

Evaluation of the Combination of Different Concentrations of Ethanolic Extracts of Mint (*Menta longifolia*) and Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) on Oral Pathogens

Mostafa Ranaei¹ , Farzane Shakeri² , Mohammad Reza Pourabbas¹ , Mina Baqeri¹ ,
Parastoo Zarghami Moghaddam^{2*} 

¹ 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

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: Dec. 04, 2023

Received in Revised Form:

Apr. 15, 2024

Accepted: Apr. 27, 2024

Published Online: Oct. 06, 2024

* Correspondence to:

Parastoo Zarghami Moghaddam
Natural Products and Medicinal
Plants Research Center, North
Khorasan University of Medical
Sciences, Bojnurd, Iran

Email:

parastoozarghami@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction: The present study aimed to investigate the antimicrobial effect of the ethanolic extracts of mint and licorice on *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. If the antibacterial and antifungal effects of these plants are observed, they can be introduced as effective plants against oral biofilm microorganisms to replace commercial drugs. They can also be considered cost-effective and innovative solutions to deal with caries.

Materials & Methods: Two medicinal plants, mint and licorice, were extracted using ethanol as a solvent following their collection and drying. The antibacterial and antifungal properties of these extracts were evaluated using disc diffusion, well diffusion, and biofilm formation measurement methods on a total of 162 samples. In addition, the Kruskal-Wallis test was employed for statistical analysis, with data processed using SPSS (version 22). A significance level of 5% was maintained across all tests.

Results: The analysis of the results in the disc and well diffusion indicated that the concentration of 100 mg/ml of licorice showed the strongest antibacterial effect among different concentrations, and *Streptococcus mutans* was more susceptible than *Candida albicans*. Moreover, the results of measuring the amount of biofilm formation demonstrated that the concentration of 100 mg/ml of licorice had the most substantial effect in inhibiting the biofilm of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*.

Conclusion: Among the examined samples, a concentration of 100 mg/ml of licorice exhibited an antibacterial effect comparable to that of commercial chlorhexidine mouthwash. This finding suggests the potential for further research into the development of an herbal mouthwash based on this extract.

Keywords: Antibacterial effect, *Menta longifolia*, Licorice, *Glycyrrhiza glabra* L., Oral pathogen

How to cite this paper: Ranaei M, Shakeri F, Pourabbas MR, Baqeri M, Zarghami Moghaddam P. Evaluation of the Combination of Different Concentrations of Ethanolic Extracts of Mint (*Menta longifolia*) and Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) on Oral Pathogens. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2024;32(4):87-98.

بررسی آزمایشگاهی ترکیب غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاهان دارویی پونه و شیرین بیان روی پاتوژن‌های دهانی

مصطفی رعنائی^۱، فرزانه شاکری^۲، محمدرضا پورعباس^۱، مینا باقری^۱، پرستو ضرغامی مقدم^{۲*}

^۱ دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

^۲ مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۱۳

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۱/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۰۸

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۷/۱۵

نویسنده مسئول:

پرستو ضرغامی مقدم

مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

Email:

parastoozarghami@yahoo.com

مقدمه: در این تحقیق، بررسی تأثیر ضد میکروبی عصاره اتانولی پونه و ریشه شیرین بیان (در غلظت‌های مختلف) بر قارچ *Candida albicans* و باکتری *Streptococcus* موتانس هدف قرار داده شده است تا در صورت مشاهده اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی این گیاهان، بتوان به عنوان گیاهانی مؤثر بر میکروارگانیسم‌های بیوفیلم دهانی برای جایگزینی با داروهای تجاری موجود در بازار معرفی کرد و به عنوان راهکاری به صرفه و نوین برای مقابله با پوسیدگی تلقی نمود.

مواد و روش‌ها: دو گیاه دارویی پونه و شیرین بیان در مطالعه آزمایشگاهی پس از جمع آوری و خشک کردن، توسط حلال اتانول عصاره گیری شدند. بررسی خاصیت ضدباکتریایی و ضدقارچی به روش‌های انتشار دیسک، چاهک پلیت و سنجش میزان تشکیل بیوفیلم روی ۱۶۲ نمونه انجام گردید. برای تجزیه و تحلیل آماری از آزمون کروسکال والیس استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در نرم‌افزار SPSS vol.22 صورت گرفت. در همه آزمون‌ها سطح معناداری ۵ درصد در نظر گرفته شد.

یافته‌های پژوهش: تجزیه و تحلیل نتایج در روش انتشار از دیسک و چاهک پلیت نشان داد که غلظت 100 mg/ml شیرین بیان قوی‌ترین اثر ضدباکتریایی را در میان غلظت‌های مختلف از خود نشان می‌دهد و باکتری *Streptococcus* موتانس حساس‌تر از قارچ *Candida albicans* است. نتایج سنجش میزان تشکیل بیوفیلم نیز نشان داد که غلظت 100 mg/ml شیرین بیان قوی‌ترین اثر را در مهار بیوفیلم باکتری *Streptococcus* موتانس و قارچ *Candida albicans* دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: در این مطالعه، از میان نمونه‌های بررسی شده، غلظت 100 mg/ml گیاه شیرین بیان اثر ضدباکتریایی مشابه در مقایسه با دهان‌شویه کلرهگزیدین تجاری دارد؛ اما تفاوت فراوانی با آنتی‌بیوتیک آزمایش شده داشت و می‌تواند در تحقیقات آتی برای ساخت دهان‌شویه گیاهی بررسی گردد.

واژه‌های کلیدی: اثر ضدباکتریایی، پونه، شیرین بیان، پاتوژن دهان

استاد: رعنائی مصطفی، شاکری فرزانه، پورعباس محمدرضا، باقری مینا، ضرغامی مقدم پرستو. بررسی آزمایشگاهی ترکیب غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاهان دارویی پونه و شیرین بیان روی پاتوژن‌های دهانی. *مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام*، مهر ۱۴۰۳؛ ۲۲(۴): ۸۷-۹۸

