

ارزیابی عصاره‌های شنبلیله و کرفس کوهی در مقایسه با کلرهگزیدین ۰/۲٪ بر شمار باکتری استرپتوکوک موتانس: یک مطالعه آزمایشگاهی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۹/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۹

چکیده

نفسه فلاح^۱
آزاده بابائی^{۲*}
زهرامومنی^۳

زمینه و هدف: پوسیدگی دندان، به دلیل شیوع فراوان و هزینه‌های بالا به عنوان یک مشکل سلامت دهان و دندان و همچنین، سلامت عمومی شناخته می‌شود که البته با انجام مداخلات زود هنگام می‌توان از ایجاد آن پیشگیری نمود. یکی از این مداخلات در جهت پیشگیری از پوسیدگی، استفاده از دهانشویه‌های آنتی میکروبیال می‌باشد. در این راستا، دهانشویه کلرهگزیدین به عنوان یک استاندارد طلایی است که در کنار خاصیت آنتی میکروبیال، دارای عوارض جانبی مانند تغییر حس چشایی، تغییر رنگ دندان‌ها و سوزش دهان می‌باشد. بنابراین، در این پژوهش با توجه به عوارض جانبی دهانشویه‌های شیمیایی، جایگزینی عصاره‌های گیاهی با آنها جهت پیشگیری از ایجاد پوسیدگی دندان مدنظر بوده است.

هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر آنتی میکروبیال عصاره‌های شنبلیله و کرفس کوهی در مقایسه با دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ بر روی شمار باکتری استرپتوکوک موتانس بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه آزمایشگاهی شامل چهار مرحله بود. در مرحله اول عصاره‌های شنبلیله و کرفس کوهی تهیه گردید و دهانشویه کلرهگزیدین و آب مقطر به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شدند. سپس در آزمایش Well Diffusion Agar قطر هاله تشکیل شده در غلظت ۱۰۰۰۰۰ ppm برای عصاره‌های مذکور و دهانشویه کلرهگزیدین ثبت شد. در مرحله بعد، MIC (حداقل غلظت مهارکنندگی) و MBC (حداقل غلظت کشندگی) عصاره‌ها و دهانشویه کلرهگزیدین تعیین گردید. در نهایت باکتری استرپتوکوک موتانس در محیط‌های کشت شمارش شدند. داده‌ها در نرم‌افزار SPSS ۲۶٫۰ تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها: در آزمایش Well Diffusion Agar، قطر هاله عدم رشد باکتری در دهانشویه و عصاره‌های شنبلیله و کرفس کوهی برابر ۱۹ mm، صفر و ۱۳ mm برآورد شد. مقادیر MIC برای این گروه‌ها به ترتیب برابر ۶۲۵۰، ۱۰۰۰۰۰ و ۵۰۰۰۰ ppm و مقادیر MBC آنها معادل ۱۲۵۰۰، ۱۰۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ ppm برآورد شد. از نظر درصد کاهش شمار باکتری‌های زنده در گروه‌های مختلف در ۳۰ دقیقه و ۶ ساعت تفاوت‌های معنی‌داری وجود داشت ($p < ۰/۰۱$). بیشترین اثر کاهش باکتری، در ۳۰ دقیقه به ترتیب، در دهانشویه کلرهگزیدین، کرفس کوهی و شنبلیله و در ۶ ساعت به ترتیب، در کرفس کوهی، دهانشویه کلرهگزیدین و شنبلیله ثبت گردید.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، عصاره برگ و دانه شنبلیله اثر ضد باکتریایی کم و عصاره کرفس کوهی اثر ضد باکتریایی قابل مقایسه‌ای با دهانشویه کلرهگزیدین بر علیه باکتری استرپتوکوک موتانس از خود نشان دادند.

واژگان کلیدی: پوسیدگی دندان، کلرهگزیدین، باکتری استرپتوکوک موتانس، عصاره‌های گیاهی، حداقل غلظت مهار کنندگی، حداقل غلظت کشندگی

۱ عضو کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
۲ استادیار گروه سلامت دهان و دندانپزشکی اجتماعی، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
۳ استادیار گروه سلامت دهان و دندانپزشکی اجتماعی، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

نویسنده مسئول*:

آزاده بابائی

استادیار گروه سلامت دهان و دندانپزشکی اجتماعی، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
ایمیل: azadeh.t.babaei@gmail.com
تلفن: ۰۲۶-۳۳۵۳۱۶۴

مقدمه

سلامت دهان، بخشی اساسی از سلامت عمومی است و دارای تأثیرات مهمی بر روی کیفیت زندگی می باشد.^۱ همچنین یکی از مؤلفه های دهان سالم، دهانی عاری از پوسیدگی دندان می باشد.^۲ امروزه پوسیدگی دندان شایعترین بیماری مزمن در بیشتر کشورها به حساب می آید.^۳ با توجه به شیوع بالای پوسیدگی دندان و بالا بودن هزینه های درمان آن، همچنین عدم بازبایی کامل سلامت و عملکرد دندان دارای حفره پوسیدگی، حتی پس از طرح درمان های پیشرفته، تنها راه اصولی در جهت مقابله و جلوگیری از وقوع پوسیدگی، پیشگیری از ایجاد این بیماری می باشد.^۴ از جمله روش های پیشگیری، کاهش دریافت مواد قندی و رعایت بهداشت دهان و دندان (استفاده از مسواک، نخ دندان، واریش و دهانشویه) می باشد.^{۵،۶}

چهار عامل اصلی ایجاد پوسیدگی شامل فلور میکروبی، زمان، وجود کربوهیدرات و دندان می باشد، که از این میان، میکروب های اصلی دخیل در ایجاد پوسیدگی، استرپتوکوک موتانس ها هستند.^۸ در این راستا کلرهگزیدین، رایج ترین دهانشویه آنتیباکتریال به عنوان استاندارد طلایی در کنترل پلاک در نظر گرفته می شود^۹ که در کنار این خاصیت، دارای عوارض جانبی از جمله تغییر رنگ دندان ها و نسوج سخت دندانی، تغییر حس چشایی، تشکیل جرم، آلرژی، طعم ناخوشایند دهان، سوزش و خشکی دهان، پوسته پوسته شدن لثه، گاهی اروژن مخاط و اثرات سیستمیک منفی در صورت بلع می باشد.^{۱۰،۹}

بنابراین، با توجه به عوارض جانبی بیان شده و از طرفی اثبات خاصیت درمانی مشابه برخی عصاره های گیاهی با عوارض جانبی به مراتب کمتر، در تحقیقات اخیر گیاهان و عصاره های گیاهی مورد توجه خاصی قرار گرفته اند.^{۱۱}

