مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۷، تیر ۱۳۹۷، ۳۳۰-۳۱۹

بررسی اثر ضد باکتریایی دهانشویه ستیل پیریدینیوم کلراید و عصاره‌های الکلی گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis L.*) بر روی استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئیس

علی‌اصغر فرجی[۱]، خسرو عیسی زاده[۲]، سمانه روحی[۳]، مریم پرواره[۴]، فاطمه زابلی[۵]

دریافت مقاله: ۹۶/۳/۱۷ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۶/۶/۲۹ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۷/۲/۱ پذیرش مقاله: ۹۷/۲/۲

چکیده

زمینه و هدف: استرپتوکوکوس سانگوئیس و موتانس عامل عفونت‌های دندانی می‌باشند. با توجه به اثر سوء ناشی از مصرف دهانشویه‌های شیمیایی، هدف از بررسی حاضر تعیین اثرات ضد باکتریایی دهانشویه ستیل پیریدینیوم کلراید و عصاره‌های الکلی گیاه بادرنجبویه بر رشد این باکتری‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، برگ‌های گیاه بادرنجبویه پس از جمع‌آوری، با روش پرکولاسیون عصاره گیری شد. روش انتشار در چاهک، تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی و کشندگی باکتری برای تعیین اثرات ضد باکتریایی عصاره الکلی گیاه و دهانشویه در غلظت‌های ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲، ۷/۸۱، ۳/۹، ۱/۹۵، ۰/۹۷ و ۰/۴۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌کار رفت. تحلیل آماری با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون انجام شد.

یافته‌ها: بیشترین اثر ضد باکتریایی عصاره‌های اتانولی و متانولی بادرنجبویه و دهانشویه بر روی استرپتوکوکوس موتانس و سانگوئیس در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و کمترین غلظت مهار کنندگی بر استرپتوکوکوس موتانس به ترتیب ۳/۹، ۳۱/۲۵ و ۱۵/۶۲ و بر استرپتوکوکوس سانگوئیس ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲ و ۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند. حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های بادرنجبویه و دهانشویه بر استرپتوکوکوس موتانس به ترتیب ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ و بر سانگوئیس به ترتیب ۶۲/۵، ۳۱/۵ و ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند. بین بالا رفتن میزان غلظت عصاره و مهار رشد باکتری، همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد از عصاره بادرنجبویه می‌توان مانند دهانشویه به عنوان یک ماده ضدعفونی کننده دهان و دندان استفاده نمود، هر چند آزمایشات درون تنی و اثبات نداشتن اثر سوء بر بدن انسان، جهت تولید این نوع از دهانشویه‌های گیاهی لازم است.

واژه‌های کلیدی: ستیل پیریدینیوم کلراید، بادرنجبویه، استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس سانگوئیس

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت‌الله‌آملی ، آمل، ایران
۲- استادیار میکروب‌شناسی، گروه آموزشی میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران
۳- دانشجوی دکترای اپیدمیولوژی مولکولی باکتری‌ها، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۴- کارشناس ارشد اپیدمیولوژی، مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر بر سلامت، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۵- (نویسنده مسئول) استادیار قارچ‌شناسی، گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت‌الله‌آملی، آمل، ایران
تلفن: ۴۲۲۵۲۱۹۶-۰۱۱، دورنگار: ۴۳۲۱۷۰۱۱-۰۱۱، پست الکترونیکی: microbiol_sci2013@yahoo.com

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.4.1.6]

مقدمه

استرپتوکوکوس سانگوئیس و استرپتوکوکوس موتانس باعث عفونت‌های دندان و لثه و به دنبال آن عفونت‌های قلبی و عروقی نیز می‌شوند [۱]. یکی از مواد مهم در از بین بردن باکتری‌های دهانی، دهانشویه است. این ماده دارای فعالیت میکروب کشی، همچنین خصوصیاتی چون زدودن پلاک دندانی، تمیزکنندگی و ایجاد طعم مطبوع در دهان می‌باشد. ستیل پیریدینیوم کلراید یکی از دهانشویه‌های شیمیایی بوده و دارای طیف وسیعی از اثرات ضد باکتریایی است. این ماده به عنوان یک شوینده دهانی به خصوص روی باکتری‌های جنس استرپتوکوکوس اثر داشته و تجمع و اتصال پلاک‌های دندانی را تضعیف می‌کند [۳-۲].

از طرفی دیگر دهانشویه‌های شیمیایی با اینکه از اثرات ضدمیکروبی بسیار خوبی برخوردارند، اما با عوارضی چون تغییر رنگ دندان‌ها و مخاط، خشکی و احساس سوزش در مخاط دهان و اثرات منفی در بدن در صورت بلع همراه هستند [۴]. به دلیل این عوارض، تأکید فراوانی به عدم استفاده از دهانشویه شیمیایی شده است. به همین دلیل تمرکز بر روی استفاده از دهانشویه‌های گیاهی افزایش یافته است [۶-۵].

