مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره سیزدهم، شمارهٔ ۶، آبان ۱۳۹۰، صفحه ۲۹-۲۱

# مقایسه اثر ضد باکتریائی عصاره هیدروالکلی چهار گونه گیاه بر میکرو ارگانیسم های عامل پوسیدگی دندان به دو روش آزمایشگاهی

**حمید کرمانشاه(DDS,MS)[۱]، صدیقه السادات هاشمی کمانگر(DDS,MS)[۲*]، سکینه آرامی(DDS,MS)[۱]، اکبر میرصالحیان (PhD)[۳]،**

**محمد کمالی نژاد(MSc)[۴]، مهرداد کریمی(MD)[۵]، فرشته جبل آملی(MSc)[۳]**

۱- مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- مرکز تحقیقات مواد دندانی دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل
۳- گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۵- دانشکده طب سنتی دانشگاه علوم پزشکی تهران

**دریافت: ۹۰/۱/۱۷، اصلاح: ۹۰/۲/۷، پذیرش: ۹۰/۴/۸**

## خلاصه

**سابقه و هدف:** پوسیدگی دندان یک بیماری چند عاملی ولی ماهیتا عفونی، میکروبی می باشد که تمرکز صرف بر درمان ترمیمی ضایعه، منجر بـه شکـست در رفـع علـت زمینه ساز آن می گردد. از سوی دیگر بدلیل عوارض شناخته شده آنتی بیوتیک ها و اقبال جامعه جهانی به درمانهای سنتی و لزوم استخراج دارو از مـواد طبیعـی و گیاهـان داروئی، در این مطالعه اثر ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی مریم گلی (Salvia officinalis)، انیسون (Pimpinella anisum) پونه (Mentha longifolia) و بومادران (Achillea millefolium) بر میکرو ارگانیسم های پوسیدگی زا بصورت in vitro با دو تست آزمایشگاهی مورد مقایسه قرار گرفته است.

**مـواد و روشـها:** در ایـن مطالعـه تجربـی از انـدام هـوایی گیـاه مـریم گلـی(Salvia officinalis)، پونـه (Mentha longifolia)، بومـادران (Achillea millefolium) و بذر انیسون (Pimpinella anisum) به روش ماسراسیون (خیساندن در حلال) عصاره هیدروالکلی تهیه شد و پس از تهیه سویه هـای اسـتاندارد باکتری های استرپتوکوک موتان، لاکتوباسیل رامنوز و اکتینومیسس ویسکوز و اسـتریل نمـودن عـصاره هـا توسـط فیلتـر اثـر آنتـی باکتریـال آنهـا بـه ۲ روش Broth macrodilution (روشی که در آن مقادیری از مواد ضد میکروبی در محیط مایع (Broth) به صورت سریال رقیق می شود) در محدوده غلظتی ۲۰۰-۰/۱۸ میکروگرم بر میلی لیتر و Agar diffusion (روشی که در آن اثر ضد میکروبی مواد در محیط جامد بررسی می شود) در محدوده غلظتی ۴۰۰-۰/۷۸ میکروگرم بـر میلـی لیتـر بـر میکروارگانیسم های مذکور ارزیابی شدند.

**یافته ها:** در روش broth macrodilution میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC:Minimum Inhibitory concentration) عصاره های انیسون، مریم گلی، پونه و بومادران برای استرپتوکوک موتان به ترتیب ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵ و ۵۰ µg/ml، برای لاکتوباسیل به ترتیب ۱۲/۵، ۱/۵۶، ۳/۱۲ و ۱۲/۵ µg/ml و برای اکتینومیسس ویسکوز به ترتیب ۵۰، ۱۲/۵، ۱۰۰و ۵۰ µg/ml بود. در روش Agar well diffusion عصاره های انیسون و مریم گلی بر روی استرپتوکوک موتان و عصاره انیسون بر روی لاکتوباسیل و عصاره پونه بر اکتینومیسس ویسکوز اثر آنتی باکتریال نشان دادند.

**نتیجه گیری:** نتایج مطالعه نشان داد که کلیه عصاره ها با روش broth macrodilution بر هر ۳ گونه باکتری اثر بازدارندگی رشد دارند و بالاترین اثر بازدارندگی رشد مربوط به مریم گلی می باشد. همچنین در محدوده غلظتی مورد بررسی کلیه عصاره ها اثر باکتریسیدال هم داشتند.

**واژه های کلیدی: پوسیدگی دندان ، استرپتوکوک موتان، لاکتوباسیل رامنوز، اکتینو میسس ویسکوز، مریم گلی، پونه، بومادران، انیسون، اثر ضد باکتریائی.**

## مقدمه

پوسیدگی دندان یک بیماری چند عاملی و ماهیتاً عفونی، میکروبی است کـه موجب حل شدن و تخریب بافتهای آهکـی دنـدان مـی شـود. درمـان علامتـی و ترمیمی بدون توجه به علت زمینه ساز بیماری با شکست مواجه خواهـد شـد (۱). علیرغم اینکه پوسیدگی دندان احتمالا شایعترین بیماری مزمن در جهان است (۱)

* مسئول مقاله:
آدرس: بابل، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، تلفن: ۸-۲۲۹۱۴۰-۰۱۱۱
e-mail: sm_hk_58@yahoo.com

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.6.3.2 ]

تا به حال هیچگاه برنامه ای برای ریشه کنی این بیماری میکروبی همانند آنچه در برابر آبله و فلج اطفال صورت پذیرفته انجام نشده است. هزینه های پرداختی برای مراقبت های دندانپزشکی تنها در ایالات متحده آمریکا در سال ۲۰۰۳، ۷۰/۳ بیلیون دلار بوده است (۱).

