

تعیین حداقل غلظت مهاري (MIC) دو نوع عصاره گیاهی بر استرپتوکوک‌های عامل پوسیدگی دندان

دکتر مریم خروشی^۱ - دکتر محمد ربانی خوراسگانی^۲ - اعظم علی اصغری^{۳†}

- ۱- استاد گروه آموزشی دندانپزشکی ترمیمی و زیبایی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اصفهان، اصفهان، ایران؛ عضو مرکز تحقیقات مواد دندان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اصفهان، اصفهان، ایران
- ۲- دانشیار گروه آموزشی زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
- ۳- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه آموزشی زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of two plants extract on cariogenic streptococci

Maryam Khoroushi¹, Mohammad Rabbani Khorasgani², Azam Aliasghari^{3†}

- 1- Professor, Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Member of Dental Materials Research Center, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
- 2- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Isfahan, Isfahan, Iran
- 3[†]- Graduate Student, Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Isfahan, Isfahan, Iran (aliasgharya@ymail.com)

Background and Aims: Tooth decay has high prevalence in the world. The use of plant material for the prevention and treatment of this disease for various reasons is considered, due to the increasing resistance of bacteria to antibiotics, the high cost and adverse effects of some chemicals used in dentistry. This study was aimed to determine the antimicrobial effect of alcoholic extract of Pepper (*Capsicum annuum*) and eggplant skin and cap on the cariogenic streptococci.

Materials and Methods: In this study, the antimicrobial activity of ethanol extract of *Capsicum annuum* and eggplant skin and cap on the cariogenic streptococci, including *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, and *Streptococcus sanguis* by microtitre plate method for MIC (Minimum Inhibitor Concentration) was performed. Data were analyzed by one-way analysis of variance using Prism 5 Graph Pad software.

Results: MIC for the *Capsicum annuum* and eggplant skin for *Streptococcus mutans* was 250 mg/ml (SD=0.052), and for the *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus sanguis* was 125 mg/ml (SD=0.027). The MIC for the cap eggplant for *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* was 500 mg/ml (SD=0) and for *S. sanguis* was getting 125 mg/ml (SD=0.159).

Conclusion: This study showed that the herbal extracts of *Capsicum annuum* and eggplant skin and cap had beneficially antimicrobial effects on all three strains of cariogenic streptococci.

Key Words: Dental caries, Minimum inhibitory concentration, *Capsicum annuum*, *Solanum melongena*

Journal of Dental Medicine-Tehran University of Medical Sciences 2017;30(1):12-17

† مؤلف مسؤول: نشانی: اصفهان- خیابان هزار جریب- دانشگاه اصفهان- دانشکده علوم- گروه آموزشی زیست شناسی
تلفن: ۳۷۹۳۲۴۶۹ نشانی الکترونیک: aliasgharya@ymail.com

چکیده

زمینه و هدف: پوسیدگی دندان از بیماری‌هایی است که شیوع بالا در جهان دارد. استفاده از مواد گیاهی برای پیشگیری و درمان این بیماری به دلایل مختلف از جمله افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، هزینه بالا و اثرات نامطلوب بعضی از مواد شیمیایی استفاده شده در دندانپزشکی مورد توجه قرار گرفته است. این مطالعه با هدف بررسی تعیین اثر ضد میکروبی عصاره الکلی فلفل دلمه‌ای قرمز، پوست و کلاهدک بادمجان بر استرپتوکوک‌های پوسیدگی‌زا انجام گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه آزمایشگاهی، اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی فلفل دلمه‌ای قرمز، پوست و کلاهدک بادمجان بر روی مهم‌ترین استرپتوکوک‌های عامل پوسیدگی دندان شامل استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس سوبرینوس و استرپتوکوکوس سنگوئیس به روش میکروتیتر پلیت برای تعیین MIC (Minimum Inhibitory Concentration) (حداقل غلظت ممانعت از رشد) انجام گرفت. نتایج توسط آزمون واریانس یک طرفه در نرم‌افزار Prism 5 Graph Pad تجزیه و تحلیل شد ($P < 0.05$).

یافته‌ها: میزان MIC در مورد فلفل دلمه‌ای و پوست بادمجان برای استرپتوکوکوس موتانس ($SD = 0.052$) و 250 mg/ml و برای استرپتوکوکوس سوبرینوس و استرپتوکوکوس سنگوئیس ($SD = 0.027$) و 125 mg/ml و در مورد کلاهدک بادمجان برای استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس ($SD = 0$) 500 mg/ml و استرپتوکوکوس سنگوئیس ($SD = 0.159$) 125 mg/ml به دست آمد.

