بررسی اثر ضدمیکروبی شقایق کوهی (Glucium) بر میکروفلور دهان

* دکتر احمد مجد

** دکتر صدیقه مهرابیان

*** آنیتا خنافری

چکیده

در این بررسی از جنس گلوسیوم چهارگونهٔ گلوسیوم کورتیکولاتوم از حصارک، گلوسیوم الگانس از کرج، گلوسیوم فلاووم از اصفهان و گلوسیوم فیمبریلیژرم از فیروزکوه دماوند را در اردیبهشت و خرداد ماه سال ۱۳۷۵ جمع‌آوری نموده، قسمتهای مختلف گیاه (ریشه، ساقه، برگ، گل، میوه و دانه) را بعد از خشک و آسیاب کردن به وسیله حلالهای مختلف اتانول، متانول و آب عصاره‌گیری نمودیم.

میکروبهای مورد آزمایش را از دهان حدود صدنفر از فاصله بین لثه و دندان به کمک سواب استریل جدا کردیم و نمونه‌ها را روی محیط نوترین آگار، مولر هینتون آگار، سابورودکستروز آگار و استرپتوکوکوس آگار کشت دادیم. میکروبهای جداشده شامل جنسهای: استرپتوکوکوس، باسیلوس، اکتینومیست، دیفتروئید، لاکتوباسیلوس و کاندیدا بود. بررسی اثر ضدمیکروبی را مطابق روش «بایروکربی» در روی محیطهای مختلف با سنجش قطر هاله مهار رشد و همچنین اضافه نمودن عصاره به محیطهای کشت و مقایسه آنها با محیط شاهد بدون عصاره انجام دادیم. اثر ضدمیکروبی گیاهان مورد پژوهش را به مجموع میکروبهای طبیعی دهان و همچنین بر هر یک از جنسهای مختلف بطور جداگانه سنجیدیم. از محلول دهان‌شوی (استیل پریدینیوم کلرید) نیز به عنوان شاهد استفاده کردیم. مقدار عصاره جذب شده در هر دیسک بلانک ۱/۲۵ میلیگرم بود. سنجش حداقل غلظت موثر عصاره: عصارهٔ قسمتهای مختلف چهارگونه گیاه مورد آزمایش با غلظت ۱/۲۵، ۵،۲/۵ و ۱۰ میلیگرم درمیلی‌لیتر تهیه شد. اثر ضدمیکروبی با سنجش قطر هالهٔ مهار شد انجام شد. نتایج نشان داد که: عصارهٔ اندامهای مختلف ۴ گونه جنس گلوسیوم بر میکروفلور دهان اثر ضدمیکروبی دارد. حداقل غلظت عصاره موثر ۲/۵٪ می‌باشد. عصاره‌های گونه الگانس نسبت به سه گونه مورد پژوهش دیگر اثر ضدمیکروبی قویتری دارد. محیط مولر هینتون برای آزمایشهای سنجش ضدمیکروبی مناسبتر است. عصاره اتانولی، متانولی، آبی دم کرده و اتوکلاو شده به ترتیب اثر ضدمیکروبی کمتری دارند. اثر ضدمیکروبی گونه‌های شقایق به نوع میکروفلور دهان افراد بستگی دارد و در افراد مختلف متفاوت است. بیشترین اثر عصاره‌ها بر جنس استرپتوکوکوس و کمترین میزان اثر بر جنس باسیلوس است.

مقدمه

سرده‌شقایق Glaucium از تیره خشخاش به دلیل اهمیت دارویی واقتصادی که دارد در دنیای کنونی مورد توجه می‌باشد.

شقایق به طور معمول در اوایل تا اواسط بهار گل می‌دهد و آن را نشان حیات، نشاط و سعادت می‌دانند. مصارف درمانی شقایق کوهی گوناگون است، از جمله برای آبسه دندان، آنژین، آسم، برونشیت، سیاه‌سرفه و بیخوابی به کار می‌رود[۲]. از

* دانشیار گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم و دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

** دانشیار گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم و دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

*** مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-08-19]

جوشانده شقایق برای غرغره به منظور تسکین ناراحتیهای مخاط دهان استفاده می‌شود[1]. وجود الکالوئیدهای مهمی از جمله گلوسین کلریترین، پروتونین، سانگیونارین و مواد رزینی و پکتینی و ماده دیگری بنام گلوکوپیکرین، در ساقه شقایق گزارش شده است[1]. اثرات ضدمیکروبی گیاهان تیره خشخاش از جمله شقایق به الکالوئیدهای بنزوکینونی آنها نسبت داده شده‌است[8,9]. در فلور ایرانیکا بیش از ۱۱ گونه شقایق از ایران گزارش شده است[6]. در پژوهش حاضر نمونه‌هایی از چهارگونه شقایق از حصارک، کرج، فیروزکوه و اصفهان جمع‌آوری و شناسایی شد و اثر ضدمیکروبی عصاره آنها بر میکروفلور دهان بررسی شد.