از عوارض تداوم این بیماری از دست رفتن دندانها، درد و عیوب زیبائی است. عامل اتیولوژیک اصلی شناخته شده برای پوسیدگی دندان استرپتوکوک های موتان و لاکتوباسیل ها هستند (۱). درمان و پیشگیری از پوسیدگی با آنتی بیوتیک ها و استروئیدها پتانسیل اکسیداسیون، احیا بزاق را تغییر داده، فعالیت لیزوزیم را ضعیف و شرایط ایجاد واکنش های آلرژیک را تسهیل می کند و باعث کاهش مقاومت بدن نسبت به فاکتورهای پاتوژنیک می شود (۲). از طرفی استقبال گسترده ای از طب سنتی و داروهای گیاهی در زمینه های مختلف علوم پزشکی صورت گرفته است که علت آن، کاربرد گیاهان به عنوان دارو از قرن های پیشین می باشد (۳). بهره گیری از طب سنتی یکی از راه های دستیابی به داروهای جدید می باشد در حال حاضر ۱۱۹ دارو با منشاء گیاهی وجود دارد که تنها از ۹۰ گونه از بین ۲۵۰/۰۰۰ گونه شناخته شده، بدست آمده است (۴). اما جستجوی سیستماتیک بر روی مواد موثره این گیاهان و تمامی بیماریها امری بسیار طولانی، هزینه بر و محال می باشد (۴).

بنابراین تکیه بر آموزه های بومی یکی از استراتژی های مقبول در دنیا در کشف، کاربرد و تحقیق در مورد گیاهان دارویی است. طب سنتی ایران از پایه های قدیمی علم طب و حاوی اطلاعات گرانبها در بکارگیری گیاهان در درمان می باشد؛ حفظ سلامت دهان و دندان در طب سنتی ایران مطرح بوده و در کتب "معالجات" (درمانی) فصلی به بیماریهای دهان و دندان اختصاص داده شده است. درمان بیماریهای دهان و دندان در سه بخش کلی "تدبیر و تغذیه"، "بکارگیری دارو" و "استفاده از ابزار (اعمال یداوی)" تقسیم بندی می شود. ترکیبات داروئی جهت "تدبیر و تغذیه" در متون طب سنتی ایران تحت عنوان "سنون" نام برده شده است (۵). لذا با توجه به روش های درمان دارویی طب سنتی ایران، یافتن منابع نوین دارویی از مراجع این دانش در درمان بیماریهای دهان و دندان ضروری به نظر می رسد.

پوسیدگی در حضور باکتریهای اسیدوژنیک مثل استرپتوکوک موتان به شدت افزایش می یابد (۶). استرپتوکوک موتان اولین و مهمترین میکروارگانیسم موجود در پلاک است که پوسیدگی زائی آن به اثبات رسیده است (۷و۱). این میکروارگانیسم در شروع پوسیدگی نقش اساسی دارد (۸) و در کلیه ضایعات پوسیدگی عاج و مینا و در همه سطوح دندانی دیده می شود (۱). لاکتوباسیل ها در پیشرفت پوسیدگی نقش دارند و اکتینومیسس ویسکوز علاوه بر دو باکتری ذکر شده در ضایعات پوسیدگی سطح ریشه نقش ایفا می کنند (۸و۷). بنابراین از بین بردن پایه باکتریائی پوسیدگی دندان یکی از عوامل کمک به رفع این عفونت فراگیر می باشد.لذا در این مطالعه چهار گیاه مریم گلی (Salvia officinalis)، انیسون (Pimpinella anisum)، پونه (Mentha longifolia) و بومادران (Achillea millefolium) که از جمله گیاهان پرکاربرد در سنون بوده اند (۱۲-۹) انتخاب شدند تا با بررسی اثر ضد میکروبی آنها بر باکتریهای عامل پوسیدگی دندان راهکاری نو و حتی الامکان با کمترین میزان عارضه جهت کنترل پوسیدگی بویژه در افرادی که دچار خشکی دهان هستند یا به دنبال درمانهائی از جمله رادیوتراپی مبتلا به پوسیدگیهای وسیع و غیرقابل کنترل شده اند، ارائه شود. ضمنا در متون طب نوین نیز به اثرات دارویی این چهار گیاه اشاره شده است (۱۴و۱۳).

علی رغم اینکه در سالهای اخیر در مورد اثر آنتی اکسیدان و ضد میکروبی بومادران (۱۵)، انیسون (۱۶)، پونه (۱۷) و همچنین اثرات متنوع دارویی مریم گلی (۲۵-۱۸) تحقیقاتی صورت گرفته است ولی تاکنون در خصوص اثر ضد میکروبی این این گیاهان بر باکتری های عامل پوسیدگی دندان مطالعه ای انجام نشده است، به جز یک مطالعه که اثر ضد میکروبی عصاره مریم گلی را فقط بر استرپتوکوک موتان بررسی کرده است (۲۱).

در پژوهش حاضر مریم گلی که گیاه شناخته شده تری است به عنوان کنترل مثبت گیاهی در نظر گرفته شده است. باتوجه به اینکه این گیاهان بومی ایران هستند و تهیه عصاره از آنها امکانپذیر است، هدف از این مطالعه تعیین اثر آنتی باکتریال چهار گیاه مریم گلی (Salvia officinalis)، انیسون (Pimpinella anisum) پونه (Mentha longifolia) و بومادران (Achillea millefolium) بر باکتریهای استرپتوکوک توتال Streptococcus mutans، لاکتوباسیل رامنوز (Lactobacillus rhamnosus) و اکتینومیس ویسکوز (Actinomyces viscosus) توسط دو روش آزمایشگاهی می باشد

