# مقایسه اثر آنتی باکتریال عصاره اتانلی ریشه ی گیاه شیرین بیان، کلرهگزیدین و داکسی سایکلین بر باکتری پورفیرومونواس جینجیوالیس در محیط آزمایشگاهی

محمد رضا طباطباییان[۱]، دکتر وحید اصفهانیان*[۲]، دکتر آرزو طهمورث پور[۳]

۱- دانشجو دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان(خوراسگان)، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه پریودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان(خوراسگان)، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم پایه پزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان(خوراسگان)، اصفهان، ایران

وصول مقاله: ۱۴۰۱/۱۰/۷ اصلاح نهایی: ۱۴۰۲/۱/۲۸ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۲/۹

## The comparison of Licorice Root Ethanolic Extract, Chlorhexidine and Doxycycline Antibacterial effects on Porphyromonas gingivalis-An In Vitro Study

**Mohammad reza Tabatabaeian[1], Vahid Esfahanian[2], Arezoo Tahmourespour[3]**

*1- Dentistry student, School of dentistry, Isfahan(khorasgan) Branch, Islamic Azad university, Isfahan, Iran*

*2- Associate professor, Department of Periodontology, Faculty of dentistry, Isfahan(khorasgan) Branch, Islamic Azad university, Isfahan, Iran*

*3- Associate professor, Department of Basic Medical Sciences, Faculty of dentistry, Isfahan(khorasgan) Branch, Islamic Azad university, Isfahan, Iran*

***Received:Jun 2023 ; Accepted: May 2023***

**Abstract**

**Background and Aims**: Periodontal disease causes the destruction of tooth supporting tissue. Anaerobic Gram-negative bacterium, Porphyromonas gingivalis is one of the causes of this disease. Recently, due to the many side effects of mouthwashes and antibiotics, herbal materials have been receiving attention. licorice plant, with the scientific name Glycyrrhiza glabra, has antiviral, antibacterial and anti-inflammatory properties. Therefore, the purpose of this laboratory study is to investigate the antibacterial effect of different concentrations of licorice root ethanolic extract compared to doxycycline and chlorhexidine on Porphyromonas gingivalis bacteria.

**Material and Methods:** After preparing Porphyromonas gingivalis(**ATCC 33277)** bacteria from Isfahan University of Medical Sciences and bacterial culture and preparation of the plant and extraction, 6 dilutions of the extract were prepared. The test was carried out against Porphyromonas gingivalis bacteria along with 0.2% chlorhexidine mouthwash and doxycycline 100 mg antibiotic, with two methods of disk diffusion and microdilution. Data were analyzed by Mann-Whitney and Kruskal-Wallis statistical tests in spss26 software at a significance level of 5%.

**Result:** All six concentrations had significant antibacterial properties compared to each other and to chlorhexidine and doxycycline(P=0/001). The inhibitory concentration of extract, MIC70 and MIC90, was related to 6.25 and 200 mg/ml concentrations, respectively. The inhibitory percentages of chlorhexidine and doxycycline were 82.4% and 77.8%, respectively.

**Conclusion:** Licorice root ethanolic extract showed a very good antimicrobial effect. So that in higher concentrations, an equal or even greater effect was obtained than the chlorhexidine and doxycycline.

**Key words**: Antibacterial agents, Licorice, Chlorhexidine

***Corresponding Author:** vahid.esfahanian@gmail.com

**J Res Dent Sci. 2023;20 (3): 130-138**

*نویسنده مسئول: **دکتر وحید اصفهانیان** پست الکترونیک: vahid.esfahanian@gmail.com

**خلاصه:**

**سابقه و هدف:** بیماری پریودنتال موجب تخریب انساج نگهدارنده دندان می شود. باکتری گرم منفی بی هوازی پورفیرومونـاس جینجیوالیس از عوامل این بیماری است. اخیرا به دلیل عوارض متعدد دهانشویه ها و آنتی بیوتیک ها، مواد گیاهی مورد توجه قرار گرفته اند. از جمله گیاه شیرین بیان، که خواص ضد ویروسی، باکتریایی و ضد التهاب دارد. لذا هدف از این مطالعه آزمایشگاهی، بررسی اثر ضدباکتریایی غلظت های مختلف عصاره اتانلی ریشه شیرین بیان در مقایسه با داکسی سایکلین و کلرهگزیدین بر باکتری پورفیرومونـاس جینجیوالیس است.

**مواد و روشها:** در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی پس از تهیه باکتری پورفیرومونـاس جینجیوالیس( Porphyromonas gingivalis ATCC 33277) از دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و کشت آن و تهیه ی گیاه و عصاره گیری، ۶رقت از عصاره تهیه شده و به همراه دهانشویه کلرهگزیدین ۰/۲٪و آنتی بیوتیک داکسی سایکلین۱۰۰ میلی گرم، آزمایش بر باکتری پورفیرومونـاس جینجیوالیس به دو روش بررسی قطرهاله عدم رشد و میکرودایلوشن براث یا رقیق سازی در محیط مایع انجام شد. داده ها در نسخه‌ی ۲۶ نرم افزارSPSS در سطح خطای ۵٪ با استفاده از آزمون‌های آماری من ویتنی و کروسکال والیس تحلیل شد.

**یافته ها:** تمامی غلظت های شش گانه در مقایسه با یکدیگر و با کلرهگزیدین و داکسی سایکلین، دارای خاصیت آنتی باکتریال به صورت معنا دار بودند (P=۰/۰۰۱). غلظـت مهارکننـدگی عصـاره، MIC70 و MIC90، بـه ترتیـب مربـوط بـه غلظـت هـای ۶/۲۵ و ۲۰۰mg/ml بـود. درصـد مهارکنندگی کلرهگزیدین و داکسی سایکلین هم به ترتیب ۸۲/۴٪ و ۷۷/۸٪ بود.

