ORIGINAL ARTICLE

Comparison of the Antimicrobial Effect of Pomegranate Seed Extract with MI Fluoride Varnish and Their Synergistic Effects against Cariogenic Bacteria (Streptococcus mutans and Lactobacillus acidophilus)-an in-Vitro Study

Azam Nahvi[1,2]
Hamid Reza Goli[3]
Ali Davoodi[4]
Ali Jafari[5]
Abolfazl Hosseinnataj[6]
Fatemeh Golkar[5]
Banafsheh Soleimani[7]

[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] Associate 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 Sciences, Sari, Iran
[5] Dentist, Sari, Iran
[6] Assistant Professor, Department of Biostatistics and Epidemiology, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[7] Pediatric Dentist, Sari, Iran

(Received June 6, 2023, 2023; Accepted November 8, 2023, 2023)

Abstract

Background and purpose: The antibacterial properties of pomegranate have been investigated in numerous studies. The aim of this study was to compare the antimicrobial effect of pomegranate seed extract (PSE) with Minnimally Invasive (MI) fluoride varnish and also to investigate their synergistic effect on the caries-causing bacteria *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* bacteria.

Materials and methods: In this in-vitro study, the antibacterial properties and the minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC, respectively) of the the compounds were investigated using the disk agar diffusion test (growth inhibition halo) and the micro broth dilution test. The antibacterial activity of the methanolic extracts was studied in 5 groups: PSE, PSE and varnish, MI varnish, positive control (ampicillin and erythromycin) and negative control (sterile physiological serum). The data were analyzed using SPSS ver22 software.

Results: The largest diameter of growth inhibition in *S. mutans* and *L. acidophilus* was observed in the combination of two extracts (12±0.22mm) and varnish (12±1.22mm), respectively, while the smallest diameters were recorded in PSE (8.0±1.0mm and 4.0±1.5mm, respectively). Varnish showed the lowest MICs and MBCs for both types of bacteria tested. PSE and varnish showed similar results in inhibiting the growth of *S. mutans* (P=0.588); however, the simultaneous use of two extracts showed significant synergistic effects (P<0.05).

Conclusion: The MI varnish has a more favorable effect than the other groups studied, and a lower concentration is required to inhibit the growth of two bacterial species. However, high concentrations of PSE, with and without fluoride varnish, can be used against *Streptococcus mutans*.

Keywords: Fluoride varnish, *Lactobacillus acidophilus*, Pomegranate seed extract, *Punica granatum*, *Streptococcus mutans*

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (Supple 2): 139-150 (Persian).

Corresponding Author: Banafsheh Soleimani– Faculty of Dentistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: banafsheh.soleimani@yahoo.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-17]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و سوم شماره ویژه نامه ۲ آذر سال ۱۴۰۲ (۱۵۰-۱۳۹)

مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره دانه انار با وارنیش فلوراید MI و اثرهای سینرژیسم آن ها بر باکتری های پوسیدگی زای دندان [استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس] در شرایط آزمایشگاهی

اعظم نحوی[۱و۲]
حمیدرضا گلی[۳]
علی داوودی[۴]
علی جعفری[۵]
ابوالفضل حسین نتاج[۶]
فاطمه گل کار[۵]
بنفشه سلیمانی[۷]

چکیده

سابقه و هدف: خواص ضد باکتریایی انار در مطالعات متعددی بررسی شده است. هدف از این مطالعه مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره دانه انار (PSE: Pomegranate Seed Extract) با وارنیش فلوراید MI و نیز بررسی اثر سینرژیسم آن‌ها بر باکتری‌های پوسیدگی‌زای دهانی *استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه in-vitro، از تست‌های دیسک آگار دیفیوژن (قطر هاله عدم رشد) و میکروبراث دایلوشن برای بررسی خواص ضد باکتریایی و حداقل غلظت مهاری (MIC) و کشندگی (MBC) ترکیبات استفاده شد. فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های متانولی در ۵ گروه PSE، PSE و وارنیش، وارنیش MI، کنترل مثبت (آمپی‌سیلین و اریتروماسین) و کنترل منفی (سرم فیزیولوژیک استریل) بررسی شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ تحلیل شدند.

یافته‌ها: بیش‌ترین قطر هاله مهار رشد در *استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به ترتیب در ترکیب دو عصاره ((mm) ۱۲/۰±۰/۲۲) و وارنیش ((mm) ۱۲/۱±۰/۲۲) بود و نیز کم‌ترین قطر هاله‌ها در PSE به ثبت رسید (به ترتیب (mm) ۸/۱±۰/۰ و (mm) ۴/۱±۰/۵). وارنیش کم‌ترین MIC و MBC را در هر دو گونه باکتریایی به ثبت رساند. در مهار رشد *استرپتوکوکوس موتانس*، PSE و وارنیش عملکردی مشابه داشتند (P=۰/۵۸۸)؛ در حالی که اثرهای سینرژیستی چشمگیری در استفاده هم‌زمان از دو عصاره مشاهده شد (P<۰/۰۵).

استنتاج: وارنیش نسبت به سایر گروه‌های مورد مطالعه دارای اثرهای سودمندتری بود و برای مهار رشد دو گونه باکتریایی به غلظت کم‌تری از آن نیاز است. با این حال می‌توان از غلظت‌های بالای PSE، با و بدون وارنیش فلوراید در برابر *استرپتوکوکوس موتانس* بهره برد.

