

In vitro* study of the combinational effects of *Ferula gummosa* ethanolic extract and chlorhexidine mouthwash on the biofilm structure of *Streptococcus mutans

Amir Moradi¹   , Parasto Zarghami Moghadam²   , Peiman Alesheikh²   , Fatemeh Eshaghigorji^{3*}   , Samaneh Mollazadeh^{2,4*}   

1. Dental Student, Faculty of Dentistry, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
2. Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
3. Department of Operative Dentistry, Faculty of Dentistry, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
4. Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

Received: 2025/11/02

Accepted: 2026/07/11

Abstract

Background and Objective: An ideal oral rinse should exhibit potent antimicrobial activity while minimizing adverse effect on the mouth's natural microflora. Therefore, the aim of this study was to investigate the combinational effects of the ethanolic extract of the *Ferula gummosa* and chlorhexidine mouthwash on the *Streptococcus mutans* biofilm structure.

Materials and Methods: The roots of *F. gummosa* were collected, dried, and extracted via ethanol maceration. Then, different combinational concentrations of *F. gummosa* and chlorhexidine were prepared followed by an investigation of their antibacterial effects on *Streptococcus mutans* using disk-diffusion and well-diffusion methods. Also, the inhibitory effect on biofilm formation was assessed using the Crystal Violet assay. Analysis of data was done using SPSS-24 and the Kruskal-Wallis test; $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results: The results of this study showed that ciprofloxacin, chlorhexidine mouthwash (100 mg/ml), and a combined concentration of chlorhexidine (80 mg/ml) and *F. gummosa* (20 mg/ml) exhibited the highest antibacterial effects against *S. mutans* in disc-diffusion, well-diffusion, and biofilm inhibition tests.

Conclusion: Based on the results, the ethanolic extract of *F. gummosa*, whether administered alone or as a major component of the chlorhexidine combination, exhibited negligible antibacterial activity against *S. mutans* compared to chlorhexidine (100 mg/mL).

***Corresponding Author:** Fatemeh Eshaghigorji & Samaneh Mollazadeh

Address: Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran.

Tel: +9805831511434

E-mail:
fateme.eshaghigorji@gmail.com
s.mollazadeh@nkums.ac.ir

Keywords *Ferula gummosa*, chlorhexidine, *Streptococcus mutans*, antibacterial effects.

How to cite this article:

Moradi A, Zarghami Moghadam P, Alesheikh P, Eshaghigorji F, Mollazadeh S., In vitro study of the combinational effects of *Ferula gummosa* ethanolic extract and chlorhexidine mouthwash on the biofilm structure of *Streptococcus mutans*, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2026; 33(3):1120-1132. DOI: 10.30468/jsums.2026.8309.3375.

INTRODUCTION

Dental plaque is a globally prevalent condition affecting individuals across all demographics and age groups, serving as a primary etiological factor in the pathogenesis of dental caries. This complex microbial biofilm is composed of diverse commensal oral microbiota, forming intricate communities of both Gram-positive and Gram-negative bacteria on a glycocalyx-rich matrix.

While mechanical plaque removal remains the gold standard for dentition protection, patient compliance often proves challenging. Consequently, there is a critical need to augment mechanical protocols with effective chemical adjuncts. An ideal oral rinse should ideally exhibit broad-spectrum antimicrobial activity and low cytotoxicity, while maintaining the integrity of the natural oral microflora and mucosal health, without inducing tooth discoloration. Although chlorhexidine-based formulations offer potent antibacterial, antifungal, and antiviral properties—effectively inhibiting plaque accumulation and gingival inflammation—their clinical utility is often limited by adverse effects. These include tooth staining, dysgeusia (taste alteration), and mucosal desquamation, alongside potential contributions to calculus formation and periodontal complications resulting from complex interactions within the oral environment.

Medicinal plants, characterized by their diverse profiles of bioactive secondary metabolites, exert a wide array of pharmacological effects. A prominent example is *Ferula gummosa* (gum ferula), a member of the Apiaceae family indigenous to the eastern, central, and western regions of Iran. The *Ferula* genus, which encompasses approximately 30 endemic species, is highly regarded in Iranian ethnopharmacology for its multifaceted therapeutic potential. The essential oils of *F. gummosa* are characterized by a complex composition of terpenoids, including β -pinene, α -pinene, myrcene, limonene, and α -thujene. Previous investigations have substantiated the

antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory, antifungal, and anticonvulsant activities of this species. Building upon the established antimicrobial efficacy of chlorhexidine and the diverse bioactive properties of *F. gummosa*, the present study aims to evaluate the potential combinatorial effects of an ethanolic extract of *F. gummosa* and chlorhexidine mouthwash on the biofilm architecture of *Streptococcus mutans* in an *in vitro* model.

METHODOLOGY

The *F. gummosa* root was extracted by maceration using absolute ethanol. Then, the antimicrobial effects of the alcoholic extract of *F. gummosa* and chlorhexidine mouthwash, at different concentrations were evaluated using well-diffusion, disk-diffusion, and biofilm inhibition tests. In the well-diffusion method, wells were prepared in culture media inoculated with the *S. mutans* strain (Iran National Genbank). A sterile Pasteur pipette was used to dispense 50 μ L of each extract into designated wells. After incubation for 24 hours at 37°C, the growth-inhibition zones were determined by measuring the radial zones around each well; results were expressed as mean values (mm). Chlorhexidine mouthwash, 0.2%, (Shahdaro, Iran) and ciprofloxacin (0.3%, Sina Darou, Iran) were included as positive controls, while DMSO was used as the negative control.

In the disc-diffusion approach, paper disks impregnated with the specified treatments were prepared and allowed to dry under sterile conditions for 1 hour. Subsequently, the discs were transferred onto prepared growth media inoculated with the *S. mutans* strain and incubated at 37°C for 24 hours. Finally, the diameters of the inhibition zones around the discs were measured.

The anti-biofilm activity was evaluated using a 96-well microtiter plate-based colorimetric assay with Crystal Violet staining. The first well served as the positive control (medium without extract). In the subsequent wells, 100

μL of different combined concentrations of the extract and chlorhexidine were added to the culture medium. A negative control well containing medium and bacteria without extract. The plate was incubated at 37°C for 24 hours to allow biofilm formation on the well surfaces. Following incubation, the contents of the wells were gently aspirated and air-dried. Subsequently, 200 μL of methanol was added to each well to chemically fix the adherent biofilm, followed by thorough air-drying. For quantification, 200 μL of 2% crystal violet was added to each well for 5 minutes. The stained biomass was then solubilized by adding 200 μL of 33% acetic acid to each well, followed by thorough agitation. Then, the absorbance of each well was measured at 630 nm using a microplate reader (BioTek, Germany). The biofilm formation status in the wells was assessed using the optical density of the positive control wells (ODC) and the treated wells (OD).

The results were replicated three times and subjected to statistical evaluation using SPSS version 24. The differences between the group means were analyzed using the Kruskal-Wallis test.

