Journal of
Arak University of Medical Sciences

June & July 2020. Vol 23. Issue 2

Research Paper

The Inhibitory and Antibacterial Effects of Peppermint Essential Oil on Periodontal Photogenes

Elaheh Rezaie[1], Mojtaba Bayani[2], Mohammad Arjomandzadegan[3]

1. Dentist in Private Practice, Arak, Iran.
2. Department of Periodontics, Faculty of Dentistry, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
3. Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Tuberculosis and Pediatrics Infectious Diseases Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation: Rezaie E, Bayani M, Arjomandzadegan M. [The Inhibitory and Antibacterial Effects of Peppermint Essential Oil on Periodontal Photogenes (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2020; 23(2):172-183. https://doi.org/10.32598/JAMS.23.2.5710.3

https://doi.org/10.32598/JAMS.23.2.5710.3

CC BY NC

Article Info:
Received: 13 Oct 2019
Accepted: 01 Feb 2020
Available Online: 01 Jun 2020

Key words:
Peppermint essential oil, Periodontal disease, Antibacterial effect

ABSTRACT

Background and Aim Although there are methods such as the use of mouthwashes to prevent periodontal diseases, these diseases are still the most common oral diseases. Given the side effects of chemical methods, the present study aimed to evaluate the inhibitory and antibacterial effects of peppermint essential oil on periodontal pathogens.

Methods & Materials Antibacterial effect of the peppermint essential oil by the disk diffusion and Microplate dilution techniques was performed on 4 standard bacteria purchased from the microbial bank of Iran, including Enterococcus Faecalis, Streptococcus Sanguinis, Eikenella corrodens, and Actinomyces Viscosus. The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of the essential oil were also evaluated. The amount of biofilm formation was obtained by calculating the average biofilm formation in the three wells and comparing it with the optical density of negative control by the Elisa Reader device.

Ethical Considerations This study was approved by the Research Ethics Committee of Arak University of Medical Sciences with code: IR.ARAKMU.REC.1397.15.

Results Results of diffusion test showed the inhibitory effect of 0.1 g/mL essential oil on Enterococcus Faecalis and Streptococcus Sanguinis. Pure essential oil of peppermint showed the strongest inhibitory effect on streptococcus sanguinis followed by enterococcus faecalis, actinomyces viscosus and eikenella corrodens.

Conclusion The peppermint plant has antibacterial and inhibitory effects on the bacteria of enterococcus faecalis, streptococcus sanguinis, eikenella corrodens, and actinomyces viscosus. Therefore, peppermint as a natural and effective antibacterial agent, has a potential application in the prevention of periodontal disease.

Extended Abstract

Introduction

With the addition of fluoride, the prevalence of dental caries has decreased, but many groups in the community still have dental caries [1]. Periodontal disease is one of the most common infectious diseases [4] and the spread of dental biofilm causes these diseases [8]. The compounds used in the treatment of periodontal disease usually have side effects, in addition to benefits [11]. Recently, plant

* *Corresponding Author:*
Mojtaba Bayani, PhD.
Address: Department of Periodontics, Faculty of Dentistry, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
Tel: +98 (912) 1754901
E-mail: mbayani@mail.com

compounds have been considered to reduce oral bacterial biofilms [12, 13]. One of these plants is peppermint whose effects on treatment of cold as well as antibacterial and antifungal properties have been reported. It has also been shown to have fewer side effects [14, 15]. Due to the importance and high prevalence of periodontal disease and the observed increase in cases of antibiotic resistance and side effects of overuse of chemical drugs, this study was conducted to investigate the possible antibacterial properties of peppermint on a number of microorganisms involved in periodontal disease.

Materials and Methods

The present study was a laboratory experiment. Fresh peppermint was prepared from the Medicinal Plants and Drugs Research Institute of Shahid Beheshti University, and was then traditionally washed several times with water. It was then dried in a dark place away from sunlight at a temperature of 24+2° C for a week and then milled. Alcoholic and aqueous extraction methods were performed. Various dilutions were prepared from the extract. Essential oil was extracted using Clevenger apparatus. Experiments were conducted on 4 standard bacteria purchased from the microbial bank of Iran, including Enterococcus Faecalis, Streptococcus Sanguinis, Eikenella corrodens, and Actinomyces Viscosus. The diffusion disc method was used for testing microbial susceptibility to the essential oil after microbial suspension preparation [14, 15].

Microdilution method was used to determine the microbial susceptibility, and culture method and MTT assay were used to determine the minimum bactericidal concentration. The analysis of the adhesion strength of biofilm in the microplate and the inhibitory effect on biofilm formation at different concentrations by optical density measurement were read by Elisa Reader. In order to perform the biofilm test, the biofilm was placed in triplicate and the amount of biofilm was obtained by calculating the average biofilm of these three wells and comparing it with negative control.

Results

The diameters of non-growth inhibition zones related to different concentrations of peppermint essential oil (in millimeters) are shown in Table 1. The 0.1 g/ml peppermint essential oil had an inhibitory effect on the growth of enterococcus faecalis and streptococcus sanguinis. Results showed the strongest effect of pure plant essential oil on streptococcus sanguinis and its weakest effect on eikenella corrodens. The effect of 1 g/ml peppermint essential oil on the growth of enterococcus faecalis is shown in Figure 1, as a sample. Acti-

Table 1. Diameters of non-growth inhibition zones related to different concentrations of peppermint essential oil (in millimeters)

Microorganism	0.1 g/ml	1 g/ml
Enterococcus faecalis	11	18
Streptococcus sanguinis	20	30
Eikenella corrodens	-	8
Actinomyces viscosus	-	11

Journal of Arak University of Medical Sciences

Table 2. Optical density in the biofilm inhibition test for different concentrations of peppermint essential oil

