



Original Article

Synergistic Effect of Methanolic Extracts of *Rosmarinus Officinalis* and *Eugenia caryophyllata* on Biofilm of Oral Pathogenic Bacteria

Mohammad Reza Abrishami ¹ , Peiman Alesheikh ² , Samineh Gharaei ³ , Mina Norozi Khalili ⁴ , Maryam Saadat Khaje ^{5,*} , Parastoo Zarghami Moghaddam ^{6,*} 

¹ Dental Student, Faculty of Dentistry, North Khorasan University of medical sciences, Bojnurd, Iran

² Ph.D. of Chinese Medicine, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

³ Assistant Professor, Department of Operative Dentistry, Faculty of Dentistry, North Khorasan University of medical sciences, Bojnurd, Iran

⁴ Department of Community Medicine and Ethics, Faculty of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

⁶ Ph.D. Student of Microbiology, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

* **Corresponding author:** Maryam Saadat Khaje, Assistant Professor, Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran. E-mail: maryamdent87@gmail.com, Parastoo Zarghami Moghaddam, Ph.D. Student of Microbiology, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran. E-mail: parastoozarghami@yahoo.com

DOI: 10.29252/nkjmd-12031

How to Cite this Article:

Abrishami MR, Alesheikh P, Gharaei S, Norozi Khalili M, Saadat Khaje M, Zarghami Moghaddam P. Synergistic Effect of Methanolic Extracts of *Rosmarinus Officinalis* and *Eugenicaryophyllata* on Biofilm of Oral Pathogenic Bacteria. *J North Khorasan Univ Med Sci*. 2020;**12**(3):1-9. DOI: 10.29252/nkjms-12031

Received: 27 May 2020

Accepted: 11 Aug 2020

Keywords:

Rosmarinus officinalis
Eugenia caryophyllata
Antibacterial Effect
Biofilm
Plant Extract

Abstract

Introduction: Tooth decay is one of the most essential and costly diseases globally, which is caused by the formation of biofilms by various bacteria. This study aimed to investigate the synergistic antibacterial effect of *Rosmarinus officinalis* and *Eugenia caryophyllata* on inhibiting the growth and biofilm obtained of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* bacteria.

Methods: *Rosmarinus officinalis* and *Eugenia caryophyllata* were extracted by methanol solvent by maceration method and drying. Antibacterial properties were studied by disc, well diffusion, and biofilm formation measurement.

Results: Analysis of the results in disc and well method showed that 100mg/ml concentration of *Eugenia caryophyllata* had the most potent antibacterial effect among different concentrations and the *Streptococcus mutans* was more sensitive than *Streptococcus sanguinis*. Measurements of biofilm formation also showed that only 100mg/ml and 80mg/ml concentrations of *Eugenia caryophyllata* could inhibit *Streptococcus mutans* biofilm. None of the extracts were able to inhibit the biofilm from *Streptococcus sanguinis*.

Conclusions: 100mg/ml concentration of *Eugenia caryophyllata* has a similar or more antibacterial effect than commercial chlorhexidine mouthwash and can be considered for future research to make an herbal mouthwash.



اثر سینرژیستی عصاره‌های متانولی دو گیاه دارویی رزماری (*Rosmarinus officinalis*) و میخک (*Eugenia caryophyllata*) بر ساختار بیوفیلمی حاصل از باکتری‌های پاتوژن دهانی

محمد رضا ابریشمی^۱، پیمان آل شیخ^۲، ثمینه قرائی^۳، مینا نوروزی خلیلی^۴، مریم سعادت خواجه^{۵*}، پرستو ضرغامی مقدم^{۶*}

^۱ دانشجوی دکترای عمومی دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
^۲ دکترای تخصصی طب چینی، مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

^۳ استادیار، گروه ترمیمی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
^۴ دکترای تخصصی پزشکی اجتماعی، گروه پزشکی اجتماعی و اخلاق، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
^۵ استادیار، گروه پرودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
^۶ دانشجوی دکترای تخصصی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

* نویسنده مسئول: مریم سعادت خواجه، استادیار، گروه پرودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران. ایمیل: maryamdent87@gmail.com و پرستو ضرغامی مقدم، دانشجوی دکترای تخصصی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران. ایمیل: parastoozarghami@yahoo.com

DOI: 10.29252/nkjms-12031

چکیده	تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۰۷
مقدمه: پوسیدگی دندان یکی از بیماری‌های مهم و هزینه بر در دنیا محسوب می‌شود که علت اصلی آن تشکیل بیوفیلم توسط باکتری	تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۲۱
ها مختلفی می‌باشد. هدف از این پژوهش بررسی اثر سینرژیستی ضد باکتریایی دو گیاه رزماری و میخک بر بازدارندگی رشد و تشکیل	واژگان کلیدی:
بیوفیلم حاصل از باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوک سانگونیئیس می‌باشد.	Rosmarinus Officinalis
روش کار: دو گیاه دارویی رزماری (<i>Rosmarinus officinalis</i>) و میخک (<i>Eugenia caryophyllata</i>) پس از جمع‌آوری و	Eugenia Caryophyllata
خشک نمودن، توسط حلال متانول به روش خیساندن عصاره‌گیری گردید و بررسی خاصیت ضدباکتریایی به روش‌های دیسک	اثر ضد باکتریایی
دیفیوژن، چاهک پلیت و سنجش میزان تشکیل بیوفیلم انجام شد.	بیوفیلم
یافته‌ها: آنالیز نتایج در روش دیسک و چاهک نشان داد که غلظت ۱۰۰ mg/ml میخک قوی‌ترین اثر ضدباکتریایی را در بین	عصاره گیاهی
غلظت‌های مختلف از خود نشان داده و باکتری استرپتوکوکوس موتانس حساس‌تر از استرپتوکوکوس سانگونیئیس مشاهده شد. نتایج	
سنجش میزان تشکیل بیوفیلم نیز نشان داد که فقط غلظت ۱۰۰ mg/ml و ۸۰ میخک قادر به مهار بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس	
بوده و هیچکدام از عصاره‌ها قادر به حذف بیوفیلم حاصل از استرپتوکوکوس سانگونیئیس نشدند.	
نتیجه‌گیری: غلظت ۱۰۰ mg/ml گیاه میخک اثر ضدباکتریایی مشابه و یا بیشتری در مقایسه با دهانشویه کلرهگزیدین تجاری	
داشته و می‌تواند برای تحقیقات آتی جهت ساخت دهانشویه گیاهی مورد بررسی قرار گیرد.	