گیاه شنبلیله، با نام علمی *Trigonella foenum-graceum* L. یک گیاه علفی یکساله از تیره Leguminosae است. این گیاه سرشار از متابولیت های متنوعی مانند تانن ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و گلیکوزیدها است که به داشتن خواص ضد میکروبی معروف هستند.^{۱۲،۱۳} همچنین این گیاه دارویی، در طب سنتی ایران و ملل مختلف سابقه مصرف دیرینه داشته و خواص درمانی چشمگیری برای آن ذکر شده است.^{۱۴}

گیاه کرفس کوهی، با نام علمی *Kelussia odoratissima*

Mozaff از گونه های شناخته شده دارویی و علوفه ای بومی مناطق خاصی از ایران است.^{۱۵} این گیاه نیز با داشتن ترکیباتی مانند فلاونوئیدها دارای اثرات ضدویروس، ضددیابت و ضد مسمومیت می باشد.^{۱۵} همچنین از جمله گیاهانیست که خاصیت آنتی باکتریال آن ثابت شده است.^{۱۶} بنابراین، در این پژوهش، از میان خواص ذکر شده برای عصاره های شنبلیله و کرفس کوهی به بررسی خاصیت آنتیباکتریال این دو عصاره پرداخته شده و هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی خاصیت آنتیباکتریال عصاره های شنبلیله و کرفس کوهی در مقایسه با دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ روی شمار باکتری استرپتوکوک موتانس می باشد.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر، یک مطالعه آزمایشگاهی بود که با هدف تعیین خاصیت آنتی باکتریال عصاره های شنبلیله و کرفس کوهی در مقایسه با دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ پس از کسب کد اخلاق (IR.ABZUMS. REC.1401.004) از دانشگاه علوم پزشکی البرز، در آزمایشگاه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی دانشگاه تهران صورت پذیرفت.

مرحله اول: تهیه مواد اولیه

در این مرحله، کلیه مواد اولیه لازم جهت انجام مطالعه تهیه گردید. در این راستا، ابتدا از گیاهان شنبلیله و کرفس کوهی، عصاره های خالص تهیه گردید. بدین صورت که، ۳۰۰ گرم از گیاه شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum-graceum* L. و کد بازار دارویی T01-054-S و برگ این گیاه با کد بازار دارویی T01-055-L و همین مقدار از گیاه کرفس کوهی با نام علمی *Kelussia odoratissima mozaff* و کد بازار دارویی K01-018-L تهیه گردید. پس از اضافه نمودن حلال هیدروالکلی ۸۰ درصد به این گیاهان، به مدت ۴۸ ساعت در محیط خنک و تاریک نگهداری شده و پس از آن، با صاف کردن محلول، جداسازی عصاره ها از باقی مانده گیاه انجام شد. این عمل سه بار تکرار شد و محلول حاصل، جهت تبخیر حلال هیدروالکلی، به دستگاه روتاری منتقل شد. به این ترتیب، عصاره های خالص شنبلیله و کرفس کوهی تهیه شدند (شکل ۱). همچنین، باکتری استرپتوکوک موتانس از سویه ATCC 25175 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC) و دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ (برند تجاری ایرشا) (به عنوان کنترل مثبت) و آب مقطر (به عنوان کنترل منفی) از داروخانه تهیه و خریداری شدند.



شکل ۱- عصاره برگ و دانه شنبلیله و برگ کرفس کوهی

مرحله سوم: تعیین MIC و MBC

در این مرحله، میزان مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) عصاره‌های شنبلیله و کرفس کوهی در مقایسه با دهانشویه کلرهگزیدین ۰.۲٪ بر روی باکتری استرپتوکوک موتانس بررسی گردید.

الف) تعیین MIC

MIC، روندی است که در طی آن حداقل غلظت مواد که باعث مهار رشد باکتری می‌شود، مشخص می‌گردد. در این مطالعه، جهت تعیین MIC مواد، پلیت‌های ۴۸ خانه‌ای استریل (چاهک‌ها) انتخاب گردید. در هر کدام از چاهک‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع مولر هیتون براث افزوده شد. چاهک اول، به عنوان شاهد برای محیط کشت (Media) و چاهک دوم، به عنوان شاهد برای محیط کشت و باکتری (Media+Bacteria) در نظر گرفته شد. برای نمونه شنبلیله از ترکیب عصاره برگ و دانه با نسبت ۵۰٪ استفاده شده و نیز، نمونه عصاره شنبلیله به دلیل آلودگی میکروبی اولیه، در دمای ۱۰۰°C به مدت ۱۰ دقیقه در اتوکلاو استریل شد. در سومین چاهک، عصاره‌های مذکور و دهانشویه با غلظت ۱۰۰۰۰۰ ppm (که در

مرحله دوم: آزمایش Well Diffusion Agar

پس از تهیه مواد اولیه، در مرحله بعد، آزمایش Well Diffusion Agar جهت تعیین هاله مهار رشد باکتری استرپتوکوک موتانس بر هریک از عصاره‌های مذکور و دهانشویه صورت پذیرفت. این روش، همان روش انتشار در چاهک است که روشی کیفی برای اثبات خاصیت آنتی باکتریال مواد به صورت تشکیل هاله مهار رشد باکتری در محیط کشت مخصوص خود به نام مولر هیتون آگار می‌باشد.

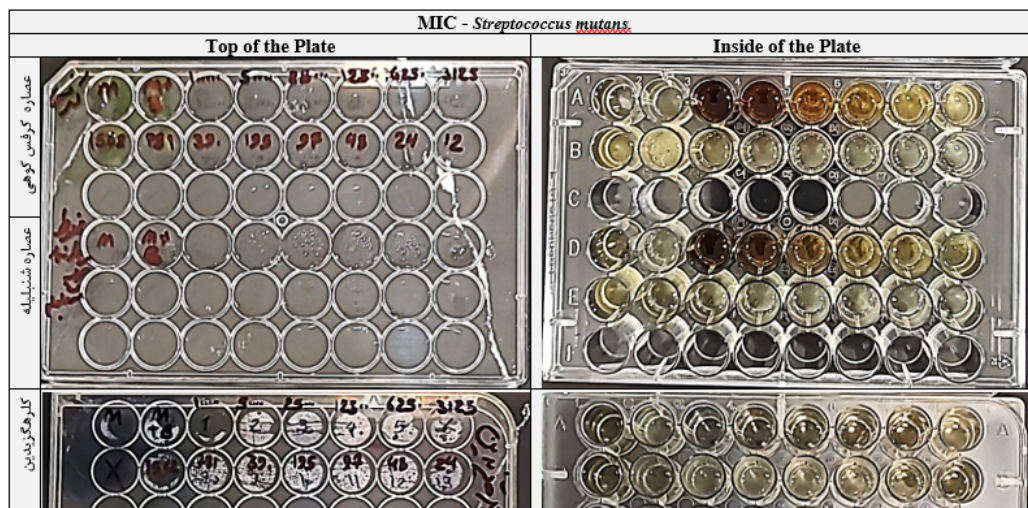
در این روش، ابتدا تعداد استاندارد (باکتری استرپتوکوک موتانس، با استفاده از سواب پنبه‌ای به صورت سطحی در محیط کشت جامد مولر هیتون آگار کشت داده شد. در ادامه، داخل پلیت‌ها به وسیله سیلندر استریل، چاهک‌هایی با قطر ۴ میلی متر با فاصله مناسب از هم ایجاد شد. سپس، ۵۰ تا ۸۰ میکرولیتر از عصاره‌ها با غلظت ۱۰۰۰۰۰ ppm به وسیله سرسمپلر استریل در داخل چاهک‌ها ریخته شد. در ادامه پلیت‌ها در دمای ۳۷ ± ۵ درجه به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در گرماخانه در جارب‌بی هوایی قرار داده شدند. پس از گرماخانه گذاری، قطر هاله به وسیله کولیس به میلی متر گزارش گردید.

