Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
No 50, Volume 13, Issue 2

Research Article

Evaluation of Antimicrobial Effects of Different *Ziziphus jujuba* Extracts on Oral Pathogens

Peiman AleSheikh [1], Fatemeh Shahinfar [2,*], Sahere Soltani [3], Parastoo Zarghami Moghaddam [4]

[1] Ph.D. of Chinese Medicine, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[2] Dentist, Faculty of Dentistry, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Prosthesis, Faculty of Dentistry, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[4] Ph.D. of Microbiology, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
*** Corresponding author:** Fatemeh Shahinfar, Dental Student, Faculty of Dentistry, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran. E-mail: fatemehshahinfarr@gmail.com

DOI: 10.52547/nkums.13.2.24

How to Cite this Article:
AleSheikh P, Shahinfar F, Soltani S, Zarghami Moghaddam P. Evaluation of Antimicrobial Effects of Different Ziziphus jujuba Extracts on Oral Pathogens. *J North Khorasan Univ Med Sci*. 2021;**13**(2):24-30. DOI: 10.29252/nkjms-13024

Received: 03 Mar 2021
Accepted: 05 Apr 2021
Keywords:
Ziziphus jujube, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, Oral Pathogens, Antimicrobial Effect

Abstract

Introduction: The interest in ziziphus jujube is growing in the world because it is an excellent source of nutrients and chemicals and has traditionally been used as an anticoagulant, sedative, anticancer, antifungal, anti-diabetic, anti-bacterial, antispasmodic, and Antioxidants are used. Therefore, the purpose of this study is to select the best extract with the highest antimicrobial effect for extracting the ziziphus jujube, to produce medicinal products of plant origin with maximum effectiveness and minimal side effects.

Methods: Ethanolic, methanolic, aqueous and dichloromethane extracts of ziziphus jujube were prepared by maceration method, and in order to evaluate the antimicrobial effect of the extracts, we used Agar Disk Test and Agar well Test method. In order to obtain the minimum inhibitory concentration and the minimum lethal concentration, 96 well microplates were used to obtain effective concentrations for the removal and inhibition of the desired microorganisms in different extracts.

Results: Analysis of Agar Disk Test and Agar well Test methods data showed that the tested extracts had no significant effect on the tested bacteria / fungi and no growth inhibition zone was observed around the disk and wells. The results of (MIC / MBC / MFC) indicated that (100 mg / mL) concentration of all aqueous, ethanolic, methanolic and dichloromethane extracts had no effects on the Streptococcus mutans and Candida albicans and we need higher concentrations.

Conclusions: Aqueous, ethanolic, methanolic and dichloromethane extracts of jujube fruit did not show significant antibacterial and antifungal effects compared to positive control (chlorhexidine and nystatin, amoxicillin).

Copyright © *2021 The Author(s); Published by Journal of North Khorasan Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۱۳، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های مختلف میوه دارویی عناب (*Ziziphus jujube*) بر پاتوژن های دهانی

پیمان آل شیخ [۱]، فاطمه شاهین فر [۲،*]، ساهره سلطانی [۳]، پرستو ضرغامی مقدم [۴]

[۱] دکتری تخصصی طب چینی، مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۲] دندانپزشک، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۳] استادیار، گروه پروتز، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۴] دکتری تخصصی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** فاطمه شاهین فر، دانشجوی دکترای عمومی دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران. ایمیل: fatemehshahinfarr@gmail.com

DOI: 10.52547/nkums.13.2.24

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۱۶
واژگان کلیدی: Ziziphus jujube, Streptococcus mutans, Candida albicans، پاتوژن های دهانی، اثر ضد میکروبی

چکیده

مقدمه: علاقه به عناب در سراسر جهان رو به افزایش است، زیرا منبع بسیار خوبی از مواد مغذی و مواد شیمیایی است و به طور سنتی به عنوان ضد انعقادی، آرام بخش، ضد سرطان، ضد قارچ، ضد دیابت، ضد باکتری، ضد اسپاسم، و آنتی اکسیدان مورد استفاده قرار می‌گیرد. لذا هدف از این تحقیق انتخاب بهترین عصاره با بالاترین اثر ضد میکروبی میوه گیاه دارویی عناب (Ziziphus jujube)، جهت تولید محصولات دارویی با منشاء گیاهی با حداکثر اثربخشی و کمترین عوارض جانبی می‌باشد.

روش کار: عصاره‌های اتانولی، متانولی، آبی و دی کلرومتانی میوه عناب به روش خیساندن تهیه شد و به منظور بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌ها از روش انتشار از دیسک و چاهک پلیت استفاده نمودیم. جهت بدست آوردن حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی از میکرو پلیت ۹۶ خانه استفاده شد تا غلظت‌های مؤثر برای حذف و مهار باکتری استرپتوکوکوس موتانس و قارچ کاندیدا آلبیکنس در عصاره‌های مختلف بدست آید.