مقدمه

بیماری‌های دهانی شامل پوسیدگی و بیماری‌های پریدونتال یک مشکل اصلی سلامت است که در کشورهای در حال توسعه دیده شده و ۶۰ تا ۹۰٪ بالغین و کودکان را تحت تأثیر قرار داده و هزینه و وقت زیادی را به خود اختصاص می‌دهد [۱، ۲]. پلاک دندانی عامل اتیولوژیک اولیه و اصلی در ایجاد و پیشرفت پوسیدگی دندان و بیماری پریدونتال است [۳-۵]. بیوفیلم‌های باکتریایی، تجمعات پیچیده میکروارگانیسمی هستند که در یک پوشش گلیکوکالیکس محصور شده و به سطوح

مختلف می‌چسبند و در هر دو رده باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مشاهده می‌شود. در حقیقت یکی از اصلی‌ترین مکانیسم‌های بقا باکتری‌ها در محیط‌های کشت مختلف استفاده از همین توان تولید بیوفیلم و زندگی در آن می‌باشد [۳]. کنترل مکانیکی پلاک یکی از روش‌های کنترل پوسیدگی است. علیرغم اینکه کنترل آن مطمئن‌ترین روش رعایت بهداشت دهان و دندان می‌باشد، بسیاری از بیماران از جمله کودکان، معلولین و افرادی که تحت عمل جراحی بوده‌اند، قادر به

بالا پوسیدگی و عوارض درمان‌های موجود شامل دهان شویه های آنتی باکتریال، WHO در سالهای اخیر مطالعه روی گونه‌های گیاهی جهت بررسی اثرات ضد میکروبی و تهیه دهانشویه های مؤثر بر پلاک باکتریال دندان را در دستور کار خود قرار داده به گونه‌ای که اثرات مشابه با داروهای شیمیایی با عوارض کمتر داشته باشند [۴، ۳]. در مطالعات مختلف نشان داده شده است که این دو گیاه خاصیت ضد میکروبی دارند [۲۲-۲۰]. ما نیز در این مطالعه برای اولین بار اثر سینرژیستی عصاره‌های متانولی دو گیاه دارویی رزماری و میخک را بر روی بیوفیلیم حاصل از باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگونیسیس ارزیابی می‌کنیم.

روش کار

عصاره گیری

گیاهان رزماری (اندام هوایی) و میخک (گل) پس از تهیه از عطاری معتبر توسط کارشناس گیاه شناسی مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی تأیید و در سایه در مجاورت هوا خشک و پودر گردیده و عصاره گیریه روش خیساندن به مدت ۴۸ ساعت با حلال متانول (۱۰۰ درصد) انجام گرفت و با استفاده از تبخیرکننده چرخان (روتاری، هایدولف آلمان) تغلیظ و پودر عصاره حاصل گردید. پودر عصاره تا زمان آزمایش در یخچال (+۴ درجه سانتی گراد) نگهداری شد. تمامی مراحل کار مربوط به عصاره گیری و انجام تست‌های میکروبی در مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی در زمستان سال ۱۳۹۸ انجام گردید.

روش چاهک پلیت

اثرات ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی با غلظت‌های (۱۰۰، ۸۰، ۶۰، ۵۰، ۴۰ و ۲۰) میلی گرم بر میلی لیتر به روش چاهک پلیت انجام شد. در این روش از پلیتهای حاوی محیط کشت مربوطه که آغشته به میکروارگانیسم (استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگونیسیس) بودند استفاده گردید. توسط یک پمپ پاستور استریل که مخصوص ایجاد چاهک است، یک حفره در محیط کشت ایجاد کرده داخل هر چاهک با سمپلر ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌ها (جدول ۱)، به طور جداگانه ریخته شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از آن میزان مناطق مهاری مورد ارزیابی قرار گرفته و براساس میلیمتر محاسبه گردید. از چاهک‌های حاوی دهانشویه کلرهگزیدین (۰،۲ درصد) و آنتی بیوتیک سیپروفلوکسازین (۰،۳ درصد) به عنوان کنترل مثبت و مایع دی متیل سولفوکساید به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته می‌شود [۲۳].

روش دیسک دیفیوژن

آزمایش آنتی بیوگرام به اینصورت است که دیسک بلانک آغشته به عصاره با غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۸۰، ۶۰، ۵۰، ۴۰ و ۲۰) میلی گرم بر میلی لیتر از دو گیاه (جدول ۱) و دیسک‌های بلانک حاوی دهانشویه کلرهگزیدین (۰،۲ درصد) و آنتی بیوتیک سیپروفلوکسازین (۰،۳ درصد) به عنوان کنترل مثبت و دیسک حاوی دی متیل سولفوکساید به عنوان کنترل منفی به مدت ۱ ساعت در انکوباتور قرار داده شد تا خشک شود. سپس بر روی محیط کشت مناسب که قبلاً توسط تلقیح میکروبی آغشته شده، در فواصل مناسب قرار داده می‌شود. سپس پلیت