امروزه پوسیدگی دندان ها و پلاک های دندانی از شایع ترین بیماری ها در سراسر جهان هستند که توسط ترکیبی از میکروارگانیسم ها و توده های غذایی ایجاد می شوند (۱). اگر این پلاک های دندانی به طور منظم از سطح دندان ها پاک نشوند، باکتری های پاتوژن موجود در آن ها بالغ می گردند و باعث ایجاد پوسیدگی های دندانی، ژینوزیت و پریودنیت می شوند (۲). باکتری های تولیدکننده اسید مانند *استرپتوکوکوس موتانس* روی سطح دندان کلونیزه می گردند و در صورت وجود کربوهیدرات های قابل تخمیر مانند گلوکز و فروکتوز، باعث آسیب به ساختار سخت دندان می شوند (۱). علل باکتریایی پوسیدگی دندان ها همچنین می توانند به سایر قسمت های بدن نیز منتقل گردند و باعث ایجاد بیماری های سیستمیک نظیر بیماری شریان های کرونری شوند (۳). *کاندیدا آلیکنس* نیز می تواند با ترشح پروتئاز آسپارتیک به سطح دندان متصل گردد و با تخمیر قندهای شیرین، اسید تولید کند و به این ترتیب، شرایط برای دمنیرالیزاسیون دندان فراهم می شود و پوسیدگی دندانی ایجاد می گردد (۴). سالیان سال است که کلرگزیدین به عنوان یک ترکیب آنتی پلاک و ضد میکروبی قوی در دندان پزشکی در طیف گسترده ای از اختلالات استفاده می شود. کلرگزیدین نه تنها روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی مؤثر است، بلکه تأثیر آن بر قارچ ها و برخی ویروس های لیپوفیلیک نیز به اثبات رسیده است. علاوه بر آثار ضدباکتریایی فوری، کلرگزیدین به مخاط دهان متصل می شود و به آرامی آزاد می گردد و باعث طولانی تر شدن اثر ضدباکتریایی می شود (۵). با وجود این، استفاده از کلرگزیدین معایبی نظیر مؤثر نبودن بر روی باسیل های مقاوم به اسید و الکل، طعم نامطلوب و رنگ پذیری دندان ها در اثر استفاده طولانی مدت دارد (۶)؛ به همین علت، چندین مورد از دهان شویه ها و عصاره های گیاهی در جست و جوی یک ماده کمی مناسب به عنوان جایگزین کلرگزیدین و برای امکان استفاده طولانی مدت، آزمایش و بررسی شدند. به علت افزایش بیماری های عفونی و مقاومتی که میکروارگانیسم های بیماری زا نسبت به داروهای

شیمیایی به مرور زمان از خود نشان داده اند و از سوی دیگر، با توجه به عوارض جانبی و هزینه های درمانی بالایی که داروهای شیمیایی و سنتزی بر جوامع بشری تحمیل می کنند، در دهه های اخیر استفاده از گیاهان دارویی با منشأ طبیعی رواج یافته است (۷). با وجود تنوع و گسترش بسیار فراوانی که گیاهان دارویی در ایران و سایر کشورهای جهان دارند، مطالعات فراوانی درباره بررسی آثار آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی این گیاهان همچنان ادامه دارد (۸). گیاه دارویی پونه با نام علمی *Mentha pulegiu* از خانواده نعنائیان است. به آن پونه، فودنه، پودنه، فودنج یا فود هم گفته می شود. عطرمایه آن در صنعت به کار می رود و ماده سمی پولگون دارد. فرهنگستان زبان فارسی این گیاه را «خالواش» (از گیاهان محلی و عطر گیلان) و «نعا خالواش» نامیده است (۹). پونه جزو داروهای استفاده شده در طب سنتی به طور استشفای، در درمان سردرد و لوزه ها است (۱۰). شیرین بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra L* و از خانواده باقلائیان (Fabaceae)، در بیشتر نقاط ایران به ویژه در شهرستان اقلید و نواحی شرقی و شمال شرقی و همچنین آذربایجان به فراوانی می روید. بخش مورد استفاده شیرین بیان ساقه های زیرزمینی و ریشه های گیاه است که ترکیبات مختلفی دارد. در طب سنتی، از این گیاه برای درمان اسپاسم عضلات، تورم، برونشیت، روماتیسم و ورم مفاصل استفاده می شود. امروزه نیز عصاره شیرین بیان یکی از اجزای ترکیبی شربت سرفه به شمار می رود. شکل طبیعی این ماده در درمان زخم های دهان و دستگاه گوارشی مفید است. شیرین بیان همچنین مدر (ادرار آور) و ملین است و می توان از آن به عنوان عامل ضد ویروس موضعی برای زخم و التهاب زونای چشم، دهان و دستگاه تناسلی استفاده کرد. مهم ترین خاصیت شیرین بیان تأثیر بر دستگاه گوارش است. این گیاه درمان کننده ورم و زخم معده و اثنی عشر است و بر سرطان معده تأثیر مطلوب دارد؛ همچنین برای درمان سوء هاضمه و از بین بردن نفخ شکم مفید است (۱۱، ۱۰). نتایج لطیفیان و همکاران نشان داد، قارچ *Beauveria bassiana* در محیط های حاوی عصاره درمنه و چریش توانایی رشد میسلومی و جوانه زنی اسپور دارد و هر دو عصاره آثار

سینرژیستی در رشد قارچ مطالعه شده و در نتیجه، بر روی هر دو مرحله رشدی حشره کامل و لارو در شرایط تغذیه از خرما داشتند (۱۲). نتایج تحقیق غلامی و همکاران نشان داد که افزودن عطرمایه گیاه پونه ماکویی به مخلوط خمیر سوسیس آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* سبب مهار رشد باکتری و کاهش تراکم آن تا ۱۵ روز نگهداری در شرایط یخچال می گردد (۱۳). نتایج آزمون میکروبی کرمی و همکاران نشان داد که استفاده از عصاره ریشه شیرین بیان در نوشابه پرتقالی باعث ماندگاری نوشابه طی ۹۰ روز می شود (۱۴). یافته های مطالعه کرمانشاه و همکاران نشان داد، هر دو عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی مریم گلی و پونه اثر بازدارندگی رشد بر روی هر سه گونه باکتری پاتوژن دهانی *استرپتوکوکوس موتانس*، *لاکتوباسیلوس رامنوزوس* و *اکتینومایسس ویسکوزوس* داشتند (۱۵). در تحقیق شیرازی و همکاران با موضوع ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی عصاره شیرین بیان بر رشد *سالمونلا*، *شیگلا* و *اشریشیا کلی* نیز، اثر ضدباکتریایی عصاره شیرین بیان بر روی *سالمونلا تیفی*، *سالمونلا پاراتیفی B*، *شیگلا سونئی*، *شیگلا فلکسنری* و *اشریشیا کلی* گزارش شد (۱۶). نوری زاده و همکاران اعلام کردند که از میان عصاره های نعنا، شیرین بیان، پونه، بابونه و آویشن، اثر ضدباکتریایی عصاره نعنا بیشترین اثر ضد هلیکوباکتر پیلوری را داشت (میانگین قطر هاله عدم رشد: ۱۴ میلی متر) (۱۷).