با توجه به مطالب ذکر شده در خصوص اهمیت استرپتوکوکوس سانگوئیس و استرپتوکوکوس موتانس در ایجاد عفونت‌های دندانی و اهمیت استفاده از دهانشویه‌های گیاهی با توجه اثر سوء کمتر آن نسبت به نوع شیمیایی، نیاز به یافتن و تولید مواد طبیعی مناسب مثل عصاره‌های گیاهی به عنوان جایگزین مواد شیمیایی توصیه می‌شود [۷]. گیاه بادرنجبویه (Melissa officinalis L.) از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) می باشد. این گیاه، بومی‌مناطق مدیترانه‌ای و غرب آسیا می‌باشد. از اسانس این گیاه صنایع آرایشی و عطرها، آشامیدنی، بستنی سازی، شیرینی سازی و محصولات غذایی استفاده می‌شود. این گیاه اثرات ضد درد و ضد تشنج داشته و در درمان بی خوابی، بیماری‌های عصبی، افسردگی، تهوع و ناراحتی‌های معده نیز مؤثر است [۸]. مطالعات متعدد در رابطه با اثرات ضد میکروبی گیاهان مختلف از جمله گیاه بادرنجبویه بر روی باکتری‌ها صورت گرفته است [۱۱-۸].

Arzhang و همکارانش به روش حداقل غلظت مهار کنندگی نشان دادند که اسانس بادرنجبویه درغلظت ۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر مهارکنندگی بر استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا داشت [۸]. Azimi Laysar و همکارانش به روش انتشار از دیسک بر آگار یا روش کربی بائر Kirby–*Bauer* antibiotic (testing or *disk diffusion agar method*) (در این روش محلول ضد باکتری جذب دیسک جاذب می‌شود. سپس این دیسک‌ها که جنس آن‌ها نوعی کاغذ است، بر روی محیط کشت قرار داده می‌شود. با انتشار تدریجی مواد ضد باکتری از دیسک، باکتری‌ها در اطراف دیسک از بین رفته و هاله عدم رشد تشکیل می‌شود) نشان دادند که عصاره روغنی سیاه دانه در غلظت ۳۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نانوسیلور کلوئیدی در غلظت‌های ۳۰۰ پی پی ام بیشترین اثر ضد باکتریایی را بر استرپتوکوکوس سانگوئیس و موتانس داشتند [۹].

سفرآبادی و همکارانش طی یک کارآزمایی بالینی بر روی ۷۰ بیمار با لوله تراشه در دهان نشان دادند که تأثیر دهانشویه گیاهی اکیناسه بر بهداشت دهان مانند دهانشویه شمیایی کلرهگزیدین می‌باشد [۱۰]. همچنین

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.4.1.6]

رستمی و همکارانش اثرات ضدباکتریایی این گیاه را بر روی انواعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان دادند و به روش گاز کروماتوگرافی – طیف سنج جرمی‌نشان دادند که ترکیبات اسانس گیاه که بیشترین اثرات ضد باکتریایی داشتند شامل تیمول، کارواکرول، منتول، بتا پینن و لینالول بودند [۱۱].

با توجه به افزایش روز افزون تقاضای جامعه جهت استفاده از داروهای گیاهی و نیز اثرات ضد میکروبی و کم خطر گیاهان، تولید مواد ضد عفونی کننده گیاهی علیه باکتری‌های بیماری زا مورد اهمیت است [۶]. همچنین هنوز تحقیقی در مورد اثرات ضد باکتریایی بادرنجبویه بر روی استرپتوکوکوس موتانس و سانگوئیس صورت نگرفته است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر ضد باکتریایی دهانشویه ستیل پیریدینیوم کلراید و عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاه بادرنجبویه در غلظت‌های مختلف بر روی استرپتوکوکوس موتانس و سانگوئیس صورت گرفته است، تا گامی‌مثبت در جهت درمان عفونت حاصل از این باکتری بدون استفاده از داروهای شیمیایی برداشته شود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، برگ گیاه بادرنجبویه از مناطق مختلف استان گیلان در اواخر فصل تابستان در سال ۱۳۹۴جمع‌آوری شد. پس از جمع‌آوری در گروه گیاه‌پزشکی واقع در دانشکده مهندسی کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد لاهیجان (کدهرباریومی: ۷۲) مورد شناسایی و تأیید علمی قرار گرفت. برگ‌های گیاه به مدت یک هفته در هوای آزاد و در سایه خشک گردید. سپس برگ‌های خشک شده درهاون کاملاً کوبیده و پودر شد و سپس مورد استفاده قرار گرفت. دهان شویه وی وان (Vi one) حاوی ستیل پیریدینیوم کلراید از داروخانه‌های تهران و سویه‌های باکتریایی استرپتوکوکوس موتانس PTCC1449 و استرپتوکوکوس سانگوئیس PTCC168 از مرکز کلکسیون قارچها و باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی‌و صنعتی ایران به صورت آمپول‌های شیشه‌ای لیوفیلیزه خریداری شدند.

برای استخراج عصاره از گیاه، برگ آن خشک و بعد از پودر شدن مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور از روش پرکولاسیون (Percolation) استفاده شد [۱۲]. بدین ترتیب که ۲۰۰ گرم از پودر نمونه گیاهی مورد نظر در داخل دکانتور (Separatory funnel) (2190/04M، پیرکس، استافوردشایر، انگلستان) ریخته شد. سپس مرحله به مرحله به آن به طور جداگانه اتانول و متانول۷۰ درصد اضافه شد. پس از حدود یک ساعت مخلوط داخل دکانتور به همان حال گذاشته شد و بعد شیر دکانتور باز شد تا محلول حاوی عصاره و الکل به صورت قطره قطره از دکانتور خارج و پس از خروج محلول، شیر دکانتور بسته و محلول مجدداً به داخل دکانتور برگردانده شد. این روند هر یک ساعت یک بار تکرار شد. جداسازی عصاره از حلال به وسیله دستگاه تبخیر کننده تغلیظ (DRE-01، درسا به ساز، کرج، ایران) انجام و سپس خشک شد [۱۳].

