



**YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI**

**İKİ FARKLI UÇUCU YAĞ İLE KARIŞTIRILMIŞ KALSİYUM
HİDROKSİT'İN ANTİMİKROBİYAL VE ANTİFUNGAL
ETKİNLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Gökalp COŞAN

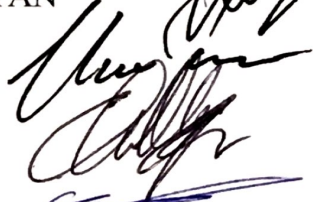
**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yaşar Meriç TUNCA**

Lefkoşa

Haziran, 2022

Onay

Gökalp COŞAN tarafından hazırlanan “İki Farklı Uçucu Yağ ile Karıştırılmış Kalsiyum Hidroksit’in Antimikrobiyal ve Antifungal Etkinliklerinin Değerlendirilmesi” başlıklı tez, kapsam ve nitelik açısından kalite standartlarına uygunluğu ile ilgili Endodonti Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak 30/06/2022 tarihinde kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Adı - Soyadı	İmza
Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Yaşar Meriç TUNCA	
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Meltem DARTAR ÖZTAN	
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Umut TUNGA	
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Umut AKSOY	
Jüri Üyesi:	Yrd. Doç. Dr. Fatma BASMACI	
Jüri ve Tez Danışmanı:	Prof. Dr. Yaşar Meriç TUNCA	
Tez Eş Danışmanı:	Yrd. Doç. Dr. Cenk Serhan ÖZVEREL	

Anabilim Dalı Başkanı Onayı

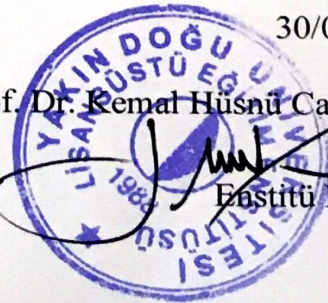
30/06/2022
Doç. Dr. Umut AKSOY

Ünvan, Ad-Soyad

Anabilim Dalı Başkanı

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

30/06/2022
Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can Başer
Enstitü Müdürü



Etik İlkelerle Uygunluk Beyanı

Bu tezin içinde sunduğum verileri, bilgileri ve belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi; tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu; çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kurallar gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Gökalp COŞAN

30/06/2022

Teşekkür

Bugün yıllar önce kendime verdiğim sözü tutarak doktora sürecini tamamlamanın mutluluğunu yaşıyorum. Bu zorlu süreçte maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan canım babam **Enis Coşan**'a, şu an aramızda olmayan ama iyi kötü her anımda kalbimde hissettiğim kanatsız meleğim canım annem **Fatma Coşan**'a ve kız kardeşim canım **Gözde Coşan**'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Endodonti alanında doktora sürecine başladığım andan itibaren bilgisi ve tecrübeleri ile yoluma ışık tutan danışman hocam **Prof. Dr. Yaşar Meriç Tunca**'ya,

Zorlu tez döneminde başarabileceğime her zaman inanan, tez çalışmamın başından sonuna yardımlarını esirgemeyen, en zorlu zamanlarda bile bilgisi ile çıkış yolunu gösteren, canım abim, eş danışmanım **Yrd. Doç. Dr. Cenk Serhan Özverel**'e,

Kıymetli vaktini ayırıp, tez çalışmamın uçucu yağ kısmı konusunda, bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren değerli hocam **Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can Başer** ve **Yrd. Doç. Dr. Duygu Yiğit Hanoğlu**'na teşekkür ederim.

Akademik ve klinik sorularımız ile kapılarını çaldığımızda bizleri hep güler yüzle karşılayan, asla geri çevirmeyen ve bilgilerini bizlere fazlasıyla aktarmaya çalışan sevgili hocalarım **Doç. Dr. Umut Aksoy**, **Yrd. Doç. Dr. Fatma Basmacı**, **Yrd. Doç. Dr. Meltem Küçük**, **Yrd. Doç. Dr. Mohamad Abduljalil**, **Yrd. Doç. Dr. Dilan Kırmızı** ve **Dr. Dt. Abdullah Sebai** hocalarıma teşekkür ederim.

Arkadaşlığın ne demek olduğunu gönülden hissettiğim ve üniversite dahil olmak üzere doktora hayatının tüm zorluklarına karşı omuz omuza yürüdüğüm, en güzel en eğlenceli anılara birlikte imza attığım ve hep iyi ki dediğim güzel insanlar, canım kardeşlerim **Dt. Buğçe Sakallı**, **Dt. Dilara Koruk Yürün**, **Dr. Dt. Gizem Andaç Yanal** ve **Dt. Ghassan Dandache** başta olmak üzere diğer tüm bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Özet

İki Farklı Uçucu Yağ İle Karıştırılmış Kalsiyum Hidroksit'in Antibakteriyel Ve Antifungal Etkinliklerinin Değerlendirilmesi

COŞAN, Gökalep

Doktora, Endodonti Anabilim Dalı

30/06/2022, 125 sayfa

Kalsiyum hidroksit $\text{Ca}(\text{OH})_2$, kök kanal tedavisi sırasında kök kanal dezenfeksiyonu için rutin olarak kullanılan bir materyaldir. Doğal ürünlerin antibakteriyel etkiler açısından büyük potansiyele sahip olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, *Origanum dubium* (*O. dubium*) ve *Mentha spicata* (*M. spicata*) uçucu yağları kullanılarak alternatif ve etkili bir kanal içi medikaman oluşturulması amaçlanmıştır. Kıbrıs, Lefke'den toplanan *O. dubium* ve *M. spicata* ayrı ayrı hidrodistilasyon'a tabi tutulmuştur. Elde edilen uçucu yağ bileşimleri Gaz Kromatografisi (GC) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GC-MS) ile eş zamanlı olarak analiz edilmiştir. Daha sonra gruplar belirlenerek, eşit konsantrasyonda $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ile karıştırılmışlardır. Pat haline getirilen karışımların antimikrobiyal etkinlikleri kök kanalında en yaygın dirençli patojen mikroorganizmalar olan *Enterococcus faecalis* ve *Candida albicans* üzerinde test edilmiştir. Patların antibakteriyel aktivitesi, disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. GC ve GC-MS analizleri neticesinde, *O. dubium*'da bulunan en yaygın bileşen karvakrol (%75.8), *M. spicata*'da ise karvon (%71.3) olarak saptanmıştır. *O. dubium* uçucu yağı içeren çalışma grupları hem *E. faecalis* (*Enterococcus faecalis*) hem de *C. albicans* (*Candida albicans*) üzerinde test edildiğinde antimikrobiyal aktivitelerin diğer gruplara kıyasla daha anlamlı ve daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuçlar ayrıca *M. spicata*'nın $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ile birlikte 72 saat süreyle inkübe edildiğinde *C. albicans* üzerinde önemli bir antifungal etki gösterdiğini göstermiştir. *M. spicata*'nın *C. albicans* üzerinde etkili bir antimikrobiyal ajan olduğu, *O. dubium*'un ise hem *E. faecalis* hem de *C. albicans* üzerinde çok etkili olduğu bulunmuştur. Bu veriler ışığında, *O. dubium* ve *M. spicata* uçucu yağlarının,

gelecekteki rutin klinik uygulamalarda alternatif bir kanal içi medikaman uygulaması için umut verici aday olabilecekleri düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: endodonti; uçucu yağlar; antimikrobiyal; antibakteriyel; *E. faecalis*, *C. albicans*, kalsiyum hidroksit

Abstract

Evaluation Of Antibacterial And Antifungal Effects Of Calcium Hydroxide Mixed With Two Different Essential Oils

COSAN, Gokalp

PhD, Department of Endodontics

30/06/2022, 125 page

Calcium hydroxide is a routinely used material for root canal disinfection during root canal treatment. Natural products have great potential in terms of their antibacterial effects. This study aimed to establish an effective alternative intracanal medicament using *Origanum dubium* (*O. dubium*) and *Mentha spicata* (*M. spicata*) essential oils. *O. dubium* and *M. spicata*, collected from Lefke, Cyprus, were separately subjected to hydrodistillation. The obtained essential oil compositions were analysed simultaneously by gas chromatography (GC) and gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS). The compositions were then divided into groups and mixed with calcium hydroxide at a 1:1 concentration; after that, the pastes were tested on *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) and *Candida albicans* (*C. albicans*), which are the most common resistant pathogenic microorganisms in the root canal. The antibacterial activity of the pastes was measured using a disk diffusion assay. The GC and GC-MS analyses revealed that *O. dubium* and *M. spicata* had major compositions of carvacrol (75.8%) and carvone (71.3%), respectively. Antimicrobial activity was found to be significantly higher when study groups with *O. dubium* essential oil were applied to both *E. faecalis* and *C. albicans*. The results also show that *M. spicata*, together with calcium hydroxide, demonstrated a significant antifungal effect on *C. albicans* when incubated for 72 h. *M. spicata* was found to be an effective antimicrobial agent on *C. albicans*, whereas

O. dubium was found to be very effective on both *E. faecalis* and *C. albicans*. These data demonstrate that these natural essential oils may be promising candidates for alternative intracanal medicament in future routine clinical applications.

Keywords: endodontics; essential oils; antimicrobial; antibacterial; *E. faecalis*; *C. albicans*; calcium hydroxide

İçindekiler

Onay.....	I
Etik İlkelere Uygunluk Beyanı.....	II
Teşekkür.....	III
Özet.....	IV
Abstract.....	V
İçindekiler.....	VI
Tablolar Listesi.....	IX
Şekiller Listesi.....	X
Simgeler ve Kısaltmalar.....	XI

BÖLÜM I

Giriş.....	1
------------	---

BÖLÜM II

Genel Bilgiler.....	4
Endodontik Enfeksiyonlar ve Endodontik Mikrobiyoloji	4
Endodontik Enfeksiyonlarda Görülen İnاتçı Mikroorganizmalar.....	7
<i>Enterococcus faecalis</i>	8
<i>Candida Albicans</i>	10
<i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Candida albicans</i> İlişkisi	12
Medikaman Uygulaması ile Kanal İçi Dezenfeksiyon Yapılmasının Önemi	12
Kalsiyum Hidroksit Ca(OH) ₂	13
Kalsiyum Hidroksit ve Sıvı Taşıyıcılar	14
Kalsiyum Hidroksit'in Antibakteriyel ve Antifungal Aktivitesi	14
Kalsiyum Hidroksit'in Pulpa Dokusu Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	15
Kalsiyum Hidroksit'in Periapikal Dokular Üzerindeki Sitotoksik Etkisi.....	16
Antibiyotikler	16
Fitoterapi	17
Dış Hekimliğinde Fitoterapi	18

