

ترکیب شیمیایی و غلظت ترکیبات اسانس حاصل از گیاه نعناع و تأثیر آن بر سه سوش *Lactobacillus casei*، *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus*

دکتر زهرا گلستان نژاد^۱، دکتر مونا بزاززاده^۲، هژیر یوسف شاهی^۳، آزاده افشاری*

چکیده

مقدمه: پوسیدگی دندان یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در جهان است. باکتری‌های مختلفی در ایجاد و پیش‌برد این ضایعه نقش دارند که لاکتوباسیل‌ها از آن جمله می‌باشند. هدف مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر اسانس گیاه نعناع (*Menthaspicata*) بر سه سوش *Lactobacillus plantarum* (PTCC 1058) و *Lactobacillus casei* (PTCC 1608) و *Lactobacillus rhamnosus* (PTCC 1637) بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی هم‌گروهی آزمایشگاهی، تهیه‌ی اسانس نعناع به‌وسیله‌ی دستگاه Clevenger type و به روش تقطیر با آب (Hydro distillation) انجام شد. جهت بررسی ترکیب شیمیایی آنالیزهای کروماتوگرافی گازی به‌همراه طیف سنجی جرمی صورت پذیرفت. برای تعیین اثر ضدباکتری اسانس از روش‌های Dilution of well و انتشار دیسک استفاده شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ به روش One way ANOVA و Tukey آنالیز آماری شد ($\alpha = 0/05$).

یافته‌ها: اسانس نعناع بر هر سه سوش مؤثر بود. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) برای هر سه سوش برابر با $222/5 \mu\text{g/mL}$ بود. حداقل غلظت کشندگی (MBC) برای دو سوش *Lactobacillus casei* و *Lactobacillus plantarum* برابر با ۴۴۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای سوش *Lactobacillus rhamnosus* 1637 برابر با ۸۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. برای غلظت‌های پایین‌تر از ۸۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، تفاوت معناداری میان میزان هاله عدم رشد (Inhibition zone) برای سه سوش باکتری مشاهده نشد ($p \text{ value} < 0/001$).

نتیجه‌گیری: با توجه به محدودیت‌های این مطالعه، اسانس نعناع دارای خواص ضد باکتری بوده و علیه پاتوژن‌های حفره‌ی دهان مؤثر است. البته مطالعات بیشتر در این زمینه توصیه می‌گردد.

کلید واژه‌ها: گیاه نعناع، اسانس، لاکتوباسیل

* دانشجوی دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران (مؤلف مسؤول)
azadehafshari_es@yahoo.com

۱: استادیار، مرکز تحقیقات ایمپلنت‌های دندان، گروه بیماری‌های دهان، فک و صورت، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲: استادیار، گروه بیماری‌های دهان، فک و صورت، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۳: دانشجوی دندان پزشکی، کمیته پژوهش‌های دانشجویی، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

این مقاله در تاریخ ۹۳/۳/۲۰ به دفتر مجله رسیده، در تاریخ ۹۳/۴/۱۰ اصلاح شده و در تاریخ ۹۳/۴/۱۷ تأیید گردیده است.

مجله دانشکده دندان پزشکی اصفهان
۱۳۹۳؛ ۱۰(۵): ۳۲۲ تا ۳۳۴

مقدمه

از زمان‌های دور تاکنون از گیاهان برای درمان بیماری‌ها استفاده می‌شده است. در طی تاریخ، ساکنان آسیا، آمریکای جنوبی و آفریقا بیشترین استفاده از گیاهان دارویی را داشته‌اند [۱]. براساس گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی هنوز حدود ۸۰٪ از مردم جهان به درمان‌های سنتی اعتماد دارند [۲]. به‌علاوه امروزه نیز تعداد فراوانی از داروهای مدرن از گیاهان مشتق می‌گردند [۳]. به‌طور مثال، مطالعه‌ی فدایی و همکاران نشان دهنده‌ی اثر ضد باکتریایی اسانس نعناع فلفلی علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی بوده است [۴].

با ظهور داروهای نوین و عوامل ضد میکروبی و استفاده‌ی گسترده از آن‌ها، مقاومت در میکروارگانیسم‌ها و عوامل بیماری‌زا افزایش یافته است. به دنبال این امر تمایل برای یافتن عناصر طبیعی و استفاده‌ی از گیاهان دارویی بیشتر شده است [۵-۷]. مشتقات گیاهی که خواص ضد میکروبی دارند به شکل‌های مختلفی هم چون اسانس موجود می‌باشند [۸، ۹].

اسانس‌ها و ترکیبات حاصل از آن‌ها علیه میکروارگانیسم‌هایی هم‌چون باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها مؤثر هستند [۱۰]. Ultee و همکاران طی تحقیقاتی دریافتند که اسانس آویشن با تأثیر بر غشای سلولی، تغییر در نفوذپذیری کانال‌های k^+/H و به تبع آن تغییر شیب یونی، منجر به توقف و اختلال عملکردهای سلولی و لیز سلول می‌گردد [۱۱]. در تحقیقاتی دیگر مشخص گردید که اسانس حاصل از درخت چای استرالیایی و نعناع فلفلی روی ویروس HSV مؤثر می‌باشند [۱۲-۱۴].

پوسیدگی دندان شایع‌ترین بیماری مزمن در جهان و یک بیماری عفونی ناشی از کلونیزاسیون باکتری‌ها است، که با دکلسیفیکاسیون بخش غیرآلی دندان شروع شده و با تخریب ماتریکس آلی دنبال می‌شود. دهان‌شویه‌ها به‌عنوان ابزار کمکی و در کنار روش‌های مکانیکی مثل مسواک‌زدن و استفاده‌ی از نخ دندان در کاهش میزان باکتری‌ها نقش دارند [۱۵]. استراتژی‌های دیگری نیز برای کنترل پوسیدگی وجود دارد که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به استفاده‌ی از مواد ضد میکروبی، بهبود دفاع میزبان و جلوگیری از ایجاد بیوفیلم اشاره کرد [۱۶]. به‌طور مثال در مطالعه‌ای که توسط Tsai و همکاران صورت پذیرفت، نتایج

نشان دهنده‌ی اثر اسانس اسطوخودوس بر باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس سانگوئیس و استرپتوکوکوس سوپرنیس بود [۱۷]. Kim و همکاران طی مطالعه‌ای نشان دادند که دهان‌شویه‌های گیاهی در مقایسه با دهان‌شویه‌های کلرهگزیدین و لیستین بر ضد گونه‌های استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئیس مؤثرتر هستند [۱۸].

