



Research Article

In vitro Study of the Synergistic Effect of Different Concentrations of Chlorhexidine Mouthwash and Ethanolic Extract of *Pinus Gerardiana* on Oral Pathogens (*Streptococcus Mutans* and *Candida Albicans*)

Vahab Imani¹, Mohammad Reza Pourabbas², Parastoo Zarghami Moghaddam³, Mina Baqeri⁴, Farzaneh Shakeri^{3,5*}

¹ Doctor of General Dentistry, Faculty of Dentistry, North Khorasan University of medical science, Bojnurd, Iran

² Dental Student, Faculty of Dentistry, North Khorasan University of medical sciences, Bojnurd, Iran

³ Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

⁴ Faculty of Dentistry, North Khorasan University of medical sciences, Bojnurd, Iran

⁵ Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

***Corresponding author:** Farzaneh Shakeri, Natural Products and Medicinal Plants Research Center and Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran. E-mail: f_1366_sh@yahoo.com.

DOI: [10.32592/nkums.16.2.83](https://doi.org/10.32592/nkums.16.2.83)

How to Cite this Article:

Imani V, Pourabbas M R, Zarghami Moghaddam P, Baqeri M, Shakeri F. In vitro Study of the Synergistic Effect of Different Concentrations of Chlorhexidine Mouthwash and Ethanolic Extract of *Pinus Gerardiana* on Oral Pathogens (*Streptococcus Mutans* and *Candida Albicans*). J North Khorasan Univ Med Sci. 2024;16(2):83-90. DOI: 10.32592/nkums.16.2.83

Received: 20 Sep 2023

Accepted: 27 Feb 2024

Keywords:

Tooth decay
Pinus gerardiana
Streptococcus mutans
Chlorhexidine
Candida albicans

Abstract

Introduction: Tooth decay is the most common chronic disease in the world. *Streptococcus mutans* is the most important bacteria that cause tooth decay. The most common chemical method to prevent tooth decay is using mouthwash. Chlorhexidine is used as a standard mouthwash. The use of herbal compounds with antibacterial effect is preferable to chlorhexidine due to less side effects. The purpose of this study was to investigate the combination of different concentrations of chlorhexidine mouthwash and ethanol extract of *Pinus gerardiana* medicinal plant on oral pathogens (*Streptococcus mutans* and *Candida albicans*).

Method: A combination of different concentrations of chlorhexidine mouthwash and ethanol extract of *Pinus gerardiana* medicinal plant was prepared and its effect in different dilution against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* was investigated by disc diffusion, well diffusion, and prevention of biofilm formation methods.

Results: The results of disc diffusion, well diffusion, and biofilm method showed that the ethanolic extract of *Pinus gerardiana* medicinal plant alone had no significant antimicrobial effect on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* and it was not comparable to chlorhexidine.

Conclusion: According to the findings of this study, the antibacterial and antifungal effects of chlorhexidine gradually increased with the increase in concentration, and 0.2% chlorhexidine had the highest inhibitory effect on bacteria and fungi under the present study.



بررسی آزمایشگاهی اثر هم‌افزایی ترکیب غلظت‌های مختلف دهان‌شویه کلرهگزیدین و عصاره اتانولی گیاه دارویی چلغوز (*Pinus gerardiana*) بر پاتوژن‌های دهانی (استرپتوکوکوس موتانس و کاندیدا آلبیکنس)

وهاب ایمانی^۱، محمدرضا پورعباس^۲، پرستو ضرغامی مقدم^۳، مینا باقری^۴، فرزانه شاکری^۵ ^{ID} *^۵

^۱ دکترای عمومی دندان پزشکی، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
^۲ دانشجوی دکترای عمومی دندان پزشکی، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
^۳ مرکز تحقیقات فراورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
^۴ دکترای تخصصی درمان ریشه (اندودانتیکس)، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
^۵ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
*نویسنده مسئول: فرزانه شاکری، مرکز تحقیقات فراورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی و گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران. ایمیل: f_1366_sh@yahoo.com

DOI: 10.32592/nkums.16.2.83

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۹	چکیده
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۰۸	مقدمه: پوسیدگی دندان شایع‌ترین بیماری مزمن در جهان است. استرپتوکوکوس موتانس نیز مهم‌ترین باکتری عامل بروز پوسیدگی دندان است. متداول‌ترین روش شیمیایی در پیشگیری از پوسیدگی دندان استفاده از دهان‌شویه است. کلرهگزیدین رایج‌ترین دهان‌شویه استاندارد شناخته شده است. لذا، یافتن ترکیبات گیاهی با اثر ضد میکروبی بالا و عوارض جانبی کمتر نسبت به کلرهگزیدین ارجحیت دارد. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر ضد میکروبی ترکیب غلظت‌های مختلف دهان‌شویه کلرهگزیدین و عصاره اتانولی گیاه دارویی چلغوز (<i>Pinus gerardiana</i>) بر پاتوژن‌های دهانی (استرپتوکوکوس موتانس و کاندیدا آلبیکنس) است.
واژگان کلیدی:	روش کار: ترکیبی از غلظت‌های مختلف دهان‌شویه کلرهگزیدین و عصاره اتانولی گیاه دارویی چلغوز تهیه شد و اثر آن در رقت‌های مختلف علیه باکتری استرپتوکوکوس موتانس و قارچ کاندیدا آلبیکنس به روش‌های انتشار دیسک، چاهک پلیت و ممانعت از تشکیل بیوفیلم بررسی شد.
پوسیدگی دندان	یافته‌ها: نتایج در روش انتشار دیسک، چاهک پلیت و بیوفیلم نشان داد که عصاره اتانولی گیاه دارویی چلغوز به تنهایی اثر ضد میکروبی درخور ملاحظه‌ای بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس و قارچ کاندیدا آلبیکنس ندارد و قیاس‌پذیر با کلرهگزیدین نیست ($P < 0.05$).
گیاه چلغوز	نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این مطالعه، با افزایش غلظت عصاره و کلرهگزیدین، اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی به تدریج افزایش می‌یابد و در این میان، کلرهگزیدین (۲ درصد) بالاترین اثر مهاری را بر باکتری و قارچ مورد مطالعه دارد.
استرپتوکوکوس موتانس	
کلرهگزیدین	
کاندیدا آلبیکنس	

