

Antimicrobial and Synergistic Effects of Garlic and Cinnamon Extract Compared with Fluoride Varnish on Oral *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus mutans* in Laboratory Conditions

Azam Nahvi^{1,2},
Hamid Reza Goli³,
Ali Davoodi⁴,
Abolfazl Hosseinnataj⁵,
Samira Sheydayee⁶,
Ali Jafari⁷,
Samaneh Hemmati^{1,2}

¹ Dental Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Associate Professor, Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dentistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Medical Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Biostatistics and Epidemiology, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ Dental Surgeon, Sari, Iran

⁷ Dentistry Student, Student Research Committee, Faculty of Dentistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 16, 2022 ; Accepted January 1, 2022)

Abstract

Background and purpose: Garlic and cinnamon extracts, like fluoride varnish, play a role in caries control due to their antimicrobial effect and controlling demineralization. This analytical laboratory study was conducted in 2021 to investigate the antimicrobial effect of garlic and cinnamon extracts compared with fluoride varnish in controlling the infection of oral *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus mutans*.

Materials and methods: The disk diffusion, minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration tests were used to check the antimicrobial effect. Ampicillin and Erythromycin discs were used for positive control and sterile physiological serum was used for negative control. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni post hoc test.

Results: In disk diffusion test, cinnamon along with fluoride varnish (10.0±1.0mm) caused a significant increase in the diameter of the growth inhibition halo of *L. acidophilus* (P<0.001). However, the largest growth inhibition halo diameters in *L. acidophilus* and *S. mutans* were associated with garlic-cinnamon-varnish (12.0±1.58mm) and fluoride varnish (9.0±0.71mm), respectively. In both strains, the antimicrobial effect of garlic extract was significantly lower than other compounds (P<0.001). The most inhibitory and bactericidal effects were associated with fluoride varnish seen in *S. mutans*.

Conclusion: According to this study, cinnamon and fluoride varnish has a synergistic antimicrobial effect against *L. acidophilus* in laboratory conditions. Also, cinnamon extract due to similar effects to fluoride varnish, can be useful as an alternative agent in controlling and preventing dental caries.

Keywords: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, Fluoride varnish, Garlic, Cinnamon

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 32 (217): 46-56 (Persian).

Corresponding Author: Samaneh Hemmati - Faculty of Dentistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
(E-mail: samaneh_hemmati@yahoo.com)

مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره سیر و دارچین با واریش فلوراید و اثر سینرژیسیم آن‌ها بر استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دهانی در شرایط آزمایشگاهی

اعظم نحوی^{۱*}
حمیدرضا گلی^۳
علی داوودی^۴
ابوالفضل حسین نتاج^۵
سمیرا شیدایی^۶
علی جعفری^۷
سمانه همتی^{۲*}

چکیده

سابقه و هدف: عصاره سیر و دارچین همانند واریش فلوراید، به دلیل اثر ضد میکروبی و کنترل دمنرالیزاسیون مینای دندان در پیشگیری از پوسیدگی دندان نقش دارد. این مطالعه آزمایشگاهی تحلیلی در سال ۱۴۰۰، با هدف بررسی اثر ضد میکروبی عصاره سیر و دارچین در مقایسه با واریش فلوراید، در کنترل عفونت باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دهانی انجام شد.

مواد و روش‌ها: جهت بررسی اثر ضد میکروبی، از تست‌های دیسک دیفیوژن، حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی استفاده شد. همچنین جهت کنترل مثبت از دیسک آمپی سیلین و اریتروماسین و برای کنترل منفی از سرم فیزیولوژیک استریل استفاده شد. مقایسه داده‌ها، با آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) و آزمون تعقیبی بونفرونی صورت پذیرفت.

یافته‌ها: در آزمایش دیسک دیفیوژن، استفاده از عصاره دارچین در کنار واریش فلوراید ($10 \pm 1/0$ mm) باعث افزایش معنی‌دار در قطر هاله مهار رشد در لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس شد ($P < 0/001$)، اما بیش‌ترین قطر هاله مهار رشد در لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و استرپتوکوکوس موتانس به ترتیب متعلق به سیر-دارچین-واریش ($12 \pm 1/58$ mm) و واریش فلوراید ($9 \pm 0/71$ mm) بود. اثر ضد میکروبی عصاره سیر به‌طور معنی‌داری از سایر ترکیبات، در هر دو سویه کم‌تر بود ($P < 0/001$). بیش‌ترین اثر مهارکنندگی و کشندگی نیز در ارتباط با واریش و در استرپتوکوکوس موتانس دیده شد.

استنتاج: یافته‌های این مطالعه نشان داد که در شرایط آزمایشگاهی استفاده از دارچین و واریش فلوراید اثر سینرژستی ضد میکروبی علیه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دارد. همچنین عصاره دارچین، به دلیل اثراتی مشابه با واریش فلوراید، می‌تواند به عنوان یک عامل جایگزین در کنترل و پیشگیری از پوسیدگی‌های دندان مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: استرپتوکوکوس موتانس، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، واریش فلوراید، سیر، دارچین

مقدمه

پوسیدگی دندان یک بیماری عفونی چند فاکتوری بسیار شایع حفره دهان است که به دلیل تداخل متابولیکی میکروارگانیسم‌های پوسیدگی‌زا و کربوهیدرات‌های تخمیری رژیم غذایی، بر سطح دندان ایجاد می‌شود (۱).

