

بررسی اثر ضد میکروبی گیاه (تورید) *Daphne Oleoides* روی باکتری های جدا شده از پلاک دندانی

فاطمه موسوی^۱، کلثوم شیرزادی کرم الله^۱، حسن محمودی^{۲*}

^۱ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، لرستان، ایران

^۲ دکتری تخصصی باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ ارائه مقاله: ۹۸/۳/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۱۴

Antimicrobial Effect of Extracts of *Daphne Oleoides* on Bacteria Isolated from Dental Plaque

Fatemeh Mousavi¹, Kolsoom Shirzadi Karamolah¹, Hassan Mahmoudi^{2*}

¹ Master of Microbiology, Islamic Azad University, Boroujerd Branch, Lorstan, Iran

² Ph.D. of Medical Microbiology, Microbiology Department, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Received: 10 June 2019; Accepted: 6 October 2019

Introduction: Oral cavity a favorable environment for the growth and colonization of a wide range of bacteria. Plaques or dental biofilms are a wide variety of bacteria found on a tooth surface. The aim of the present study is to investigate the antibacterial effect of *Daphne Oleoides* on bacteria isolated from dental plaque.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, after the collection of dental plaques and isolation of bacteria, bacteria were identified using biochemical tests and Polymerase chain reaction (PCR). Leaves and stems of *D. oleoides* were collected in the growing season and dried in shadows. The aqueous, alcoholic and hydroalcoholic extracts of *D. oleoides* were withdrawn using the classical extraction method. Thereafter, its antimicrobial effects on bacteria isolated from dental plaque were examined using the disk diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC). Data were analyzed using Turkey's and Anova test ($P < 0.05$).

Results: The obtained results of the present study confirmed the presence of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans* in the collected dental plaques. The alcoholic extract demonstrated its highest antimicrobial activity against *S. mutans* with 20.55 ± 1.05 mm inhibition zone and a Minimum lethal concentration (MLC) of 0.19 mg/ml. On the other hand, the lowest antimicrobial activity of the alcoholic extract was reported to be against *S. epidermidis* with 7.4 ± 0.5 mm inhibition zone and MLC 12.5 mg/ml.

Conclusion: The results of the current study indicated that the alcoholic extract of *D. oleoides* is able to withdraw antibacterial compounds on the bacteria which are responsible for oral infections.

Key words: Dental plaque, Minimum inhibitory concentration (MIC), *Daphne Oleoides*.

*Corresponding Author: Hassanmahmoudi24@gmail.com

J Mash Dent Sch 2019; 43(4): 387-400.

چکیده

مقدمه: حفره دهانی محیط مطلوبی برای رشد و کلونیزاسیون طیف گسترده ای از باکتری ها می باشد. پلاک یا بیوفیلم دندانی به مجموعه ای متنوع از باکتری ها اطلاق می شود که بر روی سطح دندان یافت می شوند. هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضد میکروبی گیاه تورید *Daphne Oleoides* روی باکتری های جدا شده از پلاک دندانی بود.

مواد و روش ها: این مطالعه مقطعی، پس از جمع آوری پلاک های دندانی، جداسازی باکتری های موجود در نمونه ها، شناسایی باکتری ها توسط تست های بیوشیمیایی و واکنش زنجیره پلیمرز (Polymerase Chain Reaction) صورت گرفت. برگ و ساقه گیاه *D. Oleoides* در فصل های رویش جمع آوری و در سایه خشک شد. عصاره آبی، الکلی و هیدروالکلی این گیاه با روش عصاره گیری کلاسیک استخراج شد. سپس اثرات ضد میکروبی آن با روش انتشار دیسک و حداقل غلظت مهار کنندگی مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از آزمون کروسکال-والیس و Dunn انجام شد ($\alpha = 0.05$).

یافته ها: در پلاک های دندانی جمع آوری شده، حضور باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، سودوموناس آئروجینوزا و استرپتوکوکوس موتانس به اثبات رسید. عصاره الکلی بیشترین فعالیت ضد میکروبی خود را علیه باکتری استرپتوکوکوس موتانس

با قطر هاله عدم رشد $1/05 \pm 20/55$ میلی متر و کمترین غلظت کشندگی $0/19$ میلی گرم بر میلی لیتر نشان داد. از سوی کمترین توان ضد میکروبی عصاره الکلی علیه باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس با قطر هاله عدم رشد $7/4 \pm 0/5$ میلی متر و غلظت $12/5$ میلی گرم بر میلی لیتر نشان داده شد ($P < 0/05$).

نتیجه گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره الکلی گیاه *D.Oleoides* توانایی استخراج ترکیبات آنتی باکتریایی بر ضد باکتری های ایجاد کننده عفونت های دهانی را دارد.

کلمات کلیدی: پلاک های دندانی، حداقل غلظت مهار کنندگی، گیاه توربید
مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۸ دوره ۴۳ / شماره ۴ : ۴۰۰-۳۸۷.

مقدمه

در درمان بیماری ها و با توجه به در دسترس بودن و سازگاری بیشتر آنها با سیستم ایمنی انسان، استفاده از گیاهان و مواد مؤثره آن ها در مقابله با عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی رو به افزایش است.^(۸و۹) ایران از لحاظ آب و هوا، موقعیت جغرافیایی و زمینه رشد گیاهان دارویی یکی از بهترین مناطق جهان محسوب می گردد.^(۱۰) گونه های دافنه متعلق به خانواده تیمیلاسه است که دارای ۵۰ تیره و در حدود ۵۰۰ گونه می باشد. این گیاه بوته ای معمولاً در آب و هوای گرم و استوایی و به ویژه در نواحی جنوبی آفریقا، مدیترانه و به میزان کمتر در آمریکای جنوبی و جزایر اقیانوس آرام می روید. در پاکستان و ایران ۵ تیره و ۷ گونه از آن وجود دارد.^(۱۱) مطالعات متعددی نشان داده اند که گونه های دافنه (*Daphne oleoides* و *Daphne genkwa*) به عنوان تولیدکننده های محصولات طبیعی مانند کومارین ها، لیگنان، تربتپنوتیدها و کومارینولیکانان ها شناخته می شوند. گیاهان گونه دافنه در طب به خوبی شناخته شده اند و در طب سنتی برای درمان زخم معده، رماتیسم و پوسیدگی و درد دندان، گنوره آ و سرطان استفاده می شود.^(۱۲و۱۳) در بین گونه های دافنه، گونه *D.Oleoides* دارای اثرات درمانی فراوانی می باشد.^(۱۴) با توجه به اینکه تاکنون بر روی اثر ضدباکتریایی عصاره این گیاه بر روی باکتری های دهان و باکتری های جدا شده از عفونت های بیمارستانی تحقیقاتی جامع و کامل انجام نشده است، بنابراین بررسی اثر ضدباکتریایی این گیاه ضرورت دارد تا شاید بتوان در آینده