RESULTS

In the disk-diffusion and well-diffusion assays, there was a statistically significant difference among the various combined formulations with each other and with the antibiotic with respect to the growth inhibition zone diameters. The strongest antibacterial effect against *S. mutans* was observed for ciprofloxacin followed by 100 mg/mL chlorhexidine, and a formulation containing 20 mg/mL of *F. gummosa* and 80 mg/mL of chlorhexidine. The lowest antibacterial activity was associated with the 100 mg/mL of *F. gummosa* and the combination containing 80 mg/mL of *F. gummosa* and 20 mg/mL of chlorhexidine, for which no inhibition zone was observed.

In the biofilm assay, there was no statistically significant difference in the capacity for biofilm formation among different

concentrations of *F. gummosa*+chlorhexidine on the biofilm structure of *S. mutans* ($P = 0.073$). In this method, the strongest anti-biofilm effect was observed for the 100 mg/mL of chlorhexidine mouthwash as well as 20 mg/mL of *F. gummosa*+80 mg/mL of chlorhexidine. The lowest anti-biofilm activity corresponded to the 100 mg/mL of *F. gummosa*.

DISCUSSION

S. mutans is the first and most important microorganism present in dental plaque, whose cariogenicity has been established; therefore, it is advisable to prevent the entry and proliferation of this pathogen in the oral environment. Therefore, the necessity of investigating and conducting research to find solutions to overcome these conditions is evident.

Herbal mouth rinses, compared with chlorhexidine, offer advantages due to their natural constituents, resulting in better compatibility with physiological processes and lower toxicity risk. The antimicrobial effects of plants have long attracted researchers' attention, and thus the use of herbal mouth rinses can be very beneficial when they demonstrate adequate efficacy. Therefore, identifying an effective herbal formulation to inhibit the growth of pathogenic oral bacteria for use as a mouth rinse is of considerable importance, with the aim of introducing a combination that offers greater efficacy and fewer side effects, which is the objective of the present study.

The results of this study indicated that chlorhexidine at a concentration of 100 mg/mL exhibited the greatest inhibitory effect on the growth of the studied pathogenic bacterium. The ethanolic extract of *F. gummosa*, when used alone or in high-concentration in combinations (40-80 mg/ml), did not affect the growth inhibition of this bacterium. Consistent with the strong antibacterial effects of chlorhexidine observed in this study, it has been reported that chlorhexidine at 0.2% and

eugenol at 99% concentration inhibited biofilm formation in the isolate UTMC 2446. Furthermore, these compounds effectively inhibited the growth of planktonic cells at concentrations of 0.14% and 79.2%, respectively.

In the present study, the strongest anti-biofilm effect was observed with 100 mg/mL of chlorhexidine mouthwash alone and a combination of 20 mg/ml of *F. gummosa* and 80 mg/mL of chlorhexidine; however, the addition of *F. gummosa* to the formulation did not result in a notable antibacterial effect. It has been shown that the foreign mouthwash, Kin-Gingival (Kin Spain), was more effective than the Iranian mouthwash, Epimax (Emad Darou Iran), in reducing plaque in the posterior region of the mandible, both containing identical active ingredients, 0.12% chlorhexidine and 0.05% sodium fluoride. These findings align with the current study's results, which support the strong antibacterial effect of chlorhexidine mouthwash. In contrast to our findings, it has been demonstrated that the essential oil from the aerial parts of *F. gummosa* exhibits antimicrobial effects against cariogenic bacteria comparable to those of chlorhexidine. Furthermore, it has been reported that the gum-resin of *F. gummosa* possesses significant antibacterial activity, with its alcoholic extract demonstrating a greater inhibitory effect on *Acinetobacter* strains (Minimum Inhibitory Concentration [MIC] of 18.75 mg/mL). It has been shown that the methanolic extract of *F. gummosa* gum exhibits higher antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* compared to its ethanolic and aqueous extracts. Another study demonstrated that the ethanolic extract of *F. gummosa* root exhibited greater inhibitory activity than its methanolic and aqueous extracts. Regarding the methanolic extract, the highest sensitivity was observed in *Staphylococcus aureus*, whereas in the ethanolic extract, the greatest sensitivity was observed in *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae*. It has been demonstrated that *F. gummosa* essential oil exhibits a stronger inhibitory effect on *Staphylococcus epidermidis*

than essential oil of *Cinnamomum* against several Gram-positive and Gram-negative bacteria. The discrepancies between our findings and those of previous studies may be attributed to differences in the bacterial strains tested and the specific type of *F. gummosa* extract or essential oil utilized.

In line with our findings, other researchers have shown that aqueous and alcoholic root extracts of *F. gummosa* had no inhibitory effect. It has been depicted that the aqueous root extract of *F. gummosa* does not affect the growth of *Pseudomonas aeruginosa*, in contrast to the alcoholic root extracts.

CONCLUSIONS

The results indicate that chlorhexidine (100 mg/mL) exhibited the strongest antibacterial effect against *S. mutans*, followed by the combination of chlorhexidine (80 mg/mL) and *F. gummosa* (20 mg/mL), which also demonstrated significant efficacy. In contrast, the ethanolic extract of *F. gummosa* at 100 mg/mL demonstrated the lowest antibacterial activity. Regarding biofilm formation, formulations with higher proportions of *F. gummosa* promoted biofilm growth; consequently, increasing the extract concentration within these mixtures reduced overall antibiofilm efficacy, suggesting a potential antagonistic interaction.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran, for their support during this study. This study was financially supported by the Vice Chancellor for Research and Technology at North Khorasan University of Medical Sciences (Ethics Approval Code: IR.NKUMS.REC.1401.102).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.

بررسی آزمایشگاهی اثرات ترکیبی عصاره اتانولی گیاه دارویی باریجه (*Ferula gummosa*) و دهان شویه کلرهگزیدین بر ساختار بیوفیلمی باکتری استرپتوکوکوس موتانس (*Streptococcus mutans*)

امیر مرادی^۱، پرستو ضرغامی مقدم^۲، پیمان آل شیخ^۲،
فاطمه اسحقى گرجى^{۳*}، سمانه ملازاده^{۴*}

۱. دانشجوی دکتری عمومی دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
۲. مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
۳. گروه ترمیمی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
۴. گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: یک دهان شویه مطلوب علاوه بر اثرات ضدمیکروبی باید دارای مقاداری مقاومت دارویی بوده و در عین حال اثرات نامطلوب بر میکروفلور طبیعی دهان نداشته باشد. هدف از این مطالعه، بررسی آزمایشگاهی اثرات ترکیبی عصاره اتانولی گیاه دارویی باریجه (*Ferula gummosa*) و دهان شویه کلرهگزیدین بر ساختار بیوفیلمی باکتری استرپتوکوکوس موتانس (*Streptococcus mutans*) بوده است.

مواد و روش‌ها: ریشه گیاه دارویی باریجه پس از جمع‌آوری و خشک‌نمودن، توسط حلال اتانول به روش خیساندن عصاره‌گیری گردید. سپس، غلظت‌های مختلف از ترکیب عصاره اتانولی گیاه دارویی باریجه و کلرهگزیدین تهیه شد. اثر ضدباکتریایی بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس با استفاده از روش‌های انتشار دیسک و چاهک پلیت و همچنین اثر ممانعت از تشکیل بیوفیلیم با استفاده از روش بیوفیلیم و میزان جذب نوری آن بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده نرم‌افزار آماری SPSS-V24 و آزمون Kruskal-Wallis انجام شد. سطح معناداری $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، دهان شویه کلرهگزیدین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و غلظت ترکیبی ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلرهگزیدین و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره باریجه، بیشترین تأثیر ضدباکتریایی را علیه باکتری استرپتوکوکوس موتانس در روش‌های مورد مطالعه داشتند. **نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی گیاه باریجه، به‌تنهایی یا در غلظت‌های ترکیبی دارای مقادیر بالای عصاره، در مقایسه با کلرهگزیدین ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، تأثیر ناچیزی بر باکتری استرپتوکوکوس موتانس داشت.