در روند پوسیدگی، استرپتوکوکوس موتانس در شروع پوسیدگی و لاکتوباسیل‌ها در ادامه‌ی روند پوسیدگی نقش مهمی دارند [۱۹]. لاکتوباسیل باکتری گرم مثبت بوده که در دهان و در ارتباط با پوسیدگی‌ها یافت می‌گردد. به‌وسیله‌ی تولید اسیدلاکتیک محیط خود را اسیدی نموده و از رشد برخی از گونه‌های دیگر جلوگیری می‌نماید [۲۰]. در مطالعه‌ای که توسط Byun و همکاران بر روی لاکتوباسیل‌های موجود در پوسیدگی‌های دندانی صورت پذیرفت، مشخص گردید که به‌ترتیب لاکتوباسیل *casei* (L.), لاکتوباسیل رامنوسوس (*L. rhamnosus*), لاکتوباسیل کرسپاتوس (*L. crispatus*), لاکتوباسیل گاسری (*L. gasseri*), لاکتوباسیل التونسیس (*L. ultunensis*) و لاکتوباسیل سالیواریس (*L. salivarius*) بیشترین حضور در پوسیدگی‌ها را داشته‌اند [۲۱]. نتایج مطالعه‌ی سرابی و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشانگر اثر مهاری اسانس‌های نعناع فلفلی و کاکوتی بر روی باکتری لاکتوباسیل اسیدوفیلوس بوده است [۲۲]. هم‌چنین نتایج مطالعه‌ی Mkaddem و همکاران نشان داده که اسانس گیاه نعناع بر باکتری‌هایی هم‌چون اشریشیاکلی اثر مهاری دارد [۲۳].

همان‌گونه که پیش‌تر بیان شد، گیاه نعناع که دارای ترکیبات آنتی‌باکتریال مختلف از جمله پولگون و منتون است می‌تواند بر باکتری‌هایی هم‌چون لاکتوباسیل که در پیشرفت پوسیدگی نقشی کلیدی دارد، اثر مهاری داشته باشد. با توجه به ترکیبات مختلف و غلظت متفاوت این ترکیبات در گیاه نعناع بر اساس عواملی چون محل رویش و زمان برداشت، بررسی انواع مختلف این گیاه می‌تواند در جهت یافتن ترکیبات جدید برای جلوگیری از پیشرفت پوسیدگی کمک‌کننده باشد. بدین منظور این مطالعه با هدف بررسی ترکیب اسانس *menthe spicata* و اثرات آن بر سه سوش لاکتوباسیل کازی (*PTCC 1608*)، لاکتوباسیل

رامنوسوس (PTCC 1637) و لاکتوباسیل پلانتاریوم (PTCC 1058) که از مهم‌ترین لاکتوباسیل‌ها در روند پوسیدگی هستند، انجام شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر از نوع هم‌گروهی و در محیط In vitro بود و تعیین ترکیبات، غلظت و تأثیر اسانس نعناع بر سه سوش *Lactobacillus rhamnosus*، *Lactobacillus casei* و *Lactobacillus plantarum* به روش زیر انجام گردید.

تهیه‌ی گیاه و استخراج اسانس

برای تهیه‌ی اسانس از برگ و ساقه‌ی گیاه تازه چیده شده‌ی نعناع که از استان اصفهان در سال ۱۳۹۲ جمع‌آوری گشته بود، استفاده گردید. سپس گیاه به مدت ۳ روز در دمای اتاق خشک شده و پس از آن اسانس ۵۰۰ گرم از گیاه به روش تقطیر با آب، به‌وسیله‌ی دستگاه کلونجر (Clevenger type apparatus) تهیه گردید. عمل آگیری اسانس به‌وسیله‌ی سولفات سدیم بدون آب (Na₂SO₄) صورت پذیرفت و اسانس حاصل تا زمان مصرف در یک Amber vial بسته شده و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

آنالیز اسانس

برای تهیه‌ی اسانس از برگ و ساقه‌ی گیاه تازه چیده شده‌ی نعناع که از استان اصفهان در سال ۱۳۹۲ جمع‌آوری گشته بود، استفاده گردید. سپس گیاه به مدت ۳ روز در دمای اتاق خشک شده و پس از آن اسانس ۵۰۰ گرم از گیاه به روش تقطیر با آب، به‌وسیله‌ی دستگاه کلونجر تهیه گردید. عمل آب‌گیری اسانس به‌وسیله‌ی سولفات سدیم بدون آب (Na₂SO₄) صورت پذیرفت و اسانس حاصل تا زمان مصرف در یک amber vial بسته شده و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

به‌منظور بررسی عناصر فرار موجود در اسانس از دستگاه کروماتوگرافی توام با طیف‌سنجی جری (GC/MS) استفاده گردید. آنالیز کروماتوگرافی گازی (GC) به‌وسیله‌ی دستگاه Agilent 7890A (Agilent company, United States) با ستون‌های HP- 5MS 5% (طول ستون ۳۰ متر، قطر داخلی

۰/۲۵ میلی‌متر و قطر خارجی ۰/۸ میلی‌متر) صورت پذیرفت. گاز هلیوم (با خلوص ۹۹/۹۹٪) با سرعت ۰/۸ میلی‌لیتر بر دقیقه تزریق گردید. دمای اولیه ستون ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و دمای نهایی ستون ۲۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بوده، دما با سرعت ۴ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت.

میزان جداسازی (Separation ratio) ۴۰:۱ تنظیم گردید. دمای محل تزریق ۳۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. ۰/۱ میلی‌لیتر از اسانس به‌وسیله‌ی سرنگ همپلتون تزریق گردید.

آنالیز GC/MS به‌وسیله دستگاه Agilent 5975 C (Agilent company, United States) صورت پذیرفت. انرژی یونیزاسیون در طیف سنج جرمی برابر با ۷۰ الکترون ولت بود. طیف‌سنجی بین ۵۰-۵۵۰ m/z صورت پذیرفت. IR (Inhibition index) برای همه‌ی اجزا به‌وسیله‌ی تزریق سرمی‌هایی از n-alkanes (C5-C25) که با شرایط نمونه‌ها تزریق شده بودند محاسبه گردید. شناسایی اجزای اسانس با مقایسه‌ی retention time با retention time استاندارد authentic و همچنین مقایسه‌ی الگوی طیف‌سنجی صورت پذیرفت [۲۴].