کنترل پلاک به صورت مکانیکی نبوده و نیاز به استفاده از مواد شیمیایی از جمله دهانشویه ها، ژل و خمیر دندان دارند [۶، ۷]. یک دهانشویه مطلوب علاوه بر طیف ضد میکروبی باید دارای مقاومت دارویی کمی بوده و در عین حال کمتر موجب از بین رفتن میکروفلور طبیعی دهان گردد [۸]. دهانشویه کلرهگزیدین از گروه آنتی سبتیک های بیس بی گوانید بوده و روی طیف وسیعی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها مؤثر می‌باشد و از تشکیل پلاک و التهاب لثه جلوگیری می‌نماید [۳، ۴]. مهم‌ترین عارضه کلرهگزیدین ایجاد تغییر رنگ دندان است. از سایر عوارض آن مزه تلخ، اختلال در حس ذائقه، دسکواماسیون مخاطی، فراهم کردن زمینه لازم برای تشکیل جرم فوق لثای و التهاب یک طرفه و دو طرفه پاروتید را می‌توان نام برد [۲، ۴]. در طی تولید بیوفیلیم عوارض گسترده‌ای در مسیر سلامت انسانها ایجاد می‌شود که درصد بالایی از بیماری‌های عفونی مزمن ناشی از توان بیوفیلیم زایی باکتری هاست. همچنین به دلیل شرایط اختصاصی حاکم در محیط بیوفیلیم، درمان و استفاده از آنتی بیوتیک ها علیه آن هم یکی از اصلی‌ترین چالشهای پیش رو علم پزشکی محسوب می‌گردد [۳]. گیاهان دارویی با تولید مواد مؤثره ثانویه، نقش‌های درمانی متفاوتی را از خود نشان می‌دهند که کمیت و کیفیت این ترکیبات تحت تأثیر شرایط جغرافیایی و خاستگاه گیاه می‌باشد [۱، ۲]. میخک گیاهی است با نام علمی *Eugenia caryophyllata*، یک گیاه بومی جزایر اسپایس (جزایر ادویه) در اندونزی، چین و هندی می‌باشد که جایگاه مهمی در طب سنتی دارد و همچنین به نام های *aromaticum Syzygium* و *clove* نیز شناخته می‌شود [۶، ۹]. این گیاه حاوی ماده اوژنول و B-caryophyllene می‌باشد که دارای خاصیت ضد باکتریایی و ضد التهابی است [۵-۷، ۱۰]. در گذشته میخک برای درد دندان، التهاب لثه و زخم‌های دهان استفاده می‌شد و اسانس میخک یکی از داروهای فوری برای دردهای عصبی، ضد استفراغ، ضد تشنج [۱۱]، کاهش استرس [۱۲]، ضد قارچ، آنتی اکسیدان [۸]، ضد عفونی کننده و قابض می‌باشد [۶] و روی طیف وسیعی از باکتری‌های پرودنشیوم و بیوفیلیم های دندان تأثیر گذار است. بعنوان مثال اثرگذاری آن بر روی باکتریهای استرپتوکوکوس موتانس، پره وتلا اینترمدیا و پورفیروموناس جینجیوالیس به اثبات رسیده است [۶]. رزماری، رومارن یا اکلیل کوهی با نام علمی *Rosmarinus officinalis* نیز گیاهی چند ساله و معطر می‌باشد که برگ‌هایی سوزنی شکل و همیشه سبز دارد [۱۳]. اثر محرک رزماری روی سیستم اعصاب مرکزی بسیار برجسته است. گردش خون موضع را افزایش داده و موجب گرمی و همچنین درمان عفونت ادراری [۱۴] و برطرف شدن درد و التهاب می‌شود [۱۵]. در تجارب آزمایشگاهی اثر ضد درد آن به اثبات رسیده و دارای خاصیت آنتی باکتریال است که بر روی طیف وسیعی از باکتری‌ها از جمله: استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس سالیریوس و انتروکوکوس فکالایس تأثیر گذار بوده [۱۳، ۱۶-۱۸] و از تشکیل بیوفیلیم نیز جلوگیری می‌نماید [۱۹]. این گیاه دارای ترکیبات فراوانی شامل: *verbenone*، *B. myrcene* و *B. caryophyllene*، *camphor* می‌باشند که بعضی از آن‌ها مهم‌تر بوده و خاصیت ضد باکتریایی و التهابی دارند [۱۸]. اثر ضد اکسید دو ترکیب اسانس رزماری بنام کارنوزول و آور سولیک اسید موجب برطرف کردن التهاب شده و اثر ضد التهاب و خاصیت التیام بخش اپی ژنین نشان داده شده است. با توجه به شیوع

محتویات داخل چاهک‌ها به آرامی با برگرداندن خالی شده و تمامی چاهک‌ها سه بار با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده تا تمامی باکتریهای پلانکتونیک حذف گردند. میکرو تیترا پلید در دمای اتاق خشک گردیده، در مرحله بعد با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر متانول به هر چاهک باکتریهای متصل به سطح داخلی دیواره چاهک‌ها، که همان جمعیت بیوفیلمی می‌باشند تثبیت شد. بعد از ۱۵ دقیقه محتویات چاهک‌ها را دور ریخته و پلیت در درجه حرارت اتاق خشک گردید. به منظور رنگ‌آمیزی به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه اضافه شد. سپس رنگ اضافی بطور کامل توسط جریان ملایم آب شسته شده و میکروپلیت در دمای اتاق خشک گردید. بعد از این مرحله برای سنجش میزان رنگ متصل شده به دیواره، که نمایانگر میزان بیوفیلیم می‌باشد، به هر چاهک ۲۰۰ میکرو لیتر اسید استیک ۳۳٪ اضافه شده، چندبار با سمپلر به خوبی همزده تا رنگ‌های متصل به چاهک که بیانگر میزان تشکیل بیوفیلیم می‌باشد به خوبی حل گردد. پس از یکنواخت شدن محلول هر چاهک میزان جذب در ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه الایز افرانت گردید [۱۵، ۲۳].

ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده می شوند. در ادامه اثر دیسک حاوی عصاره‌ها با دیسک حاوی دهانشویه و آنتی بیوتیک مقایسه می‌گردد [۱۹].

بررسی تأثیر عصاره های مختلف گیاه میخک و رزماری بر روی تشکیل بیو فیلم به منظور اندازه گیری میزان اثر ضد بیو فیلمی از روش میکروتیترا پلید و رنگ سنجی با کریستال ویوله استفاده گردید. روش اندازه گیری میزان تأثیر ضد بیوفیلیمی عصاره‌های مختلف به اینصورت است که ابتدا ۱۵۰ میکرو لیتر از محیط کشت بر اثر اختصاصی داخل چاهک‌های میکروتیترا پلید ۹۶ خانه ریخته، چاهک اول محیط کشت بدون عصاره به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته می‌شود. در چاهک های بعدی ۱۰۰ میکرو لیتر از نسبت‌های مختلف عصاره به محیط کشت اضافه گردید. یک چاهک هم به عنوان شاهد منفی بدون عصاره و باکتری در نظر گرفته شد. در مرحله بعد، از کشت ۲۴ ساعته میکروارگانیسیم‌ها، نیم مک فارلند تهیه شد و ۲۰ میکرو لیتر از این سوسپانسیون میکروبی به همه چاهک‌ها به جز چاهکی که به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شده بود اضافه گردید. میکروپلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری شد. سپس

جدول ۱. غلظت‌های دو عصاره متانولی گیاه رزماری و میخک برای تعیین اثرات سینرژیستی

عصاره متانولی میخک mg/ml	۱۰۰	۸۰	۶۰	۵۰	۴۰	۳۰	۲۰	۰
عصاره متانولی رزماری mg/ml	۰	۲۰	۴۰	۵۰	۶۰	۸۰	۱۰۰	۱۰۰