مقدمه

بیماری‌های دهان، شامل پوسیدگی دندان، بیماری‌های پریودنتال و از دست دادن دندان‌ها، جمعیت بسیار زیادی را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۱]. در میان بیماری‌های حفره دهان، پوسیدگی دندان‌ها از شیوع بالا و اهمیت خاصی دارد و یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی محسوب می‌شود [۲]. پوسیدگی دندان در ماهیت، نوعی بیماری عفونی میکروبی است که موجب حل شدن و تخریب بافت‌های آهکی دندان می‌شود [۳]. در این بیماری، بافت سخت دندان (مینا و سپس عاج) در اثر ترشح اسید حاصل از باکتری‌های پوسیدگی‌زا، مواد معدنی کلسیم و فسفر را از دست می‌دهد و به تدریج از بین می‌رود [۴]. استرپتوکوکوس موتانس عامل اصلی پوسیدگی در نظر گرفته می‌شود و نقشی اساسی در پیشرفت پوسیدگی دندان بازی می‌کند [۵]. کاندیدا آلبیکنس چهارمین

علت عفونت دهان معرفی شده است که می‌تواند باعث عفونت‌های موضعی مانند برفک شود [۶]. مهم‌ترین بخش در جلوگیری از پوسیدگی، پیشگیری است [۷]. یکی از روش‌های پیشگیری استفاده از عوامل ضد میکروبی مانند کلرهگزیدین یا سدیم فلوراید است تا تشکیل بیوفیلم و رشد میکروارگانیسم‌های مولد پوسیدگی، به خصوص استرپتوکوکوس موتانس را در حفره دهان محدود کند. با این حال، استفاده از مواد شیمیایی معمول به صورت منظم به دلیل محدودیت‌هایی که این عوامل از خود نشان داده‌اند، برای پیشگیری از پوسیدگی توصیه نمی‌شود [۸]؛ بنابراین، با اینکه مواد ضد پوسیدگی متعددی از نظر تجاری وجود دارد، به دلیل اثرات جانبی ناخواسته و قیمت‌های بالای این مواد و با توجه به مقاومت‌های میکروبی ایجاد شده، چالش برای

یافتن مواد ضد میکروبی جدید همچنان ادامه دارد [۲، ۵، ۷، ۸]. اخیراً مطالعات راجع به استفاده از گیاهان دارویی به عنوان منبعی از عوامل ضد میکروبی و ضد قارچی به طور چشمگیر افزایش پیدا کرده است. طیف گسترده‌ای از عصاره گیاهان معرفی شده است که فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی دارند [۹]. با وجود اینکه داروهای شیمیایی گسترش بسیاری داشته‌اند، هنوز گیاهان دارویی و اشکال مختلف آن‌ها به طور وسیع به کار می‌روند [۱۰].

از آنجایی که کشور ایران موقعیت مناسبی برای پرورش گیاهان دارویی دارد و همچنین، به دلیل اینکه گیاهان دارویی عوارض بسیار ناچیز و کمتری از داروهای شیمیایی دارند و تهیه آن‌ها کم هزینه‌تر است، مطالعات مختلف به دنبال بررسی تأثیر ضد میکروبی گیاهان دارویی مختلف هستند. به همین دلیل، چندین مورد از دهن شویه‌ها و عصاره‌های گیاهی در جست‌وجوی یک ماده‌ی کمکی مناسب به عنوان جایگزین کلرهگزیدین و برای امکان استفاده طولانی مدت آزمایش و بررسی شدند که از این موارد می‌توان به *Pinus gerardiana* از خانواده کاجیان (Pinaceae) اشاره کرد. این ماده با نام «کاج چلغوز» یا «نئوزا» شناخته می‌شود. پراکندگی این گیاه در جهان بسیار کم و محدود به رشته‌کوه‌های منطقه شرقی هند، پاکستان، افغانستان و همچنین، مناطق پراکنده هندوکش هیمالیا است. طبع این گیاه گرم است. این گیاه به دلیل داشتن منیزیم موجب از بین رفتن بی‌خوابی‌های شبانه می‌شود. همچنین، پتاسیم و منگنز موجود در چلغوز موجب تعادل فشارخون می‌شود و دردهای عضلانی، تنش، اضطراب و خستگی مفرط را از بین می‌برد و موجب رفع سنگ مثانه می‌شود. مطالعات شیمیایی درباره *Pinus gerardiana* وجود اسیدلینولئیک، اسیداولئیک، آلومونوئیدها، نشاسته، روغن، فیتواسترول، پلی‌فنول‌ها، گزانتین‌ها، کاروتنوئیدها، توکوفرول‌ها، گالوکاتچین، کاتچین، لوتئین و... را در این ماده نشان می‌دهد.

