تحقیقی

مجله دندانپزشکی جامعه اسلامی دندانپزشکان/ دوره ۲۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۰، ۱۵۵-۱۶۱

بررسی آزمایشگاهی اثر ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی مریم گلی و زنیان بر میکروارگانیسم‌های پوسیدگی زا

دکتر حمید کرمانشاه[۱]- دکتر صدیقه السادات هاشمی کمانگر[۲] - دکتر سکینه آرامی[۱] – دکتر اکبر میرصالحیان [۳]- مهندس محمد کمالی نژاد [۴]- دکتر مهرداد کریمی [۵]- فرشته جبل عاملی[۶]

۱- عضو مرکز تحقیقات دندانپزشکی و استادیار گروه آموزشی ترمیمی و زیبایی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- استادیار گروه آموزشی ترمیمی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

۳- دانشیار گروه آموزشی میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- پژوهشگر دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۵-دستیار تخصصی طب سنتی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

۶-دستیار تخصصی گروه آموزشی میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه و هدف: *جامعه جهانی به درمانهای سنتی و لزوم استخراج دارو از مواد طبیعی و گیاهان داروئی توجه خاص دارد. به همین جهت هدف از این مطالعه بررسی آزمایشگاهی اثر آنتی باکتریال عصاره هیدروالکلی دو گیاه مریم گلی (Salvia officinalis) و زنیان (Carum copticum) که در متون طب سنتی از موارد پرکاربرد در درمان بیماریهای دهان و دندان هستند بر میکرو ارگانیسم‌های پوسیدگی زا می‌باشد.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی از دو گیاه مریم گلی و زنیان به روش ماسراسیون (خیساندن) عصاره هیدروالکلی تهیه شد و پس ازاستریل کردن عصارها توسط فیلتر مربوطه، اثر آنتی باکتریا ل عصارها به روش Broth macrodilution (رقیق کردن مرتب نمونه‌ها با روش مربوطه) بر روی میکروارگانیسم‌های استرپتوکوک موتان، لاکتوباسیل رامنوز و اکتینو میسس ویسکوز ارزیابی شد. نتایج توسط آماره Mann whitney آنالیز و مقایسه شدند.*

یافته‌ها: *میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد عصاره مریم گلی و زنیان برای استرپتوکوک موتان به ترتیب ۶/۲۵ و ۱۲/۵ میکرو گرم در میلی لیتر و برای لاکتوباسیل رامنوز به ترتیب ۱/۵۶ و ۶/۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر و برای اکتینومیسس ویسکوز به ترتیب ۱۲/۵ و ۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر به دست آمد.*

نتیجه‌گیری: *هر دو عصاره مریم گلی و زنیان بر هر سه گونه باکتری اثر بازدارندگی رشد داشتند که این اثر برای مریم گلی به طرز معنی‌داری بیشتر از زنیان بود و در محدوده غلظتی مورد بررسی عصاره مریم گلی بر هر سه باکتری و زنیان بر استرپتوکوک موتان و اکتینومیسس ویسکوز اثر باکتریسیدال داشتند.*

کلید واژه‌ها: *عصاره گیاهی – مریم گلی – زنیان – میکروارگانیسم‌های پوسیدگی زا – استرپتوکوک موتان – لاکتوباسیل رامنوز – اکتینومیسس ویسکوز.*

وصول مقاله: ۱۳۸۹/۴/۶ اصلاح نهایی: ۱۳۹۰/۱/۱۴ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۳/۲۴

نویسنده مسئول: دکتر حمید کرمانشاه، گروه آموزشی ترمیمی و زیبایی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

e.mail:kermanshahhamid@yahoo.com

مقدمه

پوسیدگی دندان در اصل یک بیماری عفونی– میکروبی است که موجب حل شدن و تخریب بافتهای آهکی دندان می‌شود. درمان علامتی و ترمیمی بدون توجه به علت زمینه ساز بیماری با شکست مواجه خواهد شد. (۱)، علی‌رغم اینکه

پوسیدگی دندان شایعترین بیماری مزمن در جهان است (۱)، معذالک تا کنون هیچ برنامه‌ای برای ریشه کنی این بیماری میکروبی همانند آنچه در برابر آبله و فلج اطفال صورت پذیرفته انجام نشده است.