آماده‌سازی باکتری‌ها و محیط دکستروز آگار

گونه‌های باکتریایی از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. *Lactobacillus Lactobacillus Casei* (PTCC 1608) *lactobacillus rhamnosus plantarum* (PTCC 1058) (PTCC 1637) در این محیط‌های کشت TSB (Tripticase soy Broth) و Agar از شرکت مرک (Merck, Germany) کشت داده شدند.

تعیین هاله‌ی عدم رشد (Inhibition zone)

به‌منظور مطالعه‌ی اثر ضد باکتریایی روش انتشار دیسک (Disk diffusion) مورد استفاده قرار گرفت. پس از ۱۸ ساعت کشت، مایع حاوی باکتری با غلظت استاندارد (MacFarland) در ۰/۵ (1×10⁶CFU ml⁻¹) مک فارلند (MacFarland) در محیط TSB آماده شده با استفاده از sampler ۵۰۰ میکرولیتر از مایع به محیط بلاد آگار (Blood Agar, BA) منتقل شد. مایع به‌آرامی و به کمک یک لوپ استریل روی سطح BA پخش شد.

ادامه یافت. آخرین حفره حاوی ۱۹۵ میکرولیتر TSB culture medium و ۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی بدون هیچ گونه اسانسی بود.

این حفره به عنوان کنترل منفی لحاظ گردید. در مرحله ی بعدی محتویات تمامی حفرات به وسیله ی Rotary shaker به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط گردید. سپس ظرف به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای مناسب ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. رشد میکروبی در ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. در این مطالعه اثر اسانس بر روی هر ۳ سوش به صورت جداگانه و در ۳ نسخه بررسی شد.

آنالیز آماری

داده های پژوهش با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ی ۲۰ (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) به روش One way ANOVA آنالیز آماری شد و مقایسه میانگین ها به روش توکی صورت گرفت ($\alpha = 0.05$).

یافته ها

نتایج حاصل از آنالیز اسانس نعناع در جدول ۱ گزارش شده است. نتایج به دست آمده مربوط به حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی Minimum Bactericidal Concentration (MBC) نیز در جدول ۲ ذکر شده است.

دیسک های خالی (Blank) به قطر ۶ میلی متر حاوی ۳۰ میکرولیتر اسانس با غلظت های ۴۴۵/۵، ۲۵/۸۹۰، ۱۱۱/۲۲۲، ۶۲۵/۵۵ و ۸۱۲/۲۷ ۹۰۶/۱۳ و ۹۵۳/۶ میکروگرم بر میلی لیتر ($\mu\text{g/mL}$) روی BA قرار گرفت. یک دیسک حاوی ۳۰ میکرولیتر آب نیز به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. قطر هاله ی عدم رشد پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد و در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین حداقل غلظت مهاري (MIC) Concentration dilution of well با استفاده از روش

در ابتدا به منظور تعیین MIC برای سه گونه ی لاکتوباسیل سوسپانسیون باکتریایی از کشت مایع با تیرگی ۵٪ مک فارلند تهیه گردید. غلظت اولیه ۸۹۰ میکروگرم به میلی لیتر آماده و غلظت های مختلف (۶ غلظت)، به لوله های حاوی ۱۰ میلی لیتر مایع Culture medium اضافه شد. MIC اسانس از طریق روش Microwell تعیین گردید. در این مرحله به منظور تعیین MIC، ظرف ۹۶ حفره ای (۹۶-Well-plate) مورد استفاده قرار گرفت که هر حفره (well) حاوی ۹۵ میکرولیتر TSB و ۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی که پس از تهیه رقت های اسانس به حفرات اضافه گردید، بود. ۱۰۰ میکرولیتر اسانس با غلظت ۸۹۰ میکروگرم به میکرولیتر به اولین حفره اضافه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر مایع از حفره ی اول برداشته شد و به حفره ی بعدی منتقل گردید. این روند برای هر ۶ حفره

جدول ۱. ترکیبات و غلظت های آن ها در اسانس نعناع

شماره	IR*	ترکیب	درصد
۱	۹۲۷	α -Thujene	۰/۰۳
۲	۹۳۴	α -Pinene	۱/۰۹
۳	۹۵۰	Camphene	۰/۵۶
۴	۹۶۳	Sabinene	۰/۷۴
۵	۹۶۷	β -Pinene	۱/۵۹
۶	۹۹۱	β -Myrcene	۰/۴۱
۷	۹۹۶	3-Octanol	۰/۲۱

ادامه جدول ۱

شماره	IR*	ترکیب	درصد
۸	۱۰۱۶	α -Terpinene	۰/۱۲
۹	۱۰۲۴	p-Cymene	۰/۸۳
۱۰	۱۰۲۸	Limonene	۵/۶۶
۱۱	۱۰۳۲	1,8-Cineole	۱۳/۵۳
۱۲	۱۰۵۶	gamma-Terpinene	۰/۵۸
۱۳	۱۰۶۵	trans-Sabinene hydrate	۰/۰۶
۱۴	۱۰۸۶	α -Terpinolene	۰/۱
۱۵	۱۰۹۵	Linalool	۰/۳۷
۱۶	۱۱۵۷	Menthone	۰/۲۶
۱۷	۱۱۶۲	Borneol	۸/۱۲
۱۸	۱۱۷۲	Terpinen-4-ol	۰/۴۸
۱۹	۱۱۸۵	α -Terpineol	۳/۲۵
۲۰	۱۱۹۳	Dihydrocarvone	۰/۶۹
۲۱	۱۲۱۷	trans-(+)-Carveol	۰/۴۸
۲۲	۱۲۳۵	Pulegone	۳/۲۸
۲۳	۱۲۴۰	(-)-Carvone	۴۶/۹۹
۲۴	۱۲۸۴	Thymol	۰/۶۷
۲۵	۱۲۹۸	Carvacrol	۰/۴۷
۲۶	۱۳۷۸	β -Bourbonene	۰/۱۶
۲۷	۱۴۱۳	β -Caryophyllene	۰/۹۳
۲۸	۱۴۴۶	α -Humulene	۰/۱۶
۲۹	۱۴۷۵	Germacrene-D	۰/۰۹
۳۰	۱۵۸۳	Caryophyllene oxide	۰/۱۶

*IR: Infrared

جدول ۲. حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس نعناع

MBC	MIC	سوش باکتریایی
۵۰	۲۵	Lactobacillus casei
۵۰	۲۵	Lactobacillus plantarum
۱۰۰	۲۵	Lactobacillus Rhamnosus

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

MBC: Minimum Bactericidal Concentration

و بعد از آن غلظت $445 \mu\text{g/mL}$ کارایی بیشتری نسبت به غلظت‌های پایین‌تر در هر ۳ باکتری دارد ($p \text{ value} < 0.01$) (جدول ۳).

