

بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس شاه اسپرم بر استرپتوکوکوس موناس، استرپتوکوکوس سانگوئیس و استرپتوکوکوس سالیواریوس و مقایسه آن با دهان شویه های متداول

دکتر مهرناز کریم زاده^۱، دکتر سحر خادم نژاد، دکتر زهرا آقازاده^{۳*}

۱- دندانپزشک، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲- استادیار بخش بیماری های دهان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز-تبریز-ایران

۳- استادیار بخش بیماری های دهان و فک و صورت، مرکز سلول های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

پذیرش مقاله: ۹۹/۱۱/۱۵

اصلاح نهایی: ۹۹/۱۰/۱۵

وصول مقاله: ۹۹/۹/۴

Antimicrobial effects of *Tanacetum balsamita* L essential oil *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus salivarius* and its comparison with common mouthwashes

Mehrnaz Karimzadeh¹, Sahar Khademnejad², Zahra Aghazadeh^{3#}

1- Dentist, Surgeon. Graduated from Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

2- Assistant Professor of Oral Medicine Department, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

3- Stem Cell Research Center and Assistant Professor of Oral Medicine Department, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: June 2020 Accepted: Feb 2021

Background and aim: Tooth decay is one of the most common diseases in the world. The use of herbal substances to prevent and treat this disease has been considered for various reasons, such as increasing the resistance of bacteria to antibiotics, high cost, and adverse effects of some chemicals used in dentistry. This study aimed to investigate the effect of *Tanacetum balsamita* L essential oil on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, and *Streptococcus sanguinis*.

Material and Method: In this study, the aerial part of the *Tanacetum balsamita* L plant was extracted by distillation with essential oil, the antimicrobial effect of essential oil in concentrations (12.5, 25, 50, and 100 µg / ml) was investigated. The diffusion disc method was used to evaluate the antimicrobial activity of essential oil.

Results: According to the results, the essential oil in concentration of 100 µg/ml had inhibitory effect on growth of streptococcus mutans, salivarius, and sanguis. This effect was better than Irsha mouth wash and somehow less than Chlorhexidine and Oral B mouth washes. This differ was not significant so the essential oil with concentration of 100 µg/ml had similar effect as Oral B and Chlorhexidine mouth washes. The positive effect was seen in the concentrations of 25 and 50 µg/ml but it was not considerable comparing to control groups. There was no effect in 12.5 µg/ml concentration.

Conclusion: Based on the results of this study, it is suggested to prepare mouth washes containing the concentration of 100 µg/ml of the essential oil *Tanacetum balsamita* L. to evaluate the antimicrobial effects in more in othe in vitro and in vivo studies.

Key words: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Tanacetum balsamita* L

*Corresponding Author: maghazadehbio@gmail.com

J Res Dent Sci. 2021; 18(1):5-14.

خلاصه:

سابقه و هدف: پوسیدگی دندان از بیماری هایی است که شیوع بالا در جهان دارد. استفاده از مواد گیاهی برای پیشگیری و درمان این بیماری به دلایل مختلف از جمله افزایش مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها، هزینه بالا و اثرات نامطلوب بعضی از مواد شیمیایی استفاده شده در دندانپزشکی مورد توجه قرار گرفته است. این مطالعه با هدف بررسی اثر اسانس گیاه شاه اسپرم بر روی استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس سالیواریوس و استرپتوکوکوس سانگوئینیس انجام شد.

مواد و روش ها: در این تحقیق اندام هوایی گیاه شاه اسپرم به روش تقطیر با آب اسانس گیری شد، اثر ضد میکروبی اسانس در غلظت های (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$) مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد.

یافته ها: بر اساس نتایج بدست آمده مشخص گردید اسانس گیاه شاه اسپرم بر علیه باکتری های استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس سالیواریوس و استرپتوکوکوس سانگوئیس در غلظت ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ موثر بود. این تاثیر در مقایسه با دهانشویه ایرشا بیشتر و در مقایسه با دو دهانشویه کلر هگزیدین و اورال کمتر بود ولی این اختلاف معنی دار نبود. به عبارت دیگر اسانس شاه اسپرم در غلظت ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ معادل با دو دهانشویه اورال بی و کلر هگزیدین موثر بود. این تاثیر در غلظت های ۵۰ و ۲۵ $\mu\text{g/ml}$ وجود داشت ولی در مقایسه با گروه های کنترل کمتر بود. در غلظت ۱۲.۵ $\mu\text{g/ml}$ تاثیری دیده نشد.

نتیجه گیری: به نظر می رسد می توان از اسانس گیاه شاه اسپرم در غلظت ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ در طراحی و تولید دهانشویه های آنتی باکتریال برای مطالعات بیشتر آزمایشگاهی و بالینی استفاده کرد.

کلید واژه ها: استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس سالیواریوس، استرپتوکوکوس سانگوئیس، اسانس-شاه اسپرم

مقدمه:

دیگری از جمله از دست رفتن حس چشایی، احساس سوزش مخاط دهان، خشکی دهان برای کلر هگزیدین گزارش شده است^(۷). علاوه بر آن امروزه به دلیل افزایش مقاومت دارویی و عوارض جانبی آنتی بیوتیک ها کاربرد این مواد نیز با محدودیت هایی مواجه شده است. از سویی دیگر در سال های اخیر استفاده از گیاهان دارویی به دلیل ارزان بودن، در دسترس بودن و سازگار بودن با طبع بیمار به شدت افزایش یافته است^(۳،۸).