Diş Hekimliğinde Fitoterapi Uygulamalarının Antimikrobiyal Amaçlı Kullanım Alanları.....	18
Periodontal Tedavilerde Diş Macunu ve Gargara Olarak Kullanım.....	18
Uçucu Yağların Endodontide İrrigasyon Solüsyonu ve Guta Çözücü Olarak kullanımı.....	20
Fitoterapi ve Uçucu Yağlar	21
Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktiviteleri.....	22
Uçucu Yağların Etki Mekanizması.....	23
Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri.....	24
Uçucu Yağların Kompozisyonlarını Belirleme Yöntemleri	25
Çalışmada Kullanılan Bitkiler	26
Kekik (<i>Origanum dubium</i> Boiss)	26
Nane (<i>Mentha spicata</i> Lamiceae)	27
Antimikrobiyal Aktivite Düzeyini Saptama Yöntemleri ve Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	27
Dilüsyon Metotları: Broth Dilüsyon ve Agar Dilüsyon.....	27
Antimikrobiyal Gradyan Metodu.....	29
Disk Difüzyon Yöntemi.....	29
Antimikrobiyal Dirençli Bakterilerin Tespiti için Kromojenik Agar	29
Antimikrobiyal Dirençli Bakterilerin Tespiti için Kolorimetrik Testler	30

BÖLÜM III

Gereç ve Yöntem.....	31
Bitkiler.....	31
Uçucu Yağların Elde Edilmesi	32
GC/MS Analizleri.....	33
GC Analizleri	35
Uçucu Yağ Bileşenlerinin Saptanması	38
Bakteri ve Candida Kültürlerinin Hazırlanması	38
Deney Gruplarının Hazırlanması.....	38
Disk Diffüzyon Yöntemi	41
İstatiksel Analiz.....	46

BÖLÜM IV

Bulgular.....	47
---------------	----

BÖLÜM V

Tartışma.....	52
---------------	----

BÖLÜM VI

Sonuç ve Öneriler.....	63
------------------------	----

	X
Kaynakça	64
EKLER	93
Ek 1. Yayın	93
Ek 2. İntihal Raporu.....	105
Özgeçmiş	111

Tablolar Listesi

Sayfa

Tablo 1. <i>M. spicata</i> uçucu yağ bileşenleri.....	50
Tablo 2. <i>O. dubium</i> uçucu yağ bileşenleri.....	51
Tablo 3. <i>O. dubium</i> , kalsiyum hidroksit, distile su ve gliserin çalışma grupları.....	53
Tablo 4. <i>M. spicata</i> , kalsiyum hidroksit, distile su ve gliserin çalışma grupları.....	53

Şekiller Listesi

Şekil 1 Lefke Bölgesinden Doğal Ortamlarından Elde Edilmiş Bitkilerin Kurutulmuş Görüntüleri.....	46
Şekil 2 (A) Clevenger Tipi Aparat İle Uçucu Yağ Elde Etmek İçin Uygulanan Hidrodistilasyon Yöntemi (B), (C). Hidrodistilasyon Yöntemi İle Kurutulmuş Yapraklardan Elde Edilen Uçucu Yağlar.....	47
Şekil 3 Elde Edilmiş Uçucu Yağların 4°C’de Saklanması İçin Hava Sirkülasyonu Olmayan Şişelerde Saklanması.....	48
Şekil 4 GC/MS Analiz Cihazı.....	49
Şekil 5 Ependorf tüpler içerisinde hazırlanmış olan karışımlar.....	54
Şekil 6 Disklerin Pleytlere Yüklendikten Sonra 24-48 Ve 72 Saat Boyunca İnkubatörde Bekletilmesi.....	55
Şekil 7 (A) MH Agarlara Mikroorganizmaların Ekilmesi (B) Deney Gruplarına Ait Karışımların Difüzyon Disklerine Eklenmesi (C) Eklenen Gruplara Ait Disklerin Mikroorganizma (Faec Cad) Ekili Pleytlere Yükleneceği.....	56
Şekil 8 Her Bir Uçucu Yağ Bileşeninin Ayrıntılı Kompozisyonları ile Çalışmanın Grafikselsel Gösterimi.....	56
Şekil 9 Disk Diffüzyon Yöntemi Sonrası Disklerin Etrafında Gelişen İnhibisyon Alanları.....	58
Şekil 10 <i>E. faecalis</i> Üzerinde <i>O. dubium</i> Uçucu Yağını İçeren Farklı Çalışma Gruplarının İnhibisyon Alanı Çapları (mm).....	60
Şekil 11 <i>C. albicans</i> Üzerinde <i>O. dubium</i> Uçucu Yağını İçeren Farklı Çalışma Gruplarının İnhibisyon Zon Çapları (mm).....	62
Şekil 12 <i>C. albicans</i> Üzerinde <i>M. spicata</i> Uçucu Yağını İçeren Farklı Çalışma Gruplarının İnhibisyon Alanı Çapları (mm).....	64

Simgeler ve Kısaltmalar

%	Yüzde
°	Derece
°C	Derece Santigrat
<	Küçüktür
>	Büyüktür
CaOH ₂	Kalsiyum Hidroksit
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
CFU	Koloni Geliştiren Birim
dk	Dakika
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>O. dubium</i>	<i>Origanum dubium</i>
<i>M. spicata</i>	<i>Mentha spicata</i>
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ml	Mililitre
Mm	Milimetre
NaOCl	Sodyum Hipoklorit
pH	Hidrojen gücü
UV	Ultraviyole
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre

BÖLÜM I

Giriş

Başarılı bir endodontik tedavi için kök kanallarından mikroorganizmaları elimine etmek son derece önemli bir aşamadır (Alghamdi & Shakir, 2020; Barbosa-Ribeiro vd., 2016). Mikroorganizmaların kök kanallarından etkin bir şekilde elimine edilmediği durumlarda, dirençli bir enfeksiyon oluşabilmekte ve kanal tedavisinin başarısız olmasına neden olabilmektedirler (Alghamdi & Shakir, 2020). Diş hekimliğinde *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), özellikle apikal periodontitis teşhisi konulan vakalarda yaygın olarak izole edilen gram pozitif bir bakteri olup, ikincil endodontik enfeksiyonlara sebep olan ana patojen olarak bilinmektedir (Barbosa-Ribeiro vd., 2016). *E. faecalis*, bakterilerin canlılığını devam ettiremeyecek kadar zorlu, besin bakımından fakir ve pH'ı 11.5'lere kadar ulaşabilen yüksek alkali ortamlarda bile canlılığını sürdürebilmektedir. Bu patojen, kök kanal duvarlarında bir biyofilm olarak büyüyüp çoğalma kapasitesine sahiptir ve diğer patojen türlerinden herhangi bir sinerjetik desteği olmaksızın tedavi edilen kanallarda tek başına enfeksiyona neden olabilmektedir. Ayrıca *E. faecalis*, endodontik tedavi sırasında uygulanan antimikrobiyal ajanlara karşı yüksek direnci ile bilinmektedir (Estrela vd., 2008.; Murad vd., 2012.). Bununla birlikte, başarısız kanal tedavileri ile ilişkili olduğu bilinen tek inatçı patojen *E. faecalis* değildir. *C. albicans* (*Candida albicans*), ağız boşluğunda bulunan en yaygın kommensal ve patolojik mantarlardan biridir (Barrett vd., 1998). *C. albicans*, tekrarlayan periradiküler lezyonların sebebi olan, inatçı veya ikincil endodontik enfeksiyonlara bağlı başarısız kanal tedavilerinin %7-18'inde yaygın olarak bulunan yuvarlak/oval şekilli gram pozitif bir mantardır (Srikumar vd., 2020).

Endodontik tedavi esnasında yukarıda bahsedilmiş olan sorunları gidermek için çeşitli prosedürler uygulanmaktadır. Mekanik enstrümantasyon ve irrigasyon, endodontik tedavinin başarısı üzerinde büyük etkisi olduğu gösterilen prosedürlerden sadece birkaçıdır. Ayrıca, tedavi seansları arasında yapılan kanal içi medikasyon uygulaması, kök kanal sistemini iyi bir şekilde dezenfekte eden ve yaygın olarak uygulanan kritik bir diğer aşamadır (Martinho vd., 2018). Kanal içi medikasyon

uygulamasında kullanılan medikamanların kullanım amacı, kök kanal sistemindeki mikroorganizmaların ve bu mikroorganizmaların yan ürünlerinin miktarını önemli ölçüde azaltarak dezenfeksiyonu sağlamaktır. Ayrıca, mikroorganizmaların ve yan ürünlerinin sebep olduğu doku hasarını önlemek için kök kanallarının dezenfekte edilmesi son derece önemlidir (Donyavi vd., 2016; Takushige vd., 2004). Bu amaçla günümüzde klinikte en sık kullanılan kanal içi medikaman Ca(OH)_2 'dir (Samir Abouelenien vd., 2018).

Kalsiyum hidroksit (Ca(OH)_2), moleküler ağırlığı 74.09 gram ve pH'ı yaklaşık 12,5–12,8 olan kokusuz beyaz renkte toz bir yapıya sahiptir. Bu nedenle sıvılarla temas etmesi halinde kimyasal olarak güçlü bir bazik etki göstermektedir (Ba-Hattab vd., 2016). Ca(OH)_2 antimikrobiyal etkisini, sıvılarla karıştırıldıktan sonra kalsiyum (Ca^{2+}) ve hidroksil (OH^-) iyonlarına ayrışmasıyla göstermektedir. Bu iyonlar oldukça oksidan anyonlardır ve çeşitli biyomoleküllerle yüksek derecede reaksiyona girebilmektedir (Rehman vd., 1996). Ca(OH)_2 'nin esas etkinliği pH'ı yükselten bu iyonların etkilerine dayanmaktadır (Estrela & Holland, 2003). Oluşan alkali ortam, esterleşmiş yağ asitlerini uzaklaştırarak ve kimyasal yapılarını değiştirerek bakteriyel lipopolisakkaritleri (LPS) detoksifiye etmektedir. Sonuç olarak, bakteriyel sitoplazmik membran bütünlüğü bozulmaktadır (Ba-Hattab vd., 2016; Estrela & Holland, 2003; Rehman vd., 1996; Safavi & Nichols, 1993; Sharma vd., 2018). Bu OH^- iyonları, difüzyondan sonra doğrudan veya dolaylı temas yoluyla tüm kök kanal sisteminde antimikrobiyal etki göstermektedir (Solak & Öztan, 2003). Bununla birlikte, Ca(OH)_2 , kök kanallarında bulunan tüm mikroorganizma türlerine karşı eşit derecede etki göstermemektedir (Gomes vd., 2002). *E. faecalis*'in Ca(OH)_2 'ye dirençli olması, araştırmacıları yeni antimikrobiyal ajanları ve alternatif olarak etkilerini araştırmaya yöneltmiştir (Madhubala vd., 2011). Yoo ve arkadaşları, ağız boşluğunda yaygın olarak bulunan bir diğer patojen *C. albicans*'ın da Ca(OH)_2 'ye karşı bir miktar direnç gösterdiği bildirilmiştir. 2022 yılında Thienngern ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmanın sonuçlarına göre, Ca(OH)_2 'nin *C. albicans*'a karşı etkisiz olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle rutin endodontik tedavi protokolleri için yeni alternatif tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Thienngern vd., 2022; Yoo vd., 2020).

