ÇEŞİTLİ BİTKİ ÖZÜTLERİNİN ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİ İLE DİŞ MİNESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Dt. Zeynep DEMİREZ BİRCAN
Pedodonti Programı

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Sema AYDINOĞLU

Uzmanlık Tezi - 2021

T.C
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

ÇEŞİTLİ BİTKİ ÖZÜTLERİNİN ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİ İLE DİŞ MİNESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Dt. Zeynep DEMİREZ BİRCAN

Pedodonti Programı
Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Sema AYDINOĞLU

RİZE-2021

T.C
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
PEDODONTİ UZMANLIK EĞİTİM PROGRAMI

ÇEŞİTLİ BİTKİ ÖZÜTLERİNİN ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİ İLE DİŞ MİNESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Dt. Zeynep DEMİREZ BİRCAN

Tez Savunma Tarihi : 08.02.2021
Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Sema AYDINOĞLU
(Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi İpek ARSLAN
(Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Neslihan ÖZVEREN
(Trakya Üniversitesi)

Onay
Bu çalışma yukarıdaki tez jürisi tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zeynep Yeşil DUYMUŞ
Fakülte Dekanı

Uzmanlık Tezi
RİZE-2021

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... **I**

TEŞEKKÜR ..... **VI**

ÖZET ..... **VII**

ABSRACT ..... **IX**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **XI**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **XIV**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **XVII**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1. Diş Çürüğü 3

2.1.1. Çürük Epidemiyolojisi 4

2.1.2. Çürük Etiyolojisi 5

2.2. Çürük Mikrobiyolojisi 7

2.2.1. Streptokoklar 8

2.2.1.1. *Streptococcus Mutans* (*S. mutans*) 9

2.2.2. Laktobasiller 10

2.2.2.1. *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) 11

2.2.3. *Scardovia Wiggsiae* (*S. wiggsiae*) 12

2.3. Dental Biyofilm 13

2.4. Dental Biyofilmin Kaldırılmasında Kullanılan Antimikrobiyal Ajanlar 16

2.4.1. Flor ve Flor Bileşikleri 17

2.4.2. Klorheksidin (KHX) 17

2.4.3. Ksilitol 18

2.4.4. Probiyotikler 19
2.5. Tez Çalışmasında Kullanılan Tıbbi Aromatik Bitkiler 19
2.5.1. *Stevia rebaudiana* (Şeker otu) 19
2.5.2. *Thymus praecox* Opiz subsp. *Caucasicus* (Wild. Ex Ronniger) Jalas var. *Caucasicus* (Anzer Kekiği) 21
2.5.3. *Helichrysum arenarium* (Altın otu) 22
2.6. Ekstraksiyon Yöntemleri 24
2.6.1. Soxhlet Ekstraksiyon Yöntemi 24
2.6.2. Ultrasonik Ekstraksiyon Yöntemi 24
2.6.3. Mikrodalga Ekstraksiyon Yöntemi 25
2.6.4. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyon Yöntemi 25
2.6.5. Süperkritik Ektraksiyon Yöntemi 26
2.7. Antimikrobiyal Testler 26
2.7.1. Difüzyon Testleri 26
2.7.1.1. Agar Kuyucuk Yöntemi 26
2.7.2. İnce Tabakalı Kromatografi (TLC)–Biyootografi 27
2.7.3. Dilüsyon Yöntemleri 27
2.7.3.1. Sıvı Besiyeri Dilüsyon Yöntemi 27
2.7.4. Zaman Öldürme Testi (Zaman Öldürme Eğrisi) 28
2.7.5. ATP Biyoluminesans Analizi 28
2.7.6. Akışlı Hücre Sayım Yöntemi 28
2.8. Görüntüleme Teknikleri 29
2.8.1. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) 29
2.8.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) 29
2.8.3. Enerji Dağılım Spektroskopisi (EDS) 30

3. MATERYAL VE METOT 32

3.1. Güç Analizi ve Örnek Sayılarının Belirlenmesi 32

3.2. Deney Grupları ve Çalışma Dizaynı 32

3.3. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması 34

3.4. Çalışmada Kullanılan Bitkilerin Hazırlanması 34

3.5. Çalışmada Kullanılan Bakteriler 36

3.6. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri 36

3.6.1. Brain Heart İnfüzyon Katı Besiyeri (BHIA) 36

3.6.2. DeMan Rogosa Sharp Katı (MRSA) ve Sıvı Besiyeri (MRSB) 36

3.6.3. Mannitol Egg Yolk Polimiksin Katı Besiyeri (MYPGA) 37

3.6.4. Triptik Soy Sıvı Besiyeri (TSB) 38

3.7. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar 38

3.7.1. Sükroz 38

3.7.2. Metanol 39

3.7.3. Kuru Sistem Gaz Paketi (AnaeroGen ™) 39

3.7.4. Klorheksidin (KHX) 39

3.8. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması 40

3.8.1. *S. mutans* İzolatının Hazırlanması 40

3.8.2. *L. acidophilus* İzolatının Hazırlanması 40

3.8.3. *S. wiggsiae* İzolatının Hazırlanması 41

3.9. Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi 42

3.9.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi 42

3.9.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) ve Minimum Bakterisit Konsantrasyon (MBK)' un Belirlenmesi 43

3.10. Dişler Üzerinde Biyofilm Tabakasının Oluşturulması 45

3.10.1. Dişler Üzerinde *S. mutans* Kültürü ile Monomikrobiyal Biyofilm Oluşumu……..45
3.10.2. Dişler Üzerinde *S. mutans* ve *S. wiggsiae* Kültürleri ile Polimikrobiyal Biyofilm Oluşumu 46
3.10.3. Dişler Üzerinde *S. mutans*, *L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* Kültürleri ile Polimikrobiyal Biyofilm Oluşumu 47
3.11. KHX ve Bitki Ekstraktlarının MBK Değerlerine Göre Hazırlanması....48
3.12. KHX ve Bitki Ekstraktlarının Farklı Biyofilm Gruplarına Uygulanması…. 50
3.12.1. Monomikrobiyal Biyofilm Grubuna Uygulanması 50
3.12.2. Polimikrobiyal Biyofilm Gruplarına Uygulanması 51
3.13. KHX ve Bitki Ekstraktlarının Biyofilm Oluşumuna Etkisi 52
3.14. SEM ile Görüntü Alınması ve EDS Analizi 53
3.15. İstatistiksel Değerlendirme 54
4. BULGULAR.....56
4.1. KHX ve Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesi.....56
4.2. Bakteriyel Biyofilm Oluşumunun Işık Mikroskobu ile Görüntülenmesi57
4.3. Biyofilm Oluşumuna KHX ve Bitki Ekstraktlarının Etkisi 58
4.3.1. Monomikrobiyal Biyofilm Grubuna KHX ve Bitki Ekstraktlarının Etkisi…… 58
4.3.2. Polimikrobiyal Biyofilm Grupları KHX ve Bitki Ekstraktlarının Etkisi 60
4.3.2.1. *S. mutans* ve *S. wiggsiae* Biyofilm Grubu 60
4.3.2.2. *S. mutans, L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* Biyofilm Grubu 62
4.4. KHX ve Bitki Ekstraktlarının Biyofilm Oluşumuna Etkilerinin SEM ile Görüntülenmesi.....66

4.5. >MBK Değerinde Hazırlanan Deney Solüsyonlarının Diş Üzerine Etkisinin EDS ile İncelenmesi 73

5. TARTIŞMA 76

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 88

KAYNAKLAR 90

EKLER 102

EK-1 ÖZGEÇMİŞ 102

EK-2 ETİK KURUL ONAY FORMU 103

EK-3 BAP ONAY FORMU 104

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince gösterdiği anlayış ve her türlü yardımlarından dolayı sayın hocam ve tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Sema AYDINOĞLU' na

Tez çalışmamın yapılamasına olanak sağlayan ve her aşamasında öneri ve paylaşımları ile ufkumu açan çok kıymetli Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Emine YURTERİ' ye,

Bu çalışmanın deney aşamalarının gerçekleştirilebilmesi için gerekli ekipman ve laboratuvar olanaklarını kullanabilmem için fırsat tanıyan Prof. Dr. Serdar MAKBUL ve Prof. Dr. Fatih SEYİS'e,

Bu tez çalışmasını 2020/1093 proje numarası ile destekleyen Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' ne,

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte olmaktan mutluluk duyduğum ve her koşulda yardımlarını esirgemeyen bölüm hocalarım Dr. Öğr. Üyesi İpek ARSLAN ve Dr. Öğr. Üyesi Ayça KURT' a ve sevgili çalışma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca her anımda olduğu gibi uzmanlık sürecimde de her koşulda beni destekleyen, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sonsuz minnet, saygı ve şefkat duyduğum sevgili annem Ayten DEMİREZ, babam Rifat DEMİREZ ve canım kardeşim Elif DEMİREZ' e,

Hayat arkadaşım, sevgilim Ahmet BİRCAN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Zeynep DEMİREZ BİRCAN

ÖZET

Çeşitli Bitki Özütlerinin Antimikrobiyal Etkinliği ile Diş Minesi Üzerine Etkilerinin İn Vitro Değerlendirilmesi

Amaç: Bitki ekstraktlarının karyojenik mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliği ve süt dişi minesine etkilerinin değerlendirilmesidir.

Materyal ve Metod: Çalışmada kullanılan 150 diş örneği şeker otu, Anzer kekiği, altın otu, KHX ve distile sudan oluşan 5 gruba ayrıldı. Her bitki grubuna uygulanan konsantrasyon (MBK ve >MBK) ve biyofilm (monomikrobiyal ve polimikrobiyal) için 6 alt grup (n=5) tanımlandı. Ekstrakte edilen bitkilerin etkinlikleri agar kuyucuk difüzyon metodu ile incelendi. MİK ve MBK testleri yapıldı. Diş yüzeylerinde oluşturulan monomikrobiyal ve polimikrobiyal biyofilm tabakalarına sırasıyla 5 ve 1 günlük deney protokolleri uygulandı. Deney bitiminde biyofilm tabakaları uzaklaştırılarak bakteri sayımları yapıldı. Deney başlangıç ve bitiminde her gruptan rastgele seçilen bir diş SEM-EDS ile incelendi.

Bulgular: Monomikrobiyal biyofilmde MBK ve >MBK' da hazırlanan KHX' in *S. mutans* üzerinde etkili olduğu görüldü ($p<0.05$). Polimikrobiyal (*S. mutans*, *S. wiggsiae*) biyofilm grubunda >MBK' da hazırlanan şeker otu, Anzer kekiği ve KHX' e kıyasla distile suda daha fazla *S. wiggsiae* tespit edildi ($p<0.05$). Polimikrobiyal (*S. mutans*, *L. acidophilus*, *S. wiggsiae*) biyofilm grubunda MBK' da hazırlanan KHX' in şeker otuna kıyasla daha az *S. mutans* bulundurduğu gözlendi ($p<0.05$). Polimikrobiyal (*S. mutans*, *L. acidophilus*, *S. wiggsiae*) biyofilmdeki >MBK' da hazırlanan Anzer kekiğinde distile suya göre daha fazla sayıda *L. acidophilus* izlendi ($p<0.05$). Deney başlangıcına kıyasla bitiminde distile su grubunun daha düşük oranda Ca ihtiva ettiği belirlendi ($p<0.05$).

Sonuç: Çalışmanın sınırları dahilinde MBK değerleri esas alınarak hazırlanan Anzer kekiği, altın otu ve şeker otu ekstraktlarının karyojenik bakterilere karşı etkileri olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal etkinlik, diş çürüğü, karyojenik mikroorganizma, SEM, tıbbi bitki.

ABSRACT

In Vitro Evaluation Of Antimicrobial Activity Of Various Plant Extracts And Their Effects On Tooth Enamel

Aim: Evaluation of the antimicrobial activity of plant extracts against cariogenic microorganisms and their effects on primary tooth enamel.

Material and Method: 150 tooth specimens were divided into 5 groups as *Stevia rebaudiana*, *Anzer thyme*, *Helichrysum arenarium*, CHX and distilled water. Six subgroups (n = 5) were defined for the concentration (MBC and >MBC) and biofilm (monomicrobial and polymicrobial) applied to each plant group. The efficiencies of the extracted plants were examined by the agar well diffusion method. MIC and MBC tests were performed. After 5 and 1 day experimental protocols were applied to the monomicrobial and polymicrobial biofilm layers formed on the tooth surfaces, respectively, the number of bacteria was calculated. A randomly selected tooth from each group was examined with SEM-EDS.

Results: It was observed that CHX prepared at MBC and >MBC in monomicrobial biofilm was effective on *S. mutans* ($p<0.05$). In the polymicrobial (*S. mutans*, *S. wiggsiae*) biofilm group, less *S. wiggsiae* were detected in the *Stevia rebaudiana*, *Anzer thyme* and CHX groups compared to distilled water for MBC value ($p<0.05$). In the polymicrobial (*S. mutans*, *L. acidophilus*, *S. wiggsiae*) biofilm group, it was observed that CHX contained less *S. mutans* than *Stevia rebaudiana* at MBC ($p<0.05$). In polymicrobial (*S. mutans, L. acidophilus, S. wiggsiae*) biofilm, more *L. acidophilus* was observed in *Anzer thyme* at >MBC than in distilled water ($p<0.05$). At the end of the experiment, it was determined that distilled water contained a lower proportion of Ca ($p<0.05$).

Conclusion: It was observed that *Anzer thyme*, *Helichrysum arenarium* and *Stevia rebaudiana* extracts had effects against cariogenic bacteria**.**

Key Words: Antimicrobial activity, tooth decay, cariogenic microorganism, SEM, medicinal plant.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ark Arkadaşları

atm Atmosfer

ATP Adenozin Trifosfat

BHIA Brain Heart İnfüzyon Katı Besiyeri

Ca Kalsiyum

cfu Colony Forming Unit

CLSM Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (Confocal Laser Scanning Microscopy)

cm Santimetre

DNA Deoksiribo Nükleik Asit

DSMZ Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

DSÖ Dünya Sağlık Örgütü

EÇÇ Erken Çocukluk Çağı Çürüğü

EDS Enerji Dağılım Spektroskopisi (Energy Dispersive Spectorcopy)

F Flor

g Gram

KHX Klorheksidin

log Logaritma

m Metre

Max. Maksimum

MBK Minimum Bakterisidal Konsantrasyon

MHz Megahertz

MİK Minimum İnhibitör Konsantrasyon

Min. Minimum

ml Mililitre

mm Milimetre

Mpa Megapaskal

MRSA DeMan Rogosa Sharp Katı Besiyeri

MRSB DeMan Rogosa Sharp Sıvı Besiyeri

MYPGA Mannitol Egg Yolk Polimiksin Katı Besiyeri

n Örnek sayısı

NaF Sodyum Florür

NHANES Ulusal Sağlık ve Beslenme Kontrol Araştırması (National Health and Nutrition Examination Survey)

Örn. Örnek

P Fosfor

p İstatistiksel Anlamlılık (Perfect Value)

SEM Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning electron microscope)

SLS Sodyum Lauril Sülfat

SS Standart Sapma

TLC İnce Tabakalı Kromatografi

TSB Triptik Soy Sıvı Besiyeri

vb. Ve benzeri

x Kat

µl Mikrolitre

µm Mikrometre

%	Yüzde
>	Büyüktür
°C	Derece santigrat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No **Sayfa No**

Şekil 2.1. Sağlıklı diş anatomisi ve biyofilm tabakası[18] 3

Şekil 2.2. Çürük sürecinde patolojik ve koruyucu faktörler arasındaki denge[19] 4

Şekil 2.3 Çürüğün gelişimde etkili olan faktörler[19] 6

Şekil 2.4. *S. mutans* kolonisi 10

Şekil 2.5. *S. wiggsiae*' nin mikroskop görüntüsü 12

Şekil 2.6. Tükürük ile kaplı diş yüzeyine ilk tutunan mikroorganizmalar[72] 14

Şekil 2.7. Şeker otu bitkisi[111] 20

Şekil 2.8a. Anzer kekiği[44], **b.** Anzer kekiğinin yetiştiği bölge[116] 21

Şekil 2.9. Altın otu[127] 23

Şekil 3.1. Çalışma dizaynı 33

Şekil 3.2a. Ekstraksiyon cihazı, **b.** Evaporatör 35

Şekil 3.3. Tek kullanımlık filtre 38

Şekil 3.4. AnaeroGen™ kiti 39

Şekil 3.5. *S. mutans*' ın kanlı BHIA' da üreme görüntüsü 40

Şekil 3.6. *L. acidophilus*' un MRSA' da üreme görüntüsü 41

Şekil 3.7. *S. mutans* ve *L. acidophilus*' un bulanık görüntüsü 41

Şekil 3.8a. *S. wiggsiae*' nin kanlı BHIA' da üreme görüntüsü, **b.** Sıvı besiyerindeki bulanık görüntüler 42

Şekil 3.9. MİK değerlerinin tespiti için hazırlanan solüsyonlar 43

Şekil 3.10. Eliza plakalarında MİK ve MBK değerlerinin belirlenmesi 44

Şekil 3.11. *S. mutans*' ın üremesinin gözlenmesi (Kuyucuğun tabanındaki çökelti) 46

Şekil 3.12. Mumlu kavanoz düzeneği 47

Şekil 3.13. Günlük hazırlanan solüsyonlar 50

Şekil 3.14. 24 kuyucuklu plaklara yukarıdan aşağıya sırasıyla MBK ve >MBK derişimlerine sahip solüsyonların konulması 50

Şekil 3.15a. Serum fizyolojik ilave edilen kuyucuklar, **b.** Çalkalayıcı 51

Şekil 3.16. KHX için 1. dilüsyon sonrası bakteri ekimi. 52

Şekil 3.17. Şeker otu, Anzer kekiği, altın otu için 2. dilüsyon sonrası bakteri ekimi. ... 53

Şekil 3.18. Distile su için 3. dilüsyon sonrası bakteri ekimi 53

Şekil 3.19a. SEM cihazı, **b.** Altın kaplama cihazı, **c**. Altın tabakasıyla kaplanan diş örnekleri 54

Şekil 4.1a. *S. mutans* için kanlı BHİA' da inhibisyon zonları, **b.** *L. acidophilus* için MRSA' da inhibisyon zonları, **c.** *S. wiggsiae* için kanlı BHİA'da inhibisyon zonları ... 56

Şekil 4.2a-c. Deney öncesi ışık mikroskobu görüntüleri 57

Şekil 4.3a-c. Deney sonrası ışık mikroskobu görüntüleri 58

Şekil 4.4a-c. MRSA' da bakteri görünümü 58

Şekil 4.5. *S. mutans* biyofilmindeki canlı bakteri sayıları 60

Şekil 4.6. Polimikrobiyal biyofilmdeki canlı *S. mutans* sayıları 61

Şekil 4.7. Polimikrobiyal biyofilmdeki canlı *S. wiggsiae* sayıları 62

Şekil 4.8. Polimikrobiyal biyofilmdeki *S. mutans* sayıları 63

Şekil 4.9. Polimikrobiyal biyofilmdeki *L. acidophilus* sayıları 65

Şekil 4.10. Polimikrobiyal biyofilmdeki *S. wiggsiae* sayıları 66

Şekil 4.11. Deney başlangıcında biyofilm oluşumuna ait SEM görüntüleri (x5000 ve x10000) **a, b.** İşlem görmemiş süt dişi yüzeyi, **c, d.** Mine yüzeyini kaplayan *S. mutans* biyofilm örneği 67

Şekil 4.12. a. Deney başlangıcında *S. mutans* ve *S. wiggsiae* bakteri gruplarının görüntüsü; **b.** Deney başlangıcında *S. mutans, L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* bakteri gruplarının görüntüsü..... 67

Şekil 4.13. Biyofilm oluşumunda altın otu ekstraktının etkisine ait SEM görüntüleri (x5000, x10000) **a.** *S. mutans* biyofilmi; **b.** *S. mutans* ve *S. wiggsiae* biyofilmi; **c.** *S. mutans, L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* biyofilmi 68

Şekil 4.14. Biyofilm oluşumunda Anzer kekiği ekstraktının etkisine ait SEM görüntüleri (x5000, x10000) **a.** *S. mutans* biyofilmi; **b.** *S. mutans* ve *S. wiggsiae* biyofilmi; **c.** *S. mutans, L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* biyofilmi 69

Şekil 4.15. Biyofilm oluşumunda şeker otu ekstraktının etkisine ait SEM görüntüleri (x5000, x10000) **a.** *S. mutans* biyofilmi**; b.** *S. mutans* ve *S. wiggsiae* biyofilmi**; c.** *S. mutans, L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* biyofilmi 70

Şekil 4.16. Biyofilm oluşumunda KHX' nin etkisine ait SEM görüntüleri (x5000, x10000) **a.** *S. mutans* biyofilmi**; b.** *S. mutans* ve *S. wiggsiae* biyofilmi; **c.** *S. mutans, L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* biyofilmi……..... 71

Şekil 4.17. Biyofilm oluşumunda distile su ekstraktının etkisine ait SEM görüntüleri (x5000, x10000) **a.** *S. mutans* biyofilmi; **b.** *S. mutans* ve *S. wiggsiae* biyofilmi; **c.** *S. mutans, L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* biyofilmi 72

Şekil 4.18. EDS analizi yapılan grupların haritalaması ve mineral ölçümleri. **a.** İşlem görmemiş süt dişi; **b.** Altın otu; **c.** Anzer kekiği; **d.** Şeker otu; **e.** KHX; **f.** Distile su.... 74

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No **Sayfa No**

Tablo 3.1. Deney gruplarının oluşturulması 32

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan bitkilerin tür, lokasyon ve toplandıkları rakım 34

Tablo 3.3. MBK değeri esas alınarak hesaplanan bir diş için gerekli madde miktarı.... 49

Tablo 3.4. >MBK esas alınarak hesaplanan bir diş için gerekli madde miktarı 49

Tablo 4.1. Test edilen bitki ekstraktlarının (50 µl) *S. mutans, S. wiggsiae* ve *L. acidophilus* üzerinde oluşturduğu zon çapları (mm) 56

Tablo 4.2. KHX ve bitki ekstraktlarının *S. mutans, S. wiggsiae* ve *L. acidophilus*' a karşı MİK ve MBK değerleri..... 57

Tablo 4.3. MBK ve >MBK değerlerine göre hazırlanan KHX ve bitki ekstraktlarının uygulandığı biyofilmdeki canlı bakteri sayılarının karşılaştırılması (log_{10} cfu/ml)..... 59

Tablo 4.4. MBK ve >MBK değerlerine göre hazırlanan KHX ve bitki ekstraktlarının uygulandığı polimikrobiyal biyofilmdeki canlı *S. mutans* sayılarının karşılaştırılması (log_{10} cfu/ml)..... 60

Tablo 4.5. MBK ve >MBK değerlerine göre hazırlanan KHX ve bitki ekstraktlarının uygulandığı polimikrobiyal biyofilmdeki canlı *S. wiggsiae* sayılarının karşılaştırılması (log_{10} cfu/ml)..... 62

Tablo 4.6. MBK ve >MBK değerine göre hazırlanan KHX ve bitki ekstraktlarının uygulandığı polimikrobiyal biyofilmdeki canlı *S. mutans* sayılarının karşılaştırılması (log_{10} cfu/ml)..... 63

Tablo 4.7. MBK ve >MBK değerlerine göre hazırlanan KHX ve bitki ekstraktlarının uygulandığı polimikrobiyal biyofilmdeki canlı *L. acidophilus* sayılarının karşılaştırılması (log_{10} cfu/ml)..... 64

Tablo 4.8. MBK ve >MBK değerleri esas alınarak hazırlanan KHX ve bitki ekstraktlarının uygulandığı polimikrobiyal biyofilmdeki canlı *S. wiggsiae* sayılarının karşılaştırılması (log_{10} cfu/ml) 65

Tablo 4.9. EDS analizi sonucu dişlerin mineral içeriklerindeki değişimler 75

1. GİRİŞ

Diş çürüğü, yerleşik biyofilmdeki dengenin patojen mikroorganizmalar lehine bozulması sonucu diş sert dokularının progresif demineralizasyonuna yol açabilen polimikrobiyal bir hastalıktır.[1] Mine, dentin ve sementi oluşturan inorganik ve organik matriks arasındaki bağlantının fizikokimyasal olarak bozulması sonucu submikroskobik düzeyde madde kaybı ile başlayan ve pek çok etiyolojik faktörden etkilen diş çürükleri en yaygın çocukluk çağı hastalığı olarak kabul edilmektedir.[2]

Diş yüzeyine yapışan, düşük pH' da canlılığını sürdüren, laktik asit üreten, yüksek oranda sakkaroz kullanan ve ekzopolisakkarit matriks sentezleyebilen patojenler çürük lezyonunun oluşması ve ilerlemesinde temel elemanlardır.[3] Bu bakterilerden biri olan *Streptococcus mutans* (*S. mutans)*' ın diş çürüğünden sorumlu primer patojen olduğu düşünülmektedir.[4] Derin çürüklü lezyonlarda ise *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*)' un yüksek oranda bulunduğu bilinmektedir.[4] Yeni izole edilen türlerden olan *Scardovia wiggsiae* (*S. wiggsiae)*' *nin S.mutans*' ın varlığı ya da yokluğu ile önemli derecede ilişkisinin bulunduğu ve başlangıç çürük lezyonlarının ilerlemesine sebep olduğu tespit edilmiştir.[5,6]

Diş çürüğü oluşumuyla doğrudan bağlantılı olan biyofilmler, bir yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanan, ekzopolimerik matriks içeren mikroorganizma topluluklarıdır. Biyofilm oluşumunu engellemek veya azaltmak için mekanik temizlikle beraber topikal ve sistemik antimikrobiyal ajanlar kullanılmaktadır.[7] Antimikrobiyal amaçla kullanılan ajanlar arasında altın standart olarak kabul edilen klorheksidin (KHX) geniş spektrumlu bir antibakteriyeldir.[8] Oral dokulara retansiyon göstermesi nedeni ile uzun süreli antibakteriyel etkiye sahip olan KHX, bu özelliği ile aynı zamanda oldukça güçlü bir antiplak ajanıdır.[8] Ancak geleneksel kemoterapötik yaklaşımlar ve genellikle

klorheksidin (oral dokuları boyama, dilde yanma vb.)[9] gibi yaygın olarak kullanılan sentetik oral biyositlerle ilişkili yan etkiler ve bu ajanlara mikrobiyal direncin ortaya çıkması ile ilgili endişeler daha güvenli ve etkili alternatif ajanlara ihtiyacı kaçınılmaz hale getirmiştir.[10-13]

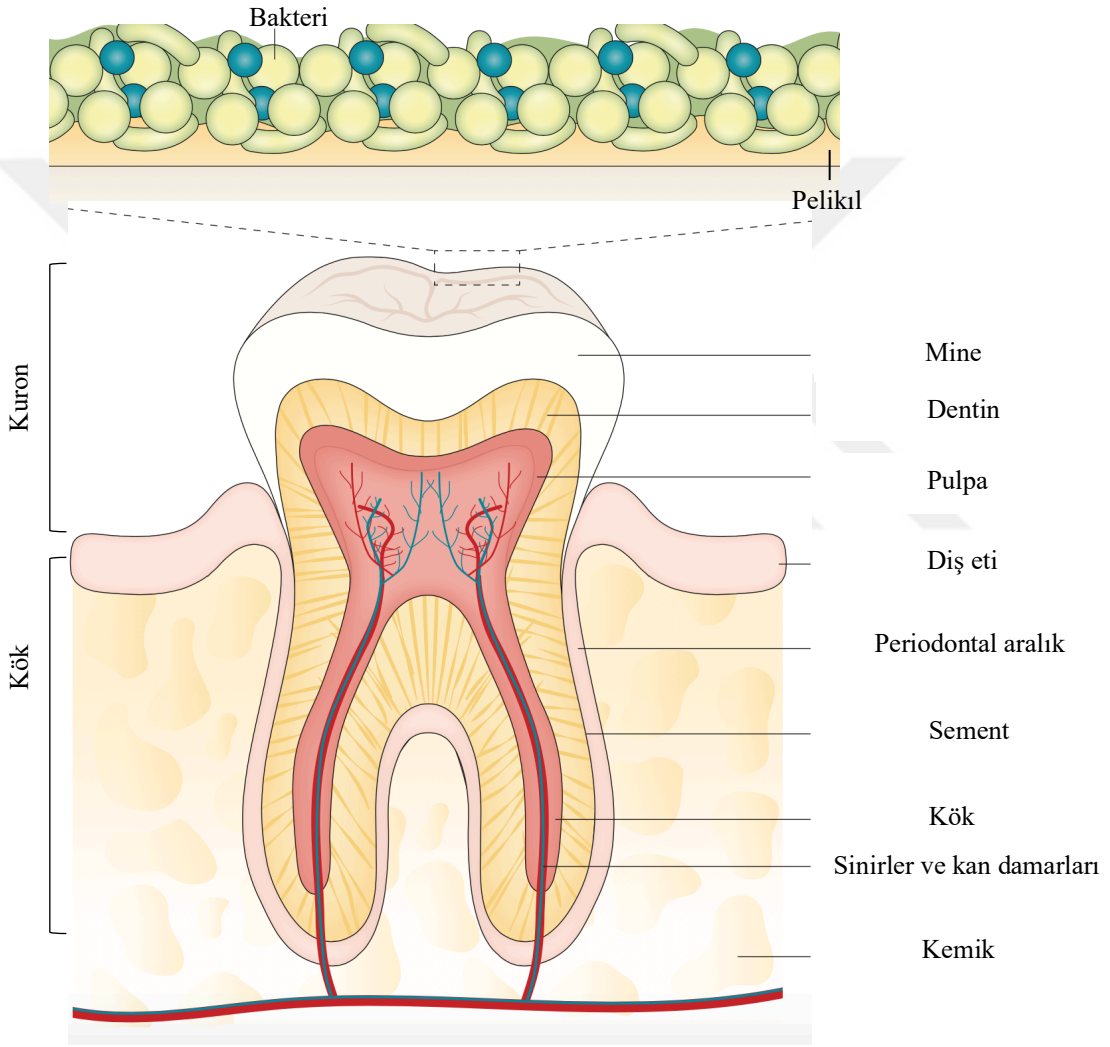
Son yıllarda, diş çürüklerini önlemek için yaygın olarak kullanılan kimyasalların özellikle tükürme refleksi gelişmemiş küçük çocuklarda ve engelli bireylerde yüksek risk oluşturduğu bilinmektedir ve alternatif olarak bitkisel kaynaklı doğal antimikrobiyal bileşiklere dikkat çekilmektedir. Güçlü antiseptik[14] özelliği nedeniyle kekik, geniş spektrumlu antimikrobiyallerden[15,16] olan altın otu ve şeker otu bu amaçla kullanılan aromatik bitkilerden bazılarıdır ve karyojenik bakteriler üzerindeki etkinlikleri hakkında literatür bilgisi oldukça sınırlıdır.

Bu tez çalışmasında karyojenik bakterilerden olan *S. mutans*, *L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* ile oluşturulan biyofilm örneklerine uygulanan *Stevia rebaudiana* (şeker otu), *Thymus praecox* Opiz subsp. *Caucasicus* (Wild. Ex Ronniger) Jalas var. *Caucasicus* (Anzer kekiği), *Helichrysum arenarium* (altın otu) bitkilerinden elde edilerek farklı konsantrasyonlarda hazırlanan solüsyonların antimikrobiyal özellikleri ve bunların süt dişi mine yüzeylerine etkilerinin in vitro olarak araştırılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diş Çürüğü

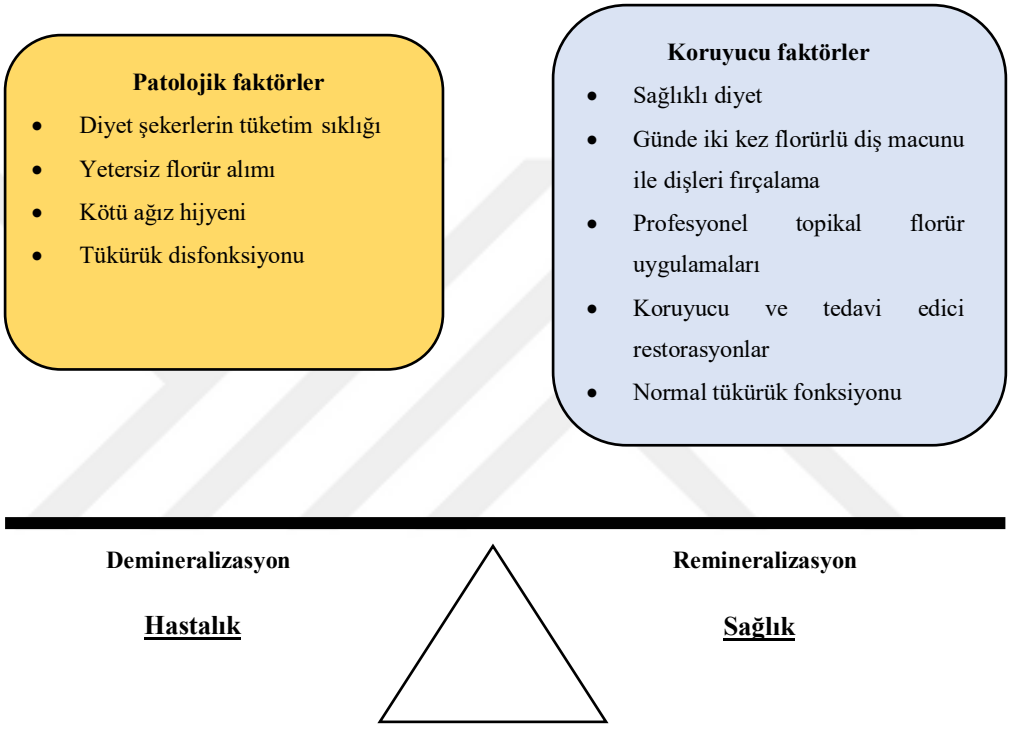
Diş çürüğü; diş yüzeyinde oluşan mikrobiyal biyofilm tabakası (Şekil 2.1), diyet karbonhidratları (çoğunlukla şeker ve daha az oranda nişasta), tükürük ve genetik faktörler arasındaki etkileşimleri içeren, yaygın görülen multifaktöriyel kronik hastalıklardan biridir.[17]



Şekil 2.1. Sağlıklı diş anatomisi ve biyofilm tabakası[18]

Dinamik çürük süreci, hızlı bir şekilde değişen demineralizasyon ve remineralizasyon dönemlerini kapsamaktadır. Yeterli süre içinde gerçekleşen demineralizasyon, dişlerin belirli anatomik bölgelerinde spesifik çürük lezyonlarının

başlamasına neden olmaktadır. Patolojik faktörlerin etkilerinin hafifletilmemesi demineralizasyonu teşvik ederek dinamik dengeyi hastalığın başlaması ve ilerlemesi yönünde değiştirmektedir (Şekil 2.2). Böylece diş sert dokularının aşamalı tahribi gerçekleşerek ağrı, apse ve diş kaybı görülmektedir. Bu süreçte koruyucu faktörlerin optimize edilmesi remineralizasyonu teşvik ederek lezyonun durdurulması yönünde etki etmektedir.