با توجه به اینکه تاکنون اثر ضد میکروبی دو گیاه دارویی پونه و شیرین بیان به صورت ترکیبی مطالعه نشده بود، در این تحقیق اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی این دو گیاه (در غلظت های مختلف) بر روی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* و باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* بررسی گردید تا در صورت مشاهده اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی این گیاهان، بتوان به عنوان گیاهانی مؤثر بر میکروارگانیسم های بیوفیلم دهانی برای جایگزینی با داروهای تجاری موجود در بازار معرفی کرد و به عنوان راهکاری به صرفه و نوین برای مقابله با پوسیدگی تلقی شود.

مواد و روش ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، میزان اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی و توانایی ممانعت از تشکیل بیوفیلم شیرین بیان، عصاره اتانولی اندام هوایی گیاه دارویی پونه و غلظت های مختلف ترکیب شیرین بیان و عصاره اتانولی اندام هوایی گیاه دارویی پونه (۸۰-۲۰، ۶۰-۴۰، ۵۰-۵۰، ۴۰-۶۰، ۵۰-۴۰، ۶۰-۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر) با استفاده از روش انتشار دیسک، چاهک پلیت و میکروتیتر پلیت و رنگ سنجی با استفاده از کریستال ویوله بررسی شد؛ همچنین هر مرحله از آزمایش، به منظور کاهش خطا، سه مرتبه تکرار و میانگین این سه مرتبه به عنوان نتیجه نهایی اعلام گردید؛ بنابراین، با در نظر گرفتن حاصل ضرب تعداد نمونه ها (۷ غلظت گیاه، کنترل مثبت و منفی)، تست های آزمایش شده (دیسک، چاهک و بیوفیلم)، میکروارگانیسم های مطالعه شده (باکتری و قارچ) و تکرار آن ها (۳ بار تکرار)، مطالعه روی ۱۶۲ مورد برآورد شد (۱۸). (IR.NKUMS.BLC.1401.004).

مراحل تحقیق؛ عصاره گیری:

گیاهان پونه و شیرین بیان پس از جمع آوری و خشک کردن در سایه در مجاورت هوا، پودر گردید و عصاره گیری به روش خیساندن توسط حلال اتانول (ماسراسیون) به مدت ۴۸ ساعت انجام شد و با استفاده از تبخیرکننده چرخان (روتاری-هایدولف آلمان) تغلیظ و پودر عصاره حاصل گردید. پودر عصاره حاصله تا زمان آزمایش در یخچال ($+4^{\circ}\text{C}$) نگهداری شد.

روش چاهک پلیت:

آثار ضدباکتری و ضدقارچی ترکیب عصاره های گیاهی پونه و شیرین بیان در غلظت های مختلف به روش چاهک پلیت صورت گرفت. در این روش، از پلیت های حاوی محیط کشت مربوطه (سویین کازئین آگار) استفاده گردید که آغشته به میکروارگانیسم (*Streptococcus mutans* و *Candida albicans*) بودند. توسط یک پیپت پاستور استریل که مخصوص ایجاد چاهک است، یک حفره در محیط کشت ایجاد گردید و داخل هر چاهک ۵۰ لانداز عصاره های خالص و ترکیبی (۸۰-۲۰، ۶۰-۴۰، ۵۰-۵۰، ۴۰-۶۰، ۵۰-۴۰، ۶۰-۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به طور جداگانه ریخته شد؛ سپس پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند.

همه چاهک‌ها سه بار با سرم فیزیولوژی استریل شستشو گردید و در مرحله بعد، ۲۰۰ میکرولیتر اتانول افزوده شد. به منظور رنگ‌آمیزی، از ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد استفاده گردید؛ سپس به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر استیک اسید ۳۳ درصد اضافه و چند بار با سمپلر به خوبی هم زده شد تا رنگ‌های متصل به چاهک که بیانگر میزان تشکیل بیوفيلم است، به خوبی حل گردد. پس از یکنواخت شدن محلول هر چاهک، میزان جذب در ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا خوانده شد (۱۸).

تجزیه و تحلیل آماری:

اطلاعات این مطالعه کاربردی از طریق رسم نمودار انجام گردید؛ همچنین به منظور مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم در گروه‌های پژوهش، به علت برقرار نبودن فرض نرمال بودن، از آزمون ناپارامتری کروسکال والیس استفاده شد. در همه آزمون‌ها سطح معناداری ۵ درصد در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در نرم افزار SPSS vol.22 انجام گردید.

یافته‌های پژوهش

در این مطالعه، اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی غلظت‌های عصاره اتانولی گیاهان دارویی پونه و شیرین بیان با استفاده از دو روش انتشار دیسک و چاهک پلیت بررسی شد؛ همچنین اثر ممانعت از تشکیل بیوفيلم نیز بررسی و به منظور به دست آمدن نتایج دقیق‌تر، آزمایش‌ها سه مرتبه تکرار گردید.

نتایج آزمون کروسکال والیس به منظور ارزیابی اثر ضدباکتریایی غلظت‌های عصاره اتانولی گیاهان دارویی پونه و شیرین بیان و آنتی‌بیوتیک سیروفلوکساسین در روش انتشار دیسک نشان داد، تفاوت آماری معنی‌داری میان غلظت‌های مختلف ترکیب با یکدیگر و با آنتی‌بیوتیک وجود دارد ($P \leq 0.05$). طبق نتایج به دست آمده که در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است، آنتی‌بیوتیک سیروفلوکساسین و غلظت ۱۰۰ درصد شیرین بیان بیشترین تأثیر ضدباکتریایی علیه باکتری/سترپتوکوکوس موتانس و غلظت ۱۰۰ درصد پونه کمترین تأثیر ضدباکتریایی را علیه این باکتری دارد؛ همچنین در مقایسه غلظت‌های مختلف پونه و شیرین بیان با گروه‌های

پس از آن، میزان مناطق مهارتی ارزیابی و بر اساس میلی‌متر محاسبه گردید. چاهک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک سیروفلوکساسین و نیستاتین به عنوان کنترل مثبت و مایع دی‌متیل سولفو کساید به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند (۱۸).

روش انتشار از دیسک:

آزمایش آنتی‌بیوگرام به روش Agar Disc Diffusion به این صورت است که دیسک بلانک آغشته به عصاره‌های خالص و ترکیبی دو گیاه پونه و شیرین بیان با غلظت‌های مختلف (۸۰-۲۰، ۶۰-۴۰، ۵۰-۵۰، ۴۰-۶۰، ۵۰-۴۰، ۸۰-۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به میزان ۵۰ لاند و دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک سیروفلوکساسین و نیستاتین به عنوان کنترل مثبت و دیسک حاوی دی‌متیل سولفو کساید به عنوان کنترل منفی، به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت تا خشک شود؛ سپس بر روی محیط کشت مناسب که پیش‌تر توسط تلقیح میکروبی آغشته گردیده بود، در فواصل مناسب قرار داده شد؛ سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. در ادامه، اثر ترکیب حاوی عصاره‌های مختلف دو گیاه با دیسک آنتی‌بیوتیک مقایسه گردید (۱۸).

