



Araştırma Makalesi (Research Article)

Cilt 3 - Sayı 3: 51-62 / Eylül 2020
(Volume 3 - Issue 3: 51-62 / September 2020)

HYPERICUM PERFORATUM L. VE SEKONDER METABOLİTLERİNİN PATOJENİK ORAL BAKTERİLERE KARŞI ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Feride BALLI¹, Ayça Tuba ULUSOY YAMAK^{2*}

¹Zonguldak Ağız Diş Sağlığı Merkezi, 67020, Zonguldak, Türkiye

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı, 55270, Samsun, Türkiye

Gönderi: 01 Haziran 2020; **Kabul:** 20 Haziran 2020; **Yayınlanma:** 01 Eylül 2020

(Received: June 01, 2020; **Accepted:** June 20, 2020; **Published:** September 01, 2020)

Özet

Bu çalışmanın amacı, *Hypericum perforatum* L.'nin ve içindeki sekonder metabolitlerin, diş çürüğü ve periodontal hastalıklardan sorumlu mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkisini araştırarak, bu bitkinin ve sekonder metabolitlerinin insan gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksitelerini *in vitro* olarak incelemektir. Çalışmamızda *Hypericum perforatum* L. bitki ekstratı ve 6 ayrı sekonder metabolit (hyperforin, hypericin, hyperoside, quercetin, quercitrin, rutin) kullanıldı. Bu ürünlerin patojenik oral mikroorganizmalara (*S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *L. acidophilus*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. Albicans*) karşı antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile incelenirken, MIC ve MBC değerleri de belirlendi. Tüm test materyallerinin oral dokular üzerine sitotoksitesi, insan gingival fibroblast hücreleri kullanılarak MTT analizi ile değerlendirildi. *Hypericum perforatum* L. ekstratı ve sekonder metabolitlerinin çalışmamızda test edilen tüm oral patojenlere etkisi istatistiksel olarak CHX'den düşük bulunmuştur. Bununla birlikte, periodontal hastalıkla ilişkili gram-negatif mikroorganizmalara ve *C. albicans*'a karşı CHX'ne yakın değerlerde inhibisyon zonu oluşturduğu görülen quercitrin'in, gingival fibroblast hücreleri üzerine CHX gibi şiddetli sitotoksite göstermediği tespit edilmiştir. Bu çalışmada, bitki ekstratlarının saf bileşimler olmaması nedeniyle bu yönde yapılacak çalışmaların sadece bitkileri değil sekonder metabolitleri de incelemesi, yüksek antimikrobiyal etkinliğe sahip, düşük sitotoksik etkili yeni antimikrobiyal ve antifungal bitki ekstratları ve sekonder metabolitlerin bulunmasını mümkün kılacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Diş çürüğü, Doğal antimikrobiyal ajanlar, Hiperforin, *Hypericum Peroratum* L., Hiperosid, Kuersetin

Assessment of the Antimicrobial Effectiveness of *Hypericum Perforatum* L. and Secondary Metabolites against Pathogenic Oral Bacteria


Abstract: The purpose of this study was to investigate the antimicrobial effect of *Hypericum perforatum* L. and secondary metabolites on microorganisms responsible for dental caries and periodontal disease and to investigate their cytotoxic effect on human gingival fibroblast cell *in vitro*. *Hypericum perforatum* L. plant extract and 6 different


secondary metabolites (hyperforin, hypericin, hyperoside, quercetin, quercitrin, rutin) were used. Disk diffusion assay was performed to analyze the antimicrobial activities of these materials against the pathogenic oral microorganisms (*S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *L. acidophilus*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. albicans*) and MIC and MBC values were also determined. Cytotoxicity all test materials was investigated by MTT assay using human gingival fibroblast cells. According to antimicrobial analysis, the inhibitory effect of all test materials were found to be statistically lower than chlorhexidine. However, the quercitrin which was seen to create an inhibition zone against periodontal disease-associated gram-negative microorganisms and *C. albicans*, did not show severe cytotoxicity as chlorhexidine on gingival fibroblast cells. In this study, plant extracts due to lack of pure compounds, it was concluded that studies must examine not only plant, are also secondary metabolites. In this way, it will be possible to find new antimicrobial and antifungal plant extracts and secondary metabolites, have high antimicrobial activity and low cytotoxic effective.

Keywords: Dental caries, Natural antimicrobial products, Hyperforin, Hypericum perforatum L., Hyperoside, Quercitrin,

***Corresponding author:** Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı, 55270, Samsun, Türkiye

E mail: aycaulusoy@yahoo.com (A.T. ULUSOY YAMAK)

Feride BALLI  <https://orcid.org/0000-0003-4976-4805>

Ayça Tuba ULUSOY YAMAK  <https://orcid.org/0000-0003-3733-2781>

Cite as: Ballı F, Ulusoy Yamak AT. 2020. Assessment of the antimicrobial effectiveness of *hypericum perforatum* L. and secondary metabolites against pathogenic oral bacteria. *BSJ Health Sci*, 3(3): 51-62.

1. Giriş

Diş çürüğü ve dişeti hastalıkları, insanların büyük bir kısmını cinsiyet, yaş, etnik köken gözetmeksizin etkileyen ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde en sık görülen enfeksiyöz hastalıklardır (Burt, 1998). Bu hastalıkların primer etiyolojik faktörü, mikrobiyal dental plak içerisinde bulunan mikroorganizmalardır (Wilson ve Ashley, 1990). *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* gibi gram-pozitif asidojenik ve asidofilik özellikteki mikroorganizmalar, diş çürüğünün oluşumundan sorumlu iken, laktobasiller dentin dokusunun yıkımından yani var olan çürük lezyonun ilerlemesinden sorumlu bulunmuştur (Fitzgerald ve ark., 1980). *Candida albicans* ise ağız florasyndan izole edilebilen ve ağız mukozasına tutunabilen en yaygın mantar türüdür ve dentin dokusunda yüksek oranda yerleşim göstererek, özellikle çocuklarda/adelosanlarda diş çürüğünün patogeneğinde aktif rol oynamaktadır (Klinke ve ark., 2011). *Porphyromonas gingivalis* ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ise periodontal hastalıklarının patogeneğinde önemli rol oynayan virülans yüksek mikroorganizmalardır (Newman ve ark., 2007). Tüm bu mikroorganizmaların yaşaması için elverişli olan mikrobiyal dental plağın ağız içerisindeki sert ve yumuşak doku üzerinden uzaklaştırılması ile diş çürüğü ve dişeti hastalıklarının engellenebileceği bilinmektedir (Mc Donald ve ark., 2004). Ancak çocukların diş fırçalama ve diş ipi kullanımı ile mekanik temizliği yeterince etkin yapamamaları ve aynı zamanda mekanik temizliğin tek başına mikrobiyal dental plağı uzaklaştırmada yeterli olmaması mekanik temizlik ile birlikte kimyasal temizliğin gerekliliğini ortaya koymaktadır (Loveren ve ark., 2000). Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda, mekanik plak kontrolüne ek olarak florürün ve antimikrobiyal kemoteröpatiklerin kullanımının, bu hastalıklara karşı korunmada etkiyi arttırdığı gösterilmektedir (Davies ve ark., 2003). Ancak özellikle gelişmekte olan ülkelerde antimikrobiyal etkili

maddelerin bilinçsizce kullanımı nedeniyle bu maddelere karşı direnç gösteren oral mikroorganizmaların artması ve kullanılan antimikrobiyal etkili ajanların dişleriboyama, ağız kuruluğu, ülseratif gingivitis, doku irritasyonu, oral kanserler gibi yan etkilere sahip olmaları nedeniyle (Silverman ve Wider, 2006; Addy, 2008; Lemos-Junior ve Villoria, 2008), bitkilerden elde edilen doğal antimikrobiyal bileşiklerin geliştirilmesine yönelik çalışmalara hız kazandırmıştır (Katsura ve ark., 2001; Botelho ve ark., 2007; Thaweboon ve Thaweboon, 2009; Sereviratne ve ark., 2011).

Halk arasında "sarı kantaron" olarak da bilinen *Hypericum perforatum* L. (*St. John's Wort*), Türkiye ve Avrupa'da yaygın olarak yetişen, antitümör, antiviral, antidepresan, antibakteriyel, antiinflamatuvar ve analjezik etkilere sahip olduğu bilinen, yabani bir bitkidir (; Reichling ve ark., 2001). Rusya'da, değişik isimler altında ticari antibiyotik preparatı bulunan *Hypericum perforatum* L.'nin, antimikrobiyal etkinliği ile ilgili yapılan pek çok çalışmada bu bitkinin çeşitli gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmalar üzerine bakteristatik ve bakterisid etkinliği gösterilmiştir (Avato ve ark., 2004; Milosevic ve ark., 2007; Sadiq ve ark., 2010).