Microorganism	Concentrations (mg/ml)											
	50	25	12.5	6.25	3.125	1.562	0.781	0.39	0.195	0.097	Positive Control	Negative Control
Enterococcus faecalis	0.053	0.057	0.058	0.369	0.499	0.539	0.602	0.592	0.615	0.595	0.789	0.058
Streptococcus sanguinis	0.083	0.078	0.521	0.497	0.546	0.523	0.540	0.525	0.530	0.675	0.789	0.092
Eikenella corrodens	0.081	0.054	0.073	0.170	0.445	0.607	0.623	0.754	0.785	0.812	1.005	0.094
Actinomyces viscosus	0.085	0.091	0.084	0.99	0.119	0.457	0.546	0.556	0.674	0.750	0.779	0.093

Journal of Arak University of Medical Sciences

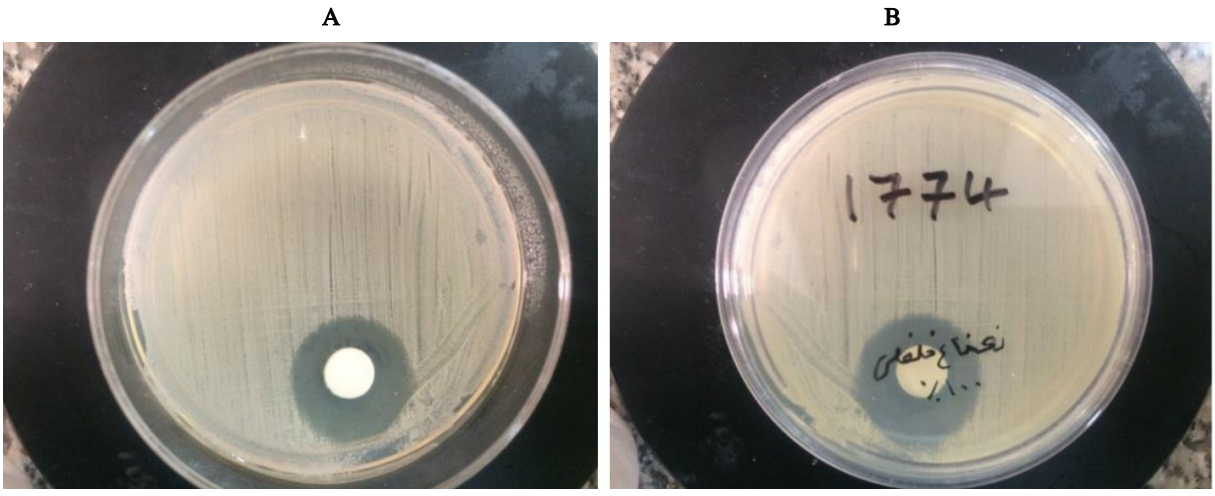


Figure 1. Effect of 1 g/ml peppermint essential oil on the growth of enterococcus faecalis (A: Before. B: After)

Journal of
Arak University of Medical Sciences

nomyces viscosus did not grow up to well No. 5 (3.125 mg/ml concentration of essential oil), and the rest of the bacteria did not grow up to well No. 6 (1.562 mg / ml concentration of essential oil).

Actinomyces viscosus was inhibited to grow at concentrations ≥3.125 mg/ml and other bacteria at concentrations ≥1.562 mg/ml of peppermint essential oil. The optical density in the biofilm inhibition test for different concentrations of peppermint essential oil is shown in Table 2. The bacterium actinomyces viscosus did not form biofilm up to well No. 4 (at concentrations ≥3.125 mg/ml) and other bacteria up to well No. 3 (at concentrations ≥12.5 mg/ml).

Discussion

Pure essential oil of peppermint showed the strongest inhibitory effect on streptococcus sanguinis followed by enterococcus faecalis, actinomyces viscosus and eikenella corrodens. The strongest bactericidal effect of peppermint essential oil was on eikenella corrodens followed by actinomyces viscosus, streptococcus sanguinis,and enterococcus faecalis. Moreover, its strongest inhibitory effect on the process of biofilm formation was observed in actinomyces viscosus followed by enterococcus faecalis, eikenella corrodens, and streptococcus sanguinis. In a study on the antibacterial effect of peppermint on the two strains of streptococcus sanguinis and Streptococcus mutans, the minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration were investigated [16], and the results were consistent with the results of the present study.

In another study, the measurement of the non-growth inhibition zone diameters of Escherichia coli bacteria, aeromonas hydrophila, Staphylococcus aureus, and enterococcus faecium was performed after using peppermint essential oil [17] whose results were in agreement with our results. Another study showed that the combined extract of peppermint and mango plants reduced the bacterial adhesion of Streptococcus mitis and streptococcus sanguinis [19].

Conclusion

The limitations of the study were the low number of study strains, the difficulty of culturing some pathogens, and the lack of similar human studies. However, this study can be a guide for further studies in human simulated models and In Vivo studies. It was concluded that peppermint plant has antibacterial properties on the bacteria of enterococcus faecalis, streptococcus sanguinis, eikenella corrodens, and actinomyces viscosus, and also has inhibitory effect on them. Therefore, peppermint as a natural and effective antibacterial agent, has a potential application in the prevention of periodontal disease.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Research Ethics Committee of Arak University of Medical Sciences with code: IR.ARAKMU.REC.1397.15.

Funding

This research did not receive any grant from funding agencies in the public, commercial, or non-profit sectors.

Authors' contributions

All authors met the writing standards based on the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Deputy for Research of Arak University of Medical Sciences for their financial support.

