بررسی آزمایشگاهی غلظت مهارکنندگی عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاه کاکوتی و قان‌تپر بر رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس و قارچ کاندیدا آلبیکنس

دکتر فرید شیعه زاده [۱]، دکتر مهسا پورزمانی [۲]، دکتر پرستو ضرغامی [۳]، دکتر میلاد عیدی [۴]، دکتر علیرضا ابراهیم پور [۵]، دکتر زهرا رفعتی گنابادی [۶*]

۱-دانشیار گروه پریودانتیکس، مرکز تحقیقات دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۲- استادیار گروه بیماری های دهان و فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

۳-دکتری تخصصی گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

۴.دستیار تخصصی،گروه پریودانتیکس، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۵.دستیار تخصصی،گروه جراحی دهان و فک و صورت، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۶.دندانپزشک، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بجنورد، ایران

وصول مقاله: ۱۴۰۰/۱۱/۱۵ اصلاح نهایی: ۱۴۰۱/۲/۱۷ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۶/۱

In vitro study of the effect of methanolic and ethanolic extracts of Ziziphora clinopodioides and Biebersteinia multifida on the growth of Streptococcus mutans and Candida albicans

farid shiezadeh[1],Mahsapoorzamani[2], Parastoo zarghami[3], milad eidy[4], alireza ebrahimpour[5], Zahra rafatigonabadi[6]*

1. Associate Professor of periodontics, Dental Research Center, Faculty of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
2. Assistant Professor, Department of Oral Medicine, Faculty of Dentistry, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
3. Phd of microbiology, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
4. Postgraduate Student, Department of Periodontics, Faculty of Dentistry, shahid sadooghi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
5. Postgraduate Student, Departmen of Periodontics, Faculty of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
6. Dentist, School of Dentistry, North Khorasan University of Medical

Received:Feb 2022 ; Accepted: Aug 2022

Abstract

Background and Aims: Due to the prevalence of caries and oral candidiasis and the complications of existing treatments, in recent years, the study of plant species has been considered to investigate the antimicrobial effects and preparation of effective mouthwashes on dental bacterial plaque. The present study evaluated the effects of methanolic and ethanolic extracts of two native plants of North Khorasan, Kakuti (Ziziphora clinopodioides) and Qantper (Biebersteinia multifida) on the growth inhibition of Streptococcusmutans and Candida albicans.

Material and Methods: This is an experimental study. 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 mg/ml Different concentrations of ethanolic and methanolic extracts of cockatiel and qantper plants were added to bacteria or fungi. Place the plate in the greenhouse for 24 hours and then add triethyl phenyltrazolium chloride reagent to each house and put it back in the greenhouse. In each row, the first concentration of red formed the lowest inhibitory concentration. A loop was transferred to plates containing the culture medium to obtain minimum lethal concentrations from all non-red houses. The first concentration of each extract in which no growth was observed on the plate was considered as MBC and MFC. Data were analyzed by SPSS23 software.

Results: MIC of two plants was in the range of 6.25 to 3.125 mg / ml and MFC, MBC was from 12.5 to more than 100 mg / ml. The ability of two types of ethanolic and methanolic extracts of Kakuti on Candida albicans is not statistically significant.(P=0.31) The effect of methanolic and ethanolic extracts of Qantper and Kakuti on Streptococcus mutans is not statistically significant. (P=0.05) Lower Methanol concentration of kakuti has antifurgal and antibacterial on candida albicans and streptococcus mutans.

Conclusion: The results showed that Qantper and Kakuti plant extracts that were studied in this study had antibacterial and antifungal effects

Key words: Ziziphora clinopodioides, Biebersteinia multifida, Streptococ mutans, Candida albicans ،caries, mouthwash, antibactrial.

***Corresponding Author:** drzahrarafati@yahoo.com

J Res Dent Sci. 2022;19 (4): 337-345

*نویسنده مسئول:زهرا رفعتی گنابادی تلفن: ۰۹۹۱۹۶۳۵۴۷۹ پست الکترونیك: آدرس ایمیل:drzahrarafati@yahoo.com

خلاصه:

سابقه و هدف: با توجه به شیوع پوسیدگی و کاندیدای دهانی و عوارض درمان های موجود ، در سالهای اخیر مطالعه روی گونه‌های گیاهی جهت بررسی اثرات ضد میکروبی و تهیه‌ی دهان‌شویه‌های موثر بر پلاک باکتریال دندانی مورد توجه قرار گرفته است. پژوهش حاضر اثرات عصاره های متانولی و اتانولی دو گیاه بومی خراسان شمالی، کاکوتی(Ziziphora clinopodioides) و قان تپر(Biebersteinia multifida) بر باز دارندگی رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس و قارچ کاندیدا آلبیکنس مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها: این مطالعه از نوع آزمایشگاهی بود غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ (میلی گرم بر میلی لیتر) عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاهان کاکوتی و قان تپر به باکتری یا قارچ افزوده شد. پلیت را ۲۴ ساعت در گرمخانه قرار داده و سپس به هریک از خانه‌ها معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید افزوده گشت و مجدد در گرماخانه گذاشته شد. در هر ردیف اولین غلظتی که رنگ قرمز تشکیل شد نشانگر حداقل غلظت مهارکنندگی بود. برای بدست آوردن مقادیر حداقل غلظت کشندگی از کلیه خانه‌هایی که رنگ قرمز در آن‌ها تشکیل نشده بود، یک لوپ به پلیت‌های حاوی محیط کشت منتقل گشت. اولین غلظتی از هر عصاره که در پلیت مربوط به آن، رشد مشاهده نشد به عنوان Minimum Bactericidal Concentration (MBC) و Minimum Fungicidal Concentration (MFC) در نظر گرفته شد. داده ها توسط نرم افزار SPSS23 و با استفاده از آزمون من ویتنی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها:حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) دوگیاه در بازه‌ی ۶/۲۵ تا ۳/۱۲۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر بود و MFC , MBC از ۱۲/۵ تا بیشتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. غلظت مهارکنندگی دو نوع عصاره‌ی اتانولی و متانولی گیاه کاکوتی بر قارچ کاندیدا آلبیکنس تفاوت معناداری از نظر آماری نداشت. (P=۰/۳۱) اثر مهارکنندگی عصاره‌ی متانولی و اتانولی دو گیاه قان‌تپر و کاکوتی بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس نیز تفاوت معناداری نداشت. (P=۰/۰۵) عصاره متانولی کاکوتی با غلظت کمتر اثر کشندگی بر استرپتوکوکوس موتانس و کاندیدا آلبیکانس دارند.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره های گیاهی قان تپر و کاکوتی می تواند دارای اثرات آنتی باکتریال بر روی استرپتوکوک موتانس و ضد قارچ بر روی کاندیدا آلبیکانس می باشد.

کلید واژه ها: Streptococ mutans, Candida albicans ,Biebersteinia multifida ,Ziziphora clinopodioides، دهانشویه، آنتی باکتریال، پوسیدگی

مقدمه:

یکی از عوامل مهم در سنجش کیفیت زندگی، بررسی سلامت دهان و دندان هاست؛که تحت عنوان (Oral Health Related Quality of Life) OHRQOL شناخته می‌شود که با توجه به اهمیت آن در کیفیت زندگی در سال‌های اخیر پژوهش‌هایی جهت برآورد آن انجام شده.[۱] در بررسی سلامت دهان و دندان، پوسیدگی دندان و بیماری لثه از بیماری های شایع حفره‌ی دهان هستندکه ۸۰درصد افراد رادرگیر کرده [۲، ۳] و هزینه و وقت زیادی را به خود اختصاص میدهند.[۴] پلاک دندانی عامل اتیولوژیک اولیه و اصلی در ایجاد و پیشرفت پوسیدگی دندان، بیماری‌های پریودنتال و در نهایت از دست رفتن دندان‌ها است.[۵] یکی از مهم ترین پاتوژن‌های پوسیدگی‌زای موجود در پلاک باکتری استرپتوکوکوس موتانس هست.[۳] کنترل مکانیکی پلاک یکی از روش‌های کنترل پوسیدگی است. علیرغم اینکه کنترل مکانیکی پلاک مطمئن ترین روش رعایت بهداشت دهان و دندان می‌باشد؛ بسیاری از بیماران ازجمله کودکان، افرادی که تحت عمل جراحی بوده‌اند و معلولین قادر به کنترل پلاک به صورت مکانیکی نبوده و نیاز به استفاده از مواد شیمیایی از جمله دهان‌شویه‌ها، ژل و خمیر دندان دارند. [۶، ۷]

یک دهان شویه‌ی مطلوب علاوه بر طیف ضد میکروبی باید دارای مقاومت دارویی کمی باشد و در عین حال کمتر موجب

از بین رفتن میکروفلور طبیعی دهان گردد[۸] در مطالعات مختلف اثر دهان‌شویه‌های مختلف از جمله فلوراید و کلرهگزیدین در کاهش تعداد باکتری‌های پلاک دندانی از جمله استرپتوکوک موتانس و پیشگیری از پوسیدگی به اثبات رسیده است.

دهانشویه‌ی کلرهگزیدین هم از گروه آنتی سپتیک‌های بیس بی گوانید بوده و روی طیف وسیعی از باکتری‌ها، کاندیدا و ویروس‌ها موثر می‌باشد و از تشکیل پلاک و التهاب لثه جلوگیری می‌کند.[۳، ۴] مهم ترین عارضه‌ی کلرهگزیدین ایجاد تغییر رنگ دندان است. از سایر عوارض کلرهگزیدن مزه‌ی تلخ، اختلال در حس ذائقه، دسکواماسیون مخاطی، فراهم کردن زمینه‌ی لازم برای تشکیل جرم فوق لثه‌ای و التهاب یک طرفه یا ۲ طرفه‌ی پاروتید را میتوان نام برد. هم چنین عوارضی نظیر پاسخ‌های افزایش یافته‌ی حساسیت مانند آنافیلاکسی گزارش شده است.[۳]