یافته‌ها: آنالیز داده‌های روش‌های دیسک دیفیوژن و چاهک پلیت نشان داد که عصاره‌های مورد آزمایش تأثیر قابل توجهی بر روی باکتری/ قارچ‌های مورد آزمایش نداشته و هیچ هاله عدم رشدی اطراف دیسک و چاهک‌ها مشاهده نشد. نتایج MIC و MBC/ MFC بیانگر این بود که، غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر همه عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و دی کلرومتانی بر روی استرپتوکوکوس موتانس و کاندیدا آلبیکنس بی تأثیر بوده و نیاز به غلظت بالاتر می‌باشد.

نتیجه گیری: عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و دی کلرو متانی میوه عناب، در مقایسه با کنترل مثبت (کلرهگزیدین، نیستاتین و آموکسی سیلین)، اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی قابل ملاحظه‌ای از خود نشان ندادند.

مقدمه

بیماری‌های دهان و دندان در حال تبدیل شدن به یک مشکل سلامت گسترده در سراسر جهان، به ویژه در کشورهای در حال توسعه‌اند، که به معنای افزایش هزینه‌ها برای درمان آن‌ها می‌باشد. پوسیدگی دندانی و بیماری‌های پریودنتال از شایعترین این مشکلات هستند (۱). پوسیدگی دندانی یک بیماری مزمن می‌باشد که به واسطه تخریب بافت سخت دندان در اسید تولید شده توسط باکتری‌های پوسیدگی زا ایجاد می‌شود. در واقع تشکیل پوسیدگی دندان نتیجه یک تعامل پیچیده در طول زمان، بین دندان، بیوفیلم میکروبی و کربوهیدرات‌های قابل تخمیر می‌باشد (۲). باکتری *استرپتوکوکوس موتانس*، به عنوان عامل اتیولوژیک اصلی پوسیدگی در مینای دندان شناخته می‌شود (۳). این باکتری یک کوکسی گرم مثبت، غیر متحرک و بی هوازی اختیاری است که باکتری معمول در تشکیل بیوفیلم پلاک در نظر گرفته می‌شود (۴, ۵). ویژگی‌هایی همچون اتصال به سطوح و رشد در محیط اسیدی موجب خاصیت پوسیدگی زایی آن می‌گردد (۶, ۷). در ایران از دست دادن دندان و بی دندانی کامل شیوع بالایی دارد و با افزایش سن افزایش می‌یابد (۸). یکی از روش‌های درمانی برای جایگزینی دندان‌ها و ساختمان‌های مرتبط با آن‌ها پروتزهای دندانی کامل می‌باشند (۹). اگرچه بیشتر عفونت‌های ناشی از کاندیدا در بیمارانی رخ می‌دهد که به نوعی دچار نقص ایمنی یا ضعف هستند (۱۰)، اما پروتزهای دندانی کامل نیز می‌تواند یکی از عوامل مستعد کننده‌ی کاندیدیازیس دهانی باشد. کاندیدیازیس دهانی یک عفونت فرصت طلب شایع در حفره دهان است که در اثر رشد بیش از حد گونه‌های کاندیدا ایجاد می‌شود و

Copyright © 2021 The Author(s); Published by Journal of North Khorasan Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