Şekil 2.2. Çürük sürecinde patolojik ve koruyucu faktörler arasındaki denge[19]

2.1.1.Çürük Epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilen diş çürüğünün çocukların % 60-90' ını ve yetişkinlerin büyük çoğunluğunu etkilediği bildirilmiştir.[20] En yaygın kronik çocukluk çağı hastalığı olarak kabul edilen ve prevalansı astımdan beş kat daha fazla olan diş çürüğünün son yıllarda 2-5 yaş arası çocuklarda arttığı görülmektedir.[2,21,22]

Birleşik Devletler' de 2011-2012 yılları arasında yapılan Ulusal Sağlık ve Beslenme Kontrol Araştırması (NHANES) sonuçlarına göre 2-5, 6-8, 9-11, 12-15, 16-19 yaş gruplarındaki çocukların sırasıyla yaklaşık % 23, % 14, % 29 , % 50 ve % 57' sinin diş çürüğüne sahip olduğu tespit edilmiştir.[21] İngiltere' de ise yapılan bir ankette 3 yaş grubundaki çocuklarda % 12 oranında çürük yaygınlığı bildirilmiştir.[23] Okul çağı çocuklarının ağız-diş sağlığı hakkında yapılan araştırmalar oldukça yaygın görülürken, erişimin daha zor olduğu okul öncesi çocuklar hakkında sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır.

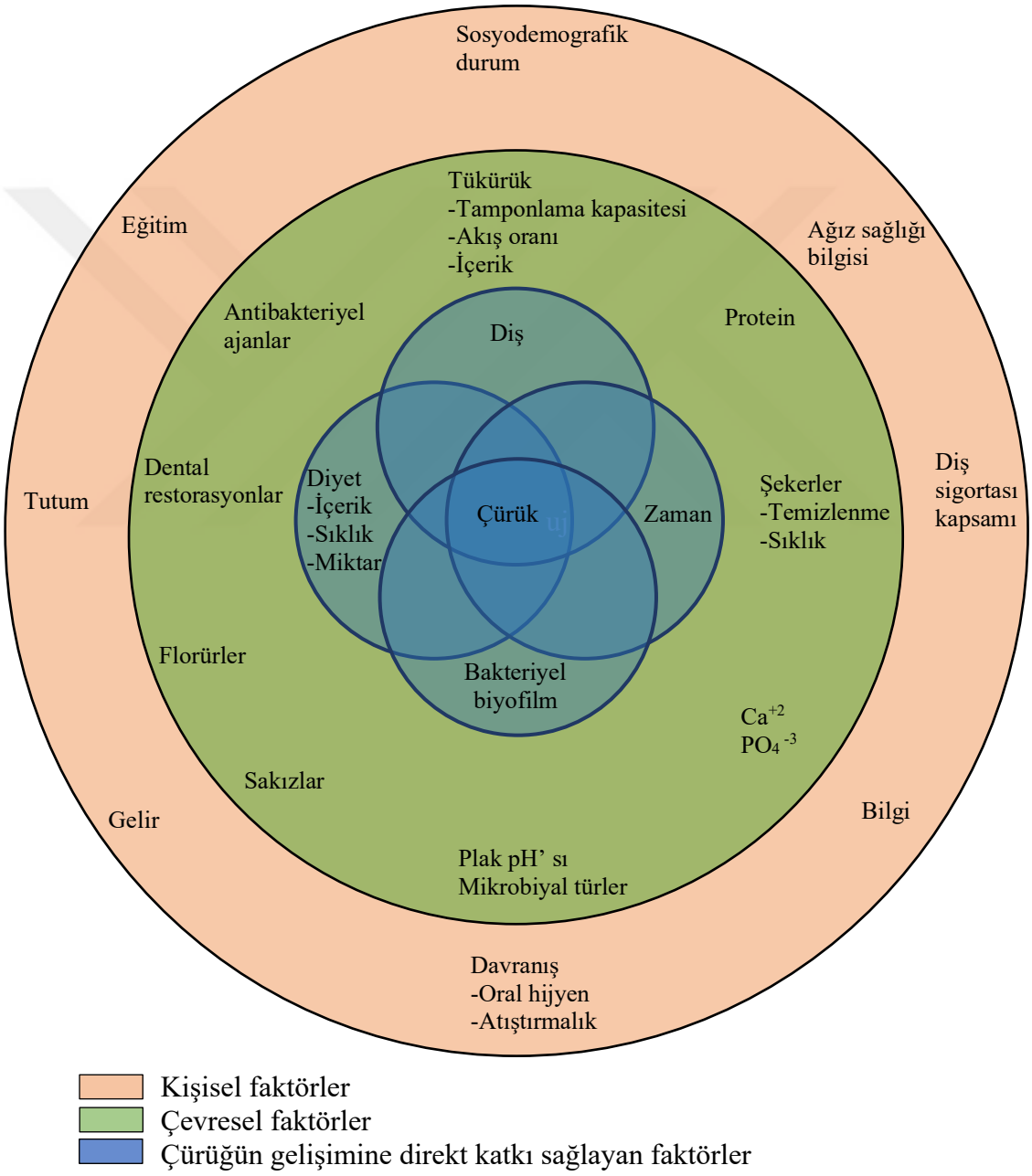
Ülkemizde yapılan bir çalışmada 6 yaş grubu çocuklarda çürüksüz dişlere sahip olanların % 15-17 arasında olduğu tespit edilmiştir.[24] Türkiye İstatistik Kurumu 2016 yılı verilerine göre Türkiye' de 0-6 yaş grubu çocukların son 6 ay içerisinde geçirdiği başlıca hastalık/sağlık sorunlarının % 7.3' ünü, 7-14 yaş aralığındaki çocukların ise % 23.4' ünü ağız ve diş sağlığı sorunları oluşturmaktadır. Kuter[25]' in 2019 yılında yaptığı çalışmada 6 yaşındaki çocuklardaki çürük prevalansının % 86.63 olduğu tespit edilmiştir. Bu oranların DSÖ tarafından belirlenen 6 yaşından küçük çocukların en az % 80' inde çürük ve 12 yaşından küçük çocuklarda ise ortalama 1.5' ten fazla çekilmiş, çürük ya da dolgulu diş bulunmaması şeklindeki hedeflerinin çok uzağında olduğu görülmektedir.[26]

Yapılan çalışmalar ülkemizde çürük riskinin hala yüksek olduğunu ve kapsamlı sağlık reformlarının hayata geçirilmesinin oldukça önem taşıdığını göstermektedir.

2.1.2.Çürük Etiyolojisi

Çeşitli biyolojik ve çevresel faktörlerden etkilenen diş çürüğü karmaşık bir doğaya sahiptir. Çürük riski ise zamanla değişebilen risk faktörleri nedeni ile farklılık göstermektedir (Şekil 2.3). Diş çürüğü için fiziksel ve biyolojik risk faktörleri arasında yetersiz tükürük akışı ve bileşimi, yüksek sayıda karyojenik bakteri, yetersiz florür alımı,

diş eti çekilmesi, immünolojik bileşenler, özel bakım ihtiyacı ve genetik faktörler yer almaktadır.[19,27,28] Ayrıca çürüğün kişinin yaşam tarzı ve alışkanlıkları ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Kötü ağız hijyeni, zayıf beslenme alışkanlıkları, sık sık rafine karbonhidrat tüketimi, şeker içeren oral ilaçların sık kullanımı ve uygun olmayan bebek besleme yöntemleri bireye özgü değişen faktörler arasında yer almaktadır.[19,27,28]



Şekil 2.3 Çürüğün gelişimde etkili olan faktörler[19]

Çürük riskiyle ilgili diğer faktörler arasında yoksulluk, yoksunluk veya sosyal statü, eğitim seviyesi, diş sigortası kapsamı, dental restorasyon varlığı, ortodontik uygulamalar ve kötü tasarlanmış veya uygun olmayan protezler yer almaktadır.[19,27]

Bakıcısı veya kardeşlerinde çürük tespit edilen çocukların çürük riskinin artmış olduğu kabul edilmektedir.[28] Düşük doğum ağırlığı ile diş çürükleri arasında bir bağlantı olduğuna dair kanıtlar kesin olmamasına rağmen, bu tür çocukların diş çürüğü açısından riskli grupta değerlendirilmeleri tavsiye edilmektedir.[19,29]

2.2. Çürük Mikrobiyolojisi

Sağlıklı bir ağız florası, yüzlerce farklı bakteriyel, viral ve fungal tür içeren vücudumuzun en çok kolonize olan kısımlarından biridir.[30] Günümüzde, oral mikrobiyal tür sayısının 700 civarında olduğu tahmin edilmektedir.[31] Temiz bir diş yüzeyini ilk kolonize eden primer bakterilerden olan streptokokların ise 25' ten fazla viridans türü tanımlanmıştır. [32,33]

Streptokokların bakteriyel aderans ve metabolik kapasiteleri epitel, diş yüzeyleri, bademcikler ve dil gibi geniş bir ağız boşluğu alanında kolonize olabilmelerini sağlamaktadır.[33] Ancak altındaki dokuları örten ve koruyan bir yapı olan oral mukoza bakterilere karşı konak yanıtında da aktif olarak rol alması, sürekli mitozlarla yenilenmesi nedeniyle mikroorganizmaların penetrasyonundan korunmaktadır.[34] Dişlerin aproksimal ve gingival yüzeyleri ise çiğneme kuvvetleri, tükürük akışı ve ağız hijyeni gibi faktörlerin koruyuculuklarından uzak kalmaktadır ve yeterince temizlenemeyen yüzeyler bakteriyel gelişim için ideal şartları sağlamaktadır.[35]

Dental plağın asidojenik potansiyeli, plak içerisinde yer alan mikroorganizmaların kompozisyonu ve metabolik aktiviteleri ile yakından ilişkilidir. Plak içerisinde asidojenik

(asit üreten) ve asidürik (asidik çevreyi tolere eden) bakterilerin miktarının fazla olması veya intrasellüler ve ekstrasellüler polisakkarit oluşturma yeteneği olan bakterilerin mevcudiyeti, plağın asidojenik potansiyelini yükseltmektedir.[36,37]

Oral streptokok ve laktobasil gibi karyojenik bakteriler, şekerleri metabolize edip asidojenik ve asidürük özellikleri nedeni ile yaşamlarını devam ettirebilmektedir.[38,39] *S. mutans*' ın çocukluk çürükleri, laktobasillerin derin çürük lezyonları, nispeten yeni bir tür olan *S.wiggsiae*' nin beyaz nokta lezyonları, şiddetli erken çocukluk çağı çürükleri (Ş-EÇÇ) ve derin dentin çürükleri ile ilişki içerisinde bulunması nedeni ile diş çürüğünün önlenebilmesi için bu karyojenik mikroorganizmaların rollerinin anlaşılması gerekmektedir.[40-46]

2.2.1.Streptokoklar

Yuvarlak veya oval şekilli, gram pozitif, katalaz negatif, fakültatif anaerop olarak tanımlanan streptokoklar daha çok anaerobik şartlarda üremektedir. Üremeleri için gereken optimal sıcaklığın 37 °C olduğu bilinmektedir. Hücre bölünmesinin tek bir eksen boyunca gerçekleştiği streptokoklar, büyüdükçe bükülmüş veya bükülmüş görünebilen zincirler oluşturma eğilimindedir. Ağız içerisinde özellikle ağız içi yumuşak dokularda, üst solunum yolunda, yemek borusunda, genitoüriner bölgede ve deride gözlenebilmektedir.[47,48]

Streptokoklar Brown[49] tarafından şu şekilde sınıflandırılmıştır;

- Alfa hemolitik streptokoklar
    - Pnömokoklar
    - Viridans streptokoklar
- Beta hemolitik streptokoklar

- A grup streptokoklar
- B Grup streptokoklar
- C Grup streptokoklar
- D Grup (enterokoklar)
- F Grup streptokoklar
- G Grup streptokoklar
- H Grup streptokoklar

- Non hemolitik streptokoklar

Viridans streptokoklar *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis* (*S. mitis*), *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*), *Streptococcus salivarius* (*S. salivarius*) ve *S. mutans* gruplarından oluşmaktadır.

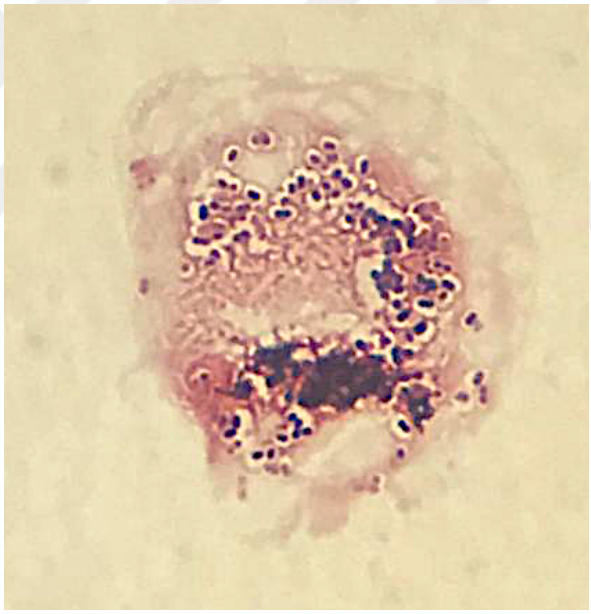
2.2.1.1. *Streptococcus Mutans* (*S. mutans*)

Alfa hemoliz yapan *S. mutans* buzlu cama benzeyen pürüzlü, kabarık ve düzensiz koloniler şeklinde üremektedir (Şekil 2.4). Kanlı agarda beyaz, gri ya da sarı renkte 0.5–2.0 mm çapında koloniler oluşturmaktadır.[50] *S. mutans* suşları, karbonhidrat antijenlerine ve DNA hibridizasyonuna göre *Streptococcus cricetus* (serotip a), *Streptococcus rattus* (serotip b), *Streptococcus mutans* (serotip c, e, f), *Streptococcus sobrinus* (serotip g, h), *Streptococcus downeii* (serotip h), *Streptococcus ferus* (serotip c) ve *Streptococcus macacae* (serotip c) olmak üzere 7 alt gruba ayrılmaktadır.[51]

İnsanlarda meydana gelen diş çürüğünün primer patojeni olarak kabul edilen *S. mutans*, diş çürüğü ile en çok ilişkilendirilen mikroorganizma grubudur. *S. mutans*' ın asidojen, asidürik ve adezyon özellikleri nedeniyle diş çürüğü patojenitesinde rol oynadığı bildirilmiştir.[52-56] Dental plakta bulunan *S. mutans*' ın başarılı bir glikolitik sisteme ve yüksek çekim kuvvetine sahip olduğu, mannitol ve sorbitolü fermante ederek,

ekstrasellüler glukan ürettiği rapor edilmiştir.[47,48] *S. mutans*' ın ekstrasellüler polisakkarit üretmesinin dental biyofilm oluşumu ve karyojenite ile yakından ilgili olduğu bilinmektedir.[47,48] Ayrıca diyetle alınan karbonhidratların uygun olmadığı durumlarda karbonhidrat rezervi gibi davranarak intrasellüler polisakkarit sentezi yapmaktadır. Depo edilen karbonhidratların parçalanması ile meydana gelen organik asitler plak pH' sının düşmesine, düşük plak pH' sının devamlılığı ise minenin demineralizasyonuna neden olmaktadır.[52]

Yapılan araştırmalarda küçük yaşta oral florasında *S. mutans* tespit edilen çocuklarda diş çürüğü gelişiminin daha fazla olduğu gösterilmiştir.[57-59]



Şekil 2.4. *S. mutans* kolonisi

2.2.2. Laktobasiller

Gram pozitif, sporsuz anaerob ya da fakültatif anaerob olan rodlar zincir şeklindedir. Asidofilik ve asidojenik olup laktik asit üretmektedir. Laktobasiller temel olarak iki gruba ayrılmaktadır:

- Homofermentatif özellik gösteren *Lactobacillus casei* (*L. casei)* ve *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus)*, glikozu fermente ederek yan ürün olarak yalnızca laktik asit oluşturmaktadır.

- Heterofermentatif özellik gösteren *Lactobacillus. fermentum* (*L. fermantum*) glikozu fermente ettikten sonra laktik asit ile birlikte asetat, etanol, karbondioksit vb. yan ürünler oluşturmaktadır.[4]

Lactobacillus salivarius, *Lactobacillus oris, Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *L. fermantum*, *Lactobacillus uli* ve *Lactobacillus rimae* ağız boşluğunda en çok rastlanan türlerdir.[4]

Çürüğün başlangıç aşamalarına göre ileri safhalarında aktif rol oynamaktadır.[4] Fırsatçı bir mikroorganizma olup tek başına çürük etkeni değildir.[60] Köhler ve Andreen[58] yaptıkları çalışmada, çok sayıda çürük lezyonu olan genç ve çocuk hastalarda tükürükteki laktobasil sayısının yüksek olduğunu saptamıştır. Başka bir çalışmada çürük, çekilmiş, dolgulu diş sayısı arttıkça ağızdaki laktobasil sayısının da arttığı gösterilmiştir.[61]

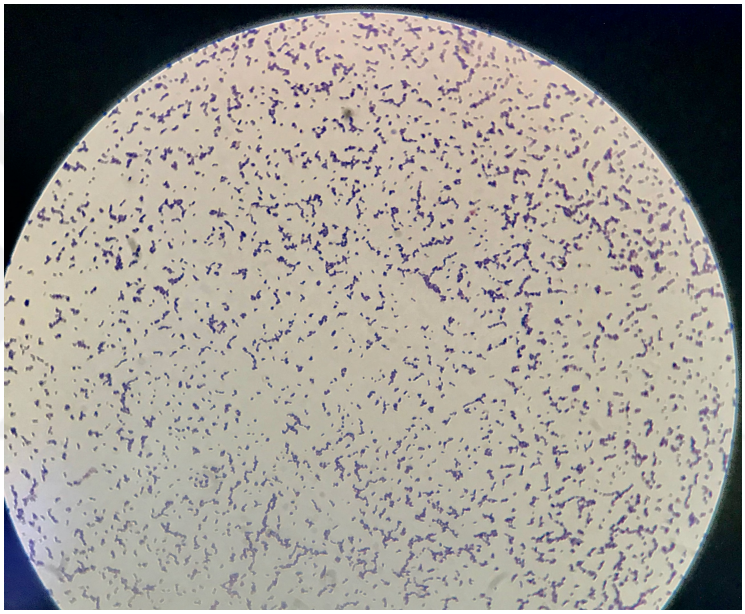
2.2.2.1. *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*)

Diş yüzeyinde kendi başlarına plak oluşturamayan laktobasiller, kolonize olabilmek için başta streptokoklar olmak üzere diğer oral organizmalar tarafından üretilen hücre dışı polisakkarite bağlanmaktadır. Laktobasillerin biyofilm oluşturma kapasitesi *S. mutans* varlığında önemli ölçüde artmaktadır.

Fermente olabilen şekerlerden laktik asit üreten ve yüksek asidik ortamda yaşayabilen *S. mutans* ve *L. acidophilus* genellikle dentin çürüğü ile ilişkili en önemli iki karyojenik bakteri olarak kabul edilmektedir.[62]

2.2.3. *Scardovia Wiggsiae* (*S. wiggsiae*)

Bifidobacteriaceae ailesine mensup *S. wiggsiae* hareketsiz, sporsuz, gram pozitif anaerob bir basildir. Genişliği 0.6-0.7 µm ve uzunluğu ise 1.6-4 µm' dir (Şekil 2.5). Hücreler tekli veya çiftli gruplar halinde sıralanmakta; bazıları kısa zincirler halinde kolonize olmaktadır. Hücrelerin şekli, çevre koşullarına bağlı olarak düz ile hafifçe kavisli form arasında değişebilir. Mezofilik bir bakteri olan *S. wiggsiae* 25-45 °C' de üreyebilir. Hücre rengi kirli beyaz, krem veya gri olabilir.[63]



Şekil 2.5. *S. wiggsiae*' nin mikroskop görüntüsü

S. wiggsiae, glikoz, sükroz ve galaktoz gibi çeşitli şekerleri gaz üretmeden fermente edebilir.[63] Bakteri asidojenik, asidürik ve aside toleranslıdır.[5] *S. wiggsiae* diş, diş etleri, dil ve damak dahil olmak üzere kendi mikrohabitatlarını içeren ağız boşluğunda bulunmaktadır.[64]

EÇÇ çocukluk çağında en sık görülen enfeksiyon hastalıklarından biridir.[5] *S. wiggsiae*' nin EÇÇ için etiyolojik bir faktör olduğu düşünülmektedir[5]. EÇÇ' den sorumlu tutulan bakterinin *S. mutans* olduğuna inanılmaktadır ancak diş çürüğü bulunan çocukların ağzında *S. mutans*' ın yokluğunda *S. wiggsiae*' nin bulunduğu ve EÇÇ için

risk faktörü olduğu gösterilmiştir.[41,49] Ayrıca polimeraz zincir reaksiyonu ile tayin edilen *S. mutans* ve *S. wiggsiae* bakterilerinin, başlangıç beyaz nokta lezyonları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.[43]

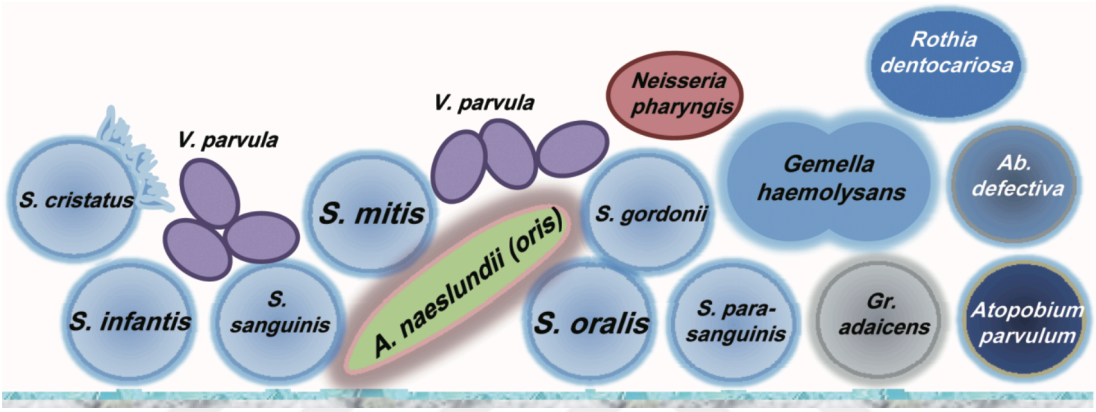
Yukarıda bahsedilen bakterilere ek olarak *Actinomycetaceae*, *Prevotella*, *Clostridium*, *Phorphyromonas*, *Bacteriodes*, *Corynobacterium*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Kingella*, *Veillonella*, *Candida*, *Mycoplasma*, *Simonsiella*, *Stomatococcus* filumlarına ait bakteri ve mantar türlerinin de diş çürüğü ile ilişkili olduğu bilinmektedir.[60]

2.3. Dental Biyofilm

Biyofilm; bir yüzeye bağlı, kendi kendine üreyebilen topluluğun antimikrobiyallere ve konak savunmalarına karşı tolerans kazanmasına yardımcı olan polimerik matrikse gömülü bakteri hücre kümeleri olarak tanımlanmaktadır.[65] Doğal bir biyofilm örneği olan dental plak "dudak, yanak, dil ve tükürük ile mekanik olarak temizlenemeyen, polimerik matriks içerisinde yoğun mikroorganizma barındıran, diş yüzeylerine sıkıca yapışan ve su spreyi ile uzaklaştırılamayan organik yığıntılar" olarak açıklanmaktadır.[66]

Diş sürer sürmez veya fırçalamadan birkaç saniye sonra, diş yüzeyleri proteinlerden ve glikoproteinlerden oluşan bir tabaka ile kaplanmaktadır. Esas olarak tükürük ve diş eti oluğu sıvısından kaynaklı bu yapı pelikıl olarak adlandırılmaktadır.[67] Seçici tükürük bileşenleri olan amilazlar, müsinler, prolin açısından zengin proteinler, histatinler, statinler, lizozimler vb. dahil olmak üzere diş yüzeyinden emilmektedir.[68,69] Bu moleküller diş yüzeylerine yapışarak gelecekteki kolonizörlerin bağlanmasını kolaylaştıran biyoaktif bölgeler sunmaktadır. Bu nedenle, diş yüzeyinde gelişen pelikıl dental plak oluşumunun başlangıcı olarak kabul edilmektedir.[70,71]

Pelikıl oluşumunu takiben, çoğunluğunu streptokokların oluşturduğu çok çeşitli bakteri türleri biyofilme gevşek bir şekilde nüfuz ederek tutunmaya başlamaktadır. Tükürük glikopoteinine bağlanan aralarında *Streptococcus oralis*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis* ve *Streptococcus gordonii*' nin de bulunduğu bakteriler birincil kolonizörler olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca *Actinomyces*, *Veillonella, Gemella*, *Abiotrophia* ve *Granulicatella* türleri sıklıkla tespit edilmektedir[72] (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Tükürük ile kaplı diş yüzeyine ilk tutunan mikroorganizmalar[72]

Bu ilk kolonizörler pelikıldaki konak reseptörleri ile geri dönüşümsüz bağlanabilmek için spesifik ve yüzeylerine sabitlenmiş proteinler (adezinler) taşımaktadır. Bakteriyel adezin ve bakteri/konak reseptör etkileşimi genellikle protein-karbonhidrat (lektin) reaksiyonuna dayanmakta olup sonunda daha kararlı ve biyoçeşitlilik açısından zengin bir yapıya dönüşmektedir. İlk bağlanma ve proliferasyon devam ettikçe yüzey adezinleri veya reseptörleri olan erken kolonizörler etkileşime girmekte ve başlangıçta kolonize olan bakterilere bağlanmaktadır. Daha fazla türün katılımıyla biyofilm bileşimi ve yapısının karmaşıklığı artmaktadır. Biyofilm üzerine dışarıdan gelen yeni bakteriler eklendikçe, ölen bakteriler diğerleri tarafından besin maddesi olarak kullanılmaktadır.

Marsh ve Bradshaw[73] dental biyofilm oluşum sürecini; bakterilerin yapışması, gelişimi, uzaklaşması ve tekrar yapışması olaylarının aynı anda yaşandığı dinamik bir süreç olarak tanımlamıştır. Böylece kalınlaşan biyofilm tabakası, plak adı verilen yapıya dönüşmektedir.[74] Plak halini alan biyofilm topluluğu, herhangi bir zarar görmezse 2-3 hafta içerisinde gelişerek 50-100 μm kalınlığa ulaşmaktadır.[75]

Dental biyofilm gelişiminin evreleri şu şekilde sıralanmaktadır:

- Pelikıl oluşumu,
- Bakterilerin yapışması (0-4 saat),
- Yapışan bakterilerin çoğalması ile farklı mikrokolonilerin oluşması (4-24 saat),
- Mikrobiyal agregasyonla artan tür sayısı ve mikrokolonilerin büyümesi (1-14 gün),
- Plağın olgunlaşması (2 hafta veya daha uzun sürede).[76]

Bazı durumlarda tek bir alanda, 50' den fazla farklı tür bulunabilmektedir. Mikroorganizmaların kendi besin ve interaktif ihtiyaçlarını takiben kolonileşmesi sonucu biyofilmde besin, hava ve pH farklılıkları oluşmaktadır.[77] Bir mikro ekosistem olarak dental plak, farklı mikroorganizmalar için geniş bir yaşam alanı sunmaktadır. Oral floradaki bakterilerin yaşamsal etkinliklerini sürdürebilmek için karşılıklı etkileşim yoluyla yaşama şansları daha yüksektir.[78] Plaktaki bakteriler, hücre dışındaki matriksin desteğiyle, inhibitör ajanlara ve konakçı savunmalara karşı daha dirençli hale gelmektedir.[79,80] Çevresel değişkenler ile hareket eden dental plak, farklı mikrobiyal kompozisyon ve metabolik aktiviteye sahip patojenik biyofilme dönüşerek diş çürüğü gibi oral bulaşıcı hastalıklara neden olmaktadır.

2.4. Dental Biyofilmin Kaldırılmasında Kullanılan Antimikrobiyal Ajanlar

Plak kontrolü, diş ve komşu bölgelerde bulunan mikrobiyal dental plağın düzenli ve etkili bir şekilde uzaklaştırılması ile sağlanmaktadır. Günümüzde plak kontrolünün en etkili yolu, diş fırçası ve arayüz temizlik araçları ile yapılan mekanik temizliktir.[7] Tek başına plağı kaldırmada yetersiz olan antimikrobiyal ajanlar mekanik plak kontrol yöntemlerine yardımcı olmak için kullanılmaktadır. Bu uygulamalar; oral patojenlerin sayısını azaltmaya, dişin direncini, tamir kapasitesini arttırmaya ve sağlıklı diş eti oluşturmaya yönelik olmalıdır.[7,81]

Antimikrobiyal ajanlar patojen plak oluşumunu;

- İçeriğindeki bakteriyel yapıları tamamen ortadan kaldırarak ya da sayılarını azaltarak,
- İntermikrobiyal matriks yapısından sorumlu olan bakteri ve tükürük ürünlerinin meydana gelmesini önleyerek,
- Plağı bulunduğu alanda çözerek,
- Plağın kalsifikasyonuna engel olup geniş retansiyon alanlarının meydana gelmesini engelleyerek,
- Bakterilerin metabolik faaliyetlerini baskılayıp plağın patojenitesini azaltarak inhibe etmektedir.[82]

Plak kontrolünün sağlanmasında kullanılan antimikrobiyal ürünler arasında diş macunları, ağız gargaraları, florürlü vernikler ve jeller, şekersiz sakızlar ve pastiller yer almaktadır. Bu ürünlerin içerisinde bulunan aktif ajanlar ise flor ve flor bileşikleri, KHX, biyoaktif cam, antimikrobiyal peptitler, kazein fosfopeptid amorf kalsiyum fosfat, gümüş ve bileşikleri, triklosan, şeker alkolleri, probiyotikler vb.' dir.[83]

2.4.1. Flor ve Flor Bileşikleri

Günümüzde diş çürüğünü önlemek amacıyla en çok kullanılan materyal olan flor, çürük önleyici etkisini diş minesinin demineralizasyonunu önleyerek ve remineralizasyonunu arttırarak göstermektedir. Pelikıl ve plak oluşumunu önlemesi, plak mikroorganizmalarının asit üretimini inhibe etmesi, minedeki hidroksiapatititin çürüğe karşı daha dirençli bir yapı olan florohidroksiapatite dönüşümünü sağlaması, kalsiyum (Ca) ve fosfor (P) iyonlarının diş yüzeyine çökelmesini hızlandırması ve bakterisit olması gibi özellikleri florun çürük önleyici ve remineralize edici etkisini açıklamaktadır.[84] En sık kullanılan topikal florür ajanları % 2' lik sodyum florür, % 8' lik kalay florür ve % 1.23' lük asidüle fosfat florür içeren jel sistemleridir.

Diş çürüğünden korunmada hala en etkili ajan olan florür kullanımının güvenilirliği ile ilgili son yıllarda giderek artan tartışmalar gündeme gelmektedir.[85,86] Bu nedenle topikal florür uygulamaları dışında farklı materyallere yönelik çalışmalar hız kazanmıştır.[7]

2.4.2. Klorheksidin (KHX)

Hidrofilik ve hidrofobik özellikte bir bisguanid olan KHX, hidrofobik kısmı ile bakterinin membran geçirgenliğini etkileyip membran fonksiyonunu bozarak; hidrofilik kısmı ile ağız mukozası, mikroorganizma ve pelikıl üzerindeki fosfat, karboksil ve sülfat gibi negatif yüklü gruplara bağlanarak etki göstermektedir.[87] KHX' i diğer antiseptiklerden ayıran en önemli özelliği, ağız boşluğundaki yüzeylere kuvvetli şekilde bağlanması ve yavaş salınımla etkisini sürdürmesidir. Bu şekilde antiseptik etkinliği artmaktadır.[88]

KHX yüksek konsantrasyonda bakterisit, daha düşük konsantrasyonlarda bakteriyostatik etki göstermektedir.[87] Gram pozitif bakterilerin gram negatif

bakterilerden daha duyarlı olduğu KHX; bakteri sporları, lipofilik virüsler, mayalar ve dermatofitlere de etki etmektedir.[89,90]

KHX' in antikaryojenik etkisi, flor ile birlikte kullanıldığı durumların aksine oldukça düşüktür.[91] *S. mutans* prevalansını ve dental plak miktarını azaltabilir ancak diş çürüğü insidansını azaltma olasılığı düşüktür.[92] Yapılan bir çalışmada diş yüzeyine uygulanan KHX verniklerinin diş çürüğü gelişimini azalttığına dair güçlü bir kanıt tespit edilememiştir.[93]

KHX kullanımı sonrası dişlerde, restorasyonlarda, protezlerde renklenme, ağız mukozasında ağrı ve döküntü, acı tat ve tat algılamada bozulma oldukça sık rastlanan lokal yan etkilerdir.[94] Ayrıca sitolojik incelemelerde KHX' in düşük dozlarda epitel hücreleri, gingival fibroblastlar, nötrofiller, makrofajlar, kırmızı kan hücrelerine karşı toksik etki gösterdiği ve insan periodontal ligament hücrelerinin protein sentezini inhibe ettiği açığa çıkmıştır.[95,96]

2.4.3. Ksilitol

Şeker alkolleri glukan sentezini inhibe ederek, tükürük ve plaktaki mikroorganizma sayısını azaltarak, dental plağın pH' sını artırarak, demineralizasyonu engelleyerek ve remineralizasyonu destekleyerek çürük gelişimini engellemektedir.

Üzerinde en çok çalışılan şeker alkolü ksilitoldür. Tadı sükroza benzeyen ve beş karbon zincirine sahip ksilitol, oral kavitedeki mikroorganizmalar ve patojenler tarafından fermente edilemez yalnızca bağırsaklardan metabolize edilebilir.[97] Yapılan çalışmalarda bakteriyostatik etkinlik gösteren ksilitolün tükürük ve plaktaki *S. mutans* seviyesini, anne bebek arasındaki mikroorganizma transferi olasılığını ve çürük miktarını düşürdüğü gösterilmiştir.[98-100].

2.4.4. Probiyotikler

Yeterli miktarda alındığı zaman konak üzerinde sağlığa yararlı etkiler sağlayan yaşayan mikroorganizmalar olarak tanımlanan probiyotikler, konak canlıyı patojenlere karşı koruyarak ve immün sistemi güçlendirerek etki göstermektedir.

Probiyotik bakterilerin patojen mikroorganizmalara organik asit, hidrojen peroksit, karbon peroksit, diasetil, bakteriosin ve adezyon inbitörleri gibi antimikrobiyal maddeleri üreterek, iyi adezyon özellikleri sayesinde oral patojenler ile ağız içi rekabet halinde bulunarak, var olan mikrobiyal ekosistemin dengesini bozmadan potansiyel patojen bakterilerle zararsız bakterilerin yer değiştirmesini sağlayıp konakçı hücrenin zarar görmesini engelleyerek etki gösterdikleri bildirilmiştir.[83]

2.5. Tez Çalışmasında Kullanılan Tıbbi Aromatik Bitkiler

2.5.1. *Stevia rebaudiana* (Şeker otu)

Çok yıllık bir bitki olan şeker otu doğal olarak verimli topraklarda 65-100 cm yüksekliğe kadar büyümektedir.[101] Kökler, zayıf ve yarı odunsu; yapraklar sapsız, zıt düzenlenmiş, mızrak şeklinde ve tırtıklıdır (Şekil 2.7). Çiçekler küçük, beyaz ve düzensiz bir şekilde sıralanmıştır. Şeker otu, 21–43 °C sıcaklık aralığına sahip Savan (Subtropikal) ikliminde, 6.5-7.5 toprak pH' sına sahip yarı nemli topraklarda iyi yetişmektedir.[102,103] *Asteraceae* familyasından olan şeker otu cinsi yaklaşık 200 tür bitki ve çalı içermektedir.