حفره دهانی محیط مناسبی برای رشد و کلونیزاسیون طیف وسیعی از باکتری ها می باشد. پلاک یا بیوفیلم دندانی، اشاره به مجموعه ای متنوع از باکتری ها دارد که بر روی سطح دندان یافت می شوند. اگر پلاک دندانی به طور کامل برداشته نشود پوسیدگی دندان رخ خواهد داد.^(۱۵) پوسیدگی دندانی ناشی از تخریب ساختارهای دندانی توسط اسید تولید شده از سوخت و ساز کربوهیدرات ها توسط باکتری های بی هوازی موجود در پلاک دندانی می باشد.^(۳) ساکنین اولیه پلاک دندانی از جمله استافیلوکوکوس ارئوس، باکتری های هوازی می باشند که با مصرف اکسیژن و کاهش پتانسیل اکسیداسیون و احیاء شرایط مساعد را برای رشد باکتری های بی هوازی فراهم می نمایند.^(۴) امروزه مقاومت باکتریایی نسبت به آنتی بیوتیک ها به صورت یک معضل جهانی در امر درمان بیماری های عفونی درآمده است. از این جهت در سالیان اخیر استفاده از گیاهان دارویی به علت عوارض کمتر آنها مورد توجه قرار گرفته است.^(۵) مشکل مقاومت به آنتی بیوتیک ها به دلایل مختلف از جمله مصرف بی رویه و نامناسب آنها اتفاق می افتد. مقاومت آنتی بیوتیکی نه تنها باعث افزایش مرگ و میر می شود بلکه موجب تلاش برای ساخت آنتی بیوتیک های جدید می شود. که مشکل این نوع آنتی بیوتیک های جدید هزینه بسیار بالای آنهاست.^(۶و۷) با توجه به اثرات مفید گیاهان دارویی

تست اکسیداسیون- تخمیر انجام و باکتری تعیین هویت گردید.^(۱۴)

ژنوم سویه های جدا شده از پلاک های دندانی که شامل باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استرپتوکوکوس موتانس، و سودوموناس آئروژینوزا بود، از کشت های ۲۴ ساعته این باکتری ها و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (Bioflux Japan) استخراج گردید. سپس DNA استخراج شده در فریزر -۲۰- درجه سلیسیوس ذخیره گردید. برای تأیید هویت باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استرپتوکوکوس موتانس، و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ژن های *gseA*، *nuc*، *gtf* و *las I* شناسایی شدند. برای انجام واکنش PCR، ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده به ۱۸ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR (Master Mix . شرکت آمپلیکون) اضافه گردید. به منظور تکثیر ژن های *gseA*، *nuc*، *gtfB* و *las I* از پرایمرهای جدول ۱ استفاده شد.

از آن به عنوان جایگزین و یا مکمل داروهای سنتتیک و دهان شویه های شیمیایی استفاده نمود.

مواد و روش ها

در این مطالعه مقطعی، نمونه های پلاک دندانی از مراجعین به کلینیک های دندان پزشکی بروجرد جمع آوری شد. نمونه ها بلافاصله در لوله های حاوی ۲ میلی لیتر فسفات بافر سالین قرار داده شده و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد بروجرد منتقل شدند.

کلیه نمونه ها پس از هموژن شدن، بر روی محیط آگار خون دار و مک کانکی آگار، کشت داده شدند. پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در شرایط هوازی و بی هوازی (داخل جار بی هوازی) انکوبه شدند. به منظور تأیید کلنی های مشکوک رشد کرده بر روی محیط های کشت مورد نظر، لام میکروسکوپی تهیه و رنگ آمیزی گرم انجام شد. بر روی باکتری های گرم منفی و گرم مثبت جدا شده تست های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز و تخمیر قندهای مانوز، سوربیتول، سالیسین، هالوز، لاکتوز و مانیتول، بررسی الگوی همولیز در محیط آگار خون دار و

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

بakteri مورد مطالعه	ژن ها	توالی پرایمر	دمای ذوب سانتی گراد	اندازه جفت باز	فرانس
استافیلوکوکوس اورئوس	nuc	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC GCGATTGATGGTGATACGGTT	۵۵	۲۷۹	۱۵
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	gse A	ATGAAAAAGAGATTTTTATCT GTTTGGTGACACTCTTAAG	۵۰	۵۰۳	۱۶
استرپتوکوکوس موتانس	gtf B	ACTACACTTTCGGGTGGCTTGG CAGTATAAGCGCCAGTTTCAT C	۵۸	۵۱۷	۱۷
سودوموناس آئروژینوزا	opr L	ATGGAATGCTGAAATTCGGC CTTCTCAGCTCGACGCGACG	۵۷	۵۰۴	۱۸

جمع آوری گیاه مورد مطالعه

برگ و ساقه گیاه D.Oleoides از مراتع استان لرستان در فصل های رویش جمع آوری شد. پس از تأیید نام علمی در آزمایشگاه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی لرستان، به این گیاهان شماره هرباریومی ۵۴ تعلق گرفت. پس از تأیید علمی و تشخیص گونه (D.Oleoides Schreb.) جزء خانواده (Thymelaeaceae) مورد نظر، برگ و پوست ساقه این گیاه بعد از برطرف نمودن ناخالصی ها در معرض هوا و در سایه، پهن و به دور از تابش مستقیم نور خورشید خشک و نگهداری شد. (تصویر ۱)

تهیه عصاره های آبی و الکلی و هیدروالکلی

جهت عصاره گیری، ابتدا به میزان ۱ گرم پودر وزن شد، که این میزان نسبت ۱ به ۱۰ بین گیاه و حلال بوده است. سپس حلال های اتانول مطلق و آب و هیدروالکل (به نسبت ۷۰ سی سی اتانول و ۳۰ سی سی آب مقطر) به مقدار ۱۰ سی سی به هر کدام از پودرها اضافه شد. سپس به مدت ۱۰ ساعت روی شیکر قرار داده شد و پس از آن به مدت ۱۴ ساعت در دمای یخچال قرار داده شد و بعد از خارج کردن آنها از یخچال با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ تفاله و ناخالصی گیاه گرفته شد و پس از آن با استفاده از

فیلتر سرسرنگی مجدداً به ظروف شیشه ای انتقال داده شد.^(۱۹) به منظور حذف حلال، عصاره های حاصل در دستگاه روتاری تحت عملیات تقطیر در خلأ قرار گرفتند. حلال موجود در عصاره حاصل از روش های مختلف استخراج توسط دستگاه تبخیر در خلأ چرخشی تبخیر و در آن تحت خلأ خشک گردید. با محاسبه وزن اولیه بالن و وزن نهایی آن که حاوی ماده خشک بر جای مانده بود، مقدار کل ماده خشک استخراج شده در مرحله استخراج محاسبه شد و به صورت درصد (گرم به صد گرم نمونه خشک) بیان گردید.