## مواد و روشها

این مطالعه تجربی طی دو مرحله انجام شد. در مرحله اول عصاره گیری به روش maceration انجام شد بدین صورت که ابتدا اندام هوایی گیاه مریم گلی (Salvia officinalis)، پونه (Mentha longifolia)، بومادران (Achillea millefolium) و بذر انیسون (Pimpinella anisum) بصورت خشک توسط ترازوی دیجیتال (Lib ROR AEU-210 Japan) به میزان ۵۰ گرم توزین شدند و پس از پودر کردن آنها درون ارلن قرار گرفته و روی هر نمونه cc ۱۵۰۰ از حلال [۵۰ ٪ اتانول (۹۶٪) و ۵۰٪ آب] ریخته شد تا کاملا پودر را بپوشاند بعد از پوشاندن سر ارلن ها با ورقه آلومینیومی به مدت ۴۸ ساعت بر روی دستگاه تکان دهنده (Heidolph unimax (shaker) 2010, Germany) با ۹۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. بعد از اینکه حلال و گیاه همگن شدند محلولها توسط کاغذ صافی (Watmann 0.5 mm USA) صاف شدند. سپس محلولها در دستگاهی به نام (Heidolph WD 2000, Germany) rotary evaporator قرار گرفتند تا حلال از عصاره جدا شود. عصاره خالص بدست آمده در ویالهای استریل جهت انجام آزمایشات میکروبی در یخچال نگهداری شدند. در مرحله دوم تست های تعیین فعالیت بازدارندگی عصاره ها انجام شد بدین صورت که سویه های استاندارد بصورت لیوفیلیزه (ATCC: [Streptococcus mutan 35668), Lactobacillus rhamnosus (ATCC: 7469, PTCC: 1637), Actinomyces viscosus (ATCC: 15987)] از مراکز رفرنس [(ATCC): American type of culture collection و [PTCC): Persian type of culture collection تهیه شدند. به منظور تهیه باکتری از نمونه های لیوفیلیزه ابتدا نمونه ها در محیط کشت مایع بصورت Overnight (یک شبانه روز در دمای ۳۵ – ۳۰ $^{o}C$) کشت داده شدند.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.6.3.2 ]

بعد از ایجاد کدورت در محیط مایع، نمونه ها بر روی محیط کشت جامد [برای اکتینومیسس ویسکوز BHI agar (Spain, CONDA)، برای استرپتوکوک موتان blood sheep 5 % + BHI agar (Spain, CONDA)، برای لاکتوباسیل رامنوز MRS Agar (Germany, Merck) ] به منظور اطمینان از خلوص آنها ایزوله شدند. سپس به ۲ روش اثر آنتی باکتریال هر کدام از عصاره ها بر این ۳ گونه باکتری بررسی شدند:

**روش broth macro dilution:** این روش طبق پروتکل CLSI 2006 (Clinical Laboratory standards institute, $M_7$-$A_4$.USA) انجام شد. ابتدا از هر کدام از عصاره ها محلول ذخیره(Stock) ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد و توسط فیلتر µm Millipore (۰/۲۲ filters) استریل شدند. سپس رقیق سازی عصاره ها در ۱۱ لوله حاوی محیط کشت مایع [برای اکتینومیسس ویسکوز (USA, Difco) Thyioglycollate Medium برای استرپتوکوک موتان (Spain, CONDA) BHI broth برای لاکتوباسیل رامنوز MRS broth (Germany, Merck) به روش Serial dilution (رقیق سازی یک دوم) انجام شد (که در نهایت ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت و عصاره در هر لوله وجود داشت).

پس از تهیه سوسپانسیون باکتری مطابق لوله ۰/۵ مک فارلند (مک فارلند یک سوسپانسیون شیمیایی است که میزان کدورت حاصل از آن قابل مقایسه با سوسپانسیون میکروبی می باشد از این طریق تعداد باکتری در هر میلی لیتر از سوسپانسیون قابل تخمین است (۲۶)) به تعداد $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU (Colony forming unit) در میلی لیتر و رقیق سازی آن توسط محیط کشت به میزان ۱ جهت بدست آوردن تعداد $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ CFU در میلی لیتر، به هر لوله ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بدست آمده اضافه شد. که نهایتا محدوده غلظتی لوله ها ۲۰۰–۰/۱۸ میکروگرم بر میلی لیتر بود. سپس گرماگذاری به مدت ۲۰ ساعت در $۳۷^{o}C$ انجام شد. بعد از وقوع رشد، با بررسی کدورت در لوله ها رشد و یا عدم رشد باکتریها ارزیابی شد. غلظت اولین لوله ای که رشد در آن مشاهده نگردید حداقل غلظت بازدارندگی (MIC: Minimum Inhibitory concentration) رشد باکتری توسط آن عصاره منظور گردید. سپس از لوله هایی که فاقد رشد بودند در محیط کشت جامد آگاردار در پلیت کشت داده شد اولین پلیتی که رشد مشاهده نگردید به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC: Minimum Bactericidal concentration) عصاره برای آن باکتری منظور گردید.

محیط کشت و عصاره بدون باکتری ← عدم رشد، محیط کشت و آب مقطر با باکتری ← رشد، محیط کشت و کلرهگزیدین (شاهد مثبت) با باکتری ← عدم رشد، در نظر گرفته شد.

ضمنا گرماگذاری در مورد اکتیومیس ویسکوز و استرپتوکوکس موتان در جار بیهوازی و در مجاورت $Co_2$ صورت گرفت. این مراحل برای هر چهار عصاره و برای هر ۳ نوع باکتری ۳ بار تکرار شد.

**روش Agar well diffusion (چاهک):** این روش طبق پروتکل Bakri & Douglas انجام شد (۲۷) ابتدا از هر کدام از عصاره ها محلول ذخیره (stock) ۸۰۰ µg/ml تهیه شد و با استفاده از فیلتر (0.22 µm milipore filters) استریل شد. سپس رقیق سازی عصاره ها در آب مقطر استریل در محدوده غلظتی (میکروگرم بر میلی لیتر ۴۰۰–۰/۷۸) انجام شد. پس از تهیه محیط کشت آگار دار مناسب و توزیع در پلیت ها به ضخامت ۴ mm و تهیه سوسپانسیون باکتری (مطابق روش قبل) به تعداد $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ cfu/ml، سوسپانسیون باکتری در سطح پلیت با سواپ استریل پخش شد. بعد از آن در سطح پلیت ها چاهک هایی به قطر ۶ mm به فواصل ۳۰ mm پانچ شد سپس در هر چاهک ۵۰ µl از رقت های مختلف عصاره توزیع گردید. سپس گرماگذاری در $۳۷^{o}C$ به مدت ۲۰ ساعت انجام شد. بعد از آن وجود یا عدم وجود هاله عدم رشد (Zone of inhibiton) به دور چاهک بررسی شد و قطر هاله برحسب میلی متر اندازه گیری شد.