جهت تهیه استوک، ۱ گرم از عصاره‌های اتانولی و متانولی در حلال دی متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide; *DMSO*) حل و غلظت‌های ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲، ۷/۸۱، ۳/۹، ۱/۹۵، ۰/۹۷ و ۰/۴۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. همچنین استوک ۱ میلی‌لیتر از دهان شویه در آب مقطر دو بار استریل حل و

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.4.1.6]

غلظت‌های ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲، ۷/۸۱، ۳/۹، ۱/۹۵، ۰/۹۷ و ۰/۴۸ از آن تهیه شد [۱۴].

آمپول حاوی باکتری لیوفیلیزه طبق دستورالعمل شرکت سازنده باز شد. آمپول‌ها از محل توده پنبه خراش داده و اطراف آن با الکل ۷۰ درصد کاملاً ضدعفونی شد. آمپول‌ها از محل خراش شکسته و در زیر هود در کنار شعله قرار داده شدند. سپس توده پنبه با پنس استریل خارج و سپس ۲ میلی‌لیتر از محیط مولر هینتون براث (مرک، آلمان) اتوکلاو شده توسط سرنگ انسولین، به ماده خشک درون آمپول اضافه شد. پس از یکنواخت کردن، کشت اولیه روی محیط‌های بلاد آگار (مرک، آلمان) و مولرهینتون آگار (مرک، آلمان) انجام گرفت. چند کلونی از هر کدام از باکتری‌های مورد استفاده به کمک سوآب استریل برداشت و در لوله آزمایش حاوی ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی تلقیح شدند. سپس کدورت لوله‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Cintra4040، GBC، براساید، استرالیا) اندازه گیری شد، تا این کدورت‌ها با کدورت لوله ۰/۵ مک فارلند $۱/۵\times۱۰^{۸}$ یکسان باشد [۱۵].

در روش انتشار از چاهک در آگار *(Well diffusion agar)*، از سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلندی که تهیه شده بود بر سطح محیط مولر هینتون آگار به صورت یکنواخت (سفره ای) کشت داده شد، سپس با استفاده از پیپت پاستور، چاهک‌هایی به قطر 7 میلی‌متر حفر گردید و به میزان 100 میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها به هر یک از چاهک‌ها ریخته و سپس به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه (Binder،ED-115، توتلینگن، آلمان) شد [۱۴].

در مرحله بعد با اندازه‌گیری قطرهاله‌های عدم رشد در اطراف هر یک از چاهک‌ها توسط خط‌کش اینچی (به علت در دسترس نبودن کولیس از خط‌کش اینچی استفاده شد) میزان حساسیت یا مقاومت باکتری‌های مورد نظر به عصاره‌ها تعیین شدند (آنتی‌بیوتیک جنتامیسین با غلظت ۱/۲۵ به عنوان کنترل مثبت و از محلول دی‌متیل سولفوکسید ۱۰۰ درصد به عنوان کنترل منفی استفاده گردید) [۱۶].

جهت تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum inhibitory concentration; MIC) گیاه و دهانشویه با روش رقت در لوله (Broth Dillution) ۱۱ لوله در نظر گرفته شد و به هرکدام از آن‌ها ۱ میلی‌لیتر از محیط مولرهینتون براث اضافه و همچنین طبق ۰/۱ سریال رقت ۱ میلی‌لیتر از عصاره نیز به آن‌ها اضافه شد. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی به لوله‌ها اضافه شد. لوله در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. لوله شماره ۱۰ به عنوان کنترل مثبت (۱ میلی‌محیط مولرهینتون براث + ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچی) و لوله شماره ۱۱ به عنوان کنترل منفی (۱ میلی‌محیط مولرهینتون براث) در نظر گرفته شد. بعد از انکوباسیون، حداقل غلظت مهار کنندگی بر اساس وجود کدورت یا عدم وجود کدورت در لوله‌ها تعیین شد. همچنین در تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری (Minimum bactericidal concentration; MBC)، ۲۰ میکرولیتر از رقت‌هایی که در روش حداقل غلظت مهار کنندگی فاقد کدورت بودند در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. رشد باکتری در هر غلظت و

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.4.1.6]

تعداد کلونی مشخص شد و پایین‌ترین غلظتی از عصاره که مانع ایجاد کلونی باکتری شده بود (کلونی رشد نکرده) به عنوان حداقل غلظت کشندگی باکتری در نظر گرفته شد [۱۴].