ممانعت از تشکیل بیوفيلم:

بررسی تأثیر عصاره با غلظت‌های مختلف اندام هوایی گیاه دارویی پونه و شیرین بیان بر روی تشکیل بیوفيلم، به منظور اندازه‌گیری میزان اثر ضد بیوفيلم، با روش میکروتیتر پلیت و رنگ‌سنجی با کریستال ویوله انجام شد. روش اندازه‌گیری میزان تأثیر ضد بیوفيلمی عصاره دو گیاه با غلظت‌های مختلف به این صورت است که ابتدا ۱۵۰ میکرولیتر از محیط کشت سویین کازئین براث اختصاصی داخل چاهک‌های میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه ریخته و چاهک اول محیط کشت بدون عصاره به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. در چاهک‌های بعدی ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف به دست آمده به محیط کشت اضافه گردید. یک چاهک هم به عنوان شاهد منفی بدون عصاره و باکتری/قارچ در نظر گرفته شد. ۲۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون نیم مک‌فارلند (۱۰۸±۱.۵) به همه چاهک‌ها (به جز شاهد منفی) اضافه گردید و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شد.

میان سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد.

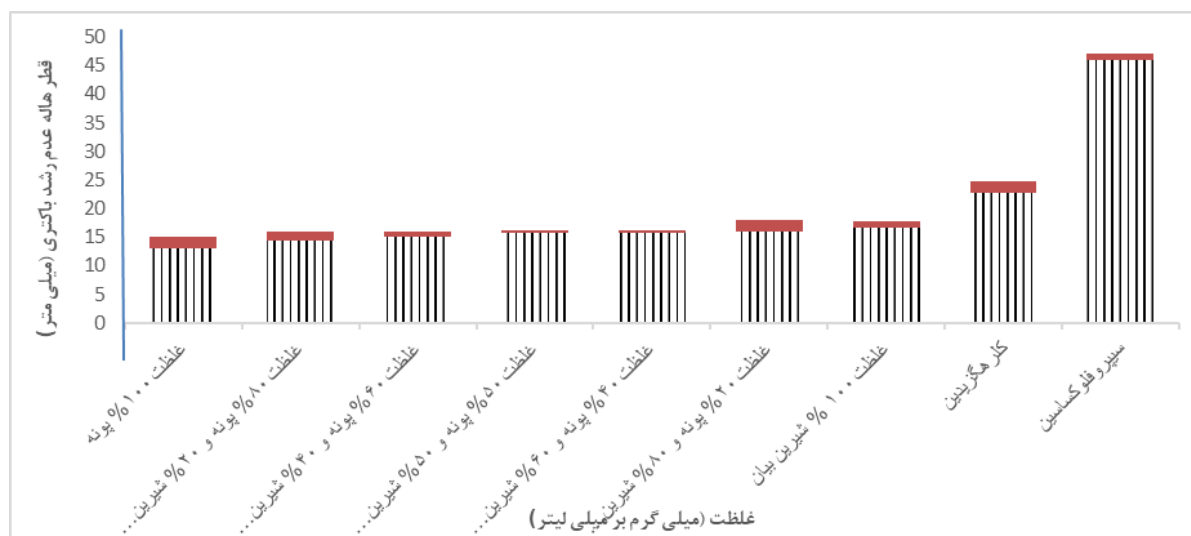
کنترل مشاهده شد که تنها میان غلظت ۱۰۰ پونه با سیپروفلوکساسین اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P=0.002$) و



نمودار شماره ۱. اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاهان دارویی پونه و شیرین بیان بر قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس با روش انتشار دیسک

استرپتوکوکوس موتانس داشت و غلظت ۱۰۰ درصد پونه کمترین تأثیر ضدباکتریایی را علیه این باکتری از خود نشان داد. در مقایسه غلظت‌های مختلف پونه و شیرین بیان با گروه‌های کنترل مشاهده گردید که تنها میان غلظت ۱۰۰ و ۸۰ پونه با سیپروفلوکساسین و ۱۰۰ پونه با کلر هگزیدین اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P<0.007$) و میان سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌دار دیده نشد.

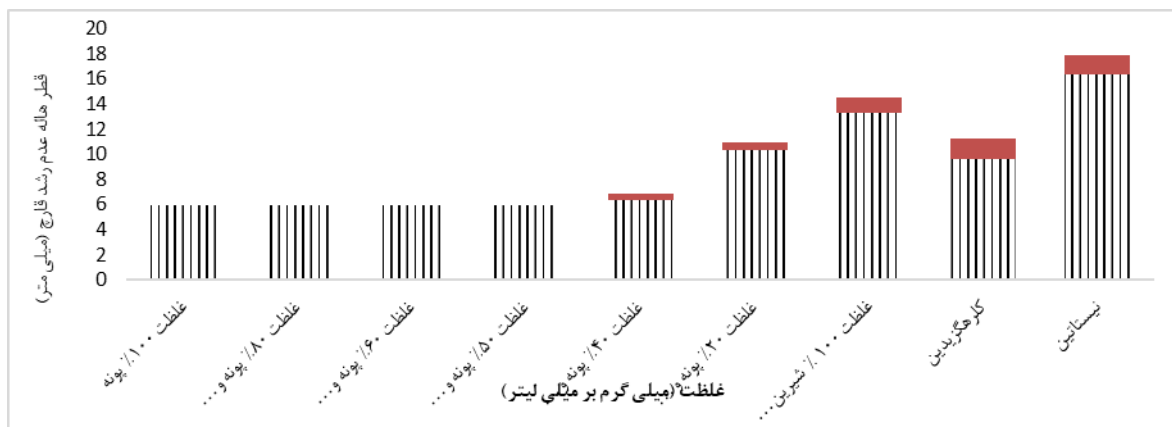
بر اساس نتایج نمودار شماره ۲، بررسی اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف پونه و شیرین بیان با دهان‌شویه کلر هگزیدین و آنتی‌بیوتیک در روش چاهک پلیت نشان داد، تفاوت آماری معنی‌داری میان غلظت‌های مختلف ترکیب با یکدیگر و با آنتی‌بیوتیک وجود دارد ($P\leq 0.05$). آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و غلظت ۱۰۰ درصد شیرین بیان بیشترین تأثیر ضدباکتریایی را علیه باکتری



نمودار شماره ۲. اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاهان دارویی پونه و شیرین بیان بر قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس با روش چاهک پلیت

همچنین غلظت ۵۰ و ۲۰ شیرین بیان و ۱۰۰ و ۶۰ پونه کمترین تأثیر ضدقارچی را علیه این قارچ دارند. در مقایسه غلظت های مختلف پونه و شیرین بیان با گروه های کنترل مشاهده گردید که تنها میان غلظت ۱۰۰، ۸۰، ۶۰ و ۵۰ پونه با نیستاتین اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < 0.007$) و میان سایر غلظت ها تفاوت معنی داری دیده نشد.