Literatür incelendiğinde *Hypericum perforatum* L.'nin ağız içerisindeki patojenlere karşı antimikrobiyal etkinliği ile ilgili az sayıda bilimsel çalışma olduğu görülmüştür. Sardella ve ark. (2008), yanan ağız sendromu bulunan bireylerde *Hypericum perforatum* L. ekstratının etkinliğini değerlendirmiş, *Hypericum perforatum* L. ekstratını içeren 300 mg'lık kapsülün (hypericin-% 0,31, hyperforin-% 3,0) 12 haftalık süre boyunca kullanılmasının semptomların görüldüğü bölge sayısını azalttığını bildirmişlerdir. Paterniti ve ark. (2010), deneysel olarak dişeti hastalığı oluşturulmuş ratlar üzerinde *Hypericum perforatum* L. ekstratının etkilerini değerlendirmişler, ligatür bağlanması sonucunda meydana gelen gingivomukozal doku yaralanmasının ve alveolar kemik kaybının derecesini

azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca gingivomukoza dokuya göç eden polimorfonükleer hücrelerin ve proinflamatuvar sitokinlerden IL-1β'nin sayısını azaltarak antiinflamatuvar etki gösterdiğini açıklamışlardır. Bu bulgular doğrultusunda enflamatuvar bir hatalık olan periodontal hastalığın tedavisinde *Hypericum perforatum L.* ekstratının uygulanabileceği sonucuna varmışlardır. Lüthi ve ark. (2009), karyojenik bakterilerden *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sobrinus*'a karşı *Hypericum perforatum L.*'nin bir sekonder metaboliti olan hypericin'in fotodinamik antibakteriyel etkisini araştırmışlar, 0,625µg/ml'den 10µg/ml'e kadar değişen konsantrasyonlarda hypericin'in test edildiği çalışmada 2,5µg/ml hypericin'in *Streptococcus sobrinus*'a antimikrobiyal etkinliği olduğunu göstermişlerdir. Süntar ve ark. (2015), *Hypericum perforatum L.*'nin farklı ekstraksiyonlarının (etanol, n-hekzan, kloroform, etil asetat, n-butanol ve su ekstraktları) *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus plantarum* ve *Enterococcus faecalis* üzerine antimikrobiyal aktivitelerini değerlendirmişler. Su ekstratının *S. mutans* (MIC:32µg/ml) ve *E. faecalis*'e (MIC:16µg/ml) kıyasla *S. sobrinus* ve *L. plantarum* (MIC:8µg/ml)'abkarşı daha güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Diğer ekstratların ise *S.sobrinus*'a daha yüksek konsantrasyonda (MIC:16 µg/ml) etki ettiğini göstermişlerdir.

Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmanın amacı, *Hypericum perforatum L.* bitki ekstratının ve içeriğindeki antimikrobiyal etkisi olduğu bildirilen sekonder metabolitlerin (hyperisin, hyperoside, hyperforin, quercetin, quercitrin, rutin) oral florada bulunan çürük ve periodontal hastalık oluşumundan sorumlu mikroorganizmalara [*S. mutans* (ATCC 35668), *S. mitis* (ATCC 903), *S. sanguinis* (ATCC 10556), *S. salivarius* (ATCC 13419), *S. sobrinus* (ATCC 33478), *L. acidophilus* (ATCC 9224), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* (ATCC 43718) karşı antimikrobiyal ve *Candida albicans* (ATCC 14053)'a karşı antifungal aktivitesi ve aynı zamanda insan gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin incelenmesidir.

2. Materyal ve Metot

Bu araştırma *Hypericum perforatum L.* (Sarı kantaron) bitkisinin antimikrobiyal analizi ve sitotoksisite analizi olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır. *Hypericum perforatum L.* ekstratı ve içerisinde bulunan altı ayrı sekonder metabolitin patojen oral mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisinin değerlendirilmesinin amaçlandığı antimikrobiyal duyarlılık testleri, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Bitki ekstratının ve sekonder metabolitlerin insan gingival fibroblastlar üzerine toksik etkisinin değerlendirilmesinin amaçlandığı sitotoksisite analizi AntiMikrop Test Laboratuvarı (Trabzon Teknoloji Geliştirme Bölgesi, Trabzon)'nda gerçekleştirildi.

2.1. Mikroorganizmalar ve Kültivasyonu

Çalışmamızda toplam 6 adet gram-pozitif bakteri, 2 adet gram-negatif bakteri ve 1 adet mantar türü kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan gram pozitif bakteriler;

- *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)
- *Streptococcus mitis* (ATCC 903)
- *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)
- *Streptococcus salivarius* (ATCC 13419)
- *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478)
- *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 9224)

Çalışmada kullanılan gram negatif bakteriler;

- *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277)
- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43718)

Çalışmada kullanılan mantar türü;

- *Candida albicans* (ATCC 10231)

Çalışmada kullanılan mantar türü ve bakteriler Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı kültür koleksiyonundan elde edilmiştir. Stok bakteri suşlarının aktivasyonu için, koyun kanlı agar (HBA) (BD BBL, USA) ve Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Oxoid, England) besiyerlerinde ekimler yapılmıştır. Gram-pozitif bakteriyel suşlar 35 °C 'de 24 saat süre ile inkübe edilirken, gram- negatif bakteriyel suşlar %5 CO₂, %10 H₂ ve %85 N₂ gaz karışımı içeren poşet içerisinde (BD, USA), anaerobik ortamda 37 °C'de 48-72 saat süre ile inkübe edilmiştir. Mantarların kültürasyonu, SDA içerisinde 37 °C'de 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Diğer mikroorganizmalardan farklı olarak *P. gingivalis*'in kültürasyonunda 5 µg/ml hemin ve 1 µg/ml vitamin K içeren Trypticase soy broth (TSB) kullanılmıştır. Saf üreme fazındaki mikroorganizma kültürleri, steril fosfat tamponlu salin solüsyonu (Oxoid, England) içerisine alınarak 0.5 McFarland (1x10⁶ hücre/ml) bulanıklığında süspansiyon hazırlanmıştır.

2.2. *Hypericum perforatum L.* Bitkisinin Sekonder Bileşenleri

Hypericum perforatum L. etanol ekstratı ve içerisinde bulunan 6 ayrı sekonder bileşik Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Germany)'ten satın alınmıştır (Tablo 1). Katı halde bulunan *Hypericum perforatum L.*, hypericin ve hyperforin üreticilerin tavsiyelerine göre Dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözdürülerek kullanıldı.

2.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

2.3.1. MIC ve MBC testi

Tüm test materyallerinin ve kontrol olarak kullanılan CHX'in, bakterilerin üremelerini engelleyecek en düşük konsantrasyon olan minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) ve bakterileri öldürmek için gerekli olan en düşük konsantrasyon olan minimum bakterisid konsantrasyon (MBC) değerleri, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI), M100-S17 (2007) yönergesine uygun olarak belirlendi. Test materyallerinin MIC değerlerini belirlemek amacıyla; öncelikle katı besi yerinde üretilen

bakterilerden 0,5 McFarland bulanıklığında, 1×10^6 konsantrasyonda bakteri süspansiyonları hazırlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonları, Katyon ilaveli Müller Hinton Broth¹ (%5 Koyun kanlı²) besi yeri ile 1/10 oranında dilüe edildi. *C. albicans* için MOPS (3-[N-

morpholino]propane-sulfonic acid, 3-morpholinopropanesulfonic acid) (Amresco, USA) ile tamponlanmış RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Media) (Sigma-Aldrich, Germany) besi yeri kullanıldı ve aynı oranda (1/10) dilüe edildi.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *Hypericum perforatum* L. ekstratı ve içerisinde bulunan sekonder bileşikler

Test materyalleri	Materyallerin başlangıç konsantrasyonları (mg/ml)	
<i>Hypericum perforatum</i> L. ekstratı	SIGMA-1607506	50
Hypericin	SIGMA-56690	2.5
Hyperforin	SIGMA-H1792	1
Hyperoside	SIGMA- 00180585	5
Quercetin	SIGMA-Q4951	50
Quercitrin	SIGMA-Q3001	50
Rutin	SIGMA-84082	50
Klorheksidin	FGM Dental Products	%2 w/v

Hazırlanan mikroorganizma+besiyeri içeren bu süspansiyonlardan 100 µl, 96 kuyucuklu U tabanlı pleytlerin her kuyucuğuna yerleştirildi. Ardından ilk kuyucuklara 100µl test edilecek maddeler (*Hypericum perforatum* L. ekstratı (50mg/ml), Hypericin (2.5mg/ml), Hyperforin (1mg/ml), Hyperoside (5mg/ml), Quercetin (50mg/ml), Quercitrin (50mg/ml),

Rutin (50mg/ml), Klorheksidin glukonat (%2)(CHX) eklendi. Test materyallerinin DMSO ile dilüe edilerek hazırlanan %50, %25, %12,5, %6,25, %3,1, %1,56, %0,78 konsantrasyonları sırası ile bir alt kuyucuğa eklendi (Test materyallerinin 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, konsantrasyonları test edilmiş oldu) (Tablo 2).

Tablo 2. 96 kuyucuklu pleyte eklenen dilüe edilmiş madde konsantrasyonları

	Madde konsantrasyonları (mg/ml)								
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
<i>Hypericum perforatum</i> L.	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.7812	0.3906	0.195
Hypericin	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	0.039	0.019	0.009
Hyperforin	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078	0.0039
Hyperoside	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1562	0.0781	0.0390	0.0195
Quercetin	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.7812	0.3906	0.195
Quercitrin	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.7812	0.3906	0.1953
Rutin	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.7812	0.3906	0.1953
Klorheksidin	%2	%1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078

Daha sonra tüm kuyucuklara 10 µl mikroorganizma süspansiyonu (1/10 oranında dilüe edilmiş) ilave edildi (Şekil 1). 96 kuyucuklu pleyt'in son iki sırasındaki mikroorganizma-besiyeri süspansiyonları kontrol olarak kullanıldı ve herhangi bir etken madde ilave edilmedi. Ardından 96 kuyucuklu pleyt, 37°C'lik etüvde 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası mikroorganizma üremesinin inhibe edildiği en düşük konsantrasyon, test edilen maddelerin MIC değerleri olarak kaydedildi.