تمام آزمایشات با سه تکرار انجام شد. بررسی اثر ضد باکتری عصاره‌های گیاه مورد استفاده با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ همراه با محاسبه ضریب همبستگی پیرسون انجام شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج روش انتشار در چاهک نشان داد که بیشترین اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی و متانولی گیاه بادرنجبویه و دهانشویه در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی استرپتوکوکوس موتانس مشاهده شد که به ترتیب ۱۸، ۱۸ و ۱۴ میلی‌متر بود. این میزان بر روی استرپتوکوکوس سانگوئیس نیز در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌های اتانولی، متانولی و دهانشویه مشاهده شد که به ترتیب ۱۹، ۲۰ و ۱۵ میلی‌متر بود. بین غلظت عصاره اتانولی، متانولی و دهانشویه و اندازه قطر هاله ممانعت از رشد در اطراف استرپتوکوکوس موتانس همبستگی معناداری وجود داشت ($p<۰/۰۰۱$). در مورد استرپتوکوکوس سانگوئیس نیز بین غلظت عصاره اتانولی، متانولی و دهانشویه و اندازه قطر هاله ممانعت از رشد همبستگی معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۰۱$). همچنین همبستگی میزان غلظت عصاره اتانولی با رشد استرپتوکوکوس سانگوئیس مستقیم و کامل بود ($r=۰/۹۹۷$، $p<۰/۰۰۱$). بدین معنا که با افزایش میزان غلظت تمامی‌عصاره‌ها در تمام غلظت‌های تهیه شده از آن‌ها، رشد باکتری‌ها کاهش یافت ($p<۰/۰۰۱$). با توجه به استفاده از آزمون ضریب همبستگی پیرسون، نتایج به صورت mean±sd گزارش نشده است (جدول ۱ و ۲).

نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی به روش لوله نشان داد که کمترین غلظت مهار کنندگی عصاره اتانولی و متانولی گیاه بادرنجبویه و دهانشویه وی وان بر استرپتوکوکوس موتانس به ترتیب ۳/۹، ۳۱/۲۵ و۱۵/۶۲میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی بر استرپتوکوکوس سانگوئیس در اثر به کار گیری مواد مذکور به ترتیب ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲ و ۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. حداقل غلظت کشندگی باکتری عصاره اتانولی و متانولی گیاه بادرنجبویه و دهانشویه وی وان بر روی استرپتوکوکوس موتانس به ترتیب ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ و بر روی استرپتوکوکوس سانگوئیس به ترتیب ۶۲/۵، ۳۱/۵ و ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.4.1.6]

جدول ۱- میانگین هاله ممانعت از رشد عصاره اتانولی و متانولی گیاه بادرنجبویه و دهانشویه ستیل پیریدینیوم کلراید بر استرپتوکوکوس موتانس (بر حسب میلی‌متر) به روش انتشار در چاهک (کنترل مثبت: جنتامایسین، کنترل منفی: دی متیل سولفوکساید) و ارتباط آن ها با غلظت های مختلف تهیه شده از گیاه بادرنجبویه (بر حسب میلی گرم بر میلی‌لیتر)

غلظت‌ها / نوع ماده ضد میکروبی	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۱۵/۶۲	۷/۸۱	۳/۹	۱/۹۵	۰/۹۷	۰/۴۸	جنتامایسین ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	دی‌متیل‌سولفوکساید	مقدار r	مقدار p
عصاره اتانولی گیاه بادرنجبویه	۱۸	۱۵	۱۳	۱۲	۱۰	۱۰	۷	۵	۴	-	۱۹	-	۰/۹۹۷	< ۰/۰۰۱
عصاره متانولی گیاه بادرنجبویه	۱۸	۱۵	۱۴	۱۳	۱۲	۱۱	۹	۵	۵	-	۱۹	-	۰/۹۹۷	< ۰/۰۰۱
دهان شویه وی وان	۱۴	۱۳	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	۵	۴	۴	۱۹	-	۰/۹۹۷	< ۰/۰۰۱

(-) نشان دهنده عدم رشد می باشد، اعداد داخل جدول نشان دهنده میانگین قطر هاله ممانعت از رشد بر حسب میلی‌متر می باشد.

جدول ۲- قطر هاله ممانعت از رشد عصاره اتانولی و متانولی گیاه بادرنجبویه و دهانشویه ستیل پیریدینیوم کلراید بر استرپتوکوکوس سانگوئیس (بر حسب میلی‌متر) به روش انتشار در چاهک (کنترل مثبت: جنتامایسین، کنترل منفی: دی‌متیل‌سولفوکساید) و ارتباط آن‌ها با غلظت‌های مختلف تهیه شده از گیاه بادرنجبویه (بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

غلظت‌ها / نوع ماده ضد میکروبی	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۱۵/۶۲	۷/۸۱	۳/۹	۱/۹۵	۰/۹۷	۰/۴۸	جنتامایسین ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	دی‌متیل‌سولفوکساید	مقدار r	مقدار p
عصاره اتانولی گیاه بادرنجبویه	۱۹	۱۸	۱۶	۱۵	۱۳	۱۲	۹	۷	۵	-	۲۱	-	۰/۹۹۷	< ۰/۰۰۱
عصاره متانولی گیاه بادرنجبویه	۲۰	۱۸	۱۸	۱۷	۱۴	۱۳	۱۰	۸	۵	-	۲۱	-	۰/۹۹۷	< ۰/۰۰۱
دهان شویه وی وان	۱۵	۱۴	۱۱	۹	۸	۷	۷	۶	۵	۴	۲۱	-	۰/۹۹۷	< ۰/۰۰۱

**** (-) نشان دهنده عدم رشد می باشد، اعداد داخل جدول نشان دهنده اندازه هاله ممانعت از رشد بر حسب میلی‌متر می باشد. * آزمون آماری به کار رفته محاسبه ضریب همبستگی Pearson در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ می‌باشد.***
**** با توجه به استفاده از آزمون ضریب همبستگی Pearson، نتایج بصورت mean±sd گزارش شده است.***