E-mail: samaneh_hemmati@yahoo.com

مؤلف مسئول: سمانه همتی - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده دندانپزشکی

۱. مرکز تحقیقات دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشیار، گروه کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. استادیار، گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استادیار، گروه فارماکوتوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. استادیار، گروه آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۶. دندانپزشک، ساری، ایران

۷. دانشجوی دندانپزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۲۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۱/۸/۲۲ تاریخ تصویب: ۱۴۰۱/۱۰/۱۱

باکتری/استرپتوکوکوس موتانس یک کوکسی گرم مثبت می باشد که از شایع ترین پاتوژن های موثر در پوسیدگی دندان به شمار می رود. لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس نیز یک باسیل گرم مثبت است که در پلاک دندان شیوع بالایی داشته و در پیشرفت ضایعات پوسیدگی موثر می باشد (۲). فلوراید موضعی نقش مهمی در پیشگیری و کنترل پوسیدگی ها دارد. فلوراید اثرات آنتی باکتریال دارد و نیز سبب کاهش دیمینرالیزاسیون و افزایش رمینرالیزاسیون مینای دندان ها می شود (۳). به طور کلی محتوای فلوراید مینا رابطه ای معکوس با شیوع پوسیدگی دندان دارد (۴). استفاده از خمیر دندان های حاوی فلوراید با غلظت های پایین برای تمامی گروه های سنی توصیه شده است؛ اما از محصولات موضعی با مقادیر بالای فلوراید مانند وارنیش و ژل به صورت دوره ای برای بالغین و کودکان با خطر بالای پوسیدگی دندان استفاده می شود (۵). وارنیش فلوراید موضعی به مینای دندان متصل شده و به مرور فلوراید آزاد می کند، لذا دندان در طولانی مدت در معرض فلوراید قرار می گیرد (۶). در یک مطالعه مروری و نظام مند مبتنی بر مطالعات بالینی، توصیه شده است که دو بار در سال از وارنیش سدیم فلوراید موضعی برای کنترل پوسیدگی دندان استفاده شود (۷). غلظت بالای فلورین بزاق (بیش از ۱۲۰۰ ppm) برای برخی باکتری ها مانند/استرپتوکوکوس موتانس توکسیک می باشد. مهار رشد/استرپتوکوکوس موتانس تا چندین هفته پس از استفاده از فلوراید موضعی نیز ادامه می یابد (۸).

استفاده از سیر (*Allium Sativum*) در پزشکی برای درمان بیماری های مختلف، پیشینه ای باستانی دارد. سیر دارای خواص آنتی باکتریال، آنتی اکسیدان و ضد التهاب است. آلیسین (Allicin) موجود در سیر مهم ترین عامل آنتی باکتریال آن است که بر طیف وسیعی از باکتری های گرم مثبت و منفی موثر می باشد (۹). مطالعاتی نیز در بررسی اثرات ضد باکتریایی سیر بر میکروارگانیسم های پوسیدگی زای دهانی صورت گرفته است؛ در این مطالعات تاثیر سیر در غلظت های مختلف بر/استرپتوکوکوس

موتانس و لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس مشاهده شده است (۱۰).

خواص پزشکی عصاره دارچین (*Cinnamomum Verum*) اولین اولین بار در دهه ۱۹۲۰ توسط Penfold گزارش شد. عصاره دارچین نیز علیه طیف وسیعی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی، ویروس ها و انگل ها و قارچ ها موثر بوده است (۱۱). دارچین سرشار از سینامالدهید (Cinnamaldehyde) است که بر کاهش عفونت، پوسیدگی دندان و بوی بد دهان اثر گذار می باشد (۱۲).

تاکنون در مطالعات بسیاری به بررسی اثرات وارنیش فلوراید موضعی بر باکتری های پوسیدگی زای دهانی پرداخته شده و اثر گذاری آن تا حد زیادی به اثبات رسیده است. از آن جا که سیر و دارچین نیز همچون فلوراید دارای خواص آنتی باکتریال می باشند و در سال های اخیر فراورده های گیاهی برای جایگزینی محصولات شیمیایی بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته اند، مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر ضد میکروبی ترکیبات حاوی عصاره های سیر و دارچین به تنهایی و خصوصاً اثر سینرژیستی آن ها در مقایسه با وارنیش فلوراید علیه گونه های پوسیدگی زای/استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس دهانی انجام گرفت.

مواد و روش ها

نحوه تهیه عصاره سیر و دارچین

برای تهیه عصاره، نمونه هرباریومی هر دو گونه (سیر E2-234-546 و دارچین E2-234-745) تهیه و توسط هیئت علمی گروه فارماکوتکونوزی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران مورد تایید قرار گرفت. میزان ۳۹ گرم چوب خشک شده دارچین و ۱۲۰ گرم سیر خرد و پودر شده در ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد در پرکولاتور به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شدند. بعد از اتمام ماسراسیون، عصاره گیری مجدد با ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد و به صورت قطره قطره با روش پرکولاتور انجام شد. پس از اتمام روند

عصاره گیری، عصاره ها صاف شده و تحت خلأ با دستگاه روتاری تغلیظ و با دستگاه فریز درایر خشک شدند. سپس میزان فنل و فلاونوئید تام مورد بررسی قرار گرفت (۱۴، ۱۳). در تمامی مراحل بعد از عصاره گیری، نمونه ها در فریزر جهت کاهش تخریب ترکیبات فنولیک نگهداری شدند. میزان بازدهی در عصاره گیری برای سیر و دارچین به ترتیب ۸ و ۲۴ درصد محاسبه شد.

نحوه تعیین آزمایش دیسک دیفیوژن

دو سویه استاندارد / استرپتوکوکوس موتانس (*Streptococcus mutans* PTCC 1683) و لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356) از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه در سال ۱۴۰۰ خریداری شد. جهت تعیین حساسیت این سویه ها به عصاره سیر و دارچین در مطالعه آزمایشگاهی تحلیلی حاضر، از روش دیسک آگار دیفیوژن (Disk agar diffusion) و روش میکروبراث دایلوژن (Broth dilution) استفاده شد (۱۵).

