

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

BİTKİ EKSTRATLARININ ÇÜRÜK ETKENİ BAKTERİLER ÜZERİNDEKİ
ANTİBAKTERİYAL ETKİNLİĞİ, SİTOTOKSİTE VE APOPİTOZ-NEKROZ
İNDEKSLEMESİNİN İN VİTRO OLARAK İNCELENMESİ

Esra GÜLAL

RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ertuğrul ERCAN

2015 – KIRIKKALE

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

BİTKİ EKSTRATLARININ ÇÜRÜK ETKENİ BAKTERİLER ÜZERİNDEKİ
ANTİBAKTERİYAL ETKİNLİĞİ, SİTOTOKSİTE VE APOPİTOZ-NEKROZ
İNDEKSLEMESİNİN İN VİTRO OLARAK İNCELENMESİ

Esra GÜLAL

RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ertuğrul ERCAN



Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje No: 114S883

2015 – KIRIKKALE

Kırıkkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Restoratif Diş Tedavisi Uzmanlık Eğitimi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04/ 01/2016

İmza

Prof. Dr. Gürkan GÜR

Ankara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Abdülkadir ŞENGÜN

Kırıkkale Üniversitesi, Diş Hekimliği
Fakültesi

Üye

İmza

Prof. Dr. Ç. Türksel DÜLGERGİL

Kırıkkale Üniversitesi, Diş Hekimliği
Fakültesi

Üye

İmza

Prof. Dr. Ertuğrul ERCAN

Kırıkkale Üniversitesi, Diş Hekimliği
Fakültesi

Danışman

Yrd. Doç. Dr. M. Mustafa HAMİDİ

Kırıkkale Üniversitesi, Diş Hekimliği
Fakültesi

Üye

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
İçindekiler	III
Önsöz	VI
Simgeler ve Kısaltmalar	VII
Şekiller	IX
Çizelgeler	XI
ÖZET	1
SUMMARY	2
1 GİRİŞ.....	3
1.1 Diş Çürüğü ve Etyolojisi	3
1.1.1 Bireysel Faktörler	4
1.1.2 Çevresel Faktörler	8
1.2 Diş Çürüğünü Önlemeye Yönelik Uygulamalar	9
1.2.1 Diş Dokusunun Güçlendirilmesi	9
1.2.2 Diyetin Modifiye Edilmesi.....	9
1.2.3 Plağın Uzaklaştırılması ve Antibakteriyel Ajanların Kullanımı	10
1.3 Kullanılan Bitkiler Ve Özellikleri	13
1.3.1 <i>Salvadora Persica</i> (Misvak).....	13
1.3.2 <i>Olea Europaea</i> (Zeytin Yaprağı)	17
1.3.3 <i>Curcuma Longa</i> (Zerdeçal)	19
1.3.4 <i>Plantago Lanceolata</i> (Damar otu)	21
1.3.5 <i>Equistum Arvense</i> (Kırk Kilit otu).....	24
1.4 Ekstraksiyon Yöntemleri	27
1.4.1 Soxhlet Ekstraksiyonu.....	27
1.4.2 Ultrasonik Ekstraksiyon	28
1.4.3 Mikrodalga Ekstraksiyon	29

1.4.4	Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyonu.....	30
1.4.5	Süperkritik Ekstraksiyon.....	31
1.5	1.5 BESİYERLERİ	33
1.5.1	Besiyeri Bileşiminde Bulunan Maddeler	43
1.5.2	Fiziksel Özelliklerine Göre Besiyerleri.....	44
1.5.3	Kimyasal Özelliklerine Göre Besiyerleri.....	44
1.5.4	Fonksiyonlarına Göre Besiyerleri	44
1.6	ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ.....	39
1.6.1	Disk Difüzyon Testleri.....	39
1.6.2	Dilüsyon Testleri.....	40
1.6.3	Gradient Strip Testleri.....	42
1.6.4	Otomatize Yöntemler (Vitec).....	42
1.7	SİTOTOKSİTE	33
1.7.1	Direk Hücre Kültürü ve Eksrakt Testi	33
1.7.2	Filtre Difüzyon Testi	34
1.7.3	Dentin Bariyer Testi.....	34
1.7.4	Canlılık Değerlendirme Testleri.....	34
1.7.5	Morfolojik Değerlendirme Testleri	35
1.7.6	Proliferasyon Değerlendirme Testleri	35
1.7.7	Metabolizma Değerlendiren Testler.....	36
1.8	Apoptoz ve Nekroz Nedir?.....	37
1.8.1	Morfolojik İnceleme Yöntemleri	37
1.8.2	İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemleri	38
1.8.3	Biyokimyasal İnceleme Yöntemler.....	38
2	GEREÇ ve YÖNTEM	46
2.1	Antimikrobiyal Aktivite Testi	46
2.2	Hücre Kültürü.....	55

2.3	MTT testi ile sitotoksitenin belirlenmesi.....	57
2.4	İkili Boyama Metodu İle Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi	59
3	BULGULAR	63
4	TARTIŞMA ve SONUÇ	73
5	KAYNAKÇA.....	73

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren ve akademik hayatta başarılarını ve saygınlığını örnek aldığım danışman hocam Prof. Dr.Ertuğrul ERCAN'a;

Her koşulda büyük desteklerini gördüğüm Prof. Dr. Abdülkadir ŞENGÜN ve Prof. Dr. Ç. Türksel DÜLGERGİL'e;

Birlikte geçirdiğimiz süre boyunca birbirimize destek olduğumuz, uzmanlık eğitimimi güzelleştiren ve kolaylaştıran çok kıymetli arkadaşlarıma,

Emeklerini tarif edemeyeceğim, varlıklarından büyük kuvvet aldığım ve çok sevdiğim kıymetli annem Havva Üzümcü, babam Mehmet Üzümcü, ablam Hanife Akın, kardeşim Niyazi Üzümcü, her koşulda desteğini esirgemeyen sevgili eşim Alperen Gülal'a ve yaşama sevincim, oğlum Mehmet Mete Gülal'a

Teşekkür ederim...

SİMGELER VE KISALTMALAR

NaCl: Sodyum klorür

pH: Hidrojen yoğunluğu

LTR: Viral long terminal repeat

CO₂: Karbon dioksit

HIV-1: İnsan bağışıklık eksikliği virüsü

ppm: Milyonda bir birim

TNF- α : Tümör nekroz faktörü alfa

CPP-ACP: Kazein fosfopeptit amorf kalsiyum fosfat

BITC: Benzil- izo- tiyosiyonat

IL- β : İnterlökin B

IRI: Plazma immünoreaktif insülin

MCF-7: Meme adenokarsinoma hücre hattı

kHZ: Kilo hertz

UACC-62: Melanoma hücre hattı

MHz: Mega hertz

L-929 : Fare fibroblast hücre hattı

Mpa: Mega paskal

LC₅₀: Letal konsantrasyon

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon

CFU: Koloni oluşturan ünite

PI: Propodyum iyodür

LDH: Laktat dehidrogenaz

ATTC: Amerika Kültür Koleksiyonu

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

Tripsin EDTA: Tripsin Etilendiamin tetraasetik asit

NADH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit

NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

DMSO: Di metil sülfoksit

PBS: Fosfat tampon zltisi

DAPI: 4,6-diamidine-2'-phenylindole

FITC: Fluorescein isothiocyanate

IMPDH: İnozin monofosfat dehidrogenaz enzimi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1 Çürük dengesi (şematik)	4
Şekil 1.2 Klorheksidin'in kimyasal formülü	11
Şekil 1.3 Sanguinaria Bitkisi	13
Şekil 1.4 Salvadora Persica(Misvak)	17
Şekil 1.5 Oloropin ve Hidroksitirozol'un kimyasal formülü	19
Şekil 1.6 Curcumin'in kimyasal formülü	21
Şekil 1.7 Plantago Lanceolata (Damar otu)	24
Şekil 1.8 Equistum Arvense (Kırkkilit otu)	27
Şekil 1.9 Soxhlet Ekstraktörü	29
Şekil 1.10 Ultrasonik Ekstraksiyon Cihazı	30
Şekil 1.11 Mikrodalga Ekstraksiyon Cihazı	31
Şekil 1.12 Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyon Cihazı	32
Şekil 1.13 Süperkritik Ekstraksiyon Cihazı	33
Şekil 1.14 MİK hesaplanması (şematik)	45
Şekil 1.15 Mikrodilüsyon testi (şematik)	45
Şekil 1.16 E test	46
Şekil 1.17 Petrilere hazırlanmış agarlı besiyeri	50
Şekil 2.1 a) Misvak, b) Zerdeçal c) Kırk kilit otu, d) Damar otu, e) Zeytin yaprağı	50
Şekil 2.2 Farklı konsantrasyonları hazırlanmış bitki ekstraktları	52
Şekil 2.3 Farklı konsantrasyonlarda ekstrakt emdirilmiş diskler	52
Şekil 2.4 Streptokokus mutans, Misvak	53
Şekil 2.5 Streptokokus mutans, Zeytin yaprağı	53
Şekil 2.6 Streptokokus mutans, Damar otu	54
Şekil 2.7 Streptokokus mutans, Zerdaçal	54
Şekil 2.8:Lactobacillus acidofilus, zerdeçal, (400,100, 12.5)	55

Şekil 2.9 <i>Lactobacillus acidophilus</i> , kırkkilit otu, (200, 50, 25)	55
Şekil 2.10 <i>Actinobacillus actinomycescomitans</i> , Misvak	56
Şekil 2.11 <i>Actinobacillus actinomycescomitans</i> , Zeytin yaprağı	56
Şekil 2.12 <i>Actinobacillus actinomycescomitans</i> , gentamisin ve boş disk	57
Şekil 2.13 <i>Lactobacillus acidophilus</i> , gentamisin ve boş disk	57
Şekil 2.14 <i>Streptococcus mutans</i> , gentamisin ve boş disk	57
Şekil 2.15 MİC hesaplaması için hazırlanmış ekstraktlar	58
Şekil 2.16 <i>Lactobacillus acidophilus</i> , Misvak	58
Şekil 2.17 <i>Lactobacillus acidophilus</i> , Zeytin yaprağı	58
Şekil 2.18 <i>Lactobacillus acidophilus</i> , Damar otu	59
Şekil 2.19 <i>Actinobacillus actinomycescomitans</i> , Kırkkilit otu	59
Şekil 2.20 <i>Actinobacillus actinomycescomitans</i> , Damar otu	59
Şekil 2.21 <i>Actinobacillus actinomycescomitans</i> , Zeytin yaprağı	59
Şekil 2.22 <i>Streptokokus mutans</i> , Zerdeçal	60
Şekil 2.23 <i>Streptokokus mutans</i> , Misvak	60
Şekil 2.24 <i>Streptokokus mutans</i> , Zeytin yaprağı	60
Şekil 2.25 Hücre ekimi yapılmış flasklar	61
Şekil 2.26 CO ₂ 'li inkübatör	61
Şekil 2.27 Hücrelerin pasajlanması	62
Şekil 2.28 Hücre sayım cihazı (cell counter)	63
Şekil 2.29 ELİSA cihazı	63
Şekil 2.30 Apoptoza uğrayan hücreler (A, B, C, D)	65
Şekil 2.31 Nekroza uğrayan hücreler (A, B,C, D)	66
Şekil 3.1 <i>Streptococcus mutans</i> 'a ait zon çapları	69
Şekil 3.2 <i>Actinobacillus actinomyctemcomitans</i> 'a ait zon çapı bulguları	71
Şekil 3.3: Canlılık yüzdeleri	74

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1 Apoptoz ve nekroz arasındaki farklılıklar	40
Çizelge 3.1 <i>Streptococcus mutans</i> 'a ait zon çapları	69
Çizelge 3.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i> 'a ait zon çapı bulguları	70
Çizelge 3.3 <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> 'a ait zon çapı bulguları	70
Çizelge 3.4 Üreme var (+), Üreme yok (-) tablosu	72
Çizelge 3.5 MİC tablosu	72
Çizelge 3.6 Nekroz yüzdesel (%) oranları	73
Çizelge 3.7 Canlılık oranları (%)	73
Çizelge 3.8 <i>S.mutans</i> 'da Konsantrasyonlara Göre Zon Çapları Bakımından Gruplar Arasındaki Farklılığa İlişkin Kruskal Wallis H Testi Sonuçları	75
Çizelge 3.9 <i>Actinobacillus Actinomycetemcomitans</i> Konsantrasyonlara Göre Zon Çapları Bakımından Gruplar Arasındaki Farklılığa İlişkin Kruskal Wallis H Testi Sonuçları	76
Çizelge 3.10 Konsantrasyonlara Göre Canlılık Oranları Bakımından Gruplar Arasındaki Farklılığa İlişkin Kruskal Wallis H Testi Sonuçları	77

Bitki Ekstratlarının Çürük Etkeni Bakteriler Üzerindeki Antibakteriyal Etkinliği, Sitotoksite ve Apoptoz-Nekroz İndekslemesinin İn Vitro Olarak İncelenmesi

Diş çürüğü, tüm dünyada en sık görülen enfeksiyöz bir ağız hastalığıdır. Antimikrobiyal kullanımı da çürük oluşumunu önlemede etkili yöntemlerin başında gelmektedir. Çalışmamızda farklı bitki ekstraktlarının, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Actinobacillus Actinomycescomitans* bakterileri üzerindeki antimikrobiyal etkinliğinin disk difüzyon yöntemi ile incelenmesi, aynı zamanda farklı konsantrasyonlarda uygulanacak bitki ekstraktlarının fare fibroblastı hücrelerinde olası apoptotik ve sitotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Misvak, *zeytin yaprağı*, *zerdeçal*, *damar otu*, *kırk kilit otu* bitkilerinden Soxhlet ekstraksiyonu yöntemi ile ekstraktlar elde edildi. Antimikrobiyal etkinlik disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemi ile belirlendi. Sitotoksite için, 96 kuyucuklu plakaya her bir kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve hücre canlılığı MTT yöntemi (3,4,5-dimetiltiazol-2,5 bifenil tetrazolium bromid) ile saptandı. Absorban değeri, bir mikroplate okuyucu ile spektrofotometre yardımı ile ölçüldü

S.mutans'da, zeytin yaprağı grubundaki zon çapları diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0.05$). *A.Actinomycescomitans*'da misvak grubundaki zon çapları diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). Zeytin yaprağı grubundaki canlılık oranının, diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü.

Çalışmamız sonucunda zeytin yaprağı (*Olea Europaea*) ekstraktının *S. mutans*'da ve misvak (*Salvadora persica*) ekstraktının *A.Actinomycescomitans*'da en etkili antimikrobiyal ajan olduğu *in vitro* olarak tespit edilmiş olup bu tür bitkilerden kaynaklı yeni antimikrobiyal ajanların oluşum sürecinin başlatılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Diş çürüğü, bitki ekstraktları, damar otu, zeytin yaprağı, zerdeçal, kırkkilit otu, misvak

The Antibacterial Effect of Different Herbal Extracts on Caries- Causing Bacteria and Examination of Cytotoxicity and Apoptosis Necrosis Indexing in vitro

Dental caries is the most common oral infectious disease in the world. The aim of this in vitro study is to evaluate the antimicrobial activity of different herbal extracts on *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinobacillus Actinomycescomitans* by using the disc diffusion method. At the same time, , plant extract treated L929 mouse fibroblast cells at various dose were investigated for cycotoxic activation.

From *Salvadora Persica*, *Olea Europea*, *Curcuma Longa*, *Plantago Lanceolata*, *Equistum Arvense*, extract was obtained by using Soxhlet extraction method. Antimicrobial activities were investigated by disc diffusion and micro dilution techniques. For determining the cytotoxic activity, cells were seeded on 96-well plates and cell viability was determined by MTT assay (3,4,5-dimethylthiazol-2,5 biphenyl tetrazolium bromide). The absorbance was monitored using a spectrophotometer with a microplate reader.

The zone diameters in *olea europea* group is significantly higher than other groups on *S.mutans* ($p<0.05$). The zone diameters in *Salvadora Persica* group is significantly higher than other groups on *A.Actinomycescomitans* ($p<0.05$). survival rate of the olive leaf group was found to be significantly higher than the other groups ($p<0.05$).

In our study, the extract of *Olea europaea* and *Salvadora persica* were identified as the most effective antimicrobial in order of on *S.mutans* and *A. Actinomycescomitans*. The formation process of this type of antimicrobial agents from new plant is expected.

Key words: dental caries, herbal extracts, olea europea, plantago lanceolata, curcuma longa and equistum arvense, salvadora persica

1 GİRİŞ

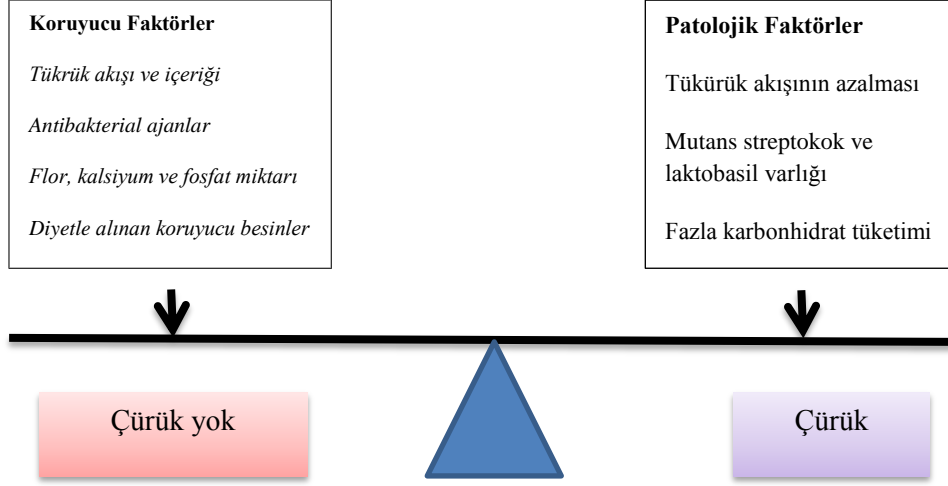
1.1 Diş Çürüğü ve Etyolojisi

Diş çürüğü bilinen en yaygın enfeksiyon hastalıklarından biridir ve çocukluk çağından itibaren bireyleri tüm yaş gruplarında etkiler (Dye ve ark. 2012). Diş çürüğü; biyolojik, genetik, sosyoekonomik, kültürel ve çevresel konuları içeren çok faktörlü; karbonhidratla tetiklenen ve diş çürüğüne neden olan mikroorganizmaların asit üretimi nedeniyle diş sert dokularından mineral kaybıyla karakterize, davranışla değiştirilebilen bir enfeksiyon hastalığıdır (Bader ve ark. 2004).

Biyofilm içerisindeki başta *S. mutans* olmak üzere değişik bakteriler, şekerleri organik asitlere metabolize etmekte ve bu asitler dişin kristal yapısının çözünmesine dolayısıyla çürük başlangıcına sebebiyet vermektedir (Paes Leme ve ark. 2006). Mine ya da dentin dokusundan kalsiyum fosfat kaybı ile gerçekleşen sürece **demineralizasyon**, demineralizasyona uğramış bölgelerdeki mineral kaybının tekrar yerine konulmasına ise **remineralizasyon** denir (Featherstone 1990). Demineralizasyon süreci durdurulmaz ya da remineralizasyon lehine çevrilmezse çürük oluşmaya başlar. Çürüğün ilerlemesinin durdurulması için bakteri kökenli asit atağının engellenmesi ve demineralizasyonun engellenmesi ~ remineralizasyonun teşvik edilmesi birbiri ile önemli ölçüde ilişkilidir (Featherstone 1999). Patolojik faktörler (bakteri ve karbonhidrat) ve protektif faktörler (tükürük, kalsiyum fosfat, florid) arasında bir denge bulunmaktadır.

Protektif Faktörler: Tükürük, dişlerin çürükten korunmasındaki en temel faktördür ve kalsiyum, fosfat, antibakteriyal komponentler, proteinler gibi doğal koruyucu birçok bileşene sahiptir (Lamkin ve Oppenheim 1993). Tükürüğün bileşenleri bakteri metabolizması sonucu oluşan asitleri nötralize eder, pH'yı yükseltir, yapısındaki kalsiyum ve fosfatın dişe difüzyonunu artırır (LeGeros 1990). Dışarıdan alınan antibakteriyal ajanlar (klorheksidin vb.), flor, diyetle alınan koruyucu maddeler bu dengenin sağlanmasındaki koruyucu faktörlerdendir (Featherstone 1996).

Patolojik Faktörler: Tükürük akışının azalması, mutans streptokok ve laktobasil varlığı, karbonhidratın sık tüketimi patolojik faktörlerdir .



Şekil 1.1 Çürük dengesi (şematik), Featherstone 1996

Karbonhidratlar özellikle de sükröz ağızdaki bakteriler tarafından fermente edilir. Bu bakteriler fermantasyona bağlı olarak ekstraselüler ve intraselüler polisakkarit üretirler (Bowen 2002). Ekstraselüler polisakkaritler bakterinin dış yüzeyine yapışmasını kolaylaştırır ve biyofilmin yapısal bütünlüğüne katkıda bulunur (Zhao ve ark. 2014). Aynı zamanda biyofilmin porözitesini artırır, bu da şekerin biyofilmin en derin noktalara kadar ulaşmasını sağlar (Hassan ve ark. 2015).

1.1.1 Bireysel Faktörler

Diş Ait Faktörler

Çürük oluşumunda birçok faktörün etkili olduğu bilinmekle birlikte dişin yapısı ve mineralizasyon özellikleri önemli rol oynamaktadır (Holbrook ve ark. 1993). Dislerin bozulmuş anatomik ve morfolojik yapıları, çaprasıklıklar, azı dislerin ara yüzeyleri, derin pit ve fissür yapıları plak retansiyonuna neden olmakta ve çürük gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Brambilla ve ark. 2000).

Dişlerin ilk sürdükleri dönemde mineralizasyonları tam olarak tamamlanmadığı için geçirgenlikleri çok fazladır ve çürüğe daha yatkındırlar. Disin sürmesinden sonraki bir-iki yıl içerisinde minenin pörözitesi ve geçirgenliği azalır. Hidroksiapatitin yapısındaki sodyum ve magnezyum azalarak, kalsiyum ve fosfat (P) iyonları artar. Sürme sonrası olgunlaşma ile apatit yapısının çözünürlüğü azalarak çürüğe karşı direnç artar (McDonald ve ark. 2000).

Tükürük ile İlgili Faktörler

Tükürük; büyük tükürük bezleri olan parotis, submandibular ve sublingual tükürük bezleri ile ağız mukozası içerisine dağılmış çok sayıdaki küçük tükürük bezlerinin sekresyonları ve dişeti oluğu sıvısından meydana gelen kompleks bir sekresyondur (Hicks ve ark. 2003).

Tükürük dört şekilde çürük önleyici etki gösterir.

1. Mekanik olarak temizleyerek plak akümülyasyonunu azaltır.
2. İçerdiği kalsiyum, fosfat ve flor iyonu ile minenin çözünürlüğünü azaltır.
3. Beslenme ve karyojenik mikroorganizmalar tarafından oluşan asiti nötralize eder ve tamponlar.
4. Antibakteriyel özelliğe sahiptir. (Dodds ve ark. 2005)

1.1.1.3 Bakteri plağı

Diş üzerinde biriken bakteri ve ürünlerinden oluşan yumuşak, yarı saydam, yapışkan materyale plak denir. Plağın diş üzerinde birikimi organize ve düzenli bir şekildedir. Tükürüğün seçici çökmesiyle pelikül oluşmaktadır. Bu pelikül öncül bakteriler tutunmaktadır. Taze plak aerobik topluluklar içerir ve yeterli oranda zararlı metabolit bulundurmamaktadır. Plak olgunlaştıkça enerji kullanımı sonucu olarak asit miktarı artmaktadır. pH düşüşlerine bağlı olarak dişte demineralizasyon süreci hızlanmaktadır (Marsh 1994).

Karyojenik Mikroorganizmalar

Bakteriler çürük lezyonunun oluşması ve ilerlemesinde temel elemanlardır. Bu bakteriler izole edilebilir ve tanımlanabilir (Littman 1993). Ağız mikroflorasında çürükle ilgili başlıca bakteri ağız içerisinde bulunan mikroorganizmaların çürük

oluşturabilmesi için; diş yüzeyine yapışabilme, farklı pH'larda üreyebilme, düşük pH'lı ortamlarda canlı kalabilme, laktik asit üretebilme, yüksek oranda sakkaroz kullanabilme, ekstraselüler ve intraselüler polisakkarit yapabilme gibi özelliklere sahip olmaları gerekmektedir (Bowen 2002).

Çürüğün başlamasında bakterilerin rolü oldukça büyüktür. Bakteri enfeksiyonu olmayan mikropsuz hayvanlarda veya sürmemiş insan dişlerinde çürük gelişemez. Bu bağlamda yapılan kapsamlı çalışmalardan şu sonuçlar elde edilmiştir:

1. İnsan ve hayvanlarda çürüğün azalmasında antibiyotikler etkilidir.
2. Ağız bakterileri in vitro olarak mineyi demineralize edebilir ve doğal çürüğe benzer lezyon oluşturur.
3. Çürük lezyonlarının üstündeki plaktaki spesifik grupların oral streptokoklar laktobasiller ve aktinomiçesler olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından saptanmıştır (Mattos-Graner ve ark. 2000).

A. Streptokokus Mutans

Gram pozitif, küresel veya oval şekilli, 0.5-2µm çapında, çiftler veya zincirler halindedir. Gaz üretimleri yoktur. Metabolizmaları fermantatiftir. Katalaz içermemektedir. A veya β-hemolotiktir. Çoğalmaları için ideal sıcaklık 37°C'dir. Mutans streptokoklar genç plakta toplam koloni oluşturan birimlerin % 50'sini oluşturmaktadır (Marsh ve Bradshaw 1995). Bu bakteriler yüksek ısıda (45°C) üremektedir, fakat % 6.5 NaCl varlığında üreyememektedir. 10°C'de, pH:9.6 buyyonda, % 0.1 metilen mavili sütte, % 40 safralı agarda üremezler. Amonyak oluşturamaz ve jelatini eritmemektedir (Sayiner 2008).

Diş çürüklerinin patogenezi ve etiyojisi diş yüzeyinde kolonize olan *S.mutans* ile ilişkilidir (Beighton 2005). Bu bakterinin, glukozil transferazı kullanarak sükrozdan ekstraselüler glukan sentezleme yeteneği en önemli virülans faktörüdür (Yamashita ve ark. 1993). Epidemiyolojik çalışmalara göre çocuklarda ve gençlerde mine çürüğünün, yaşlılarda kök çürüğünün ve bebeklerde biberon çürüğünün etyolojisinde birincil patojendir (Marsh ve Bradshaw 1995). Glukozil transferazı salgılayan *S.mutans* diş yüzeyi üzerindeki pelikula ve diğer

mikroorganizmalara sıkıca yapışmaktadır. Yüzeyde oldukça aktiftir (Vacca-Smith ve Bowen 1998).

Diş yüzeyindeki biyofilm sıklıkla karbonhidrata maruz kalırsa S.mutans polisakkarit sentezlemeye ve şekerleri organik asitlere dönüştürmeye devam etmektedir. Yüksek miktardaki polisakkarit biyofilmin stabilitesini ve yapısal bütünlüğünü artırır, antimikrobiyallerin zararlı etkilerinden ve diğer çevresel saldırılardan bakterileri korumaktadır (Paes Leme ve ark. 2006).

Mutansın ekstra ve intraselüler polisakkaritleri kullanabilme yeteneği fazladan ekolojik yarar sağlar, aynı zamanda da asit üretim ve asidifikasyon miktarını artırmaktadır. Asidik ortamın devamlılığı, asit toleranslı bir floranın seçimine neden olmaktadır (Marquis ve ark. 2003). Düşük plak pH'sı mine dokusunda demineralizasyonla sonuçlanmaktadır, bu şekilde diş çürüğü süreci başlamaktadır. Ekstraselüler polisakkaritler ve asidifikasyon, çürüğe neden olan plağın başlamasında ve devam etmesinde kritik rol oynamaktadır (Marsh 2003). Kemoterapötik müdahaleler için ekstraselüler polisakkarit ve asidifikasyon birincil hedefdir (Koo ve ark. 2002).

B. Laktobasiller

Laktobasiller gram pozitif, hareketsiz, kapsülsüz ve sporsuzdur. Asit fermentasyonu yapmaktadır. Mikroskobisinde kalın çomak şeklinde görünmektedir. En iyi pH=6'da üremektedir. Optimal üreme ısısı 36°C'dir, ancak 5-53°C'ler arasında da çoğalabilir. CO₂ ve Tween80 üremeyi artırmaktadır. Laktobasillerin metabolik son ürünleri homofermentatif olanlarda laktik asit, heterofermentatif olanlarda ise laktik asit, asetik asit ve etil alkoldür. Hem üredikleri ortamda asit oluştururlar (asidürik) hem de asit ortamda daha kolay ve bol ürerler (asidofilik). Sükrozdan dekstran sentezlerler, bu da bakterinin adezyonunu sağlamaktadır.

Laktobasiller dil, yanak gibi fizyolojik olarak temizlenebilen yerlere değil daha korunaklı olan arayüz ve fissürlere yerleşmektedir (Chow 2000). Laktobasiller en sık ağız ortamına açık dentin çürüğünde gözlenmektedir (Munson ve ark. 2004). Ağız ortamına açık, derin çürük lezyonlu dişlerin restorasyonundan sonra, tükürük

Laktobasil sayısında azalma tespit edilmiştir (Van Houte 1994). Tüketilen karbonhidrat miktarı ve ağızda kalma süresi ile laktobasil sayısı arasında doğru orantı mevcuttur (Marsh ve Bradshaw 1995).

C. Aktinomiçesler

Aktinomiçesler anaerob, gram pozitif, filamanlı ya da hifli, sporsuz, hareketsiz bakterilerdir. 37°C’de ve %5-10 CO₂’li ortamda iyi üremektedir. *A.israeli*, *A.bovis*, *A.meyeri* anaerob, diğerleri ise fakültatif anaerobtur. Glikozu fermente etmektedir (Murray ve ark. 1994). Kök yüzeyi çürüğü ve gingivitis ile ilişkili oldukları belirtilmiştir. Koronal çürüklerin oluşumunda da rol oynadıkları düşünülmektedir. Çürük oluşumunda etkili olduğu bilinen türleri, *A. viscosus* ve *A. naeslundii*’ dir (Ma ve ark. 2011).

1.1.2 Çevresel Faktörler

Beslenme ile alınan sükröz, hem mutans’ın kolonizasyonunu kolaylaştırır hem de organik asitlere metabolize edilmesine olanak tanır. Bu da plak pH’sının uzun süre düşük kalmasına neden olur. Çürük aktivitesi değerlendirilirken sükrözün tüketilen miktarından ziyade tüketim sıklığı daha çok önem arz etmektedir. Çürüğü azaltmak amacıyla diyet modifikasyonları denenmiş olsa da istenilen düzeyde başarıya ulaşılamamıştır (Doichinova ve ark. 2015).

Çürük oluşumu için gerekli olan diş, karbonhidrat ve mikroorganizmanın belirli bir süre bir arada bulunması gerekmektedir (Moynihan ve Kelly 2014).

1.2 Diş Çürüğünü Önlemeye Yönelik Uygulamalar

Diş çürüğünü önlemeye yönelik koruyucu uygulamalar; diş dokusunun kuvvetlendirilmesi, diyetin modifiye edilmesi, plağın uzaklaştırılması ve antibakteriyal ajanların kullanımı olarak temelde üçe ayrılmaktadır.

1.2.1 Diş Dokusunun Güçlendirilmesi

Flor değişik formlarda diş dokusunu güçlendirerek diş çürüğünü engellemek amacıyla kullanılmaktadır.

Florlu Diş Macunları

Diş macununun kullanılan miktarından ziyade içerisindeki flor miktarı çürük engellemede daha önemlidir. 1000 ppm flor içeren macunların etkisi birçok çalışma ile gösterilmiştir. 5000 ppm flor içeren macunlar ise demineralizasyonu daha çok azaltır ve remineralizasyonu hızlandırmaktadır (Oliveira ve ark. 2013).

Sistemik Flor Kullanımı

Suların florlanması, tuzun florlanması, sütün florlanması, flor tabletleri sistemik flor uygulamalarını oluşturan uygulamalardır (Peckham ve Awofeso 2014).