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.4.1.6]

بحث

دهانشویه‌های شیمیایی یکی مؤثرترین مواد به کار گرفته شده جهت پاکسازی کانال‌های دندانی و زدودن باکتری‌های عفونت زای دهان و دندان می‌باشند. از طرفی تأثیر گیاهان بر عوامل عفونی از زمان‌های گذشته در ایران و همچنین دیگر مناطق جهان مورد توجه محققان در این زمینه و مردم عادی بوده است و اثرات آن در بسیاری از آزمایشات و تحقیقات تأیید شده است [۱۸-۱۷]. در این تحقیق عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاه بادرنجبویه مانند دهان شویه وی وان اثر ضدمیکروبی مطلوبی از خود نشان دادند و تأثیر ضد باکتریایی آن‌ها بر دو باکتری استرپتوکوکوس موتانس و سانگوئیس تأیید شد.

طی یک بررسی Kamali و همکارانش در ایران به روش انتشار از دیسک بر آگار یا کربی بائر (در مقدمه در مورد این روش توضیح داده شد) نشان دادند که عصاره اتیل استاتی بادرنجبویه اثر ضد رشد بر روی باکتری باسیلوس سرئوس دارد و بیشترین قطرهاله ممانعت از رشد در این روش اطراف این باکتری ۱۲ میلی‌متر است. همچنین حداقل غلظت مهار کنندگی و کشندگی باکتری توسط عصاره اتیل استاتی بادرنجبویه در این تحقیق برای این باکتری ۰/۷۸-۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. در مطالعه ما نیز اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های اتانولی و متانولی بادرنجبویه بر هر دو باکتری استرپتوکوکوس سانگوئیس و موتانس نشان داده شد. بیشترین قطرهاله ممانعت از رشد اطراف استرپتوکوکوس سانگوئیس برای عصاره‌های اتانولی و متانولی به ترتیب ۱۹ و ۲۰ و بر موتانس در اثر به کارگیری هر دو عصاره قطر این‌هاله ۱۸ میلی‌متر تعیین شدکه اندازه آن در مقایسه با مطالعه Kamali بیشتر بود [۱۹]. تغییر در ترکیبات شیمیایی عصاره‌ها باعث تغییرات در میزان فعالیت‌های ضد میکروبی آن‌ها می‌گردد که بر میزان قطرهاله‌ها که ناشی از فعالیت ضد میکروبی این مواد است می‌تواند اثر مستقیم داشته باشد [۲۰-۱۹].

در مطالعه حاضر حداقل غلظت مهار کنندگی و کشندگی باکتری در اثر به کارگیری عصاره اتانولی و متانولی بادرنجبویه بر استرپتوکوکوس موتانس به ترتیب ۳/۹ و ۳۱/۲۵ و بر استرپتوکوکوس سانگوئیس ۳۱/۲۵ و ۱۵/۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. از طرفی حداقل غلظت کشندگی باکتری این دو عصاره اتانولی و متانولی نیز به ترتیب بر روی استرپتوکوکوس موتانس ۱۲۵ و ۶۲/۵ و بر روی سانگوئیس ۶۲/۵ و ۳۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. این میزان از حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد و کشندگی باکتری در مقایسه با مطالعه کمالی میزان بالاتری بود [۱۹]. بررسی‌ها نشان داده است که ترکیبات ضد باکتریایی مانند فلاونوئیدها و پلی فنول‌ها باعث مهار ساخت DNA و RNA باکتریایی می‌شوند و از رشد باکتری‌ها جلوگیری می‌کند. در این راستا میزان و جایگاه ترکیبات فنولی در عصاره‌های مختلف الکلی گیاهان نیز متفاوت است و بنابراین میزان تأثیرگذاری عصاره‌های مختلف در غلظت‌های مختلف نیز متغیر می‌باشد [۱۹، ۱۳].

Lee و همکارن در کشور کره تأیید کردند که روغن بادرنجبویه بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین مؤثر بود و حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد آن ۲۵۹۲- ۲۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که بسیار کمتر از میزان به دست آمده در مطالعه ما بود [۲۱].

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.4.1.6]

اثرات متفاوت ضد رشد باکتریایی مواد گیاهی در غلظت‌های مختلف ممکن است به علت شرایط اقلیمی از جمله آب، هوا، خاک و ارتفاعی که گیاه در آن می‌روید بستگی داشته داشته باشد [۲۰].