* نویسنده مسئول: فاطمه اسحقى گرجى، سمانه ملازاده
نشانی: دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
تلفن: +۹۸۰۵۸۳۱۵۱۱۴۳۴
رایانامه: s.mollazadeh@nkums.ac.ir
شناسه ORCID: 0000-0001-6582-4500
شناسه ORCID نویسنده اول: 0009-0005-7790-4328
DOI: 10.30468/jsums.2026.8309.3375

کلیدواژه‌ها: گیاه دارویی باریجه، کلرهگزیدین، استرپتوکوکوس موتانس، اثرات ضدباکتریایی.

۱. مقدمه

پوسیدگی دندان و بیماری‌های پریدونتال ناشی از فعالیت گونه‌های مختلف باکتری‌های دهان است. پلاک دندانی اپیدمی خفیف ولی بسیار رایج در سطح جهان است و در اقشار مختلف جامعه و همه سنین مشاهده می‌شود و یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد پوسیدگی دندان است. علاوه بر پوسیدگی، در صورت تجمع پلاک روی دندان و حذف‌نشدن آن، التهاب لثه آغاز و در اثر پیشرفت بیماری، تخریب استخوان آلوئل، سست شدن دندان و در نهایت از دست رفتن دندان اتفاق خواهد افتاد. پلاک دندانی، نوعی بیوفیلم میکروبی است که توسط میکروارگانیسم‌های فلور طبیعی دهان ایجاد می‌شود. فعل و انفعالات بین سلولی باکتری‌ها با یکدیگر در فلور دهان و تأثیر آن‌ها بر اتصال باکتری‌ها روی سطوح باعث شروع و شکل‌گیری بیوفیلم می‌شود (۱، ۲). بیوفیلم‌های باکتریایی، تجمعات پیچیده میکروارگانیسمی هستند که در یک پوشش گلیکوکالیکس محصور شده و به سطوح مختلف می‌چسبند و در هر دو رده باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مشاهده می‌شوند. در حقیقت، یکی از اصلی‌ترین مکانیسم‌های بقاء باکتری‌ها در محیط‌های کشت مختلف، استفاده از توان تولید بیوفیلم و زندگی در آن می‌باشد (۳).

کنترل مکانیکی پلاک، یکی از روش‌های کنترل پوسیدگی و مطمئن‌ترین روش رعایت بهداشت دهان و دندان است. اما بسیاری از بیماران به خصوص کودکان، معلولین و افرادی که تحت عمل جراحی بوده اند، قادر به کنترل پلاک به صورت مکانیکی نبوده و نیاز به استفاده از مواد شیمیایی مانند دهان‌شویه، ژل و خمیر دندان دارند (۴، ۵). یک دهان‌شویه مطلوب، علاوه بر دارا بودن طیف ضد میکروبی، باید مقاومت دارویی کمی نیز ایجاد کند و در عین حال بر روی از بین رفتن میکروفلور طبیعی دهان تأثیری نداشته باشد (۶). دهان‌شویه کلرهگزیدین از گروه آنتی‌سپتیک‌های بیس گوانید بوده و روی طیف وسیعی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها تأثیرگذار است و از تشکیل پلاک و التهاب لثه جلوگیری می‌کند. کلرهگزیدین عوارض مختلفی به همراه دارد از جمله مزه تلخ، اختلال در حس ذائقه، دسکواماسیون مخاطی، فراهم‌کردن زمینه برای تشکیل جرم فوق لثه‌ای و التهاب یک

طرفه و دوطرفه پارتید. مهم‌ترین عارضه آن، تغییر رنگ دندان است (۳، ۷، ۸). از سایر عوارض کلرهگزیدین می‌توان درصد بالایی از بیماری‌های عفونی مزمن دهانی، ناشی از توان بیوفیلم‌زایی باکتری‌ها می‌باشد. همچنین، به دلیل شرایط اختصاصی حاکم در محیط بیوفیلم، درمان و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها علیه آن یکی از اصلی‌ترین چالش‌های پیش رو در علم پزشکی محسوب می‌گردد (۳).

گیاهان دارویی با تولید مواد مؤثر ثانویه، نقش‌های درمانی متفاوتی را از خود نشان می‌دهند که کمیت و کیفیت این ترکیبات تحت تأثیر شرایط جغرافیایی و خاستگاه گیاه می‌باشد (۷، ۹). گیاه باریجه، کما یا قسنی با نام علمی فرولا گاموسا (*Ferula gummosa*)، از خانواده چتریان است. این گیاه بومی در مناطق شرقی، مرکزی و غرب ایران و در استان‌های سمنان، اصفهان، فارس و خراسان پراکنده است (۱۰). این گیاه در کشورهای آسیای مرکزی، غرب آسیا و شمال آفریقا کشت می‌شود. جنس فرولا دارای ۳۰ گونه بومی بوده و به دلیل داشتن خواص گوناگون از محبوبیت خاصی در ایران برخوردار می‌باشد (۱۱). عصاره این گیاه دارای ترکیباتی همچون بتا-پینن، آلفا-پینن، میرسن، لیمونن، آلفا توجن و پاراسیمن است (۱۳-۱۰). پژوهش‌ها نشان داده است که عصاره این گیاه دارای خواص ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدقارچی و ضدتشنجی می‌باشد (۱۹-۱۴). با توجه به خواص ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد قارچی و ضدتشنجی فرولا گاموسا و خواص آنتی‌میکروبیال دهان‌شویه کلرهگزیدین، در این مطالعه برای اولین بار به بررسی آزمایشگاهی اثرات ترکیبی عصاره اتانولی گیاه دارویی باریجه (*Ferula gummosa*) و دهان‌شویه کلرهگزیدین بر ساختار بیوفیلمی باکتری استرپتوکوکوس موتانس (*Streptococcus mutans*) پرداخته شد.

۲. مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری

ریشه گیاه باریجه پس از جمع‌آوری توسط کارشناس گیاه‌شناسی مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی، تأیید و در سایه در مجاورت هوا، خشک و پودر گردید. عصاره‌گیری به روش خیساندن به مدت ۴۸ ساعت با حلال

اتانول (۱۰۰ درصد) انجام شد. عصاره اتانولی حاصله با استفاده از تبخیرکننده چرخان (روتاری، هایدولف آلمان) تغلیظ و پودر عصاره حاصل گردید (pH=5.7). پودر عصاره تا زمان آزمایش در یخچال (۴+ سانتی‌گراد) نگهداری شد.