Profösyonel Flor Uygulamaları

Flor jeli, 5000-12300 ppm flor ihtiva eder, yılda iki kere diş hekimi tarafından uygulanması önerilir (Ogard ve ark. 1994). *Flor verniği*, 22600 ppm flor içerir, üç yada altı ayda bir diş hekimi tarafından uygulanması önerilir. Yapılan birçok çalışmada flor verniğinin diş çürüğü oluşumunun %38 oranında azalttığı bulunmuştur (Helfenstein ve Steiner 1994).

1.2.2 Diyetin Modifiye Edilmesi

Ksilitol, beş karbonlu bir şeker alkolüdür. *S.mutans* ve *S.sobrinus* tarafından fermente edilemez. In vivo ya da in vitro ortamlarda pH'yı düşürmez (Duane 2015). Dental plaktaki sükröz ve glikoz varlığı ile oluşan asit üretimi üzerinde inhibitör etkisi vardır. Asit oluşumunu engelleyici etkisinin yanısıra, *S.mutans* popülasyonunu azaltabilme yeteneğine sahiptir (Riley ve ark. 2015).

Sütün yapısındaki kalsiyum fosfat ve kazein, süte non-karyojenik özellik kazandırır. İnek sütü tüketiminin çürük üzerinde pozitif yada nötral bir etkiye sahip olduğu çalışmalarda görülmüştür (Marshall ve ark. 2003). Süt proteini kazein fosfopeptitle (CPP) amorf kalsiyum fosfatın (ACP) nano kompleksi, dentin ve minerin remineralizasyonu için kullanılmaktadır (Tvetman ve ark. 2004). CPP-ACP kompleksinin jel, krema ve sakız içerisine konulmuş formları bulunmaktadır.

Probiyotikler; besinler aracılığıyla vücuda alınıp, insan sağlığı üzerinde yararlı etki gösteren bakteri kültürleri veya mikro organizmalardır (Gorbach 2002). Probiyotikler çeşitli gastrointestinal sistem hastalıklardan korunmak ve tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır. Çürük profilaksisi amacıyla diş hekimliğinde kullanılmıştır (Meurman 2005).

1.2.3 Plağın Uzaklaştırılması ve Antibakteriyel Ajanların Kullanımı

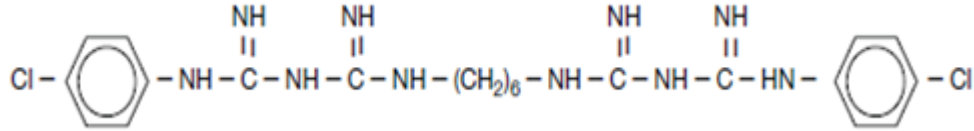
Plağın Uzaklaştırılması; Dental plağın diş fırçalama ve diğer destekleyici yöntemler ile mekanik olarak uzaklaştırılması plak kontrolünde en yaygın olarak tavsiye edilen yöntemdir (Arora ve ark. 2014). Diş ipi, dişlerin birbiri ile temasta olan yüzeylerindeki plak kontrolü için kullanılmaktadır. Uygun bir şekilde kullanılan diş ipi arayüzlerdeki bakteri plağının etkili bir şekilde azaltılmasına yardımcı olmaktadır (Salas ve ark. 2012).

Klorheksidin; Klorheksidin, hem hidrofilik hem de hidrofobik özelliği olan bir bisguaniddir. Pozitif yüklü molekül; ağız mukozası, mikroorganizma ve pelikül üzerindeki fosfat, karboksil ve sülfat gibi negatif yüklü gruplara bağlanmaktadır. Hidrofobik kısım, bakterinin membran geçirgenliğini etkileyerek membran fonksiyonunu bozmaktadır. Klorheksidin yüksek konsantrasyonda bakterisid, daha düşük konsantrasyonlarda bakteriyostatik etki göstermektedir (Tomasin ve ark. 2015).

Geniş bir spektruma sahip olan klorheksidine gram pozitif bakteriler, gram negatif bakterilerden daha duyarlıdır. Klorheksidinin antikaryojenik etkisi, florla birlikte kullanıldığındaki antikaryojenik etkisine göre oldukça düşüktür. Yüksek

çürük aktivitesi olan bireylerde ve tükürük akışının azaldığı radyasyon terapisi alan hastalarda bu kombinasyon kullanılmaktadır (Autio-Gold 2008).

Dişlerde & restorasyonlarda & protezlerde renklenme, ağız mukozasında ağrı ve döküntü, tad algılamada bozulma, acı tad klorheksidin kullanımı sonrası oldukça sık olarak görülen lokal yan etkilerdir (Luoma 1992).



Şekil 1.2 Klorheksidin'in kimyasal formülü

Triklolan; Triklolan; hidrofilik ve hidrofobik komponentleri olan non iyonik bir antibakteriyal ajandır. Gram pozitif bakterilere, gram negatif bakterilere ve mantarlara etki etmektedir. *S.mutans*, *S.sanguinis* ve *S.salivarius* düşük konsantrasyonlarda bile triklosana duyarlıdır. Lipit sentezini inhibe ederek defektif hücre membranı sentezine yol açmaktadır (Subramaniam ve Nandan 2011). Triklolan içeren ürünlerin yaygın olarak kullanımının antimikrobiyal direnç gelişimine neden olacağı düşünülmektedir. Bu durum triklolan kullanımını bir miktarda olsa sınırlamaktadır (Yazdankhah ve ark. 2006).

Enzimler; Tükürük, hidrojen peroksit varlığında tiyosiyonatu hipotiyosiyonata çeviren peroksidaz enzimleri içermektedir. Hipotiyosiyonat'ın bazı streptokok ve laktobasil türleri üzerinde *in vitro* çalışmalarda inhibisyon özelliği bulunmuştur (Lumikari ve ark. 1991). Hidrojen peroksit bazı bakterilerin son ürünlerindedir ve tükürük peroksidaz sisteminin çalışması için gerekli bir maddedir. Enzim içeren gargaraların biyofilmi, diş çürüğünü ve gingiviti azalttığı ancak bu etkinin oldukça düşük olduğu gösterilmiştir (Morou-Bermudez ve ark. 2015).

Sanguinaria Ekstraktı; Sanguinaria ekstraktı, kan otundan elde edilmektedir. Aynı zamanda topikal enfeksiyonların tedavisinde ve balgam söktürücü olarak kullanılmaktadır. Ağız florasındaki mikroorganizmalar da dahil olmak üzere

gram pozitif ve negatif mikroorganizmalara antimikrobiyal etki gösterir. Etki mekanizması tam olarak bilinmese de, bakteri hücre duvarı sentezini lipofilik özelliğinin de katkısı ile inhibe etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek miktarda çinko içermesi de antibakteriyel etkinliğine katkı sağladığı düşünülmektedir.(Walker ve ark. 1994)

Bazı çalışmalarda antigingivitis ve antibiyofilm etkisi bulunmuşken, bazı çalışmalarda da hiçbir etki gözlenmemiştir. Bazı çalışmalarda tükürük akışını artırdığı bu sayede de antikaryojenik etki gösterebileceği düşünülmüştür. Bu durum in vivo olarak biyofilm formasyonunu engellemesine katkı sağladığı düşünülse de çürük üzerindeki etkisi kanıtlanamamıştır (Vlachoianis ve ark. 2012b).



Şekil 1.3 **Sanguinaria** Bitkisi

Tez çalışmamızda kullanılacak olan *Salvadora Persica*, *Curcuma Longa*, *Equistum Arvense*, *Olea Europaea*, *Plantago Lanceolata* bitkilerini inceliyeceğiz.

Kullanılan Bitkiler ve Özellikleri

1.2.4 *Salvadora Persika* (Misvak)

Salvadoraceae ailesinin bir üyesi olan *Salvadora Persika*, sürekli yeşil kalan bodur bir ağaçtır. Kısa bir gövdeye, bu gövdeyi saran bir beyaz kabuğa ve pürüzsüz yeşil yapraklara sahip bir bitkidir. Bu bitkinin ortalama ömrü 25 yıldır ve geniş bir coğrafyada kullanılmaktadır. Misvak Arapça'da diş temizleyici çubuk anlamına gelmektedir (Hattab 1997). İslam kültüründe yaygın bir kullanıma sahip olan bu bitki İslam öncesi de dünyanın farklı yerlerinde de kullanılmıştır (Bos 1993). *S.persica*'nın kimyasal analizinde β -sitosterol, m-anisik asit, kloridler, pirolidin, pirol, piperidin çeşitleri, kamferol, kuersetin ve kuersetin glukozid tespit edilmiştir. (Ezmirly ve ark. 1979)

Misvağın antibakteriyal ve temizleyici etkisinin yüksek miktarda sodyum ve potasyum klorid; orta derecede silika, sülfür, c vitamini, florid; az miktarda da tannin ve saponin'den kaynaklandığı düşünülmektedir. Misvakta yaklaşık olarak 1.0 $\mu\text{l}/\mu\text{g}$ flor bulunur, suya da önemli miktarda kalsiyum ve fosfor salınımı yapar (Gazi ve ark. 1987). *S.persica*'dan izole edilen **benzil- izo- tiyosiyonat** (BITC), bitkideki glukozinolatın enzimatik hidrolizisi ile oluşan bir son üründür. Misvağa çürük oluşumunu engelleyici özelliği veren molekülün BITC olduğu düşünülmektedir (Aldosari ve ark. 1992). 133.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyondaki BITC, herpes simpleks I'e karşı virüsidal etkisinin olduğu bulunmuştur (Al-Bagieh 1992).

Ayrıca BITC, geniş spektrumlu bakterisidal etki göstermekle birlikte, *S.Mutans*'ın büyümesini ve asit üretimini engellediği belirtilmiştir (Al-Baojeh ve Weinberg 1988). *S.persica*'nın % 4.73'ü bakterisidal etkiye sahip olan sülfürden oluşmaktadır ve bu oldukça yüksek bir orandır (Galletti ve ark. 1993). İçeriğindeki C vitamininin doku iyileşmesine ve onarımına yardımcı olduğu bulunmuştur (Almas 1993). Bir abraziv gibi davranan ve misvakın içinde bulunan silika, diş yüzeyindeki lekelerin giderilmesinde yardımcı olmaktadır (Ababneh 1995). Kanamayı durdurucu etkisi olan **tannin** gingivitis klinik olarak azaltmaya yardımcı olur, aynı zamanda glukozil transferazın faaliyetini durdurur bu sayede plak ve gingivitis azalmaktadır. Misvakta var olan bir alkaloid olan **salvadorin** bakterisidal etki gösterir ve diş etini uyarmaktadır (Almas 1993).

S.persica'daki esansiyel yağlardan dolayı meydana gelen acı tad tükürük akışını uyarmaktadır. Yüksek konsantrasyondaki klorid ise diş taşı oluşumunu engellemektedir (Akhtar ve Ajmal 1981). Tükürükteki kalsiyum yoğunluğunun artması minenin remineralizasyonunu artırmaktadır (Gazi ve ark. 1992). Flavanoidlerin antinflamatuar, antioksidan, antialerjik, antitrombotik ve antikarsinojenik etkileri mevcuttur. Flavanoidler, bünyesinde bulunan hidrojen iyonlarını vererek serbest radikallerin etkisini kolaylıkla nötralize etmektedir (Sala ve ark. 2003). Luteolin, kuersetin, apigenin (Sher ve ark. 2010) ve p-kumarik, ferulik, sinapik asit, sinnamik asit (AbdELRahman ve ark. 2003) misvakta bulunan flavonoidlerdir. Bu bileşenler oldukça yüksek antioksidan aktivite göstermektedir.

Salvadora persica'nın kökleri düşük de olsa antiinflamatuar etkiye sahiptir (Ezmirly ve ark. 1979). Yaprakları öksürük, astım, skorbit ve romatizma benzeri semptomların tedavisinde kullanılmıştır (Farooqi ve Srivastava 1968). İnsanoğlu misvağı, burun problemlerini, hemoroiti, uyuzu, lökodermayı gonoryayı, çıbanı, bağırsak kurdunu tedavi etmede, zührevi hastalıklarda, plazma kolesterol seviyesini düşürmede, mide içeriğinin yeniden temin etmede kullanılmıştır (Alali ve ark. 2005). Misvak ekstraktı sülfür içerir ve bu madde hipoglisemik etki göstermektedir (Kupiecki ve ark. 1974). Travato ve ark., *S.persica* köklerini kaynatarak elde ettikleri sıvı (dekoksiyon) ile deney farelerini tedavi ettiklerinde vücut ağırlığındaki azalma ile paralel olarak oral glukoz toleransında ve plazma immünoreaktif insülin (IRI)'de artış gözlemlenmiştir (Trovato ve ark. 1998).

Yine aynı çalışmada, glikoz yüklenmesini takiben glikozdan yararlanımın artması bu bitki dekoksiyonunun hipoglisemik etkiye sahip olduğunu işaret etmekte olup, glikoz alınımını veya insülin salınımını artırarak periferdeki glukoz kullanımını kolaylaştırdığı belirtilmiştir. Antidiyabetik, antioksidan ve antihiperlipidemik etkisinin içeriğindeki β -sitosterol'e bağlı olarak gözlenmekte olduğu hatta bu molekülün pankreasta bulunan β hücrelerinin rejenerasyonuna katkıda bulunduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Trovato ve ark. 1998). Almas ve ark, klorheksidin glukonat ve misvak ekstraktının insan dişindeki sağlıklı dentin dokusunda aynı etkiyi gösterdiğini tespit etmiştir (Almas 2002). Başka bir çalışmada

misvak ağacının gövdesinden dört farklı benzilamid izole edilmiştir. Bunlar N^1, N^4 – bis(fenilmetil) - 2(S) – hidroksi - butandiamide; *N*-benzil-2-fenilasetamide; *N*-benzilbenzamide; benzilüre'dir. *Salvadora persica* içerisindeki temel yağların %46'sı ökaliptol (1,8-cineole), %13,4'ü α -karyofellen, %6,3'ü β -pinen ve %4,3'ü 9-epi-(E)-karyofelen'den oluşmaktadır (Khalil 2006).

Darmani ve ark, dişi farelerde yaptıkları bir çalışmada misvak ekstraktının yumurtalık ağırlığının düşüşüne ve uterus ağırlığının artışına neden olmasına rağmen; fertilitiyi etkilemediğini gözlemlemiştir. Erkek farelerde testis ve prepusyal bezlerin ağırlığında önemli bir artış, meni kesesi ağırlığında ise azalma tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara göre misvağın kadın & erkek üreme sistemi ve fertilité üzerinde olumsuz bir etkisinin olduğu söylenebilir (Darmani ve ark. 2003).

Sanogo ve ark., misvağın etanol ve strese bağılı oluşan ülserle karşı önemli bir koruyucu etkisine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. *S.persica*'yı suda kaynatarak oluşan sıvıyı ışık mikroskopu altında incelemişler, bu sıvı içerisindeki elementlerin mide mukozasını eski haline getirmeye çalışmada yararlı olabileceğini görmüşlerdir (Sanogo ve ark. 1999).

Noumi ve ark., *S.persica* köklerinden elde edilmiş 300 mg/ml yoğunluktaki ekstraktın *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis* 'a karşı antifungal etkisini gözlemlerken *Candida atlantica*, *Candida famata*, and *Candida maritima*'ya karşı etkili olmamıştır. Bu antimikotik etkinin misvağın kök kısmında bulunan klor, trimetilamin, alkaloid resin, and sülfür içeriğine bağılı olduğu düşünülmektedir (Noumi ve ark. 2010). Böbrek nakli yapılmış hastalarda, ağız hijyeni sağlamak amacıyla misvağı kullananlarda kullanmayanlara göre mantar enfeksiyonu açısından anlamlı bir düşüş gözlenmiştir (Al-Mohaya ve ark. 2002).

Yine başka bir çalışmada misvak ekstraktının *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* ve *Candida albicans* üzerinde etkili antimikotik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Saadabi 2006). Klinik olarak izole edilen oral kandida türleri (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida*

krusei, *Candida guilliermondii*, *Candida dubliniensis* ve *Candida glabrata*) üzerinde agar difüzyon testi ile yapılan bir çalışmada katı ve toz haline getirilmiş bir misvak kullanılmıştır. Katı misvak kullanılan grupta tüm kandida türlerinde güçlü antifungal etki gözlenirken, toz halindeki misvakın kullanıldığı grupta hiçbir antifungal etki tespit edilememiştir. Bu çalışmanın sonucu depolama ve inkübasyon süresinin yanısıra çubuk çapının da inhibitör etki aşamasında etkili olduğu düşünülmüştür (Alili ve ark. 2014)



Şekil 1.4 Salvadora Persika(Misvak)

1.2.5 *Olea Europaea* (Zeytin Yaprağı)

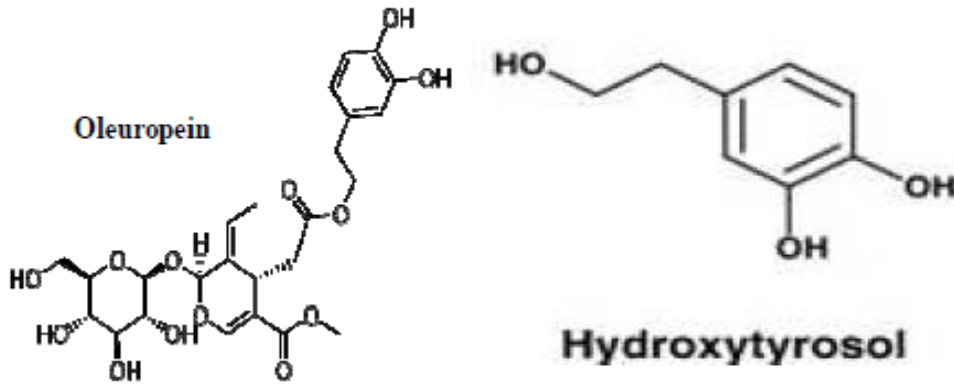
Zeytingiller familyası, en iyi asya kıtasının ılıman ve tropikal bölgelerinde yetişir. Zeytin yaprağı geleneksel tıp alanında birçok amaçla kullanılmıştır. Kan şekerini, kolestrolu ve ürik asidi düşürdüğü bilinmektedir. Diyabet, hipertansiyon, inflamasyon, diyare, üriner ve solunum sistemi hastalıkları, karın ve bağırsak hastalıkları, astım, hemoroid, romatizma gibi birçok hastalık tedavisinde hala kullanılmaktadır (Bendini ve ark. 2007). Sekoiridoidler ve iridoidler başta olmak üzere fenol içeren grupların farmakolojik etkinin odak noktasını oluşturduğu düşünülmektedir. Oleuropein, zeytin yaprağının temel bileşenini oluşturmaktadır ve bu madde ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Ryan ve Robards 1998). Flavonoidler, flavon glikozidler, flavanonlar, iridoidler, iridan glikozidler, sekoiridoidler, sekoiridoid glikozidler, triterpenler, biofenoller, benzoik asit türevleri, ksilitol, steroller, izokromanlar izole edilmiştir (Obied 2013). Fenolik bileşikler, flavonoidler, sekoiridoidler ve sekoiridoid glikozidler *O. Europaea*'nın tüm kısımlarında mevcuttur (Jerman ve ark. 2010).

Al-Azzawie ve ark., diyabetli hastaların tedavisini güçlü bir antioksidan kullanarak oksidatif stresleri azaltmak suretiyle kan glukoz seviyesini düşürebileceklerini düşünerek bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Tavşanlar, alloksan kullanılarak diyabet hastası haline getirilmişler ve oldukça güçlü bir antioksidan olan **oleuropein** 20mg/Kg oranında 16 hafta boyunca verilmiştir. Çalışma sonunda kontrol grubundaki tavşanlarla deney grubundaki tavşanların kan glukoz seviyelerinin birbirine oldukça yakın olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuca göre de **oleuropein**'in antihiperглиsemik ve antioksidan bir etken madde olduğunu kanıtlamışlardır (Al-Azzawie ve Alhamdani 2006)

Duquesnoy ve ark, *O. europaea*'daki eritrodiol maddesinin antiproliferatif ve apoptotik aktivitesi nedeniyle kanseri önlediğini tespit etmişlerdir (Duquesnoy ve ark. 2007). Pereira ve ark, zeytin yaprağı içindeki fenolik bileşiklerin gastrointestinal ve solunum sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde başarılı sonuçlar verdiğini görmüşlerdir (Pereira ve ark. 2007). Göğüs kanseri tümörünün gelişiminde, **oleuropein** ve **hidroksitirozol**'un etkisi araştırılmış, çalışma sonucuna göre bu iki maddenin tümör hacminde ve ağırlığında ciddi bir düşüşe neden olduğu gözlenmiştir

(Milanizadeh ve ark. 2014). **Oleuropein**, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus plantarum*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas fragi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus carnosus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus* gibi birçok mikroorganizma üzerinde antibakteriyal etki göstermiştir (Furneri ve ark. 2002).

Fenolik bileşiklerin (oleuropein gibi), proteinleri denatüre edip hücre zarı geçirgenliğini olumsuz etkileyerek protein, inorganik fosfat, glutamat veya potasyum gibi sitoplazma bileşenlerinin dışarı sızmasına neden olarak antimikrobiyal etki gösterdiği düşünülmektedir (Sousa ve ark. 2006). Fenolik bileşenlerin konsantrasyonu mikroorganizmalar üzerindeki etki modelini belirlemektedir. Düşük konsantrasyonlarda enzim aktivitesi olumsuz etkilenirken, yüksek konsantrasyonlarda ise protein denaturasyonu meydana gelmektedir (Denyer ve Stewart 1998).



Şekil 1.5 Oloropin ve Hidroksitirozol'un kimyasal formülü

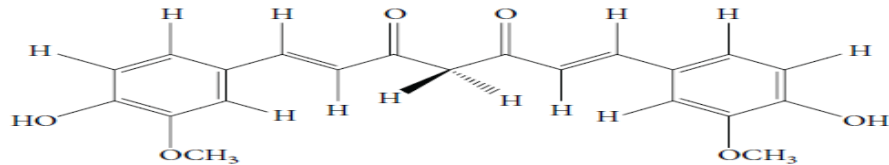
Birinci aşama hipertansiyon hastaları üzerinde yapılan paralel randomize klinik bir çalışmada, zeytin yaprağı ekstraktı ve antihipertansif bir ilaç olan Captopril kıyaslanmıştır. Sekiz hafta boyunca deney grubuna günde iki kere 500 mg zeytin yaprağı ekstraktı, kontrol grubuna ise günde iki kere 25 mg Captopril verilmiştir. Çalışmaya katılan tüm hastaların hem diyastolik hem sistolik tansiyonlarında düşüş gözlenmiş, zeytin yaprağı ekstraktı ile tedavi edilen gruptan daha iyi sonuç alınmıştır

(Susalit ve ark. 2011). 50mg/kg ile 200mg/kg arasında değişen dozlarda Wistar farelerine zeytin yaprağı ekstraktı verilmiş ve doza bağımlı analjezik etki görülmüştür. 200mg/kg zeytin yaprağı ekstraktı intraperitonel olarak uygulandığında formalin testine karşı oluşan ağrı cevabında ciddi bir düşüş gözlenmiştir (Esmaeili-Mahani ve ark. 2010).

Flemming ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, zeytin yaprağı ekstraktında bulunan maddelerin (apigenin, caffeic acid, luteolin-7-O-β-D-glucoside ve luteolin) gut hastalığına neden olan ksantoz oksidan enzimi üzerinde inhibitör etkisinin olduğunu bulmuşlardır (Flemmig ve ark. 2011).

1.2.6 Curcuma Longa (Zerdeçal)

Zencefil ailesinden olan zerdeçal, içeriğindeki "curcumin" maddesi ile tüm dünyadaki araştırmacıların dikkatini çekmeyi başarmıştır (Maheshwari ve ark. 2006). Zerdeçal içindeki curcumin oranı ve miktarı coğrafya farklılığının curcuminlerin hibridizasyonuna etki etmesinden kaynaklanabileceği düşünölmektedir (Anand ve ark. 2010). Curcuma Longa köklerinden elde edilen sıvı sinek kovucu olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır. Birçok çalışmada zerdeçalın; antibakteriyal, antiviral, antifungal ve antimalaryal aktivitesi bulunmuştur. Bahsedilen birçok antimikrobiyal etkinin curcumin'e bağlı olduğu tespit edilmiş ve curcumin'in sentetik türevleri üretilmeye çalışılmıştır (Anand ve ark. 2007). Curcumin, aloe vera ve kitosan ile kombine edildiğinde pamuk, yün ve tavşan saçı üzerinde mikrobiyal gelişimi engellediği görölmüş, bu bağlamda tekstil materyalleri için uygun bir antimikrobiyal ajan olarak düşünölmüştür (Ammayappan ve Moses 2009).



şekil 1.6 Curcumin'in kimyasal formölü

C.longa kökünün sulu ekstraktı, 4-16g/L MİC ve 16-32 g/L MBC değerlerinde *S. Epidermis*, *Staph. Aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli*'ye etki ettiği gösterilmiştir (Niamsa ve Sittiwet 2009). Curcumin; ampicillin, oksasillin, and norfloksasin gibi bazı antibiyotiklerle kullanıldığında sinerjistik etki göstermektedir (Mun ve ark. 2013). Bir bitki bileşeni olan curcumin birçok virüse karşı geniş antiviral etki göstermektedir. Guanin nükleotidlerinin sentezlendiği de nova döngüsünde hız kısıtlayıcı enzim olan inozin monofosfat dehidrogenaz enzimi (IMPDH) antiviral ve antikanser tedavilerinde hedef noktasıdır. Curcumin, IMPDH enzimi üzerinde antiviral etki gösterir (Dairaku ve ark. 2010).

Viral uzun dönem tekrarı (viral long terminal repeat), HIV-1 virüsünün transkripsiyonunda kritik bir role sahiptir. LTR aktivitesinin inhibe edilmesi antiviral ilaçlarda HIV-1 replikasyonunu engellemesi için muhtemel bir yol olduğu düşünülmüştür. Yapılan çalışmalarda curcumin'in hücre canlılığına büyük bir zarar vermeden LTR aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir (Li ve ark. 1993).

In vitro bir çalışmada curcumin, curcumin-galyum, curcumin-bakır olmak üzere üç tip curcumin türevi kullanılmıştır. LC₅₀ dozları sırasıyla 33,0 µg/mL, 13,9 µg/mL, 23.1 µg/mL'dir. Bu dozlarda Herpes Simpleks Virüs-1'e karşı antiviral etki tespit edilmiştir (Zandi ve ark. 2010).

Zerdeçal yiyeceklerde fazlaca kullanılmaktadır. Birçok araştırmacı mantara bağlı bozulmaları ve patojen mantarları kontrol altına almak amacıyla zerdeçal kullanmıştır. 0.8 ve 1.0g/L konsantrasyonlardaki zerdeçal tozunun mantar kontaminasyonlarına karşı kaydadeğer bir inhibitör aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Upendra ve ark. 2011). Taiwan'da oral lökoplakili, serviks, deri ya da mide kanserli hastalarda yapılan faz 1 klinik çalışmasında 3 ay boyunca 8 g/gün'e kadar **curcumin** desteği uygulanmıştır. Oral lökoplakili 7 hastadan 2 tanesinde, servikal intraepitelyal neoplazili 4 hastadan 1 tanesinde, deride pullu karsinomalı 6 hastadan 2 tanesinde ve bağırsak metaplazili 6 hastadan 1 tanesinde alınan biyopsilerde histolojik iyileşmeler gözlenmiştir. Ancak tedavi bitiminde oral lökoplakili 7 hastadan 1 tanesinde ve servikal intraepitelyal neoplazili 4 hastadan 1 tanesinde kanser gelişmiştir. Bu çalışma, ağırlıklı olarak oral **curcumin** biyoyararlanımını ve güvenilirliğini

incelemek için tasarlanmıştır ve sonuçlar karşılaştırma için bir kontrol grubunun bulunmaması nedeniyle sınırlı düzeyde kalmıştır (Sharma ve ark. 2004).

Curcuminin kanserli hücre kültürlerinde apoptozu farklı mekanizmalarla indüklemesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Sharma ve ark. 2005). Curcuminin, tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), IL- β gibi proenflamatuvar sitokinlerin üretimini azalttığı, ayrıca proenflamatuvar mediatörleri ve koruyucu antioksidan genleri düzenleyen protein 1'i (AP-1) aktive ettiği ve transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör- KB (NF- KB)'yi inhibe ettiği çalışmalarla kanıtlanmıştır (Surh ve ark. 2000).

İnsan keratinosit ve fibroblast hücrelerinde curcuminin hidrojen peroksit sebebiyle oluşan hasarı önlediği gözlenmiştir. Bu etkinin curcumin'in antioksidan etkisinden olduğu düşünülmektedir (Phan ve ark. 2001). Anjiyogenez; mevcut damarlar içinde yeni kılcal kanalların oluşması ile tanımlanan ve embriyonik gelişim, yeniden üretilme, yara iyileşmesi, kemik onarımı gibi çeşitli fiziksel olaylarda temel öneme sahip olan bir olaydır. Kontrol edilemeyen anjiyogenez ise patolojiktir (Folkman 1995). Curcumin'in damar endoteli hücrelerindeki, tıkaçlarda anjiyogenik farklılaşmayı inhibe ettiği, endotel hücre infiltrasyonunu ve damar dönüşümünü engelleyerek, anti-anjiyogenik aktivite gösterdiği gözlenmiştir (Thaloor ve ark. 1998).

1.2.7 Plantago Lanceolata (Damar otu)

Plantago ailesi, 275 türü ile oldukça çok çeşide sahiptir. Yapılan çalışmalarda Plantago türlerinin önemli oranda antiviral, antinflamatuar ve antioksidan etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Bera ve ark. 2012). *P.intermedia* ekstraktı'nın *Escherichia coli*'ye karşı inhibitör etkili olduğu (Uzunve ark. 2004), *P. Major*'ün birçok virüs, bakteri ve mantar üzerinde etkili olduğu (Chiang ve ark. 2002), *P. Lanceolata*'nın içeriğindeki yüksek iridoid glikozid sebebiyle *Spodoptera exigua*(böcek) ve *Diaporthe adunca*(mantar)'ya karşı dirençli olduğu (Biere ve ark. 2004) yapılan birçok çalışmada ortaya konmuştur.

Yapılan fitokimyasal çalışmalarda plantago türlerinin (damar otu) oldukça yüksek oranda fenolik bileşikler (flavonoid, tannin) içerdiği tespit edilmiştir. Yüksek

düzeydeki fenolik bileşiklerin yanısıra, flavanoidler, sinnamik asit ve glikozidler de bulunmaktadır. Özellikle bu fenolik bileşiklerin bakterilerin gelişimini kontrol altına almada etkin rol oynadığı, oral floranın virulansını ve gelişimini azaltarak diş çürüklerinde korunmanın mümkün olabileceği düşünülmüştür (Smullen ve ark. 2007). Yapılan son çalışmalarda, plantago'nun sulu/metanollü ekstraktlarının fenolik bileşikler ve benzoik asit türevlerinden oldukça zengin olduğunu göstermiştir (Beara ve ark. 2012).

Avrupa İlaç Kurumu (EMA, European Union Agency) damar otu'nun ağız ve farenksteki irritasyonları azaltmak için lokal tedavide güvenle kullanılabileceğini açıklamıştır (Ferrazzano ve ark. 2015). *P. major*, farklı gram pozitif bakterilerin hücre duvarında önemli oranda bozulmaya neden olmaktadır (Ashrafi ve ark. 2010). *Plantago Lanceolata*'dan yapılmış bir gargara ile ağız çalkalama işleminin ardından plasebo grup ile karşılaştırma yapıldığında, *S. mutans*'da ciddi bir düşüş gözlenirken, Laktobasil seviyesinde kaydadeğer bir düşüş olmadığı belirtilmiştir. Buna sebep olarak ise, *S. mutans* ile gargaranın daha büyük ve düz bir alanda temas ederken, Laktobasil ile gargaranın kısıtlı süre ve ulaşılması daha zor alanlarda temas etmesi olabileceği düşünülmüştür (Cildir ve ark. 2009).

Harvey ve ark, yaptıkları bir çalışmada *P. Lanceolata*'nın otçul böceklere karşı kovucu yada toksik etkisini gözlemlemiştir. Bu etkinin de içeriğindeki iridoid glikozid, aucubin ve katolpol'den kaynaklandığını düşünmüşlerdir (Harvey ve ark. 2005).