ضدباکتریایی ترکیب غلظت‌های مختلف دو گیاه رزماری و میخک از دهانشویه بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس بهتر بوده است. نتایج حاصله در تصویر (۲) نیز تفاوت آماری معنی داری را بین غلظت‌های مختلف رزماری و میخک با دهانشویه و آنتی بیوتیک بر قطر هاله عدم رشد استرپتوکوکوس سانگوینیس در روش دیسک دیفیوژن نشان می‌دهد ($P < 0.05$). در این روش نیز آنتی بیوتیک و دهانشویه به ترتیب با ۴۲ و ۲۲ میلیمتر قطر هاله عدم رشد بالاترین میزان اثر ضد باکتریایی را از خود نشان دادند و در مورد غلظت‌های مختلف دو گیاه رزماری و میخک نیز همان گونه که در تصویر مشاهده می‌شود غلظت ۱۰۰ mg/ml میخک با قطر هاله ۲۱٫۶ میلیمتر بر روی این باکتری نیز از بقیه غلظت‌ها موثرتر بوده و با کم شدن میزان غلظت این گیاه، اثر مهاری بر روی باکتری مورد آزمایش نیز کاهش یافته است. در این تست نیز اثر مهاری دهانشویه تقریباً مشابه با غلظت ۱۰۰ mg/ml میخک بر روی باکتری استرپتوکوکوس سانگوینیس می‌باشد. باتوجه به نتایج تصویر (۳)، تفاوت آماری توسط آزمون کروسکال والیس نشان داد که تفاوت معنی داری بین دهانشویه، آنتی بیوتیک و غلظت‌های مختلف رزماری و میخک بر قطر هاله عدم رشد استرپتوکوکوس موتانس در روش چاهک‌پلید وجود دارد ($P < 0.05$). در این روش آنتی بیوتیک با هاله عدم رشد ۳۷ میلیمتر بالاترین میزان اثر مهاری را از خود نشان داده و دو غلظت ۸۰ mg/ml و ۱۰۰ گیاه میخک نیز همان گونه که در تصویر مشاهده می‌شود با هاله ۲۳ و ۲۱ میلیمتر اثر ضدباکتریایی بیشتری از دهانشویه (۲۰ میلیمتر) از خود نشان داده‌اند.

سنجش میزان تشکیل بیو فیلم

وضعیت تشکیل بیوفیلیم در چاهک‌ها نیز طبق فرمول زیر محاسبه گردید که ODC میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل مثبت و در آن (OD ODT) میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار می‌باشد.

عدم تشکیل بیو فیلم $OD \leq ODC$

قدرت تشکیل بیوفیلیم ضعیف $ODC < OD \leq (2 \times ODC)$

قدرت تشکیل بیوفیلیم متوسط $(4 \times ODC) > OD \geq (2 \times ODC)$

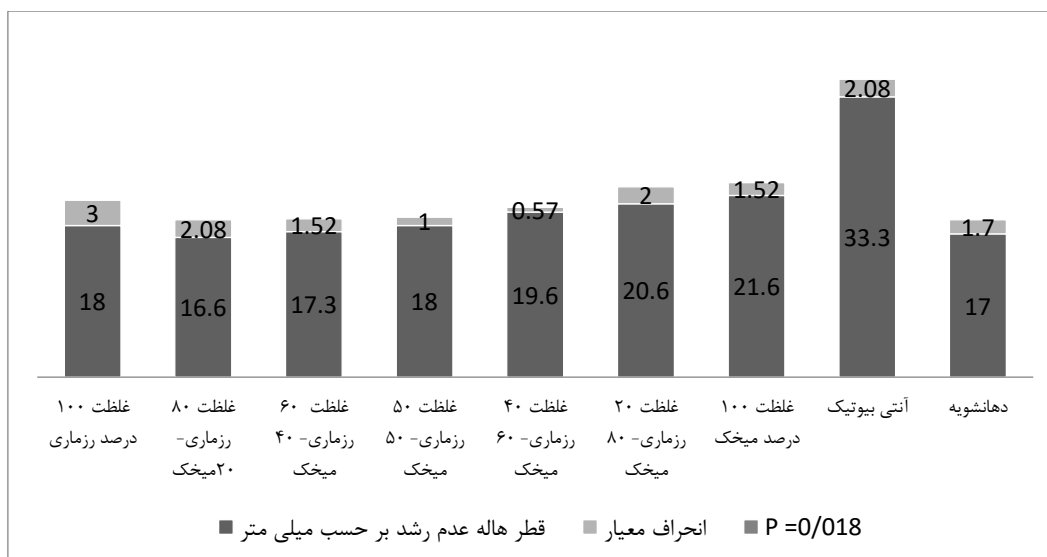
قدرت تشکیل بیوفیلیم قوی $OD < (4 \times ODC)$

آنالیز آماری

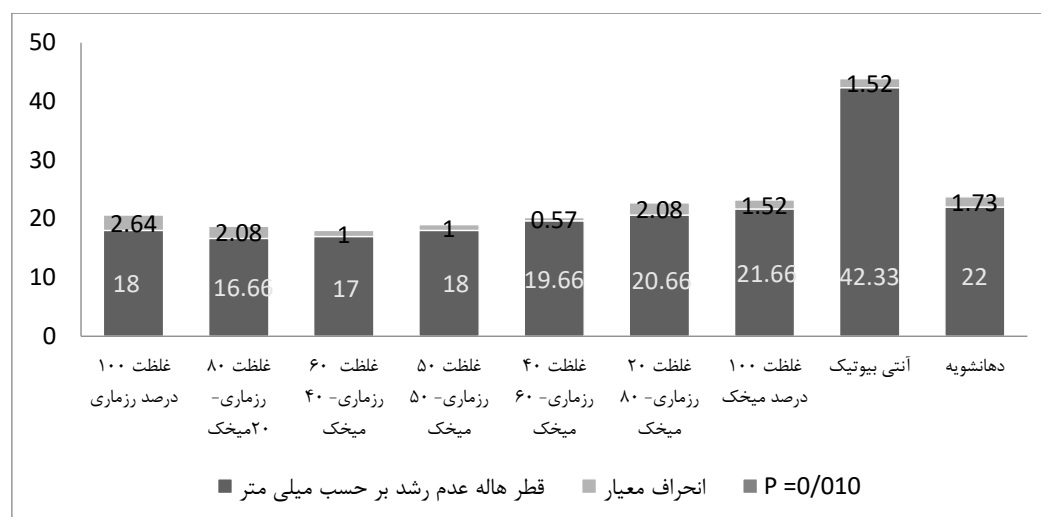
نتایج به صورت سه بار تکرار ثبت گردید و برای تحلیل نتایج از نرم افزار SPSS و آزمون کروسکال والیس استفاده شد.