واژه های کلیدی: *استرپتوکوکوس موتانس*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، عصاره دانه انار، وارنیش فلوراید، *Punica granatum*

مقدمه

پوسیدگی دندان عارضه‌ای چندعاملی و مولتی‌فاکتوریال است که از تعامل سه عامل اصلی ایجاد می‌شود: میزبان، محیط و باکتری‌ها. امروزه، نقش گونه‌های باکتریایی پوسیدگی زا در شیوع و بروز

مولف مسئول: بنفشه سلیمانی– ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده دندان‌پزشکی
E-mail: banafsheh.soleimani@yahoo.com
۱. مرکز تحقیقات دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشیار، گروه کودکان، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشیار، گروه میکروب‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. دندان‌پزشک، ساری، ایران
۶. استادیار، گروه آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۷. متخصص دندان‌پزشک اطفال، ساری، ایران
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۵/۱ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۸/۱۷

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-17]

پوسیدگی دندان به خوبی مشخص شده است. *استرپتوکوکوس موتانس* مهم‌ترین گونه باکتریایی است که با متابولیسم قندها و تولید اسید، با گذشت زمان، سبب دمینرالیزه شدن بافت‌های دندانی و آغاز فرایند پوسیدگی می‌شود(۱). *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* موجود در ضایعات پوسیدگی نیز در پیشرفت پوسیدگی ها نقشی مهم دارد(۲). امروزه، محققان بر این باورند که کنترل پوسیدگی‌های اولیه و توقف دمینرالیزاسیون مینایی با مهار تشکیل پلاک و فاکتورهای محافظتی بزاق ممکن خواهد بود(۳). استفاده از وارنیش فلورایـد می‌تواند سبب جلوگیری، کاهش سرعت و نیز توقف پوسیدگی‌های دندانی شود. فلورایـد معدنی موجود در وارنیش فلوراید دمینرالیزاسیون مینای دندانی را متوقف می‌کند و رمینرالیزاسیون دندانی را افزایش می‌دهد(۴). Minimally Invasive (MI) Varnish یک روش درمانی Bioavailable است که حاوی کلسیم، فسفات و فلوراید است. این محصول بیش‌تر از سایر وارنیش‌های فلوراید بر سطوح دندانی باقی می‌ماند و حاوی مقادیر زیادی فلورایـد و کلسیم آزاد شده در حفره دهان است(۵). وارنیش‌ها برای مدت طولانی‌تری به سطح دندان می‌چسبند و مانع از دست رفتن فوری آن می‌شوند؛ بنابراین، به عنوان مخازن آزاد کننده آهسته عمل می‌کنند(۶).

مقاومت میکروارگانیسم‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های معمول استفاده شونده برای درمان عفونت‌های دهانی (نظیر پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها، اریترومایسین، تتراسایکلین و مشتقات آن و نیز مترونیدازول)، لزوم شناسایی استراتژی‌های مؤثر و نوین علیه عوامل بیماری‌زای دهان را ضروری می‌کند(۷). در دهه‌های گذشته، استفاده از گیاهان دارویی با اثرهای پیشگیرانه و درمانی که به مراقبت‌های بهداشتی کمک می‌کنند، به طور چشمگیری افزایش یافته است. پژوهشگران برای یافتن اثربخشی احتمالی آن‌ها در جلوگیری از تشکیل پلاک دندانی، بسیاری از محصولات گیاهی را بررسی کرده‌اند(۷، ۸). عصاره‌های این گیاهان دارویی اغلب به علت خواص ضد باکتریایی یا کاهش دادن چسبندگی عوامل بیماری‌زای میکروبی به سطوح دندانی، از ایجاد بیوفیلم‌های باکتریایی جلوگیری می‌کنند(۹)؛ با این حال، فقط تعداد کمی از محصولات طبیعی کاربردهای درمانی پیدا کرده‌اند. دلایل این استفاده محدود به عوامل مختلفی از جمله اثربخشی، پایداری، بو، طعم و هزینه برمی‌گردد(۱۰). انار (Punica granatum L.) که میوه‌ای است از خانواده Lythraceae، بومی مناطق شمال هند تا ایران است و از دیرباز، در منطقه مدیترانه کشت و برداشت می‌شده است(۱۱). بهره‌گیری از خواص دارویی انار پیشینه‌ای طولانی دارد؛ با این حال، در دهه‌های اخیر، علاقه به ارزیابی اثرهای درمانی انار به طور محسوسی افزایش یافته است(۱۲، ۱۳). انار گیاهی دارویی با پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و خواص ضد التهابی است و در درمان سرطان، بیماری‌های قلبی و عروقی، دیابت و ضایعات دهان و دندان از آن استفاده کرده‌اند. اثرهای درمانی درخور توجه انار را می‌توان با ترکیبات بیوشیمیایی نظیر فلاوونوئیدها، آنتوسیانیدین‌ها و الاژیتانین‌ها مرتبط دانست(۱۴).

El-Sharkawy و همکاران اثرگذاری چشمگیر مصرف دهان‌شویه‌های حاوی عصاره پوست انار و نیز آب انار تازه را در کاهش کلونی‌های *استرپتوکوکوس موتانس* حاضر در بزاق بیماران (به ترتیب با ۱۰۰ و ۹۹/۷۵ درصد کاهش) گزارش کرده‌اند(۱۵).