This Page Intentionally Left Blank

ارزیابی اثر مهارکنندگی و ضدمیکروبی اسانس گیاه نعناع فلفلی بر پاتوژن‌های بیماری‌های پریودنتال

الهه رضایی[۱]، *مجتبی بیانی[۲]، محمد ارجمندزادگان[۳]

۱. دندان‌پزشک عمومی، اراک، ایران.
۲. گروه پریودانتیکس، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
۳.گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۲۱ مهر ۱۳۹۸
تاریخ پذیرش: ۱۲ بهمن ۱۳۹۸
تاریخ انتشار: ۱۲ خرداد ۱۳۹۹

چکیده

زمینه و هدف اگرچه راه‌هایی ازجمله استفاده از دهان‌شویه برای جلوگیری از بیماری‌های پریودنتال وجود دارد، اما این بیماری‌ها همچنان از شایع‌ترین بیماری‌های دهان و دندان هستند. با توجه به عوارض روش‌های شیمیایی، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر احتمالی ضدباکتریال گیاه نعناع فلفلی علیه پاتوژن‌های پریودنتال انجام شد.

مواد و روش‌ها بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس نعناع فلفلی با استفاده از روش‌های دیسک دیفیوژن و میکروپلیت دایلوشن بر چهار باکتری انتروکوکوس فکالیس، استرپتوکوکوس سانگوئیس، ایکنلا کورودنس و اکتینومایسس ویسکوز انجام شد؛ همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس نیز برای هر چهار باکتری تعیین شد. میزان بیوفیلم از طریق محاسبه میانگین بیوفیلم تشکیل شده سه چاهک و مقایسه آن با جذب نوری کنترل منفی و با استفاده از دستگاه الایزاریدر به دست آمد.

ملاحظات اخلاقی این مطالعه با کد اخلاق IR.ARAKMU.REC ۱۳۹۷/۱۵ به تصویب کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک رسید.

یافته‌ها نتایج تست دیسک دیفیوژن بیان داشت که اسانس با غلظت ۰/۱ گرم بر میلی‌لیتر از گیاه، اثر مهاری بر رشد انتروکوک فکالیس و استرپتوکوک سانگوئیس دارد. اسانس خالص گیاه به‌ترتیب از قوی‌ترین اثر به ضعیف‌ترین روی استرپتوکوک سانگوئیس، انتروکوک فکالیس، اکتینومایسس ویسکوز و ایکنلا کورودنس اثر مهاری نشان داد.

نتیجه‌گیری نتایج این مطالعه نشان داد که گیاه نعناع فلفلی دارای خاصیت آنتی‌باکتریال بر باکتری های ایکنلا کورودنس ،اکتینومایسس ویسکوز، استرپتوکوک سانگوئیس و انتروکوک فکالیس است. اثر مهاری اسانس این گیاه نیز نشان داده شد؛ لذا می‌توان گفت که گیاه نعناع فلفلی به عنوان یک آنتی‌باکتریال طبیعی و مؤثر، کاربرد احتمالی در پیشگیری از بیماری های پریودنتال دارد.

کلیدواژه‌ها:
اسانس نعناع فلفلی، بیماری‌های پریودنتال، اثر ضدمیکروبی

مقدمه

اگرچه با اضافه کردن فلوراید شیوع پوسیدگی‌های دندان کاهش یافته است، اما هنوز گروه‌های بسیاری از جامعه مبتلا به پوسیدگی دندان هستند [۱]. به طور طبیعی فلور دهان شامل گروه متنوعی از ارگانیسم‌ها بوده و دربرگیرنده باکتری‌ها، قارچ‌ها، میکوپلاسماها، تک‌یاخته‌ها و احتمالاً فلور ویروسی است. از این میان باکتری‌ها نسبت به سایر گروه‌ها غالب هستند و گونه‌های بسیار زیادی از آن‌ها کشت داده شده است [۲]. شرایط مختلفی ازجمله شکل دندان‌ها، شیارها، نامرتب بودن دندان‌ها و کیفیت پایین ترمیم بر پوسیدگی دندان و ایجاد بیماری‌های پریودنتال اثر دارد [۳]. بیماری‌های پریودنتال از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی هستند [۴] که از انواع مهم آن‌ها می‌توان به جینجیوایتیس، پریودنتیت، پریودنتیت مزمن، نکروزان و ایمپلنتایسیس اشاره کرد [۵]. باکتری‌های دخیل در بیماری‌های پریودنتال عبارت‌اند از اکتینومایس‌ها، پروتلا اینترمدیا، پورفیرومونا‌س ژنژیوالیس، آنتروباکتریاسه و غیره [۶].

بیوفیلم به سلول‌هایی گفته می‌شود که روی یک سطح تثبیت شده و به وسیله یک ماتریکس از مواد پلیمری خارج سلولی با منشأ میکروبی احاطه شده‌اند [۷]. ایجاد بیوفیلم باعث مقاومت باکتری در برابر عوامل ضدمیکروبی می‌شود و ممکن است به بروز مشکلات حاد در این زمینه منجر شود. بیوفیلم یک توده متراکم و ترکیب‌شده با میکروارگانیسم‌ها است. این باکتری‌ها به طور عمده شامل استرپتوکوکوس میتیس و سانگوئیس هستند. وجود بیوفیلم نیز باعث التهاب لثه و پریودنتیت می‌شود [۸].