1 Minimum Inhibitory Concentration

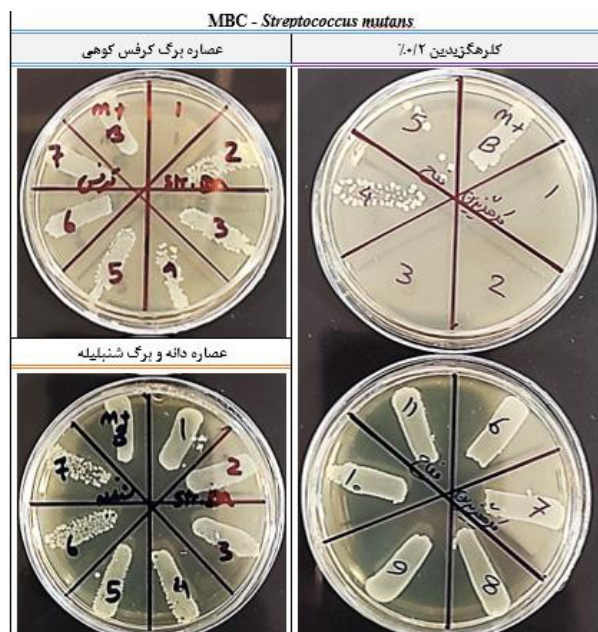
2 Minimum Bactericidal Concentration

بعد از تلقیح باکتری، پلیت‌ها در جار بی هوازی در دمای ۳۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت گرماخانه‌گذاری شدند؛ پس از گرماخانه‌گذاری، با توجه به اینکه چاهک‌های شفاف، نشانه عدم رشد باکتری و چاهک‌های کدر، نشانه رشد باکتری می‌باشند، کمترین غلظت عصاره‌ها که باعث مهار رشد باکتری و شفاف شدن چاهک گردید، به عنوان MIC نمونه‌ها در نظر گرفته شد (شکل ۲).

آزمایش انتشار در چاهک مشخص گردید) به محیط کشت اضافه شده و در چاهک‌های بعدی تا غلظت ۱۲ ppm به نسبت ۱ به ۱ رقیق سازی گردید. بعد از رقیق کردن متوالی عصاره‌ها، به همه چاهک‌ها به جز چاهک اول میزان مساوی از باکتری استرپتوکوک موتانس (1×10^6 CFU/mL) اضافه شد.



شکل ۲- تعیین MIC عصاره‌ها و دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪

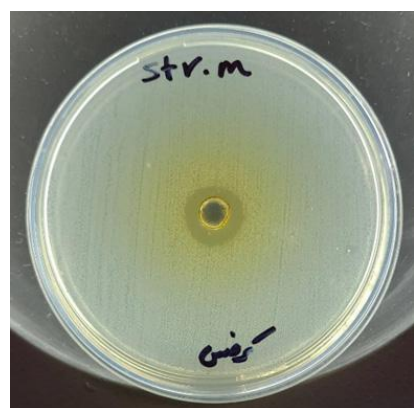
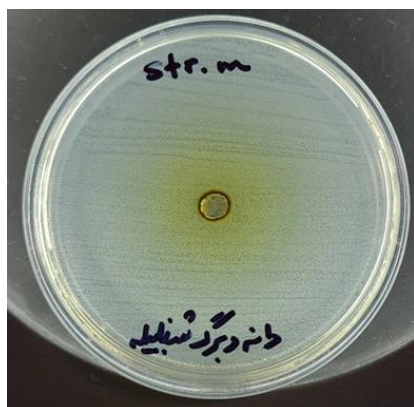


شکل ۳- تعیین MBC عصاره‌ها و دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪

ب) تعیین MBC

بعد از تعیین MIC مواد مذکور، MBC آنها نیز مشخص گردید. MBC، روندی است که در طی آن حداقل غلظت کشندگی مواد مشخص می‌گردد. برای تعیین اولین غلظت کشندگی عصاره‌ها و دهانشویه در چاهک، از غلظت "چاهک‌هایی که MIC عصاره‌ها و دهانشویه در آن مشاهده گردید"، شروع کرده و در جهت غلظت‌های بالاتر از آن در پلیت‌های ۸ خانه‌ای، روند کار ادامه پیدا کرد. سپس باکتری به میزان مساوی به چاهک‌های حاوی عصاره و دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ اضافه گردید. در ادامه، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت در جار بی هوازی قرار داده شد و کمترین غلظتی که در آن عدم رشد باکتری استرپتوکوک موتانس مشاهده شد، به عنوان MBC عصاره‌های شنبلیله، کرفس کوهی و دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ در نظر گرفته شد (شکل ۳).

شنبليله با عصاره کرفس کوهی و دهانشویه کلرهگزیدین دیده شده ولی قطر هاله عدم رشد عصاره کرفس کوهی قابل مقایسه با دهانشویه بوده است. براین اساس، حساسیت مناسب باکتری استرپتوکوک موتانس در برابر عصاره کرفس کوهی در این تحقیق دیده شد. برای آب مقطر هم به عنوان کنترل منفی، هاله ای تشکیل نگردید.



شکل ۴- نتایج آزمایش well diffusion agar با غلظت ۱۰۰۰۰۰ppm

مرحله چهارم: روش Viable Cell Count

Viable Cell Count، روش کمی اثبات خاصیت آنتی باکتریال مواد می باشد. به این صورت که در این روش، باکتری ها شمارش شده و خاصیت آنتی باکتریال، به شکل درصد و کاهش لگاریتم گزارش می شود. در این مرحله، ابتدا عصاره های مذکور با غلظت های یکسان (۵۰۰۰۰ ppm) و دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ در محیط کشت مایع مولر هیتون براث ریخته شد و سپس، تعداد (باکتری استرپتوکوک موتانس به محیط های کشت اضافه گردید.