از طرفی کاندیدیازیس دهانی نیز از شایع ترین عفونت‌های قارچی انسان است که به صورت فلورنرمال همزیست در ۳۰ تا ۶۰ درصد و گاهی ۷۵ درصد افراد سالم دیده می‌شود. ازجمله عوامل مستعدکننده‌ی این‌بیماری میتوان به اختلال در ترشح بزاق، استفاده از آنتی‌بیوتیک با اثر گسترده و کورتیکواستروئید به صورت طولانی، بدخیمی‌ها، بارداری، نوزادی، ایدز، سن بالا، استفاده از دنچر، لوسمی، دیابت و کشیدن سیگار اشاره کرد. [۹، ۱۰] طیف این‌عفونت‌ها از کلونیزاسیون مخاطی تا عفونت‌های مهاجم و کشنده متغیر است و یکی از علل شایع مرگ و میرهای بیمارستانی در بیماران بستری شده به ویژه در افراد دارای نقص ایمنی است.[۱۱، ۱۲] از آزول‌ها و پلی ان‌ها به صورت موضعی و از آزول‌های سیستمیک برای درمان کاندیدا استفاده می‌شود و پروفیلاکسی هم برای بیماران ایدزی و ولوسمی کاربرد دارد. [۱۰] دهان شویه‌ی کلرهگزیدین هم در این بیماران نتایج خوبی به همراه داشته اما درمان موفقیت آمیز برای سویه‌های مقاوم دربرابر عوامل ضد قارچی یک مساله‌ی پیچیده است زیرا علاوه بر محدود بودن داروهای ضد قارچی اکثرا گران، دارای طعم نامطبوع و در دوز بالا، سمی هستند.[۱۲، ۱۳]

با توجه به شیوع پوسیدگی و کاندیدای دهانی و عوارض درمان های موجود شامل دهان‌شویه‌های آنتی باکتریال و ضد قارچ‌ها، WHO (سازمان بهداشت جهانی) در سالهای اخیر مطالعه روی گونه‌های گیاهی جهت بررسی اثرات ضد میکروبی و تهیه‌ی دهان‌شویه‌های موثر بر پلاک باکتریال دندانی را در دستور کار خود قرار داده است.[۲، ۱۴] به گونه ای که اثرات مثبت مشابه داروهای شیمیایی با عوارض کمتر داشته باشد.[۱۲]

گیاه کاکوتی(Ziziphora clinopodioide)یکی از گیاهان دارویی از تیره‌ی نعنائیان است که در نواحی کوهستانی ایران مانند ارتفاعات شهرستان بجنورد و جاجرم واقع در خراسان شمالی می‌روید.[۱۵] گیاه قان‌تپر (Biebersteinia multifida) یکی از گیاهان دارویی از خانواده biebersteiniaceae (شمعدانی) است که به صورت خودرو در بسیاری از مناطق ایران می‌روید که به طور سنتی در خراسان شمالی به آن قان‌تپر می‌گویند.[۱۶]

این دو گیاه از جمله گیاهان بومی منطقه هستند و استفاده ی معمول از آنها موجب شد تا به اثر آنها در حوزه ی دهان و دندان توجه شود. هدف از این پژوهش بررسی آزمایشگاهی اثر عصاره های متانولی و اتانولی گیاه کاکوتی(Ziziphora clinopodioides and و قان‌تپر(biebersteinia multifidi) بر رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس و قارچ کاندیدا آلبیکنس است تا بتوان قدمی در راستای اهداف WHO برداشت.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه از نوع تجربی و آزمایشگاهی بود و بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس قارچ کاندیدا آلبیکنس صورت پذیرفت. اثر دو گیاه قان‌تپر و کاکوتی بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس و قارچ کاندیدا آلبیکنس بر روی عصاره‌های متانولی، اتانولی ،کنترل مثبت و کنترل منفی در روش mic-mbc سه بار تکرار شد. گیاهان Ziziphora clinopodioides و

Biebersteinia multifida از مناطق کوهستانی خراسان شمالی جمع‌آوری شد و بعد از تایید نام علمی آن‌ها در هرباریوم گیاهی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، برگ-های کاکوتی و ریشه‌ی قان‌تپر در هوای آزاد و در سایه خشک شد، سپس توسط دستگاه خردکن Desktopmill(Iran شرکت توس شکن خراسان) آسیاب گردید. این مطالعه با کد اخلاق IR.NKUMS.REC.1397.039 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی مورد تایید قرار گرفت.

عصاره‌های مختلف با استفاده از حلال‌های متانول و اتانول، هر یک به صورت جداگانه و به روش خیساندن(قرار گرفتن حلال و گیاه پودر شده در دمای محیط و به مدت ۴۸ ساعت) استخراج شد. در این مرحله ۱۰۰ گرم کاکوتی و ۸۰۰ گرم قان‌تپر پودر شده در ۵۰۰ میلی لیتر متانول و اتانول به صورت مجزا به مدت ۴۸ ساعت خیسانده شد سپس از صافی رد شد تا حلال برای مرحله‌ی بعد جدا شود. این مرحله تا زمان تغییر رنگ حلال و خروج کامل مواد ادامه پیدا کرد. در نهایت محلول به دست آمده از کاغذ فیلتراسیون (, Englandمارک واتمن) عبور داده شد و سپس در تبخیرکننده چرخان (Iran روتاری مارک هایدولف ساخت پرشیای) ریخته شد و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۸۰ mbar تغلیظ گشت. بازده عصاره‌ی متانولی قان تپر ۲/۴۳٪، بازده اتانولی قان‌تپر ۱/۸۷۵٪، بازده عصاره‌ی اتانولی کاکوتی ۱٪ و عصاره‌ی متانولی کاکوتی۶/۱٪ بود. در نهایت عصاره‌ی به دست آمده در پلیت ریخته شد و در انکوباتور(memert,Germany) با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا پودر عصاره حاصل گشت. پودر حاصله تا زمان آزمایش در یخچال(c°۴+) نگهداری شد.