با توجه به دلایل فوق، استفاده از گیاهان دارویی برای پیشگیری، کنترل و درمان پوسیدگی دندان مورد توجه قرار گرفته است. در حال حاضر توجه جهانی به سمت داروهای گیاهی و فاصله گرفتن از داروهای شیمیایی می باشد. مطالعات مختلف در حوزه دندانپزشکی نشان داده است که تعدادی از گیاهان به دلیل داشتن ترکیبات فیتوشیمیایی مانند فلاونوئیدها و دیگر پلی فنول ها، ترپن ها، آلکالوئیدها و قندهای الکلی مانند زایلیتول، دارای فعالیت ضد میکروبی علیه میکروب های دهانی می باشند^(۸). یکی از گیاهان دارویی مفید

پوسیدگی دندان یکی از بیماری های متداول عفونی مخصوصا در گروه های با موقعیت اجتماعی و اقتصادی پایین می باشد^(۱). پوسیدگی دندان که به واسطه ی حضور عوامل میکروبی و نقش آن ها در تجزیه بافت دندان یک بیماری عفونی محسوب می شود^(۲). در بین عوامل میکروبی عامل پوسیدگی دندان گونه های استرپتوکوک مهمترین عامل می باشند^(۳). در بین گونه های جنس استرپتوکوک، استرپتوکوکوس موتانس به عنوان مهمترین عامل اتیولوژیک پوسیدگی دندان در انسان در نظر گرفته می شود سایر گونه های با اهمیت شامل استرپتوکوک سالیواریوس و استرپتوکوک سانگوئیس می باشند^(۴). یکی از راهکارهای پیشگیری از پوسیدگی دندان استفاده از مواد ضد میکروبی شیمیایی می باشد. متداول ترین ماده ضد میکروبی کلر هگزیدین می باشد که به اشکال مختلف از قبیل دهانشویه، خمیر دندان و ژل عرضه می شود^(۵). خاصیت ضد پلاک کلر هگزیدین به دلیل ماهیت دی کاتیونی آن می باشد و همین ماهیت کاتیونی باعث تغییر رنگ خارجی دندان می شود^(۶). علاوه بر تغییر رنگ دندان عوارض متعدد

استرپتوکوک سانگوئینیس) انجام نشده است، لذا بر آن شدیم که در این تحقیق اثرات آنتی باکتریایی اسانس گیاه شاه اسپرم را مورد بررسی و آزمایش قرار دهیم.

مواد و روش ها:

این مطالعه به روش تجربی و آزمایشگاهی انجام شد.

تهیه سویه های میکروبی:

سه سویه استاندارد استرپتوکوکوس موتانس (PTCC 1683)، استرپتوکوکوس سانگوئیس (PTCC 1449) و استرپتوکوکوس سالیواریوس (PTCC 1448) به صورت لیوفیلیزه از مرکز میکروارگانیسم های صنعتی ایران خریداری شد. معیار ورود جهت تأیید این سویه ها ارائه آزمایش های تأییدی مانند رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، همولیز، کشت در محیط میتیس سالیواریس آگاروتخمیر قند^(۱۴) توسط مرکز مزبور بود. قبل از تهیه کشت های میکروبی باکتری ها را فعال نموده و در حالت تکثیر از آن ها استفاده شد.

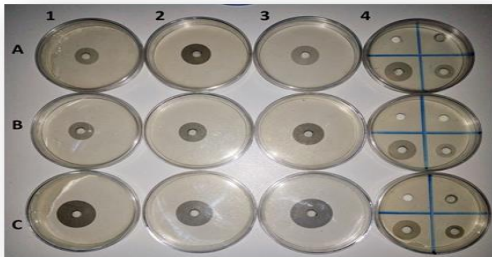
روش تهیه عصاره:

جمع آوری نمونه های گیاهی شامل اندام های هوایی گیاه شاه اسپرم از مزرعه تحقیقاتی شرکت دانش بنیان پژوهشگران داروی سبز به روش انتخاب تصادفی انجام گرفت. و پس از شناسایی دقیق و اطمینان از صحت انتخاب، به دور از نور خورشید و در شرایط سایه و دمای ۲۸-۲۰ درجه سانتی گراد اتاق خشک شد. در هنگام جمع آوری گیاهان، سعی شد که نمونه ها در فصل رشد مرحله فنولوژیکی باشند که بیشترین متابولیت ثانویه را دارند. جمع آوری نمونه ها در یک فاصله زمانی بسیار کوتاه از اندام های هوایی گیاه در ساعات ۱۲ الی ۱۵ در اوج تابش خورشید به دلیل وجود بیشترین ماده موثره انجام شد. در مرحله بعدی اندام مورد نظر گیاه خشک شده توسط آسیاب برقی (Moulinex, France) به صورت پودر درآمد. اسانس گیری طبق پروتکل های استاندارد^(۱۵) و به شرح زیر انجام گرفت. از پودر بدست آمده با استفاده از ترازوی دیجیتال 50 (Philips, Germany) گرم برداشته و اسانس گیری توسط دستگاه کلونجر و با روش تقطیر با آب طبق روش بریتانیا انجام شد.^(۱۵) نمونه ها ابتدا خرد و سپس درون بالن یک لیتری منتقل شده و ۶۰۰ میلی لیتر آب به آنها اضافه گردید،