نتیجه‌گیری: این پژوهش نشان داد عصاره‌های گیاهی فلفل دلمه‌ای و پوست و کلاهدک بادمجان اثرات ضد میکروبی مطلوبی بر روی هر سه سوبه استرپتوکوک عامل پوسیدگی دندان دارند.

کلید واژه‌ها: پوسیدگی دندان، حداقل غلظت مهاری، فلفل دلمه‌ای، بادمجان

وصول: ۹۵/۰۴/۲۲ اصلاح نهایی: ۹۶/۰۱/۱۹ تأیید چاپ: ۹۶/۰۱/۲۳

مقدمه

گیاه درمانی از زمان‌های گذشته برای درمان بیماری‌های گوناگون به ویژه بیماری‌های عفونی مورد توجه بوده است. در حال حاضر نیز توجه جهانی به سمت داروهای گیاهی و فاصله گرفتن از داروهای شیمیایی قرار گرفته است. مطالعات فراوانی نیز در حوزه دندانپزشکی برای مقابله با پوسیدگی دندان با استفاده از مواد طبیعی و گیاهان دارویی مختلف و جداسازی عصاره‌های آن‌ها انجام شده و در حال انجام است. برخی مطالعات نشان داده‌اند که گیاهان حاوی ترکیبات فیتوشیمیایی مانند فلاونوئیدها و دیگر پلی‌فنول‌ها، ترپن‌ها، آلکالوئیدها و قندهای الکلی مانند زایلیتول، دارای فعالیت ضد میکروبی علیه میکروب‌های دهانی می‌باشند (۵).

فلفل دلمه‌ای (*Capsicum annuum*)، گیاهی یکساله از خانواده Solonaceae بوده که دارای خواص دارویی ارزشمندی می‌باشد و کاربردهای فراوانی در بیماری‌های مختلف از جمله فشارخون بالا، بیماری‌های قلبی، چاقی، دیابت و افزایش اشتها دارد (۶،۷). گزارشاتی در مورد اثرات ضد میکروبی فلفل انتشار یافته (۸) اما یافته تحقیقی اندکی در مورد اثر ضد میکروبی این گیاه علیه باکتری‌های دهانی به ویژه استرپتوکوک‌های عامل پوسیدگی دندان وجود دارد (۹).

بادمجان (*Eggplant*) با نام علمی *Solanum melongena* L، گیاهی است از خانواده Solanaceae منبع غنی از فیبر غذایی،

پوسیدگی دندان یکی از بیماری‌های عفونی رایج در میان انسانهاست که مخصوصاً در گروه‌های دارای موقعیت اجتماعی و اقتصادی پایین وجود دارد (۱). استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس از گروه موتانس به عنوان عوامل اصلی اتیولوژیکی پوسیدگی دندان در انسان در نظر گرفته می‌شوند. این باکتری‌ها به عنوان رایج‌ترین پاتوژن‌هایی هستند که از پلاک دندان انسان جدا می‌شوند و شیوع آن‌ها در مطالعات اپیدمیولوژیک گزارش شده است (۲). استرپتوکوکوس سنگوئیس نیز از دیگر استرپتوکوک‌های غالب در پلاک دندانی انسان است و از اولین میکروارگانیسم‌هایی است که روی پلاک دندان کلونیزه می‌شود. این باکتری حتی در غیاب تخمیر کربوهیدرات با هیدرولیز آرژینین می‌تواند فعال بماند (۳).

مواد شیمیایی گوناگونی برای پیشگیری و درمان پوسیدگی دندان به صورت تجاری در دسترس هستند اما این‌ها می‌توانند باعث تغییر میکروبیوم دهان شوند و عوارض ناخواسته ای مانند اسهال، استفراغ و تغییر رنگ دندان‌ها را ایجاد کنند (۴).

با توجه به موارد فوق استفاده از ترکیبات طبیعی به خصوص گیاهان برای پیشگیری، کنترل و درمان پوسیدگی دندان مد نظر قرار گرفته است.

تا کاملاً خشک شود. سپس از هر کدام از عصاره‌ها محلول ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد (۱۳).