نتایج

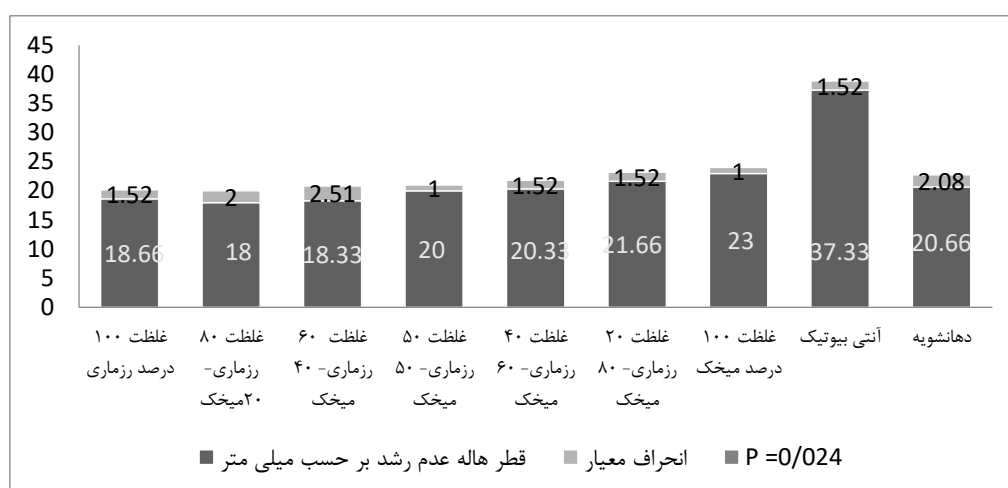
باتوجه به نتایج به دست آمده در تصویر (۱)، بررسی آماری توسط آزمون کروسکال والیس نشان داد که تفاوت معنی داری بین غلظت‌های مختلف رزماری و میخک با دهانشویه و آنتی بیوتیک بر قطر هاله عدم رشد استرپتوکوکوس موتانس در روش دیسک دیفیوژن وجود دارد ($P < 0.05$). در این روش آنتی بیوتیک بالاترین میزان اثر مهاری را بر روی باکتری مورد آزمایش استرپتوکوکوس موتانس از خود نشان داده و در مورد غلظت‌های مختلف دو گیاه رزماری و میخک نیز همان گونه که در تصویر مشاهده می‌شود غلظت ۱۰۰ mg/ml میخک از بقیه موثرتر بوده و با کم شدن میزان غلظت این گیاه، اثر مهاری بر روی باکتری مورد آزمایش نیز کاهش یافته است. به طور کلی اثر



تصویر ۱. توزیع اثر غلظت‌های مختلف رزماری و میخک و گروه‌های کنترل بر قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس با روش دیسک دیفیوژن



تصویر ۲. توزیع اثر غلظت‌های مختلف رزماری و میخک و گروه‌های کنترل بر قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس سانگوئینیس با روش دیسک دیفیوژن



تصویر ۳. توزیع اثر غلظت‌های مختلف رزماری و میخک و گروه‌های کنترل (مثبت و منفی) بر قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس به روش چاهک

و آنتی بیوتیک بر روی باکتری استرپتوکوکوس سانگوئینیس در روش چاهک پلیت نشان می‌دهد ($P < 0/05$). در این روش آنتی بیوتیک و

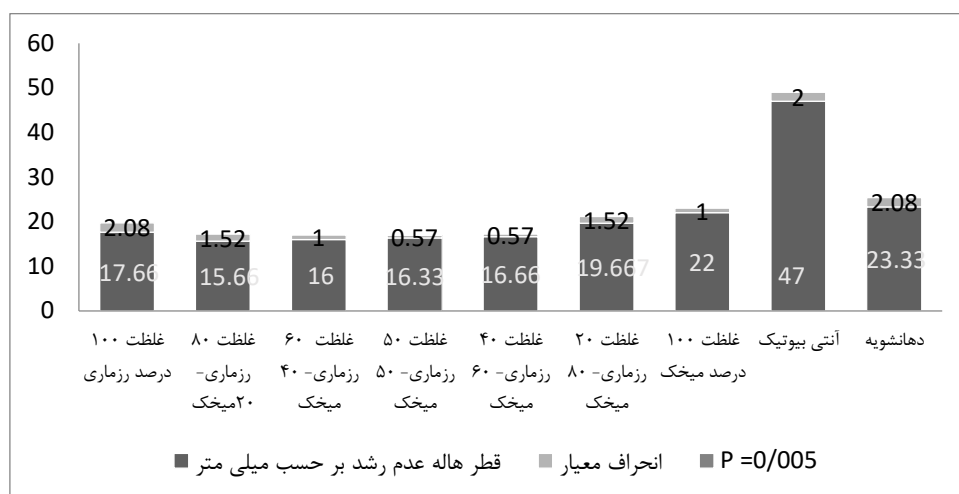
تفاوت آماری معنی داری را بین اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف گیاهان مورد مطالعه (رزماری و میخک) با دهانشویه

مانع تشکیل بیوفیلم باکتریایی شده و سایر غلظت‌ها اثر مهاری کمتری بر روی رشد باکتری‌ها داشته و بیوفیلم ضعیفی توسط باکتری‌ها درون چاهک‌ها ایجاد گردید.

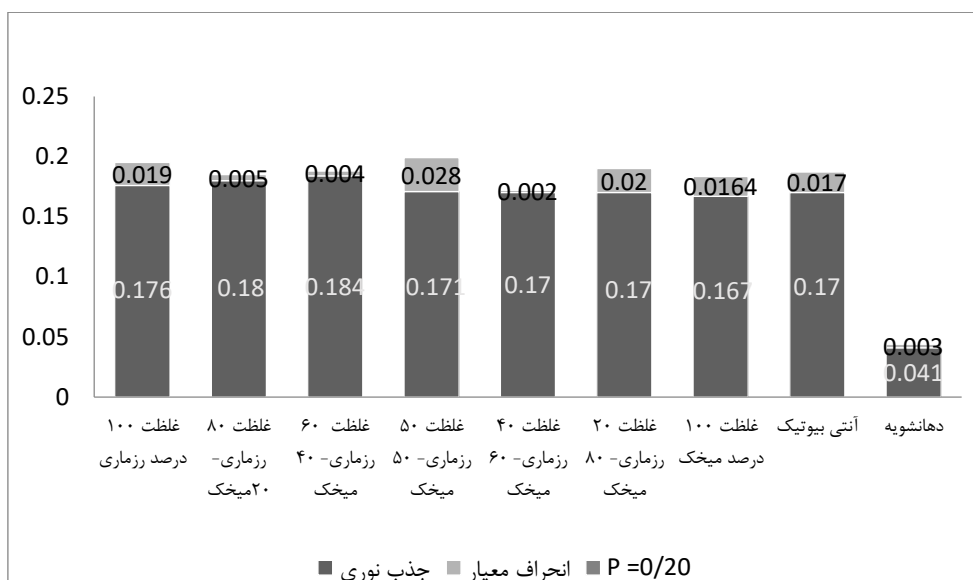
در این تصویر (۶) نیز تفاوت معنی داری بین تمامی غلظت‌های رزماری و میخک با دهانشویه و آنتی بیوتیک بر جذب نوری استرپتوکوکوس سانگوینیس با روش بیوفیلم مشاهده نشد ($P > 0/05$) و مقایسه تصویرها با کنترل مثبت نشان می‌دهد که تمامی غلظت‌های مورد آزمایش میخک و رزماری اثر مهاری کمی بر روی رشد باکتری‌ها داشته و بیوفیلم ضعیفی توسط باکتری‌ها درون چاهک‌ها ایجاد گردیده است. در بین تمامی غلظت‌ها نیز غلظت ۱۰۰ mg/ml میخک از سایرین جذب کمتر و قدرت مهار بیوفیلم بیشتری از خود نشان داد و کمترین میزان مهار بیوفیلم مربوط به غلظت ۸۰ mg/ml رزماری بود.