در مطالعه Kote و همکاران نیز مصرف دهان‌شویه آب انار سبب کاهش چشمگیر تعداد کلونی‌های استرپتوکوکی و لاکتوباسیلی در پلاک‌های دندانی بیماران در مقایسه با پیش از مداخله شد(۱۶). اگرچه وارنیش فلوراید هم‌چنان از عوامل مؤثر در پیشگیری از پوسیدگی به شمار می‌رود، مصرف آن در بیماران مبتلا به فلوروزیس و نیز بیماران مبتلا به اختلالات کلیوی توصیه نمی‌شود(۱۷). از طرف دیگر، پژوهش‌های پیشین

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-17]

تأثیر شایسته توجه استفاده هم‌زمان از عصاره‌های گیاهی مختلف را به همراه وارنیش MI بر باکتری‌های پوسیدگی‌زای دندانی نشان داده‌اند(۱۸)؛ لذا، مطالعه حاضر با هدف مقایسه خواص ضد میکروبی عصاره دانه انار (PSE) با وارنیش فلوراید MI و نیز بررسی اثر سینرژیسم احتمالی آن‌ها بر باکتری‌های پوسیدگی‌زای دندان (*استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*) صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی و آزمایشگاهی (in vitro) با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1400.460 در سال ۱۴۰۰، به تصویب کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی مازندران رسید و سپس، مراحل آن اجرا شد. ابتدا، گیاه انار تازه فصل پاییز (از یک نوع) از بازار معتبر تهیه شد و متخصص سیستماتیک واریته آن (انار شیرین) را مشخص کرد. سپس، نمونه هرباریومی از آن تهیه و برای آن، شماره هرباریومی تنظیم شد. پس از آن، پوست خارجی و پالپ میوه جدا شد و دانه‌های آریل‌دار میوه شسته شدند و برای مراحل بعد، از آن‌ها استفاده شد. بعد از این مرحله، با فشردن، آریل‌ها حذف و دانه‌ها در دمای ۴۰ درجه در خشک‌کن، به صورت کامل، خشک شدند. سپس، دانه‌ها تا اندازه مدنظر (۲۰۰ مش) پودر شدند و در ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد، در پرکولاتور، به مدت ۲۴ ساعت، خیسانده شدند. پس از اتمام روند عصاره‌گیری، عصاره‌ها صاف شدند و در خلأ، با دستگاه روتاری تغلیظ و با دستگاه فریزدرایر خشک شدند. عصاره‌های به دست آمده از نظر فنل و فلاوونوئید تام استانداردسازی شدند.

مقادیر تام ترکیبات فنولیک با استفاده از روش فولین سیوکالتیو تعیین شدند. در این مرحله، ۱ میلی‌لیتر از محلول ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتری عصاره با ۱ میلی‌لیتر محلول ۳ برابر رقیق شده واکنشگر فولین ترکیب و به لوله آزمایش منتقل شد. سپس، برای مدت ۵ دقیقه، در دمای اتاق و محلی تاریک انکوبه شد و ۱ میلی‌لیتر محلول ۱۰ درصد (W/W) سدیم‌کربنات به آن اضافه و برای مدت ۶۰ دقیقه، در دمای اتاق انکوبه شد. در نهایت، در طول موج ۷۶۵ نانومتر و با دستگاه اسپکتروفوتومتر، جذب آن خوانده شد. هم‌چنین، منحنی کالیبراسیون با استفاده از مقادیر استاندارد گالیک اسید و با اجرای پروسه قبلی برای گالیک اسید تهیه و تنظیم و مقدار تام ترکیبات فنولیک تعیین شد. این مراحل برای عصاره تا ۳ بار تکرار و نتایج به صورت میانگین ± انحراف استاندارد گزارش شد(۲۳-۱۹). هم‌چنین، به عنوان بلانک از محلولی استفاده شد که از ابتدا، بدون عصاره و حاوی بقیه اجزای واکنش باشد. مقادیر تام ترکیبات فلاوونوئیدی در عصاره تهیه شده با روش اسپکتروفوتومتریک آلومینیم کلرید تعیین شد. در این مرحله، ۱ میلی‌لیتر محلول ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتری عصاره با ۱ میلی‌لیتر محلول ۲ درصد آلومینیم کلرید در لوله آزمایش ترکیب و ۱/۵ میلی‌لیتر محلول ۵۰ گرم بر لیتری سدیم‌استات به آن‌ها افزوده شد و محلول حاصل به مدت ۲/۵ ساعت، در دمای اتاق و شرایط تاریک، انکوبه شد. در نهایت، در طول موج ۴۴۰ نانومتر و با دستگاه اسپکتروفوتومتر، جذب آن تعیین شد. هم‌چنین، منحنی کالیبراسیون با استفاده از مقادیر استاندارد کوئرستین و با اجرای پروسه قبلی برای آن، تهیه و تنظیم و مقدار تام فلاوونوئیدها تعیین شد. این مراحل برای هر عصاره تا ۳ بار تکرار و نتایج به صورت میانگین ± انحراف استاندارد گزارش شد(۲۱-۱۹). هم‌چنین، به عنوان بلانک از محلولی استفاده شد که از ابتدا، بدون عصاره و حاوی بقیه اجزای واکنش باشد.

بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌ها در آزمایش دیسک دیفیوژن

دو سویه باکتری در این مطالعه بررسی شدند *Streptococcus mutans ATCC 35668* و *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356* که به

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-17]

ترتیب، روی محیط‌های کشت میتیس سالیواریوس اگار و MRS agar (مرک، آلمان) کشت داده شدند. هر دو محیط کشت به مدت ۴۸ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. فعالیت‌های ضد باکتریایی عصاره‌های متانولی گیاهان مختلف با استفاده از روش انتشار دیسک، طبق روش استاندارد انجام شد(۲۴، ۲۵). این تست طبق توصیه مؤسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی با استفاده از روش دیسک آگار دیفیوژن انجام شد(۲۶). کلونی‌های کشت داده شده هر دو باکتری در سرم فیزیولوژیک حل شد و کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند (معادل $1/5\times10^{8}$ CFU/mL) تهیه شد. سپس، ۵ گروه تعیین شدند: G1: عصاره دانه انار (PSE)؛ G2: ترکیب وارنیش MI و PSE؛ G3: وارنیش MI (V-Varnish، Vericom، Korea)؛ G4: کنترل مثبت (اریترومایسین و آمپی‌سیلین (سیگما، آلمان))؛ G5: کنترل منفی (آب مقطر).