روش چاهک پلیت

اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی گیاه باریجه و دهان‌شویه کلرهگزیدین با غلظت‌های مختلف (میلی گرم بر میلی لیتر) به روش چاهک پلیت انجام شد (جدول ۱). در این روش از پلیت‌های حاوی محیط کشت مربوطه که آغشته به میکروارگانیسم استرپتوکوکوس موتانس (تهیه شده از سایت مرکز ذخایر ژنتیکی ایران با غلظت ۰/۵ مک فارلند معادل $10^8 \times 1/5$ باکتری در سرم فیزیولوژی) بودند، استفاده گردید. توسط یک پیپت پاستور استریل که مخصوص ایجاد چاهک است، یک حفره در محیط کشت ایجاد شده و داخل هر چاهک با سمپلر ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌ها به‌طور جداگانه ریخته شد. سپس، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور (به‌داد، ایران) قرار داده شدند. پس از آن میزان مناطق بهاری مورد ارزیابی قرار گرفته و بر اساس میلی‌متر محاسبه گردید. چاهک‌های حاوی دهان‌شویه کلرهگزیدین (۰/۲ درصد، شهردارو، ایران) و سیپروفلوکساسین (۰/۳ درصد، سینا دارو، ایران) به‌عنوان کنترل مثبت و مایع دی متیل سولفوکساید به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند (۲۰).

جدول ۱. غلظت‌های ترکیبی (برحسب میلی گرم بر میلی لیتر) مختلف عصاره اتانولی باریجه و دهان‌شویه کلرهگزیدین

عصاره اتانولی باریجه	۱۰۰	۸۰	۶۰	۵۰	۴۰	۲۰	۰
دهان‌شویه کلرهگزیدین (۰/۲ درصد)	۰	۲۰	۴۰	۵۰	۶۰	۸۰	۱۰۰

روش انتشار از دیسک

آزمایش آنتی‌بیوگرام به این صورت است که دیسک بلانک آغشته به عصاره با غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاه باریجه و دهان‌شویه کلرهگزیدین (جدول ۱)، دیسک‌های بلانک حاوی دهان‌شویه (۰/۲ درصد) و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۰/۳ درصد) به‌عنوان کنترل مثبت و

دیسک حاوی دی متیل سولفوکساید به‌عنوان کنترل منفی به مدت ۱ ساعت در انکوباتور قرار داده شده و خشک شدند. سپس، دیسک‌های تیمار شده بر روی محیط کشت مناسب که قبلاً توسط تلقیح میکروبی آغشته شده، در فواصل مناسب قرار داده شدند. در ادامه، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند و اثر دیسک حاوی عصاره‌ها با دیسک حاوی دهان‌شویه و آنتی‌بیوتیک مقایسه گردید (۲۱).

تست بیوفیلم

برای ارزیابی اثر ضد بیوفیلمی عصاره اتانولی گیاه باریجه، میزان تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت و رنگ‌سنجی با کریستال ویوله بررسی شد. روش اندازه‌گیری میزان تأثیر ضد بیوفیلمی عصاره‌های مختلف به این صورت بود که ابتدا ۱۵۰ میکرولیتر از محیط کشت اختصاصی داخل چاهک‌های میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه ریخته شد، چاهک اول محیط کشت بدون عصاره به‌عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. در چاهک‌های بعدی ۱۰۰ میکرولیتر از نسبت‌های مختلف عصاره و کلرهگزیدین به محیط کشت اضافه شد. یک چاهک هم به‌عنوان شاهد منفی بدون عصاره و باکتری در نظر گرفته شد. در مرحله بعد، سوسپانسیون میکروبی با کدورت نیم مک‌فارلند از کشت ۲۴ ساعته میکروارگانیسم‌ها تهیه شد. سپس، ۲۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به تمام چاهک‌ها، به‌جز چاهک شاهد منفی، افزوده گردید. میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس، محتویات داخل چاهک‌ها به آرامی با برگرداندن خالی شد و تمامی چاهک ۳ بار با سرم فیزیولوژی استریل شست‌وشو داده شدند تا تمامی باکتری‌های پلانکتونیک حذف گردند. میکروتیتر پلیت در دمای اتاق خشک گردید. در مرحله بعد، با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر متانول به هر چاهک، باکتری‌های متصل به سطح داخلی دیواره چاهک‌ها - که همان جمعیت بیوفیلمی می‌باشند - تثبیت شدند. پس از ۱۵ دقیقه، محتویات چاهک‌ها دور ریخته شد و پلیت در درجه حرارت اتاق خشک شد. به منظور رنگ‌آمیزی، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه اضافه شد. سپس، رنگ اضافی به‌طور کامل توسط جریان ملایم آب شسته و میکروپلیت در دمای اتاق خشک شد. پس از این مرحله، برای سنجش میزان بیوفیلم، به هر چاهک ۲۰۰

بر اساس آزمون کروسکال والیس، در روش انتشار از دیسک، تفاوت آماری معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف ترکیبی با آنتی‌بیوتیک وجود داشت ($P=0.003$). در بررسی تأثیر ضدباکتریایی بر استرپتوکوکوس موتانس، بیشترین مهار رشد به ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (قطر هاله عدم رشد: ۴۵/۳ میلی‌متر)، دهان‌شویه کلرهگزیدین غلظت ۱۰۰ درصد (قطر هاله عدم رشد: ۱۶ میلی‌متر) و ترکیب باریجه با غلظت ۲۰ درصد و کلرهگزیدین ۸۰ درصد (قطر هاله عدم رشد: ۱۳/۶۶ میلی‌متر) بود. کمترین تأثیر ضدباکتریایی نیز مربوط به باریجه با غلظت ۱۰۰ درصد و غلظت‌های ترکیبی باریجه و کلرهگزیدین حاوی مقادیر بالای عصاره (۴۰-۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود؛ که هاله عدم رشد مشاهده نشد. همچنین، تفاوتی بین اثرات ضدباکتریایی باریجه با غلظت ۱۰۰ درصد و غلظت‌های ترکیبی باریجه و کلرهگزیدین حاوی مقادیر بالای عصاره (۴۰-۸۰) مشاهده نشد (شکل ۱).

میکرولیترا سید استیک ۳۳ درصد اضافه شد. سپس، چاهک‌ها با استفاده از سمپلر به‌خوبی هم‌زده شدند تا رنگ‌های متصل به دیواره چاهک‌ها به‌طور کامل حل شوند. پس از یکنواخت‌شدن محلول هر چاهک، میزان جذب در ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا (بایوتک، آلمان) قرائت گردید (۲۲، ۲۰). وضعیت تشکیل بیوفیلم در چاهک‌ها با کمک ODC (میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل مثبت) و OD (میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار) محاسبه گردید.