اثر غلظت‌های مختلف نعناع بر ۳ سویه باکتری *Lactobacillus casei*، *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus* در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مورد بررسی آماری قرار گرفت، نتایج نشان داد که غلظت $890 \mu\text{g/mL}$

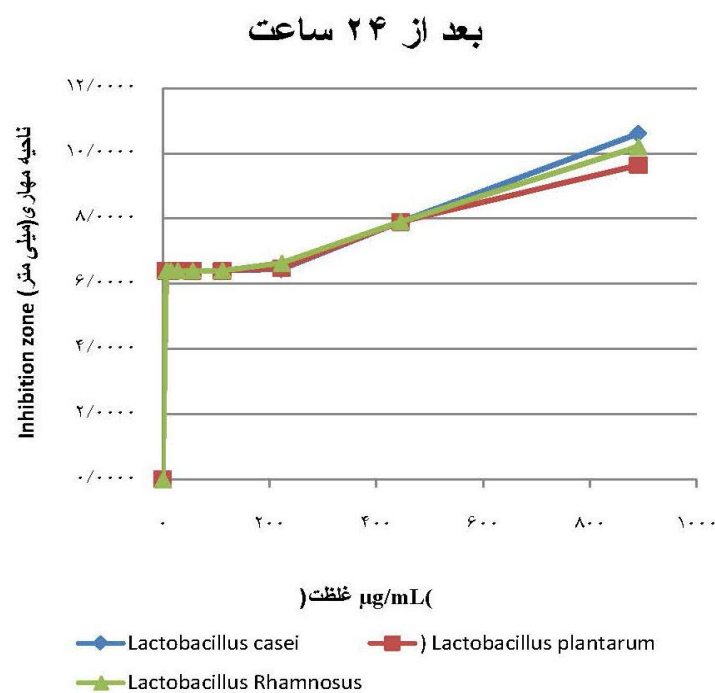
جدول ۳. نتایج حاصل از کشت و مساحت Inhibition zone

Lactobacillus casei			Lactobacillus plantarum			Lactobacillus Rhamnosus			غلظت اسانس ننا $\mu\text{g/mL}$
میانگین $\pm$ انحراف معیار			میانگین $\pm$ انحراف معیار			میانگین $\pm$ انحراف معیار			
۲۴	۴۸	۷۲	۲۴	۴۸	۷۲	۲۴	۴۸	۷۲	
$6/400 \pm$ $0/000^a$	$6/400 \pm$ $0/000^a$	$6/400 \pm 0/000^a$	$6/400 \pm$ $0/000^a$	$6/400 \pm$ $0/000^a$	$6/400 \pm$ $0/000^a$	$6/400 \pm 0/000^a$	$6/400 \pm$ $0/000^a$	$6/400 \pm 0/000^a$	۶/۹۵۳
$6/400 \pm$ $0/000^a$	$6/400 \pm$ $0/000^a$	$6/400 \pm 0/000^a$	$6/400 \pm$ $0/000^a$	$6/400 \pm$ $0/000^a$	$6/400 \pm$ $0/000^a$	$6/400 \pm 0/000^a$	$6/400 \pm$ $0/000^a$	$6/400 \pm 0/000^a$	۱۳/۹۶۰
$6/400 \pm$ $0/000^a$	$6/403 \pm 0/005^a$	$6/403 \pm 0/005^a$	$6/403 \pm$ $0/005^a$	$6/403 \pm$ $0/005^a$	$6/403 \pm$ $0/005^a$	$6/400 \pm 0/000^a$	$6/400 \pm$ $0/000^a$	$6/406 \pm 0/005^a$	۲۷/۸۱۲
$6/403 \pm$ $0/005^a$	$6/426 \pm 0/025^a$	$6/419 \pm 0/023^a$	$6/400 \pm$ $0/000^a$	$6/403 \pm$ $0/005^a$	$6/403 \pm$ $0/011^a$	$6/403 \pm 0/005^a$	$6/410 \pm$ $0/017^a$	$6/416 \pm 0/020^a$	۵۵/۶۲۵
$6/400 \pm$ $0/000^a$	$6/416 \pm 0/005^a$	$6/426 \pm 0/005^a$	$6/400 \pm$ $0/000^a$	$6/403 \pm$ $0/005^a$	$6/410 \pm$ $0/010^a$	$6/400 \pm 0/000^a$	$6/423 \pm$ $0/023^a$	$6/430 \pm 0/020^a$	۱۱۱/۲۵
$6/440 \pm$ $0/036^a$	$6/470 \pm 0/045^a$	$6/770 \pm 0/103^a$	$6/467 \pm$ $0/030^a$	$6/513 \pm$ $0/015^a$	$6/520 \pm$ $0/010^a$	$6/633 \pm$ $0/404^{ab}$	$6/680 \pm$ $0/416^a$	$6/706 \pm 0/409^a$	۲۲۲/۵
$7/900 \pm$ $0/700^b$	$8/266 \pm 0/640^b$	$8/440 \pm 0/588^b$	$7/896 \pm$ $0/703^{ab}$	$8/016 \pm$ $0/663^a$	$8/110 \pm$ $0/656^b$	$7/900 \pm$ $0/700^b$	$8/073 \pm$ $0/725^b$	$8/116 \pm 0/702^b$	۴۴۵
$10/603 \pm$ $0/420^c$	$11/290 \pm$ $0/095^c$	$11/353 \pm 0/085^c$	$9/636 \pm$ $0/936^b$	$10/020 \pm$ $0/687^b$	$11/163 \pm$ $0/233^c$	$10/206 \pm$ $0/143^c$	$0/323 \pm 0/135^c$	$10/376 \pm 0/150^c$	۸۹۰