Şekil 1.7 *Plantago lanceolata* (Damar otu)

1.2.8 *Equistum Arvense* (Kırk Kilit otu)

Equistum Arvense oldukça iyi bilinen ve kuzey yarım kürede oldukça yaygın bir dağılım gösteren bir bitkidir. Bu bitkinin idrar söktürücü, antioksidan (Trouillas ve ark. 2003), vazodilatör (Sakurai ve ark. 2003), antinflamatuar (Do Monte ve ark. 2004) ve tohumların çimlenmesini engelleyici etkiye sahip olduğu görülmüştür. **At kuyruğu** olarak da bilinen bu bitkinin kimyasal içeriğinin %10'dan fazlası silisik asit ve potasyum tuzları gibi inorganik bileşenlerden oluşur. Ayrıca, steroller (β -sitosterol, campasterol, isofucosterol), askorbik asit, fenolik asitler (sinamik asit, kafeik asit, di-E-kafeol-mezo-tartarik asit, 5-O-kafeolşikimik asit), flavonoidler, sitrilpironlar, alkaloidler (e.g. nikotin, ekusetin, palustrin), flavonoid glikozitler (kuersetin 3-O-glukozit, apigenin 5-O-glukozit, kamferol 3-O-glikozit), kalsiyum karbonat, potasyum sülfat, potasyum klorid, manganez klorid, demir, manganez, kalsiyum fosfat ve nadir bulunan dikarbolik asit(equisetolik asit) içermektedir (Vlachojannis ve ark. 2012a). Ayrıca 1 kg taze *equisetum arvense*, yaklaşık 200 - 260 mL kadar C vitamini içermektedir.

Equistum Arvense, çoğunlukla sulu bölgelerde yetişir ve kanama durdurucu etkisi vardır. Yapılan çalışmalarda bu bitkinin sulu ve metanollü ekstraktının süperoksit anyonlarına ve hidroksil radikallerine karşı yüksek antioksidan aktivite gösterdiği, ancak kökünün antioksidan etki bakımından oldukça yetersiz kaldığı tespit edilmiştir (Nagai ve ark. 2005).

Atkuyruğu bitkisi, tıbbi amaçlı birçok alanda kullanılmaktadır. İçeriğinde silika bulunmaması nedeniyle yara iyileşmesinde, kemik, diş, saç ve tırnak yapısının güçlendirilmesinde, gut seviyesinin düşürülmesinde, böbrek taşı oluşumunu önlemede, burun kanamalarının kontrol altına alınmasında, aşırı kan kaybedilen adet kanamalarının düzenlenmesinde ve romatoid artrit tedavisinde başarıyla kullanılmıştır. Ayrıca antiseptik, antioksidan, antinflamatuar, diüretik (idrar artırıcı), antikönvülzan (kanama durdurucu) ve kanser önleyici bir ajandır (Jiang ve ark. 2014). Farelerde yapılan bir çalışmada *Equistum Arvense*'nin kreatin seviyesini düşürdüğü ve antidiyabetik özelliğinin olduğunu ortaya koymuştur. Sulu ve etanollü ekstraktlarının *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* ve *Candida*

türleri üzerinde antimikrobiyal özelliklerinin olduğu ortaya konmuştur (Mimica-Dukic ve ark. 2008).

Özay ve ark, farelerde yaptığı bir çalışmada *Equisetum Arvense*'nin 14 gün sonra dermis ve epidermisin yeniden şekillendirilmesinde, damarlanmasında ve granülasyon dokusu kalınlığında önemli katkılarının olduğunu tespit etmiştir (Özay ve ark. 2010). Ashrafi ve ark, tavşanlarda deri iyileşmesi sürecini histometrik ve histopatolojik olarak inceledikleri bir çalışmada *Equisetum arvense*'li kremin çinko oksitli kreme göre yara büyüklüğünü daha etkili bir şekilde azalttığını görmüşlerdir. İkinci ve üçüncü haftadaki yara iyileşmesi değerlendirildiğinde, *Equisetum arvense*'li kremin kullanılmasının daha uygun olduğu tespit edilmiştir (Ashrafi ve ark. 2010).

Do monte ve ark, farelerde *E. Arvense* ekstraktının analjezik etkisini incelemişler ve opioid sistemden bağımsız olarak analjezik etki gösterdiğini bulmuşlardır (Do Monte ve ark. 2004). Sağlıklı gönüllüler üzerinde yapılan bir çalışmada, diüretik etki negatif kontrol grubuna göre oldukça güçlü bir biçimde görülmüştür. Diüretik bir ilaç olan hidrokloro tiyazid ile ise aynı etkiyi göstermiş olup elektrolit kaybına sebep olmaması *E. Arvense*'yi bu bağlamda bir adım öne geçirmiştir (Carneiro ve ark. 2014).

Costa-Rodrigue ve ark, yaptıkları çalışmada *E. Arvense*'nin insanda osteoklastik aktiviteyi azalttığını tespit etmişler ve artmış osteoklastik aktivite ile ilgili patofizyolojik durumlar üzerinde muhtemel bir yararın olabileceğini ve kemik rejenerasyon stratejilerinde tedaviye katkı sağlamak amacı ile kullanılabileceğini ifade etmişlerdir (Costa-Rodrigues ve ark. 2012). Başka bir çalışmada, *E. Arvense*'nin etanollü ekstraktının anksiyete giderici etkisinin sahip olduğunu, diazepam'a göre daha düşük sedatif etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Singh ve ark. 2011).



Şekil 1.8 Equisetum Arvense (Kırkkilit otu)

Bitki ekstraktlarının elde edilmesi değişik laboratuvar prosedürleri içerir.

1.3 Ekstraksiyon Yöntemleri

Doğada var olan bitkiler, kendi türüne özgü olarak biyoaktif moleküller barındırmaktadır. Biyoaktif bu moleküllerin ortaya çıkarılarak ticarileştirilebilmesi için ekstraksiyon denilen özüt çıkarma işlemine ihtiyaç duyulmuş ve bu çerçevede ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir. (Wang ve Weller 2006). En sık kullanılan ekstraksiyon yöntemleri şunlardır:

1.3.1 Soxhlet Ekstraksiyonu

Katı veya yarı-katı numuneler için uygun olan bu yöntem 1879 yılında Franz von Soxhlet tarafından icat edilmiştir. Katı örnek, örnek bölmesine, solvent (çözücü) de çözücü şişesine konmaktadır. Çözücü kaynama sıcaklığının üzerinde ısıtılır, sıcak çözücü buharı yoğunlaştırıcıya ilerler, yoğunlaşarak katı numunenin üzerine düşmektedir. Solvent örneği ıslatır, devamında solvent seviyesi sifonun tepesine ulaştığı anda, solvent tüm örnek bolmesini boşaltarak, solvent şişesine geri damlamaya başlamaktadır. Bu sayede sıcak solvent birkaç kere örnek içerisinde devir daim yapmaktadır. Ekstrakt solvent şişesinin içinde kalırken, yalnızca temiz solventin buharlaşması sebebiyle, her dolaşımında taze solvent kullanılmaktadır. Bu sistemle ekstraksiyon zamanı 6 saat ile 24 saat arasında değişmektedir. 100-500 mL arasında büyük sayılabilecek hacimde solvent gereklidir. Soxhlet ekstraksiyonu, esas olarak organik bileşiklerin katı örneklerden ekstrakte edilmesinde kullanılmaktadır. Bileşikler, solventin kaynama sıcaklığında termal olarak kararlı olmalıdır (De Castro ve Priego-Capote 2010).

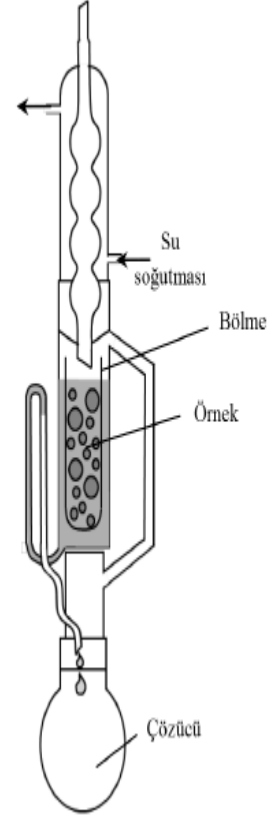
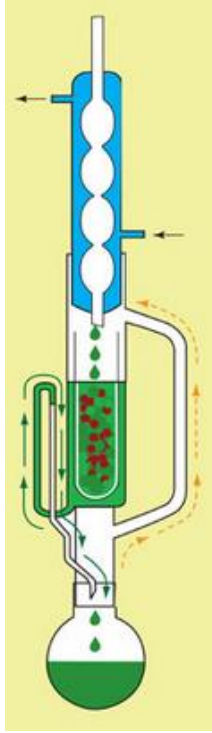
Bu sistemin avantajları:

1. Çözücünün katı matriksle tekrarlanan bir şekilde etkileşmesi (sürekli taze solventle temas halinde olması)
2. Ekstraksiyondan sonra filtreleme işlemine gerek duyulmaması
3. Yöntemin basit ve ucuz olması arasında sayılabilir.

Dezavantajları ise;

1. Uzun zaman gerektirmesi
2. Büyük hacimlerde çözücü gerektirmesi
3. Sıcakla bozulabilecek maddelerde bu yöntemin tercih edilememesi

4. Örnek bölmesinin hassas bir şekilde temizlenme gereği, dezavantajları arasında sayılabilir (Mermet ve ark. 2004).



Şekil 1.9 Soxhlet Ekstraktörü

1.3.2 Ultrasonik Ekstraksiyon

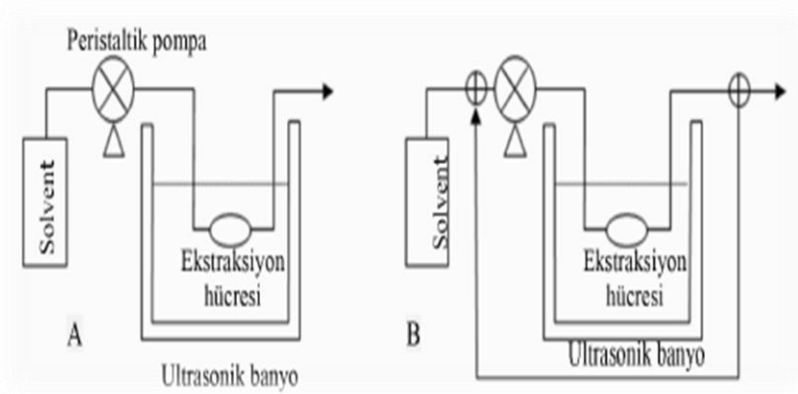
Ultrasonik ekstraksiyonda örneğe 20 kHz üstündeki frekanslarla akustik titreşimler uygulanmaktadır. Sıvının içinden geçen bu titreşimler kavitasyon (boşluk) oluşturur. Bu sayede sıvı ortamda çok sayıda ufak kabarcıklar oluşur ve katılardan partiküllerin kopmasını sağlamaktadır (Capelo ve Mota 2005).

Hem katı hem sıvı örnek hazırlamada ultrasonik ekstraksiyon kullanılmaktadır. Katı örneklerin ekstraksiyonu, su banyosuna ultrasonik radyasyon uygulanmasıyla gerçekleştirilmektedir. (Santos ve Capelo 2007). Ekstraksiyon verimini parametreler; sonikasyon zamanı, örnek partikül boyutu, örnek miktarı, bitkiye özgü nem oranı solvent türü ve kullanılan cihazdır (Domeño ve ark. 2006).

Numune ultrasonik su banyosuna yerleştirilmiş bir ekstraksiyon hücresi veya ultrasonik problu bir su banyosu içine konmaktadır. Bu sistem taze ekstraksiyon

solventinin sürekli olarak örneğe pompalandığı, acık bir sistem(A) veya ekstraktın seyrelmesini engelleyen ekstraksiyon solventinin yeniden dolaştığı kapalı bir sistem(B) olarak kullanılabilir (Tadeo ve ark. 2010).

Pahalı olmaması, basit olması, ekstraksiyon kinetiğinin hızlı olması ve ısıya duyarlı bileşiklerin ekstrakte edilebilir olması bu metodun avantajları olarak belirtilebilir. (Wang ve Weller 2006).



Şekil 1.10 Ultrasonik Ekstraksiyon Cihazı

1.3.3 Mikrodalga Ekstraksiyon

Mikrodalgalar frekansı 300-300000 MHz arasında değişen elektromanyetik dalgalardır. Doğal ürünlerde 2500-75000 MHz'de ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir. Bu enerjinin etkinliği çözücünün içeriğine, bitkinin içeriğine ve elektromanyetik dalga gücüne bağlı olmaktadır (Kılıç 2008).

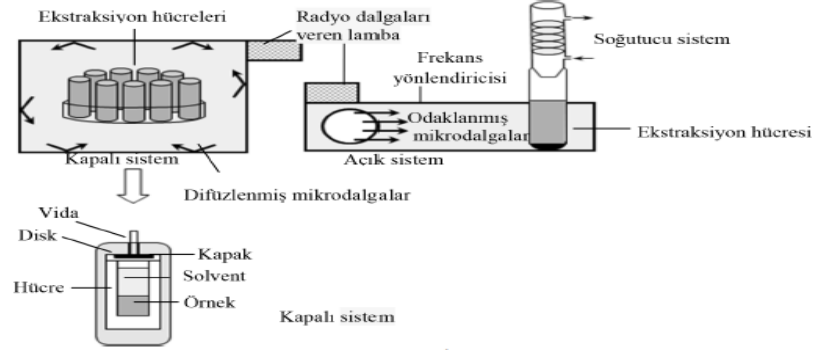
Mikrodalga ışıması, ekstraksiyon solventini ve örneği ısıtmak için kullanılır. Ekstraksiyonu sorunsuz bir şekilde gerçekleştirmek için solvent seçimi oldukça önemlidir. Solventin mikrodalga ışımasını absorplaması, solventin örnekle etkileşimi ve örneğin solventteki çözünürlüğü dikkat edilmesi gereken hususlardır (Lopez-Avila 1999).

Bu sistemin avantajları:

1. Daha az çözücü kullanılması
2. Daha kısa zamanda ekstraksiyonun yapılabilmesi
3. Basit ve ucuz olması

Dezavantajları ise:

1. Filtreleme ve santifürj gerektirmesi (katı atıkları yok etmek için)
2. Uçucu bileşiklerin ekstraksiyonunda etkili olmamasıdır (Wang ve Weller 2006).



Şekil 1.11 Mikrodalga Ekstraksiyon Cihazı

1.3.4 Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyonu

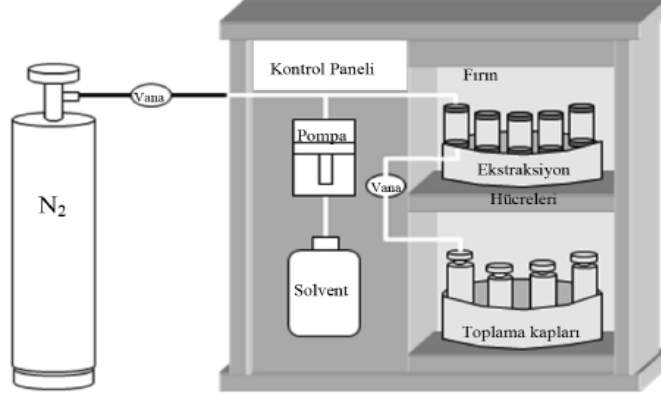
Sıcaklık 50-200 °C ve 10-15 Mpa basınç aralıklarında gerçekleştirilen katı-sıvı ekstraksiyon tekniğidir. Basınç, sıvı ile ekstraksiyon hücresindeki örneğin güçlü bir şekilde etkileşmesine olanak vermektedir. Örnek, sızdırmaz bir yüksek basınç ortamında tutularak, solventler için daha yüksek sıcaklıklar kullanılmasına izin veren bir aletler kullanılır. Bu sayede solvent daha yüksek sıcaklıklarda sıvı halde bulunabilir bu da ekstraksiyonu hızlandırır (Kaufmann ve Christen 2002).

Avantajları:

1. Ekonomik ve çevresel çözücülerin bu teknikte kullanılabilmesi(CO₂, su gibi)
2. Polar bileşiklerin ekstrakte edilebilmesi,
3. Daha az miktardaki çözücü kullanımı ile ekstraksiyonun yapılabilmesi.

Dezavantajı:

Yüksek ısı kullanımı gerektirdiği için ısıya duyarlı örneklerde kullanılamamasıdır (Smith 2002).



Şekil 1.12 Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyon Cihazı

1.3.5 Süperkritik Ekstraksiyon

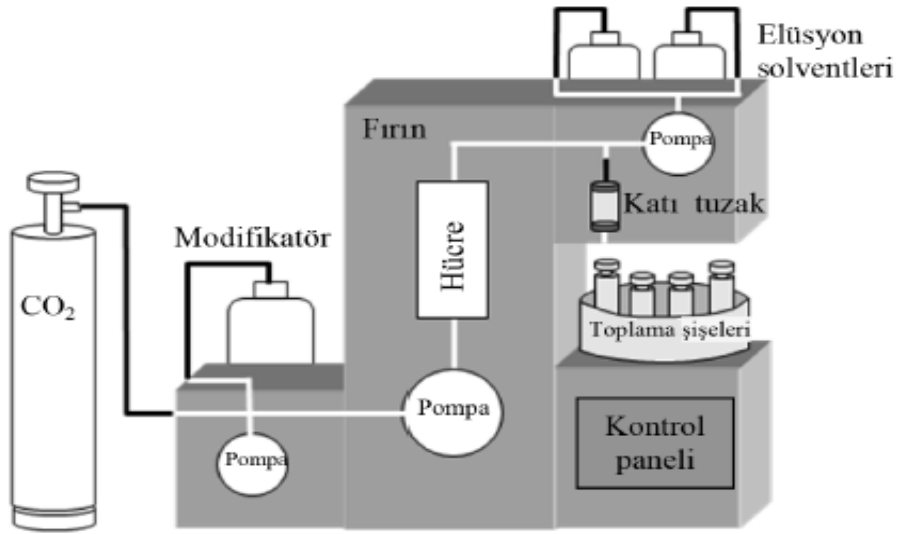
Süperkritik akışkan, kendi kritik sıcaklığı üzerinde ısıtılan ve kendi kritik basıncı üzerinde basıncı uygulanan bir element, madde veya karışıma verilen isimdir. Bu akışkan tek bir faz halinde bulunmaktadır (ne gaz ne de sıvıdır). Basıncın veya sıcaklığın artmasıyla sıvılaştırılmaz veya buharlaştırılmaz (Zougagh ve ark. 2004). Akışkan CO₂ ile katı matriks seçilen süperkritik şartlarda etkileşime girmektedir. Kütle transferi çözünenin desorpsiyonu ile süperkritik akışkanın adsorpsiyon ve difüzyonunu içermektedir (Mukhopadhyay 2000).

Avantajları:

1. Hızlı olması (20-60 dakika)
2. Düşük solvent tüketimi (10-20 mL)
3. CO₂ in toksik olmaması, alev almaması, çevre dostu olması, ucuz olması
4. Sıcaklık, basınc ve modifikator değiştirilerek yüksek secicilik sağlanması
5. Isısal olarak kararsız örnekler için uygun olması (Moreno ve ark. 2007).

Dezavantajları

1. Yüksek maliyet
 2. CO₂ non-polar olduğundan, daha polar analitlerin ekstraksiyondaki zorluk,
 3. Islak veya sıvı örnekler ve çözeltilerin ekstraksiyonunda zorluktur
- (Mermet ve ark. 2004).



Şekil 1.13 Süperkritik Ekstraksiyon Cihazı

Soxhlet ekstraktörü kullanılarak elde edilen ekstraktların antibakteriyal etkinlik değerlendirmesi yapılması planlanmıştır. Antibakteriyal etkinliğin değerlendirilmesi, kullanılan yöntemler ve besiyerleri hakkında detaylı bilgi verilecektir.

1.4 Sitotoksite ve Çalışma Yöntemleri

Hücre kültürleri, canlı dokuların vücut dışında yaşatılmasını, sürekli üretimini ve gelişimini ifade eder ve temel olarak hücre yapısı, çoğalma, tamir mekanizmalarının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra hücre kültürleri viroloji ve toksikolojide farklı maddelerin etkinliklerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Sitotoksitite, materyallerin hücreler üzerindeki toksik etkilerini belirten bir biyouyumluluk test prosedürüdür (Aldridge 1993). Laboratuvar şartlarında sitotoksitenin tanımlanması için şu yöntemler kullanılmaktadır:

1.4.1 Direk Hücre Kültürü ve Eksrakt Testi

Tek tabaka hücre üzerine toksisitesi araştırılan materyal kısa bir süreliğine (>24 saat) direk olarak konur. Doz cevap eğrisi değerlendirilerek materyalin içerisindeki toksik bileşik tahmin edilir. Hücre ve koloni sayımının zaman alıcı ve meşakkatli olması, morfolojisindeki küçük değişikliklere duyarlı olması hücre kültürü pratiğinin komplikasyonlarından biridir. Temasta olan hücreler morfolojilerine göre sayılır ancak canlı ve ölü hücre ayırımı yapılamaz. Koloni sayma işlemi sıklıkla koloninin ne içerdiği ve geniş çeşitlilik gösteren artefaktların tespiti gibi subjektif kurallarla yapılır (Moharamzadeh ve ark. 2009).

Bariyer Test Yöntemi

Materyal bir bölme içine yerleştirilir, asılı bir şekilde medyum içine bir askı yardımıyla tutturulur. Materyalin içinde bulunduğu bölmenin alt kısmında bir membran bulunur, bu membran bariyer görevi üstlenir. Materyalden çözünen bileşenler bu membran vasıtasıyla medyum tabanında bulunan hücrelerle temas eder (Tang ve ark. 1999).

Agar Difüzyon Testi

Tek tabakalı hücre kültürünün üzerine bir tabaka agar konur. Test materyali bu agarın üzerine yerleştirilir. Bu metod, test materyalindeki filtre edilebilir içeriğin sitotoksitesini tespit etmede kalıcı (permanent) hücre hatları ile kullanılır. Bu hücreler nötral kırmızı ile boyanır. Agarla kaplanmış test materyali 24 saat inkübe

edilir. Filtre edilebilir toksik madde, hücrelerde lizis yapması sebebiyle boyanan hücrelerin renginin solmasına neden olur. Hangi konsantrasyonda sitotoksik olduğu farklı derişimlerdeki materyal ile tespit edilir. Bu yöntemin dezavantajı ise test materyali çözünmüyor ya da difüze olmuyorsa toksik bile olsa hiçbir zaman membran hasarına yol açmaz, dolayısıyla toksisite doğru bir şekilde belirlenemez (Murray ve ark. 2007).

1.4.2 Filtre Difüzyon Testi

Selüloz asetat'tan yapılmış bir filtrenin bir tarafına primer hücreler diğer tarafına da test materyali yerleştirilir. 0.45µm'lik filtre deliklerinden materyal sızar ve yayılır. Bu şekilde hücreler üzerinde sitotoksik etkisi varsa ortaya çıkar. Hücrelerde test materyaline karşı oluşan dekolorizasyon alanının ölçülmesi veya boyanma yoğunluğunun incelenmesi ile sitotoksite tespit yapılır (Powers ve Sakaguchi 2006)

1.4.3 Dentin Bariyer Testi

Dental materyallerin biyouyumunun incelenmesi için hazırlanan bir dentin diski, materyal ve hedef hücre arasına arasına Schmalz ve arkadaşları tarafından tantılmış bir sistemdir. Dentin bariyer testinde yerleştirilir. İmmortilize edilmiş pulpal fibroblastlar hedef hücre olarak kullanılır (Schmalz ve ark. 1999).

Şengün ve ark., bu yöntemle dentin bonding ajanların, üç boyutlu pulpa hücreleri üzerinde sitotoksitesini değerlendirmişlerdir (Şengün ve ark. 2011).Sitotoksite testleri, hücre reaksiyonlarının morfolojik veya kantitatif olarak hücre canlılığı, proliferasyon, hücre fonksiyonu gibi kriterlerin incelenmesi temeline dayanır. Bu testler:

1.4.4 Canlılık Değerlendirme Testleri

Bu testler, hücrenin membran bütünlüğü bozulmuşsa hücre içine tripan mavisi, eritrosin ya da naftalin siyahı gibi boyaların ya da membran bütünlüğü bozulmamış hücrelere diasetil florasan ya da notral kırmızı boyalarının uygulanması ile yapılır (Freshney , Freshney 2005).

➤ *Nötral kırmızı testi:*

Nötral kırmızı canlı hücelerde depolanan ve canlı hücreyi boyayan bir boyadır, membran hasarı sonrası ortama yayılır ve hücre canlılığı ile ilgili bir index oluşturur. Nötral kırmızı testinde sadece canlı hücrelerin boyanabildiği hayatta kalan hücreler değerlendirilir ve lizis sonrası fotometrik ölçüm yapılabilir (Hikage ve ark. 2003).

➤ *Tripan mavisi testi:* Membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin non vital bir boya olan tripan mavisi ile boyanması esasına dayanır. Hemositometre ile boyanmış hücrelerin oranı tespit edilir (Powers ve Sakaguchi 2006).

➤ *Propodyum iyodür testi:* Hücre membranının toksik herhangi bir madde nedeniyle zarar görmesi sonucu propodyum iyodür (PI) hücrelerin içine girer. Aynı zamanda DNA ve RNA'yı da etkiler. Floresans boya ile boyanmış hücrelerin sayısı flow sitometri ile tespit edilir. Floresans hücrelerin oranı, ölü hücrelerin sayısı anlamına gelmektedir (Mantellini ve ark. 2003).

1.4.5 Morfolojik Değerlendirme Testleri

Nükleusta genişleme, binükleasyon, nükleus anomalisi ve koful oluşumu gibi hücre içindeki patolojik değişimlerin incelenmesi esasına dayanır. Ölü hücreler nükleus parçalanması ve piknozis (nükleus yoğunlaşması) ile karakterize edilir (Moharamzadeh ve ark. 2008).

1.4.6 Proliferasyon Değerlendirme Testleri

Materyalin uygulanmasından bir kaç gün sonra kültürdeki hücrelerin proliferasyon değişiminin incelenmesi yöntemidir.

Bromodeoksiuridin immunohistokimyasal teknik: Hücre bölünmesi sırasında yeni sentezlenen DNA'nın içine bromodeoksiuridin girerek DNA ile birleşir. Floresan özelliği olan anti-BrdU antikor ve nükleik asit izleri aracılığıyla hızlıca çoğalan hücreler tespit edilir (Dolbeare ve Selden 2009). Theilig ve ark., dental rezin monomerlerin insan fibroblast ve keratinositleri üzerindeki proliferasyon etkisini bu yöntemle incelemişlerdir (Theilig ve ark. 2000). 3H-timidin testi: Hücre proliferasyonunun değerlendirilmesinde kullanılan başka bir yöntem de bu testtir.

Hücre bölünmesi esnasında ve yeni DNA sentezi sırasında radyoaktif bir madde olan ³H-timidin hücre ile birleşir (Aronsson ve ark. 2000).

1.4.7 Metabolizma Değerlendiren Testler

Bu testler uzun dönemde oluşacak zararı anlamak için hücrelerin metabolik veya proliferatif kapasitelerini ölçer. MTT testi: Kolorimetrik MTT değerlendirme yöntemi mitokondrial dehidrogenaz aktivitesindeki değişimleri inceleme esasına dayanır. Suda çözünen metiltiyazol tetrazolyum'u çözünmeyen formazon bileşiğine dönüşmesi ile tespit yapılır. Bu formazon daha sonra çözülür ve yoğunluğu spektrofotometrik olarak değerlendirilir. MTT değerlendirme yöntemi hızlı ve pahalı olmaması sebebiyle en çok kullanılan sitotoksite değerlendirme yöntemidir (Schmalz ve ark. 2002). Alamar mavisi testi: Alamar blue güvenilir, toksik olmayan sulu bir boyadır. Bu yöntem ile sonuçlar florometrik ve kolorimetrik olarak değerlendirilebilir. Çift taraflı değerlendirilme imkanı ve toksik olmaması bu sistemin avantajı iken pahalı olması dezavantajıdır (Uo ve ark. 2003).

➤ LDH testi: Hücrede membran hasarı varsa ya da sitozolis durumunda laktat dehidrogenaz ölçülerek sitotoksite belirlenir (Quinlan ve ark. 2002).

1.5 Apoptoz ve Nekroz Nedir?

Apoptoz, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerji gibi ihtiyaçları olan canlılarda hücrelerin kendi kendilerini yok etmeleri yoluyla homeostazi koruyan fizyolojik bir olaydır (Chawla-Sarkar ve ark. 2003). Nekroz, genler tarafından kontrol edilemeyen, fiziksel ve kimyasal uyarılar (ısı, yanma, toksik md.) etkisiyle gerçekleşen düzensiz bir süreçtir (Golstein ve Kroemer 2007).

Çizelge 1: Apoptoz ve nekroz arasındaki farklılıklar

	APOPİTOZ	NEKROZ
Morfolojik özellikler	Hücre membranı sağlamdır. Hücre küçülür. Kromatin yoğunlaşması olur. Organeller sağlamdır. Apoptotik cisimler oluşur.	Hücre membran bütünlüğü bozulur. Hücre şişer. Büyük vakuoller oluşur. Hücre lizisi gerçekleşir.
Biyokimyasal özellikleri	Programlıdır. ATP gerektirir. DNA kırıkları merdiven şeklini alır.	İyon dengesi bozulur. ATP gerekmez. DNA rastgele parçalanır.

Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler şunlardır:

1.5.1 Morfolojik İnceleme Yöntemleri

Işık Mikroskobu Yöntemi

a) *Hemotoksilen Eozin Boyama*: Kromatini boyayan hemotoksilen boyası ile apoptotik hücreler belirlenir

b) *Giemsa boyama*: Nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır (Mountz ve Zhou 2001).

Floresan Mikroskobu Yöntemi

Propodyum iyodür ve Hoechst boyası ile yapılan ikili boyama tekniğidir. Hoechst boyası, canlı ve ölü tüm hücrelerin DNA'sını boyayabilen floresan özellikli bir boyadır. Propodyum iyodür ise sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyar. Ölü ve canlı hücreler bu şekilde ayrıldıktan sonra, nükleus

morfolojisine göre ölü hücrelerin apopitotik mi nekrotik mi olduğuna karar verilir (Montaner ve ark. 2000).

Elektron Mikroskopisi Yöntemi

Sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu, mitokondrinin durumu, hücre zarı, nukleus membran bütünlüğünün gibi ayrıntıların elektron mikroskopuyla etkili bir şekilde incelendiği bir yöntemdir (Benchimol ve ark. 2007)

1.5.2 İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemleri

Tunel Yöntemi; Apopitotik parçalanma sonucu oluşan DNA parçalarının enzimatik etiketler aracılığı ile işaretlenerek belirlenmesidir (Jin ve ark. 2007).

Anneksin V Yöntemi; Fosfatidilserin (membran fosfolipitlerinden biri), normal hücrede membranının sitoplazma kısmına bakan iç yüzünde iken, apopitotik sürecin başlaması ile membranın dış yüzeyine çıkar. Anneksin V, fosfatidilserin'e bağlanabilen bir proteindir. Bu iki protein birleşir ve flow-sitometri ile bu oran ölçülerek apopitotik hücrelerin oranı bulunur (Güleş ve Ülker 2008).

M30 Yöntemi; Epitelyal kökenli dokularda kullanılabilen bu yöntem, sitokeratin 18'in kaspaz etkisiyle kırılması sonucu oluşan bölgenin immünohistokimyasal olarak değerlendirilerek apopitozun belirlenmesidir (Caulín ve ark. 1997).

1.5.3 Biyokimyasal İnceleme Yöntemler

Agaroz jel elektroforezi; 50 kb'a kadar olan nükleik asitlerin ayrıştırılabildiği bu sistemde, agaroz jeller floresan bir boya olan ethidium bromide ile boyanır ve UV ışığı altında DNA parçaları görüntülenir. Apopitotik hücreler bu şekilde belirlenir (Serenó ve ark. 2001).

Western blotting; Dokudaki spesifik bir proteini analiz etmek için bu proteine karşı yönlendirilen yüksek kalitede antikor ile dokuda bulunan bir proteinin varlığı, büyüklüğü, konsantrasyonu tespit edilebilir (Kurien ve Scofield 2006)

1.6 Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testleri içinde en sık kullanılanlar şunlardır:

1. Disk difüzyon testleri
2. Dilüsyon testleri
 - A. Agar dilüsyon testleri
 - B. Broth dilüsyon testleri
 - Makrodilüsyon
 - Mikrodilüsyon
3. Gradient strip testleri (E-test,)
4. Otomatize yöntemler (Vitec)

1.6.1 Disk Difüzyon Testleri

Disk difüzyon testi, antibiyotik duyarlılık testlerinin en eski ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık kullanılan yöntemlerindedir. Tüm antimikrobiyal ajanlar, özel ekipman gerektirmeden bu yöntemle değerlendirilebilir (Woods 1995).

