

بررسی اثر ضد میکروبی شقایق کوهی (Glucium) بر میکروفلور دهان

• دکتر احمد مجد

•• دکتر صدیقه مهراییان

••• آیتنا خنافری

چکیده

در این بررسی از جنس گلوسیوم چهارگونه 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.

میکروبیهای مورد آزمایش را از دهان حدود صد نفر از فاصله بین لثه و دندان به کمک سواب استریل جدا کردیم و نمونه‌ها را روی محیط نوترین آگار، مولر هینتون آگار، سابوردکستروز آگار و استرپتوکوکوس آگار کشت دادیم. میکروبیهای جدا شده شامل جنسهای: استرپتوکوکوس، باسیلوس، اکتینومیسیت، دیفتروئید، لاکتوباسیلوس و کاندیدا بود. بررسی اثر ضد میکروبی 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 ضد میکروبی گیاهان مورد پژوهش را به مجموع میکروبیهای طبیعی دهان و همچنین بر هر یک از جنسهای مختلف بطور جداگانه سنجیدیم. از محلول دهان شوی (استیل پریدینوم کلرید) نیز به عنوان شاهد استفاده کردیم. مقدار عصاره جذب شده در هر دیسک بالانک ۱/۲۵ میلیگرم بود. سنجش حداقل غلظت موثر عصاره: عصاره قسمتهای مختلف چهارگونه گیاه مورد آزمایش با غلظت ۱/۲۵، ۵، ۲/۵ و ۱۰ میلیگرم در میلی لیتر تهیه شد. اثر ضد میکروبی با سنجش قطر هاله مهار شد انجام شد. نتایج نشان داد که: عصاره اندامهای مختلف ۴ گونه جنس گلوسیوم بر میکروفلور دهان اثر ضد میکروبی دارد. حداقل غلظت عصاره موثر ۲/۵٪ می‌باشد. عصاره‌های گونه الگانس نسبت به سه گونه مورد پژوهش دیگر اثر ضد میکروبی قویتری دارد. محیط مولر هینتون برای آزمایشهای سنجش ضد میکروبی مناسبتر است. عصاره اتانولی، متانولی، آبی دم کرده و اتوکلاو شده به ترتیب اثر ضد میکروبی کمتری دارند. اثر ضد میکروبی 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

سرده شقایق *Glaucium* از تیره خشخاش به دلیل اهمیت دارویی و اقتصادی 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 آبره دندان، آنژین، آسم، برونشیت، سیاه‌سرفه و بیخوابی به کار می‌رود^{۱،۲}، از

• دانشیار گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تربیت‌معلم و دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

•• دانشیار گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تربیت‌معلم و دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

••• مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

شویه‌های رایج می‌تواند موجب کاهش میکروبیهای دهان و عاملی برای جلوگیری از یلاکهای دندانی و در نتیجه جلوگیری از پوسیدگی دندانها باشد.

مواد و روشها

چهارگونه شقایق شامل: *Corniculatum*: G. *G. Flavum*, *G. Fimbrilligerum*, *G. Elegans*, 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، گلهای، 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 ضد میکروبی استفاده کردیم.^{۱۳}

تهیه میکروفلور دهان

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 میکروبیهای از جنس *استرپتوکوکوس*، *اکتی نومیست*، *باسیلوس*، *لاکتوباسیلوس*، *دیفترئوئید* و *کاندیدا* را که بعنوان نمونه‌های موجود در میکروفلور دهان گزارش شده‌اند، جدا نمودیم.^{۱۴} گیاهان مورد پژوهش را بر هر یک از این میکروبیها بررسی کردیم. بررسی اثر ضد میکروبی بر بنای