دهان انسان همچون دیگر قسمتهای بدن دارای میکروبهای همسفره‌ای است که ترکیب و فعالیت آنها بر حسب اوضاع و شرایط محیط تغییر می‌کند. دهان تنها ناحیه‌ای از بدن است که سطوحی سخت، محکم و متعدد بنام دندانها را برای تثبیت و فعالیت میکروبها فراهم می‌سازد. سطح دندانها محل تجمع توده‌های عظیمی از میکروبها (به ویژه باکتریها) و همچنین فرآورده‌های تراوشی آنها است. مجموعه میکروبها و مواد تراوشی آنها بر سطح دندان را «پلاک دندانی» می‌نامند. پلاک دندانی عامل پوسیدگی (کرم خوردگی) و بیماری دور دندانی است. هر دو بیماری در نتیجه روابط پیچیده بین رژیم غذایی، میکروبهای طبیعی و میزبان حاصل می‌شوند[11].

امروزه جهت جلوگیری از پوسیدگی دندان استفاده از ترکیبات فلورید در خمیر دندان و با استفاده ازدهان شوی‌های مختلف که ترکیبات شیمیایی ضد میکروبی هستند. رایج می‌باشد.

هدف از این بررسی مشخص کردن اثرات ضدمیکروبی شقایق و امکان به کارگیری آن در تهیه دهان شوی به جای ترکیبات شیمیایی رایج و پاسخ به این سوال است که آیا عصاره گونه‌های شقایق در غلظتهای مشابه با دهان شویه‌های رایج می‌تواند موجب کاهش میکروبهای دهان و عاملی برای جلوگیری از پلاکهای دندانی و در نتیجه جلوگیری از پوسیدگی دندانها باشد.

مواد و روشها

چهارگونه شقایق شامل: G. Corniculatum, G. Fimbrilligerum, G. Eleganes, G.Flavum را به ترتیب از حصارک کرج، اطراف کرج، فیروزکوه دماوند و اصفهان در بین ماههای اردیبهشت تا خرداد ۱۳۷۵ جمع‌آوری و در حرارت معمولی، دور از تابش مستقیم نور خشک کردیم. پودر خشک اندامهای مختلف گیاهان (ریشه، ساقه، برگها، گلها، میوه‌ها و دانه‌ها) را بطور جداگانه با آسیاب کردن هر بخش تهیه کردیم. عصاره آبی، متانولی، اتانولی هر یک از اندامهای گیاهان مورد پژوهش را با خیساندن به نسبت ۲/۵ گرم پودر در ۱۰۰ میلی‌لیتر از هر حلال (نسبت برابر با غلظت دهان‌شوی ستیل پیریدینیوم کلرید بعنوان شاهد) به مدت ۴۸ ساعت تهیه کردیم. جداکردن عصاره این محلولها هم با استفاده از دستگاه سوکسله و هم با عبور از صافی انجام شد. عصاره آبی به دست آمده از روش صاف کردن را اتوکلاو کردیم. همچنین از جوشانده آبی ۲/۵ درصد پودر اندامهای گیاهان برای آزمونهای ضدمیکروبی استفاده کردیم.[13]

تهیه میکروفلوردهان

از دهان حدود ۱۰۰ نفر که اکثر آنها در گروه سنی ۲۴ تا ۱۸ سال بودند، از فاصله بین دندان و لثه با سواب سترون برداشت نموده و در محیطهای کشت مختلف کشت دادیم. از محیط کشت شده میکروبهایی از جنس استرپتوکوکوس،اکتی نومیست، باسیلوس، لاکتوباسیلوس، دیفتروئید و کاندیدا را که بعنوان نمونه‌های موجود در میکروفلور دهان گزارش شده‌اند، جدا نمودیم[12]. گیاهان مورد پژوهش را بر هر یک از این میکروبها بررسی کردیم. بررسی اثر ضدمیکروبی بر بنای

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-08-19]

روش Kirby & Bauer و به شرح زیر انجام شد:

۱ ـ روش سنجش قطر هاله مهار رشد: از مجموعه میکروفلور دهان با سواب سترون برداشت نموده و به مدت ۱۲ ساعت در نوترین برات در ۳۷°C قرار دادیم، در فاز لگاریتمی رشد، میکروبها را در محیطهای نوترین آگار، مولر هینتون آگار، استرپتوکوکوس آگار و سابورودکستروز آگار (Oxoid) کشت دادیم. دیسکهای دارای ۱/۲۵ میلی‌گرم از عصاره قسمتهای مختلف گیاه در حلالهای مختلف و نیز دیسکهای دارای حلالهای به کار گرفته شده و همچنین دیسکهای دارای مقدار مشابه دهان‌شوی ستیل پیریدینیوم کلرید ۰/۲۵٪ را بعنوان شاهد به طور جداگانه در محیط کشت قراردادیم. ظرفهای کشت را به مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷°C گذاشتیم، نتایج را با سنجش قطر هاله عدم رشد بررسی کردیم.

۲ ـ روش (Pour Plate) در این روش عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی تهیه شده را به طور جداگانه با محیطهای کشت مذاب ۴۵°C به نسبت ۰/۲۵٪ مخلوط کردیم و میکروفلور دهان را روی محیطهای دارای عصاره‌ها بطور جداگانه کشت دادیم و با محیطهای بدون عصاره و کشتهای مشابه مقایسه کردیم.

۳ ـ تعیین MIC(Minimum Inhibitory Concentration): مقدار حداقل غلظت بازدارنده عصاره‌های مختلف گیاهان مورد پژوهش بر میکروفلور دهان را به میزان میلیگرم در میلی‌لیتر بررسی‌کردیم، به این‌منظور عصاره‌های‌گیاهی به مقادیر ۱/۲۵، ۵:۲/۵، ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و نیز دهان‌شوی مورداستفاده‌بامقدار ۱/۲۵میلی‌گرم‌در میلی‌لیتر تهیه نموده و با روش سنجش قطر هاله مهار رشد اثر ضدمیکروبی هر کدام را سنجیدیم و مقایسه کردیم.

نتایج و بحث

بررسی اثر عصاره‌های گیاهان مورد پژوهش بر میکروبهای کشت شده دهان نشان داد که:

۱ـ قسمتهای مختلف هر ۴ گونه گیاه سرده شقایق بر میکروفلور دهان اثر ضدمیکروبی دارند (نمودار ۱). نتایج به دست آمده مشخص می‌کند به طور کلی اثر عصاره ریشه گونه‌های مورد بررسی بیشتر از سایر اندامهای گیاهی بوده است. این نتایج با تحقیقات Cabo.j در ۱۹۸۸ همسویی دارد. این پژوهشگر اثر ضدمیکروبی عصاره Glaucium Flavum را در ریشه بیشتر از سایر بخشهای گیاه گزارش نموده است و این اثرات را به آلکالوئیدهای گلوسین، بربرین، سانگیونارین موجود در ریشه نسبت داده است.[۱۵]

۲ ـ عصاره‌های گونه الگانس جمع‌آوری شده از حوالی کرج و حصارک نسبت به سایر گونه‌ها اثر ضدمیکروبی قویتری داشت (نمودار ۱)؛ Okunade و همکارانش در سال ۱۹۹۴ درگونه الگانس بیش از ۶ نوع آلکالوئید از جمله بربرین، سانگیونارین، گلوسین و مقدار بیشتری پروتوپین را شناسایی کرده و اثر ضدمیکروبی برای آنها در نظر گرفته‌اند[۱۸].

۳ ـ عصاره‌های گونه فلاوم نیز دارای اثر ضدمیکروبی بود، این نتایج با گزارشهای Itinkurt در سال ۱۹۸۹ بر روی گلوسیوم فلاوم همسویی دارد. این محقق برای گلوسیوم روبروم (Ruberum) نیز اثر ضدمیکروبی گزارش کرده وجود آلکالوئید، از جمله گلوسین را در این گیاهان معرفی نموده است[۲۱]. بررسیهای مقایسه‌ای آزمایشهایی که انجام داده‌ایم نشان داد که عصارهٔ گلوسیوم فلاووم نسبت به سایر گونه‌ها اثر ضدمیکروبی کمتری دارد (نمودار ۱).