شایعترین آن *کاندیدا آلبیکنس* است (۱۱). در صورت عدم درمان، کاندیدیازیس دهانی می‌تواند باعث ایجاد مشکل در جویدن و بلع و در برخی مواقع اسهال شدید شود، بنابراین کسانی که از کاندیدیازیس دهانی رنج می‌برند اغلب به دلیل گلودرد شدید و مشکل در غذا خوردن مقدار زیادی از وزن بدنشان را از دست می‌دهند (۱۲). نیستاتین و آمفوتریسین B از جمله داروهای توصیه شده برای استفاده در برابر این بیماری هستند (۱۳) اگر چه نیستاتین در درمان کاندیدیازیس دهانی به عنوان داروی انتخابی در نظر گرفته می‌شود، اما می‌تواند سبب برخی مشکلات از جمله آسیب کلیوی، تهوع، استفراغ و اسهال شود (۱۴). کاهش میکروب‌های بیماری زای دهان در بهبود عفونت‌های دهان بسیار مهم می‌باشد. یکی از روش‌های مؤثر در کاهش تعداد میکروب‌های دهان، استفاده از دهانشویه ها می‌باشد. دهانشویه کلرهگزیدین که به دلیل فعالیت ضد میکروبی گسترده و سمیت پایین به عنوان استاندارد طلایی شناخته می‌شود، می‌تواند در مواردی همچون مهار پوسیدگی سطوح صاف، کنترل التهاب لثه، ضدعفونی دست دندان مصنوعی و کاهش پلاک میکروبی کاربرد داشته باشد (۱۵, ۱۶). عوارض جانبی این دهانشویه شامل ایجاد رنگیزه دندانی، طعم ناخوشایند، آلرژی، تغییر حس چشایی، ایجاد خشکی و سوزش در مخاط، اثرات سیستمیک منفی در صورت بلع و تغییر رنگ‌ترمیم های همرنگ دندان می‌باشد (۱۵, ۱۷). امروزه به دلیل عوارض جانبی داروهای شیمیایی در سراسر جهان تمایل به استفاده از داروهای گیاهی افزایش یافته است (۱۸). گیاهان به دلیل داشتن مکانیسم‌های دفاعی خاص و ترکیبات ضد میکروبی به صورت اندوژن می‌توانند منبع غنی از ترکیبات ضد میکروبی به حساب آیند. ترکیبات ضد میکروبی بدست آمده از گیاهان می‌توانند با مکانیسم‌های متفاوتی نسبت به آنتی بیوتیک ها، باکتری‌ها را حذف کنند. در نتیجه می‌توان در برابر عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم میکروبی از این خصوصیت استفاده کرد (۱۹). عناب (*Ziziphus jujube*) گیاهی است از خانواده رامناسه (*Rhamnaceae*) که درختچه آن دارای ارتفاع ۶-۸ متر بوده و به شکل تیغ دار یا بدون تیغ دیده می‌شود. این گیاه در برابر خشکی بسیار مقاوم است و از لحاظ تیپ جسمی به راسته شمشاد و کهور شباهت دارد. این گیاه به طور عمده در استان خراسان جنوبی، اصفهان، گلستان، مازندران، فارس، یزد، همدان و قزوین کشت می‌شود (۲۰). میوه رسیده عناب (*Ziziphus jujube*) به رنگ قرمز تخم مرغی شکل و به اندازه زیتون تک هسته‌ای و شیرین است (۲۱). از میوه خشک شده عناب، به عنوان آرام بخش، ضد سرطان، تب بر، مسکن، اشتها آور، بند آورنده خون و همچنین درمان بیماری‌های عفونی و سرماخوردگی استفاده می‌شود (۲۲). میوه عناب حاوی مواد قندی، پروتئینی، املاح آلی و ویتامین c بوده و غنی از لینوئیک اسید است. ترکیباتی نظیر فلاونوئید ها، تری ترپنوئید ها، ساپونین ها، آلکالوئیدها، استرول‌ها، اسید لوریک و پپتید snakin-z نیز در آن شناسایی شده‌اند (۲۱, ۲۳). در مطالعات گذشته اثرات قسمت‌های مختلف گیاه عناب بر گونه‌های میکروبی متفاوتی بررسی شده است. طبق تحقیقات، عصاره اتانولی ریشه و برگ‌های گیاه عناب دارای اثرات ضد قارچی و ضد باکتریایی می‌باشد (۲۴, ۲۵). همچنین مطالعات نشان داد عصاره اتانولی میوه عناب اثر ضد میکروبی علیه *استافیلوکوک* ها دارد و برای بهبود بیماری‌های عفونی میکروبی کودکان مناسب است (۲۶). طبق مطالعه امیری عصاره استونی و الکلی میوه عناب می‌تواند سبب کاهش تعداد باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* شود. مطالعات آزمایشگاهی نشان داد دانه و پالپ میوه عناب بیشترین اثر ضد میکروبی را در برابر *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد (۲۷). با توجه به اینکه عواملی مانند نحوه عصاره گیری، نوع حلال، شرایط اقلیمی گیاه و اکوتیپ های مختلف یک گونه و ... می تواند در میزان اثربخشی، مواد مؤثره و اثرات بیولوژیک گیاهان تأثیر گذار باشد (۲۸)، لذا هدف از این تحقیق بررسی اثرات ضد قارچی و ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف (آبی، اتانولی، متانولی و دی کلرومتانولی) میوه گیاه دارویی عناب بر روی پاتوژن های دهانی (*کاندیدا آلبیکنس* و *استرپتوکوک موتانس*) و مقایسه آن‌ها با آنتی میکروبیال های تجاری، به منظور استفاده از این گیاه در محصولات دارویی گیاهی با حداکثر اثربخشی وکمترین عوارض جانبی می‌باشد.

روش کار

این مطالعه از نوع آزمایشگاهی بود و به منظور بررسی تأثیر ضد میکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و دی کلرو متانی میوه عناب بر استرپتوکوکوس موتانس و کاندیدا آلبیکنس انجام شد. جامعه آماری شامل ۱۲ پلیت استرپتوکوکوس موتانس (تهیه شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران)، ۱۲ پلیت کاندیدا آلبیکنس (تهیه شده از مرکز انستیتو پاستور ایران) و ۳ میکرو پلیت ۹۶ خانه بود و غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره‌ها با کلر هگزیدین ۲ درصد (شرکت داروسازی ایران ناژو)، نیستاتین ۱۰۰۰۰۰ واحد در میلی لیتر (داروسازی جابرابن حیان) و اموکسی سیلین ۴۰۰ (شرکت داروسازی فارابی) با سه تکرار مقایسه شد.

عصاره گیری

در این مطالعه آزمایشگاهی، میوه گیاه عناب با همکاری کارشناس گیاه شناس مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی از منطقه بیرجند تهیه شد. پس از شناسایی و تأیید گونه (هرباریوم به شماره ۵۳۵۲)، میوه‌ها در سایه در مجاورت هوا خشک شده و سپس توسط آسیاب برقی پودر گردید. عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و دی کلرومتانی میوه عناب به روش خیساندن (اضافه نمودن ۵ گرم پودر خشک شده میوه عناب در ۱۰۰ میلی لیتر حلال) به مدت ۴۸ ساعت تهیه شد. سپس محلول بدست آمده با استفاده از کاغذ صافی (واتمن ۱) را با تبخیرکننده چرخان (دستگاه روتاری heidolph آلمان) تغلیظ نموده و پودر عصاره حاصل گردید. پودر عصاره حاصله تا زمان آزمایش در یخچال (۴°c+) نگهداری شد.