جوشانده شقایق برای غرغره به منظور تسکین ناراحتیهای مخاط دهان استفاده می‌شود.^{۱۱} وجود الکالوئیدهای مهمی از جمله گلوکوسین کلرترین، پروتونین، سانگیونارین و مواد رزینی و بکتینی و ماده دیگری بنام گلوکویپکیرین، در ساقه شقایق گزارش شده است.^{۱۱} اثرات ضد میکروبی گیاهان تیره خشخاش از جمله شقایق به الکالوئیدهای بنزوکینونی آنها نسبت داده شده‌است.^{۱۵،۱۶} در فلور ایرانیکا بیش از ۱۱ گونه شقایق از ایران گزارش شده است.^{۱۶} در پژوهش حاضر نمونه‌هایی از چهارگونه شقایق از حصارک، کرج، فیروزکوه و اصفهان جمع‌آوری و شناسایی شد و اثر ضد میکروبی عصاره آنها بر میکروفلور دهان بررسی شد.

دهان انسان همچون دیگر قسمتهای بدن دارای میکروبیهای 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 میکروبیها فراهم می‌سازد. سطح دندانها محل تجمع توده‌های عظیمی از میکروبیها (به ویژه باکتریها) و همچنین فرآورده‌های تراوشی آنها است. مجموعه میکروبیها 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، میکروبیهای طبیعی و میزبان حاصل می‌شوند.^{۱۱}

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

هدف از این بررسی مشخص کردن اثرات ضد میکروبی 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

روش Kirby & Bauer و به شرح زیر انجام شد:

- ۱- روش سنجش قطر هاله مهار رشد: از مجموعه میکروفلور دهان با سواب سترون برداشت نموده و به مدت ۱۲ ساعت در نوترین برات در 37°C قرار دادیم، در فاز لگاریتمی رشد، میکروبها را در محیطهای نوترین آگار، مولر هینتون آگار، استرپتوکوکوس آگار و سابوردکستروز آگار (Oxoid) کشت دادیم. دیسکهای دارای $1/25$ میلی گرم از عصاره قسمتهای مختلف گیاه در حلالهای مختلف و نیز دیسکهای دارای حلالهای به کار گرفته شده و همچنین دیسکهای دارای مقدار مشابه دهان شوی ستیل پیریدینیوم کلرید $2/5\%$ را بعنوان شاهد به طور جداگانه در محیط کشت قرار دادیم. ظرفهای کشت را به مدت ۲۴ ساعت در حرارت 37°C گذاشتیم، نتایج را با سنجش قطر هاله عدم رشد بررسی کردیم.
- ۲- روش (Pour Plate) در این روش عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی تهیه شده را به طور جداگانه با محیطهای کشت مذاب 45°C به نسبت $2/5\%$ 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- تعیین (Minimum Inhibitory Concentration) MIC: مقدار حداقل غلظت بازدارنده عصاره‌های مختلف گیاهان مورد پژوهش بر میکروفلور دهان را به میزان میلیگرم در میلی لیتر بررسی کردیم، به این منظور عصاره‌های گیاهی به مقادیر $1/25$ ، $2/5$ ، 5 ، 10 میلی گرم در میلی لیتر و نیز دهان شوی مورد استفاده با مقدار $1/25$ میلی گرم در میلی لیتر تهیه نموده و با روش سنجش قطر هاله مهار رشد اثر ضد میکروبی هر کدام را سنجیدیم و مقایسه کردیم.

نتایج و بحث

بررسی اثر عصاره‌های گیاهان مورد پژوهش بر

میکروبهای کشت شده دهان نشان داد که:

- ۱- قسمتهای مختلف هر ۴ گونه گیاه سرده شقایق بر میکروفلور دهان اثر ضد میکروبی 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 ضد میکروبی عصاره *Glaucium Flavum* را در ریشه بیشتر از سایر بخشهای گیاه گزارش نموده است و این اثرات را به آلکالوئیدهای گلووسین، بربرین، سانگیونارین موجود در ریشه نسبت داده است.^{۱۵}
- ۲- عصاره‌های گونه الگانس جمع‌آوری شده از حوالی کرج و حصارک نسبت به سایر گونه‌ها اثر ضد میکروبی قویتری داشت (نمودار ۱)؛ Okunade و همکارانش در سال ۱۹۹۴ در گونه الگانس بیش از ۶ نوع آلکالوئید از جمله بربرین، سانگیونارین، گلووسین و مقدار بیشتری پروتوئین را شناسایی کرده و اثر ضد میکروبی برای آنها در نظر گرفته‌اند.^{۱۶}
- ۳- عصاره‌های گونه فلاوم نیز دارای اثر ضد میکروبی بود، این نتایج با گزارشهای Itinkurt در سال ۱۹۸۹ بر روی گلووسیوم فلاوم همسویی دارد. این محقق برای گلووسیوم روبروم (*Ruberum*) نیز اثر ضد میکروبی گزارش کرده وجود آلکالوئید، از جمله گلووسین را در این گیاهان معرفی نموده است.^{۱۷} بررسیهای مقایسه‌ای آزمایشهایی که انجام داده‌ایم نشان داد که عصاره گلووسیوم فلاوم نسبت به سایر گونه‌ها اثر ضد میکروبی کمتری دارد (نمودار ۱).
- ۴- از بین عصاره‌های مختلف گیاهی عصاره اتانولی، متانولی، آبی دم کرده و اتوکلاو شده به ترتیب اثر ضد میکروبی بیشتری نشان دادند (نمودار ۲).
- ۵- تجربیات انجام شده نشان می‌دهد که مواد ضد میکروبی موجود در گیاهان مورد پژوهش با حلالهای آلی بهتر

سوکسله بر ترکیبات ضد میکروبی موجود در عصاره اثر تخریبی ندارد از آنجا که محققان زیادی در گزارشهای علمی خود^{۱۱۰،۱۱۱} اثرات ضد میکروبی گونه‌های گیاهان تیره خشخاش را بیشتر به الکلونیدهای این گیاهان نسبت داده‌اند. تصور ما بر این است که اثرات ضد میکروبی عصاره گیاهان مورد پژوهش ما نیز بیشتر مربوط به الکلونیدهای موجود در این گیاهان باشد. بررسی دقیق این نظر نیاز به جداسازی و خالص‌سازی الکلونیدها و مشخص کردن اثرات ضد میکروبی آنها دارد. با تشکر از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال که بودجه و امکانات این پژوهش را فراهم آوردند.

استخراج می‌شوند و اتانول نسبت به متانول حلال بهتری است. برخی محققان^{۱۱۲} 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^{۱۱۳} که الکلونیدهای گیاهان تیره خشخاش اغلب از نوع بنزیل ایزوکینون می‌باشند (دارای بنیان ایزوکینون) و این دسته از الکلونیدها دارای خواص ضد قارچی و ضد باکتریایی هستند.

- اثر ضد میکروبی عصاره گیاهان مورد پژوهش بر میکروفلور دهان افراد مختلف تفاوتی دارد که ناشی از تفاوت در نوع 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 ضد میکروبی بر جنس استریتوکوکوس و کمترین اثر بر جنس باسیلوس بود (نمودار ۴). در این زمینه در حد بررسیهای مرجع‌شناسی که انجام دادیم تاکنون گزارش دیگری داده نشده است و به احتمال اولین گزارش در این زمینه می‌باشد.

۷- از بین محیطهای کشت انتخابی محیط مولر هیتتون آگار نسبت به محیطهای دیگر مورد استفاده برای آزمایشهای سنجش اثرات ضد میکروبی 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 میکروارگانیسم‌ها تماس بیشتری پیدا کنند.

۸- مقایسه نتایج حاصل از عصاره‌های تهیه شده با دستگاه سوکسله و عصاره‌هایی که با روش خیساندن تهیه شده بود تفاوت معنی‌داری بین اثرات ضد میکروبی آنها نشان نداد؛ این مطلب مشخص می‌سازد که گرمای دستگاه

Abstract

Antimicrobial Effect of Four Species of *Glaucium* on Mouth Microflora.

Four species of *Glaucium*: *G. corniculatum* 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 obtained 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 microorganism 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.