دهانشویه به ترتیب با ۴۷ و ۲۳ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد بالاترین میزان اثر ضد باکتریایی را از خود نشان دادند و در مورد غلظت‌های مختلف دو گیاه رزماری و میخک نیز همان گونه که در تصویر مشاهده می‌شود غلظت ۱۰۰ mg/ml میخک بر روی استرپتوکوکوس سانگوینیس اثر مهاری کمتری (۲۲ میلی‌متر) از دهانشویه داشته و با کم شدن میزان غلظت این گیاه، اثر ضد باکتریایی آن نیز کاهش یافته است. در تصویرها مشاهده می‌گردد که غلظت ۱۰۰ mg/ml رزماری نیز از برخی از غلظت‌ها اثر مهاری بیشتری داشته است.

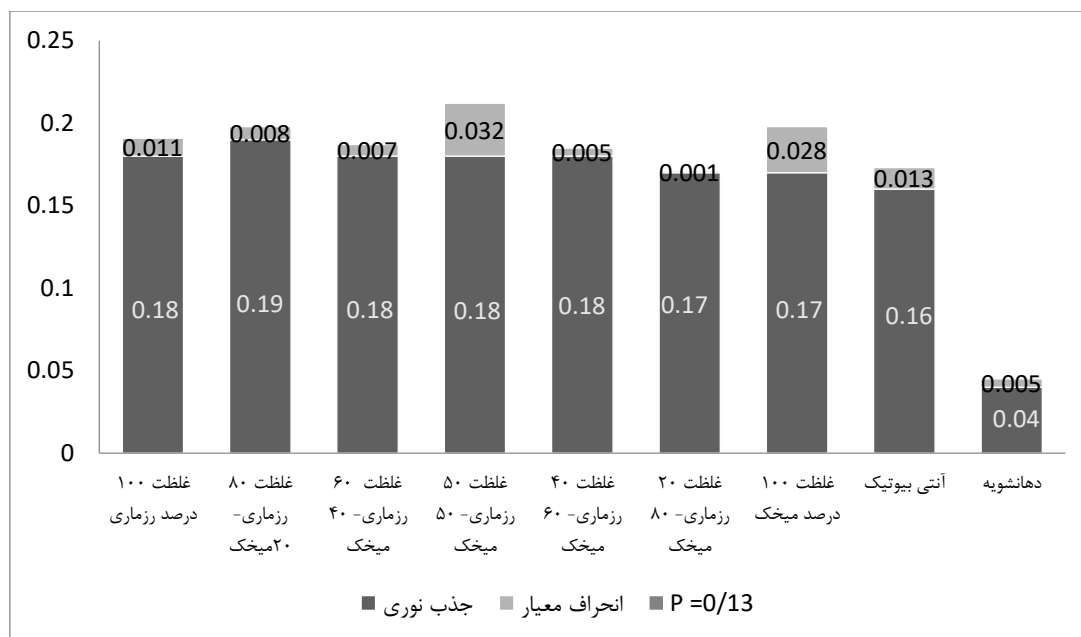
آنالیز آماری نتایج تصویر (۵) نشان داد تفاوت معنی داری بین تمامی غلظت‌های رزماری و میخک با دهانشویه و آنتی بیوتیک بر جذب نوری استرپتوکوکوس موتانس با روش بیوفیلم وجود نداشته ($P > 0/05$) و مقایسه تصویرها با کنترل مثبت نشان می‌دهد که فقط دو غلظت ۸۰ و ۱۰۰ mg/ml میخک بعد از محاسبه در فرمول جذبی ذکر شده



تصویر ۴. توزیع اثر غلظت‌های مختلف رزماری و میخک و گروه‌های کنترل (مثبت و منفی) بر قطر هاله عدم رشد استرپتوکوکوس سانگوینیس به روش چاهک پلیت



تصویر ۵. توزیع اثر غلظت‌های مختلف رزماری و میخک و گروه‌های کنترل بر جذب نوری استرپتوکوکوس موتانس با روش بیوفیلم



تصویر ۶. توزیع اثر غلظت‌های مختلف رزماری و میخک و گروه‌های کنترل بر جذب نوری استرپتوکوکوس سانگوتینیس با روش بیوفیلم

بحث

نتایج مطالعه ما بر روی عصاره متانولی گیاه میخک و رزماری مشخص کرد که عصاره خالص گیاه دارویی میخک به تنهایی اثر ضدباکتریایی قویتری نسبت به گیاه رزماری داشته که این مطلب تاییدی بر کاربرد سنتی این گیاه در درمان دندان درد می‌باشد. مقایسه نتایج ما نشان داد که هر چه غلظت عصاره میخک بیشتر باشد اثر ضدباکتریایی این گیاه بر روی دو باکتری استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوتینیس بیشتر و تقریباً مشابه دهانشویه تجاری کلروهگزیدین عمل می‌نماید. نتایج سنجش میزان تشکیل بیوفیلم نیز نشان داد که فقط غلظت‌های بالا (۱۰۰ و ۸۰ mg/ml) میخک قادر به مهار تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس بوده و هیچکدام از عصاره‌ها قادر به مهار تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس سانگوتینیس نشدند.

زاینول و همکاران در سال ۲۰۱۷ در تحقیقی اثر سینرژیستی اسانس‌های دو گیاه میخک و دارچین را بر روی ۴ باکتری مقاوم شناخته شده حفره دهان (*E. faecalis*, *S. salivarius*, *A. actinomycetemcomitans*, *S. mutans*) انجام دادند. نتایج آنها نشان داد که اسانس‌های میخک و دارچین به تنهایی و در ترکیب با هم دارای خاصیت ضد میکروبی در مقابل هر چهار باکتری می‌باشند و زمانیکه این دو اسانس در ترکیب باهم استفاده شود، مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی برای هر چهار باکتری کاهش می‌یابد. آنها در این مطالعه به این نتیجه رسیدند که ترکیب اسانس‌های میخک و دارچین فعالیت ضد میکروبی بالایی دارد و می‌تواند جایگزین آنتی بیوتیک‌های رایج مانند آموکسی سیلین گردد [۲۱]. ولی در مطالعه ما عصاره خالص میخک اثر ضدباکتریایی بهتری از ترکیب دو عصاره رزماری با میخک (نسبت‌های مختلف) و عصاره خالص رزماری از خود نشان داد و هر چه غلظت میخک در ترکیب دو عصاره بالاتر بود اثر ضد باکتریایی مثبت‌تری به چشم می‌خورد که حاکی از اثر ضدباکتریایی قوی‌تر گیاه میخک نسبت به رزماری است.