همچنین، مطالعات مختلف وجود ویتامین‌های مختلف، از جمله ویتامین E، تیامین (B1)، بتاکاروتن، ریوفلاوین (B2)، نیاسین (B3)، ویتامین k، اسیدپانتوتنیک (B5)، ویتامین B6، فولات (B9) و مواد معدنی از جمله منیزیم، کلسیم، منگنز، فسفر، پتاسیم، آهن و روی را در این ماده نشان داده‌اند. این گیاه همچنین، فعالیت‌های بیولوژیکی مختلفی از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضد ترومبوتیک و ضدپلاکتی، فعالیت ضد دیابت، فعالیت ضد التهابی، فعالیت ضد قارچی و فعالیت ضد باکتری را در ارزیابی‌های علمی نشان داده است [۱۱، ۱۲]. Aditi و همکاران، گزارش کرده‌اند که عصاره پوست ساقه *P. gerardiana* بیشترین عملکرد ضد میکروبی را در بین قارچ‌ها و باکتری‌های مورد مطالعه علیه *P. areuginosa* و *C. albican* نشان داده‌اند [۱۲]. نتایج مطالعه رحمان و همکاران که در سال ۲۰۱۷ با هدف بررسی فعالیت ضد ترومبوتیک و ضدپلاکتی گیاه چلغوز انجام شد، نشان داد که گیاه چلغوز باعث تجزیه لخته خون در شرایط آزمایشگاهی

می‌شود [۱۳]. نتایج مطالعه Alfahdawi و همکاران که در سال ۲۰۲۱ با هدف بررسی اثر مهارکنندگی عصاره‌های مختلف گیاه دارویی مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) و دهن شویه کلرهگزیدین بر پاتوژن‌های دهانی انجام شد، نشان داد که روغن گیاه مریم‌گلی خالص بیشترین بازدارندگی را در برابر باکتری‌ها در مقایسه با دهن شویه کلرهگزیدین دارد [۱۴]. در مطالعه اقبال و همکاران که در سال ۲۰۲۱ با هدف بررسی تأثیر ضدباکتریایی اسانس گیاه دارویی مریم‌گلی و مقایسه آن با تأثیر داروی کلرهگزیدین بر عوامل باکتریایی حفره دهانی انجام شد، نشان داده شد که این گیاه اثرات مهارکنندگی درخور توجهی بر انواع باکتری‌های گرم منفی و مثبت دارد و مشخص شد که اسانس این گیاه دارویی نتایج بهتری بر باکتری / استریپتوکوکوس موتانس نسبت به دهن شویه کلرهگزیدین ایجاد می‌کند [۱۵]. در مطالعه پاتان و همکاران که در سال ۲۰۱۷ با هدف مقایسه تأثیر دهن شویه گیاهی و کلرهگزیدین بر پاتوژن‌های پریدنتال انجام شد، نشان داده شد که کلرهگزیدین نسبت به دهن شویه‌های گیاهی، علیه گونه‌های باکتریایی، اثر ضد میکروبی بیشتری دارد [۱۶]. هدف از مطالعه حاضر دستیابی به نتایج ضد میکروبی مثبت جهت یافتن ترکیبی از عصاره گیاهی چلغوز با دهن شویه کلرهگزیدین با دوز کمتر با حداکثر کارایی و حداقل عوارض جانبی در آینده بود که بتواند جایگزین مناسبی برای دهن شویه کلرهگزیدین شود.

روش کار

طرح تحقیقاتی این مطالعه پس از تصویب در شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی و اخذ کد اخلاق (IR.NKUMS. REC.1400.174) در سال ۱۴۰۱، در مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی اجرا شد.

در این مطالعه، اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی ترکیبی از غلظت‌های مختلف دهن شویه کلرهگزیدین و عصاره اتانولی گیاه چلغوز (۸۰-۲۰، ۴۰-۶۰، ۵۰-۵۰، ۴۰-۲۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر) بر پاتوژن‌های دهانی (استریپتوکوکوس موتانس و کاندیدا آلبیکنس) با استفاده از سه روش انتشار دیسک، چاهک پلیت و ممانعت از تشکیل بیوفیلم بررسی شد. در روش انتشار دیسک و چاهک پلیت، قطر هاله‌ی عدم رشد برحسب میلی‌متر محاسبه شد. در روش بیوفیلم نیز طول موج توسط دستگاه خوانشگر الایزا (BioTek- ژاپن) خوانده و در فرمول مرتبط قرار داده شد.

مراحل تحقیق

عصاره‌گیری

گیاه چلغوز پس از تهیه و خشک شدن، پودر شد و عصاره‌گیری به روش خیساندن توسط حلال اتانول به مدت ۴۸ ساعت انجام شد و با استفاده از تبخیرکننده چرخان (روتاری، هایدولف آلمان) تغلیظ شد. پودر عصاره حاصل تا زمان آزمایش در یخچال (۴°C+) نگهداری شد.

روش چاهک پلیت

میکروارگانسیم‌ها، نیم مک فارلند تهیه شد و ۲۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به همه چاهک‌ها، به‌جز چاهکی که به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شده بود، اضافه شد. میکروپلیت در انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس، محتویات داخل چاهک‌ها به آرامی با برگرداندن خالی شد و تمامی چاهک‌ها سه بار با سرم فیزیولوژی استریل شست‌وشو داده شدند تا تمامی باکتری‌های پلانکتونیک حذف شوند. میکروتیرپلیت در دمای اتاق خشک شد. در مرحله بعد، با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر متانول به هر چاهک، باکتری‌های متصل به سطح داخلی دیواره چاهک‌ها که همان جمعیت بیوفیلیم هستند، تثبیت شدند. بعد از ۱۵ دقیقه، محتویات چاهک‌ها دور ریخته شد و پلیت در درجه حرارت اتاق خشک شد. به‌منظور رنگ‌آمیزی، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه اضافه شد. سپس، رنگ اضافی به‌طور کامل توسط جریان ملایم آب شسته شد و میکروپلیت در دمای اتاق خشک شد. بعد از این مرحله، برای سنجش میزان رنگ متصل‌شده به دیواره که نمایانگر میزان بیوفیلیم است، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر استیک اسید ۳۳ درصد اضافه شد. چند بار با سمپلر به‌خوبی هم زده شد تا رنگ‌های متصل به چاهک که بیانگر میزان تشکیل بیوفیلیم است، به‌خوبی حل شود. پس از یکنواخت شدن محلول چاهک‌ها، میزان جذب در ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا قرائت شد [۱۸].