Agar Well Test: اندازه گیری اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی عصاره‌های مختلف گیاه (اتانولی، متانولی، آبی و دی کلرومتانی) به روش چاهک پلیت انجام شد. در این روش از پلیت های حاوی محیط کشت سوئیبن کازئین آگار که آغشته به استرپتوکوکوس موتانس و کاندیدا آلبیکنس بودند استفاده شد. توسط یک پیپت پاستور استریل که مخصوص ایجاد چاهک است، یک حفره در محیط کشت ایجاد کرده و داخل هر چاهک با سمپلر ۵۰ لاندا از عصاره‌ها با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر به طور جداگانه قرار داده شد. سپس پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور متناسب با شرایط رشد هر میکروارگانیسم قرار

گرفتند. پس از آن میزان مناطق مهاری براساس میلی متر محاسبه شد. از چاهک‌های حاوی نیستاتین (۱۰۰۰۰۰ واحد در میلی لیتر)، کلرهگزیدین (۰/۲) و آموکسی سیلین ۴۰۰ به عنوان کنترل مثبت و مایع دی متیل سولفوکساید به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

Agar Disc Test: آزمایش آنتی بیوگرام به روش انتشار دیسک به این صورت است که دیسک بلانک آغشته به عصاره‌های مختلف (اتانولی، متانولی، آبی و دی کلرومتانی) با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از گیاه، دیسک‌های بلانک حاوی نیستاتین، کلرهگزیدین و اموکسی سیلین به عنوان کنترل مثبت و دیسک حاوی دی متیل سولفوکساید به عنوان کنترل منفی به مدت یک ساعت در انکوباتور قرار داده شده تا خشک گردند. سپس بر روی محیط کشت اختصاصی (سوبین کازئین آگار) که قبلاً توسط تلقیح میکروبی آغشته شده، در فواصل مناسب قرار داده شد. سپس پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور متناسب با شرایط رشد هر میکروارگانیسم قرار گرفتند. در ادامه اثر دیسک حاوی عصاره‌ها با دیسک‌های حاوی کلرهگزیدین، نیستاتین و آموکسی سیلین مقایسه گردید.

تعیین میزان اثر مهاری و بازدارندگی رشد عصاره‌های مختلف: در این روش مقدار ۲۰۰ مایکرولیتر از غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۲۵۶ و ۰/۱۸۷ میلی گرم در میلی لیتر هر یک از عصاره‌ها به خانه‌های یک پلیت ۹۶ خانه منتقل شد. سپس از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده به میزان ۲۰ مایکرولیتر به هر یک از خانه‌ها اضافه گردید. به عنوان کنترل مثبت، در تعدادی از خانه‌های پلیت ۱۵۰ مایکرولیتر از محیط کشت اختصاصی،۲۰ مایکرولیتر سوسپانسیون استرپتوکوکوس موتانس/ کاندیدا آلبیکنس و ۵۰ مایکرولیتر کلرهگزیدین / نیستاتین اضافه شد. از خانه‌های حاوی ۲۰۰ مایکرولیتر از محیط کشت و ۲۰ مایکرولیتر استرپتوکوکوس موتانس/ کاندیدا آلبیکنس به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. پلیت ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷°C قرار داده شد. پس از این مدت به تمام خانه‌های هر پلیت ۵۰ ماکرولیتر از معرف‌تری فنیل تترازولیوم کلراید با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه شد و مجدداً به مدت ۳ ساعت در گرمخانه قرار گرفت. پس از خروج از گرمخانه، در هر ردیف مربوط به غلظت‌های مختلف یک عصاره، اولین غلظتی که در آن رنگ قرمز تشکیل نشده بود، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای به دست آوردن مقادیر حداقل غلظت کشندگی (MBC/MFC) از کلیه خانه‌هایی که رنگ قرمز در آن‌ها تشکیل نشده بود، یک لوپ به پلیت های حاوی محیط کشت آگار اختصاصی منتقل شد. اولین غلظتی از هر عصاره که در پلیت مربوط به آن رشد مشاهده نشود به عنوان MBC/MFC در نظر گرفته شد (۲۹).

آنالیز آماری

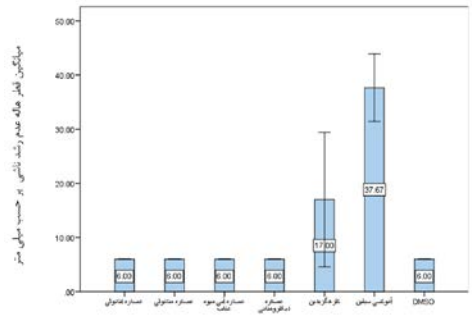
کلیه تست‌ها ۳ بار انجام گردید و برای تحلیل نتایج از نرم افزار spss۲۲ و آزمون کروسکال والیس استفاده شد.