در روش دیسک آگار دیفیوژن، بعد از تلقیح میکروبی کدورت های استاندارد نیم مک فارلند با استفاده از سوآپ استریل بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار (MHA: Muller-Hinton agar) حاوی ۵ درصد خون لیز شده گوسفند برای / استرپتوکوکوس موتانس (۱۶) و محیط کشت MRS Agar برای لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس انتقال داده و به صورت سفره ای کشت داده شدند (۱۷). سپس دیسک های کاغذی بلانک (Blank disk) تهیه شده و به مقدار ۲۰ میکرولیتر از همه عصاره ها و در نسبت های مختلف به دیسک ها اضافه شد. دیسک ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در شرایط بهینه هر باکتری انکوبه شدند تا حساسیت سویه ها به واریش فلوراید (V-varnish, Vericom, Korea)، عصاره سیر و دارچین و ترکیبات آن ها به واسطه اندازه گیری قطر هاله عدم رشد بر پایه میلی متر و به وسیله خط کش بررسی گردد. برای کنترل مثبت از دیسک آمپی سیلین و اریتروماسین

و به عنوان کنترل منفی از سرم فیزیولوژیک استریل استفاده شد و هر آزمایش ۵ بار تکرار شد (۱۸).

نحوه تعیین حداقل غلظت مهار (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

از روش میکروبراث دایلوژن، برای تعیین میزان حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) استفاده شد و اثر آنتی باکتریال عصاره دارچین و سیر بر روی باکتری های / استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس به منظور تعیین دقیق تر حساسیت بررسی شد. آزمایش MIC در میکروپلیت های ۹۶ خانه ای U شکل با روش میکروبراث دایلوژن و بر اساس استاندارد CLSI با ۵ بار تکرار برای هر نمونه و در مجموع ۳۵ نمونه انجام شد. بدین طریق که در تمامی چاهک های مربوطه در میکروپلیت، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هیتون براث (حاوی ۵ درصد خون لیز شده گوسفند برای / استرپتوکوکوس موتانس) را اضافه کرده و غلظت های مورد نظر از ماده تست شونده براساس سریال دایلوژن در چاهک های مربوطه تهیه شدند. در نهایت، به همه چاهک ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون نیم مک فارلند ۱ به ۱۰۰ رقیق شده باکتری اضافه شد. پس از پوشاندن چاهک ها با پارافیل، میکروپلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه شدند و نتایج MIC مورد مطالعه قرار گرفت. اولین چاهکی که هیچ رشدی از ارگانسیم مورد نظر نشان نداده بود، به عنوان حداقل غلظت مهار کنندگی گزارش شد. یکی از چاهک های انتهایی به عنوان کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری و بدون عصاره) و چاهکی دیگر به عنوان کنترل منفی (محیط کشت با عصاره و بدون باکتری) در نظر گرفته شد. همین روش برای باکتری لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس با محیط کشت MRS broth نیز انجام شد و نتایج ثبت گردید.

مطابق این جدول، تفاوت داده‌های گروه‌های دارچین - وارنیش، دارچین - وارنیش - سیر و وارنیش در دو باکتری معنی‌دار بود و هر سه گروه قطر هاله عدم رشد بیش‌تری را در لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس نشان داده‌اند.

جدول ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) در استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس با ترکیبات مختلف ضد باکتری‌های دهانی

گروه	میانگین		بیش‌ترین - کم‌ترین		میانگین $\pm$ انحراف معیار		سطح معنی‌داری
	L.A*	S.M**	L.A	S.M	L.A	S.M	
سیر	۴/۰	۴/۰	۵-۳	۵-۳	۴/۰ $\pm$ ۱/۰	۴/۰ $\pm$ ۱/۰	۰/۹۹۹
دارچین	۸/۰	۸/۰	۱۰-۶	۱۰-۵	۸/۰ $\pm$ ۱/۵۸	۸/۰ $\pm$ ۱/۸۷	۰/۹۹۹
سیر-دارچین	۸/۰	۸/۰	۹-۶	۱۰-۶	۸/۰ $\pm$ ۱/۵۸	۸/۰ $\pm$ ۱/۲۲	۰/۹۹۹
سیر-وارنیش فلوراید	۸/۰	۷/۰	۹-۷	۸-۶	۸/۰ $\pm$ ۱/۰	۷/۰ $\pm$ ۱/۰	۰/۱۰۵
دارچین-وارنیش فلوراید	۱۰/۰	۷/۰	۱۱-۹	۸-۶	۱۰/۰ $\pm$ ۱/۰	۷/۰ $\pm$ ۱/۰	۰/۰۰۱
سیر-دارچین-وارنیش فلوراید	۱۲/۰	۸/۰	۱۴-۱۰	۱۰-۶	۱۲/۰ $\pm$ ۱/۵۸	۸/۰ $\pm$ ۱/۵۸	۰/۰۰۴
وارنیش فلوراید	۱۲/۰	۹/۰	۱۳-۱۱	۱۰-۸	۱۲/۰ $\pm$ ۱/۰	۹/۰ $\pm$ ۱/۰	۰/۰۰۱

* L.A: *Lactobacillus acidophilus*

** S.M: *Streptococcus mutans*

جهت مقایسه قطر هاله عدم رشد مواد مختلف مورد استفاده از آزمون تحلیل واریانس استفاده شد، نتایج این آزمون نشان داد که میانگین قطر هاله عدم رشد در گروه‌های مختلف متفاوت و معنی‌دار بود (لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس: $P < ۰/۰۰۱$ ، استرپتوکوکوس موتانس: $P < ۰/۰۰۱$)؛ به همین دلیل، از آزمون تعقیبی بونفرونی جهت مقایسه دو به دو میانگین گروه‌ها استفاده شد (جدول شماره ۲).