**نتیجه‌گیری:** عصاره اتانلی شیرین بیان اثر آنتی میکروبیال بسیار خوبی نشان داد. به طوری که در غلظت های بالاتر تاثیری برابر و حتی بیشتر از کلرهگزیدین و داکسی سایکلین مشاهده شد.

**کلید واژه ها:** شیرین بیان، عوامل ضدباکتریایی، کلرهگزیدین

**مقدمه:**

فلور باکتریایی محیط دهان با بیش از ۷۵۰ گونه باکتریایی متنوع، یک زیستگاه میکروبی است که در ایجاد بیماری های عفونی دهانی، دخالت دارد. بیماری های پریودنتال، از شایع ترین بیماری های عفونی پلی میکروبی هستند که از انواع مهم آنها می‌توان به جینجیویت، پریودنتیت و پریودنتیت نکروزان اشاره کرد[۱،۲]. پریودنتیت، بیماری التهابی انساج نگهدارنده دندان است که عامل آن گونه یا گروه های خاصی از میکروارگانیسم ها است؛ که موجب تخریب پیشرونده لیگامان پریودنتال و استخوان آلوئولار، همراه با افزایش عمق پروبینگ یا تحلیل می شوند[۳]. حدود ۱۰ درصد از افراد جامعه، درگیر شدیدترین نوع پریودنتیت هستند؛ و پریودنتیت جزو شش بیماری شایع جهان است که با بیماری های سیستمیک، مانند دیابت، روماتویید و عفونت مزمن کلیوی ارتباط دارد. این بیماری در مردها (۵۶٪) شایع تر از زن ها (۳۸٪) می باشد[۴]. وجه تمایز کلینیکی پریودنتیت از بیماری جینجیویت، از دست رفتن چسبندگی کلینیکی بارز در پریودنتیت است؛ که معمولاً باعث تشکیل پاکت و تغییر در تراکم و ارتفاع استخوان آلوئول مجاور می شود[۵]. از جمله عوامل ایجاد کننده این بیماری، باکتری های گرم منفی بی هوازی مانند پورفیرومونـاس جینجیوالیس و فوزوباکتریوم نوکلئاتوم است[۶،۷]. باکتری پورفیرومونـاس جینجیوالیس می تواند در محیط دهان به سلولهای اپی تلیایی تهاجم نماید. این گونه از نظر تعداد و یا فراوانی در مکان هایی که پیشرفت بیماری پریودنتال دیده شده، افزایش یافته و در نواحی که با موفقیت درمان شده اند، کاهش یافته است.[۸] از جمله راه های پیشگیری و درمان بیماری های پریودنتال، روش های مختلفی مانند استفاده از دهان شویه ها و خمیر دندان های شیمیایی است. دهانشویه کلرهگزیدین به عنوان استاندارد طلایی معرفی شده؛ که البته عوارض گوناگونی همچون ایجاد رنگیزه های دندانی، تغییر حس چشایی، سوزش و خشکی دهان و متفلس شدن لثه نیز دارد.[۹] همچنین آنتی بیوتیک ها مانند تتراسایکلین و داکسی

سایکلین به وفور به کار برده شده است. امروزه به دلیل استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها و عوارضی از جمله تغییر در ترکیب فلور طبیعی، و همچنین عوارض دهان شویه های شیمیایی، موجب شده تا استفاده از مواد گیاهی، جهت پیشگیری و درمان، در معرض توجه قرار گیرد.[۱۰،۱۱] یکی از این گیاهان، شیرین بیان، با نام علمیGlycyrrhizaglabraL است که دارای گونه های متفاوتی بوده و ریشه ی آن دارای ترکیباتی نظیر قند های مختلف، فلاونوئیدها، استرول ها، اسیدهای آمینه، نشاسته، اسانس های روغنی و ساپونین ها است؛ که عمده ترین ساپونین آن Glycyrrhizic acid یا Glycyrrhizinمی باشد و دارای خواص ضد ویروسی، ضد باکتریایی، ضد التهاب و تومور است و در درمان بیماری های آسم، پارکینسون، روماتیسم و دیابت وابسته به انسولین موثر است.[۱۲–۱۸]

تحقیقات زیادی راجع به تاثیرات ضد میکروبی این گیاه و مقایسه آن با آنتی بیوتیک داکسی سایکلین- به جز بر روی برخی باکتری‌ها-موجود نیست و عمده مطالعات بر روی باکتری های غیر پریو پاتوژن است. در مطالعه ی آزمایشگاهی De و همکاران که به بررسی تاثیر گلیسریتینیک اسید بر جلوگیری از رشد باکتری ها و تشکیل پلاک بالای لثه ای پرداختند؛ نشان داد این ماده میتواند از تشکیل بیوفیلم ممانعت کند؛ و از تجمع باکتری پورفیرومونواس جینجیوالیس با باکتری های پلاک جلوگیری می‌کند.[۱] Sidhu و همکاران در سال ۲۰۲۰، نشان دادند پلی ساکارید های موجود در شیرین بیان می توانند از اتصال پورفیرومونواس جینجیوالیس به پلاک باکتریایی و مراحل اولیه عفونت در کودکان جلوگیری کنند[۱۹]. در یک کارآزمایی بالینی بر روی ۴۵ بیمار مبتلا به پریودنتیت مزمن، جهت مقایسه اثر قرص شیرین بیان با آنتی بیوتیک داکسی سایکلین ، نشان داده شد. میزانPocket depth ، Bleeding on probingو Clinical attachment loss بعد از درمان در هر سه گروه به طور معنی داری کاهش یافته است.[۵]

لذا با توجه به کاربرد های فراوان شیرین بیان در طب سنتی و عدم دسترسی به نتایج مطالعات در زمینه خواص آنتی باکتریال این گیاه بر پریوپاتوژن ها، این مطالعه آزمایشگاهی با هدف بررسی اثر ضدباکتریایی غلظت های مختلف عصاره اتانلی ریشه شیرین بیان در مقایسه با آنتی بیوتیک داکسی سیکلین و دهان شویه کلرهگزیدین بر باکتری پورفیرومونواس جینجیوالیس انجام شد.