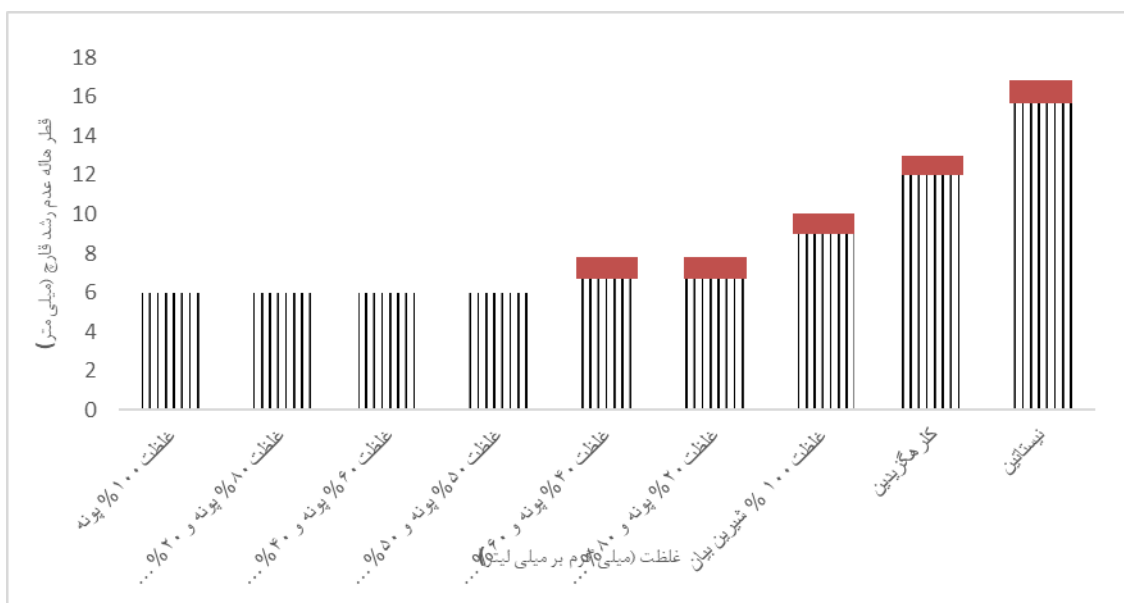
بر اساس نمودار شماره ۳، نتایج اثر ضدقارچی غلظت های عصاره اتانولی گیاهان دارویی پونه و شیرین بیان و آنتی بیوتیک نیستاتین در روش انتشار دیسک نشان داد، تفاوت آماری معنی داری میان غلظت های مختلف ترکیب با یکدیگر و با آنتی بیوتیک وجود دارد ($P \leq 0.05$). این آزمون نشان داد، آنتی بیوتیک نیستاتین و غلظت ۱۰۰ درصد شیرین بیان بیشترین تأثیر ضدقارچی را علیه قارچ *کاندیدا آلبیکنس* دارند؛



نمودار شماره ۳. اثر ضدقارچی غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاهان دارویی پونه و شیرین بیان بر قطر هاله عدم رشد قارچ *کاندیدا آلبیکنس* با روش انتشار دیسک

همچنین غلظت ۵۰ درصد و ۲۰ درصد شیرین بیان و غلظت ۱۰۰ درصد و ۶۰ درصد پونه کمترین تأثیر ضدقارچی را علیه این قارچ دارند. در مقایسه غلظت های مختلف پونه و شیرین بیان با گروه های کنترل مشاهده گردید که تنها میان غلظت ۱۰۰، ۸۰، ۶۰ و ۵۰ پونه با نیستاتین اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < 0.007$) و میان سایر غلظت ها تفاوت معنی داری دیده نشد.

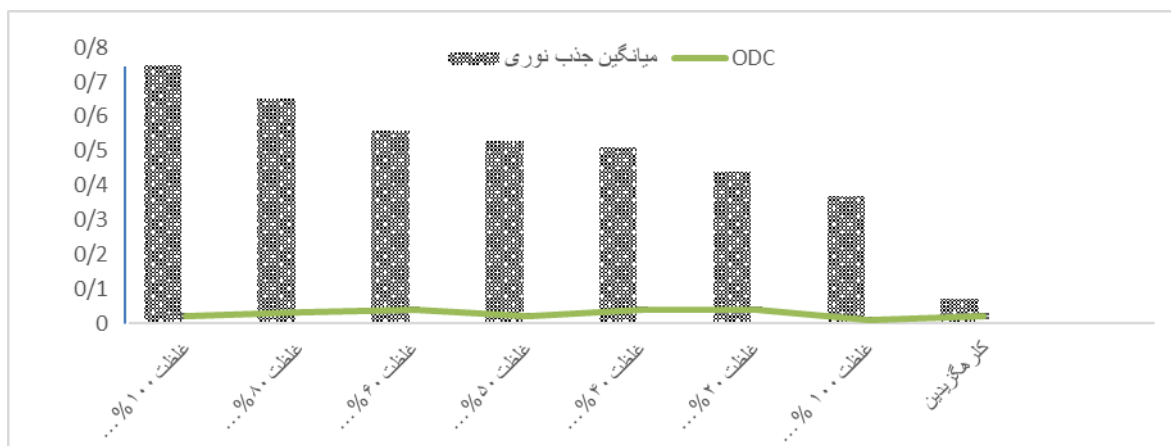
بر اساس نتایج نمودار شماره ۴، در بررسی اثر ضدقارچی غلظت های عصاره اتانولی گیاهان دارویی پونه و شیرین بیان و آنتی بیوتیک نیستاتین به روش چاهک پلیت نیز، تفاوت آماری معنی داری میان غلظت های مختلف ترکیب با یکدیگر و با آنتی بیوتیک وجود دارد ($P \leq 0.05$). آنتی بیوتیک نیستاتین و غلظت ۱۰۰ درصد شیرین بیان بیشترین تأثیر ضدقارچی را علیه قارچ *کاندیدا آلبیکنس* دارند؛ اما در مقایسه با کلرگزیدین، تأثیر ضدقارچی شیرین بیان کمتر است؛