تعیین MIC (Minimum Inhibitor Concentration)

از کشت تازه استرپتوکوک‌ها در محیط آبگوشت تریپتوز سوی براث (TSB; Quelab, Montreal, Canada) کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه و به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد، تا کدورتی معادل 1×10^6 به دست آید. از عصاره‌های مورد آزمایش استریل شده با فیلتر سرسرنگی با قطر منفذ ۰/۴۵ رقت‌های مختلف (Serial dilutions) در محیط براث تهیه شد. سپس در پلیت ۹۶ خانه پلی استایرن ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره که حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون باکتری است ریخته شد (۱۴). همچنین چاهک‌هایی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط براث به عنوان کنترل منفی و چاهک‌هایی حاوی محیط کشت و باکتری به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. چاهک‌هایی نیز به عنوان شاهد کدورت حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر محیط و ۱۰۰ میکرو لیتر از هر رقت در نظر گرفته شد. برای هر باکتری سه بار تکرار در نظر گرفته شد. سپس سطح پلیت‌ها پوشیده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد درون جار بی‌هوازی انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت کدورت در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط الایزا ریدر (AWARENESS, TechnilogyINC, Atat fax 2100) خوانده شد.

MIC به عنوان کمترین غلظتی از مواد که باعث کاهش ۹۰ درصدی کدورت در مقایسه با گروه کنترل شده بود در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها (آنالیز واریانس یک طرفه، آزمون توکی) و رسم نمودارها با نرم‌افزار Prism 5 Graph Pad انجام شد. سطح معنی‌داری داده‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه حداقل غلظت ممانعت از رشد هر سه عصاره بر علیه سه سویه استرپتوکوک عامل پوسیدگی دندان مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است. در مورد فلفل دلمه‌ای و پوست بادمجان کمترین MIC بر روی استرپتوکوکوس سوپربینوس و استرپتوکوکوس سنگوئیس با میزان ۱۲۵ mg/ml و بیشترین MIC با میزان ۲۵۰ mg/ml در مورد استرپتوکوکوس موتانس به دست آمد. این

ویتامین B1، ویتامین B6، پتاسیم، منگنز، فولات و نیاسین می‌باشد (۱۰). بادمجان در طب سنتی برای درمان کم خونی، کاهش ورم و التهاب، توقف خونریزی روده، جلوگیری از سکته قلبی، اثر ضد سم قارچ و مسهل توجه شده است (۷،۱۱). در مورد اثر ضد میکروبی بادمجان گزارشاتی موجود است (۱۱،۱۲) اما گزارشی مبنی بر بررسی تأثیر این گیاه علیه میکروب‌های دهانی مشاهده نشد. این پژوهش آزمایشگاهی با هدف بررسی تأثیر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف عصاره الکلی پوست و کلاهک بادمجان و فلفل دلمه‌ای بر روی سه گونه از مهم‌ترین استرپتوکوک‌های عامل پوسیدگی دندان شامل استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس سوپربینوس و استرپتوکوکوس سنگوئیس انجام گرفت.

روش بررسی

تهیه سویه‌های میکروبی

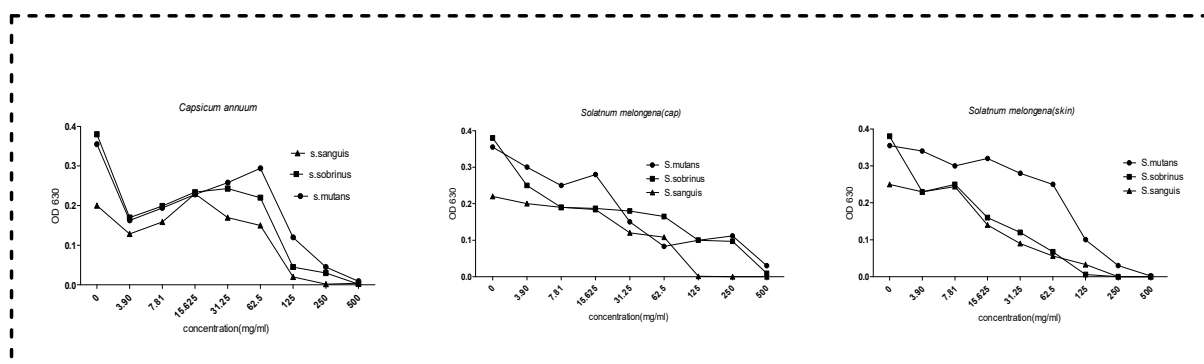
سه سویه استاندارد استرپتوکوکوس موتانس (ATCC 35668)، استرپتوکوکوس سوپربینوس (ATCC 27607) و استرپتوکوکوس سنگوئیس (PTCC 1449) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه خریداری شد. برای تأیید این سویه‌ها چند آزمایش تأییدی مانند رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، همولیز، کشت در محیط میتیس سالیواریس آگار و تخمیر قند انجام گرفت.