نتایج آزمون بونفرونی نشان داد که اثر ضد میکروبی عصاره سیر علیه لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس به‌طور معنی‌داری کم‌تر از سایر ترکیبات بود ($P < ۰/۰۰۱$). به‌طور میانگین قطر هاله عدم رشد لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در گروه وارنیش و دارچین-وارنیش-سیر با هم برابر و به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایرین بود ($P < ۰/۰۰۱$). هم‌چنین تفاوت معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در گروه دارچین-وارنیش با گروه وارنیش دیده نشد ($P = ۰/۲۳۶$). در استرپتوکوکوس موتانس نیز اثر ضد میکروبی عصاره سیر به‌طور معنی‌داری کم‌تر از سایر ترکیبات بود ($P = ۰/۰۰۱$) اما بین قطر هاله عدم رشد سایر ترکیبات بر روی استرپتوکوکوس موتانس تفاوت معنی‌داری دیده نشد.

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی، از اولین چاهکی که هیچ رشدی از میکروارگانیزم مورد نظر نشان نداده بود و نیز از ۳ تا ۴ چاهک بعدی به مقدار ۲۰ میکرولیتر نمونه برداشته و در محیط کشت مولر هیتون آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفند (برای استرپتوکوکوس موتانس) و محیط کشت MRS Agar (برای لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس) کشت داده شد. چاهکی که هیچ رشدی را در محیط مزبور نشان نداد به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) مطرح گردید. در صورت مشترک بودن اعداد MIC و MBC و یا تفاوت حداکثر ۲ رقت، وارنیش، عصاره و یا ترکیب مربوطه باکتری‌سیدال در نظر گرفته شدند (۱۹).

توزیع نرمال داده‌ها توسط آزمون شاپیرو ویلک مورد بررسی قرار گرفت، سپس جهت مقایسه میانگین و انحراف معیار در گروه‌های مختلف، از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) و آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد. برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 22 استفاده گردید و مقادیر $P < ۰/۰۵$ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

یافته‌های آزمایش *disk agar diffusion*، مقایسه قطر هاله عدم رشد با ترکیبات مختلف ضد باکتری‌های دهانی در جدول شماره ۱، میانگین $\pm$ انحراف معیار و میانگین قطر هاله عدم رشد و هم‌چنین کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار قطر هاله عدم رشد در میان ۵ نمونه از هر یک از ترکیب‌ها آورده شده است. طبق داده‌های این جدول در لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس، عصاره سیر کم‌ترین قطر هاله عدم رشد و سیر-دارچین-وارنیش فلوراید در کنار V وارنیش بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد را داشته است. در مورد استرپتوکوکوس موتانس نیز عصاره سیر دارای کم‌ترین قطر هاله عدم رشد بود و بیش‌ترین مقدار در ارتباط با V وارنیش بوده است.

جدول ۲: نتایج آزمون بونفرونی جهت مقایسه دو به دو میانگین قطر هاله عدم رشد لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس و استرپتوکوکوس موتانس در ترکیبات مختلف ضد باکتری‌های دهانی

گروه	سیر	دارچین	سیر-دارچین	سیر-وارنیش فلوراید	دارچین-وارنیش فلوراید	سیر-دارچین-وارنیش فلوراید	وارنیش فلوراید
لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس	سیر	دارچین	سیر-دارچین	سیر-وارنیش فلوراید	دارچین-وارنیش فلوراید	سیر-دارچین-وارنیش فلوراید	وارنیش فلوراید
	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	دارچین	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	سیر-دارچین	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	سیر-وارنیش فلوراید	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	دارچین-وارنیش فلوراید	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	سیر-دارچین-وارنیش فلوراید	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	وارنیش فلوراید	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
استرپتوکوکوس موتانس	سیر	دارچین	سیر-دارچین	سیر-وارنیش فلوراید	دارچین-وارنیش فلوراید	سیر-دارچین-وارنیش فلوراید	وارنیش فلوراید
	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	دارچین	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	سیر-دارچین	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	سیر-وارنیش فلوراید	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	دارچین-وارنیش فلوراید	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	سیر-دارچین-وارنیش فلوراید	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
	وارنیش فلوراید	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

مقایسه‌ای که در جدول شماره ۳ انجام داده شد بیان کرد که حداقل غلظت کشندگی وارنیش فلوراید به‌طور معنی‌داری کم‌تر از سایر گروه‌ها بوده و در استرپتوکوکوس موتانس به‌طور معنی‌داری کم‌تر از لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس بود ($P < 0/001$) اما تفاوت معنی‌داری بین سایر ترکیبات دیده نشد.

جدول شماره ۳: مقایسه حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی (بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر) در ترکیبات مختلف ضد باکتری‌های دهانی