۴ ـ از بین عصاره‌های مختلف گیاهی عصاره اتانولی، متانولی، آبی دم کرده و اتوکلاو شده به ترتیب اثر ضدمیکروبی بیشتری نشان دادند (نمودار ۲).

۵ ـ تجربیات انجام شده نشان می‌دهد که مواد ضدمیکروبی موجود در گیاهان مورد پژوهش با حلالهای آلی بهتر

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-08-19]

استخراج می‌شوند و اتانول نسبت به متانول حلال بهتری است. برخی محققان[3] دلیل این برتری را وابسته به نامحلول بودن نشاسته در اتانول می‌دانند که زمینه را برای حل بیشتر سایر ترکیبات مناسب می‌سازد. در گزارشهای بسیاری آمده است[6,8] که الکالوئیدهای گیاهان تیرهٔ خشخاش اغلب از نوع بنزیل ایزوکینون می‌باشند (دارای بنیان ایزوکینون) و این دسته از الکالوئیدها دارای خواص ضدقارچی و ضدباکتریایی هستند.

ـ اثر ضدمیکروبی عصارهٔ گیاهان مورد پژوهش بر میکروفلور دهان افراد مختلف تفاوتهایی دارد که ناشی از تفاوت درنوع و میزان میکروفلور دهان آنها می‌باشد، اما به طور کلی در روش Pour Plate که عصاره گیاه به نسبت ۲/۵٪ به محیط کشت اضافه شده بود، و با محیط شاهد بدون عصاره مقایسه شد تعداد باکتری به طور قابل ملاحظه‌ای کم شد (نمودار ۳). بیشترین اثر ضدمیکروبی بر جنس استرپتوکوکوس و کمترین اثر بر جنس باسیلوس بود (نمودار ۴). در این زمینه درحد بررسیهای مرجع‌شناسی که انجام دادیم تاکنون گزارش دیگری داده نشده است و به احتمال اولین گزارش در این زمینه می‌باشد.

۷ ـ از بین محیطهای کشت انتخابی محیط مولر هینتون آگار نسبت به محیطهای دیگر مورد استفاده برای آزمایشهای سنجش اثرات ضدمیکروبی مناسب‌تر بود، شاید دلیل این برتری نفوذپذیری بیشتر این محیط باشد که موجب می‌شود عصاره‌های بکارگرفته شده در این محیط پراکنش بهتری داشته و با میکروبها تماس بیشتری پیدا کنند.

۸ ـ مقایسه نتایج حاصل از عصاره‌های تهیه شده با دستگاه سوکسله و عصاره‌هایی که با روش خیساندن تهیه شده بود تفاوت معنی‌داری بین اثرات ضدمیکروبی آنها نشان نداد؛ این مطلب مشخص می‌سازد که گرمای دستگاه سوکسله بر ترکیبات ضدمیکروبی موجود در عصاره اثر تخریبی ندارد از آنجا که محققان زیادی در گزارشهای علمی خود[7,10] اثرات ضدمیکروبی گونه‌های گیاهان تیره خشخاش را بیشتر به الکالوئیدهای این گیاهان نسبت داده‌اند. تصور ما بر این است که اثرات ضدمیکروبی عصاره گیاهان مورد پژوهش ما نیز بیشتر مربوط به الکالوئیدهای موجود در این گیاهان باشد. بررسی دقیق این نظر نیاز به جداسازی و خالص‌سازی الکالوئیدها و مشخص کردن اثرات ضدمیکروبی آنها دارد.

با تشکر از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال که بودجه و امکانات این پژوهش را فراهم آوردند.

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-08-19]

Abstract

Antimicrobial Effect of Four Species of Glaucium on Mouth Microflora.

Four species of glaucium: G. cornicalutum from hesarak, G. elegans from karaj, G. flavum from esfahan and G. fimbriligerum from firuzkooh were gathered during may & june 1996. After drying, all parts of the plant were powdered and using water, ethanol and methanol they were extracted. Extraction was done by 1) Using suxulete 2) Remaining in the solvent for 48 hours. Watery extracts were obtaine by utoclave and infusion.

Microorganisms used were separated from mouths of 100 persons.

They were first cultured in nutrient agar, muler-Hinton agar, saburo dextrose agar, and strept agar. Isolated microorganisim contained : streptococos, bacillus, actinomycete, diphtroid, lactobacillus and candida.

The antimicrobial effect in different media was studied using MIC method also by adding the extract to different media (pour plate) and comparing with the control.

The antimicrobial effect was studied on the whole mouth microflora as a group and each of them separately.