در مطالعه یاقوتی خراسانی و همکاران در ایران اثر ضد باکتریایی دهانشویه‌های هیپوکلریت سدیم، کلرهگزیدین ۲ درصد و اسانس هیدورالکلی آویشن شیرازی ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر باکتری انتروکوکوس فکالیس به روش انتشار از دیسک بر آگار تأیید شد. در این مطالعه بیشترین قطرهاله ممانعت از رشد به ترتیب اطراف دیسک‌های آغشته به هیپوکلریت سدیم (۱۹/۱ میلی‌متر)، کلرهگزیدین ۲ درصد (۱۶/۱ میلی‌متر) و اسانس هیدورالکلی (۱۳/۵ میلی‌متر) مشاهده شد. در این مطالعه اختلاف معنی‌درای بین محلول‌های مختلف مورد مطالعه مشاهده شد (p=۰/۰۰۱). در مطالعه ما نیزهاله‌های ممانعت از رشد اطراف چاهک‌های حاوی عصاره‌های الکلی بادرنجبویه و دهانشویه ستیل پیریدینیوم مشاهده شدند که برای استرپتوکوکوس موتانس بیشترین اندازه ۱۸ میلی‌متر و مربوط به به کارگیری عصاره اتانولی و متانولی بادرنجبویه بود. قطرهاله عدم رشد اطراف چاهک حاوی دهانشویه ۱۴ میلی‌متر بود. اطراف استرپتوکوکوس سانگوئیس به ترتیب هاله‌های ممانعت از رشد ۱۹، ۲۰ و ۱۵ میلی‌متر در اطراف چاهک‌های حاوی عصاره‌های اتانولی بادرنجبویه و دهانشویه ستیل پیریدینیوم مشاهده شدند. این اندازه از قطرهاله ممانعت از رشد اطراف دهانشویه شیمیایی در مطالعه ما کمتر از میزان مشاهده شده در مطالعه یاقوتی خراسانی و همکاران بود و برعکس عصاره‌های هیدروالکلی گیاه اثرات بهتری را نشان دادند [۲۲].

دلایل مختلفی را می‌توان علت اختلافات در اندازه قطرهاله عدم رشد و اثرات مختلف ضد باکتریایی این مواد دانست. از جمله علل اختلاف میزان حلالیت پایین یا بالای این مواد در حلال مربوطه، میزان انتشار این مواد در آگار، میزان غلظت بکار گرفته از مواد مذکور، اثرات ضدباکتریایی بیشتر بعضی از این مواد نسبت به سایرین (که در تحقیقات مختلف نشان داده شده است) می‌باشد [۲۳، ۱۴].

زاکانی و همکارانش در ایران به روش انتشار از چاهک در آگار (این روش در بخش روش کار این مقاله توضیح داده شده است) و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اثرات ضدباکتریایی دهانشویه‌های رقیق شده در آب فلوراید ۲٪ و دهانشویه ترکیبی زایلیتول و فلوراید را بر استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نشان دادند. در روش انتشار از چاهک در آگار دهانشویه ترکیبی زایلیتول و فلوراید بر هردو باکتری بی تأثیر بود. اما بیشترین هاله ممانعت از رشد در اطراف لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۲۴ و در اطراف استرپتوکوکوس موتانس ۱۷ میلی‌متر بود. حداقل غلظت مهارکنندگی فلوراید ۲ درصد بر هر دو باکتری در غلظت ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و دهانشویه ترکیبی زایلیتول و فلوراید نیز بر هردو باکتری در غلظت ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در تحقیق حاضر، کمترین غلظت مهار کنندگی دهانشویه بر استرپتوکوکوس موتانس ۱۵/۶۲ و سانگوئیس ۳۱/۲۵ بر میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که این میزان غلظت نسبت به مطالعه زاکانی و همکارانش بیشتر بود که نشان دهنده

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.4.1.6]

اثرات بهتر دهانشویه فلوراید ۲ درصد و دهانشویه ترکیبی زایلیتول و فلوراید است. در مطالعه ما نیز از روش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد و تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری جهت بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های این گیاه استفاده شد. این دور روش، روش‌های کمی بوده و به عنوان استاندارد طلایی جهت تعیین حساسیت باکتری نسبت به مواد ضد میکروبی انجام می‌شود که از محاسن این روش به‌حساب می‌آید [۲۳].

در انتها از محدودیت مطالعه می‌توان موارد زیر را نام برد: روش چاهک یک روش کیفی است و جهت شناسایی مقاومت یا حساسیت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می شوند، بنابراین به علت کیفی بودن از دقت چندان بالایی برخودار نیست. همچنین در این روش باکتری کشی یا خاصیت بازدارندگی از رشد باکتری ماده مورد مطالعه مشخص نمی‌شود. همچنین ممکن است بعضی از ترکیبات گیاهی در حلال حل نشده باشند و اثرات خود را به خوبی ظاهر نساخته باشند [۲۳، ۱۸].

با توجه به اثرات ضد باکتریایی گیاه بادرنجبویه در این مطالعه، پیشنهاد می‌شود تا روش‌های دقیق‌تر و درون‌تنی جهت بررسی‌های بیشتر روی اثرات ضد باکتریایی این گیاه مورد توجه قرار گیرد. تحقیقات گسترده تر در زمینه اثرات سایر گیاهان دارویی بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای دهان صورت گیرد و قطعاً با همکاری گسترده بین مراکز مربوط می‌توان انتظار داشت، تا تحقیقات جامع‌تری در این زمینه به مرحله اجرا در آید. همچنین شناخت بهترین گونه از گیاهان دارویی و استخراج ماده مؤثره خالص آن‌ها خواهد توانست راه را برای تولید انبوه دهانشویه‌های گیاهی کار آمد با حداقل اثرات سوء نسبت به مواد شیمیایی هموار سازد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه اثرات ضد میکروبی این گیاه مشاهده شد. یافته‌های مطالعه حاضر نشان دهنده اثرات ضد باکتریایی دهانشویه وی-وان حاوی ستیل پیرینیدیوم کلراید و عصاره‌های الکلی بادرنجبویه بر روی باکتری‌های مورد مطالعه در این تحقیق (استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سنگوئیس) بود. به نظر می‌رسد از عصاره بادرنجبویه عنوان ماده ضدعفونی کننده دهان و دندان می‌توان استفاده نمود. اما آزمایشات درون تنی و آزمایشات متعدد بر روی انسان جهت اثبات بی خطر و بی ضرر بودن این ترکیب لازم می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمام افرادی که در راهنمایی و انجام آزمایشات و نوشتن و ویرایش مقاله حاضر به نحوی راهنمایی و همکاری نموده اند و همچنین کمک و راهنمایی عوامل و کارکنان دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد آیت ا ... آملی در انجام امور اداری مربوط به اجازه استفاده از آزمایشگاه، لوازم و دستگاه‌های مورد نیاز در انجام کارهای عملی مربوط به این تحقیق تقدیر و تشکر می‌نمایند.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.4.1.6]