Tarih boyunca doğadan toplanan bitkiler ve bu bitkilerden elde edilen ürünler ile birçok hastalığın tedavisi mümkün olmuştur. Bu doğal ürünler, özellikle uçucu yağlar, sahip oldukları yüksek antimikrobiyal aktiviteleri ile de bilinmektedirler

(Wińska vd., 2019). Uçucu yağlar hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere ayrıca *C. albicans* da dahil olmak üzere diğer birçok mantar türüne karşı yüksek etkiye sahiptirler (Park vd., 1998). Çalışmada kullanılan Kıbrıs dağ kekiği (*Origanum dubium* Boiss. veya *O. dubium*) ve Kıbrıs bahçe nanesi (*Mentha spicata* L. veya *M. spicata*) içeriklerinin analizleri sonucunda sırası ile karvakrol ve karvon'un majör bileşenler oldukları saptanmıştır. Bu bitkilerden elde edilen uçucu yağların yüksek antimikrobiyal potansiyele sahip olduğu bilinmektedir. Karvakrol'un kekik ve oregano türlerinde yüksek miktarda bulunduğu bilinmektedir. Karvakrol aynı zamanda geniş bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olması nedeniyle klinikte güncel kullanılan medikamanları destekleyici veya tamamı ile yerini tutabilecek bir ajan olduğu düşünülmektedir. Karvakrol antimikrobiyal etkisini, ATPaz aktivitesini bloke ederek ve bakteri hücre zarlarının geçirgenliğini artırarak göstermektedir. Karvakrol sadece mikrobiyal kolonizasyonu engellemekle kalmaz, aynı zamanda patojenlerin antibakteriyel ajanlara duyarlılığını da arttırmaktadır (Sinha & Sinha, 2014).

Yürütülen bu *in vitro* çalışmada, ilk olarak, ağız boşluğunda bulunan en yaygın iki dirençli mikroorganizma olan *E. faecalis* ve *C. albicans*'a karşı, Ca(OH)_2 ile kombine edilmiş veya tek başına kullanılan iki farklı uçucu yağın (*O. dubium* ve *M. spicata*) antimikrobiyal etkilerinin analiz edilmesi amaçlanmıştır. İkinci olarak ise, endodontik tedavinin başarısızlığını önlemek için kullanılabilecek potansiyel kanal içi medikaman kombinasyonları hakkında ön verilerin sağlanması amaçlanmıştır. Çalışmanın farksızlık hipotezi şu şekildedir; *O. dubium* ve/veya *M. spicata* uçucu yağı, *E. faecalis* ve/veya *C. albicans* üzerinde antimikrobiyal bir etkiye sahip olmayacaktır.

BÖLÜM II

Genel Bilgiler

Endodontik Enfeksiyonlar ve Endodontik Mikrobiyoloji

Kök kanal tedavisi uygulanmamış sağlıklı ve canlı bir dişin kök kanal sistemi steril durumdadır (Taschieri vd., 2014). Ağız boşluğundan farklı olarak, normal koşullarda bu dişlerin kök kanal sisteminde mikroorganizma bulunmamaktadır. Steril kök kanal sisteminde herhangi bir mikroorganizmaya rastlanırsa, mikroorganizma potansiyel olarak patojen kabul edilmektedir. Çürük veya travma gibi çeşitli nedenlerle mikroorganizmalar kök kanal sistemine ulaştığında, sırasıyla pulpitis, pulpa nekrozu ve periapikal periodontitisin oluşmasına kadar farklı endodontik hastalıkların gelişmesine yol açabilmektedir. Travma gibi nedenler ile gelişen pulpa nekrozu kendi başına periapikal dokularda hasara neden olmaz iken, ortama herhangi bir patojen mikroorganizma dahil olduğunda periapikal periodontitis gelişmektedir. Periapikal periodontitis enfekte olan kök kanal sistemine periapikal dokuların ve vücudun savunma sisteminin verdiği inflamatuvar bir yanıttır (Persoon & Özok, 2017).

Sağlıklı bir oral ekosistemde, ağız boşluğunda bulunan mikrobiyota ile konak kommensal bir yaşam sürdürmektedirler. Kişinin diyeti karbonhidratlar bakımından zengin olarak değiştiğinde ağız ortamındaki bazı mikroorganizmalar sayıca artarak dominant hale gelmeye başlayabilirler. Bunun sonucunda diş çürüğü gelişimi veya kök kanal sisteminin bu mikroorganizmalar ile enfekte olması mümkün hale gelmektedir. Kök kanal sistemindeki ekolojik koşullar ağız boşluğu ile farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle ağız boşluğunda patojen etkiye sahip olmayan mikroorganizmalar kök kanal sisteminde farklı bir mikrobiyal topluluk yaratabilmektedir. Kök kanal sistemindeki mikrobiyal toplulukta büyük ve farklı değişimler meydana gelse de konak savunma sisteminin gösterdiği hastalık aktivitesine göre meydana gelen endodontik hastalıklar semptomatik veya asemptomatik bir seyir gösterebilmektedirler (Anderson vd., 2013).

Pulpa ve periradiküler dokularda meydana gelen hastalıklar genel olarak patojen mikroorganizmalarla ilişkilidirler (Dudeja vd., 2015). Kök kanal sistemi herhangi bir nedenden dolayı ağız ortamı ile direkt / dolaylı olarak temas ettiğinde ve

vücudun bağışıklık sistemini baskılayan herhangi bir neden olduğu takdirde endodontik hastalıklar görülebilmektedir (J. F. Siqueira & Rôçac, 2009). Kök kanallarında gelişen mikrobiyal topluluk polimikrobiyal bir yapıdadır ve bu nedenle gelişen endodontik hastalıklar da polimikrobiyal enfeksiyonlardır. Bu polimikrobiyal yapının bileşimi, kök kanal ekolojisi ve türler arası etkileşimlerle desteklenerek zamanla oluşan bir durumdur. Enfeksiyonun ilk evreleri sırasında, pulpadaki yüksek oksijen basıncı ve ağız boşluğunda bulunan bol miktarda besin maddesinin katkısı kök kanal siteminde fakültatif bakterilerin gelişmesine, mikroorganizmaların çoğalmasına ve genel çeşitliliğe yol açmaktadır (Fabrıcıus vd., 1982).

Endodontik lezyonlardan elde edilen mikrobiyolojik kültür sonuçlarına göre, biokütle ve çeşitlilik bakımından en sık rastlanan mikroorganizma türü bakterilerdir (Singh, 2022). Tedavi edilmeyen diş çürüğü, travma, pulpitis, pulpa nekrozu ve apikal periodontitis, periapikal apse ve kistik lezyonlar ilerde daha dirençli endodontik hastalıklara yol açabilmektedir. Enfeksiyonun pulpadan periapikal bölgeye ilerlemesi ile dişin bütünlüğü ve bireyin sistemik sağlığı üzerinde olumsuz etkiler görülebilmektedir. Endodontik tedavinin başarısızlığı sadece hasta için değil hekim için de istenmeyen bir durumdur (KS & Mathew, 2018).

Genel olarak bakteriler derin dentin çürüğünün pulpaya ulaşmasıyla veya ağız içerisinde olan mevcut restorasyonların mikrosızıntı yapması ile pulpaya ulaşip yerleşmektedirler. Derin dentin çürüğü içerisinde dominant olarak bulunan bakteriler çürüğün farklı bölgelerinde çeşitlilik gösterebilmektedirler. Çürük dentin yüzeyinden sıklıkla fakültatif bakteri olan *Streptococcus mutans* izole edilirken, kavite tabanındaki mikrobiyota daha karışıktır ve dominant olarak *Eubacterium*, *Propionibacterium* ve *Bifidobacterium* gibi gram pozitif anaerop çokmaklar, *Actinomyces* ve *Lactobacillus* türleri bulunmaktadır (Love & Jenkinson, 2002). Periodontal cepte bulunan bakteriler, travma kaynaklı hasar almış periodonsiyumun kan damarları aracılığı ile pulpaya ulaşabilmektedirler. Ayrıca bu bakteriler “Anakorezis” denilen kan dolaşımı yoluyla da pulpaya ulaşabilmektedirler (Drucker vd., 1997).

Kök kanallarındaki mikrobiyotanın teşhisi için transmisyon elektron mikroskobu (TEM), ışık mikroskobu ve kültür yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler enfekte kök kanallarında mikrobiyotanın gerçek topografisinin belirlenmesi için sınırlıdır (Sen vd., 1995). Yakın zamanda bu yöntemlere ek olarak

16S rRNA analizi ile oral kavitede yavaş gelişen ve kültüre edilememiş bakterilerin teşhisi yapılmıştır (Slaton vd., 2017).

Enfekte kök kanalındaki mikrobiyotanın kompozisyonu; kök kanalındaki oksijen miktarı (redoks potansiyeli), bakteriler arasındaki sinerjistik etki, konağın savunması ve patojenlerin besinlere ulaşip uygun besinleri bulabilmesi gibi bazı lokal faktörlere bağlıdır (Haapasalo vd., 2010). Enfekte kök kanallarında mikrobiyota kompozisyonunu belirlemek için mikrobiyolojik örneklerin alınması sonucu, kök kanallarından kültüre edilen bakterilerin türü ve bu bakterilerin miktarı ile ilgili farklı veriler elde edilmiştir. Enfeksiyonun hangi safhasında örnek alındığı, besiyerinin tipi, inkübasyon ortamı, mikroskop ve boyama metodu gibi faktörler enfekte kök kanalındaki bakterilerin teşhisi için son derece önem arz etmektedir (Baumgartner vd., 1999).

Endodontik enfeksiyonlarda, kök kanalları içerisinde besin durumu, ortam pH'ı, düşük oksijen basıncı, ısı, ortam asiditesi bakteri etkileşimleri ve konak rezistansı gibi faktörler enfekte kök kanallarındaki mikrobiyota çeşitliliğini belirlemektedir (Narayanan & Vaishnavi, 2010).

Birincil endodontik enfeksiyon varlığında enfekte kök kanalındaki mikrobiyotanın büyük bir kısmını anaerobik mikroorganizmalar oluşturmaktadır. Fakat anaeroblar etyolojik olarak pulpal hastalıkların gelişmesinde ikincil sebepler olup, meydana getirdikleri enfeksiyonlar önceden aerob ve zorunlu anaerobların yaptıkları enfeksiyonu takiben oluşmaktadır (Baumgartner vd., 1999).

Enfeksiyon sebebi dominant olan zorunlu anaerobik patojenler olabileceği gibi, *Lactobacillus*, *Actinomyces* ve *Streptococcus* gibi mikroaerofilik ve fakültatif bakteriler de enfeksiyona dahil olabilmektedir (Haapasalo vd., 2005).