Cetylpyridinium chloride 2.5% was used as control. The dose of extract in each disk was 1.25 mg. Different concentration of the extracts were 1.25, 2.5, 5 and 10mg/ml.

The results showed that:

1). Different parts of all species have antimicrobial effect on mouth microflora.

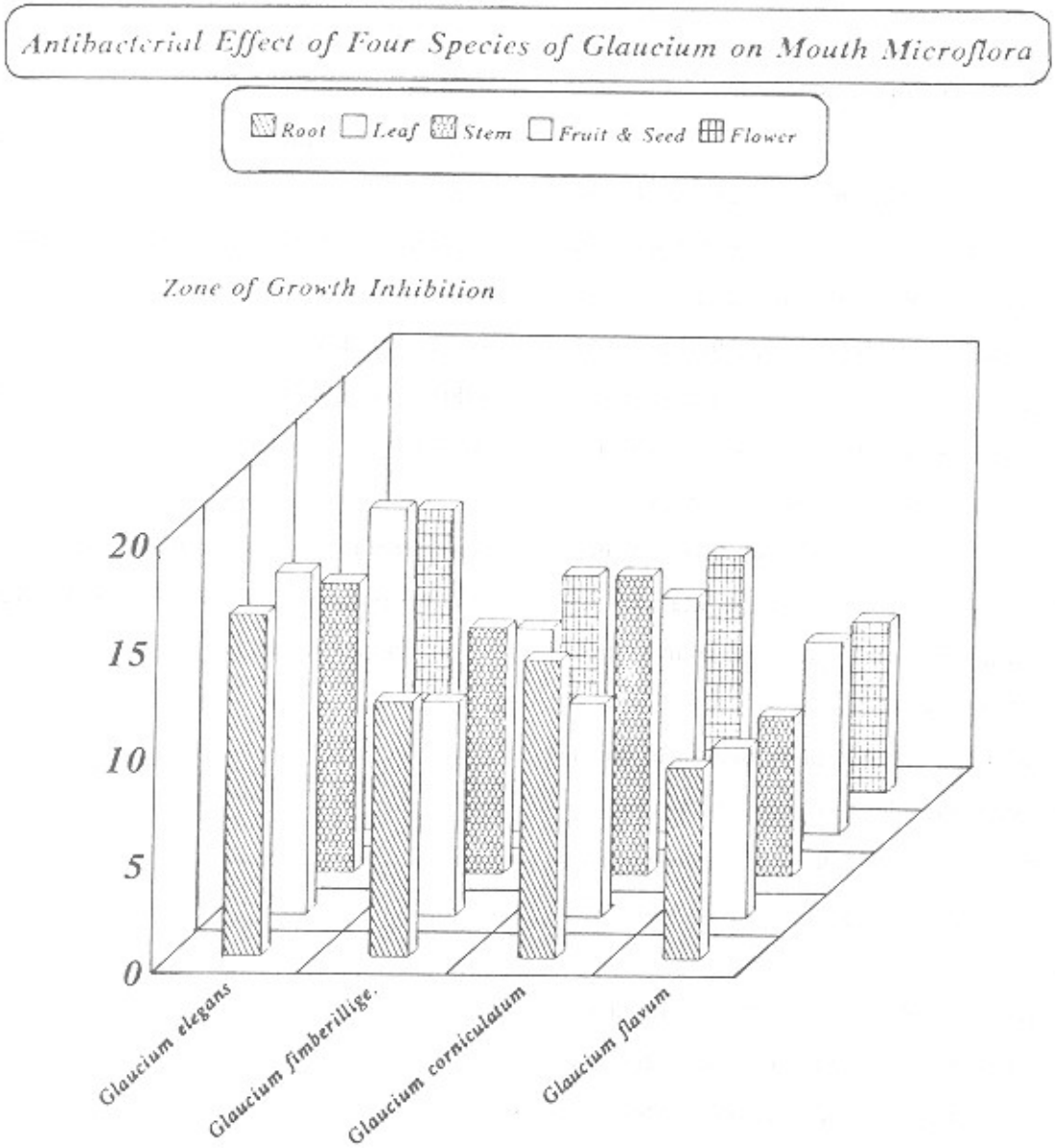
2). G. elegans antimicrobial effect is more than the other species.

3). From the medium used, muler - hinton agar is more suitable for studying the antimicrobial effect.

4). The antimicrobial strength of the extracts was as follows (respectively): ethanolic, methanolic, infused, watery obtained by utocalver.