آنالیز آماری

برای گزارش اطلاعات توصیفی از رسم نمودار، برای گزارش متغیرهای کیفی از فراوانی (درصد) و برای گزارش متغیرهای کمی از میانگین (انحراف معیار) استفاده شد. همچنین، به‌منظور مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری (میلی متر) هاله عدم رشد میکروارگانسیم در گروه‌های مورد بررسی، از آزمون کروسکال والیس استفاده شد. در تمام آزمون‌ها، سطح معناداری ۵ درصد در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در نرم‌افزار SPSS 22 به انجام رسید.

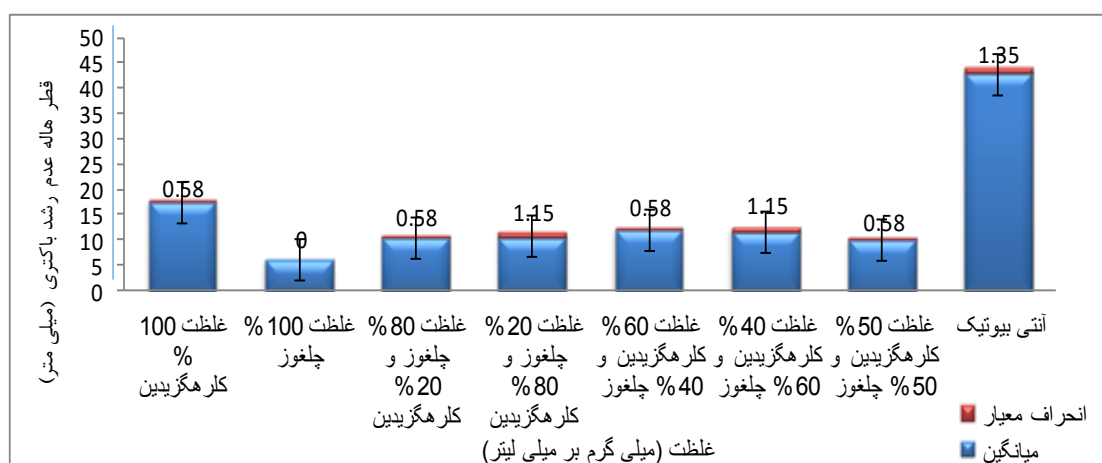
توسط یک پیپت پاستور استریل که مخصوص ایجاد چاهک است، یک حفره در محیط کشت تریپتیک سوی آگار آغشته به باکتری *استریپتوکوکوس موتانس* و قارچ *کاندیدا آلیکنس* ایجاد شد و جداگانه داخل هر چاهک با سمپلر ۵۰ لاندا از غلظت‌های مختلف دهان‌شویه کلرهگزیدین و عصاره اتانولی گیاه چلغوز (۲۰-۸۰، ۴۰-۶۰، ۵۰-۵۰، ۴۰-۶۰، ۲۰-۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر) افزوده شد. سپس، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. پس از آن، میزان مناطق مهاری مدنظر بر اساس میلی‌متر محاسبه شد. چاهک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و ضدقارچ نیستاتین کنترل مثبت و چاهک‌های حاوی مایع دی‌متیل‌سولفوکساید کنترل منفی در نظر گرفته شدند [۱۷].

روش انتشار از دیسک

دیسک آغشته به ۵۰ لاندا از غلظت‌های مختلف دهان‌شویه و عصاره (۲۰-۸۰، ۴۰-۶۰، ۵۰-۵۰، ۴۰-۶۰، ۲۰-۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و ضدقارچ نیستاتین به‌عنوان کنترل مثبت و دیسک حاوی دی‌متیل‌سولفوکساید به‌عنوان کنترل منفی، به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفتند تا خشک شوند. سپس روی محیط کشت در فواصل مناسب قرار داده شدند و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند در فواصل مناسب قرار داده شدند. در ادامه، اثر ترکیب حاوی عصاره و دهان‌شویه با دیسک آنتی‌بیوتیک مقایسه شد [۱۷].

مانعت از تشکیل بیوفیلیم

ابتدا ۱۸۰ میکرولیتر از محیط کشت تریپتیک سوی براث داخل چاهک‌های میکروتیرپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. چاهک اول محیط کشت بدون عصاره به‌عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. در چاهک‌های بعدی، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف ترکیب به‌دست‌آمده به محیط کشت اضافه شد. یک چاهک هم به‌عنوان شاهد منفی بدون عصاره و باکتری در نظر گرفته شد. پس از کشت ۲۴ ساعته



نمودار ۱. توزیع اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف ترکیب دهان‌شویه کلرهگزیدین و عصاره اتانولی گیاه چلغوز و گروه کنترل در باکتری *استریپتوکوکوس موتانس* در روش انتشار دیسک

یافته‌ها

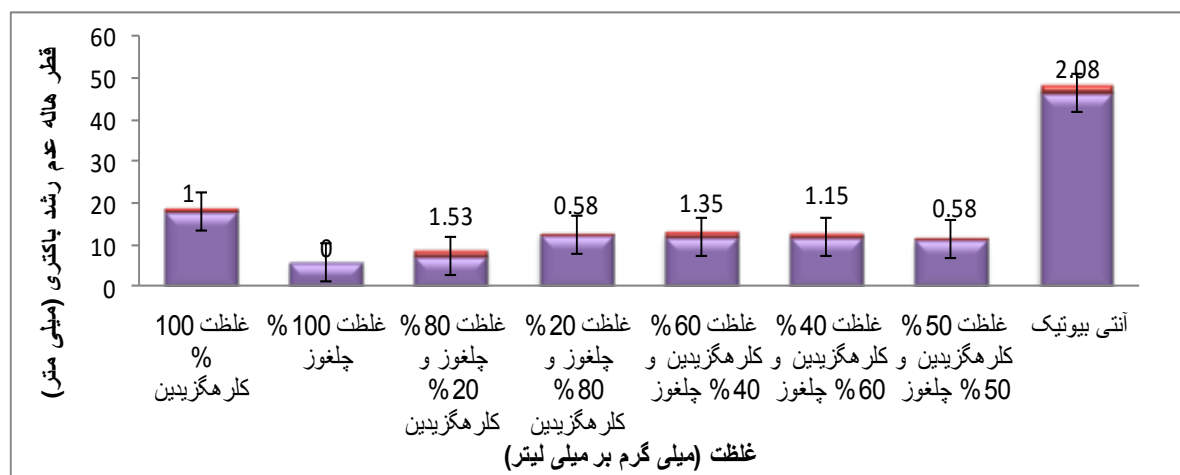
نتایج آزمون کروسکال‌والیس در استفاده از روش دیسک نشان داد که آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و غلظت ۱۰۰ درصد دهان‌شویه کلرهگزیدین بیشترین تأثیر ضدباکتریایی را با اندازه هاله عدم رشد ۴۲/۶۷ و ۱۷/۳۳ میلی‌متر علیه باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* دارند. غلظت ۱۰۰ درصد عصاره اتانولی اندام هوایی گیاه دارویی چلغوز کمترین تأثیر ضدباکتریایی را علیه این باکتری داشت (نمودار ۱).