Bu testin temeli, standart agar plak besiyeri üzerine ekim yapılması ve antimikrobiyal içeren disklerin yerleştirilerek, 2 saat oda sıcaklığında ve 18-24 saat $35-37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılması şeklinde açıklanmaktadır. Bu sürenin sonunda bakteri üreme önlenim alanının (inhibisyon zonu) çapı ölçülerek antimikrobiyale mikroorganizmanın duyarlılığı hakkında karar verilir. Besiyerinde hiç mikroorganizma üremeyen bölgeye “**üreme önlenim bölgesi**”- inhibisyon zonu, bunun hemen 1-2 mm dışındaki bölgeye “**uyarım bölgesi**”-stimülasyon zonu ve en dıştaki kısma “**üreme bölgesi**” denir. Disk çevresindeki üreme önlenim alanının çapına göre duyarlılık not edilir (Köksal 1998).

Kullanılacak disklerin bazı özellikleri bulundurması gerekir:

-Diskin besiyeri, antibiyotik ve mikroorganizma üzerinde olumsuz etki göstermemelidir.

-Diskin ne kadar sıvı emeceği bilinmelidir.(standart diskler 6 mm olup, 0.02 ml sıvı emmektedir)

-Diskler -14°C ile -20°C saklanmalıdır

-Diskler merkezden merkeze 24 mm'den yakın olmayacak şekilde yerleştirilmelidir.

Tolerans: Bakterisit etkili ajanların (antibiyotik gibi) bakteriye bakteriyostatik etkinlik göstermesidir. MBC/MIC oranı ile tolerans hesaplanır. Bu oran 32'nin üstünde ise bakteri toleranslı kabul edilir (Şenyar ve Efendiyev 2008).

1.6.2 Dilüsyon Testleri

A.Agar Dilüsyon Testleri

Antimikrobiyal konsantrasyonlarının, geometrik artış gösterir şekilde, agar katılaşmadan besiyerine katılması ve bu şekilde hazırlanan besiyeri üzerine nokta ekimi yapılması esasına dayanır. Bu yöntemle aynı anda çok sayıda bakteri test edilebilir. Petrideki agar kalınlığı 3-4 mm olmalıdır.

Katı besiyerinde üreyen mikroorganizmalar Mueller-Hinton, Brain-Heart infüzyon gibi bir sıvı besiyerine kültür edilir. Bakteri bulanıklıklarının 0.5 Mc Farland standartına gelmesi sağlanır. Ekim yapılan noktalar kuruyana kadar oda ısısında, daha sonra ise 30°C' de 16-20 saat inkübe edilir. Bakteri üremesinin inhibe olduğu antimikrobiyal maddenin en düşük konsantrasyonu "MİK" değerini verir (Eşel ve ark. 2004).

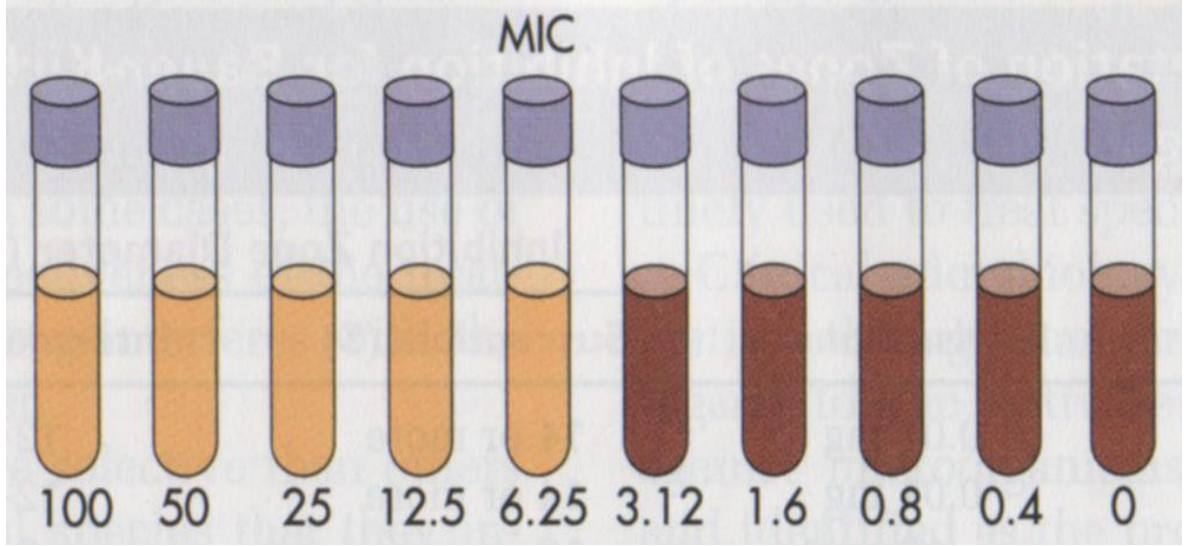
B.Broth Dilüsyon Testleri

a.Makrodilüsyon (tüp dilüsyon) yöntemi

b.Mikrodilüsyon testleri

a.Makrodilüsyon (tüp dilüsyon) yöntemi

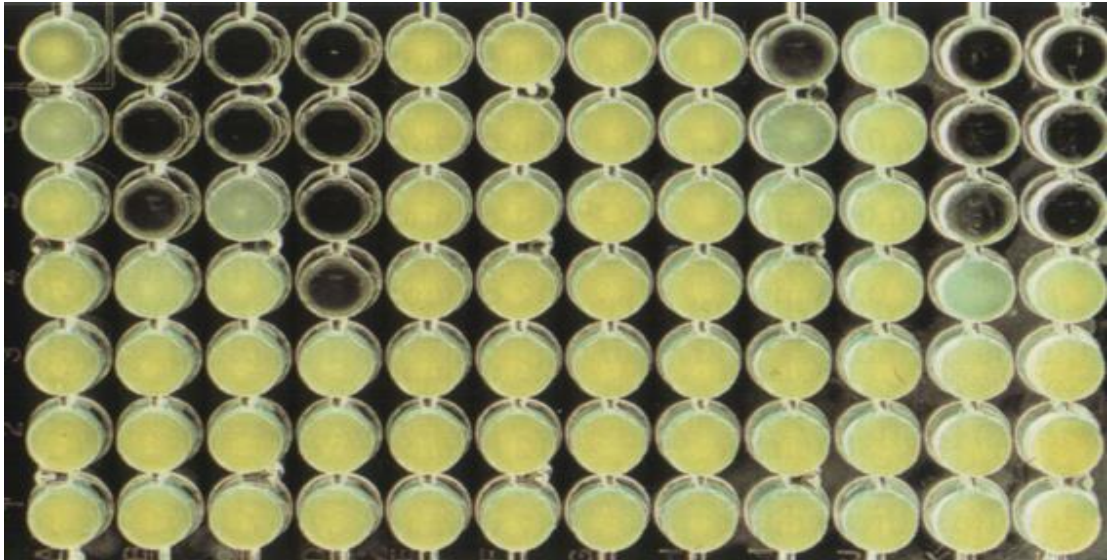
13x100 mm'lik tüplere 1mL Mueller-Hinton Broth dağıtılır. İlk tüpe 1mL antimikrobiyal eriyiği konarak 1/2 sulandırımı yapılır. Son tüp "üreme kontrol tüpü" olduğundan antimikrobiyal eklenmez. Tüplerde 5×10^5 CFU olacak şekilde bakteri ekimi yapılır. (0.5 Mc Farland bulanıklığındaki solüsyon 1/100 oranında sulandırılır.) Tüm tüplere bu süspansiyondan 1mL eklenir ve 35°C'de 16-20 saat inkübe edilir. Üremenin olmadığı en küçük konsantrasyon "MİK" değerini verir (Özkan ve ark. 2009).



Şekil 1.14 MİK hesaplanması (şematik)

b.Mikrodilüsyon testleri

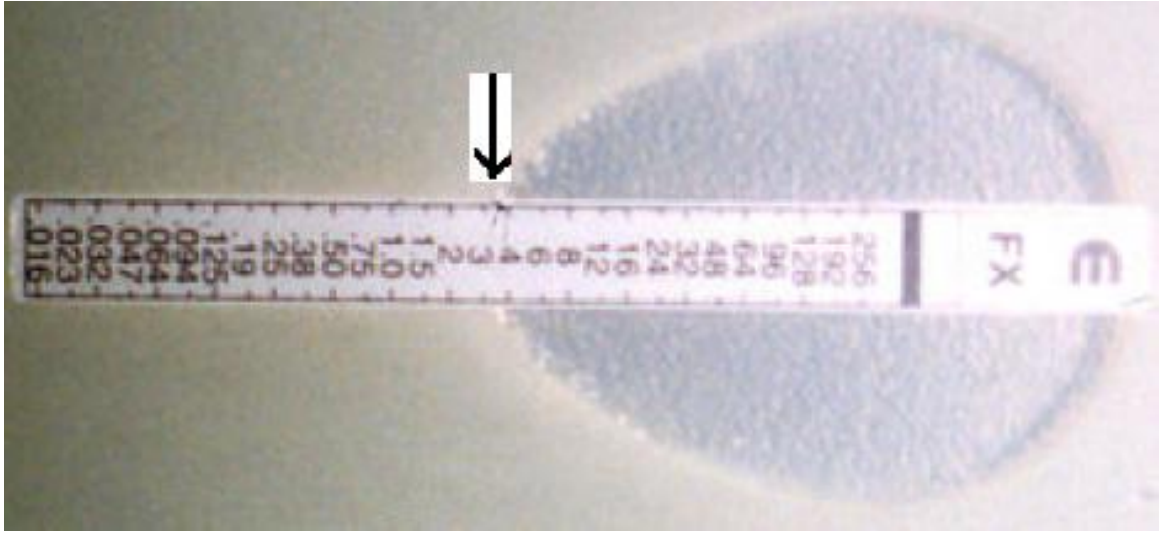
80/100 kuyucuklu 500 mL kapasiteli mikroplate kuyucuklarında yapılmaktadır. 100 mikrolitre hacimde, kuyucuk başına yaklaşık 5×10^4 CFU bakteri bulunur. Makrodilüsyon yöntemindeki işlemlerin benzeri yapılır ve “MİK” belirlenir (Sümerkan 2009).



Şekil 1.15 Mikrodilüsyon testi (şematik)

1.6.3 Gradient Strip Testleri (E Test)

Antimikrobiyal disk yerine plastik strip üzerindedir.E test striplerinin arka yüzeyinde 0.016-256 mikrogram/mL veya 0.002-32 mikrogram/mL derişimlerinde antimikrobiyal madde kurutulmuş olarak bulunur.Diğer yüzünde ise konsantrasyonlar bir cetvel gibi sıralanmıştır.150 mm çapında, 60-65 mL agar içeren plaklarda uygulanır (Matar ve ark. 2003).



Sekil 1.16 E test

1.6.4 Otomatize Yöntemler (Vitec)

En yaygın olarak kullanılan otomatize sistemlerden vitec sisteminde; amaca göre uygun, gram negatifler, gram pozitifler, bakteri sayımı, anaeroblar ya da antibiyogram için özel kartlar seçilir. Kartlardaki çukurlarda liyofilize ayıraçlı besiyerleri veya antibiyotikli besiyerleri vardır. Cihaz tarafından, standart bulanıklıkla bakteri süspansiyonlarından kartlara ekim yapılır; üretilir, sonuçlar okunur, değerlendirilir ve kaydedilir. Bu cihazlar; hızlı sonuç verir, iş yükünü azaltır, tekrarlanabilirliği yüksek, fakat pahalı olması kullanımını sınırlamaktadır (Testi ve ark. 2013).

Materyalin antimikrobiyal özelliklerini belirlemek için değişik laboratuvar yöntemleri geliştirilmiştir. Antimikrobiyal çalışmalarda sıklıkla kullanılan besiyerleri şu şekilde ifade edilebilir.

1.7 Besiyerleri

Cansız ortamda üreyebilen mikroorganizmaları üretmek, saf olarak elde etmek ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi ile biyolojik ürünlerin elde edilebilmesi amacıyla kullanılan cansız ortamlara **besiyeri** denir (Bilgehan 2002).

1.7.1 Besiyeri Bileşiminde Bulunan Maddeler

Su: pH'ı 6,5-7,5 arasında olan deiyonize su kullanılması gerekmektedir.

Pepton: Proteinlerin hidrolizi sonucu elde edilir. Peptonlar, mikroorganizmalar tarafından hem karbon hem azot kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Et suyu: Temel besiyerinde mikroorganizmalar için besleyici özelliği nedeniyle konan bir maddedir.

Zenginleştirici Maddeler: Kan, serum, safra, haben sıvısı, maya özütü gibi maddeler katılarak besiyeri zenginleştirme işlemi yapılmaktadır.

Agar: Besiyerini katılaştırmak amacıyla kullanılmaktadır. Yosunlardan elde edilmiş uzun zincirli bir polisakkarittir. 85°C'de erimekte, 40°C'de jelleşmektedir. Jelleşme özelliğinin 5'in altındaki pH'da kaybetmektedir.

İnhibitör: İstenmeyen mikroorganizmaların üremesini engellemek için besiyerlerine eklenmektedir. Metilen mavisi, malaşit yeşili, eosin, safra tuzları, metakrom sarısı, antibiyotikler, deoksikolat, bizmut, selenit bu amaçla eklenen inhibitör maddelerdendir (Halkman 1995).

Besiyerleri;

-Fiziksel özelliklerine göre
-Kimyasal özelliklerine göre
-Fonksiyonlarına göre

} sınıflandırılır.

1.7.2 Fiziksel Özelliklerine Göre Besiyerleri

a) **Sıvı Besiyeri:** Agar gibi katılaştırıcı bir madde bulunmayan besiyerleridir.

b) **Yarı Katı Besiyeri:** % 0,3-0,5 oranında agar içeren besiyerleridir.

c) **Katı Besiyeri:** % 1,5-3 oranında agar içeren besiyerleridir.

1.7.3 Kimyasal Özelliklerine Göre Besiyerleri

a) Sentetik olan besiyerleri

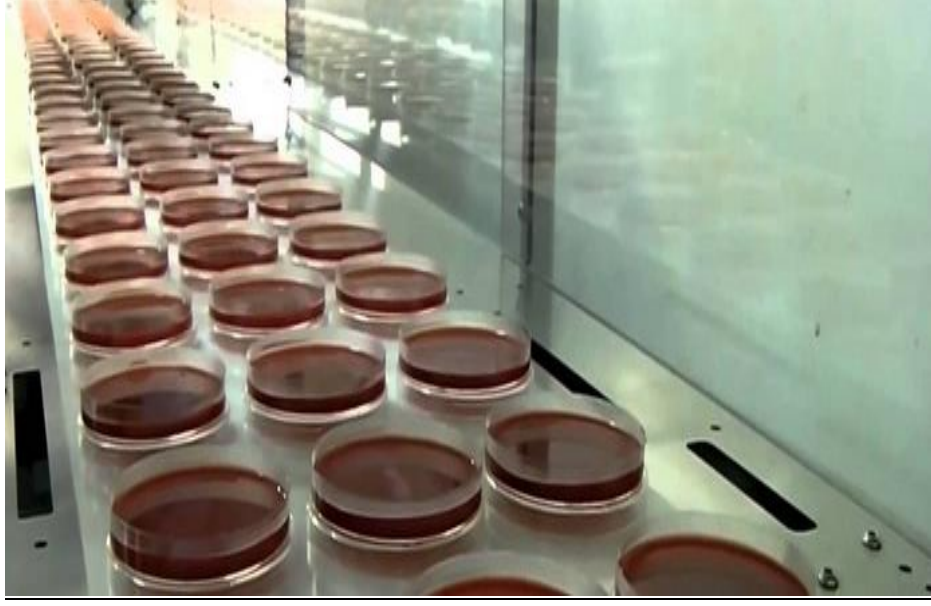
b) Sentetik olmayan besiyerleri

1.7.4 Fonsiyonlarına Göre Besiyerleri

a) **Temel Besiyeri:** Mikroorganizmaların çoğunun ürediği besiyerleridir. (% 1 pepton + %1 et özütü + % 0,5 NaCl + distile su=buyyon)

b) **Zenginleştirilmiş Besiyeri:** Temel besiyerinde üretilmeyen birçok mikroorganizmayı üretmek için kullanılır. Temel besiyerine *glikoz, kan, serum, haben sıvısı, yumurta* eklenecek elde edilir.

c) **Özel Besiyerleri:** Üretilmesinde çeşitli zorluklar yaşanan mikroorganizmaların üretilmesi için özel olarak hazırlanan besiyerleridir. Mikroorganizma tanısı, saf kültür eldesi, duyarlılık araştırması amacıyla bazı maddelerin eklendiği veya bazı mikroorganizmaların üremesini engelleyici maddelerin ilave edildiği besiyerleridir. Örneğin, **Mc Conkey besiyeri** içerisindeki kristal viyole boyası ve safra gram pozitif bakterilerin üremesini engellerken, gram negatif enterik bakterilerin kolaylıkla üremesini sağlar (Brooks ve ark. 1998) .



Şekil 1.17 Petrilere hazırlanmış agarlı besiyeri

1.8 Amaç ve Hipotez

Bu çalışmanın amacı, beş farklı bitki ekstraktının çürük etkeni bakteriler üzerindeki antibakteriyal etkinliğini ve sitotoksitesini değerlendirmektir. Çalışmanın hipotezi, “beş farklı bitki ekstraktı çürük etkeni bakteriler üzerinde antibakteriyal etkinliğe sahiptir ve sitotoksitesi kabul edilebilir değerler arasındadır.” önermesi üzerine kurulmuştur.

2 GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda çeşitli bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliği, sitotoksitesi ve apoptoz -nekroz indekslemesi değerlendirilmiştir. *Salvadora Persica* (Misvak), *Olea Europea* (Zeytin yaprağı), *Curcuma Longa* (Zerdeçal), *Plantago Lanceolata* (Damar otu), *Equistum Arvense* (Kırk kilit otu) çalışmamızda kullandığımız bitkilerdir. *Salvadora Persica* (Misvak) vakumla paketlenmiş bir şekilde aktardan, diğer bitkiler ise İmmunat (Muğla Türkiye) isimli firmadan temin edilmiştir.



Şekil 2.1 a) Misvak, b) Zerdeçal c) Kırk kilit otu, d) Damar otu, e) Zeytin yaprağı

Bitkiler, öğütülerek küçük parçalar haline getirilmiştir. 100 gram öğütülmüş bitki SOXHLET ekstraktöründe, metanol kullanılarak solvent rengini kaybedene kadar (yaklaşık 10 saat boyunca) ekstrakte edilmiştir. Döner vakumlu buharlaştırıcı kullanılarak 40°C'de solvent uzaklaştırılmıştır. Elde edilen bitki ekstraktları, uygulanacak testlerde kullanılmaya kadar buzlukta bekletilmiştir.

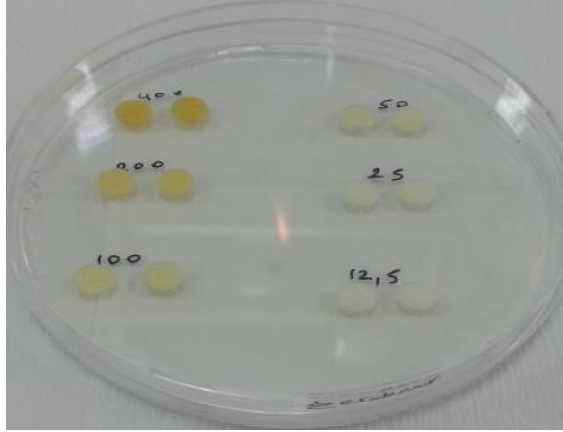
2.1 Antimikrobiyal Aktivite Testi

Disk difüzyon testi için; damar otu, zeytin yaprağı, zerdeçal, misvak ve kırkkilit otu ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonları (1 ml'de; 400 µl, 200 µl, 100 µl, 50 µl, 25 µl ve 12,5 µl olacak şekilde) hazırlanmıştır.



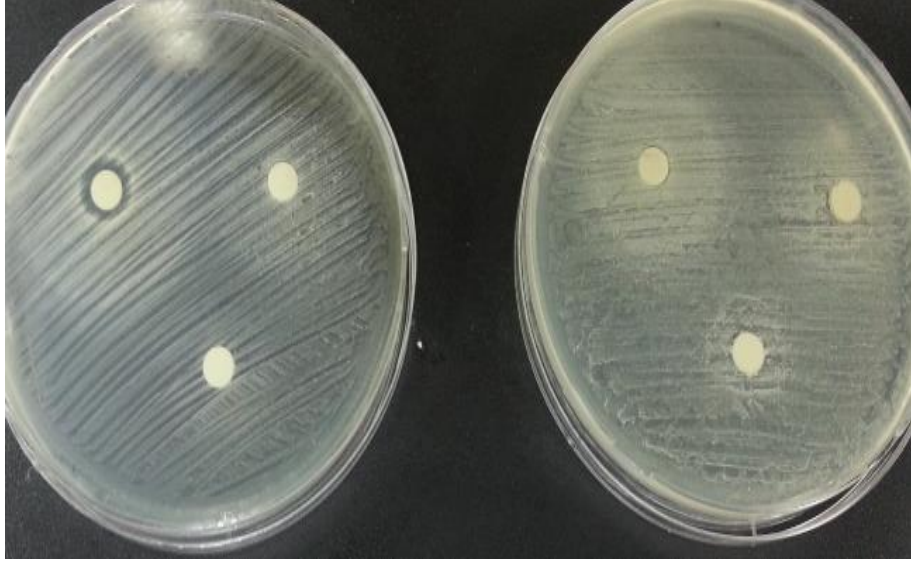
Şekil 2.2 Farklı konsantrasyonları hazırlanmış bitki ekstraktları

Farklı konsantrasyonlardaki ekstraktlar boş disklerle 20 μ l emdirilip, sterilizasyonu yapılmıştır.

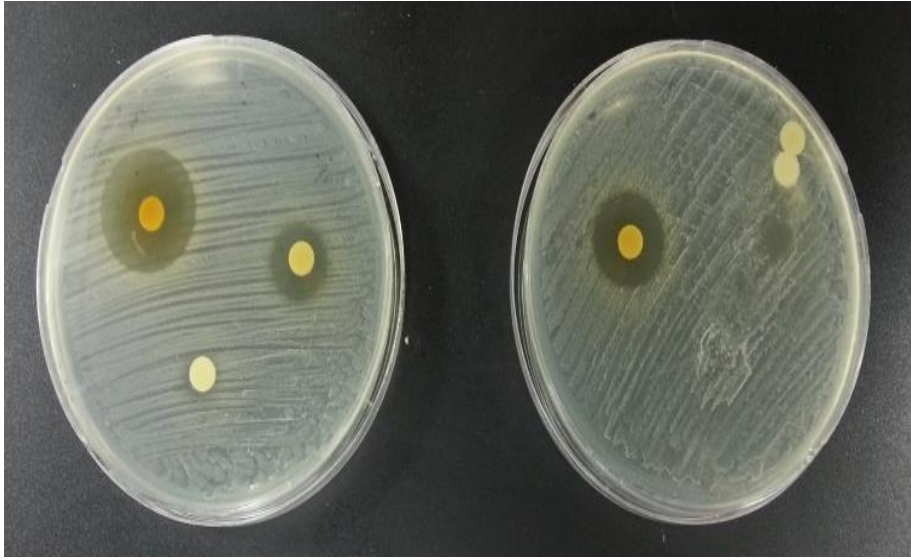


Şekil 2.3 Farklı konsantrasyonlarda ekstrakt emdirilmiş diskler

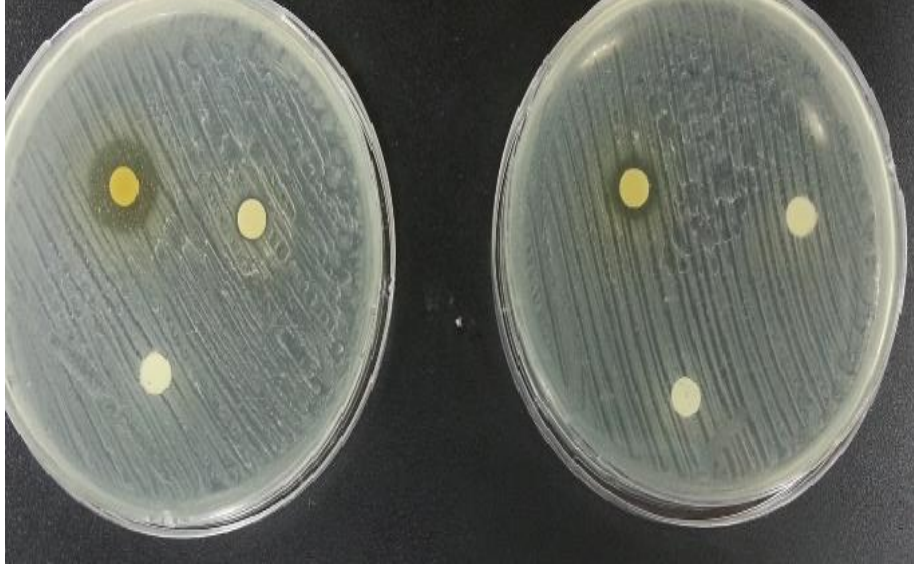
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'ndan alınan liyofilize suşlar, suş açma protokolüne uygun bir şekilde açılmıştır. *Streptococcus mutans* (ATTC 2517), *Lactobacillus acidofilus* (ATTC 43121) ve *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (ATTC 29523) bakterileri talimatlara uygun bir şekilde ekilmiştir. Üzerlerine ekstrakt emdirilmiş olan diskler, antibiyotik ve kontrol diskleri, bakterilerin ekildiği petrilere yerleştirilerek 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası diskler etrafında oluşan zon çapları ölçülmüştür.



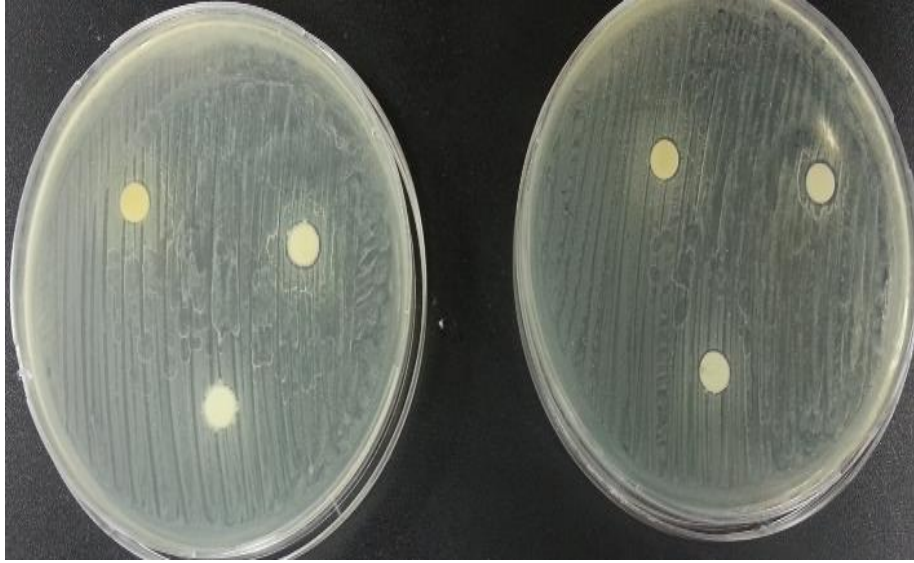
Şekil 2.4 Streptokokus mutans, Misvak



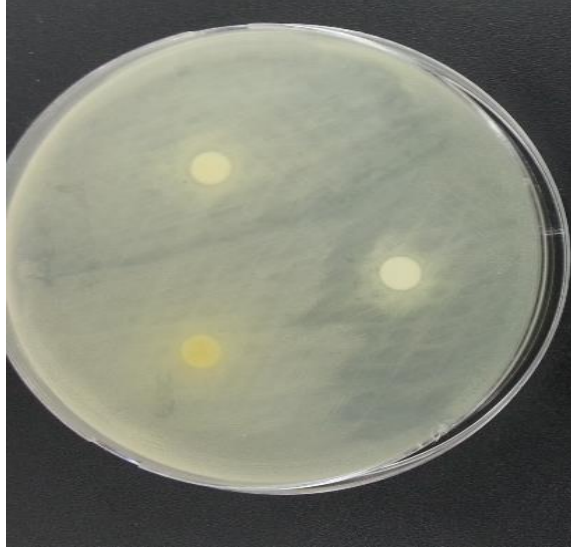
Şekil 2.5 Streptokokus mutans, Zeytin yaprağı



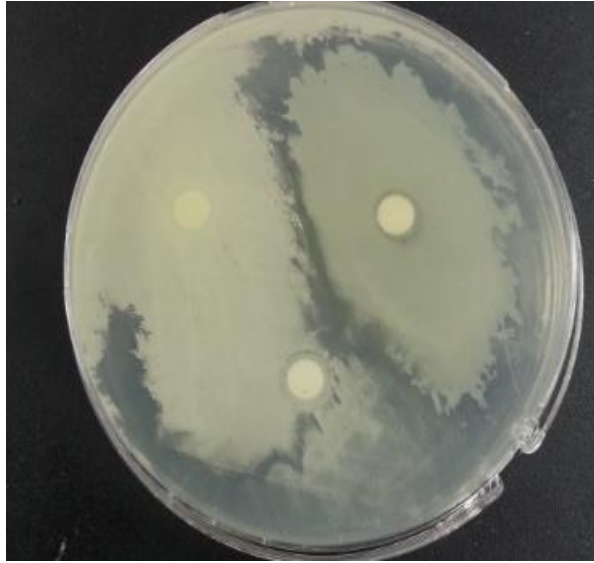
Şekil 2.6 Streptokokus mutans, Damar otu



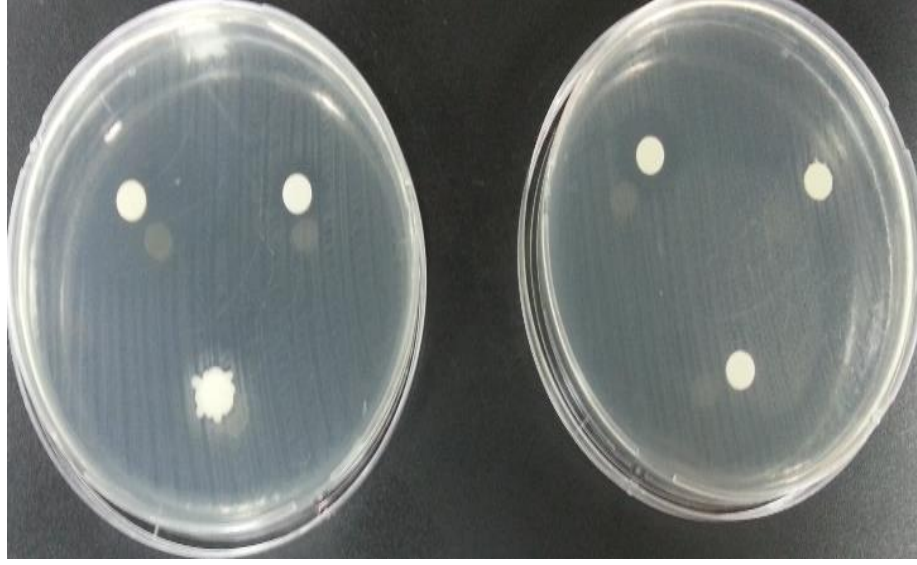
Şekil 2.7 Streptokokus mutans, Zerdaçal



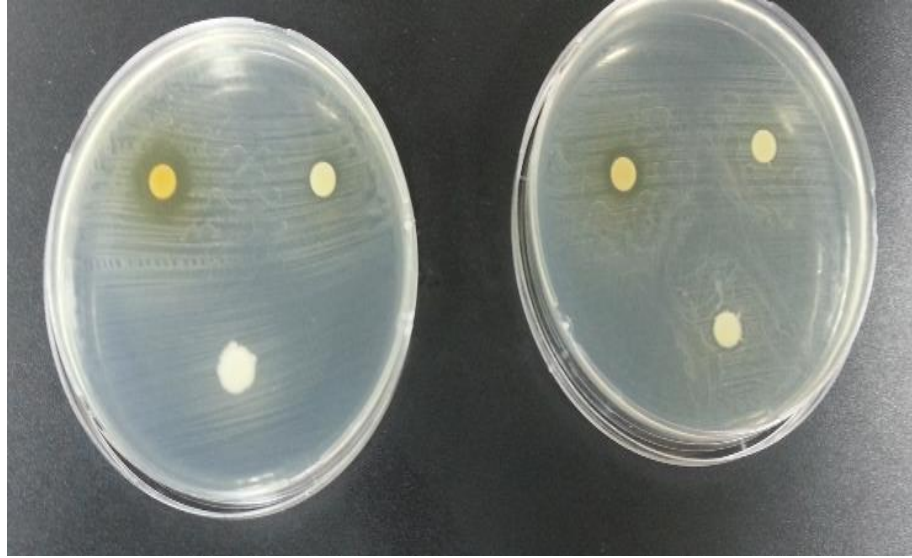
Şekil 2.8: *Lactobacillus acidophilus*, zerdeçal, (400,100, 12.5)