**مواد و روش‌ها:**

این مطالعه به روش تجربی- آزمایشگاهی انجام شد.

کد اخلاق در پژوهش، از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان(خوراسگان) برای این تحقیق IR.IAU.KHUISF.REC.1401.272مصوب گردیده است.

سوش میکروبی:

سویه ی استاندارد باکتری پورفیرومونواس جینجیوالیس (Porphyromonas gingivalis ATCC 33277)از دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه گردید .

جمع آوری گیاه و تهیه عصاره الکلی گیاه شیرین بیان

گیاه شیرین بیان (Glycyrrhiza glabraL.) از زمین های زراعی منطقه ی شهرستان اردستان(از توابع شهر اصفهان) تهیه و توسط جهاد کشاورزی منطقه، اصالت گیاه تایید شد. عصاره گیری این گیاه در آزمایشگاه دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام گرفت. مقدار ۲۰۰گرم از پودر خشک آسیاب شده به درون یک دسیکاتور شیشه ای ریخته و مقدار ۱۰۰۰ میلی لیتر اتانول۷۰ ٪ به آن اضافه شد. سپس به مدت ۷ روز خیسانده، و به روش ماسراسیون عصاره گیری انجام شد. عصاره گیری ۳ بار تکرارگردید. عصاره به دست آمده نهایی، توسط کاغذ صافی فیلتر، و عصاره حاصله توسط دستگاه روتاری تغلیظ شد. میانگین سه بار تکرار آزمایش به عنوان وزن خشک اسانس (معادل ۳۳/۲۱ گرم) در نظر گرفته شد.[۲۰،۲۱]

تهیه رقت های عصاره

رقیق سازی در محیط مایع (Microdilution) در پلیت های ۹۶ خانه ای ته گرد انجام شد. ۲۰۰ میلی گرم از عصاره در ۱ cc Dimethyl sulfoxide (DMSO) (به عنوان حلال عصاره) حل شد؛ که این غلظت (200mg/ml )به عنوان رقت اصلی عصاره (یا رقت ۱۰۰ درصد) استفاده شد. سپس با استفاده از محیط کشت و در شرایط آزمایش، رقت های بعدی از عصاره نیز ایجاد شد. رقت های مورد استفاده و غلظت هر کدام در جدول ۱ ارائه شده است .

**غلظت عصاره استفاده شده(mg/ml) رقت تهیه شده**

| غلظت عصاره استفاده (mg/mlشده) | رقت تهیه شده (٪) |
|---|---|
| ۲۰۰ | ۱۰۰ |
| ۱۰۰ | ۵۰ |
| ۵۰ | ۲۵ |
| ۲۵ | ۱۲/۵ |
| ۱۲/۵ | ۶/۲۵ |
| ۶/۲۵ | ۳/۱۲۵ |

تهیه سوسپانسیون میکروبی استاندارد

جهت رشد و آماده سازی اولیه از محیط کشت بلاد آگار حاوی ۵- mg/ml همین و ۱۰ µg/ml ویتامین K استفاده شد.

جهت انجام تست های ضدمیکروبی، سوسپانسیونی استاندارد از باکتری معادل کدورت سوسپانسیون نیم مک فارلند در سرم فیزیولوژیک، حاوی$CFU/ml$ $^{8}$ ۱۰ × ۱/۵ تهیه گردید. تهیه گردید. جذب نوری کدورت استاندارد نیم مک فارلند در ۶۲۵ نانومتر باید بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ باشد.

بررسی فعالیت های ضدمیکروبی

الف- روش انتشار دیسک بر آگار

از هر کدام از ۶ رقت تهیه شده ی عصاره (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵) میزان ۲۰ میکرولیتر به دیسک های خالی استریل تلقیح شد. دیسک ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفته تا کاملا خشک شده و جهت دیسک گذاری آماده گردید. سوسپانسیون استاندارد باکتری (۱۰۰ میکرولیتر ) به روش کشت چمنی بر محیط مولرهینتون آگار حاوی ۵ درصد خون تلقیح شد و دیسک های آماده با فاصله مناسب بر محیط کشت های تلقیح شده قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور $CO2$ دار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس پلیت ها از نظر وجود هاله عدم رشد بررسی گردید. اندازه گیری قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک ها به وسیله خط کش میلی متری انجام شد. همچنین به منظور مقایسه خواص ضدمیکروبی عصاره با مواد آنتی باکتریال، این آزمایش با کلرهگزیدین ۰/۲٪ و آنتی بیوتیک داکسی سایکلین ۱۰۰ mgهم انجام شد.

ب- روش میکرودایلوشن براث (رقیق سازی در محیط کشت مایع)

حساسیت باکتری پورفیروموناس جینجیوالیس نسبت به عصاره بدست آمده از ریشه گیاه شیرین بیان با استفاده از روش رقیق سازی در محیط کشت مایع Brain Heart Infusion (BHI)در میکروتیتر پلیت های ۹۶ خانه ای ته گرد نیز مورد بررسی قرار گرفت.