گیاه شاه اسپرم (*Tanacetum balsamita* L) می باشد. این گیاه با منشاء مدیترانه ای بوده و چند ساله و از تیره آستراسه یا کلپرک سانان می باشد^(۹). تیره آستراسه شامل ۲۲۷۵۰ گونه پذیرفته شده است که در ۱۶۲۰ جنس و ۱۲ زیر گروه توزیع شده اند. جنس *Tanacetum* دارای بیش از ۲۰۰ گونه است که در شرق آسیا و اروپا توسعه یافته اند. گیاهان جنس *Tanacetum* که تا ارتفاع بیش از ۲۰۰ متر رشد می کنند، دارای گونه هایی با عطر و بوی بسیار قوی هستند^(۱۰). جنس *Tanacetum* در ایران شامل ۲۶ گونه است. گونه *balsamita* با نام های محلی شاه اسپرم یا شاسپرم در منطقه آذربایجان به صورت طبیعی می روید^(۱۱،۱۲). اهمیت دارویی این گیاه به خاطر اسانس موجود در کرک های ترشحی سطح تحتانی برگ می باشد^(۱۳). اسانس این گیاه دارای ترکیبات سس کوئی ترپن، لاکتون ها و ترکیبات تلخ است که دارای فعالیت های بیولوژیکی مانند تنظیم کنندگی رشد، خاصیت آنتی میکروبی و سایر موارد است^(۱۰). از لحاظ ویژگی های درمانی این گیاه و اسانس استحصالی از آن به عنوان محافظ کبد، مقوی معده، بادشکن، نیرودهنده، ضد تشنج، ضد کرم، صفرابر، قاعده آور و نیز به خاطر ویژگی های ضد میکروبی، ضد آلرژیک، آرام بخش و تقویت کنندگی قلب مورد استفاده قرار می گیرد. آزمایشات مختلف نشان داده اند که با مصرف فرآورده های آن ترشح صفرا زیاد شده و سنگ های صفراوی حل می گردند. در کاربرد موضعی با خیساندن برگ های این گیاه در روغن زیتون، نوعی ماده روغنی حاصل می گردد که برای پانسمان زخم ها بسیار مفید است. جوشانده نمک دار شاه اسپرم در بهبود و التیام زخم ها اثر مفید دارد^(۹).

هر چند مقالات متعددی در مجلات داخلی و خارجی در مورد اثر ضد میکروبی عصاره های مختلف گیاهان دارویی وجود دارد اما مطالعه در مورد اثر گیاهان دارویی بر عوامل بیماری زای دهانی اندک است. با توجه به خواص ضد میکروبی گیاه شاه اسپرم و از آنجا که طی بررسی های به عمل آمده از منابع مختلف تحقیقی مبنی بر اثرات ضد باکتریایی گیاه *Tanacetum balsamita* L بر روی استرپتوکوک های دهان (استرپتوکوک موتانس، استرپتوکوک سالیواریوس و

یک پلیت برای بررسی ۴ غلظت موثر این اسانس (۱۲/۵ ، ۲۵ ، ۵۰ و $100 \mu\text{g}/\text{ml}$) و یک پلیت برای هر کدام از گروههای کنترل در نظر گرفته شد. این پلیتها برای هر نوع باکتری مورد نظر آماده گردید (شکل ۱).



شکل ۱ : تصویر پلیت‌های تست قطر هاله عدم رشد دهانشویه کلرهگزیدین ۲٪ (ردیف ۱)، دهانشویه ایرشا (ردیف ۲)، دهانشویه اورال بی (ردیف ۳) و غلظت‌های مختلف اسانس شاه اسپرم (ردیف ۴)، علیه سویه‌های باکتریایی استرپتوکوکوس موتانس (A)، استرپتوکوکوس سالیواریس (B) و استرپتوکوکوس سانگوئینیس (C) در این روش از باکتری‌هایی که در محیط کشت رشد کرده اند، سوسپانسیونی در سرم فیزیولوژیک به تعداد 3×10^8 باکتری در میلی لیتر تهیه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون بر روی محیط مولر هینتون براث تلقیح گردید و دیسک گذاری انجام شد. بر روی دیسک ها ۲۰ میکرولیتر از اسانس اضافه شد و به مدت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد ۴۸ ساعت انکوبه گردید. بعد از دو روز پلیت‌ها از نظر وجود هاله عدم رشد بررسی شدند. از دیسک‌های استاندارد کلرهگزیدین (شرکت وی وان)، دهانشویه روزانه ایرشا و دهانشویه اورال بی به منظور گروه کنترل مثبت استفاده شد. اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها به وسیله خط کش انجام شد. داده های بدست آمده از هر گروه طریق آزمون تی تست و نرم افزار SPSS 23 مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. سطح معنی داری داده ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بر اساس نتایج حاصل از اندازه‌گیری MIC و MBC غلظت-های مختلف اسانس شاه اسپرم علیه سویه‌های باکتریایی، استرپتوکوک سانگوئینیس حساسیت بیشتری را نسبت به دو

سوسپانسیون بدست آمده به مدت ۴ ساعت در دستگاه کلونجر قرار داده شد و در نهایت توسط سولفات سدیم آب زدایی انجام شد. لازم به ذکر است ماده موثره این گیاه بر اساس مطالعات Quercetin می باشد^(۱۶) تعیین آنتی بیوگرام MIC (Minimum Inhibitor Concentration) و MBC

(Minimum Bactericidal Concentration)

منظور از MIC ، غلظتی از یک آنتی بیوتیک است که می تواند رشد باکتری را در شرایط آزمایشگاهی مهار کند و منظور از MBC ، حداقل غلظتی از دارو است که باکتری را از بین می برد. اساس روش برای تعیین MIC و MBC در مجموعه بر پایه روش رقیق کردن در محیط مایع Broth

Dilution است. برای این منظور از کشت تازه استرپتوکوکها در محیط آگوست تریپتوز سوی براث (TSB; Quelab, Montreal, Canada) کدورتی معادل ۰/۵ مک- فارلند تهیه و به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد، تا کدورتی معادل 1×10^6 به دست آید. از عصاره های مورد آزمایش استریل شده با فیلتر سرسرنگی با قطر منفذ ۰/۲۲ میکرون رقت های متوالی (Serial dilutions) در محیط براث تهیه شد. سپس در پلیت ۹۶ خانه پلی استایرن ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های مختلف عصاره و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری، ریخته شد در این پلیت ۹۶ خانه ۳ چاهک حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط براث به عنوان کنترل منفی و ۳ چاهک حاوی محیط کشت و باکتری به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. چاهک‌هایی حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط و ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به عنوان شاهد کدورت در نظر گرفته شد. سپس سطح پلیت ها پوشانده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد درون جار بی هوازی انکوبه شدند. بعد از ۲۴ ساعت کدورت در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط الیزا ریدر (AWARENESS, Technology INC Atafax 2100) خوانده شد. این پروسه برای هر نوع باکتری سه بار تکرار شد.