در گام بعد، محیط های کشت حاوی عصاره و دهانشویه به همراه باکتری در شیکر (دمای ۳۷ درجه و ۱۰۰rpm) قرار داده شد. سپس در زمان های ۳۰ دقیقه، ۶ ساعت و ۲۴ ساعت، مقدار ۰/۱cc از محلول ها با میله L شکلی روی محیط کشت جامد تریپتیک سوی آگار با روش spread plate کشت داده شد. در ادامه، پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در جار بی هوازی گرماخانه گذاری شدند. در نهایت، تعداد کلنی باکتری بر اساس تعداد سلول های زنده در واحد حجم (CFU/mL) به شکل درصد و لگاریتم کاهش محاسبه شدند و شمارش آنها (تعداد کلنی باکتری)، برای هر یک از عصاره های گیاهی و دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲، ۰/۷٪ مرتبه تکرار گردید. جهت تأیید نتایج به دست آمده از این آزمایش، آنالیز آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS صورت گرفت. سطح معنی داری نیز، ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

پس از انجام مراحل آزمایشگاهی و مشاهده و ثبت گزارشات بدست آمده، نتایج مطالعه حاضر، در سه بخش مختلف شامل: ۱-Well Diffusion Agar ۲- MIC و Viable Cell Count ۳- MBC توصیف و تحلیل گردید.

نتایج آزمایش Well Diffusion Agar

در آزمایش well diffusion agar، قطر هاله عدم رشد برای گونه گرم مثبت استرپتوکوک موتانس در دهانشویه برابر ۱۹mm، برای عصاره برگ و دانه شنبليله در غلظت ۱۰۰۰۰۰ppm برابر صفر و برای عصاره کرفس کوهی در همین غلظت برابر ۱۳mm گزارش شد. بدین ترتیب، قطر هاله کلرهگزیدین ۰/۲٪ از دو عصاره شنبليله و کرفس کوهی بیشتر بوده است (شکل ۴)؛ همچنین اختلاف زیادی بین قطر هاله عدم رشد عصاره

نتایج آزمایشات MIC و MBC

عصاره کرفس کوهی کمتر از عصاره شنبلیله گزارش شده است. براساس نتایج مشاهده شده باکتری استرپتوکوک موتانس حساسیت بیشتری در برابر دهانشویه کلرهگزیدین نشان داده است و در مقایسه عصاره ها، این باکتری، حساسیت بیشتری در برابر کرفس کوهی داشت.

در ادامه، همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می شود، MIC عصاره شنبلیله، کرفس کوهی و دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ به ترتیب، < 100000 ، 50000 و 6250 ppm و MBC آنها به ترتیب 100000 ، 100000 و 12500 ppm گزارش شده است. براساس نتایج بدست آمده حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی دهانشویه کمتر از عصاره ها بوده و این پارامتر برای



MBC (Minimum Bactericidal Concentration): حداقل غلظت باکتری کشی
MIC (Minimum Inhibitory Concentration): حداقل غلظت مهار کنندگی

نمودار ۱ - مقایسه حداقل غلظت مهار کنندگی و کشندگی باکتری، برای عصاره شنبلیله، کرفس کوهی و دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪

۳) نتایج آزمایش Viable Cell Count

هر یک از عصاره های گیاهی و دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ در شکل ۸ مشاهده می شود.

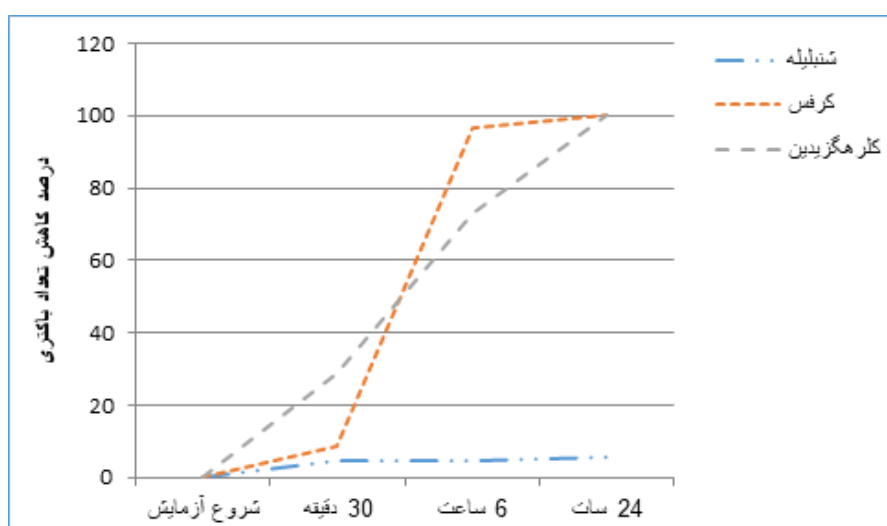
بنابراین، بر اساس نتایج بدست آمده می توان نتیجه گرفت که با گذشت زمان، میزان کاهش تعداد باکتری در عصاره کرفس کوهی و دهانشویه کلرهگزیدین بیشتر شده است. همچنین، تأثیر عصاره کرفس کوهی در کاهش تعداد باکتری، بعد از گذشت ۶ ساعت، بیشتر از دهانشویه کلرهگزیدین ثبت گردیده است؛ که نشان از حساسیت بیشتر این باکتری در برابر عصاره مذکور می باشد.

در مرحله بعد، شمارش باکتری استرپتوکوک موتانس قبل و بعد از تأثیر عصاره های شنبلیله و کرفس کوهی و دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ صورت پذیرفت. بر اساس نتایج بدست آمده، میانگین درصد کاهش باکتری بعد از ۳۰ دقیقه برای عصاره شنبلیله، عصاره کرفس کوهی و دهانشویه کلرهگزیدین به ترتیب معادل $6/8$ ، $> 5/0$ و $6/28$ ٪ بوده است. این مقادیر برای گروه ها در ۶ ساعت بعد به ترتیب برابر $5/0$ ، $9/71$ ٪ و $9/99$ ٪ و در ۲۴ ساعت به ترتیب معادل $9/99$ ، $> 8/5$ ٪ و $> 9/99$ ٪ گزارش گردید (نمودار ۲).