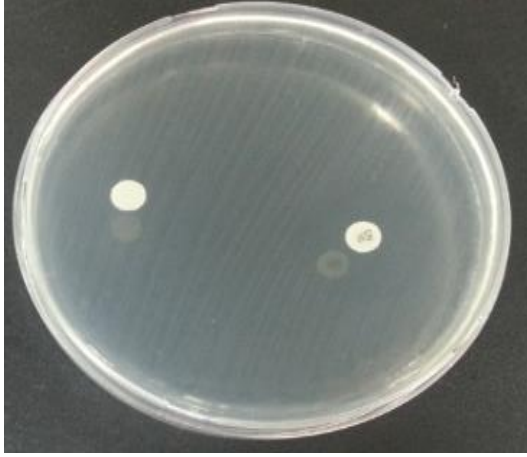
Şekil 2.9 *Lactobacillus acidophilus*, kırkkilit otu, (200, 50, 25)



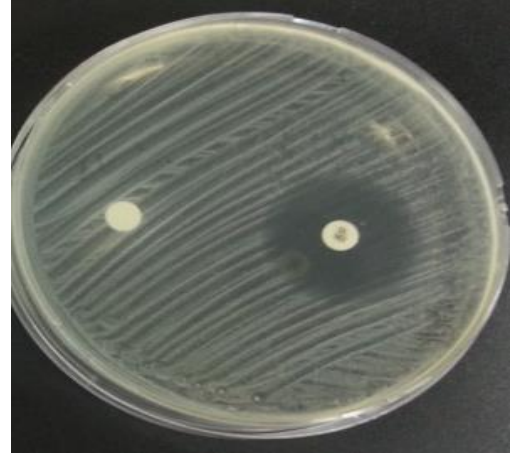
Şekil 2.10 *Actinobacillus actinomycescomitans*, Misvak



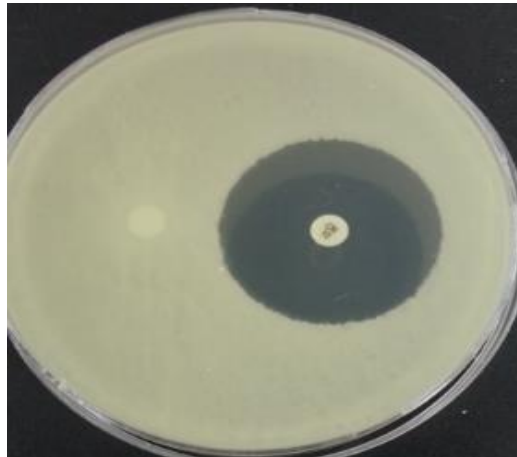
Şekil 2.11 *Actinobacillus actinomycescomitans*, Zeytin yaprağı



Şekil 2.12 *A.actinomycetescomitans*,
gentamisin ve boş disk

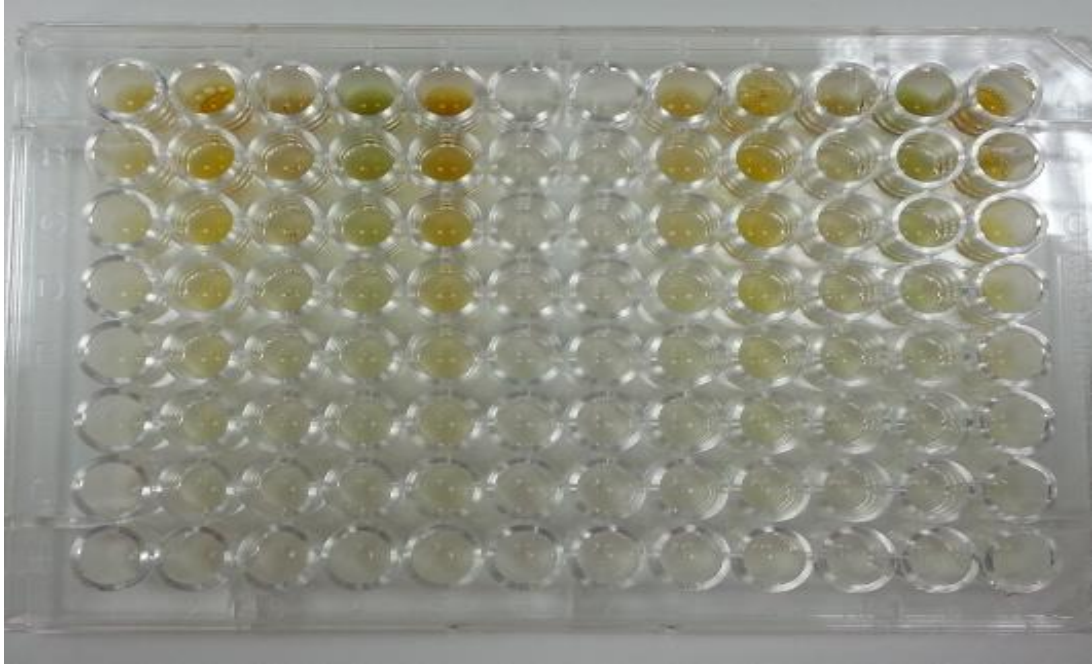


Şekil 2.14 *Streptococcus mutans*,
gentamisin ve boş disk



Şekil 2.13 *Lactobacillus acidophilus*, gentamisin ve boş disk

MİK (minumum inhibisyon konsantrasyonu) testi için; damar otu, zeytin yaprağı, zerdeçal, misvak ve kırkkilit otu ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonları (1 ml'de; 400 µl, 200 µl, 100 µl, 50 µl, 25 µl ve 12,5 µl olacak şekilde) 96 kuyucuklu plate içinde hazırlanmıştır.



Şekil 2.15 MİK hesaplaması için hazırlanmış ekstraktlar

Daha sonra üzerlerine *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp.* ve *Actinobacillus sp.* bakterileri 10'ar µl eklenerek 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası her kuyucuktan Nutrient Agar besiyerine ekim yapılarak üreme olup olmamasına göre sonuçlar gözlemlenmiştir



Şekil 2.16 *Lactobacillus acidophilus*, Misvak



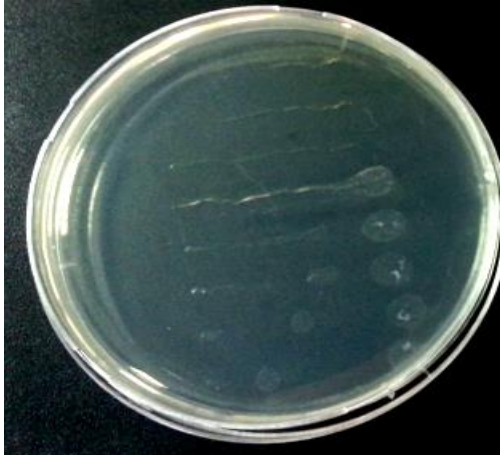
Şekil 2.17 *Lactobacillus acidophilus*, Zeytin yaprağı



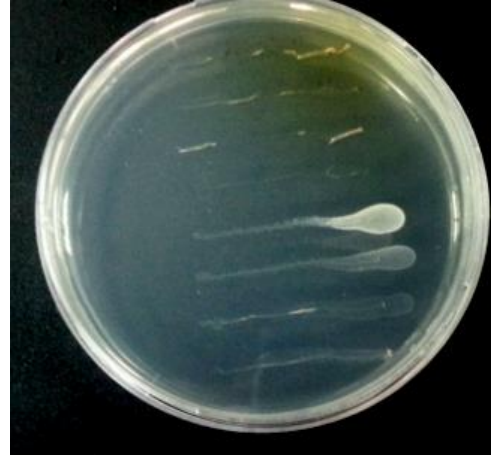
Şekil 2.18 *Lactobacillus acidophilus*, Damar otu



Şekil 2.19 *Actinobacillus actinomycescomitans*, Kırkkilit otu



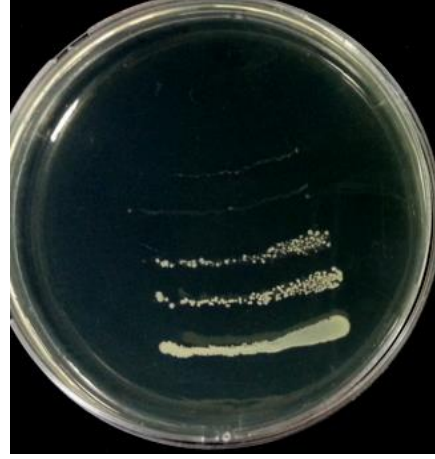
Şekil 2.20 *Actinobacillus actinomycescomitans*, Damar otu



Şekil 2.21 *Actinobacillus actinomycescomitans*, Zeytin yaprağı



Şekil 2.22 Streptococcus mutans,
Zerdeçal



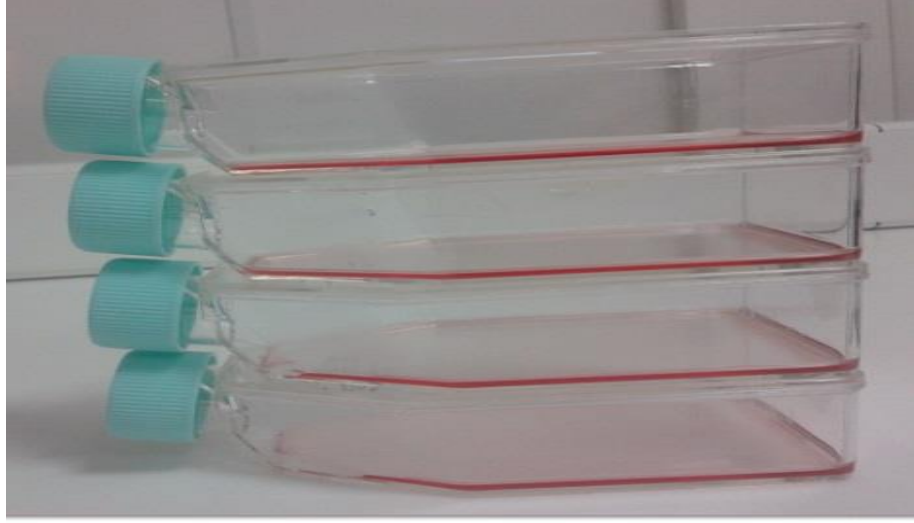
Şekil 2.23 Streptococcus mutans,
Misvak



Şekil 2.24 Streptococcus mutans, Zeytin yaprağı

2.2 Hücre Kültürü

Sıvı nitrojen tankında saklanan L929 fibroblast hücreleri çözündükten sonra santrifüj edilmiştir. Üzerine 3 ml (%100 DMEM+ %10 FetalBovine Serum+ %1 Antibiyotik içeren) medyum eklendikten sonra flaska ekimi yapıp % 5 CO₂, 37°C 'de inkübe edilmiştir.



Şekil 2.25 Hücre ekimi yapılmış flasklar



Şekil 2.26 CO₂'li inkübatör

Hücreler yeterli sayıya ulaşıncaya kadar Tripsin EDTA ile kaldırılarak pasajlama işlemine devam edilmiştir.



Şekil 2.27 Hücrelerin pasajlanması

2.3 MTT testi ile sitotoksitenin belirlenmesi

Sitotoksitenin belirlenmesi için MTT testi kullanıldı. MTT testi ISO 10993-5 standartlarına uygun şekilde yapıldı. Bu test hücre proliferasyonunun ölçülmesi için 3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) tetrazolyum tuzu'nun kullanıldığı hassas bir metoddur. MTT, metabolik aktivite ile ilgili mitokondrial enzimler tarafından suda çözünmeyen formazan boyaya indirgenmektedir. MTT'nin indirgenmesi primer olarak hücre içerisindeki glikolitik aktivite ile ilgili olmakla birlikte NADH (NicotinamideAdenineDinucleotide) ve NADPH(NicotinamideAdenineDinucleotidePhosphate) varlığına bağlıdır. MTT solusyonu canlı veya apoptozun erken evresindeki hücrelerin mitokondrileri aracılığıyla ile oluşturduğu reaksiyonda, solusyonlarda bulunan tetrazolium halkası hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak renkli formazan kristalleri oluşturur. Canlı hücrelerde gözlenen renk değişimi ELİSA reader da yapılan okuma sonundaki absorbance degerlerini verir. L-929 fare fibroblast hücreleri, 48 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğana 10×10^3 hücre olacak şekilde ekimi yapılmıştır.



Şekil 2.28 Hücre sayım cihazı (cell counter)

Hücreler 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Daha önceden hazırlanan 1mg/mL'lik bitki ekstraktları örneklerinden belirlenen konsantrasyonlarda (0- 12,5µg/mL - 25µg/mL - 50µg/mL - 100µg/mL - 200µg/mL - 400 µg/mL) hücrelerin üzerine uygulanıp, 24 saat inkübe edilmiştir. Örnekler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Pozitif kontrol olarak sadece besi ortamı hücrelere uygulanmıştır. 24 saat sonunda kuyucuklardaki vasatlar atılarak her kuyucuğa 100 µl besiyeri ve 20 µl MTT çözeltisi ilave edilmiştir. 37 °C'de 3,5 saat inkübasyondan sonra kuyucuklara 150 µl MTT solventi (DMSO) eklenerek 15 dakika inkübe edilmiştir. Hücre canlılığının tespiti için 24 kuyucuklu plate'in absorbans değerleri ELİSA plate okuyucuda 570 nm'de okutulmuştur. Kontrol grupları baz alınarak canlılık yüzde olarak hesaplanmıştır.



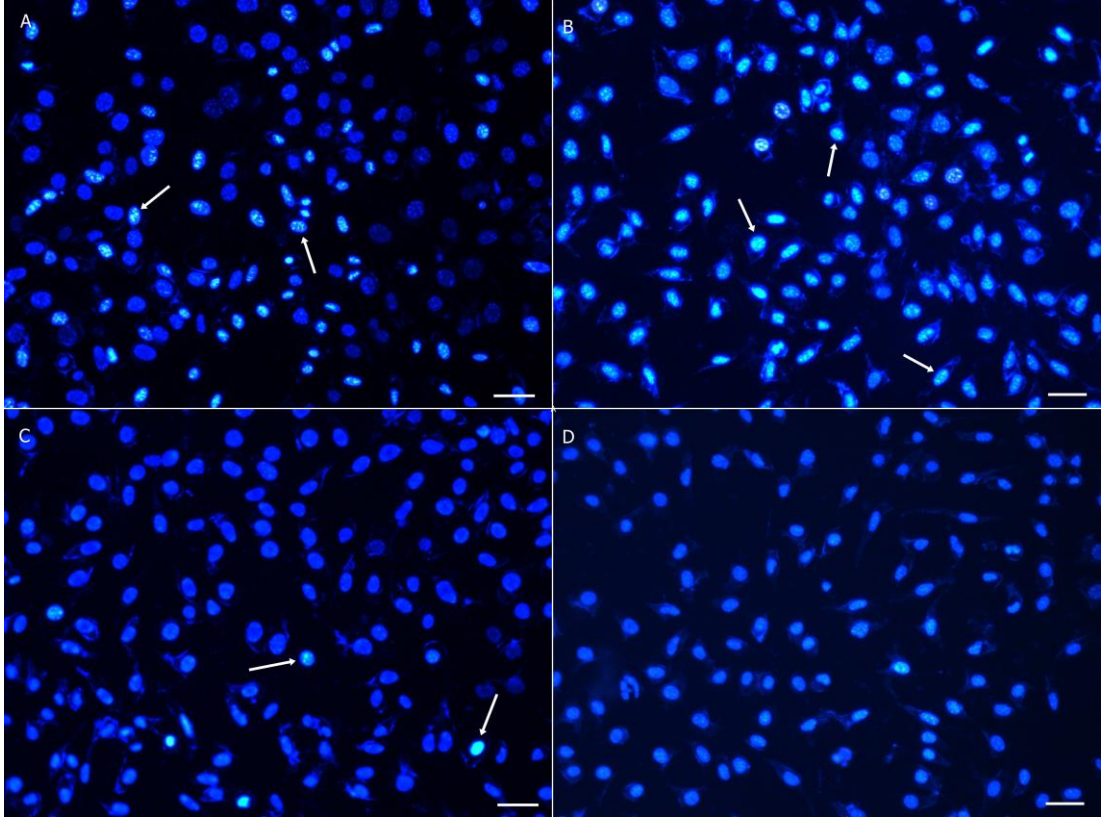
Şekil 2.29 ELİSA cihazı

2.4 İkili Boyama Metodu İle Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi

İkili boyama metodu çekirdeği boyamakta ve bu sayede apoptozu ve nekrozu göstermektedir. Ribonükleaz A kullanılır. – 20°C’de saklanır (Sigma R-500). Ribonükleaz A RNA’yı boyamaz. Bu sayede sitoplazmik RNA’yı yok eder. Hoechst boyama: +4 °C’da saklanır (33342). Apoptotik hücreleri boyar. Bu sayede gerçek apoptotik hücreler belirlenir. Propidium iodide: +4 °C’de saklanır. DNA’yı ve RNA’yı boyar. Kırmızıya boyayarak sekonder nekrozu gösterir.

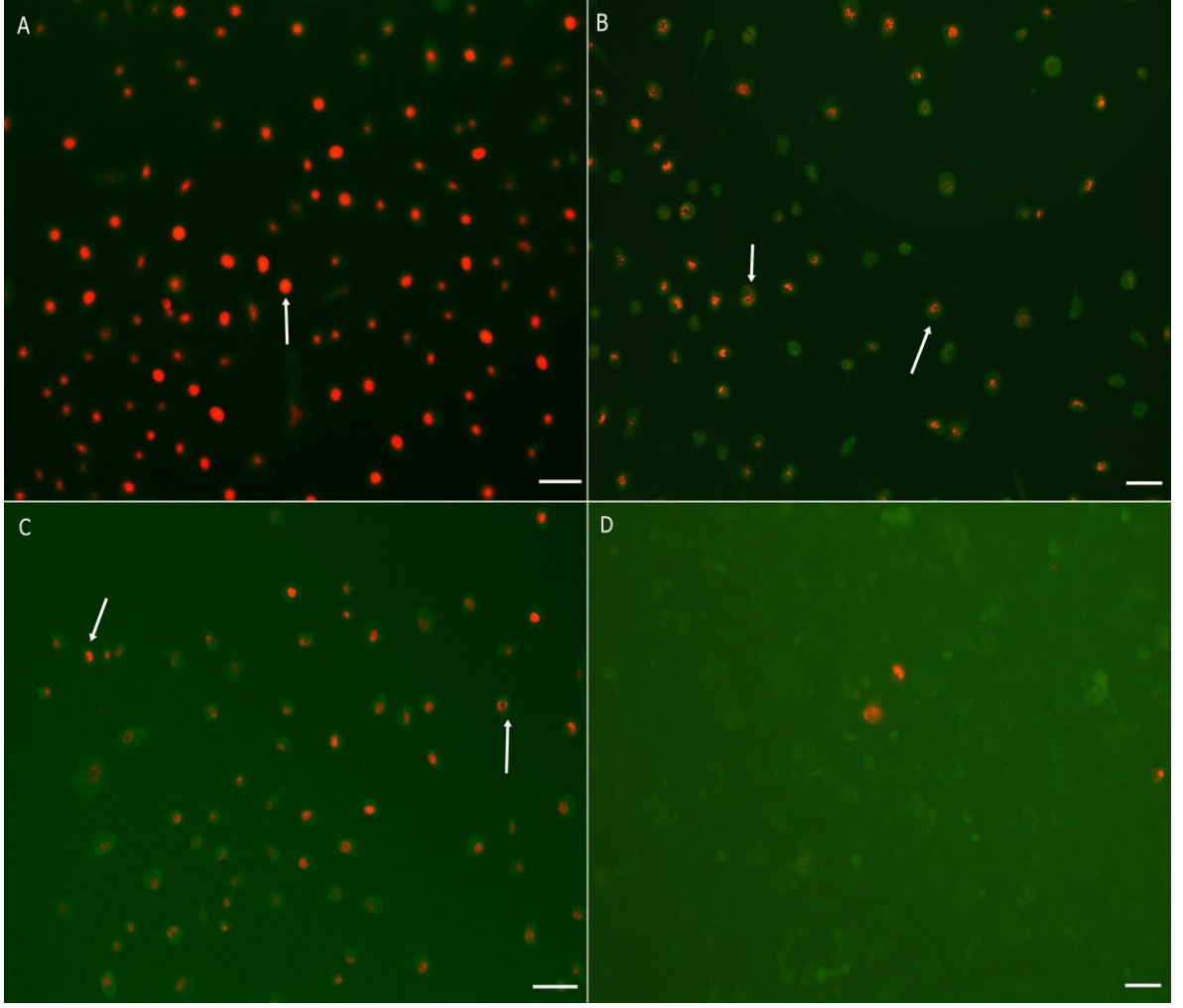
İkili boyama solüsyonunun hazırlanışı: Ribonükleaz A’dan 1ml PBS ’de 10 mg RNA olacak şekilde hazırlanır. Hoechst ise 1 ml PBS’de 200 mikrogram olacak şekilde hazırlanır. Propidium iodide 1ml PBS’de 100 mikrogram olacak şekilde hazırlanır.

Çalışma solüsyonunun hazırlanışı: 10 mL PBS içine 100 mikrolitre RNAaz, 500 mikrolitre Hoechst, 100 mikrolitre Propidium iodide ilave edilerek hazırlanır. İkili boyama için 48 kuyucuklu plaka kullanılmıştır. Hücre sayımından sonra canlı hücre sayısına göre her kuyucukta 10×10^3 hücre olacak şekilde hesaplama yapılmıştır. 48 kuyucuklu plakada her kuyucuga 100 µl hücre koyulmuş ve 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda kuyucuklardaki medyum boşaltılmıştır. 48 kuyucuklu plakanın tüm kuyucuklarına 150 µl medyum koyulmuştur. Daha önceden hazırlanan 1mg/mL lik 1mg/mL’lik bitki ekstraktları belirlenen konsantrasyonlarda (0, 12,5µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 200µg/mL, 400 µg/mL) hücrelerin üzerine uygulanıp, 24 saat inkübe edilmiştir. Kontrol grubuna sadece medyum eklenip, 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki medyum boşaltılmış ve her kuyucuga 70 µl ikili çalışma solüsyonu (doublestaining çalışma solüsyonu) eklenmiş, 48 kuyucuklu plaka hiç ışık görmeyecek şekilde kapatılıp 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptozu uğramış hücrelerin ve FITC filtresi kullanılarak da (480-520 nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapılmıştır.



Şekil 2.30 Apoptoza uğrayan hücreler; A. 400 µg/ml konsantrasyonda zeytin yaprağı ekstresi uygulanmış B, C, D) B. 200 µg/ml damarotu ekstresi uygulanmış L929 fibroblast hücreleri. Apoptotik hücreler Hoechst 33342 ile parlak mavi renkte görülmekte ve DAPI filtresinde incelenmektedir. C. 50 µg/ml konsantrasyonda kırkkilit otu ekstresi uygulanmış L929 fibroblast hücreleri. D. DAPI filtresinde sadece medyum uygulanmış kontrol grubu hücreleri.

Apoptotik hücreler Hoechst 33342 ile parlak mavi renkte görülmektedir (Şekil 2.30) Bar 100 µm göstermektedir. Fotoğraflar Leica DMI6000B inverted mikroskop ile görüntülenmiştir.



Şekil 2.31 Nekroza uğrayan hücreler; A. 400 µg/ml konsantrasyonda damarotu ekstresi uygulanmış L929 fibroblast hücreleri. Kırmızı görünen hücreler propodium iodide ile boyanmış, nekrotik hücrelerdir. Nekrotik hücreler FITC filtresinde görülmektedir. B. 100 µg/ml zerdeçal ekstresi uygulanmış L929 fibroblast hücreleri. C. 50 µg/ml konsantrasyonda misvak uygulanmış L929 fibroblast hücreleri. D.FITC filtresinde sadece medyum uygulanmış kontrol grubu hücreleri. Bar 100 µm göstermektedir.

İkili boyama ile nekrotik hücrelerin gösterilmesi. Bar 100 µm göstermektedir. Fotograflar Leica DMI6000B inverted mikroskop ile görüntülenmiştir.

İstatistik analizi

Bu çalışmada elde edilen veriler SPSS 20 paket programı ile analiz edilmiştir. Değişkenlerin normal dağılımdan gelme durumları araştırılırken birim sayıları nedeniyle Shapiro Wilk's' den yararlanılmıştır. Sonuçlar yorumlanırken anlamlılık düzeyi olarak 0,05 kullanılmış olup; $p < 0,05$ olması durumunda değişkenlerin normal dağılımdan gelmediği, $p > 0,05$ olması durumunda ise değişkenlerin normal dağılımdan geldikleri belirtilmiştir.

Gruplar arasındaki farklılıklar incelenirken değişkenlerin normal dağılımdan gelmemesi durumunda Kruskal Wallis-H Testi'nden yararlanılmıştır. Kruskal Wallis-H Testinde anlamlı farklılıkların görülmesi durumunda Post-Hoc Çoklu Karşılaştırma Testi ile aralarında farklılık olan gruplar belirlenmiştir.

3 BULGULAR

S.mutans'da 400, 200 ve 100 µg/ml konsantrasyon için zon çapları bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,05$). *S.mutans*'da, 400 µg/ml konsantrasyondaki zeytin yaprağı grubunun zon çapı zerdeçal ve kırkkilite, 200 ve 100 µg/ml konsantrasyonda ise zerdeçal, misvak ve kırkkilit gruplarına göre anlamlı derecede yüksektir. (Çizelge 3.1)

Actinobacillus Actinomycetemcomitans'da 400, 200 ve 100 µg/ml konsantrasyon için zon çapları bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,05$). *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*'da 400, 200 ve 100 µg/ml konsantrasyon için misvak grubunun zon çapı; damar otu, zerdeçal ve kırkkilit grubunun zon çaplarına göre anlamlı derecede yüksektir. (Çizelge 3.3)

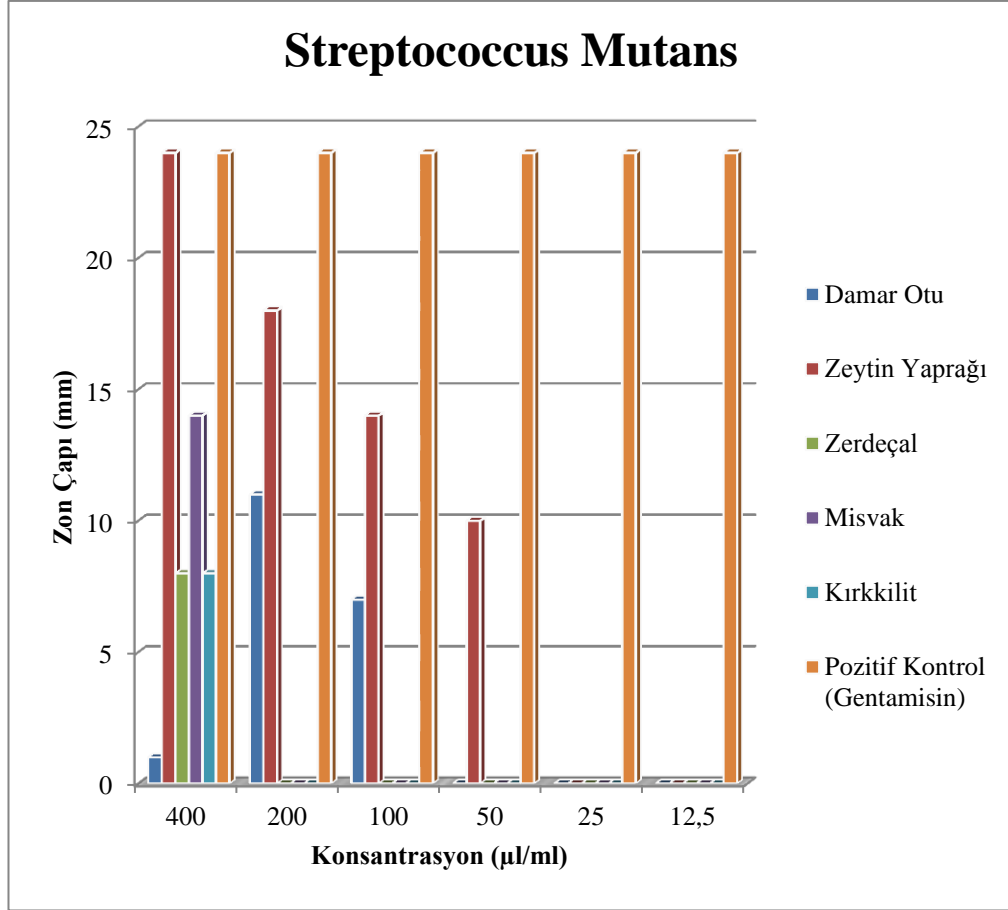
Bu in vitro çalışmada kullandığımız bitki etkstratlarının *Lactobasillus acidophilus* üzerinde antibakteriyal etkinliğe sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Canlılık oranları bakımından, 400, 200, 100 ve 50 µg/ml konsantrasyonda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,05$). 400 ve 200 µg/ml konsantrasyon için zeytin yaprağı grubunun canlılık oranları sırasıyla damar otu ve zerdeçal grubuna göre anlamlı derecede yüksektir. 100µg/ml konsantrasyon için damar otu ve zeytin yaprağı gruplarının canlılık oranları, 50 µg/ml konsantrasyon için zeytin yaprağı grubunun canlılık oranları, zerdeçal grubuna göre anlamlı derecede yüksektir.

Canlılık oranları bakımından, 25 ve 12,5 µg/ml konsantrasyonda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,05$). 25 µg/ml konsantrasyon için zeytin yaprağı grubunun canlılık oranı, 12.5 µg/ml konsantrasyon için kırk kilit grubunun canlılık oranı, zerdeçal grubuna göre anlamlı derecede yüksektir.