از عوارض تداوم این بیماری از دست رفتن دندانها، درد و عیوب زیبائی است. عامل اتیولوژیک اصلی شناخته شده برای پوسیدگی دندان استرپتوکوک های موتان و لاکتوباسیل ها هستند. (۱)، درمان و پیشگیری از پوسیدگی با آنتی بیوتیک ها و استروئیدها توان اکسیداسیون – احیای بزاق را تغییر داده فعالیت لیزوزیم را ضعیف و شرایط ایجاد واکنشهای آلرژیک را تسهیل می کنند و باعث کاهش مقاومت بدن نسبت به عوامل پاتوژنیک می شوند. (۲)

از طرفی استقبال گسترده ای از طب سنتی و داروهای گیاهی در زمینه های مختلف علوم پزشکی صورت گرفته است که علت آن کاربرد گیاهان به عنوان دارو از قرنهای پیشین می باشد. (۳)، بهره گیری از طب سنتی یکی از راههای دستیابی به داروهای جدید می‌باشد در حال حاضر ۱۱۹ دارو با منشا گیاهی وجود دارد که تنها از نود گونه از بین دویست و پنجاه هزار گونه شناخته شده، به دست آمده است. (۴)، اما جستجوی سیستماتیک بر روی مواد موثره این گیاهان و تمامی بیماریها امری بسیار طولانی، هزینه بر و محال می باشد. (۴)، بنابراین تکیه بر آموزه های بومی یکی از استراتژی های مقبول در دنیا در کشف، کاربرد و تحقیق در مورد گیاهان دارویی است. طب سنتی ایران از پایه های قدیمی علم طب و حاوی اطلاعات گرانبها در به کارگیری گیاهان در درمان می باشد، حفظ سلامت دهان و دندان در طب سنتی ایران مطرح بوده و در کتب «معالجات» (درمانی) فصلی به بیماریهای دهان و دندان اختصاص داده شده است. درمان بیماریهای دهان و دندان در سه بخش کلی "تدبیر و تغذیه"، "به کارگیری دارو" و "استفاده از ابزار (اعمال یداوی)" تقسیم بندی می شود. ترکیبات داروئی جهت "تدبیر و تغذیه" در متون طب سنتی ایران تحت عنوان "سنون" نام برده شده است. (۵)، لذا باتوجه به روشهای درمان دارویی طب سنتی ایران، یافتن منابع نوین دارویی از مراجع این دانش در درمان بیماریهای دهان و دندان ضروری به نظر می رسد. بنابراین در این مطالعه دو گیاه مریم گلی (Salvia officinalis) و زنیان (Carum copticum) که از جمله گیاهان پرکاربرد در سنون بوده اند (۶- ۹) انتخاب شدند تا با بررسی اثر ضد میکروبی آنها بر باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان راهکاری با کمترین میزان عارضه جهت کنترل پوسیدگی به ویژه در افرادی که دچار خشکی دهان هستند یا به دنبال درمانهایی از جمله رادیوتراپی مبتلا به پوسیدگیهای وسیع و غیرقابل کنترل شده اند، ارائه شود. ضمناً در متون و مقالات اخیر نیز به بررسی اثرات ضد میکروبی این گیاهان پرداخته شده است. (۱۰ - ۱۵)