روش تهیه عصاره

جهت انجام آزمایش در این پژوهش، میوه فلفل دلمه‌ای قرمز، همچنین پوست و کلاهک بادمجان در سایه خشک شدند. سپس با آسیاب پودر شده و ۵۰ گرم از پودرهای حاصله به دقت توسط ترازوی دیجیتال توزین شد و سپس درون ارلن قرار گرفته و روی هر نمونه حلال اتانول ۵۰٪ ریخته تا کاملاً پودر را بپوشاند. بعد از پوشاندن سر ارلن‌ها با ورقه آلومینیومی به مدت ۴۸-۷۲ ساعت روی دستگاه shaker با دور ۹۰ دور دقیقه قرار گرفتند. بعد از همگن شدن حلال و گیاه توسط کاغذ صافی صاف شد. سپس عصاره در دستگاه روتاری (Rotary Evaporator) (شرکت Heidolph آلمان) قرار گرفت تا حلال از عصاره جدا شود. سپس در آون در دمای ۴۰ درجه قرارداده شد

میزان در دو باکتری استرپتوکوکوس سوبرینوس و استرپتوکوکوس سنگوئیس به طور معنی‌دار از باکتری استرپتوکوکوس موتانس کمتر بود
جدول ۱- میزان MIC های عصاره الکی گیاهان مورد آزمایش بر روی سه سویه استرپتوکوک دهانی

| MIC (mg/ml) | | | |
|---------------------|-----------------------|----------------------|-------------------|
| استرپتوکوکوس موتانس | استرپتوکوکوس سوبرینوس | استرپتوکوکوس سنگوئیس | |
| ۵۰۰ | ۵۰۰ | ۱۲۵ | کلاهیک بادمجان |
| ۲۵۰ | ۱۲۵ | ۱۲۵ | فلفل دلمه‌ای قرمز |
| ۲۵۰ | ۱۲۵ | ۱۲۵ | پوست بادمجان |



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره الکی فلفل دلمه‌ای قرمز، پوست و کلاهیک بادمجان بر سه سویه استرپتوکوک عامل پوسیدگی دندان
منحنی X= رقت‌های مختلف عصاره‌های الکی گیاهان مورد آزمایش، منحنی Y= جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) با وجود پیشرفت‌های زیاد در بهداشت دهانی مردم در سراسر جهان، مشکل پوسیدگی دندان همچنان باقی مانده است و به ویژه در گروه‌های محروم اجتماعی هم در کشورهای پیشرفته و هم در حال پیشرفت وجود دارد به گونه‌ای که طبق گزارش این سازمان در سال ۲۰۰۳، پوسیدگی دندان ۶۰ تا ۷۰ درصد کودکان در سنین مدرسه و اکثریت بزرگسالان را تحت تأثیر قرار داده است (۱۵). این بیماری نه تنها باعث درد و ناراحتی می‌شود، بلکه سبب تحمیل بار مالی قابل توجهی به خانواده‌ها می‌گردد (۱۶). نیاز جهانی به جایگزینی مواد یا روش‌های بی‌خطر، مؤثر و مقرون به صرفه پیشگیری و درمان بیماری‌های دهانی به دلیل شیوع این بیماری به ویژه در کشورهای در حال توسعه و مقاومت میکروب‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمی درمانی بخوبی احساس می‌شود (۱۷). گیاهان می‌توانند به عنوان یک جایگزین درمانی مهم در نظر گرفته شوند چرا که در بسیاری از موارد آن‌ها در مقایسه با

($P < 0.05$). در مورد کلاهیک بادمجان کمترین MIC مربوط به استرپتوکوکوس سنگوئیس با میزان ۱۲۵ mg/ml و بیشترین آن مربوط به استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس با میزان ۵۰۰ mg/ml بدست آمد. که کاهش معنی‌داری را در میزان MIC استرپتوکوکوس سنگوئیس نسبت به دو باکتری دیگر نشان می‌دهد ($P < 0.05$). میزان MIC کلاهیک بادمجان در دو باکتری استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سوبرینوس نسبت به فلفل دلمه‌ای و پوست بادمجان بیشتر است ($P < 0.05$). اما در استرپتوکوکوس سنگوئیس اختلاف معنی‌داری بین سه عصاره مشاهده نشد ($P > 0.05$). در مورد میزان MIC فلفل دلمه‌ای و پوست بادمجان در مورد هر سه باکتری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$) (شکل ۱).