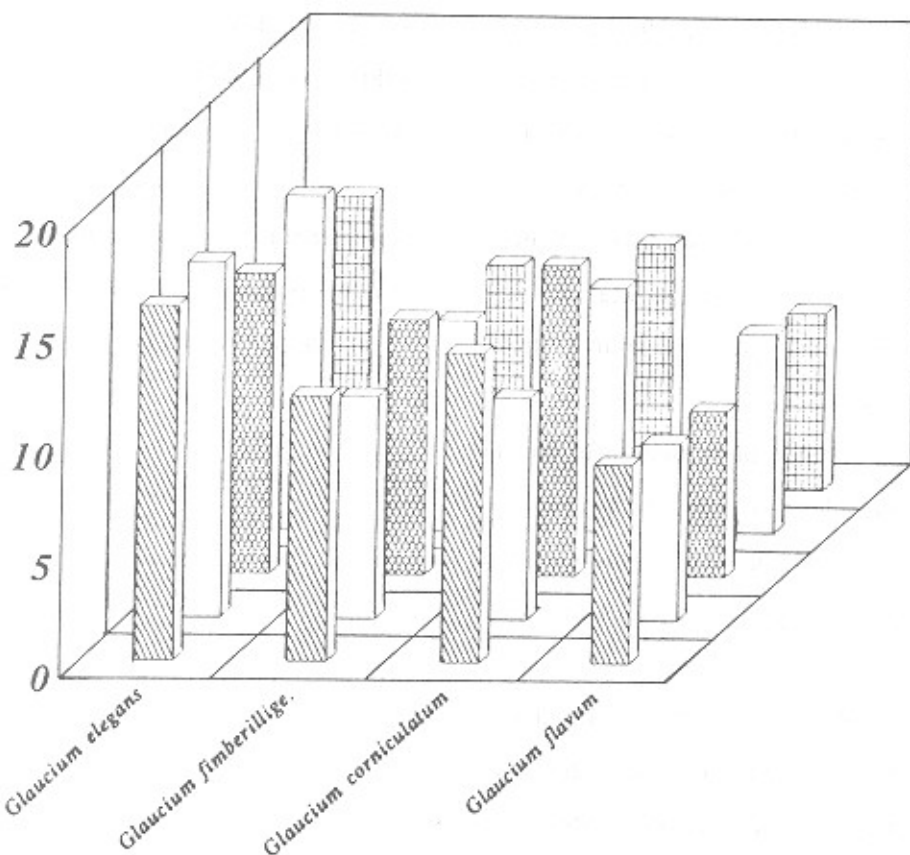
The results showed that:

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

Antibacterial Effect of Four Species of Glaucium on Mouth Microflora

Root Leaf Stem Fruit & Seed Flower

Zone of Growth Inhibition








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

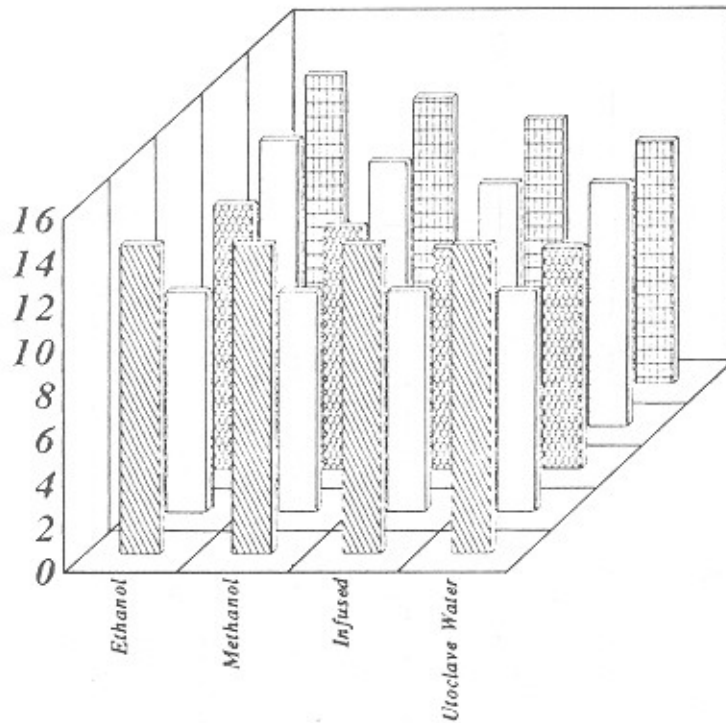
Microorganism

نمودار ۱

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

-  Control & 1.25
-  Glaucium Extract & 2.5
-  Glaucium Extract & 10
-  Glaucium Extract & 1.25
-  Glaucium Extract & 5