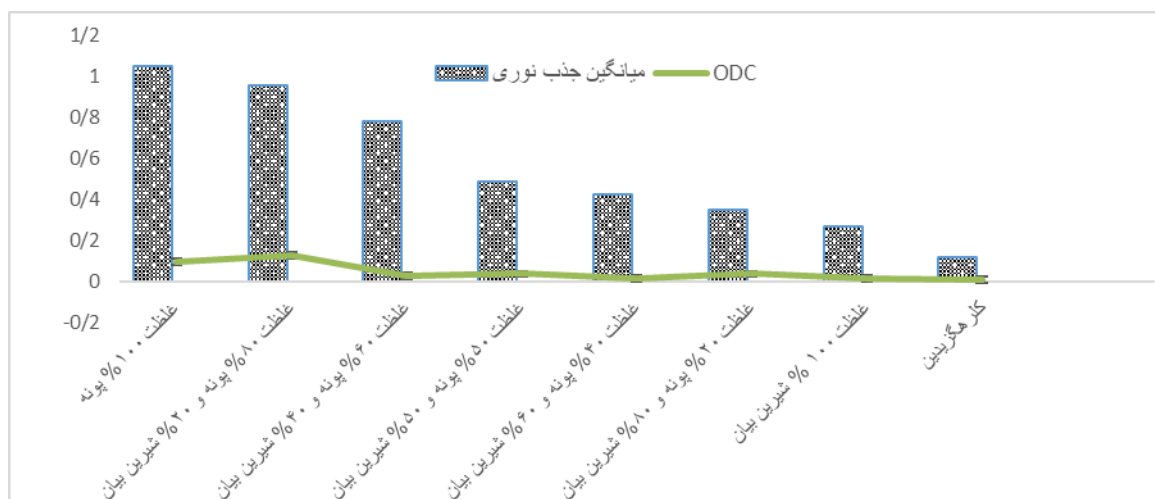
نمودار شماره ۴. اثر ضد قارچی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاهان دارویی پونه و شیرین بیان بر قطر هاله عدم رشد قارچ کاندیدا آلیکس با روش چاهک پلیت

کاندیدا آلیکس و استرپتوکوکوس موتانس جلوگیری کردند و در میان غلظت‌های مختلف، بیشترین اثر مهاري بیوفيلم مربوط به ۱۰۰ درصد شیرین بیان بود که کمترین میزان جذب (کمترین رشد باکتری/قارچ) را به خود اختصاص داده است. هرچه میزان جذب بر حسب نانومتر کمتر باشد، اثر مهاري بهتری خواهیم داشت.

بررسی آماری توسط آزمون کروسکال والیس نشان داد، تفاوت معنی‌داری میان غلظت‌های مختلف پونه و شیرین بیان با دهان‌شویه و آنتی‌بیوتیک بر اثر ممانعت از تشکیل بیوفيلم قارچ کاندیدا آلیکس و استرپتوکوکوس موتانس وجود دارد ($P < 0.05$). با توجه به نتایج نمودارهای شماره ۵ و ۶، دهان‌شویه کلر هگزیدین و آنتی‌بیوتیک‌ها از تشکیل بیوفيلم



نمودار شماره ۵. توزیع اثر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاهان دارویی پونه و شیرین بیان بر جذب نوری کاندیدا آلیکس با روش بیوفيلم



نمودار شماره ۶. توزیع اثر غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاهان دارویی پونه و شیرین بیان بر جذب نوری استرپتوکوکوس موتانس با روش بیوفيلم.

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره اتانولی دو گیاه پونه و شیرین بیان به صورت ترکیبی بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس و باکتری استرپتوکوکوس موتانس بررسی شد. نتایج مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان در ممانعت از رشد استرپتوکوکوس موتانس مؤثر است؛ اما نسبت به کلر هگزیدین، تأثیر آن کمتر ثبت شد و عصاره اتانولی پونه کمترین اثر مهاری را بر رشد این باکتری داشت. غلظت ۱۰۰ درصد شیرین بیان بیشترین اثر در ممانعت از رشد قارچ کاندیدا آلبیکنس را نشان داد؛ اما عصاره اتانولی پونه تأثیر چشمگیری نداشت و کلر هگزیدین بیشتر تأثیر بر ممانعت از رشد کاندیدا آلبیکنس را داشت؛ بنابراین، بسته به نوع حلال عصاره گیری، میزان مواد مؤثره استخراج شده با عملکرد ضد میکروبی از گیاهان دارویی متفاوت است؛ همچنین در مطالعات دیگر بیان شده است که شرایط اقلیمی و جغرافیایی بر روی مقدار گلاسیریزیک اسید در ریشه شیرین بیان مؤثر است که به تفاوت هایی در میزان فعالیت ضد میکروبی گیاه منجر می شود (۱۹). در مطالعه حاضر، در همه غلظت ها اثر مهاری بر روی رشد باکتری ها مشاهده گردید؛ اما در همه گروه ها اثر مهاری آنتی بیوتیک از غلظت های عصاره های گیاهی بیشتر ثبت شد. صدیقی نیا و همکارانش نیز به بررسی تأثیر عصاره ریشه شیرین بیان روی میکروارگانیسم های دهان پرداختند که بر اساس این مطالعه،

عصاره ریشه شیرین بیان کاندید مناسبی برای کمک به کنترل پوسیدگی دندان و عفونت اندودنتیک به شمار می آید که تأییدی بر نتایج مطالعه حاضر است (۲۰). نتایج مطالعه جیتا و همکاران نشان داد که عصاره ریشه شیرین بیان اثر ضدباکتریایی علیه گونه استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس سانگونیس، استرپتوکوکوس سالیاریوس، استرپتوکوکوس میتیس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دارد که در تحقیق حاضر نیز بالاترین اثر ضدباکتریایی این گیاه بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس ثبت شد (۲۱). نتیجه مطالعه حاضر با نتایج مطالعات صدیقی نیا (۲۰)، جیتا (۱۶) و لینگواراج (۲۲) در مشاهده اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی گیاهان مطالعه شده هم خوانی دارد و نتایج مطالعات اتسونومیا (۲۳) و اربابی (۲۴) با نتایج این مطالعه بر روی استرپتوکوکوس موتانس و کاندیدا آلبیکنس همسو است. اتسونومیا و همکاران در مطالعه خود نشان دادند، استفاده از ترکیبات شیرین بیان سبب افزایش میزان بقای موش های دچار ضعف ایمنی در مقابل عفونت کاندیدا آلبیکنس شده است (۲۳). عزیزی تبریززاد و همکاران به شناسایی ترکیبات شیمیایی عطرمایه های پونه، نعنا و آویشن و بررسی فعالیت ضد میکروبی آنها بر تعدادی از باکتری های گرم منفی و گرم مثبت در روش انتشار دیسک پرداختند. نتایج پژوهش آنان نشان داد، باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی حساسیت بیشتری به عطرمایه های مطالعه شده دارد و عصاره