در این تحقیق سوش باکتری استرپتوکوکوس موتانس-(IBRC10682) و قارچ کاندیدا آلبیکنس (ATCC10231) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. ابتدا این میکروب‌ها هریک به صورت جداگانه بر روی محیط کشت اختصاصی خود (,Merck Germany) کشت داده‌شد. آمپول لیوفیلیزه باکتری استرپتوکوکوس موتانس/ قارچ کاندیدا آلبیکنس در شرایط کاملا استریل در زیر هود در کنار شعله باز شد و با کمک سرنگ یک سی‌سی از محیط سوی بین کازئین براث یا تریپتیک سوی بین براث (TSB) برداشته و به قرص داخل ویال شیشه ای افزوده، سپس بعد از حل شدن قرص، چند قطره از محلول را بر روی محیط سوی بین کازئین آگار به صورت خطی کشت داده و در انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. از روش اندازه‌گیری میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری‌ها و قارچ‌ها (MBC و MFC) برای تعیین حساسیت این میکروارگانیسم‌ها نسبت به مواد ضد میکروبی استفاده گردید.

برای تمامی پودر عصاره‌های گیاهی از غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. ابتدا مقدار دو دهم گرم از هر یک از پودر عصاره‌ها را وزن نموده و در یک سی‌سی دی متیل سولفوکساید در دستگاه اولتراسونیک(Germany مارک elma) به کمک امواج صوتی سطح بالا حل نموده و در زیر هود یک سی‌سی از محیط‌های کشت مولر هینتون براث(باکتری)، سوی بین کازئین براث(قارچ) به آن‌ها افزوده تا غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حاصل گشت، به همین ترتیب با انتقال یک سی‌سی از غلظت اولیه به یک سی‌سی از محیط کشت‌های مربوطه، سایر غلظت‌ها ساخته شد.

در این روش مقدار ۲۰۰ مایکرولیتر(لاندا) از غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هر یک از عصاره‌ها (تهیه شده در محیط کشت مولر هینتون براث (باکتری)، سوی بین کازئین براث(قارچ)) به خانه‌های پلیت ۹۶ خانه جداگانه منتقل گشت سپس از سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند (باکتری یا قارچ) به میزان ۲۰ مایکرولیتر به هر یک از خانه‌های حاوی غلظت‌های مختلف اضافه شد. به عنوان کنترل مثبت، در خانه‌های هر دو پلیت۱۵۰ مایکرولیتر از محیط کشت(مولر هینتون براث و سوی بین کازئین براث)، ۲۰ مایکرولیتر سوسپانسیون باکتری و

قارچ و ۵۰ مایکرولیتر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین برای باکتری وضد قارچ نیستاتین اضافه گردید. از خانه‌های حاوی ۲۰۰ مایکرولیتر از محیط کشت(مولر هینتون براث و سوی بین کازئین براث) و باکتری/ قارچ به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

پلیت ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ^{o}C ۳۲-۳۷ قرار داده شد. پس از این مدت به تمام خانه‌های هر پلیت ۵۰ ماکرولیتر از معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید(معرف شناسایی) حضور میکروارگانیسم رشد یافته (Germany محصول شرکت Merck اضافه شد و مجدداً به مدت ۳ ساعت در گرمخانه قرار داده شد.

پس از خروج از گرمخانه، در هر ردیف مربوط به غلظت‌های مختلف یک عصاره، اولین غلظتی که در آن رنگ قرمز تشکیل نشده و فاقد کدورت باشد، به عنوان MIC (حداقل غلظت مهارکنندگی که باعث توقف رشد باکتری/قارچ شده و جلو افزایش تعداد آن را می‌گیرد ولی باعث کشتن آنها نمی‌گردد (باکتریواستاتیک)در نظر گرفته شد. ملاک تشخیص کدورت نیز درمیکرو پلیت ۹۶ خانه تغییر رنگ محلول به قرمز و رسوب ذرات باکتری درون هر چاهک بود که بعد از افزودن ترکیب تری فنیل تترازولیم کلراید اتفاق افتاد.

برای بدست آوردن مقادیر حداقل غلظت کشندگی , MFC) (MBCبرای هر یک از این ۴ نوع عصاره، از کلیه خانه‌هایی که رنگ قرمز در آن‌ها تشکیل نشده بود و فاقد کدورت بودند، یک لوپ به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار و سوی بین کازئین آگار منتقل گشت. این کار در کنار شعله انجام شد. اولین غلظتی از هر عصاره که در پلیت مربوط به آن رشد مشاهده شد، به عنوان MBC، MFC در نظر گرفته شد.

اطلاعات این مطالعه پس از جمع آوری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پس از بررسی نرمالیتی داده ها با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف، نتایج این آزمون معنادار بود که نشان دهنده غیر نرمال بودن توزیع داده ها بود. بنابراین برای مقایسه بین گروهی از آزمون غیر پارمتری من ویتنی برای بررسی فرضیات مطالعه استفاده گردید. سطح معناداری برای کلیه آزمونها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها:

در این مطالعه اثر نتایج بررسی تفاوت غلظت مهارکنندگی(MIC) بین عصاره‌ی اتانولی و متانولی گیاهان مورد بررسی بر روی کاندیدا البیکنس و باکتری استرپتوکوکوس موتانس در جدول ۱ دیده می شود.