5). The antimicrobial effect of these plants dependes on the mouth microflora, so varies in different persons. The most effect is on streptococos sp and the least is on bacillus sp.

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-08-19]

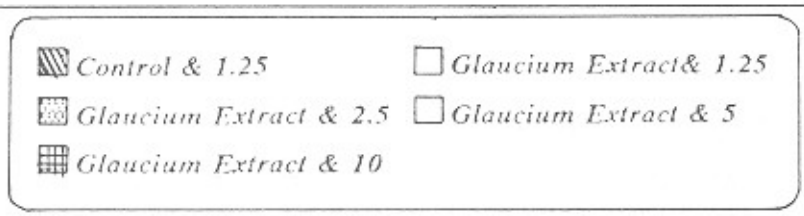


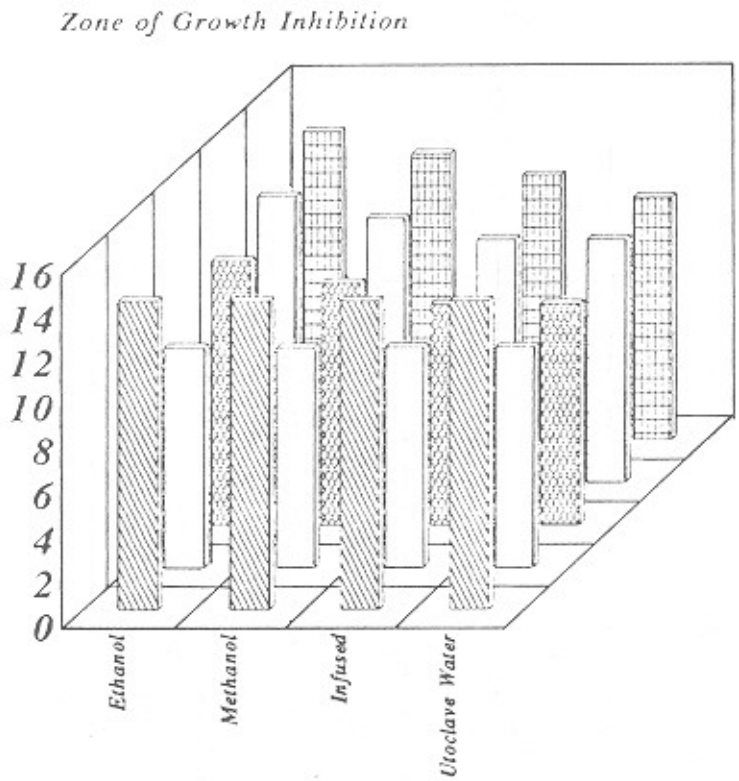
Flower	13	10	11	8
Fruit & Seed	15	9.5	11	9
Stem	13.5	11.5	14	7.5
Leaf	16	10	10	8
Root	16	12	14	9

نمودار ۱

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-08-19]

Antibacterial Effect of Different Concentrations of Ethanolic, Methanolic and Watery Extract of Glaucium on Mouth Microflora.





Glaucium Extract & 10	14	13	12	11
Glaucium Extract & 5	13	12	11	11
Glaucium Extract & 2.5	12	11	10	10
Glaucium Extract& 1.25	10	10	10	10
Control & 1.25	14	14	14	14