آماده سازی باکتری ها برای کشت

از سوش های میکروبی ایزوله شده از پلاک های دندان، کشت داده شد. بعد از رشد باکتری ها بر روی محیط مولر هیتون آگار، یک لوپ از کلونی باکتری به یک میلی لیتر BHI broth (Brain Heart infusion broth) انتقال و در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. همچنین غلظت سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند ($10^8 \times 1/5$) باکتری در هر میلی لیتر در محیط BHI broth تهیه شد.^(۱۹)



تصویر ۱: نمونه های گرفته شده از برگ و ساقه گیاه D.Oleoides (کوه های روستای قلعه نصیر استان لرستان)

قبلاً تهیه شده بود، ۲۰۰ میکرولیتر به چاهک های شماره ۱ تا ۱۰ یک میکرو پلیت ۹۶ خانه ای استریل منتقل شد. در هر پلیت، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی اضافه شد و در نهایت همه ی پلیت ها به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل و پس از ۲۴ ساعت برای تعیین MIC بررسی گردیدند. آزمون به صورت سه بار تکرار انجام شد. برای تعیین MIC عصاره ها، از محلول ۵ mg/ml تری فنیل تترازولیوم کلراید استفاده شد. پس از اضافه نمودن رنگ تترازولیوم، پلیت ها به مدت یک ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. پس از یک ساعت پلیت ها از انکوباتور خارج گردید. خانه هایی که رنگ قرمز در آن ها ایجاد شده بود، نشانه آن بود که در این خانه ها باکتری رشد کرده است و خانه هایی که به رنگ سبز یا زرد باقی مانده بودند، نشانه آن بود که باکتری در این خانه ها رشد نکرده بود. چاهک شاهد مثبت شامل محیط کشت و سوسپانسیون باکتری و چاهک شاهد منفی حاوی محیط کشت و عصاره بود. (۱۹۲۰)

از نرم افزار SPSS با ویرایش ۲۰ آزمون های کروسکال والیس و Dunn برای آنالیز داده های بدست آمده استفاده شد.

یافته ها

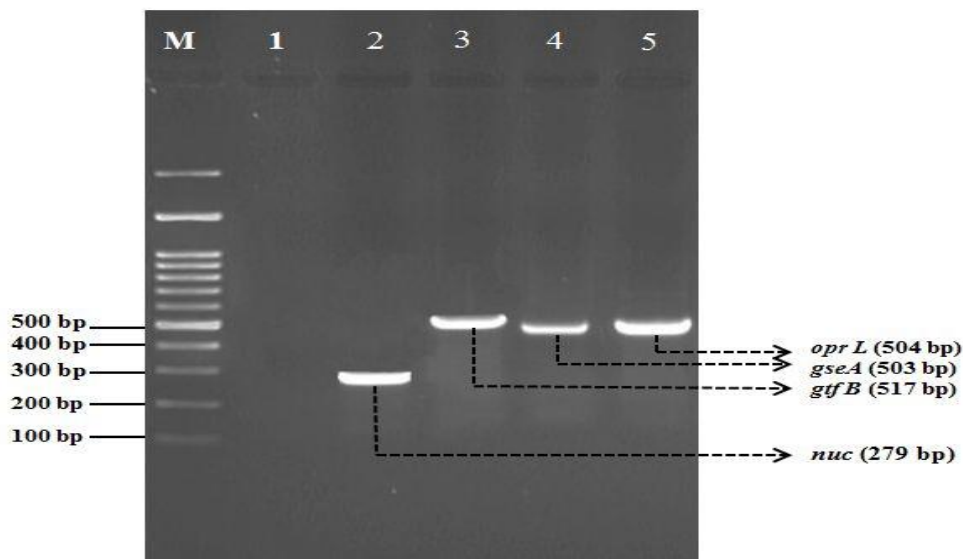
از بین پلاک های دندانی جمع آوری شده، براساس نتیجه ی آزمایش PCR حضور باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استرپتوکوکوس موتانس، سودوموناس آئروژینوزا تأیید شد. (تصویر ۲)

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره *Daphne Oleoides* به روش انتشار دیسک و رقت در آگار

سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند ($1/5 \times 10^8$) باکتری در هر میلی لیتر در محیط BHI broth تهیه شد. سپس از این سوسپانسیون بر روی محیط Mueller Hinton Agar (MHA) کشت داده شد. دیسک های آماده شده از غلظت های مختلف با رعایت شرایط آنتی بیوگرام بر روی محیط قرار داده شدند. از دیسک های حاوی دی متیل سولفوکساید (دی متیل سولفوکساید) به عنوان کنترل منفی و از دیسک های آنتی بیوتیکی (پنی سیلین ۱۰ میکروگرمی، ونکومایسین ۳۰ میکروگرمی، جنتا مایسین ۱۰ میکروگرمی) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. پلیت ها ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردیدند و بعد از آن خواص ضدباکتریایی عصاره های برگ و ساقه گیاه مورد ارزیابی قرار گرفتند. (۱۹)

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره *D. Oleoides* به روش حداقل غلظت مهاري (Minimal Inhibitory Concentration) MIC

آزمون تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی به روش رقت مایع (میکرو برات دایلوژن) صورت گرفت. از سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه شده از کشت یک شبه ی میکروارگانیزم ها، رقت های یک دهم و سپس یک صدم تهیه گردید تا تعداد تقریبی 10^6 میکروارگانیزم در هر میلی لیتر از سوسپانسیون ایجاد شود. از رقت های متوالی ۱۰ تا ۰/۰۱۹۵ میلی گرم در هر میلی لیتر هر یک از عصاره ها که



تصویر ۲: ژل الکتروفورز محصولات PCR ژن های تأییدی برای باکتری های مورد مطالعه: چاهک شماره ۱ کنترل منفی، چاهک شماره ۲ محصول PCR ژن nuc برای تأیید استافیلوکوکوس اورئوس، چاهک شماره ۳ محصول PCR ژن gse A برای تأیید استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، چاهک شماره ۴ محصول PCR ژن opr L برای تأیید سودوموناس آئروژینوزا، چاهک شماره ۵ محصول PCR ژن gtf B برای تأیید استرپتوکوکوس موتانس، چاهک M، مارکر DNA، 100 bp

اورئوس در غلظت (۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) از خود نشان دادند. عصاره هیدروالکلی بیشترین حساسیت را باکتری استرپتوکوکوس موتانس (۶/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و کمترین حساسیت را باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا در غلظت (۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) از خود نشان دادند. عصاره آبی نسبت به هیچ یک از باکتری ها از خود خاصیت میکروبی نشان نداد و باکتری ها در تمامی غلظت ها توانستند رشد کنند. (جدول ۴ و تصویر ۳)

نتایج بدست آمده در روش دیسک دیفیوژن برای گیاه *D.Oleoides* در جدول ۳ و ۲ شرح داده شده است. عصاره الکلی گیاه *D.Oleoides* بیشترین قطر هاله عدم رشد را در باکتری ایجاد نمود، که در این میان بیشترین قطر هاله عدم رشد تشکیل شده مربوط به باکتری استرپتوکوکوس موتانس بود. در عصاره آبی هیچ گونه هاله عدم رشدی تشکیل نداد. عصاره الکلی بیشترین حساسیت را باکتری استرپتوکوکوس موتانس در غلظت (۰/۱۹ میلی گرم بر میلی لیتر) و کمترین حساسیت را باکتری استافیلوکوکوس