کدورت ۰/۵ مک فارلند از هر سویه باکتریایی به طور جداگانه، با استفاده از یک سواب استریل، به صفحات آگار مولر هینتون تلقیح شد. تمام دیسک‌های کاغذی استریل روی سطح آگار تلقیح شده مولر هینتون قرار گرفتند. سپس، به مقدار ۲۰ میکرولیتر از هریک از غلظت‌های تهیه شده از عصاره و وارنیش بر دیسک‌ها تلقیح شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انکوبه شدند و فعالیت ضد باکتریایی هر عصاره با اندازه‌گیری قطر منطقه مهار (میلی‌متر) بیان شد. این آزمایش برای اطمینان از سازگاری ۳ بار تکرار شد.

بررسی حداقل غلظت مهاری عصاره‌ها (Minimum Inhibitory Concentration (MIC))

به منظور تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) عصاره دانه انار و وارنیش فلوراید و ترکیب آن دو، از روش Micro Broth Dilution استفاده شد.

در این مطالعه، از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای U شکل استریل استفاده شده است. ابتدا، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث برای *استرپتوکوکوس موتانس* و MRS براث حاوی سیستئین برای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به تمام چاهک‌ها اضافه شد. سپس، رقت‌های سریالی از PSE، وارنیش فلوراید و ترکیب این دو در چاهک‌های میکروپلیت تهیه شد. میکروپلیت ۹۶ خانه ای U شکل دارای ۸ ردیف و ۱۲ ستون است. ستون‌های ۱ تا ۱۰ حاوی غلظت‌های مختلف ماده مدنظر و سوسپانسیون میکروبی بود و ستون ۱۱ به عنوان کنترل منفی، تنها حاوی محیط کشت و عصاره یا وارنیش یا ترکیب این دو و ستون ۱۲ به عنوان کنترل مثبت، حاوی محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی بود.

بدین صورت که ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از PSE با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به چاهک اول اضافه شد و سپس، غلظت‌های مختلف تا ۹ شماره رقت، به چاهک دوم تا چاهک آخر (۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶ و...) ریخته شد. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند ۱/۱۰۰ رقیق شده باکتری مدنظر به هریک از چاهک‌ها اضافه شد که در این حالت، تعداد باکتری‌ها در هر چاهک معادل 10^{5} CFU/mL خواهد بود. در نهایت، میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط مساعد هر باکتری (شرایط بی‌هوازی برای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و CO_2 ۱۰ درصد برای رشد *استرپتوکوکوس موتانس*) انکوبه شدند. با بررسی چشمی کدورت ایجاد شده در چاهک‌ها، کم‌ترین رقت از ماده مدنظر که در چاهک مربوط به آن رقت کدورتی مشاهده نمی‌شد، به عنوان میزان MIC در نظر گرفته شد. هم‌چنین، از پودر اریترومایسین و آمپی‌سیلین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد(۲۹-۲۷، ۲۰،۱۸). به منظور تأیید یافته‌های مطالعه، تمامی مراحل ۵ بار تکرار شدند(۱۸).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-17]

بررسی حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها (Minimum Bactericidal Concentration (MBC))

برای اجرای تست حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از اولین چاهکی که هیچ رشدی از ارگانیسم مدنظر را نشان نداده بود و ۳ تا ۴ چاهک بعدی، ۱۰ میکرولیتر نمونه برداشته و در محیط کشت بلاد آگار، کشت داده شد. نمونه‌ای که هیچ رشدی نشان نداد، حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

برای توصیف داده‌ها از شاخص‌های میانگین، انحراف معیار، درصد، جدول‌ها و نمودارهای مناسب استفاده شد. توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون‌های کولمگروف اسمیرنوف و شاپیروویلک بررسی شد و با توجه به توزیع داده‌ها، برای مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری در گروه‌های مختلف، از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) و آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد. برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 22 استفاده شد و مقادیر P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

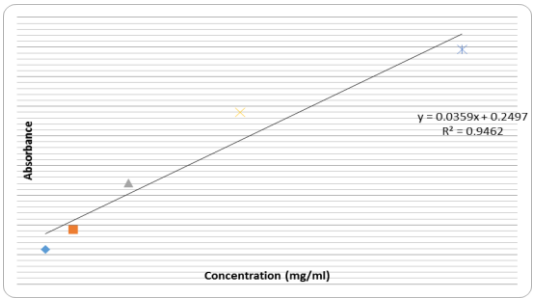
یافته‌ها

نتایج آزمایش فولین سیوکالتیو

میزان فنل گیاه انار معادل ۲۸۶/۵±۲۵/۶ میلی گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم گیاه محاسبه شد. منحنی کالیبراسیون در نمودار شماره ۱ شرح داده شده است.

نتایج آزمون دیسک دیفیوژن

میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* در کل آزمایش‌ها برابر با ۹/۶۷±۲/۰۶ بود. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* در عصاره های دانه انار، وارنیش و ترکیب انار و وارنیش به ترتیب، ۸/۰±۱/۰، ۹/۰±۱/۲۲ و ۱۲/۰±۰/۲۲ گزارش شد. نتایج آزمون تحلیل واریانس نشان داد که به صورت کلی، میانگین قطر هاله باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* در آزمون دیسک دیفیوژن در گروه‌ها متفاوت و دارای اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱). به همین دلیل، از آزمون تعقیبی بونفرونی برای مقایسه دوبه‌دو میانگین گروه‌ها استفاده شد. در جدول شماره ۱، مقایسه دوبه‌دو گروه‌ها از نظر میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس*، با استفاده از آزمون تعقیبی گزارش شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، هاله مهار رشد این باکتری در عصاره سینرژیسم انار و وارنیش با هر دو گروه اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)؛ اما اختلاف معنی‌داری بین دو گروه دانه انار و وارنیش مشاهده نشد (P=۰/۵۸۸).