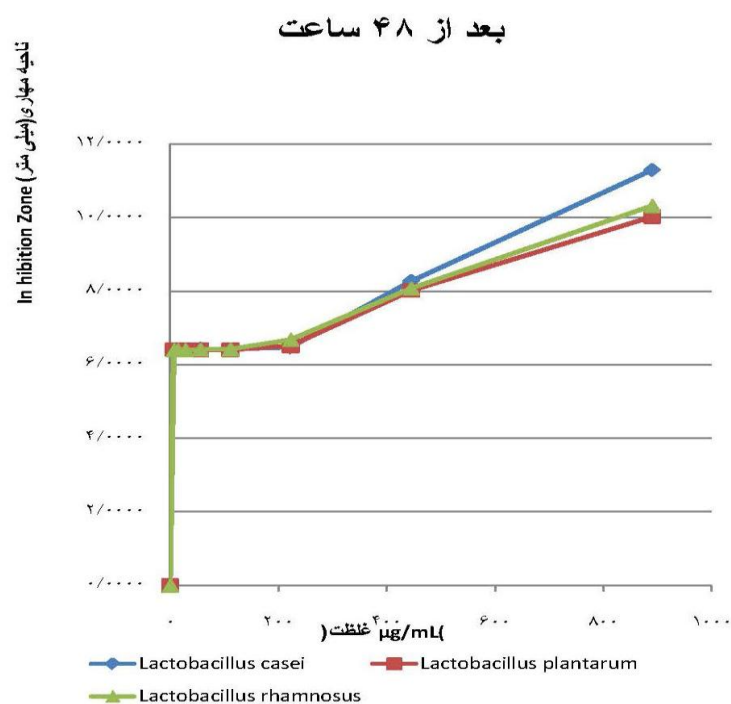
حروف متفاوت در هر ستون نشان از تفاوت معنی داری در سطح ($p \text{ value} < 0/001$) دارد.

رشد سریع میزان هاله‌ی عدم رشد مشاهده می‌شود. که این مطلب حاکی از روند رو به رشد میزان اثربخشی نعناع بر هر ۳ سویه باکتری برای غلظت‌های بیشتر از ۲۲۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. در هر سه نمودار برای غلظت‌های پایین‌تر از ۸۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، تفاوت معناداری میان میزان هاله‌ی عدم رشد برای سه سویه باکتری مشاهده نمی‌شود ولی برای غلظت از ۸۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر شاهد اثربخشی نسبتاً بیشتر نعناع بر سویه باکتری *Lactobacillus casei* هستیم.

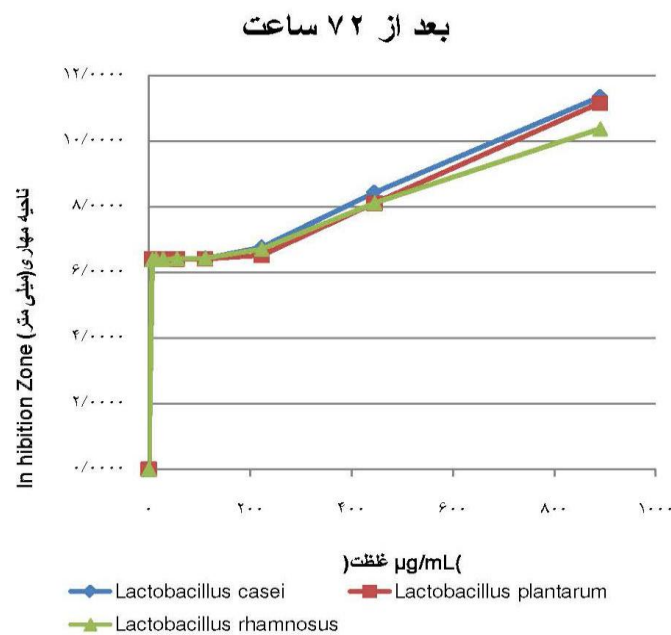
نمودارهای ۱ و ۲ و ۳ با ثابت در نظر گرفتن زمان، به بررسی و مقایسه‌ی میزان تغییرات صورت گرفته در میزان هاله‌ی عدم رشد در اثر تغییر در غلظت، برای ۳ سویه باکتری *Lactobacillus casei*، *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus* پرداخته است. در هر سه نمودار، برای غلظت‌های ۲۲۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمتر از آن شاهد یک روند خطی (با شیب صفر) در میزان افزایش هاله‌ی عدم رشد و از غلظت ۲۲۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به بعد شاهد



نمودار ۱. مقایسه‌ی تاثیر ضد باکتری غلظت‌های مختلف اسانس نعناع در طی ۲۴ ساعت بر سه سوش *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus*



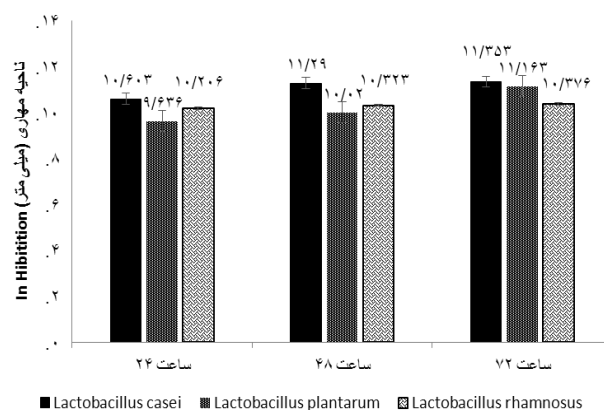
نمودار ۲. مقایسه‌ی تاثیر ضد باکتری غلظت‌های مختلف اسانس نعناع در طی ۴۸ ساعت بر سه سوش *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus*



نمودار ۳. مقایسه تاثیر ضد باکتری غلظت‌های مختلف اسانس نعناع در طی ۷۲ ساعت بر سه سوش *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus*

میزان هاله عدم رشد *Lactobacillus casei* و *Lactobacillus rhamnosus* برای هر سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مشاهده نمی‌شود. اما از نگاه ریزینیانه می‌توان اثر غلظت ۸۹۰ µg/mL از نعناع بر سویه باکتری *Lactobacillus casei* را بیشتر دانست.