در چاهک های هر ستون از میکروتیتر پلیت به میزان ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های شش گانه ( ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ ٪) از عصاره به همراه ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه شد.

چاهک های کنترل مثبت (چاهک های ردیف اول پلیت) فقط حاوی محیط کشت (۱۰۰ میکرولیتر) سوسپانسیون باکتری (۲۰ میکرولیتر) و ۱۰۰ میکرولیتر از سرم فیزیولوژی به جای عصاره موردنظر بودند.

چاهک های کنترل منفی (چاهک های ردیف آخر پلیت) فقط حاوی محیط کشت (۱۰۰ میکرولیتر) سرم فیزیولوژی استریل به جای سوسپانسیون باکتری (۲۰ میکرولیتر) و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره موردنظر بودند.

همچنین برای مقایسه از کلرهگزیدین ۰/۲٪ و آنتی بیوتیک داکسی سایکلین 100 mg استفاده شد. به این صورت که در هر گروه ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از این مواد به همراه ۱۰۰

میکرولیتر از محیط کشت و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری وجود داشت .محتویات هر چاهک، ۲ دقیقه به وسیله دستگاه ELISA Reader مارک Dana ساخت ایران) مجهز به تکان دهنده با هم مخلوط شده و یک بار در زمان صفر و بار دیگر پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در شرایط بی هوازی، عمل طیف سنجی در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه گیری شد. این آزمایش در سه تکرار جداگانه انجام شد.[۲۰،۲۱]

در نهایت میانگین جذب نوری های چاهک های کنترل مثبت و چاهک های تحت تاثیر ترکیبات ضد میکروبی، مقایسه و درصد مهارکنندگی هر کدام بر اساس فرمول زیر تعیین گردید:

در نهایت غلظت های مربوط به MIC70 و MIC90 نیز تعیین گردید MIC70:غلظتی که در آن بیش از ۷۰ درصد رشد باکتری ها مهار شده است MIC90:.غلظتی که در آن بیش از ۹۰ درصد رشد باکتری ها مهار شده است.

آنالیز های آماری:

تجزیه و تحلیل داده ها در دو سطح توصیفی و استنباطی انجام شد. در سطح توصیفی از شاخص‌های میانگین، انحراف معیار و نمودارهای آماری و در سطح استنباطی با توجه به نرمال نبودن توزیع داده ها، از روش های آماری ناپارامتری شامل آزمون های کروسکال والیس و من ویتنی استفاده شد. آزمون ها در سطح خطای پنج درصد و با استفاده از نسخه ۲۶نرم افزار SPSS انجام شد. برای رسم نمودار ها از نرم افزار GraphPad Prism 8 استفاده گردید.

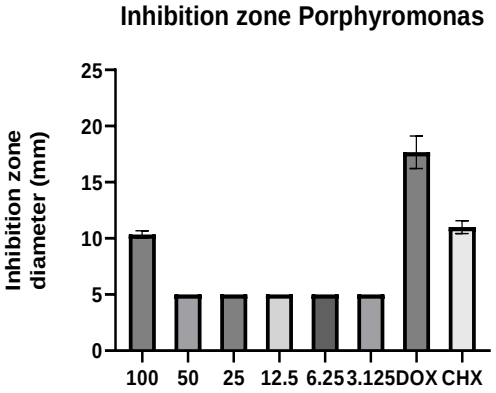
**یافته ها:**

در این مطالعه از عصاره الکلی ریشه شیرین بیان در ۶ غلظت و کلرهگزیدین ۰/۲ ٪ و آنتی بیوتیک داکسی سایکلین ۱۰۰ میلی گرم، استفاده شد. خواص آنتی باکتریال مواد مذکور بر روی باکتری پورفیرومونا‌س جینجیوالیس، در طی دو آزمایش کیفی بررسی قطر هاله عدم رشد و کمی میکرودایلوشن براث یا رقیق سازی در محیط مایع بررسی شد.