شاخص	گروه	لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس	استرپتوکوکوس موتانس	P-value
حداقل غلظت مهاری	سیر	۳۱۲۴	۳۱۲۴	۰/۹۹۹
	دارچین	۳۹۰/۶۲	۳۹۰/۶۲	۰/۹۹۹
	سیر-دارچین	۷۸۱/۲۵	۷۸۱/۲۵	۰/۹۹۹
	سیر-وارنیش فلوراید	۳۹۰/۶۲	۳۹۰/۶۲	۰/۹۹۹
	دارچین-وارنیش فلوراید	۱۹۵/۳۱	۳۹۰/۶۲	۰/۰۰۱
	سیر-دارچین-وارنیش فلوراید	۹۷/۶۵	۳۹۰/۶۲	۰/۰۰۱
	وارنیش فلوراید	۹۷/۶۵	۲۴/۴۸	۰/۰۰۱
حداقل غلظت کشندگی	سیر	۱۲۵۰۰	۱۲۵۰۰	۰/۹۹۹
	دارچین	۳۱۲۵	۳۱۲۵	۰/۹۹۹
	سیر-دارچین	۶۲۵۰	۶۲۵۰	۰/۹۹۹
	سیر-وارنیش فلوراید	۳۱۲۵	۳۱۲۵	۰/۹۹۹
	دارچین-وارنیش فلوراید	۱۵۶۲/۵	۳۱۲۵	۰/۹۹۹
	سیر-دارچین-وارنیش فلوراید	۷۸۱/۲۵	۳۱۲۵	۰/۹۹۹
	وارنیش فلوراید	۳۹۰/۶۲	۶۷/۶۵	۰/۰۰۱

مقایسه حداقل غلظت مهاری دو گونه میکروبی طبق جدول شماره ۳ کم‌ترین اثر مهاری در عصاره سیر در هر دو باکتری مشاهده شد و بیش‌ترین اثر مهاری مربوط به اثر وارنیش بر روی استرپتوکوکوس موتانس بود. طبق مقایسه‌ای که در جدول شماره ۳ انجام شد، یافته‌ها نشان داد که حداقل غلظت مهاری وارنیش فلوراید به‌طور معنی‌داری کم‌تر از سایر گروه‌ها بوده و در استرپتوکوکوس موتانس به‌طور معنی‌داری کم‌تر از لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس بود ($P < 0/001$). هم‌چنین حداقل غلظت مهاری عصاره دارچین-وارنیش و دارچین-وارنیش-سیر به‌طور معنی‌داری در لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس کم‌تر از استرپتوکوکوس موتانس بود ($P < 0/001$).

مقایسه حداقل غلظت کشندگی دو گونه میکروبی مقایسه حداقل غلظت کشندگی هر کدام از گروه‌ها علیه دو گونه میکروبی لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس و استرپتوکوکوس موتانس در جدول شماره ۳ درج شده است. مطابق داده‌های این جدول عصاره سیر کم‌ترین تاثیر را در هر دو باکتری داشته و بیش‌ترین تاثیر را وارنیش بر روی استرپتوکوکوس موتانس نشان داده است.

بحث

در مطالعه حاضر، که با هدف بررسی اثرات ضد باکتریایی ترکیبات حاوی عصاره‌های سیر و دارچین در مقایسه با ورنیش فلوراید انجام شد، سیر در هر دو سویه باکتریایی *استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* کم‌ترین قطر هاله عدم رشد و نیز کم‌ترین اثرات مهار و کشندگی را داشت، در حالی که بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد در *استرپتوکوکوس موتانس* در گروه ورنیش فلوراید و در سویه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در گروه‌های ورنیش فلوراید و سیر-دارچین-ورنیش دیده شد. اثرات مهار و کشندگی نیز در هر دو سویه در گروه ورنیش فلوراید به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر گروه‌ها بود.

فلوراید یکی از مهم‌ترین عوامل پیشگیری از پوسیدگی دندان به شمار می‌رود. مهم‌ترین اثر ضد پوسیدگی فلوراید ناشی از مهار دمنیرالیزاسیون و ارتقای روند دمنیرالیزاسیون پوسیدگی‌های اولیه است (۳). در این مطالعه از V ورنیش به عنوان ورنیش فلوراید استفاده شده است. در ساختار V ورنیش قند زایلیتول وجود دارد که علیه *استرپتوکوکوس موتانس* حفره دهان موثر است. هم‌چنین از CPP-ACP (یک پروتئین استخراج شده از شیر که به یون کلسیم و فسفات متصل شده است) نیز در ساخت V ورنیش استفاده می‌شود که به‌طور موثری چسبندگی یون‌های فلوراید و کلسیم را در محیط دهان بالا برده و روند دمنیرالیزاسیون پوسیدگی‌های اولیه را ارتقا می‌دهد (۲۲-۲۰). این ماده دمنیرالیزاسیون مینایی و به تبع آن پوسیدگی دندان را به‌طور معنی‌دار کاهش می‌دهد (۲۳).

در این مطالعه، در تمامی گروه‌ها، قطر هاله عدم رشد علیه هر دو گونه میکروبی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *استرپتوکوکوس موتانس* دیده شد. در بررسی انجام شده قطر هاله عدم رشد، در گروه V ورنیش فلوراید، برای *استرپتوکوکوس موتانس* ۹ میلی‌متر و برای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ۱۲ میلی‌متر بوده است.

یافته‌های مطالعه جعفری و همکاران (۲۴) بیان داشت که قطر هاله عدم رشد V ورنیش علیه *استرپتوکوکوس موتانس* صفر میلی‌متر بود و ورنیش فلوراید، با وجود آزادسازی کلسیم در محیط دهانی، در شرایط آزمایشگاهی مانع از رشد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* نشده است. V ورنیش در بین تمامی ورنیش‌ها بیش‌ترین ویسکوزیته را دارد و به همین دلیل، تهیه محلول آن بسیار دشوار است. این ماده پس از قرارگیری در محیط کشت میکروبی، به سرعت set شده و اثرات ضد میکروبی آن مشخص نمی‌شود. لذا می‌بایست در شرایط آزمایشگاهی با کاهش رزین و خاصیت چسبندگی ورنیش، شرایط را برای بررسی اثرات ضد میکروبی آن مهیا کرد. در این مطالعه برای بررسی اثرات ضد میکروبی V ورنیش، این ماده در ۲۰ درصد حلال DMSO و ۸۰ درصد آب حل شد. بنابراین احتمالاً تفاوت در یافته‌های مطالعه جعفری و همکاران با مطالعه حاضر به علت وجود رزین در V-varnish بوده است.