* نویسنده مسئول:
مجتبی بیانی
نشانی: اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده دندانپزشکی، گروه پریودانتیکس.
تلفن: ۱۷۵۴۹۰۱ (۹۱۲) ۹۸+
پست الکترونیکی: afr_na_sa@yahoo.com

از ترکیبات مختلف شیمیایی ازجمله دهان‌شویه‌ها برای جلوگیری از بیماری‌های لثه، پریودنتیت و کاهش بیوفیلم استفاده می‌شود [۹، ۱۰] که این ترکیبات معمولاً در کنار فواید، عوارضی نیز دارند [۱۱]. اخیراً ترکیبات گیاهی برای کاهش بیوفیلم باکتریایی دهان مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۲، ۱۳]. یکی از این ترکیبات نعناع فلفلی است. اثر این گیاه بر درمان عوارض سرماخوردگی اثبات و مشخص شده است که عوارض جانبی آن کم است. نعناع فلفلی حاوی ۱/۲ تا ۱/۵ اسانس اصلی است. منتول جزء اصلی اسانس نعناع فلفلی است که موجب تحریک جریان صفراوی، تسهیل آروغ زدن و خواص ضدباکتری است [۱۴، ۱۵].

با توجه به اهمیت بیماری‌های پریودنتال و مقاومت آنتی‌بیوتیکی و عوارض داروهای شیمیایی، مطالعه حاضر با هدف بررسی خواص ضدباکتریایی احتمالی گیاه نعناع فلفلی بر تعدادی از میکروارگانیسم‌های شایع انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به صورت تجربی و آزمایشگاهی[1] انجام شد. گیاه نعناع فلفلی به صورت تازه از گلخانه گیاهان دارویی و از کوه‌های منطقه فراهان اراک استان مرکزی تهیه و به صورت سنتی چند بار با آب شست‌وشو داده شد و سپس در محلی تاریک و دور از نور خورشید در دمای ۲±۲۴ یک هفته خشک و سپس آسیاب شد. روش‌های عصاره‌گیری الکلی و آبی انجام و از عصاره، رقت‌های مختلف تهیه شد. اسانس‌گیری با استفاده از دستگاه کلونجر انجام شد. در این دستگاه گیاه به طور مستقیم در یک بالن تقطیر داخل آب قرار گرفت؛ دو سوم حجم بالن با آب اشغال و سپس حرارت داده شد. بخارهایی که در این مرحله تولید می‌شوند، حاوی مولکول‌های اسانسی هستند. این بخارها پس از عبور از لوله‌های خنک‌کننده به صورت مایع درآمدند و در قسمت گیرنده جمع‌آوری شدند.

در این مطالعه، چهار سویه استاندارد خریداری‌شده از بانک میکروبی ایران شامل Eikenella corrodens PTCC 1391، Streptococcus Sanguis PTCC1449، Enterococcus Faecalis PTCC1778 و Actinomyces Viscosus PTCC1202 بررسی شدند. برای انجام آزمون حساسیت میکروبی به اسانس به روش دیسک دیفیوژن بعد از تهیه سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند (۱/۵×۱۰ cfu/ml) کشت سوسپانسیون به صورت سفرهای روی محیط مولر هینتون آگار انجام شد و دیسک بلانک آغشته به ۲۰ µl اسانس با غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی محیط کشت و در فاصله مناسب با دیواره پلیت قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از سپری کردن دوره انکوباسیون قطر هاله عدم رشد باکتری بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و ثبت شد.

برای تعیین حساسیت میکروبی به روش میکروپلیت دایلوشن ابتدا سوسپانسیونی از باکتری‌هایی که از قبل کشت داده شده بودند و از زمان کشت آن‌ها ۲۴-۱۸ ساعت گذشته بود، تهیه شد و در مولر هینتون براث به کدورت نیم مک فارلند رسانده شد؛ سپس محتویات وارد میکروپلیت شدند. بدین صورت که ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تا چاهک شماره ۱۱ ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر از میکرواملسیون اسانس نعناع فلفلی در چاهک اول ریخته شد و سریالی تا چاهک شماره ۱۰ تهیه شد؛ سپس به مدت ۴۸ ساعت میکروپلیت را انکوبه کرده و پس از ۴۸ ساعت با دستگاه الایزاریدر ۳۲۰۰ Stat Fax ساخت کشور آمریکا در طول موج ۵۴۵ نانومتر کدورت‌سنجی شد تا حداقل غلظت مهارکنندگی به دست آید. بعد از آن برای تعیین حداقل غلظت کشندگی از روش کشت و روش رنگ MTT استفاده شد. روش کشت بدین صورت بود که پلیت را تقسیم بندی کرده و برای هر سویه از شماره ۱ تا ۱۲ نوشته شد که شماره ۱۱ مربوط به کنترل مثبت و تنها حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری بدون اسانس بود. شماره ۱۲ مربوط به کنترل منفی بود، یعنی تنها ۱۰۰ میکرولیتر محیط براث در آن بود؛ سپس به ترتیب شماره از هر چاهک هم ردیف همان سویه به میزان ۱۰ میکرولیتر روی پلیت کشت داده شد؛ پلیت‌ها را تا ۲۴ ساعت انکوبه کرده و فردای آن روز نتایج قرائت شد. اولین چاهک یا قسمتی که در آن رشد مشاهده شد، یک چاهک قبل از آن به عنوان حداقل غلظت کشندگی شد.

درواقع می‌توان این‌گونه تفسیر کرد که بعد از اتمام زمان انکوباسیون، آخرین رقت از لوله‌های حاوی سویه‌ها و اسانس گیاهی نعناع فلفلی که در محیط مولر هینتون آگار دارای رشد بوده و رقت بالاتر از آن فاقد رشد است، به عنوان حداقل غلظت کشندگی اسانس گیاه محاسبه شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی از طریق روش رنگ MTT مقدار ۱۰ میکرولیتر رنگ آماده‌شده MTT به تمام چاهک‌ها اضافه کردیم. بعد از ۴۰ دقیقه انکوباسیون چاهک‌هایی که باکتری در آن‌ها زنده است، رنگ را احیا و تولید رنگ بنفش کرد و چاهک‌هایی که باکتری در آن‌ها از بین رفته بود، بدون تغییر باقی ماند. به این ترتیب چاهک قبل از اولین چاهک بنفش رنگ، حداقل غلظت کشندگی است.