**کنترل ها:** در یک چاهک سرم فیزیولوژی ← قطرهاله عدم رشد صفر میلی متر، در یک چاهک کلرهگزیدین← ایجاد هاله عدم رشد

ابتدا اختلاف بین گروه ها توسط آماره Kruskal_Wallis ارزیابی شد. سپس در صورت معنی دار شدن، مقایسه دو به دو توسط Donn-Procedure انجام شد و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

## یافته ها

**نتایج روش broth macrodilution:** در مورد استرپتوکوک موتان، مریم گلی کمترین میزان MIC (۶/۲۵ µg/ml) را داشت که به طرز معنی داری از MIC انیسون و پونه (۱۲/۵ µg/ml) کمتر بود و بومادران بیشترین میزان MIC (۵۰ µg/ml) را داشت که به طرز معنی داری از میزان MIC بقیه عصاره ها بیشتر بود ($p<۰/۰۵$). در مورد لاکتوباسیل مریم گلی کمترین میزان MIC (۱/۵۶ µg/ml) را داشت که به طرز معنی داری کمتر از MIC پونه (۳/۱۲ µg/ml) بود. MIC انیسون و بومادران (۱۲/۵ µg/ml) به طرز معنی داری از همه اینها بیشتر بود ($p<۰/۰۵$).

در مورد اکتینومیسس ویسکوز مریم گلی کمترین میزان MIC (۱۲/۵ µg/ml) را داشت. MIC انیسون و بومادران (۵۰ µg/ml) به طرز معنی داری از مریم گلی بیشتر بود و پونه بیشترین میزان MIC (۵۰ µg/ml) را داشت که به طرز معنی داری از میزان MIC بقیه عصاره ها بیشتر بود ($p<۰/۰۵$). بنابراین کلیه عصاره ها بر هر سه گونه باکتری اثر بازدارندگی رشد داشتند. مریم گلی بالاترین اثر بازدارندگی رشد را در هر سه گونه باکتری داشت. همه عصاره ها در محدوده غلظتی مورد بررسی علاوه بر اثر بازدارندگی رشد اثر باکتریسیدال نیز داشتند (جدول شماره ۱). (کوچکتر بودن میزان MIC و MBC به معنی بالاتر بودن اثر آنتی باکتریال است).

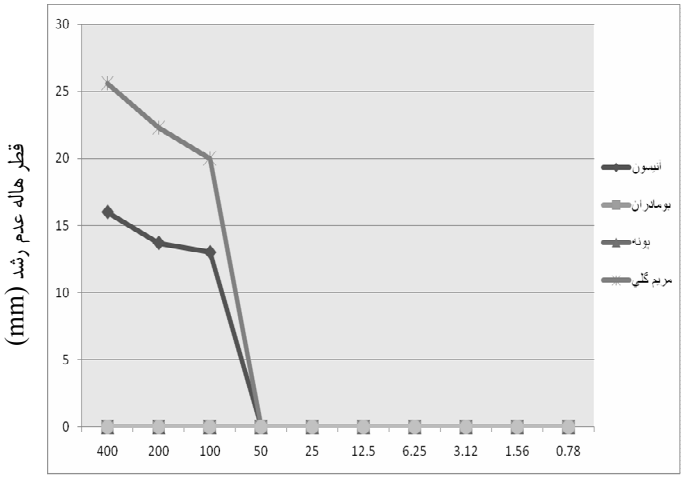
**نتایج روش Agar well Diffusion:** در مورد استرپتوکوک موتان فقط عصاره های انیسون و مریم گلی مانع از رشد باکتری شده اند که اثر آنتی باکتریال مریم گلی بالاترین بوده و در غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ µg/ml به طرز معنی داری بیشتر از انیسون بود ($p<۰/۰۵$) و در غلظتهای پائین تر از ۵۰ µg/ml هاله عدم رشد ایجاد نشد (نمودار ۱). در مورد لاکتوباسیل فقط در عصاره انیسون هاله عدم رشد دیده شد و در غلظتهای پائین تر از ۱۲/۵ µg/ml هاله عدم رشد ایجاد نشد (نمودار ۲). در مورد اکتینومیسس ویسکوز فقط عصاره پونه هاله عدم رشد ایجاد کرد که در غلظتهای پائین تر از ۲۵ µg/ml هاله عدم رشد ایجاد نشد (نمودار ۳).

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.6.3.2 ]

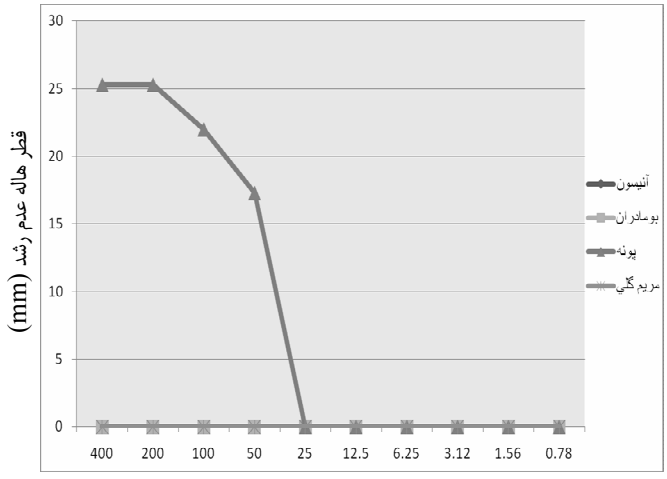
**جدول ۱. میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) برحسب میکروگرم بر میلی لیتر برای عصاره ها و گونه های میکروبی.**