بررسی فعالیت ضد میکروبی شاه اسپرم:

جهت بررسی فعالیت‌های ضد میکروبی اسانس شاه اسپرم از روش بررسی قطر هاله عدم رشد (Disk diffusion) استفاده شد. با توجه به شروع اثر این اسانس در غلظت $12/5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ،

استرپتوکوک سانگوئینیس برابر ۱۲/۵ و میزان MBC اسانس این گیاه دارویی علیه باکتری استرپتوکوک سانگوئینیس ۱۲/۵ می‌باشد.

در کل می‌توان نتیجه گرفت که اسانس گیاه دارویی شاه اسپرم دارای قدرت بازدارندگی و کشندگی مناسبی در مقابل باکتری های استرپتوکوک موتانس، استرپتوکوک سانگوئینیس و استرپتوکوک سالیواریس می‌باشد.

مقایسه نتایج حاصل از اندازه گیری هاله عدم رشد این اسانس با سه دهانشویه متداول و در دسترس بیماران در جدول ۲ آورده شده است.

سویه باکتریایی دیگر در برابر اسانس گیاه دارویی شاه اسپرم از خود نشان داد (جدول ۱).

بر اساس نتایج حاصل می‌توان بیان کرد که:

الف) میزان MIC اسانس گیاه دارویی شاه اسپرم علیه استرپتوکوک موتانس برابر ۵۰ و میزان MBC اسانس این گیاه دارویی علیه باکتری استرپتوکوک موتانس ۵۰ می‌باشد.

ب) میزان MIC اسانس گیاه دارویی شاه اسپرم علیه استرپتوکوک سالیواریس برابر ۲۵ و میزان MBC اسانس این گیاه دارویی علیه باکتری استرپتوکوک سالیواریس ۵۰ می‌باشد.

ج) میزان MIC اسانس گیاه دارویی شاه اسپرم علیه

جدول ۱- نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف اسانس شاه اسپرم، کلرگزیدین ۲٪، ایرشا و اورال - بی علیه سویه

های باکتریایی مورد مطالعه

غلظت باکتری مورد مطالعه	کیلوگرم بر میلی لیتر				اورال-بی	ایرشا	کلرگزیدین ۲٪
	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵			
۱ استرپتوکوکوس موتانس	-	۶/۷	۹/۴	۱۳/۶	۱۶/۴	۱۰/۲	۱۴/۹
۲ استرپتوکوکوس سالیواریس	-	-	۸/۴	۱۱/۶	۱۷/۲	۱۳/۴	۱۵/۲
۳ استرپتوکوکوس سانگوئیس	-	۴/۲	۸/۴	۱۳/۷	۱۵/۳	۱۱/۴	۱۵/۶

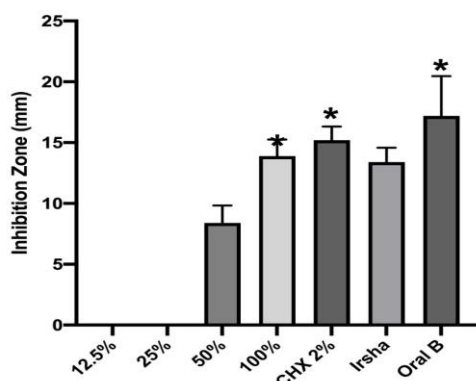
جدول ۲. تایج MIC و MBC غلظت‌های مختلف اسانس شاه اسپرم بر روی باکتری های مورد مطالعه

نام باکتری مورد مطالعه							
استرپتوکوکوس سانگوئیس		استرپتوکوکوس سالیواریس		استرپتوکوکوس موتانس		غلظت	ردیف
MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC		
-	-	-	-	-	-	٪۱۰۰	۱
-	-	+	-	-	-	٪۵۰	۲
-	-	+	+	-	-	٪۲۵	۳
-	-	+	+	+	+	٪۱۲.۵	۴
+	+	+	+	+	+	٪۶.۲۵	۵
+	+	+	+	+	+	٪۳.۱۲	۶
*	+	*	+	*	+	٪۱.۵۶	۷
*	+	*	+	*	+	۰.۷۸	۸
*	+	*	+	*	+	۰.۳۹	۹
*	+	*	+	*	+	شاهد باکتری	۱۰
*	-	*	-	*	-	شاهد اسانس	۱۱
*	-	*	-	*	-	شاهد محیط	۱۲
S	*	S	*	S	*	کلرگزیدین	۱۳
S	*	S	*	S	*	ایرشا	۱۴
S	*	S	*	S	*	اورال بی	۱۵