در این مطالعه محدوده اثر ضد میکروبی V ورنیش در آزمایش دیسک آگار دیفیوژن در *استرپتوکوکوس موتانس* کم‌تر از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بوده است. علت مهار رشد بالای این ورنیش در هر دو گونه باکتریایی می‌تواند غلظت بالای کلسیم آزاد شده به محیط دهان باشد.

در این مطالعه عصاره سیر بیش‌ترین حداقل غلظت مهار و کم‌ترین اثر مهارکنندگی را علیه هر دو گونه *استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* داشت. این در حالی است که در مطالعه فانی و همکاران، تمامی سویه‌های مقاوم و غیرمقاوم به تتراسایکلین به عصاره سیر حساس بودند و محدوده حداقل غلظت مهار آن بین ۴ تا ۳۲ میکروگرم متغیر بود (۲۵). هم‌چنین در مطالعه Thomas و همکاران، استفاده از دهان‌شویه حاوی سیر باعث کاهش معنی‌دار تعداد کلونی‌های *استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* شده بود (۲۶). در مطالعه Urgehe و همکاران نیز، حداقل

غلظت مهاری عصاره سیر علیه *استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر و قطر هاله عدم رشد آن علیه *استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ۲۰ میلی متر گزارش شده است (۲۷). هم چنین در مطالعه Kashirsagar و همکاران قطر هاله عدم رشد عصاره سیر علیه *استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بیش تر از دهان شویه کلر هگزیدین گزارش شده است (۲۸). در مطالعه مطالعه Gabriel و نیز حساسیت *استرپتوکوکوس موتانس* به عصاره سیر در غلظت های مختلف مشاهده شد (۲۹).

ماده موجود در سیر *Allium Sativum* یا آلیسین (allyl 2-propenethiosulfinate or diallyl thiosulfinate) یک ترکیب بیواکتیو می باشد و باعث مهار متابولیسم و عملکرد میکروارگانیسم ها می شود (۳۰). آلیسین پس از کوبیدن سیر، از آلیین (alliin) موجود در سیر سالم ایجاد می شود. این ماده توانایی مهار آنزیم های سولفو هیدریل را دارد (۳۱)؛ لذا مکانیسم اصلی ضد میکروبی سیر را می توان به آلیسین آن نسبت داد، چرا که آنزیم های سولفو هیدریل برای تغذیه و متابولیسم باکتری ها ضروری هستند. اثر ضد میکروبی آلیسین، بسته به نوع حلالی که عصاره در آن گرفته شده و نیز روش کشت و برداشت سیر متفاوت است، که تفاوت در یافته های این مطالعه با مطالعات فوق را می توان به آن نسبت داد (۳۲).

در یافته های مطالعه Yadav و همکاران (۳۳) نشان داده شد که قطر هاله عدم رشد عصاره دارچین در آزمایش دیسک دیفیوژن علیه هر دو گونه *استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به طور معنی داری بیش تر از عصاره سیر است. مطابق یافته های این مطالعه نیز، اثر ضد میکروبی عصاره سیر کم تر از عصاره دارچین و فلوراید بود. این یافته با یافته های مطالعه Yadav و همکاران (۳۳) و Riyani و همکاران (۳۴) همخوانی دارد. لذا به نظر می رسد که اثر ضد میکروبی عصاره سیر علیه دو سویه باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به تنهایی کافی نیست.

یافته های این مطالعه نشان داد که استفاده از عصاره دارچین باعث افزایش حساسیت گونه های *استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* شده است. یافته های مطالعه Elgamily و همکاران (۱۹) نیز نشان داد که استفاده از عصاره دارچین باعث افزایش حساسیت این دو گونه به دهان شویه می شود. در پژوهش Bersy و همکاران نیز استفاده از دهان شویه حاوی دارچین همچون دهان شویه کلر هگزیدین سبب کاهش تعداد *استرپتوکوکوس موتانس* دهانی در نمونه های بزاقی بیماران شد (۳۵). به طور کلی دارچین حاوی ترکیبات اتانولی است که اثر ضد میکروبی بالایی دارد با این حال اثرات ضد میکروبی بالای دارچین را بیش تر به متابولیت های ثانویه آن، از جمله Cinnamaldehyde نسبت می دهند. این ماده روند بیولوژیک متابولیسم میکروبی مانند چرخه انتقال الکترون را مختل کرده و با ترکیبات حاوی نیتروژن واکنش نشان می دهد و در رشد میکروارگانیسم ها اختلال ایجاد می کند (۳۲). هم چنین عصاره اوژنول و کارواکرول موجود در دارچین باعث از هم گسیختگی ساختار لپیدی غشای سلولی باکتری، نشت محتویات باکتری ها و در نهایت مرگ آن ها می شود (۳۶).

در این مطالعه افزودن عصاره سیر به دارچین و واریش، تاثیر معنی داری روی قطر هاله عدم رشد و حداقل غلظت مهاری و کشندگی دو گونه میکروبی نداشت. لذا یافته های این مطالعه فرضیه اثر سینرژیستی عصاره سیر در ترکیب با عصاره دارچین و یا واریش فلوراید را جهت افزایش خواص ضد میکروبی آن ها رد می کند. همچنین در این مطالعه استفاده از هر سه عصاره سیر-دارچین-واریش به همراه یکدیگر نیز فاقد اثر سینرژیستی بر روی مهار رشد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* بود.