Bazı gram negatif bakteri türlerinin, bilhassa siyah pigmentli anaeroblar (*Phorprohomonas*, *Prevotella*), *Fusobacterium* ve *Peptostreptococcus* türlerinin endodontik enfeksiyonlarda yoğun olarak bulunduğu bildirilmiştir (Gomes vd., 2004; Pinheiro vd., 2003; José F. Siqueira vd., 2004). Pulpitis denilen pulpal enfeksiyonun ilk evresinde fakültatif patojen mikroorganizma türleri dominant iken (Fabricious vd., 1982), patojenlerin oksijen kullanımına bağlı olarak birkaç gün ya da birkaç hafta içerisinde ortam anaerobik hale gelmektedir. Zaman geçtikçe özellikle kök kanalının apikal üçlü kısmında anaerobik ortam dominant hale gelmekte ve böylece anaerobik patojen mikroorganizmalar fakültatiflere karşı mikrobiyotada hakimiyet kurmaktadır (Singh vd., 2020). Semptomatik dişlerin mikrobiyota kompozisyonu

asemptomatik dişlere kıyasla büyük farklılığa sahiptir (Siqueira & Rôças, 2004). Bu fark, semptomatik vakalardaki dominant türlerin değişikliği ve daha çok sayıda patojen bulunmasına dayandırılabilir. Endodontik enfeksiyonlarda klinik bulguların baş göstermesinde, birçok patojen türünün aralarındaki sinerjetik etkileşimin, önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir (Gomes vd., 2004; Khemaleelakul vd., 2002; Souza-Filho, 2003). Yapılan araştırmalara göre semptomatik apikal periodontitisli dişlerin etiolojisinde başta siyah pigmentli patojenler olmak üzere birkaç türün önemli rol oynadığı bildirilse de bazı araştırmalarda semptoma sebep olan patojenlerin asemptomatik vakalarda da aynı oranlarda görüldüğü bildirilmiştir (Baumgartner vd., 1999; Khemaleelakul vd., 2002).

Değişiklik gösteren kök kanal mikrobiyotasında, ağız ortamı ile direkt ilişkisi olan kök kanallarında aerobik ve ağız florasında bulunan aynı mikroorganizmalar kültüre edilirken, kapalı kök kanallarında mikroorganizma türleri daha az sayıda bulunmakta ve anaerobik mikroorganizmalar daha sık kültüre edilmektedir (Ando & Hoshino, 1990).

Endodontik Enfeksiyonlarda Görülen İnatçı Mikroorganizmalar

Literatürde kök kanal tedavisinin başarısız olmasında ekstraradiküler enfeksiyon veya non-mikrobiyal faktörlerin de sebep olacağını bildiren araştırmalar da bulunmaktadır. Fakat inatçı ve tekrarlayan enfeksiyonlar genellikle ikincil intraradiküler enfeksiyonlar olup kök kanal tedavisinde başarısızlığın ana nedenleri olarak kabul edilmektedir. Rutin endodontik tedaviye karşı gelişen bir inatçı enfeksiyon durumunda gram pozitif bakterilerin dominant olduğundan söz edilebilir. Gram pozitif bakteriler, gram negatiflere kıyasla daha dirençlidir ve zor ortam şartlarına daha rahat adapte olabilmektedir. İnatçı ve tekrarlayan enfeksiyonlarda sıklıkla kültüre edilen patojenler gram pozitif fakültatif veya anaerobikler olmak üzere streptokoklar, *P. micra*, *Propionibacterium* türleri, *Actinomyces* türleri, *E. faecalis*, *Lactobacilli* ve *Olsenella*'dir (Chu vd., 2006; Gomes vd., 1996; Rôças & Siqueira, 2011). Primer apikal periodontitis vakalarında ortamda anaerobik bakteriler dominant iken, başarısız endodontik tedavi sonrası gelişen apikal periodontitis vakalarında sıklıkla izole edilen patojenler *E. faecalis* ve *C. albicans*'tır (Paz vd., 2004; Haapasalo vd., 2005; Siren vd., 1997; Waltimo vd., 1999). Tedavisi başarısız olmuş apikal periodontitis vakalarında saptanan *E. Faecalis* sayısı, primer apikal

periodontitis vakalarına oranla dokuz kat daha fazla bulunmaktadır (Rôças vd., 2004). Primer apikal periodontitis vakalarında yüksek oranda başarılı bir tedavi elde etme sebebi gram negatif mikrobiyotanın, kemomekanik preparasyon sonucu değişen ekolojik ortama karşı daha hassas olduğu esasına dayandırılmaktadır. Kemomekanik preparasyon sonucu ortamda bulunan besin değerleri azaldığından mikrobiyota gelişip çoğalmaya devam edememektedir ve aynı zamanda gram negatif anaerobik mikrobiyotaların rutin tedavi prosedürlerine diğer mikrobiyotalara kıyasla çok daha hassas olduğu bildirilmiştir (Gomes vd., 1996).

Bakteriler kök kanalı içerisindeki dentin tübüllerine geliş güzel dağılım sergilemektedirler. Tübüllerden biri tamamen bakteri barındırırken, bir diğeri bakteri içermeyebilmektedir. Bu bakteriler genellikle kök kanal merkezinden periferik doğru bir yayılım göstermekte olup seyrek veya sık olarak bir yerleşim sergilemektedirler (Ramachandran, 1987). Çekilmiş dişler üzerinde çalışan Peters ve ark. bakterilerin kök kanal dentinine olan penetrasyonunu araştırmışlar ve kök kanal dentinine %77-87 oranında bir bakteri penetrasyonu olduğunu bildirmişlerdir (Peters vd., 2001). Başka bir çalışmanın sonuçlarına göre %80 oranında anaerobik bakteri penetrasyonu olduğu aynı zamanda kök kanalında bakterilerin sergilediği penetrasyon ile derin dentin çürüğündeki bakteri penetrasyonu arasında bir fark olmadığı bilgisi bildirilmiştir (Ando & Hoshino, 1990). Başka bir çalışmanın sonucuna göre kök kanal dentininde bulunan tübüler kompozisyonun *S. mutans* ve *S. gordonii*'nin penetrasyonuna engel olduğu fakat *E. faecalis*'in penetrasyonunu sadece azalttığı bildirilmiştir (Love & Jenkinson, 2002).

Enterococcus faecalis

***E. faecalis* Virülans Faktörleri.** *E. faecalis* değişken virülans faktörlerine sahiptir. Bu faktörler başlıca sitolisin, lizis enzimleri, agregasyon faktörü, feromonlar ve lipoteikoik asit olarak bilinmektedir (Gomes vd., 2008; Rôças vd., 2004). Bu faktörler patojen bakteriye hayatta kalabilme ve enfeksiyon oluşturabilme kabiliyeti kazandırmaktadır (Upadhyaya vd., 2010). Sahip olduğu virülans faktörleri *E. faecalis*'in mevcut niteliklerine destek sağlayabilir. Bu nedenle *E. faecalis* hayatta kalabilme ve kök kanalında inatçı patojen olarak yaşam sürdürebilme kabiliyetine sahiptir (Jett vd., 1994).

Virölans faktörleri sayesinde *E. faecalis*; Besin bakımından fakir olan ortamlarda uzun süre beslenmeden yaşamını sürdürebilmektedir. Kök kanal dentinini bağlanmasına yardımcı olan proteaz, jelatinaz ve kollajen bağlayıcı olan (Ace) proteine sahiptir. Bu sayede kök kanal dentinine bağlanır ve ortamda hakimiyet kurmuş bir patojen olarak kök kanal sistemindeki dentin tübüllerini kaplar. Konağın verdiği savunma yanıtını olumsuz yönde değiştirir. Lenfosit aktivitelerini baskılar. Serumunu beslenebilmesi için menşeye alır. Ca(OH)_2 gibi kanal içi medikamanlara karşı direnç gösterir. Dentin duvarı üzerinde Biyofilm oluşturur (Stuart vd., 2006).

***E. faecalis*'in Endodontik Açıdan Önemi.** *E. faecalis*'in endodontik enfeksiyonlarda yaygın olarak gözlenmesinin sebepleri, aşırı genetik çeşitliliğe sahip olması, antimikrobiyal ajanlara karşı direnç sergilemesi, bakteriler için kötü ortam şartlarına çabuk adapte olabilme yeteneğine sahip olması, kök kanal sisteminde biyofilm olarak çoğalabilmesi, diğer mikroorganizmalara kıyasla dentin tübüllerine daha yüksek penetrasyon yeteneğine sahip olması nedeniyle ortamdaki besini tüketebilmesi ve böylece ortamda bulunan diğer mikroorganizmaların beslenmesine fırsat vermemesi olabilmektedir (Deng vd., 2009).

Zorlu ortam koşullarına rağmen yaşamını sürdürebilen *E. faecalis*, kök kanal sisteminde bulundan diğer mikroorganizmalar gibi simbiyotik ilişkiye ihtiyaç duymamaktadır (Kayaoglu & Ørstavik, 2004). *E. faecalis* bulunduğu ortam besin bakımından fakir olsa bile yaşamaya devam edebilmekte ve ortam besin bakımından zenginleşmeye başlar başlamaz çoğalabilmektedir (Sedgley vd., 2005). Çoğalabilmesi için gereken besini foramen apikaleden gelen eksüda ve virölans faktörlerinden olan hyalüridiniyaz sayesinde dentin veya smear tabakasından sağladığı düşünülmektedir (Kayaoglu & Ørstavik, 2004).

Ca(OH)_2 , NaOCL ve klorheksidin (CHX) gibi birçok antimikrobiyal ajan *E. faecalis*'i kök kanal sisteminden elimine etmek için teste tabii tutulmuştur. NaOCL solüsyonunun tamponlanmış veya tamponlanmamış olarak *E. faecalis*'e karşı etkili olduğu bildirilmiştir. Fakat, %0,5'lik NaOCL'nin *E. faecalis*'i elimine edebilmesi için minimum 30 dk kadar solüsyona maruz bırakılması gereklidir (Gomes vd., 2001). Genellikle %2 konsantrasyonunda antimikrobiyal ajan olarak uygulanan CHX'in bakterisidal etki gösterdiği bilinmektedir. CHX'in, Gram-pozitif, Gram-negatif ve mantarlara karşı etkili bir antimikrobiyal ajandır. Yüzde 0,2-2 konsantrasyonlarının *E. faecalis*'i elimine edebilmesi için minimum 30 dk

gerekmekteyken, %5.25'in altındaki konsantrasyonlarda bulunan NaOCL'nin *E. faecalis*'e 5 dk uygulanmasının yeterli olabileceği bildirilmiştir (Gomes vd., 2001).