Zone of Growth Inhibition



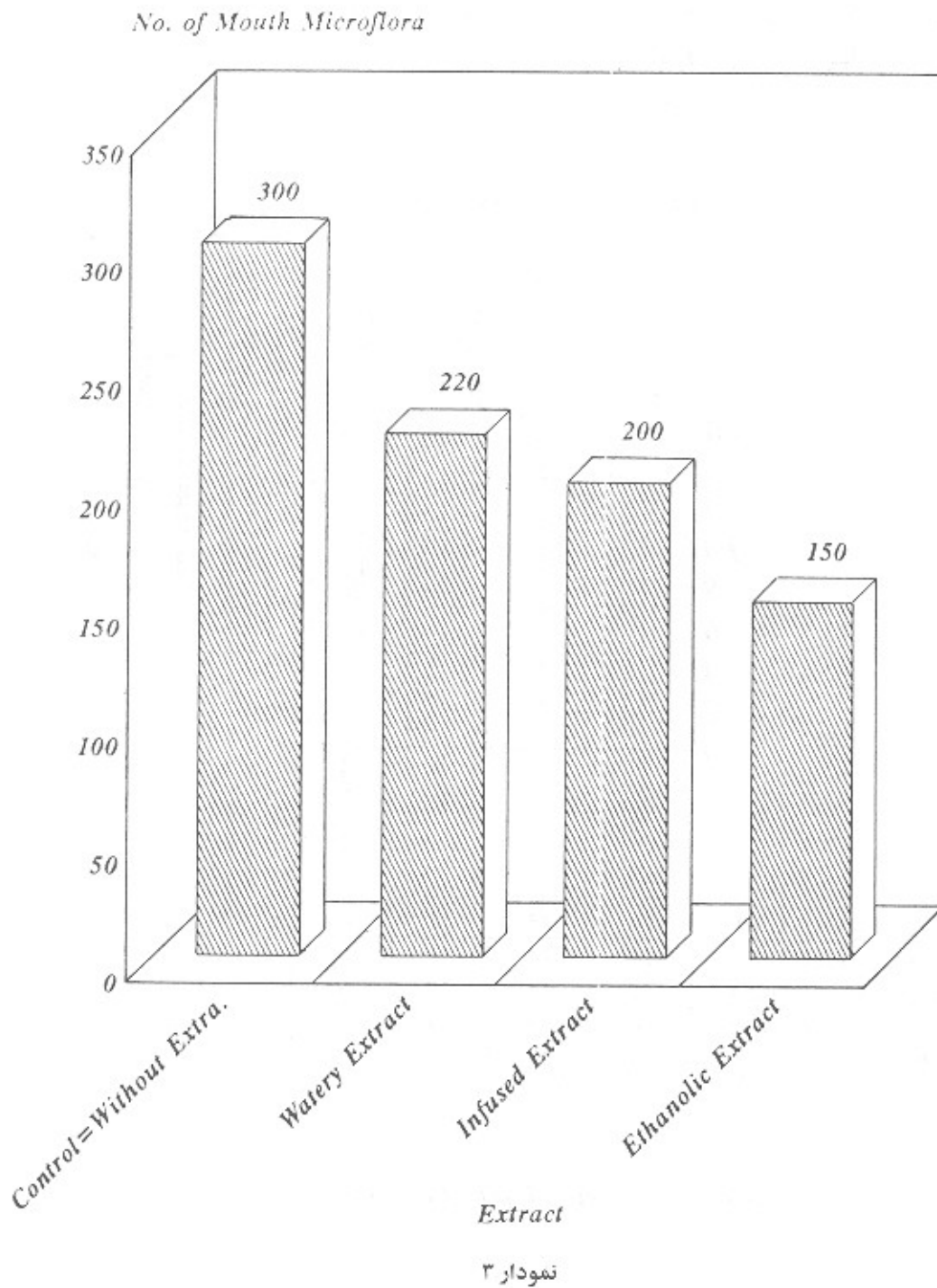
<i>Glaucium Extract & 10</i>	14	13	12	11
<i>Glaucium Extract & 5</i>	13	12	11	11
<i>Glaucium Extract & 2.5</i>	12	11	10	10
<i>Glaucium Extract & 1.25</i>	10	10	10	10
<i>Control & 1.25</i>	14	14	14	14