مریم گلی گیاه شناخته شده تری است که مطالعات ضد میکروبی بیشتری در مورد آن انجام شده و به عنوان کنترل مثبت گیاهی در این پژوهش درنظر گرفته شده است. (۱۳- ۱۶)، در مورد دو گیاه مریم گلی و بومادران، در مورد اثر ضد میکروبی آنها بر باکتری های پوسیدگی زا مطالعه ای انجام نشده است به جز یک مطالعه که اثر ضد میکروبی عصاره مریم گلی را فقط بر استرپتوکوک موتان بررسی کرده است. (۱۶)، با توجه به اینکه این گیاهان بومی ایران هستند و تهیه عصاره از آنها امکان پذیر است، این مطالعه اثر آنتی باکتریال آنها را به طور اختصاصی بر روی باکتری‌هایی که پوسیدگی زایی آنها اثبات شده است یعنی استرپتوکوک موتان، لاکتو باسیل رامنوز و اکتینومیسس ویسکوز بررسی کرده است

روش بررسی

این مطالعه تجربی طی دو مرحله انجام گردید:

۱ – **عصاره گیری**: به روش Maceration انجام شد. ابتدا اندام هوایی گیاهان به صورت خشک (از بازار گیاهان دارویی تهیه شده) توسط ترازوی دیجیتال (Lib ROR AEU-210) به میزان پنجاه گرم توزین شدند و پس از پودر کردن آنها درون ارلن قرار گرفته و روی هر نمونه هزار و پانصد سی سی از حلال [۵۰٪ اتانول (۹۶٪) و ۵۰٪ آب] ریخته شد تا

کاملاً پودر را بپوشاند، بعد از پوشاندن سر ارلن ها با ورقه آلومینیومی به مدت ۴۸ ساعت بر روی دستگاه Shaker (Heidolph unimax 2010) با نود دور در دقیقه قرار گرفتند. بعد از اینکه حلال و گیاه همگن شدند محلولها توسط کاغذ صافی (Watmann 0.5 mm USA) صاف شدند. سپس محلولها در دستگاهی به نام rotary (Heidolph WD 2000) evaporator قرار گرفتند تا حلال از عصاره جدا شود. عصاره خالص به دست آمده در ویال‌های استریل جهت انجام آزمایشهای میکروبی در یخچال نگهداری شدند. (۱۷)

۲- تست تعیین فعالیت بازدارندگی عصاره‌ها:

سویه‌های استاندارد به صورت لیوفیلیزه Lactobacillus rhamnosus (ATCC: 7469, PTCC: 1637), Actinomyces viscosus (ATCC: 15987) Streptococcus mutan(ATCC: 35668) از مراکز رفرنس American Type of Culture collection: ATCC و مرکز پژوهشهای علمی صنعتی ایران (PTCC; persian type of culture collection) تهیه شدند. به منظور تهیه باکتری از نمونه های لیوفیلیزه ابتدا نمونه ها در محیط کشت مایع به صورت Overnight (یک شبانه روز در دمای ۳۰ – ۳۵ درجه سانتی گراد) کشت داده شدند.

بعد از ایجاد کدورت در محیط مایع، نمونه ها بر روی محیط کشت جامد [برای اکتینومیسس ویسکوز BHI agar (Spain, CONDA)، برای استرپتوکوک موتان Blood sheep 5 % + BHI agar (Spain, CONDA)، برای لاکتوباسیل رامنوز MRS Agar [(Germany, Merck)] به منظور اطمینان از خلوص آنها ایزوله شدند.

سپس به روش Borth macrodilution طبق پروتکل CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, 2006, M_7-A_4.USA) اثر آنتی باکتریال هر کدام از عصاره‌ها بر این سه گونه باکتری بررسی گردیدند.