$OD \geq ODC$ عدم تشکیل بیوفیلم

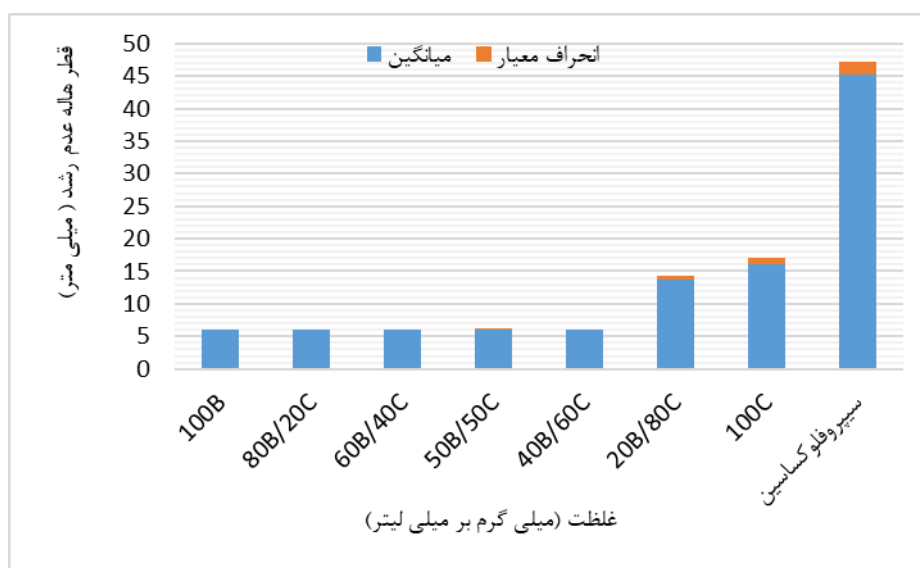
$OD < ODC \leq 2OD$ قدرت تشکیل بیوفیلم ضعیف

$2OD < OD \leq 4OD$ قدرت تشکیل بیوفیلم متوسط

$4OD < OD$ قدرت تشکیل بیوفیلم قوی

نتایج به صورت سه بار تکرار ثبت گردید و برای تحلیل نتایج از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ و آزمون کروسکال والیس (برای مقایسه میانگین‌ها) استفاده شد.

۳. نتایج



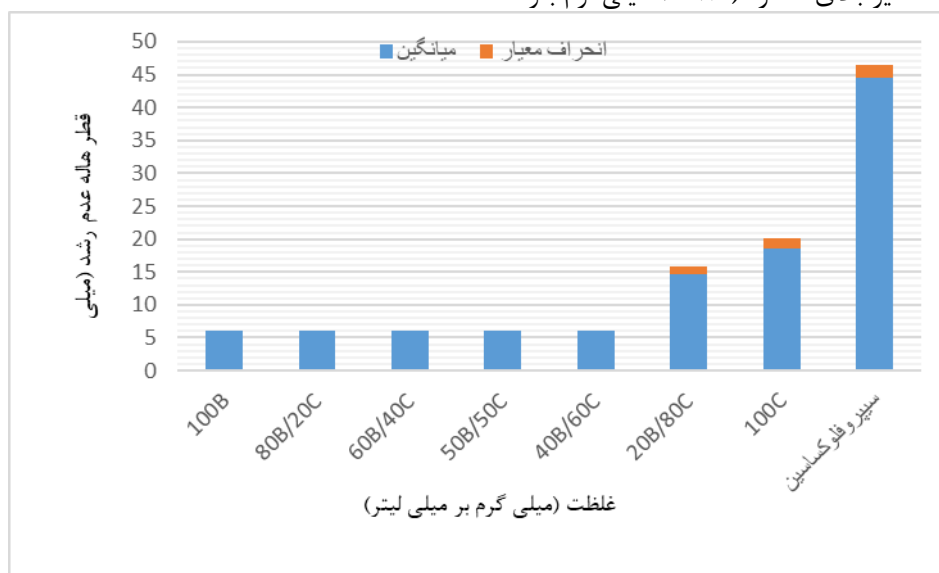
شکل ۱. توزیع اثر ضدباکتریایی غلظت‌های ترکیبی مختلف باریجه و کلرهگزیدین بر قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس با روش انتشار از دیسک، (B: باریجه و C: کلرهگزیدین)

($P=0.004$). به‌طوری‌که، بیشترین تأثیر ضدباکتریایی بر استرپتوکوکوس موتانس به‌ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین با قطر هاله عدم رشد ۴۴/۶ میلی‌متری، غلظت ۱۰۰ درصدی دهان‌شویه کلرهگزیدین با قطر هاله عدم

با توجه به نتایج به دست آمده در شکل ۲، آزمون کروسکال والیس نشان داد که در روش چاهک پلیت، تفاوت آماری معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف ترکیبی با آنتی‌بیوتیک از لحاظ قطر هاله عدم رشد وجود داشت

میلی لیتر) بود که هاله عدم رشد مشاهده نشد. لازم به ذکر است که تفاوتی بین اثرات ضدباکتریایی غلظت ۱۰۰ درصدی باریجه و غلظت‌های ترکیبی باریجه و کلرهگزیدین حاوی مقادیر بالای عصاره (۸۰-۴۰) مشاهده نشد.

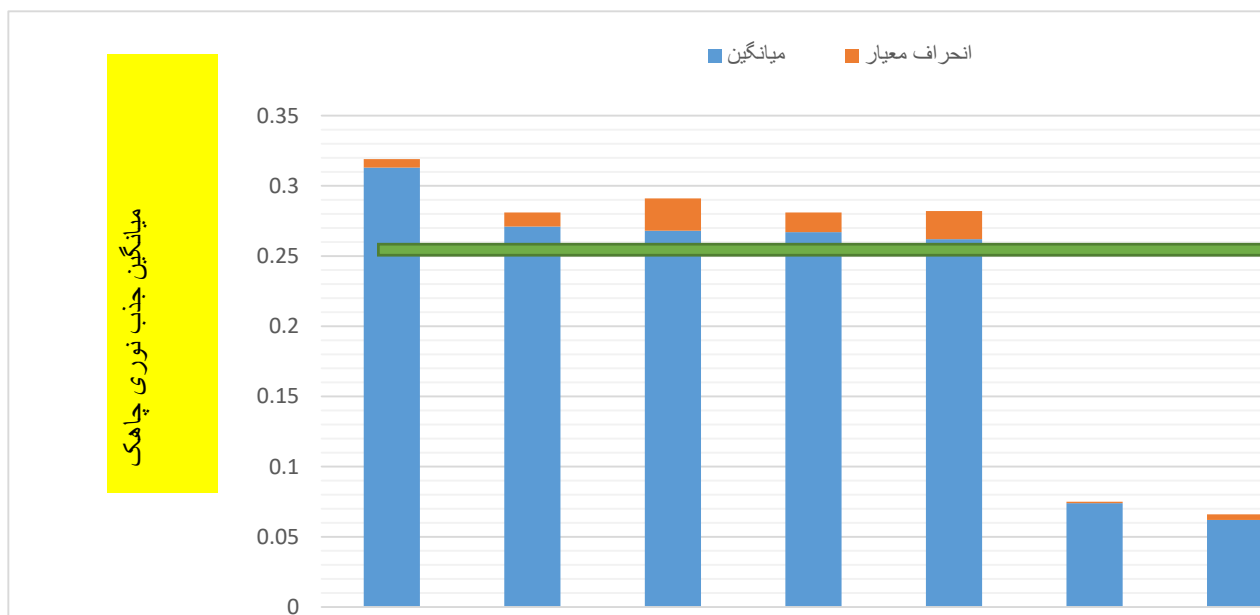
رشد ۱۸/۶۶ میلی متری و غلظت ترکیبی ۲۰ درصدی باریجه و ۸۰ درصدی کلرهگزیدین با قطر هاله عدم رشد ۱۴/۶۶ میلی متری بود. کمترین تأثیر ضدباکتریایی نیز مربوط به غلظت ۱۰۰ درصدی باریجه و غلظت‌های ترکیبی باریجه و کلرهگزیدین حاوی مقادیر بالای عصاره (۸۰-۴۰) میلی گرم بر



شکل ۲: توزیع اثر ضدباکتریایی غلظت‌های ترکیبی مختلف باریجه و کلرهگزیدین بر قطر هاله عدم رشد استرپتوکوکوس موتانس با روش چاهک پلیت (B): باریجه و C: کلرهگزیدین).