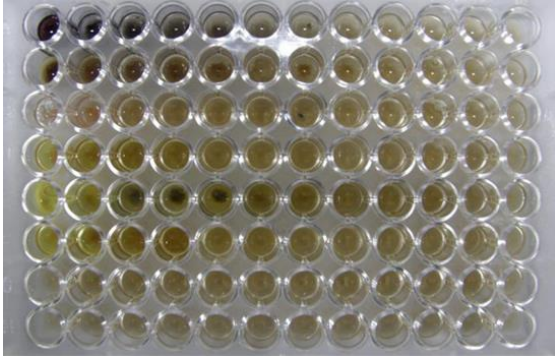
Test materyallerinin MBC değerlerini belirlemek amacıyla; test materyallerinin 96 kuyucuklu pleytte belirlenen MIC değerleri hangi kuyucuğa denk geliyorsa, o kuyucuğa kadar olan kuyucuklardan 10'ar µl alınıp HBA ve SDA besi yerleri üzerine pasajlar yapıldı ve 37°C'lik etüvde 18-24 saat süre ile inkübe edildi. Koloni oluşumunun tespit edilmediği en düşük madde

konsantrasyonu, test materyalinin MBC değeri olarak belirlendi.

2.3.2. Disk Difüzyon Analizi

Patojen oral mikroorganizmaların *Hypericum perforatum* L. ekstratı ve içerisinde bulunan sekonder metabolitlere karşı antimikrobiyal duyarlılıklarını test etmek amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanıldı.

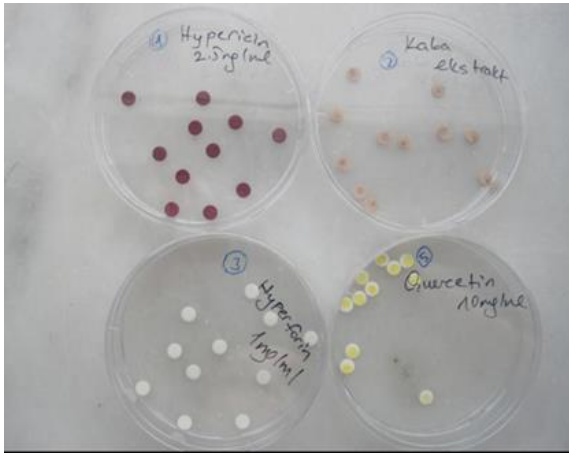
Disk difüzyon analizi için HBA ve SDA besi yerleri sterilize edilerek (121°C, 15 dk Otoklav) 45-50°C'ye kadar soğutuldu. Ardından 9,0 cm çapındaki steril petri kutularına 20'er ml dağıtıldı ve besiyerlerinin petri kutuları içerisinde dağılımları sağlandı. Besiyerleri katılaştıktan sonra inkübatör içerisinde bir gece kontaminasyon testine tabi tutuldu (37°C).



Şekil 1. 96 kuyucuklu plate'in inhibisyon öncesi görüntüsü.

McFarland 0,5 standardına göre 1×10^6 konsantrasyonda ayarlanmış her bir mikroorganizma süspansiyonunun ekimi, HBA (bakteriyal suşlar için) ve SDA (maya suşu için) besiyerleri üzerine cam bağıet ile homojen bir şekilde yayılarak yapıldı. Bir bakteri için 3 plak kullanıldı.

6 mm çapındaki steril diskler (Oxoid, England), boş steril petriye konuldu ve test materyallerinden 20'şer µl (Hypericum perforatum L. ekstratı (50mg/ml), Hypericin (2,5mg/ml), Hyperforin (1mg/ml), Hyperoside (5mg/ml), Quercetin (50mg/ml), Quercitrin (50mg/ml), Rutin (50mg/ml), CHX emdirildi (Şekil 2).



Şekil 2. Test materyallerinin disk difüzyon analizi için hazırlanışı.

Test materyali emdirilmiş steril diskler kuruduktan sonra, deneylerde kullanıldı. Madde emdirilmiş diskler, mikroorganizmaların ekiminin yapıldığı besi yeri içeren petriyerin yüzeyine dikkatli bir şekilde birbirine temas etmeyecek şekilde yerleştirildi. Diskler yerleştirildikten sonra 10-15 dk bekletildi ve ardından 37°C'lik etüvde 24 saat inkübe edildi. *A. actinomycetemcomitans*'ın ekiminin yapıldığı plak CO₂'li etüvde 48 saat, *P. gingivalis* ise anaerobik ortamda 72 saat inkübe edildiler. Süre sonunda petriyerde oluşan üreme inhibisyon zonları milimetrik cetvel kullanılarak ölçüldü. CHX emdirilmiş diskler pozitif kontrol olarak kullanıldı.

2.3.3. Sitotoksite analizi

Bitki ekstratının ve sekonder metabolitlerin insan gingival fibroblastlar üzerine toksik etkilerinin değerlendirilmesinin amaçlandığı sitotoksite analizi için MTT (Metiltiazol difenil tetrazolyum) testi, AntiMikrop Test Laboratuvarı (Trabzon Teknoloji Geliştirme Bölgesi, Trabzon)'nda ISO 10993- 5 (2009) no'lu protokole uygun olarak yürütüldü. Çalışmamızda tüm test materyallerinin sitotoksite analizi için kullanılan İnsan Gingival Fibroblast (HGF) hücre kültürü Antimikrop Test Laboratuvarı koleksiyonundan sağlandı.

2.3.4. Hücre kültürünün hazırlanması

Gingival fibroblast hücreleri saklama ortamları olan -196 °C'den çıkarılarak 37 °C'su banyosunda çözündürüldü ve 1500 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüjün ardından üstteki süpernatant kısım atılarak hücreler %10 fetal dana serumu (FDS), 100 IU/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve 5 µg/ml fungizone içeren EMEM (Eagle's minimal essential medium) (BioWhittaker, Lonza) besi ortamı ile süspansiyon edilerek T25 hücre kültürü kabına alındı.

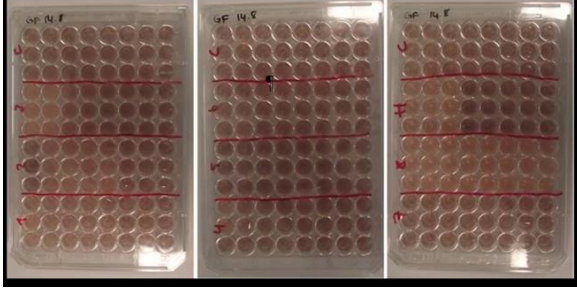
Hücrelerin kültür kabının yüzeyini kaplamaları ve üremeleri (monolayer hücre tabakası), doku kültürü mikroskopunda (TCM 400, Labomed) kontrol edildi. Hücreler kültür kabının yüzeyini tamamen kapladığında kültür kabındaki besi ortamı uzaklaştırıldı ve hücre tabakası Ca²⁺, Mg²⁺ içermeyen fosfat tamponlu salin solüsyonu (PBS, pH=7) ile yıkandı. Ardından % 0,25 tripsin+ EDTA solüsyonu ile yıkanarak 37 °C'de 5 dakika inkübasyona (Heal Force, HF90) bırakıldı. Süre sonunda mikroskopik olarak incelenen hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrıldıkları görüldü. Yüzeyden ayrılan hücrelere %10 FDS içeren EMEM ilave edilerek süspansiyon edildi ve 15ml'lik tüplere aktarıldı. 1500 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj (Elektro-mag M4812M, Turkey) edildikten sonra süpernatant kısım atıldı.

Ardından hücreler %10 FDS ve antibiyotik/antimikotik içeren EMEM besi ortamı ile homojenize edildi ve hücre süspansiyonu 2 adet T25 cm²'lik kültür kabına bölünerek hücre pasajlama işlemi tamamlandı. Bu şekilde 4 seri pasaj yapıldı.

2.3.5. MTT testinin uygulanması

4. pasajın ardından 96 kuyucuklu kültür kapları için istenen yoğunluktaki hücre sayısı hesaplandı ve mililitresinde $1,3 \times 10^6$ hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. Bu hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu kültür kabına her kuyucukta 100 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Her bir test materyalinden 100 µl, [(Hypericum perforatum L. ekstratı (50mg/ml), Hypericin (2.5mg/ml), Hyperforin (1mg/ml), Hyperoside (5mg/ml), Quercetin (50mg/ml), Quercitrin (50mg/ml), Rutin (50mg/ml), CHX 96 kuyucuklu kültür kabının ilk kuyucuklarına ilave edildi. Ardından test materyalleri DMSO ile süspansiyon edilerek her seferinde %50 oranında azalan konsantrasyonda bir alt kuyucuğa eklendi, böylece materyallerin 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, konsantrasyonları test edilmiş oldu (Tablo 2). Bu şekilde hazırlanan 96 kuyucuklu kültür kabı 37 °C'de %5 CO₂

içeren etüvde 48 saat süre ile inkübe edildi. 48 saat inkübasyonun ardından 96 kuyucuklu kültür kaplarındaki besi ortamı boşaltıldı ve her bir kuyucuğa çoklu pipet ile 0,1 ml EMEM (%0,5 FDS, %1 antibiyotik+ %1 fungizon) ilave edilerek yıkama işlemi yapıldı. Ardından her bir kuyucuğa tekrar çoklu pipet ile 0,1 ml EMEM (%0,5 FDS, %1 antibiyotik+ %1 fungizon) eklenerek 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 5-10 dakika süre ile inkübe edildi (Şekil 3).



Şekil 3. Hücrelerin test materyalleri ile inkübasyonu sonucu görüntüsü.