Mikroorganizmaların endodontik tedavi sonrasında kök kanal sistemi içerisinde yaşam sürdürebilmesi için, rutin kanal içi dezenfeksiyon prosedürlerine ve zorlu ortam koşullarına adapte olmaları gerekmektedir. *E. faecalis* kök kanal sisteminde bulunan derin dentin tübüllerine penetre olabilme niteliği sayesinde, kemomekanik preparasyon ve irrigasyon işlemlerine direnç göstermektedir. Kök kanal sisteminde biyofilm oluşturma niteliği sayesinde, rutin olarak uygulanan antimikrobiyal prosedürlere karşı kök kanal sisteminde yaşam sürdürebilmektedir (Distel vd., 2002).

Biyofilm oluşturabilme niteliği sayesinde kanal içi dezenfeksiyon materyali olarak kullanılan Ca(OH)_2 'ye karşı 10 günden fazla direnç gösterebilmektedir. Ca(OH)_2 ile ortam pH'ı yükselmekte ve bu pH değerine karşı direnç gösterebilme kabiliyeti, sitoplazmayı asidifiye etmek için protonları hücreye yönlendiren bir proton pompası işlevi görmesiyle alakalı olduğu düşünülmektedir (Evans vd., 2002).

Özellikle ikincil endodontik enfeksiyon kaynaklı, kök kanal tedavisinin yenilenmesi gereken vakalardan sıklıkla kültüre edilen *E. faecalis*, bu nitelikleri sayesinde inatçı ve rezistans kabiliyeti yüksek bir patojen olarak kabul edilmektedir (Siqueira, 2016).

Candida albicans

C. albicans, sağlıklı veya hasta olan kişilerin ağız boşluğunda sıklıkla kültüre edilen bir mantar türüdür. Sağlıklı bireylerin ağız boşluğunda *C. albicans* insidansının %30-45 oranında olduğu bildirilmiştir (Arendorf & Walker, 1980; Lucas, 1993). *C. albicans*, ağız boşluğu içerisinde bulunan mikrobiyotada normal koşullarda bir problem yaratmamaktadır. Fakat, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, immunsupresif kullanımı (Siqueira J & Sen, 2004) veya HIV gibi bireylerin bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlarda, viral enfeksiyonlar ağız boşluğu içerisindeki bu normal mikrobiyota üzerinde düzensizliğe sebep olabilmektedir. Bu durum ağız boşluğu içerisinde *C. albicans*'ın oranın %95'lere kadar çıkabilmesine yol açmaktadır (Dupont vd., 1992).

Ağız boşluğunda dilin üst yüzeyi *C. albicans* için birincil yaşam alanı olarak kabul edilmektedir. İkincil olarak kolonize olduğu bölgeler ise, mukoza, diş eti üzeri

(Arendorf & Walker, 1980), dentin (Hodson & Craig, 1972), kök (Lynch & Beighton, 1994), diş eti altı (Pizzo vd., 2002; Slots vd., 1988) ve periodontal ceplerdir (Reynaud vd., 2001). *C. albicans* birincil kök kanal tedavisi ve başarısız kök kanal tedavilerinden sıklıkla kültüre edilen bir mantar türüdür. Bu oran %1 ile %17 arasında değişiklik gösterebilmektedir (Mohammadi vd., 2012).

***C. albicans* Virülans Faktörleri.** *C. albicans* virülans faktörleri adezyon, hif üretimi, ekstrasellüler hidrolitik enzimleri ve immodülasyon olarak sayılabilmektedir. (José F. Siqueira & Sen, 2004; Staniszevska vd., 2012)

- **Çeşitli çevresel koşullara uyumluluk sağlayabilme:** *C. albicans*'ın pH gibi zorlu koşullara adapte olabilme kabiliyeti sayesinde kan dolaşımındaki nötr pH'da veya düşük pH'a sahip doku ortamlarında yaşam sürdürebilmekte ve çoğalabilmektedir (Calderone & Fonzi, 2001).
- **Çeşitli yüzeylere yapışma yeteneği:** *Candida* türlerinin konak dokulara penetre olabilmesini sağlayan yüzey reseptörleri bulunmaktadır (Senet, 1998).
- **Hidrolitik Enzimlerin Formasyonu:** *C. albicans*'ın ürettiği bu enzim dokulara zarar verebilmektedir (Calderone vd., 2001; Haynes, 2001. Salgılanan proteinaz, aminopeptidaz, hyaluronidaz ve kondroitin sülfataz dentin kollajenini de bozabilmektedir (Hagihara vd., 2022).
- **Morfolojik Geçiş Yeteneği:** *C. albicans* polimorfik bir mantar olup birçok morfolojik formada çevre koşullarına adapte olarak gelişebilmektedir (Şen vd., 1997).
- **Konakçı Savunma Kaybı ve İmmünomodülasyon etkisi:** *C. albicans* birtakım mekanizmalar sonucu konak savunmasından kaçabilmektedir. Monositleri elimine etmesi, oksijen radikalleri üretimi ve oksijen degranülasyonu gibi polimorfonükleer nötrofillerin işlevlerini engelledikleri bildirilmiştir (Ashman & Papadimitriou, 1995). *C. albicans*'ın, makrofajlar, endotel hücreleri ve fibroblastlar tarafından proinflamatuvar sitokin sentezini başlatabildiği kanıtlanmıştır (Dongari-Bagtzoglou vd., 1999).

***Enterococcus faecalis* - *Candida albicans* İlişkisi**

E. faecalis ve *C. albicans*'ın oral mukozada, birlikte bulunduklarına dair yapılan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artış göstermektedir (Alshanta vd., 2022). Önceden yapılan bir araştırmada *E. faecalis* ve *C. albicans* kök kanalları ve periapikal lezyonlu vakaların %10'unda ve oral mukoza lezyonlarının %40'ında birlikte kültüre edilmiştir (Dahlén vd., 2012). Başka bir retrospektif araştırmada ise, *Candida spp.*'ye sıklıkla refakat eden patojen *E. faecalis* olarak bildirilmiştir (Hermann vd., 1999). *E. faecalis*'in *C. albicans* filamentasyonu, biyofilm oluşumunu ve genel virülansını inhibe edebileceği bildirilmiştir (Cruz vd., 2013). *E. faecalis* ve *C. albicans*'ın salgıladıkları bakteriyel kompozisyonun, ikili türlerin biyofilmlerine etki edebileceği gösterilmiştir. Bu etki, fırsatçı patojen olan *C. albicans* virülans faktörlerinden olan "bakteriler arası iletişim" kabiliyeti sayesinde penetrasyon yapabilmesine olanak sağlamaktadır (Graham vd., 2017).

Medikaman Uygulaması ile Kanal İçi Dezenfeksiyon Yapılmasının Önemi

Endodontik tedaviler 1928 yılından beridir diş hekimliğinde bir tedavi şekli olarak uygulanmaktadır. Endodonti alanındaki çeşitli gelişmeler sayesinde, uygulanan endodontik tedavilerde başarı oranı yüksek seviyelere çıkmıştır. Bu gelişmelerin ana sebebi ise endodontik patolojilere sebep olan endodontik mikrobiyolojinin tam olarak anlaşılmasıdır. Endodontik mikrobiyolojinin anlaşılması, endodonti alanındaki araştırmacıları geleneksel yöntemler geliştirip daha etkili olacak bir biçimde geliştirilmesine yöneltmiştir. Günümüzdeki çalışmalar kök kanal sistemindeki en dirençli patojenleri saptamayı ve bunları ortadan kaldıracak yeni yöntemler keşfetmeyi hedeflemektedir (Narayanan & Vaishnavi, 2010).

Endodontik tedavi sırasında giriş kavitesinin açılmasının ardından izlenen ilk adım, canlı veya nekrotik pulpa dokusunun uzaklaştırılması ve kök kanallarının boy tespiti işlemleridir. Bu işlemleri takiben, yıkama solüsyonlarının desteğiyle kök kanal aletleriyle kök kanallarının genişletilmesi ve şekillendirilmesi yapılmaktadır. Fakat, yıkama solüsyonlarıyla birlikte yapılan kemomekanik preparasyon, pulpa artıkları ve patojen mikroorganizmaların eliminasyonu için tek başına etkili değildir. Bu amaçla kemomekanik preparasyonu takiben tedavi seansları arasında kanal içi medikasyon işlemi uygulanmaktadır (Kawashima vd., 2009). Chong ve Ford, endodontik tedavide kök kanalının dezenfeksiyonun önemini vurgulayan birkaç noktaya değinmişlerdir. Bunlar;

- Kök kanal preparasyonundan sonra kanal içerisinde kalan bakteri ve yan ürünlerini elimine etmek,
- Pulpadan arta kalan dokuları azaltıp etkisiz hale getirmek ve nötralize etmek,
- Periapikal dokularda oluşabilecek veya mevcut enfeksiyonun önüne geçmek,
- Dezenfeksiyon için kullanılan materyalin, ara seanslarda kullanılan geçici dolgu kaynaklı oluşabilecek mikro sızıntıya karşı bir bariyer görevi görmesi,
- Kanama için tampon görevi görüp nemli kalan kök kanallarını kurutmasıdır. (Chong & Ford, 1992).

Bu amaçlarla endodontik tedavilerde kanal içi medikaman materyalleri olarak CHX, biyoaktif cam, dörtlü amonyum bileşikler, fenolik bileşikler ve antibiyotik kombinasyonları kullanılabiliyor olsa da günümüz endodontik tedavi yaklaşımlarında rutin olarak kullanılan ve kanal içi dezenfeksiyonda altın standart olarak kabul edilen materyal Ca(OH)_2 'dir.

Kalsiyum Hidroksit Ca(OH)_2

Ca(OH)_2 diş hekimliğinde ilk olarak 18.'inci yüzyıl ortalarında diş enfeksiyonu kaynaklı oluşan fistüllerin tedavisinde kullanılmıştır. Daha sonra 1920 yılında Hermann tarafından pulpa kuafajı için kullanılmış olup, Ca(OH)_2 'nin pulpa üzerinde tamir edici bir etkisi olduğunu bildirilmiştir. (Mohammadi & Dummer, 2011). Yıllar içerisinde Ca(OH)_2 'nin pulpa üzerindeki tamir etkisi birçok çalışma ile desteklenmiştir. Aynı zamanda kök kırıklarının tedavisinde, perforasyonlarda, apeksifikasyon veya kuafaj tedavisinde kullanıldığı zaman, sert doku oluşumunu sağlayarak pulpal ve periapikal dokuların iyileşmesini hızlandırmada en iyi medikaman olduğu kanıtlanmıştır (Farhad & Mohammadi, 2005).

Ca(OH)_2 su içerisinde düşük bir çözünürlüğe sahip ve pH değeri yaklaşık 12.5-12.8 arasında kokusuz, beyaz renkte ve toz formunda bulunmaktadır (Siqueira & Lopes, 1999). Aynı zamanda alkol içerisinde de iyonize olamayan Ca(OH)_2 su ile tiksotropik reaksiyon göstermekte ve akışkan bir form haline geçmektedir (Spångberg & Haapasalo, 2002).