| عصاره (µg/ml) / گونه باکتری | | انیسون | مریم گلی | پونه | بومادران | نتیجه آزمون آماری* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| لاکتوباسیل رامنوز | MIC | ۱۲/۵ | ۱/۵۶ | ۳/۱۲ | ۱۲/۵ | انیسون و بومادران < پونه <مریم گلی |
| | MBC | ۱۲/۵ | ۱۲/۵ | ۶/۲۵ | ۱۲/۵ | بومادران، انیسون و مریم گلی <پونه |
| استرپتوکوک موتان | MIC | ۱۲/۵ | ۶/۲۵ | ۱۲/۵ | ۵۰ | بومادران < پونه، انیسون < مریم گلی |
| | MBC | ۲۰۰ | ۵۰ | ۱۰۰ | ۲۰۰ | انیسون، بومادران < پونه < مریم گلی |
| اکتینومیسس ویسکوز | MIC | ۵۰ | ۱۲/۵ | ۱۰۰ | ۵۰ | پونه < انیون و بومادران < مریم گلی |
| | MBC | ۱۰۰ | ۱۲/۵ | ۱۰۰ | ۱۰۰ | انیسون، پونه، بومادران < مریم گلی |

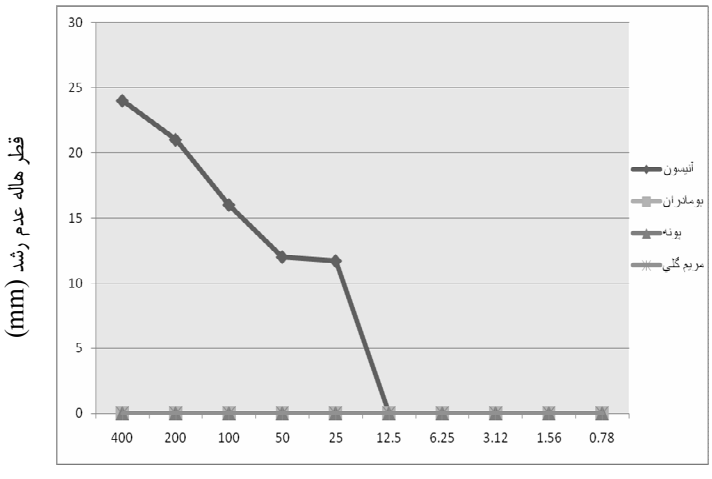
* علامت < نشاندهنده معنی دار بودن (P< ۰/۰۵) میزان MBC و MIC نسبت به عصاره های سمت راست است. (کمتر بودن میزان MIC و MBC به معنی بالاتر بودن اثـر بازدارنـدگی و کشندگی عصاره بر میکروارگانیسم است)




**نمودار ۱. میزان هاله عدم رشد (برحسب mm) برای استرپتوکوک موتان در غلظتهای مختلف (برحسب µg/ml) عصاره ها**




**نمودار ۳. میزان هاله عدم رشد (برحسب mm) برای اکتینومیسس ویسکوز در غلظتهای مختلف *(*برحسب µg/ml) عصاره ها**




**نمودار ۲. میزان هاله عدم رشد (برحسب mm) برای لاکتوباسیل رامنوز در غلظتهای مختلف (برحسب µg/ml) عصاره ها**

## بحث و نتیجه گیری

در این مطالعـه، در روش broth macrodilution کلیـه عـصاره هـای گیاهان مورد تحقیق بر سه باکتری مزبور اثر ضد باکتریایی داشتند، ولـی در روش Agar diffusion در همه عصاره ها اثر ضد میکروبی دیده نشد چون عوامـل تاثیرگذار بر نتایج روش های آگار دیفیوژن بیش از عوامـل مـوثر بـر روش هـای broth dilution هستند. از جمله مواردی که بر نتایج آگار دیفیوژن موثر است میزان نفوذ ماده ضد میکروبی در آگار است که به ماهیـت آن مـاده بـستگی دارد. ضمنا روش های Agar diffusion برای تعیین حساسیت ضد میکروبی صرفاً حساسیت یا مقاومت میکروارگانیسم نسبت به ماده ضد میکروبی را مشخص مـی کنند ولی روش های broth dilution با تعیین MIC روشهایی هـستند کـه میزان اثر ضد میکروبی را بصورت کمی مـشخص مـی کننـد (۲۹و۲۸). بنـابراین نتـایج روش broth dilution قابـل اسـتنادتر هـستند. در روش broth macrodilution اثر مهاری مریم گلی بیشترین اثـر بـوده و بعـد از آن پونـه، بومادران و انیسون قرار می گیرند. در این روش گیـاه مـریم گلـی دارای بهتـرین

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.6.3.2 ]

پاسخ های ضد باکتریائی بر سه باکتری مورد آزمایش می باشد که به عنوان کنترل مثبت گیاهی تحقیق هم مدنظر بوده است. مریم گلی (Saliva officinalis) گیاه شناخته شده تری است که مطالعات ضد میکروبی بیشتری در مورد آن انجام شده است (۲۴-۱۸). کاربرد آن در بی اشتهایی، التهاب دهان و حلق و افزایش تعریق مورد تایید مراجع طب گیاهی است (۱۳). شواهدی از اثرات ضد باکتریائی، ضد قارچی و ضد ویروسی آن وجود دارد (۲۴-۱۹ و ۱۴و۱۳) در مریم گلی ترکیبات آلفا و بتاتوژون (alpha, beta-thujone) (۶۰-۲۰ ٪) و ۱ و ۸ سینئول (Cineol) (۱۶-۶٪) و نیز فلاونوئیدهائی مانند اپی ژنین (epigenin) موجود است. علاوه بر آن ترکیبات لینالول (Linalool)، بورنئول (borneol) و آلفا و بتا کاریوفیلین (α,β-Caryophyllene) نیز در اسانس فرار مریم گلی موجود است (۱۳).