جدول ۱- تفاوت غلظت مهارکنندگی(MIC) بین عصاره‌ی اتانولی و متانولی گیاهان مورد بررسی بر روی کاندیدا البیکنس و باکتری استرپتوکوکوس موتانس

نوع گیاه	نوع عصاره	مقادیر توصیفی استرپتوکوکوس موتانس			مقادیر توصیفی کاندیدا البیکنس		
		انحراف معیار± میانگین	میانه	P	انحراف معیار± میانگین	میانه	P
قان‌تپر	اتانولی	۶/۳* ± ۰/۰	۶.۲۵	۱	۴/۲ ± ۱/۸	۳.۱۲۵	۰/۱۲
	متانولی	۶/۳ ± ۰/۰	۶.۲۵		۶/۳ ± ۰/۰	۶.۲۵	
کاکوتی	اتانولی	۸/۳ ± ۳/۶	۶.۲۵	۰/۷۹۶	۳/۱۲ ± ۰/۰	۳.۱۲۵	۰/۳۱۷
	متانولی	۱۲/۵ ± ۱۰/۸	۶.۲۵		۴/۲ ± ۱/۸	۳.۱۲۵	

*واحد مربوطه،میلی گرم بر میلی لیتر از ماده مورد نظر است.

جدول ۲. تفاوت غلظت کشندگی MBC/MFC در دو عصاره‌ی اتانولی و متانولی گیاهان مورد بررسی بر روی کاندیدا البیکنس و باکتری استرپتوکوکوس موتانس

نوع گیاه	نوع عصاره	مقادیر توصیفی استرپتوکوکوس موتانس			مقادیر توصیفی کاندیدا البیکنس		
		میانگین±انحراف معیار	میانه	P	میانگین±انحراف معیار	میانه	P
قان‌تپر	اتانولی	۱۰۰/۰ ± ۰/۰*	۱۰۰	۰/۰۲۵	۵۰/۰ ± ۰/۰	۵۰	۱
	متانولی	۱۰۱/۰ ± ۰/۰	۱۰۰		۵۰/۰ ± ۰/۰	۵۰	
کاکوتی	اتانولی	۱۰۰/۰ ± ۰/۰	۱۰۰	۰/۱۱۴	۲۵/۰ ± ۰/۰	۲۵	۰/۰۲۵
	متانولی	۶۶/۷ ± ۲۸/۹	۵۰		۱۲/۵ ± ۰/۰	۱۲/۵	

*واحد مربوطه،میلی گرم بر میلی لیتر از ماده مورد نظر است

با توجه به نتایج به دست آمده در گیاه قان‌تپر بین دو روش عصاره‌گیری اتانولی و متانولی بر روی غلظت مهارکنندگی باکتری استرپتوکوکوس موتانس تفاوت معناداری از نظر آماری مشاهده نگردید. (P=۱) همچنین اثر غلظت مهارکنندگی بین عصاره‌ی اتانولی و متانولی گیاه کاکوتی تفاوت معناداری را در مهارکنندگی باکتری استرپتوکوکوس موتانس نداشت. (P=۰/۷۹) و می‌توان گفت که این دو عصاره‌ی گیاه کاکوتی اثر مهارکنندگی یکسانی بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس داشتند.

علاوه بر این اثر غلظت مهارکنندگی دو نوع عصاره‌ی اتانولی و متانولی گیاه قان‌تپر تفاوت معناداری از نظر آماری را بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس نشان نداد. (P=۰/۱۲) و میتوان گفت که دو نوع عصاره اتانولی و متانولی گیاه قان‌تپر اثر مهارکنندگی یکسانی بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس دارند. همچنین بررسی ها نشان داد که غلظت مهارکنندگی دو نوع عصاره‌ی اتانولی و متانولی گیاه کاکوتی بر قارچ کاندیدا آلبیکنس تفاوت معناداری از نظر آماری نداشت. (P=۰/۳۱) می‌توان گفت اثر مهارکنندگی دو نوع عصاره‌ی کاکوتی بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس یکسان می‌باشد.

نتایج حاصل از بررسی تفاوت غلظت کشندگی MBC/MFC در دو عصاره‌ی اتانولی و متانولی گیاهان مورد بررسی بر روی کاندیدا البیکنس و باکتری استرپتوکوکوس موتانس در جدول ۲ به نمایش در آمده است.

حداقل غلظت کشندگی(MBC) بررسی شده نیز نشانگر این است که عصاره‌ی اتانولی دو گیاه قان‌تپر و کاکوتی بر باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* ۱۰۰ mg/ml است. MBC عصاره‌ی متانولی قان‌تپر بر باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* بیشتر از ۱۰۰ mg/ml است و MBC عصاره‌ی متانولی کاکوتی بر باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* مشابه MBC عصاره‌ی اتانولی و متانولی گیاه قان‌تپر بر قارچ *کاندیدا آلبیکنس* بوده و ۵۰ mg/ml است. در حالیکه MBC عصاره‌ی اتانولی کاکوتی بر *کاندیدا آلبیکنس* ۲۵ mg/ml و متانولی آن ۱۲/۵ mg/ml است.