جدول ۲: نتایج رقت های مختلف عصاره های الکی D.Oleoides

رقت های عصاره												
میانگین و انحراف معیار هاله عدم رشد (میلی گرم/میلی لیتر)												
عصاره الکی ساقه				عصاره الکی برگ				عصاره آبی برگ				
A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	
.	.	.	.	۷/۵±۰/۵	۷/۴±۰/۵	.	۱۰/۳۵±۱/۳۵	۸/۹±۱/۴	۵/۵±۳/۹	۹/۶±۰/۴۱	۸/۲۵±۱/۲۵	۱۰۰
.	.	.	.	۱۳±۰/۸۱	۳/۸±۲/۷	۶/۴±۱/۱	۱۴±۲	۱۱/۹۵±۱/۴۵	۱۱/۱۵±۰/۰۵	۱۰/۶۲±۱/۶	۱۱/۲۵±۱/۲۴	۵۰
.	.	.	.	۱۴/۵±۰/۵	۹/۵±۰/۴	۹/۷±۲/۲	۱۵/۷۵±۰/۹۵	۱۳/۶۷±۰/۳۲	۱۵/۰۵±۰/۴۴	۱۲/۹±۰/۶۰	۱۳/۲۵±۱/۱۵	۲۵
.	.	.	.	۱۵/۶±۰/۴	۱۲±۰/۳۵	۱۲/۲±۲/۷	۱۸/۷±۰/۸	۱۴/۸۷±۰/۸۷	۱۶/۱۵±۰/۵۵	۱۴/۸±۱/۹	۱۴/۸±۰/۱۹	۱۲/۵
.	.	.	.	۱۷/۵±۰/۳	۱۴/۰۵±۰/۰۴	۱۴±۲	۲۰/۵۵±۱/۰۵	۱۸/۳±۰/۵	۱۸/۲۵±۱/۲۵	۱۷/۳±۰/۶۲	۱۷/۹±۰/۹۰	۶/۲۵
۱۷/۶±۰/۴۷	۱۷/۶±۰/۴۷			۱۷/۶±۰/۴۷	۱۷/۶±۰/۴۷	.	.	۱۷/۶±۰/۴۷	۱۷/۶±۰/۴۷	.	.	کنترل
.	.	۲۵/۱±۰/۰۹		.	.	۲۵/۱±۰/۰۹	.	.	.	۲۵/۱±۰/۰۹	.	پنی سیلین
.	.	.	۱۴/۲±۰/۰۸	.	.	.	۱۴/۲±۰/۰۸	.	.	.	۱۴/۲±۰/۰۸	مثبت
.	ونکوماپسین
.	کنترل منفی
(DMSO)												

A: استافیلوکوکوس اورئوس B: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس C: سودوموناس آئروجینوزا D: استرپتوکوکوس موتانس
DMSO: Dimethyl Sulfoxide

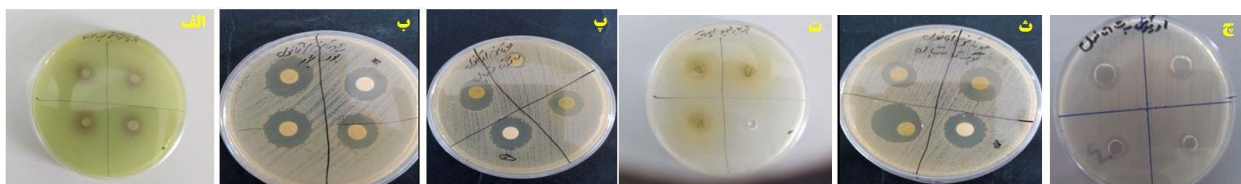
جدول ۳: نتایج رقت های مختلف عصاره های هیدروالکی D.Oleoides

رقت های عصاره												
میانگین و انحراف معیار هاله عدم رشد (میلی گرم/میلی لیتر)												
عصاره هیدروالکی ساقه				عصاره هیدروالکی برگ				عصاره آبی برگ				
A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	
.	.	.	.	۷/۱۶±۲/۱۶	۴/۱±۲/۹	۵/۳۳±۳/۷	۸/۷۵±۱/۲۵	۷/۶±۰/۹	۷/۸±۰/۲	۹/۷۵±۰/۰۴	۷/۶۵±۱/۰۵	۱۰۰
.	.	.	.	۱۱/۶۵±۰/۳۵	۴/۹۶±۳/۵۱	۸/۹۶±۰/۳۶	۱۱/۲۵±۱/۷۵	۱۲/۲±۱	۱۱/۸۷±۲/۱	۱۱/۶±۰/۴	۱۰/۶±۲/۶	۵۰
.	.	.	.	۱۳/۲±۰/۲۰	۹/۷±۲/۷	۱۰/۵۵±۰/۵۴	۱۴/۳۷±۰/۶۲	۱۴/۱±۰/۰۹	۱۵/۸۵±۰/۳۵	۱۴/۴±۰/۳۰	۱۳/۰۵±۳/۰۵	۲۵
.	.	.	.	۱۵/۳±۰/۱۹	۱۳/۷۵±۰/۷۵	۱۴/۲۵±۰/۲۵	۱۶/۹۵±۱/۴۵	۱۶/۹±۰/۱۰	۱۷/۶±۰/۳۹	۱۶/۱۵±۰/۶۵	۱۵/۹±۲/۹	۱۲/۵
.	.	.	.	۱۶/۸۵±۰/۶۴	۱۶/۷۵±۰/۲۵	۱۶/۵±۰/۵	۱۸/۲۵±۰/۷۵	۱۸/۱۲±۰/۳۷	۱۴/۳۳±۱/۶۴	۱۷/۷۵±۰/۲۵	۱۶/۸۷±۲/۸۷	۶/۲۵
۱۷/۶±۰/۴۷	۱۷/۶±۰/۴۷			۱۷/۶±۰/۴۷	۱۷/۶±۰/۴۷	.	.	۱۷/۶±۰/۴۷	۱۷/۶±۰/۴۷	.	.	کنترل
.	.	۱۷/۶±۰/۴۷		.	.	۲۵/۱±۰/۰۹	.	.	.	۲۵/۱±۰/۰۹	.	پنی سیلین
.	.	.	۲۵/۱±۰/۰۹	.	.	.	۱۴/۲±۰/۰۸	.	.	.	۱۴/۲±۰/۰۸	مثبت
.	ونکوماپسین
.	کنترل منفی
(DMSO)												

A: استافیلوکوکوس اورئوس B: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس C: سودوموناس آئروجینوزا D: استرپتوکوکوس موتانس
DMSO: Dimethyl Sulfoxide

جدول ۴: نتایج حداقل غلظت مهاری عصاره های الکلی، هیدروالکلی و آبی سویه های مورد مطالعه در بهار و تابستان