یافته های این مطالعه نشان داد که افزودن عصاره دارچین به واریش فلوراید اثر سینرژیستی بر مهار رشد باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* داشته است، در حالی که این اثر سینرژیستی علیه باکتری *استرپتوکوکوس*

موتانس دیده نشد. همچنین مطابق یافته‌های این مطالعه، اثر سینرژیستی استفاده همزمان از هر سه ترکیب سیر-دارچین-وارنیش علیه لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس بیش‌تر از استرپتوکوکوس موتانس بوده است. این تفاوت در اثرگذاری بین دو گونه را می‌توان در ارتباط با تفاوت در ساختارها و نیز آنزیم‌های متابولیکی دو گونه، علی‌الخصوص توکسین‌های متعدد و اسپور میکروبی موجود در گونه‌های استرپتوکوکوس دانست؛ این ویژگی‌ها مقاومت استرپتوکوکوس موتانس را علیه عوامل ضد میکروبی نسبت به سایر گونه‌های میکروبی از جمله لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس افزایش داده است.

امروزه با پیشرفت‌های به دست آمده در شیمی آلی و تحولات چشمگیر در روش‌های استخراج، تخلیص و تعیین ساختمان ترکیبات طبیعی گیاهان، ارزش داروهای حاصل از منابع گیاهی روز به روز آشکارتر می‌شود. داروهای گیاهی به دلیل داشتن عوارض کم‌تر در مقایسه با داروهای شیمیایی به‌طور قابل توجهی نظر محققان را به خود معطوف کرده‌اند.

مطابق یافته‌های این مطالعه، عصاره سیر به تنهایی خواص ضدباکتریایی ناچیزی دارد، همچنین افزودن آن به عصاره دارچین، وارنیش و ترکیبات آن‌ها نیز اثرات سینرژیستی قابل ملاحظه‌ای ندارد. عصاره دارچین، با توجه به اثرات مشابه وارنیش فلوراید، می‌تواند به عنوان

یک عامل جایگزین در کنترل و پیشگیری از پوسیدگی‌های دندانی کمک کننده باشد. استفاده از دارچین و وارنیش فلوراید، اثرات سینرژیستی ضد میکروبی علیه لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس دارد، اما علیه استرپتوکوکوس موتانس این اثرات قابل توجه نیست.

پیشگیری، بهترین و موثرترین راه مقابله با هر گونه بیماری از جمله پوسیدگی‌های دندانی است. هزینه پیشگیری از بیماری‌ها در کودکان در مقایسه با هزینه‌های درمانی بعدی آن‌ها بسیار ناچیز است. با توجه به داده‌های بدست آمده در این پژوهش، توصیه می‌گردد استفاده از عصاره‌های گیاهی که حاوی ترکیبات ارزشمندی همچون پلی‌اتیلن‌ها می‌باشند در جهت کنترل و ارتقای بهداشت دهان و دندان کودکان مورد توجه ویژه قرار گیرند.

سپاسگزاری

این مقاله، حاصل پایان‌نامه دانشجویی مصوب با کد ۵۲۸۹ از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران و با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1400.258 می‌باشد. بدین وسیله معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر به عمل می‌آید.

References

- Ahmad P, Hussain A, Carrasco-Labra A, Siqueira WL. Salivary Proteins as Dental Caries Biomarkers: A Systematic Review. Caries Res 2022; 56(4): 385-398.
- Salehi M, Molania T, Nemati N, Goli HR, Nahvi A. Antimicrobial Effect of Kids Dentifrices on Streptococcus mutans and Lactobacillus acidophilus: An In-Vitro Study. J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32(209): 24-32 (Persian).
- Jullien S. Prophylaxis of caries with fluoride for children under five years. BMC Pediatr 2021; 21(1): 351.
- Kavya Rani B, Ramanna PK, Mailankote S, Joy AK, Thomas AA, Baby M. Evaluation of Anticaries Efficacy of Various Fluoride Varnishes on Artificial Enamel Lesion: An In Vitro Study. J Contemp Dent Pract 2021; 22(7): 775-777.
- Pessan JP, Toumba KJ, Buzalaf MAR.