-: عدم رشد باکتری * = صفر = حساس S
+: رشد باکتری

در سویه استرپتوکوک سالیواریس: در این گروه دهان شویه اورال- بی با ایجاد ۱۷/۲ میلی متر قطر هاله عدم رشد بیشترین و غلظت ۵۰ µg/ml اسانس گیاه دارویی شاه اسپرم با ایجاد قطر هاله ۸/۴ میلی متری کمترین میزان قطر هاله عدم رشد را به خود اختصاص داد، این در حالی است که غلظت ۲۵µg/ml اسانس گیاه دارویی شاه اسپرم بر روی باکتری استرپتوکوک سالیواریس تاثیر ممانعت از رشد نشان نداد. همچنین غلظت ۱۰۰ µg/ml اسانس گیاه شاه اسپرم با ایجاد قطر هاله ۱۱.۶ میلی متری نتیجه نزدیکی نسبت به دهانشویه ایرشا نشان داد. این اختلاف اثر ما بین اسانس با غلظت ۱۰۰ µg/ml و دهانشویه اورال بی و همچنین اسانس با همین غلظت و دهانشویه کلرهگزیدین معنی دار نبود. به عبارت دیگر اسانس در این غلظت برابر با دهانشویه های اورال بی و کلرهگزیدین اثر مهاری داشت (نمودار ۲)

Streptococcus Salvaris



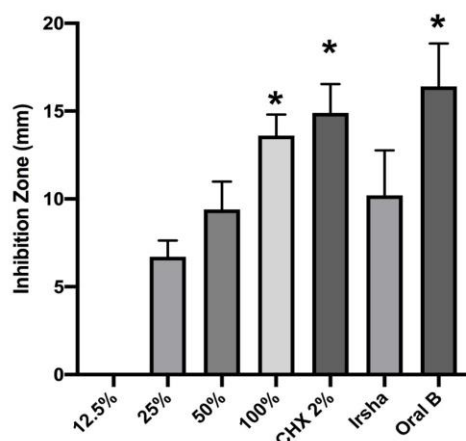
نمودار ۲- هاله عدم رشد گونه استرپتوکوک سالیواری در گروههای مورد مطالعه. (مواردیکه با ستاره مشخص شده اند از نظر آماری با هم اختلاف معنی دار ندارند).

در سویه استرپتوکوک سانگوئینیس: در این سویه دهانشویه کلرهگزیدین با ایجاد ۱۵/۶ قطر هاله عدم رشد بیشترین و غلظت ۲۵ µg/ml اسانس گیاه دارویی شاه اسپرم با ایجاد قطر هاله ۴/۲ میلی متری کمترین میزان قطر هاله عدم رشد را به خود اختصاص داد. غلظت ۱۰۰ µg/ml اسانس گیاه دارویی شاه اسپرم با ایجاد قطر هاله ۱۳/۷ میلی متری نتیجه بهتری نسبت به داروی ایرشا و نتیجه نسبتاً مشابه به دو داروی

در این مطالعه به دلیل عدم ایجاد قطر هاله عدم رشد در غلظت ۱۲.۵ µg/ml اسانس گیاه دارویی شاه اسپرم علیه هر سه سویه باکتریایی استرپتوکوک موتانس، استرپتوکوک سانگوئینیس و استرپتوکوک سالیواریس این گروه از مطالعه حذف گردید. بر اساس نتایج حاصل از غلظت های مختلف اسانس گیاه دارویی شاه اسپرم و مقایسه نتایج حاصل از دهانشویه های گروه شاهد می توان بسته به نوع باکتری مورد بررسی موارد زیر را عنوان کرد.

در سویه استرپتوکوک موتانس: دهانشویه اورال بی با ایجاد ۱۶/۴ قطر هاله عدم رشد بیشترین و غلظت ۲۵ µg/ml اسانس گیاه دارویی شاه اسپرم با ایجاد قطر هاله ۶/۷ میلی متری کمترین میزان قطر هاله عدم رشد را به خود اختصاص داد. همچنین غلظت ۱۰۰ µg/ml اسانس گیاه دارویی شاه اسپرم با ایجاد قطر هاله ۱۳/۶ میلی متری نتیجه بهتری نسبت به دهانشویه ایرشا و نتیجه نسبتاً مشابه به دو دهانشویه دیگر نشان داد. قطر هاله عدم رشد اسانس در غلظت ۱۰۰ µg/ml از نظر آماری با دو دهانشویه اورال بی و کارهگزیدین اختلاف معنی دار نداشت. یعنی قدرت اثر این اسانس در این غلظت معادل با دو دهانشویه عنوان شده بود. (نمودار ۱)

Streptococcus Mutans



نمودار ۱- هاله عدم رشد گونه استرپتوکوک موتانس در گروههای مورد مطالعه. (مواردیکه با ستاره مشخص شده اند با هم اختلاف معنی دار ندارند).