نمودار شماره ۱: منحنی استاندارد ترکیب گالیک اسید

جدول شماره ۱: مقایسه دوبه‌دو گروه‌های حاوی عصاره‌های ضد باکتری‌های دهانی، از نظر میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* با استفاده از آزمون تعقیبی

عصاره	عصاره دانه انار	وارنیش	ترکیب عصاره دانه انار و وارنیش
عصاره دانه انار	-	۰/۵۸۸	<۰/۰۰۱
وارنیش		-	۰/۰۰۴
ترکیب عصاره دانه انار و وارنیش			-

میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در کل آزمایش‌ها برابر با ۹/۳۳±۴/۰۸ بود. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در PSE، وارنیش، ترکیب PSE و وارنیش به ترتیب، ۴/۰±۱/۵۸، ۱۲/۰±۱/۲۲ و ۱۲/۰±۱/۰ گزارش شد. نتایج آزمون تحلیل واریانس نشان داد که به صورت کلی، میانگین قطر هاله مهار رشد باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در آزمون دیسک دیفیوژن

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-17]

در گروه‌ها متفاوت و دارای اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱). به همین دلیل، از آزمون تعقیبی برای مقایسه دوبه‌دو میانگین قطر هاله مهار رشد گروه‌ها استفاده شد. در جدول شماره ۲، مقایسه‌های دوبه‌دو گروه‌ها از نظر میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، با استفاده از آزمون تعقیبی بونفرونی گزارش شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، هاله مهار رشد این باکتری در PSE، با هر دو گروه اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)؛ اما اختلاف معنی‌داری بین دو گروه وارنیش و سینرژیسم PSE و وارنیش مشاهده نشد (P>۰/۹۹۹).

نتایج حداقل غلظت مهاری و کشندگی عصاره‌ها

با توجه به جدول شماره ۳، بیش‌ترین حداقل غلظت مهاری و کشندگی در هر دو گونه باکتریایی مربوط به PSE بود و کم‌ترین غلظت مهاری و کشندگی نیز در هر دو گونه متعلق به وارنیش بود.

جدول شماره ۲: مقایسه دوبه‌دو گروه‌های حاوی عصاره‌های ضد باکتری‌های دهانی، از نظر میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با استفاده از آزمون تعقیبی

عصاره	عصاره دانه انار	وارنیش	ترکیب عصاره دانه انار و وارنیش
دانه انار	-	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱
وارنیش		-	>۰/۹۹۹
ترکیب عصاره دانه انار و وارنیش			-

جدول شماره ۳: حداقل غلظت مهاری و کشندگی در باکتری های *استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در عصاره های مختلف ضد باکتری‌های دهانی (بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر)

عصاره	*استرپتوکوکوس موتانس*		*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*	
	MIC	MBC	MIC	MBC
عصاره دانه انار	۷۸۱/۲۵	۶۲۵۰	۱۵۶۲/۲۵	۱۲۵۰۰
وارنیش	۲۴/۴۱	۹۷/۶۵	۹۷/۶۵	۳۹۰/۶۲
ترکیب عصاره دانه انار و وارنیش	۹۷/۶۵	۳۹۰/۶۲	۱۹۵/۳۱	۲۵۶۲/۵

بحث

در مطالعه حاضر که با هدف مقایسه اثرهای آنتی‌میکروبیال عصاره دانه انار با وارنیش فلورایـد علیه *استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* انجام گرفت، مقایسه قطر هاله‌های عدم رشد عصاره‌ها نشان داد که وارنیش فلورایـد بیش از PSE سبب مهار رشد هر دو گونه باکتریایی مورد مطالعه شده است. از نگاه آماری، تفاوت قطر هاله عدم رشد در دو عصاره مذکور در گونه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* چشمگیر گزارش شد، در حالی که برتری آماری چشمگیری میان دو عصاره در *استرپتوکوکوس موتانس* دیده نشد. هم‌چنین، PSE در هر دو گونه باکتریایی، با تشکیل هاله ای سبب مهار رشد کلونی‌ها شده بود. با این حال، قطر هاله مهار رشد در *استرپتوکوکوس موتانس* بیش‌تر بود. Vahid-Dastjerdi و همکاران کاهش بیان ژن‌های گلیکوزیل ترانسفراز موجود در *استرپتوکوکوس موتانس* در محیطی حاوی عصاره گل انار را نسبت به گروه کنترل گزارش کردند(۳۰). از آن‌جا که گلیکوزیل ترانسفراز از آنزیم‌های مهم در تشکیل بیوفیلم باکتریایی به شمار می‌رود، مطالعه ایشان استفاده از محصولات حاوی عصاره‌های طبیعی انار را به عنوان ضد پلاک پیشنهاد می‌کرد(۳۰). مطالعه حاضر نیز اثر ضد میکروبی گیاه انار علیه این گونه باکتریایی را تأیید می‌کند. Hajifattahi و همکاران در مطالعه خود، به بررسی خواص آنتی‌باکتریال عصاره هیدروالکلیک انار علیه میکروارگانیسم‌های شایع دهانی پرداختند(۳۱). بررسی قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گوناگون در مطالعه ایشان نیز اثرهای آنتی‌باکتریال درخور توجه عصاره انار را علیه *استرپتوکوکوس موتانس* نشان داد. Subramaniam و همکاران نیز تشکیل هاله مهار رشد را در تمامی غلظت‌های مورد مطالعه خود علیه *استرپتوکوکوس موتانس* گزارش کردند(۱۴).