در مطالعات قبلی اثر عصاره هیدروالکلی برگ مریم گلی بر فعالیت کلاژنولیتیک پورفیروموناس ژنژیوالیس نشان داده شده (۱۴) و اثر وسیع آنتی باکتریال و ضد قارچ مریم گلی بر طیف وسیعی از باکتریها مانند سودوموناس و آسپرژیلوس و کاندیدا گزارش شده بود (۳۰و۱۴) که یافته های این پژوهش در مورد اثر باکتریسیدال مریم گلی با تحقیقات فوق همخوانی دارد.

در مطالعه Sanei و همکاران، اثر عصاره گیاهانی از جمله مریم گلی بر تعدادی از باکتریهای بیماریزای حفره دهان از جمله استافیلوکوک اورئوس، استرپتوکوک سالیواریس و استرپتوکوک موتان بررسی شده است، که مریم گلی با غلظتهای ۴/۸ میلی گرم در میلی لیتر در زمان ۶۰ ثانیه و ۹۰ ثانیه بر این میکروارگانیسم اثر مهاری رشد داشته است (۲۱)، که نتایج مطالعه حاضر با آن هماهنگ است. در عین حال در مطالعه حاضر اثر بومادران و مریم گلی بر کلیه میکروارگانیسم های پوسیدگی زا، که هر کدام نقش ویژه ای در ایجاد پوسیدگی دارند، بررسی شده است، که از این لحاظ نسبت به مطالعه Sanei و همکاران جامعیت بیشتری دارد. گیاه بومادران (Achillea millefolium) از جمله گیاهانی است که از دیرباز در درمان زخم ها، مشکلات گوارشی و عفونی مورد استفاده می باشد و حتی در کاهش چربی خون هم موثر است (۱۳و۱۱). از جمله موادی که در بومادران یافت می شود می توان به کامازولن (chamazulene)، کاریوفیلین (Caryophyllene)، ۱ و ۸ سینئول و فلاونوئیدهایی مانند اپی ژنین و روتین (Rutin) اشاره کرد (۱۳). بومادران اثر مهاری و کشندگی بر سوش های مورد نظر در این تحقیق داشته است که با نتایج تحقیق Candan و همکاران (۱۵) در مورد اثر آنتی باکتریال اسانس بومادران همخوانی دارد.

گیاه پونه (Mentha longifolia) از جمله گیاهان دارویی با کاربرد خوراکی است. در بررسی های انجام شده اسانس انواع Mentha اثرات ضد باکتریائی قوی از خود بروز داده اند (۳۱). عصاره متانولی پونه نیز اثرات ضد باکتریائی و ضد قارچی بر طیف وسیعی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی و قارچ ها از خود بروز داده است (۱۷). در عصاره هیدروالکلی گیاه پونه بطور عمده پیپریتون (Piperitone) (۸۰-۶۰ ٪) و بتاکاریوفیلن (β-caryophyllene) (۱۵-۵٪)، ۱ و ۸ سینئول (1,8 cineole) (۷-۲٪) و فلاونوئیدهای هسپیریدین (hespiridin) و کوئرسیترین (quercitrin) وجود دارند. (۱۳) در روش brothmacrodilution اثر عصاره هیدروالکلی پونه بر باکتری لاکتوباسیل بطور معنی داری دارای اثر کشندگی بهتری نسبت به گیاه شناخته شده مریم گلی می باشد که نشاندهنده اثر احتمالی ماده موثره اصلی پیپریتون بر لاکتوباسیل است. اثر گیاه پونه بر استرپتوکوک موتان نیز مناسب بوده و بعد از مریم گلی دارای بیشترین اثر کشندگی و مهاری بر استرپتوکوک های موتان می باشد که باتوجه به گزارش عدم وجود اثر مهاری بر استرپتوکوکهائی مانند استرپتوکوک پیوژن (۳۱) این اثر حائز اهمیت بوده و قابل بررسی بیشتری می باشد. اثرات پونه بر اکتینومیسس ویسکوز همانند اثر پونه بر ۲ نوع باکتری دیگر نبوده و احتمالاً ناشی از اختصاصات اکتینومیسس ویسکوز می باشد که یک باکتری بیهوازی است و هم در بافت و هم در محیط مایع پرگنه هایی شبیه دانه های زرد بنام Sulfure Granule ایجاد می کند که شاید یکی از دلایل مقاومت بیشتر این باکتری قرار گرفتن در این دانه ها باشد. ضمناً این باکتری برای رشد کافی و بهتر به محیط های حاوی خون و سرم نیاز دارد و در محیطهای ساده رشد چندان مناسبی ندارد (۳۲). از طرفی می توان احتمال داد که اثر هم افزائی مواد موثره گیاه پونه بر لاکتوباسیل و استرپتوکوک موتان بیشتر از اکتینومیسس ویسکوز باشد. علاوه بر آن اثر فلاونوئیدهای موجود در گیاه را نیز نمی توان نادیده گرفت خصوصاً اثر هیسپیریدین که اثرات ضد باکتریائی آن بصورت مجزا هم مورد بررسی قرار گرفته است (۳۳).