نمودار لگاریتم و درصد کاهش باکتری استرپتوکوک موتانس نیز برای



نمودار ۲- درصد کاهش شمار باکتری استرپتوکوک موتانس، ۳۰ دقیقه و ۶ ساعت پس از تأثیر عصاره‌های برگ و دانه شنبليله، کرفس کوهی و دهانشویه کلر هگزیدین، در غلظت ۵۰۰۰۰ ppm



نمودار ۳- درصد و لگاریتم کاهش باکتری استرپتوکوک موتانس ۳۰ دقیقه و ۶ ساعت پس از شروع آزمایش برای عصاره شنبليله کرفس کوهی و دهانشویه کلر هگزیدین ۰٫۲٪ در غلظت ۵۰۰۰۰ ppm

بودن واریانس ها هم که با استفاده از آزمون Levene انجام شد، مشخص گردید واریانس مقادیر درصد کاهش باکتری در زمان ها و در گروه های مختلف همگن نیستند ($p > 0.05$). به دلیل عدم تبعیت داده ها از توزیع نرمال در تمام گروه ها، عدم برقراری فرض همگن بودن داده ها و نیز تعداد اندک نمونه ها در گروه ها (۷ نمونه) از آزمون های پارامتری برای مقایسات آماری استفاده شد. نتایج آزمون های آماری را در جدول ۲ گزارش گردیده است.

برای آنالیزهای آماری، در ابتدا تبعیت داده ها از توزیع نرمال با آزمون های Kolmogorov-Smirnov و Shapiro-will ارزیابی شده و طبق نتایج این آزمون ها، درصد کاهش باکتری استرپتوکوک موتانس در زمان های ۳۰ دقیقه و ۶ ساعت در کاربرد عصاره شنبلیله و نیز در زمان ۶ ساعت در کاربرد عصاره کرفس کوهی از توزیع نرمال تبعیت نمی کردند. در سایر گروه ها و زمان ها، تبعیت داده های کاهش باکتری از توزیع نرمال تأیید گردید (جدول ۱). از طرف دیگر، در بررسی برقراری فرض همگن

زمان	گروه	Kolmogorov-Smirnov آزمون			Shapiro-Wilk آزمون		
		آماره	درجه ی آزادی	P value	آماره	درجه ی آزادی	P value
۳۰ دقیقه	شنبلیله	۰/۳۶۰	۷	۰/۰۰۷	۰/۶۶۴	۷	۰/۰۰۱
	کرفس کوهی	۰/۲۵۶	۷	۰/۱۸۲	۰/۸۳۳	۷	۰/۰۸۶
	کلرهگزیدین	۰/۲۵۸	۷	۰/۱۷۴	۰/۸۱۸	۷	۰/۰۶۲
۶ ساعت	شنبلیله	۰/۳۶۰	۷	۰/۰۰۷	۰/۶۶۴	۷	۰/۰۰۱
	کرفس کوهی	۰/۳۳۰	۷	۰/۰۲۰	۰/۷۶۰	۷	۰/۰۱۶
	کلرهگزیدین	۰/۲۵۸	۷	۰/۱۷۴	۰/۸۱۸	۷	۰/۰۶۲

جدول ۱- نتایج آزمون های Shapiro-Wilk و Kolmogorov-Smirnov در بررسی وضعیت تبعیت داده ها از توزیع نرمال

نتیجه	رد یا عدم رد فرض صفر در سطح اطمینان ۹۵٪	P value	آماره آزمون	زمان سپری شده	فرض صفر	نوع آزمون	شرح آزمون
حداقل یک متغیر اثر کاهشی بیشتر دارد.	رد فرض	۰/۰۰۰	۱۶/۹۳۷	۳۰ دقیقه	همه متغیرها اثر برابر دارند	کروسکال-والیس	آزمون برابری اثر کاهشی باکتری تمامی متغیرها
حداقل یک متغیر اثر کاهشی بیشتر دارد.	رد فرض	۰/۰۰۰	۱۷/۷۱۵	۶ ساعت			
اثر کاهشی بیشتر کرفس کوهی از شنبلیله	رد فرض	۰/۰۰۷	۴/۵	۳۰ دقیقه	اثر کاهشی شنبلیله و کرفس کوهی برابر است		آزمون مقایسه اثر شنبلیله و کرفس کوهی
اثر کاهشی بیشتر کرفس کوهی از شنبلیله	رد فرض	۰/۰۰۱	۰/۰۰	۶ ساعت			
اثر کاهشی بیشتر کلرگزیدین از شنبلیله	رد فرض	۰/۰۰۱	۰/۰۰	۳۰ دقیقه	اثر کاهشی شنبلیله و کلرگزیدین برابر است	من-ویتنی	آزمون مقایسه اثر شنبلیله و کلرگزیدین
اثر کاهشی بیشتر کلرگزیدین از شنبلیله	رد فرض	۰/۰۰۱	۰/۰۰	۶ ساعت			
اثر کاهشی بیشتر کلرگزیدین از کرفس کوهی	رد فرض	۰/۰۰۱	۵/۴۲۲-	۳۰ دقیقه	اثر کاهشی دهانشویه و کرفس کوهی برابر است	تی-مستقل	آزمون مقایسه اثر دهانشویه کلرگزیدین و کرفس کوهی
اثر کاهشی بیشتر کرفس کوهی از کلرگزیدین	رد فرض	۰/۰۰۳	۱/۵	۶ ساعت		من-ویتنی	

جدول ۲- نتایج آزمون های آماری

بحث

تحقیق حاضر با هدف تعیین خاصیت آنتی باکتریال عصاره برگ و دانه شنبلیله و عصاره گیاه کرفس کوهی بر شمار باکتری استرپتوکوک موتانس که یکی از میکروارگانیسم های اصلی دخیل در فرایند ایجاد پوسیدگی می باشد، انجام شد.

آزمایش well diffusion agar

طبق نتایج تحقیق حاضر، در روش well diffusion agar، قطر هاله عدم رشد برای باکتری در دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ بیشتر از عصاره های شنبلیله و کرفس کوهی بوده است؛ و عصاره شنبلیله فاقد هاله مهار رشد بود. این یافته ها نشان دهنده حساسیت بیشتر باکتری در برابر دهانشویه کلرهگزیدین نسبت به عصاره ها و همچنین حساسیت بیشتر نسبت به عصاره کرفس کوهی در مقایسه با عصاره شنبلیله می باشد.