بحث و نتیجه‌گیری

دارای بیشترین اثر ضد میکروبی با قطر هاله عدم رشد ۵۰ mm در *Trichophyton mentagrophytes* و ۳۰ mm در مورد *Candida albicans* می‌باشد.

Sharma و همکاران (۱۲) با بررسی اثر ضد قارچی برگ و ریشه‌های جوان عصاره‌های کلروفومی، متانولی و آبی سه عصاره گیاهی بادمجان، *Lawsonia inermis* L (حنا) و *Justicia gendarussa* علیه ۴ گونه قارچ درماتوفیتیک پرداختند و نشان دادند که عصاره کلروفومی بادمجان دارای بهترین اثر ضد میکروبی در بین سه عصاره مورد مطالعه، علیه پاتوژن‌های پوستی می‌باشد. این عصاره کلروفومی با غلظت ۱۰۰ mg/ml، بر علیه *Trichophyton mentagrophytes* با قطر هاله عدم رشد ۴۲ میلی متر و میزان MIC، ۱۲/۲۵-۳/۶ را نشان داد. نتایج مطالعه حاضر که می‌تواند اولین مطالعه در زمینه تأثیر ضد میکروبی عصاره الکی کلاهدک و پوست بادمجان و فلفل دلمه‌ای قرمز علیه استرپتوکوک‌های دهانی باشد، نشان داد که تأثیر ضد میکروبی فلفل دلمه‌ای قرمز و پوست بادمجان بر روی سه باکتری مورد مطالعه مناسب و مشابه می‌باشد و می‌تواند در کاهش خطر پوسیدگی دندان مؤثر باشد.

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

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری گروه محترم زیست‌شناسی دانشکده علوم و حمایت مالی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه اصفهان تشکر و قدردانی می‌شود.

داروهای سنتتیک ارزان تر هستند و اثرات جانبی کمتری دارند (۳). گیاه بادمجان که در مطالعه حاضر از آن استفاده شد، کاربردهای زیادی در طب سنتی دارد و استفاده سنتی از این گیاه عدم وقوع اثرات جانبی قابل توجهی را برای انسان نشان داده است (۱۱). فلفل منبعی غنی از ویتامین C و E همچنین ویتامین و کاروتنوئیدها که دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانسی هستند همچنین دارای فلاونوئید و ترکیبات فنولیک هستند (۱۸). تاکنون مطالعاتی در مورد اثر ضد میکروبی فلفل و بادمجان انجام شده که از آن جمله می‌توان به این موارد اشاره کرد. Dorantes و همکاران (۸) گزارش کردند که عصاره فلفل دلمه‌ای *Capsicum annuum* با استفاده از روش انتشار آگار دارای اثر مهاری بر روی باکتری‌های سالمونلا تیفی موریوم، لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، و باسیلوس سرئوس می‌باشد.

Santos و همکاران (۹) در مطالعه‌ای با بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتیل استات و کاپسایسین و دی‌هیدروکاپسایسین و مشتقات کاپسایسینوئید سنتتیک از میوه *Capsicum annuum* علیه استرپتوکوکوس موتانس حداقل غلظت ممانعت از رشد را در مورد عصاره اتیل استاتی ۲/۵ mg/mL و کاپسایسین و دی‌هیدروکاپسایسین را ۱/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش کردند.

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره الکی میوه فلفل دلمه‌ای دارای اثر ضد میکروبی علیه استرپتوکوکوس موتانس با حداقل غلظت ممانعت از رشد ۲۵۰ mg/mL و علیه استرپتوکوکوس سوبرینوس و استرپتوکوکوس سنگوئیس دارای MIC=۱۲۵ mg/mL می‌باشد.