همچنین، نتایج استفاده از روش چاهک پلیت نشان داد که با کاهش غلظت کلرهگزیدین و افزایش غلظت گیاه، میزان اثر به‌تدریج کاهش پیدا می‌کند (نمودار ۲). در هر دو روش نتایج نشان داد که تفاوت آماری معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف ترکیب با یکدیگر و با آنتی‌بیوتیک وجود دارد ($P \leq 0.05$).

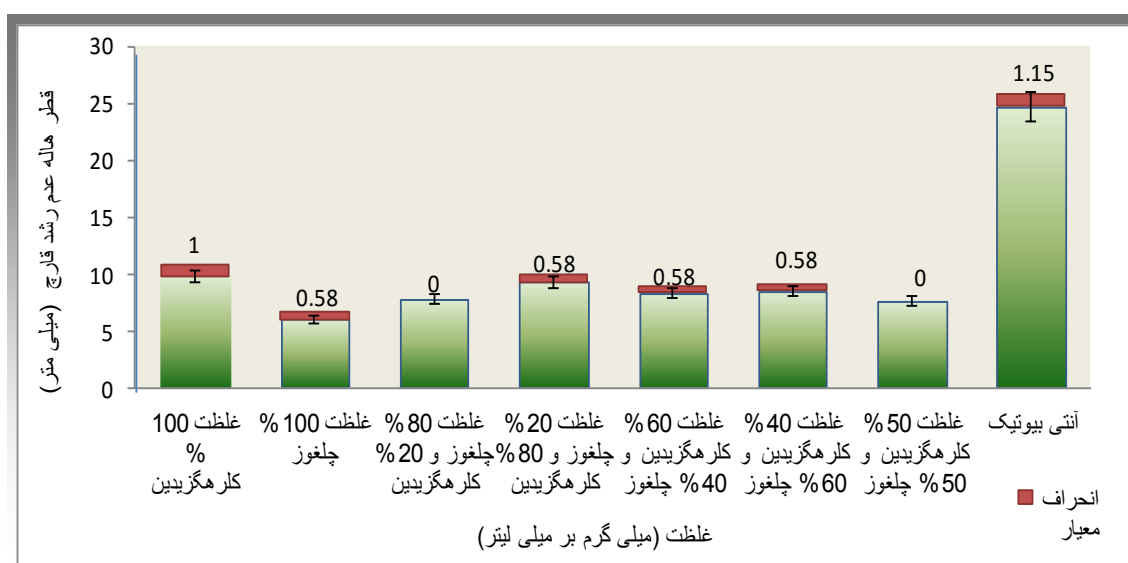
در روش انتشار از دیسک و چاهک پلیت، ضدقارچ نیستاتین و غلظت ۱۰۰ درصد دهان‌شویه کلرهگزیدین بیشترین تأثیر را علیه قارچ کاندیدا/

آلبیکنس (به‌ترتیب با اندازه هاله ۲۴/۶۷ و ۹/۸ میلی‌متر در روش انتشار از دیسک و ۳۲/۳۳ و ۹/۳۳ میلی‌متر در چاهک پلیت) نشان دادند که در روش دیسک، تفاوت آماری معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف با یکدیگر و با آنتی‌بیوتیک وجود داشت ($P \leq 0.05$), ولی در روش چاهک این تفاوت معنادار مشاهده نشد ($P \geq 0.05$). در روش انتشار از دیسک و چاهک پلیت، غلظت ۱۰۰ درصد عصاره اتانولی اندام هوایی گیاه دارویی چلغوز با اندازه هاله ۶ و ۶/۰۱ میلی‌متر، کمترین تأثیر ضدقارچی را داشت (نمودار ۳ و ۴).