حداقل غلظت مهاری (میلی گرم/میلی لیتر)				عصاره	نمونه های جمع آوری شده
استافیلوکوکوس	استافیلوکوکوس	سودوموناس	استرپتوکوکوس		
اورئوس	اپیدرمیدیس	آئروجینوزا	موتانس		
۱۲/۵	۳/۱۲	۶/۲۵	۱/۵۶	عصاره الکلی	برگ در فصل بهار
۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	عصاره هیدروالکلی	
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	عصاره آبی	
۱۲/۵	۳/۱۲	۶/۲۵	۱/۵۶	عصاره الکلی	ساقه در فصل بهار
۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	عصاره هیدروالکلی	
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	عصاره آبی	
۶/۲۵	۳/۱۲	۱۲/۵	۰/۱۹	عصاره الکلی	برگ و ساقه در فصل بهار
۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	عصاره هیدروالکلی	
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	عصاره آبی	
۶/۲۵	۳/۱۲	۶/۲۵	۱/۵۶	عصاره الکلی	برگ در فصل تابستان
۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵	عصاره هیدروالکلی	
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	عصاره آبی	
۶/۲۵	۳/۱۲	۶/۲۵	۱/۵۶	عصاره الکلی	ساقه در فصل تابستان
۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵	عصاره هیدروالکلی	
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	عصاره آبی	
۶/۲۵	۳/۱۲	۶/۲۵	۱/۵۶	عصاره الکلی	برگ و ساقه در فصل تابستان
۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵	عصاره هیدروالکلی	
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	عصاره آبی	



تصویر ۳: نتایج تأثیر رقت های مختلف عصاره گیاه *D. Oleoides* بر روی سویه های مورد مطالعه

الف: سودوموناس آئروجینوزا (ATCC10205) (عصاره الکلی ساقه *D. Oleoides* در فصل بهار)

ب: استرپتوکوکوس موتانس (ATCC 10672) (عصاره الکلی برگ *D. Oleoides* در فصل بهار)

ج: استرپتوکوکوس موتانس (ATCC 10672) (عصاره الکلی ساقه *D. Oleoides* در فصل تابستان)

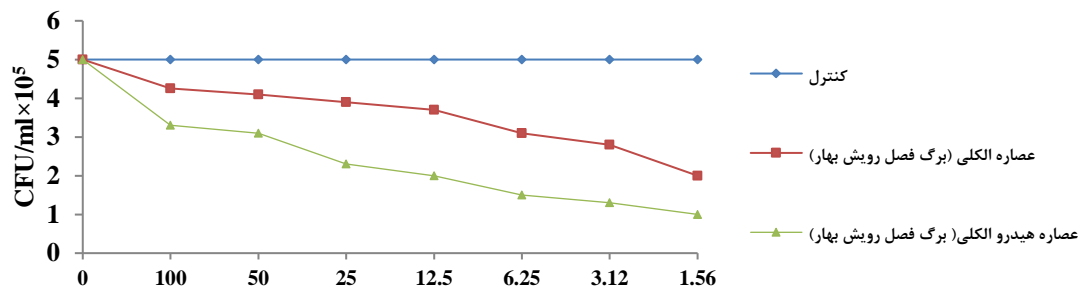
ت: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (ATCC12228) (عصاره الکلی برگ *D. Oleoides* در فصل بهار)

ث: استرپتوکوکوس موتانس (ATCC 10672) (عصاره الکلی برگ *D. Oleoides* در فصل تابستان)

ج: استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 10690) (عصاره الکلی برگ *D. Oleoides* در فصل بهار)

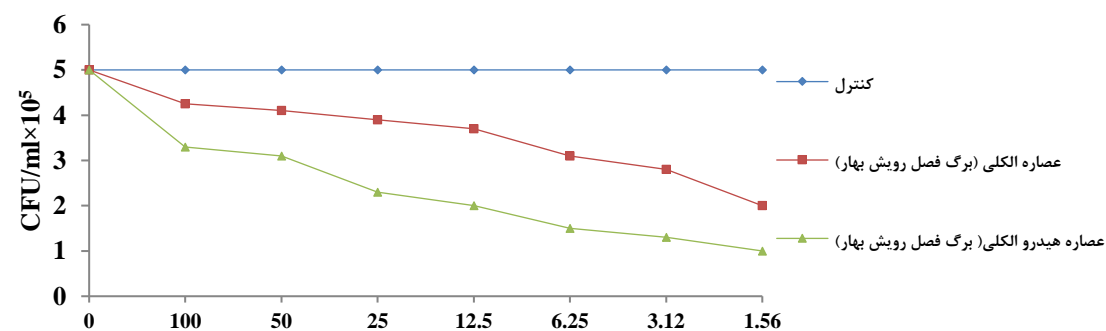
D.Oleoides در فصل بهار و تابستان به ترتیب 10^4 و $10^3/8$ باکتری استرپتوکوکوس موتانس را کاهش داد (تصویر ۴).

نتایج شمارش باکتری ها نشان داد که با افزایش غلظت عصاره الکلی و هیدروالکلی گیاه D.Oleoides میزان کشتن باکتری ها نیز افزایش پیدا کرد، بطوریکه عصاره الکلی برگ



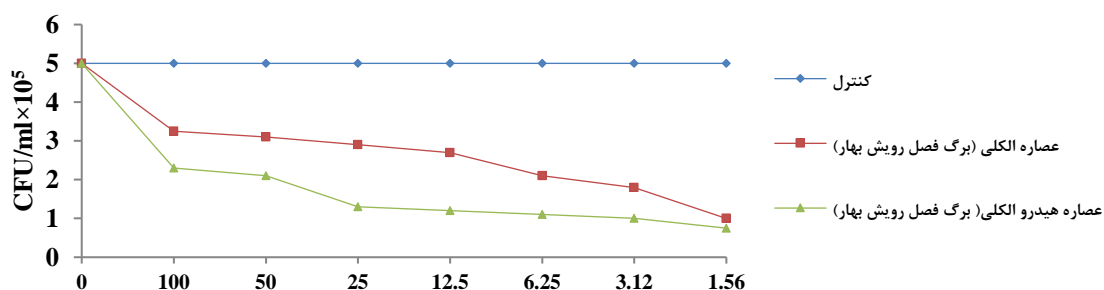
الف

غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)



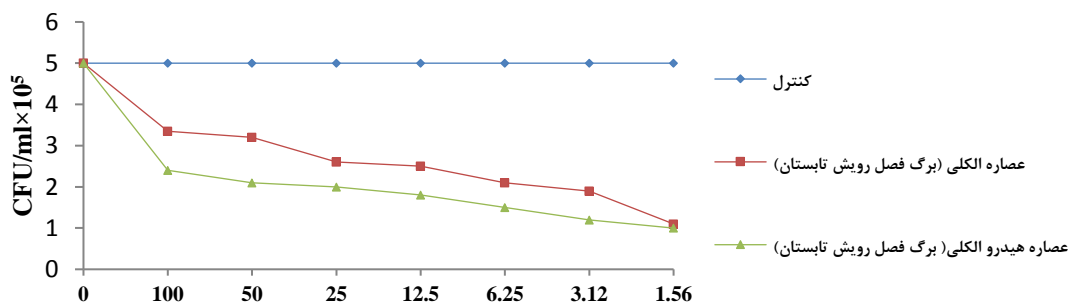
ب

غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)