Ca(OH)_2 'in sahip olduğu birtakım avantajlardan dolayı endodonti alanında sıklıkla kullanılmaktadır (Agrawal, 2011). Bunlar;

- İlk etapta bakterisidal sonrasında bakteriyostatik etki göstermesi,
- Hasarlı dokularda iyileşme ve tamiri başlatması,

- Yüksek pH'ı ile fibroblastları uyarması,
- İnternal rezorpsiyonu durdurması
- Bakterilerin ve yan ürünlerinin oluşturduğu asidik ortamı nötralize etmesi,
- Maliyetinin düşük olması,
- Kolay uygulanabiliyor olması.

Kalsiyum Hidroksit ve Sıvı Taşıyıcılar

Ca(OH)_2 'in kök kanalları içerisinde iyonize olup etki gösterebilmesi için aköz bir ortama, aköz bir ortam için ise sıvı taşıyıcılara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu taşıyıcılar;

- Su içerisinde çözünebilen maddeler (Serum, distile su, anestezi solüsyon vb.)
- Viskoz maddeler (Gliserin, propilen glikol vb.)
- Yağ esaslı maddeler (Zeytin yağı, kamfor, ojenol, yağ asitleri vb.) gibi taşıyıcılardır (Fava & Saunders, 1999).

Bu taşıyıcılardan, viskoz ve yağ esaslı olanlar Ca(OH)_2 'in patojenler üzerine etkinliğini artırırken, su içerisinde çözünebilen maddelere kıyasla kök kanallarından daha zor uzaklaştırılabilmektedir (Fava & Saunders, 1999; Figueiredo vd., 2002). OH^- iyonunun hızlı bir şekilde salınımına sebep olduğu için rutinde daha çok serum ve distile su kullanılmaktadır (Athanassiadis vd., 2007).

Homojen bir pat elde etmek için Ca(OH)_2 tozu distile su, monoklorofenol (CMCP), gliserin ve propilen glikol (PG) gibi viskoz taşıyıcılar ile karıştırılarak hazırlanmaktadır (Fava & Saunders, 1999).

Kalsiyum Hidroksit'in Antibakteriyel ve Antifungal Aktivitesi

Yapılan araştırmalarda *C. albicans*'ın Ca(OH)_2 'e karşı direnci *E. faecalis*'ten daha yüksek olduğu bildirilmiştir. *C. albicans* farklı pH değerlerinde bile hayatta kalabilmesinden dolayı Ca(OH)_2 'in sağladığı yüksek ortam pH'ı bile *C. albicans* üzerinde hiçbir etki gösterememektedir (Mohammadi vd., 2012). Ayrıca Ca(OH)_2 esaslı patların *C. albicans* üzerinde sınırlı ve hiç etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Thienngern vd., 2022; Yoo vd., 2020).

Ca(OH)_2 iyonize olduğunda, ortama Ca^{2+} ve OH^- iyonlarını bırakmaktadır. Özellikle hidroksit iyonları patojenlerin hücre duvarını ayrıştırarak ve patojenlerin

protein yapılarında yıkım meydana getirerek antibakteriyel özellik göstermektedir (Gordon vd., 1985; Safavi & Nichols, 1993). Ayrıca bu OH^- iyonları sayesinde $\text{Ca}(\text{OH})_2$, patojenlerin hücre duvarında bulunan lipopolisakkaritleri (LPS) de yıkıma uğrattığı (Safavi & Nichols, 1993, 1994) ve bir proinflatuar sitokin olan $\text{TNF-}\alpha$ oluşumunu inhibe ettiği, böylelikle de dokunun verdiği immün yanıtı azalttığı bildirilmiştir (Barthel vd., 1997).

$\text{Ca}(\text{OH})_2$, organik dokular ile temas ettiğinde karbondioksit (CO_2) ya da karbonat (CO_3^-) ile karşılaşmakta ve salınım yaptığı iyonlardan biri olan Ca^{+2} tükenene dek kalsiyum karbonat (CaCO_3) meydana getirmektedir. Aynı zamanda yapılan bir çalışmada $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 'ye 30 gün boyunca CO_2 verilmiş ve 30 gün boyunca bakterisidal etki gösteren pH verileri elde edildiği bildirilmiştir (Estrela C. & Pesce, 1997). Yapılan başka bir çalışmanın sonuçlarına göre ise, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 'in CO_2 soğurma yeteneğinin antibakteriyel etkinliğinde artışa neden olabileceği görüşü savunulmuştur (Kontakiotis vd., 1995).

İyon salınımını yavaş bir şekilde yapan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 'in kök kanalları içerisinde ne kadar kalması gerektiğine dair literatüre birtakım fikirler ibraz edilmiştir. Literatürde, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 'in en az 24 saat (Safavi & Nichols, 1993), 12-72 saat (Estrela C. vd., 1999), 7 gün (Sjögren vd., 1991), 10 gün (Ørstavik & Haapasalo, 1990) veya 1-3 ay (Cvek vd., 1974; Sjögren vd., 1991) kök kanalları içerisinde kalması gerektiğinin bildiren bazı çalışmalar mevcuttur. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 'in 24 saat içerisinde *E. faecalis*'i yok edemediği (Baker vd., 2004), ayrıca yapılan geniş kapsamlı araştırmalar sonucunda ise *E. faecalis*'in kök kanalları içerisinde bulunan dentin tübüllerinde $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 'e rağmen yaşama devam edebildiği bildirilmiştir (Haapasalo & Ørstavik, 1987; Siqueira vd., 1996).

Kalsiyum Hidroksit'in Pulpa Dokusu Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

Pulpanın en temel görevi dişin beslenmesini temin ederek, odontoblastik ve ameloblastik prosedüre önemli ölçüde destek sağlamasıdır. Mezenkimal hücrelerin odontoblastlara diferansiyasyonu sonucu kolajen matriks, diş oluşumuna neden olacak mineralizasyonu sağlamaktadır. Dentin, ilk oluşumundan itibaren sürekli odontoblastlar tarafından üretilmektedir. Dentinde meydana gelen herhangi bir fiziksel ve kimyasal hasar sonucu tersiyer (tamir) dentin yapımı gerçekleşmektedir (Modena vd., 2009). Pulpa-dentin kompleksi, restoratif materyallerin uygulanması

ile canlılığını koruyabilmektedir. Ca(OH)_2 esaslı materyaller özelliklerinden dolayı bu amaç için biçilmiş bir kaftandır (Briso vd., 2006).

Kalsiyum Hidroksit'in Periapikal Dokular Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

Ca(OH)_2 kanal içi medikament olarak kullanıldığında bazen foramen apikale denilen dişin kök uç kısmından taşıp periradiküler dokulara yayılabilmektedir. Bazı araştırmacılar geniş çaplı kronik periapikal lezyonlu vakalarda Ca(OH)_2 'in periapikal dokulara bilinçli bir şekilde taşırılması gerektiği fikrini savunmaktadırlar. Bu fikir, Ca(OH)_2 'in direkt olarak enfekte dokular üzerinde iyileşme ve tamir prosedürlerini başlatıp artırdığı görüşünden dolayı savunulmaktadırlar. Diğer bir yandan bu hipotez diğer araştırmacılar tarafından kabul edilmemiştir. Ca(OH)_2 'in foramen apikaleden periradiküler dokulara taşmasının olumsuz etkileri olabileceğini bildirmişlerdir (Orucoglu & Cobankara, 2008). Fakat günümüzde endodonti alanında ticari olarak üretilen Ca(OH)_2 materyalleri baryum sülfat içermektedir. Ca(OH)_2 'e baryum sülfat eklenmesinin nedeni ise materyale radyoopasite özelliği katmasından dolayıdır. Aynı zamanda bazı Ca(OH)_2 materyalleri polimetilmetakrilat partikülleri de içermektedir. Bu maddelerin periradiküler alana ekstrüze olması sonucu hem dokulardaki enflamatuvar mediyatörler sayıca artmakta hem de dokular üzerinde iyileşmeyi geciktirmektedir (Revathi & Chandra S.M, 2014).

Antibiyotikler

Antibiyotikler, günümüz diş hekimliği de dahil olmak üzere sağlık alanında yaygın olarak kullanılan ilaçlardan biridir (Kandemir vd., 2000; Karabay O., 2008; Versporten vd., 2014). Endodontik tedavilerde gram pozitif, zorunlu anaerob, fakültatif ve aerob patojenlerin oluşturdukları polimikrobiyal enfeksiyonlar antibiyotik kullanma gereksinimini doğurmaktadır (Segura-Egea vd., 2017). Diş hekimliğinde kullanılan antibiyotiklerin rakamları az sayıdadır (Ellison, 2011; Kuriyama vd., 2002). Bunlar;

- **Penisilin:** Düşük toksisite, dar spektrumlu, etki bakımından yüksek, zorunlu anaerob, fakültatif ve streptokoklar üzerinde etkili olan bir antibiyotiktir. Diş kaynaklı enfeksiyonlardan dolayı gelişen apse vakalarında, kullanımına başvurulmuş ilk antibiyotik türlerindendir (Aydın vd., 2017).

- **Penisilin ve Beta-Laktamaz İnhibitörleri:** Özellikle endodontik enfeksiyonlarda çok sık kullanılan bir antibiyotik türü olup genellikle klavulanik asit + amoksisilin / sulbaktam + ampisilin olarak kombine şekildedirler (Aydın vd., 2017).
- **Klindamisin:** Kemik gibi sert dokularda yayılımı etkili, gram pozitif anaerob ve aeroblara karşı etki gösteren bir antibiyotik türüdür. Penisiline karşı alerjik olan bireylerde kullanılmaktadır (Aydın vd., 2017).
- **Amoksisilin:** Penisilin ile karşılaştırıldığında, gram negatif patojenler üzerinde daha geniş spektrumlu bir etkiye sahiptir. Güvenilirliği ve emilim hızı yüksek, etkili bir antibiyotik türüdür (Aydın vd., 2017).
- **Tetrasiklin:** Anti-inflamatuvar özelliği olan, direkt antimikrobiyal etki sağlayan, aerob gram pozitif ve gram negatif patojenler üzerinde bakteriyostatik etkiye sahip olan bir antibiyotik türüdür. Patojenlerin bu tür antibiyotiklere karşı direnç gösterme oranı diğerlerine kıyasla yüksektir. Dişlerde renklenme ve hipoplaziye neden olduğu gibi, teratojen olduğundan dolayı gebelerde kullanımı kontrendikedir (Aydın vd., 2017).
- **Metronidazol:** Zorunlu anaeroblar üzerinde etki göstrebiliyor olsa da, aerob ve fakültatif anaeroblara karşı aşırı bir etkinliği gözlemlenemeyen bir antibiyotik türüdür (Aydın vd., 2017).