مشابه این مطالعه، رئیسی و همکاران در سال ۲۰۱۵، مطالعه ای تحت عنوان بررسی خاصیت آنتی باکتریال عصاره هیدروالکلی گیاه نعنای و نمک سدیم کلراید روی باکتری استرپتوکوک موتانس انجام داده اند. در این مطالعه مشاهده گردید، در روش های Well Diffusion Agar و Disk Diffusion Agar برای عصاره گیاه نعنای، هاله ای تشکیل نشد. همچنین، طبق مطالعه ای که حیدری و همکاران در سال ۲۰۱۴، با هدف بررسی پتانسیل آنتی باکتریال کرفس کوهی انجام دادند، در روش دیسک دیفیوژن، تمامی غلظت های عصاره اتانولی، اثر بازدارندگی بر علیه باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس داشتند. در بررسی عیبری و همکاران نیز، در سال ۲۰۰۹ که بر روی اثرات عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله بر علیه گونه های مختلف انجام شد، قطر هاله عدم رشد برای گونه آئروژینوزا صفر برآورد شد که با یافته های تحقیق حاضر همخوانی دارد.^{۱۹}

این در حالی است که، در مطالعه الوان و همکاران در سال ۲۰۱۷، بیشترین اثرات ضدباکتریایی عصاره متانولی دانه شنبلیله، شامل بیشترین مقدار هاله عدم رشد بر علیه گونه های سودوموناس آئروژینوزا در غلظت ۷۵٪ و حداقل غلظت مهار کنندگی بر علیه گونه های اشیریشیا کولای و در غلظت ۲۵٪ ثبت گردید.^{۲۰}

دهاراجیا و همکاران نیز، در سال ۲۰۱۶؛ اثرات ضد میکروبی عصاره های مختلف شنبلیله را بررسی و در روش انتشار چاهک نشان دادند، بیشترین

میزان فعالیت آنتی باکتریال عصاره برگ شنبلیله بر علیه گروه های *Serratia marcescens* بوده و بعد از آن، بیشترین خاصیت ضد باکتریایی برای گونه های *Bacillus cereus* در عصاره متانولی بوده است.^{۲۱}

مشاهده هاله عدم رشد در مطالعه های اخیر برای عصاره شنبلیله می تواند به دلیل متفاوت بودن باکتری های مورد بررسی در آنها نسبت به تحقیق حاضر باشد. همچنین، برخی عوامل از جمله غلظت ماده ضدباکتری، تعداد میکروارگانیسم ها، نوع آزمون میکروارگانیسم، دما و pH در نتایج خاصیت ضد میکروبی مواد مختلف نیز تأثیرگذار هستند.^{۲۲} در این مطالعه نیز، استفاده از حرارت بالا به جهت آلودگی زدایی عصاره اولیه، می تواند موجب تغییر خاصیت ذاتی این عصاره شده باشد.

آزمایشات MIC و MBC

طبق نتایج تحقیق حاضر، میزان MIC (حداقل غلظت مهار کنندگی) و MBC (حداقل غلظت کشندگی) دهانشویه در مقایسه با عصاره ها کمتر بوده و نیز حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره کرفس کوهی حدود نصف عصاره شنبلیله بوده است. بالاتر بودن MIC عصاره شنبلیله نسبت به عصاره کرفس کوهی نشان دهنده حساسیت بیشتر باکتری استرپتوکوک موتانس در برابر کرفس کوهی بوده است.

در راستای نتایج مطالعه حاضر، ناظمی سلمان و همکاران در سال ۲۰۲۱، تحقیقی تحت عنوان مقایسه خاصیت آنتی باکتریال ذرات نانوپارتیکل سیاه دانه و دهانشویه کلرهگزیدین علیه پاتوژن های دهان انجام دادند، که نتایج حاکی از آن بود که MIC و MBC ذرات سیاه دانه، بر روی دو باکتری انتروکوک فوکالیس و استرپتوکوک موتانس از سایر پاتوژن ها بالاتر بوده و دو باکتری مذکور نسبت به سایر پاتوژن های مورد بررسی به ذرات سیاه دانه مقام ترند. همچنین MIC و MBC دهانشویه کلرهگزیدین از ذرات سیاه دانه کمتر بوده که نشان دهنده حساسیت بیشتر پاتوژن های مورد بررسی در برابر دهانشویه کلرهگزیدین بوده است.^{۲۳}

همچنین، در مطالعه ای که محمودی و همکاران در سال ۲۰۱۳ پتانسیل آنتی باکتریال اسانس کرفس کوهی علیه باکتری های ناشی از غذا و باکتری های پروبیوتیک را بررسی کردند، در میان پاتوژن ها، *S. aureus* حساس ترین باکتری مورد مطالعه بوده است. رنج MIC و MBC اسانس این گیاه نیز، نشان دهنده خاصیت آنتی باکتریال قابل قبول این گیاه در مقابل باکتری های مورد مطالعه بوده است.^{۲۴}

این در حالی است که، بابایی و همکاران در سال ۲۰۱۸، اثرات

در راستای این مطالعه، خلیفه و همکاران در سال ۲۰۲۱، که به بررسی خاصیت آنتی میکروبیال تیموکینون علیه پاتوژن های دهان پرداخته اند، در میزان کاهش تعداد باکتری استرپتوکوک موتانس بین تیموکینون و دهانشویه کلرهگزیدین اختلاف زیادی مشاهده گردید. در واقع میزان کاهش باکتری در تیموکینون کمتر از دهانشویه کلرهگزیدین گزارش شده است.^{۲۷}

همچنین در مطالعه میلان و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بررسی و مقایسه خاصیت آنتی باکتریال دهانشویه کلرهگزیدین و غلظت های متفاوت عصاره دانه انگور علیه باکتری استرپتوکوک موتانس پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد که هرچه غلظت عصاره دانه انگور بالاتر می رود، کاهش تعداد باکتری مذکور بیشتر شده است، به گونه ای که در غلظت های پایین تر، کاهش قابل توجهی در تعداد باکتری مشاهده نشد. به طور کلی در این پژوهش حساسیت باکتری استرپتوکوک موتانس نسبت به دهانشویه کلرهگزیدین، بیشتر از غلظت های مختلف عصاره دانه انگور گزارش گردید.^{۲۸}

نتیجه گیری

ایسن مطالعه با هدف بررسی خاصیت آنتی باکتریال عصاره شنبلیله و کرفس کوهی در مقایسه با دهانشویه کلرهگزیدین انجام پذیرفت که در نتیجه این پژوهش، عصاره شنبلیله خاصیت ضد میکروبی کمی در مقابل این باکتری از خود نشان داد؛ از طرفی هاله مهار رشد باکتری استرپتوکوک موتانس، برای عصاره کرفس کوهی میزان قابل مقایسه ای با هاله مهار رشد برای دهانشویه کلرهگزیدین بود. همچنین، میزان کاهش بیشتر تعداد باکتری استرپتوکوک موتانس پس از گذشت ۶ ساعت در مواجهه با عصاره کرفس کوهی در مقایسه با دهانشویه کلرهگزیدین، در آزمون شمارش باکتری، می تواند نشان دهنده حساسیت قابل توجه این باکتری به عصاره مذکور باشد. لذا، عصاره کرفس کوهی اثرات ضدباکتریایی قابل مقایسه ای با دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ بر علیه گونه های استرپتوکوک موتانس داشته و در صورت تأیید اثرات آن در آزمایشات دیگر و نیز در شرایط بالینی، می توان از این عصاره طبیعی در راستای کاهش باکتری های استرپتوکوک موتانس به صورت دهانشویه استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از واحد توسعه تحقیقات بالینی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی البرز تشکر و قدردانی به عمل می آید.