عبدالله حامد و همکاران در سال ۲۰۱۵، فعالیت آنتی باکتریال اسانس دو گیاه رزماری و میخک را به صورت جداگانه با روش چاهک پلیت در مقابل چهار گونه مقاوم به دارو اکتینوباکتر بومانی، سودوموناس آئروژینوز، استافیلوکوکوس اورئوس و آنتروکوکوس فکالیز ارزیابی کردند. اسانس هر دو گیاه اثر مهارکنندگی در مقابل تمام ارگانیسم‌های تست شده دارا بودند و اسانس میخک فعالیت ضد میکروبی اندکی بیشتر از رزماری داشت. آن‌ها پیشنهاد کردند که اسانس میخک و رزماری می‌تواند بعنوان عوامل ضد میکروبی طبیعی برای درمان عفونت‌های ایجاد شده با باکتریهای مقاوم به دارو بکار رود [۲۲]. نتایج بدست آمده از تحقیق ما نیز با روش‌هایی مشابه (چاهک) و سایر تست‌ها (دیسک و بیوفیلم) نیز برتری اثر ضد باکتریایی عصاره گیاه میخک نسبت به رزماری و ترکیب این دو گیاه را بر روی باکتری‌های پاتوژن دهانی را نشان می‌دهد.

مون و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه‌ای از اسانس میخک و اجزای اصلی آن یعنی اوژنول و بتا کاروفیلین بر روی ۱۱ گونه باکتری: *S. S. anginosus*, *S. criceti*, *S. sobrinus*, *S. sanguinis*, *mutans*, *P. F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, *gordonii*, *S. rattib*, *P. gingivalis*, *intermedia* 25611 به تنهایی و در ترکیب با آنتی بیوتیک آمپی سیلین و جنتامایسین استفاده کردند و با روش MIC و MBC اندازه گیری انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که روغن میخک دارای خاصیت آنتی باکتریال است و از خاصیت آنتی باکتریال بتا کاروفیلین به تنهایی بیشتر می‌باشد ولی مشابه اوژنول است. در نتیجه ترکیب میخک یا اوژنول با آنتی بیوتیک‌ها حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی کاهش می‌یابد. نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که روغن میخک و اوژنول می‌تواند بعنوان عامل ضد باکتری طبیعی در مقابل باکتری‌های مؤثر در پوسیدگی و بیماری پریودنتال معرفی شود [۵]. تحقیق ما نیز نشان دهنده اثر ضدباکتریایی قوی‌تر عصاره متانولی گیاه میخک در برابر دو سویه مورد مطالعه مشترک با این تحقیق می‌باشد (*S. sanguinis*, *S. mutans*).

آن دو هم نتیجه سینرژیستی، هم‌افزایی و آنتاگونیستی در پی داشته است و در غلظت‌های مختلف نتایج متفاوتی بر روی پاتوژن‌ها داشت [۲۰]. ما در تحقیق خود با توجه هزینه بر بودن تهیه باکتری‌های پاتوژن دهانی فقط دو پاتوژن شاخص بیماریزا را مورد مطالعه قرار دادیم.

نتیجه گیری

آنالیز نتایج در روش دیسک و چاهک نشان داد که غلظت mg/ml ۱۰۰ میخک قوی‌ترین اثر ضدباکتریایی را در بین غلظت‌های مختلف از خود نشان داده و باکتری استرپتوکوکوس موتانس حساس‌تر از استرپتوکوکوس سانگوئیس مشاهده شد. نتایج سنجش میزان تشکیل بیوفیلم نیز نشان داد که فقط غلظت ۱۰۰ mg/ml و ۸۰ میخک قادر به مهار تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس بوده و هیچکدام از عصاره‌ها قادر به مهار تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس سانگوئیس نشدند.

همچنین غلظت ۱۰۰ mg/ml گیاه میخک اثر ضدباکتریایی مشابه و یا بیشتری در مقایسه با دهانشویه کلروهگزیدین تجاری داشته است.

محدودیت، مشکلات و پیشنهاد

عدم دسترسی به سایر باکتری‌های پاتوژن دهانی و هزینه بر بودن تهیه آنها و عدم دسترسی به انکوباتور CO₂ کار در زمینه سویه‌های بی‌هوازی پاتوژن دهانی را با مشکل مواجه کرده بود. لذا کار بر روی سایر پاتوژن‌های دهانی و عصاره‌گیری با سایر حلال‌های قطبی و غیر قطبی در مطالعات آینده پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی بخاطر تصویب این طرح با کد پژوهشی ۹۸/پ/۱۲۶۵/کد اخلاق IR.NKUMS.REC.1398.064 و تأمین منابع مالی توسط این معاونت و همچنین از مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی که ما را در اجرای این طرح یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

- Borhan-mojabi K, Azimi S. Antimicrobial Natural Products in Oral Health. Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them. Sci Technol Educat. 2013;932-9.
- Salam R, Sarker BK, Haq MR, Khokon JU. Antimicrobial activity of medicinal plant for oral health and hygiene. Int J Natural Soc Sci. 2015;1:1-2.
- Kouidhi B, Al Qurashi YM, Chaieb K. Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment. Microb Pathog. 2015;80:39-49. doi: 10.1016/j.micpath.2015.02.007 pmid: 25708507
- Salman BN, Vahabi S, Rad MM. Use of herbs and medicinal plants in dentistry: a review. J Dental School. 2017;35(2).
- Moon SE, Kim HY, Cha JD. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. Arch Oral Biol. 2011;56(9):907-16. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.02.005 pmid: 21397894
- Saeed S, Tariq P. In vitro antibacterial activity of clove against Gram negative bacteria. Pak J Bot. 2008;40(5):2157-60.
- Nunez L, Aquino MD. Microbicide activity of clove essential oil (Eugenia caryophyllata). Braz J Microbiol. 2012;43(4):1255-60. doi: 10.1590/S1517-83822012000400003 pmid: 24031950
- Chaieb K, Zmantar T, Ksouri R, Hajlaoui H, Mahdouani K, Abdelly C, et al. Antioxidant properties of the essential oil of

برناردز و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر اسانس رزماری و ترکیب‌های آن [carnosol, carnosic acid] را بر روی ۶ باکتری دهانی *S.mutans, S.mitis, S.sanguinis, S.slivarius, S.sobrinus, E.faecal* is به روش MIC اندازه‌گیری کردند. در این مطالعه به این نتیجه رسیدند که اجزای اصلی خالص، فعال‌تر از اسانس می‌باشد و در میان تمام باکتری‌های تست شده *S.mitis* حساس‌ترین و *E. faecalis* مقاوم‌ترین باکتری‌ها بودند [۱۸]. این تحقیق بر روی اسانس گیاه رزماری انجام شده بود ولی ما اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی رزماری را بررسی نمودیم که نتایج نشان از اثر ضد باکتریایی هر دو ترکیب اسانس و عصاره گیاه رزماری می‌باشد.

