



Republic of Iraq  
Ministry of Higher Education  
and Scientific Research  
University of Baghdad  
College of Dentistry



**POTENTIAL EFFECT OF LEMONGRASS OIL**  
**(*Cymbopogon citratus*) AGAINST *Streptococcus mitis***  
**AND *Streptococcus oralis* (PRIMARY**  
**PERIODONTAL COLONIZERS)**  
**(IN VITRO STUDY)**

A Thesis

Submitted to the Council of the College of Dentistry at the University of  
Baghdad, in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master  
of Science in Periodontics

Submitted by

**Hasanain Abdul Razzaq Mohammed**

B.D.S.

Supervised by

**Assist. Prof. Alaa Omran**

B.D.S., M.Sc.

**Prof. Dr. Khalida K. Abbas Al-Kelaby**

PhD/ Microbiology

2022 A.D

1444 A.H

## ABSTRACT

**Introduction:** Periodontal diseases are an infection caused by many factors include different bacterial pattern. Biofilm is the main reason for periodontal disease that consist of many microorganism. *Streptococci* of Mitis group such as *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, are early colonizers within development of dental biofilms. Multi-drug resistance within the treatment of infectious diseases is a growing problem and also the widespread use of broad-spectrum antibiotics had created the antibiotic resistance for several human microorganism. Recently, Lemongrass oil (*Cymbopogon citratus*) have significant attention for medical applications because of their antimicrobial effectiveness. Lemongrass oil were considered as potential agent to control oral bacterial infection because of its optimal antibacterial activity and no cytotoxic effects on human cells. aim of the study it is to investigate antibacterial effect of lemongrass oil against *Streptococcus mitis* and *Streptococcus oralis* .

**Materials and methods:** This study was involved collection of samples from 30 patient from supra gingival area, for the isolation and identification of *S. mitis* and *S. oralis*, biochemical tests were used to identify these *S. mitis* and *S. oralis* strains, followed by the molecular diagnostic technique using real-time PCR. To dissect molecular responses of lemongrass oil, qPCR assay was performed to examine the transcriptional level of biofilm-related genes. The relative fold change in gene expressions of *S. mitis* and *S. oralis* were normalized to housekeeping gene *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* and calculated by the DeltaDeltaCt method (DNA relative quantification system of Livak method).

The relative expression of *S. mitis* and *S. oralis* gene was calculated after treatment with different concentrations of lemongrass oil (selected

concentrations ranging from ( $1.151 \times 10^5, 1.151 \times 10^4, 1.151 \times 10^3, 1.151 \times 10^2, 1.151 \times 10^1$ )  $\mu\text{M}$  with dimethyl sulfoxide the final concentration of dimethyl sulfoxide not exceeding of (0.05%) for all experiments as compared with Chlorhexidine (0.2%)

**Results:** This study showed that from the total of samples investigated, *Streptococcus mitis* positive sample was detected with 2 samples (6.7 %), and *Streptococcus oralis* was detected in one sample (3.3%). Dual existence was detected in 23 samples (76.7 %). *Streptococcus mitis* positive gene detection CT mean  $\pm$ SD was  $14.55 \pm 3.71$ , while *Streptococcus. oralis* gene detection CT mean  $\pm$ SD was  $13.60 \pm 3.36$ . This study also revealed absence of *Streptococcus mitis* positivity or *Streptococcus oralis* in 5 and 6 sample from the total samples investigated respectively.

The results of IC50 calculation in our study presented by  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  values were illustrated that significant down regulation was observed via treatment with the gradual concentration of lemongrass essential oil, and the halve maximal dose of lemongrass oil that cause down regulation of gene expression ratio to the halve (50%) for both *Streptococcus mitis* and *Streptococcus oralis* respectively was  $31.335 \mu\text{M}$  and  $8.145 \mu\text{M}$ . Lemongrass oil treated samples showed remarkable downregulated expression of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus oralis* related genes with dose dependent manner ( $r^2=0.7605$  and  $0.6507$  respectively).

**Conclusion:**

The results of current study showed that the lemon grass oil was effectively inhibited the bacterial proliferation with significant declining in fold expression values ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ) at different concentrations with dose dependency.

## الخلاصة

المقدمة :

أمراض اللثة هي اصابه تسببها عوامل عديدة, تشمل أنماط بكتيرية مختلفة تؤدي الى اصابة الغشاء الحيوي وتعتبر هي السبب الرئيسي وراء امراض اللثة. وتتألف هذه الانماط البكتيرية من العديد من الكائنات الحية الدقيقة.

مثل *Streptococcus mitis*، *Streptococcus oralis* ، وهي مستعمرات تتكون بشكل مبكر في داخل الأغشية الحيوية للأسنان.

يركز علاج أمراض اللثة في المقام الأول على الحد من عدد الكائنات الحية الدقيقة وبالتالي مضادات الميكروبات, ويعتمد هذا العلاج على استخدام العوامل المساعدة للعلاج التقليدي. وتعتبر ظاهرة المقاومة المتعددة من الكائنات الحية الدقيقة البشرية للعلاج التقليدي مشكلة متنامية مع الاستخدام الواسع النطاق للمضادات الحيوية.