آویشن از عصاره گیاه پونه تأثیر بیشتری برای از بین بردن پاتوژن‌های دهانی نشان می‌دهد؛ بنابراین می‌توان از عصاره آویشن در مطالعات بعدی در کنار عصاره پونه به‌منظور هم‌افزایی بیشتر استفاده کرد (۲۵) در مطالعه حاضر نیز، اثر ضدباکتریایی گیاه پونه بر روی باکتری گرم مثبت *استرپتوکوکوس موتانس* ثبت شد. در مطالعه شریعتی‌فر و همکاران، اثر ضدباکتریایی عصاره‌های آبی زیتون، تاجریزی سیاه، کلپوره، درمنه و شیرین‌بیان بر برخی باکتری‌های بیماری‌زای منتقله از غذا بررسی گردید و نتایج نشان داد که اثر بازدارندگی و کشندگی عصاره آبی میوه تاجریزی سیاه بیشتر از سایر عصاره‌های آبی بود و از سوئی، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس‌ترین باکتری و *سالمونلا تیفی* موریوم مقاوم‌ترین باکتری نسبت به عصاره‌های آبی شناخته شدند (۲۶). نتایج این مطالعه نیز با نتایج مطالعه ما همسو بود و نشان داد که عصاره گیاه شیرین‌بیان خواص ضد باکتری دارد و می‌تواند شیوع و رشد پاتوژن‌ها رو به طرز چشمگیری کاهش دهد. آزموده و همکاران در سال ۲۰۱۷، به بررسی آزمایشگاهی تأثیر عصاره آبی ریشه شیرین‌بیان بر باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* پرداختند. در مقایسه این مطالعه با مطالعه حاضر، خواص ضد میکروبی گیاه شیرین‌بیان اثبات شده است. در این مطالعه نیز مشخص شد، گیاه شیرین‌بیان به‌صورت مؤثری بر روی باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* اثر دارد؛ به همین علت استفاده از آن در ترکیب دهان‌شویه‌ها توصیه می‌شود (۲۷). برجیان و همکاران در سال ۲۰۱۶، به بررسی آثار ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی آلوئه‌ورا و شیرین‌بیان بر باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان در شرایط آزمایشگاهی پرداختند. وجه اشتراک این مطالعه با مطالعه حاضر، استفاده از عصاره شیرین‌بیان بر روی پاتوژن‌های دهانی به‌ویژه *استرپتوکوکوس موتانس* بود. نتایج آنان نشان داد که عصاره آلوئه‌ورا از عصاره گیاه شیرین‌بیان تأثیر بیشتری برای از بین بردن پاتوژن‌های دهانی نشان می‌دهد؛ بنابراین می‌توان از عصاره آلوئه‌ورا در مطالعات بعدی در کنار عصاره شیرین‌بیان برای افزایش اثر هم‌افزایی استفاده کرد (۲۸).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره اتانولی شیرین‌بیان (غلظت ۱۰۰ درصد) بیشترین اثر ضدباکتریایی علیه *استرپتوکوکوس موتانس* و *کاندیدا آلبیکنس* را در روش‌های انتشار از دیسک و روش چاهک پلیت دارد که در مقایسه با کلر هگزیدین، کمتر است. عصاره اتانولی گیاه پونه تأثیر اندکی بر رشد باکتریایی علیه *استرپتوکوکوس موتانس* داشت و همین‌طور آثار ضدقارچی علیه *کاندیدا آلبیکنس* ندارد. آثار ضدباکتریایی عصاره اتانولی ریشه شیرین‌بیان علیه *استرپتوکوکوس موتانس* می‌تواند آن را کاندید مناسبی برای استفاده در خمیردندان‌ها، دهان‌شویه‌ها و ژل‌ها برای جلوگیری از پوسیدگی دندان و کنترل عفونت‌های حفره دهانی قرار دهد؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی، عصاره‌گیری توسط حلال‌های قطبی و غیرقطبی و اثر آن بر روی تعداد بیشتری از پاتوژن‌های دهانی آزمایش گردد و ضرورت انجام تحقیقات بالینی برای تأیید نتایج این مطالعه احساس می‌شود.

سپاس‌گزاری

بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه کارکنان محترم مرکز تحقیقات فرآورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی که در این راه هدایت‌گر بنده بودند، کمال تشکر را دارم.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