مختلف باریجه و کلرهگزیدین بر ساختار بیوفیلمی باکتری استرپتوکوکوس موتانس وجود نداشت ($P=0.073$).

با توجه به نتایج به دست آمده در شکل ۳، بررسی آماری توسط آزمون کروسکال والیس نشان داد که در روش بیوفیلیم، تفاوت معناداری در قدرت تشکیل بیوفیلیم بین غلظت‌های



شکل ۳. توزیع اثر ضدباکتریایی غلظت‌های ترکیبی مختلف باریجه و کلرگزیدین بر ساختار بیوفیلمی باکتری استرپتوکوکوس موتانس در روش بیوفیلم (B): باریجه و C: کلرگزیدین).

دارویی باریجه نشان داد که غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر کلرگزیدین بیشترین اثر مهاری را بر روی رشد باکتری پاتوژن مورد مطالعه داشت. عصاره اتانولی گیاه دارویی باریجه به تنهایی و در غلظت‌های ترکیبی بالا (۸۰-۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر) تأثیری بر مهار رشد این باکتری نداشت. هم‌راستا با نتایج حاصل از اثرات ضدباکتریایی قوی کلرگزیدین در مطالعه حاضر، مبارک‌زاده و همکاران پژوهشی با عنوان ارزیابی اثر ضد میکروبی کلرگزیدین و اوژنول بر روی سلول‌های پلانکتونیک و بیوفیلم استرپتوکوکوس ویریدانس جدا شده از پلاک‌های دندانی انجام دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که جدایه UTMC 2446 که ۹۸/۰۴ درصد شباهت به استرپتوکوکوس سانژیوس دارد، بیشترین توانمندی تولید بیوفیلم را در بین جدایه‌ها داشت. غلظت‌های ۰/۲ درصد کلرگزیدین و ۹۹ درصد اوژنول، مانع از تشکیل بیوفیلم در این جدایه شد؛ در حالی که این ترکیبات به ترتیب در غلظت‌های ۰/۱۴ درصد و ۷۹/۲ درصد به خوبی قادر به مهار رشد سلول‌های پلانکتونی بودند (۲۶).

در مطالعه حاضر بیشترین اثر ضدبیوفیلمی مربوط به غلظت ۱۰۰ درصدی دهان‌شویه کلرگزیدین و غلظت ترکیبی ۲۰ درصدی باریجه و ۸۰ درصدی کلرگزیدین بود. گیاه باریجه مورد مطالعه، اثر ضدباکتریایی قابل‌ملاحظه‌ای از خود نشان نداد. اصفهانیان و همکاران پژوهشی با عنوان مقایسه اثر بالینی دو دهان‌شویه ایرانی و خارجی حاوی کلرگزیدین و سدیم فلوراید بر میزان برداشت پلاک دندانی انجام دادند. در این مطالعه اثرات آنتی‌پلاک دو دهان‌شویه Kin-Gingival ساخت کمپانی kin اسپانیا و دهان‌شویه Epimax ساخت شرکت عماد داروی ایران که هر دو حاوی مقادیر یکسان کلرگزیدین ۰/۱۲ درصد و سدیم فلوراید ۰/۰۵ درصد بودند، بررسی شد. یافته‌ها نشان داد که دهان‌شویه خارجی در مقایسه با دهان‌شویه ایرانی، در حذف پلاک در ناحیه خلفی فک پایین مؤثرتر بوده است. هر دو دهان‌شویه ایرانی و خارجی در ناحیه قدامی مؤثرتر بودند؛ در حالی که هیچ تفاوتی در تأثیر آن‌ها بین فک بالا و پایین مشاهده نشد (۲۷). یافته‌های مربوط به اثر ضدباکتریایی قوی دهان‌شویه کلرگزیدین،

در این روش بیشترین اثر ضدبیوفیلمی مربوط به غلظت ۱۰۰ درصدی دهان‌شویه کلرگزیدین و غلظت ترکیبی ۲۰ درصدی باریجه و ۸۰ درصدی کلرگزیدین بود. کمترین تأثیر ضدبیوفیلمی نیز مربوط به غلظت ۱۰۰ درصدی باریجه و غلظت‌های ترکیبی باریجه و کلرگزیدین حاوی مقادیر بالای عصاره (۸۰-۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر) ثبت شد.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

پوسیدگی دندان در حضور باکتری‌های اسیدوژنیک مانند استرپتوکوکوس موتانس به شدت افزایش می‌یابد. استرپتوکوکوس موتانس، اولین و مهم‌ترین میکروارگانیسم موجود در پلاک دندانی است که پوسیدگی‌زایی آن به اثبات رسیده است. بنابراین توصیه می‌شود از ورود و تکثیر این پاتوژن به محیط دهانی جلوگیری شود (۲۳). با توجه به ماهیت عفونی پوسیدگی‌های دندانی و بیماری‌های پریدونتال که یکی از شایع‌ترین بیماری‌های دهانی قرن حاضر هستند؛ انجام تحقیقات برای یافتن راه‌حل غلبه بر این بیماری‌ها ضرورت دارد (۲۴).

دهان‌شویه‌های گیاهی نسبت به کلرگزیدین به علت داشتن ترکیبات طبیعی، از نظر سازگاری با فیزیولوژی بدن و احتمال مسمومیت کمتر دارای شرایط مناسب‌تری هستند. بنابراین، دهان‌شویه‌های گیاهی برای افرادی که امکان استفاده از دهان‌شویه‌های شیمیایی را ندارند، توصیه می‌شوند. تأثیر گیاهان بر عوامل عفونی از گذشته مورد توجه محققان بوده است. استفاده از دهان‌شویه‌های گیاهی در صورتی که کارایی مطلوب داشته باشند، بسیار مفید خواهد بود؛ چرا که دهان‌شویه‌های سنتتیک دارای عوارض جانبی هستند (۲۵). لذا، یافتن یک ترکیب گیاهی مؤثر جهت مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زای دهانی برای دهان‌شویه بسیار حائز اهمیت است؛ زیرا می‌توان ترکیبی با کارایی بیشتر و عوارض جانبی کمتر معرفی کرد. در این تحقیق، به بررسی اثرات ضدباکتریایی غلظت‌های ترکیبی مختلف عصاره اتانولی گیاه دارویی باریجه (*Ferula gummosa*) و دهان‌شویه کلرگزیدین بر استرپتوکوکوس موتانس به صورت برون‌تنی پرداخته شده است. نتایج مطالعه حاضر بر روی عصاره اتانولی ریشه گیاه