ابتدا از هر کدام از عصاره‌ها محلول ذخیره (Stock) هشتصد میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد و توسط فیلتر Millipore filters (۰/۲۲ µm) استریل شدند. سپس رقیق سازی عصاره‌ها در ۱۱ لوله حاوی محیط کشت مایع [برای اکتینومیسس ویسکوز (USA, Difco) Thyioglycollate Medium برای استرپتوکوک موتان BHI (Spain, CONDA) broth برای لاکتوباسیل رامنوز MRS broth (Germany, Merck) به روش Serial dilution (رقیق سازی $\frac{۱}{۲}$) انجام شد (که در نهایت پانصد میکرولیتر از محیط کشت و عصاره در هر لوله وجود داشت.) پس از تهیه سوسپانسیون باکتری مطابق لوله ۰/۵ مک فارلند (مک فارلند یک سوسپانسیون شیمیایی است که میزان کدورت حاصل از آن قابل مقایسه با سوسپانسیون میکروبی می‌باشد از این طریق تعداد باکتری در هر میلی لیتر از سوسپانسیون قابل تخمین است (۱۸)) به تعداد $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU (Colony forming unit) در میلی لیتر و رقیق سازی آن توسط محیط کشت به میزان $\frac{۱}{۱۰۰}$ جهت بدست آوردن تعداد $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ CFU در میلی‌لیتر، به هر لوله پانصد میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به دست آمده اضافه شد. که نهایتاً محدوده غلظتی لوله‌ها ۰/۱۸– ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. پس از آن گرماگذاری به مدت بیست ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد. بعد از وقوع رشد، با بررسی کدورت در لوله‌ها رشد و یا عدم رشد باکتری‌ها ارزیابی گردید.

غلظت اولین لوله‌ای که رشد در آن مشاهده نشد حداقل غلظت بازدارندگی(MIC: Minimum Inhibitory concentration) رشد باکتری توسط آن عصاره منظور گردید. سپس از لوله‌هایی که فاقد رشد بودند در محیط کشت جامد آگاردار در پلیت کشت داده شد اولین پلیتی که رشد مشاهده نگردید به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC: Minimum Bactericidal concentration) عصاره برای آن باکتری منظور گردید.

کنترل‌ها به شرح زیر بودند:

محیط کشت و عصاره بدون باکتری ← عدم رشد، محیط کشت و آب مقطر با باکتری ← رشد، محیط کشت و کلرهگزیدین (شاهد مثبت) با باکتری ← عدم رشد.

ضمناً گرماگذاری در مورد Actinomyces viscosus و

Streptococcus mutans در جار بی‌هوازی و در مجاورت Co_2 صورت گرفت. این مراحل برای هر دو عصاره و برای هر سه نوع باکتری سه بار تکرار شد. نتایج توسط آماره Mann-whitney ($p< ۰/۰۵$) آنالیز و مقایسه گردید.

یافته‌ها

در نتایج Broth macrodilution میزان (MIC; Minimum Inhibitory Concentration و Minimum Bactericidal concentration; MBC) برحسب میکروگرم بر میلی لیتر و سطح معنی‌دار بودن آنها ($P< ۰/۰۵$) برای هر کدام از عصاره‌ها بر روی هر سه گونه باکتری در جدول ۱ نشان داده شده است. (کوچکتر بودن میزان MIC و MBC به معنی بالاتر بودن اثر آنتی باکتریال است).

در مورد استرپتوکوک موتان میزان MIC و MBC برای مریم گلی به ترتیب ۶/۲۵ و پنجاه میکروگرم بر میلی لیتر است که به طرز معنی‌داری از میزان MIC و MBC برای زنیان که به ترتیب ۱۲/۵ و دویست میکروگرم بر میلی‌لیتر است، کمتر است. در مورد لاکتوباسیل میزان MIC و MBC برای مریم گلی به ترتیب ۱/۵۶ و ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر است که به طرز معنی‌داری از میزان MIC و MBC برای زنیان که به ترتیب ۶/۲۵ و بیشتر از دویست میکروگرم بر میلی‌لیتر است، کمتر می‌باشد. در مورد اکتینومیسس ویسکوز میزان MIC و MBC برای مریم گلی ۱۲/۵ و ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر است که به طرز معنی‌داری از میزان MIC و MBC برای زنیان که به ترتیب ۲۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر است، کمتر می‌باشد.