- Topical use of fluorides for caries control. *Monogr Oral Sci* 2011; 22: 115-132.
6. Rashed T, Alkhalefa N, Adam A, AlKheraif A. Pit and Fissure Sealant versus Fluoride Varnish for the Prevention of Dental Caries in School Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Clin Pract* 2022; 2022: 8635254.
 7. Comar LP, Wiegand A, Moron BM, Rios D, Buzalaf MAR, Buchalla W, et al. In situ effect of sodium fluoride or titanium tetrafluoride varnish and solution on carious demineralization of enamel. *Eur J Oral Sci* 2012; 120(4): 342-348.
 8. Kamotsay K, Herczegh A, Rozgonyi F, Nász I, Gintner Z, Bánóczy J. Effect of fluoride on cariogenic oral microorganisms (an in vitro study). *Acta Microbiol Immunol Hung* 2002; 49(1): 47-58.
 9. Torbati M, Emamverdizadeh P, Torbati M, Maghalian M, Mirghafourvand M. Effect of garlic (*Allium sativum*) extract on salivary streptococcus mutans: a systematic review and meta-analysis. *Pharm Sci* 2021; 27(4): 472-480.
 10. Devaraju R, Arulselvan K, Gayas Z, Uday V. Antibacterial Activity of Garlic Extract against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*: An In Vitro Study. *J South Asian Assoc Pediatr Dent* 2022; 5(1): 26-31.
 11. Mohamed AE, Abdur R, MM SA. Cinnamon bark as antibacterial agent: A mini-review. *GSC Biol Pharm Sci* 2020; 10(1): 103-108.
 12. Lai DYJ, Chua LW, Chong JJ, Chong PX, Tegginamani AS, Zamzuri ATB. Antibacterial properties of cinnamon: A concise review. *Indian J Oral Health Res* 2021; 7(1): 7-13.
 13. Gu C, Howell K, Dunshea FR, Suleria HA. Lc-esi-qtof/ms characterisation of phenolic acids and flavonoids in polyphenol-rich fruits and vegetables and their potential antioxidant activities. *Antioxidants (Basel)* 2019; 8(9): 405-420.
 14. Subbiah V, Zhong B, Nawaz MA, Barrow CJ, Dunshea FR, Suleria HA. Screening of Phenolic Compounds in Australian Grown Berries by LC-ESI-QTOF-MS/MS and Determination of Their Antioxidant Potential. *Antioxidants (Basel)* 2021; 10(1): 26-48.
 15. Kaskatepe B, Kiymaci ME, Şimşek D, Basak H, Aslan Erdem S. Comparison of the Contents and Antimicrobial Activities of Commercial and Natural Cinnamon Oils. *Indian J Pharm Sci* 2016; 78(4): 541-548.
 16. Nowak A, Christensen JR, Mabry TR, Townsend JA, Wells MH. *Pediatric Dentistry: Infancy through adolescence*. Amsterdam: Elsevier; 2018.
 17. Nagyzbekkyzy E, Abitayeva G, Anuarbekova S, Shaikhina D, Li K, Shaikhin S, et al. Investigation of Acid and Bile Tolerance, Antimicrobial Activity and Antibiotic Resistance of *Lactobacillus* Strains Isolated from Kazakh Dairy Foods. *Asian J Appl Sci* 2016; 9(4): 143-158.
 18. Smullen J, Koutsou G, Foster H, Zumbé A, Storey D. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 2007; 41(5): 342-349.
 19. Elgamily H, Safy R, Makharita R. Influence of medicinal plant extracts on the growth of oral pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*: an in-vitro study. *Open Access Maced J Med Sci* 2019; 7(14): 23-28.
 20. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res* 2010; 89(11): 1187-1197.

21. Vogel GL. Oral fluoride reservoirs and the prevention of dental caries. *Monogr Oral Sci* 2011; 22: 146-157.
22. Attiguppe P, Malik N, Ballal S, Naik SV. CPP-ACP and fluoride: a synergism to combat caries. *Int J Clin Pediatr Dent* 2019; 12(2): 120-125.
23. Abufarwa M, Noureldin A, Campbell PM, Buschang PH. How different time intervals between repeated applications of CPP-ACP fluoride varnish effect smooth surface enamel demineralization? *J Dent* 2021; 112: 103742.
24. Jafari K, Hekmatfar S, Fereydunzadeh M. In vitro Comparison of Antimicrobial Activity of Conventional Fluoride Varnishes Containing Xylitol and Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate. *J Int Soc Prev Community Dent* 2018; 8(4): 309-313.
25. Fani MM, Kohanteb J, Dayaghi M. Inhibitory activity of garlic (*Allium Sativum*) extract on multidrug-resistant *Streptococcus mutans*. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2007; 25(4): 164-168.
26. Thomas A, Thakur S, Habib R. Comparison of Antimicrobial Efficacy of Green Tea, Garlic with Lime, and Sodium Fluoride Mouth Rinses against *Streptococcus mutans*, *Lactobacilli* species, and *Candida albicans* in Children: A Randomized Double-blind Controlled Clinical Trial. *Int J Clin Pediatr Dent* 2017; 10(3): 234-239.
27. Urgehe W EA, Eboh O. Antibacterial activity of garlic and lime on isolates of extracted carious teeth. *Afr J Biotech* 2010; 9(21): 3163-3166.
28. Kshirsagar MM, Dodamani AS, Karibasappa GN, Vishwakarma PK, Vathar JB, Sonawane KR, et al. Antibacterial activity of garlic extract on cariogenic bacteria: An in vitro study. *Ayu* 2018; 39(3): 165-168.
29. Gabriel T, Vestine A, Kim KD, Kwon SJ, Sivanesan I, Chun SC. Antibacterial Activity of Nanoparticles of Garlic (*Allium sativum*) Extract against Different Bacteria Such as *Streptococcus mutans* and *Poryphomonas gingivalis*. *Appl Sci* 2022; 12(7): 3491.
30. Leontiev R, Hohaus N, Jacob C, Gruhlke MCH, Slusarenko AJ. A Comparison of the Antibacterial and Antifungal Activities of Thiosulfinate Analogues of Allicin. *Sci Rep* 2018; 8(1): 6763.
31. Bakri IM, Douglas CW. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol* 2005; 50(7): 645-651.
32. Ogunjobi AA, Abiala MA. Antimicrobial activity of *Senna alata* and *Phyllanthus amarus*. *Glob J Pharm* 2013; 7(2): 198-202.
33. Yadav P, Gupta S, Singh C, Anand S, Masih U, Hegde YD. Comparative evaluation of antimicrobial potential of gin-ger, garlic and cinnamon extracts against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. *Int J Adv Res* 2017; 5: 332-336.
34. Riyanti E, Maskoen AM, Oewen RR, Pratidina NB, Achmad H, Ramadhany YF. Antibacterial Activity of *Allium sativum* against *Streptococcus mutans* ATCC 25175 in Indonesia. *Syst Rev Pharm* 2020; 11(4): 313-318.
35. Bersy DA, Mostafa MH, El-Araby SM. Evaluation of the Antibacterial Effect of Cinnamon Extract on *Streptococcus Mutans*. *Al Azhar Dent J Girls* 2021; 8(1-A): 123-128.
36. Ajay Rao HT, Bhat SS, Hegde S, Jhamb V. Efficacy of garlic extract and chlorhexidine mouthwash in reduction of oral salivary microorganisms, an in vitro study. *Anc Sci Life* 2014; 34(2): 85-88.