آنتی باکتریال و سابتوتوکسیک عصاره های مختلف دانه شنبلیله را بررسی و نشان دادند در روش انتشار آگار، این عصاره ها هاله عدم رشد بر علیه گونه های باکتری نداشته ولی در روش broth micro-dilution، حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره ها بر علیه گونه های باکتری مشاهده شد.^{۲۹}

همچنین، دهاراجیا و همکاران در سال ۲۰۱۶، محدوده حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره های مختلف شنبلیله را بررسی و عناصر فیتوشیمی موجود در عصاره های برگ های شنبلیله را با خواص آنتی باکتریال آنها مرتبط دانستند.^{۳۱}

عبیری و همکاران نیز، در سال ۲۰۰۹ میزان MIC عصاره هیدروالکلی دانه های شنبلیله بر علیه گونه های پنومونی، اشریشیا کولای، آئروژینوزا و استافیلوکوک آئروس را بررسی کردند که درباره سه گونه های اول یکسان و برای گونه استافیلوکوک آئروس کمتر بوده است.^{۱۹}

آزمایش viable cell count

طبق نتایج تحقیق حاضر در روش viable cell count و در زمان های ۳۰ دقیقه و ۶ ساعت بعد از مواجهه، تفاوت های معنی داری از نظر مقادیر باکتری های زنده در عصاره ها و دهانشویه مشاهده گردید، بطوری که در ۳۰ دقیقه، بیشترین اثر کاهش باکتری به ترتیب در دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪، کرفس کوهی و شنبلیله و در زمان ۶ ساعت، بیشترین کاهش در شمار باکتری ها به ترتیب در کرفس کوهی، دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪ و شنبلیله مشاهده شد. در زمان ۲۴ ساعت نیز، عصاره کرفس کوهی و دهانشویه کلرهگزیدین سبب کاهش ۱۰۰ درصدی گونه های باکتری شده بودند.

دهاراجیا و همکاران، در سال ۲۰۱۶، اثرات ضد میکروبی عصاره های مختلف شنبلیله را بررسی و گزارش کردند که عصاره های برگ شنبلیله به دلیل داشتن عناصر فیتوشیمیایی، خواص آنتی باکتریال دارند.^{۳۱}

همچنین خاندرا و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش کردند عصاره دانه ای شنبلیله، خصوصیات ضدباکتریایی علیه اشریشیا کولای، استافیلوکوک آئروس، باسیلوس سابیلیس و لاکتوباسیلوس دارد ۲۶ که این یافته ها با نتایج مطالعه حاضر مغایرت داشت. دلیل این مغایرت، می تواند استفاده از حرارت بالا به جهت آلودگی زدایی عصاره اولیه باشد که موجب تغییر خاصیت ذاتی این عصاره شده است. همچنین، مواردی مثل غلظت ماده ضدباکتری، تعداد میکروارگانیسم ها، نوع آزمون میکروارگانیسم و pH در خاصیت ضد میکروبی مواد مختلف تأثیر گذار هستند.^{۳۲}

تعارض منافع

References

در این مطالعه هیچگونه تعارض منافی وجود ندارد.

حمایت مالی

این مطالعه برگرفته از رساله دکتری در رشته دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی البرز است که در قالب طرح به شماره ۱۴۰۱/۵/۱۸۰/۶۰ مصوب گردیده است.

ملاحظات اخلاقی

این طرح با شناسه IR.ABZUMS.REC.۱۴۰۱،۰۰۴ در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی البرز تأیید گردید.

مشارکت نویسندگان

نفیسه فلاح: ایده پژوهش، جمع آوری داده ها، تجزیه و تحلیل داده ها، نگارش مقاله
آزاده بابائی (نویسنده مسئول): ایده پژوهش، طراحی پروپوزال، جمع آوری داده ها، تجزیه و تحلیل داده ها، نگارش مقاله
زهرا مومنی: ایده پژوهش، طراحی پروپوزال، تجزیه و تحلیل داده ها، نگارش مقاله

Khoshnevisan M, Ghasemianpour M, Samadzadeh H, Baez R. Oral health status and healthcare system in IR Iran. J Contemp Med Sci. 2018;4(3):107-8.

Ezati F, Bakhshi E, Ezati E, Salimi N. Investigate of Tooth Decay and Its Relationship with Knowledge, Attitude and Performance (Kap) in High School Students in Islamabad-E-Gharb City. J Arak Uni Med Sci 2023;26(2):450-463

Ryan KJ, Ray CG. Med Microbiol. McGraw Hill. 2004;4:370.

Nourizadeh Tehrani P. The Cost of All Types of Dental Services Presented by Farman Farmaeian Comprehensive Health Services Center at Tehran University of Medical Sciences using Activity-Based Costing Method in 1397. Hakim Res J. 2019;22(4):319-328.

Marthaler TM, Steiner M, Menghini G, Bandi A. Caries prevalence in Switzerland. Int Dent J. 1994;44(4 Suppl 1):393-401.

Babadi, F, Mohammadtaghvaei, N, Delnavaz S. Comparison of the effects of Jaflex and Persica mouthwashes on salivary pH and buffer capacity in the students and patients referred to the dentistry clinic of Sina hospital in Ahvaz. Jundishapur Sci Me J. 2019;18(1):13-21.

Nahvi M, Zarei E, Marzban S, Jahanmehr N. Utilization of dental services and its out-of-pocket payments: a study in dental clinics of Ramsar. J Mashhad Dent School 2017;41:171-182.

Neamatollahi A, Nekokah F. Comparison of the Antimicrobial Activity of ethanol Extract of Celery (Kelussia odoratissima) with common antibiotics used in Rainbow trout farms. J Aquac Res Dev. 2018;12(2):27-36.

Zajkani E, Abdi Z, Zeighami H. Evaluating the effect of 0. 05% fluoride and chlorhexidine 0. 2% mouthwashes in comparison to nanosil D1+ F mouthwash on Streptococcus mutans, in vitro. 2022;19(1)28-36.