بحث

پوسیدگی دندان بیماری تخریبی نسج سخت دندان است که در عین اینکه اتیولوژی آن چند عاملی است، ثابت شده که یک بیماری وابسته به پلاک میکروبی است. (۱۹)، پوسیدگی در حضور باکتری‌های اسیدوژنیک مثل استرپتوکوک موتان به شدت افزایش می‌یابد. (۱۹)، استرپتوکوک موتان اولین و مهمترین میکروارگانیسم موجود در پلاک است که پوسیدگی زائی آن به اثبات رسیده است. (۱، ۲۰) این میکروارگانیسم در شروع پوسیدگی نقش اساسی دارد (۲۰) و در کلیه ضایعات پوسیدگی عاج و مینا و در همه سطوح دندانی دیده می‌شود. (۱)، لاکتوباسیل‌ها در پیشرفت پوسیدگی نقش دارند و اکتینومیسس ویسکوز علاوه بر دو باکتری ذکر شده در ضایعات پوسیدگی سطح ریشه نقش ایفا می‌کنند. (۲۰-۲۱)، بنابراین از بین بردن پایه باکتریائی پوسیدگی دندان یکی از عوامل کمک به رفع این عفونت فراگیر می‌باشد. در سالهای اخیر باتوجه به گسترش روز افزون مقاومت میکروارگانیسم‌های بیماری زا نسبت به داروهای موجود و نیز اثرات جانبی آنتی بیوتیک‌ها جستجوی مواد ضد میکروبی جدید از گیاهان مدنظر قرار گرفته است. در این پژوهش اثرات ضد باکتریائی عصاره‌های هیدروالکلی گیاهان بومادران و مریم گلی به روش Broth macrodilution بر سه باکتری اصلی عامل پوسیدگی دندان بررسی گردید.

همان گونه که در جدول ۱ آورده شده است هر دو عصاره مورد مطالعه بر سه باکتری مزبور اثر ضد باکتریائی داشته‌اند که اثر مهاری مریم گلی به طرز معنی‌داری بیشتر از زنیان برای هر سه باکتری بوده است. مریم گلی (Salvia officinalis) گیاه شناخته شده تری است که مطالعات ضد میکروبی بیشتری در مورد آن انجام شده است. (۱۳ – ۱۶) کاربرد آن در بی اشتهایی، التهاب دهان و حلق و افزایش تعریق مورد تأیید مراجع طب گیاهی است. (۱۰)، شواهدی از اثرات ضد باکتریائی، ضد قارچی و ضد ویروسی آن وجود دارد (۱۰- ۱۱، ۱۴- ۱۵) در مریم گلی ترکیبات آلفا و بتاتوژون (Alpha, Beta-Thujone) (۲۰٪ – ۶۰٪) و یک و هشت سینئول (Cineol ۸ و ۱) (۱۶٪ – ۶ ٪) و نیز فلاونوئیدهائی مانند اپی ژنین (epigenin) موجود است. علاوه بر آن ترکیبات لینالول (Linalool)، بورنئول (borneol) و آلفا و بتا کاریوفیلین (α,β-Caryophyllene) نیز در اسانس فرار مریم گلی موجود است. (۱۰)

در مطالعات قبلی اثر عصاره هیدروالکلی برگ مریم گلی بر فعالیت کلاژنولیتیک پورفیرومونـاس ژنژیوالیس نشان داده شده بود (۱۱) و اثر وسیع آنتی باکتریال و ضد قارچ مریم

جدول ۱: میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) برحسب میکروگرم بر میلی لیتر برای عصاره ها و گونه های میکروبی

اثر آنتی باکتریال				نتیجه تست آماری
عصاره میکروگرم بر میلی لیتر / گونه باکتری	متغیرها	مریم گلی	زنیان	
لاکتوباسیل رامنوز	MIC	۱/۵۶	۶/۲۵	S*
	MBC	۱۲/۵	>۲۰۰	S
استرپتوکوک موتان	MIC	۶/۲۵	۱۲/۵	S
	MBC	۵۰	۲۰۰	S
اکتینومیسس ویسکوز	MIC	۱۲/۵	۲۵	S
	MBC	۱۲/۵	۲۵	S

*** S: Significant (P< ۰/۰۵)**

گلی بر طیف وسیعی از باکتری‌ها مانند سودوموناس و آسپرژیلوس و کاندیدا گزارش شده بود (۱۱، ۲۲) که یافته‌های این مطالعه در مورد اثر باکتریسیدال مریم گلی با تحقیقات فوق همخوانی دارد.