**جدول۱- نتایج ازمون من ویتنی برای مقایسه جفت گروه ها**

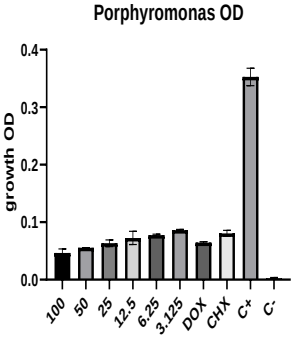
| رقت۱ | رقت۲ | سطح معنی داری مولفه هاله عدم رشد | سطح معنی داری مولفه جذب نوری |
|---|---|---|---|
| ۱۰۰ | ۵۰ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۴۶ |
| ۱۰۰ | ۲۵ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۴۶ |
| ۱۰ | ۱۵/۲ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۵۰ |
| ۱۰۰ | ۶/۲۵ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۵۰ |
| ۱۰۰ | ۳/۱۲۵ | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۴۶ |
| ۱۰۰ | داکسی سایکلین | ۰/۰۴۶ | ۰/۰۵۰ |
| ۱۰۰ | کلرهگزیدین | ۰/۳۴۶ | ۰/۰۵۰ |
| ۱۰۰ | کنترل مثبت | - | ۰/۰۵۰ |
| ۱۰۰ | کنترل منفی | - | ۰/۰۴۶ |
| ۵۰ | 25 | ۱/۰۰۰ | ۰/۰۴۳ |
| ۵۰ | ۱۲/۵ | ۱/۰۰۰ | ۰/۰۴۶ |
| ۵۰ | ۶/۲۵ | ۰/۰۰۰ | ۰/۰۴۶ |
| ۵۰ | ۳/۱۲۵ | ۱/۰۰۰ | ۰/۰۴۳ |
| ۵۰ | داکسی سایکلین | ۰/۰۳۷ | ۰/۰۴۶ |
| ۵۰ | کلرهگزیدین | ۰/۰۳۷ | ۰/۰۴۶ |
| ۵۰ | کنترل مثبت | - | ۰/۰۴۶ |
| ۵۰ | کنترل منفی | - | ۰/۰۴۳ |
| ۲۵ | ۱۲/۵ | ۱/۰۰۰ | ۰/۲۶۸ |
| ۲۵ | ۶/۲۵ | ۰/۰۰۰ | ۰/۰۴۶ |
| ۲۵ | ۳/۱۲۵ | ۱/۰۰۰ | ۰/۰۴۳ |
| ۲۵ | داکسی سایکلین | ۰/۰۳۷ | ۰/۵۰۷ |
| ۲۵ | کلروهگزیدین | ۰/۰۳۷ | ۰/۰۴۶ |
| ۲۵ | کنترل مثبت | - | ۰/۰۴۶ |
| ۲۵ | کنترل منفی | - | ۰/۰۴۳ |
| ۱۲/۵ | ۶/۲۵ | ۱/۰۰۰ | ۰/۵۱۳ |
| ۱۲/۵ | ۳/۱۲۵ | ۱/۰۰۰ | ۰/۱۲۱ |
| ۱۲/۵ | داکسی سایکلین | ۰/۰۳۷ | ۰/۱۸٤ |
| ۱۲/۵ | کلرهگزیدین | ۰/۰۳۷ | ۰/۵۱۳ |
| ۱۲/۵ | کنترل مثبت | - | ۰/۰۵۰ |
| ۱۲/۵ | کنترل منفی | - | ۰/۰٤٦ |
| ۶/۲۵ | 3/125 | ۱/۰۰۰ | ۰/۵۱۳ |
| ۶/۲۵ | داکسی سایکلین | ۰/۰۳۷ | ۰/۰٤٦ |
| ۶/۲۵ | کلرهگزیدین | ۰/۰۳۷ | ۰/۸۲۷ |
| ۶/۲۵ | کنترل مثبت | - | ۰/۰۵۰ |
| ۶/۲۵ | کنترل منفی | - | ۰/۰٤٦ |
| ۳/۱۲۵ | داکسی سایکلین | ۰/۰۳۷ | ۰/۰٤٦ |
| ۳/۱۲۵ | کلرهگزیدین | ۰/۰۳۷ | ۰/۰۷۲ |
| ۳/۱۲۵ | کنترل مثبت | - | ۰/۰٤٦ |
| ۳/۱۲۵ | کنترل منفی | - | ۰/۰٤۳ |
| داکسی سایکلین | کلرهگزیدین | ۰/۰۵۰ | ۰/۰۵۰ |
| داکسی سایکلین | کنترل مثبت | - | ۰/۰۵۰ |
| داکسی سایکلین | کنترل منفی | - | ۰/۰٤٦ |

| | | | |
|---|---|---|---|
| کلرهگزیدین | کنترل مثبت | - | ۰/۰۵۰ |
| کلرهگزیدین | کنترل منفی | - | ۰/۰٤٦ |
| کنترل مثبت | کنترل منفی | - | ۰/۰٤٦ |



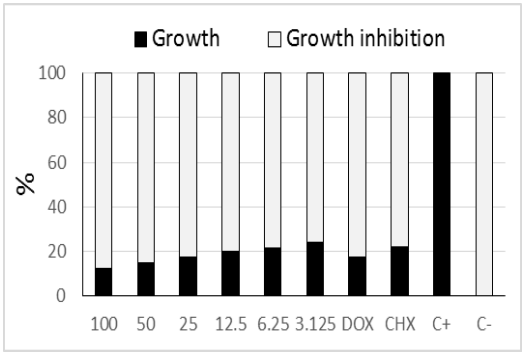

**نمودار ۱: قطر هاله عدم رشد (mm) باکتری پورفیرومونا‌س جینجیوالیس در حضور رقت های مختلف عصاره اتانلی ریشه شیرین بیان، داکسی سایکلین(DOX) و کلرهگزیدین(CHX)**

بر اساس نتایج حاصله از مقایسه غلظت های شش گانه با یکدیگر و با کلرهگزیدین و داکسی سایکلین، تمامی غلظت های شیرین بیان، دارای خاصیت آنتی باکتریال به صورت معنا دار بودند. (P=۰/۰۰۱). نتایج آزمون بررسی مولفه هاله عدم رشد پورفیرومونا‌س جینجیوالیس، در نمودار ۱، نتایج آزمایش جذب نوری، در نمودار ۲ و نهایتا درصد رشد و مهار رشد در حضور عوامل ضد باکتری مورد استفاده در نمودار ۳ ارائه شده است.




**نمودار۲- جذب نوری، نشانگر رشد باکتری پورفیرومونا‌س** جینجیوالیس در حضور رقت های مختلف عصاره اتانلی ریشه شیرین بیان، داکسی سایکلین(DOX) و کلرهگزیدین(CHX)

با توجه به اینکه برای این باکتری، حداقل غلظت کشندگی در هیچ یک از غلظت های شیرین بیان حاصل نشد، حداقل غلظت مهارکنندگی به دو صورت MIC 70 و MIC90 یا حداقل غلظت های مهار کننده ۷۰ و ۹۰ درصد از باکتری ها گزارش




گردید که به ترتیب عبارتند از غلظت های ۶/۲۵ و ۲۰۰mg/ml.