Tatlandırma potansiyeli olan ailenin en yaygın türleri *Stevia dianthoidea*, *Stevia phlebophylla, Stevia ani-sostemma, Stevia bertholdii, Stevia crenata, Stevia enigmatica, Stevia eupatoria, Stevia lemmonii, Stevia micrantha, Stevia plummerae, Stevia rebaudiana, Stevia salicifolia, Stevia serrata* ve *Stevia viscida*' dır, fakat bunlar arasında şeker otunun tatlandırma kapasitesinin en yüksek olduğu bildirilmiştir.[104]

Şeker otu şekerden daha tatlı (150-300 kat) olan steviol glikozitler olarak bilinen sıfır kalorili bir tatlandırıcı madde ile ent-kauren, diterpen glikozitleri barındırmaktadır.[105-107] Şeker otu yaprakları steviosit, rebaudiosit A, B, C, D, E ve dulkosit-A glikozitleri, flavonoidler, alkaloidler, uçucu yağlar, suda çözünür klorofil, ksantofil ve hidroksinamik asit içermektedir.[102,107,108] Şeker otu yaprakları ayrıca iyi miktarda protein, 9 esansiyel amino asit (glutamik asit, aspartik asit, lizin, serin, alanin, prolin, tirozin, izolösin, metiyonin), lipitler, vitaminler (Riboflavin, β-karoten, Askorbik asit, Niasin vb.) ve mineraller (krom, magnezyum, manganez, fosfor, potasyum, selenyum, çinko) ihtiva etmektedir.[109,110]

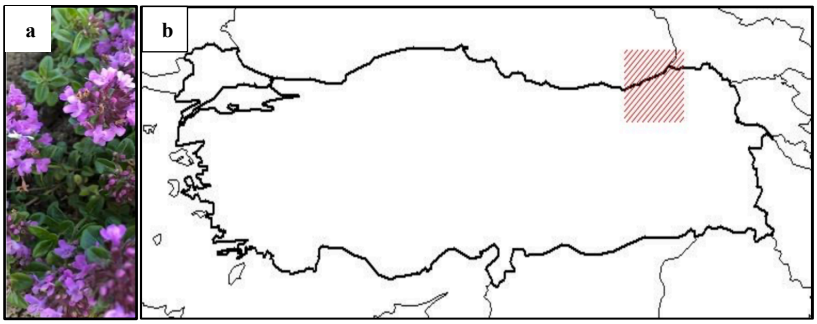
Antihiperlipidemik, antihipertansif, antimikrobiyal, antioksidan, antikanser, antienflamatuar ve immün sistemi modüle etme gibi özelliklere sahip olan şeker otu türlerinin tüm dünyada yüksek tıbbi değer ve ticari önemi bulunmaktadır.[16]

Şekil 2.7. Şeker otu bitkisi[111]

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi kütle spektrometresi ile yapılan analizlerde kurutulmuş şeker otu bitkisinin terpenoidler, stigmasterol, β-sitosterol, kampesterol gibi çeşitli flavonoidler ve polifenolik bileşikleri içerdiği gösterilmiştir.[112-114] Ayrıca önemli bir ikincil metabolit olan steviositin, *Staphylococcus aureus*, *S.mutans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichiacoli* ve *Sclerotinia* gibi bakterilere; *Curvularia lunata* gibi mantar suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.[112,113] Çeşitli bakterilerin büyümesini ve gelişmesini geciktiren şeker otu türlerinin diş eti enfeksiyonları ve diş çürüğü gibi bakteriyel hastalıkları azaltabileceği, diş macunu ve ağız gargarası gibi ağız bakım ürünleri için faydalı olabileceği belirtilmiştir.[115]

2.5.2. *Thymus praecox* Opiz subsp. *Caucasicus* (Wild. Ex Ronniger) Jalas var. *Caucasicus* (Anzer Kekiği)

Ülkemizde yetişen 41 kekik (*Lamicae* ailesine mensup) türü içerisinden 24' ü endemik özellik göstermektedir.[14] Küçük yapraklı, 15–20 cm boyunda, çok aromatik pembemsi-beyaz, mor çiçekleri olan çok yıllık bir bitkidir[14,116] (Şekil 2.8a). Bu çalışmada kullanılan tür, Türkiye' de Doğu Karadeniz Bölgesi' ndeki Rize iline ait Anzer platosundan adını almıştır (Şekil 2.8b).



Şekil 2.8a. Anzer kekiği[44], **b.** Anzer kekiğinin yetiştiği bölge[116]

Timol, karvakrol ve aromatik olmayan terpenler kekik türlerine antimikrobiyal özellik kazandırmaktadır.[14,117] Tüm kekik türleri güçlü bir antiseptik olan uçucu yağ bakımından zengindir.[14,117] Uçucu yağının kimyasal yapısı Gaz Kromatografisi-Kütle

Spektropisi ile incelen Anzer kekiğinin timol, γ-terpen, *p*-simen, terpinil asetat ve karvakrol gibi antimikrobiyal komponentleri içerdiği tespit edilmiştir.[14]

Kekik türlerinin aroması çeşitlilik gösterse de çoğunluğu yiyeceklerin tatlandırılmasında kullanılabilir. Aromatik özellik gösteren kekik bitkisinin sakinleştirici, idrar ve balgam söktürücü, spazmları azaltıcı ve sindirimi iyileştirici etkisi bulunmaktadır. Kurutulmuş çiçek ve yaprakları bitkisel çaylarda mide ve bağırsak bozukluklarını veya ateş ve grip semptomlarını tedavi etmek için kullanılmaktadır.[118] Geleneksel tıpta oldukça yaygın ve uzun yıllardır kullanılan kekik bitkisinin gaz giderici, antispazmodik, öksürük kesici, balgam söktürücü, sekretomotor, antibakteriyel ve kanama durdurucu özelliklere sahip olduğu belirtilmektedir.[119] *Tymus vulgaris*' in gram negatiflere kıyasla gram pozitif bakteriler üzerinde daha belirgin bakteriostatik ve fungostatik etki gösterdiği saptanmıştır.[119]

Diş hekimliğinde de oldukça yaygın kullanım alanına sahip kekik ile ilgili oldukça fazla çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada kekik türlerinin *S. mutans* ve *L. acidophilus*' un da içinde bulunduğu sekiz bakteriye karşı antimikrobiyal etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.[120] Kekik bitkisinden elde edilen yağın *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), *S. mutans*, *Candida albicans* (*C. albicans*), *Actinomyces actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) ve *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)' in klinik örnekleri üzerinde güçlü antimikrobiyal aktivite sergilediği sonucuna varılmıştır.[121]

2.5.3. *Helichrysum arenarium* (Altın otu)

Asteraceae familyasına ait olan *Helichrysum arenarium* (Altın otu) çok yıllık otsu bir bitkidir (Şekil 2.9). Halk arasında altın otu, sonsuza dek süren, ölümsüz çiçek veya solmaz çiçek olarak bilinmektedir. Dünyada 600' ün üzerinde, Türkiye florasında 9' u

endemik olan 18 türü bulunmaktadır. Geniş coğrafyada kumlu ve yarı sert topraklarda yetişen altın otu, 90 cm yüksekliğinde çok yıllık bir bitkidir.[122-125]

Altın otu çiçeği flavonoidler, uçucu yağlar, yağ asitleri, karotenoidler, steroidler, acı maddeler, polifenoller, vitaminler, mineral tuzları, polisakkaritler, glikozitler, kumarinler, kateşinler ve proantosiyanidinler de dahil olmak üzere fenolik bileşikler bakımından zengindir. Ayrıca astragalin, luteolin, kaempferol vb. bileşenleri de içermektedir.[123,126]

Şekil 2.9. Altın otu[127]

Altın otu çiçeği özellikle antibakteriyel, antiviral, antifungal, antienflamatuar, antiproliferatif, antimikrobiyal, antialerjik, antioksidan, antiradikal, antikolinerjik, hepatoprotektif ve detoksifikasyon aktiviteleri de dahil olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahiptir.[15,123,128,129]

Geleneksel tıpta solunum, sindirim ve üro-genital sistem hastalıkları, karaciğer, safra, mide, eklem ve cilt enfeksiyonları ile böbrek taşı gibi rahatsızlıkları tedavi etmek için kullanılmıştır.[130]

2.6. Ekstraksiyon Yöntemleri

Bitkiler, kendi türlerine özgü biyoaktif moleküller barındırmaktadır. Bu biyoaktif moleküllerin ortaya çıkarılabilmesi için özüt elde etme (ekstraksiyon) yöntemleri geliştirilmiştir.[131]

2.6.1. Soxhlet Ekstraksiyon Yöntemi

Katı veya yarı-katı numuneler için uygun olan bu yöntemde örnek, örnek bölmesine, solvent (çözücü) de çözücü bölmesine yerleştirilmektedir. Çözücü kaynama sıcaklığının üzerinde ısıtılmakta, yoğunlaştırıcıda yoğunlaşan çözücü örneğin üzerine damlayarak cihazdaki örneği ıslatmaktadır. Örneğin yerleştirildiği bölmeyi dolduran çözücü belli bir seviyeye ulaştığında, tüm örnek bölmesini boşaltarak çözücü bölmesine geri damlamaya başlamaktadır. Böylece sıcak çözücü birkaç kez örnek içerisinde devir daim yapmaktadır. Ekstrakt çözücü şişesinin altında kalırken, yalnızca temiz çözücünün buharlaşması sebebi ile her döngüde taze çözücü kullanılmaktadır. Bu sistemle ekstraksiyon zamanı 6 ile 24 saat arasında değişmektedir. Bu yöntemde 100-500 ml arasında büyük sayılabilecek hacimde çözücü gereklidir. Soxhlet ekstraksiyonu, esas olarak örneklerden organik bileşiklerin ekstrakte edilmesinde kullanılmaktadır.[132]

2.6.2. Ultrasonik Ekstraksiyon Yöntemi

Hem katı hem de sıvı örnekler için kullanılan ultrasonik ekstraksiyon yönteminde örneğe 20 kHz üzerindeki frekanslarla akustik titreşimler uygulanmaktadır. Sıvının içinden geçen bu titreşimler kavitasyon (boşluk) oluşturmaktadır. Bu sayede sıvı ortamda çok sayıda ufak kabarcıklar meydana gelerek katı örneklerin partiküllerinin kopmasını sağlamaktadır.[133]

Örnek, ultrasonik su banyosuna yerleştirilmiş bir ekstraksiyon hücresi içerisine konulmaktadır. Bu yöntem taze ekstraksiyon çözücüsünün sürekli olarak örneğe

pompalandığı, açık bir sistem şeklinde veya ekstraktın seyrelmesini engelleyen ve çözücünün yeniden dolaştığı kapalı bir sistem olarak da kullanılabilmektedir.[134] Pahalı olmaması, ısıya duyarlı bileşiklerin ekstrakte edilebilir olması, ekstraksiyon kinetiğinin hızlı ve basit olması bu metodun avantajları olarak belirtilmektedir.[131]

2.6.3. Mikrodalga Ekstraksiyon Yöntemi

Doğal ürünlerde 2500-75000 MHz' de ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir. Bu enerjinin etkinliği çözücü ve bitkinin içerikleri ile elektromanyetik dalga gücüne bağlı olarak değişmektedir.[135]

Mikrodalga ışıması, ekstraksiyon çözücüsünü ve örneği ısıtmak için kullanılmaktadır. Daha kısa zamanda ve daha az çözücü kullanılarak yapılan bu ekstraksiyonu sorunsuz bir şekilde gerçekleştirmek için çözücü seçimi oldukça önemlidir. Çözücünün mikrodalga ışımasını absorbe etmesi, çözücünün örnekle etkileşimi ve örneğin çözücü içerisindeki çözünürlüğü dikkat edilmesi gereken hususlardır.[136] Ayrıca ekstraksiyon sonunda elde edilen solüsyonun filtreleme gerektirmesi ve uçucu bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılamaması gibi dezavantajları bulunmaktadır.[131]

2.6.4. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyon Yöntemi

Katı ve sıvı örnekler için kullanılan, 50-200 °C sıcaklık ve 10-15 Mpa basınç aralıklarında gerçekleştirilen bir ekstraksiyon tekniğidir. Basınç, sıvının ekstraksiyon hücresinde bulunan örneklerle güçlü bir şekilde etkileşime girmesine olanak sağlamaktadır. Bu nedenle örneğin bulunduğu ortam sızdırmaz yüksek basınca, çözücülerin bulunduğu ortam ise yüksek sıcaklıklara dayanabilen özelliklere sahip olmalıdır. [137]

2.6.5. Süperkritik Ektraksiyon Yöntemi

Süperkritik akışkan, kendi kritik sıcaklığı üzerinde ısıtılan ve kendi kritik basıncı üzerinde basınç uygulanan bir element, madde veya karışıma verilen isimdir. Tek bir faz halinde bulunan bu akışkanın basınç veya sıcaklığın artmasıyla sıvılaştırılması veya buharlaştırılması mümkün olmamaktadır.[138] Akışkan karbondioksit ile katı matriks, seçilen süperkritik şartlarda etkileşime girmektedir. Kütle transferi, çözünenin desorpsiyonu ile süperkritik akışkanın adsorpsiyonunu içermektedir.[139]

2.7. Antimikrobiyal Testler

Bir antimikrobiyal ajanın belli bir bakteri türüne karşı in vitro etkinliğini saptamak amacıyla uygulanan tarama ve değerlendirme yöntemleridir.

2.7.1. Difüzyon Testleri

Bir ekstraktın veya saf bir bileşiğin in vitro şartlarda antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek veya taramak için kullanılan testlerdir. Agar disk-difüzyon testi, antimikrobiyal gradyan testi (E test) ve diğer difüzyon yöntemleri (agar kuyucuk yöntemi, agar dolgu yöntemi, çapraz çizgi yöntemi, zehirli gıda yöntemi)[140] gibi yöntemler bu grupta yer almaktadır.

2.7.1.1. Agar Kuyucuk Yöntemi

Agar kuyucuk difüzyon yöntemi, bitkilerin veya çeşitli ajanlardan elde edilen ekstraktların antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Önceden petrilere hazırlanan agar yüzeyine bir miktar mikrobiyal inokülum yayılarak inoküle edilmektedir. Steril bir cam boru veya uç yardımıyla 6 ile 8 mm çapında delikler açılmaktadır. İstenen konsantrasyonda antimikrobiyal ajan veya ekstrakt çözeltisinden belli bir hacimde (20-100 µl) kuyucuğa verilmektedir. Daha sonra agar plakaları, test mikroorganizmasına bağlı olarak uygun koşullar altında inkübe

edilmektedir. Antimikrobiyal ajan, agar ortamında yayılarak test edilen mikrobiyal suşun büyümesini engellemektedir.[141]

2.7.2. İnce Tabakalı Kromatografi (TLC)–Biyootografi

TLC–biyootografi yöntemi, özellikle bitkilerden elde edilen organik ekstraktların, antibakteriyel ve antifungal aktivite açısından değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Agar difüzyon, direkt biyootografi ve agar biyoanaliz kaplama metotlarını kapsamaktadır.[140]

2.7.3. Dilüsyon Yöntemleri

Dilüsyon yöntemleri, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerinin belirlenmesi için en uygun tekniklerdir. Bu sebeple test edilen antimikrobiyal ajanın agar (katı besiyeri) veya broth (sıvı besiyeri) ortamında (makrodilüsyon veya mikrodilüsyon) seyreltilerek konsantrasyonunu tahmin etme imkânı sunmaktadır. Üremenin olmadığı en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonu MİK olarak kabul edilmektedir.[142] Minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) ise mikroorganizmayı öldüren en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır.[142] Katı ve sıvı besiyeri dilüsyon metotlarından oluşmaktadır.

2.7.3.1. Sıvı Besiyeri Dilüsyon Yöntemi

Sıvı besiyeri mikro veya makro dilüsyon yöntemi en temel antimikrobiyal duyarlılık testlerinden biridir. Prosedür, sıvı besiyerinin en az 2 ml (makrodilüsyon) hacimli tüpler veya daha küçük hacimli (mikrodilüsyon) 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakları kullanılarak dağıtılmasının ardından antimikrobiyal ajanın (örn. 1, 2, 4, 8, 16 ve 32 µg/ml) iki kat seyreltilmesini içermektedir. Daha sonra her tüp veya kuyucuk, 0.5 McFarland ölçeğine ayarlanan standart mikrobiyal süspansiyon seyreltilerek inoküle edilmektedir. Aşılanan tüpler veya 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakası, test

mikroorganizmasına bağlı olarak uygun koşullar altında (çoğunlukla çalkalama olmaksızın) inkübe edilmektedir. [142]

İnkübasyon süresinin bitiminde kuyucuk ve test tüplerinin çıplak gözle incelenmesi sonucu bulanıklığın olmadığı en son konsantrasyon MİK değerini göstermektedir.

2.7.4. Zaman Öldürme Testi (Zaman Öldürme Eğrisi)

Zaman öldürme testi, bakterisidal veya fungisidal etkiyi belirlemek için en uygun yöntemdir. Antimikrobiyal ajan ile mikrobiyal suş arasındaki dinamik etkileşim hakkında bilgi elde etmek için güçlü bir araçtır. Zaman öldürme testi, zamana bağlı veya konsantrasyona bağlı bir antimikrobiyal etki ortaya koymaktadır.[140]

2.7.5. ATP Biyoluminesans Analizi

ATP biyolüminesans testi, bakteri veya mantarlar tarafından üretilen adenozin trifosfatı (ATP) ölçme kapasitesine dayanmaktadır. ATP, tüm canlı hücrelerin kimyasal enerji formu olduğundan, her hücrede sabit miktarda bulunmaktadır. Bu nedenle, örneklerdeki mikrobiyal popülasyonun miktarını tahmin etmek için kullanılmaktadır.[140]

2.7.6. Akışlı Hücre Sayım Yöntemi

Hasarlı hücrelerin hızlı tespiti, uygun boyaların boyanmasına bağlıdır. Bu yöntem ile parçalanmış hücrelerin yanı sıra üç alt popülasyon (ölü, canlı ve yaralı hücreler) açıkça ayırt edilebilmektedir. Akışlı hücre sayım yöntemi, antimikrobiyal direncin saptanmasına izin verirken test edilen molekülün ve mikroorganizmanın canlılığı ile hücre hasarı üzerindeki olası etkilerinin tahminine dayalıdır.[140]

2.8. Görüntüleme Teknikleri

2.8.1. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM)

Özellikle biyoloji ve patoloji bölümlerinde geniş kullanım alanı bulan Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) nondesktrüktif bir mikroskobik görüntüleme tekniğidir.[143] CLSM aracılığı ile örneklerin incelenebilmesi için çeşitli floresans boyalar kullanılmaktadır. Yöntemin uygulanması sırasında aydınlatma, odaklanmış bir lazer kaynağından elde edilmekte ve taramalar örnek üzerinde çizgiler halinde yapılmaktadır.[143-145] Taranan örnekler x, y, z düzlemlerinde tabakalar halinde bir araya getirilerek yüksek çözünürlükte üç boyutlu görüntüler elde edilebilmektedir.[144]

SEM görüntüleme tekniğinin aksine CLSM' de doğal nemlerinde olan dişler ile çalışmak mümkündür. Ayrıca bu tekniğin bir diğer avantajı da örnek yüzeylerindeki düzensizliklerin göz ardı edilebilmesidir. Örneklerin hassas kesim cihazları ile ince kesitler halinde hazırlanması ve kurutulması gibi uygulamaların olmaması hata oluşumunu engellemektedir.[144] Buna karşın örnek hazırlama prosedürünün zaman alması, maliyetinin yüksek oluşu ve kullanımının uzmanlık gerektirmesinin yanısıra örnek yüzeyinin topografik özelliklerinin incelenememesi gibi dezavantajlara sahiptir.[144]

2.8.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Çok küçük bir alana odaklanan yüksek enerjili elektronlar ile yüzeyin taranması prensibine göre çalışmaktadır. Yüzeyden yayılan ikincil elektronlarla yapılan ölçüm, özellikle yüzeyin topoğrafik yapısıyla ilişkili bir görüntü oluşturmaktadır. SEM' de görüntü;

1. Yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların örnek üzerine odaklanması,

2. Elektron demetinin örnek yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve örneğe ait atomlar arasında oluşan etkileşimin uygun algılayıcılarda toplanması,

3. Sinyal güçlendiricilerden geçirildikten sonra katot ışınları tüpünün ekrana, günümüzde ise dijital sinyallere çevrilip monitöre aktarılması ile elde edilmektedir.[146]

Geleneksel SEM incelemesi için örnekler iletken olmalıdır. Bu nedenle metalik olmayan örneklerin kurutulduktan sonra, vakumlu ortamda kaplanmaları gereklidir. Argon gazı varlığında yapılan kaplama işleminde kaplama materyali olarak genellikle altın kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra platin, osmiyum, iridyum, tungsten, krom, grafit gibi metaller de kullanılabilmektedir. Örnekler statik elektrik şarjını önleyecek kadar iletken olsalar bile çözümlemeyi arttırmak ve sinyalleri kuvvetlendirmek için kaplanmaları tavsiye edilmektedir.[147,148]

Diğer mikroskoplara göre odak derinliği daha fazla olan SEM' in ayrım gücü 0.05 nanometereye kadar inmiştir. Büyütme miktarı ise X5-X300000 arasında değişmektedir.[149] Böylece incelenen numunelerin yüzey özellikleri daha kesin ve ayrıntılı olarak görüntülenebilmektedir. SEM ile yapılan yüzey analizinin çürük benzeri lezyonların değerlendirilmesinde güçlü bir metot olduğu bildirilmiştir.[147,150,151]

2.8.3. Enerji Dağılım Spektroskopisi (EDS)

Örnek üzerine X ışını gönderilmesini sağlayan EDS, geri emilen X ışınlarının karakteristiğini ölçerek nicel olarak element analizi yapan bir yöntemdir.[152,153] EDS, genellikle mühendislik, kimya alanlarında kullanılmasına rağmen, diş hekimliği alanında da birçok çalışmada yer almaktadır.[154-156]

Bu yöntem ile örnek yüzeyine temas etmeden katı, toz, sıvı formda ve farklı türde materyal ölçümleri yapılabilmektedir. EDS çalışmalarında, kalsiyum (Ca) ve fosfor (P)

yüzdeleri ile birlikte flor (F) ve diğer elementleri içeren ajanların mine üzerine etkisi de ölçülebilmektedir.[152,153]

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 16.01.2020 tarih 2020/10 sayılı karar ile bilimsel ve etik açıdan uygun bulundu. Etik kurul onayı alındıktan sonra, çalışmanın deney aşaması Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Ana Bilim Dalı, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü ile Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1. Güç Analizi ve Örnek Sayılarının Belirlenmesi

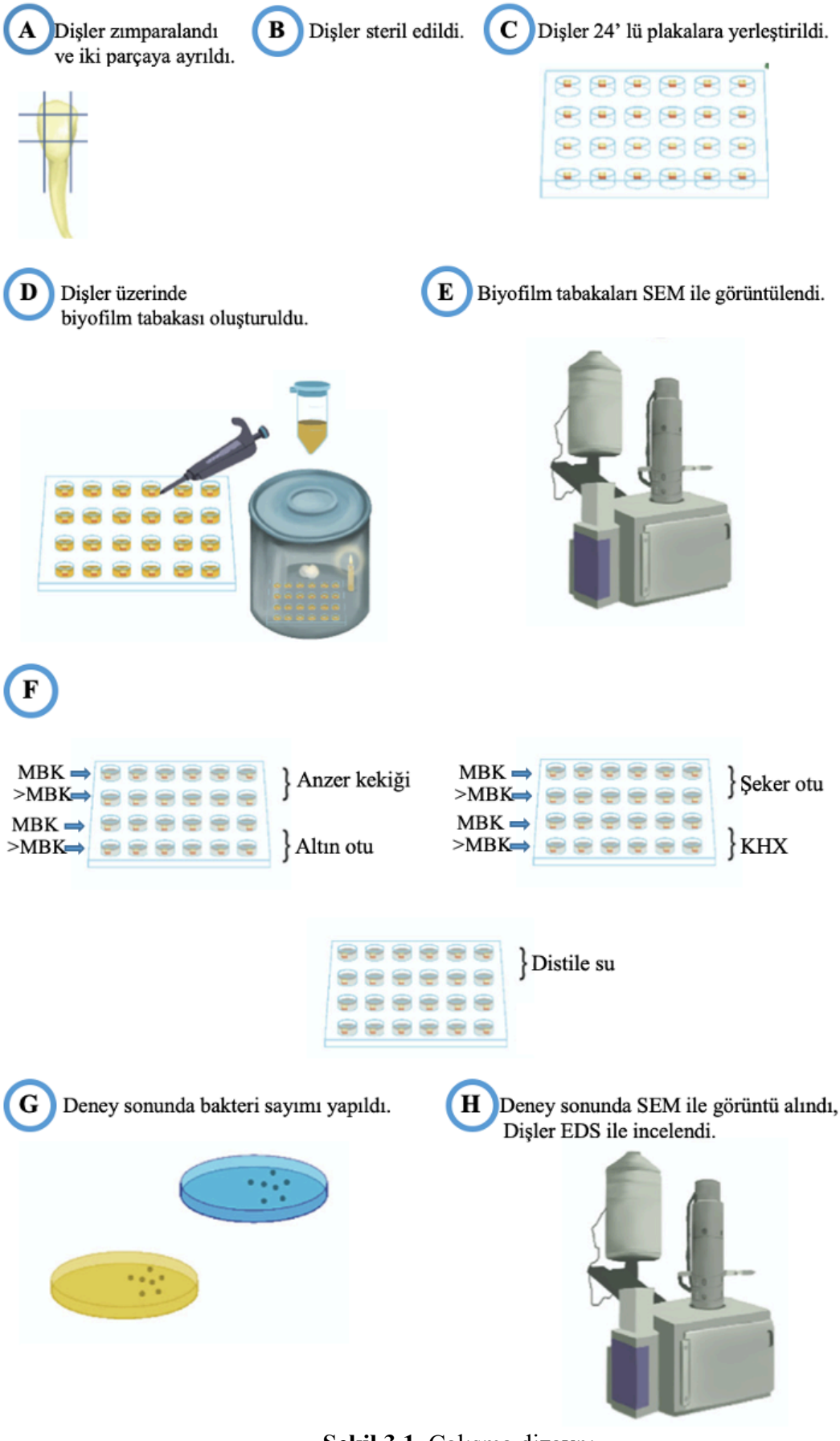
Tez çalışmasına başlamadan önce güç analizi yapıldı. Örneklem büyüklüğü % 95 güven, % 97.2 test gücü ve f=1.205 etki büyüklüğünde hesaplanarak her grupta en az 4 örnek incelenmesi gerektiği saptandı.[157] Buna göre, deney öncesi biyofilm oluşturulduktan sonra rastgelen seçilen bir örneğin SEM ve EDS ile incelenmesi planlandığı için her grupta 5 adet olmak üzere toplam 150 adet örnek kullanılmasına karar verildi.

3.2. Deney Grupları ve Çalışma Dizaynı

Aşağıda deney grupları (Tablo 3.1) ve çalışma dizaynı (Şekil 3.1) gösterilmektedir

Tablo 3.1. Deney gruplarının oluşturulması

	BİTKİLER									
BAKTERİLER	Altın otu		Anzer kekiği		Şeker otu		KHX		Distile su	
	MBK	>MBK	MBK	>MBK	MBK	>MBK	MBK	>MBK	MBK	MBK
S. mutans	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
S. mutans+ *S. wiggsiae*	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
S. mutans+ *L.acidophilus*+ *S. wiggsiae*	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5



Şekil 3.1. Çalışma dizaynı

3.3. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması

Çalışmada 75 adet çürüksüz, sağlıklı insan süt dişi kuronlarının mineleri kullanıldı. Kuronal harabiyeti, çürüğü, restorasyonu, hipomineralizyonu, beyaz nokta lezyonu ve gelişimsel defekti bulunan dişler çalışmaya dahil edilmedi.

Dişlerin yüzeyindeki artıklar düşük hızda polisaj fırçası yardımı ile uzaklaştırıldı. Dişler 600-1200 gridlik silikon karbid kâğıt zımparalar yardımıyla sırayla zımparalandı. Daha sonra mevcut kökler su soğutması altında aeratör ve silindir uçlu frezle (No. 557D, Brasseler, Savannah, GA, ABD) mine-sement birleşiminden uzaklaştırılarak kuronlar bukko-lingual olarak iki parçaya ayrıldı. Toplam 150 adet mine yüzeyi elde edildi. Açıkta kalan dentin tabakaları çift katlı tırnak cilası ile kaplandı. Dişler steril edileceği güne kadar % 0.1 timol içeren distile su içinde +4 ºC' de bekletildi. Deney öncesi dişler gruplar halinde 121 °C' de 45 dakika boyunca otoklavda steril edildi.

3.4. Çalışmada Kullanılan Bitkilerin Hazırlanması

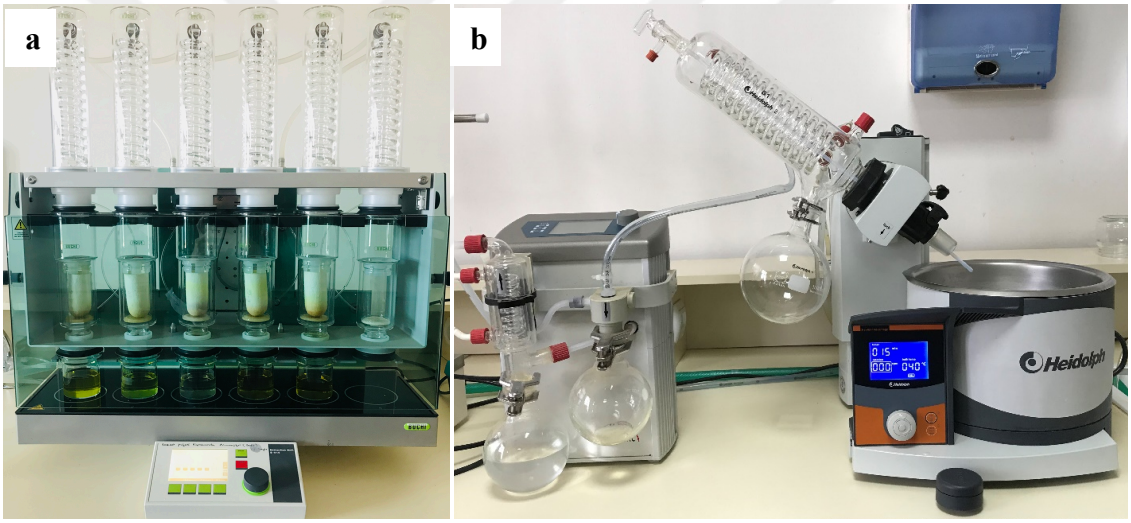
Çalışmada kullanılan şeker otu, Anzer kekiği, altın otu Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Ziraat Fakültesi' nden temin edildi.

Çalışmaya dahil edilen bitkilerin tür, lokasyon ve toplandıkları rakım Tablo 3.2' de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan bitkilerin tür, lokasyon ve toplandıkları rakım

Bitki türleri	Lokasyon	Rakım
Thymus praecox Opiz subsp. *Caucasicus* (Wild. Ex Ronniger) Jalas var. *Caucasicus*	Anzer, Rize	2200 m
Helichrysum arenarium	Doğu Anadolu Bölgesi	1565 m
Stevia rebaudiana	RTEÜ Ziraat Fakültesi	2 m

Yetiştikleri mevsim ve içeriklerinin zengin olduğu dönemler göz önünde tutularak toplanan bitkiler, toprak, yabancı ot gibi materyallerden temizlendi. Mantarlaşma ve bozulmalarını engellemek için uygun temizleme çözeltileri, etil alkol ve distile su ile yıkandıktan sonra nem oranı düşürülmüş (% 25 nem oranı) açık alanda 1-2 gün kurumaları sağlandı. Çalışmada kullanılan bitkiler bütün halinde (sap, kök, dal, yaprak çiçek) öğütücü yardımıyla toz haline getirildi. Her biri 5' er gram olacak şekilde tartılarak kartuşlara konuldu. Ekstraksiyon cihazına (Buchi, İsviçre) yerleştirilen kartuşlara 100 ml metanol (Merck, Almanya) ilavesi yapıldı. Ekstraksiyon işlemi 1 saat süre ile gerçekleştirildi (Şekil 3.2a).



Şekil 3.2a. Ekstraksiyon cihazı, **b.** Evaporatör

Elde edilen ekstraktlardaki metanol büyük oranda evaporatör (Heidolph, Almanya) yardımıyla uzaklaştırıldı (Şekil 3.2b). Farklı beherlere (Isolab, Almanya) yerleştirilen her bitki türü 37 °C' ye ayarlanan etüvde (Memmert, Almanya) çözücünün tamamen uzaklaşması için birkaç gün bekletildi. Metanolün uzaklaşmasının ardından her bitki ekstraktı steril falkon tüplere (Isolab, Almanya) konularak -20°C' de depolandı.

3.5. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Leibniz-Institut Deutsche (Almanya) Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)' ye kayıtlı *L. acidophillus* DSM 20242 ve *S. wiggsiae* DSM 22457 ile Hıfzıssıhha Refik Saydam Enstitüsü' nde (Ankara) tanımlaması yapılan *S. mutans* RSKK07038 suşları kullanıldı.

3.6. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

3.6.1.Brain Heart İnfüzyon Katı Besiyeri (BHIA)

HM infüzyon tozu	12.5 g
BHI tozu	5.0 g
Proteoz pepton	10 g
Dekstroz (Glikoz)	2.0 g
Sodyum klorit	5.0 g
Disodyum hidrojen fosfat	2.5 g

Katı besiyeri üretici firma (Himedia, Hindistan)' nın önerisi doğrultusunda 1 litre distile edilmiş suda 37 g madde olacak şekilde çözüldü. Otoklavda (Nüve, Türkiye) 121 °C' de 15 dakika 1.1 atm basınç altında steril edildikten sonra 90 mm çaplı steril petrilere 20 ml olacak şekilde dağıtıldı. Deney aşamasına kadar buzdolabında +4 °C' de muhafaza edildi.

3.6.2. DeMan Rogosa Sharp Katı (MRSA) ve Sıvı Besiyeri (MRSB)

Kazein peptonu	10.0 g
Et ekstraktı	8.0 g
Maya ekstraktı	4.0 g
D (+) Glikoz	20.0 g
Di potasyum hidrojen fosfat	2.0 g

Tween® 80	1.0 g
Di amonyum hidrojen sitrat	2.0 g
Sodyum asetat	5.0 g
Magnezyum sülfat	0.2 g
Manganez sülfat	0.04 g
Ultra saf su	1000 ml

Katı ve sıvı besiyerleri üretici firma (Merck, Almanya)' nın önerisi doğrultusunda 52.2 g madde 1 litre distile suya ilave edilerek çözüldü. Otoklavda 121 °C' de 20 dakika 1.1 atm basınç altında steril edildikten sonra 90 mm çaplı steril petrilere (Isolab, Almanya) 20 ml olacak şekilde dağıtıldı. Sıvı besiyeri üretici firmanın (Merck, Almanya) önerisi doğrultusunda agar içermeyen formu kullanılarak yeşil kapaklı şişelerde (Merck, Almanya) hazırlandı. Deney aşamasına kadar buzdolabında +4 °C' de muhafaza edildi.