یافته‌های این دو مطالعه هم‌سو با نتایج مطالعه حاضر است. در پژوهش Satta وهمکاران نیز اثرهای آب انار علیه *استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مطالعه شد(۳۲). نتایج آزمون دیسک دیفیوژن نشان داد که آب انار در غلظت‌هایی به جز ۱۰ درصد، در تمامی نمونه‌های *استرپتوکوکوس موتانس*، باعث ایجاد هاله های مهار رشد شده بود. این در حالی بود که در ۲ نمونه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-17]

از ۷ نمونه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* هیچ هاله رشدی شکل نگرفته بود و به طور میانگین، قطر هاله در این گونه کم‌تر از *استرپتوکوکوس موتانس* گزارش شد. این نتایج نیز هم‌سو با مطالعه حاضر بود و به نظر می‌رسد که خواص مهاری انار بر *استرپتوکوکوس موتانس* چشمگیرتر از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* باشد.

در مطالعه حاضر، مقادیر حداقل غلظت مهاری (MIC) در برابر *استرپتوکوکوس موتانس* در گروه‌های PSE، وارنیش MI و ترکیب دو عصاره، به ترتیب ۷۸۱/۲۵، ۲۴/۴۱ و ۹۷/۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. حداقل غلظت کشندگی (MBC) در برابر *استرپتوکوکوس موتانس* نیز در گروه‌های PSE، وارنیش MI و گروه ترکیب، به ترتیب ۶۲۵۰، ۹۷/۶۵ و ۳۹۰/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. MIC و MBC در گروه PSE، بیش‌تر از سایر گروه‌ها بود و وارنیش MI به تنهایی دارای حداقل MIC و MBC بود. لذا، وارنیش فلوراید در مقایسه با PSE در غلظت‌های پایین‌تری بر *استرپتوکوکوس موتانس* اثرگذار است. Ferrazzano و همکاران با بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های هیدروالکلیک پوست و آب انار در برابر *استرپتوکوکوس موتانس*، MIC و MBC عصاره آب انار را به ترتیب، ۲۵۰۰۰ و ۴۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند، در حالی که MIC و MBC عصاره پوست انار به ترتیب، ۱۰۰۰۰ و ۱۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ثبت رسید(۳۳).

Hajifattahi و همکاران نیز MIC و MBC عصاره گلبرگ گیاه انار را ۳۹۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند(۳۱). این دو مطالعه از نقطه نظر اثرهای مهاری و کشندگی گیاه انار بر *استرپتوکوکوس موتانس* با مطالعه حاضر هم‌سو هستند. با این حال، اختلاف در مقادیر MIC و MBC می‌تواند به دلیل استفاده از مواد مؤثر مختلف انار باشد. در مطالعه حاضر، از عصاره دانه انار استفاده شد و مقادیر بسیار پایین‌تری نیز برای MIC و MBC در برابر *استرپتوکوکوس موتانس* گزارش شد. Vahid-Dastjerdi و همکاران نیز MIC عصاره گل انار علیه این گونه باکتریایی را ۵۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش کرده‌اند که بسیار بالاتر از مطالعه حاضر است(۳۴). با مقایسه مطالعه حاضر با پژوهش‌های فوق، به نظر می‌رسد که عصاره دانه انار خواص آنتی‌باکتریال بالاتری را نسبت به دیگر محصولات گیاه انار علیه *استرپتوکوکوس موتانس* داشته باشد. با این حال، در مطالعه Gulube و همکاران، MBC عصاره پوست میوه انار علیه این باکتری ۶۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ثبت رسید و عصاره خام پوست انار و PSE نتایج مشابهی در MBC نشان دادند(۳۵).

در مطالعه حاضر، مقادیر MIC در برابر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در گروه‌های PSE، وارنیش MI و گروه ترکیب دو عصاره، به ترتیب ۱۵۶۲/۲۵، ۹۷/۶۵ و ۱۹۵/۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. مقادیر MBC در برابر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نیز در گروه‌های PSE، وارنیش MI و گروه ترکیب، به ترتیب ۱۲۵۰۰، ۳۹۰/۶۲ و ۱۵۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. هم‌چون *استرپتوکوکوس موتانس*، در *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نیز MIC و MBC در گروه PSE، بیش از سایر گروه‌ها بود و وارنیش به تنهایی دارای کم‌ترین MIC و MBC بود. حداقل غلظت مهاری و کشندگی عصاره‌های گیاه انار در برابر این گونه باکتریایی تا کنون در هیچ پژوهشی بررسی نشده است و لذا، امکان مقایسه یافته‌های این پژوهش با مطالعات دیگر وجود ندارد. با این حال، غلظت‌های ثبت شده می‌تواند نشان دهنده اثرگذاری مهاری و کشندگی بالاتر عصاره‌های مورد مطالعه در غلظت‌های یکسان علیه *استرپتوکوکوس موتانس* نسبت به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* باشد. یافته‌هایی مشابه در مطالعات Mittal و همکاران(۳۶) و Satta و همکاران(۳۲) نیز به ثبت رسیده است. به نظر می‌رسد پژوهش‌ها به منظور یافتن عصاره ای مؤثر بر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، بایستی درباره دیگر گیاهان دارویی صورت گیرد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-17]