Bu sırada -20°C'de saklanan MTT boyası (Sigma, St. Louis, MO, USA) derin dondurucudan çıkartılıp erimesi için 37°C'de inkübatöre yerleştirildi. 96 kuyucuklu kültür kabının her kuyucuğuna 10 µl MTT çoklu pipet yardımı ile konuldu. 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 2 saat inkübasyonu sağlandı.

Ardından MTT boyası boşaltılarak her kuyucuğa 0,1 µl DMSO (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) eklendi ve 10-15 dakika 37 °C'de bekletildi böylece formazan krisallerinin çözülmesi sağlandı. Hücrelerin optik yoğunluğu mikroplate okuyucuda (Tecan GmbH, Austria) 570/630 nm dalga boyunda ölçüldü.

Hücre proliferasyonu çalışmasında her bir test materyali için 3 tekrar yapılarak istatistiksel değerlendirmenin anlamlı olması amaçlandı ve CHX pozitif kontrol ajanı olarak kullanılırken, sadece hücre içeren kuyucuklar negatif kontrol grubu olarak belirlendi.

Her bir kuyucuktaki hücre canlılığı (%) aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\% \text{ Hücre canlılığı} = \frac{\text{Test materyalinin absorbanansı}}{\text{Kontrol materyalinin absorbanansı}} \times 100$$

Test materyallerinin sitotoksitesi, hücre canlılığı göz önünde bulundurularak ve kontrol grubu karşılaştırılarak sitotoksik olmayan (hücre canlılığı >%90), hafif derecede sitotoksik (hücre canlılığı: %60-%90), orta derecede sitotoksik (hücre canlılığı: %30-%59), şiddetli sitotoksik (hücre canlılığı <%30) şeklinde derecelendirildi (Dahl ve ark., 2006).

2.4. İstatistiksel Analiz

Antimikrobiyal analiz incelemesi, tesadüf parsellemede faktöriyel deneme tertibine göre, 3 tekerrürlü olarak düzenlendi. Örnek büyüklüğü MİNİTAB yazılımı Power and Sample Size yordamında 2-Level Factorial Design

komutu ile hesaplanmış olup tahmin edilen testin gücü 1.00 olarak hesaplandı. İstatistiksel analizler SPSS (SPSS 20.0 Software Package Programme Inc., Chicago, Illinois, ABD) kullanılarak yapıldı. Çalışmanın antimikrobiyal analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) uygulanmış olup kontrol grubu olan CHX grubuyla farklılıkların karşılaştırılmasında Dunnet testi uygulandı. Sitotoksosite analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde Post-Hoc Bonferroni düzeltmeli Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) kullanıldı. Kontrol grubuyla farklılıkların karşılaştırılmasında ise Dunnet testi uygulandı.

3. Bulgular

3.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Bulguları

Disk difüzyon analizi sonucunda kullanılan test materyallerinin mikroorganizmalara karşı oluşturdukları inhibisyon zon değerleri, mm cinsinden Tablo 3'de verildi. Kontrol grubu olarak kullanılan CHX, *Hypericum perforatum* L. ekstratı ve sekonder metabolitleri ile kıyaslandığında test edilen tüm mikroorganizmalara karşı tüm konsantrasyonlarda, istatistiksel olarak daha fazla inhibisyon alanı oluşturduğu görüldü (p<0,001).

Tüm test materyallerinin MIC ve MBC değerleri CHX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0,05) (Tablo 4). *Hypericum perforatum* L.'nin *P. gingivalis* ve *C. albicans*'a MIC ve MBC değerleri 1:1/1:2 ve 1:2/1:1 konsantrasyonlarda elde edildi. Hyperforin'in *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *L. acidophilus* ve *A. actinomycetemcomitans*'a karşı duyarlı olduğu, MIC ve MBC değerlerinin sırası ile 1:128/1:8, 1:32/1:16, 1:32/1:8, 1:128/1:16, 1:32/1:4, 1:128/1:8 ve 1:256/1:16 olduğu belirlendi.

Hyperoside'e karşı en duyarlı mikroorganizma *S. mutans* olarak tespit edildi (MIC/MBC=1:64/1:4 konsantrasyon). Ardından sırası ile *L. acidophilus* (MIC/MBC=1:16/1:4 konsantrasyon), *A. actinomycetemcomitans* (MIC/MBC=1:4/1:1 konsantrasyon), *S. sanguinis*'a (MIC/MBC=1:2/1:1 konsantrasyon) etkili olduğu görüldü. *S. mitis*, *S. sobrinus* ve *S. salivarius*'un MIC ve MBC değerleri 1:1 olarak tespit edildi. Quercetin'in *P. gingivalis*'e MIC ve MBC değerleri 1:1/1:1 olarak belirlenirken Quercitrin'in *P. gingivalis*, *C. albicans* ve *A. Actinomycetemcomitans* için MIC ve MBC değerleri sırasıyla 1:8/1:1, 1:8/1:1, 1:8/1:4 olarak belirlendi.

3.2. Sitotoksosite Analizi Bulguları

MTT analizi sonucunda mikroplate okuyucuda ölçülen test materyallerinin hücre canlılığı yüzdelerinin ortalamaları Şekil 4'de görülmektedir. Kontrol grubu olarak kullanılan CHX'in, 1:1-1:32 konsantrasyonları arasında gingival fibroblast hücreleri üzerine şiddetli derecede sitotoksik olduğu, 1:64 ve 1:128 konsantrasyonlarda ise hafif derecede sitotoksik olduğu görüldü. *Hypericum perforatum* L.'nin 1:32 ve daha düşük konsantrasyonlarda gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik olmadığı görüldü. MIC değerinin elde edildiği 1:1 ve 1:2 konsantrasyonlarda hafif derecede sitotoksik etkiye sahip olduğu ve bu konsantrasyonlarda CHX ile

karşılaştırıldığında sitotoksitesinin anlamlı derecede düşük olduğu görüldü ($p<0,001$). 1:1 ve 1:2 konsantrasyonlarda şiddetli sitotoksik etki gösteren hyperforin'in, bu konsantrasyonlarda kontrol grubu olan CHX ile aralarında anlamlı farklılık olmadığı tespit edildi

($p>0,001$). MIC oluşturduğu konsantrasyonlarda (1:16-1:128) gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin olmadığı ve CHX ile karşılaştırıldığında sitotoksitesinin anlamlı derecede düşük olduğu görüldü ($p<0,001$).

Tablo 3. Test materyallerinin mikroorganizmalar üzerine oluşturduğu inhibisyon zonu (mm) değerleri

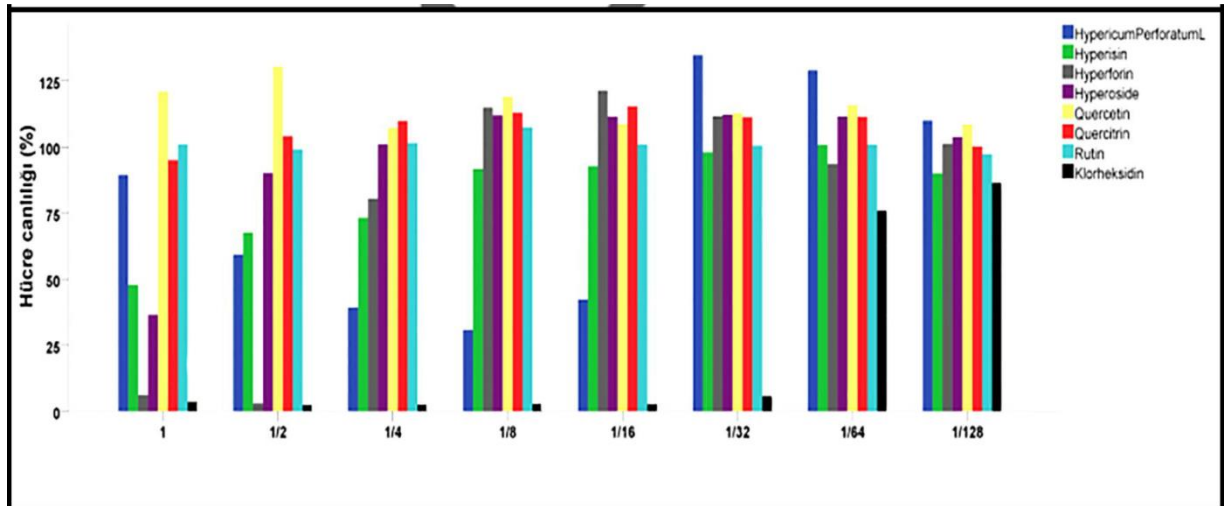
Mikroorganizma	Hypericum Perforatum L.	Hypericin	Hyperforin	Hyperoside	Klorheksidin	Quercetin	Quercitrin	Rutin
S. mutans	0,00±0,00b	0,00±0,0b	10,27±0,75b	8,21±0,55b	25,43±0,59a	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,0b
S. mitis	0,00±0,00b	0,00±0,0b	10,30±0,34b	9,02±0,26b	26,07±0,38a	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,0b
S.sanguinis	0,00±0,00b	0,00±0,0b	9,00±0,08b	9,05±0,24b	26,13±0,34a	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,0b
S. salivarius	0,00±0,00b	0,00±0,0b	9,29±0,35b	9,34±0,23b	24,20±0,38a	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,0b
S. sobrinus	0,00±0,00b	0,00±0,0b	10,20±0,36b	9,14±0,22b	25,13±0,38a	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,0b
L.acidophilus	0,00±0,00b	0,00±0,0b	10,39±0,31b	9,27±0,42b	25,40±0,10a	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,0b
P.gingivalis	15,13±0,20	0,00±0,0b	0,00±0,00b	0,00±0,00b	25,8±0,55a	17,14±0,22b	23,1±0,34b	0,00±0,0b
AAC	0,00±0,00b	0,00±0,0b	9,99±0,53b	9,14±0,28b	25,43±0,41a	0,00±0,00b	22,57±1,12b	0,00±0,0b
C. albicans	8,00±0,06b	0,00±0,0b	0,00±0,00b	0,00±0,00b	25,63±0,67a	0,00±0,00b	11,8±0,66b	0,00±0,0b
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