برای بررسی تشکیل و قدرت چسبندگی بیوفیلم در میکروپلیت و ارزیابی کنترل تشکیل بیوفیلم در غلظت‌های مختلف توسط باکتری ابتدا در میکروپلیت به مقدار ۱۷۰ میکرولیتر محیط کشت آماده شد؛ سپس ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری و ۱۰ میکرولیتر ماده ضدمیکروبی اضافه شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت چاهک‌ها تخلیه و شست‌وشو داده شد. پس از خشک شدن چاهک‌ها با استفاده از اتانول ۹۵ درصد بیوفیلم‌ها حل و سپس چگالی نوری به وسیله الایزاریدر خوانده شد.

برای انجام تست سنجش بیوفیلم ابتدا باکتری‌ها به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در محیط مناسب کشت داده شدند؛ سپس از

1. Field study

جدول ۱. قطر هاله‌های عدم رشد بر حسب میلی‌متر مربوط به غلظت‌های مختلف اسانس گیاه نعناع فلفلی

نام میکروارگانیسم	غلظت ۰/۱ گرم بر میلی‌لیتر	غلظت ۱ گرم بر میلی‌لیتر
انتروکوکوس فکالیس	۱۱	۱۸
استرپتوکوکوس سانگوئیس	۲۰	۳۰
ایکنلا کورودنس	–	۸
اکتینومایسس ویسکوز	–	۱۱

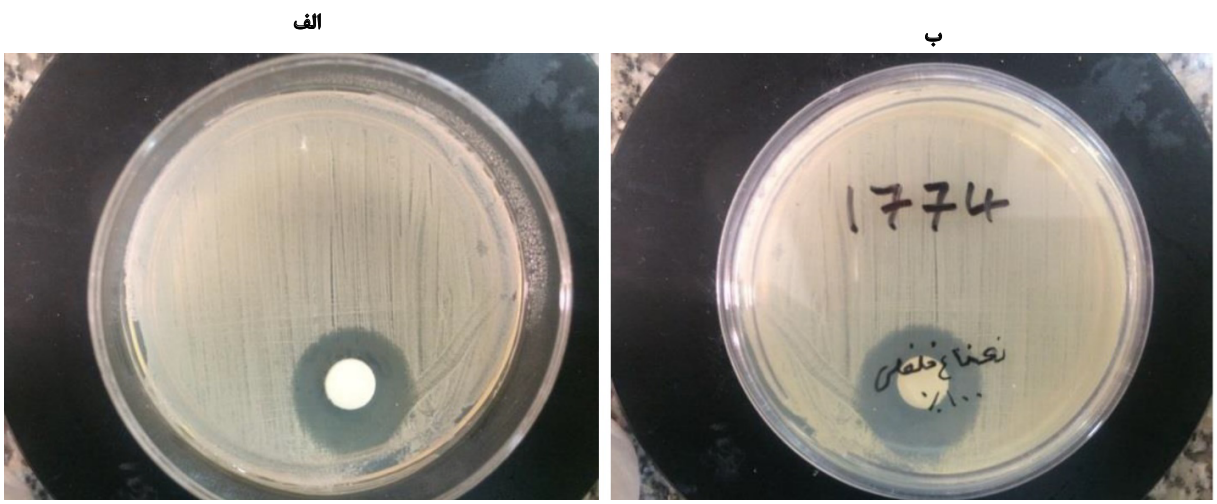
کلنی‌های تک و یکسان سه کلنی برداشته شد و در مقداری محیط BHI[2] کشت داده شد. در مرحله بعد سوسپانسیون کشت‌داده‌شده به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد و سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون و ۱۸۰ میکرولیتر از محیط حاوی نمک روی میکروپلیت پلی استایرن انتقال داده شد. میکروپلیت به مدت ۴۸ ساعت انکوبه و پس از گذشت ۴۸ ساعت محتویات چاهک‌ها به‌آرامی خارج شد و دو مرتبه با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شد؛ سپس ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۱ درصد در چاهک‌ها ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. رنگ به‌آرامی با سمپلر خالی شد و سپس چاهک‌ها دو مرتبه با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند. درنهایت به‌آرامی روی دستمال کاغذی ضربه زده شد تا آب چاهک‌ها خالی شود. در این مرحله اجازه داده شد که چاهک‌ها در دمای اتاق خشک شوند و سپس برای ارزیابی نسبی تشکیل بیوفیلم ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد بری حل شدن رنگ مرتبط با سطح به چاهک‌ها زده و به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد؛ سپس محتویات هر چاهک با استفاده از پیپتینگ مخلوط شد و ۱۲۵ میکرولیتر از این محلول در طول موج ۵۴۵ نانومتر به وسیله دستگاه الایزاریدر اندازه‌گیری شد. بیوفیلم هر سویه به صورت سه‌تایی گذاشته شد و میزان بیوفیلم توسط محاسبه میانگین بیوفیلم تشکیل‌شده این سه چاهک و مقایسه آن با جذب نوری کنترل منفی به دست آمد.

2.Brain heart infusion

نتایج

مقادیر قطر هاله‌های عدم رشد مربوط به غلظت‌های مختلف اسانس نعناع فلفی بر حسب میلی‌متر در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. نتایج این تست نشان می‌دهد که اسانس با غلظت g/ml ۰/۱ از گیاه اثر مهاری بر رشد انتروکوک فکالیس و استرپتوکوک سانگوئیس دارد؛ همچنین قوی‌ترین اثر اسانس خالص گیاه برای استرپتوکوک سانگوئیس و ضعیف‌ترین اثر برای ایکنلا کورودنس را نشان داد. نمونه‌ای از تأثیر اسانس نعناع فلفلی با غلظت g/ml ۱ بر رشد باکتری انتروکوکوس فکالیس در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است.