Çizelge 3.1 *Streptococcus mutans*'a ait zon çapları

	Zon Çapları (mm)						
	Konsantrasyon	Damar Otu	Zeytin Yapağı	Zerdeçal	Misvak	Kırkkilit	Pozitif Kontrol (Gentamisin)
<i>Streptococcus mutans</i>	400 µl/ml	15 mm	24 mm	8mm	14mm	8mm	24mm
	200 µl/ml	11 mm	18 mm	0	0	0	24mm
	100 µl/ml	7 mm	14 mm	0	0	0	24mm
	50 µl/ml	0	10 mm	0	0	0	24mm
	25 µl/ml	0	0	0	0	0	24mm
	12,5 µl/ml	0	0	0	0	0	24mm



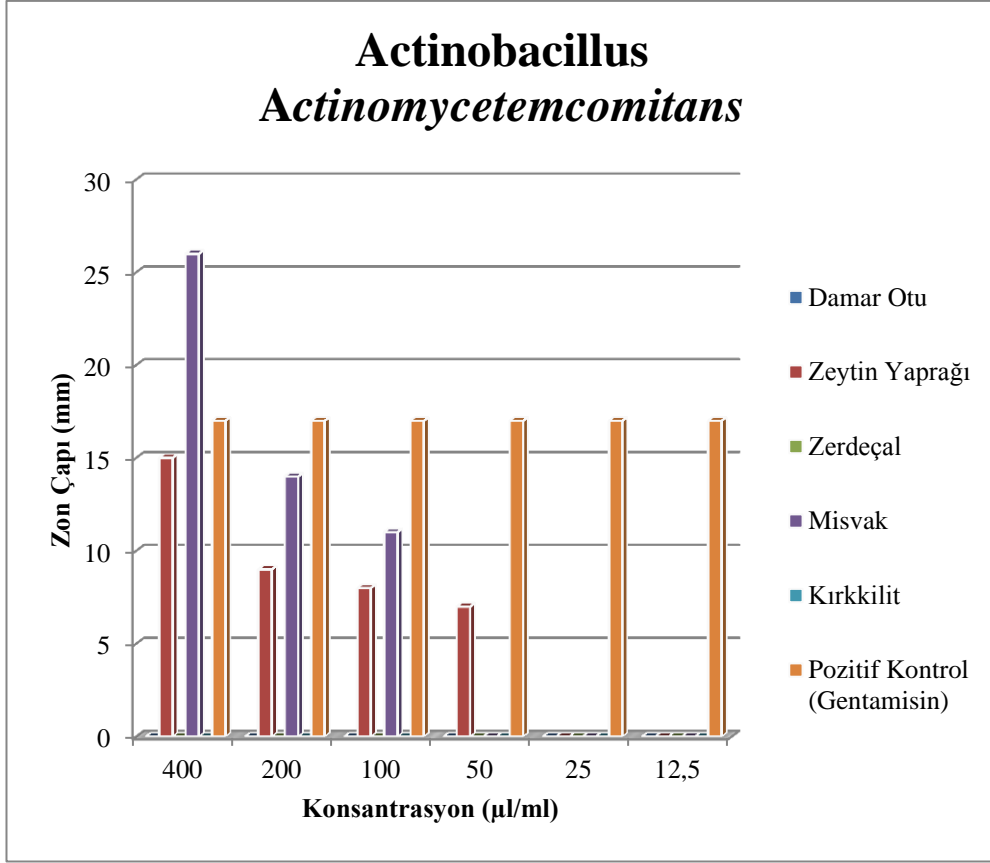
Şekil 3.1 *Streptococcus mutans*'a ait zon çapları

Çizelge 3.2 *Lactobacillus acidophilus* 'a ait zon çapı bulguları

	Zon Çapları (mm)						
	Konsantrasyon	Damar Otu	Zeytin Yapağı	Zerdeçal	Misvak	Kırkkilit	Pozitif Kontrol (Gentamisin)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	400 µl/ml	-	-	-	-	-	30mm
	200 µl/ml	-	-	-	-	-	30mm
	100 µl/ml	-	-	-	-	-	30mm
	50 µl/ml	-	-	-	-	-	30mm
	25 µl/ml	-	-	-	-	-	30mm
	12,5 µl/ml	-	-	-	-	-	30mm

Çizelge 3.3 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 'a ait zon çapı bulguları

	Zon Çapları (mm)						
	Konsantrasyon	Damar Otu	Zeytin Yapağı	Zerdeçal	Misvak	Kırkkilit	Pozitif Kontrol (Gentamisin)
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	400 µl/ml	-	15mm	-	26mm	-	17mm
	200 µl/ml	-	9mm	-	14mm	-	17mm
	100 µl/ml	-	8mm	-	11mm	-	17mm
	50 µl/ml	-	7mm	-	-	-	17mm
	25 µl/ml	-	-	-	-	-	17mm
	12,5 µl/ml	-	-	-	-	-	17mm



Şekil 3.2 *Actinobacillus actinomyctemcomitans* 'a ait zon çapı bulguları

Çizelge 3.4 Üreme var (+), Üreme yok (-) tablosu

	Üreme var (+), Üreme yok (-)						
	Konsantrasyon	Damar Otu	Zeytin Yapağı	Zerdeçal	Misvak	Kırkkilit	Pozitif Kontrol (Gentamisin)
<i>Streptococcus mutans</i>	400 µl/ml	+	-	+	-	+	-
	200 µl/ml	+	-	+	-	+	-
	100 µl/ml	+	-	+	-	+	-
	50 µl/ml	+	+	+	+	+	-
	25 µl/ml	+	+	+	+	+	-
	12,5 µl/ml	+	+	+	+	+	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	400 µl/ml	+	+	+	+	+	-
	200 µl/ml	+	+	+	+	+	-
	100 µl/ml	+	+	+	+	+	-
	50 µl/ml	+	+	+	+	+	-
	25 µl/ml	+	+	+	+	+	-
	12,5 µl/ml	+	+	+	+	+	-
<i>Actinobacillus actinomycescomitans</i>	400 µl/ml	-	-	-	-	-	-
	200 µl/ml	-	-	-	-	+	-
	100 µl/ml	+	-	-	-	+	-
	50 µl/ml	+	-	+	-	+	-
	25 µl/ml	+	+	+	+	+	-
	12,5 µl/ml	+	+	+	+	+	-

Çizelge 3.5 MİK tablosu

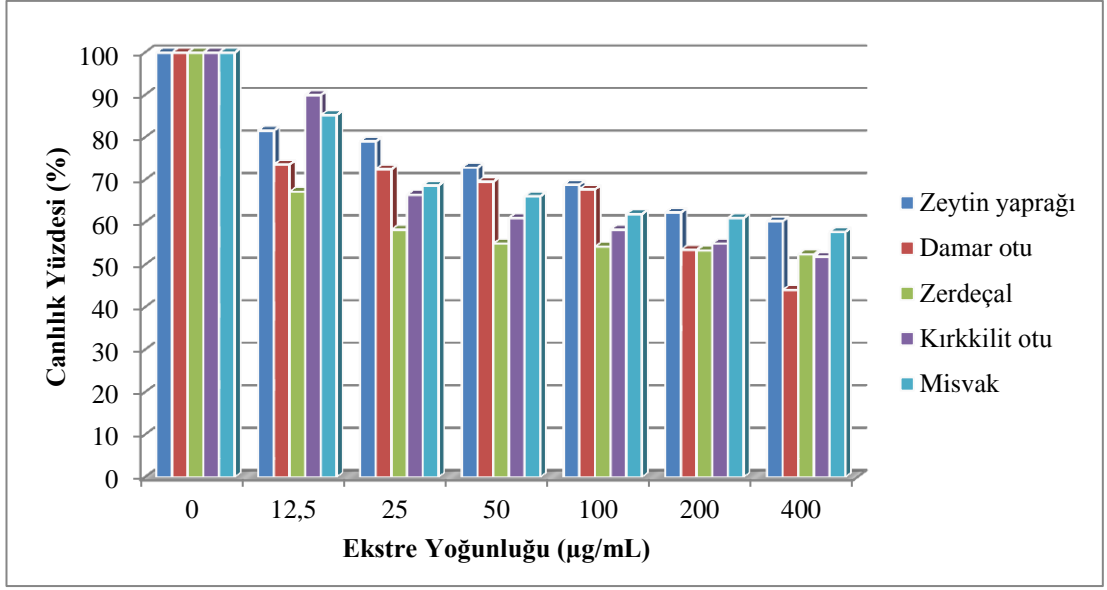
MİK	Damar otu	Zeytin yapağı	Zerdeçal	Misvak	Kırkkilit otu
<i>S.mutans</i>	>400 µg/ml	100 µg/ml	>400 µg/ml	100 µg/ml	>400 µg/ml
<i>Lactobacillus sp.</i>	>400 µg/ml	>400 µg/ml	>400 µg/ml	>400 µg/ml	>400 µg/ml
<i>Actinobacillus</i>	200 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	400 µg/ml

Çizelge 3.6 Nekroz ve Apopitoz Oranları

Konsantrasyon	Zeytin yaprağı	Damar otu	Zerdeçal	Kırkkilit otu	Misvak
0	Nekroz oranı	1±1	1±1	1±1	1±1
	Apopitoz oranı	0	0	0	0
12.5	Nekroz oranı	5±0,5	7±0,7	4,5±1	6±1
	Apopitoz oranı	16±1	18,4±0,7	22,5±1	10,5±1
25	Nekroz oranı	7,5±1	7,5±1	5±1,4	7±0,5
	Apopitoz oranı	21,5±1	23,5±1	26±1,4	15,2±1
50	Nekroz oranı	8±1,4	8±0,5	5,5±1	8,5±1
	Apopitoz oranı	24±0,5	27±1,5	28,5±1	18±0,5
100	Nekroz oranı	8±1	8,5±1	6±0,5	8±1
	Apopitoz oranı	26,5±2	30±0,7	29±1,5	22,5±1,4
200	Nekroz oranı	9±0,7	9,5±0,5	7±0,7	9±0,7
	Apopitoz oranı	27,5±1,5	34±2	30±0,7	28±1,5
400	Nekroz oranı	10,5±1	10±1,4	8±1	10,5±1
	Apopitoz oranı	28±1,4	38,5±1	30,5±1	32±2

Çizelge 3.7 Canlılık oranları (%)

Konsantrasyon	Zeytin yaprağı	Damar otu	Zerdeçal	Kırkkilit otu	Misvak
0	100	100	100	100	100
12,5	81,6	73,6	67,2	90,0	85,3
25	79,1	72,5	58,3	66,5	68,7
50	72,9	69,6	55,0	61,0	66,2
100	68,9	67,8	54,3	58,3	62,0
200	62,3	53,6	53,4	55,0	61,0
400	60,3	44,1	52,5	51,9	57,8



Şekil 3.3 Canlılık yüzdeleri

Çizelge 3.8 *S.mutans*'da Konsantrasyonlara Göre Zon Çapları Bakımından Gruplar Arasındaki Farklılığa İlişkin Kruskal Wallis H Testi Sonuçları

		Zon Çapı						Kruskal Wallis H Testi			
		n	Mean	Median	Min	Max	ss	Sıra Ort.	H	p	
<i>S.mutans</i>	400 µl/ml	Damar Otu	3	15	15	15	15	0	11	14	0,007
		Zeytin Yaprağı	3	24	24	24	24	0	14		
		Zerdeçal	3	8	8	8	8	0	3,5		
		Misvak	3	14	14	14	14	0	8		
		Kıkkilit	3	8	8	8	8	0	3,5		
		Toplam	15	13,8	14	8	24	6,1	3-2 5-2		
	200 µl/ml	Damar Otu	3	11	11	11	11	0	11	14	0,007
		Zeytin Yaprağı	3	18	18	18	18	0	14		
		Zerdeçal	3	0	0	0	0	0	5		
		Misvak	3	0	0	0	0	0	5		
		Kıkkilit	3	0	0	0	0	0	5		
		Toplam	15	5,8	0	0	18	7,7	3-2 4-2 5-2		
	100 µl/ml	Damar Otu	3	7	7	7	7	0	11	14	0,007
		Zeytin Yaprağı	3	14	14	14	14	0	14		
		Zerdeçal	3	0	0	0	0	0	5		
		Misvak	3	0	0	0	0	0	5		
		Kıkkilit	3	0	0	0	0	0	5		
		Toplam	15	4,2	0	0	14	5,8	3-2 4-2 5-2		

Çizelge 3.9 *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* Konsantrasyonlara Göre Zon Çapları Bakımından Gruplar Arasındaki Farklılığa İlişkin Kruskal Wallis H Testi Sonuçları

			Zon Çapı					Kruskal Wallis H Testi			
			n	Mean	Median	Min	Max	ss	Sıra Ort.	H	p
<i>Actinobacillus Actinomycetemcomitans</i>	400 µl/ml	Damar Otu	3	0	0	0	0	0	5	14	0,007
		Zeytin Yaprağı	3	15	15	15	15	0	11		
		Zerdeçal	3	0	0	0	0	0	5		
		Misvak	3	26	26	26	26	0	14		
		Kırkkilit	3	0	0	0	0	0	5		
		Toplam	15	8,2	0	0	26	11	1-4 3-4 5-4		
	200 µl/ml	Damar Otu	3	0	0	0	0	0	5	14	0,007
		Zeytin Yaprağı	3	9	9	9	9	0	11		
		Zerdeçal	3	0	0	0	0	0	5		
		Misvak	3	14	14	14	14	0	14		
		Kırkkilit	3	0	0	0	0	0	5		
		Toplam	15	4,6	0	0	14	6,1	1-4 3-4 5-4		
	100 µl/ml	Damar Otu	3	0	0	0	0	0	5	14	0,007
		Zeytin Yaprağı	3	8	8	8	8	0	11		
		Zerdeçal	3	0	0	0	0	0	5		
		Misvak	3	11	11	11	11	0	14		
		Kırkkilit	3	0	0	0	0	0	5		
		Toplam	15	3,8	0	0	11	4,9	1-4 3-4 5-4		

Çizelge 3.10 Konsantrasyonlara Göre Canlılık Oranları Bakımından Gruplar Arasındaki Farklılığa İlişkin Kruskal Wallis H Testi Sonuçları

		Canlılık Oranları						Kruskal Wallis H Testi		
		n	Mean	Median	Min	Max	ss	Sıra Ort.	H	p
400 µl/ml	Damar Otu	3	44	44	44	44	0	2	13,491	0,009
	Zeytin Yaprağı	3	60	60	60	60	0	14		
	Zerdeçal	3	52,3	52	52	53	0,6	7,33		
	Misvak	3	57,7	58	57	58	0,6	11		
	Kırkkilit Otu	3	51,7	52	51	52	0,6	5,67		
	Toplam	15	53,1	52	44	60	5,8	1-2		
200 µl/ml	Damar Otu	3	53,7	54	53	54	0,6	4	13,304	0,01
	Zeytin Yaprağı	3	62,3	62	62	63	0,6	14		
	Zerdeçal	3	53,3	53	53	54	0,6	3		
	Misvak	3	61	61	61	61	0	11		
	Kırkkilit Otu	3	55	55	55	55	0	8		
	Toplam	15	57,1	55	53	63	4	3-2		
100 µl/ml	Damar Otu	3	69	69	68	70	1	12,5	13,202	0,01
	Zeytin Yaprağı	3	69	69	69	69	0	12,5		
	Zerdeçal	3	54,7	55	54	55	0,6	2		
	Misvak	3	62	62	62	62	0	8		
	Kırkkilit Otu	3	57,7	58	57	58	0,6	5		
	Toplam	15	62,5	62	54	70	6	3-1 3-2		
50 µl/ml	Damar Otu	3	69,7	70	69	70	0,6	11	13,821	0,008
	Zeytin Yaprağı	3	73	73	72	74	1	14		
	Zerdeçal	3	55	55	55	55	0	2		
	Misvak	3	66	66	66	66	0	8		
	Kırkkilit Otu	3	61	61	61	61	0	5		
	Toplam	15	64,9	66	55	74	6,6	3-2		
25 µl/ml	Damar Otu	3	72,3	72	72	73	0,6	11	13,671	0,008
	Zeytin Yaprağı	3	79	79	79	79	0	14		
	Zerdeçal	3	58	58	57	59	1	2		
	Misvak	3	68,7	69	68	69	0,6	8		
	Kırkkilit Otu	3	66,7	67	66	67	0,6	5		
	Toplam	15	68,9	69	57	79	7,2	3-2		
12,5 µl/ml	Damar Otu	3	73,3	73	73	74	0,6	5	13,77	0,008
	Zeytin Yaprağı	3	81,3	81	81	82	0,6	8		
	Zerdeçal	3	67	67	67	67	0	2		
	Misvak	3	85,3	85	85	86	0,6	11		
	Kırkkilit Otu	3	90	90	90	90	0	14		
	Toplam	15	79,4	81	67	90	8,6	3-5		
0 µl/ml	Damar Otu	3	100	100	100	100	0	8	0	1,00
	Zeytin Yaprağı	3	100	100	100	100	0	8		
	Zerdeçal	3	100	100	100	100	0	8		
	Misvak	3	100	100	100	100	0	8		
	Kırkkilit Otu	3	100	100	100	100	0	8		
	Toplam	15	100	100	100	100	0			

4 TARTIŞMA ve SONUÇ

Diş çürüğü, tüm dünyada en sık görülen ve en çok maliyet gerektiren enfeksiyöz bir ağız hastalığıdır (Panel 2001, Bagramian ve ark. 2009). Birçok çürük önleyici yöntem araştırılmakta ve geliştirilmektedir (Bönecker ve ark. 2012). Antimikrobiyal kullanımı da çürük oluşumunu önlemede etkili yöntemlerin başında gelmektedir (Gunsolley 2010). Bu bağlamda kullanılan başlıca kimyasal ajanlar flor, klorheksidin, setil piridinyum klorid ve doğal ürünlerdir. (Samuels ve ark. 2012).

Doğal ürünler (bitki ekstraktları, esansiyel yağlar ve deniz ürünleri) diş çürüğünü engellemeye yönelik önerilen yeni ürünlerdir (Jeon ve ark. 2011). Propolis, siyah ve yeşil çay, kakao çekirdeğinin kabuğu, yulaf kabuğu, yaban mersini, kabuklu deniz canlılarının kabukları bu doğal ürünlere örnek olarak gösterilebilir (Jeon ve ark. 2011). Doğal ürünlerin kullanımı ile sentetik ürünlerin kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan tad alma bozukluğu, mukozada deskuamasyon ve dişlerin renklenmesi gibi yan etkilerin giderilmesinin yanısıra güvenli ve etkili bir çürük önleme yöntemi olduğu düşünülmektedir. (Magee 2007)

Genel tıbbi alanlarda kullanılan ilaçların yaklaşık %25'i bitkisel kaynaklıdır (Rates 2001). Her bitki kendine özgü biyoaktif maddeler taşır, bu nedenle bitkilerin kimyasal, farmakolojik ve toksikolojik özellikleri, bu özelliğ göz önünde bulundurularak çalışılmalıdır (Ghani 2003).

Esansiyel yağlar, antimikrobiyal aktiviteye neden olan biyoaktif ajanlar içermektedir. Gıda, kozmetik ve farmasotik endüstride esansiyel yağlar oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Bassolé ve Juliani 2012). Esansiyel yağların kimyasal yapısı terpen & terpenoidler ve alifatik & aromatik bileşikler olarak ikiye ayrılmaktadır. (Bakkali ve ark. 2008). Monoterpenler, esansiyel yağların içinde en çok bulunan ve çürükle ilgili bakteriler üzerinde antibakteriyal etkiyi gösteren yapı olduğu düşünülmektedir (Bernardes ve ark. 2010).

Bu çalışmada değerlendirilen beş bitkiden *S.persica*, dışındaki bitkilerin çürükle ilişkili bakteriler üzerinde etkinliğinin henüz detaylı olarak araştırılmamış

olması ilgi çekicidir. *S.persica* (*misvak*), trimetilamin, salvadorin, klor, flor, silika, sülfür, askorbik asit, tannin, saponin, flavenoid, sterol gibi tanımlanabilmiş komponentler içermektedir (Darmani ve ark. 2006).

S.persica (*misvak*), antibakteriyal ve tükürük akışını artırıcı etkinin içeriğindeki yüksek miktardaki NaCl, KCl, trimetilamin, salvadorea and salvadorin'den kaynaklandığı düşünülmektedir (Hattab 1996). Misvaktan gelen tiyosiyonat'ın tükürükteki tiyosiyonat seviyesini artırdığını, bunun da hidrojen peroksit-peroksidaz-tiyosiyonat sistemini harekete geçirerek antimikrobiyal etkinlik gösterdiği yapılan bir çalışmada tespit edilmiştir (Darout ve ark. 2000).

Al-Otaibi ve ark, yaptıkları çalışmada kuru yada taze misvaktan elde edilen ekstraktların (sulu, metanollü, etil asetatlı, asetonlu) *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *E. Corrodens* ve *C. Rectus* üzerinde önemli oranda inhibitör etkiye sahip olduğunu, diş fırçası ve misvak kullanımı kıyaslandığında misvak kullanılan grupta *A. actinomycetemcomitans* seviyesinde anlamlı bir düşüş olduğu belirtmişlerdir ($p<0.05$) (Al-Otaibi ve ark. 2004).

Bu çalışmada kuru misvaktan elde edilen etanollü ekstraktın 400 µg/ml konsantrasyonunda *Streptococcus mutans*'da 14 mm'lik zon çapı tespit edilmiş, bu konsantrasyonda antimikrobiyal etkinlik görülmüştür (referans antibiyotik zon çapı=24 mm). *A. actinomycetemcomitans* çalışmada kullandığımız üç bakteriden birisi olup, 400 µg/ml konsantrasyonda 26 mm, 200 µg/ml konsantrasyonda 14mm, 100 µg/ml konsantrasyonda 11mm zon çapı tespit edilmiştir ($p<0.05$). *A. actinomycetemcomitans*'da referans antibiyotikten daha güçlü bir etki gösterdiği rapor edilmiştir. (*A. actinomycetemcomitans* referans antibiyotik zon çapı=17mm). Al-Otaibi ve ark, çalışmasının sonuçları ile çalışma sonuçlarımız benzerlik göstermektedir.

Almas ve ark, misvak ekstraktı kullanarak yaptıkları bir çalışmada, konsantrasyona bağlı olarak *Strep. faecalis* (inhibisyon zonu= 7 mm) ve *S. Mutans* (inhibisyon zonu= 3mm)'da antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir

(Almas ve ark. 2005). Çalışmamızda *S. mutans*'da 14 mm'lik inhibisyon zonu tespit edilerek, Almas ve ark., yaptığı çalışma ile benzerlik göstermektedir .

Sofarata ve ark, yaptıkları başka bir çalışmada, misvaktan elde edilen ekstraktın, misvağın gerçek antimikrobiyal etkinliğini yansıtmadığını iddia etmişlerdir (Sofrata ve ark. 2008) Bazı aktif bileşenlerin tam olarak ekstrakte edilemediğini ya da ekstraksiyon işlemi esnasında bazı aktif bileşenlerin kaybolduğunu savunmuşlardır. Misvağın sulu ekstraktı ve hiçbir işleme tabi tutulmadan kesilmiş bir parçası antimikrobiyal etkinlik açısından değerlendirilmiş ve parça misvağın oldukça güçlü antimikrobiyal etkinlik gösterdiğini fark ederek iddialarını doğrulamışlardır.

P.gingivalis ve *A. Actinomycetemcomitans*'da oldukça güçlü, *S.mutans*'da daha az, *L.acidophilus* üzerinde oldukça düşük antimikrobiyal etkinlik görülmüştür (Sofrata ve ark. 2008). Çalışmamızda en çok antimikrobiyal etki *A. Actinomycetemcomitans*'da (26 mm, 14 mm, 11 mm), daha sonra *S.mutans*'da (14 mm) görülmüştür. *Lactobacillus acidophilus*'da herhangi bir antimikrobiyal etki izlenmemiştir. Sofrata ve ark, yaptıkları çalışmanın sonucu ile elde ettiğimiz sonuçlar uyumludur.

Diş fırçası ve misvak kullanan bireylerden oluşan grupların karşılaştırıldığı bir çalışmada, misvak kullanan bireylerde *S.mutans* seviyesinin daha düşük olduğu gözlenirken, *Lactobacillus*' da bir farklılık olmadığı anlaşılmıştır (Almas ve Al-Zeid 2004). Çalışmamızda *Lactobacillus acidophilus*'da antimikrobiyal bir etkinin izlenmeyip *S.mutans*'da antimikrobiyal bir etki görülmesi Almas ve Al- Zeid'in çalışması ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Balb/C 3T3 fare fibroblastları ile sulu misvak ekstraktının kullanıldığı bir hücre proliferasyonu çalışmasında, misvağın çeşitli konsantrasyonlarında oldukça yüksek oranda hücre proliferasyonunda artışa neden olduğu vurgulanmıştır (Darmani ve ark. 2006). Çalışmamızda konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında bir

azalma görülmektedir yani hücre proliferasyonunda bir artış görülmemektedir. Bu açıdan Darmani ve ark., yaptıkları çalışma sonucu ile bizim sonuçlarımız örtüşmemektedir. Bu farklılığın misvağın yetiştiği coğrafi bölgenin özelliklerine göre farklılık gösterebilmesine ve kullandığımız ekstraktın su ile değil etanol ile çıkarılmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Başka bir çalışmada %0.1 yoğunlukta *S.persica* içeren gargara kullanılmıştır. Makrofaj, epitel, fibroblast ve osteoblast gibi yara iyileşmesinde görevli hücreler üzerinde oldukça yüksek sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. Bu etkinin nedeni olarak *S.persica*'nın içeriğindeki alkaloid ve flavonoid'lerden olabileceği düşünülmüştür. Bu sebeple ağızda taze yara olan hastaların, misvaklı gargara kullanmaması gerektiği iddia edilmektedir (Rajabalian ve ark. 2009).

Tabatabaei ve ark, 5.75-1.43 mg/ml konsantrasyonlarındaki etanollü misvak ekstraktları ile yaptıkları hücre proliferasyonunu değerlendirdikleri çalışmada, ciddi oranda hücre proliferasyonunda azalma görülmüştür. 0.08-0.71 mg/ml konsantrasyonlarında ise kontrol grubuna göre önemli bir fark görülmemiştir (sadat Tabatabaei ve ark. 2015).

Rajabalian ve ark, Tabatababei ve ark, yaptıkları çalışmaların sitotoksik sonuçları ile çalışmamız benzerlik göstermektedir. Çalışmada denenen konsantrasyonlar içerisinde %50'sinden daha fazla hücre ölümü gerçekleşmemesinden dolayı toksik sayılabilecek bir durum söz konusu olmamıştır.

Olea europaea, geleneksel tıpta bakteri, mantar ve virüs kökenli hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılmıştır (Adnan ve ark. 2014). Zeytin yaprağı, antioksidan aktivitesinin yanısıra yapısındaki bilhassa fenolik gruplar nedeniyle antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Oleoropin, fenolik bileşikler içinde en aktif olan bileşiği olarak düşünülmektedir (Markin ve ark. 2003).

Salamura edilmiş zeytinlerin antimikrobiyal etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, hidroksetirozol'un bir bileşenin salamura işlemleri ile dialdehitli forma

dönüştüğü, bu formun da *Lactobacillus*'lar gibi laktik asit üreten bakteriler üzerinde antibakteriyal etkinlik gösterdiği ortaya konulmuştur (Medina ve ark. 2007).

Çalışmamızda zeytin yaprağı ekstraktının *Lactobacillus acidophilus* üzerindeki antimikrobiyal etkinliği incelendi. Herhangi bir antimikrobiyal etkinlik gözlenmemesinin nedeni olarak zeytin yaprağı ekstraktına herhangi bir salamura işleminin yapılmamış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Sudjana ve ark, 122 mikroorganizma üzerinde yaptıkları çalışmada, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, and *Staphylococcus aureus* bakterileri dışında antimikrobiyal bir etki gözlemlememişlerdir (Sudjana ve ark. 2009).

Asya kıtasında geleneksel olarak diş temizliğinde kullanılan çiğneme çubuklarının (*Azadirachta indica*, *Olea europaea*, *Acacia arabica*, *Salvadora persica*, *Gycosmic pentaphylla*, *Capparis aphylla*) ekstraktlarının kullanıldığı ve *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, üzerinde antimikrobiyal etkinliğin değerlendirildiği bir çalışmada, *Acacia arabica* ve *Salvadora persica*'nın sadece *Streptococcus faecalis* (2mm) üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu, diğer ekstraktların herhangi bir antimikrobiyal etki göstermediğini belirtmiştir. (Almas 2001). Çalışmamızda *Olea europaea* ve *Salvadora persica*'nın *S.mutans*, *L.acidophilus* ve *A. Actinomycescomitans* üzerindeki antimikrobiyal etkinliğini araştırılmış olup, *S.mutans* üzerinde zeytin yaprağının diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek zon oluşturduğu görülmüştür ($p<0.05$). 400µg/ml konsantrasyonda zeytin yaprağında 24 mm, misvakta 14 mm zon çapı tespit edilmiştir. Bu açıdan çalışma sonuçları, Almas'ın çalışma sonuçları ile benzerlik göstermemektedir. Bu farklılığın bölgesel değişikliklere bağlı olarak gerçekleşebileceğini düşünmekteyiz.

Zeytin yaprağının sulu, asetonlu, dietil eterli, ve etil alkollü ekstraktlarının kullanıldığı bir çalışmada, sadece asetonlu ekstraktın kullanıldığı grupta *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus thermophiles*, *Enterococcus faecalis*, ve *Lactobacillus bulgaricus* bakterilerine karşı

antimikrobiyal etkinlik görülmüştür (Korukluoglu ve ark. 2010). Çalışmada *Lactobacillus acidophilus* üzerinde zeytin yaprağının etanollü ekstraktının antibakteriyal etkinliği araştırılmış olup, olumlu bir sonuç alınamamıştır. Korukluoglu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada asetonlu ekstraktan olumlu bir sonuç aldıkları vurgulanmıştır. Çalışmamızda *L. Acidophilus* 'da antimikrobiyal etkinlik tespit edilememesinde, ekstrakt elde edilirken kullanılan çözücü olarak aseton değil etanol kullanılmasına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Zeytin yaprağının antimikrobiyal etkinliğinin araştırıldığı başka bir çalışmada *B. cereus*, *B.subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* bacteria, and *C. albicans* ve *C. neoformans* (mantar) kullanılmıştır. Kullanılan bu mikroorganizmaların hepsi üzerinde etkinlik görülmekle birlikte, sıralama şu şekildedir. *B. cereus* ~ *C. albicans* > *E. coli* > *S. aureus* > *C. neoformans* ~ *K. pneumoniae* ~ *P. aeruginosa* > *B. Subtilis* (Ahmed ve ark. 2001).

Hidroksitirozol ve oloropinin, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio alginolyticus* gibi bağırsak ve solunum yolu patojen mikroorganizmalarının gelişimini inhibe ettiği ya da geciktirdiği bildirilmiştir (Bisignano ve ark. 1999).

Ahmed ve ark, Bisignano ve ark, yaptıkları çalışmalarda çalışmamızda kullanılan bakterilerden herhangi biri birebir kullanılmamış olsa da, *S.aureus* gibi gram pozitif bakterilerde antimikrobiyal etkinlik göstermesi, *S.mutans*'da antimikrobiyal etkinlik göstermesi ile uyumlu bir sonuç göstermektedir. (Bisignano ve ark. 1999)

Zeytin yaprağı içerisinde glukozit, hidroksitirozol, tirozol, kafeik asit, p-kumarik asit, vanillik asit, vanillin, oleuropein, luteolin, diosmetin, rutin, luteolin-7-glukozit, apigenin-7-glukozit, ve diosmetin-7- glukozit gibi birçok etken madde içerir (Bianco ve Uccella 2000).

Oloropin, rutin, kafeik asit, vanilin ve bu dört maddenin karışımı zeytin yaprağından izole edilerek antimikrobiyal etkinliği incelenmiştir. *Salmonella enteritidis*' de oloropin(23.5 ± 0.8), kafeik asit(10.4 ± 0.2) ve karışım(24.5 ± 0.5) , *Escherichia coli*'de sadece kafeik asit(10.1 ± 0.1), *Bacillus cereus*'da kafeik asit(9.8 ± 0.0) ve karışım(28.5 ± 0.3) antimikrobiyal etki göstermiştir. Bu çalışmaya göre, zeytin yaprağı içerisindeki fenolik komponentlerin bir arada bulduklarında sinerjistik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (Lee ve Lee 2010).

Körüklüoğlu ve arkadaşlarının yaptıkları benzer bir çalışma ise şu şekilde planlanmıştır. Zeytin yaprağı bileşenlerine ayrılmış ve herbir bileşeni (4-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, p kumarik asit, tirozol, kafeik asit, şiringik asit ve oloropin) ayrı bir grup oluşturmuştur. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*'un da aralarında bulunduğu onbeş bakteri üzerinde bu bileşenler üç farklı konsantrasyonda (0.1, 0.3, 0.5) ayrı ayrı uygulanmıştır. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus brevis*'a tirozol , kafeik asit , oloropin; *Lactobacillus bulgaricus*'e 4-hidroksibenzoik asit dışındaki tüm bileşenler; *Streptococcus thermophilus*'a 4-hidroksibenzoik asit ve şiringik asit dışındaki tüm bileşenler 0.5 mg/ml derişiminde antimikrobiyal etki göstermiştir (Korukluoğlu ve ark. 2010). Çalışmamızda *L.acidophilus* üzerinde herhangi bir antimikrobiyal etkinlik göstermemesi yönüyle Körüklüoğlu ve ark, çalışması ile benzerlik göstermezken, *Streptococcus thermophilus*'a benzer bir tür olan *S.mutans*'da antimikrobiyal etkinlik tespit edilmesi yönü ile de uyum göstermektedir. (Korukluoğlu ve ark. 2010).

O.europaea'nın sulu ekstraktının antimikrobiyal etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, *S.aureus*(10mm), *S.faecalis*(11mm), *E.coli*(9mm), *P.aeruginosa*(9mm), *K.pneumoniae*(11mm) bu sonuçlar bulunmuştur (Keskin ve ark. 2012). Çalışmamızda *S.mutans* kullanılmış ve zeytin yaprağının etanollü ekstraktı kullanılarak *S.mutans*(24mm) bulunmuştur. *S.faecalis* ile aynı tür olan *S.mutans*

üzerinde antimikrobiyal etkinlik gözlenerek Keskin ve ark, çalışması ile uyumlu olduğu görülmüştür. (Keskin ve ark. 2012).