- Adelbergh J. Microbiology. 1992;238-245.
- Nahvi M, Zarei E, Marzban S, Jahanmehr N. Utilization of dental services and its out-of-pocket payments: a study in dental clinics of Ramsar. J Mashhad Dent School 2017;41:171-182.
- Dini M. Scientific name of medicinal plants used in traditional medicine. Forest and Rangeland Research Institute Publication, Iran. 2006:299-300.
- Al-Timimi LA. Antibacterial and anticancer activities of fenugreek seed extract. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP. 2019;20(12):3771.
- Mozaffarian V. Two new genera of Iranian Umbelliferae. Botanicheskii Zhurnal (St Petersburg). 2003;2:88-94.
- Ghasemi Pirbalouti A, Shah Wali A, Saghaee S, Azizi S, Hamed B, Shahgholian L. Effect of chicory extract (cichorium intybus L.) and cultivars of Bakhtiari essence (Kleussia ordratassima Mizaff) on removal of organophosphoric toxin poisoning in rat. Herbal Medicine. 2011;2:31-36.
- Salimi MA, Ebrahimi A, Asadieh ZS, Dehkordi SS. Essential oil composition of Kelussia odoratissima Mozaff. Iranian J Medicinal Aromatic Plants. 2010;26(2):147-156.
- Rayesi M, Mohammadpour M, Feridouni M, Zare M, Heydari H. Investigating the bactericidal and bacteriostatic effect of hydroalcoholic extract of mint plant and sodium chloride salt on Streptococcus mutans bacteria. Res Sci J Ardabil Univ Med Sci Health Serv. 2015; 22(4)
- Heidari Sureshjani M, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Shahidi F. Comparison of the inhibitory and antibacterial effect of aqueous and ethanolic extract of Kelussia odoratissima on some pathogenic bacteria. Rafsanjan Uni Med Sci J. 2015;13(9):775-84.
- Abiri R, Majnooni M, Malek Khatabi P, Adibi H. Study of antimicrobial effects of Trigonella Foenum hydroalcoholic extract on different bacterial strains. Med Lab J. 2009;3(1).
- Alwan AM, Jassim IM, Jasim GM. Study of antibacterial activities of seeds extract of fenugreek (trigonella foenum-graecum). Diyala J Med. 2017;13(1):62-67.
- Dharajiya D, Jasani H, Khatrani T, Kapuria M, Pachchigar K, Patel P. Evaluation of antibacterial and antifungal activity of fenugreek (Trigonella foenum-graecum) extracts. Int J Pharmacy and Pharmaceutical Sci. 2016;8(4):212-217.
- Khotimah H, Wahyu Indriati D, Sundari AS. Screening in vitro antimicrobial activity of celery (Apium Graveolens) against Staphylococcus sp. Mal J Med Health Sci. 2020;16(Suppl6):72-77.
- Salman BN, Sallah S, Abdi F, Salahi S, Rostamizadeh K, Shabestari SB. The Comparison of Antimicrobial Effect of Nigella sativa Nanoparticle and Chlorhexidine Emulsion on the Most Common Dental Cariogenicic Bacteria. Med J Islam Repub Iran. 2021;35.
- Mahmoudi R, Kosari M, Zare P, Barati S. Kelussia odoratissima essential oil: biochemical analysis and antibacterial properties against pathogenic and probiotic bacteria. J. Agroaliment. Processes Technol. 2014;20(1):109-5.
- Babaei AH, Motamedifar M, Khalifat S, Mohammadi A, Zamani KH, Motamedifar A. In vitro study of antibacterial property and cytotoxic effects of aqueous, ethanolic, methanolic, and hydroalcoholic extracts of fenugreek seed. P J M H S 2018;12(2):906- 910.
- Khanra R. Antimicrobial activity of ethanolic extract of Tigonella Foenum-Graecum Linn. Int Res J Pharm. 2010;1(1):181-183.
- Al-Khalifa KS, AlSheikh R, Al-Hariri MT, El-Sayyad H, Alqurashi MS, Ali S, Bugshan AS. Evaluation of the Antimicrobial Effect of Thymoquinone against Different Dental Pathogens: An In Vitro Study. Molecules. 2021;26(21):6451.
- Swadas M, Dave B, Vyas SM, Shah N. Evaluation and comparison of the antibacterial activity against Streptococcus mutans of grape seed extract at different concentrations with chlorhexidine gluconate: An in vitro study. Int J Clin Pediatr Dent. 2016;9(3):181.

Antibacterial effects of *Trigonella foenum-graceum* L. and *Kellusia odoratissima* Mozaff versus 0.2% chlorhexidine on *Streptococcus mutans* count: An in vitro study

Received: 07 Dec 2023; Accepted: 18 Feb 2024

Nafise Fallah¹,
Azadeh Babaei^{*2}
Zahra Momeni³

¹ Student Research Committee,
Alborz University of Medical
Sciences, Karaj, Iran.
² Community Oral Health
Department, School of Dentistry,
Alborz University of Medical
Sciences, Karaj, Iran.
³ Community Oral Health
Department, School of Dentistry,
Alborz University of Medical
Sciences, Karaj, Iran.

*Corresponding author:
Azadeh Babaei, DDS, PhD
Community Oral Health Dept.
School of Dentistry
Alborz University of Medical
Sciences Karaj Iran
Email: azadeh.t.babaei@gmail.com
(AB)
Tel: +98-26-3353 1614

Abstract

Introduction: Tooth decay is a prevalent chronic disease worldwide; preventive care is essential for its management. Despite some side effects, Chlorhexidine mouthwash is the gold standard for controlling plaque and preventing caries. This study evaluates the antibacterial effects of “*Trigonella foenum-graceum*” L. and “*Kellusia odoratissima*” Mozaff extracts on “*Streptococcus mutans*” compared to 0.2% chlorhexidine mouthwash.

Materials & Methods: This laboratory study involved preparing herbal extracts of “*Trigonella foenum-graceum*” L. and “*Kellusia odoratissima*” Mozaff. The Well Diffusion Agar test measured the inhibition zone diameter at a concentration of 100,000 ppm for the extracts and chlorhexidine mouthwash, with chlorhexidine and distilled water serving as positive and negative controls, respectively. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were determined for the extracts and mouthwash. Finally, the “*Streptococcus mutans*” count was assessed after exposure to the extracts and mouthwash. Data were analyzed using SPSS 26.0, applying the Kruskal-Wallis test for group comparisons and the Mann-Whitney U test for pairwise comparisons.

Results: The study reported three key findings. The inhibition zone diameters were 19 mm for chlorhexidine mouthwash, 0 mm for “*Trigonella foenum-graceum*” L., and 13 mm for “*Kellusia odoratissima*” Mozaff. MIC values were 6250 ppm for chlorhexidine, >100000 ppm for “*Trigonella foenum-graceum*”, and 50000 ppm for “*Kellusia odoratissima*”, with corresponding MBC values of 12500 ppm, >100000 ppm, and 100000 ppm. Significant differences in bacterial reduction percentages were noted after 30 minutes and 6 hours (both: $p < 0.001$), with chlorhexidine showing the highest efficacy at 30 minutes, while “*Kellusia odoratissima*” Mozaff had the highest efficacy at 6 hours.

Conclusion: This study demonstrated that “*Kellusia odoratissima*” Mozaff extract has antibacterial effects comparable to chlorhexidine, while “*Trigonella foenum-graceum*” L. showed limited antibacterial activity against “*Streptococcus mutans*”.

Keywords: Dental caries, Chlorhexidine, *Streptococcus mutans*, Herbal Medicine, Minimum Inhibitory Concentration, Minimum Bactericidal Concentration