^{a,b} Aynı satırda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemlidir.
AAC= A.actinomycescomitans

Tablo 4. Test materyallerinin minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) ve minimum bakterisid konsantrasyon (MBC) değerleri (mg/ml)

MA	Hypericum Perforatum L.	Hypericin	Hyperforin	Hyperoside	Klorheksidin	Quercetin	Quercitrin	Rutin
S. mutans	≥50 ^b - ≥50 ^b	0.0097 ^b - 1.25 ^b	0.0078 ^b - 0.125 ^b	0.0781 ^b - 1.25 ^b	6x10 ^{-7a} - ≥0,0002 ^a	0.0976 ^b - 50 ^b	0.0976 ^b - 50 ^b	3.125 ^b - 50 ^b
S. mitis	≥50 ^b - ≥50 ^b	≥1.25 ^b - ≥1.25 ^b	0.0312 ^b - 0.0625 ^b	≥5 ^b - ≥5 ^b	18x10 ^{-8a} - 38x10 ^{-7a}	≥50 ^b - ≥50 ^b	≥50 ^b - ≥50 ^b	≥50 ^b - ≥50 ^b
S.sanguinis	≥50 ^b - ≥50 ^b	≥1.25 ^b - ≥1.25 ^b	0.0312 ^b - 0.125 ^b	2.5 ^b - ≥5 ^b	0.0078 ^a - 0.0625 ^a	≥50 ^b - ≥50 ^b	≥50 ^b - ≥50 ^b	25 ^b - ≥50 ^b
S. salivarius	≥50 ^b - ≥50 ^b	≥1.25 ^b - ≥1.25 ^b	0.0078 ^b - 0.0625 ^b	≥5 ^b - ≥5 ^b	≥0.0002 ^a - ≥0.0002 ^a	≥50 ^b - ≥50 ^b	≥50 ^b - ≥50 ^b	≥50 ^b - ≥50 ^b
S. sobrinus	≥50 ^b - ≥50 ^b	≥1.25 ^b - ≥1.25 ^b	0.0312 ^b - 0.25 ^b	≥5 ^b - ≥5 ^b	≥0.0002 ^a - ≥0.0002 ^a	≥50 ^b - ≥50 ^b	≥50 ^b - ≥50 ^b	≥50 ^b - ≥50 ^b
L.acidophilus	≥50 ^b - ≥50 ^b	≥1.25 ^b - ≥1.25 ^b	0.0078 ^b - 0.125 ^b	0.3125 ^b - 1.25 ^b	0.0039 ^a - 0.0039 ^a	≥50 ^b - ≥50 ^b	≥50 ^b - ≥50 ^b	12.5 ^b - ≥50 ^b
P.gingivalis	≥50 ^b - ≥50 ^b	≥1.25 ^b - ≥1.25 ^b	0.0039 ^b - 0.0625 ^b	1.25 ^b - ≥5 ^b	≥0.0002 ^a - ≥0.0002 ^a	≥50 ^b - ≥50 ^b	6.25 ^b - ≥50 ^b	≥50 ^b - ≥50 ^b
AAC	≥50 ^b - ≥50 ^b	≥1.25 ^b - ≥1.25 ^b	0.0039 ^b - 0.0425 ^b	1.25 ^b - ≥5 ^b	≥0.0002 ^a - ≥0.0002 ^a	≥50 ^b - ≥50 ^b	6.25 ^b - ≥50 ^b	≥50 ^b - ≥50 ^b
C. albicans	25 ^b - ≥50 ^b	0.156 ^b - 0.312 ^b	0.0625 ^b - 0.125 ^b	0.625 ^b - 1.25 ^b	0.0039 ^a - ≥0.0002 ^a	6.25 ^b - 6.25 ^b	6.25 ^b - 12.5 ^b	3.125 ^b - 6.25 ^b
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

^{a,b} Aynı satırda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemlidir.
MA= mikroorganizma, AAC= A.actinomycescomitans



Şekil 4. Dilüe edilen test materyallerinin gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksitesisi.

Hypericin'in sitotoksik etkisinin doza bağlı olarak azaldığı görüldü: 1:1 konsantrasyonda orta derecede sitotoksik, 1:2 ve 1:4 konsantrasyonlarda hafif derecede sitotoksik olduğu, 1:8 ve daha düşük konsantrasyonlarda ise gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik

olmadığı tespit edildi. CHX ile karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda her iki grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p<0,001$). Hyperoside'in 1:2 ve daha düşük konsantrasyonlarda gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik olmadığı;

1:1 konsantrasyonda ise orta derecede sitotoksik olduğu tespit edildi. Hyperoside'in test edilen tüm konsantrasyonda, CHX ile karşılaştırıldığında sitotoksitesinin anlamlı derecede düşük olduğu görüldü ($p<0,001$).

Quercetin, quercitrin ve rutin'in test edilen tüm dilüsyonlarda gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik olmadığı tespit edildi. CHX ile karşılaştırıldığında her üç metabolitin test edilen tüm konsantrasyonlarda anlamlı derecede düşük sitotoksitesiteye sahip oldukları görüldü ($p<0,001$).

4. Tartışma

Diş çürüğü ve periodontal hastalıkların en sık gözlenen enfeksiyöz hastalıklar olduğu bildirilmektedir (Misra ve ark., 2007). Gelişmiş ülkelerde bu hastalıkların görülme sıklığında gün geçtikçe belirgin bir düşüş gözlenirken Türkiye gibi gelişmekte olan ve koruyucu diş hekimliği uygulamalarının yeterince yaygınlaşmadığı ülkelerde, ağız ve diş sağlığı problemleri ciddi ekonomik ve sosyal sorunlar oluşturmaktadır. Bu nedenle bu hastalıkları önlemeye yönelik çalışmalar önemli ölçüde hız kazanmıştır.

Mikrobiyal dental plak, içerdiği mikroorganizma çeşitliliği açısından diş çürüğü ve periodontal hastalıkların başlamasında ve ilerlemesinde primer etiyolojik ajan olarak kabul edilir. Bu nedenle bu hastalıklardan korunmada birinci adım mikrobiyal dental plağın mekanik olarak uzaklaştırılmasıdır (Maes ve ark., 2006). Mekanik plak kontrolü diş fırçası, diş ipi, ara yüz fırçası, kürdan gibi ara yüz temizleyicileri ile sağlanmaktadır. Ancak özellikle çocukların diş fırçalamayı yeterince etkin yapamamaları (Hashim ve ark., 2013) ve tek başına mekanik temizliğin mikrobiyal dental plağın uzaklaştırılmasında yeterli olmaması, antimikrobiyal etkili kemaproflaktik ajanların kullanımını gündeme getirmiştir (Tedesco, 2000). Genellikle gargara solüsyonları ve diş macunları içerisinde kullanılan enzimler, kuarterner amonyum bileşikler, amin alkoller, fenoller, deterjanlar ve bisbiquanidler gibi antimikrobiyal özellikteki maddelerin etkinlikleri pek çok çalışma ile değerlendirilmiştir (Addy, 2003; Almas ve ark., 2005; Robertshaw ve Leppard, 2007; Çelik ve ark., 2008; Joiner ve ark., 2008; Malhotra ve ark., 2011; Todkar ve ark., 2012). Ancak antimikrobiyal etkili maddelere karşı direnç gösteren oral mikroorganizmaların artmış olması ve ticari ürünlerin çeşitli yan etkilere sahip olmaları (Davies ve ark., 2010), doğal ürünlere olan eğilimi arttırmıştır (Lee ve ark., 2004). Bitkilerden elde edilecek doğal antimikrobiyallerin günümüzde yaygın olarak kullanılan sentetik ajanlara iyi bir alternatif oluşturabileceği düşünülmekte ve bu konuda pek çok çalışma yapılmaktadır. Bilimsel literatür incelendiğinde ulaşılmasının kolay ve maliyetinin ucuz olması nedeniyle genellikle çalışmanın yapıldığı bölgeye ait bitkilerin çalışmalara dahil edildiği görülmektedir (Sereviratne ve ark., 2011).

Bu nedenle bu çalışmada tüm dünyada yaygın olarak yetişen ve ülkemizde de 43 endemik türü bulunan (Davis, 1988) Hypericaceae familyasına ait bir bitki olan *Hypericum perforatum* L bitkisi kullanılmıştır. Bu bitkinin halk arasında deri yaraları, yanıklar ve nevralji tedavisi için kullanıldığı bildirilmiştir (Beerhues, 2006). Bu etkilerin yanında herpes simpleks virüs tip 1 ve tip 2'ye karşı antiviral aktivitesi (Medina ve ark., 2006), antidepresan (Gaster ve Holroyd, 2000;) ve antitümöral etkinliği (Quiney ve ark., 2007) yapılan çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir.