شاید دلیل اینکه میزان MIC به دست آمده علیه استرپتوکوکوس موتانس در این مطالعه نسبت به مطالعه Santos بیشتر است این باشد که در این مطالعه از عصاره کامل استفاده شده که احتمالاً با جداسازی ترکیبات غیر مؤثر آن میزان MIC کاهش می‌یابد.

Das و همکاران (۱۱) با بررسی فعالیت ضد میکروبی برگ بادمجان علیه پاتوژن‌های درماتوفیت نشان دادند عصاره کلروفومی

منابع:

1- Curzon, M E, Preston AJ. Risk groups: nursing bottle caries/caries in the elderly. *Caries Res.* 2004;38(1):24-33.
2- Oda Y, Hayashi F, Okada M. Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in patients with intellectual disabilities. *BMC Oral Health.* 2015;15:102:1-5.

3- Fani MM, Bazargani A, Farboodniay Jahromi MA, Hasanpour Z. An in Vitro Study on the Antibacterial Effect of *Ferula Assa-Foetida* L. and *Quercus Infectoria* Olivier Extracts on *Streptococcus Mutans* and *Streptococcus Sanguis*. *Avicenna J Dent Res.* 2015;7(1):1-5.

- 4- Ayub F, Thomas B, Paualian B, Emil J. Herb and dental caries-a review. UJP. 2013;2(5):18-21.
- 5- 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. J Dent Tehran Univ Med Sci. 2015;28(2):122-31.
- 6- Otroushi M, Moradi K, Khayam Nekuei M. Micropropagation of Pepper (*Capsicum annuum* L.) Through in vitro. Iranian J Plant Bio. 2010;2(1):1-12.
- 7- Rahmatabadi MD, Anvari MO, Sadrabadi MR, Tafti HF, Zانباغ S, Yadegari SA. The effect of *Solanum melongena* L. hydro-alcoholic extract on chronic pain in male mice as compared with morphine. Iranian J Med Aroma Plants. 2009;25(1):129-38.
- 8- Dorantes L, Colmenero R, Hernandez H, Mota L, Jaramillo ME, Fernandez E, Solano C. Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annuum* extracts. Int J Food Microbiol. 2000;57:125-8.
- 9- Santos MM, Vieira-da-Motta O, Vieira IJ, Braz-Filho R, Gonçalves PS, Maria EJ, et al. Antibacterial activity of *Capsicum annuum* extract and synthetic capsaicinoid derivatives against *Streptococcus mutans*. J Nat Med. 2012;66(2):354-6.
- 10- Al-Janabi AA, Al-Rubeey SA. Detection of Antimicrobial Activity of *Solanum melongena* L. (Egg plant) Against Pathogenic Microorganisms. Pharm J. 2010;2(15):35-9.
- 11- Das J, Lahan JP, Srivastava RB. *Solanum melongena*: A potential source of antifungal agent. Indian J Microbiol. 2010;50(1):62-9.
- 12- Sharma KK, Saikia R, Kotoky J, Kalita JC, Devi R. Antifungal activity of *Solanum melongena* L, *Lawsonia inermis* L. and *Justicia gendarussa* B. against Dermatophytes. Int. J Pharm Tech Res. 2011;3(3):1635-40.
- 13- Kermanshah H, Hashemi Kamangar S, Arami S, Mirsalehian A, Kamalinejad M, Karimi M, et al. In vitro evaluation of antibacterial activity of hydroalcoholic extract of *Salvia officinalis* and *Pimpinella anisum* against cariogenic bacteria. J Dent Med. 2009;22(2):149-54.
- 14- Tsai T, Tsai T, Chien Y, Lee C, Tsai P. In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. Food Chem. 2008;110(4):859-64.
- 15- Petersen PE, Lennon MA. Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. Community Dent Oral Epidemiol. 2004;32(5):319-21.
- 16- Moses J, Rangeeth BN, Gurunathan D. Prevalence of dental Caries, Socio-Economic Old School Going Children Of Chidambaram Status And Treatment Needs Among 5 To 15 Year Old School Going Children Of Chidambaram. J Clin and Diagn Res. 2012;5(1):146-51.
- 17- Palombo EA. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. Evid Based Complement Alternat Med. 2011;2011:680354.
- 18- Materska M, Perucka I. Antioxidant Activity of the Main Phenolic Compounds Isolated from Hot Pepper Fruit (*Capsicum annuum* L). J Agric Food Chem. 2005;53(5):1750-6.