گیاه انیسون (Pimpinella anisum) نیز از گیاهان پرکاربرد در طب سنتی ایران است که استفاده عمده آن در بیماریهای گوارشی می باشد ولی در بیماریهای دستگاه تنفس فوقانی، تب و التهاب دهان و حلق نیز بکار می رود (۱۳). عصاره استونی انیسون بر مهار رشد باکتریهائی چون اشریشیاکلی و استافیلوکوک طلائی موثر است و اسانس آن نیز دارای اثرات مناسبی بر طیف مختلفی از باکتری ها مانند سالمونلاتیفی و ای – کولای می باشد (۳۰). ترکیب اصلی آن ترانس آنتول (transe-anethole) (۹۴ ٪) می باشد و در آن بتاکاریوفیلین و فلاونوئیدهایی مثل اپی ژنین (epigenin) و ایزوویتکسین (isovitexin) موجود است (۱۴و۱۳). انیسون اثر مهاری مناسبی بر استرپتوکوک موتان و در غلظتهای بالاتر بر مهار رشد لاکتوباسیل و اکتینومیسس ویسکوز دارد که احتمالا ناشی از آنتول و بتاکاریوفیلین و فلاونوئیدها می باشد. اثرات انیسون در این تحقیق با اثر باکتریسیدال عصاره آبی انیسون از طریق تست دیسک دیفیوژن بر فلور باکتریال دهان هم خوانی دارد (۳۴) و احتمالا مواد هیدروفیل موجود در انیسون نقش مهمی در اثرات ضد میکروبی آن دارد.

نکته حائز اهمیت دیگر وجود ماده مشترک کاریوفیلین در انیسون، پونه و بومادران می باشد (۱۴و۱۳) علاوه بر آن ماده ۱ و ۸ سینئول در پونه و بومادران و مریم گلی موجود می باشد (۱۴و۱۳) و احتمال اثر این ترکیبات بر باکتریها را مطرح می سازد. تفاوت موجود در اثر ضد باکتریائی بین ۲ روش Broth macrodilation و agar well diffusion به علت وجود ترکیبات قطبی می باشد که در محیط محلول روش broth macrodilution بهتر رها شده و اثر ضد باکتریائی بروز می دهند.

تفاوت اثر ضد باکتریائی بین ۲ روش به نوعی در تعیین دسته مواد موثره نیز کمک کرده و اجازه می دهد تا براساس قطبیت مواد موجود در گیاهان به ماده موثره اصلی نزدیک شود. باتوجه به اینکه در روش broth macrodilation کلیه عصاره ها اثر ضد باکتریائی مناسب داشته اند در مورد گیاهانی که در روش آگار دیفیوژن هاله عدم رشد ایجاد نکرده اند احتمالاً در غلظتهای بالاتر بدلیل وجود شیب غلظتی مناسب تر برای نفوذ در محیط جامد، اثر ضد باکتریائی از خود بروز داده و هاله عدم رشد ایجاد می کنند. نتیجه نهایی آنکه عصاره هیدروالکلی

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.6.3.2 ]

کلیه گیاهان مورد بررسی در روش broth macrodilution اثـر بازدارنـدگی رشد بر باکتریهای عامل پوسـیدگی دنـدان را دارنـد و مـریم گلـی بـالاترین اثـر بازدارندگی رشد در هر سه گونه باکتری را نشان داد و در محـدوده غلظتـی مـورد بررسی کلیه عصاره ها اثر باکتریسیدال هم داشتند.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.6.3.2 ]

# Comparison of Antibacterial Effect of Hydroalcoholic Extract of Four Plants against Cariogenic Microorganisms by two in Vitro Methods

**H. Kermanshah (DDS, MS) [1], S.S. Hashemi Kamangar (DDS, MS) [*2], S. Arami (DDS, MS) [1], A. Mirsalehian (PhD) [3], M. Kamalinegad (MSc) [4], M. Karimi (MD) [5], F. Jabalameli (MSc) [3]**

1. Dental Materials Research Center, Dental School, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran
2. Dental Materials Research Center, Dental School, Babol University of Medical Science, Babol, Iran
3. Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5. Traditional Medicine School, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**J Babol Univ Med Sci; 13(6); Nov 2011**
**Received: Apr 6th 2011, Revised: Apr 27th 2011, Accepted: Jun 29th 2011.**

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Caries is a multifactorial disease with a microbial nature. Thus, more concentration on its operative treatment will lead to failure in annihilating its origin. On the other hand, because of known side effects of antibiotics and world attraction to traditional treatment and importance of drug extraction of natural material and plants, this study was done to compare the antibacterial effect of hydroalcoholic extract of Salvia officinalis, Pimpinella anisum, Mentha longifolia and Achillea millefolium against Streptococcus mutans, Lactobacillus rhamnosus and Actinomyces viscosus with two in vitro methods.

**METHODS:** In this experimental study, hydroalcoholic extracts have been prepared from Salvia officinalis, Pimpinella anisum, Mentha longifolia and Achillea millefolium with maceration method. Their antibacterial activity against Streptococcus mutans, Lactobacillus rhamnosus and Actinomyces viscosus have been evaluated with Broth macrodilution (the method in which amounts of antimicrobial agents is diluted in broth environment serially) (0.18-200 µg/ml) and Agar diffusion (the method in which antimicrobial effect is assessed in solid environment) (0.78-400 µg/ml) methods.

**FINDINGS:** In Broth macrodilution method MIC (Minimum Inhibitory Concentration) for Pimpinella anisum, Salvia officinalis, Mentha longifolia and Achillea millefolium for Streptococcus mutans were respectively 12.5, 6.25, 12.5 and 50 µg/ml, for Lactobacillus rhamnosus 12.5,1.56, 3.12 and 12.5 µg/ml and for Actinomyces viscosus 50, 12.5, 100 and 50 µg/ml. In Agar diffusion method Pimpinella anisum and Salvia officinalis against Streptococcus mutans, Pimpinella anisum against Lactobacillus rhamnosus and Mentha longifolia against Actinomyces viscosus had antibacterial effect.

**CONCLUSION:** According to the results of this study, four extracts had growth inhibitory effect on all three bacteria. Salvia officinalis had greater effect on inhibition of growth of all three bacteria. All of the extracts had bactericidal effect in the range of concentration.