3.6.3. Mannitol Egg Yolk Polimiksin Katı Besiyeri (MYPGA)

Arpa ekstraktı	3.0 g
Maya ekstraktı	3.0 g
Dekstroz (Glikoz)	10.0 g
Jelatin pepton	5.0 g
Bakır sülfat	0.4 g
Agar	20.0 g

Üretici firma (Himedia, Almanya)' nın önerisi doğrultusunda 1 litre demineralize suya 41.4 g madde eklenerek mavi kapaklı şişelerde çözdürüldü. Otoklavda 121 °C' de 15 dakika 1.1 atm basınç altında steril edildikten sonra deney aşamasına kadar +4 °C' de buzdolabında muhafaza edildi.

3.6.4. Triptik Soy Sıvı Besiyeri (TSB)

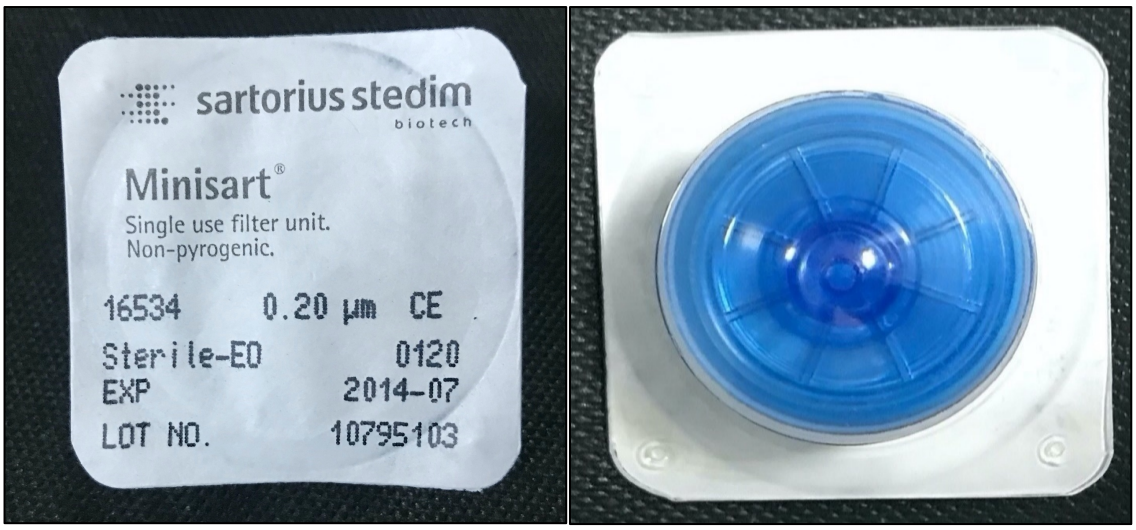
Kazein peptonu	17.0 g
Soya küspesi peptonu	3.0 g
D (+) Glikoz monohidrat	2.5 g
Sodyum klorit	5.0 g
Di potasyum hidrojen fosfat	2.5 g

Üretici firma (Merck, Almanya)' nın önerisi doğrultusunda 1 litre demineralize suya 30 g madde eklenerek mavi kapaklı şişelerde çözdürüldü. Otoklavda 121 °C' de 15 dakika 1.1 atm basınç altında steril edildikten sonra deney aşamasına kadar buzdolabında +4 °C' de muhafaza edildi.

3.7. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

3.7.1. Sükroz

Kimyasal formülü $C_{12}H_{22}O_{11}$ olan sükroz (Merck, Almanya) besiyerlerine eklenmek üzere 98 ml distile suyun içerisine 2 g ilave edildi. Daha sonra çözelti tek kullanımlık filtre (Minisart, Almanya) ile filtrelenerek steril edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Tek kullanımlık filtre

3.7.2. Metanol

Metanol (Merck, Almanya) ticari olarak temin edildi. Kurutulmuş bitkilerin özütlerinin elde edilebilmesi ve sonrasında hazırlanmış ekstraktların çözülebilmesi için kullanıldı.

3.7.3. Kuru Sistem Gaz Paketi (AnaeroGen ™)

Anaerob kavanoz içerisine konulan AnaeroGen (Oxoid, Fransa) atmosferik oksijeni hızlıca absorbe edip eş zamanlı karbondioksit üreterek etki etmektedir. Anaerobik kit kullanıldığında kavanozun içindeki oksijeni 30 dakika içerisinde % 1' in altına düşürmekte, karbondioksit seviyesini de % 9-13 arasında tutmaktadır (Şekil 3.4). Bu metot ile reaksiyonu aktive etmek için su ilavesi gerekmemektedir.

Şekil 3.4. AnaeroGen™ kiti

3.7.4. Klorheksidin (KHX)

Klorheksidin glukonatın % 2' lik (Imicryl, Türkiye) solüsyonu ticari olarak temin edildi. Solüsyonun içerisinde klorheksidin glukonat ve distile su bulunmaktadır.

3.8. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması

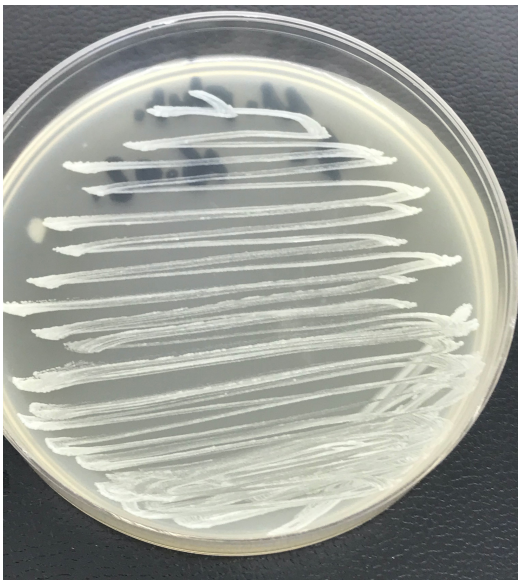
3.8.1. *S. mutans* İzolatının Hazırlanması

Kanlı BHIA' da hazırlanan plak kültüründe 24 saat inkübe edilerek aktifleştirildi (Şekil 3.5). Sıvı besi ortamı olarak % 2 sükroz ilaveli MRSB ve TSB (1:1) hazırlanarak bir gece inkübe edildi. Daha sonra aktifleşen kültür 0.5 McFarland standardına ayarlandı (Şekil 3.6).

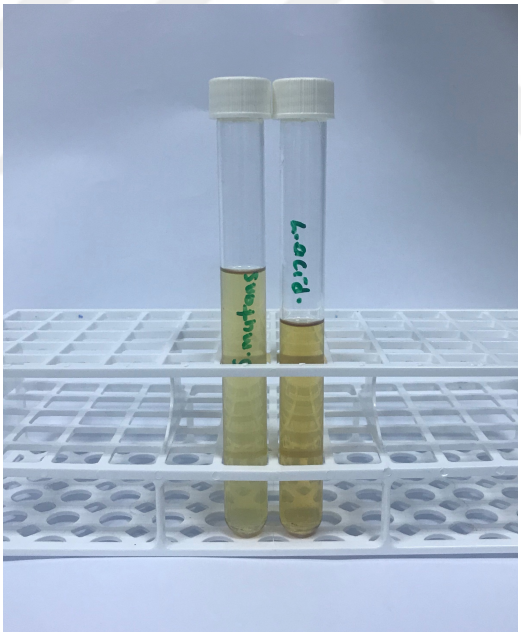
Şekil 3.5. *S. mutans*' ın kanlı BHIA' da üreme görüntüsü

3.8.2. *L. acidophilus* İzolatının Hazırlanması

MRSA' da hazırlanan plak kültüründe ve mikroaerofilik ortamda 2 günlük inkübasyon süresinin sonunda aktifleştirildi (Şekil 3.7). Sıvı besi ortamı olarak % 2 sükroz ilaveli MRSB hazırlanarak 2 gün süre ile inkübe edildi. Daha sonra aktifleşen kültür 1 McFarland standardına ayarlandı. Şekil 3.8' de *S. mutans* ve *L. acidophilus*' un sıvı besiyerinde oluşturdukları bulanık görüntü gösterildi.



Şekil 3.6. *L. acidophilus*' un MRSA' da üreme görüntüsü

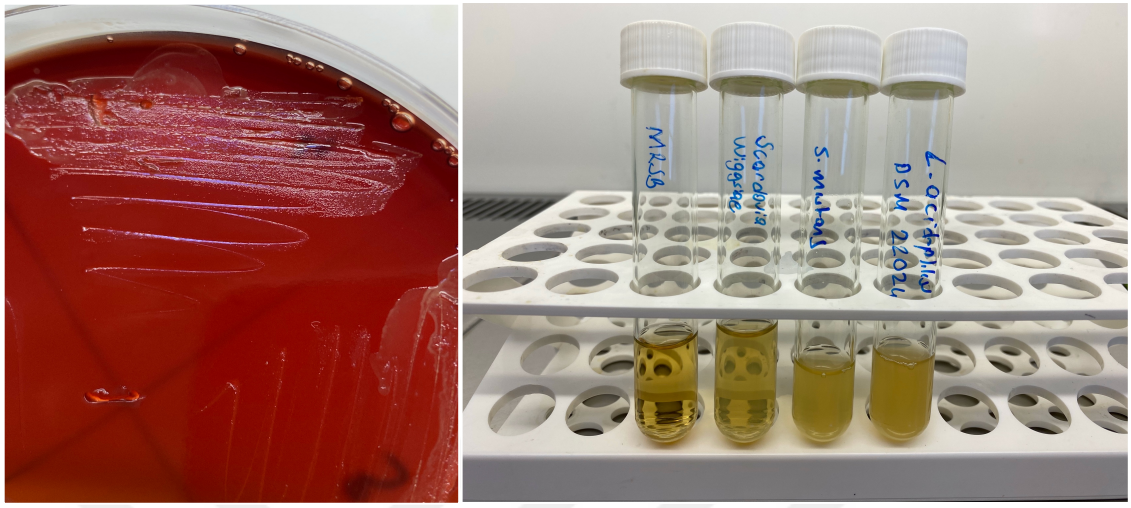


Şekil 3.7. *S. mutans* ve *L. acidophilus*' un bulanık görüntüsü

3.8.3. *S. wiggsiae* İzolatının Hazırlanması

Kanlı BHIA ve MYPGA' da hazırlanan ve anaerobik ortamda 3 gün inkübe edildikten sonra aktifleşen kültürler (Şekil 3.8a), % 2 sükroz ilaveli MRSB + TSB (1:1)

sıvı besiyerinde 1 McFarland standardında ayarlandı. Şekil 3.8b' de *S. wiggssiae* ve diğer bakterilerin sıvı besiyerinde oluşturdukları bulanık görüntü gösterilmiştir.



Şekil 3.8a. S. wiggsiae' nin kanlı BHIA' da üreme görüntüsü, **b.** Sıvı besiyerindeki bulanık görüntüler

3.9. Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi

3.9.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi

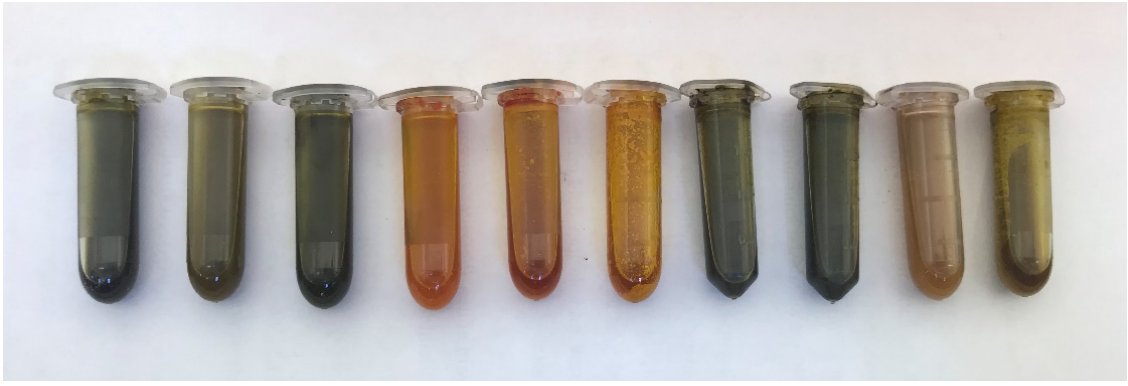
Çalışmada yer alan bitki ekstraktları agar kuyucuk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal etkinlik yönünden test edildi.[158] *S. mutans* için bir gecelik , *L. acidophilus* için 2 günlük mikroaerofilik taze kültürler kullanıldı. *S. mutans*' a 0.5, *L. acidophilus'* a 1.0, *S. wiggsiae* ise 1.0 McFarland bulanıklıkta (yaklaşık $10^{7\text{-}8}$ cfu/ml bakteri) (cfu: colony forming unit) dilüsyonlar yapıldı. Önceden hazırlanmış MRSA ve kanlı BHIA plakları üzerine steril eküvyon çubuğu (Isolab, Almanya) ile bakterilerin yaygın ekimleri gerçekleştirildi. Ekimleri tamamlanan besiyerleri üzerine steril cam boru aracılığıyla 2 cm aralıklarla, 5 mm çapında kuyucuklar açıldı. Önceden hazırlanan bitki ekstraktlarının her birinden 20 mg olacak şekilde tartılarak ependorf tüpler (Isolab, Almanya) içerisine yerleştirildi. Daha sonra 1 ml metanol tüplere eklendi ve 1 dakika boyunca vorteksle karıştırıldı. Her bir kuyucuğa elde edilen çözeltiden 50 µl damlatıldı. *S. mutans* ihtiva

eden petri 24 saat 37 °C, *L. acidophilus* ihtiva eden petri 48 saat 37 °C mikroaerofilik ortamda, *S. wiggsiae* ise 72 saat 37 °C anaerobik ortamda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra zon çapları bir cetvel yardımıyla ölçülerek ekstraktların bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkinlikleri belirlendi.

3.9.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) ve Minimum Bakterisit Konsantrasyon (MBK)' un Belirlenmesi

Agar kuyucuk yöntemiyle antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu tespit edilen bitki ekstraktları için bu aktivitenin kantitatif değerinin belirlenebilmesi amacıyla MİK ve MBK testleri yapıldı. BHIB, MRSB besiyerleri kullanılarak MİK ve MBK değerleri hesaplandı. McFarland *S. mutans* için 0.5, *L. acidophilus* için 1.0 ve *S. wiggsiae* için 1.0 olacak şekilde bakteriyel süspansiyonlar hazırlandı.[159,160]

Altın otu, Anzer kekiği ve şeker otu ekstraktlarının her birinden 20 mg olacak şekilde hassas terazide (And, Japonya) tartılarak ependorf tüplere konuldu. Daha sonra her bir ependorfa 1ml distile su eklenerek vorteks aracılığıyla homojen bir solüsyon elde edildi (Şekil 3.9). Pozitif kontrol olan KHX solüsyonu distile su ile dilüe edilirken; negatif kontrol olan distile su herhangi bir işleme tabi tutulmadı.



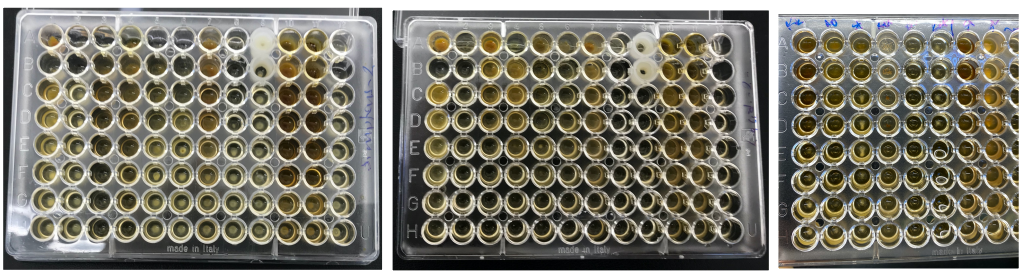
Şekil 3.9. MİK değerlerinin tespiti için hazırlanan solüsyonlar

S. mutans için 100 µl BHIB, *L. acidophilus* için 100 µl MRSB ve *S. wiggsiae* için 100 µl MRSB + TSB (1:1), 96 kuyucuklu mikroplakaların her bir çukuruna eklendi. Daha

sonra Eliza plakalarının her sütunu bir bitki için kullanılmak kaydıyla hazırlanan solüsyonların her birinden 100 µl ilk kuyucuklara ilave edildi. Her sütunda en yüksek konsantrasyon olan ilk kuyucuktan 100 µl alınıp 2. kuyucuğa aktarım ve pipetasyon, 2. kuyucuktan 100 µl alınıp 3. kuyucuğa aktarım ve pipetasyon şeklinde her bitki grubu için yukarıdan aşağıya olmak üzere son kuyucuğa kadar çift katlı seri dilüsyonlar yapıldı. En son kuyucuktaki pipetasyondan kalan 100 µl sıvı uzaklaştırıldı. İlk ve son kuyucuklar kontrol için bırakıldı. Diğer tüm kuyucuklara 10 µl bakteri süspansiyonları belirlenen McFarland değerinde inoküle edildi. *S. mutans* grubu 24 saat, *L. acidophilus* grubu 48 saat 37 ℃' de mikroaerofilik ortamda, *S. wiggsiae* ise 72 saat 37 ℃' de anaerobik inkübasyona bırakıldı.

Mikroplakalardaki solüsyonların konsantrasyonları şu şekilde seri olarak dilüe edildi (Her sütun için yukarıdan aşağıya) (Şekil 3.10):

1. 1 mg/ml
2. 0.5 mg/ml
3. 0.25 mg/ml
4. 0.125 mg/ml
5. 0.0625 mg/ml
6. 0.0312 mg/ml
7. 0.0156 mg/ml
8. 0.0078 mg/ml



Şekil 3.10. Eliza plakalarında MİK ve MBK değerlerinin belirlenmesi

İnkübasyon sonrası kuyucuklarda gözle görülebilen, bulanıklığın olmadığı en düşük konsantrasyondaki madde miktarı minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yani mikroorganizmanın üremesini durduran değer olarak belirlendi.

Minimum bakterisidal konsantrasyon tespit edilirken Eliza plakalarında test edilen her solüsyon için üremenin görülmediği en düşük konsantrasyonun bir üst ve bir alt kuyucuğundan 50' şer µl örnek alınarak *S. mutans* ve *S. wiggsiae* için kanlı BHIA, *L. acidophilus* için MRSA besiyerlerine ekim yapıldı. Sırasıyla 37 ℃' de 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. Koloni oluşumunun tespit edilmediği en düşük konsantrasyon test solüsyonunun çalışılan mikroorganizma için MBK değeri yani mikroorganizmayı öldüren dilüsyon değeri olarak belirlendi.

3.10. Dişler Üzerinde Biyofilm Tabakasının Oluşturulması

Steril edilen dişler kontaminasyona engel olmak amacıyla steril kabin (Nüve, Türkiye) içerisinde açıldı. *S. mutans* (n=50), *S. mutans ve S. wiggsiae* (n=50), *S. mutans*, *L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* (n=50) biyofilm grupları için rastgele seçilen dişler steril 24 kuyucuklu plakalara presel yardımıyla yerleştirildi. Her kuyucukta sadece bir diş olacak şekilde planlama yapıldı. Kuyucuklara yerleştirilen dişler üzerine her grup için % 2 sükroz ilave edilen 1 ml MRSB + TSB (1:1) sıvı besiyeri eklendi.

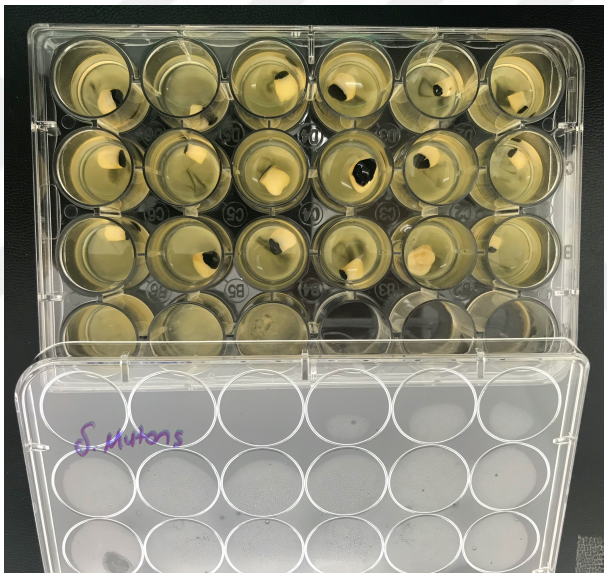
3.10.1. Dişler Üzerinde *S. mutans* Kültürü ile Monomikrobiyal Biyofilm Oluşumu

S. mutans 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlandı.

1. gün: Hazırlanan aktif kültür süspansiyonundan 50 µl doku kültürü plakalarına (24'lü) steril mikropipet kullanılarak aktarıldı. Mikroaerofilik ortamda 37 °C' de 24 saat boyunca inkübe edildi.

2. gün: Diş örneklerinin içerisinde bulunduğu besiyerleri pipetasyon yapılarak tamamen uzaklaştırıldı. Daha sonra 1ml yeni besiyeri eklenip 37 °C' de mikroaerofilik ortamda 24 saat boyunca inkübe edildi.

3. gün: Günün erken saatlerinde etüvden çıkarılan plakalardaki *S. mutans*' ın kuyucukların tabanında çökelti oluşturduğu görüldükten sonra besiyerlerinden 1 µl elektronik pipet ile lam üzerine alınarak negatif boyama yapıldı (Şekil 3.11). Işık mikroskobunda biyofilm varlığı incelendi. Mine yüzeyindeki biyofilm varlığının tespiti için her gruptan rastgele seçilen bir dişten SEM ile görüntü alındı.



Şekil 3.11. *S. mutans*' ın üremesinin gözlenmesi (Kuyucuğun tabanındaki çökelti)

3.10.2. Dişler Üzerinde *S. mutans* ve *S. wiggsiae* Kültürleri ile Polimikrobiyal Biyofilm Oluşumu

S. mutans 0.5, *S. wiggsiae* 1.0 McFarland standardında ayarlandı. Bakteriler 1:1 oranında karıştırıldı.

1. gün: Hazırlanan aktif kültür süspansiyonundan 50 µl doku kültürü plakalarına (24'lü) steril mikropipet kullanılarak aktarıldı. Anaerobik kit ve mumlu kavanoz eşliğinde 37 °C' de 3 gün süre ile inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.12)

3. gün: Gün sonunda etüvden çıkarılan plakalardaki besiyerlerinden 1 µl elektronik pipet ile lam üzerine alındı. Gram boyama yapıldı. Işık mikroskobunda biyofilm varlığı incelendi. *S. wiggsiae*' nin üremediği görüldü ve tekrar 1.0 McFarland standardında 25 µl bakteri eklendi. Anaerobik kit ve mumlu kavanoz eşliğinde 37 °C' de 3 gün süre ile inkübasyona bırakıldı.

Şekil 3.12. Mumlu kavanoz düzeneği

6. gün: Gün sonunda etüvden çıkarılan plakalardaki besiyerlerinden 1 µl elektronik pipet ile lam üzerine alındı. Negatif boyama tekniği ile boyandıktan sonra mikroskop altında biyofilm varlığı görüntülendi. Mine yüzeyindeki biyofilm varlığının tespiti için her gruptan rastgele seçilen bir dişten SEM ile görüntü alındı.

3.10.3. Dişler Üzerinde *S. mutans*, *L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* Kültürleri ile Polimikrobiyal Biyofilm Oluşumu

Spektrofotometre ile *S. mutans* 0.5, *L. acidophilus* 1.0, *S. wiggsiae* 1.0 McFarland standardında ayarlandı. Bakteriler sırası ile 1:2:2 oranında karıştırıldı.

1. gün: Hazırlanan aktif kültür süspansiyonundan 50 µl doku kültürü plakalarına (24'lü) steril mikropipet kullanılarak aktarıldı. Anaerobik kit ve mumlu kavanoz eşliğinde 37 °C' de 3 gün süre ile inkübasyona bırakıldı.

3. gün: Gün sonunda etüvden çıkarılan plakalardaki besiyerlerinden 1 µl elektronik pipet ile lam üzerine alındı. Gram boyama yapıldı. Işık mikroskobunda biyofilm varlığı incelendi. *S. wiggsiae*' nin üremediği görüldü ve tekrar 1.0 McFarland standardında 20 µl bakteri eklendi. Anaerobik kit ve mumlu kavanoz eşliğinde 37 °C' de 3 gün süre ile inkübasyona bırakıldı.

6. gün: Gün sonunda etüvden çıkarılan plakalardaki besiyerlerinden 1 µl elektronik pipet ile lam üzerine alındı. Negatif ve gram boyama tekniği ile boyandıktan sonra mikroskop altında biyofilm varlığı görüntülendi. Mine yüzeyindeki biyofilm varlığının tespiti için her gruptan rastgele seçilen bir dişten SEM ile görüntü alındı.

Anaerob koşullarda üreyebilen *S. wiggsiae*' nin bulunduğu gruplarda besiyeri değiştirilmedi çünkü besiyerinin sürekli değiştirilmesi bakterilerin hayatta kalma şansını azaltmaktadır.

Çalışmada kullanılan kültürlerin kontaminasyon kontrolü hem makroskobik hem de mikroskobik olarak takip edildi. Makroskobik takip sırasında kültürün üremesi renk, koku ya da bulanıklık açısından incelendi.

3.11. KHX ve Bitki Ekstraktlarının MBK Değerlerine Göre Hazırlanması

Biyofilm oluştuktan sonra tedavi prosedürüne geçildi. Tablo 3.3 ve 3.4' te belirtilen miktardaki ekstraktlar tartılarak falkon tüplere konuldu. Gerekli solüsyon miktarı her gruptaki toplam diş sayısı dikkate alınarak hesaplandı. Buna göre uygun miktarda distile su falkon tüplere ilave edildi. Daha sonra solüsyon vorteks (Heidolph,

Almanya) yardımıyla homojen karışım elde edilene kadar karıştırıldı ve günlük solüsyonlar hazırlandı (Şekil 3.13).

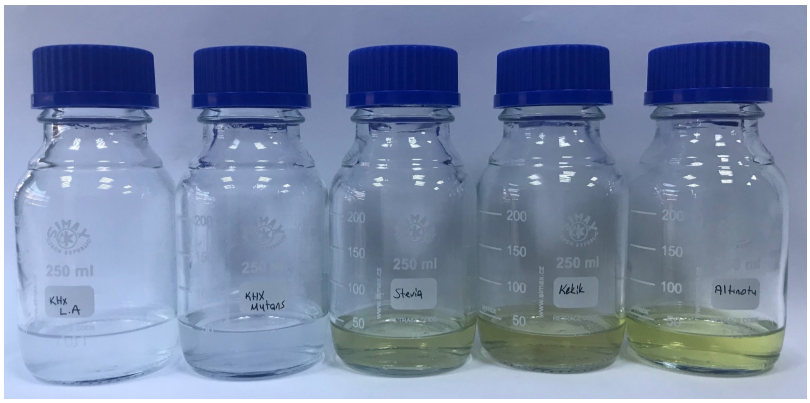
Anzer kekiği, altın otu, şeker otu ve KHX için önceden belirlenen MBK değerlerine bağlı kalınarak gruplar dizayn edildi. Her plakada sadece bir biyofilm grubu olacak şekilde planlama yapıldı. Buna göre tüm biyofilm grupları için Şekil 3.14' te gösterildiği gibi MBK ve MBK değerinin iki katı (>MBK) derişiminde hazırlanan solüsyonlar sırayla kuyucuklara eklendi (Şekil 3.14). Negatif kontrol olan distile su grubunda solüsyonun derişiminde herhangi bir değişiklik yapılmadı.

Tablo 3.3. MBK değeri esas alınarak hesaplanan bir diş için gerekli madde miktarı

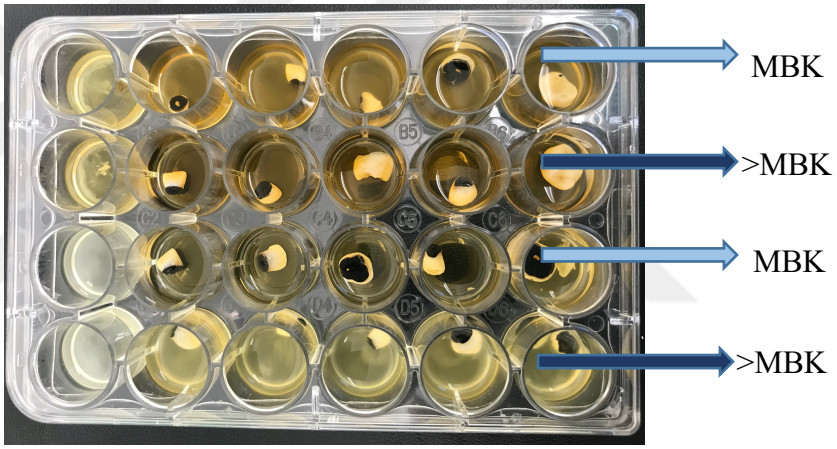
	BİTKİLER			
BAKTERİLER	Şeker otu	Altın otu	Anzer kekiği	KHX
S. mutans	0.5 mg/ml	0.125 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 ml
L. acidophilus	0.5 mg/ml	0.125 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 ml
S. wiggsiae	-	0.0625 mg/ml	0.5mg/ml	<0.0001

Tablo 3.4. >MBK esas alınarak hesaplanan bir diş için gerekli madde miktarı

	BİTKİLER			
BAKTERİLER	Şeker otu	Altın otu	Anzer kekiği	KHX
S. mutans	1.0 mg/ml	0.25 mg/ml	1.0 mg/ml	0.5 ml
L. acidophilus	1.0 mg/ml	0.25 mg/ml	1.0 mg/ml	0.5 ml
S. wiggsiae	-	0.125 mg/ml	1.0 mg/ml	<0.0001



Şekil 3.13. Günlük hazırlanan solüsyonlar

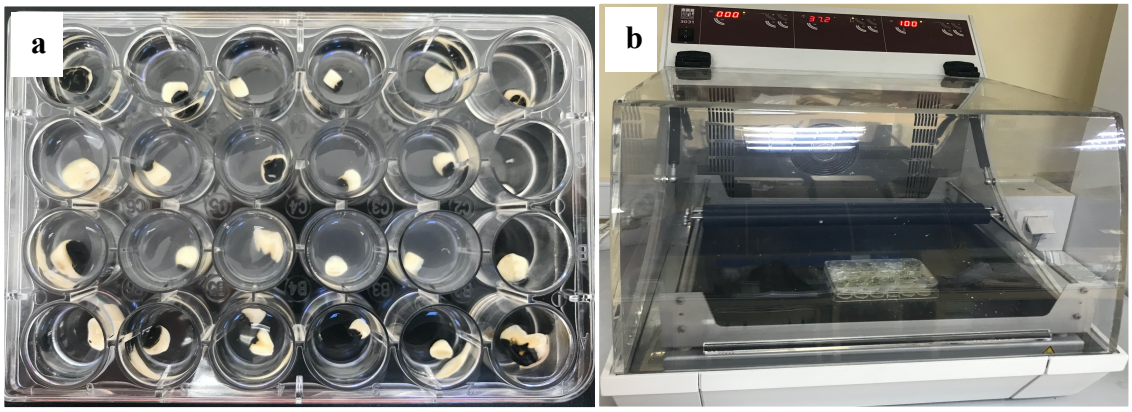


Şekil 3.14. 24 kuyucuklu plaklara yukarıdan aşağıya sırasıyla MBK ve >MBK derişimlerine sahip solüsyonların konulması

3.12.KHX ve Bitki Ekstraktlarının Farklı Biyofilm Gruplarına Uygulanması

3.12.1. Monomikrobiyal Biyofilm Grubuna Uygulanması

Etüvden çıkarılan plakalar steril kabin içerisine taşındı. Daha sonra plakaların içerisindeki besiyeri pipetasyon yapılarak uzaklaştırıldı. Boşalan kuyucuklara 2 ml % 9' luk serum fizyolojik eklendi (Şekil 3.15a). Çalkalayıcıya (Gfl, Kore) konularak 2 dakika boyunca 2 kere çalkalama işlemi uygulandı (Şekil 3.15b).



Şekil 3.15a. Serum fizyolojik ilave edilen kuyucuklar, **b.** Çalkalayıcı

Çalkalama işlemini takiben kuyucuklardaki serum fizyolojik elektronik pipet ile uzaklaştırıldı. Hazırlanan solüsyonlardan her kuyucuğa 2 ml eklendi ve 30 dakika boyunca 37 °C' de bekletildi. Süre bitiminde solüsyonlar kuyucuklardan tamamen uzaklaştırıldıktan sonra 1ml yeni besiyeri eklenip 37 °C' de 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.

Bu deney prosedürü beş gün boyunca tekrarlandı. Beşinci günün sonunda tedavi solüsyonları kuyucuklardan tamamen uzaklaştırılarak deney sonlandırıldı.

3.12.2. Polimikrobiyal Biyofilm Gruplarına Uygulanması

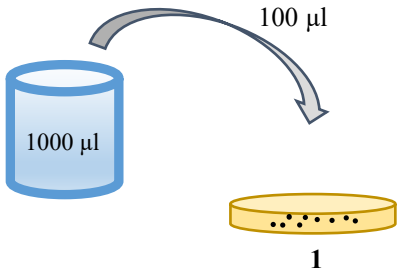
Polimikrobiyal biyofilm grupları için biyofilm oluşumunu takiben 1 günlük tedavi prosedürü uygulandı. Etüvden çıkarılan plakalar steril kabin içerisine taşındı. Daha sonra plakaların içerisindeki besiyeri pipetasyon yapılarak uzaklaştırıldı. Boşalan kuyucuklara 2 ml serum fizyolojik eklendi. Çalkalayıcıya konularak 2 dakika boyunca 2 kere çalkalama işlemi yapıldı. Çalkalama işlemini takiben kuyucuklardaki serum fizyolojik elektronik pipet ile uzaklaştırıldı. Hazırlanan solüsyonlardan her kuyucuğa 2 ml eklendi ve 30 dakika boyunca 37 °C' de bekletildi. Sürenin bitiminde solüsyonlar kuyucuklardan tamamen uzaklaştırılarak deney sonlandırıldı.

3.13. KHX ve Bitki Ekstraktlarının Biyofilm Oluşumuna Etkisi

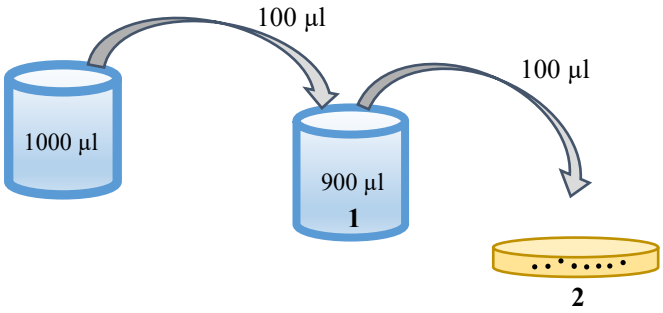
Deneyin sonlandırılmasını takiben boş kalan kuyucuklara 1 ml distile su ilave edilip dişler 2 kere yıkandı. Daha sonra distile su tamamen uzaklaştırıldı. Kuyucuklarda bulunan dişler, içerisine 1 ml steril serum fizyolojik konulan ependorf tüplere aktarıldı ve 1 dk boyunca biyofilmin diş yüzeyinden ayrılması için vortekslendi.