Olea europaea'nın bir bileşeni olan maslinik asit, farelere yüksek dozda ağızdan uygulanmıştır. Tek seferde 1000mg/kg ya da 28 gün 50 mg/kg dozda verilen zeytin yaprağının toksisiteye bağlı herhangi bir reaksiyon oluşturmadığı görülmüştür (Sánchez-González ve ark. 2013). Çalışmamızda kullanılan en yüksek konsantrasyon olan 400 µg/ml ekstrakt uygulanmasında sonra hücre canlılığı yaklaşık %60 olarak bulunmuştur. Diğer gruplardaki canlılık yüzdeleri kıyaslamasında zeytin yaprağı grubunda anlamlı oranda canlılık yüzdesi yüksek bulunmuştur (p<0.05).

Yüksek glukozun neden olduğu apopitozisi engelleyerek diyabete bağlı oluşan nöropatik ağrıları engellediği yapılan bir çalışma ile belirlenen *Olea europaea* ve glukozun, PC12(feokromostoma) hücreleri üzerindeki etkisi MTT yöntemi ile incelenmiş; 50, 75, 100, 125 konsantrasyonlarında glukoz ve *Olea europaea* uygulanmıştır. 100µg/ml konsantrasyonundaki glukoz uygulanan grupta canlı hücre sayısı yüzdesi %52. iken, aynı konsantrasyondaki *Olea europaea* grubundaki canlılık oranı %75 olarak bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucuna göre, glukozun *Olea europaea*'ya göre toksisitesinin oldukça yüksek olduğu belirtilmiştir (Kaeidi ve ark. 2011). Çalışmamızda zeytin yaprağı grubundaki canlılık yüzdesi, diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur, bu nedenle Kaeidi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Turmerik ismiyle bilinen *Curcuma longa* (zerdeçal), özellikle Asya'nın güneyinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yerel tıpta sinüzit gibi enfeksiyon hastalıklarının, karaciğer hastalıklarının, romatizma ve anoroksiyanın tedavisinde kullanılmıştır (Agarwal ve ark. 2009).

Yapılan bir çalışmada *C.longa*'nın etanollü ekstraktının antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. *B.subtilis* (15.17 ± 0.6), *K. pneumoniae* (16.50 ± 0.41), *P. mirabilis* (21.50 ± 0.62), *S. aureus* (15.67 ± 0.54), *P. aeruginosa* (12.17 ± 0.49),

E.coli (10.83 ± 0.36) disk difüzyon testinden bu sonuçlar elde edilmiştir (Chakraborty ve ark. 2014).

Srinivasan ve ark, yaptıkları farklı bir çalışmada 50 farklı bitkinin sulu ekstraktları ile yaptıkları çalışmada *B.subtilis* (13mm), *K. pneumoniae* (0 mm), *P. mirabilis* (18mm), *S. aureus* (20mm), *P. aeruginosa* (18mm), *E.coli* (27mm) sonuçlarını bulmuşlardır (Srinivasan ve ark. 2001).

Fagbemi ve ark, olgunlaşmamış muz, limon otu ve turmerik (*C.longa*) bitkilerinin sulu ve etanollü ekstraktlarını elde ederek sekiz farklı mikroorganizma üzerinde inhibitör etkisini incelemiştirlerdir. Turmerik'in etanollü ekstraktının *E. coli*, *S. paratyphi*, *S.flexnerii*, *K. pneumonia*, *S. aureus* ve *B.subtilis*'de bakteriyostatik etki gösterdiğini; sulu ekstraktının ise sadece *S. aureus*'a bakterisit bunun dışındaki bakterilere bakteriyostatik etkili olduğunu vurgulamışlardır (Fagbemi ve ark. 2009).

Lee ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, yedi farklı bitkinin altı farklı çözücü ile ekstraktlarını hazırlayıp *Escherichia coli*, *Burkholderia* sp., *Haemophilus somnus*, *Haemophilus parvulus*, *Clostridium perfringens* bakterileri üzerinde antimikrobiyal etkinlik değerlendirmesi yapmışlardır. Yedi bitkiden biri olan *C.longa*'nın etanollü ve sulu ekstraktının sadece *Clostridium perfringens*'e karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu; metanollü, hekzanlı, kloroformlu ve butanollü ekstraktların antimikrobiyal bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür (Lee ve ark. 2014).

Chan ve ark., zencefilgiller familyasına ait, içlerinde *C.longa*'nın da bulunduğu üç farklı bitkinin yapraklarından ve köklerinden ekstraktlar elde ederek, antioksidan kapasite ve antimikrobiyal etkinlik çalışmışlardır. *M. Luteus*, *S. aureus*, *B. cereus* bakterileri üzerinde *C.longa*'nın yaprak ekstresinden antimikrobiyal etkinlik gözlenmezken kök ekstresinden oldukça düşük de olsa antimikrobiyal etkinlik tespit edilmiştir (0.13mg/disk) (Chan ve ark. 2011).

Chakraborty ve arkadaşları, Srinivasan ve arkadaşları, Fagbemi ve arkadaşları, Lee ve arkadaşları, Chan ve arkadaşları *C.longa*'nın antimikrobiyal

etkinliğini araştırmalarında çoğunlukla *S. paratyphi*, *S. flexnerii*, *K. pneumonia* gram negatif mikroorganizmalar üzerinde çalışmışlar ve antimikrobiyal etkinlik tespit etmişlerdir. Çalışmamızda sadece 400 µg/ml konsantrasyonundaki *C. longa* ekstraktının gram pozitif bir mikroorganizma olan *S. mutans*'da 8mm'lik bir inhibisyon zonu oluşturduğunu tespit ettik. Antimikrobiyal etkinlikteki gram pozitif bakterilerin, gram negatif bakterilere gore *C. longa*'ya daha dirençli olabileceği fikri farklılığın oluşmasında bir etken sayılabilir.

Curcuma longa'nın 500, 250, 125g/L konsantrasyonundaki ekstraktlarının *S. epidermidis*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *Lactobacillus plantorum*, *E. coli*, *P. aeruginosa* bakterileri üzerinde disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal etkinliği araştırılmış, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *Lactobacillus plantorum* bakterilerinde hiçbir konsantrasyonda bakterisit etki gözlenememiştir. *S. epidermidis* (17.4±0.3, 13.4±0.6) ve *E. coli* (18.2±0.3, 14.3±0.6)' de ise 500 ve 250 g/L konsantrasyonlarda inhibisyon zonu çapları görülmüştür (Niamsa ve Sittiwet 2009). Çalışmamızda *L. acidophilus*'da hiçbir konsantrasyonda etkinlik gözlenmemesi, Niamsa ve ark, yaptıkları çalışma ile benzerlik göstermektedir.

C. longa'nın etken maddesi olan curcumin'in 0-100 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarında MCF-7 hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Curcumin'in küçülme, yuvarlaklaşma ve kısmi parçalanma gibi sitotoksik etkileri MCF-7 hücrelerinde ortaya çıkmıştır. 40 µg/ml'da ciddi bir hücre ölümü görülmüştür (Koohtar ve ark. 2015). Çalışmamızda 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 µg/ml konsantrasyonlarında *C. longa* ekstraktının canlılık oranlarına bakıldı, 400 µg/ml konsantrasyon dışındaki konsantrasyonlarda, diğer gruplara göre canlılık yüzdesi anlamlı şekilde düşük çıkmıştır (p<0.05). *C. longa*'nın içeriğinde bulunan curcumin maddesinin tümör hücrelerini yok edebilme yeteneğine bağlı olarak bu durumun söz konusu olabileceğini düşünmekteyiz.

Yapılan son çalışmalarda antiviral, antiinflamatuvar ve antioksidan aktivitesinin doğrulandığı *Plantago lanceolata*, 275 türü ile geniş bir dağılıma sahiptir (Beara ve ark. 2012). Yüksek miktardaki fenolik içeriğinin bakteri gelişimini

ve patojenik oral floranın virülansını azaltabileceği düşünülmüştür (Smullen ve ark. 2007). Avrupa İlaç Kurumu, Avrupa ülkelerinde *P. lanceolata*'nın yapraklarından elde edilen bitki çayının ağız ve faringeal dokular üzerinde koruyucu etkisi olduğunu açıklamıştır (Consultation 2008).

P. lanceolata'nın ağız gargarası olarak kullanıldığı bir çalışmada, streptokok grubunda plasebo grubu ile karşılaştırıldığında ciddi bir azalma gözlenirken, laktobasil grubunda ise anlamlı bir düşüş gözlenmemiştir (Ferrazzano ve ark. 2015). Çalışmamızda *P. lanceolata*'nın 400, 200, 100 µg/ml konsantrasyonlarının, *S.mutans*'da sırasıyla 15 mm, 11mm, 7 mm'lik inhibisyon zonu oluşturduğu; *L.acidophilus*'da da hiç zon oluşturmadığı görülmüştür. Bu bağlamda Ferrazzano ve ark, yaptıkları çalışmanın sonucu ile sonuçlarımız benzerlik göstermektedir.

Çıldır ve ark, bu farklılığın klinik sebebi olarak, *S.mutans*'ın daha kolay ulaşılabilir yerde olmasına, Laktobasiller'in ise ulaşması daha zor olan retantif bölgelerde bulunmasına bağlı olabileceğini düşünmüşlerdir (Cildir ve ark. 2009). *P. lanceolata*, streptokoklar üzerinde oldukça iyi antimikrobiyal etkiye sahiptir. Bu etkinin gram pozitif bakterilerin hücre duvarında önemli değişiklikler yapmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (Sharifa ve ark. 2008).

Karakaş ve ark; su, etanol ve metanol ile hazırladıkları bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliğini *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, ve *Klebsiella pneumoniae* bakterileri üzerinde incelenmiştir. ***P. lanceolata*** *Staphylococcus aureus* = 8.0±0.2 (sulu ekstrakt), *Staphylococcus epidermidis* = 7.5±0.2 (sulu ekstrakt), *Staphylococcus epidermidis* = 7.0±0.3 (etanollü ekstrakt), *Proteus vulgaris* =9.3±0.9 (sulu ekstrakt) , bakterileri üzerinde etkili olmuştur (Karakaş ve ark. 2012). Çalışmamızda *Staphylococcus aureus*'a gram pozitif olma yönü ile benzeyen *S.mutans* üzerinde antimikrobiyal etkinlik tespit edilmiş olması çalışma sonuçlarının paralellik gösterdiği şeklinde yorumlanabilir.

Aşkın ve ark., yaptıkları bir çalışmada, 15g/L ve 30 g/L yoğunluklu *P. lanceolata* 'nın sulu ekstraktının mitotik indeksi (bölünen hücre sayısı) önemli oranda düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Mitotik indeksteki bu düşüş, sulu ekstrakta bulunan içeriğin sitotoksik etkiye neden olabileceğini düşündürmektedir (Aşkın Çelik ve Aslantürk 2006). Bu çalışmada 400µg/ml konsantrasyonda damar otu grubunun canlılık oranları diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p<0.05). Çalışmamızın sonuçları, Çelik ve Aslantürk'ün çalışmasının sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Plantago ailesinin yedi türünün, 0.025 ile 250 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarının sitotoksitesinin değerlendirilebilmesi için TK-10 (renal adenokarsinoma), MCF-7 (meme adenokarsinoma) ve UACC-62 (melanoma) hücre hatları kullanılmıştır. Yedi ekstraktın tamamı MCF-7 ve UACC-62 tümör hücrelerinde konsantrasyona bağlı sitotoksik etki göstermiştir. *P. lanceolata*, MCF-7 ve UACC-62 hücreleri üzerindeki LC₅₀ değeri yaklaşık olarak 212µg/ml olarak bulunmuştur (Galvez ve ark. 2003). Çalışmamızda sağlıklı fibroblast hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlarla sitotoksite değerlendirilmesi yapılmıştır. Galvez ve arkadaşları, tümöral hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyonu 212µg/ml olarak bulunmuşken, bizim sonuçlarımıza göre sağlıklı fibroblastlar üzerinde bu konsantrasyon yaklaşık olarak 395 µg/ml'dir. *P. lanceolata* 'nın tümöral hücrelere daha düşük konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterirken sağlıklı hücrelere aynı konsantrasyonda sitotoksik etki göstermemesi kanser tedavisinde araştırılmaya değer bir durumdur.

Oliveira ve ark, ağızdan izole edilen tüm *S.mutans* türlerini 25mg/ml *Equisetum arvense* 'nin inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. 50 mg/ml konsantrasyonda stafilokok ve candida türlerine etkili olduğunu, metanollü ekstraktın doza bağlı 10-1000mg/ml konsantrasyonları arasında *S. aureus*'a etki ettiğini de belirtmişlerdir.

Yine aynı çalışmada *E. arvense* L, *G. glabra* L, *P. granatum* L. ve *S. barbatimam* ekstraktlarının sitotoksiteleri incelenmiş ve canlı hücre yüzdeleri

sırasıyla 48 ± 5.29 , 52 ± 2.96 , 76 ± 3.10 , 86 ± 4.05 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, *E. arvensis*(at kuyruğu) bu dört bitki içerisinde %50'den daha çok hücre ölümüne neden olduğu için en sitotoksik bitki olduğu belirtilmiştir (de Oliveira ve ark. 2013). Çalışmamızda 400µg/ml konsantrasyondaki *E. arvensis*'nin düşük de olsa *S.mutans*'da 8mm'lik inhibisyon zonu oluşturduğu gözlenerek antimikrobiyal etkinliği tespit edilmiştir. 200 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında bir etki gözlenmemiştir. Oliveira ve arkadaşlarının, çalışmalarında kullandıkları ekstraktın konsantrasyonu çalışmamızda kullanılan konsantrasyona göre oldukça yüksektir ve izole edilen tüm *S.mutans*ların inhibe olması doza bağlı bir reaksiyonun sonucu olabilir. İnhibisyon zonunun oluştuğu 400µg/ml konsantrasyondaki *E. arvensis*'nin sitotoksitesi incelenmiş ve canlılık yüzdesi 51.7 ± 0.6 olarak bulunmuştur. Oliveira ve ark., çalışma sonuçları ile çalışmamızın sonuçları uyumludur.

Heba ve ark., yaptıkları bir çalışmada *T. Farfara*, *E. arvensis*, *S. nigra*, *A. hippocastanum* bitkilerinin metanollü ekstraktlarının *Escherichia coli*, *Serratia rubidaea*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus raffinosus* ve *Staphylococcus epidermis* bakterileri üzerindeki etkisine bakılmış, *Lactobacillus rhamnosus*'un bakterisit etki gösterebilmesi için 512 µg/ml'den büyük bir konsantrasyonda olması gerektiğini vurgulamışlardır (Hleba ve ark. 2014). Çalışmamızda *E. arvensis*'nin 400 ile 12.5 µg/ml konsantrasyonları uygulanmış ve *Lactobacillus acidophilus* üzerinde herhangi bir inhibisyon zonu gözlenmemiştir. Heba ve ark., çalışmalarında *Lactobacillus rhamnosus*'da bakterisit özellik görülebilmesi için 512 µg/ml'den daha yüksek konsantrasyonların olması gerektiğini bildirmesi, daha yüksek konsantrasyonlarda antimikrobiyal etkinin gözlenebileceği durumunu akla getirmektedir, genel olarak çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Milovanović ve ark., yaptıkları bir çalışmada *E. arvensis*'nin, *Staphylococcus aureus* (gram+), *Klebsiella pneumoniae* (gram -), *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* bakterileri üzerindeki etkisi incelenmiş ve sırasıyla zon çapları 11.7 ± 0.9 , 11.3 ± 0.1 , 14.1 ± 0.5 , 13.0 ± 0.6 bu şekildedir.

Pseudomonas aeruginosa en duyarlı mikroorganizma olarak karşımıza çıkmaktadır (Milovanović ve ark. 2007).

E. arvense'nin etil asetat, bütanol sulu ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada, *P. aeruginosa* (10.5, 9.5, 8.0), *E. coli* (0, 0, 0), *Staph. aureus* (13.3, 8.7, 0) ve *B. cereus* (8,7, 8, 7) sonuçları bulunmuştur. *E. arvense*'nin *E. coli* üzerinde hiçbir antimikrobiyal etkisinin olmadığı çalışmada çıkarılan bir sonuç olarak kaydedilmiştir (Čanadanović-Brunet ve ark. 2009).

Canadoviç ve ark, Milanoviç ve ark, yaptıkları çalışmalarda çoğunluğu gram negatif mikroorganizmalardan oluşan bakterilere karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. Çalışmamızda kullanılan bakterilerin kullanıldığı benzer çalışmalar bulunmama ile birlikte; bu farklılığın bakteri türünden, kullanılan ekstraktın yoğunluğundan ve bitkinin yetiştiği toprağın mineral içeriğine göre değişebileceğinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Metanollü *E. arvense* ekstraktı, sıfırdan 100 µg/ml'ye kadar, doza bağımlı olarak osteoblastların proliferasyonunu teşvik edici etkisi yapılan çalışma ile tespit edilmiştir. 100 µg/ml konsantrasyonda aynı zamanda, kemik enfeksiyonlarında sıklıkla rastlanan *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyal etkinlik görülmüştür (Bessa Pereirave ark. 2012). Çalışmamızda fare fibroblastı kullanılarak sitotoksite tespiti yapılmış ve denenen konsantrasyonlarda %50'sinden fazla hücre ölümüne neden olan derişim bulunmamıştır. Tüm konsantrasyonlarda canlılık yüzdesi zerdeçala göre anlamlı dercede yüksek bulunmuştur (p<0,05).

SONUÇ

Diş çürüğünden çoğunlukla izole edilen bakteriler için çeşitli antimikrobiyal ajanlar araştırılmış ve araştırılmaya da devam etmektedir. Çalışmamızın esası da bu felsefeye dayanmaktadır. Bitkiler uzun yıllardır insan sağlığını için çeşitli alanlarda kullanılmıştır.

Bu *in vitro* çalışmada Zeytin yaprağının, hem *S.mutans*'da hem de *A. actinomycetemcomitans*'da oldukça yüksek antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar *in vivo* çalışmalar ile de desteklenirse oral hijyen ürünleri içerisinde kısa zamanda yerini alabileceği düşünülmektedir.

Misvak, *A. actinomycetemcomitans*'da oldukça yüksek antimikrobiyal etkinlik göstererek özellikle periodontal dokularda sıklıkla izole edilen ve sert dokularda invazyon yeteneği olan bu bakterinin inhibisyonunda önemli rol oynadığı *in vitro* olarak görülmüştür. Zeytin yaprağı kadar olmasa da misvağın da *S.mutans* üzerinde antimikrobiyal etkinliğinin varlığı, antimikrobiyal ajan olarak zeytin yaprağı ve misvağı öne çıkarmaktadır.

Damar otu, *S.mutans* üzerinde denediğimiz konsantrasyonlar içerisinde misvağa göre daha etkili olduğu görülmüştür.

Canlılık yüzdeleri açısından değerlendirildiğinde, antitümoral etkisi kanıtlanan zerdeçal de (*curcuma longa*) antimikrobiyal aktivite görülmeyip, zerdeçal'ın diğer gruplara göre canlı hücre yüzdesinin düşük çıkması diş hekimliği ve çürük önleme adına zerdeçalı çekici kılmaktan çıkarmaktadır.

Gruplarda gerçekleşen hücre ölümünün tipinin bilinmesi önemli bir konudur. Nekroz, iskemi ve toksiteye bağlı olarak gerçekleşirken; apoptoz fizyolojik olarak gerçekleşen bir hücre ölümü olayıdır. Çalışmamızda hücre ölümlerinin büyük bir kısmının nekroz ile değil apoptoz ile olması bitkilerin biyoyum açısından bir sıkıntı taşımadığını teyit etmektedir. Hipotezimiz antimikrobiyal etkinlik ve sitotoksite değerleri bakımından desteklenmiştir.

In vitro yapılan bu çalışmada bulunan sonuçlar, *in vivo* çalışmalar ile de desteklenirse, antimikrobiyal etkinlik tespit ettiğimiz bitkilerden bir oral hijyen ürünü elde edilebileceği düşünülmektedir.

5 KAYNAKÇA

- ABABNEH H. (1995) The effect of the extract of the miswak (chewing sticks) used in Jordan and the Middle East on oral bacteria. *International Dental Journal*,45,218-222.
- ABDELRAHMAN HF, SKAUG N, WHYATT AM ,FRANCIS GW. (2003) Volatile compounds in crude *Salvadora persica* extracts. *Pharmaceutical biology*,41,399-404.
- ADNAN M, BIBI R, MUSSARAT S, TARIQ A ,SHINWARI ZK. (2014) Ethnomedicinal and phytochemical review of Pakistani medicinal plants used as antibacterial agents against *Escherichia coli*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*,13,40.
- AGARWAL R, GUPTA SK, SRIVASTAVA S, AGARWAL P ,AGRAWAL SS. (2009) Therapeutic potential of *Curcuma longa*, the golden spice of India, in drug discovery for ophthalmic diseases.
- AHMED MS, GALAL AM, ROSS SA, FERREIRA D, ELSOHLY MA, IBRAHIM A-RS, MOSSA JS ,EL-FERALY FS. (2001) A weakly antimalarial biflavanone from *Rhus retinorrhoea*. *Phytochemistry*,58,599-602.
- AKHTAR M ,AJMAL M. (1981) Significance of chewing-sticks (miswaks) in oral hygiene from a pharmacological view-point. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*,31,89.
- AL-AZZAWIE HF ,ALHAMDANI M-SS. (2006) Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life sciences*,78,1371-1377.
- AL-BAGIEH NH. (1992) Antiherpes simplex virus type 1 activity of benzylisothiocyanate. *Biomedical letters*,47,67-70.
- AL-BAOJEH NH ,WEINBERG E. (1988) Benzylisothiocyanate: a possible agent for controlling dental caries.

- AL-MOHAYA MA, DARWAZEH A ,AL-KHUDAIR W. (2002) Oral fungal colonization and oral candidiasis in renal transplant patients: the relationship to Miswak use. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*,93,455-460.
- AL-OTAIBI M, AL-HARTHY M, GUSTAFSSON A, JOHANSSON A, CLAESSION R ,ANGMAR-MÅNSSON B. (2004) Subgingival plaque microbiota in Saudi Arabians after use of miswak chewing stick and toothbrush. *Journal of clinical periodontology*,31,1048-1053.
- ALALI F, HUDAIB M, ABURJAI T, KHAIRALLAH K ,AL-HADIDI N. (2005) GC-MS Analysis and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from the Stem of the Jordanian Toothbrush Tree *Salvadora persica*. *Pharmaceutical biology*,42,577-580.
- ALDOSARI A, KAFRAWY A ,STANDISH S. (1992) The effect of benzyliothiocyanate on epithelial changes induced by trauma and DMBA in the hamster tongue. *Saudi Dental Journal*,4,4-10.
- ALDRIDGE W. (1993) The biochemical principles of toxicology. *Exp Toxicol*,5,56-78.
- ALILI N, TÜRP JC, KULIK EM ,WALTIMO T. (2014) Volatile compounds of *Salvadora persica* inhibit the growth of oral *Candida* species. *Archives of oral biology*,59,441-447.
- ALMAS K. (1993) Miswak (chewing stick) and its role in oral health.
- ALMAS K. (2001) The antimicrobial effects of seven different types of Asian chewing sticks. *TROPICAL DENTAL JOURNAL*,17-20.
- ALMAS K. (2002) The effect of *Salvadora persica* extract (miswak) and chlorhexidine gluconate on human dentin: a SEM study. *J Contemp Dent Pract*,3,27-35.

- ALMAS K ,AL-ZEID Z. (2004) The immediate antimicrobial effect of a toothbrush and miswak on cariogenic bacteria: a clinical study. *The journal of contemporary dental practice*,5,105-114.
- ALMAS K, SKAUG N ,AHMAD I. (2005) An in vitro antimicrobial comparison of miswak extract with commercially available non-alcohol mouthrinses. *International journal of dental hygiene*,3,18-24.
- AMMAYAPPAN L ,MOSES JJ. (2009) Study of antimicrobial activity of aloe vera, chitosan, and curcumin on cotton, wool, and rabbit hair. *Fibers and polymers*,10,161-166.
- ANAND P, KUNNUMAKKARA AB, NEWMAN RA ,AGGARWAL BB. (2007) Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular pharmaceutics*,4,807-818.
- ANAND P, NAIR HB, SUNG B, KUNNUMAKKARA AB, YADAV VR, TEKMAL RR ,AGGARWAL BB. (2010) Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. *Biochemical pharmacology*,79,330-338.
- ARONSSON G, DAHLGREN UI ,KARLSSON S. (2000) Human and rat mononuclear cell proliferation show different sensitivity, in vitro, to single constituents of dental composite resins. *Journal of biomedical materials research*,53,651-657.
- ARORA V, TANGADE P, T LR, TIRTH A, PAL S ,TANDON V. (2014) Efficacy of dental floss and chlorhexidine mouth rinse as an adjunct to toothbrushing in removing plaque and gingival inflammation - a three way cross over trial. *J Clin Diagn Res*,8,ZC01-04.
- ASHRAFI A, REZAI A, SOHRABI HI, MEHDINEGHAD B, ASHRAFI I ,ASMARIYAN S. (2010) HISTOMETRIC AND HISTOPATHOLOGIC EVALUATION OF THE EFFECTS OF EQUISTUM ARVENSE HERBAL EXTRACT VERSUS ZINC OXIDE IN RABBIT SKIN WOUND HEALING MODEL.

- AŞKIN ÇELİK T ,ASLANTÜRK Ö. (2006) Anti-mitotic and anti-genotoxic effects of *Plantago lanceolata* aqueous extract on *Allium cepa* root tip meristem cells. *Biologia*,61,693-697.
- AUTIO-GOLD J. (2008) The role of chlorhexidine in caries prevention. *Oper Dent*,33,710-716.
- BADER JD, ROZIER RG, LOHR KN ,FRAME PS. (2004) Physicians' roles in preventing dental caries in preschool children: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Am J Prev Med*,26,315-325.
- BAGRAMIAN RA, GARCIA-GODOY F ,VOLPE AR. (2009) The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *Am J Dent*,22,3-8.
- BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D ,IDAOMAR M. (2008) Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*,46,446-475.
- BASSOLÉ IHN ,JULIANI HR. (2012) Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*,17,3989-4006.
- BEARA IN, LESJAK MM, ORČIĆ DZ, SIMIN NĐ, ČETOJEVIĆ-SIMIN DD, BOŽIN BN ,MIMICA-DUKIĆ NM. (2012) Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. *LWT-Food Science and Technology*,47,64-70.
- BEIGHTON D. (2005) The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol*,33,248-255.
- BENCHIMOL M, DA SILVA FONTES R ,DIAS ÂJB. (2007) *Tritrichomonas foetus* damages bovine oocytes in vitro. *Veterinary research*,38,399-408.

- BENDINI A, CERRETANI L, CARRASCO-PANCORBO A, GÓMEZ-CARAVACA AM, SEGURA-CARRETERO A, FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ A ,LERCKER G. (2007) Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade Alessandra. *Molecules*,12,1679-1719.
- BERNARDES WA, LUCARINI R, TOZATTI MG, BOCALON FLAUZINO LG, SOUZA MG, TURATTI IC, ANDRADE E SILVA ML, MARTINS CH, SILVA FILHO AAD ,CUNHA WR. (2010) Antibacterial Activity of the Essential Oil from *Rosmarinus officinalis* and its Major Components against Oral Pathogens. *Zeitschrift für Naturforschung C*,65,588-593.
- BESSA PEREIRA C, GOMES P, COSTA-RODRIGUES J, ALMEIDA PALMAS R, VIEIRA L, FERRAZ M, LOPES M ,FERNANDES M. (2012) Equisetum arvense hydromethanolic extracts in bone tissue regeneration: in vitro osteoblastic modulation and antibacterial activity. *Cell proliferation*,45,386-396.
- BIANCO A ,UCCELLA N. (2000) Biophenolic components of olives. *Food Research International*,33,475-485.
- BIERE A, MARAK HB ,VAN DAMME JM. (2004) Plant chemical defense against herbivores and pathogens: generalized defense or trade-offs? *Oecologia*,140,430-441.
- BILGEHAN H. (2002) *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. 2002. Barış Yayınları, İzmir.
- BISIGNANO G, TOMAINO A, CASCIO RL, CRISAFI G, UCCELLA N ,SAIJA A. (1999) On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*,51,971-974.
- BOS G. (1993) The miswak, an aspect of dental care in Islam. *Med Hist*,37,68-79.
- BOWEN WH. (2002) Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Crit Rev Oral Biol Med*,13,126-131.

- BÖNECKER M, PUCCA JUNIOR GA, COSTA PB ,PITTS N. (2012) A social movement to reduce caries prevalence in the world. *Brazilian oral research*,26,491-492.
- BRAMBILLA E, GARCIA-GODOY F ,STROHMENGER L. (2000) Principles of diagnosis and treatment of high-caries-risk subjects. *Dent Clin North Am*,44,507-540, vi.
- BROOKS GF, BUTEL JS ,MORSE SA. (1998) *Medical microbiology*. United States. 25th.
- ČANADANOVIĆ-BRUNET JM, ĆETKOVIĆ GS, DJILAS SM, TUMBAS VT, SAVATOVIĆ SS, MANDIĆ AI, MARKOV SL ,CVETKOVIĆ DD. (2009) Radical scavenging and antimicrobial activity of horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts. *International Journal of Food Science & Technology*,44,269-278.
- CAPELO J ,MOTA A. (2005) Ultrasonication for analytical chemistry. *Current Analytical Chemistry*,1,193-201.
- CARNEIRO DM, FREIRE RC, HONÓRIO TCDD, ZOGHAIB I, CARDOSO FFDS, TRESVENZOL LMF, DE PAULA JR, SOUSA ALL, JARDIM PCBV ,CUNHA LCD. (2014) Randomized, double-blind clinical trial to assess the acute diuretic effect of *Equisetum arvense* (field horsetail) in healthy volunteers. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*,2014.
- CAULÍN C, SALVESEN GS ,OSHIMA RG. (1997) Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *The Journal of cell biology*,138,1379-1394.
- CHAKRABORTY B, NATH A, SAIKIA H ,SENGUPTA M. (2014) Bactericidal activity of selected medicinal plants against multidrug resistant bacterial strains from clinical isolates. *Asian Pacific journal of tropical medicine*,7,S435-S441.
- CHAN EW, NG VP, TAN VV ,LOW YY. (2011) Antioxidant and antibacterial properties of *Alpinia galanga*, *Curcuma longa*, and *Etilingera elatior* (Zingiberaceae). *Pharmacognosy Journal*,3,54-61.

- CHAWLA-SARKAR M, LINDNER D, LIU Y-F, WILLIAMS B, SEN G, SILVERMAN R ,BORDEN E. (2003) Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*,8,237-249.
- CHIANG L, CHIANG W, CHANG M, NG L ,LIN C. (2002) Antiviral activity of *Plantago* major extracts and related compounds in vitro. *Antiviral research*,55,53-62.
- CHOW A. (2000) Infections of the oral cavity, neck, and head. *Principles and Practice of infectious diseases*. 5th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone,689-701.
- CILDIR SK, GERMEC D, SANDALLI N, OZDEMIR FI, ARUN T, TWETMAN S ,CAGLAR E. (2009) Reduction of salivary mutans streptococci in orthodontic patients during daily consumption of yoghurt containing probiotic bacteria. *The European Journal of Orthodontics*,31,407-411.
- CONSULTATION E. (2008) COMMITTEE ON HERBAL MEDICINAL PRODUCTS (HMPC).
- COSTA-RODRIGUES J, CARMO S, SILVA J ,FERNANDES M. (2012) Inhibition of human in vitro osteoclastogenesis by *Equisetum arvense*. *Cell proliferation*,45,566-576.
- DAIRAKU I, HAN Y, YANAKA N ,KATO N. (2010) Inhibitory effect of curcumin on IMP dehydrogenase, the target for anticancer and antiviral chemotherapy agents. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*,74,185-187.
- DARMANI H, NUSAYR T ,AL-HIYASAT A. (2006) Effects of extracts of miswak and derum on proliferation of Balb/C 3T3 fibroblasts and viability of cariogenic bacteria. *International journal of dental hygiene*,4,62-66.
- DARMANI H, AL-HIYASAT A, ELBETIEHA A ,ALKOFAHI A. (2003) The effect of an extract of *Salvadora persica* (Meswak, chewing stick) on fertility of male and female mice. *Phytomedicine*,10,62-65.