هم‌راستا با نتایج پژوهش حاضر است. در مغایرت با نتایج مطالعه حاضر، ناظمی سلمان و همکاران نشان دادند که اسانس اندام‌های هوایی باریجه، اثرات ضد میکروبی مشابه کلرهگزیدین بر باکتری‌های پوسیدگی‌زا دارند؛ به‌طوری‌که قطر ناحیه بازدارنده در باکتری استرپتوکوک سوبرینوس تیمار شده با اسانس باریجه به صورت غیرمعدناداری بیشتر از کلرهگزیدین بود (۲۸). همچنین، فرید افشار و همکاران گزارش کردند که صمغ-رزین باریجه، فعالیت ضدباکتریایی قابل‌توجهی دارد و اسانس الکلی آن اثر بازدارندگی بیشتری بر سویه‌های آسینتوباکتر نشان داد (۲۹). قاسمی و همکاران نشان دادند که عصاره متانولی صمغ گیاه باریجه، فعالیت ضد میکروبی بالاتری بر روی باکتری باسیلوس سوبتیلیس نسبت به عصاره‌های اتانولی و آبی دارد (۳۰). نتایج مطالعه هاشمی و همکاران نشان داد که عصاره اتانولی ریشه باریجه، فعالیت مهارکنندگی بیشتری نسبت به عصاره‌های متانولی و آبی دارد. بیشترین حساسیت در عصاره متانولی مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس و بیشترین حساسیت در عصاره اتانولی مربوط به اش‌ریشاکلی و شیگلا دیسانتریه بود (۳۱). سلیمانی و همکاران نشان دادند که گیاه باریجه بیشترین اثر مهارکنندگی را بر روی باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس با هاله عدم رشدی به قطر ۳۳ میلی‌متر و MIC=0.01 داشت (۳۲). از علل مغایرت در نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های سایر پژوهش‌ها، می‌توان به نوع باکتری و نوع عصاره و یا اسانس باریجه اشاره نمود.

نتایج مطالعه صالحی و همکاران با عنوان بررسی اثر ضد قارچی عصاره‌های آبی و الکلی ریشه باریجه نشان داد که در روش دیسک و چاهک، عصاره‌های آبی و الکلی ریشه باریجه هیچ‌گونه اثر ضدباکتریایی ندارند. یافته‌های این مطالعه مشابه و در تأیید مطالعه حاضر بود که نشان داد باریجه با روش‌های مشابه (دیسک و چاهک) و سایر تست‌ها (بیوفیلیم)، اثر ضدباکتریایی ندارد (۳۳). صالحی و همکاران پژوهشی با عنوان اثر عصاره‌های آبی و الکلی ریشه باریجه بر سودوموناس آئروژینوزا انجام دادند. یافته‌های ایشان نشان داد که در هر دو روش دیسک و چاهک، عصاره آبی ریشه باریجه تأثیری بر رشد سودوموناس آئروژینوزا نداشت و هاله عدم رشد مشاهده نشد، اما عصاره‌های الکلی ریشه باریجه، اثر ضدباکتریایی بر

سودوموناس آئروژینوزا داشتند. همان‌طور که در این مطالعه مشخص شد، گیاه دارویی باریجه دارای اثر ضدباکتریایی بود (۳۴).

تحلیل نتایج در روش دیسک و چاهک نشان داد که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلرهگزیدین ۰/۲ درصد، بیشترین اثر ضدباکتریایی را بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس داشته است. بعد از آن غلظت ترکیبی ۸۰ کلرهگزیدین و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باریجه مؤثر بوده و در مقابل غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی باریجه کمترین اثر ضدباکتریایی را از خود نشان داد. نتایج سنجش میزان تشکیل بیوفیلیم نشان داد که تنها غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلرهگزیدین و نیز غلظت ترکیبی ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلرهگزیدین و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باریجه، قادر به مهار تشکیل بیوفیلیم استرپتوکوکوس موتانس بودند؛ در حالی که در غلظت‌های ترکیبی حاوی درصد بالایی از عصاره باریجه، تشکیل بیوفیلیم باکتری مشاهده گردید.

به نظر می‌رسد باریجه در غلظت‌های بالا، نه‌تنها به اثرات ضد میکروبی کلرهگزیدین کمک نمی‌کند، بلکه ممکن است اثربخشی آن را نیز مختل کند (اثر آنتاگونیستی). عصاره باریجه، احتمالاً تنها در دوزهای پایین می‌تواند به‌عنوان یک عامل کمکی در کنار کلرهگزیدین عمل کند؛ اما توانایی ضدباکتریایی کافی برای جایگزینی کامل کلرهگزیدین ندارد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که غلظت ترکیبی ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلرهگزیدین و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باریجه می‌تواند یک فرمولاسیون بهینه برای مهار استرپتوکوکوس موتانس باشد. با این حال، افزایش نسبت باریجه در این ترکیب منجر به کاهش کارایی می‌شود. بنابراین، باریجه تنها زمانی پیشنهاد می‌شود که هدف کاهش دوز کلرهگزیدین، نه لزوماً افزایش قدرت میکروب‌کشی باشد؛ زیرا این عصاره به تنهایی فاقد اثر مهار بیوفیلیم بر استرپتوکوکوس موتانس است. از این‌رو، انجام مطالعات تکمیلی برای بررسی مکانیسم دقیق برهم‌کنش این دو ترکیب در غلظت‌های مختلف، به‌منظور تعیین احتمال تداخل بیوشیمیایی باریجه با عملکرد کلرهگزیدین، توصیه می‌گردد.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم تعیین MIC و MBC اشاره نمود که در تصمیم‌گیری درباره دوز مؤثر نقش

در این مطالعه، نویسندگان اول و دوم در ایده‌پردازی و انجام طرح، نویسنده سوم در انجام پروژه، نویسندگان چهارم و پنجم در ایده‌پردازی، نگارش، ویرایش و ارسال مقاله مشارکت داشته‌اند.

حمایت مالی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی و با کد مصوب ۴۰۱۰۰۹۳ انجام شده است. نویسندگان مراتب قدردانی خود را از این معاونت محترم ابراز می‌دارند.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

دارند. همچنین از دیگر محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به شناسایی‌نشدن ماده مؤثره عصاره و عدم انجام آزمون سمیت سلولی در شرایط برون‌تنی اشاره نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله، از مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی که ما را در اجرای این طرح یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش در دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی با کد اخلاق (IR.NKUMS.REC.1401.102) تصویب شده است.