Vortekslenen sıvıdan 1 µl elektronik pipet ile alınarak ışık mikroskobunda incelendi. Buna göre bakteri üremesinin az olduğu KHX grubunda birinci dilüsyon, cfu sayıları hesaplanamayacak olan bitkisel ekstrakt gruplarında ikinci ve distile su grubunda üçüncü dilüsyonda ekim yapılmasına karar verildi (Şekil 3.16, 3.17 ve 3.18). Biyofilminden ayrılan ependorftaki sıvıdan steril bir mikropipet yardımıyla 100 µl çekildi. Çekilen sıvı içine 900 µl serum fizyolojik konulan başka bir ependorf tüpe sıvı transfer edildi. Her dişe ayrı seri dilüsyonlar yapıldı.

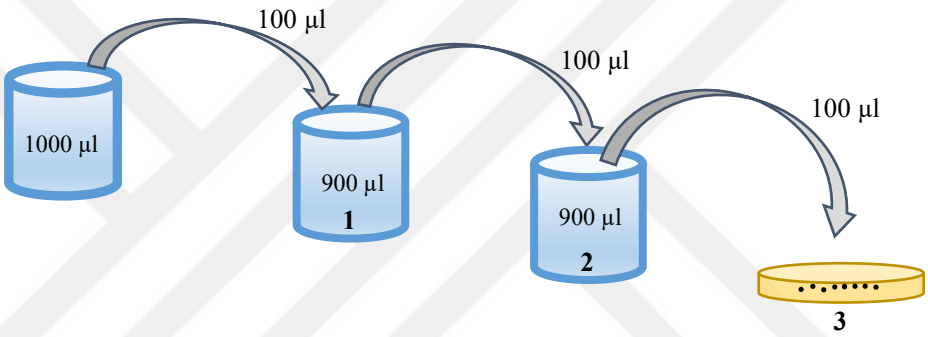
Elde edilen en son dilüsyondan 100 µl alınarak MRSA konulan petrilere steril baget ile yüzeyel bakteri ekimleri yapıldı. Monomikrobiyal biyofilm grubu mikroaerofilik ortamda 24 saat boyunca 37 °C' de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra makroskopik olarak koloniler sayılarak canlı mikroorganizma miktarı cfu olarak belirlendi.



Şekil 3.16. KHX için 1. dilüsyon sonrası bakteri ekimi.



Şekil 3.17. Şeker otu, Anzer kekiği, altın otu için 2. dilüsyon sonrası bakteri ekimi.



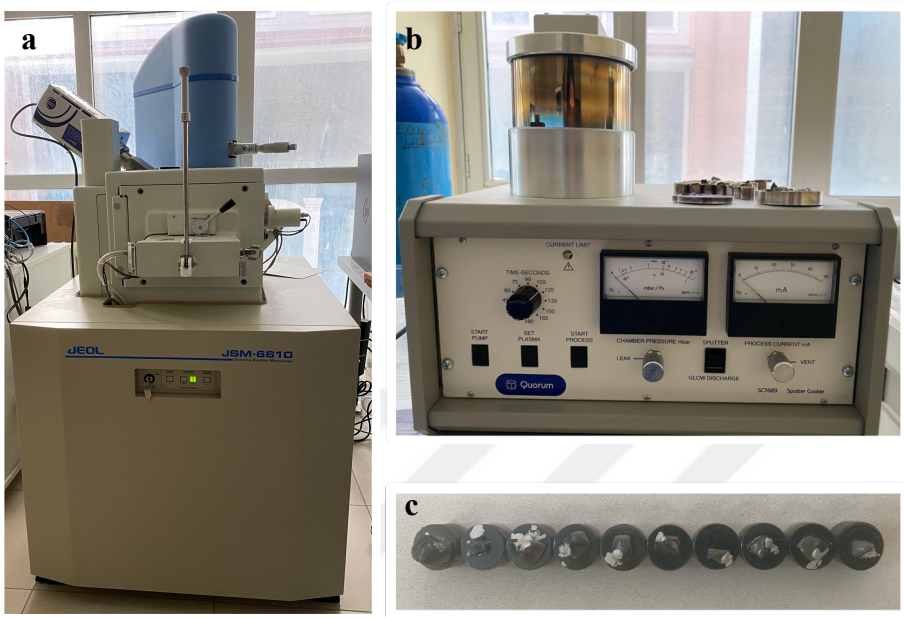
Şekil 3.18. Distile su için 3. dilüsyon sonrası bakteri ekimi

Polimikrobiyal biyofilm grupları anaerobik kit konulan mumlu kavanozlarda 37 ℃' de ilk olarak 24 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra etüvden çıkarılıp *S. mutans* bakteri sayımları makroskopik olarak yapıldı. *L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* bakterilerinin üremeye devam edebilmeleri için 37 ℃' de 48 saat süre boyunca tekrar anaerob şartlar oluşturularak inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda makroskopik olarak birbirinden farklı görünümdeki bakterilerin sayımları yapılarak kayıt altına alındı.

3.14. SEM ile Görüntü Alınması ve EDS Analizi

Deney başlangıç ve bitiminde tüm gruplardan rastgele seçilen 1' er örnek, vakumlu ortamda püskürtmeli kaplayıcı (SC7620 "Mini", Polaron Sputter Coater,

İngiltere) tarafından ince altın tabakasıyla kaplandı ve SEM (Jeol, ABD) ile görüntülendi (Şekil 3.19a-c).



Şekil 3.19a. SEM cihazı, **b.** Altın kaplama cihazı, **c**. Altın tabakasıyla kaplanan diş örnekleri

SEM ile X2000, X5000, X10000 büyütme ile mine yüzey topografisi ve mikroorganizma varlığı incelendi.

Deneyin başlangıcında ve bitiminde, her gruptan rastgele bir diş seçildi. EDS (Jeol, ABD) ile dişlerin mineral içeriğinde meydana gelen değişiklikler analiz edildi.

3.15. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğunu tespit etmek için Shapiro-Wilk testi uygulandı. MBK ve >MBK' da hazırlanan farklı bitki türlerinin biyofilm oluşumuna etkilerinin değerlendirilmesinde, verilerin normal dağılım göstermeyen gruplarda Kruskal-Wallis testi normal dağılım gösteren gruplarda ise One-Way ANOVA testi uygulandı. Grup varyanslarının homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Buna göre monomikrobiyal biyofilm grubunda Levene testi sonucu p=0.08 bulunarak varyansların

homejen olduğu görüldü. Çoklu karşılaştırmalar için Tukey Post-Hoc testi kullanıldı. Polimikrobiyal biyofilm grubunda *S. mutans* için Levene testi sonucu $p<0.001$ bulunarak varyansların homojen olmadığı belirlendi. Buna göre çoklu karşılaştırmalar için Tamhane Post-Hoc testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

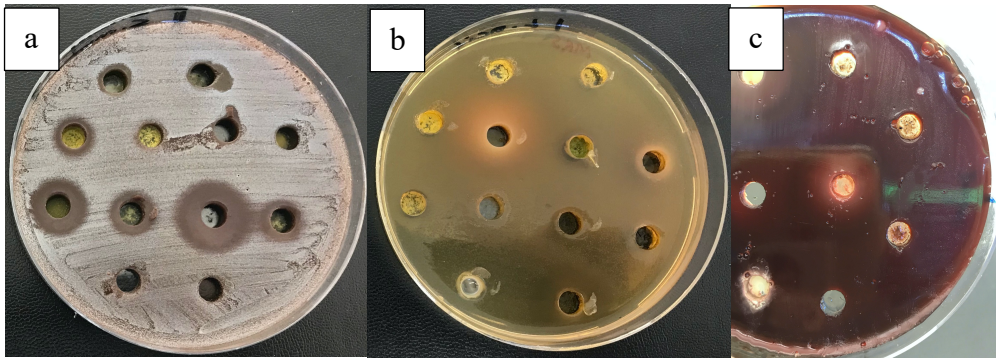
4. BULGULAR

4.1. KHX ve Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesi

S. mutans, *S. wiggsiae* ve *L. acidophilus* suşları üzerinde şeker otu, altın otu ve Anzer kekiği ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi amacıyla agar kuyucuk yöntemi kullanıldı. KHX ve bitki ekstraktlarının besiyerinde oluşturulan kuyucuklara bırakılmasından 24 saat sonra oluşan zon çapları ölçüldü (Tablo 4.1). Altın otunun *L. acidophilus*, KHX' in ise *S. mutans* ve *S. wiggsiae* için en büyük zon çapını oluşturduğu görüldü (Şekil 4.1).

Tablo 4.1. Test edilen bitki ekstraktlarının (50 µl) *S. mutans*, *S. wiggsiae* ve *L. acidophilus* üzerinde oluşturduğu zon çapları (mm)

BAKTERİLER	**BİTKİLER**			
	Altın otu	Anzer kekiği	Şeker otu	KHX
S. mutans	12	22	18	>30
L. acidophilus	>30	25	17	21
S. wiggsiae	-	-	8	30



Şekil 4.1a. *S. mutans* için kanlı BHİA' da inhibisyon zonları, **b.** L. acidophilus için MRSA' da inhibisyon zonları, **c.** *S. wiggsiae* için kanlı BHİA'da inhibisyon zonları

S. mutans, *S. wiggsiae* ve *L. acidophilus* bakterileri için KHX ve bitki ekstraktlarının MİK ve MBK değerleri Tablo 4.2' de özetlenmiştir. Altın otu 0.03125-

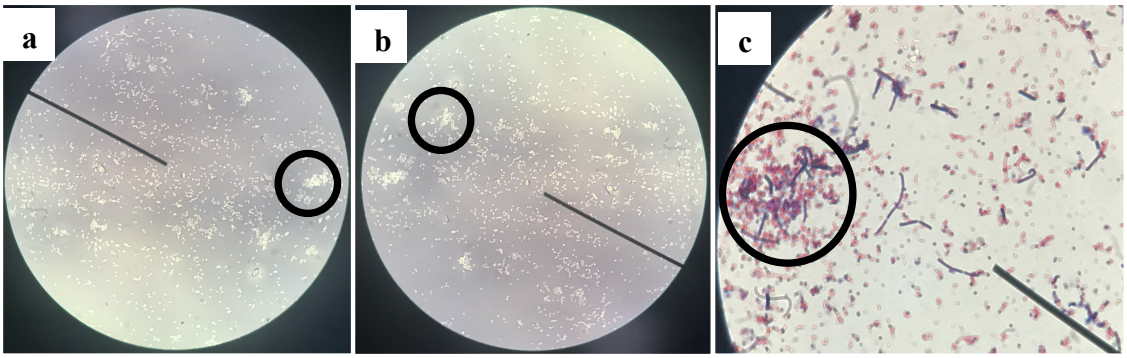
0.0625 mg/ml, Anzer kekiği 0.125 mg/ml, şeker otu 0.125-0.250 mg/ml ve KHX' in 0.0078-0.125 mg/ml arasında değişen MİK değerlerine sahip olduğu belirlendi. Diğer bitki türlerine kıyasla altın otu ekstraktının test edilen bakteriler üzerinde daha düşük konsantrasyonda etkili olduğu görüldü. Anzer kekiği ekstraktının ise üç bakteri üzerinde aynı derişimde etkili olduğu gözlendi. Şeker otunun *S. wiggsiae*' nin üremesini durdurken bu bakteri üzerinde lethal etki göstermediği tespit edildi.

Tablo 4.2. KHX ve bitki ekstraktlarının *S. mutans*, *S. wiggsiae* ve *L. acidophilus*' a karşı MİK ve MBK değerleri

BAKTERİLER	BİTKİLER							
	Altın otu		Anzer kekiği		Şeker otu		KHX	
	MİK (mg/ml)	MBK (mg/ml)	MİK (mg/ml)	MBK (mg/ml)	MİK (mg/ml)	MBK (mg/ml)	MİK (ml)	MBK (ml)
S. mutans	0.03125	0.0625	0.125	0.250	0.250	0.250	0.0625	0.125
L. acidophilus	0.0625	0.0625	0.125	0.250	0.125	0.250	0.125	0.125
S. wiggsiae	0.015125	0.03125	0.125	0.250	0.250	-	0.0078	<0.0078

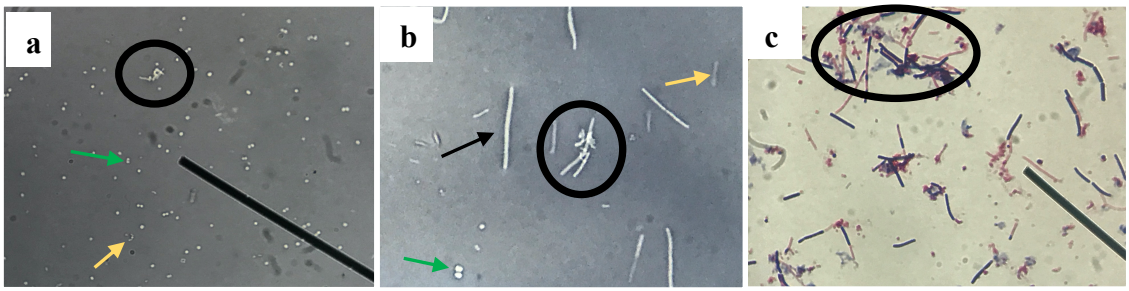
4.2. Bakteriyel Biyofilm Oluşumunun Işık Mikroskobu ile Görüntülenmesi

Deneye başlamadan *S. mutans*' ın oluşturduğu 3 günlük biyofilm ve polimikrobiyal içerikli 6 günlük biyofilm tabakaları ışık mikroskobu altında incelendi (Şekil 4.2a-c). Şekil 4.2a' da *S. mutans*, Şekil 4.2b' de *S. mutans* ve *S. wiggsiae*, Şekil 4.2c' de *S. mutans*, *L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* kolonileri gösterilmektedir.



Şekil 4.2a-c. Deney öncesi ışık mikroskobu görüntüleri

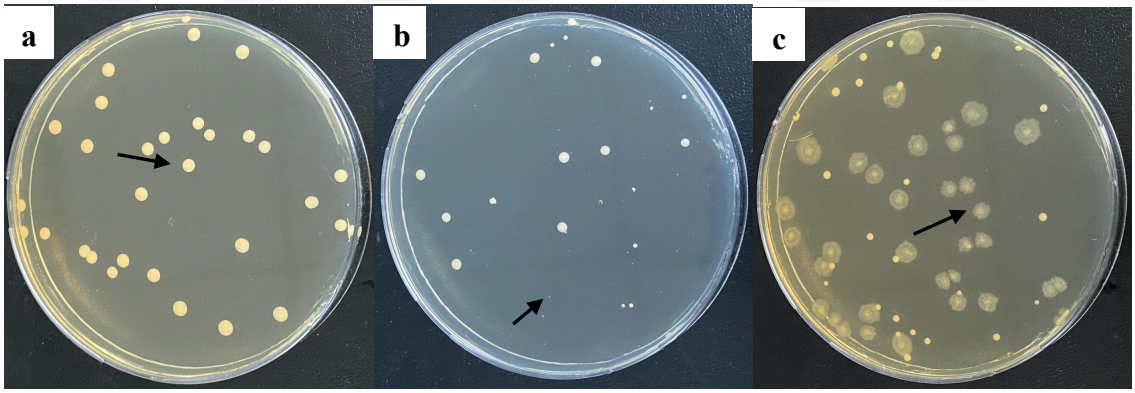
Aşağıda deney sonrası mikroskop görüntüleri yer almaktadır. Şekil 4.3a' da *S. mutans* ve *S. wiggsiae*, Şekil 4.3b-3c' de *S. mutans*, *L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* bakteri ve kolonileri gösterilmektedir.



Şekil 4.3a-c. Deney sonrası ışık mikroskobu görüntüleri

4.3. Biyofilm Oluşumuna KHX ve Bitki Ekstraktlarının Etkisi

Biyofilm grupları için önceden belirtilen sürelerde inkübasyon yapıldı. Daha sonra canlı bakteri sayımı yapılarak sonuçlar $\log_{10}$ cfu/ml olarak ifade edildi. Aşağıda MRSA' da bakteri üremeleri görülmektedir. Buna göre Şekil 4.4a' da *S. mutans*, Şekil 4.4b' de *S. wiggsiae*, Şekil 4.4c' de *L. acidophilus* izlenmektedir (Şekil 4.4a-c).



Şekil 4.4a-c. MRSA' da bakteri görünümü

4.3.1. Monomikrobiyal Biyofilm Grubuna KHX ve Bitki Ekstraktlarının Etkisi

MBK ve >MBK değerleri esas alınarak hazırlanan deney solüsyonlarının *S. mutans* biyofilmi üzerine etkisi Tablo 4.3 ve Şekil 4.5' te gösterilmektedir. MBK değerinde hazırlanan solüsyonlar incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark tespit edildi ($p=0.011$). Buna göre KHX grubunda distile su grubuna kıyasla

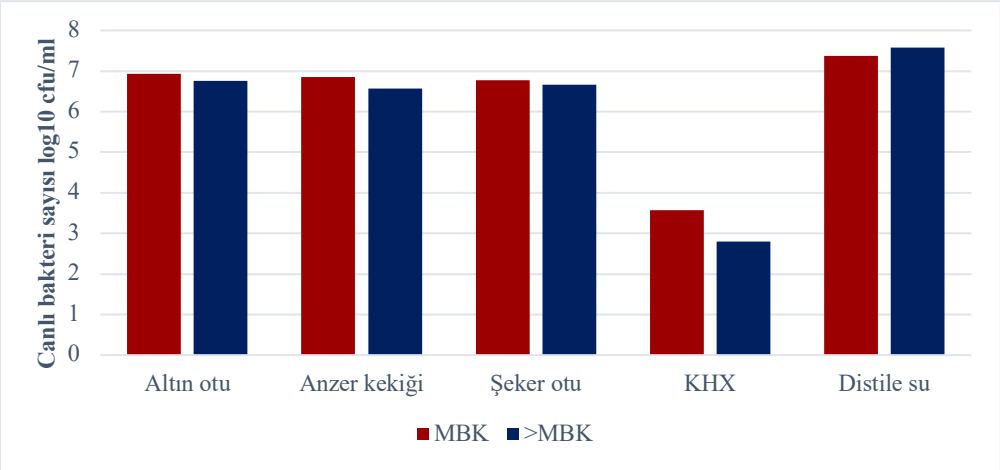
bakteri sayısının az olduğu görüldü (p=0.003). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p>0.05).

>MBK değerinde hazırlanan KHX ve bitki ekstraktlarının *S. mutans* üzerinde antibakteriyel etkinlikleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlendi (p<0.001). Tukey testi ile gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında KHX' nin tüm bitki ekstraktları ve distile suya kıyasla *S. mutans* üzerinde anlamlı derecede etkili olduğu belirlendi (p<0.001). Şeker otu, Anzer kekiği ve altın otu gruplarına göre distile su grubunda daha fazla sayıda bakteri izlendi (p=0.002; p=0.001; p=0.005).

Tablo 4.3. MBK ve >MBK değerlerine göre hazırlanan KHX ve bitki ekstraktlarının uygulandığı biyofilmdeki canlı bakteri sayılarının karşılaştırılması (log_{10} cfu/ml)

	MBK[x]			**>MBK[y]**		
Bitkiler	Mean±SS	Median	(Min-Max.)	Mean±SS	Median	(Min-Max.)
Altın otu	6.93±0.64	6.85	(6.23-7.79)	6.75±0.20[c]	6.70	(6.57-7.04)
Anzer kekiği	6.86±0.17	6.85	(6.71-7.04)	6.57±0.16[c]	6.59	(6.38-6.75)
Şeker otu	6.78±0.34	6.86	(6.30-7.11)	6.67±0.11[c]	6.65	(6.56-6.83)
KHX	3.57±0.18	3.65	(3.30-3.70)[a]	2.80±0.43[d]	2.80	(2.30-3.30)
Distile su	7.37±0.16	7.38	(7.20-7.52)[b]	7.58±0.32[e]	7.51	(7.28-8.04)
p değeri		**0.011***			**<0.001***	

[x] Kruskal Wallis, [y] One-Way ANOVA, **p*<0.05
SS: Standart sapma; Min: Minimum; Max: Maksimum
[a-b, c-d, c-e, d-e] İstatistiksel olarak farklı; p<0.05



Şekil 4.5. *S. mutans* biyofilmindeki canlı bakteri sayıları

4.3.2. Polimikrobiyal Biyofilm Grupları KHX ve Bitki Ekstraktlarının Etkisi

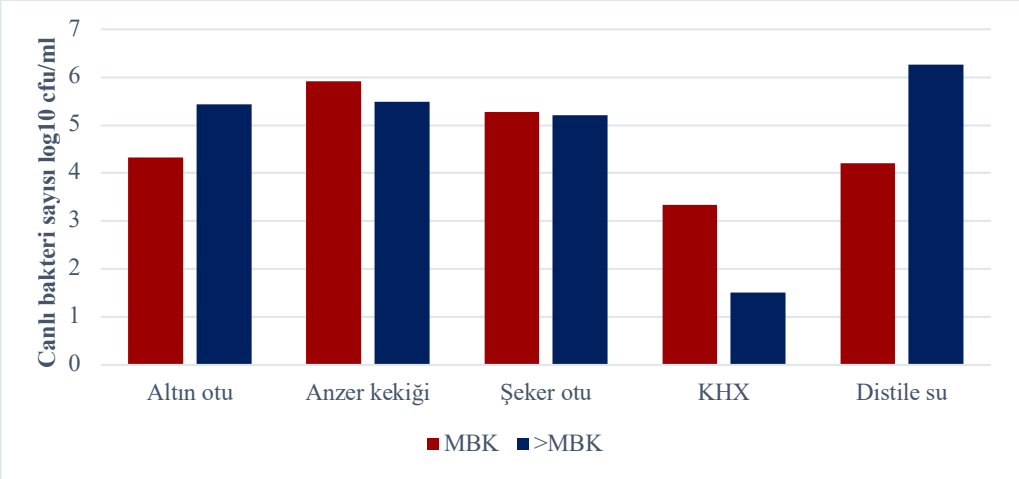
4.3.2.1. *S. mutans* ve *S. wiggsiae* Biyofilm Grubu

MBK ve >MBK değerleri esas alınarak hazırlanan deney solüsyonlarının polimikrobiyal biyofilm tabakasındaki *S. mutans* sayısına etkileri Tablo 4.4 ve Şekil 4.6'da gösterilmektedir. MBK ve >MBK değerlerinde hazırlanan deney solüsyonlarının polimikrobiyal biyofilm tabakasındaki *S. mutans* sayısına etkileri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p=0.05).

Tablo 4.4. MBK ve >MBK değerlerine göre hazırlanan KHX ve bitki ekstraktlarının uygulandığı polimikrobiyal biyofilmdeki canlı *S. mutans* sayılarının karşılaştırılması (log_{10} cfu/ml)

	MBK[x]			**>MBK[y]**		
Bitkiler	Mean±SS	Median	(Min-Max.)	Mean±SS	Median	(Min-Max.)
Altın otu	4.32±0.47	4.15	(4.00-5.00)	5.44±0.15	5.40	(5.30-5.64)
Anzer kekiği	5.92±0.24	6.00	(5.59-6.11)	5.49±0.43	5.50	(5.00-5.95)
Şeker otu	5.28±0.75	5.37	(4.30-6.10)	5.21±0.72	5.30	(4.30-5.96)
KHX	3.34±2.25	4.34	(0.00-4.70)	1.51±1.75	1.42	(0.00-3.20)
Distile su	4.21±0.34	4.30	(3.72-4.52)	6.26±0.51	6.37	(5.54-6.76)
p değeri		0.05			0.05	

[x] Kruskal Wallis, [y] One-Way ANOVA, *$p<0.05$
SS: Standart sapma; Min: Minimum; Max: Maksimum



Şekil 4.6. Polimikrobiyal biyofilmdeki canlı S. mutans sayıları

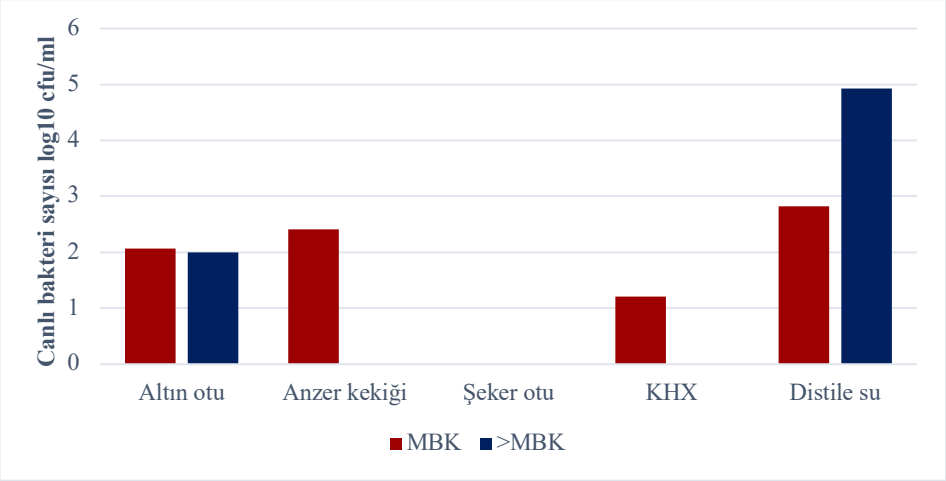
MBK ve >MBK değerleri esas alınarak hazırlanan deney solüsyonlarının polimikrobiyal biyofilm tabakasındaki *S. wiggsiae* sayısına etkileri Tablo 4.5 ve Şekil 4.7' de gösterilmektedir. Buna göre MBK derişiminde hazırlanan solüsyonların polimikrobiyal biyofilmdeki *S. wiggsiae* üzerine etkileri istatistiksel olarak önemsiz bulundu (p=0.304).

>MBK derişiminde hazırlanan solüsyonların polimikrobiyal biyofilmdeki *S. wiggsiae*' ye etkileri istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturdu (p=0.003). Buna göre grupların ikili karşılaştırmasında şeker otu, Anzer kekiği ve KHX solüsyonları ile yıkama yapılan gruplarda distile su grubuna göre daha az bakteri varlığı tespit edildi (p=0.012; p=0.012; p=0.012). Diğer gruplar arasında anlamlı düzeyde bir fark gözlenmedi (p>0.05).

Tablo 4.5. MBK ve >MBK değerlerine göre hazırlanan KHX ve bitki ekstraktlarının uygulandığı polimikrobiyal biyofilmdeki canlı *S. wiggsiae* sayılarının karşılaştırılması (log_{10} cfu/ml)

	MBK[x]			>MBK[y]		
Bitkiler	Mean±SS	Median	(Min-Max.)	Mean±SS	Median	(Min-Max.)
Altın otu	2.07±2.39	2.00	(0.00-4.30)	2.00±2.30	2.00	(0.00-4.00)
Anzer kekiği	2.41±2.80	2.23	(0.00-5.18)	0.00[a]	0.00	
Şeker otu	0.00	0.00		0.00[a]	0.00	
KHX	1.21±2.42	0.00	(0.00-4.85)	0.00[a]	0.00	
Distile su	2.82±0.27	2.83	(2.48-3.15)	4.93±0.34[b]	4.99	(4.48-5.30)
p değeri	0.304			**0.003***		

[x] Kruskal Wallis, [y] One-Way ANOVA, **p*<0.05
SS: Standart sapma; Min: Minimum; Max: Maksimum
[a-b]İstatistiksel olarak farklı; p<0.05



Şekil 4.7. Polimikrobiyal biyofilmdeki canlı *S. wiggsiae* sayıları

4.3.2.2. S. mutans, L. acidophilus ve S. wiggsiae Biyofilm Grubu

MBK ve >MBK değerleri esas alınarak hazırlanan deney solüsyonlarının polimikrobiyal biyofilm tabakasındaki *S. mutans* sayısına etkileri Tablo 4.6 ve Şekil 4.8'de gösterilmektedir. MBK değeri esas alınarak hazırlanan deney solüsyonlarının *polimikrobiyal* biyofilm tabasındaki *S. mutans* sayısına etkileri incelendiğinde gruplar arasında solüsyona göre bakteri sayılarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu

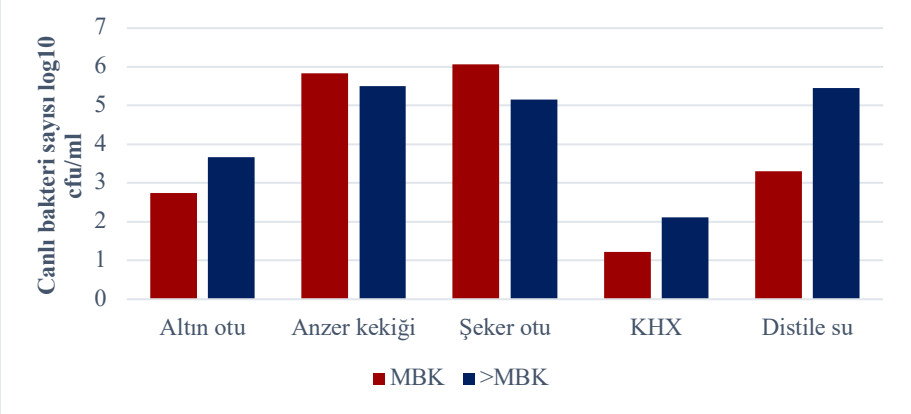
(p=0.012). Şeker otu grubuna göre KHX grubunda anlamlı düzeyde daha az sayıda *S. mutans* tespit edildi (p=0.026). Diğer gruplar arasındaki farkın anlamsız olduğu görüldü (p>0.05).

>MBK değeri esas alınarak hazırlanan deney solüsyonlarının polimikrobiyal biyofilmdeki *S. mutans* üzerine etkileri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmedi (p=0.05).

Tablo 4.6. MBK ve >MBK değerine göre hazırlanan KHX ve bitki ekstraktlarının uygulandığı polimikrobiyal biyofilmdeki canlı *S. mutans* sayılarının karşılaştırılması (log_{10} cfu/ml)

	MBK[x]			**>MBK[x]**		
Bitkiler	Mean±SS	Median	(Min-Max.)	Mean±SS	Median	(Min-Max.)
Altın otu	2.74±3.19	2.47	(0.00-6.02)	3.67±2.49	4.65	(0.00-5.40)
Anzer kekiği	5.83±0.38	5.75	(5.48-6.35)	5.51±0.54	5.51	(4.70-5.88)
Şeker otu	6.07±0.10	6.10	(5.92-6.18)[a]	5.15±0.56	5.09	(4.60-5.81)
KHX	1.22±2.45	0.00	(0.00-4.90)[b]	2.11±1.51	2.45	(0.00-3.57)
Distile su	3.30±0.89	2.96	(2.70-4.60)	5.46±0.30	5.39	(5.18-5.90)
p değeri		**0.012***			0.05	

[x] Kruskal Wallis, **p*<0.05
SS: Standart sapma; Min: Minimum; Max: Maksimum
[a-b] İstatistiksel olarak farklı; p<0.05



Şekil 4.8. Polimikrobiyal biyofilmdeki *S. mutans* sayıları

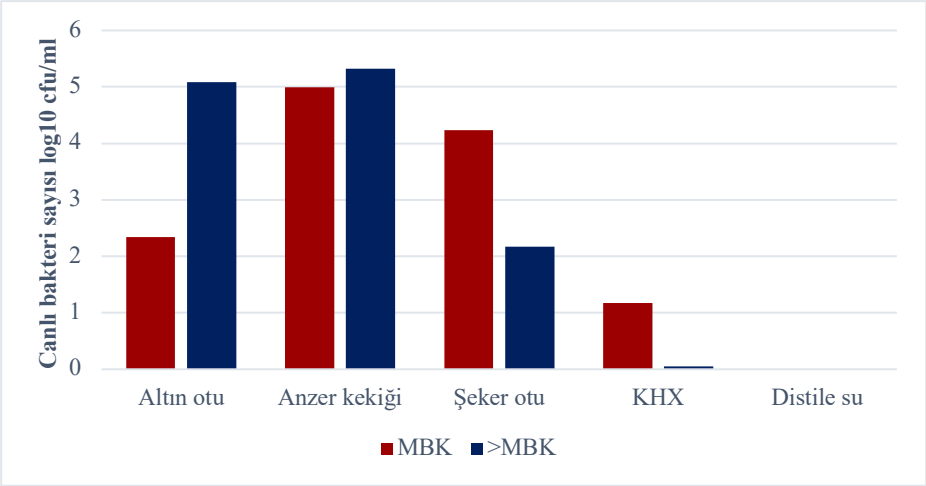
MBK ve >MBK değerlerine göre hazırlanan deney solüsyonlarının polimikrobiyal biyofilmdeki *L. acidophilus*' a karşı etkileri Tablo 4.7 ve Şekil 4.9' da gösterilmektedir. MBK değerlerine göre hazırlanan deney solüsyonların *L. acidophilus*' a karşı istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı (p=0.05).

>MBK değerinde hazırlanan solüsyonlara maruz bırakılan polimikrobiyal biyofilmdeki *L. acidophilus* sayıları arasında gruplara göre fark olduğu görüldü (p=0.005). Distile su grubuna göre Anzer kekiği grubunda daha çok sayıda *L. acidophilus* izlendi (p=0.021). Diğer gruplar arasında anlamlı ilişki bulunmadı (p>0.05).

Tablo 4.7. MBK ve >MBK değerlerine göre hazırlanan KHX ve bitki ekstraktlarının uygulandığı polimikrobiyal biyofilmdeki canlı *L. acidophilus* sayılarının karşılaştırılması (log_{10} cfu/ml)

	MBK[x]			**>MBK[x]**		
Bitkiler	Mean±SS	Median	(Min-Max.)	Mean±SS	Median	(Min-Max.)
Altın otu	2.34±2.71	2.34	(0.00-4.70)	5.08±0.57	5.12	(4.48-5.60)
Anzer kekiği	4.99±0.36	4.88	(4.70-5.51)	5.32±0.49	5.43	(4.70-5.74)[b]
Şeker otu	4.24±2.87	5.31	(0.00-6.34)	2.17±2.52	4.00	(0.00-4.70)
KHX	1.17±2.34	0.00	(0.00-4.70)	0.05±1.00	0.00	(0.00-2.00)
Distile su	0.00	0.00		0.00	0.00[a]	
p değeri		0.05			**0.005***	

[x] Kruskal Wallis, **p*<0.05
SS: Standart sapma; Min: Minimum; Max: Maksimum
[a-b] İstatistiksel olarak farklı; p<0.05



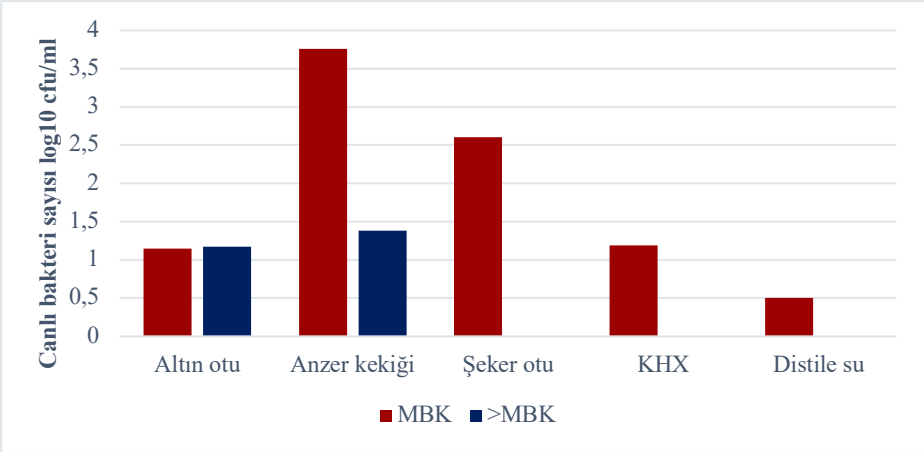
Şekil 4.9. Polimikrobiyal biyofilmdeki *L. acidophilus* sayıları

MBK ve >MBK değerleri esas alınarak hazırlanan deney solüsyonlarının polimikrobiyal biyofilm tabakasındaki *S. wiggsiae* sayısına etkileri Tablo 4.8 ve Şekil 4.10' da gösterilmektedir. Buna göre her iki derişimde hazırlanan solüsyonlara maruz bırakılan polimikrobiyal biyofilmdeki *S. wiggsiae* üzerine etkileri istatistiksel olarak önemsiz bulundu (p=0.319; p=0.530).