یافته‌ها

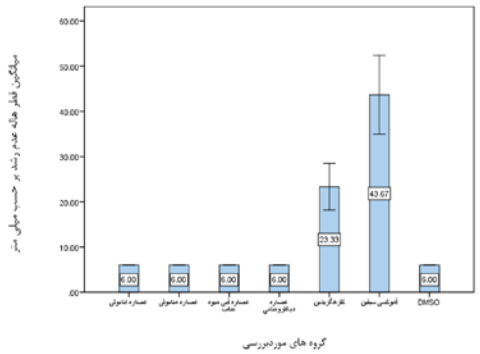
نمودار ۱ و ۲ تأثیر آنتی باکتریال غلظت‌های ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره‌های اتانولی، متانولی، آبی و دی کلرومتانی بر باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* در روش دیسک دیفیوژن و چاهک پلیت را نشان می‌دهد. همان طور که در نمودار مشاهده می‌شود میانگین قطر هاله عدم رشد حاصل از ۳ بار تکرار در روش‌های دیسک دیفیوژن و چاهک پلیت برای تمام عصاره‌ها برابر با ۶ میلی متر بود. بررسی آماری توسط آزمون کروسکال والیس نشان داد که تفاوت معنی داری بین عصاره‌های مختلف میوه عناب (*Ziziphus jujube*) با کنترل مثبت (دهانشویه نیستاتین، کلرهگزیدین و اموکسی سیلین) بر قطر هاله عدم رشد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* در روش دیسک دیفیوژن و چاهک وجود دارد (sig<۰/۰۵). در این روش‌ها آموکسی سیلین با بالاترین میزان میانگین قطر هاله عدم رشد (۳۷،۶۷ میلی متر در روش دیسک دیفیوژن و ۴۳،۶۷ میلی متر در روش چاهک پلیت) بیشترین اثر مهاری را بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس از خود نشان داده و همان گونه که در نمودارها مشاهده می‌شود، عصاره‌های مورد آزمایش تأثیر قابل توجهی بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس نداشته‌اند.

نتیاج حاصل از تأثیر ضد قارچی غلظت‌های ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره مختلف عناب بر قارچ کاندیدا آلبیکنس در روش‌های دیسک دیفیوژن و چاهک پلیت، در نمودار های ۳ و ۴ منعکس شده است. طبق آزمون کروسکالوالیس، تفاوت آماری معنی داری بین عصاره‌های مختلف با دهانشویه ها و آنتی بیوتیک بر قطر هاله عدم رشد کاندیدا آلبیکنس در روش دیسک دیفیوژن و چاهک نشان وجود دارد (sig<۰/۰۵). میانگین قطر هاله عدم رشد ناشی از ۳ بار تکرار روش‌های دیسک دیفیوژن و چاهک پلیت عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و دی کلرومتانی میوه عناب برابر با ۶ میلی متر گزارش شده است. که می توان نتیجه گرفت همه عصاره‌ها قادر به مهار رشد قارچ مورد آزمایش در مقایسه با سایر گروه‌ها نبودند و قارچ کاندیدا آلبیکنس به تمامی عصاره‌ها مقاوم مشاهده شد. از میان گروه‌های مورد بررسی کلرهگزیدین با بالاترین میانگین هاله عدم رشد (۲۳،۳۳ در روش دیسک دیفیوژن و ۲۴،۳۳ در روش چاهک پلیت) در ۳ بار تکرار، بیشترین اثر ضد قارچی را نشان داد. غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۲۵۶، ۰/۱۸۷ میلی گرم در میلی لیتر عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و دی کلرومتانی میوه عناب در ۳ بار تکرار، خاصیت مهار کنندگی و حذف باکتری و قارچ مورد آزمایش را نداشتند در نتیجه غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر همه عصاره‌های تست شده ممکن است غلظت مهار کنندگی برای رشد باکتری گرم مثبت (استرپتوکوکوس موتانس) و قارچ (کاندیدا آلبیکنس) باشداز طرفی بدلیل عدم انحلال عصاره‌ها در غلظت‌های بالاتر، در این مطالعه نتایج برای MIC و MBC / MFC به صورت >۱۰۰ در نظر گرفته شد.

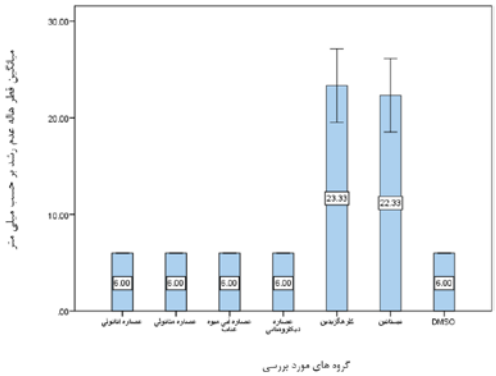
طبق نتایجی که در بالا به آن اشاره شد، هر سه روش آزمایش اعم از دیسک دیفیوژن و چاهک پلیت و MIC تاییدی بر یکدیگر بودند.