در این مطالعه، ترکیب وارنیش فلوراید و PSE به صورت چشمگیری، سبب افزایش قطر هاله عدم رشد *استرپتوکوکوس موتانس* نسبت به گروه وارنیش فلوراید شد. با این حال، قطر هاله گروه وارنیش و گروه ترکیب دو عصاره تفاوتی در *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نداشتند. هم‌چنین، افزودن PSE به وارنیش در هر دو گونه، سبب افزایش اندک در MIC و MBC نسبت به گروه وارنیش شد. امروزه، در دندان‌پزشکی پیشگیرانه، به اثرهای ضد پوسیدگی فلوراید که ناشی از مهار دمینرالیزاسیون و تحریک رمینرالیزاسیون پوسیدگی‌های اولیه است، بسیار توجه می‌شود(۳۷). V وارنیش استفاده شده در مطالعه حاضر، حاوی قند زایلیتول و CPP-ACP (نوعی پروتئین استخراج شده از شیر که به یون‌های کلسیم و فسفات متصل شده است) بود. زایلیتول عاملی مؤثر بر مهار رشد *استرپتوکوکوس موتانس* حفره دهان است. CPP-ACP نیز تقویت کننده چسبندگی یون‌های کلسیم و فلوراید در محیط دهان است و رمینرالیزاسیون پوسیدگی‌های اولیه را سرعت می‌بخشد(۳۸). گیاه انار بومی فلات ایران است و از دیرباز، گیاهی مهم در طب سنتی ایرانی به شمار می‌رود(۳۹). مصرف محصولات انار و نیز نوشیدن آب انار برای بهبود سلامت دهان و دندان، سابقه‌ای دیرینه دارد(۴۰). امروزه، پژوهشگران فلاونوئیدهای پلی‌فنولیک را مسئول خواص آنتی‌باکتریال، ضد التهاب و آنتی‌اکسیدانی این گیاه می دانند(۴۰). فلاونوئیدها با کاهش قابل توجه فعالیت آنزیم های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلفا گلوکوزیداز و نیز افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی سرولوپلاسمین، نقش بسزایی در افزایش سلامت دهان، دندان و بافت های پریودنتال ایفا می کنند(۴۰).

یافته‌های این مطالعه تأیید کننده اثرگذاری فوق‌العاده وارنیش فلوراید بر دو گونه باکتریایی مهم (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *استرپتوکوکوس موتانس*) در پوسیدگی‌های دندانی بود؛ با این حال، با توجه به محدودیت‌های استفاده از آن، به نظر می‌رسد که از غلظت‌های بالای PSE می‌توان به عنوان جایگزینی مناسب برای فلوراید در برابر *استرپتوکوکوس موتانس* استفاده کرد. در مطالعه حاضر، عصاره دانه انار عملکرد ضعیفی را در برابر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به ثبت رساند؛ با این حال، به نظر می‌رسد که اثرهای سینرژیستی مطلوبی در مصرف هم‌زمان وارنیش فلوراید و این عصاره علیه *استرپتوکوکوس موتانس* وجود داشته باشد.

مطالعه آزمایشگاهی حاضر هم‌چون تمامی پژوهش های in-vitro، بدون در نظر گرفتن شرایط و متغیرهای تأثیرگذار بالینی مانند تغذیه، رعایت بهداشت، اسیدیته، حجم، خاصیت بافری و غلظت بزاق، اثرهای باکتری های موجود در فلور نرمال و نیز دیگر میکروارگانیسم های پوسیدگی‌زای کلونیزه شونده در حفره‌ی دهانی انجام گرفت؛ لذا، با توجه به یافته‌های این مطالعه و خواص آنتی‌باکتریال درخور توجه عصاره دانه انار علیه *استرپتوکوکوس موتانس* و نیز اثرهای هم‌افزایی آن در ترکیب با وارنیش فلوراید، توصیه می‌شود که پژوهش هایی بالینی هم‌راستا با این مطالعه صورت گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی مصوب از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران و با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1400.460 است. بدین‌وسیله، از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر به عمل می‌آید.

References

1. Vijayakumar A, Sarveswari HB, Vasudevan S, Shanmugam K, Solomon AP, Neelakantan P. Baicalein Inhibits Streptococcus mutans Biofilms and Dental Caries-Related

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-17]

Virulence Phenotypes. Antibiotics 2021; 10(2): 215.
2. Hashem ZS, Hashem AS. An in vitro study on the antifungal and antibiofilm activities of probiotic bacteria against Candida species isolated from orthodontic appliances and dental caries. Nov Res Microb J 2021; 5(2): 1176-93.
3. Delimont NM, Carlson BN. Prevention of dental caries by grape seed extract supplementation: A systematic review. Nutr Health 2020; 26(1): 43-52.
4. Bijle MN, Ekambaram M, Lo EC, Yiu CKY. The enamel remineralization potential of fluoride varnishes containing arginine. J Dent 2020; 99: 103411.
5. Cochrane NJ, Shen P, Yuan Y ,Reynolds EC. Ion release from calcium and fluoride containing dental varnishes. Aust Dent J 2014; 59(1): 100-5.
6. Baik A, Alamoudi N, El-Housseiny A, Altuwirqi A. Fluoride varnishes for preventing occlusal dental caries: A review. Dent J 2021; 9(6): 64.
7. Jain I, Jain P, Bisht D, Sharma A, Srivastava B, Gupta N. Comparative evaluation of antibacterial efficacy of six Indian plant extracts against Streptococcus mutans. J Clin Diagn Res 2015; 9(2): ZC50-ZC3.
8. Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A ,Pinto G, Pollio A. Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. Molecules 2011; 16(2): 1486-507.
9. Tahmourespour A, Aminzadeh A, Salehifard I. Anti-adherence and anti-bacterial activities of Pistacia atlantica resin extract against strongly adherent Streptococcus mutans strains. Dent Res J 2022; 19: 36.
10. Ferrazzano GF, Roberto L, Catania MR, Chiaviello A, De Natale A, Roscetto E, et al. Screening and scoring of antimicrobial and biological activities of Italian vulnerary plants against major oral pathogenic bacteria. Evid Based Complementary Altern Med 2013; 2013: 1-10.
11. Prasad D, Kunnaiah R. Punica granatum: A review on its potential role in treating periodontal disease. J Indian Soc Periodontol 2014; 18(4): 428-32.
12. Howell AB, D'Souza DH. The pomegranate: effects on bacteria and viruses that influence human health. Evid Based Complementary Altern Med 2013; 2013: 1-11.
13. Ismail T, Sestili P, Akhtar S. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. J Ethnopharmacol 2012; 143(2): 397-405.
14. Subramaniam P, Dwivedi S, Uma E, Babu KG. Effect of pomegranate and aloe vera extract on streptococcus mutans: An: in vitro: study. Dent Hypotheses 2012; 3(3): 99-105.
15. El-Sharkawy MS .Evaluation of the antimicrobial effect of pomegranate extract on Streptococcus mutans. Al-Azhar Dent J Girls 2019; 6(4): 467-73.
16. Kote S, Kote S, Nagesh L. Effect of pomegranate juice on dental plaque microorganisms (streptococci and lactobacilli). Anc Sci Life 2011; 31(2): 49-51.
17. Abuzenada BM, Souror YR, Waly AS, Abo Khalifa YH. Mutans streptococci growth on glass ionomer incorporated with chlorhexidine: in-vivo study. Braz dent sci 2020; 23(2): 1-7.
18. 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): 2328-2334.
19. Swadas M, Dave B, Vyas SM, Shah N.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-17]