کد اخلاق

IR.NKUMS.BLC.1401.004

References

1. Forssten SD, Bjorklund M, Ouwehand AC. *Streptococcus mutans*, caries and simulation models. *Nutrients* 2010; 2: 290 - 8. doi:10.3390/nu2030290.
2. Gurenlian JR. The Role of Dental Plaque Biofilm in Oral Health. *J Dent Hyg* 2007;81. doi:10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.
3. Kafshgari HS, Yazdani M, Ranjbar R, Tahmasebi E, Mirsaeed SRG, et al. The effect of *Citrullus colocynthis* extracts on *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, normal gingival fibroblast and breast cancer cells. *J Biol Res* 2019; 92: 30-3. doi:0.4081/jbr.2019.8201.
4. Zhang W, Li Y, Lin J, Abduryim A, Zhao J. Cariogenicity of *Candida albicans* of distinct genotypes among 3-5-year-old Uygur children in Kashgar, Chi na-a case-control study. *BMC Oral Health* 2018;18:203. doi: 10.1186/s12903-018-0658-4.
5. Haydari M, Bardakci AG, Koldslund OC, Aass AM, Sandvik L, et al. Comparing the effect of 0.06%, 0.12% and 0.2% Chlorhexidine on plaque, bleeding and side effects in an experimental gingivitis model: a parallel group, double masked randomized clinical trial. *BMC Oral Health* 2017;17:118. doi: 10.1186/s12903-017-0400-7.
6. Pretti H, Barbosa GLdR, Lages EMB, Gala-Garcia A, Magalhaes CSd, et al. Effect of chlorhexidine varnish on gingival growth in orthodontic patients: a randomized prospective split-mouth study. *Dent Press J Orthod* 2015; 20:66-71. doi: 10.1590/2177-6709.20.5.066-071.
7. Raissy M, Khamesipour F, Rahimi E, Khodadoostan A. Occurrence of *Vibrio* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* and *Campylobacter* spp. in crayfish (*Astacus leptodactylus*) from Iran. *Iran J Fish Sci* 2014;13:944-54.
8. Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Roshanak S, Alizadeh Behbahani B, Vasiee A, Norouz N. Antimicrobial activity of *Taraxacum pseudocalocephalum* leaves extract on pathogenic microorganisms and comparison with common therapeutic antibiotics in vitro. *Iran J Infect Dis Trop Med* 2019;23:37-46. doi:10.52547/qums.14.9.1.
9. Farhadi M, Lotfali E, Farhadi S F, Jolehar M. Evaluation of Antifungal Effects of Aqueous Extract of *Mentha Longifolia* Using 0.2% Chlorhexidine on Clinical Isolates of *Candida Albicans* from Oral Cavity of Patients with Leukemia. *Res Med* 2020; 44: 436-41.
10. Najat Agiel, Yavuz Bulent Kose, Zeynep Gülcan, Nagehan Saltan, Mine Kurkcuoglu, Gokalp Iscan. Antioxidant and antimicrobial activity of the endemic *Mentha longifolia* subsp. *cyprica* growing in Cyprus. *Phytochem Lett* 2023; 60: 243-8. doi:10.1016/j.phytol.2023.09.003.
11. Wahab S, Annadurai S, Abullais SS, Das G, Ahmad W, Ahmad MF, et al. *Glycyrrhiza glabra* (Licorice): A Comprehensive Review on Its Phytochemistry, Biological Activities, Clinical Evidence and Toxicology. *Plants (Basel)* 2021; 14;10:2751. doi:10.3390/plants10122751.
12. Latifian M, Rad B, Shakarami J, Rahkhodaei E. Evaluation of the lethal effect of plant extracts and their synergistic effect with *Beauveria bassiana* to control the population of *Oryzaephilus surinaemensis* fed on date palm. *BCPP* 2020; 20;7:17-30.
13. Gholami Pornaki P, Aghazadeh M, Sadeghi MR. Evaluation of chemical composition and in-vitro antibacterial activity of oregano (*Mentha pulegium*) growing wild in maku and its inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* in sausage. *VJ* 2017;30:69-77 .
14. Karami Z, Mirzaei H, Imam Juma Z, Sadeghi Mahonak A, Khamiri M. Evaluation of antimicrobial activity of licorice root ethanolic extract in orange soda. *IFSTRJ* 2012; 8: 251-261. doi: 10.22067/ifstrj.v8i2.17288.
15. Kermanshah H, Hashemi Kamangar S, Arami S, Mirsalehian A, Kamalinejad M, Karimi M, et al . In vitro evaluation of antibacterial activity of hydroalcoholic extract of *Salvia officinalis* and *Pimpinella anisum* against cariogenic bacteria. *JDM* 2009; 22:149-54.
16. Shirazi M, Ranjbar R, Eshraghi S, Sadeghi G, Jonaidi N, Bazzaz N, et al. An evaluation of antibacterial activity of *Glycyrrhiza glabra* extract on the growth of *Salmonella*, *Shigella* and *ETEC E. coli*. *J Biol Sci* 2007;7:827-9. doi: 10.3923/jbs.2007.827.829.
17. Nourizadeh E, Mirzapour T, Ghasemi K, Razavi SM, Latifi NS. Survey of antibacterial effects of spearmint, liquorice, perennial weed, mayweed and thyme on *helicobacter pylori*. *Daneshvar Med* 2004; 11: 67-70. (persian)
18. Abrishami MR, Alesheikh P, Gharaei S, Norozi Khalili M, Saadat Khaje M, et al. Synergistic Effect of Methanolic Extracts of *Rosmarinus Officinalis* and *Eugenicaryophyllataon* Biofilm of Oral Pathogenic Bacteria. *J North Khorasan Univ Med Sci* 2020;12:1-9. doi: 10.29252/nkjms-12031.
19. Scorzoni L, Benaducci T, Almeida A, Silva DHS, Bolzani V da S, Mendes-Giannini MJS. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and

- Cryptococcus sp. Rev Ciênc Farm Básica Apl 2007; 28:25-34.
20. Sedighinia F SAA, Soleimanpour S, Zarif R AJ, Ghazvini K. Antibacterial activity, in oGgaopa, 118. Avicenna J Phytomed 2012;2:118-24.
 21. Geetta RV, Roy A. In vitro Evaluation of Antibacterial activity of Ethanolic root extract of *Glycyrrhiza glabra* on oral microbes. Int J Drug Dev Res 2012 ;4: 161-5.
 22. Linguaraj A, jagannanauar S, Battur H, Shamara S, Siuakumar V, up p. Effect of aqueous and alcoholic Licorice(*Glycyrrhiza Glabra*)Root Extract Against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* in comparison to chlorhexidine: An In Vitro study. J Int Oral Health 2014; 6: 29-34.
 23. Utsunomiya T, Kobayashi M, Ito M, Pollard RB, Suzuki F. Glycyrrhizin improves the resistance of *Candida albicans* through the modulation of MAIDS-associated type 2 T cell responses. Clin Immunol 2000;95:145-55. doi:10.1006/clim.2000.4854.
 24. Arbabi-Kalat F, Porzamani M. Comparison the antifungal effect of licorice and nystatin, invitro study study. JDM 2013; 26:71-4.
 25. Azizi Tabrizzad N, SeyedinArdebili M, Hojjati M. Investigation of chemical compounds and antibacterial activity of pennyroyal, mint and thyme essential oils. FST 2019;16:395-404.
 26. Shariatifar N, Pirali-Hamedani M, Moazzen M, Ahmadloo M, Yazdani D. Study of the Antimicrobial Effects of Aqueous Extract of *Olea europaea*, *Solanum nigrum*, *Artemisia sieberi*, *Teucrium polium*, *Glycyrrhiza glabra* on some Food-borne Pathogenic Bacteria. J Med Plants 2019; 18:264-73. doi: 10.29252/jmp.4.72.264.
 27. Azmoudeh F, Aslanimehr M, Lourizadeh N. Effect of *Glycyrrhiza glabra* extract on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* (in vitro study). Stud Med Sci 2017; 28:394-400.
 28. Borjian Brojeni S, Kaveh Baba Heydari E, Mortezaei S, Karimian M, Shirzad M, Validi M. The Antibacterial Effects of the Hydroalcoholic Extracts of Aloe Vera and *Glycyrrhiza Glabra* against Cariogenic Bacteria InVitro. J Babol Univ Med Sci 2016; 18:14-20. doi: 10.22088/jbums.18.4.14.