dent Sch 2016; 40(3):203-12.
18. Khamverdi Z, Mir-Esmaeili AF, Daneshyar F, Toliat T, Alikhani MY, Amiri MM. Evaluation of the green tea varnish efficacy on dental caries depth around the orthodontic brackets. J Mashhad Dent Sch 2017; 41(1):21-30.
19. Khoramian Tusi S, Jafari A, Amin Marashi SM, Faramarzi Niknam S, Farid M. Effect of teucrium polium-containing chewing gum on reducing salivary *Streptococcus mutans* counts. J Mashhad Dent Sch 2018; 42(2):141-50.
20. Meredith MJ. Herbal nutriceuticals: a primer for dentists and dental hygienists. J Contemp Dent Pract 2001; 2(2):1-24.
21. Sharifa AA, Neoh YL, Iswadi MI, Khairul O, Abdul Halim M, Jamaludin M, et al. Effects of methanol, ethanol and aqueous extract of Plantago major on gram positive bacteria, gram negative bacteria and yeast. Ann Microsc 2008; 8:42-4.
22. United Nations Industrial Development Organization, Handa SS, Khanuja SP, Longo G, Rakesh DD. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. Trieste: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology; 2008. P. 156-8.
23. Hamedi S, Shams-Ardakani MR, Sadeghpour O, Amin G, Hajighasemali D, Orafai H. Designing mucoadhesive discs containing stem bark extract of *Ziziphus jujuba* based on Iranian traditional documents. Iran J Basic Med Sci 2016; 19(3):330.
24. Almoudi MM, Hussein AS, Hassan MI, Zain NM. A systematic review on antibacterial activity of zinc against *Streptococcus mutans*. Saudi Dent J 2018; 30(4):283-91.
25. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr Rev 1998; 56(11):317-33.
26. Chiang LC, Chiang W, Chang MY, Ng TL, Lin CC. Antiviral activity of P. major extracts and related compounds in vitro. Antiviral Res 2002; 55(1):53-62.
27. Davari A, Mosaddegh A, Daneshkazemi A, Mortazavi Sanigei SM. Comparison of antibacterial effect of composite resins incorporating copper with zinc oxide nanoparticles on *Streptococcus mutans*. J Mashhad Dent Sch 2019; 43(4):344-51.