**نمودار ۳- درصد رشد و عدم رشد باکتری *پورفیرومونا‌س جینجیوالیس* در حضور رقت های مختلف عصاره اتانلی ریشه شیرین بیان، داکسی سایکلین(DOX) و کلرهگزیدین(CHX)**

نتایج آزمون من ویتنی برای مقایسه ی جفت گروه ها برای هر دو مولفه ی جذب نوری و هاله عدم رشد، مطابق جدول ۱ می باشد. بر این اساس مقدار احتمال مربوط به بررسی معنی داری آن برای مولفه جذب نوری برابر ۰/۰۰۱ و برای مولفه هاله عدم رشد برابر با ۰/۰۰۲ می باشد که از ۰/۰۵ کمتر است، بنابراین با اطمینان ۰/۹۵ فرض صفر آماری مبنی بر برابر بودن میانگین ها رد می شود.

## بحث

در این تحقیق از دو روش بررسی تعیین قطر هاله عدم رشد به روش انتشار دیسک بر آگار و مقایسه رشد با بررسی جذب نوری با روش میکرودایلوشن براث در حضور غلظتهای مختلف عصاره الکلی شیرین بیان، دهانشویه ۰/۲ ٪ کلرهگزیدین(CHX) و آنتی بیوتیک داکسی سایکلین(DOX) ۱۰۰mg استفاده شد.

از نظر قطر هاله عدم رشد، تنها در حضور رقت ۱۰۰ عصاره (معادل غلظت ۲۰۰mg/ml)، CHX و DOX هاله عدم رشد مشاهده گردید. بین تاثیر این غلظت از عصاره و کلرهگزیدین تفاوت معنی دار آماری مشاهده نشد.( P=۰/۳۴) در حالی که با داکسی سایکلین تفاوت معنی داری دیده شد. (P=۰/۰۴) به عبارت دیگر در بررسی قطر هاله عدم رشد، داکسی سایکلین دارای بیشترین تاثیر ضد میکروبی و سپس کلرهگزیدین و غلظت mg/ml ۲۰۰ دارای تاثیری معادل یکدیگر بودند. در مطالعه یAjagannanavar و همکاران که به بررسی خواص آنتی میکروبیال عصاره ابی و الکلی شیرین بیان در مقایسه با کلرهگزیدین بر باکتری های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *استرپتوکوکوس موتانس* پرداختند؛ برخلاف نتایج حاصل از این تحقیق، میزان قطر هاله عدم رشد در حضور عصاره الکلی شیرین بیان بیشتر از عصاره آبی و همچنین CHX بود؛ که این تفاوت قطعا به دلیل تفاوت در ویژگی های ذاتی باکتری های مورد بررسی و همچنین غلظت عصاره الکلی مورد استفاده (۲۵۰ در مقایسه با ۲۰۰ mg/ml ) می باشد[۲۲]. در روش میکرودایلوشن براث که در میکروتیتر پلیت های ۹۶ خانه ای ته گرد بررسی انجام شد، تمامی غلظت های عصاره دارای تفاوت معنی دار با گروه کنترل بودند. با توجه به میانگین متغیرها، (رقت ۱۰۰ برابر با ۰/۰۴۶۳، رقت ۵۰ برابر با ۰/۰۵۵۳، رقت ۲۵ برابر با ۰/۰۶۳۳، رقت ۱۲/۵ برابر با ۰/۰۷۲۷، رقت ۶/۲۵ برابر با ۰/۰۷۷۷، رقت ۳/۱۲۵ برابر با ۰/۰۸۶۳، داکسی سایکلین برابر با ۰/۰۶۴۷، کلرهگزیدین برابر با ۰/۰۷۹۳، کنترل مثبت برابر با ۰/۳۵۲۷ و کنترل منفی برابر با ۰/۰۰۲۷ )، رقت های ۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ اثرات ضدباکتریایی بهتری نسبت به کلرهگزیدین از خود نشان داده و بر اساس آنالیز های آماری این تفاوت معنی دار بود و در رقت ۱۲/۵ تاثیر عصاره تقریبا با کلرهگزیدین برابر است همچنین رقت های ۱۰۰ و ۵۰ عملکرد بهتری با تفاوت آماری معنی دار نسبت به داکسی سایکلین نشان داده، و در رقت ۲۵، تقریبا تاثیری برابر با داکسی سایکلین دیده شد. حداقل غلظت کشندگی در هیچ یک از رقت های عصاره حاصل نشد. حداقل غلظت مهارکننده رشد حدود ۷۰٪ و ۹۰٪ باکتری ها با عناوین MIC70 و MIC90 به ترتیب ۶/۲۵ و ۲۰۰mg/ml (رقت ۳/۱۲۵ و ۱۰۰ ٪) گزارش شد. این در حالی است که سایر غلظت های مابین دو غلظت حداقل و حداکثر مورد استفاده همگی منجر به مهار رشد بیش از ۷۰ درصد بودند (نمودار ۳). در مطالعه ی Ajagannanavar ، عصاره الکلی بخصوص برای باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* تا غلظت mg/ml ۶/۲۵ موثر بود که با نتایج مطالعه ما همسو است[۲۲]. Suwannakul و همکاران نیز تاثیر ضد میکروبی بسیار موثری از عصاره الکلی ریشه گیاه شیرین بیان بر *پورفیرومواناس جینجیوالیس* (با MIC معادل ۶۲/۵ µg/ml) گزارش نمودند. در مطالعه فوق تاثیر مترونیدازول بهتر از عصاره الکلی شیرین بیان گزارش گردید[۲۳]. Dewake و همکاران در سال ۲۰۲۱، طی یک مطالعه آزمایشگاهی، به بررسی تاثیر گلیسریتینیک اسید بر جلوگیری از رشد باکتری ها و تشکیل پلاک بالای لثه ای پرداختند؛ که نتایج نشان داد این ماده در غلظت های µg/ml ۱۲۸ تا ۲۵۶ ، می تواند از تشکیل بیوفیلم ممانعت کند. همچنین در غلظت های µg/ml ۳۲ یا ۶۴ از اگریگیشن باکتری *پورفیرومواناس جینجیوالیس* با باکتری های پلاک جلوگیری می‌کند[۱]. Villinski و همکاران در مطالعه ای مبنی بر خاصیت انتی باکتریال ایزوفلاون های موجود در شیرین بیان چینی(گونه ی uralensis) بر باکتری های *استرپتوکوکوس موتانس* و *پورفیرومواناس جینجیوالیس*؛ از ۹ ایزوفلاون گیاهی و همچنین آنتی بیوتیک های تتراسایکلین و پنیسیلین G استفاده نمودند. MIC برای پورفیرومواناس جینجیوالیس در ایزوفلاون های ۷ الی ۹ ( licorisoflavan C، licorisoflavan D، licorisoflavan E ) در غلظت های µg/ml ۶/۲۵ – ۱۲/۵ حاصل شد که نتایج آن با وجود تفاوت در گونه ی گیاه و منطقه جغرافیایی، با مطالعه ی حاضر همخوانی دارد[۲۴]. Tanabe و همکاران طی مطالعه ای بر