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس گیاه نعناع فلفلی در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج، حداقل غلظت کشندگی قوی‌ترین اثر اسانس گیاه



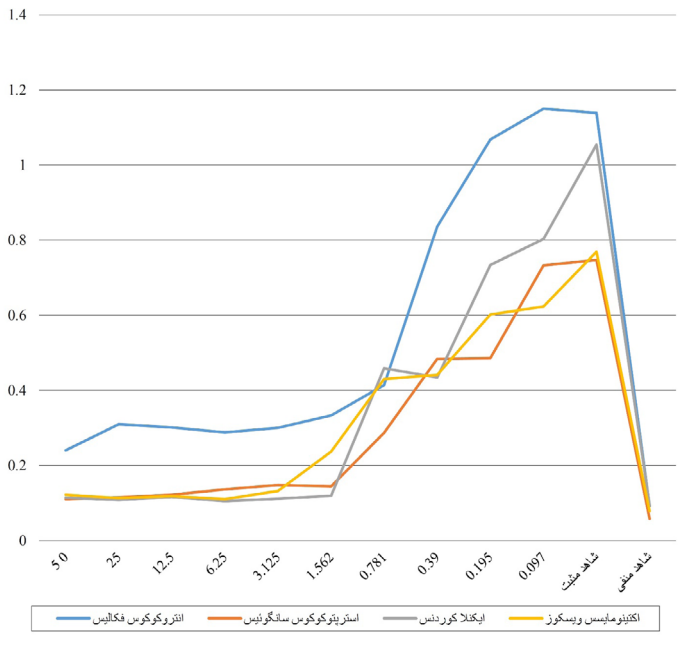
تصویر ۱. نمونه‌ای از تأثیر اسانس نعناع فلفلی با غلظت lm/g ۱ بر رشد باکتری انتروکوکوس فکالیس (الف: قبل؛ ب: بعد)

تصویر ۲. حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس گیاه نعناع فلفلی (حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی رشد بر حسب ml/µg اندازه‌گیری شده است)

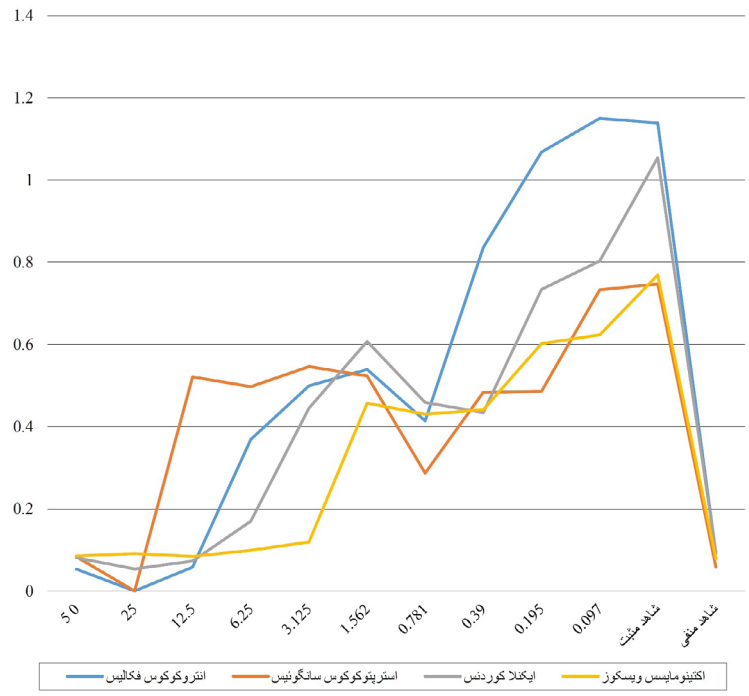
برای باکتری ایکنلا کورودنس (۱/۵۶۲ mg/ml) و ضعیف‌ترین اثر اسانس گیاه برای باکتری انتروکوک فکالیس (۱۲/۵ mg/ml) به دست آمد؛ همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری اکتینومایسس ویسکوز ضعیف‌تر (۳/۱۲۵ mg/ml) و برای سه باکتری دیگر قوی‌تر و برابر (۱/۵۶۲ mg/ml) به دست آمد.

نتایج میزان چگالی نوری در آزمایش میکروپلیت دایلوشن مربوط به غلظت‌های مختلف اسانس گیاه نعناع فلفلی در تصویر شماره ۳ نشان داده شده است. نتایج این تست نشان داد که سه باکتری انتروکوکوس فکالیس، استرپتوکوکوس سانگوئیس و ایکنلا کورودنس تا چاهک شماره ۶، یعنی تا غلظت ۱/۵۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس گیاه نعناع فلفلی و باکتری اکتینومایسس ویسکوز تا غلظت ۳/۱۲۵ رشد نکرده‌اند.

نتایج میزان آزمایش مهار تشکیل بیوفیلم مربوط به اسانس نعناع فلفلی مربوط به غلظت‌های مختلف اسانس گیاه در تصویر شماره ۴ نشان داده شده است. نتایج این تست نشان داد که باکتری انتروکوکوس فکالیس ایکنلا کورودنس تا چاهک ۳ یعنی تا غلظت ۱۲/۵، استرپتوکوکوس سانگوئیس تا چاهک ۲ یعنی تا غلظت ۲۵ و باکتری اکتینومایسس ویسکوز تا چاهک ۴ یعنی با غلظت ۶/۲۵



تصویر ۳. میزان چگالی نوری در آزمایش میکروپلیت دایلوشن مربوط به غلظت‌های مختلف اسانس گیاه نعناع فلفلی



تصویر ۴. میزان آزمایش مهار تشکیل بیوفیلم مربوط به اسانس نعناع فلفلی مربوط به غلظت‌های مختلف اسانس گیاه

میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس گیاه نعناع فلفلی رشد نکرده‌اند.