نمودار ۴ با ثابت نگه داشتن غلظت (۸۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، به مقایسه‌ی میزان هاله عدم رشد برای ۳ سویه باکتری *Lactobacillus casei*، *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus* تحت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پرداخته است. براساس این نمودار می‌توان این گونه استنباط نمود که برای غلظت ثابت ۸۹۰ µg/mL تفاوت معناداری بین



نمودار ۴. مقایسه‌ی تاثیر غلظت ثابت ۸۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر سه سوش *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus*

بحث

در طی دو دهه‌ی اخیر ایجاد مقاومت دارویی و در کنار آن عوارض جانبی آنتی‌بیوتیک‌ها باعث گردیده تا تلاش‌ها برای یافتن ترکیبات ضد میکروبی به‌خصوص در میان مشتقات گیاهی به‌منظور یافتن ترکیبات جدید افزایش یابد [۲۵-۲۹]. اسانس‌ها یکی از مشتقات گیاهی بوده که علیه پاتوژن‌های دهانی مؤثر می‌باشند [۳۰].

نعناع گیاهی است که علاوه بر معطر بودن خاصیت ضد میکروبی نیز دارد [۳۱]. گیاه نعناع از بیش از ۲۵ گونه از جمله *mentha spicata*, *mentha piperita*, *mentha spicata* تشکیل شده است [۳۲]. اسانس نعناع دارای ترکیباتی مختلفی همچون پولگون، منتون، پوکلون، آلفا پینن، ترپنولن می‌باشد [۳۳]. نوع و درصد ترکیبات اسانس گیاه نعناع (*Mentha spicata*) به فاکتورهایی چون شرایط جغرافیایی، شرایط محیطی مانند دما، رطوبت و دوره‌ی نوری مربوط است [۱۱].

در مطالعه‌ای که توسط Mkaddem [۲۳] و همکاران به انجام رسید، اسانس حاصل از گیاه نعناع جمع‌آوری شده از کشور تونس حاوی ۴/۸۷٪ *limonen*، ۹/۱۴٪ *cineole*، ۰/۰٪ *menthone*، ۱/۱۱٪ *Pulegone* و ۵۰/۴۷٪ *Carvone* بود. در مطالعه‌ای که توسط Chauhan و همکاران صورت پذیرفت، اسانس حاصل از گیاه نعناع جمع‌آوری شده از هیمالیای غربی در هند، حاوی ۹/۵۷٪ *limonene*، ۱/۹٪ *S. cineol*، ۷۶/۶۵٪ *Carvone*، ۰٪ *pulegone* بود [۳۴]. در مطالعه‌ای که توسط Abdullah Hussain و همکاران روی گیاه نعناع انجام گرفت، مشخص گردید که غلظت ترکیبات موجود در اسانس گیاهان جمع‌آوری شده از دره‌ی Gil Git در شمال غرب پاکستان در فصول مختلف تا حدودی متفاوت است [۳۲]. نکته‌ی قابل توجه عدم وجود ترکیب آنتی‌باکتریال *pulegone* در اسانس حاصل از گیاهان در این تحقیق بود. وجود غلظت ۳/۲۸٪ *pulegone* در اسانس مورد نظر در این مطالعه نکته‌ای قابل توجه بوده که می‌تواند موضوعی برای مطالعات بیشتر به‌منظور یافتن علت وجود این غلظت بالاتر باشد. در مطالعه‌ای که توسط Toncer و Kizil همکاران در زمینه‌ی ارتباط زمان برداشت گیاه نعناع با غلظت ترکیبات اسانس صورت پذیرفت، مشخص گردید که زمان برداشت بر غلظت ترکیبات مؤثر است [۳۵]. اما در

مطالعه‌ی حاضر آنالیز اسانس حاصل از گیاه نعناع جمع‌آوری شده از استان اصفهان در سال ۱۳۹۲ مقادیر ۵/۶۶٪ برای *limonene*، ۱۳/۵۳٪ برای *S. cineol*، ۳/۲۸٪ برای *Pulegone* و ۴۶/۹۹٪ برای *Carvone* یافت گردید. در مقایسه آنالیز گیاه نعناع مورد آزمایش در این مطالعه با مطالعات قبلی ذکر شده نشان می‌دهد که ترکیب پولگون (*Pulegone*) در مطالعات قبلی به مقدار ۰ یا حداکثر ۱/۱٪ گزارش شده ولی در مطالعه حاضر غلظت این ترکیب مهم آنتی‌باکتریال ۳/۲۸٪ بوده است. قابل ذکر است که پولگون یکی از قوی‌ترین ترکیبات ضد باکتریال در اسانس نعناع می‌باشد [۳۶].

خاصیت ضد باکتری اسانس نعناع به‌دلیل وجود منتول و کتون‌ها نظیر پوکلون، ایزومنتون، کارون و دهیدروکارون می‌باشد [۳۷]. مشخص شده که با افزایش درصد این ترکیبات در اسانس، میزان فعالیت ضد میکروبی نیز افزایش می‌یابد [۳۸].

بر اساس تحقیقات Oumzil و همکاران بر روی عصاره‌ی گیاه *Mentha suaveolens* مشخص گردید که ترکیب *pulegone* دارای بیشترین اثر ضد باکتریایی بر روی گونه‌های مورد آزمایش بوده است، همچنین *methone* که حاصل از واکنش کاهش *pulegone* است، فعالیت ضدباکتریایی کمتری دارد. ترکیبات *limoene* و *Carvone* نیز نسبت به *pulegone* اثر ضد باکتریایی کمتری (moderate) دارند [۳۶]. این یافته‌ها مشابه نتایج حاصل از تحقیقات Ruth و همکاران در سال ۱۹۹۶ و Flamini و همکاران در سال ۱۹۹۹ بوده است [۴۰، ۳۹].