- DAROUT IA, CHRISTY AA, SKAUG N ,EGEBERG P. (2000) Identification and quantification of some potentially antimicrobial anionic components in miswak extract. *Indian Journal of Pharmacology*,32,11-14.
- DE CASTRO ML ,PRIEGO-CAPOTE F. (2010) Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*,1217,2383-2389.
- DE OLIVEIRA JR, DE CASTRO VC, VILELA PDGF, CAMARGO SEA, CARVALHO CAT, JORGE AOC ,DE OLIVEIRA LD. (2013) Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *BMC complementary and alternative medicine*,13,208.
- DENYER SP ,STEWART G. (1998) Mechanisms of action of disinfectants. *International biodeterioration & biodegradation*,41,261-268.
- DO MONTE FCHM, DOS SANTOS JG, RUSSI M, LANZIOTTI VMNB, LEAL LKAM ,DE ANDRADE CUNHA GM. (2004) Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. *Pharmacological research*,49,239-243.
- DODDS MW, JOHNSON DA ,YEH CK. (2005) Health benefits of saliva: a review. *J Dent*,33,223-233.
- DOICHINOVA L, BAKARDJIEV P ,PENEVA M. (2015) Assessment of food habits in children aged 6-12 years and the risk of caries. *Biotechnol Biotechnol Equip*,29,200-204.
- DOLBEARE F ,SELDEN JR. (2009) Immunochemical quantitation of bromodeoxyuridine: application to cell-cycle kinetics. *Essential Cytometry Methods*,331.
- DOMEÑO C, BLASCO M, SÁNCHEZ C ,NERÍN C. (2006) A fast extraction technique for extracting polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from lichens samples used as

biomonitors of air pollution: Dynamic sonication versus other methods. *Analytica chimica acta*,569,103-112.

DUANE B. (2015) Xylitol and caries prevention. *Evid Based Dent*,16,37-38.

DUQUESNOY E, CASTOLA V ,CASANOVA J. (2007) Triterpenes in the hexane extract of leaves of *Olea europaea* L.: analysis using ¹³C-NMR spectroscopy. *Phytochemical Analysis*,18,347-353.

DYE BA, LI X ,BELTRAN-AGUILAR ED. (2012) Selected oral health indicators in the United States, 2005-2008. *NCHS Data Brief*,1-8.

ESMAEILI-MAHANI S, REZAEZADEH-ROUKERD M, ESMAEILPOUR K, ABBASNEJAD M, RASOULIAN B, SHEIBANI V, KAEIDI A ,HAJIALIZADEH Z. (2010) Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. *Journal of ethnopharmacology*,132,200-205.

EŞEL D, SÜMERKAN B, AYANGİL D ,TELLİ M. (2004) BRUCELLA MELITENSIS SUŞLARININ ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİNDE AGAR DİLÜSYON VE E-TEST YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI. *Ankem Derg*,18,196-199.

EZMIRLY ST, CHENG JC ,WILSON SR. (1979) Saudi Arabian medicinal plants: *Salvadora persica*. *Planta Med*,35,191-192.

FAGBEMI JF, UGOJI E, ADENIPEKUN T ,ADELOWOTAN O. (2009) Evaluation of the antimicrobial properties of unripe banana (*Musa sapientum* L.), lemon grass (*Cymbopogon citratus* S.) and turmeric (*Curcuma longa* L.) on pathogens. *African Journal of Biotechnology*,8.

FAROOQI M ,SRIVASTAVA J. (1968) The tooth-brush tree (*Salvadora persica*). *Quarterly Journal of Crude Drug Research*,8,1297-1299.

- FEATHERSTONE J. (1990) An updated understanding of the mechanism of dental decay and its prevention. *Nutr Q*,14,5-11.
- FEATHERSTONE J. (1996) Clinical implications: New strategies for caries prevention, in: (Ed.)^(Eds.), Indiana Conference. pp. 287-295.
- FEATHERSTONE JD. (1999) Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community dentistry and oral epidemiology*,27,31-40.
- FERRAZZANO GF, CANTILE T, ROBERTO L, INGENITO A, CATANIA MR, ROSCETTO E, PALUMBO G, ZARRELLI A ,POLLIO A. (2015) Determination of the In Vitro and In Vivo Antimicrobial Activity on Salivary Streptococci and Lactobacilli and Chemical Characterisation of the Phenolic Content of a *Plantago lanceolata* Infusion. *BioMed research international*,2015.
- FLEMMIG J, KUCHTA K, ARNHOLD J ,RAUWALD H. (2011) *Olea europaea* leaf (Ph. Eur.) extract as well as several of its isolated phenolics inhibit the gout-related enzyme xanthine oxidase. *Phytomedicine*,18,561-566.
- FOLKMAN J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature medicine*,1,27-30.
- FRESHNEY RI. Culture of animal cells, a manual of basic technique, in: (Ed.)^(Eds.), John Wiley and Sons, inc. pp.
- FRESHNEY RI. (2005) Culture of specific cell types. ed. Wiley Online Library. s.
- FURNERI PM, MARINO A, SAIJA A, UCCELLA N ,BISIGNANO G. (2002) In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *International journal of antimicrobial agents*,20,293-296.

- GALLETTI GC, CHIAVARI G ,KAHIE YD. (1993) Pyrolysis/gas chromatography/ion-trap mass spectrometry of the 'tooth brush'tree (*Salvadora persica* L.). Rapid communications in mass spectrometry,7,651-655.
- GALVEZ M, MARTÍ C, LOPEZ-LAZARO M, CORTES F ,AYUSO J. (2003) Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines. Journal of ethnopharmacology,88,125-130.
- GAZI M, DAVIES TJ, AI-BAGIEH N ,COX S. (1992) The immediate-and medium-term effects of Meswak on the composition of mixed saliva. Journal of clinical periodontology,19,113-117.
- GAZI MI, LAMBOURNE A ,CHAGLA AH. (1987) The antiplaque effect of toothpaste containing *salvadora persica* compared with chlorhexidine gluconate. Clin Prev Dent,9,3-8.
- GHANI A. (2003) Medicinal Plants of Bangladesh with chemical constituents and uses. ; published by Asiatic Society of Bangladesh.
- GOLSTEIN P ,KROEMER G. (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. Trends in biochemical sciences,32,37-43.
- GORBACH SL. (2002) Probiotics in the third millennium. Dig Liver Dis,34 Suppl 2,S2-7.
- GUNSOLLEY JC. (2010) Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. Journal of dentistry,38,S6-S10.
- GÜLEŞ Ö ,ÜLKER E. (2008) Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi,19,73-78.
- HALKMAN KA. (1995) Mikrobiyolojide kullanılan besiyerleri. ed. Orkim Kimyevi Maddeler Ticaret Limited Şirketi. s.

- HARVEY JA, VAN NOUHUYS S ,BIERE A. (2005) Effects of quantitative variation in allelochemicals in *Plantago lanceolata* on development of a generalist and a specialist herbivore and their endoparasitoids. *Journal of chemical ecology*,31,287-302.
- HASSAN H, LINGSTROM P ,CARLEN A. (2015) Plaque pH in caries-free and caries-active young individuals before and after frequent rinses with sucrose and urea solution. *Caries Res*,49,18-25.
- HATTAB F. (1996) Meswak: the natural toothbrush. *The Journal of clinical dentistry*,8,125-129.
- HATTAB FN. (1997) Meswak: the natural toothbrush. *J Clin Dent*,8,125-129.
- HELFENSTEIN U ,STEINER M. (1994) Fluoride varnishes (Duraphat): a meta-analysis. *Community Dent Oral Epidemiol*,22,1-5.
- HICKS J, GARCIA-GODOY F ,FLAITZ C. (2003) Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *J Clin Pediatr Dent*,28,47-52.
- HIKAGE S, NAKAYAMA K, SAITO T, TAKAHASHI Y, KAMATAKI T, SUZUKI S, HONGO T ,SATO A. (2003) Cytotoxicity of bisphenol A glycidyl methacrylate on cytochrome P450-producing cells. *Journal of oral rehabilitation*,30,544-549.
- HLEBA L, VUKOVIĆ N, HORSKÁ E, PETROVÁ J, SUKDOLAK S ,KAČÁNIOVÁ M. (2014) Phenolic profile and antimicrobial activities to selected microorganisms of some wild medical plant from Slovakia. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*,4,269-274.
- HOLBROOK WP, DE SOET JJ ,DE GRAAFF J. (1993) Prediction of dental caries in pre-school children. *Caries Res*,27,424-430.

- JEON J-G, ROSALEN P, FALSETTA M ,KOO H. (2011) Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries research*,45,243-263.
- JERMAN T, TREBŠE P ,VODOPIVEC BM. (2010) Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. *Food Chemistry*,123,175-182.
- JIANG X, QU Q, LI M, MIAO S, LI X ,CAI W. (2014) Horsetail mixture on rheumatoid arthritis and its regulation on TNF-alpha and IL-10. *Pak J Pharm Sci*,27,2019-2023.
- JIN W, QUAN X, MENG F, CUI X ,PIAO H. (2007) [Relationship among hepatocyte apoptosis, P450 2E1 and oxidative stress in alcoholic liver disease of rats]. *Zhongguo wei zhong bing ji jiu yi xue= Chinese critical care medicine= Zhongguo weizhongbing jijiuyixue*,19,419-421.
- KAEIDI A, ESMAEILI-MAHANI S, SHEIBANI V, ABBASNEJAD M, RASOULIAN B, HAJIALIZADEH Z ,AFRAZI S. (2011) Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract attenuates early diabetic neuropathic pain through prevention of high glucose-induced apoptosis: in vitro and in vivo studies. *Journal of ethnopharmacology*,136,188-196.
- KARAKAŞ FP, YILDIRIM A ,TÜRKER A. (2012) Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. *Turk J Biol*,36,641-652.
- KAUFMANN B ,CHRISTEN P. (2002) Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical analysis*,13,105-113.
- KESKİN D, CEYHAN N, UĞUR A ,DBEYS AD. (2012) Antimicrobial activity and chemical constitutions of West Anatolian olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Journal of Food, Agriculture & Environment*,10,99-102.

KHALIL AT. (2006) Benzylamides from *Salvadora persica*. Archives of pharmacal research,29,952-956.

KILIÇ A. (2008) Uçucu yağ elde etme yöntemleri. Bartın Orman Fakültesi Dergisi,10.

KOO H, PEARSON SK, SCOTT-ANNE K, ABRANCHES J, CURY JA, ROSALEN PL, PARK YK, MARQUIS RE ,BOWEN WH. (2002) Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. Oral Microbiol Immunol,17,337-343.

KOOHPAR ZK, ENTEZARI M, MOVAFAGH A ,HASHEMI M. (2015) Anticancer Activity of Curcumin on Human Breast Adenocarcinoma: Role of Mcl-1 Gene. Iranian Journal of Cancer Prevention,8.

KORUKLUOĞLU M, SAHAN Y, YIGIT A, OZER ET ,GÜCER S. (2010) Antibacterial activity and chemical constitutions of *Olea europaea* L. leaf extracts. Journal of food processing and preservation,34,383-396.

KÖKSAL İ. (1998) ANTİBİYOGRAMIN KLİNİĞE YANSIMASI: KLİNİSYEN GÖZÜYLE ANTİBİYOGRAM.

KUPIECKI FP, OGZEWALLA CD ,SCHELL FM. (1974) Isolation and characterization of a hypoglycemic agent from *Xanthium strumarium*. Journal of pharmaceutical sciences,63,1166-1167.

KURIEN BT ,SCOFIELD RH. (2006) Western blotting. Methods,38,283-293.

LAMKIN MS ,OPPENHEIM FG. (1993) Structural features of salivary function. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine,4,251-259.

LEE J, CHO S, PAIK H, CHOI C, NAM K, HWANG S ,KIM S. (2014) Investigation on antibacterial and antioxidant activities, phenolic and flavonoid contents of some thai

edible plants as an alternative for antibiotics. *Asian-Australasian journal of animal sciences*,27,1461.

LEE O-H ,LEE B-Y. (2010) Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource technology*,101,3751-3754.

LEGEROS RZ. (1990) Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monographs in oral science*,15,1-201.

LI CJ, ZHANG LJ, DEZUBE BJ, CRUMPACKER CS ,PARDEE AB. (1993) Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,90,1839-1842.

LITTMAN H. (1993) Cariology: theories past and present. *Compendium*,14,748, 750.

LOPEZ-AVILA V. (1999) Sample preparation for environmental analysis. *Critical reviews in analytical chemistry*,29,195-230.

LUMIKARI M, SOUKKA T, NURMIO S ,TENOVUO J. (1991) Inhibition of the growth of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus casei* by oral peroxidase systems in human saliva. *Arch Oral Biol*,36,155-160.

LUOMA H. (1992) Chlorhexidine solutions, gels and varnishes in caries prevention. *Proc Finn Dent Soc*,88,147-153.

MA SF, LIANG JP, JIANG YT ,ZHU CL. (2011) [Analysis of community composition in dental plaque of elder people with root caries]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*,46,590-594.

MAGEE P. (2007) 24 Antiseptic drugs and disinfectants. *Side Effects of Drugs Annual*,29,241-243.

- MAHESHWARI RK, SINGH AK, GADDIPATI J ,SRIMAL RC. (2006) Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life sciences*,78,2081-2087.
- MANTELLINI M, BOTERO T, YAMAN P, DENNISON J, HANKS C ,NÖR J. (2003) Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. *Journal of dental research*,82,592-596.
- MARKIN D, DUEK L ,BERDICEVSKY I. (2003) In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses*,46,132-136.
- MARQUIS RE, CLOCK SA ,MOTA-MEIRA M. (2003) Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. *FEMS Microbiol Rev*,26,493-510.
- MARSH P. (1994) Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Advances in dental research*,8,263-271.
- MARSH PD. (2003) Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*,149,279-294.
- MARSH PD ,BRADSHAW DJ. (1995) Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol*,15,169-175.
- MARSHALL TA, LEVY SM, BROFFITT B, WARREN JJ, EICHENBERGER-GILMORE JM, BURNS TL ,STUMBO PJ. (2003) Dental caries and beverage consumption in young children. *Pediatrics*,112,e184-191.
- MATAR MJ, OSTROSKY-ZEICHNER L, PAETZNICK VL, RODRIGUEZ JR, CHEN E ,REX JH. (2003) Correlation between E-test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy*,47,1647-1651.

- MATTOS-GRANER RO, SMITH DJ, KING WF ,MAYER MP. (2000) Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J Dent Res*,79,1371-1377.
- MCDONALD AV, CLAFFEY NM, PEARSON GJ, BLAU W ,SETCHELL DJ. (2000) Effect of Nd:YAG radiation at millisecond pulse duration on dentine crater depth. *Lasers Surg Med*,27,213-223.
- MEDINA E, BRENES M, ROMERO C, GARCÍA A ,CASTRO AD. (2007) Main antimicrobial compounds in table olives. *Journal of agricultural and food chemistry*,55,9817-9823.
- MERMET J-M, OTTO M ,VALCARCEL CASES M. (2004) Analytical chemistry: a modern approach to analytical science.
- MEURMAN JH. (2005) Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci*,113,188-196.
- MILANIZADEH S, BIGDELI MR, RASOULIAN B ,AMANI D. (2014) The effects of olive leaf extract on antioxidant enzymes activity and tumor growth in breast cancer. *Thrita*,3.
- MILOVANOVIĆ V, RADULOVIĆ N, TODOROVIĆ Z, STANKOVIĆ M ,STOJANOVIĆ G. (2007) Antioxidant, antimicrobial and genotoxicity screening of hydro-alcoholic extracts of five Serbian Equisetum species. *Plant Foods for Human Nutrition*,62,113-119.
- MIMICA-DUKIC N, SIMIN N, CVEJIC J, JOVIN E, ORCIC D ,BOZIN B. (2008) Phenolic compounds in field horsetail (*Equisetum arvense* L.) as natural antioxidants. *Molecules*,13,1455-1464.
- MOHARAMZADEH K, BROOK IM ,VAN NOORT R. (2009) Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials*,2,514-548.

- MOHARAMZADEH K, BROOK IM, SCUTT AM, THORNHILL MH ,VAN NOORT R. (2008) Mucotoxicity of dental composite resins on a tissue-engineered human oral mucosal model. *Journal of dentistry*,36,331-336.
- MONTANER B, NAVARRO S, PIQUÉ M, VILASECA M, MARTINELL M, GIRALT E, GIL J ,PÉREZ-TOMÁS R. (2000) Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *British journal of pharmacology*,131,585-593.
- MORENO E, REZA J ,TREJO A. (2007) Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using water under subcritical conditions. *Polycyclic Aromatic Compounds*,27,239-260.
- MOROU-BERMUDEZ E, RODRIGUEZ S, BELLO AS ,DOMINGUEZ-BELLO MG. (2015) Urease and Dental Plaque Microbial Profiles in Children. *PloS one*,10,e0139315.
- MOUNTZ J ,ZHOU T. (2001) Apoptosis and autoimmunity. *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions*. Lippincott Williams & Wilkins.
- MOYNIHAN PJ ,KELLY SA. (2014) Effect on caries of restricting sugars intake: systematic review to inform WHO guidelines. *J Dent Res*,93,8-18.
- MUKHOPADHYAY M. (2000) *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*. ed. CRC press. s.
- MUN S-H, JOUNG D-K, KIM Y-S, KANG O-H, KIM S-B, SEO Y-S, KIM Y-C, LEE D-S, SHIN D-W ,KWEON K-T. (2013) Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*,20,714-718.
- MUNSON MA, BANERJEE A, WATSON TF ,WADE WG. (2004) Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol*,42,3023-3029.

- MURRAY PE, GARCÍA GODOY C ,GARCÍA GODOY F. (2007) How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*,12,258-266.
- MURRAY PR, ROSENTHAL KS ,PFALLER MA. (1994) *Medical microbiology*. ed. Mosby. s.
- NAGAI T, MYODA T ,NAGASHIMA T. (2005) Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense* L. *Food chemistry*,91,389-394.
- NIAMSA N ,SITTIWET C. (2009) Antimicrobial activity of *Curcuma longa* aqueous extract. *Journal of Pharmacology and Toxicology*,4,173-177.
- NOUMI E, SNOUSSI M, HAJLAOUI H, VALENTIN E ,BAKHROUF A. (2010) Antifungal properties of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts against oral *Candida* strains. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*,29,81-88.
- OBIED HK. (2013) Biography of biophenols: past, present and future. *Functional Foods in Health and Disease*,3,230-241.
- OGARD B, SEPPA L ,ROLLA G. (1994) Professional topical fluoride applications--clinical efficacy and mechanism of action. *Adv Dent Res*,8,190-201.
- OLIVEIRA MJ, MARTINS CC, PAIVA SM, TENUTA LM ,CURY JA. (2013) Estimated fluoride doses from toothpastes should be based on total soluble fluoride. *Int J Environ Res Public Health*,10,5726-5736.
- OZAY Y, OZYURT S, GUZEL S, CIMBIZ A, OLGUN EG ,CAYCI MK. (2010) Effects of *Equisetum arvense* Ointment on Dermal Wound Healing in Rats. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*,22,261-267.

- ÖZKAN O, AYDIN H ,BAĞCIĞIL A. (2009) *Salvia verticillata* ve *Phlomis pungens*' in vitro antibakteriyel etkinliğinin değerlendirilmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*,15,587-590.
- PAES LEME AF, KOO H, BELLATO CM, BEDI G ,CURY JA. (2006) The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res*,85,878-887.
- PANEL NIOHCD. (2001) National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1–3, 2000. *Journal of the National Cancer Institute*,93,979-989.
- PECKHAM S ,AWOFESO N. (2014) Water fluoridation: a critical review of the physiological effects of ingested fluoride as a public health intervention. *ScientificWorldJournal*,2014,293019.
- PEREIRA AP, FERREIRA IC, MARCELINO F, VALENTÃO P, ANDRADE PB, SEABRA R, ESTEVINHO L, BENTO A ,PEREIRA JA. (2007) Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*,12,1153-1162.
- PHAN T-T, SEE P, LEE S-T ,CHAN S-Y. (2001) Protective effects of curcumin against oxidative damage on skin cells in vitro: its implication for wound healing. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*,51,927-931.
- POWERS JM ,SAKAGUCHI RL. (2006) *Craig's restorative dental materials*, 13/e. ed. Elsevier India. s.
- QUINLAN C, ZISTERER D, TIPTON K ,O'SULLIVAN M. (2002) In vitro cytotoxicity of a composite resin and compomer. *International endodontic journal*,35,47-55.
- RAJABALIAN S, MOHAMMADI M ,MOZAFFARI B. (2009) Cytotoxicity evaluation of Persica mouthwash on cultured human and mouse cell lines in the presence and absence of fetal calf serum. *Indian Journal of Dental Research*,20,169.

RATES SMK. (2001) Plants as source of drugs. *Toxicol*,39,603-613.

RILEY P, MOORE D, AHMED F, SHARIF MO ,WORTHINGTON HV. (2015) Xylitol-containing products for preventing dental caries in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev*,3,CD010743.

RYAN D ,ROBARDS K. (1998) Critical Review. Phenolic compounds in olives. *Analyst*,123,31R-44R.

SAADABI AM. (2006) Antifungal activity of some Saudi plants used in traditional medicine. *Asian J Plant Sci*,5,907-909.

SADAT TABATABAEI F, MOEZIZADEH M ,JAVAND F. (2015) Effects of extracts of *Salvadora persica* on proliferation and viability of human dental pulp stem cells. *Journal of conservative dentistry: JCD*,18,315.

SAKURAI N, IIZUKA T, NAKAYAMA S, FUNAYAMA H, NOGUCHI M ,NAGAI M. (2003) [Vasorelaxant activity of caffeic acid derivatives from *Cichorium intybus* and *Equisetum arvense*]. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*,123,593-598.

SALA A, RECIO MC, SCHINELLA GR, MÁÑEZ S, GINER RM, CERDÁ-NICOLÁS M ,RÍOS J-L. (2003) Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *European Journal of Pharmacology*,461,53-61.

SALAS ML, MCCLELLAN AC, MACNEILL SR, SATHEESH KM ,COBB CM. (2012) Interproximal cervical lesions caused by incorrect flossing technique. *Int J Dent Hyg*,10,83-85.

SAMUELS N, GRBIC J, SAFFER A, WEXLER I ,WILLIAMS R. (2012) Effect of an herbal mouth rinse in preventing periodontal inflammation in an experimental gingivitis model: a pilot study. *Compendium of continuing education in dentistry (Jamesburg, NJ: 1995)*,33,204-206, 208-211.

- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ M, LOZANO-MENA G, JUAN ME, GARCÍA-GRANADOS A ,PLANAS JM. (2013) Assessment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L. *Molecular nutrition & food research*,57,339-346.
- SANOGO R, MONFORTE M, D'AQUINO A, ROSSITTO A, DI MAURO D ,GALATI E. (1999) Antiulcer activity of *Salvadora persica* L.: structural modifications. *Phytomedicine*,6,363-366.
- SANTOS H ,CAPELO J. (2007) Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta*,73,795-802.
- SAYINER HS. (2008) ISTANBUL.
- SCHMALZ G, SCHUSTER U, NUETZEL K ,SCHWEIKL H. (1999) An in vitro pulp chamber with three-dimensional cell cultures. *Journal of endodontics*,25,24-29.
- SCHMALZ G, SCHUSTER U, KOCH A ,SCHWEIKL H. (2002) Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test in vitro. *Journal of endodontics*,28,188-192.
- SERENO D, HOLZMULLER P, MANGOT I, CUNY G, OUAISSI A ,LEMESRE J-L. (2001) Antimonial-Mediated DNA Fragmentation in *Leishmania infantum* Amastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*,45,2064-2069.
- SHARIFA A, NEOH Y, ISWADI M, KHAIRUL O, ABDUL HALIM M, JAMALUDIN M, MOHAMED AZMAN A ,HING H. (2008) Effects of methanol, ethanol and aqueous extract of *Plantago major* on gram positive bacteria, gram negative bacteria and yeast. *Ann Microsc*,8,42-44.
- SHARMA R, GESCHER A ,STEWART W. (2005) Curcumin: the story so far. *European journal of cancer*,41,1955-1968.

- SHARMA RA, EUDEN SA, PLATTON SL, COOKE DN, SHAFAYAT A, HEWITT HR, MARCZYLO TH, MORGAN B, HEMINGWAY D ,PLUMMER SM. (2004) Phase I clinical trial of oral curcumin biomarkers of systemic activity and compliance. *Clinical Cancer Research*,10,6847-6854.
- SHER H, AL-YEMENI M, MASRAHI YS ,SHAH AH. (2010) Ethnomedicinal and ethnoecological evaluation of *Salvadora persica* L.: A threatened medicinal plant in Arabian Peninsula. *Journal of Medicinal Plants Research*,4,1209-1215.
- SINGH N, KAUR S, BEDI P ,KAUR D. (2011) Anxiolytic effects of *Equisetum arvense* Linn. extracts in mice.
- SMITH RM. (2002) Extractions with superheated water. *Journal of Chromatography A*,975,31-46.
- SMULLEN J, KOUTSOU G, FOSTER H, ZUMBÉ A ,STOREY D. (2007) The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries research*,41,342-349.
- SOFRATA AH, CLAESSION RL, LINGSTRÖM PK ,GUSTAFSSON AK. (2008) Strong antibacterial effect of miswak against oral microorganisms associated with periodontitis and caries. *Journal of periodontology*,79,1474-1479.
- SOUSA A, FERREIRA IC, CALHELHA R, ANDRADE PB, VALENTÃO P, SEABRA R, ESTEVINHO L, BENTO A ,PEREIRA JA. (2006) Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives 'alcaparra'. *Bioorganic & medicinal chemistry*,14,8533-8538.
- SRINIVASAN D, NATHAN S, SURESH T ,PERUMALSAMY PL. (2001) Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*,74,217-220.

- SUBRAMANIAM P ,NANDAN N. (2011) Effect of xylitol, sodium fluoride and triclosan containing mouth rinse on *Streptococcus mutans*. *Contemp Clin Dent*,2,287-290.
- SUDJANA AN, D'ORAZIO C, RYAN V, RASOOL N, NG J, ISLAM N, RILEY TV ,HAMMER KA. (2009) Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*,33,461-463.
- SURH YJ, HAN SS, KEUM YS, SEO HJ ,LEE SS. (2000) Inhibitory effects of curcumin and capsaicin on phorbol ester-induced activation of eukaryotic transcription factors, NF- κ B and AP-1. *Biofactors*,12,107-112.
- SUSALIT E, AGUS N, EFFENDI I, TJANDRAWINATA RR, NOFIARNY D, PERRINJAQUET-MOCSETTI T ,VERBRUGGEN M. (2011) Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: comparison with Captopril. *Phytomedicine*,18,251-258.
- SÜMERKAN B. (2009) Gram pozitif bakterilerde yorumlu antibiyogram. *Ankem Derg*,23,182-187.
- ŞENGÜN A, YALÇIN M, ÜLKER HE, ÖZTÜRK B ,HAKKI SS. (2011) Cytotoxicity evaluation of dentin bonding agents by dentin barrier test on 3-dimensional pulp cells. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*,112,e83-e88.
- ŞENYER N ,EFENDIYEV Ç. (2008) Automatic antibiogram inhibition zone diameter determination through circular hough transform, in: (Ed.)^(Eds.), *Signal Processing, Communication and Applications Conference, 2008. SIU 2008. IEEE 16th, IEEE*. pp. 1-4.
- TADEO JL, SÁNCHEZ-BRUNETE C, ALBERO B ,GARCÍA-VALCÁRCEL AI. (2010) Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Journal of Chromatography A*,1217,2415-2440.

- TANG A, LI J, EKSTRAND J ,LIU Y. (1999) Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *Journal of biomedical materials research*,45,214-222.
- TESTİ SDD, SİSTEM O, KARŞILAŞTIRILMASI KB, UZUN B, ŞENER AGK, GÜNGÖR S, AFŞAR İ, ERGİN ÖY ,DEMİRCİ M. (2013) Özgün Çalışma/Original Article *Mikrobiyol Bul* 2013; 47 (1): 11-18. *Mikrobiyol Bul*,47,11-18.
- THALOOD D, SINGH AK, SIDHU GS, PRASAD PV, KLEINMAN HK ,MAHESHWARI RK. (1998) Inhibition of angiogenic differentiation of human umbilical vein endothelial cells by curcumin. *Cell Growth and Differentiation-Publication American Association for Cancer Research*,9,305-312.
- THEILIG C, TEGTMEIER Y, LEYHAUSEN G ,GEURTSSEN W. (2000) Effects of BisGMA and TEGDMA on proliferation, migration, and tenascin expression of human fibroblasts and keratinocytes. *Journal of biomedical materials research*,53,632-639.
- TOMASIN L, PUSINANTI L ,ZERMAN N. (2015) The role of fluoride tablets in the prophylaxis of dental caries. A literature review. *Ann Stomatol (Roma)*,6,1-5.
- TROUILLAS P, CALLISTE C-A, ALLAIS D-P, SIMON A, MARFAK A, DELAGE C ,DUROUX J-L. (2003) Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry*,80,399-407.
- TROVATO A, GALATI EM, ROSSITTO A, MONFORTE MT, D'AQUINO A ,FORESTIERI AM. (1998) Hypoglycemic effects of *Salvadora persica* L. in the rat. *Phytomedicine*,5,129-132.
- TWETMAN S, PETERSSON L, AXELSSON S, DAHLGREN H, HOLM AK, KALLESTAL C, LAGERLOF F, LINGSTROM P, MEJARE I, NORDENRAM G, NORLUND A ,SODER B. (2004) Caries-preventive effect of sodium fluoride

mouthrinses: a systematic review of controlled clinical trials. *Acta Odontol Scand*,62,223-230.

UO M, SJOREN G, SUNDH A, WATARI F, BERGMAN M ,LERNER U. (2003) Cytotoxicity and bonding property of dental ceramics. *Dental Materials*,19,487-492.

UPENDRA R, KHANDELWAL P ,REDDY AM. (2011) Turmeric powder (*Curcuma longa* Linn.) as an antifungal agent in plant tissue culture studies. *International Journal of Engineering Science*,3,7899-7904.

UZUN E, SARIYAR G, ADSERSEN A, KARAKOC B, ÖTÜK G, OKTAYOGLU E ,PIRILDAR S. (2004) Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species. *Journal of Ethnopharmacology*,95,287-296.

VACCA-SMITH AM ,BOWEN WH. (1998) Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. *Arch Oral Biol*,43,103-110.

VLACHOJANNIS C, MAGORA F ,CHRUBASIK S. (2012a) Rise and Fall of Oral Health Products with Canadian Bloodroot Extract†. *Phytotherapy Research*,26,1423-1426.

VLACHOJANNIS C, MAGORA F ,CHRUBASIK S. (2012b) Rise and fall of oral health products with Canadian bloodroot extract. *Phytother Res*,26,1423-1426.

WALKER C, BORDEN LC, ZAMBON JJ, BONTA CY, DEVIZIO W ,VOLPE AR. (1994) The effects of a 0.3% triclosan-containing dentifrice on the microbial composition of supragingival plaque. *J Clin Periodontol*,21,334-341.

WANG L ,WELLER CL. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*,17,300-312.

- WOODS G. (1995) Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. *Manual of clinical microbiology*,1327-1341.
- YAMASHITA Y, BOWEN WH, BURNE RA ,KURAMITSU HK. (1993) Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect Immun*,61,3811-3817.
- YAZDANKHAH SP, SCHEIE AA, HOIBY EA, LUNESTAD BT, HEIR E, FOTLAND TO, NATERSTAD K ,KRUSE H. (2006) Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview. *Microb Drug Resist*,12,83-90.
- ZANDI K, RAMEDANI E, MOHAMMADI K, TAJBAKSH S, DEILAMI I, RASTIAN Z, FOULADVAND M, YOUSEFI F ,FARSHADPOUR F. (2010) Evaluation of antiviral activities of curcumin derivatives against HSV-1 in Vero cell line. *Natural product communications*,5,1935-1938.
- ZHAO W, LI W, LIN J, CHEN Z ,YU D. (2014) Effect of sucrose concentration on sucrose-dependent adhesion and glucosyltransferase expression of *S. mutans* in children with severe early-childhood caries (S-ECC). *Nutrients*,6,3572-3586.
- ZOUGAGH M, VALCÁRCEL M ,RÍOS A. (2004) Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*,23,399-405.

6 ÖZGEÇMİŞ

01.01.1986 tarihinde Konya'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Konya'da tamamladı. 2005 yılında başladığı Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden 2010 yılında dönem birincisi olarak mezun oldu. 2011-2012 yıllarında Konya/Hüyük Devlet Hastanesi'nde diş tabibi olarak görev yaptı. Diş Uzmanlık Sınavı (DUS) ile 2012 yılında eğitimine başladığı Kırıkkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmektedir. Evli ve bir çocuk annesi olup, İngilizce bilmektedir (ÜDS: 88).