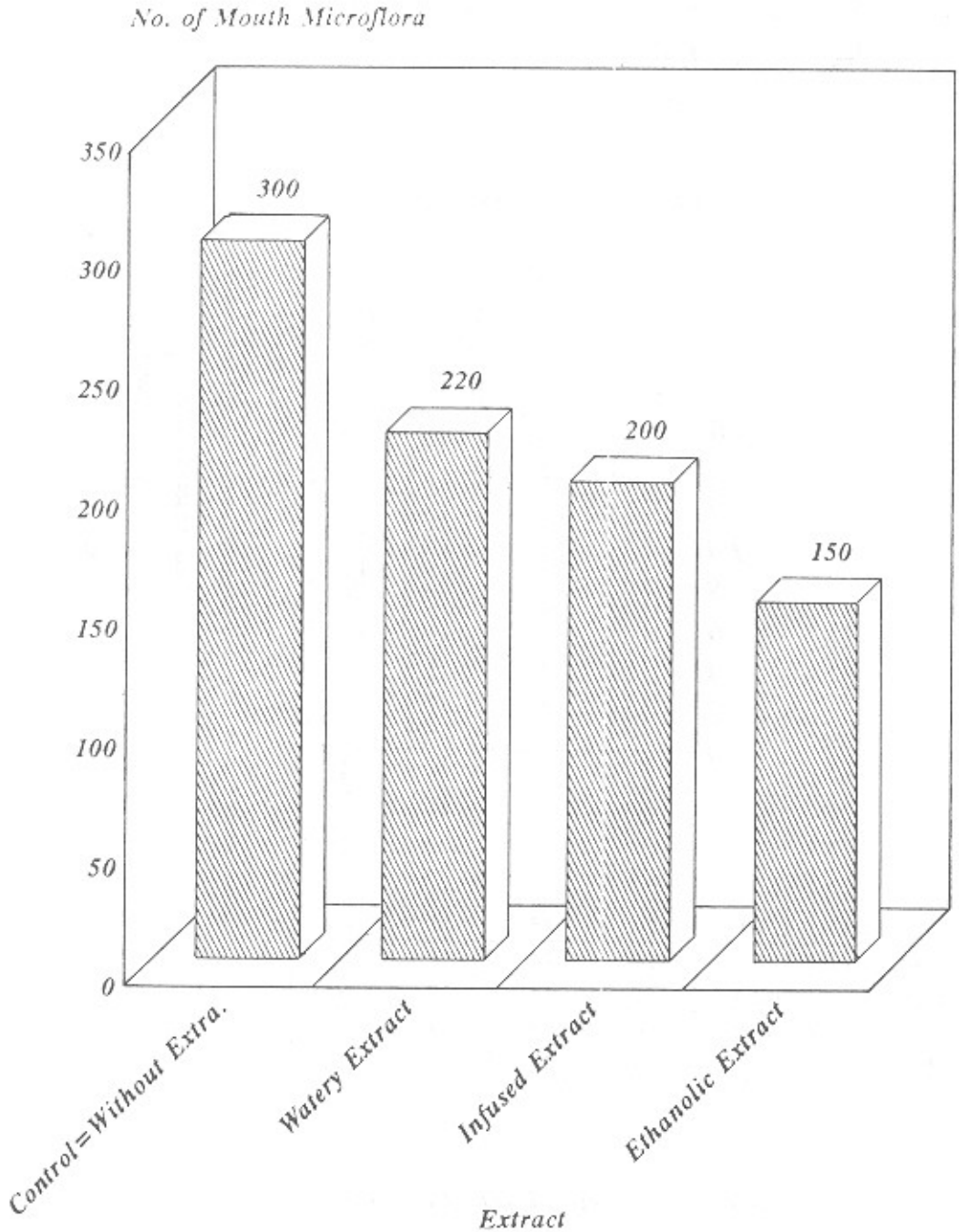
Extract

Control=Cetyl Pyridinum Chloride

نمودار ۲

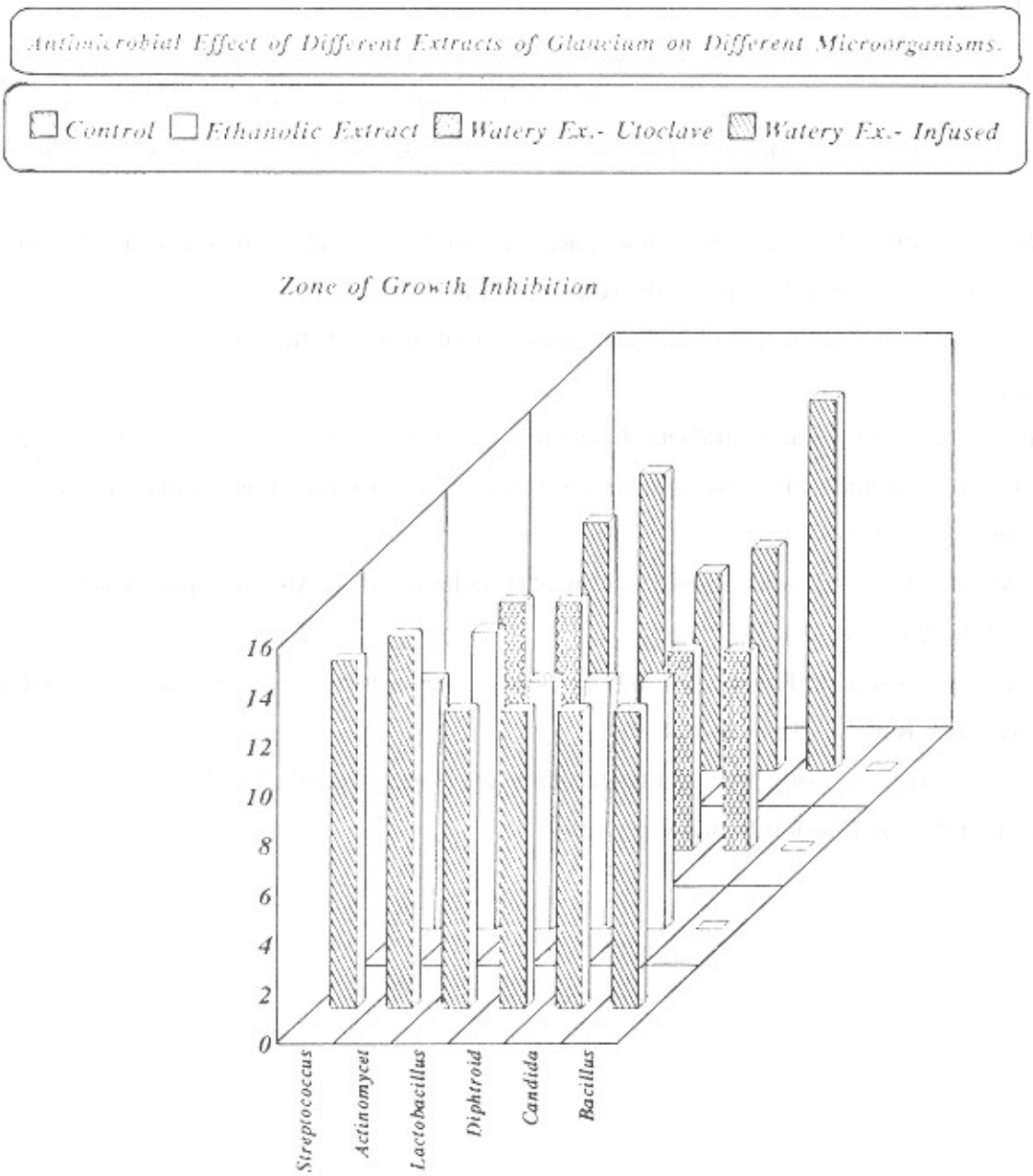
[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-08-19]

Antimicrobial Effect of Different Extracts of Glaucium Using Pour Plate Method.



نمودار ۳

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-08-19]



Watery Ex.- Infused	10	12	8	9	15	0
Watery Ex.- Utoclave	10	10	0	8	8	0
Ethanolic Extract	10	12	10	10	10	0
Control	14	15	12	12	12	12

نمودار ۴

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-08-19]

REFERENCES

۱. زرگری علی، (۱۳۶۹): گیاهان دارویی جلد چهارم انتشارات دانشگاه تهران.

۲. عرفانی حسین، (۱۳۶۳): صدگیاه و هزار درمان موسسه انتشارات سکه.

۳ ـ صمصمام شریعت سیدهادی، (۱۳۷۱): عصاره‌گیری و استخراج مواد موثر گیاهان دارویی و روشهای شناسایی آنها انتشارات کافی اصفهان.

4. Altinkurt, O. (1989): Pharmacological Insectional and Antibiotic Qualities of Glaucium Flavum (tulip Yellow) and Glaucium Ruberum (Tulip Red). *J. Pharm.*

5. Cabo J. et al. (1988): Glaucium Flavum Crantz Antimicrobial Activity *J. Microbios;* Vol. 56.

6. Fl Iranica (1966): Vol. 34.

7. Lalezari, I et al. (1990): Major Alkaloids of Glaucium Flavum Crantz Population Ghom. *J. Pharm SCI.*

8. Okunade - AL - Hufford - CD (1994): Antimicrobial Properties of Alkaloids from Xanthoriza Sinplissima *J. Pharm - Sci.* Vol. 83

9. Pailo - M - de - O (1992): Antimicrobial Activity of Benzylizoquinoline Alkaloids from Annona Salzmanii D.C. *J. Et Pharmacol* Vol. 36

10. Shafiee, E; Lapezari, I: Rahimi, O (1977): Alkaloids of Papaver Genus IX-Alkaloids of Glaucium Mitellinuum Roiss. *J. Pharm Sci* Vol. 40.

11. Van Der Hovven, J.S. (1980): Microbial Interaction in the mouth Academic Press.

12. Zinser Microbiology (Medical Bacteriology) (1991).

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-08-19]