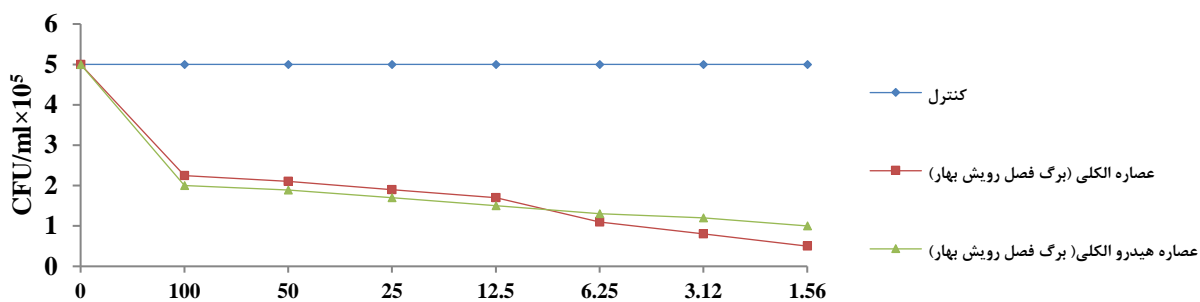
ج

غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)



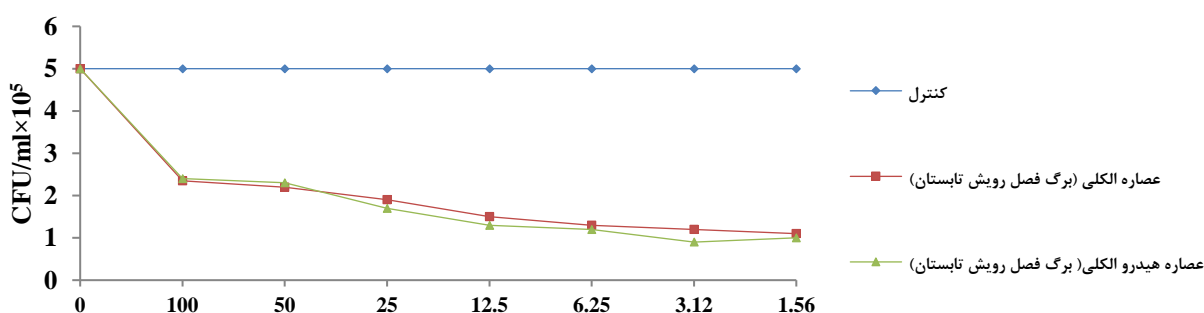
د

غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)



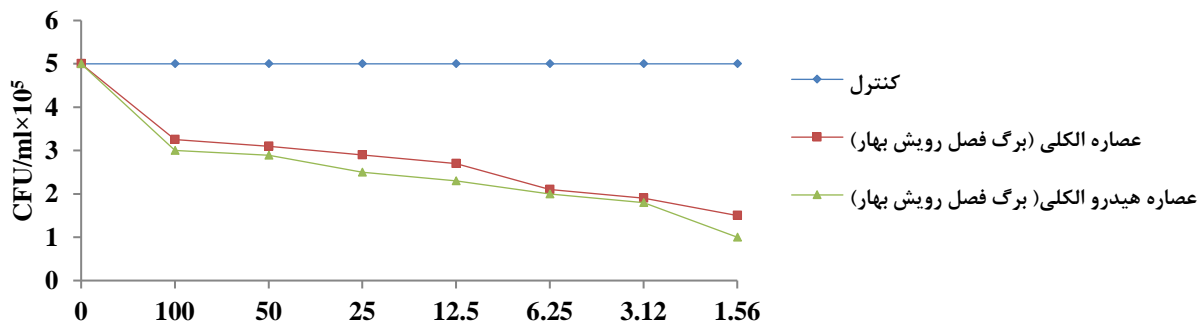
غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)

ث



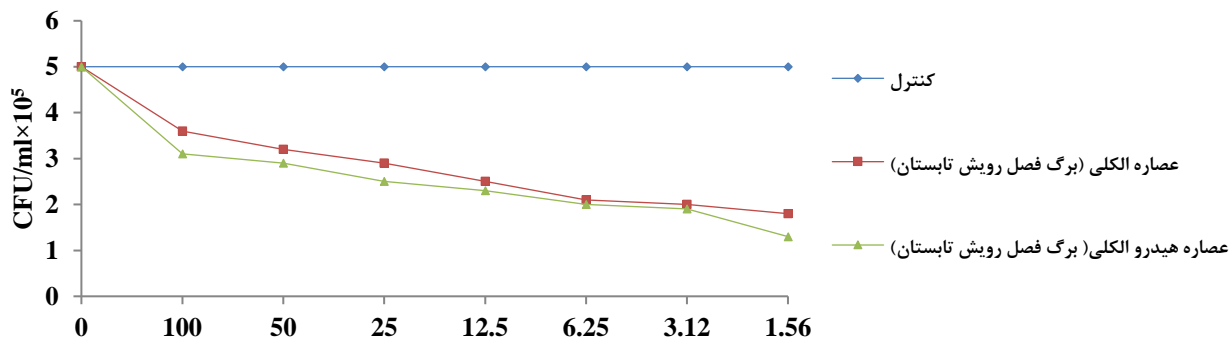
غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)

ج



غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)

چ



غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)

ح

تصویر ۴ : نتایج شمارش باکتری ها (Colony-forming unit /ml) در غلظت های مختلف عصاره الکلی و هیدروالکلی D.Oleoides

- الف: تأثیر عصاره الکلی و هیدروالکلی برگ (فصل رویش بهار) بر استرپتوکوکوس موتانس
 ب: تأثیر عصاره الکلی و هیدروالکلی برگ (فصل رویش بهار) بر استرپتوکوکوس موتانس
 پ: تأثیر عصاره الکلی و هیدروالکلی برگ (فصل رویش بهار) بر استافیلوکوکوس اورئوس
 ت: تأثیر عصاره الکلی و هیدروالکلی برگ (فصل رویش تابستان) بر استافیلوکوکوس اورئوس
 ث: تأثیر عصاره الکلی و هیدروالکلی برگ (فصل رویش بهار) بر استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس
 ج: تأثیر عصاره الکلی و هیدروالکلی برگ (فصل رویش تابستان) بر استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس
 چ: تأثیر عصاره الکلی و هیدروالکلی برگ (فصل رویش بهار) بر سودوموناس آئروجینوزا
 ح: تأثیر عصاره الکلی و هیدروالکلی برگ (فصل رویش تابستان) بر سودوموناس آئروجینوزا

مقایسه با داروهای شیمیایی بطور قابل ملاحظه ای نظر پژوهشگران را به خود جلب کرده است.^(۲۱) امروزه با پیشرفت های بدست آمده در شیمی آلی و تحولات چشمگیر در روش های استخراج، تخلیص و تعیین ساختمان ترکیبات طبیعی گیاهان، ارزش داروهای حاصل از منابع گیاهی روز به روز آشکارتر شده به طوری که در حال حاضر حدود یک سوم تا نیمی از فرآورده های دارویی موجود در آمریکا دارای منشاء گیاهی هستند.^(۲۲)

نتایج آنالیز آماری با تست Dunn نشان داد که بین گروه های تیمار شده با عصاره الکلی و هیدروالکلی برگ، نسبت به گروه تیمار شده با عصاره الکلی و هیدروالکلی ساقه، تفاوت معناداری وجود داشت. همچنین این تفاوت معنادار در آنالیز بین گروهی هم مشاهده شد (جدول ۵).