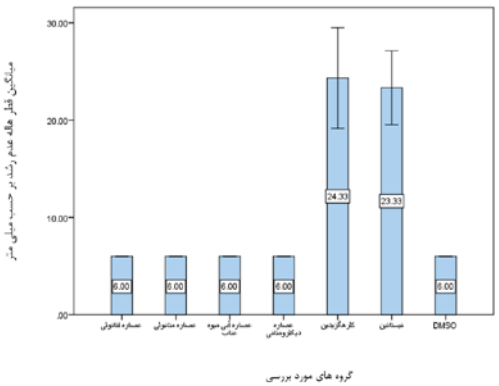
نمودار ۱. توزیع اثر عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و دی کلرومتانولی میوه گیاه دارویی عناب (*Ziziphus jujube*) با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر و گروه‌های کنترل بر قطر هاله عدم رشد *استرپتوکوکوس موتانس* ناشی از ۳ بار تکرار روش دیسک دیفیوژن



نمودار ۲. توزیع اثر عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی، دی کلرومتانولی میوه گیاه دارویی عناب (*Ziziphus jujube*) با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر و گروه‌های کنترل بر قطر هاله عدم رشد *استرپتوکوکوس موتانس* ناشی از ۳ بار تکرار روش چاهک پلیت



نمودار ۳. توزیع اثر عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی، دی کلرومتانولی، میوه گیاه دارویی عناب (*Ziziphus jujube*) با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر و گروه‌های کنترل بر قطر هاله عدم رشد *کاندیدا آلبیکنس* ناشی از ۳ بار تکرار روش دیسک دیفیوژن



نمودار ۴. توزیع اثر عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی، دی کلرومتانولی، میوه گیاه دارویی عناب (*Ziziphus jujube*) با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر و گروه‌های کنترل بر قطر هاله عدم رشد *کاندیدا آلبیکنس* ناشی از ۳ بار تکرار روش چاهک پلیت

بحث

امروزه بدلیل استفاده بیش از حد داروهای شیمیایی و ایجاد سویه‌های مقاوم میکروبی، همچین توصیه‌های مکرر سازمان جهانی بهداشت به رویکرد جامع به طب سنتی و گیاهان دارویی انجام تحقیقاتی برای شناسایی گیاهان دارویی ضرورت پیدا می‌کند (۳۰, ۳۱). با توجه به تحقیقات صورت گرفته در گذشته که پوسیدگی‌های دندانی و کاندیدیازیس دهانی را جزء بیماری‌های شایع و با اهمیت دهان می دانند (۱۱, ۳۲)، ما را بر آن داشت تا به بررسی اثر عصاره‌های مختلف میوه عناب بر روی عوامل این بیماری‌ها یعنی باکتری استرپتوکوکس موتانس و کاندیدا آلبیکنس بپردازیم. طبق بررسی‌های انجام گرفته در این مطالعه، عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و دی کلرو متانی میوه عناب روی باکتری استرپتوکوک موتانس و قارچ کاندیدا البیکنس بی تأثیر می‌باشند. این نتیجه با نتایج به دست آمده توسط توسط نیکبخت و همکارانش در سال ۱۳۹۴ در خصوص تولید زیستی نانو ذرات نقره به به وسیله عصاره آبی و متانولی میوه عناب، همسو می‌باشد. طبق مطالعه آنها میانگین قطر هاله عدم رشد در عصاره حاوی نانو ذرات نقره بیشتر از عصاره آبی و متانولی خالص میوه عناب بوده و عصاره آبی و متانولی خالص میوه عناب تأثیر قابل توجه بالینی بر باکتری‌های اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، استافیلکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس نداشته است (۳۳). دانشمند در سال ۱۳۹۳ یک پپتید ضد میکروبی جدید از گیاه عناب (*Ziziphus jujube*) به نام Snakin-Z استخراج کرد. طبق نتایج این مطالعه قارچها در مقایسه با باکتری‌ها، نسبت به عملکرد این پپتید حساستر بودند (مقدار MIC برای *کاندیدا آلبیکنس*، ۸,۲۳ میکروگرم بر میلی لیتر بود) و در این بین قارچهای بیماری زای گیاهی، حساسیت بیشتری را از خود نشان دادند (۲۳). با توجه به اینکه حلال‌های مختلف منجر به تولید مواد مؤثره متفاوتی می‌شوند به نظر می‌رسد در عصاره‌های مطالعه حاضر مقدار این پپتید بسیار ناچیز باشد و پیشنهاد می‌شود از حلال‌های دیگری برای نمونه گیری استفاده گردد. Ahmad و همکارانش در سال ۲۰۱۶ از گونه دیگری از خانواده رامناسه به نام *Ziziphus oxyphylla* برای بررسی اثر ضد قارچی علیه *کاندیدا آلبیکنس* استفاده کردند. و مشابه نتیجه آزمایش حاضر قسمت‌های مختلف گیاه *Ziziphus oxyphylla* بر روی کاندیدا آلبیکنس اثری نداشت (۳۴). امیری و همکارانش در سال ۱۳۹۸، از عصاره الکلی عناب که MIC و MBC آن: ۳۹/۸۷۵ mg/ml و ۷۹/۷۵ mg/ml و عصاره استونی عناب که MIC و MBC آن: ۸/۶۲۵ mg/ml و ۱۷/۲۵ mg/ml بود، برای تهیه پماد استفاده کردند. طبق نتایج آن‌ها در این غلظت‌ها کاهش چشمگیری در تعداد باکتری های سودوموناس آئروژینوزا ناشی از سوختگی اتفاق می افتد (۳۵). احتمالاً عواملی همچون تفاوت در اکوتیپ میوه عناب [۲۸]، نوع باکتری و نوع حلال در حصول نتیجه‌ی متفاوت تأثیر گذار بوده‌اند.