بحث

استفاده از گیاهان دارویی مزیت‌های متعددی از جمله ارزان بودن، در دسترس بودن و سازگاری با طبع بیماران دارد که این موارد در کنار عوارض ناشی از درمان‌های مدرن لزوم توجه به این دسته از دارو ها را دو چندان می کند. [۱۸،۱۷] هدف از انجام این مطالعه تعیین اثر دو گیاه کاکوتی و قان‌تپر بر باکتری استرپتوکوکوس‌موتانس و قارچ کاندیدا آلبیکنس بود.نتایج آزمایشات در قسمت حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) عصاره‌ی اتانولی و متانولی کاکوتی و قان‌تپر بر باکتری

استرپتوکوکوس موتانس ۶/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. اثر عصاره‌ی اتانولی و متانولی کاکوتی و اتانولی قان‌تپر بر *کاندیدا آلبیکنس* نیز مشابه هم بوده و حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) آن ها ۳/۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر است. در حالیکه MIC عصاره‌ی متانولی قان‌تپر بر *کاندیدا آلبیکنس* ۶/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

حداقل غلظت کشندگی(MBC) بررسی شده نیز نشانگر این است که عصاره‌ی اتانولی دو گیاه قان‌تپر و کاکوتی بر باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* ۱۰۰میلی گرم بر میلی لیتر است.

MBCعصاره‌ی متانولی قان‌تپر بر باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* بیشتر از ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر است و MBC عصاره‌ی متانولی کاکوتی بر باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* مشابه MBC عصاره‌ی اتانولی و متانولی گیاه قان‌تپر بر قارچ *کاندیدا آلبیکنس* بوده و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر است. در حالیکه MBC عصاره‌ی اتانولی کاکوتی بر *کاندیدا آلبیکنس* ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر و متانولی آن ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر است.

نتایج این پژوهش حاکی از این است که هر دو گیاه قان‌تپر و کاکوتی بر *کاندیدا آلبیکنس* و باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* موثر بوده‌اند. البته تفاوت‌ها و شباهت‌هایی از نظر اثرگذاری بین این دو عصاره‌ی گیاهی دیده شد، به طوری که MIC عصاره‌ی اتانولی و متانولی کاکوتی و قان‌تپر بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس مشابه بود. این چهار نوع عصاره بر کاندیدا آلبیکنس، به جز عصاره متانولی قان‌تپر MIC مشابه داشتند. اثرگذاری سایر عصاره‌ها بیشتر از عصاره‌ی متانولی قان تپر مشاهده گشت. دلیل تفاوت در اثرگذاری، احتمالا به خاطر ترکیبات قان‌تپر و اثری که متانول بر آن دارد، می باشد.

از نظر شاخص MBC و در مورد *استرپتوکوکوس موتانس* نیز، عصاره‌ی متانولی کاکوتی دارای بیشترین اثرگذاری و عصاره‌ی متانولی قان‌تپر نیز دارای کمترین اثرگذاری بودند. همچنین عصاره‌ی متانولی کاکوتی اثر کشندگی بیشتری بر *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به سه عصاره‌ی دیگر داشت.

Soltaninejad و همکارانش در مطالعه‌ای به بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس و عصاره‌ی متانولی کاکوتی کوهی بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زا پرداختند. رشد همه‌ی باکتری‌های مورد بررسی به جز سودوموناس آئروژینوزا بوسیله اسانس و عصاره‌ی کاکوتی کوهی مهار شد. حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس برای لیستریا منوسیتوژنز ۰/۱۲۵ µg/ml و برای متانولی سالمونلا انتریکا و انتروباکتر آئروژنز ۰/۲۵ µg/ml بود که با حداقل غلظت میکروب‌کشی اسانس برابر می‌باشد. در مورد عصاره متانولی حداقل غلظت مهارکنندگی و میکروب‌کشی برای *لیستریا منوسیتوژنز* ۱ µg/ml، *سالمونلا انتریکا، استافیلوکوکوس اورئوس و انتروباکتر آئروژنز* ۲µg/ml مشاهده شد. اسانس و عصاره‌ی متانولی کاکوتی کوهی اثر ضد باکتریایی قوی بر روی بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا به ویژه *لیستریا منوسیتوژنز* داشت. در مقایسه با عصاره متانولی، اسانس تاثیر بیشتری بر روی باکتری های مورد بررسی داشت، زیرا در غلظت‌های کمتری قادر به جلوگیری از رشد باکتری‌ها بود[۱۹] نتایج این مطالعه با مطالعه‌ی ما مشابه و حاکی از تاثیر عصاره کاکوتی بر باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* بود با این تفاوت که حداقل غلظت اثر کاکوتی در این مطالعه نسبت به مطالعه حاضر کمتر بود که احتمالا به دلیل تفاوت در روش عصاره-گیری، شرایط آب و هوایی، محل رویش، ارتفاع محل جمع آوری گیاه در این مطالعه می‌باشد. Shafei و همکارانش به شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس کاکوتی و بررسی اثر ضد میکروبی آن بر روی مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* پرداختند. نتیجه‌ی حاصل حاکی از آن بود که MIC اسانس کاکوتی بر مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* ۰/۲۵ درصد بود، که نشانی از موثر بودن اسانس کاکوتی است. [۲۰] نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه حاضر مشابه بود که احتمالا به علت شباهت در محل جمع‌آوری گیاه از مناطق کوهستانی خراسان باشد. بررسی Ozturk و همکاران بر روی فعالیت ضد باکتریایی و ترکیبات شیمیایی گیاه Ziziphora clinopodioides که از ارتفاع ۲۹۰۰متری کوه های Erzurum–Palandokenترکیه جمع آوری شده بود؛ نشان داد