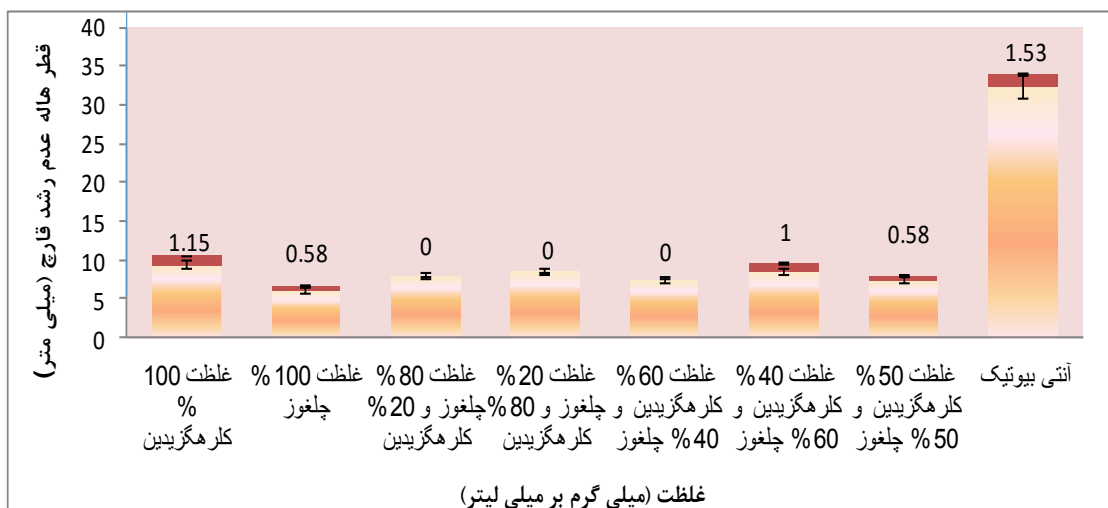
نتایج به‌دست‌آمده در مورد اثر ممانعت از تشکیل بیوفیلم قارچ کاندیدا/ *آلبیکنس* و باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* در غلظت‌های مختلف ترکیب دهان‌شویه کلرهگزیدین و عصاره اتانولی اندام هوایی گیاه دارویی چلغوز در نمودار ۵ و ۶ مشاهده می‌شود. نتایج این بررسی نشان داد که غلظت ۱۰۰ درصد دهان‌شویه کلرهگزیدین از تشکیل بیوفیلم کاندیدا/ *آلبیکنس* و *استرپتوکوکوس موتانس* جلوگیری می‌کند.



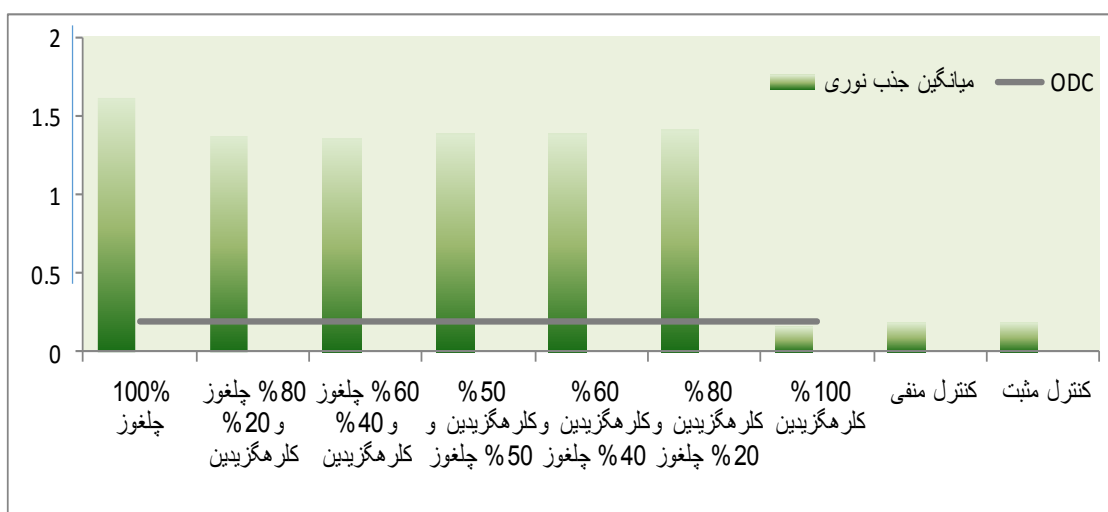
نمودار ۲. توزیع اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف ترکیب دهان‌شویه کلرهگزیدین و عصاره اتانولی گیاه چلغوز و گروه کنترل در باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* با روش چاهک پلیت



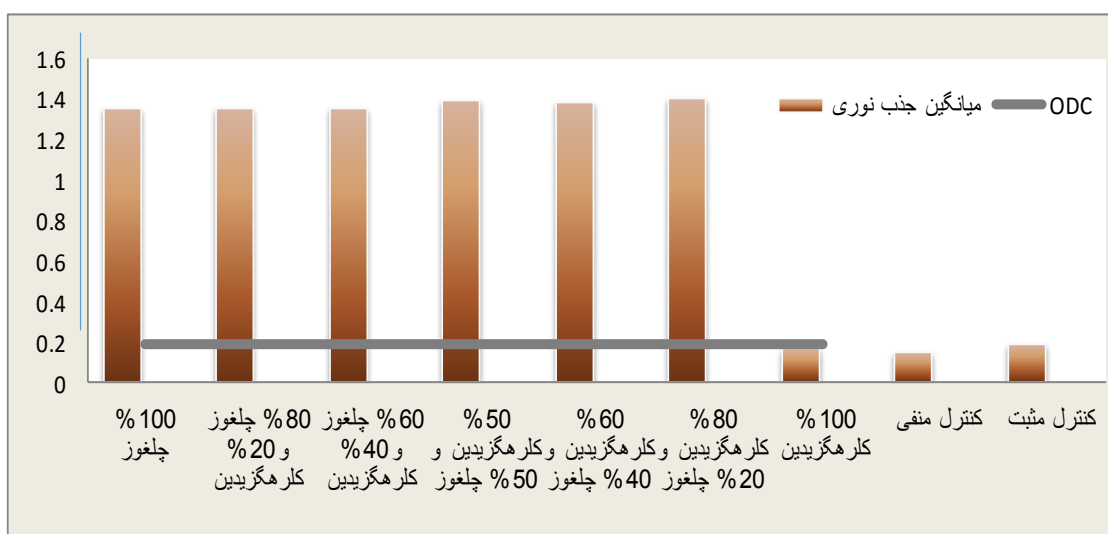
نمودار ۳. توزیع اثر ضدقارچی غلظت‌های مختلف ترکیب دهان‌شویه کلرهگزیدین و عصاره اتانولی گیاه چلغوز و گروه کنترل در قارچ کاندیدا/ *آلبیکنس* با روش انتشار دیسک