باکتری های *پورفیرومونا جینجیوالیس* و *پروتلا اینترمدیا*، به بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره اتانلی گیاه شیرین بیان (گونه ی uralensis) و دو نوع از ایزوفلاون های آن(licoricidin و licorisoflavan) پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد MIC برای *پورفیرومونا جینجیوالیس* در تیمار عصاره اصلی برابر با µg/ml ۲۰ و در تیمار ایزوفلاون ها برابر با µg/ml ۲ بود[۶]. و نسبت به مطالعه حاضر عملکرد بهتری نشان داده است. در مجموع تفاوت در حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره گیاه شیرین بیان در این تحقیق و سایر تحقیقات، احتمالا مربوط به تفاوت در گونه گیاهی و زمان برداشت گیاه، نحوه تهیه عصاره، شرایط نگهداری محیط های کشت در ازمایشگاه و سوش های کارشده در محیط ازمایشگاه می باشد. Sidhu و همکاران، هم نشان دادند پلی ساکارید های موجود در شیرین بیان می توانند از اتصال *پورفیرومونا جینجیوالیس* به پلاک باکتریایی و مراحل اولیه عفونت در کودکان جلوگیری کنند. بنابراین این گیاه میتواند یک ابزار جایگزین برای درمان پروفیلاکسی در مقابل عفونت باکتریال باشد[۱۹] La و همکاران در مطالعه ای در زمینه تاثیر ترکیبات غالب شیرین بیان (licoricidin و licorisoflavan)، بر پتانسیل ممانعت از ترشح سایتوکاین ها و ماتریکس متالوپروتئیناز های ناشی از تحریک باکتری *Actinobacillus actinomycetemcomitans*، از مونوسیت های انسانی مشتق از ماکروفاژ ها؛ نشان دادند این ترکیبات توانایی مقابله با ترشح برخی اینترلوکین ها را دارند و در نتیجه می توانند در درمان بیماری های مرتبط با سیتوکاین ها و MMP ها، از جمله بیماری پریودنتال مؤثر باشند[۷] Wittschier و همکاران با استفاده از عصاره ابی شیرین بیان گونه ی glabra بر روی باکتری های *پورفیرومونا جینجیوالیس* و *هلیکوباکترپیلوری*، نشان دادند این عصاره تاثیر بسیار قوی در مهار رشد و چسبندگی باکتری *پورفیرومونا جینجیوالیس* دارد[۲۵].

## نتیجه گیری

عصاره اتانلی ریشه ی گیاه شیرین بیان مورد استفاده در این تحقیق بر باکتری پریوپاتوژن *پورفیرومونا جینجیوالیس*، اثر آنتی میکروبیال بسیار خوبی نشان داد. به طوری که در حداقل غلظت مورد استفاده (mg/ml ۶/۲۵) مهار رشدی معادل ۷۶ درصد مشاهده شد و در غلظت های بالاتر( از جمله غلظت mg/ml ۲۵ )، تاثیر آنتی باکتریال برابر و یا حتی بیشتر از کلرهگزیدین و داکسی سایکلین مشاهده شد.