Tablo 4.8. MBK ve >MBK değerleri esas alınarak hazırlanan KHX ve bitki ekstraktlarının uygulandığı polimikrobiyal biyofilmdeki canlı *S. wiggsiae* sayılarının karşılaştırılması (log_{10} cfu/ml)

	MBK[x]			**>MBK[x]**		
Bitkiler	Mean±SS	Median	(Min-Max.)	Mean±SD	Median	(Min-Max.)
Altın otu	1.15±2.30	0.00	(0.00-4.60)	1.17±2.34	0.00	(0.00-4.70)
Anzer kekiği	3.76±2.54	4.72	(0.00-5.60)	1.38±2.77	0.00	(0.00-5.54)
Şeker otu	2.60±3.00	2.55	(0.00-5.30)	0.00	0.00	
KHX	1.19±2.38	0.00	(0.00-4.78)	0.00	0.00	
Distile su	0.50±1.00	0.00	(0.00-2.00)	0.00	0.00	
p değeri	0.319			0.530		

[x] Kruskal Wallis, **p*<0.05
SS: Standart sapma; Min: Minimum; Max: Maksimum



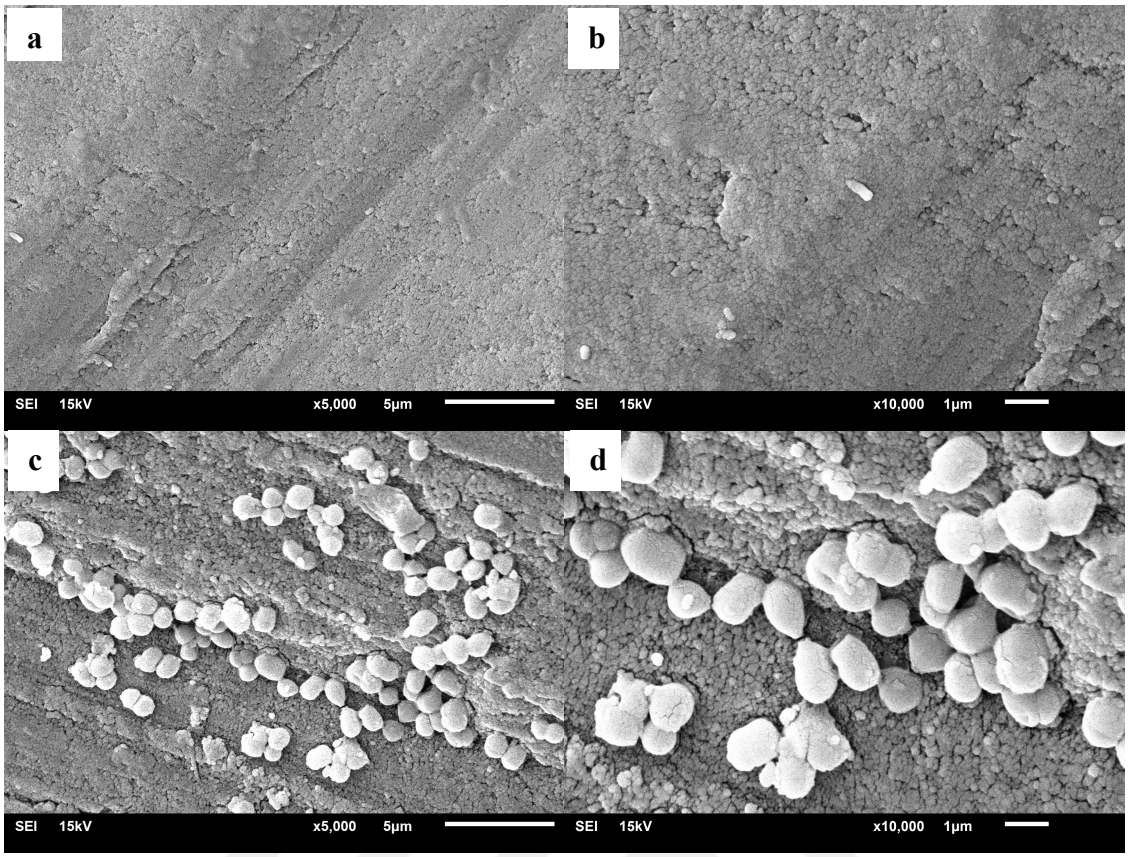
Şekil 4.10. Polimikrobiyal biyofilmdeki *S. wiggsiae* sayıları

4.4. KHX ve Bitki Ekstraktlarının Biyofilm Oluşumuna Etkilerinin SEM ile Görüntülenmesi

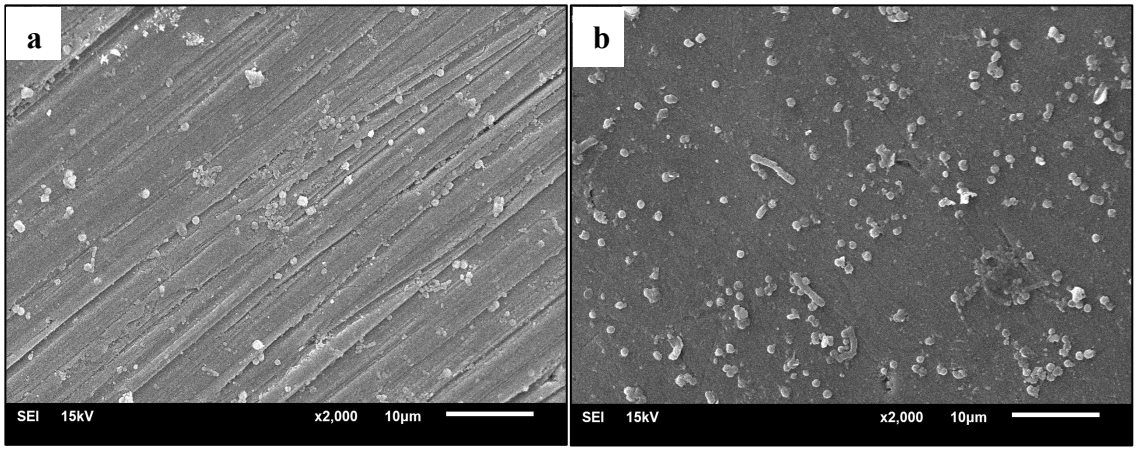
Diş yüzeylerinde oluşturulan biyofilm tabakaları SEM ile incelendi. *S. mutans, S. mutans* ve *S. wiggsiae, S. mutans, L acidophilus* ve *S. wiggsiae* bakterileri ile oluşturulan biyofilmlerin varlığı doğrulandı.

Şekil 4.10c-d' de ekstrasellüler polimerik matrikse tutunmuş *S. mutans* bakteri kolonileri görüldü. Üç günlük biyofilm örneğindeki *S. mutans* bakteri hücrelerinin düzgün şekilli, parlak ve pürüzsüz bir yapıya sahip oldukları izlendi.

Deney başlamadan önce 6 gün süre ile inkübe edilen, polimikrobiyal biyofilm gruplarının SEM görüntülerinde, *S. wiggsiae* bakterilerinin *S. mutans*' tan uzakta da kolonize olabildikleri izlendi (Şekil 4.11a-b). *L. acidophilus* bakterileri genellikle *S. mutans* bakterileri ile birlikte görüntülendi.

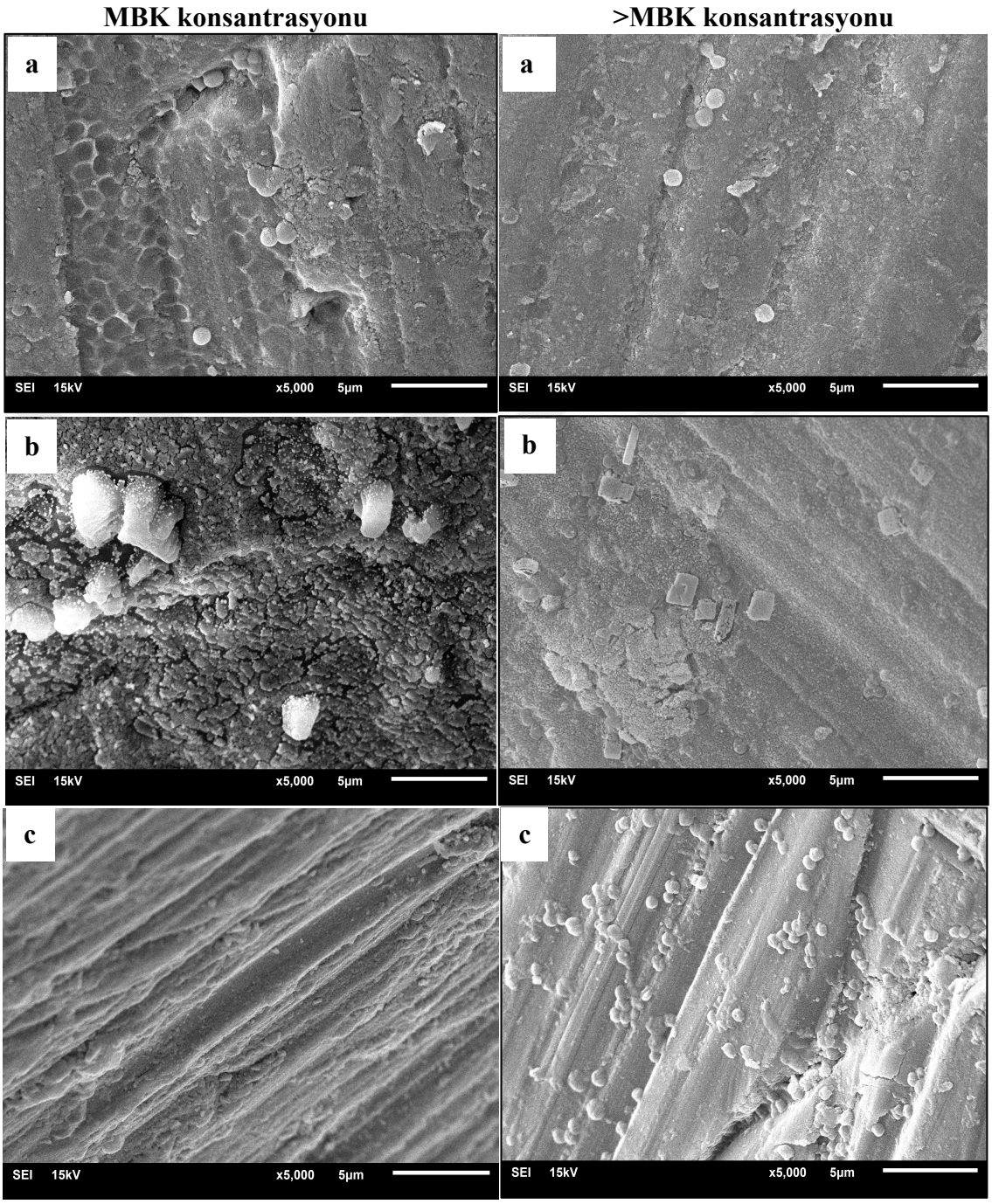


Şekil 4.11. Deney başlangıcında biyofilm oluşumuna ait SEM görüntüleri (x5000 ve x10000) **a, b.** İşlem görmemiş süt dişi yüzeyi, **c, d.** Mine yüzeyini kaplayan *S. mutans* biyofilm örneği

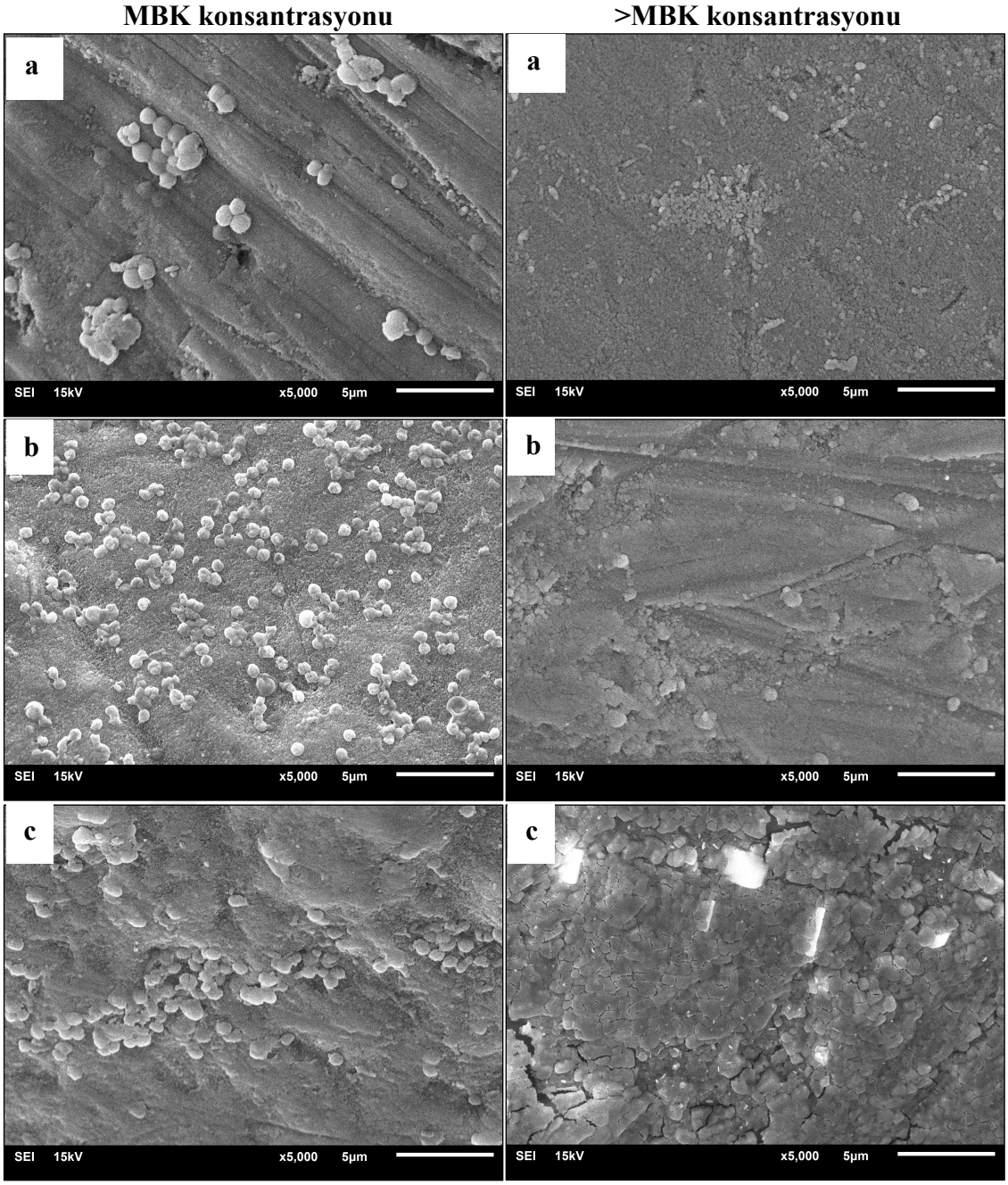


Şekil 4.12. a. Deney başlangıcında *S. mutans* ve *S. wiggsiae* bakteri gruplarının görüntüsü; **b.** Deney başlangıcında *S. mutans*, *L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* bakteri gruplarının görüntüsü

Bakterilerin adezyon gösterdiği diş yüzeylerinde opak noktalar görüldü (Şekil 4.13b). *S. mutans, L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* biyofilmi Şekil 4.13c.' de görüntülendi.

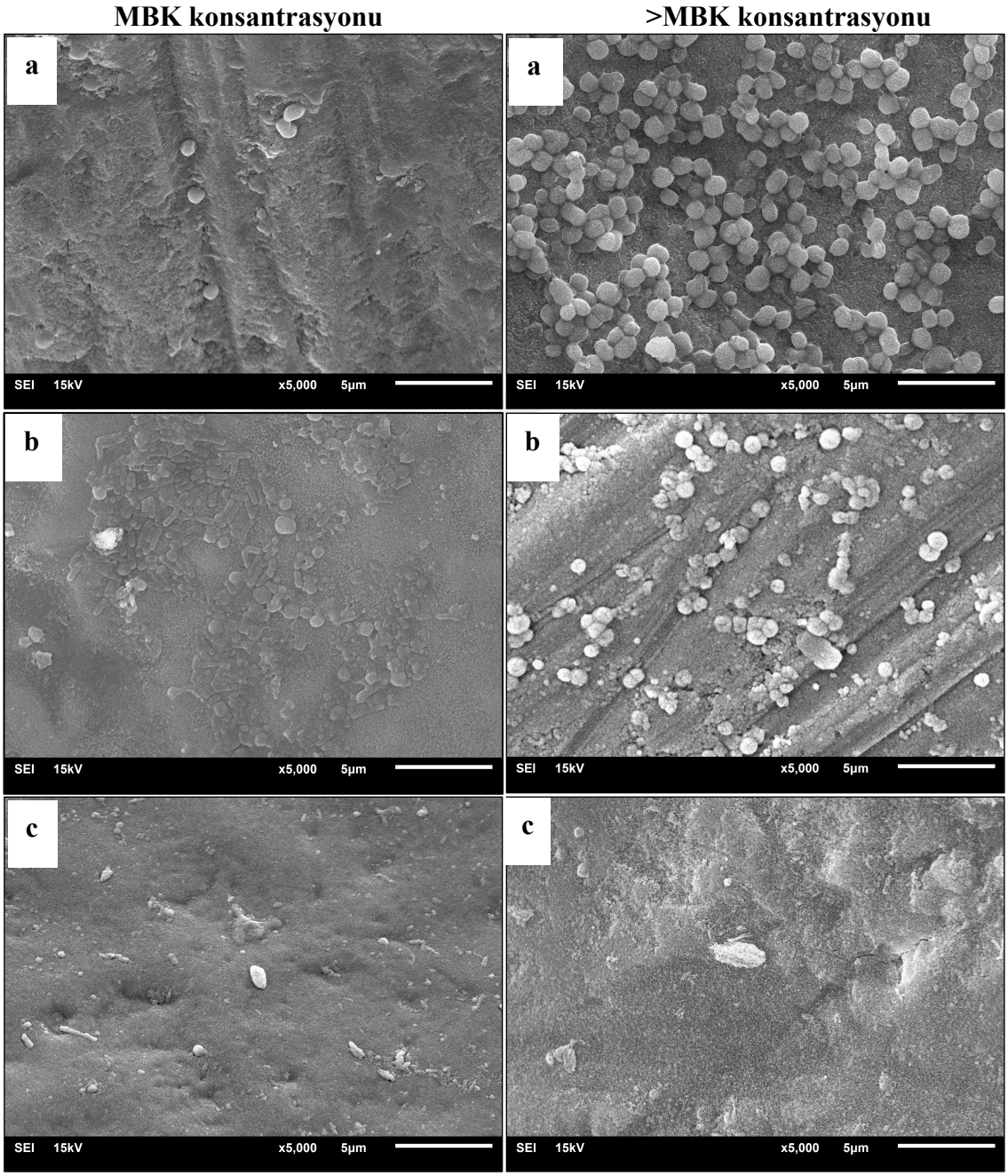


Şekil 4.13. Biyofilm oluşumunda altın otu ekstraktının etkisine ait SEM görüntüleri (x5000, x10000) **a.** *S. mutans* biyofilmi; **b.** *S. mutans* ve *S. wiggsiae* biyofilmi; **c.** *S. mutans*, *L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* biyofilmi



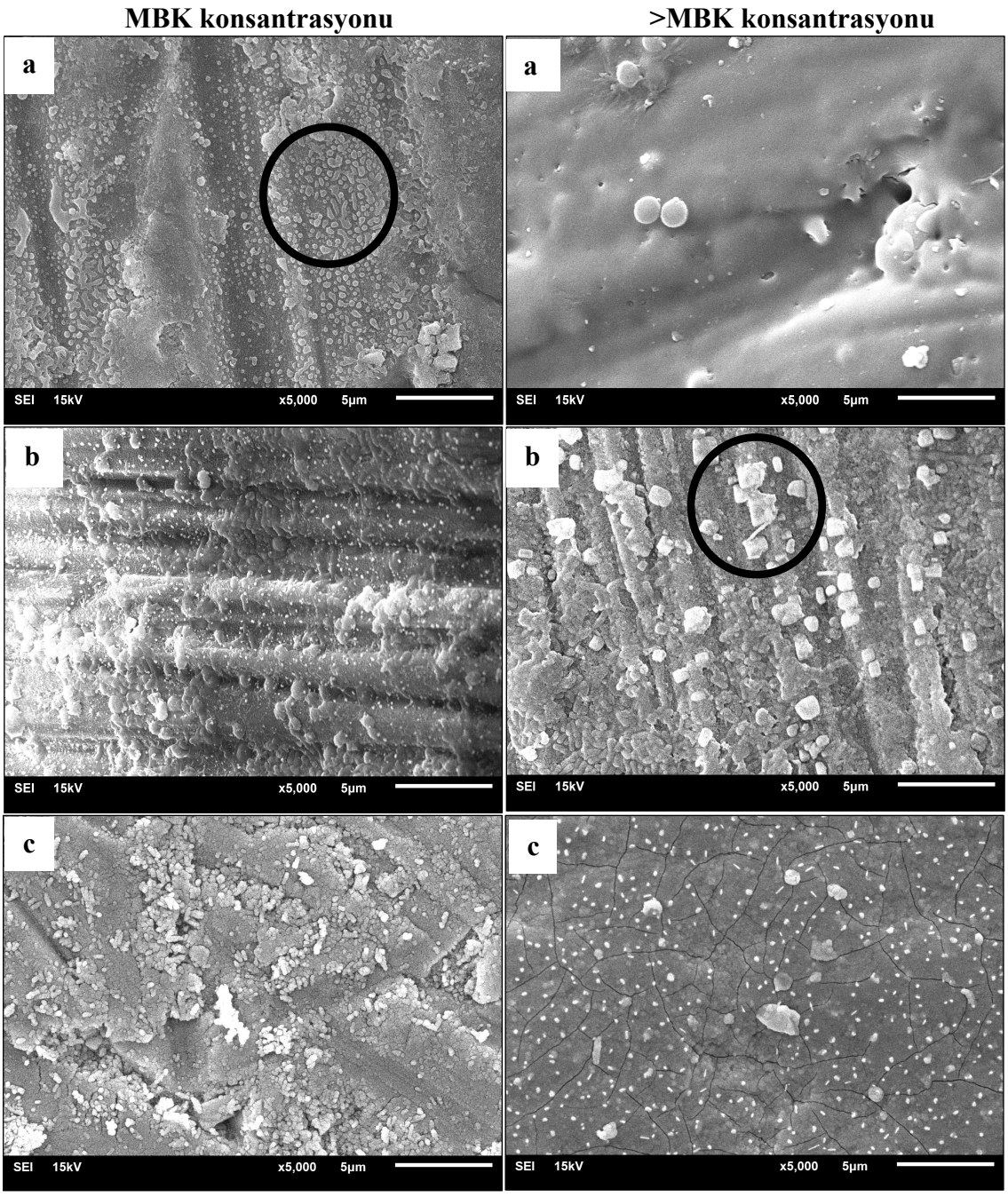
Şekil 4.14. Biyofilm oluşumunda Anzer kekiği ekstraktının etkisine ait SEM görüntüleri (x5000, x10000) **a.** *S. mutans* biyofilmi; **b.** *S. mutans* ve *S. wiggsiae* biyofilmi; **c.** *S. mutans*, *L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* biyofilmi

S. mutans biyofilm grubuna >MBK derişiminde uygulanan şeker otu ekstraktı sonrası *S. mutans* hücre duvarında beyaz, opak, kar tanesi şeklinde pürüzlülük ve kabartılar gözlemlendi. Şekil 4.15b' de yoğun olarak kümelenmiş *S. mutans* ve *S. wiggsiae* biyofilmi izlendi.



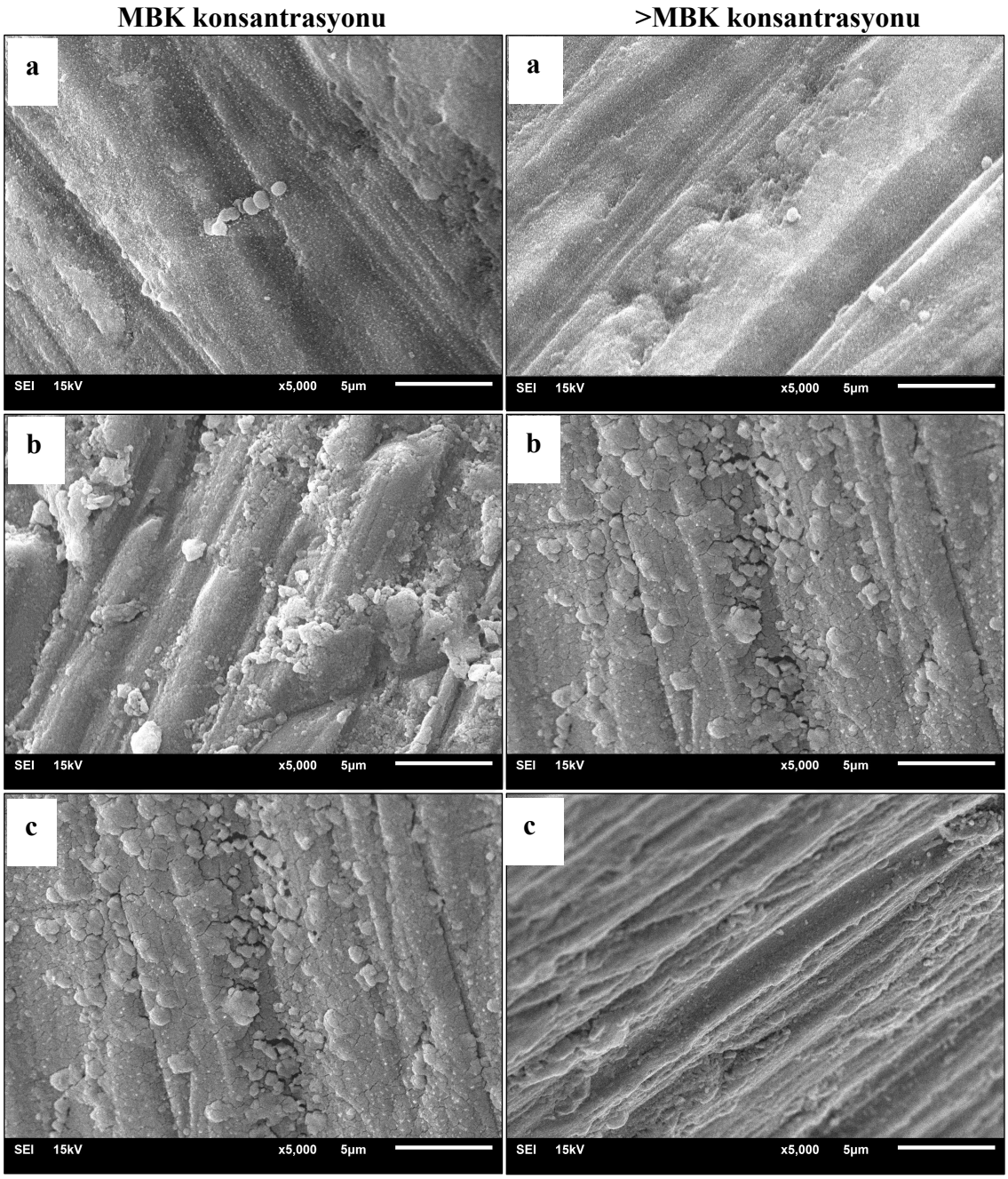
Şekil 4.15. Biyofilm oluşumunda şeker otu ekstraktının etkisine ait SEM görüntüleri (x5000, x10000) **a.** *S. mutans* biyofilmi**; b.** *S. mutans* ve *S. wiggsiae* biyofilmi**; c.** *S. mutans*, *L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* biyofilmi

S. mutans biyofilm grubuna MBK derişiminde uygulanan KHX' in diş yüzeyinde oluşturduğu çökelti Şekil 4.16a' da görüntülendi, Çökelmiş tuz partikülleri ise Şekil 4.16b' de gözlendi.



Şekil 4.16. Biyofilm oluşumunda KHX' nin etkisine ait SEM görüntüleri (x5000, x10000) **a.** *S. mutans* biyofilmi**; b.** *S. mutans* ve *S. wiggsiae* biyofilmi; **c.** *S. mutans*, *L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* biyofilmi

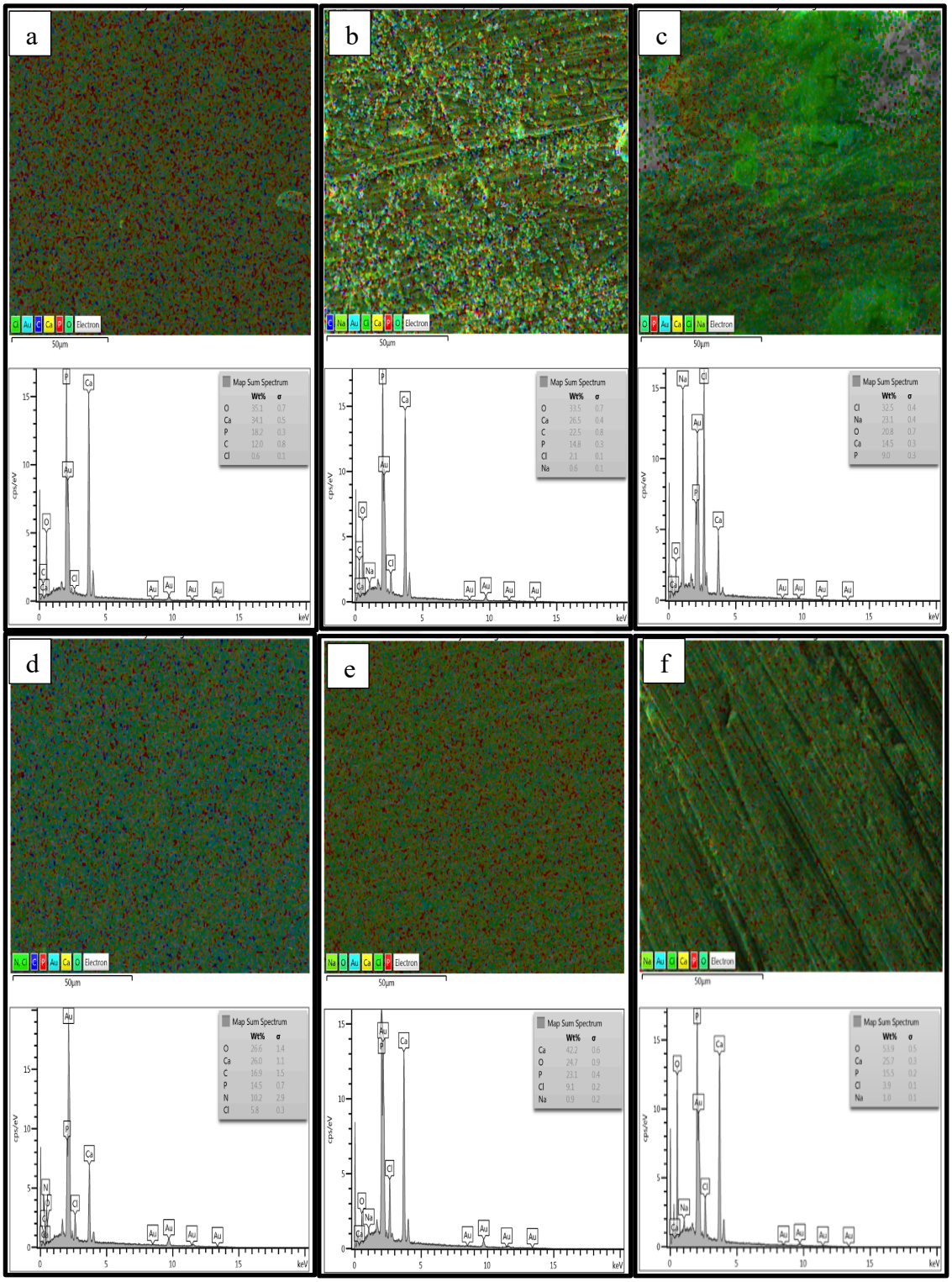
Şekil.4.17’ de bakteri ve mine yüzeylerinde kar tanesi şeklinde opasiteler izlendi.



Şekil 4.17. Biyofilm oluşumunda distile su ekstraktının etkisine ait SEM görüntüleri (x5000, x10000) **a.** *S. mutans* biyofilmi; **b.** *S. mutans* ve *S. wiggsiae* biyofilmi; **c.** *S. mutans*, *L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* biyofilmi

4.5. >MBK Değerinde Hazırlanan Deney Solüsyonlarının Diş Üzerine Etkisinin EDS ile İncelenmesi

Deneyin başlangıç ve bitiminde >MBK konsantrasyonunda hazırlanan solüsyon gruplarından rastgele seçilen birer diş EDS ile analiz edildi. Çalışmada incelenmek istenen Ca ve P elementleri periodik cetvelden seçilerek yüzeydeki minerallerin ölçümü gerçekleştirildi. Örnek içindeki elementlerin oluşturduğu pikler ve bu piklerin temsil ettiği X ışınları seçilerek, örnek yüzeyindeki her bir nokta için elementlerin göreceli oranı tespit edildi ve haritalandı. (Şekil 4.18.) Tablo 4.9' da yer alan verilerde deneyin bitiminde işlem görmemiş süt dişinin distile su grubuna göre anlamlı şekilde yüksek oranda Ca ihtiva ettiği tespit edildi ($p=0.038$). Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda diğer gruplar arasında korelasyon olmadığı belirlendi ($p>0.05$).