در مطالعه صانعی و همکاران (۱۶) ، اثر عصاره گیاهانی از جمله مریم گلی بر تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای حفره دهان از جمله استافیلوکوک اورئوس، استرپتوکوک سالیواریس و استرپتوکوک موتان بررسی شده است، که مریم گلی با غلظتهای ۴/۸ میلی گرم در میلی لیتر در زمان شصت و نود ثانیه بر این میکروارگانیسم اثر مهار رشد داشته است، که نتایج مطالعه حاضر با آن هماهنگ است. در عین حال در مطالعه حاضر اثر زنیان و مریم گلی بر کلیه میکروارگانیسم های پوسیدگی زا، که هر کدام نقش ویژه‌ای در ایجاد پوسیدگی دارند، بررسی شده است، که از این لحاظ نسبت به مطالعه صانعی و همکاران جامعیت بیشتری دارد.

زنیان (Carum copticum) یا نانخواه میوهٔ نوعی گیاه معطر با بوی عطر تیمول واز گیاهان مورد استفاده در بیماریهای گوارشی در طب سنتی ایران می باشد (۷) دارای ۴ ٪- ۶ ٪ اسانس فرّار است که در حدود ۴۵ ٪- ۵۵ ٪ آن را تیمول تشکیل می‌دهد ولی در اسانس زنیان، سیمن و آلفاپی نن و دیپانتن نیز یافت می شود و تنها عضو خانواده چتریان می‌باشد که تیمول و کارواکرول دارد. (۲۲)

اثر عصاره هیدروالکلی زنیان بر سه باکتری عامل پوسیدگی دندان احتمالاً برای اولین بار در این مطالعه گزارش شده است. البته اثر اسانس زنیان بر طیفهای مختلف باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و درماتیت ها گزارش شده است (۲۲) که با توجه به اشتراک موادی مانند کارواکرول و گاماسیمن (γ-cymene) در اسانس فرار و عصاره هیدروالکلی می‌توان این دو ماده را به عنوان عوامل احتمالی بروز اثر ضد باکتریائی برشمرد.

در مطالعه Singh و همکاران (۱۲) اثر ضد باکتریائی Carum copticum (زنیان) بر پاتوژن های دیگر عامل عفونت در بدن انسان ثابت شده است که از این نظر با مطالعه حاضر همخوانی دارد. بنابراین با توجه به اینکه در نتایج این مطالعه عصاره هیدروالکلی گیاهان مریم گلی و زنیان اثر بازدارندگی رشد و کشندگی بر باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان داشته‌اند بررسی اثر ضد باکتریائی آنها به صورت حیوانی در پژوهشهای آینده پیشنهاد می‌شود. از طرفی به دلیل اقبال جامعه جهانی به درمانهای سنتی و لزوم استخراج دارو از گیاهان و مقاومت میکروبی به داروهای شیمیایی تهیه فرآورده از جمله دهان‌شویه ضد میکروبی از این گیاهان مفید و ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

هر دو عصاره مریم گلی وزنیان بر هر سه گونه باکتری اثر بازدارندگی رشد داشتند.

۲- اثر بازدارندگی مریم گلی به طرز معنی‌داری بیشتر از زنیان بود.

۳- در محدوده غلظتی مورد بررسی، عصاره مریم گلی بر هر سه باکتری و زنیان بر استرپتوکوک موتان و اکتینومیسس ویسکوز اثر باکتریسیدال هم داشتند.