Fitoterapi

Fitoterapi, günümüzde giderek popüler olmaya başlayan alternatif ve tamamlayıcı tıp arasında sıklıkla kullanılan bir metot olup, bitkiler ile yapılan tedavi anlamını taşımaktadır (Pauli, 2011). Bitkilerden elde edilen içerik orijinal yapısının bozulmayacağı bir şekilde, tümü veya farklı materyallerle kombinasyonu ile tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır. Allopatik tıp, naturopatik tıp, geleneksel Çin tıbbı olmak üzere çeşitli geleneksel tıp alanlarında da uygulanmıştır. (Falzon & Balabanova, 2017). Geleneksel tıp metodunda bitkiler çay gibi bütünüyle kullanılıyorken, batı tıbbında ise bitkilerden elde edilen bileşenler kullanılmaktadır. Bitkilerden elde edilen farmasötik ilcalar; endüstriyel ayrılma metodu ile tipik olarak bitkilerden izole edilen tek bileşenler ve bu bileşenlerin ekstraksiyonlarının terapötik özelliklerine göre tanımlanmasıdır (Carnelio vd., 2008).

Gereksiz antibiyotik kullanımı sonucu bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç ve antibiyotiklerin insan vücudunda yarattığı yan etkiler araştırmacıları fitoterapi alanında çalışmalar yapmaya yönlendirmiştir (Guzmán-Blanco vd., 2000; Pannuti & Grinbaum, 1995).

Diş Hekimliğinde Fitoterapi

Geçmiřten günümüze genel olarak bitkilerin, insanların günlük yaşamlarında gıda ve birçok hastalığın tedavisi amacıyla önemli bir yeri olmuştur. Günümüzde kullanılan ilaçların yaklaşık %40'ının doğrudan ya da dolaylı olarak doğal ürünlerden, %25'inin ise bitkilerden üretildiği bilinmektedir (Calixto, 2003). Son yıllarda, şıfalı bitkiler ve bitkisel ilaçların kullanımı ile doğal tedavilere olan ilgi önemli ölçüde artmış olsa da diş hekimliği uygulamalarında fitoterapik yaklaşımlar henüz sınırlıdır (Menezes vd., 2009).

Günümüz diş hekimliğinde antimikrobiyal, antiinflamatuvar, analjezik ve sedatif etki yaratmak amacıyla yapılan bazı uygulamalarda fitoterapi metodu kullanılmaktadır (Groppo vd., 2008).

Diş Hekimliğinde Fitoterapi Uygulamalarının Antimikrobiyal Amaçlı Kullanım Alanları

Periodontal Tedavilerde Diş Macunu ve Gargara Olarak Kullanım

Ağız boşluğunda bulunan, özellikle subgingival ve supragingival diş etinde, biyofilm oluşumuna katkıda bulunan patojenlere karşı kullanılan antimikrobiyal ajanlar, diş çürüklerinin ve periodontal hastalıkların önlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Diş macunlarında ve gargaralarda çürük veya biyofilm oluşumunu önlemek amacıyla birçok çeşitli antimikrobiyal ajanlar ve bitkisel ürünler eklenmektedir (Mendes vd., 2003; Pistorius vd., 2003). Bugün piyasada bulunan bitkisel esaslı ürünler arasında bulunan Parodontax® (GlaxoSmithKline, Middlesex, UK) diş hekimliğinde geniş çaplı test edilmiştir.

Parodontax®, sodyum bikarbonat (NaHCO₃) ve sodyum florür (NaF)'ün (1.400 ppm) yanı sıra bir takım farklı bitkisel ürünleri içermektedir. Bunlardan

Matricaria chamomilla (Asteraceae), diş eti iltihabını azaltan anti-inflamatuvar özelliklere sahiptir. *Echinacea purpurea* (Asteraceae) immün sistem mediyatörlerini uyarır. *Salvia officinalis* (Lamiaceae) macuna anti-hemorajik özellik katmaktadır. *Commiphora myrrha* (Burseraceae) doğal antiseptik özelliklere sahiptir. *Mentha piperita* (Lamiaceae) ise analjezik, antiseptik ve anti-inflamatuvar özelliklerin kaynağıdır.

Pistorius ve ark., *S. officinalis*, *M. piperita*, *M. chamomilla*, *C. myrrha*, *Carum carvi*, *Eugenia caryophyllus* ve *E. purpurea* bitkilerinden elde edilen bileşikleri içeren ağız gargarası ile birlikte, gingival enfeksiyonu azaltmak amacıyla kullanılabilecek ek bir prosedür olarak periodontal hastalığı olan hastalarda günlük kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Pistorius vd., 2003).

Aloe vera (Asphodelaceae Juss) üzerinde, diş hekimliğinde aftöz ülserleri tedavi etmek ve gömülü üçüncü molar diş çekim ameliyatlarından sonra alveolar osteitis insidansını azaltmak için çalışılmıştır (Wynn, 2005. Yapılan bir çalışmada *Aloe vera* içeren bir ağız gargarasının, diş eti iltihabını ve diş eti kanamasını azalttığı bildirilmiştir (Scherer, 1998). Aynı zamanda bu gargara aerobik, mikroaerofilik ve anaerobik patojen sayısını azaltmada Listerine®'den daha etkili bulunduğu bildirilmiştir (Kaim, 1998).

Centella asiatica (Apiaceae) ve *Punica granatum* (Punicaceae)'nin doku iyileşmesini desteklediği ve konağın verdiği immün yanıtı modüle ettiği bildirilmiştir. *P. granatum* ile kombinasyon halinde, *C. asiatica*'dan izole edilen ve subgingival uygulama için biyolojik olarak parçalanabilen çipler olarak formüle edilen bitki özleri, kronik periodontitis indekslerinde IL-1 beta ve IL-6 proinflamatuvar sitokin seviyelerinde önemli bir azalmaya neden olmaktadır (Sastravaha, 2005).

Salvadora persica'nın dental plak oluşumunu kontrol etmede etkili olduğunu, aynı zamanda *E. faecalis* ve *A. actinomycetemcomitans*'a karşı büyük antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Al-Otaibi vd., 2004; Almas K., 2002).

Vanka ve ark. *Azadirachta indica* esaslı ağız gargarasının, başlangıç çürük lezyonlarını azaltarak *S. mutans*'a karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir (Vanka vd., 2001). Farklı bir çalışmada kullanılan *Mikania laevigata* ve *Mikaniaglomerata* bitkilerinin ekstreleri ve fraksiyonları da *S. mutans*'a karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Yatsuda, 2005).

Propolis, kök kanalında bulunan *E. faecalis*'e karşı *in vitro* antibakteriyel aktivitesi nedeniyle alternatif bir kanal içi ilaç olarak önerilmiştir (Oncag vd., 2006).

Ricinus communis'ten ekstrakte edilen hint yağı, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella nigrescens*, *Clostridium perfringens* ve *Bacteroides fragilis* gibi bazı oral patojenlere karşı etkili bir antimikrobiyal ajandır. Ayrıca endodontide pulpa nekrozu vakalarında faydalı olabileceği bildirilmiştir (C. M. Ferreira vd., 2002).

Uçucu Yağların Endodontide İrrigasyon Solüsyonu ve Guta Çözücü Olarak kullanımı

Kök kanal tedavisi için bitkisel alternatiflerin kullanımı giderek daha da popüler hale gelmektedir. "Fitoterapi, Fitomedikal veya Etnofarmakoloji", çeşitli rahatsızlıkları tedavi etmek için bitkileri kullanma terimleridir. Bitkisel ilaç kullanımı ve doğal ürünlere ilgi, yararlı özellikleri, kolay bulunabilirliği ve yan etkilerinin olmaması nedeniyle son yıllarda artış göstermiştir (Vishnuvardhini vd., 2018).

Endodontik irrigasyon solüsyonları, kök kanal artıkları yanı sıra mikroorganizmaları öldürmek ve kök kanal patlarını çözmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Enstrümantasyon sırasında kanal aletleri ile kök ucuna kadar ulaşılsa da kök kanalı enine kesitlerde mikroskoplar ile incelendiğinde, kök kanalının erişilemeyen alanlarının olduğu görülmektedir ve bu da kanal tedavisinin başarısız olmasına neden olmaktadır. İrrigasyon, mikroorganizmalar ile enfekte olmuş kök kanallarının uygun şekilde dezenfeksiyonuna ve bu kanallarda bulunan mikroorganizmaların yok edilmesine yardımcı olmaktadır. NaOCl, CHX, H₂O₂, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), sitrik asit ve diğer şelatör maddeler bu amaç için kullanılmaktadır (Zehnder, 2006).

Bitkilerin kök kanal tedavisinde kullanım amacı kök kanal dezenfeksiyonudur. Sentetik kanal içi ilaçların çoğunun yan etkilerinden dolayı, bitkisel kanal yıkama solüsyonları ile ilgili araştırmalarda artış olmuştur (Karobari vd., 2022).

Çay ağacı ve Chamomillia hidro-alkol esaslı doğal ürünlerin, smear tabakasını uzaklaştırmada distile sudan çok daha etkili olduğu ancak %17'lik EDTA kadar etkili olmadığı bildirilmiştir (Sadr Lahijani vd., 2006).

C. camphora cioneoliferum ve *M. ericifolia* uçucu yağlarının umut verici antibakteriyel potansiyel gösterdiği, irrigasyon solüsyonu olarak kullanılabileceği fakat üzerinde çalışılması gerektiği ve geleneksel kanal içi medikamanlardan

sırasıyla aynı derecede ve/veya daha iyi biyouyumluluk sağladığı bildirilmiştir (Marinkovic vd., 2022).

Doğal ürünlerle yapılan bir diğer çalışmada ise portakaldan elde edilen uçucu yağın, halotan ve kloroform gibi geleneksel çözücülere kıyasla güta-perkayı yumuşatmada daha etkili olduğu gözlemlenmiştir (Oyama vd., 2002). Okaliptüs yağı ve portakal yağının güta-perkayı çözmek veya yumuşatmak için kloroform ve ksilen kadar etkili olduğu bildirilmiştir (Hansen, 1998).

Ksilol ve portakaldan elde edilen uçucu yağın, Ca(OH)_2 bazlı (Sealer 26), silikon-polidimetilsiloksan bazlı (RoekoSeal) ve çinko-oksit-öjenol bazlı (Endofilland Intrafill) gibi birçok kök kanal patını çözmede okaliptol ve distile sudan daha iyi ve etkili olduğu bulunmuştur (Martos vd., 2006). Portakal yağı, ksilol ve kloroform'un toksik ve karyojenik etkileri olduğundan, endodontik re-treatment için kloroform ve ksilole alternatif olarak önerilmiştir. Bu uçucu yağın etki süresinin hızlı olduğu ve hücreler üzerinde toksik etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir (Oyama, 2002).