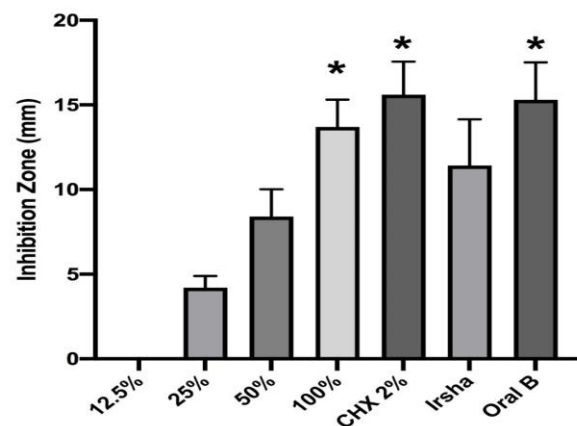
بر اساس نتایج این مطالعه اسانس گیاه دارویی شاه اسپرم دارای قدرت بازدارندگی و کشندگی مناسبی در مقابل باکتری های استرپتوکوک موتانس، استرپتوکوک سانگوئینیس و استرپتوکوک سالیاریوس می باشد. این اسانس در غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ اثری معادل با دو دهانشویه کلرهگزیدین و اورال بی داشت. با توجه به اینکه دهانشویه اورال بی به عنوان یکی از شناخته شده ترین دهانشویه های مورد کاربرد در دندانپزشکی و در سطح بین المللی مطرح می باشد، حصول نتایج معادل با این دهانشویه در غلظت مزبور اسانس شاه اسپرم نشاندهنده پتانسیل بالای این گیاه برای کاربرد در دهانشویه های دندانپزشکی می باشد. نتایج حاصل از غلظت های مختلف اسانس گیاه دارویی شاه اسپرم و مقایسه نتایج حاصل از داروهای شاهد نشان داد که در هر سویه استرپتوکوک موتانس، استرپتوکوک سانگوئینیس و استرپتوکوک سانگوئینیس اثر دهانشویه اورال بی در بین دهانشویه های گروه کنترل بیشتر بود. این تاثیر بعد از آن به ترتیب در دهانشویه های کلرهگزیدین، اسانس شاه اسپرم با غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ و بعد از آن در دهانشویه ایرشا بیشتر بود. این تاثیر در دو غلظت دیگر مورد بررسی در اسانس قابل توجه نبود و به شکل معنی داری کمتر از اثر دهانشویه های گروه کنترل بود بنابراین اساس شاه اسپرم در غلظت های ۵۰، ۲۵ و $12.5 \mu\text{g/ml}$ موثر نبوده و استفاده از این غلظتها برای استفاده در دهانشویه ها یا هر گونه کاربرد موضعی در دهان توصیه نمی شود. لازم به ذکر است دهانشویه با غلظت $12.5 \mu\text{g/ml}$ بر روی این باکتری اثر رشد مهاری نداشت.

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) با وجود پیشرفت های زیاد در بهداشت دهانی مردم در سراسر جهان، مشکل پوسیدگی دندان همچنان یکی از چالشهای مهم بهداشتی به ویژه در گروه های محروم اجتماعی در کشورهای پیشرفته و در حال توسعه محسوب می شود^(۱۸).

پژوهش مظفری و همکاران نشان داد، دهانشویه کلرهگزیدین در رقت های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۱ و ۰/۰۲ درصد از رشد میکروارگانیسم های استرپتوکوکوس سانگوئینیس، استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس کازئی در محیط

شاهد دیگر نشان داد. اختلاف اثر مهاری اسانس شاه اسپرم در غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ از نظر آماری با دو دهانشویه اورال بی و کلرهگزیدین معنی دار نبود. (نمودار ۳)
بنابراین در این مورد نیز اسانس شاه اسپرم با غلظت عنوان شده اثر مشابه دو دهانشویه متداول و مورد مصرف بیماران داشت.

Streptococcus sanguis



نمودار ۳- هاله عدم رشد گونه استرپتوکوک سانگوئینیس در گروه های مورد مطالعه. (مواردیکه با ستاره مشخص شده اند از نظر آماری با هم اختلاف معنی دار ندارند.)

جدول ۳- مقایسه دو گروه مطرح در این مطالعه: اسانس و دهانشویه اورال بی شاه اسپرم با غلظت ۱۰ کیلوگرم بر میلی لیتر

P value	قطر هاله عدم رشد (میلی متر)	گونه باکتریایی
۰/۴۴	اسانس: $13/6 \pm 1/2$ دهانشویه اورال بی: $16/4 \pm 2/45$	استرپتوکوک موتانس
۰/۹۱	اسانس: $13/89 \pm 1/36$ دهانشویه اورال بی: $15/3 \pm 2/21$	استرپتوکوک سالیاریوس
۰/۹۱	اسانس: $13/7 \pm 1/61$ دهانشویه اورال بی: $15/3 \pm 2/21$	استرپتوکوک سانگوئینیس

بحث:

استرپتوکوکوس و موتانس به ترتیب ۵/۱ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر و برای استرپتوکوکوس سالیواریوس به ترتیب ۲۵/۵/۱ میلی گرم بر میلی لیتر و برای استرپتوکوکوس سانگوئیس به ترتیب ۱۲۵/۰ و ۵/۰ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش کردند. همچنین میزان MIC و MBC عصاره آلوئه ورا نیز برای استرپتوکوکوس موتانس بترتیب ۴ و ۱۶، برای استرپتوکوکوس سالیواریوس به ترتیب ۵/۰ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر و برای استرپتوکوکوس سانگوئیس بترتیب ۱ و ۴ استرپتوکوکوس سانگوئیس بترتیب ۱ و ۴ mg/ml گزارش کردند^(۲۳).

تحقیقات Ferrazanno و همکاران نشان داد که پلی فنول چای سبز با مهار استرپتوکوک‌های دهان باعث پیشگیری از پوسیدگی می‌شود^(۲۴). همچنین اثر ضد میکروبی روغن درخت چای، محلول‌های سیر و کلرگزیدین بر روی میکروارگانسیم‌های دهانی بررسی و اثر ضد میکروبی آن‌ها بر روی استرپتوکوکوس موتانس به اثبات رسیده و نتیجه‌گیری کرده است که سیر و روغن درخت چای می‌توانند به عنوان جایگزین کلرگزیدین استفاده شوند. در مطالعه‌ای اثر ضد میکروبی عصاره دو نوع سیر قرمز و سفید بر روی میکروارگانسیم‌های دهانی به صورت آزمایشگاهی و بالینی مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شده که محلول دهان‌شویه حاوی ۵/۲ درصد سیر اثر ضد میکروبی خوبی علیه استرپتوکوکوس موتانس و میکروارگانسیم‌های دهانی دارد^(۲۵).