سهم نویسندگان

References

- [1]. Ahn SJ, Ahn SJ, Wen ZT, Brady LJ, Burne RA. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus* mutans in the presence of saliva. *Infect Immun*. 2008;76(9):4259-68.
- [2]. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011;90(3):294-303.
- [3]. Kouidhi B, Al Qurashi YMA, Chaieb K. Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment. *Microb Pathog*. 2015;80:39-49.
- [4]. Saeed S, Tariq P. In vitro antibacterial activity of clove against gram negative bacteria. *Pak J Bot*. 2008;40(5):2157-60.
- [5]. Nuñez L, D'Aquino M. Microbicide activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*). *Braz J Microbiol*. 2012;43:1255-60.
- [6]. Chaieb K, Zmantar T, Ksouri R, Hajlaoui H, Mahdouani K, Abdelly C, et al. Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species. *Mycoses*. 2007;50(5):403-6.
- [7]. Salam R, Sarker BK, Haq MR, Khokon JU. Antimicrobial activity of medicinal plant for oral health and hygiene. *Int J Nat Soc Sci*. 2015;1(2):1-12.
- [8]. Salman BN, Vahabi S, Rad MM. Use of herbs and medicinal plants in dentistry: a review. *J Dent Sch*. 2017;35(2):58-64.
- [9]. Borhan-Mojabi K, Azimi S. Antimicrobial natural products in oral health. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*. 2013;2:932-9.
- [10]. Bouratoua A, Ferhat M, Kabouche A, Laggoune S, Touzani R, Kabouche Z. Comparative compositions of essential oils of *Ferula*. *J Mater Environ Sci*. 2014;5(4):1214-7.
- [11]. Sahebkar A, Iranshahi M. Biological activities of essential oils from the genus *Ferula* (Apiaceae). *Asian Biomed*. 2010;4(6):835-47.
- [12]. Jalali HT, Ebrahimian ZJ, Evtuguin DV, Neto CP. Chemical composition of oleo-gum-resin from *Ferula gummosa*. *Ind Crops Prod*. 2011;33(2):549-53.
- [13]. Hashemi Z, Hojjati M, Tahanejad M. Evaluation of antioxidant activity of essential oil extracted from *Ferula gummosa* Boiss in deep oil frying. *Iran Food Sci Technol Res J*. 2015;11(5):631-42.
- [14]. Eftekhari F, Yousefzadeh M, Borhani K. Antibacterial activity of the essential oil from *Ferula gummosa* seed. *Fitoterapia*. 2004;75(7-8):758-9.
- [15]. Ebrahimzadeh M, Nabavi S, Nabavi S, Dehpour A. Antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Ferula gummosa* Boiss roots. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011;15(6):658-64.
- [16]. Mandegary A, Sayyah M, Heidari MR. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of the seed and root extracts of *Ferula gummosa* Boiss in mice and rats. *DARU J Pharm Sci*. 2004;12(2):58-62.
- [17]. Moosavi SJ, Habibian M, Peeri M, Azarbayjani MA, Nabavi SM, Nabavi SF, et al. Protective effect of *Ferula gummosa* hydroalcoholic extract against nitric oxide deficiency-induced oxidative stress and inflammation in rats renal tissues. *Clinical Exp Hypertens*. 2015;37(2):136-41.
- [18]. Jahansooz F, Ebrahimzadeh H, Najafi AA, Naghavi MR, Kouyakhki ET, Farzaneh H. Composition and antifungal

- activity of the oil of *Ferula gummosa* samples from Iran. *J Essent Oil-Bear Plants*. 2008;11(3):284-91.
- [19]. Sayyah M, Mandgary A, Kamalinejad M. Evaluation of the anticonvulsant activity of the seed acetone extract of *Ferula gummosa* Boiss. against seizures induced by pentylenetetrazole and electroconvulsive shock in mice. *J Ethnopharmacol*. 2002;82(2-3):105-9.
- [20]. Jafari S, Mobasher M, Najafipour S, Ghasemi Y, Mobasher N, Naghizade MM, et al. Evaluation of *Chlorella vulgaris* extract inhibitory effects on growth, proliferation and biofilm formation by streptococcus mutans and evaluation of its toxicity. *J Adv Biomed Sci*. 2015; 5(3):387-96.
- [21]. Rasooli I, Shayegh S, Taghizadeh M, Astaneh SDA. *Rosemarinus officinalis* and *Thymus eriocalyx* essential oils combat in vitro and in vivo dental biofilm formation. *Pharmacogn Mag*. 2008; 4(14):65-72.
- [22]. De Oliveira JR, de Jesus D, Figueira LW, de Oliveira FE, Pacheco Soares C, Camargo SEA, et al. Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Exp Biol Med*. 2017;242(6):625-34.
- [23]. Koo H, Bowen WH. *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*: a potential synergistic alliance to cause virulent tooth decay in children. Taylor & Francis; 2014. p. 1295-7.
- [24]. Martins N, Ferreira IC, Barros L, Silva S, Henriques M. Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. *Mycopathologia*. 2014;177(5):223-40.
- [25]. Paknejad M, Jafarzadeh T, Shamloo A. Comparison of the efficacy of Matrica and % 0.2 chlorhexidine mouthwashes on 3-6 mm pockets in patients with chronic periodontitis. *J Islamic Dent Assoc Iran*. 2006; 18(3): 92-7. [in Persian]
- [26]. Mobarakzadeh H, Hamed J, Haghighat S. Evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and eugenol on planktonic and biofilm-producing viridans group streptococci isolated from dental plaques. *Journal of Mashhad Dental School*. 2018;42(1):75-86.
- [27]. Esfahanian V, Farhad S, Nasirian S, Memarian J. Clinical comparison of anti-plaque efficacy between Iranian and Spanish mouthwashes containing 0.12% Chlorhexidine and 0.05% Sodium Fluoride. *Res Dent Sci*. 2015;12(1):11-5.
- [28]. Nazemi Salman B, Yazdi Nejad A, Haghi F, Mohammadi Gheydari M, Basir Shabestari S. Comparison the effect of *Ferula gummosa* and Chlorhexidine on dental cariogenic bacteria. *J Res Dent Sci*. 2024;21(2):125-132.
- [29]. Farid Afshar F, Saffarian P, Mahmoodzadeh Hosseini H, Sattarian F, Amin M, Imani Fooladi AA. Antimicrobial effects of *Ferula Gummosa* Boiss gum against extended-spectrum β -lactamase producing *Acinetobacter* clinical isolates. *Iran J Microbiol*. 2016;8(4):263-73.
- [30]. Ghasemi M, Govahi M, Rajaei Litkahi H. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of aqueous and hydroalcoholic extracts of *Ferula gummosa* Boiss plant gum: An in vitro study. *J Birjand Univ Med Sci*. 2023; 30(3): 243-56. [Persian].
- [31]. Hashemi Karuie SM, Salehi M, Asghar Heidari M, Mobiny M, Nasrollahi Omran A. Effect of Aqueous and Alcoholic Extracts of Roots of *Ferula Gummosa* Boiss on Growth of Some Bacterial Pathogens. *J Neyshabur Univ Medl Sci*. 2016; 4(3): 10-18.
- [32]. Soleimani N, Ebraze N. Evaluate anti-bacterial effects of cinnamomun verum and *ferula gummosa* essential oil on some pathogen gram positive and negative bacteria. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*. 2016;6(23):87-94.
- [33]. Salehi M, Hashemi Karoi M, Nasrollahi omran A, Mobini M, Asghar Hedari M. Antifungal activity of in vitro aqueous and alcoholic extracts of Barije root (*Ferula gummosa*). *J Birjand Univ Med Sci*. 2014; 21 (4) :444-50.
- [34]. Salehi M, SM HK, Mobini M, Hedari A. Effect of aqueous and alcoholic extracts of roots of *Ferula gummosa* Boiss. on the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gorgan Univ Med Sci*. 2013;15(4):18-22.