في الآونة الأخيرة ، يحظى زيت عشب الليمون (LGO) (*Cymbopogon citratus*) باهتمام كبير للتطبيقات الطبية بسبب فعاليته المضادة للميكروبات. تم اعتبار زيت الليمون كعامل محتمل للسيطرة على الاصابه البكتيرية عن طريق الفم بسبب نشاطه المضاد للبكتيريا الأمثل وعدم وجود آثار سامة للخلايا على الخلايا البشرية

الهدف من الدراسة: الدراسة الحالية عبارة عن دراسة مقطعية تهدف إلى توثيق التأثير المضاد للبكتيريا لزيت عشبة الليمون (*Cymbopogon citratus*) الأساسي (LGO) ضد *Streptococcus mitis* و *Streptococcus oralis*.

طرق العمل : تضمنت هذه الدراسة جمع عينات من 30 حالة من منطقة فوق اللثة لعزل والتعرف على *S. oralis* و *S. mitis* ، واستخدمت الاختبارات الكيميائية الحيوية لتحديد سلالات *S. oralis* و *S. mitis* ، متبوعة بتقنية التشخيص الجزيئي باستخدام تفاعل البوليميريز في الوقت الحقيقي مع مواد أولية محددة لـ *S. oralis* و *S. mitis*.

لتشريح الاستجابات الجزيئية لزيت الليمون ، تم اجراء اختبار qPCR للفحص المستوى النسخي للجينات المرتبطة بالأغشية الحيوية . تم تطبيع التغير النسبي في التعبيرات الجينية ل *S. Oralis* و *S. Mitis* الى جين التدبير المنزلي GAPDH وتم حسابه بواسطة طريقة Delta Delta CT (نظام القياس الكمي النسبي للحمض النووي لطريقة ليفاك).

تم حساب التعبير النسبي لجين *S. Oralis* و *S. Mitis* بعد المعالجة المسبقة بتركيزات مختلفة من زيت عشبة الليمون (تركيزات مختارة تتراوح من 0.1 ، 0.01 ، 0.001 ، 0.0001 و 0.00001 ( % V/V)

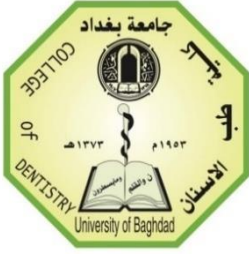
مع DMSO التركيز النهائي ل DMSO لا تزيد عن (0.05%) لجميع التجارب مقارنة بالكلور هيكسيدين (0.2%).

النتائج: ظهرت هذه الدراسة أنه من مجموع العينات التي تم فحصها ، ارتبطت عينة *S. mitis* الموجبة مع عينتين (6.7%). وتم الكشف عن *S. oralis* في حالة واحدة (3.3%). تم الكشف عن وجود مزدوج في 23 حالة (76.7%). كان الكشف عن الجينات المكورات العقدية الإيجابية CT يعني  $\pm 14.55$  SD  $\pm 3.71$  ، بينما كان الكشف عن الجينات العقدية الفموية CT يعني  $\pm 13.60$  SD  $\pm 3.36$ . أظهرت هذه الدراسة أيضًا عدم وجود إيجابية المكورات العقدية أو العقدية الفموية في 5 و 6 حالات من إجمالي العينات التي تم فحصها على التوالي.

وقد اظهرت نتائج حساب IC 50 في دراستنا المقدمة بقيم التعبير الجيني المحسوب بطريقة ليفاك (2<sup>-</sup>).  $\Delta\Delta CT$  ) وجود تنظيم نزولي كبير من خلال معاملة النوعين من البكتيرية المسببة مايتس واورالس بالتركيز التدريجي للزيت العطري لعشبة الليمون وبتأثير يتناسب طرديا مع التركيز المستخدم ( قيم معامل الارتباط تساوي 0.7605 و 0.6507 على التوالي), والجرعة القصوى من زيت عشبة الليمون التي تتسبب في تنظيم تنازلي لنسبة التعبير الجيني. إلى النصف (50%) لكل من *S. Oralis* و *S. mitis* على التوالي كانت 31.335 ميكرومولر و 8.145 ميكرومولر على التوالي.

الاستنتاج:

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن زيت عشبة الليمون الأساسي قد منع بشكل فعال تكاثر البكتيريا مع انخفاض كبير في قيم التعبير الجيني (2<sup>-</sup> $\Delta\Delta CT$ ) بتركيزات مختلفة مع الاعتماد على الجرعة.



جمهورية العراق  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة بغداد  
كلية طب الأسنان



التأثير المحتمل زيت عشب الليمون (*cymbopogon citratus*) ضد  
المكورات العقدية والمكورات العقدية الفموية (المستعمرات الاولية اللثوية)  
(دراسه في المختبر)

رسالة مقدمة الى  
مجلس كلية طب الأسنان/جامعة بغداد  
كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في امراض وجراحة ما حول الاسنان

من قبل  
حسنين عبد الرزاق محمد  
بكالوريوس طب وجراحة الفم والأسنان

بإشراف

ا.د. خالدة كاظم عباس الكلابي  
دكتوراه احياء مجهرية

ا.م. الاء عمران  
ماجستير امراض وجراحة ما حول الاسنان