در مقایسه اثر دهان‌شویه کلرگزیدین با عصاره‌های گیاهی نشان دادند که عصاره‌های گیاهان میخک، مازو، پوست انار، آویشن و هلبله سیاه اثرات بهتری نسبت به دهان‌شویه کلرگزیدین از خود نشان دادند^(۲۶،۲۷).

نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌تواند زمینه تحقیقات بیشتر را در آینده برای جداسازی مواد مؤثر این گیاهان و مطالعات تکمیلی جهت تهیه فرمولاسیون دارویی مناسب از بهترین ماده مؤثر آن و بررسی تأثیر آن در کارآزمایی بالینی را فراهم کند.

بر اساس نتایج حاصل از تست آنتی بیوگرام، MIC و MBC می‌توان نتیجه گرفت که گیاه دارویی شاه اسپرم قدرت مقابله با

کشت ممانعت می‌کند. این نتایج با یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر همخوانی دارد و بیانگر خاصیت آنتی‌میکروبیال نسبتاً قوی کلرگزیدین در برابر باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئیس می‌باشد^(۱۹). اکثر پژوهش‌های مورد بررسی اثرات ضدباکتریایی مؤثر دهان‌شویه کلرگزیدین و دهان‌شویه تیمول را بر باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئیس تأیید می‌نمایند، اما نتایج به دست آمده به علت غلظت‌های متفاوت به کار رفته در مطالعات مختلف و روش‌های متفاوت انجام آزمایشات به طور دقیق قابل مقایسه نمی‌باشند.

نتایج مطالعه خروشی و همکاران نشان داد که عصاره الکلی میوه فلفل دلمه‌ای دارای اثر ضد میکروبی علیه استرپتوکوکوس موتانس با حداقل غلظت ممانعت از رشد ۲۵۰ mg/mL و علیه استرپتوکوکوس سوربینوس و استرپتوکوکوس سانگوئیس دارای MIC=۱۲۵ mg/mL می‌باشد^(۲۰).

Khaledi و همکاران به بررسی حداقل غلظت مهار کننده گیاه مریم نخودی بر روی استرپتوکوک موتانس پرداختند و حداقل غلظت مهار کننده این گیاه را ۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش کردند^(۲۱).

جلایر نادری و همکاران در مطالعه خود جهت تعیین تأثیر عصاره مصطکی بر میزان رشد باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس، استرپتوکوک موتانس، استرپتوکوک سانگوئیس و پسودوموناس آئروژینوزا نشان دادند که استرپتوکوک موتانس و پسودوموناس آئروژینوزا به مصطکی حساس نبودند. استافیلوکوک اورئوس و استرپتوکوک سانگوئیس در رقت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم/میلی لیتر حساسیت نشان دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که گیاه مصطکی فاقد اثر ضدباکتری بر استرپتوکوک موتانس بود^(۲۲).

در تحقیقی که توسط بروجنی و همکاران بر روی تأثیر اثر ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی آلوئه ورا و شیرین بیان بر روی باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که MIC و MBC عصاره شیرین بیان برای

References:

1. Curzon MEJ, Preston AJ. Risk groups: Nursing bottle caries/caries in the elderly. *Caries Research Journal*. 2004;38(1):24–33.
2. Thorild I, Lindau-Jonson B, Twetman S. Prevalence of salivary *Streptococcus mutans* in mothers and in their preschool children. *international journal paediatric dentistry*. 2002;12(1):2–7.
3. Delfani S, Mohammadrezaei-Khorramabadi R, Ghamari S, Boroujeni RK, Khodabandelo N, Khorzoughi MG, et al. [Systematic review for phytotherapy in *Streptococcus Mutans*]. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2017;9(5):552–61. (Persian)
4. Oda Y, Hayashi F, Okada M. Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in patients with intellectual disabilities. *BMC Oral Health*. 2015;15(1):1–5.
5. Flotra L. Different modes of Chlorhexidine application and related local side effects. *Journal of Periodontal Research*. 1973;8(12): 41-44.
6. Jones C.C. Chlorhexidine: Is it still the gold standard? *Periodontology*. 1997;15(5): 55-62.
7. Hepsz HU, Bjørnland T, Skoglund LA. Side effects and patient acceptance of 0.2% versus 0.1% chlorhexidine used as post Operative Prophylactic Mouthwash. *International Journal Oral Maxillofacial Surgery*. 1988;17(Ici):17–20.
8. Yaghootikhorasani M, Assar S, Rezahoseini O. [Comparison of Antimicrobial Effects of Persica® and Chlorhexidine with Sodium Hypochlorite on *Enterococcus Fecalis* and *Candida Albicans*: An In vitro study]. *Malaysian Journal of Medical Science*. 2010; 34(2):153–60. (Persian)
9. Hasan pour aghdam MB, Tabatabaei SJ, Nazemieh H, Aflatouni A. [Effects of different concentrations of nutrient Solution on vegetative growth and essential oil of costmary (*Tanacetum balsamita* L.)]. *Journal of Agricultural Science (University Tabriz) [Internet]*. 2008;18(1):27–38.
10. Kumar V, Tyagi D. Chemical composition and biological activities of essential oils of the genus *Tanacetum* – A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013;2(2):155-159.
11. Jaimand K, Rezaee MB. [Chemical Constituents of Essential Oils from *Tanacetum balsamita* L. ssp. *balsamitoides* (Schultz-Bip.) Grierson. from Iran]. *Journal of Essential Oil Research*. 2005;17(5):565–6. (Persian).
12. Nickavar B, Amin G, Mehregan N. [Quercetine, a Major Flavonol Aglycon from *Tanacetum balsamita* L.]. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2003;2(4):249–50. (Persian).
13. Mărculescu A, Sand C, Barbu CH, Bobiț D. Possibilities of Influencing the Biosynthesis and Accumulation of the Active Principles in *Chrysanthemum balsamita* L S pecies Results and Discussions Influence of the Plantation Time and Nutrition Area. 2002;7(1):577–84.