نتیجه گیری

عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و دی کلرو متانی میوه عناب که در این مطالعه بررسی شده بودند، اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی قابل توجه ای در مقایسه با کنترل‌های مثبت (آموکسی سیلین، کلرهگزیدین و نیستاتین) از خود نشان ندادند.

محدودیت‌ها و پیشنهادات

در مطالعه حاضر از عصاره کامل میوه عناب استفاده شده بود. با توجه به اینکه میوه عناب دارای مواد مؤثره ارزشمندی است پیشنهاد می گردد به استخراج و خالص سازی مواد مؤثره این میوه پرداخته و اثر ضد میکروبی آن‌ها بررسی شود. از طرفی در این پژوهش از سویه‌های میکروبی استاندارد استفاده شد پیشنهاد می‌شود برای تأیید نتایج از میکروارگانیسم‌های جدا شده از محیط دهان استفاده شود.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی بخاطر تصویب این طرح با شناسه اخلاق IR.NKUMS.REC.۱۳۹۹.۰۷۶ و تأمین منابع مالی توسط این معاونت و همچنین ازمرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی که ما را در اجرای این طرح یاری نمودند تشکر و قدردانی می نمایند.

References

1. Golestan Nejad Z, Khozaimeh F, Ghalyani P, Ghorbani A, Ghorbani F. Evaluation Of Prevalence Of Dental Caries Among Patients With Migraine Headache. *J Isfahan Dent Sch.* 2014;**10**(6):490-497.
2. Salimiyan Rizi K, Farsiani H. The role of bacterial biofilm in the clinical outcomes of oral and dental infections. *Razi J Med Sci* 2019;**25**(10):90-101.
3. Jebali n, Rabbani Khorasgani M, Keyhanfar M, Emami S. Evaluation of the effects of honey, vinegar and rosewater on adhesion and biofilm formation of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus. *J Isfahan Dent Sch.* 2019;**12**(3):232-247.
4. Fani MM, Kohanteb J, Dayaghi M. Inhibitory activity of garlic (Allium sativum) extract on multidrug-resistant Streptococcus mutans. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2007;**25**(4):164-168. **doi:** 10.4103/0970-4388.37011 **pmid:** 18007101
5. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;**3**(1):17030. **doi:** 10.1038/nrdp.2017.30 **pmid:** 28540937
6. Clarke JK. On the Bacterial Factor in the Ætiology of Dental Caries. *Br J Exp Pathol.* 1924;**5**(3):141-147.
7. Loesche WJ. Microbiology of Dental Decay and Periodontal Disease. In: Baron S e, editor. Med Microbiol. 4 ed1996.
8. Khazaei S, Firouzei MS, Sadeghpour S, Jahangiri P, Savabi O, Keshteli AH. Edentulism and Tooth Loss in Iran: SEPAHAN Systematic Review No. 6. *Int J Prev Med.* 2012;**3**(1):42-47.
9. Bonakdarchian M, Ghorbanipour RM, Fatemeh H, Tahmores. Prevalence of edentulism among adults aged 35 years and over and associated factors in Yasooj. *J Jahrom Univ Med Sc.* 2011;**7**(1):101-104.
10. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of Candida albicans. *Trends Microbiol.* 2001;**9**(7):327-335. **doi:** 10.1016/s0966-842x(01)02094-7 **pmid:** 11435107
11. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002;**78**(922):455-459. **doi:** 10.1136/pmj.78.922.455 **pmid:** 12185216
12. Azmudeh F, Hajikhani SH, Alizadeh SA. Evaluation of the hydroalcoholic chamomile extract antifungal activity on Candida albicans-Invitro Study. *journal of research in dental sciences.* 2016;**13**(4):210-215. **doi:** 10.18869/acadpub.jrds.13.4.210
13. Barkvoll P, Attramadal A. Effect of nystatin and chlorhexidine digluconate on Candida albicans. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1989;**67**(3):279-281. **doi:** 10.1016/0030-4220(89)90354-x **pmid:** 2648241
14. Jazayeri M, Radi S, Abdosamadi HR, Madani Pour A, Samie L. Comparison the Inhibitory Effects Of Essential Oil of Thymus eriocalyx and Thymus kotschyanus with Nystatin on Candida Albicans Growth - In Vitro Study. *J Mashhad Dent Sch.* 2016;**40**(2):133-142.
15. Sadeghi M, Bahramabadi R, Assar S. Antibacterial Effects of Persica and Matrica Herbal Mouthwashes on Common Oral Microorganisms: An In Vitro Study. *J Mashhad Dent Sch.* 2011;**35**(2):107-114.
16. Esfahanian V, Ketabi M, Ara HF. Efficacy of Chlorhexidine and Irsha (Anti-plaque) Mouth-rinses on Reducing Dental Plaques. *J Isfahan Dent Sch.* 2007;**3**(1):10-14.