رسولی و همکاران در سال ۲۰۰۸ مطالعه‌ای بر روی اسانس رزماری و آویشن و دهانشویه کلروهگزیدین بر روی دو باکتری *S. mutans, S. pyogenes* جهت جلوگیری از رشد بیوفیلم به صورت *in vivo* و *in vitro* انجام دادند و به این نتایج رسیدند که اسانس این گیاهان دارای خاصیت آنتی باکتریال بوده و مشاهده کردند گروهی که از خمیر دندان‌های حاوی اسانس گیاهی استفاده کردند کمترین تشکیل پلاک را داشته‌اند. MBC رزماری و آویشن به ترتیب ۴۰۰۰ و ۲۰۰۰ ppm و کلروهگزیدین ۱۰۰۰ ppm ثبت شد. در آزمایشات به این نتیجه رسیدند که رزماری تأثیر بیشتری داشته و در مطالعه *in vivo* تأثیر رزماری از دهانشویه کلروهگزیدین (۰.۲٪) بیشتر می‌باشد [۱۹]. بررسی ما هم نشان دهنده این است که اثر ضد باکتریایی رزماری تا حدودی مشابه دهانشویه کلروهگزیدین است.

فو و همکاران در سال ۲۰۰۷ دو گیاه رزماری و میخک و اجزای آنها را به روش GC/GM آنالیز کردند. آن‌ها اسانس‌ها را بر روی سه باکتری گرم مثبت و سه باکتری گرم منفی و دو گونه از قارچ‌ها (استافیلوکوکوس اپیدرمیس، اشرشیاکلی، کاندیدا آلبیکنس) تست کردند و به روش MIC نتایج را بررسی کردند. مشاهده گردید که هر دو اسانس رزماری و میخک بر روی تمام موارد فوق اثر گذار می‌باشند و مشاهده کردند MIC میخک (۰.۰۶۲٪ تا ۰.۵۰۰٪) کمتر از رزماری (۰.۱۲۵٪ تا ۱.۰۰٪) بود، یعنی تأثیر آن بیشتر است و همچنین ترکیب

- Eugenia caryophyllata and its antifungal activity against a large number of clinical Candida species. Mycoses. 2007;50(5):403-6. doi: 10.1111/j.1439-0507.2007.01391.x pmid: 17714361
- Bhuiyan MN, Begum J, Akter F. Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (Syzgiumcaryophyllatum (L.) Alston). Africa J Plant Sci. 2010;4(11):451-4.
- Nonsee K, Supitchaya C, Thawien W. Antimicrobial activity and the properties of edible hydroxypropyl methylcellulose based films incorporated with encapsulated clove (Eugenia caryophyllataThunb.) oil. Int Food Res J. 2011;18(4):1531.
- Hosseini M, Jafarianheris T, Seddighi N, Parvaneh M, Ghorbani A, Sadeghnia HR, et al. Effects of different extracts of Eugenia caryophyllata on pentylenetetrazole-induced seizures in mice. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. 2012;10(12):1476-81. doi: 10.3736/jcim20121222 pmid: 23257144
- Halder S, Mehta AK, Kar R, Mustafa M, Mediratta PK, Sharma KK. Clove oil reverses learning and memory deficits in scopolamine-treated mice. Planta Med. 2011;77(8):830-4. doi: 10.1055/s-0030-1250605 pmid: 21157682
- de Faria LR, Lima CS, Perazzo FF, Carvalho JC. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the essential oil from Rosmarinus officinalis L.(Lamiaceae). Int J Pharm Sci Rev Res. 2011;7(2).

14. Petrolini FV, Lucarini R, de Souza MG, Pires RH, Cunha WR, Martins CH. Evaluation of the antibacterial potential of *Petroselinum crispum* and *Rosmarinus officinalis* against bacteria that cause urinary tract infections. *Braz J Microbiol.* 2013;44(3):829-34. doi: 10.1590/S1517-83822013005000061 pmid: 24516424
15. de Oliveira JR, de Jesus D, Figueira LW, de Oliveira FE, Pacheco Soares C, Camargo SE, et al. Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2017;242(6):625-34. doi: 10.1177/1535370216688571 pmid: 28093936
16. Tsai PJ, Tsai TH, Ho SC. In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food Chemist.* 2007;105(1):311-6. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.11.051
17. Bernardes WA, Lucarini R, Tozatti MG, Souza MG, Silva ML, Filho AA, et al. Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol. *Chem Biodivers.* 2010;7(7):1835-40. doi: 10.1002/cbdv.200900301 pmid: 20658673
18. Bernardes WA, Lucarini R, Tozatti MG, Flauzino LG, Souza MG, Turatti IC, et al. Antibacterial activity of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* and its major components against oral pathogens. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2010;65(9-10):588-93. doi: 10.1515/znc-2010-9-1009 pmid: 21138060
19. Rasooli I, Shayegh S, Taghizadeh M, Aastaneh SA. *Rosmarinus officinalis* and *Thymus eriocalyx* essential oils combat in vitro and in vivo dental biofilm formation. *Pharmacognosy Magazine.* 2008;4(14):65.
20. Fu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Wang Z, Sun S, et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytother Res.* 2007;21(10):989-94. doi: 10.1002/ptr.2179 pmid: 17562569
21. Zainol SN, Said SM, Abidin ZZ, Azizan N, Majid FA, Jantan I. Synergistic benefit of *Eugenia caryophyllata* L. And *cinnamomumzeylanicumblume* essential oils against oral pathogenic bacteria. *Chemical Engineer Transaction.* 2017;56:1429-34.
22. Abdullah BH, Hatem SF, Jumaa W. A comparative study of the antibacterial activity of clove and rosemary essential oils on multidrug resistant bacteria. *UK J Pharmaceutical Biosci.* 2015;3(1):18-22. doi: 10.20510/ukjpb/3/i1/89220
23. Jafari S, Mobasher M, Najafipour S, Ghasemi Y, Mobasher N, Naghizadeh M, et al. Evaluation of inhibitory effects of *Chlorella vulgaris* extract on growth, proliferation and biofilm formation by *Streptococcus mutans* and evaluation of its toxicity. *J Fasa Univ Med Sci.* 2015;5(3):387-96.