بحث

در پژوهش حاضر فعالیت ضدباکتریایی اسانس گیاه نعناع فلفلی بررسی شد. روش مورد استفاده دیسک دیفیوژن و میکروپلیت دایلوشن بود. نتایج تست دیسک دیفیوژن بیان داشت که اسانس با غلظت۰/۱ g/ml از گیاه، اثر مهاری بر رشد انتروکوک فکالیس و استرپتوکوک سانگوئیس دارد. اسانس خالص گیاه به‌ترتیب از قوی‌ترین اثر به ضعیف‌ترین روی استرپتوکوک سانگوئیس، انتروکوک فکالیس، اکتینومایسس ویسکوز و ایکنلا کورودنس اثر مهاری نشان داد. نتایج تست میکروپلیت دایلوشن بیان داشت که اسانس گیاه، اثر مهاری بر رشد هر چهار باکتری دارد. حداقل غلظت کشندگی برای باکتری‌ها از قوی‌ترین اثر اسانس به ضعیف‌ترین شامل ایکنلا کورودنس، اکتینومایسس ویسکوز، استرپتوکوک سانگوئیس و انتروکوک فکالیس بود. حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری انتروکوک فکالیس کمتر از سه باکتری دیگر برابر بود. تست سنجش بیوفیلم در این باکتری‌ها نشان داد که اسانس گیاه نعناع فلفلی بر روند تشکیل بیوفیلم در هر چهار باکتری اثر مهاری داشت و این اثر مهاری به‌ترتیب از قوی‌ترین به ضعیف‌ترین برای باکتری اکتینومایسس ویسکوز، انتروکوک فکالیس، ایکنلا کورودنس و استرپتوکوک سانگوئیس بود.

نتایج برخی از مطالعات با مطالعه حاضر همخوان است. در مطالعه‌ای که در مورد اثر آنتی‌باکتریال گیاه نعناع روی دو باکتری استرپتوکوک سانگوئیس و استرپتوکوک موتانس انجام شد، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بررسی شد که نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت؛ البته در مطالعه مذکور از عصاره گیاه نعناع زینتی استفاده شده که از این لحاظ با مطالعه ما متفاوت بود [۱۶]. در مطالعه دیگری، اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد باکتری‌های اشریشیای کولی، آئروموناس هیدروفیلیا، استافیلوکوک اورئوس و انتروکوکوس فاسیوم پس از استفاده از اسانس برگ نعناع فلفلی انجام شد که این مطالعه نیز نتایج مشابهی با مطالعه ما داشت، با این تفاوت که گونه‌های مورد بررسی باکتریایی در مطالعه مذکور با مطالعه ما یکسان نبود [۱۷]. در مطالعه دیگری اثر ضد باکتریایی عصاره گیاه نعناع بر پاتوژن‌های انسانی مقاوم به آنتی‌بیوتیک بررسی شد. یکی از باکتری‌هایی که در آن مطالعه بررسی شد، انتروکوک فکالیس بود که در مطالعه حاضر نیز بررسی شد. نتایج مطالعه مذکور مشابه با مطالعه ما بود. هر دو مطالعه حاکی از وجود اثر مهاری این گیاه بر باکتری انتروکوک فکالیس بود [۱۸]. در مطالعه دیگری اثر نعناع در یک عصاره ترکیبی شامل سه گیاه گواوا، انبه و نعناع بر مهار بیوفیلم باکتریایی بررسی شد. در این مطالعه نشان داده شد که عصاره ترکیبی گیاهان مذکور، چسبندگی باکتریایی استرپتوک میتیس و استرپتوکوک سانگوئیس را کاهش می‌دهد. البته در مطالعه مذکور از مدل دهان مصنوعی برای سنجش بیوفیلم استفاده شد، اما نتایج هر دو مطالعه نشان داد که گیاه

نعناع بر تشکیل بیوفیلم اثر مهاری دارد [۱۹].

در مطالعه حاضر محدودیت‌هایی نیز وجود داشت که ازجمله آن‌ها می‌توان به کم بودن انواع سویه‌های باکتری مورد مطالعه، سخت بودن کشت دادن برخی از پاتوژن‌ها مثل پورفیروموناس ژینژیوالیس و همچنین عدم مطالعات مشابه انسانی و در شرایط In vivo برای مقایسه نتایج مطالعه حاضر با آن‌ها اشاره کرد. نتایج اندک تست دیسک دیفیوژن در این بررسی، علی‌رغم تکرار سه مرتبه‌ای تست، حاکی از اثر ضعیف گیاه روی باکتری‌های موردنظر بود. این مسئله را می‌توان به حساسیت کمتر تست دیسک دیفیوژن نسبت به سایر روش‌ها ارتباط داد. نتایج قطعی و حساس‌تر بررسی این گیاه روی باکتری‌های مورد نظر را می‌توان در تست‌های میکروپلیت و بررسی بیوفیلم سنجید. علی‌رغم وجود این محدودیت‌ها و با توجه به نتایج این مطالعه، اسانس این گیاه می‌تواند در صنایع دارویی در آینده برای کنترل رشد و تشکیل بیوفیلم توسط این باکتری‌ها همچنین برای کنترل و پیشگیری بیماری‌های پریودنتال استفاده شود. لازم به ذکر است که به مطالعات بیشتری در ارتباط با بررسی اثرات اسانس گیاه بر بافت‌های دهان انسان نیاز خواهد بود. این مطالعه می‌تواند راهنمایی برای مطالعات بعدی در مدل‌های شبیه‌سازی‌شده انسانی و همچنین مطالعات In Vivo باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که گیاه نعناع فلفلی دارای خاصیت آنتی‌باکتریال بر باکتری‌های ایکنلا کورودنس، اکتینومایسس ویسکوز، استرپتوکوک سانگوئیس و انتروکوک فکالیس است. اثر مهاری اسانس این گیاه نیز نشان داده شد؛ لذا می‌توان گفت که گیاه نعناع فلفلی به عنوان یک آنتی‌باکتریال طبیعی و مؤثر، کاربرد احتمالی در پیشگیری از بیماری‌های پریودنتال دارد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه با کد اخلاق IR.ARAKMU.REC.1397.15 به تصویب کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک رسید.