بحث

استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری ها به ویژه بیماری های عفونی در سال های اخیر روند رو به رشدی داشته است. همچنین به دلیل داشتن عوارض کمتر در

جدول ۵ : میانگین و انحراف معیار هاله عدم رشد بر حسب گروه ها

گروه ها	نام گروه ها	انحراف معیار	میانگین	نتیجه آزمون کروسکال والیس
				<i>P</i> -value
۱	تیمار شده با عصاره الکلی (برگ)	۴/۲۷۲	۲۰/۷۵	۰/۰۲۵
۲	تیمار شده با عصاره هیدروالکلی (برگ)	۵/۲۵۲	۱۷/۷۵	
۳	تیمار شده با عصاره آبی (برگ)	۰	۰	
۱	تیمار شده با عصاره الکلی (ساقه)	۳/۳	۱۸/۳۷۵	۰/۰۴۶
۲	تیمار شده با عصاره هیدروالکلی (ساقه)	۲/۶۹	۱۷/۳۰۸	
۳	تیمار شده با عصاره آبی (ساقه)	۰	۰	

حاضر نیز عصاره الکلی و هیدروالکلی گیاه توربید بر روی باکتری های مختلف مورد مطالعه، اثر بازدارندگی بسیار خوبی نشان داد، اما میزان بازدارندگی عصاره آبی گیاه بر روی رشد باکتریها کمتر بود، که این اختلاف می تواند به دلیل تفاوت در نوع ترکیبات موثره مختلف در دو جنس گیاه باشد.^(۲۴)

بر اساس نتایج این مطالعه، استرپتوکوکوس موتانس بالاترین حساسیت نسبت به گیاه توربید را در مقایسه با سایر باکتریها نشان داد. شیرزادی و همکاران^(۱۹)، به ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره های آبی، هیدروالکلی و الکلی برگ و ساقه *Daphne Mucronata* علیه باکتری های ایجاد کننده عفونت های دهان پرداختند. نتایج آنها نشان داد که بیشترین خاصیت ضد میکروبی مربوط به عصاره الکلی گیاه خوشک (*D. Mucronata*) بود. در بین باکتری های مورد مطالعه، استرپتوکوکوس موتانس دارای بیشترین حساسیت نسبت به عصاره الکلی گیاه (*D. Mucronata*) بود.^(۱۹)

در آزمایشاتی که Manojlovic و همکاران^(۲۵) روی عصاره متانولی *D. Cneorum* انجام دادند، ترکیب ۷ و ۸ دی هیدروکسی کومارین که یکی از متابولیت های ثانویه این گیاه است و در گذشته آن را *Daphnetin* می نامیدند، از عصاره متانولی برگ، جدا و دارای خاصیت ضد میکروبی شناخته شده بود که با آزمایش مورد مطالعه ما همخوانی ندارد. با توجه به نتایج بدست آمده، برخی از تفاوت ها را می توان به دلیل نحوه عصاره گیری، نحوه انجام آزمایش، نوع و گونه گیاهان و حتی روشگاه طبیعی آنها دانست.

خسروی و همکاران^(۳۶)، اثرات ضدباکتریایی گیاه *Daphne gnidium* L را ارزیابی کردند. نتایج آنها نشان داد که بیشترین تأثیرگذاری را عصاره ساقه گیاه *Daphne gnidium* L بر روی میکروارگانیسمها دارد که مشابه نتایج این مطالعه بود. در ساقه *D. Gnidium* L، ۴ کومارین و ۷

بسیاری از خواص ضد میکروبی عصاره های گیاهی به علت وجود موادی همانند تانن ها، ترکیبات فنولی و ترکیباتی نظیر آن ها می باشد که در قسمت های مختلف گیاهان نظیر ریشه، برگ، جوانه ها، نهال و پوست وجود دارد. فعالیت ضد میکروبی گیاهان به شرایط محیطی که گیاه در آن می روید، نوع حلال و روش عصاره گیری، روش بررسی فعالیت های ضد میکروبی و میکروارگانیسم های مورد مطالعه بستگی دارد. ویژگی یک حلال خوب شامل سمیت کم، سهولت تبخیر در دمای کم و ناتوانی در ایجاد کمپلکس با ترکیبات و تفکیک آن است.^(۲۳) مطالعات مختلفی اثر ضدباکتریایی گونه های *Daphne* را به اثبات رسانده اند. از این مطالعات می توان مطالعه جاوید نیا و همکاران^(۲۴) را نام برد، که فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی ریشه، ساقه و برگ گیاه خوشک (*D. Mucronata*) علیه باکتری های باسیلوس سوبتیلیس، اشیریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس را گزارش کردند. طبق نتایج این گروه، عصاره ریشه در مقایسه با عصاره های دیگر دارای اثر قویتری روی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس بوده است. نتایج این مطالعه بر روی باکتری های استاندارد بوده ولی مطالعه حاضر بر روی باکتری هایی که از کلینیک جدا شده نیز، انجام گرفته است. لذا اختلاف نتایج می تواند به دلیل نوع گونه های باکتریایی و نیز اختلاف در نوع ترکیبات موجود در گیاهان مورد آزمایش باشد.^(۸) در مطالعه دیگر توسط Tayob و همکاران^(۸)، اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی گل، برگ و ساقه گیاه سیاه گینه (*Daphne Oleifolia*) Lam علیه باکتری های اشیریشیا کلی، باسیلوس سودوموناس بررسی شد. براساس نتایج این مطالعه، عصاره گل بیشترین حساسیت و مقاومت را به ترتیب بر روی باکتری های باسیلوس و اشیریشیا کلی نشان داد. در تحقیق

در دو فصل بهار و تابستان، مخلوط برگ و ساقه بهار عملکرد بهتری را نشان می‌دهد. در روش انتشار دیسک برگ بهار بیشترین تأثیرگذاری را داشته است که می‌توان گفت به این علت است که در فصل بهار ترکیبات رزینی موجود در گیاهان افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که قسمت‌های مختلف گیاه *D.Oleoides* دارای اثرات ضد میکروبی بر علیه باکتری‌های ایجادکننده عفونت‌های دندانی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. بنابراین، با توجه به اهمیت این موضوع، تحقیقات بر روی گیاه *D.Oleoides* دارای ارزش تحقیقی و صنعتی زیادی است و می‌تواند در آینده با به کارگیری روش‌های مختلف و بهینه‌سازی تکنیک‌های استفاده از *D.Oleoides* برای درمان بیماری‌های دهان و دندان استفاده شود.