با توجه به اثرات ضد باکتریایی گیاه نعناع [۳۲] نتایج مطالعه Abdullah Hussain و همکاران نشان داد که اسانس گیاه نعناع در غلظت $2 \pm 29\%$ در اسانس حاصل از گیاهان برداشت شده در تابستان و زمستان بر روی گونه‌ی *Bacillus subtilis* در محیط آگار اثر مهاری دارد. همچنین MIC در اسانس حاصل از گیاه تابستانی برابر با $1/1 \pm 25/4\%$ و در اساس حاصل از گیاه زمستانی برابر با $1/1 \pm 25/3\%$ بود [۳۲]. Duarte Moreira و همکاران گزارش نمودند که اسانس نعناع بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی مؤثرتر است [۳۰]. اما در مطالعه‌ی Mkadden و همکاران نیز برای اسانس گیاه نعناع بر علیه گونه‌ی گرم مثبت اشریشیاکلی قطر هاله‌ی عدم رشد ۲۵ میلی‌متر تعیین گردید. اما این اسانس بر روی *klebsiella*

مقایسه‌ی نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر با دو مطالعه‌ی قبل (Seydim و Alvino) نشان دهنده‌ی تأثیر آنتی‌باکتریال بیشتر اسانس نعناع نسبت به دو گیاه رزماری و *Croton cajucara* بر سوش‌های لاکتوباسیل می‌باشد. ولی با توجه به نبود مقالات مشابه در زمینه‌ی تأثیرات اسانس نعناع بر سوش‌های مورد آزمایش در مطالعه‌ی حاضر، انجام مطالعات بیشتر ضروری به‌نظر می‌رسد. مشخص نبودن سن تقریبی گیاهان جمع‌آوری شده به‌دلیل کمبود افراد آموزش‌دیده و نیز دسترسی مشکل به مناطق رشد این گیاه، از مشکلات عمده‌ی این طرح بود که برطرف ساختن آن‌ها در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به محدودیت‌های این مطالعه، اسانس نعناع بر روی سه سوش (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus* مورد مطالعه مؤثر است. لازم به ذکر است غلظت و ترکیبات موجود در اسانس نعناع در مناطق مختلف متفاوت است و این تفاوت‌ها ممکن است اثرات ضد باکتریایی را تحت تأثیر قرار دهد.

pneumonia که نوعی باکتری گرم مثبت است، بی‌تأثیر بوده که این امر نشان‌گر عدم تأثیر انتخابی این اسانس بر اساس نوع دیواره سلولی (گرم مثبت/ گرم منفی) می‌باشد [۲۳]. مطالعه‌ی حاضر بر روی اثر اسانس نعناع بر سه سوش لاکتوباسیل که گرم مثبت می‌باشد صورت گرفت که نتایج نشان داد اسانس نعناع بر هر سه سوش اثر باکتریو سیدال دارد. در مطالعه‌ای که توسط Badet و همکاران صورت پذیرفت نتایج حاصل نشان‌دهنده‌ی اثر مهاری عسل Manuka در غلظت حداقلی ۲۰۰ PPM بر *Lactobasillus Rhamnous* بود، این در حالی است که نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که اسانس نعناع با غلظت حداقل ۲۲۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر این باکتری اثر مهاری دارد [۴۱]. در مطالعه‌ی Alvino و همکاران نتایج نشان‌دهنده‌ی بی‌تأثیر بودن یکی از ترکیبات گیاه *Croton cajucara* در غلظت‌های مورد آزمایش بر *Lactobasillus Casei* می‌باشد [۴۲]. همچنین در مطالعه‌ی Seydim و همکاران نتایج نشان دهنده‌ی بی‌تأثیر بودن اسانس رزماری در غلظت‌های مورد آزمایش بر *Lactobasillus plantarum* بود [۴۳]، اما نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر نشان داد که حداقل غلظت ۲۲۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر این دو باکتری اثر مهاری دارد.

References

1. Sarwar M, Attitalla IH, Abdollahi M. A review on the recent advances in pharmacological studies on medicinal plants: Animal studies are done but clinical studies needs completing. *Asian J anim vet adv* 2011; 6(8): 867-83.
2. Gram H. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. Switzerland: World Health Organization; 1993. p. 13-4.
3. Jones FA. Herbs-useful plants. Their role in history and today. *Euro J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8(12): 1227-31.
4. Fadaei S, Sharifan A, Larijani K. Evaluation of antimicrobial activity of *Mentha piperita* L. essential oil and its comparison with sodium benzoate. *Journal of Food Technology & Nutrition* 2011; 2011; 8(1): 34-41.
5. Pesewu GA, Cutler RR, Humber DP. Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. *J Ethnopharmacol* 2008; 116(1): 102-11.
6. Caelli M, Porteous J, Carson CF, Heller R, Riley TV. Tea tree oil as an alternative topical decolonization agent for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 2000; 46(3): 236-7.
7. Fani MM, Kohanteb J, Dayaghi M. Inhibitory activity of garlic (*Allium sativum*) extract on multidrug-resistant *Streptococcus mutans*. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2007; 25(4): 164-8.
8. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12(4): 564-82.
9. Özkalp B, Özcan MM. Antibacterial activity of several concentrations of sater (*Satureja hortensis* L.) essential oil on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *World Applied Sciences Journal* 2009; 6(4): 509-14.
10. Stringaro A, Vavala E, Colone M, Pepi F, Mignogna G, Garzoli S, et al. Effects of *Mentha suaveolens* Essential Oil Alone or in Combination with Other Drugs in *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume* 2014 (2014), Article ID 125904, 9 pages.
11. Ultee A, Kets EP, Smid EJ. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65(10): 4606-10.