Hypericum perforatum L.'nin antimikrobiyal aktivitesinin, içerisinde bulunan sekonder metabolitler sayesinde gerçekleştiği bilinmektedir. İçerisinde bulunan sekonder metabolitlerden hyperforin (Reichling ve ark., 2001), hypericin (Avato ve ark., 2004;), rutin, hyperoside, quercitrin, quercetin gibi flavonoidlerin (Cowan, 1999) antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle bu çalışmada *Hypericum perforatum* L. bitki ekstratının yanı sıra içerdiği bu sekonder metabolitlerin de antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Bir maddenin antimikrobiyal etkinliği agar difüzyon testleri (disk difüzyon, E-test), sıvı makro ve mikrodilüsyon testleri, agar dilüsyon testi, akım sitometri ve moleküler yöntemler ile incelenmektedir. Disk difüzyon yöntemi, hızlı üreyen aerop ve fakültatif anaerop bakteriler için önerilen ucuz, kolay uygulanabilen ve laboratuvarlarda rutin olarak tercih edilen bir testtir. Bir petri kutusunda 5-6 maddeye karşı duyarlılığın belirlenebilmesi ve en etkili olanın saptanması disk difüzyon testi ile mümkün olmaktadır. Sıvı dilüsyon testleri ise, antimikrobiyal ajanın bir mikroorganizmanın üremesini inhibe etmek (MIC) veya mikroorganizmaları öldürmek (MBC) için gerekli olan minimum konsantrasyonu belirlemenin mümkün olması nedeniyle en sık tercih edilen yöntemlerden biridir (Toroğlu ve Çenet, 2006). Bu nedenle çalışmamızda *Hypericum perforatum* L. ekstati ve sekonder metabolitlerin antimikrobiyal analizinde disk difüzyon analizi ve gerekli olan minimum konsantrasyonları belirleyebilmek için de sıvı dilüsyon testleri tercih edildi. Dental materyallerin antimikrobiyal etkinlik çalışmaları incelendiğinde, kontrol grubu olarak farklı antibakteriyel ajanların kullanıldığı görülmüştür. Test edilen mikroorganizma türüne göre ampisillin (Yu ve ark., 2003), vankomisin (Botelho ve ark., 2007), siprofloksasin (Abdollahzadeh ve ark., 2011) spiramisin (Iauk ve ark., 2003), gatifloksaasin ve moksifloksasin (Eick ve ark., 2004), tetrasiklin, amoksisilin (Al-hebshi ve ark., 2005) ve gentamisin (Yu ve ark., 2003) gibi çeşitli antibiyotiklerin yanı sıra, oral floradaki mikroorganizmalar için kontrol ajanı olarak CHX'in pek çok çalışmada tercih edildiği görülmektedir (Fathilah ve ark., 2009; Rasooli ve ark., 2009; Sampaio ve ark., 2009; Thaweboon ve Thaweboon, 2009; Wong ve ark., 2010; Sereviratne ve ark., 2011). CHX, aerop ve anerop olmak üzere hem gram-pozitif hem de gram-negatif mikroorganizmalara, mayalara ve mantarlara karşı etkisi

kanıtlanmış antiplak aktiviteye sahip yaygın olarak kullanılan antibakteriyel bir ajandır. Düşük konsantrasyonlarda hücre membran enzimlerini inhibe ederek ve hücre zarının geçirgenliğini artırarak bakteriyostatik etki gösterirken yüksek konsantrasyonlarda sitoplazmik makromoleküllerin koagülasyonuna yol açtığı ve böylece bakterisidal etki göstermektedir (Malhotra ve ark., 2011). Bu nedenlerle çalışmamızda bitki ekstratının ve içerisindeki sekonder metabolitlerin antimikrobiyal analizinde kontrol ajanı olarak CHX kullanıldı.

Bu çalışmada CHX, *Hypericum perforatum* L. ekstratı ve sekonder metabolitlerine göre test edilen gram-pozitif, gram-negatif mikroorganizmalar ile *C. albicans*'a karşı tüm konsantrasyonlarda daha yüksek inhibitör etki göstermiştir. *Hypericum perforatum* L. ekstratının ise sadece gram-negatif bir mikroorganizma olan *P. gingivalis* ve oral bölgede sıklıkla mantar enfeksiyonuna neden olan *C. albicans*'a karşı inhibisyon zonu oluşturduğu görülmüştür. Süntar ve ark., (2016), *Hypericum perforatum* L.'nin çeşitli ekstratlarının *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. plantarum*, *E. faecalis*'e karşı antimikrobiyal aktivitesini kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemi ile değerlendirmişler ve ampisilin antimikrobiyal aktivitesi ile karşılaştırdıkları çalışmalarında, ampisilin *Hypericum perforatum* L.'nin tüm ekstratlarından daha etkili olduğunu bulmuşlar. Bununla birlikte bitkinin tüm ekstratlarının test edilen mikroorganizmalara karşı inhibisyon alanı oluşturmasına rağmen çözücü olarak su kullanıldığında etanole göre daha yüksek antimikrobiyal etki ortaya çıktığını bildirmişler. Oysaki Dadgar ve ark (2006), *Hypericum perforatum* L.'nin etanol ekstratının metisiline dirençli *S.aureusa* karşı antimikrobiyal etkinliğini de ortaya koymuştur. Her ne kadar *Hypericum perforatum* L.'nin değişik çözücüler ile ekstrakte edilmesinin antimikrobiyal etkinliğinin test edildiği çalışmalarda gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmaların türüne göre değişiklik gösterse de genellikle yapılan çalışmalarda *Hypericum perforatum* L.'nin gram-negatif yerine gram-pozitif bakterilere daha etkili olduğunu göstermektedir. Nitekim Mazandarani ve ark. (2007), *Hypericum perforatum* L.'nin etanol ekstratının gram-pozitif (*E. faecalis*, *S. aureus*) ve gram-negatif (*Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*, *P.aeruginosa*) mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktivitesini inceledikleri çalışmalarında gram-pozitif bakterilerde karşı antimikrobiyal etki gösterirken gram-negatif bakterilere antimikrobiyal etki göstermediğini ortaya koymuşlardır. Oysaki mevcut bu çalışmada *Hypericum perforatum* L.'nin gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etki göstermezken gram-negatif bir bakteri olan *S. gingivalise* karşı antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. Daha farklı olarak Milosevic ve ark. (2007), *Hypericum perforatum* L. ekstratının meyve ve sebzelere izole edilebilen gram-negatif (*Pseudomonas fluorescens*, *P.phaseolicola*, *P. Glycinea*, *Erwinia carotovora*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*,

Agrobacterium tumefaciens, *Azobacter chroococum*) ve gram-pozitif (*B.mycoides*, *B. subtilis*) bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliğini incelemişler. *Hypericum perforatum* L. 'nin etanol ekstratının test edilen tüm gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliği olduğunu göstermişler. Çalışmalar arasındaki bu sonuç farklılığının antimikrobiyal etkinliğin test edildiği mikroorganizma çeşitliliği, kullanılan çözücülerin farklılığı, duyarlılık test yöntemlerinin farklılığından kaynaklanabileceği gibi *Hypericum perforatum* L. bitkisinin içerisindeki bileşenlerinin bitkinin yetiştiği bölgenin özelliklerine göre değişiklik göstermesinden de kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Nitekim, Avato ve ark., (2004) aynı çözücü kullanılsa bile aynı bitkinin farklı örneklerinin, farklı sonuçlar doğurabileceğini, bunun nedeninin de bitki içerisindeki aktif bileşen miktarının, bitkinin yetiştiği bölgeye, toplanma zamanına, ilk ekstraksiyon işlemi süresince maruz kaldığı ışığa bağlı olarak değişebilmesine bağlı olabileceğini söylemişlerdir (Vattikuti ve Ciddi, 2005).

Bu çalışmada *Hypericum Perforatum* L. içerisinde bulunan flavonoidlerden quercetin ve quercitrinin, dişeti hastalıklarından sorumlu gram-negatif bir bakteri olan *P.gingivalise* karşı antimikrobiyal etki gösterdiği görülmüştür. Geoghean ve ark.'nın 2008 yılında quercetin çeşitli ağız içi mikroorganizmalara etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında flavonoidin *P. gingivalis* ve *A. actinomycetemcomitans*' a karşı antimikrobiyal etki gösterirken bu çalışmaya benzer şekilde *S.mutans* ve *C albicansa* karşı etkili olmadığını bulmuşlar. *P. gingivalis* ve *A. actinomycetemcomitans*' a karşı antimikrobiyal etkisinin ise kontrol olarak kullanılan CHX ile benzer olduğunu göstermişler. Pek çok bitkide bulunan ve bitkiler tarafından mikrobiyal enfeksiyonlara cevap olarak sentezlenen flavonoid bileşiklerin antimikrobiyal etki mekanizmaları mikroorganizmanın nükleik asit sentezini durdurmak, sitoplazmik membranın inhibisyonu ve enerji metabolizmasının inhibisyonu şeklinde olduğu bildirilmiştir (Cushnie ve ark., 2005). Genellikle quercetin ve quercitrin dahil tüm flavonoidlerin antimikrobiyal etkinliğinin antibiyotiklerden düşük olduğu kabul edilir (Yamada, 1991). Ancak sitotoksik etkilerinin antimikrobiyal ajanlardan daha düşük olması onların yeni ve etkili antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi yönünde araştırılmalarının en büyük nedenidir.