References

[1] Murray PR. Bahador A, Editors. Murray Medical Microbiology. 7th ed, Tehran, Khosravipub, 2013; 151-3. [Farsi]

[2] Delshad S, karimzadeh K, Mostafaie A. extraction of chondroitin sulfate from cartilage sturgeon, stellate sturgeon (acipenser stellatus) and its inductive effect on human fibroblast proliferation. *Iran South Med J* 2017; 20(4): 349-61. [Farsi]

[3] Rizwana N. The role of cetylpyridinium chloride mouthwash in the treatment of periodontitis. *Int J Pharml Sci Invent* 2013; 2(12): 36-7.

[4] Aksungur P, Sungur A, Ünal S, Iskit A, Squier C, Şenel S. Chitosan delivery systems for the treatment of oral mucositis: in vitro and in vivo studies. *J Control Release* 2004; 98(2): 269-79.

[5] Atheesh Kumar P, Balan A, Sankar A, Bose T. Radiation induced oral mucositis. *Indian J Palliat Care* 2009; 15(2): 95-6.

[6] Kumar G, Jalaluddin MD, Rout P, Mohanty R, Dileep CL. Emerging trends of herbal care in dentistry. *J Clin Diagn Res* 2013; 7(8): 1827–9.

[7] Rabbani Khorasgani M, Aliasghari A, Khoroushi M. Comparison of methods for controlling dental caries in the classical medicine and alternative medical practices and future prospects. *JDT* 2015; 28(2): 122-31.

[8] Arzhang M, Dakhili M, Farahani F. Investigation of chemical compounds and anti-microbial activity of essential oil of Melissa officinalis L. *Qom Univ Med Sci J* 2015; 9(1-2): 7-13. [Farsi]

[9] Azimi Laysar HR, Niakan M, Mohammad Taghi G, Jafarian Z, Mostafavizade M, Niakan S. Comparison of the antibacterial activity of various concentrations of Nigella Sativa and Nanosilver on the growth of S. sanguis and S. mutans. *J Res Dent Sci* 2013, 9(4): 179-86. [Farsi]

[10] Safarabadi M, Rezaei K, Ghaznavi-Rad E. Comparing the effect of Echinacea and chlorhexidine mouthwash on oral health in patients hospitalized in intensive care units. *CMJA* 2013: 2(3): 222-34. [Farsi]

[11] Rostami H, Kazemi M, Shafiei S. Antibacterial activity of lavandula officinalis and Melissa officinalis againts some human pathogenic bacteria. *Asian J Biochem* 2012; 7(3): 133-42.

[12] Azadbakht M, Hosseini AS, Fakhri M. Necessity of standardization of medicinal plant extracts in investigations and the manner to perform it. *RJMS* 2017; 23(152): 8-17. [Farsi]

[13] Sharafati-Chaleshtori R, Sharafati-Chaleshtori F, Rafieian- kopaei M, Drees F, Ashrafi K. Comparison of the antibacterial effect of ethanolic walnut (juglans regia) leaf extract with chlorhexidine mouth rinse on Streptococcus mutans and sanguinis. *J Islamic Dental Associat Iran* 2011; 22(4): 211-7.

[14] Gholampourazizi E, Rouhi S, Nouri B, Hassanzadeh Miandasteh SH. In Vitro Study of Antifungal Effect of Walnut (Juglans regia L.) Leaf Extract on the Malassezia Furfur Fungus. *SJKUMS* 2015; 20(1): 30-9. [Farsi]

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.4.1.6]

[15] Gholampourazizi I, Rouhi S, Zandi S, Kashefi H, Hassanzadeh Miandasteh SH. ntifungal effect of Melia azedarach alcoholic and aquatic extract on malassezia furfur. *NHJ* 2017; 2(1): 11-7. [Farsi]

[16] Mohammadi A, Ahmadzadeh Sani T, Kamali H, Alesheikh P, Feyzi P, Zarghami moghaddam P. Evaluation of phenolic compounds and the antibacterial effect of various extracts of aerial parts of scutellaria pinnatifida on typical food-born pathogens. *JNKUMS* 2015; 7(1): 393-403. [Farsi]

[17] Amin M, Abasi Montazeri E, Javadi M, Shahin F, Teymuri Rad M. Evaluation of antimicrobial effect of essential oil of leaves of Eucalyptus glubulos methanol base against some of mouth bacteria. *Jentashapir Sci Med J* 2013; Supplement (Supplement): 41-7. [Farsi]

[18] Jalal Z, Atki YE, Lyoussi B, Abdellaoui A. Phytochemistry of the essential oil of Melissa officinalis L. growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. *Asian Pac J Trop Biomed* 2015; 5(6): 458–61.