حامی مالی

این پژوهش حامی مالی نداشته است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین‌المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

تعارض منافع

نویسندگان بدین‌وسیله تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه هیچ‌گونه حامی مالی نداشته است. بدین‌وسیله از همکاری‌های دانشگاه علوم پزشکی اراک در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

References

[1] Heng C. Tooth decay is the most prevalent disease. Fed Pract. 2016; 33(10):31-3. [PMID] [PMCID]

[2] Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. J Clin Microbiol. 2008; 46(4):1407-17. [DOI:10.1128/JCM.01410-07] [PMID] [PMCID]

[3] Kim J, Amar S. Periodontal disease and systemic conditions: A bidirectional relationship. Odontology. 2006; 94(1):10-21. [DOI:10.1007/s10266-006-0060-6] [PMID] [PMCID]

[4] Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. Int J Health Sci. 2017; 11(2):72-80. [PMID] [PMCID]

[5] Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. Lancet. 2005; 366(9499):1809-20. [DOI:10.1016/S0140-6736(05)67728-8]

[6] Lovegrove JM. Dental plaque revisited: Bacteria associated with periodontal disease. J N Z Soc Periodontol. 2004; (87):7-21. [PMID]

[7] Berger D, Rakhamimova A, Pollack A, Loewy Z. Oral biofilms: Development, control, and analysis. High-Throughput. 2018; 7:24. [DOI:10.20944/preprints201808.0174.v1]

[8] Lasserre JF, Brecx MC, Toma S. Oral microbes, biofilms and their role in periodontal and peri-implant diseases. Materials. 2018; 11(10):1802. [DOI:10.3390/ma11101802] [PMID] [PMCID]

[9] Ouhayoun JP. Penetrating the plaque biofilm: Impact of essential oil mouthwash. J Clin Periodontol. 2003; 30(s5):10-2. [DOI:10.1034/j.1600-051X.30.s5.4.x] [PMID]

[10] Jones SB, West NX, Nesmiyanov PP, Krylov SE, Klechkovskaya VV, Arkharova NA, et al. The antibacterial efficacy of a foam mouthwash and its ability to remove biofilms. BDJ Open. 2018; 4:17038. [DOI:10.1038/s41405-018-0005-5] [PMID] [PMCID]

[11] da Costa LFNP, da Silva Furtado Amaral C, da Silva Barbirato D, Leão ATT, Fogacci MF. Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis. J Am Dent Assoc. 2017; 148(5):308-18. [DOI:10.1016/j.adaj.2017.01.021] [PMID]

[12] Karim B, Bhaskar DJ, Agali C, Gupta D, Gupta RK, Jain A, et al. Effect of Aloe vera mouthwash on periodontal health: Triple blind randomized control trial. Oral Health Dent Manag. 2014; 13(1):14-9. [PMID]

[13] Shoae Hassani A, Hamdi K, Ghaemi A. [In vitro Reduction in Colonization of Streptococcus mutans by honey beeswax ethyl acetate extract (Persian)]. J Arak Univ Med Sci. 2008; 11(4):87-95. http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-290-en.html

[14] Imai H, Osawa K, Yasuda H, Hamashima H, Arai T, Sasatsu M. Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint of the growth of pathogenic bacteria. Microbios. 2001; 106 Suppl 1:31-9. [PMID]

[15] Liang R, Xu Sh, Shoemaker CF, Li Y, Zhong F, Huang Q. Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. J Agric Food Chem. 2012; 60(30):7548-55. [DOI:10.1021/jf301129k] [PMID]

[16] Shafiei Z, Haji Abdul Rahim Z, Philip K, Thurairajah N. Antibacterial and anti-adherence effects of a Plant Extract Mixture (PEM) and its individual constituent extracts (Psidium sp., Mangifera sp., and Mentha sp.) on single- and dual-species biofilms. PeerJ. 2016; 4:e2519. [DOI:10.7717/peerj.2519] [PMID] [PMCID]

[17] Abdel-Hameed ESS, Salman MS, Fadl MA, Elkhateeb A, El-Awady MA. Chemical composition of hydrodistillation and solvent free microwave extraction of essential oils from Mentha piperita L. Growing in Taif, Kingdom of Saudi Arabia, and their anticancer and antimicrobial activity. Orient J Chem. 2018; 34(1):222-33. [DOI:10.13005/ojc/340125]

[18] Shalayel MHF, Asaad AM, Qureshi MA, Elhussein AB. Anti-bacterial activity of peppermint (Mentha piperita) extracts against some emerging multi-drug resistant human bacterial pathogens. J Herb Med. 2017; 7:27-30. [DOI:10.1016/j.hermed.2016.08.003]

[19] Wan Nordini Hasnor WI, Fathilah AR, Rahim ZHA. Plant extracts of Psidium guajava, Mangifera and Mentha sp. inhibit the growth of the population of single-species oral biofilm. Altern Integr Med. 2013; 2(1):1000102. [DOI:10.4172/2327-5162.1000102]