Extract

Control = Cetyl Pyridinum Chloride

نمودار ۲

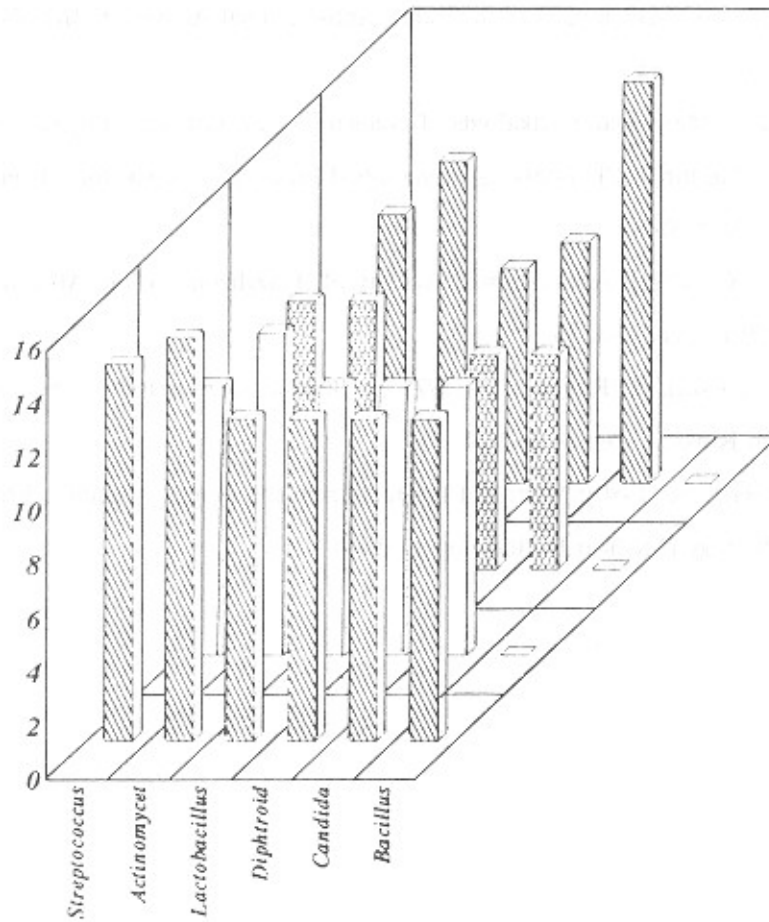
Antimicrobial Effect of Different Extracts of Glucium Using Pour Plate Method.



Antimicrobial Effect of Different Extracts of Glaucium on Different Microorganisms.

□ Control □ Ethanolic Extract □ Watery Ex.- Utoclave ▨ Watery Ex.- Infused

Zone of Growth Inhibition



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

Microorganism

نمودار ۴

REFERENCES

۱. زرگری علی، (۱۳۶۹): گیاهان دارویی جلد چهارم انتشارات دانشگاه تهران.
۲. عرفانی حسین، (۱۳۶۳): صد گیاه و هزار درمان موسسه انتشارات سکه.
- ۳ - صمصام شریعت سیدهادی، (۱۳۷۱): عصاره گیری 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 Benzylisoquinoline 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 Mitellinum 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).