REFERENCES

1. Theondor MR, Harold OH, Ward J, Swift JR. Art and science of operative dentistry. 5th ed. St. Louis, Missouri: Mosby, Elsevier; 2006, Chapter3.
2. Walsb LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Aust Dent J. 1997 Oct; 42 (5): 302 – 6.
3. Fabrican DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. Environ Health Perspect. 2001 March; 109 (Suppl 1): 69 – 75.
4. Farnsworth NR. The role of ethnopharmacology in drug development. Ciba Found Symp. 1990; 154: 2-11.
5. Nazem Jahan Mohammad Azam Khan. Eksire Azam, Dehli: Nami Monshi Nolkshur; 1315, 38-70.
6. Nazem Jahan Mohammad Azam Khan. Gharabadin Azam, Dehli: Nami Monshi Nolkshur; 1315, 80-82, 150-152, 167-171.
7. Aghili Khorasani Mohammad Hossein. Makhzanol Adviye, 1st ed. Tehran: Entesharate Elmi va Farhangi; 1367, 719-772.
8. Zakariyaye Razi Abubakr Mohammad. Alhavi fe Teb, 1st ed. Bambaee: Matbae Osmaniye; 1886, 270-273.
9. Akhvini Bokhari Abubakr. Hedayatol Motealemin fe Teb, 1st ed. Mashhad: Entesharate Daneshgahe Ferdosi; 1371, 40-45.
10. La Gow B. PDR for herbal medicine. 3rd ed. USA: Thamson; 2005, 698-700.
11. Kemper FH. ESCOP monographs. 2nd ed. Stuttgart: Theime; 2003, 452-4.
12. Singh G, Kapoor IPS, Pandey SK, SinghWK, Singh RK. Studies on essential oil: Part 10; Antibacterial activity of volatile oils of some spices. Rhytother Res. 2002 Nov;16(7): 680-682.
13. Weckesser S, Engel E, Simon–Haarhaus B, Wittmer A, Pelz K, Schmepp CM. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeast with dermatological relevance. Phytomedicine. 2007 Aug;14(7-8):508-9.
14. Bozin B, Mimica – Dukic N, Samojlik I, Emilija J. Antimcrobial and antioxidant properties of Rosmary and Sage (Rosmarinus officinalis L. and Salvia officinalis L., Lamiaceae) Essential oils. J Agric Food Chem. 2007 Sep; 55 (19): 7879 – 85.
15. Hayouni A, Chraiaf I, Abedrabba M, Bovix M, Leveau J, Mohammed H, et al. Tunisian salvia officinalis L. and schinus mollel. Essential oil: their chemical compositions and their preservative effects against salmonella inoculated in minced beef meat. Int J Food Microb. 2008 Jul; 125(3): 242 –51.
16. Sanei Ashraf Sadat, Pour Esmaeeli Hamid Reza, Ebadi far Asghar, Madahi Ali, Saboor Bahman, Mojab Faraz coworker. The effect of anti bacterial activity of seven plant extraction on number of aerobic microorganism of oral cavity. Pajuhande j. 1976 Fall; (6): 22-25.
17. Samsum shariat H. Extraction of effective substance from drug plants. 2nd ed. Esfehan: Manni; 1386, 12-20.
18. Jean F. Mac faddin biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. St. Louis Missouri: Mosby; 2000, 825.

19. Prabu GR, Gnanamani A, sadulla S. Guaijaverin a plant flavonoid as potential antiplaque agent against streptococcus mutans. J Appl Microb. 2006 Aug; 101 (2): 487–95.
20. Fejerskov O, Kidd E. Dental Caries: The disease and its clinical management. 2nd ed. Singapore: Blackwell; 2008, Chapter 10, 16, 17.
21. Summitt JB, Robbins JW, Hilton TJ, Schwartz RS. Fundamentals of operative dentistry. 3rd ed. China: Quintessence; 2006, Chapter 1, 4, 12.
22. Ray AB, Sarma BK, Singh UP. Medicinalis properties of plants; anti fungal, antibacterial and antivival activities. 1st ed. India: International Book Distributing Co; 2004, 8, 9, 488.