**KEY WORDS:** *Dental caries, Streptococcus mutans, Lactobacillus rhamnosus, Actinomyces viscosus, Salvia officinalis, Mentha longifolia, Achillea millefolium, Pimpinella anisum, Antibacterial effect.*

[*] **Corresponding Author;**
**Address:** Dental School, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
**Tel:** +98 111 2291408
**E-mail:** sm_hk_58@yahoo.com

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.6.3.2 ]

## References

1. Theondor MR, Harold OH, Ward J, Swift JR. Art and science of operative dentistry, 5th ed. St. Louis Missouri: Mosby Elsevier 2006; pp: 67-70.
2. Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Aust Dent J 1997;42(5):302- 6.
3. Fabrican DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. Environ Health Perspect 2001;109 (Suppl 1):69-75.
4. Farnsworth NR. The role of ethnopharmacology in drug development. Ciba Found Symp 1990;154:2-11.
5. Nazem Jahan Mohammad AK. Eksir-e-Azam. 1st ed. Dehli: Nami Monshi Nolkshur 1936; pp: 38-70.
6. Prabu GR, Gnanamani A, Sadulla S. Guaijaverin a plant flavonoid as potential antiplaque agent against streptococcus mutans. J Appl Microb 2006;101(2):487-95.
7. Fejerskov O, Kidd E. Dental caries: the disease and its clinical management. 2nd ed. Singapore: Blackwell 2008; pp: 164-85, 280-5, 266-9.
8. Summitt JB, Robbins JW, Hilton TJ, Schwartz RS. Fundamentals of operative dentistry. 3rd ed. China: Quintessence 2006; pp: 16, 82, 395-6.
9. Nazem Jahan MAK. Gharabadin Azam. 1st ed. Dehli: Nami Monshi Nolkshur 1936; pp: 80-2,150-2, 167-71.
10. Aghili Khorasani MH. Makhzanol Advie, 2nd ed. Tehran: Elmi va Farhangi Publication 1988; pp: 719-72. [in Persian]
11. Zakariya al Razi AM. Alhavi Fe Teb. 1st ed. Bombay: Matbaa Osmaniye 1886; pp: 270-3.
12. Akhvini Bokhari A. Hedayatol Motealemin Fe Teb, 1st ed. Mashhad: Ferdosi University Publication 1992; pp: 40-5. [in Persian]
13. La Gow B. PDR for herbal medicine. 3rd ed. USA: Thamson 2005; pp: 698-79, 899-901.
14. Kemper FH. ESCOP monographs. 2nd ed. Stuttgart: Theime 2003; pp: 452- 6.
15. Candan F, Unlu M, Tepe B, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of essential oil and methanol extract of Achillea millefolium subsp. millefolium Afan. (Asteraceae). J Ethnopharmacol 2003;87(2-3):215-20.
16. Singh G, Kapoor IP, Pandey SK, Singh UK, Singh RK. Studies on essential oil: part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices. Rhytother Res 2002;16(7):680-2.
17. Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil and methanol extract from Mentha longifolia. ssp. Longifolia. Food Chem 2007;103(4):1449-56.
18. Weckesser S, Engel E, Simon-Haarhaus B, Wittmer A, Pelz K, Schmepp CM. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. Phytomedicine 2007;14 (7- 8):508-9.
19. Bozin B, Mimica–Dukic N, Samojlik I, Jovin E. Antimcrobial and antioxidant properties of rosmary and sage (Rosmarinus officinalis L. and Salvia officinalis L., Lamiaceae) essential oils. J Agric Food Chem 2007;55 (19):7879- 85.
20. Hayouni el A, Chraiaf I, Abedrabba M, et al. Tunisian Salvia officinalis L. and Schinus mollel. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against salmonella inoculated in minced beef meat. Int J Food Microbiol 2008;125 (3):242-51.
21. Sanei AS, Poureslami HR, Ebadifar A, et al. Antimicrobial effects of seven plant extracts on pathogenic bacteria of the oral cavity. Pejouhandeh 1997;2(6):9-15. [in Persian]
22. Miguel G, Cruz C, Faleiro ML, et al. Salvia officinalis L. essential oils: effect of hydrodistillation time on the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. Nat Prod Res 2011;25(5):526-41.
23. Royo M, Fernández-Pan I, Maté JI. Antimicrobial effectiveness of oregano and sage essential oils incorporated into whey protein films or cellulose-based filter paper. J Sci Food Agric 2010;90(9):1513-9.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.6.3.2 ]

24. Ramos AA, Azqueta A, Pereira-Wilson C, Collins AR. Polyphenolic compounds from Salvia species protect cellular DNA from oxidation and stimulate DNA repair in cultured human cells. J Agric Food Chem 2010;58(12):7465-71.
25. Gammariello D, Conte A, Attanasio M, Alessandro Del Nobile M. Study on the combined effects of essential oils on microbiological quality of Fior di Latte cheese. J Dairy Res 2010;77(2):144-50.
26. Mac Faddin JF. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. St. Louis Missouri: Mosby 2000; p: 825.
27. Bakri IM, Douglass CW. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. Arch Oral Biol 2005;50(7):645-51.
28. Ncube NS, Afolayan AJ, Okoh AI. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. African J Biotechnol 2008;7(12):1797-806.
29. Winn Jr W, Allen S, Janda W, et al. Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Sydney: Lippincott Williams & Wilkins 2006; pp: 982-8.
30. Ray AB, Sarma BK, Singh UP. Medicinal properties of plants; antifungal, antibacterial and antiviral activities. 1st ed. India: International Book Distributing Co 2004; pp: 8, 9, 488.
31. Mimica Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Mihajlovic B, Matavuj M. Antimicrobial and antioxidant activities of three Mentha species essential oils. Planta Med 2003;69(5):413-9.
32. Collier L, Balows A, Sussman M. Topley & Wilson's microbiology and microbial infections. 9th ed. Oxford: Hodder Arnold 1998; pp: 539-65.
33. Iio M, Uyeda M, Iwanami T, Nakagawa Y. Flavonoids as a possible preventive of dental caries. Agric Biol Chem 1984; 28:2143-5.
34. Chaudhry NM, Tarig P. Bactericidal activity of black pepper, bay leaf, aniseed and coriander against oral isolates. Pak J Pharm Sci 2006;19(3):214-18.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.6.3.2 ]