17. Ghasemi M, Moghaddas O. The Effect of Different Times Application of Chlorhexidine on the Microbial Plaque. *J Dent Shiraz Univ Med Sc.* 2010;**11**(3):240-246.
18. Atai Z, Abdolahi H, Naderi Poor S, Mohamadi S. An in vitro study of the effects of Yarrow, Chamomile and Rhubarb herbal extracts on candida albicans and common oral bacteria. *J Islamic Dent Assoc Iran.* 2006;**18**(3):25-31.
19. Jebelli Javan A, Ahmadi Hamedani M, Bayani M, Keykhosravy K, Abdollahi Z, Alijanpoor Z. Antioxidant and antimicrobial effects of different mints, the most widely used in Caspian Sea areas, Iran. *J Vet Lab Res.* 2014;**6**(2):93-102.
20. Abbasi S, Malekzadeh S, Shafaroudi Ghous K, Shahriari FA. Genetic Diversity Analysis of Iranian Jujube Ecotypes (Ziziphus spp.) Using RAPD Molecular Marker. *Iran J Field Crops Res.* 2013;**10**(3):583-590.
21. Alipour Barzegar S, Bahram AT. Preventive effects of jujube (Ziziphus jujuba) extract on hepatic steatosis in the rats fed with high fat diet. *J Comp Pathol.* 2017;**13**:2037-2049.
22. Nakhai A, Zeraatgar H. A review of the composition and properties of the wonderful jujube in improving human health. *Barberry Jujube Promotion J.* 2020;**1**(2):1-8.
23. Daneshmand F. Identification and purification of an antimicrobial peptide from ziziphus jujuba. *J Cell Mol Res.* 2014;**27**(2):211-223.
24. Preeti T, S.. Ziziphus jujuba: A Phytopharmacological Review. *Int J Res Dev Pharm Life Sci.* 2014;**2014**.
25. Zamin I, Shah J, Shah I, Khan A, Majid M, Mujaddad. In-Vitro Efficacy of Crude Extract of Zizipus Jujuba against Selected Bacterial Strains. *Inte J Sci Res Publ.* 2014;**4**:1-5.
26. Daneshmand F, Zare-Zardini H, Tolueinia B, Hasani Z, Ghanbari T. Crude Extract from Ziziphus Jujuba Fruits, a Weapon against Pediatric Infectious Disease. *Iran J Ped Hematol Oncol.* 2013;**3**(1):216-221. **pmid:** 24575267
27. Rajaei A, Salarbashi D, Asrari N, Fazly Bazzaz BS, Aboutorabzade SM, Shaddel R. Antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activities of extracts from the seed and pulp of Jujube (Ziziphus jujuba) grown in Iran. *Food Sci Nutr.* 2021;**9**(2):682-691. **doi:** 10.1002/fsn3.2031 **pmid:** 33598153
28. Vajargah SK, Baradaran R, Mousavi SG, Abolhasani MT, Yazdani D. Morphological and phytochemical diversity of some jujube ecotypes (Zizyphus jujuba Mill.). *Iran J Med Aromat Plants.* 2019;**35**(2):182-185.
29. Zarghami Moghaddam P, Mohammadi A, Feyzi P, Alesheikh P. In vitro antioxidant and antibacterial activity of various extracts from exocarps and endocarps of walnut. *Pakistan J Pharmaceutical Sci.* 2017;**30**:1725-1731.
30. Izadi ZMSS, Sorooshzadeh A, Esna-Ashari M, Davoodi P. Antimicrobial activity of chamomile (Matricaria chamomilla L.) and feverfew (Tanacetum parthenium L.). *Armaghane Danesh.* 2013;**18**(1):31-43.
31. Saeidnia S, Dasian Z, Hadjiakhoondi A. Herbal Medicines and Pediatric Diseases. *J Med Plants.* 2010;**9**(33):16-25.
32. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabe E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, et al. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res.* 2013;**92**(7):592-597. **doi:** 10.1177/0022034513490168 **pmid:** 23720570

33. Nikbakht M, Pourali P. Survey of biological and antibacterial effects of silver nanoparticles of aqueous and methanol extracts of Berberis Vulgaris. *Med Sci J*. 2015;**25**(2):112-118.
34. Ahmad R, Ahmad N, Naqvi AA, Cos P, Maes L, Apers S, et al. Anti-infective, cytotoxic and antioxidant activity of Ziziphus oxyphylla and Cedrela serrata. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016;**6**(8):671-676. **doi:** 10.1016/j.apjtb.2016.04.012
35. Amiri F, Shapouri R, Jafarzadeh M. Comparison of antimicrobial effects of several plant extracts with silversulfadiazine in the treatment of burns caused by Pseudomonas aeruginosa in vitro and in vivo. *Razi J Med Sci*. 2020;**26**(11):112-123.