Bu çalışmada hyperforine ve hyperosidin özellikle çürük oluşumundan ve ilerlemesinden sorumlu *S.mutans*, *S. mitis*, *S.sanguis*, *S.salivarius*, *S.sobrinus* ve *A. Actinomycetemcomitans*'a tek antimikrobiyal etkili sekonder metabolitler olduğu görülmüştür. Rusya'da geliştirilen ve *S. aureus* enfeksiyonlarına karşı Sulfanilamid'den daha etkili olduğu bildirilen Novoiamine ve İmanine isimli antibakteriyel ürünlerin içeriğinde bulunan hyperforin bulunmaktadır (Saddiqe ve ark., 2010). Schempp ve ark. (1999), hyperforin'in gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmalar üzerine

(*S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) antibakteriyel etkisini ve *C. albicans* üzerine antifungal etkisini inceledikleri çalışmalarında hyperforinin farklı konsantrasyonlarının (0.1, 1.0, 10, ve 100 µg/mL) tüm gram-pozitif mikroorganizmalar üzerine etkili olduğunu, gram-negatif mikroorganizmalara ve *C. albicans*'a inhibitör etki göstermediğini bildirmişler. Literatür incelendiğinde bu çalışma dışında hyperforinin oral mikroorganizmalara karşı etkinliğini inceleyen başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada ağız içerisinde sıklıkla mantar enfeksiyonuna neden olan *C. albicans* tek etkili sekonder metabolitin quercitrin olduğu görülmüştür. Literatür incelendiğinde quercitrinin mantarlara karşı antimikotik aktivitesini inceleyen tek çalışma olan Gehrke ve ark. (2013)'ün çalışmasında quercitrinin *C. albicans*'a düşük antimikotik etki gösterdiği bulunmuştur.

Hypericum perforatum L.'nin sitotoksitesitesi ile ilgili yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde fototoksitesitesi üzerine odaklanıldığı görülmektedir. Hypericin fototoksitesiteden sorumlu bileşen olarak bildirilmiş ve aşırı miktarda bitki tüketen hayvanlarda güneş ışığına maruz kalınması sonucu ciltte kızarıklık ve ödem olduğu açıklanmıştır (Traynor ve ark., 2005). *Hypericum perforatum* L. ile ilgili bu tip yan etkiler bildirilse de yapılan klinik çalışmalar sonucunda, bitkinin fototoksik etkilerinin son derece seyrek olarak ortaya çıktığı ve yüksek dozlarda, aşırı kullanımı sonucu olduğu rapor edilmiştir (Schempp ve ark., 2003). Çalışmamızda *Hypericum perforatum* L. bitki ekstratı'nın gingival fibroblastlar üzerine sitotoksitesitesi incelendiğinde doza bağlı olarak değişen bir grafik gösterdiği ve 1,56 mg/ml ve daha düşük dozlardaki bitki ekstratının gingival fibroblastlar üzerine sitotoksik olmadığı görüldü. Aynı şekilde bu çalışmada *Hypericum perforatum* L.'nin ekstratının ve içeriğindeki sekonder metabolitlerinin sitotoksitesitesinin de CHX'den anlamlı derecede düşük olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak *Hypericum perforatum* L. ekstratı ve sekonder metabolitlerinden quercetin ve quercitrinin dişeti hastalığından sorumlu *P. gingivalise*; hyperforin hyperosidin çürük oluşumundan sorumlu *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. sabrinus* ve *A. actinomycetemcomitans*'a ve quercitrinin ağız içi mantar enfeksiyonundan sorumlu *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivite göstermişlerdir. *Hypericum perforatum* L. ekstratı ve sekonder metabolitlerinin bahsedilen bu antimikrobiyal etkisi tüm konsantrasyonlar için her ne kadar CHX'den düşük bulunmuş olsada gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkileri CHX'den anlamlı şekilde düşük bulunduğu da göz önünde bulundurulmalıdır. Bitki ekstratlarının saf bileşikler olmadığı için bu yönde yapılacak çalışmalar ile içerdikleri sekonder metabolitlerin de incelenmesi, yüksek antimikrobiyal etkinliğe sahip, düşük sitotoksik etkili yeni antimikrobiyal ve antifungal bitki ekstratları ve sekonder

metabolitler için kapı aralayacaktır.

Çıkar İlişkisi

Yazarlar bu çalışmada hiçbir çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmektedirler.

Teşekkür ve Bilgilendirme

Bu çalışma PYO.DIS.1904.12.008 nolu araştırma projesi ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Abdollahzadeh SH, Mashouf R, Mortazavi H, Moghaddam M, Roozbahani N, Vahedi M. 2011. Antibacterial and antifungal activities of punica granatum peel extracts against oral pathogens. *J Dent*, 8(1): 1-6.
- Adams D, Addy M. 1994. Mouthrinses. *Adv Dent Res*, 8(2): 291-301.
- Addy M. 2008. The use of antiseptics in periodontal therapy. In: Linde J, Korrring T, Lang NP (eds.). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 4th Ed., Munksgaard, Blackwell Publishing Ltd., 464-493.
- Addy M, Martin MV. 2003. Systemic antimicrobials in the treatment of chronic periodontal diseases: a dilemma. *Oral Dis*, 9(1):38-44.
- Al-hebshi N, Al-haroni M, Skaug N. 2006. In vitro antimicrobial and resistance-modifying activities of aqueous crude khat extracts against oral microorganisms. *Arch Oral Biol*, 51(3): 183-188.
- Almas K, Skaug N, Ahmad I. 2005. An in vitro antimicrobial comparison of miswak extract with commercially available non-alcohol mouthrinses. *Int J Dent Hyg*, 3(1): 18-24.
- Autio-Gold J. 2008. The role of chlorhexidine in caries prevention. *Oper Dent*, 33(6): 710-716.
- Avato P, Raffo F, Guglielmi G, Vitali C, Rosato A. 2004. Extracts from St John's Wort and their antimicrobial activity. *Phytother Res*, 18(3): 230-232.
- Baehni PC, Takeuchi Y. 2003. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm associated oral diseases. *Oral Dis*, 9(1): 23-29.
- Balakrishnan M, Simmonds RS, Tagg JR. 2000. Dental caries is a preventable infectious disease. *Aust Dent J*, 45(4): 235-245.
- Beerhues L. 2006. Hyperforin. *Phytochemistry*, 67(20): 2201-2207.
- Bighton D, Brailsford S, Samaranyake LP, Brown JP, Ping FX, Grant-Mills D, Harris R, Lo EC, Naidoo S, Ramos-Gomez F, Soo TC, Burnside G, Pine CM. 2004. A multi-country comparison of caries-associated microflora in demographically diverse children. *Community Dent Health*, 21: 96-101.
- Borrajó JLL, Varela AG, Castro GL, Nunez IR, Figueroa MG, Torreira MG. 2002. Efficacy of clorhexidine mouthrinses with and without alcohol: a clinical study. *J Peridontol*, 73: 317-321.
- Botelho MA, Nogueira NA, Bastos GM, Fonseca SG, Lemos TL, Matos FJ, Montenegro D, Heukelbach J, Rao VS, Brito GA. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Braz J Med Biol Res*, 40(3): 349-356.
- Brambilla E, Garcia-Godoy F, Strohmenger L. 2000. Principles of diagnosis and treatment of high-caries-risk subjects. *Dent Clin North Am*, 44(3): 507-540.
- Burt BA. 1998. Prevention policies in the light of the changed distribution of dental caries. *Acta Odontol Scand*, 56: 179-186.
- Colasanti A, Kisslinger A, Liuzzi R, Quarto M, Riccio P, Roberti G,