باکتری‌های استرپتوکوک موتانس، استرپتوکوک سالیواریس و استرپتوکوک سانگوئینیس را دارا می‌باشد. مقایسه نتایج حاصل از این اسانس با داروهای شاهد کلرهگزیدین، ایرشا و اورال بی نشان داد که اسانس گیاه دارویی شاه اسپرم با غلظت $\mu\text{g/ml}$ ۱۰۰ نتایج بهتری نسبت به دهان‌شویه ایرشا و نتایج مشابه با دهان‌شویه های کلرهگزیدین و اورال-بی داشت و می‌توان در مطالعات بالینی از این اسانس در دهان‌شویه‌ها به عنوان عامل مقابله کننده با باکتری‌های استرپتوکوک موتانس، سانگوئینیس و سالیواریس استفاده کرد.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج بدست آمده از این مطالعه پیشنهاد میگردد از اسانس گیاه شاه اسپرم در غلظت $\mu\text{g/ml}$ ۱۰۰ در طراحی و تولید دهان‌شویه های آنتی باکتریال برای مطالعات بیشتر آزمایشگاهی و بالینی استفاده گردد.

محدودیتها:

مطالعات حاضر در محیط آزمایشگاهی و با اسانس گیاه شاه اسپرم انجام شد. اگرچه بر اساس این مطالعه غلظت موثر اسانس این گیاه بر روی گونه های باکتریایی موثر در پوسیدگی دندان مشخص گردید، ولی این تاثیر در محیط دهان به علت وجود بزاق و فاکتورهای موجود در آن ممکن است شرایط متفاوتی داشته باشد، بنابراین برای تایید بالینی این نتایج نیاز به انجام مطالعات بالینی پس از دهان‌شویه حاوی اسانس ضروری به نظر می‌رسد.

14. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Scott E, Bailey W. Diagnostic microbiology. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 2002;11.
15. Vieira RF, Grayer RJ, Paton A, Simon JE. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochem Syst Ecol.* 2001;29(3):287-304.
16. Kazemzadeh M, Yaghmaei P, Mohammadi S. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Tanacetum balsamita* essential oil and one of its major constituents (Quercetin) in male rats. *Clin Neurol Neurosci [Internet].* 2017;1(3):60-6. Available from: <https://www.iomcworld.org/proceedings/analgesic-and-antiinflammatory-effects-of-tanacetum-balsamita-essential-oil-and-one-of-its-major-constituents-quercetin--49469.html>
17. Coté H, Boucher M-A, Pichette A, Legault J. Anti-Inflammatory, Antioxidant, Antibiotic, and Cytotoxic Activities of *Tanacetum vulgare* L. Essential Oil and Its Constituents. *Medicines.* 2017;4(2):34.
18. Peterson PE, Lennon MA. effective use of fluorides WHO approach. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004;32:319-21.
19. Mozaffari B, Mansouri S, Rajabalian S, Alimardani A, Mohammadi, M. [In vitro study between antibacterial and cytotoxic effects of chlorhexidine and persica mouthrinses]. *Journal of Dental School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences.* 2005;23(3):494-509. (Persian).
20. Khoroushi M, Rabbani Khorasgani M, Aliasghari A. [Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of two plants extract on cariogenic streptococci]. *Journal of dentistry of Tehran University of Medical Sciences (Tehran).* 2017;30(1):12-17. (Persian).
21. Khaledi M, Heidari-Sureshjani R, Gholipour A, Mardanpour-Shahrekordi E, Roohi Broojeni H. [Study of the Antimicrobial effects of the hydroalcoholic extract of *Teucrium chamaedrys* on the bacteria *Streptococcus mutans* in vitro]. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences.* 2016;17(Suppl): 61-67. (Persian). <http://eprints.skums.ac.ir/id/eprint/4820>
22. Jalayer-Naderi N, Niakan M, Mohamadi-Motlagh M. [Determination of antibacterial activity of *Pistacia lentiscus* Methanolic Extract on *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Pseudomonas aeruginosa*]. *Journal of Ilam University of Medical Sciences.* 2013;22(7):67-74. (Persian).
23. Borjian Brojeni S, Kaveh Babaheydari E, Mortezaei S, Karimian M, Shirzad M, Validi M. [The antibacterial effects of the hydroalcoholic extracts of Aloe Vera and Glycyrrhiza Glabra against Cariogenic Bacteria InVitro]. *Journal of Babol University of Medical Sciences.* 2016;18(4):14-20. (Persian).
24. Ferrazzano GF, Roberto L, Amato I, Cantile T, Sangianantoni G, Ingenito A. Antimicrobial properties of green tea extract against cariogenic microflora: An in vivo study. *J Med Food.* 2011;14(9):907-11. . DOI: 10.1089/jmf.2010.0196
25. Groppo FC, Ramacciato JC, Motta RH, Ferraresi PM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic against oral streptococci. *Int J Dent Hyg.* 2007;5(2):109-15. DOI: 10.1111/j.1601-5037.2007.00230.x
26. Kaim JM, Gultz J, Do L, Scherer W. An in vitro investigation of the antimicrobial activity of an herbal mouthrinse. *J Clin Dent.* 1998;9(2):46-8. PMID: 10518853
27. Pan PH, Finnegan MB, Sturdivant L, Barnett ML. Comparative antimicrobial activity of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse in vitro. *J Clin Periodontol.* 1999;26(7):474-6. doi: 10.1034/j.1600-051x.1999.260710.x.