که اسانس کاکوتی کوهی از۳۱/۸۶ ٪ پولگون، ۱۲/۲۱٪ سینئول-۱و۸، ۱۰/۴۸٪ لیمونن، ۹/۱۳٪ منتول، ۶/۸۸٪ بتا پینن، ۶/۷۳٪ منتون،۵/۳۰٪ پیپریتنون و ۴/۱۸٪ پیپریتون تشکیل شده است. در این پژوهش اثر اسانس و عصاره‌ی متانولی این گیاه بر روی ۵۲ گونه باکتری گرم مثبت و منفی بررسی شده بود که بر روی طیف وسیعی موثر واقع شده و بیشترین MIC، ۵۰۰µg/ml بود.[۲۱] نتایج این مطالعه نیز با مطالعه‌ی ما مشابه بود.Zajkani و همکاران در یک مطالعه به بررسی اثر دهانشویه های فلوراید ۰/۰۵ درصد و کلرهگزیدین ۰/۲ درصد در مقایسه با دهانشویه ترکیبی نانوسیل F+D1 بر روی استرپتوکوکوس موتانس پرداختند. در این مطالعه مقادیر MICو MBC دهانشویه ها بر روی استرپتوکوکوس موتانس در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت که جهت غربالگری اثرات ضد میکروبی، قطر هاله عدم رشد دهانشویه ها به روش چاهک-پلیت اندازه گیری شد. میزان MIC برای دهانشویه فلوراید، کلرهگزیدین و نانوسیل ۱۲۵mg/mL ، ۳.۹ ، ۱.۹۵ تعیین شد.[۲۲] این مطالعه نتیجه مشابه با مطالعه حاضر داشت اما میزان MIC دو دهانشویه کلرهگزیدین و نانوسیل کمتر از عصاره های استفاده شده در مطالعه ما بود که احتمالا به دلیل استفاده از مواد متفاوت با این مطالعه بود. Mahoubi و همکارانش در پژوهشی به بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس ziziphora tenuir پرداختند. در این پژوهش به این مساله که اقلیم منطقه و شرایط محیطی بر روی محتوای اسانس موثر است تاکید شده و میزان MIC بر روی باکتری‌ها و قارچ‌های مختلفی بررسی شده و شاهد اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی آن بوده است. ترپینئول موجود در این گیاه جزء اصلی بوده و عامل اصلی در فعالیت ضد باکتریایی آن است. از سویی دیگر ترپینئول فعالیت میکروبیولوژیک قابل توجهی علیه کاندیدا آلبیکنس دارد. MIC این گیاه بر کاندیدا آلبیکنس µ۲l/ml به دست آمد.[۲۳] نتایج این مطالعه نیز با مطالعه‌ی ما مشابه بود با این تفاوت که حداقل غلظت مهاری دهان‌شویه استفاده شده در این مطالعه کمتر از مطالعه‌ی حاضر بود که احتمالا به دلیل استفاده از اسانس به جای عصاره و استفاده از ماده‌ی ضد میکروبی متفاوت است.

قان‌تپر یک گیاه بومی ایران است که ریشه‌ی آن به صورت موضعی برای درمان اختلالات اسکلتی-عضلانی به عنوان یک داروی محلی مورد استفاده قرار گرفته است. اثرات ضد التهابی و ضد درد عصاره‌ی ریشه این گیاه در پژوهش Farsam و همکارانش مورد بررسی قرار گرفت. اثر ضد دردی قان-تپر(۵۰mg/kg) با مورفین(۵ mg/kg) تفاوت معناداری نداشت و این عصاره هم به صورت مرکزی و هم محیطی به عنوان ضد درد عمل می‌کند. در این پژوهش اندازه و تعداد زخم های مخاطی بعد از مصرف قان‌تپر به طور قابل توجهی کمتر از زمان مصرف اندومتاسین بود.[۲۴]Ghodrati و همکارانش در مطالعه ای خاصیت آنتی‌باکتریایی عصاره های اتانولی، دی کلرومتانی و هگزانی ریشه‌ی گیاه آدمک(قان تپر) را بر سه باکتری گرم منفی و سه باکتری گرم مثبت بررسی کردند. گیاه مورد نظر از اسدلی خراسان شمالی جمع آوری گشته و عصاره ی اتانولی آن بر E. Coli و B. cereus تنها در غلظت۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر آنتی‌باکتریایی(MBC) داشت. این موضوع شاید نشان‌دهنده‌ی این باشد که عصاره‌ی این گیاه بر این باکتری‌ها اثرات آنتی‌باکتریال قوی ندارد و برای رسیدن به اطمینان باید مواد خالص‌تر از عصاره را (مانند اسانس) استخراج و بررسی کرد[۲۵] نتایج حاصل از پژوهش ما نیز مشابه نتایج قدرتی بوده و اثرگذاری در غلظت بیشتر از ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است که نیازمند بررسی اسانس بر روی میکروب‌های دهانی است تا به نتایج قابل اطمینان برسد.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره های گیاهی قان تپر و کاکوتی می تواند دارای اثرات آنتی باکتریال بر روی استرپتوکوک موتانس و ضد قارچ بر روی کاندیدا آلبیکانس می باشد.

پیشنهادات: مطالعه به روش اثر انسانی این گیاهان بر میکروب های دهانی پیشنهاد می شود.