نمودار ۴. توزیع اثر ضدقارچی غلظت‌های مختلف ترکیب دهان‌شویه کلرهگزیدین و عصاره اتانولی گیاه چلغوز و گروه کنترل در قارچ کاندیدا/آلبیکس با روش چاک پلین



نمودار ۵. توزیع اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف ترکیب دهان‌شویه کلرهگزیدین و عصاره اتانولی گیاه چلغوز و گروه‌های کنترل بر جذب نوری استرپتوکوکوس موتانس با روش بیوفیلم



نمودار ۶. توزیع اثر ضدقارچی غلظت‌های مختلف ترکیب دهان‌شویه کلرهگزیدین و عصاره اتانولی گیاه چلغوز و گروه‌های کنترل بر جذب نوری کاندیدا/آلبیکس با روش بیوفیلم

بحث

کلرهگزیدین نسبت به دیگر دهان‌شو‌ه‌های رایج احتمالاً به‌علت مکانیسم عمل این ترکیب کاتیونی است که قدرت تخریب غشا را دارد و به همین دلیل، می‌تواند به مهار رشد یا مرگ سلولی منجر شود. همچنین، مهار آنزیم‌های پروتئولیتیک و گلیکوزیدیک توسط این ماده از اهمیت خاصی برخوردار است. ماهیت کاتیونی این ترکیب سبب اتصال آن به سطوح دندان و مخاط دهان می‌شود و با کاهش تشکیل پلک‌های همراه خواهد شد [۲۵، ۲۶]. همچنین، یون‌های مثبت کلرهگزیدین یون‌های منفی دیواره‌های سلولی استرپتوکوک‌های بیماری‌زا را جذب می‌کند و این باعث تخریب دیواره‌های سلولی میکروارگانیسم می‌شود [۲۷]. در عین‌اینکه کلرهگزیدین مزایای زیادی دارد، معایبی نیز دارد: رنگ‌پذیری دندان‌ها هنگام استفاده طولانی‌مدت از آن، طعم تلخ و مؤثر نبودن بر باسیل‌های مقاوم به اسید و الکل [۲۸].

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره‌های اتانولی گیاه دارویی چلغوز بر باکتری پاتوژن دهانی/استرپتوکوکوس موتانس و قارچ کاندیدا/آلبیکنس اثر مهارکنندگی رشد درخورد ملاحظه‌ای در مقایسه با دهان‌شو‌ه تجاری کلرهگزیدین ندارد؛ لذا تحقیق درباره استفاده از سایر حلال‌های قطبی و غیرقطبی به‌منظور عصاره‌گیری و استخراج مواد مؤثر گیاهی پیشنهاد می‌شود. همچنین، انجام بررسی‌ها و مطالعات بیشتری در خصوص بررسی اثرات گیاهان دارویی مختلف بر این باکتری‌ها توصیه می‌شود تا بتوان به ترکیب گیاهی مؤثری دست پیدا کرد که فاقد عوارض و اثرات جانبی باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از پرسنل محترم مرکز تحقیقات فراورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی که در این راه هدایتگر بنده بودند، کمال تشکر را دارم.

تعارض منافع

بنا بر اظهار نویسندگان، در این مقاله، تعارض منافع وجود ندارد.

References

- Wu CD. Grape products and oral health. J Nutr. 2009; 139(9):1818S-23S. DOI: 10.3945/jn.109.107854 PMID: 19640974
- Hala EA. Inhibitory effect of grape seed extract (GSE) on cariogenic bacteria. J Med Plants Res. 2012;6(34):4883-91. DOI: 10.5897/JMPRI2.1011
- Roberson T, Heymann HO, Swift Jr. Sturdevant's art and science of operative dentistry: Elsevier Health Sciences; 2006. [Link]
- Kleinberg I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to Streptococcus mutans and the specific-plaque hypothesis. Crit Rev Oral Biol Med. 2002;13(2):108-25. DOI: 10.1177/154411130201300202 PMID: 12097354
- Smullen J, Finney M, Storey DM, Foster HA. Prevention of artificial dental plaque formation in vitro by plant extracts. J Appl Microbiol. 2012;113(4):964-73. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05380.x PMID: 22747830
- Han Y. Synergic effect of grape seed extract with amphotericin B against disseminated candidiasis due to Candida albicans. Phytomed. 2007;14(11):733-8. DOI: 10.1016/j.phymed.2007.08.004 PMID: 17913484
- Kshitiz P, Shipra Z, Rani S, Jayanti S. Anti-cariogenic effects of polyphenol plant products-a review. Int J Res Ayurveda Pharm. 2011;2(3):736-42. [Link]
- Zhao W, Xie Q, Bedran-Russo AK, Pan S, Ling J, Wu CD. The preventive effect of grape seed extract on artificial enamel caries progression in a microbial biofilm-induced caries model. J Dent. 2014;42(8):1010-8. DOI: 10.1016/j.jdent.2014.05.006 PMID: 24863939
- Casaroto AR, Lara VS. Phytomedicines for Candida-associated denture stomatitis. Fitoterapia. 2010;81(5):323-8. DOI: 10.1016/j.fitote.2009.12.003 PMID: 20026192
- Ghassemi Dehkordi N, Sajjadi S, Ghannadi A, Amanzadeh Y, Azadbakht M, Asghari G. Iranian Herbal Pharmacopoeia (IHP). Hakim RJ. 2003;6(3):63-9. [Link]