Evaluation and comparison of the antibacterial activity against Streptococcus mutans of grape seed extract at different concentrations with chlorhexidine gluconate: An in vitro study. Int J Clin Pediatr Dent 2016; 9(3): 181-185.

20. Mirkarimi M, Amin-Marashi SM, Bargrizan M, Abtahi A, Fooladi I, Ali A. The antimicrobial activity of grape seed extract against two important oral pathogens. Zahedan J Res Med Sci 2013; 15(1): 43-6.
21. Mousavi F, Shirzadi Karamolah K, Mahmoudi H. Antimicrobial Effect of Extracts of Daphne Oleoides on Bacteria Isolated from Dental Plaque. J Mashhad Dent Sch 2019; 43(4): 387-400 (Persian).
22. Shafiee F, Khoshvishkaie E, Davoodi A, Dashti Kalantar A, Bakhshi Jouybari H, Ataee R. The determination of blood glucose lowering and metabolic effects of Mespilus germanica L. hydroacetonic extract on streptozocin-induced diabetic Balb/c mice. Medicines 2018; 5(1): 1.
23. Fakhri M, Davoodi A, Parviz M, Sadeghi Ghadi Z, Mousavinasab SN, Farhadi R, et al. Characterization and HPLC analysis of manna from some Cotoneaster species. Int J Pharm Sci Res 2017; 8(12): 5360-66.
24. Bauer A. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am J clin pathol 1966; 45(4): 149-58.
25. Zaidan M, Noor Rain A, Badrul A, Adlin A, Norazah A, Zakiah I. In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. Trop biomed 2005; 22(2): 165-170.
26. Wayne P. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Inform Suppl 2011; 31(1): 100-121.
27. Zarei M, Rajabnia M, Moghadamnia AA, Khafri S, Khodadadi E. Effect of different Vitis vinifera seed extracts on lactobacillus acidophilus and casei bacteria. Caspian J Dent Res 2021; 10(1): 42-47.
28. 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.
29. Fakhri E. Evaluation of antimicrobial efficacy of grape seed extract and Nd: YAG against persistent endodontic pathogens: Tabriz University of Medical Sciences, School of dentistry 2018.
30. Vahid-Dastjerdi E, Monadi E, Khalighi HR, Torshabi M. Down-regulation of glycosyl transferase genes in Streptococcus mutans by Punica granatum L. flower and Rhus coriaria L. fruit water extracts. Iran J Pharm Res 2016; 15(2): 513-519.
31. Hajifattahi F, Moravej-Salehi E, Taheri M, Mahboubi A, Kamalinejad M. Antibacterial effect of hydroalcoholic extract of Punica granatum Linn. petal on common oral microorganisms. Int J Biomater 2016;2016: 8098943.
32. Satta BOA, Hasan AM, Khashman BM, Hafeadh HA-H. Study of Antimicrobial Activity to Pomegranate Juice Against Some of Dental Pathogenes. J Coll Basic Educ 2013; 19(72).
33. Ferrazzano GF, Scioscia E, Sateriale D, Pastore G, Colicchio R, Pagliuca C, et al. In vitro antibacterial activity of pomegranate juice and peel extracts on cariogenic bacteria. BioMed res int 2017; 2017: 2152749.
34. Vahid-Dastjerdi E, Abdolazimi Z, Ghazanfarian M, Amdjadi P, Kamalinejad M, Mahboubi A. Effect of Punica granatum L. flower water

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-17]

extract on five common oral bacteria and bacterial biofilm formation on orthodontic wire. Iran J public health 2014; 43(12): 1688-1694.

35. Gulube Z, Patel M. Effect of Punica granatum on the virulence factors of cariogenic bacteria Streptococcus mutans. Microb Pathog 2016; 98 : 45-49.
36. Mittal S, Hiregoudar M, Subramaniam R, Muralikrishna K, Sakeenabi B, Prashant G, et al. Effect of three herbal extracts against Streptococcus mutansobacillus acidophilus in comparison to Chlorhexidine. J Indian Assoc Public Health Dent 2011; 9(Suppl 1): S336-S40.
37. Jullien S. Prophylaxis of caries with fluoride for children under five years. BMC Pediatr 2021; 21(1): 1-11.
38. 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.
39. Kiany F, Niknahad H, Niknahad M. Assessing the effect of pomegranate fruit seed extract mouthwash on dental plaque and gingival inflammation. J Dent Res Rev 2016; 3(4).
40. Narayan T, Deshpande S, Jha A, Ramprasad V. Punica granatum (Pomegranate) fruit and its relevance in oral hygiene. J Dent Med Sci 2014; 13(8): 29-34.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-06-17]