[19] Kamali M, Khosroyar S, Mohammadi A. Antibacterial activity of various extracts from Dracocephalum kotschyi against food pathogenic microorganisms. *Int J Pharm Tech Research* 2015; 8(9): 158-63.

[20] Ahmadi E, Abdollahi A, Najafipour S, Meshkibaf MH, Fasihi-Ramandi M, Namdar N, et al. Surveying the effect of the phenol compounds on antibacterial activity of herbal extracts: in vitro assessment of herbal extracts in Fasa-Fars province. *J Fasa Univ Med Sci* 2016: 6(2): 210-20. [Farsi]

[21] Lee SB, Cha KH, Kim SN, Altantsetseg S, Shatar S, Sarangerel O, et al. The antimicrobial activity of essential oil from Dracocephalum foetidum against pathogenic microorganisms. *J Microbiol* 2007; 45(1): 53-7.

[22] Yaghooti Khorasani MM, Bahramabadi R, Moghbeli H. In vitro comparison of the antimicrobial efficacy of Zataria multiflora, chlorhexidine and sodium hypochlorite against Enterococcus faecalis and Candida albicans. *J Res Dent Sci* 2015; 12(1): 21-6. [Farsi]

[23] Zajkani E, Zeighami H, Zaeefjou A. Comparision of the effect of fluoride 0.2% and a combination mouthwash (xylitol and fluoride) on streptococcus mutans and lactobacillus acidophilus growths. *JDT* 2017; 30(1): 57-64. [Farsi]

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.4.1.6]

A Survey on the Antibacterial Effects of Mouthwash Cetylpyridinium Chloride and Alcoholic Extract of Melissa officinalis L. on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*

A.A. Faraji[1], Kh. Issazadeh[2], S. Rouhi[3], M. Parvareh[4], F. Zaboli[5]

Received: 07/06/2017 Sent for Revision: 20/09/2017 Received Revised Manuscript: 21/04/2018 Accepted: 22/04/2018

Background and Objectives: Streptococcus sanguinis and mutans are dental infections agents. Due to the adverse effects of chemical mouthwashes, the aim of the present study was to determine the antibacterial effects of cetylpyridinium chloride mouthwash and alcoholic extracts of Melissa officinalis plant on the growth of these bacteria.

Materials and Methods: In this laboratory study, M. officinalis leaves were collected and extracted using percolation method. Well diffusion method and determination of minimum inhibitory and bactericidal concentrations were used for the antibacterial effects determination of alcoholic extracts of the plant and mouthwash in the concentrations of 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.9, 1.95, 0.97 and 0.48 mg/ml. Statistical analysis was performed using Pearson's correlation coefficient.

Results: The most antibacterial effect of ethanolic and methanolic extracts of M. officinalis and mouthwash on S. mutans and sanguinis was in the concentration of 250 mg/ml and the least inhibitory concentrations against S. mutans were 3.9, 31.25 and 15.26 and against S. sanguinis were 31.25, 15.62and 31.25 mg/ml, respectively. The minimum bactericidal concentrations of ethanolic and methanolic extracts of M. officinalis and mouthwash against S. mutans were 125, 62.5 and 31.25 and against S. sanguinis were 62.5, 31.5 and 62.5 mg/ml, respectively. There was a positive significant correlation between increasing concentration of extracts and inhibition of bacterial growth ($p < 0.001$).

Conclusion: It seems that M. officinalis extract like mouthwash can be used as an oral and teeth antiseptic. However, *in-vivo* tests and proves that there is no harmful effects on the human body are essential for the production of this type of herbal mouthwash.

Key words: Cetylpyridinium chloride, Melissa officinalis, Streptococcus mutans, Streptococcus sanguinis

Funding: This research was funded by the deputy of research and technology of Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch, Amol, Iran.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics committee of Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch approved this study. Ethics committee code for this research: 23930507932007.

How to cite this study: Faraji AA, Issazadeh Kh, Rouhi S, Parvareh M, Zaboli F. **A** Survey on the Antibacterial Effects of Mouthwash Cetylpyridinium Chloride and Alcoholic Extract of Melissa officinalis L. on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2018; 17 (4): 319-30. [Farsi]

1- MSc Student of Microbiology, Faculty of Food Industry, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch, Amol, Iran, 0000-0002-3772-8631

2- Assistant Prof. of Microbiology, Dept. of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Lahijan Branch, Lahijan, Iran, ORCID: 0000-0002-3849-8716

3- PhD Student of Molecular Epidemiology of Bacteria, Student Research Committee, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran, ORCID: 0000-0003-0160-0924

4- MSc in Epidemiology, Social Determinants of Health Research Center, Health Development Research Institute, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran, ORCID: 0000-0003-2625-3637

5- Assistant Prof. of Mycology, Dept. of Biology, Faculty of Food Industry, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch, Amol, Iran, ORCID: 0000-0002-3569-233x

(Corresponding Author) Tel: (011) 42252196, Fax: (011) 43217011, E-mail: microbiol_sci2013@yahoo.com.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.4.1.6]