تشکر و قدردانی

از کلیه عزیزانی که ما را در اجرای این پژوهش یاری کردند، تقدیر و تشکر می‌نمایم.

فلاونوئید وجود دارد که می‌توان فعالیت ضدباکتری دافنه را به این ترکیبات نسبت داد.

در همین راستا، مطالعه Cottigli و همکاران^(۲۷) فعالیت آنتی‌میکروبیال ساقه *Daphne ginidium* را به دلیل ترکیباتی همچون کومارین‌ها و فلاونوئیدها دانسته‌اند. همچنین این مطالعه نشان داد که برگ گیاه *Daphne ginidium* دارای ترکیبات فلاونوئیدی و فنولی می‌باشد. جنس دافنه دارای تعداد زیادی از انواع متابولیت‌های ثانویه می‌باشد که بیشتر این ترکیبات مربوط به کومارین، فلاونوئیدها، لیگنان‌ها و استروئیدها است که در قسمت‌های برگ و ساقه این گیاه موجود می‌باشد. بر اساس مطالعه Tiwari و همکاران^(۲۸) علت فعالیت بیشتر عصاره‌های اتانولی، وجود پلی‌فنول‌های تولید شده می‌باشد که منجر به تأثیرگذاری بیشتر در دیواره سلولی و حل شدن ذرات غیر قطبی می‌شوند. در حالی که عصاره آبی-الکلی و عصاره آبی فعالیت کمتری دارند. مشخص شده است که حلال‌های آلی خاصیت ضد میکروبی بیشتری را اعمال می‌کنند و فعالیت کم عصاره‌های آبی به علت غلظت کم ترکیبات فنولی محلول در آب می‌باشد. در مقایسه بین قسمت‌های مختلف گیاه (برگ، ساقه، مخلوط)

منابع

1. Fayaz M, Sivakumaar PK, Joe MM. Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of dental biofilm forming bacteria. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2014; 3(5):46-50.
2. Nouri Gharajalar S, Emamverdizade P. Detection of betalactamase production among *Staphylococcus aureus* isolated from human dental plaques using iodometric and molecular methods. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2018; 25(10):790-9.
3. Hale FA. Dental caries in dog. *Can Vet J* 2009; 50(12):1301-4.
4. Zambori C, Tirziu E, Nichita I, Cumpanasoie C, Gros RV, Seres M, et al. Biofilm implication in oral diseases of dogs and cats. *J Anim Sci Biotechnol* 2012; 45(2):208-12.
5. 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.
6. Wright GD. Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. *Can J Microbiol* 2014; 60(3):147-54.
7. Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol* 2013; 4:47.
8. Tayoub G, Abu A, Shamma M. Microbial inhibitory of the *Daphne oleifolia* lam Ethanolic extract. *Int J Med Aromatic Plants* 2012; 2(1):161-6.

9. Buhner SH. Herbal antibiotics: natural alternatives for treating drug-resistant bacteria. North Adams: Storey Publishing; 2012.
10. Bolouri ME, Hemati K, Bashiri SZ, Mashayekhi K. Effect of harvest time and root diameter on Glycyrrhizin content in *Glycyrrhiza glabra*. *J Plant Prod* 2009; 16(2):29-45.
11. Hedayati S, Azizi F. The effect of *daphne mucronata* extract on *tnf-α* and its receptors on cultured human monocytes. *Cell J* 2005; 3(16):152-7.
12. Uysal A, Zengin G, Aktumsek A, Rigano D, Senatore F, Sanda MA. *Daphne oleoides*: an alternative source of important sesquiterpenes. *Int J Food Prop* 2017; 20(3):549-59.
13. Gürbüz İ, Demirci B, Franz G, Başer KH, Yeşilada E, Demirci F. Comparison of the volatiles of *Daphne pontica* L. and *D. oleoides* Schreber subsp. *oleoides* isolated by hydro- and microdistillation methods. *Turk J Biol* 2013; 37(1):114-21.
14. Mahon CR, Manuseelis G. Textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia: Saunders; 1995.
15. Mahmoudi H, Arabestani MR, Mousavi SF, Alikhani MY. Molecular analysis of the coagulase gene in clinical and nasal carrier isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by restriction fragment length polymorphism. *J Glob Antimicrob Resist* 2017; 8:41-5.
16. Marouf SH, Rezk A. The role of lesser grain borer in transmission of pathogenic bacteria to poultry and animal feed. *Merit Res J Med Med Sci* 2015; 3(8):306-14.
17. Rahmandoost S, Amini K. Identification of streptococcus mutans isolated from dental plaques based on the presence of *gtfB* gene. *J Isfahan Med Sch* 2015; 33(356):1804-9.
18. Saderi H, Owlia P. Detection of multidrug resistant (MDR) and extremely drug resistant (XDR) *P. aeruginosa* isolated from patients in Tehran, Iran. *Iran J Pathol* 2015; 10(4):265.
19. Karamolah KS, Mousavi F, Mahmoudi H. Antimicrobial inhibitory activity of aqueous, hydroalcoholic and alcoholic extracts of leaves and stem of *Daphne mucronata* on growth of oral bacteria. *GMS Hyg Infect Control* 2017; 12:1-10.
20. Mahmoudi H, Arabestani MR, Molavi M, Karamolah K, Fahim N. The study effects antimicrobial of *Foeniculum vulgare* mill and *Achilles mille folium* plant on bacterial pathogens causing urinary tract infections and nosocomial infection. *Int J Pharmacogn Phytochem Res* 2016; 8(9):1549-54.
21. Avijgan M, Saadat M, Nilfrooshzadeh MA, Hafizi M. Anti fungal effect of *Echinophora platyloba* extract on some common dermathophytes. *J Med Plant* 2006; 5(18):10-6.
22. Clark AM. Natural products as a resource for new drugs. *J Pharm Res* 1996; 13(8):1133-41.
23. Dholwani K, Saluja A, Gupta A, Shah D. A review on plant-derived natural products and their analogs with anti-tumor activity. *Indian J Pharmacol* 2008; 40(2):49.
24. Javidnia K, Miri R, Jahromi RB. A preliminary study on the biological activity of *Daphne mucronata* Royle. *DARU J Pharm Sci* 2003; 11(1):28-1.
25. Manojlović NT, Mašković PZ, Vasiljević PJ, Jelić RM, Jusković MŽ, Sovrlić M, et al. HPLC analysis, antimicrobial and antioxidant activities of *Daphne cneorum* L. *Hemijaska Industrija* 2012; 66(5):709-16.
26. Khosravi A, Malecan M. Effects of *lavandula stoechas* extracts on *staphylococcus aureus* and other gram negative bacteria. *J Qazvin Univ Med Sci* 2004; 7(5):3-9.
27. Cottigli F, Loy G, Garau D, Floris C, Caus M, Pompei R, et al. Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine* 2001; 8(4):302-5.
28. Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. Phytochemical screening and extraction: a review. *Int Pharm Sci* 2011; 1(1):98-106.