11. Singh G, Kumar D, Dash AK. *Pinus gerardiana* Wallichex. D. Don- .A Review. *Phytomedicine Plus*. 2021;1(1):1-10. **DOI:** [10.1016/j.phyplu.2021.100024](https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100024)
12. Sharma A, Goyal R, Sharma L. Potential biological efficacy of *Pinus* plant species against oxidative, inflammatory and microbial disorders. *BMC Complement Altern Med*. 2016;28:16-35. **DOI:** [10.1186/s12906-016-1011-6](https://doi.org/10.1186/s12906-016-1011-6) **PMID:** [26822870](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26822870/)
13. Rehman AU, Naz S, Zaman M, Saeed-ul-Hassan S, Iqbal J, Zaidi AA. A preliminary investigation of in vitro anti-thrombotic and anti-platelet activity of *Pinus Gerardiana*. *Biomed Res Ther*. 2017;4(1):1098-1109. **DOI:** [10.15419/bmrat.v4i1.145](https://doi.org/10.15419/bmrat.v4i1.145)
14. Alfahdawi I, Alsewidi W, Jaber S. Comparing the Inhibitory effectiveness of *Salvia Officinalis* extracts and chlorhexidine (chx) mouthwash on some oral bacterial species. *Lat Am J Pharm*. 2021; 40:210-5. [[Link](#)]
15. Eghbal H, Mohammadi A, Mohammad Nejad Khiavi N, Jahani N. Study of antibacterial effect of *Salvia officinalis* essence and comparison with chlorhexidine on some of bacterial agents of the oral cavity. *J Neyshabur Univ Med Sci*. 2021; 9(1):94-104. [[Link](#)]
16. Pathan MM, Bhat KG, Joshi VM. Comparative evaluation of the efficacy of a herbal mouthwash and chlorhexidine mouthwash on select periodontal pathogens: An in vitro and ex vivo study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2017;21(4):270-5. **DOI:** [10.4103/jisp.jisp_382_16](https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_382_16) **PMID:** [29456300](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29456300/)
17. Zarghami Moghaddam P, Mohammadi A, Feyzi P, Alesheikh P. In vitro antioxidant and antibacterial activity of various extracts from exocarps and endocarps of walnut. *Pak J Pharm Sci*. 2017;30(5):1725-31. **PMID:** [29084695](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29084695/)
18. Abrishami MR, Alesheikh P, Gharaei S, Norozi Khalili M, Saadat Khaje M, et al. Synergistic effect of methanolic extracts of *Rosmarinus Officinalis* and eugenicyophyllataon biofilm of oral pathogenic bacteria. *J North Khorasan Univ Med Sci*. 2020;12(3):1-9. **DOI:** [10.52547/nkums.12.3.1](https://doi.org/10.52547/nkums.12.3.1)
19. Ribeiro LG HL, Maltz M. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity: A systematic review of the literature. *J Dent*. 2007;35(5):359-70. **DOI:** [10.1016/j.jdent.2007.01.007](https://doi.org/10.1016/j.jdent.2007.01.007) **PMID:** [17391828](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17391828/)
20. Kulkarni VV, SG D. Comparative evaluation of efficacy of sodium fluoride, Chlorohexidine and triclosan mouth rinses in reducing the mutans streptococci count in saliva: An in vivo study. *J Indian SocPedoPrev Dent*. 2003;21(3):98-104. **PMID:** [14703215](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14703215/)
21. Yassaei S, Nasr A, Zandi H, Motallaei MN. Comparison of antibacterial effects of orthodontic composites containing different nanoparticles on *Streptococcus mutans* at different times. *Dental Press J Orthod*. 2020;25(2):52-60. **DOI:** [10.1590/2177-6709.25.2.052-060.oar](https://doi.org/10.1590/2177-6709.25.2.052-060.oar) **PMID:** [32490920](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32490920/)
22. Shahriari M, Shafiei G. Comparison of the effect of chamomile flower mouthwash with chlorhexidine on stomatitis caused by chemotherapy and radiation therapy. *J Birjand Univ Med Sci*. 2021;28(2):106-19. **DOI:** [10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.2.101](https://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.2.101)
23. Stabholz A, Soskolne WA, Friedman M, Sela MN. The use of sustained release delivery of chlorhexidine for the maintenance of periodontal pockets: 2-year clinical trial. *J Periodontol*. 1991;62(7):429-33. **DOI:** [10.1902/jop.1991.62.7.429](https://doi.org/10.1902/jop.1991.62.7.429) **PMID:** [1920009](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1920009/)
24. Penmetsa GS, Subbareddy B, Mopidevi A, Arunbhupathi P, Baipalli V, et al. Comparing the effect of combination of 1% ornidazole and 0.25% chlorhexidine gluconate (Ornigreat™) gel and Aloe Vera gel in the treatment of chronic periodontitis: A randomized, single-blind, split-mouth study. *J Contemp Dent Pract*. 2019;10(2):226-31. **DOI:** [10.4103/ccd.ccd_407_18](https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_407_18) **PMID:** [32308282](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32308282/)
25. Rosin M, Welk A, Kocher T, Majic-Todt A, Kramer A, Pitten FA. The effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse compared to an essential oil rinse and a chlorhexidine rinse on bacterial counts and 4-day plaque regrowth. *J Clin Periodontol*. 2002;29:392-9. **DOI:** [10.1034/j.1600-051x.2002.290503.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2002.290503.x) **PMID:** [12060421](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12060421/)
26. Shapiro S, Giertsens E, Guggenheim B. An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Res*. 2002;36(2):93-100. **DOI:** [10.1159/000057866](https://doi.org/10.1159/000057866) **PMID:** [12037365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12037365/)
27. Haghighati F JS, Momen Beitollahi J. Comparison of antimicrobial effects of ten herbal extracts with Chlorhexidine on three different oral pathogens: An in vitro study. *Hakim Res J*. 2003;3:71-6. [[Link](#)]
28. Pretti H, Barbosa GL, Lages EM, Gala-García A, Magalhães CS, Moreira AN. Effect of chlorhexidine varnish on gingival growth in orthodontic patients: a randomized prospective split-mouth study. *Dental Press J Orthod*. 2015;20(5):66-71. **DOI:** [10.1590/2177-6709.20.5.066-071.oar](https://doi.org/10.1590/2177-6709.20.5.066-071.oar) **PMID:** [26560823](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26560823/)