## References:


1. Dewake N, Ma X, Sato K, Nakatsu S, Yoshimura K, Eshita Y, et al. β-Glycyrrhetinic acid inhibits the bacterial growth and biofilm formation by supragingival plaque commensals. Microbiol Immunol. 2021 Sep;65(9):343–51.
2. Rezaie E, Bayani M, Arjomandzadegan M. The Inhibitory and Antibacterial Effects of Peppermint Essential Oil on Periodontal Photogenes. J Arak Univ Med Sci. 2020 Aug 30 [cited 2022 Jan 11];23(2):172–83.
3. Carranza F, Newman M. G, Takei H KD. Carranza's clinical periodontology.11 th ed.St Louis:Elsevier,2012:(12-26) (58-80) (84-103) (129-131) (281-282).
4. Binti Badlishah Sham NI, Lewin SD, Grant MM. Proteomic Investigations of In Vitro and In Vivo Models of Periodontal Disease. Proteomics Clin Appl. 2020 May;14(3):e1900043.
5. Mahmudpourmoteshakker T, Rafiee E, Farhad S AA. Comparison of the Effect of Doxycycline and Licorice on Chronic Periodontitis – A Clinical Trial Study. J Res Dent Sci. 2014;11(3):123–9.
6. Tanabe S, Desjardins J, Bergeron C, Gafner S, Villinski JR, Grenier D. Reduction of bacterial volatile sulfur compound production by licoricidin and licorisoflavan A from licorice. J Breath Res. 2012 Mar;6(1):16006.
7. La VD, Tanabe S, Bergeron C, Gafner S, Grenier D. Modulation of matrix metalloproteinase and cytokine production by licorice isolates licoricidin and licorisoflavan A: potential therapeutic approach for periodontitis. J Periodontol. 2011 Jan;82(1):122–8.
8. Lang NP, Berglundh T, Giannobile WV, Sanz M E. Lindhe's Clinical Periodontology and Implant Dentistry, 2 Volume Set. John Wiley & Sons; 2021 Oct 18.
9. Chitsazi M, Shirmohammadi A BE. lEffects of herbal mouthwash on periodontal indexes: comparable persica, Matrica, chlorhexidine. J Dent Shiraz Univ Med Sci. 2007;8(4 (17)):54–60.
10. Farhad SZ, Aminzadeh A, Mafi M, Barekatain M, Naghney M, Ghafari MR. The effect of adjunctive low-dose doxycycline and licorice therapy on gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in chronic periodontitis. Dent Res J (Isfahan). 2013;10(5):624–9.
11.Kanwar I, Sah AK, Suresh PK. Biofilm-mediated Antibiotic-resistant Oral Bacterial Infections: Mechanism and Combat Strategies. Curr Pharm Des. 2017;23(14):2084–95.
12. Khoshnam S E, Farzaneh M, valipour M, Bahaoddini A valipour A. Review of the phytochemical, pharmacological and physiological properties of Licorice (Glycyrrhizaglabra). Vol. 4, Clinical-Excellence. 2015. p. 56–71.
13.Mamedov NA, Egamberdieva D. Phytochemical Constituents and Pharmacological Effects of Licorice: A Review. In: Ozturk M, Hakeem KR, editors. Plant and Human Health, Volume 3: Pharmacology and Therapeutic Uses. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 1–21.
14.Hasan MK, Ara I, Mondal MSA, Kabir Y. Phytochemistry, pharmacological activity, and potential health benefits of Gly cyrrhiza glabra. Heliyon. 2021 Jun;7(6):e07240.
15. Azmoudeh F, Aslanimehr M, Lourizadeh N. Effect of Glycyrrhiza glabra extract on Streptococcus mutans and Candida albicans (in vitro study). URMIAMJ. 2017 Sep 1;28(6):394–400.
16. Khanahmadi M M, Naghdi Badi H, Akhondzadeh S, Khalighi Sigaroodi F, Mehrafarin A SS et al . A Review on Medicinal Plant of Glycyrrhiza glabra L. J Med Plants. 2013;12(46):1–12.
17. El-Saber Batiha G, Magdy Beshbishy A, El-Mleeh A, Abdel-Daim MM, Prasad Devkota H. Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, and Pharmacological and Toxicological Activities of Glycyrrhiza glabra L. (Fabaceae). Biomolecules. 2020 Feb;10(3).
18. Jiang M, Zhao S, Yang S, Lin X, He X, Wei X, et al. An "essential herbal medicine"-licorice: A review of phytochemicals and its effects in combination preparations. J Ethnopharmacol. 2020 Mar;249:112439.
19. Sidhu P, Shankargouda S, Rath A, Hesarghatta Ramamurthy P, Fernandes B, Kumar Singh A. Therapeutic benefits of liquorice in dentistry. J Ayurveda Integr Med. 2020;11(1):82–8.
20. Youngseok H, Tae-Jong K. Conditions for Preparing Glycyrrhiza uralensis Extract for Inhibiting Biofilm Formation of Streptococcus mutans. 2019 Mar 25;47(2):178–88.
21. Malvania EA, Sharma AS, Sheth SA, Rathod S, Chovatia NR, Kachwala MS. In Vitro Analysis of Licorice (Glycyrrhiza glabra) Root Extract Activity on Streptococcus mutans in Comparison to Chlorhexidine and Fluoride Mouthwash. J Contemp Dent Pract. 2019 Dec;20(12):1389–94.
22. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M GR. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. J Periodontol. 2000 Oct;71(10):1554–60.
23. Gunsolley JC. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. Journal of dentistry. 2010 Jun 1;38:S6-10.
24. Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. Environmental health perspectives. 2001 Mar;109(suppl 1):69-75.
25. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International journal of food microbiology. 2004 Aug 1;94(3):223-53.
26. Ajagannanavar SL, Battur H, Shamarao S, Sivakumar V, Patil PU, Shanavas 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 Heal JIOH. 2014;6(4):29–34.
27. Suwannakul S, Chaibenjawong P. Antibacterial Activities of Glycyrrhiza gabra Linn. (Licorice) Root Extract against Porphyromonas gingivalis rand Its Inhibitory Effects on Cysteine Proteases and Biofilms. J Dent Indones. 2017 Dec 31;24.
28. Villinski JR, Bergeron C, Cannistra JC, Gloer JB, Coleman CM, Ferreira D, et al. Pyrano-isoflavans from Glycyrrhiza uralensis with antibacterial activity against Streptococcus mutans and Porphyromonas gingivalis. J Nat Prod. 2014 Mar;77(3):521–6.
29. Wittschier N, Faller G, Hensel A. Aqueous extracts and polysaccharides from liquorice roots (Glycyrrhiza glabra L.) inhibit adhesion of Helicobacter pylori to human gastric mucosa. J Ethnopharmacol. 2009 Sep;125(2):218–23.