12. Reichling J, Koch C, Stahl-Biskup E, Sojka C, Schnitzler P. Virucidal activity of a beta-triketone-rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture. *Planta Med* 2005; 71(12): 1123-7.
13. Schuhmacher A, Reichling J, Schnitzler P. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Phytomedicine* 2003; 10(6-7): 504-10.
14. Schnitzler P, Schon K, Reichling J. Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. *Pharmazie* 2001; 56(4): 343-7.
15. Rezaei-Soufi L, Rafieian N, Jazaeri M, Abdolsamadi H, Kasraei SH, Alikhani MU, et al. Comparison of the anti-carries effect of polyphenol extract of green tea with 0.05% fluoride, 0.2% chlorhexidine and fluoride-chlorhexidine, an in vitro study. *J Mash Dent Sch* 2013; 36(4): 301-8.
16. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol* 2003; 11(2): 94-100.
17. Tsai TH, Tsai TH, Chien YC, Lee CW, Tsai PJ. In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. *Food Chemistry* 2008; 110(4):859-64.
18. Kim J, Gultz J, Dol L. An in vitro investigation of the antimicrobial activity of an herbal mouthrinse. *J Clin Dent* 1998; 9(2):46-8.
19. Kermanshah H, Hashemi Kamangar S, Arami S, Mirsalehian A, Kamalinegad M, Karimi M. Comparison of antibacterial effect of Hydroalcoholic Extract of four plants against cariogenic microorganisms by two in vitro methods. *J babol univ med sci* 2011;13(6): 21-9.
20. Ljungh A, Wadstrom T. *Lactobacillus molecular biology: from genomics to probiotics*. 1st ed. Norfolk: Caister Academic Press; 2009.
21. Byun R, Nadkarni MA, Chhour KL, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *J Clin Microbiol* 2004; 42(7): 3128-36.
22. Sarabi-Jamab M, Niazmand R. Effect of essential oil of *Mentha piperita* and *Ziziphora clinopodioides* on *Lactobacillus acidophilus* activity as bioyoghurt starter culture. *Am Eur J Agric Environ Sci* 2009; 6(2): 129-31.
23. Mkaddem M, Bouajila J, Ennajar M, Lebrihi A, Mathieu F, Romdhane M. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha* (*longifolia* L. and *viridis*) essential oils. *J Food Sci* 2009; 74(7): M358-63.
24. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry: 4th ed. Carol Stream: Allured publishing corporation; 2007.
25. Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Ribner BS, Standiford HC, John JF, Korvick JA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *Am J Med* 1993; 94(3): 313-28.
26. Piddock LJ, Wise R. Mechanisms of resistance to quinolones and clinical perspectives. *J Antimicrob Chemother* 1989; 23(4): 475-80.
27. Cohen R, de la Rocque F, Boucherat M, Doit C, Bingen E, Geslin P. Treatment failure in otitis media: an analysis. *J Chemother* 1994; 6 (Suppl 4): 17-22; discussion 3-4.
28. Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 1994; 264(5157): 375-82.
29. Poole K. Overcoming antimicrobial resistance by targeting resistance mechanisms. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53(3): 283-94.
30. Duarte Moreira RR, Zimmermann Martins G, Teixeira Botelho V, dos Santos LE, Cavaleiro C, Salgueiro L, et al. Composition and activity against oral pathogens of the essential oil of *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC. *Chem Biodivers* 2014; 11(3): 438-44.
31. Tassou C, Koutsoumanis K, Nychas GJE. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Res Int* 2000; 33(3): 273-80.
32. Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Ashraf M, Gilani AH. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *J Sci Food Agric* 2010; 90(11): 1827-36.
33. Eidi A, Rustaiyan A, Eidi M, Bahramian M. Anticiception effects of ethanolic extract of *Mentha piperita* leaves in adult mice. *Iranian Journal of Biology* 2009; 23(4): 613-21.
34. Chauhan SS, Prakash O, Padalia RC, Vivekanand, Pant AK, Mathela CS. Chemical diversity in *mentha spicata*: antioxidant and potato sprout inhibition activity of its essential oils. *Nat Prod Commun* 2011; 6(9): 1373-8.
35. Kizil S, Tonçer Ö. Influence of different harvest times on the yield and oil composition of spearmint (*Mentha spicata* L. var. *spicata*) *J Food Agri Environ* 2006; 4(3&4):135-7.
36. Oumzil H, Ghouami S, Rhajaoui M, Ilidrissi A, Fkih-Tetouani S, Faid M, et al. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytother Res* 2002; 16(8): 727-31.
37. Beuchat L, Golden D. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food technol* 1998; 43(11): 134-42.
38. Alvandi KR, Sharifan A, Aghazadeh Meshghi M. Study of chemical composition and antimicrobial activity of peppermint essential oil. *Comprative pathobiology* 2010; 7(4): 355-64.

39. Ruth N, Kalck p, Roques C, Roux I, Michel G. Comparision of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products. *Planta Med* 1996; 62(3): 275-7.
40. Flamini G, Cioni P, Puleio R, Morelli L, Pannizi L. Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. *Phytother Res* 1999; 13(4): 349-51.
41. Badet C, Quero F. The in vitro effect of manuka honeys on growth and adherence of oral bacteria. *Anaerobe* 2011; 17(1): 19-22.
42. Alviano WS, Alviano DS, Diniz CG, Antonioli AR, Alviano CS, Farias LM, et al. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Archives of Oral Biology* 2008; 53(6): 545-52.
43. Seydim AC, Sarikus G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res Int* 2006; 39(5): 639-44.

The composition and concentration of *Mentha spicata* essential oil and its effect on *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus*

Zahra Golestannejad, Mona Bazazzadeh, Hazhir Yousefshahi, Azadeh Afshari *

Abstract

Introduction: Dental caries is one of the most common diseases all over the world. Several bacteria are involved in this process; one of them is *Lactobacillus* species. The aim of this study was to evaluate the effect of *Mentha spicata* essential oil on three species of *Lactobacillus*, including *Lactobacillus casei* (PTCC 1608), *Lactobacillus plantarum* (PTCC 1058) and *Lactobacillus rhamnosus* (PTCC 1637).

Materials and Methods: In this *in vitro* cohort study *Mentha spicata* essential oil was extracted using a Clevenger type apparatus with hydro distillation method. Gas chromatography (GC) in association with GC/MS (mass spectrophotometry) analysis was performed. Disk diffusion and dilution of well methods were used to evaluate the antibacterial effect of the extract. Data were analyzed with one-way ANOVA and post hoc Tukey tests, using SPSS 20 ($\alpha=0.05$).

Results: *Mentha spicata* essential oil was affected all the three bacterial species. MIC (minimum inhibitory concentration) for all the three species was 222.5 $\mu\text{g/mL}$. MBCs (minimum bactericidal concentrations) for 1608 and 1058 species and 1637 species were 445 $\mu\text{g/mL}$ and 890 $\mu\text{g/mL}$, respectively. At concentrations less than 890 $\mu\text{g/mL}$, no significant differences were observed in inhibition zones between the three species (p value < 0.001).

Conclusion: Under the limitations of the present study, *Mentha spicata* extract had antibacterial properties on oral pathogens. Further studies are recommended in this respect.

Key words: Essential oil, *Lactobacillus*, *Mentha spicata*

Received: 10 Jun, 2014

Accepted: 8 Jul, 2014

Address: Dental Student, School Of Dentistry, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

Email: azadehafshari_es@yahoo.com

Citation: Golestannejad Z, Bazazzadeh M, Yousefshahi H, Afshari A. The composition and concentration of *Mentha spicata* essential oil and its effect on *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus*. J Isfahan Dent Sch 2014; 10(5): 322-334.