Şekil 4.18. EDS analizi yapılan grupların haritalaması ve mineral ölçümleri. **a.** İşlem görmemiş süt dişi; **b.** Altın otu; **c.** Anzer kekiği; **d.** Şeker otu; **e.** KHX; **f.** Distile su

Tablo 4.9. EDS analizi sonucu dişlerin mineral içeriklerindeki değişimler

Element		Bitkiler									
		Altın otu[a]		Anzer kekiği[a]		Şeker otu[a]		KHX[a]		Distile su[a]	
		Mean±SS	Median (Min-Max)	Mean±SS	Median (Min-Max)	Mean±SS	Median (Min-Max)	Mean±SS	Median (Min-Max)	Mean±SS	Median (Min-Max)
P	Önce	13.10±6.10	15.90 (6.1-17.3)	17.63±3.75	16.90 (14.30-21.70)	13.36±7.03	14.60 (5.80±19.70)	10.83±9.46	15.00 (0.00±17.50)	16.33±2.68	15.20 (14.40±19.40)
	Sonra	17.80±3.81	16.50 (14.8-22.1)	15.80±2.26	14.70 (14.30-18.40)	16.53±2.70	15.50 (14.50±19.60)	16.36±5.85	13.50 (12.50±23.10)	16.03±2.05	15.50 (14.30±18.30)
p değeri		0.293		0.637		0.629		0.908		0.711	
Ca	Önce	25.53±13.08	30.70 (9.5-33.4)	2.25±8.51	31.10 (24.40-41.30)	24.80±13.43	26.50 (10.60±37.30)	22.66±21.23	25.90 (0.00±42.10)	32.70±5.59	30.80 (28.33±39.00)
	Sonra	36.10±14.02	29.60 (26.5-52.2)	30.76±2.83	32.30 (27.50-32.50)	30.23±4.46	29.80 (26.00±34.90)	28.73±11.71	23.10 (20.90±42.20)	28.70±5.45	25.70 (25.40±35.00)
p değeri		0.280		0.790		0.651		0.227		**0.038***	
Ca/P	Önce	1.80±0.21	1.93 (1.56-1.93)	1.81±0.10	1.84 (1.71-1.90)	1.84±0.42	1.82 (1.82-1.89)	1.98±0.36	1.83 (1.73±2.41)	2.00±0.03	2.01 (1.97±2.03)
	Sonra	1.98±0.32	1.79 (1.79-2.36)	1.96±0.27	1.87 (1.76-2.27)	1.83±0.07	1.79 (1.78-1.92)	1.73±0.08	1.71 (1.67±1.83)	1.78±0.12	1.77 (1.66±1.91)
p değeri		0.285		0.307		0.851		0.263		0.073	

[a] Kruskal Wallis
**p*<0.05
SS: Standart sapma; Min: Minimum; Max: Maksimum

5. TARTIŞMA

Diş çürüğü, biyofilm orijinli ve diyet şekerleri alımıyla yüksek oranda ilişkili olan en yaygın, kronik çocukluk çağı hastalığıdır.[45] Diyetle alınan şekerlerin biyofilm mikroorganizmaları tarafından fermantasyonu asit üretimine yol açarak mikrobiyal homeostazı bozar ve diş minerallerinin çözünmesine neden olur.[35]

Dişe yapışan protein ve polisakkaritlerden oluşan dental plak içinde çok sayıda mikrobiyal tür bulunmaktadır. Dental plakta bulunan *S. mutans*, diş çürüğünün primer patojeni olup karyojenite ile en çok ilişkilendirilen mikroorganizmadır.[47] Çürüğün ileri safhalarında aktif role sahip *L. acidophilus* diş yüzeyinde kolonize olabilmek için başta streptokok olmak üzere diğer oral patojenlerin ürettiği polisakkaritlere tutunmaktadır.[62] Şiddetli EÇÇ ile ilişkili olduğu belirlenen *S. wiggsiae*[41,63], daha önce "*Bifidobacterium*" klonu CX010 olarak isimlendirilmiştir.[161] Ağız ortamında *S. mutans* bulunmayan ancak diş çürüğü tespit edilen çocukların % 40' ından *S. wiggsiae* izole edildiği rapor edilmiştir.[78]

Diş çürüğü, koruyucu diş hekimliği uygulamaları ile engellenebilir ve başlangıç aşamasında gelişimi durdurabilir bir hastalıktır. Herhangi bir kavitasyon oluşmadan biyofilm kontrolüne yönelik koruyucu uygulamalar yapılarak diş dokusu kaybının önüne geçilebilmektedir. Günümüzde plak kontrolünü sağlama konusunda en etkili yöntemin diş fırçası ve arayüz temizlik araçları ile yapılan mekanik temizlik olduğu belirtilmektedir.[7] Mekanik plak kontrol yöntemlerine yardımcı olmak için kullanılan antimikrobiyal ajanların başında gelen ve ebeveyn gözetimi altında kullanılan diş macunları ve ağız gargaraları ile hekim tarafından uygulanan florürlü jel ve verniklerin içeriklerindeki bazı kimyasalların sağlık için zararlı olduğu belirtilmektedir. Özellikle

temel ağız sağlığı koruma programlarında adı ilk sırada yer alan diş macunlarının içeriğindeki florür, sodyum lauril sülfat ve triklosan gibi bileşenlerin lokalize (ağız içi iltihabı, dil iltihabı, diş eti iltihabı, yanak mukozası iltihabı) ve sistemik alerji, akut veya kronik zehirlenme reaksiyonları gibi yan etkilere yol açabildikleri gösterilmiştir.[10,12,13]

Günlük florür alımı için güvenli aralık 0.005-0.07 mg F/kg (ppm) olarak belirtilmiştir.[162] Florürün fazla miktarda alınması ile akut veya kronik toksisite meydana gelebilmektedir. Çocuklarda 5 mg/kg florürün alınması ile akut toksisite görülürken optimum günlük dozun üzerinde veya farklı dozlarda uzun süre alınması ile kronik toksisite ortaya çıkmaktadır.[162] Kronik florür toksisitesi sonucu gelişen dental florozis, dişlerin gelişimleri sırasında yüksek konsantrasyonda florüre maruz kalması sonucu minenin mineral içeriğinin azalması ve pörözitesinin artmasına yol açan gelişimsel bir mine defektidir.[162]

Çocuklarda kullanım kısıtlılığına rağmen gargaraların içeriğindeki KHX' nin düşük dozlarda bile epitel hücreleri, gingival fibroblastlar, nötrofiller, makrofajlar ve kırmızı kan hücrelerine karşı toksik etkisinin olduğu ve insan periodontal ligament hücrelerindeki protein sentezini inhibe ettiği bildirilmiştir.[95,163] Dişlerde, restoratif materyallerde ve dilde kahverengi renk değişikliği, tat duyusunu değiştirmesi (özellikle tuz tadı için), yüksek konsantrasyonlarda mukozal erozyon, nadir durumlarda parotis şişmesi ve artmış supragingival taş oluşumu gibi çok sayıda yan etkisi bulunmaktadır.[164] Koruyucu ve önleyici tedavilerin temelini oluşturan bu kimyasalların çocuklar için olası yan etkileri bitkisel içerikli ürünlerin popülaritesinin artmasını ve bu konudaki çalışmaların hız kazanmasını sağlamıştır.

Yapılan literatür araştırmasında nispeten yeni bir tür olan *S. wiggsiae*' nin insan dişleri üzerinde polimikrobiyal biyofilm oluşturularak kullanıldığı başka bir in vitro

çalışmaya rastlanmadı. Ayrıca Anzer kekiği ve altın otu bitkilerinin oral patojenler üzerinde antimikrobiyal etkinliklerini değerlendiren bir çalışma görülmedi. Bu amaçla tez çalışmasında altın otu, Anzer kekiği ve şeker otu bitkilerinden hazırlanan farklı konsantrasyondaki solüsyonların *S. mutans, L. acidophilus* ve *S. wiggsiae* bakterilerinden oluşturulan biyofilm grupları üzerindeki etkinlikleri değerlendirildi.

Çalışmada üç farklı biyofilm grubu oluşturuldu. Tüm biyofilm gruplarının üreyebileceği ortak besiyeri ve ilave sükroz kullanılarak bunların farklılığından doğabilecek olumsuzluklar minimalize edildi. *S. mutans* biyofilm grubunda 37 °C' de üç günlük inkübasyon süresi tercih edildi. Bu süre boyunca % 2 sükroz içeren MRSB+TSB (1:1) besiyeri 24 saatte bir yenilendi. *S. mutans* biyofilminin oluşumu için 48-72 saatlik inkübasyon sürelerinin kullanıldığı ve bu süre boyunca besiyerine % 0.2-10 sükroz ilavesinin yapıldığı çalışmalar literatürde yer almaktadır.[1,165,166]

Yalnızca anaerob şartlarda üreyebilen *S. wiggsiae*' yi Tanner ve ark.[6] ile Bossù ve arkadaşları[167] beş, Downes ve ark.[63] yedi, Chalmers ve ark.[168] on iki günlük inkübasyon süresinin sonunda üretebilmişlerdir. Yapılan tez çalışmasında *S. wiggsiae* için BHIA ve MYPG agar kullanarak üç günlük anaerobik inkübasyon periyodunun bitiminde kültürler aktifleştirildi. Daha sonra % 2 sükroz ilaveli MRSB+TSB (1:1) sıvı besiyeri kullanılarak 6 günlük inkübasyonun ardından biyofilm oluşumu izlenerek tedavi protokolüne başlandı.

Bitki özütlerinin antimikrobiyal etkinliklerinin değerlendirildiği çalışmalarda uygulamaların farklı sürelerde yapıldığı görülmektedir. Philip ve ark.[1], *S. mutans* biyofilmi oluşturulan dentin diskleri üzerinde dut meyvesinden hazırlanan ekstraktı 1 saat süre ile uygulamış ve ekstraktın bakterinin canlılığından ziyade virülansını bozarak etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada deney solüsyonları, *S. mutans* ile

enfekte edilmiş sığır dişlerine 15 dakika süre ile günde üç defa uygulanmış ve bu döngü 4 gün boyunca sürdürülmüştür.[169] Tedavi solüsyonu olarak kakao polifenollerinin *S. mutans* ve *S. sanguis* bakterileri üzerinde test edildiği çalışmada, 15 ve 60 dakikalık deney süreleri tercih edilmiştir.[170] Zhao ve ark.[3] besiyerine ilave ettikleri üzüm çekirdeği ekstraktını *S. mutans* ile çürük lezyonu oluşturulan dişler üzerine bir hafta boyunca her gün solüsyonu yenileyerek uygulamışlardır. Bu çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliklerini değerlendirmek için biyofilm oluşturulan diş örnekleri 30 dk süresince deney solüsyonlarına maruz bırakıldı.

Nadelman ve ark.[159] *S. mutans* bakterisini kullandıkları çalışmada 5 günlük süre ile tedavi solüsyonlarını uygulamıştır. Bu sonuçlar göz önünde bulundurularak *S. mutans* biyofilm grubu için 5 gün boyunca, diğer biyofilm grupları için biyofilm oluşumunun tespit edildiği gün içerisinde olmak üzere tedavi solüsyonları uygulandı. Alviano ve ark.[171] anaerobik oral patojenleri kullanarak bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliğini inceledikleri çalışmada bakterileri kültüre ettikten sonra 30 dakikalık tedavi protokolü uygulamış ve deneyi sonlandırmışlardır. Bu çalışmada da anaerobik mikroorganizmaların bulunduğu biyofilm gruplarına 1 kez 30 dk' lık deney solüsyonları uygulandı.

Tıbbi ve aromatik bitkilerden çeşitli çözücüler (etanol, metanol, aseton, etil asetat, kloroform, hekzan, distile su vb.) aracılığı ile elde edilen ekstraktlar içerdikleri bileşikler sayesinde hastalıklara iyi gelmektedir. Bu çalışma kullanılan altın otu, Anzer kekiği ve şeker otu bitkileri açık havada kurutulup öğütüldükten sonra soxhlet ekstraksiyon yöntemiyle metanol kullanılarak ekstrakte edildi. Ayrıca çözücü etkinliğini ortadan kaldırıp yalnızca bitkinin kendi etkinliğinin değerlendirilebilmesi amacıyla elde edilen ekstraktlar ile hazırlanan tedavi solüsyonlarına metanol yerine distile su ilave edildi. Kim

ve Jin[172] bitki ekstraksiyonu için etanol kullanırken, Hammad ve ark.[119] kekik bitkisinin ekstraksiyonu için distile su tercih etmiştir. Başka bir çalışmada ise bitki karışımın ekstraksiyonu için kloroform/metanol karışımı kullanılmış, çözücü uzaklaştırıldıktan sonra tedavi solüsyonu için polar bir çözücü olan % 1 dimetil sülfoksit uygulanmıştır.[173]

Aromatik ve tıbbi özellikleri olan kekik, antioksidan ve antimikrobiyal özelliklere sahip 60' tan fazla bileşen içeren oldukça popüler bir bitkidir.[174] Kekik bitkisine bu özellikleri kazandıran ana bileşenler timol, karvakrol ile monoterpen hidrokarbonlarıdır.[174] Diş hekimliğinde oldukça yaygın kullanım alanına sahip kekik ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada kekik türlerinin *S. mutans* ve *L. acidophilus'* un da içinde bulunduğu sekiz bakteriye karşı antimikrobiyal etkinlik gösterdiği saptanmıştır.[120] Kekik bitkisinden elde edilen yağın *S. pyogenes*, *S. mutans*, *C. albicans*, *A. actinomycetemcomitans* ve *P. gingivalis*' in klinik örnekleri üzerinde güçlü antimikrobiyal aktivite sergilediği sonucuna varılmıştır.[121] Vardar-Ünlü ve ark.[175] tarafından yapılan bir çalışmada kekik bitkisinin metanollü ekstraktının polar alt fraksiyonu bakterilere karşı herhangi bir aktivite göstermezken polar olmayan formu mayalar ve *Streptococcus pneumoniae'* ye karşı etkili bulunmuştur. Tichy ve Novak[176] çözücü olarak su, etanol, metanol, aseton, kloroform, bütanol, etil asetat ve bunların çeşitli karışımlarını kullanarak hazırladığı içlerinde kekik bitkisinin de bulunduğu 27 çeşit ekstraktın oral streptokoklar üzerinde antimikrobiyal etkinliğini test etmiştir. Buna göre en çok antibakteriyel özellik gösteren ekstraktlar taze bitkilerin % 60 etanol ile ekstraktsiyonu ile elde edilmiştir.[176]

Şekeroğlu ve ark.[14] Anzer kekiğinden hidrodistilasyon tekniği ile elde edilen uçucu yağın *S. aureus*, *Bacteriodes subtilis*, *Escherichia coli* ve *C. albicans*' a karşı güçlü antibakteriyel aktivite sergilediğini göstermiştir.[14] Schött ve ark.[177]' nın yaptıkları bir in

situ çalışmada ise sığır dişinden elde edilen mine plakaları deneklerin ağzında 8 saat inkübe edilerek biyofilm oluşturulmuştur. Deneklerden, hazırlanan kekik esansiyel yağı ve kekik suyu ile 10 dakika boyunca çalkalama yapmaları istenmiştir. Deney sonunda kekik esansiyel yağının bakteri sayısı üzerine anlamlı bir etkisi bulunmazken kekiğin sulu çözeltisinin bakteri sayısını azaltarak kolonizasyonu geciktirdiği saptanmıştır.[177] Schött ve ark.[177] *S. mutans* üzerinde 10 mg/ml derişimde uygulanan etanollü kekik ekstraktının negatif kontrol grubuna göre etkili olduğunu bulmuştur. Schött ve ark.[177]' nın bulgularına benzer şekilde bu çalışmada distile suya kıyasla 0.5 mg/ml derişimde hazırlanan Anzer kekiği ekstraktının *S. mutans* sayısını anlamlı şekilde azalttığı tespit edildi. Polimikrobiyal (*S. mutans*, *S. wiggsiae*) biyofilm grubunda ise 0.5 mg/ml derişimde hazırlanan Anzer kekiğinin distile suya kıyasla *S wiggsiae* üzerinde daha etkili olduğu görüldü.

Fermente edilebilen diyet şekerinin diş çürüğü etiyolojisinde önemli bir faktör olduğu bilinmektedir. Sükroz, bakteri plağının oluşumuna ve gelişimine katkıda bulunan önemli bir etkendir.[178] Walsh[179] çalışmasında sükroza maruz bırakılan diş plağının hızla asit üretebildiğini, pH' nın hızlı bir şekilde düştüğünü ve ardından önceki plak pH' sına doğru kademeli olarak yükseldiğini göstermiştir. Bu nedenle diyette yer alan sükrozun fermente edilemeyen şekerler ile değiştirilmesi, çürük gelişiminin önlenmesinde önemli bir strateji haline gelmiştir. Ancak fermente edilemeyen tatlandırıcıların çoğunun kendine özgü yan etkileri bulunmaktadır ve uzun süreli tüketimi insanlarda sağlık sorunlarına yol açmaktadır.[179] Bu durum göz önünde bulundurularak çalışmada doğal bir tatlandırıcı olan şeker otu bitkisi kullanıldı.

Razak ve ark.[180] şeker otu gibi alternatif tatlandırıcıların streptokok biyofilmlerinde hücre dışı matriks varlığını ksilitol kadar etkili şekilde azaltabildiğini

göstermiştir. Gamboa ve Chaves[181], şeker otu yapraklarından hazırlanan ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesini değerlendirdikleri in vitro çalışmada, hem *S. mutans* hem de *Lactobacilli* üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Siraj ve ark.[178] ise şeker otu bitkisinin su ile hazırlanan ekstraktının *S. mutans* ve *L. acidophilus'* a karşı antimikrobiyal etkinlik göstermediğini saptamıştır. *S. mutans*' a karşı alkollü ve sulu şeker otu ekstraktlarının etkisini inceleyen bir başka çalışmada, alkolle hazırlanan şeker otu ekstraktının KHX ile benzer antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir.[182] Ekstraksiyon işleminde metanol, etanol gibi alkol içerikli çözücülerin kullanılması ile bitkilerin kendi antimikrobiyal etkinliklerinin önüne geçilmektedir.

Mousumi[112] tarafından yapılan bir çalışmada ise şeker otunun kloroform ve metanol ile hazırlanan ekstraktlarının antimikrobiyal özellikleri karşılaştırılmıştır. Buna göre antimikrobiyal etkinliklerinin konsantrasyona bağlı arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Agajannanavar ve ark.[182] şeker otu bitkisinin etil alkolle hazırlanan çözeltisinin MİK değerini *S. mutans* için 0.125 mg/ml, *L. acidophilus* için 0.625 mg/ml olarak belirlemiştir. Bu çalışmada ise MİK değerleri *S. mutans* için 0.250 mg/ml, *L. acidophilus* için 0.125 mg/ml ve *S. wiggsiae* için 0.250 mg/ml olarak hesaplandı. MİK değerlerindeki değişkenliğin çözücünün cinsi, bitkilerin kurutma ve ekstraksiyon yöntemi, sıcaklık, bitkisel veya mevsimsel farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada monomikrobiyal biyofilm grubuna uygulanan şeker otu ekstraktının distile suya göre *S. mutans* sayılarını daha çok azalttığı tespit edildi. Polimikrobiyal (*S. mutans*, *S. wiggsaiae*) biyofilm grubunda >MBK derişiminde hazırlanan şeker otunun distile su grubuna göre *S. wiggsaiae* sayılarını anlamlı şekilde azalttığı gözlendi. Polimikrobiyal (*S. mutans*, *L. acidophilus*, *S. wiggsaiae*) biyofilm grubunda ise MBK konsantrasyonunda

hazırlanan şeker otu ekstraktına göre KHX' nin *S. mutans* sayısını anlamlı şekilde azalttığı görüldü.

Geleneksel tıpta iyi bilinen bir tür olan altın otu bitkisinin antibakteriyel, antiviral, antifungal, antienflamatuar vb. birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir.[123] Bu çalışmada kullanılan altın otu türünün oral patojenler üzerindeki etkinliği daha önce herhangi bir çalışmada değerlendirilmemiştir. Ancak az sayıda araştırmada farklı altın otu türleri ile oral patojenler birlikte çalışılmıştır.[183-185]

Motamedifar ve ark.[184] yapmış oldukları çalışmada *Helichrysum leucocephalum* bitkisinin hidroalkalik çözeltisinin *S. mutans* üzerinde antibakteriyel etkinlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ferrazzano ve ark.[183] tarafından yapılan in vivo çalışmada *Helichrysum litoreum*' un etanollü ekstraktından hazırlanan gargara solüsyonu ile günlük düzenli çalkalama yapan deneklerin % 50' sinde, ağız boşluğundaki karyojenik patojenlerden olan *S.mutans*' ın tükürükteki seviyesinin azaldığı gösterilmiştir.[183] *Helichrysum italicum'* un etanol ile hazırlanan ekstraktının lam üzerinde kolonize olan *S. mutans* hücrelerinin sükroza bağlı yapışmasını ve aynı ekstrakt ile inkübe edilen *S. mutans*' ın dekstran ilavesine rağmen agregasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir.[185] Bu çalışmada *S. mutans* biyofilm grubunda >MBK konsantrasyonunda hazırlanan altın otu türünün distile suya kıyasla daha güçlü antimikrobiyal etkinlik sergilediği görüldü.

Bu çalışmada pozitif kontrol grubu olarak oral bakteriler üzerinde antibakteriyel etkinliği kanıtlanmış bir ajan olan KHX kullanıldı. Gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkili ve geniş spekturumlu KHX lokal enfeksiyonların tedavisinde altın standart olarak kabul edilmektedir.[186] Bis-biguanid bileşiklerinden olan KHX, geniş spektrumlu antibakteriyel özellik gösteren katyonik bir bileşiktir.

KHX' in, *S. mutans* üzerinde etkili olduğunu, plak oluşumunu ve asit üretimini engellediğini gösteren çalışmalar mevcuttur.[187,188] Netto ve ark.[189], % 0.12' lik KHX gargara kullanan hastalardan 7. ve 14. gün topladıkları tükürük örneklerindeki *S. mutans* düzeylerinde önemli farklılıklar olduğunu bildirmiş ancak laktobasil sayılarında herhangi bir fark gözlemlememişlerdir. Albertsson ve ark. [190], % 0.12' lik KHX ile yapılan 16 günlük ağız gargarası sonucunda, *S. mutans* ve laktobasil sayılarında önemli derecede azalma olduğunu rapor etmiştir. Lamarque ve ark.[166] ise *S. mutans* sayılarında herhangi bir değişiklik olmaksızın % 0.12' lik KHX uygulamasından 24 saat sonra toplam laktobasil sayısında önemli azalma olduğunu belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında *S. mutans* biyofilm grubunda MBK ve >MBK konsantrasyonlarında hazırlanan KHX' nin distile su grubuna göre daha etkili olduğu bulundu. *S. mutans* biyofilm grubunda >MBK derişiminde hazırlanan KHX' nin diğer tüm gruplara göre bakteri sayısını anlamlı şekilde azalttığı tespit edildi. Polimikrobiyal (*S. mutans*, *S. wiggsaiae*) biyofilm grubunda >MBK' da hazırlanan solüsyonlardan KHX' nin distile su grubuna göre *S. wiggsaiae* sayısını azalttığı görüldü. Polimikrobiyal (*S. mutans*, *L. acidophilus*, *S. wiggsaiae*) biyofilm grubunda MBK derişiminde hazırlanan KHX' in şeker otuna göre *S. mutans* sayılarını daha etkili şekilde azalttığı izlendi. Bu sonuçlar Lamarque ve ark.[166], Albuquerque ve ark.[191], Ramalingam ve ark.[173], Pires ve ark.[192], Philip ve ark.[1], Valerie ve ark.[193] ve Hannig ve ark.[194]' nın yapmış oldukları çalışmaları desteklemektedir.

Bakteriler tüm canlı organizmalar arasında neredeyse her çevresel ortamda yaşayabilen türlerdir. Bu konudaki başarıları dış ortamdaki değişiklikleri algılamaları ve bunlara tepki vermelerini sağlayacak şekilde stres stratejileri geliştirmelerine bağlanmaktadır. Hücre dışı ortamın ozmolaritesi bakterilerin etkilendiği çevresel parametrelerden biridir. Dış çevrenin ozmolaritesindeki değişikliklere uyum sağlama

yeteneği bakterilerin büyümesi ve hayatta kalması için oldukça önemlidir. Bu nedenle çevresel parametrelerde meydana gelen değişikliklerle başa çıkmak için bir dizi ozmoadaptif strateji geliştirebilmektedirler.[195]

Bakterinin maruz kaldığı hiper-ozmotik şok, sitoplazmik hacmin önemli ölçüde küçülmesine neden olmaktadır. Plazmoliz olarak bilinen bu süreç, hücrelerin artan ozmolariteye sahip ortama sokulması üzerine kültürlerin bulanıklığında anlık bir artış olarak gözlenmektedir.[196] Plazmolizin kinetiği ve kapsamı, ortamın ozmolaritesindeki artışın büyüklüğüne bağlıdır. Doğal ortamlarındaki bakterilerin hiper-ozmotik şok kadar hipo-ozmotik veya dilüsyon stresiyle karşılaşma olasılığı da bulunmaktadır. Dış çevrenin su aktivitesindeki hızlı artış hücre içerisine büyük miktarda su girmesine neden olmaktadır. Bu durum hücre parçalanmasını önlemek için bakterilerin hızlı bir şekilde reaksiyona girmesini gerektirmektedir. Pek çok bakteri hiper ozmotik ortamlar tarafından zorlandığında iyonları ve organik ozmolitleri biriktirerek hipo-ozmotik koşullarla karşılaştığında onları dışarı salmaktadır. *Lactobacillus plantarum*' un, hipo-ozmotik şoka maruz kaldığında, hızlı şekilde glisin betain, prolin ve bazı glutamatları hücre dışına pompalarken diğer amino asitleri bünyesinde tutmaya devam ettiği belirlenmiştir.[197] Jewell ve Kashet[198] *Lactobacillus casei subsp. Rhamnosus*' un, hipo-ozmotik şoka uğradığında 1 dakika içerisinde hücre içinde biriken prolinin % 90' ını hücre dışına çıkardığı gözlenmiştir.

Bu çalışmada polimikrobiyal biyofilm (*S. mutans*, *L. acidophilus*, *S. wiggsaiae*) grubunda yer alan *L. acidophilus*' un >MBK' da hazırlanan solüsyonlardan Anzer kekiğine kıyasla distile suda daha az sayıda olduğu gözlendi. Bu durum polimikrobiyal biyofilm grubunda bulunan *L. acidophilus*' un hipo-ozmotik şoka uğradığını düşündürmektedir. Ozmotik regülasyonunu sağlayamayan hücrelerin parçalanması

sonucu diğer gruplara kıyasla distile su ile yıkama yapılan grupta daha az bakteri bulunduğu görüldü.

Tıbbi bitkilerin farklı kompozisyonlarda hazırlanan biyofilmler üzerindeki antimikrobiyal etkinliklerinin değerlendirildiği tez çalışmasında SEM görüntüleme yöntemi ile sonuçlar desteklendi. Buna göre elde edilen SEM bulgularında *S. mutans* biyofilminde MBK ve >MBK konsantrasyonlarında hazırlanan KHX' nin mine yüzeyini kapladığı görüldü. Distile su grubunda saçılmış kar taneleri şeklindeki SEM görüntüsünün ozmotik strese giren bakterilerin ozmoregülasyonu sağlayabilmeleri için sentezledikleri peptitler veya parçalanan bakteri artıkları olduğu düşünülmektedir. Ancak kesin sonuca varılabilmesi için kütle spektrofotometresi ile doğrulanması gerekmektedir. Besinis ve ark.[199]' nın yapmış oldukları bir çalışmada ultra saf suyun (Milli-Q), salin negatif kontrol grubuna göre daha fazla antimikrobiyal özellik sergilemesi bu çalışmanın bulgularını desteklemektedir. Ayrıca Farkas ve ark.[200] bakteriyel hücre membranının lizisi gerçekleşirken hücre içindeki bazı komponentlerin hücre dışına çıktığını SEM ile görüntülemiştir. Akciğer fibroblastları üzerinde yapılan bir çalışmada hipotonik ortamın adenozin trifosfat salınımına neden olduğu ve beyaz noktalar şeklinde görüntünün izlendiği rapor edilmiştir.[201] Diğer bir çalışmada hücrenin bulunduğu ortamın ozmotik basıncının azalması ve bu ortam ile temasta bulunma süresinin artmasının hücrenin canlı kalma olasılığını azalttığı sonucuna varılmıştır.[202]

Ca, P ve Ca/P oranlarının deney öncesi ve sonrası değerlerinin gruplar arasında anlamlı farklılık oluşturmadığı gözlendi. Yalnızca distile su grubunda deney başlangıcına göre deney sonunda daha düşük oranda Ca varlığı tespit edildi. Bu bulguları destekler nitelikte olan çeşitli sıvıların mine yüzeyindeki eroziv etkinliklerinin incelendiği bir

çalışmada diğer içeceklere kıyasla distile suda bekleyen örneklerde Ca' nın daha hızlı çözündüğü tespit edilmiştir.[203]

Yapılan literatür araştırmasına göre *S. wiggsiae*' nin kültüre edildikten sonra SEM ile görüntülendiği yalnızca bir çalışma mevcuttur.[167] Bu çalışmada elde edilen SEM görüntüleri Bossù ve arkadaşları[167] tarafından görüntülenen *S. wiggsiae* bakterisi ile benzer özellik göstermektedir. Ayrıca bildiğimiz kadarıyla *S. wiggsiae* ile ilgili literatürde yer alan kapsamlı ve çekilmiş dişler üzerinde yapılan herhangi bir in vitro çalışma bulunmamaktadır.

Doğal bitkiler kullanılarak yapılan çalışmalarda bitki ekstraktlarının hazırlanma koşulları yanında bitkilerin hasat zamanı, iklim, mevsim, coğrafi konum ve toprak yapısı gibi faktörlerin de önemli etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bitkilerin çeşitli değişkenlerden etkilenen antibakteriyel etkinliğinin standardize edilebilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sınırları dahilinde elde edilen sonuç ve öneriler aşağıda sunulmuştur.

1. Monomikrobiyal biyofilm grubu için 3, polimikrobiyal gruplar için ise 6 gün süren inkübasyonun ardından süt dişi mine yüzeyini kaplayan bakteriler biyofilm oluşturdu.

2.Monomikrobiyal biyofilm grubu için >MBK konsantrasyonunda kullanılan altın otu ekstraktının distile suya göre etkili olduğu izlendi.

3.Monomikrobiyal biyofilm grubunda >MBK değerinde hazırlanan Anzer kekiği solüsyonunda distile suya göre daha az bakteri varlığı tespit edildi.

4. Polimikrobiyal (*S. mutans*, *S. wiggsiae*) biyofilm grubunda >MBK değerinde hazırlanan Anzer kekiği solüsyonunda distile suya göre daha az *S. wiggsiae* varlığı tespit edildi.

5. Monomikrobiyal biyofilm grubunda >MBK değerinde hazırlanan şeker otu solüsyonu distile suya göre daha etkili bulundu.

6. Polimikrobiyal (*S. mutans*, *S. wiggsiae*) biyofilm grubunda >MBK değerinde hazırlan şeker otu solüsyonu distile suya göre *S. wiggsiae* üzerinde daha etkili bulundu.

7.KHX solüsyon grubu MBK konsantrasyonunda monomikrobiyal grupta distile suya karşı etkili bulunurken, >MBK konsantrasyonunda tüm solüsyon gruplarına karşı daha etkili görüldü.

8. Polimikrobiyal (*S. mutans*, *S. wiggsiae*) grupta >MBK konsantrasyonunda KHX' nin şeker otuna göre *S. wiggsiae* sayısını daha çok azalttığı tespit edildi.

9. Polimikrobiyal (*S. mutans*, *L. acidophilus*, *S. wiggsiae*) grupta *S. mutans*' a karşı >MBK konsantrasyonunda hazırlanan KHX' nin distile suya göre etkili olduğu belirlendi.

10. Polimikrobiyal (*S. mutans*, *L. acidophilus*, *S. wiggsiae*) grupta >MBK konsantrasyonunda hazırlanan solüsyonlardan Anzer kekiğine karşı distile su *L. acidophilus*' un sayısını daha etkili şekilde azalttı.

11. Ca, P ve Ca/P oranlarının deney öncesi ve sonrası değerlerinin gruplar arasında anlamlı farklılık oluşturmadığı gözlendi. Yalnızca distile su grubunda deney başlangıcına göre deney sonunda daha düşük oranda Ca varlığı tespit edildi.

Bu tez çalışmasında toksik özellikte kimyasallar barındıran ajanlar yerine çocuklarda daha güvenle kullanılabilecek bitkisel içerikli solüsyonlar uygulandı. MBK değeri esas alınarak hazırlanan Anzer kekiği, altın otu ve şeker otu bitki ekstraktlarının karyojenik bakterilere karşı etkili olduğu görüldü. Daha yüksek konsantrasyonda farklı çözücüler kullanılarak veya bu bitkilerin içeriklerindeki aktif metabolitlerden yararlanarak yeni ve kapsamlı çalışmalar planlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Philip N, Bandara H, Leishman SJ, Walsh LJ. Inhibitory effects of fruit berry extracts on Streptococcus mutans biofilms. *European Journal of Oral Sciences.* 2019;127(2):122-129.
2. Dentistry AAoP. American Academy of Pediatric Dentistry reference manual 2014-2015. *Pediatric Dentistry* 36(6):1-140.
3. Zhao W, Li W, Lin J, Chen Z, Yu D. Effect of sucrose concentration on sucrose-dependent adhesion and glucosyltransferase expression of S. mutans in children with severe early-childhood caries (S-ECC). *Nutrients.* 2014;6(9):3572-3586.
4. Karpiński TM, Szkaradkiewicz AK. Microbiology of dental caries. *Journal of Biology and Earth Sciences* 2013;3(1):M21-24.
5. Tanner A, Mathney J, Kent R, et al. Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood caries. *Journal of Clinical Microbiology.* 2011;49(4):1464-1474.
6. Tanner A, Sonis A, Lif Holgerson P, et al. White-spot lesions and gingivitis microbiotas in orthodontic patients. *Journal of Dental Research.* 2012;91(9):853-858.
7. Özdaş DÖ. Güncelleme; Çocuk diş hekimliğinde koruyucu uygulamalar. *Selcuk Dental Journal.*1(2):84-91.
8. Aktaş A, Giray B. Diş Hekimliğinde Klorheksidin: Özellikleri ve güncel kullanım alanları. *Türkiye Klinikleri Diş Hekimliği Bilimleri Dergisi.* 2010;16(1):51-58.
9. Heintze SD, Twetman S. Interdental mutans streptococci suppression in vivo: a comparison of different chlorhexidine regimens in relation to restorative material. *American Journal of Dentistry.* Apr 2002;15(2):103-108.
10. Tadin A, Gavic L, Govic T, Galic N, Zorica Vladislavic N, Zeljezic D. In vivo evaluation of fluoride and sodium lauryl sulphate in toothpaste on buccal epithelial cells toxicity. *Acta Odontologica Scandinavica.* 2019;77(5):386-393.
11. Resende AHM, Farias JM, Silva DD, et al. Application of biosurfactants and chitosan in toothpaste formulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2019;181:77-84.
12. Van Loveren C. *Toothpastes.* Vol 23: *Karger Medical and Scientific Publishers*; 2013.
13. De Groot A. Contact allergy to (ingredients of) toothpastes. *Dermatitis.* 2017;28(2):95-114.
14. Şekeroğlu N, Deveci M, Buruk CK, Gürbüz B, İpek A. Chemical composition and antimicrobial activity of Anzer tea essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2007;87(7):1424-1426.
15. Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA, Sokmen A. In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of four Helichrysum species from Turkey. *Food Chemistry.* 2005;90(4):685-689.
16. Singh D, Kumari M, Prakash H, Rao G, Solomon S. Phytochemical and Pharmacological Importance of Stevia: A Calorie-Free Natural Sweetener. *Sugar Tech.* 2019;21(2):227-234.
17. Pitts N, Zero D. White paper on dental caries prevention and management. *FDI World Dental Federation.* 2016.
18. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, et al. Final submitted and accepted Version from Nigel Pitts as at March 17th 2017.

19. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *The Lancet.* 2007;369(9555):51-59.
20. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the World Health Organization.* 2005;83:661-669.
21. Dye BA, Thornton-Evans G, Li X, Iafolla TJ. Dental caries and sealant prevalence in children and adolescents in the United States, 2011-2012. 2015.
22. Loesche WJ, Grenier E. Detection of Streptococcus mutans in plaque samples by the direct fluorescent antibody test. *Journal of Dental Research.* 1976;55(1_suppl):87-93.
23. Curtis LA, Burns A. Unit costs of health and social care *2015*: *Personal Social Services Research Unit*; 2015.
24. Kılınç G, Koca H, Ellidokuz H. 3-4 yaş grubu çocukların ağız sağlık durumlarının iki yıllık takibi. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 2013;27(1):25-31.
25. Kuter B. İzmir İlindeki 6 Yaş Grubu Çocukların Ağız-Diş Sağlığı Durumlarının Değerlendirilmesi Ve Önemli Çürük İndeksinin Önemi. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi.* 2019;29(2):176-181.
26. http://www.tdb.org.tr/sag_menu_yazdir.php?Id=423. 17.11.2020.
27. Featherstone JD, Adair SM, Anderson MH, et al. Caries management by risk assessment: consensus statement, April 2002. *Journal of the California Dental Association.* 2003;31(3):257-269.
28. Fejerskov O, Kidd E. Dental caries: the disease and its clinical management: *John Wiley & Sons*; 2009.
29. Berkowitz RJ. Acquisition and transmission of mutans streptococci. *California Dental Association.* 2003;31(2):135-138.
30. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz Ö. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA and Cell Biology.* 2009;28(8):405-411.
31. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, et al. The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology.* 2010;192(19):5002-5017.
32. Nyvad B, Kilian M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Research.* 1990;24(4):267-272.
33. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. Streptococcus adherence and colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2009;73(3):407-450.
34. Yüncü M. Oral Mukoza Histolojisi ve Biyolojisi. *Türkiye Klinikleri Dermatoloji-Özel Konular.* 2015;8(4):1-10.
35. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 2003;149(2):279-294.
36. Leone CW, Oppenheim FG. Physical and chemical aspects of saliva as indicators of risk for dental caries in humans. *Journal of Dental Education.* 2001;65(10):1054-1062.
37. Edgar W, Higham S. Role of saliva in caries models. *Advances in Dental Research.* 1995;9(3):235-238.
38. García-Godoy F, Hicks MJ. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *The Journal of the American Dental Association.* 2008;139:25S-34S.

39. Smiech-Slomkowska G, Jablonska-Zrobek J. The effect of oral health education on dental plaque development and the level of caries-related Streptococcus mutans and Lactobacillus spp. *The European Journal of Orthodontics.* 2007;29(2):157-160.
40. Unsal G, Topcuoglu N, Ulukapi I, Kulekci G, Aktoren O. Scardovia Wiggsiae and the Other Microorganisms in Severe Early Childhood Caries. *Journal of Dentistry and Oral Care Medicine.* 2017;3(3):302.
41. Tanner A, Kent Jr R, Holgerson PL, et al. Microbiota of severe early childhood caries before and after therapy. *Journal of Dental Research.* 2011;90(11):1298-1305.
42. Fakhruddin KS, Ngo HC, Samaranayake LP. Cariogenic microbiome and microbiota of the early primary dentition: A contemporary overview. *Oral Diseases.* 2019;25(4):982-995.
43. Kressirer CA, Smith DJ, King WF, Dobeck JM, Starr JR, Tanner AC. Scardovia wiggsiae and its potential role as a caries pathogen. *Journal of Oral Biosciences.* 2017;59(3):135-141.
44. Yurteri E, Seyis F, Ozcan A. The passing adventure of Anzer Thyme (Thymus praecox Opiz subsp. caucasicus (Wild. Ex Ronniger) Jalas var. caucasicus) from the Highland to the Field.
45. Gomez A, Nelson KE. The oral microbiome of children: development, disease, and implications beyond oral health. *Microbial Ecology.* 2017;73(2):492-503.
46. Holgerson PL, Öhman C, Rönnlund A, Johansson I. Maturation of oral microbiota in children with or without dental caries. *Plos One.* 2015;10(5):e0128534.
47. Loesche WJ. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiological Reviews.* 1986;50(4):353.
48. Nyvad B, Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scandinavian Journal of Dental Research.* 1987;95(5):369.
49. Brown J. Classıfıcatıon of streptococcı, Groups-A, Group-B, Group-C and Group-D. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy.* 1953;3(4):163-169.
50. Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. Competition and coexistence between Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis in the dental biofilm. *Journal of Bacteriology.* 2005;187(21):7193-7203.
51. Arthur RA, Cury AADB, Graner ROM, et al. Genotypic and phenotypic analysis of S. mutans isolated from dental biofilms formed in vivo under high cariogenic conditions. *Brazilian Dental Journal.* 2011;22(4):267-274.
52. Yoshida A, Kuramitsu HK. Multiple Streptococcus mutans genes are involved in biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology.* 2002;68(12):6283-6291.
53. Martinez AR, Abranches J, Kajfasz JK, Lemos JA. Characterization of the Streptococcus sobrinus acid-stress response by interspecies microarrays and proteomics. *Molecular Oral Microbiology.* 2010;25(5):331-342.
54. Chu CH, Mei L, Seneviratne CJ, Lo ECM. Effects of silver diamine fluoride on dentine carious lesions induced by Streptococcus mutans and Actinomyces naeslundii biofilms. *International journal of Paediatric Dentistry.* 2012;22(1):2-10.
55. Nakano K, Nomura R, Matsumoto M, Ooshima T. Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases—from molecular mechanisms to clinical cases: cell-surface structures of novel serotype k Streptococcus mutans strains and their

correlation to virulence. *Journal of Pharmacological Sciences.* 2010;113(2):120-125.
56. Van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *Journal of Dental Research.* 1994;73(3):672-681.
57. Alaluusua S, Renkonen OV. Streptococcus mutans establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. *European Journal of Oral Sciences.* 1983;91(6):453-457.
58. Köhler B, Andreen I. Influence of caries-preventive measures in mothers on cariogenic bacteria and caries experience in their children. *Archives of Oral Biology.* 1994;39(10):907-911.
59. Okada M, Soda Y, Hayashi F, et al. Longitudinal study of dental caries incidence associated with Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in pre-school children. *Journal of Medical Microbiology.* 2005;54(7):661-665.
60. Çakır FY, Gürgan S, Attar N. Çürük mikrobiyolojisi. *Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2010;34(3):78-91.
61. Koll-Klais P, Mandar R, Leibur E, Kjaeldgaard M. High levels of salivary lactobacilli in Estonian schoolchildren. *European Journal of Paediatric Dentistry.* 2004;5:107-109.
62. Mei ML, Chu CH, Low KH, Che CM, Lo EC. Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with S. mutans and L. acidophilus dual-species cariogenic biofilm. *Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirugia Bucal.* 2013;18(6):e824.
63. Downes J, Mantzourani M, Beighton D, et al. Scardovia wiggsiae sp. nov., isolated from the human oral cavity and clinical material, and emended descriptions of the genus Scardovia and Scardovia inopinata. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2011;61(1):25-29.
64. Fe D, Chen T, Izard J, et al. The human oral microbiome. *Journal of Bacteriol.* 2010;192(19):5002-5017.
65. Donlan RM. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clinical Infectious Diseases.* 2001;33(8):1387-1392.
66. Tenovuo J. Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. *Community Dentistry and Oral Epidemiology.* 1997;25(1):82-86.
67. Jakubovics N, Kolenbrander P. The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Diseases.* 2010;16(8):729-739.
68. Mayhall CW, Butler WT. The carbohydrate composition of experimental salivary pellicles. *Journal of Oral Pathology & Medicine.* 1976;5(6):358-370.
69. Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG. Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC− ESI− MS/MS. *Journal of Proteome Research.* 2007;6(6):2152-2160.
70. Bowen W, Koo H. Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Research.* 2011;45(1):69-86.
71. Gibbons R, Hay D, Childs Iii W, Davis G. Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces. *Archives of Oral Biology.* 1990;35:S107-S114.
72. Jenkinson HFJEm. Beyond the oral microbiome. 2011;13(12):3077-3087.
73. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology.* 1995;15(3):169-175.

74. Cengiz A, Mısırlıgil A, Aydın M. Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji. *Ankara: Güneş Kitapevi.* 2004.
75. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews.* 2002;15(2):167-193.
76. Roberson T, Heyman H, Swift E. Introduction to Art and Science of Operative Dentistry: St. Louis, ABD: Mosby Co; 2011.
77. Chalmers NI, Palmer RJ, Cisar JO, Kolenbrander PE. Characterization of a Streptococcus sp.-Veillonella sp. community micromanipulated from dental plaque. *Journal of Bacteriology.* 2008;190(24):8145-8154.
78. Periasamy S, Kolenbrander PE. Aggregatibacter actinomycetemcomitans builds mutualistic biofilm communities with Fusobacterium nucleatum and Veillonella species in saliva. *Infection and Immunity.* 2009;77(9):3542-3551.
79. Van Winkelhoff A, Gonzales DH, Winkel E, Dellemijn-Kippuw N, Vandenbroucke-Grauls C, Sanz M. Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis: a comparison between the Netherlands and Spain. *Journal of Clinical Periodontology.* 2000;27(2):79-86.
80. Van Winkelhoff A, Winkel E, Barendregt D, Dellemijn-Kippuw N, Stijne A, Van der Velden U. β-lactamase producing bacteria in adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology.* 1997;24(8):538-543.
81. Ulusoy AT. Pedodontide Güncel Koruyucu Yaklaşımlar. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi.* 2010;2010(3):28-37.
82. Özcan G, Ersan S. Dental Plak İnhibisyonunda Antiseptik Ajanların Etkileri. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi.*7(1):287-300.
83. ÇELİK Ç. Diş Çürüklerinin Önlenmesinde Güncel Yaklaşımlar. *ADO Klinik Bilimler Dergisi.*6(3):1284-1292.
84. Moi GP, Tenuta LMA, Cury JA. Anticaries potential of a fluoride mouthrinse evaluated in vitro by validated protocols. *Brazilian Dental Journal.* 2008;19(2):91-96.
85. Bashash M, Marchand M, Hu H, et al. Prenatal fluoride exposure and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) symptoms in children at 6–12 years of age in Mexico City. *Environment International.* 2018;121:658-666.
86. Lu F, Zhang Y, Trivedi A, et al. Fluoride related changes in behavioral outcomes may relate to increased serotonin. *Physiology & Behavior.* 2019;206:76-83.
87. Tomasin L, Pusinanti L, Zerman N. The role of fluoride tablets in the prophylaxis of dental caries. A literature review. *Annali Di Stomatologia.* 2015;6(1):1.
88. Sekino S, Ramberg P, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J. Effect of various chlorhexidine regimens on salivary bacteria and de novo plaque formation. *Journal of Clinical Periodontology.* 2003;30(10):919-925.
89. Stitzel RE, Craig CR. *Modern pharmacology with clinical applications***:** *Lippincott Williams & Wilkins*; 2004.
90. Hassan SA, Bhateja S, Arora G, Prathyusha F. Major antiseptic in dentistry. *IP Journal of Surgery and Allied Sciences.* 2020;2(2):29-32.
91. Autio-Gold J. The role of chlorhexidine in caries prevention. *Operative dentistry.* 2008;33(6):710-716.
92. Brookes ZL, Bescos R, Belfield LA, Ali K, Roberts A. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. *Journal of Dentistry.* 2020:103497.

93. Wang Y, Li J, Sun W, Li H, Cannon RD, Mei L. Effect of non-fluoride agents on the prevention of dental caries in primary dentition: A systematic review. *Plos One.* 2017;12(8):e0182221.
94. Luoma H. Chlorhexidine solutions, gels and varnishes in caries prevention. *Proceedings of the Finnish Dental Society. Suomen Hammaslaakariseuran Toimituksia.* 1992;88(3-4):147-153.
95. Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. *Toxicology in Vitro.* 2008;22(2):308-317.
96. Chang Y-C, Huang F-M, Tai K-W, Chou M-Y. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 2001;92(4):446-450.
97. Matsukubo T, Takazoe I. Sucrose substitutes and their role in caries prevention. *International Dental Journal.* 2006;56(3):119-130.
98. Assev S, RÖLla G. Further studies on the growth inhibition of Streptococcus mutans OMZ 176 by xylitol. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology.* 1986;94(1-6):97-102.
99. Ly KA, Milgrom P, Roberts MC, Yamaguchi DK, Rothen M, Mueller G. Linear response of mutans streptococci to increasing frequency of xylitol chewing gum use: a randomized controlled trial [ISRCTN43479664]. *BMC Oral Health.* 2006;6(1):6.
100. Milgrom P, Ly K, Roberts M, Rothen M, Mueller G, Yamaguchi D. Mutans streptococci dose response to xylitol chewing gum. *Journal of Dental Research.* 2006;85(2):177-181.
101. Chan P, Tomlinson B, Chen YJ, Liu JC, Hsieh MH, Cheng JT. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *British Journal of Clinical Pharmacology.* 2000;50(3):215-220.
102. Singh S, Rao G. Stevia: The herbal sugar of 21 st Century. *Sugar Tech.* 2005;7(1):17-24.
103. Huxley A. The New RHS Dictionary of Gardening. *MacMillan Press*, London. 1992.
104. Carakostas M, Curry L, Boileau A, Brusick D. Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food and Chemical Toxicology.* 2008;46(7):S1-S10.
105. Raut D, Aruna K. Antimicrobial activity of Stevia rebaudiana against antibiotic resistant ESBL producing uropathogens and evaluation of its antioxidant activity. *International Journal Advanced Research Biological Sciences* 2017;4(3):110-118.
106. Liu J, Ong C, Li S. Subcritical fluid extraction of stevia sweeteners from Stevia rebaudiana. *Journal of chromatographic science.* 1997;35(9):446-450.
107. Carneiro J, Muniz A, Guedes T. Greenhouse bedding plant production of Stevia rebaudiana (Bert) Bertoni. *Canadian Journal of Plant Science.* 1997;77(3):473-474.
108. Fronza D, Folegatti MV. Water consumption of the estevia (Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni) crop estimated through microlysimeter. *Scientia Agricola.* 2003;60(3):595-599.

109. Rafiq M, Dahot MU, Mangrio SM, Naqvi HA, Qarshi IA. In vitro clonal propagation and biochemical analysis of field established Stevia rebaudiana Bertoni. *Pakistan Journal Botany* 2007;39(7):2467-2474.
110. Abou-Arab AE, Abou-Arab AA, Abu-Salem MF. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from Stevia rebaudiana Bertoni plant. *African Journal of Food Science.* 2010;4(5):269-281.
111. https://tr.wikipedia.org/wiki/Stevia. 17.11.2020.
112. Debnath M. Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant Stevia rebaudiana. *Journal of Medicinal Plants Research.* 2007;2(2):045-051.
113. Vidyanagar V. Preliminary studies on Stevia rebaudiana leaves: proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening. *Journal of Medical Sciences* 2006;6(3):321-326.
114. Karagöz Ş, Demirdöven A. Stevia rebaudiana Bitkisinin Tatlandırıcı, Antioksidan ve Antimikrobiyal Özellikleri. *Academic Food Journal/Akademik GIDA.* 2018;16(4).
115. Das S, Das A, Murphy R, Punwani I, Nasution M, Kinghorn A. Evaluation of the cariogenic potential of the intense natural sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Caries Research.* 1992;26(5):363-366.
116. http://www.tubives.com/. 25.11.2020.
117. Blanco E, Morales R, Pellin R. Harvesting and trade of thymus in Spain. Paper presented at: Medicinal plant trade in Europe: conservation and supply. In: Proceedings of the First International Symposium on the Conservation of Medicinal Plants in Trade in Europe, Brussel, Belgium1998.
118. Orhan I, Şenol F, Gülpinar A, et al. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of Cyclotrichium niveum, Thymus praecox subsp. caucasicus var. caucasicus, Echinacea purpurea and E. pallida. *Food and Chemical Toxicology.* 2009;47(6):1304-1310.
119. Hammad M, Sallal AK, Darmani H. Inhibition of Streptococcus mutans adhesion to buccal epithelial cells by an aqueous extract of Thymus vulgaris. *International Journal of Dental Hygiene.* 2007;5(4):232-235.
120. Nikolić M, Glamočlija J, Ferreira IC, et al. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of Thymus serpyllum L., Thymus algeriensis Boiss. and Reut and Thymus vulgaris L. essential oils. *Industrial Crops and Products.* 2014;52:183-190.
121. Fani M, Kohanteb J. In vitro antimicrobial activity of Thymus vulgaris essential oil against major oral pathogens. *Journal of Evidence-based Complementary & Alternative Medicine.* 2017;22(4):660-666.
122. Moghadam HD, Sani AM, Sangatash MM. Inhibitory effect of Helichrysum arenarium essential oil on the growth of food contaminated microorganisms. *Journal of Essential Oil Bearing Plants.* 2014;17(5):911-921.
123. Liu X, Jing X, Li G. A process to acquire essential oil by distillation concatenated liquid-liquid extraction and flavonoids by solid-liquid extraction simultaneously from Helichrysum arenarium (L.) Moench inflorescences under ionic liquid-microwave mediated. *Separation and Purification Technology.* 2019;209:164-174.
124. Reidel RVB, Cioni PL, Ruffoni B, Cervelli C, Pistelli L. Aroma profile and essential oil composition of Helichrysum species. *Natural Product Communications.* 2017;12(9):1934578X1701200931.

125. Kutluk I, Aslan M, Orhan I, Özçelik B. Antibacterial, antifungal and antiviral bioactivities of selected Helichrysum species. *South African Journal of Botany.* 2018;119:252-257.
126. Jarzycka A, Lewińska A, Gancarz R, Wilk KA. Assessment of extracts of Helichrysum arenarium, Crataegus monogyna, Sambucus nigra in photoprotective UVA and UVB; photostability in cosmetic emulsions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2013;128:50-57.
127. https://gramho.com/explore-hashtag/alt%C4%B1notu. 7.12.2020.
128. Gradinaru AC, Silion M, Trifan A, Miron A, Aprotosoaie AC. Helichrysum arenarium subsp. arenarium: phenolic composition and antibacterial activity against lower respiratory tract pathogens. *Natural Product Research.* 2014;28(22):2076-2080.
129. Akin M, Saki N. Antimicrobial, DPPH scavenging and tyrosinase inhibitory activities of Thymus vulgaris, Helichrysum arenarium and Rosa damascena mill. ethanol extracts by using TLC bioautography and chemical screening methods. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.* 2019;42(7-8):204-216.
130. Adil U, Kader U. İki Farklı Lokasyona ait Altın Otunun (Helichrysum arenarium) Uçucu Bileşenlerinin Belirlenmesi ve Karşılaştırılması. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi.*10(3):592-600.
131. Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology.* 2006;17(6):300-312.
132. De Castro ML, Priego-Capote F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A.* 2010;1217(16):2383-2389.
133. Capelo J, Mota A. Ultrasonication for analytical chemistry. *Current Analytical Chemistry.* 2005;1(2):193-201.
134. Tadeo JL, Sánchez-Brunete C, Albero B, García-Valcárcel AI. Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Journal of Chromatography A.* 2010;1217(16):2415-2440.
135. Kılıç A. Uçucu yağ elde etme yöntemleri. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi.* 2008;10(13):37-45.
136. Lopez-Avila V. Sample preparation for environmental analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry.* 1999;29(3):195-230.
137. Kaufmann B, Christen P. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques.* 2002;13(2):105-113.
138. Zougagh M, Valcárcel M, Rıos A. Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2004;23(5):399-405.
139. Mukhopadhyay M. *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*: *CRC press*; 2000.
140. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis.* 2016;6(2):71-79.
141. Jones RN, Stilwell MG, Wilson ML, Mendes RE. Contemporary tetracycline susceptibility testing: doxycycline MIC methods and interpretive criteria (CLSI and EUCAST) performance when testing Gram-positive pathogens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2013;76(1):69-72.

142. Eşel D, Sümerkan B, Ayangil D, Telli M. Brucella melitensis suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde agar dilüsyon ve e-test yöntemlerinin karşılaştırılması. *Ankem Dergisi.* 2004;18(4):196-199.
143. Goldstein JI, Newbury DE, Michael JR, Ritchie NW, Scott JHJ, Joy DC. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*: Springer; 2017.
144. Gonzalez-Cabezas C, Fontana M, Dunipace A, et al. Measurement of enamel remineralization using microradiography and confocal microscopy. *Caries Research.* 1998;32(5):385-392.
145. Contreras-Bulnes R, Olea-Mejía OF, Rodríguez-Vilchis LE, Scougall-Vilchis RJ, Centeno-Pedzara C. Structural changes on human dental enamel treated with Er: YAG, CO2 lasers and remineralizing solution: EDS analysis. *Oral Health Care-Prosthodontics, Periodontology, Biology, Research and Systemic Conditions.* 2012.
146. O'Brien WJ. Dental materials and their selection. *Quintessence Publishing Co. Inc.*, Chicago. 2002:113-131.
147. Yıldırım Y. Altı yaş dişlerine direkt ve indirekt yöntemlerle uygulanan farklı kompozit sistemlerin klinik başarısının ve fiziksel özelliklerinin değerlendirilmesi, *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*; 2013.
148. Craig R, Power J. Restorative dental materials. Mosby-Year Book. *Inc., Missouri.* 1997:486.
149. Dabanoğlu A, Yücel T. Farklı polimerizasyon tekniklerinin yüzey sertliği üzerine etkileri. *Araştırmalar İÜ.* 2003;5:84-88.
150. Nakata K, Nikaido T, Ikeda M, Foxton RM, Tagami J. Relationship between fluorescence loss of QLF and depth of demineralization in an enamel erosion model. *Dental Materials Journal.* 2009;28(5):523-529.
151. Arnold W, Cerman M, Neuhaus K, Gaengler P. Volumetric assessment and quantitative element analysis of the effect of fluoridated milk on enamel demineralization. *Archives of Oral Biology.* 2003;48(6):467-473.
152. Babay N. SEM study on the effect of two different demineralization methods with saturated tetracycline hydrochloride on diseased root surfaces. *The Journal of Contemporary Dental Practice.* 2001;2(2):25-35.
153. Breschi L, Gobbi P, Chersoni S, Mazzotti G, Prati C. Effects of different acid and sodium hypochlorite treatments on dentin collagen: a FEISEM analysis. *American Journal of Dentistry.* 2003;16:77A-81A.
154. Markovic DL, Petrovic BB, Peric TO. Fluoride content and recharge ability of five glassionomer dental materials. *BMC Oral Health.* 2008;8(1):21.
155. Takaichi A, Nakamoto T, Joko N, et al. Microstructures and mechanical properties of Co–29Cr–6Mo alloy fabricated by selective laser melting process for dental applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.* 2013;21:67-76.
156. Koopaie M, Bordbar-Khiabani A, Kolahdooz S, Darbandsari AK, Mozafari M. Advanced surface treatment techniques counteract biofilm-associated infections on dental implants. *Materials Research Express.* 2020;7(1):015417.
157. Cardoso JG, Iorio NLP, Rodrigues LF, et al. Influence of a Brazilian wild green propolis on the enamel mineral loss and Streptococcus mutans' count in dental biofilm. *Archives of Oral Biology.* 2016;65:77-81.
158. Renda G, Kalaycı Y, Korkmaz B, Karaoglu SA, Yaylı N. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Five Scrophularia L. Species from Turkey. *Records of Natural Products.* 2017;11(6).

159. Nadelman P, Monteiro A, Balthazar CF, et al. Probiotic fermented sheep's milk containing Lactobacillus casei 01: Effects on enamel mineral loss and Streptococcus counts in a dental biofilm model. *Journal of Functional Foods.* 2019;54:241-248.
160. Alviano W, Mendonça-Filho R, Alviano D, et al. Antimicrobial activity of Croton cajucara Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiology and Immunology.* 2005;20(2):101-105.
161. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *Journal of Clinical Microbiology.* 2002;40(3):1001-1009.
162. Bacaksız A, Tulunoğlu Ö. Fluorid Kullanımı, Dental Fluorozis ve Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Yayın Kuralları.* 2012.
163. Chang Y-C, Chou M-Y. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 2001;91(2):230-234.
164. Alnouri DMA, Kouchaji C, Nattouf AH, Hasan MMAA. Effect of aloe vera mouthwash on dental plaque and gingivitis indices in children: A randomized controlled clinical trial. *Pediatric Dental Journal.* 2020.
165. Martins ML, de França Leite KL, Pacheco-Filho EF, et al. Efficacy of red propolis hydro-alcoholic extract in controlling Streptococcus mutans biofilm build-up and dental enamel demineralization. *Archives of Oral Biology.* 2018;93:56-65.
166. Lamarque GCC, Méndez DAC, Gutierrez E, et al. Could chlorhexidine be an adequate positive control for antimicrobial photodynamic therapy in-in vitro studies? *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2019;25:58-62.
167. Bossù M, Selan L, Artini M, et al. Characterization of Scardovia wiggsiae Biofilm by Original Scanning Electron Microscopy Protocol. *Microorganisms.* 2020;8(6):807.
168. Chalmers NI, Oh K, Hughes CV, et al. Pulp and plaque microbiotas of children with severe early childhood caries. *Journal of Oral Microbiology.* 2015;7(1):25951.
169. Kishta-Derani M, Neiva GF, Boynton JR, Kim YE, Fontana M. The antimicrobial potential of stevia in an in vitro microbial caries model. *American Journal Dentistry* 2016;29(2):87-92.
170. Percival RS, Devine DA, Duggal MS, Chartron S, Marsh PD. The effect of cocoa polyphenols on the growth, metabolism, and biofilm formation by Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis. *European Journal of Oral Sciences.* 2006;114(4):343-348.
171. Alviano WS, Alviano DS, Diniz CG, et al. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Archives of Oral Biology.* 2008;53(6):545-552.
172. Kim E-J, Jin B-H. Galla chinensis extracts and calcium induce remineralization and antibacterial effects of enamel in a Streptococcus mutans biofilm model. *Journal of Korean Academy of Oral Health.* 2018;42(3):90-96.
173. Ramalingam K, Amaechi BT. Antimicrobial effect of herbal extract of Acacia arabica with triphala on the biofilm forming cariogenic microorganisms. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine.* 2018.
174. Fournomiti M, Kimbaris A, Mantzourani I, et al. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (Origanum vulgare), sage (Salvia officinalis), and thyme (Thymus vulgaris) against clinical isolates of Escherichia coli,

Klebsiella oxytoca, and Klebsiella pneumoniae. *Microbial Ecology in Health and Disease.* 2015;26(1):23289.
175. Vardar-Ünlü G, Candan F, Sökmen A, et al. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of Thymus pectinatus Fisch. et Mey. Var. pectinatus (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2003;51(1):63-67.
176. Tichy J, Novak J. Extraction, assay, and analysis of antimicrobials from plants with activity against dental pathogens (Streptococcus sp.). *The Journal of Alternative and Complementary Medicine.* 1998;4(1):39-45.
177. Schött G, Liesegang S, Gaunitz F, et al. The chemical composition of the pharmacologically active Thymus species, its antibacterial activity against Streptococcus mutans and the antiadherent effects of T. vulgaris on the bacterial colonization of the in situ pellicle. *Fitoterapia.* 2017;121:118-128.
178. Siraj ES, Pushpanjali K, Manoranjitha B. Efficacy of stevioside sweetener on pH of plaque among young adults. *Dental Research Journal.* 2019;16(2):104.
179. Walsh LJ. Dental plaque fermentation and its role in caries risk assessment. *International Dentistry South Afria (Australasian Edition).* 2006;1(3):4-13.
180. Razak FA, Baharuddin BA, Akbar EFM, Norizan AH, Ibrahim NF, Musa MY. Alternative sweeteners influence the biomass of oral biofilm. *Archives of Oral Biology.* 2017;80:180-184.
181. Gamboa F, Chaves M. Antimicrobial potential of extracts from Stevia rebaudiana leaves against bacteria of importance in dental caries. *Acta Odontológica Latinoamericana.* 2012;25(2):171-175.
182. Ajagannanavar SL, Shamarao S, Battur H, Tikare S, Al-Kheraif AA, Al Sayed MSAE. Effect of aqueous and alcoholic Stevia (Stevia rebaudiana) extracts against Streptococcus mutans and Lactobacillus acidophilus in comparison to chlorhexidine: An in vitro study. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry.* 2014;4(Suppl 2):S116.
183. Ferrazzano GF, Roberto L, Catania MR, et al. Screening and scoring of antimicrobial and biological activities of Italian vulnerary plants against major oral pathogenic bacteria. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2013;2013.
184. Motamedifar M, Nozari A, Ghasrodashti EA. In vitro Investigation of Hydro-alcoholic Extract of Helichrysum leucocephalum on the Inhibition of Streptococcus Mutans Growt. *Journal of Dental Biomaterials.* 2017;4(4):484-488.
185. Nostro A, Cannatelli M, Crisafi G, Musolino A, Procopio F, Alonzo V. Modifications of hydrophobicity, in vitro adherence and cellular aggregation of Streptococcus mutans by Helichrysum italicum extract. *Letters in Applied Microbiology.* 2004;38(5):423-427.
186. Hennessey T. Some antibacterial properties of chlorhexidine. *Journal of periodontal Research.* 1973;8:61-67.
187. Zaura-Arite E, Van Marle J, Ten Cate J. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *Journal of Dental Research.* 2001;80(5):1436-1440.
188. Pratten J, Barnett P, Wilson M. Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms of oral bacteria. *Applied and Environmental Microbiology.* 1998;64(9):3515-3519.

189. Netto CA, Marcucci MC, Paulino N, et al. Effects of typified propolis on mutans streptococci and lactobacilli: a randomized clinical trial. *Brazilian Dental Science.* 2013;16(2):31.
190. Wikén Albertsson K, Persson A, Van Dijken JW. Effect of essential oils containing and alcohol-free chlorhexidine mouthrinses on cariogenic micro-organisms in human saliva. *Acta Odontologica Scandinavica.* 2013;71(3-4):883-891.
191. Albuquerque YE, Danelon M, Salvador MJ, et al. Mouthwash containing Croton doctoris essential oil: In vitro study using a validated model of caries induction. *Future Microbiology.* 2018;13(06):631-643.
192. Pires JG, Zabini SS, Braga AS, et al. Hydroalcoholic extracts of Myracrodruon urundeuva All. and Qualea grandiflora Mart. leaves on Streptococcus mutans biofilm and tooth demineralization. *Archives of Oral Biology.* 2018;91:17-22.
193. Lee VA, Karthikeyan R, Rawls HR, Amaechi BT. Anti-cariogenic effect of a cetylpyridinium chloride-containing nanoemulsion. *Journal of Dentistry.* 2010;38(9):742-749.
194. Hannig C, Gaeding A, Basche S, Richter G, Helbig R, Hannig M. Effect of conventional mouthrinses on initial bioadhesion to enamel and dentin in situ. *Caries Research.* 2013;47(2):150-161.
195. Wood JM. Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 1999;63(1):230-262.
196. Csonka LN. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 1989;53(1):121-147.
197. Glaasker E, Tjan FS, Ter Steeg PF, Konings WN, Poolman B. Physiological response of Lactobacillus plantarum to salt and nonelectrolyte stress. *Journal of Bacteriology.* 1998;180(17):4718-4723.
198. Jewell JB, Kashket E. Osmotically regulated transport of proline by Lactobacillus acidophilus IFO 3532. *Applied and Environmental Microbiology.* 1991;57(10):2829-2833.
199. Besinis A, De Peralta T, Handy RD. The antibacterial effects of silver, titanium dioxide and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant chlorhexidine on Streptococcus mutans using a suite of bioassays. *Nanotoxicology.* 2014;8(1):1-16.
200. Farkas A, Maróti G, Kereszt A, Kondorosi É. Comparative Analysis of the Bacterial Membrane Disruption Effect of Two Natural Plant Antimicrobial Peptides. *Frontiers in Microbiology.* 2017-January-23 2017;8(51).
201. Takahashi K, Ito S, Furuya K, Asano S, Sokabe M, Hasegawa Y. Real-time imaging of mechanically and chemically induced ATP release in human lung fibroblasts. *Respiratory Physiology & Neurobiology.* 2017;242:96-101.
202. Kabeche R, Howard L, Moseley JB. Eisosomes provide membrane reservoirs for rapid expansion of the yeast plasma membrane. *Journal of Cell Science.* 2015;128(22):4057-4062.
203. Larsen M, Richards A. Fluoride is unable to reduce dental erosion from soft drinks. *Caries Research.* 2002;36(1):75-80.

EKLER

EK-1 ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	**:** Zeynep Demirez Bircan
Doğum Tarihi	: 21.06.1989
Doğum Yeri	: Kayseri
Uyruğu	: T.C.
Adres	: Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Ana Bilim Dalı, 53100, Rize
Tel	: 0464 222 00 00-01
Fax	: 0464 222 00 02
Email	: zeynep.demirez@erdogan.edu.tr
Eğitim	
Lise	: İbrahim Hakkı Fen Lisesi (2006)
Lisans	: Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (2007-2012)
Uzmanlık	**:** Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (2017-2021)
Yabancı dil bilgisi	
İngilizce	

EK-2 ETİK KURUL ONAY FORMU

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

Sayı : 40465587-102.01-19 24.01.2020
Konu : Etik Kurul

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sema AYDINOĞLU

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz **"Çeşitli Bitki Özütlerinin Antimikrobiyal Etkinliği İle Diş Minesi Üzerine Etkilerinin İn Vitro Değerlendirilmesi"** isimli başvurunuz etik kurulumuz yönergesine göre **16.01.2020** tarihinde yapmış olduğu toplantıda incelenmiş olup, **2020/10** karar numarası ile bilimsel ve etik yönden **uygun** bulunmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini saygılarımla rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Hüseyin Avni UYDU
Başkan

Tel : Fax : Bilgi : BURAK HANKAYA

Bu belge 5070 sayılı elektronik imza kanuna göre güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Belge Kodu : CA8601FC-47A4-491A-A462-E2E7A56AD374 - http://ebys.erdogan.edu.tr/EBYS/eimzadogrulam

EK-3 BAP ONAY FORMU

TC

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ

Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

Sayı: **Tarih**

25.12.2020

Konu: Araştırmacının Görev Aldığı Projeler

İlgili Makama

ZEYNEP DEMİREZ BİRCAN'IN Birimimiz tarafından desteklenen araştırma projelerinde aldığı görevlere ilişkin bilgiler aşağıda verilmiştir.

Bilgilerinizi arz/rica ederim.

Prof.Dr. GÖKTUĞ DALGIÇ
Koordinatör

Proje Kodu:	TDH-2020-1093	**Proje Türü:**	D.H.Uzmanlık	**Baş.Tarihi:**	12.03.2020	**Bitiş Tarihi:**	12.03.2021	**Görevi:**	Araştırmacı
Durumu:	Yürüyen	**Süresi:**	12(ay)						
Başlık:	Çeşitli Bitki Özütlerinin Antimikrobiyal Etkinliği İle Diş Minesi Üzerine Etkilerinin İn Vitro Değerlendirilmesi								