- Tramontano D, Villani F. 2000. Hypericin photosensitization of tumor and metastatic cell lines of human prostate. *J Photochem Photobiol B*, 54(2-3): 103-107.
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, 12(4): 564-582.
- Cushnie TP, Lamb T, Andrew J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Inter J Antimicrob Agents*, 26(5) : 343-356
- Çakır FY, Gürkan S, Attar N. 2010. Çürük mikrobiyolojisi. *Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 34(3-4): 78-91.
- Çelik EU, Sirin TC, Ergucu Z, Turkun M, Ates M. 2008. Can different chlorhexidine agents be used as cavity disinfectants? *Gen Dent*, 56(6): 33-37.
- Dadgar T, Asmar M, Saifi A, Mazandarani M, Bayat H, Moradi A, Bazueri M, Ghaemi E. 2006. Antibacterial activity of certain Iranian medicinal plants against methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*. *Asian J Plant Sci*, 5(5): 861-866.
- Dahl JE, Frangou-Polyzois MJ, Polyzois GL. 2006. In vitro biocompatibility of denture relining materials. *Gerodontology*, 23(1): 17-22.
- Davies RM, Davies GM, Ellwood RP, Kay EJ. 2003. Prevention. Part 4: What advice should be given to patients? *Br Dent J*, 195: 135-141.
- Davis PH. 1988. *Flora of Turkey and East Aegean Island*. 1th Edition, England, University of Edinburgh.
- De Soet JJ, Holbrook WP, Vanamerongen WE, Schipper E, Homburg CHE, Degraaff J. 1990. Prevalence of streptococcus-sobrinus in relation to dental-caries in children from Iceland and the Netherlands. *J Dent Child*, 57: 337-342.
- Eick S, Schmitt A, Sachse S, Schmidt KH, Pfister W. 2004. In vitro antibacterial activity of fluoroquinolones against *Porphyromonas gingivalis* strains. *J Antimicrob Chemother*, 54(2): 553-556.
- Eley BM. 1999. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque--a review. *Br Dent J*, 186(6): 286-296.
- Fathilah AR, Rahim ZH, Othman Y, Yusoff M. 2009. Bacteriostatic effect of Piper betle and Psidium guajava extracts on dental plaque bacteria. *Pak J Biol Sci*, 12(6):518-521.
- Fitzgerald RJ, Fitzgerald DB, Adams BO, Duany LF. 1980. Cariogenicity of human oral lactobacilli in hamsters. *J Dent Res*, 59(5): 832-837.
- Gabris K, Nagy G, Madlena M, Denes Z, Marton S, Keszthelyi G, Banoczy J. 1999. Associations between microbiological and salivary caries activity tests and caries experience in Hungarian adolescents. *Caries Res*, 33: 191-195.
- Gaster B, Holroyd J. 2000. St John's wort for depression. *Arch Intern Med*;160(2):152-156.
- Geoghegan F, Tsui VW, Wong RW, Rabie AB. 2008. Inhibitory effect of quercetin on periodontal pathogens. *Ann R Australas Coll Dent Surg*, 19: 157-158
- Gehrke, ITS, et al. 2013. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* Anacardiaceae). *J Ethnopharmacol*, 148(2): 486-491
- Hashim R, Williams S, Thomson WM. 2013. Oral hygiene and dental caries in 5- to 6-year-old children in Ajman, United Arab Emirates. , 11(3): 208-215.
- Iauk L, Lo Bue AM, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G. 2003. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. *Phytother Res*, 17(6): 599-604.
- Joiner A, Schwarz A, Philpotts CJ, Cox TF, Huber K, Hannig M. 2008. The protective nature of pellicle towards toothpaste abrasion on enamel and dentine. *J Dent*, 36:360-368.
- Katsura H, Tsukiyama R, Suzuki A, Kobayashi M. 2001. In vitro antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(11): 3009-3013.
- Klinke T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T. 2011. Dental Caries in Rats Associated with *Candida albicans*. *Caries Res*, 45(2): 100-106.
- Lee JW, Choi BK, Yoo YJ, et al. 2003. Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. *J Periodontol*, 74: 1329-35.
- Lee SS, Zhang W, Li Y. 2004. The antimicrobial potential of 14 natural herbal dentifrices. *JADA*, 135:1133-1141.
- Lemos-Junior CA, Villoria GEM. 2008. Reviewed evidence about the safety of the daily use of alcohol-based mouthrinses. *Braz Oral Res*, 22: 24-31.
- Loreven CV, Buijs JF, Cate JM. 2000. The effect of triclosan toothpaste on enamel demineralization in a bacterial demineralization model. *J Antimicrob Chemother*, 45(2): 153-158.
- Lüthi M, Gyenge EB, Engström M, Bredell M, Gratz K, Walt H, Gmür R, Maaake C. 2009. Hypericin and mTHPC-mediated photodynamic therapy for the treatment of cariogenic bacteria. *Med Laser Applic*, 24: 227-236.
- Maes L, Vereecken C, Vanobbergen J, Honkala S. 2006. Tooth brushing and social characteristics of families in 32 countries. *Int Dent J*, 56: 159-167.
- Malhotra N, Rao SP, Acharya S, Vasudev B. 2011. Comparative in vitro evaluation of efficacy of mouthrinses against *Streptococcus mutans*, *Lactobacilli* and *Candida albicans*. *Oral Health Prev Dent*, 9(3): 261-268.
- Mazandarani M, Yassaghi S, Rezaei MB, Mansourian AR, Ghaemi EO. 2007. Ethnobotany and antibacterial activities of two endemic species of *Hypericum* in North-East of Iran. *Asian J Plant Sci*, 6: 354-358.
- Mc Donald RE, Avery DR, Dean JA. 2004. *Dentistry For The Child and Adolescent*. 8th Edition, Indiana, Mosby Year Book., 340-356.
- Medina MA, Martinez-Poveda B, Amores-Sanchez MI, Quesada AR. 2006. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? *Life Sci*, 79(2): 105-111.
- Milosevic T, Solujic S, Sukdolak S. 2007. In vitro study of ethanolic extract of *Hypericum perforatum* L. on growth and sporulation of some bacteria and fungi. *Turkish J Biol*, 31: 237-241.
- Misra S, Tahmassebi JF, Brosnan M. 2007. Early childhood caries--a review. *Dent update*, 34(9): 556-564.
- Moalic E, Gestalin A, Quinio D, Gest PE, Zerilli A, Le Flohic AM. 2001. The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationship with dental caries. *Caries Res*, 35: 149-155.
- Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. 2007. *Carranza's Clinical Periodontology Middle East and Africa* Edition. 10th Edition, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 99-208.
- Norman OH, Garcia- Godoy F. 2004. *Introduction to Primary Preventive Dentistry*. 6th edition, New Jersey, Pearson Prentice Hall., 23-45.
- Paterniti I, Briguglio E, Mazzon E, Galuppo M, Oteri G, Cordasco G, Cuzzecrea S. 2010. Effect of *Hypericum perforatum*, in rodent model of periodontitis. *BMC Complement Altern Med*, 10(73): 1-10.
- Poggi P, Baena RR, Rizzo S, Rota MT. 2003. Mouthrinses with alcohol: cytotoxic effect on human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol*, 74: 623-629.
- Quiney C, Billard C, Faussat AM, Salanoubat C, Kolb JP. 2007. Hyperforin inhibits P-gp and BCRP activities in chronic lymphocytic leukaemia cells and myeloid cells. *Leuk*

- Lymphoma, 48(8): 1587-1599.
- Rasooli I, Shayegh S, Astaneh S. 2009. The effect of *Mentha spicata* and *Eucalyptus camaldulensis* essential oils on dental biofilm. *Int J Dent Hyg*, 7(3): 196-203.
- Reichling J, Weseler A, Saller R. 2001. A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*, 34(1): 116-118.
- Roberson TM, Heyman HO, Swift EJ. 2011. *Introduction to Art and Science of Operative Dentistry*. 5th Edition, St. Louis, Mosby Co., 67-134.
- Robertshaw H, Leppard B. 2007. Contact dermatitis to triclosan in toothpaste. *Contact Dermatitis*, 57(6): 383-384.
- Saddiqe Z, Naem I, Maimoona A. 2010. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol*, 131(3): 511-521.
- Sampaio FC, Pereira Mdo S, Dias CS, Costa VC, Conde NC, Buzalaf MAJ. 2009. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *Ethnopharmacol*, 124(2): 289-294.
- Santos A. 2003. Evidence-based control of plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol*, 30(5): 13-16.
- Sardella A, Lodi G, Demarosi F, Tarozzi M, Canegallo L, Carrassi A. 2008. *Hypericum perforatum* extract in burning mouth syndrome: a randomized placebo-controlled study. *J Oral Pathol Med*, 37: 395-401.
- Schempp CM, Pelz K, Wittmer A, Schöpf E, Simon JC. 1999. Antibacterial activity of hyperforin from *St John's wort*, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *Lancet*, 353(19): 21-29.
- Schempp CM, Winghofer B, Müller K, Schulte-Monting J, Mannel M, Schopf E, Simon JC. 2003. Effect of oral administration of *Hypericum perforatum* extract (*St. John's wort*) on skin erythema and pigmentation induced by UVB, UVA, visible light and solar stimulated radiation. *Phytother Res*, 17(2): 141-146.
- Sereviratne CJ, Wong RWK, Hagg U, Chen Y, Herath TDK, Samaranayake PL, Kao R. 2011. *Prunus mume* extract antimicrobial activity against pathogenic oral bacteria. *Int J Pediatr Dent*, 21(4): 299-305.
- Silverman S, Wilder R. 2006. Antimicrobial mouthrinse as part of a comprehensive oral care regimen safety and compliance factors. *JADA*, 137: 22-26.
- Süntar I, Oyardı O, Akkol EK, Özçelik B. 2016. Antimicrobial effect of the extracts from *Hypericum perforatum* against oral bacteria and biofilm formation. *Pharm Biol*, 54(6): 1065-1070.
- Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. 2001. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ*, 65: 1028-1037.
- Tedesco LA. 2000. Behavioral research related to oral hygiene practices: A new century model of oral health promotion. *Periodontol*, 1995, 8: 15-23.
- Thaweboon S, Thaweboon B. 2009. In vitro antimicrobial activity of *Ocimum americanum* L. essential oil against oral microorganisms. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 40(5): 1025-1033.
- Todkar R, Sheikh S, Byakod G, Muglikar S. 2012. Efficacy of chlorhexidine mouthrinses with and without alcohol - a clinical study. *Oral Health Prev Dent*, 10(3): 291-296.
- Toroğlu S, Çenet M. 2006. Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(2): 12-20.
- Traynor NJ, Beattie PE, Ibbotson SH, Moseley H, Ferguson J, Woods JA. 2005. Photogenotoxicity of hypericin in HaCaT keratinocytes: implications for *St. John's Wort* supplements and high dose UVA-1 therapy. *Toxicol Lett*, 158(3): 220-224.
- Vattikuti UMR, Ciddi V. 2005. An overview on *Hypericum perforatum* Linn. *NPR*, 4(5): 1-6.
- Wilson RF, Ashley FP. 1990. The relationship between the biochemical composition of dental plaque from both approximal and free smooth surfaces of teeth and subsequent 3-year caries increment in adolescents. *Arch Oral Biol*, 35(12): 933-937.
- Wong RW, Hagg U, Samaranayake L, Yuen MK, Seneviratne CJ, Kao R. 2010. Antimicrobial activity of Chinese medicine herbs against common bacteria in oral biofilm. A pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 39(6): 599-605.
- Yamada, H. 1991. Natural products of commercial potential as medicines. *Current opinion in biotechnology*, 2(2): 203-210.
- Yu HH, Kim YH, Kil BS, Kim KJ, Jeong SI, You YO. 2003. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Artemisia iwayomogi*. *Planta Med*, 69(12): 1159-1162.