References:

1.Haque MM, Alsareii SA. A review of the therapeutic effects of using miswak (Salvadora Persica) on oral health. Saudi Med J. 2015;36(5):530-43.

2.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.

3.Kurita-Ochiai T, Jia R, Cai Y, Yamaguchi Y, Yamamoto M. Periodontal Disease-Induced Atherosclerosis and Oxidative Stress. Antioxidants (Basel). 2015;4(3):577-90.

4.Kwan SY, Petersen PE, Pine CM, Borutta A. Health-promoting schools: an opportunity for oral health promotion. Bull World Health Organ. 2005;83(9):677-85.

5.Bhat N, Bapat S, Asawa K, Tak M, Chaturvedi P, Gupta VV, et al. The antiplaque efficacy of propolis-based herbal toothpaste: A crossover clinical study. J Nat Sci Biol Med. 2015;6(2):364-8.

6.Patil SS, Rakhewar PS, Limaye PS, Chaudhari NP. A comparative evaluation of plaque-removing efficacy of air polishing and rubber-cup, bristle brush with paste polishing on oral hygiene status: A clinical study. J Int Soc Prev Community Dent. 2015;5(6):457-62.

7.Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. Oral Microbiol Immunol. 2004;19(1):61-4.

8.Liu BY, Lo EC, Chu CH, Lin HC. Randomized trial on fluorides and sealants for fissure caries prevention. J Dent Res. 2012;91(8):753-8.

9.Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of Candida albicans in man. Arch Oral Biol. 1980;25(1):1-10.

10.Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis MA. In vitro susceptibility of oral Candida to seven antifungal agents. Oral Microbiol Immunol. 2005;20(6):349-53.

11.Cuellar-Cruz M, Vega-Gonzalez A, Mendoza-Novelo B, Lopez-Romero E, Ruiz-Baca E, Quintanar-Escorza MA, et al. The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by Candida species: a review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(10):2513-27.

12.Raut JS, Shinde RB, Chauhan NM, Karuppayil SM. Phenylpropanoids of plant origin as inhibitors of biofilm formation by Candida albicans. J Microbiol Biotechnol. 2014;24(9):1216-25.

13.Motsei ML, Lindsey KL, van Staden J, Jager AK. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against Candida albicans. J Ethnopharmacol. 2003;86(2-3):235-41.

14.Jain A, Bhaskar DJ, Gupta D, Agali C, Gupta V, Gupta RK, et al. Comparative evaluation of honey, chlorhexidine gluconate (0.2%) and combination of xylitol and chlorhexidine mouthwash (0.2%) on the clinical level of dental plaque: A 30 days randomized control trial. Perspect Clin Res. 2015;6(1):53-7.

15. Khosravi AR, Minooeianhaghighi MH, Shokri H, Emami SA, S MA, Asili J. The potential inhibitory effect of cuminum cyminum, ziziphora clinopodioides and nigella sativa essential oils on the growth of Aspergillus fumigatus and Aspergillus. Braz J Microbiol. 2011;42(1):216-24.

16Gursoy N, Sihoglu-Tepe A, Tepe B. Determination of in vitro antioxidative and antimicrobial properties and total phenolic contents of Ziziphora clinopodioides, Cyclotrichium niveum, and Mentha longifolia ssp. typhoides var. typhoides. J Med Food. 2009;12(3):684-9.

17. Jain A, Bhaskar DJ, Gupta D, Agali C, Gupta V, Gupta RK, et al. Comparative evaluation of honey, chlorhexidine gluconate (0.2%) and combination of xylitol and chlorhexidine mouthwash (0.2%) on the clinical level of dental plaque: A 30 days randomized control trial . Perspect Clin Res. 2015;6(1):53-7.

18Hajifattahi 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.

19.Soltani nejad SH, Setayi mokhtari T, Rahbariyan P. Antimicrobial activity of essential oil and methanolic extracts of Kakotti Mountain on some pathogenic bacteria. Journal Of Microbial Biotechnology 2010;2(5): 1-6. (Persian)

20. M. shafei , A. Sharifan , M. Aghazade Meshki. Composition of Essential Oil of Ziziphora clinopodioides and Its Antimicrobial Activity on Kluyveromyces marxianus.JFTN 2010;9(1): 101-106. (Persian)

21 Ozturk S, Ercisli S. Antibacterial activity and chemical constitutions of Ziziphora clinopodioides. Food control 2007;18(5):535-40.

22. zajkani E, abdi Z, Zeighami H. Evaluating the effect of 0.05% fluoride and chlorhexidine 0.2% mouthwashes in comparison to nanosil D1+F mouthwash on Streptococcus mutans, in vitro. J Res Dent Sci. 2022; 19 (1) :28-36

23 Mahboubi M, Kazempour N, Hosseini H. Chemical composition, antimicrobial activity of essential oil from Ziziphora tenuir L. aerial parts. J ESSENT OIL BEAR PL 2012;15(4):545-9.

24..Farsam H, Amanlou M, Dehpour AR, Jahaniani F. Anti-inflammatory and analgesic activity of Biebersteinia multifida DC. root extract. J Ethnopharmacol 2000;71(3):443-7.

25. Ghodrati n, Asili J, Mohammadi Sani A, Fazli Bazzaz B. S. Evaluation of Antibacterial activities of different roots extracts of Biebersteinia multifida DC.NKUMS Journal 2012;4 ;149-154.(Persian)