Fitoterapi ve Uçucu Yağlar

Bitkilerden çeşitli yöntemlerle elde edilen uçucu yağlar bitkilerin yaprak, çiçek, kabuk, tohum ve köklerinden, genellikle hidrodistilasyon metodu ya da diğer ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilmekte, oda sıcaklığında sıvı ve hızlı kristalleşebilme özelliğine sahip, genellikle renksiz ya da açık sarı renkte, hava sirkülasyonu olmayan ortamlarda yağ fakat hava ile herhangi bir temas durumunda kolayca buharlaşabilen karışımlardır. Bulundukları bitkiye karakteristik koku ve acı tat veren bu bileşenlerin en belirgin özellikleri oda sıcaklığında uçucu ve kokulu olmalarıdır (Şengezer & Güngör, 2008; Yuca vd., 2016).

Uçucu yağlar ilk kez Parcelsus von Honheim tarafından ilaçların içerisinde bulunan majör bileşenlerin "Quinta essentia" olarak isimlendirilmesi ile literatürdeki yerini almıştır (Çelen, 2006; Dirmenci, 2005).

Bilimsel alanda yaşanan gelişmeler ışığında bitkiler tıbbi özellikleri, farmakolojik aktiviteleri ve ekonomik olmaları nedeniyle büyük ilgi görmektedir (Auddy vd., 2003).

Uçucu yağların antibakteriyel özelliklerinin araştırılması ilk olarak 1881'de Dela Croix tarafından yapılmıştır. Literatürde yapılmış çeşitli çalışmalar için Dela Croix'in çalışmalar bir rehber niteliği taşımaktadır (Çelen, 2006)

Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktiviteleri

Son yıllarda mikroorganizmaların, uygulanan kimyasallara karşı direnç göstermesi nedeni ile yeni antimikrobiyal ajanların ihtiyacı doğmuş ve Ar-Ge çalışmaları bu doğrultuya yönelmiştir (Kim vd., 1995).

Çeşitli maddelerin antimikrobiyal etkinliklerinin saptanabilmesi için kuyu difüzyonu, disk difüzyonu ve broth veya agar dilüsyonu gibi çeşitli yöntemler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Balouiri vd., 2016). Mikrodilüsyon kuyularında veya tüplerinde, mikroorganizmanın çıplak gözle tespit edildiği şekilde büyümesini tamamen engelleyen en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonuna minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) denmektedir. MIC değerinin belirlenmesi için en uygun yöntem, agar dilüsyon ve broth yöntemleridir. Bunun nedeni ise, bahsedilen yöntemlerin, test edilen antimikrobiyal ajanın içindeki konsantrasyonunu tahmin etme imkanını sunmasıdır. Bakterisidal aktivitenin en yaygın tahmini, başlangıçtaki inokulumların %99.9'unu veya daha fazlasını öldüren konsantrasyon olarak tanımlanan minimum bakterisidal konsantrasyonun (MBC) belirlenmesidir (Canillac & Mourey, 2001).

Martuccia ve ark. Lavanta (*Lavandula officinalis*) yaprak ve çiçekleri ile tam olarak gelişmiş, önceden kurutulmuş kekik (*Origanum vulgare*) yapraklarından elde edilen uçucu yağın antibakteriyel aktivitesi bildirilmiştir. Minimum inhibitör konsantrasyonun en düşük değerleri, 1600-1800 ppm MIC değeri ile *E. coli*'ye karşı kekik uçucu yağı ile elde edilirken, lavanta uçucu yağının MIC değeri 2000 ppm olarak tespit edilmiştir. Öte yandan, *S. aureus*'a karşı kekik uçucu yağının MIC değeri 800-900 ppm ve lavanta uçucu yağının MIC değeri 1000-1200 ppm olarak bulundu. Yüksek fenolik bileşik içeriğinin bu inhibisyonun ana nedeni olduğu bildirilmiştir (Martucci vd., 2015).

Antibiyotiklere karşı bakteriyel direncin artması ve piyasaya yeni antibiyotiklerin girmemesi, ilaca dirençli bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonlarla başa çıkmak için alternatif stratejiler bulma ihtiyacını doğurmuştur (Bajer vd., 2017). Antibiyotikler için alternatiflerin geliştirilmesi, adjuvan sistemlerinin geliştirilip uygulanması önerilen potansiyel stratejiler arasındadır (Bush vd., 2011). Çoklu ilaçlara direnç gösteren bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği artırmak veya eski haline getirmek için bir takım çalışmalar yapılmıştır. Uçucu yağların antibiyotiklere

eklenmesi, antimikrobiyal MIC değerlerinde bir azalmaya neden olabileceği gibi, amikasin gibi aminoglikozitlerle karşı maksimum etki göstermiştir (Sousa vd., 2010).

Beş *Lamiaceae* türünden, yani *Mentha piperita*, *Lavandula angustifolia*, *Mentha pulegium*, *Salvia lavandulifolia* ve *Satureja montana*'dan elde edilen uçucu yağların biyolojik aktivitesi Nikolić ve arkadaşları tarafından antimikrobiyal özellikleri ve kimyasal bileşimleri bakımından değerlendirilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis* ve *Lactobacillus acidophilus* yedi farklı bakteri türü ve 58 klinik oral *Candida spp.* çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, *Satureja montana* uçucu yağının diğer uçucu yağlara göre en yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Nikolić vd., 2014).

Uçucu Yağların Etki Mekanizması

Antimikrobiyal ajan ile mikrobiyal suş arasındaki dinamik etkileşim hakkında veri elde etmek için güçlü bir araç olduğu kadar, bakterisidal etkiyi belirlemek için de en uygun yöntem, “time-kill” testidir. Ayrıca zamana bağlı veya konsantrasyona bağlı bir antimikrobiyal etki, “time-kill” testi ile ortaya çıkmaktadır (Kim vd., 1995).

Uçucu yağların aktivitesini belirleyen faktörler; Yağın kompozisyonu, aktif olmayan bileşenleri içeren fonksiyonel gruplar ve bunların sinerjetik etkileşimleridir (Dorman & Deans, 2000). Antimikrobiyal etki mekanizması, uçucu yağ tipine veya kullanılan mikroorganizmanın türüne göre değişmektedir. Gram negatif bakterilerle karşılaştırıldığında, Gram pozitif bakterilerin uçucu yağlara daha duyarlı olduğu iyi bilinmektedir (Hojjati vd., 2016; Huang vd., 2014). Bu durum şu şekilde açıklanmaktadır; Gram-negatif bakterilerin hücrelerinin, zengin lipopolisakkarit (LPS) yapısına ve karmaşık bir dış zara sahip olmaları nedeni ile hidrofobik bileşiklerin difüzyonunu sınırlamasına bağlanabilirken, Gram-pozitif bakterilerde bu kompleks zar yerine, küçük antimikrobiyal moleküllere direnecek kadar yoğun olmayan ve hücre zarına erişimi kolaylaştıran kalın bir peptidoglikan duvarla çevrili olmasıdır (Hyldgaard vd., 2012; Zinoviadou vd., 2009). Ayrıca, Gram-pozitif bakterilerin, hücre zarında bulunan lipoteikoik asidin lipofilik uçlarından dolayı uçucu yağların hidrofobik bileşiklerinin infiltrasyonunu kolaylaştırabilmektedir (Cox vd., 2000).

Uçucu yağlarda bulunan biyoaktif bileşenlerin hücrenin yüzeyine bağlanabileceği ve daha sonra hücre zarının fosfolipid çift tabakasına nüfuz

edebileceği çeşitli araştırmalarca belirtilmiştir. Hücre zarının yapısal bütünlüğü, hücre ölümüne neden olan hücre metabolizmasını olumsuz yönde etkileyebilecek şekilde birikmesiyle bozulmaktadır (Bajpai vd., 2013; Lv vd., 2011). Ayrıca, uçucu yağların hücre zarının bütünlüğü üzerindeki etkisinin, proteinler, indirgen şekerler, ATP ve DNA gibi hayati hücre içi içeriklerin kaybına yol açan zar geçirgenliğini değiştirdiği, uçucu yağların hücrenin tahrip olmasına ve elektrolitlerin sızmasına neden olurken enerji (ATP) üretimini ve buna öncülük eden ilgili enzimleri inhibe ettiği bildirilmiştir (Lakehal vd., 2016; Cui vd., 2015).

Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri

Uçucu yağlar, çeşitli ekstraksiyon yöntemleri ile farklı kısımlara sahip birçok bitkiden elde edilebilir. Uçucu yağların üretimi ve uçucu yağ ekstraksiyonu için kullanılacak olan yöntem kullanılan botanik ürüne bağlıdır. Malzemenin durumu ile biçimi, dikkate alınan bir diğer faktördür. Ekstraksiyon yöntemi, uçucu yağın kalitesini belirleyen başlıca faktörlerden biridir (Tongnuanchan & Benjakul, 2014). Uygun olmayan ekstraksiyon prosedürü, uçucu yağın kimyasal yapısının zarar görmesine veya etkisini değiştirmesine neden olabilmektedir. Bu, biyoaktivite ve doğal özelliklerde kayıpla sonuçlanır. Bazı durumlarda uçucu yağda renk bozulması, koku / tat ve ayrıca artan viskozite gibi fiziksel değişiklikler meydana gelebilir. Ekstrakte edilen uçucu yağdaki bu değişikliklerden kaçınılmalıdır (Tongnuanchan & Benjakul, 2014). Uçucu yağ elde etme metodları 3 başlıkta incelenmektedir. Bunlar;

- **Buhar distilasyon Metodu**

Uçucu yağ elde etmede en yaygın olarak kullanılan yöntemdir (Reverchon & Senatore, 1992). Buhar distilasyon yöntemi ile elde edilen uçucu yağların oranı %93'tür ve kalan %7'lik kısım aşağıda belirtilen çeşitli yöntemlerle ekstrakte edilmektedir (Masango, 2005). Uygulanan ısı, bitkinin hücre yapısının patlaması ve parçalanmasının ana nedenidir. Bunun sonucu olarak, bitki materyalinden aromatik bileşikler veya uçucu yağlar salınmaktadır (Babu & Kaul, 2005; Perineau vd., 1992).

- **Hidro distilasyon Metodu**

Hidro distilasyon yöntemi suda çözünmeyen, yüksek kaynama noktasına sahip doğal ürünleri izole etmek için sıklıkla kullanılan odunsu veya çiçek gibi bitki materyallerinden uçucu yağ ekstraksiyonunun standart yöntemi olarak bilinmektedir. İşlem, bitki materyallerinin suya tamamen daldırılmasını ve

ardından kaynatılmasını içerir. Bu yöntem, çevreleyen su aşırı ısınmasını önlemek için bir bariyer görevi gördüğünden, çıkarılan yağları belirli bir dereceye kadar korumaktadır. Bu tekniğin avantajı, materyalin 100°C'nin altındaki bir sıcaklıkta damıtılabilmesidir (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

- **Hidro diffüzyon Metodu**

Hidrodiffüzyon ekstraksiyonu, buhar distilasyon metodunun farklı bir tipi olup, yalnızca damıtma kabına buharın giriş yolunda farkı olan bir tür damıtma işlemidir. Bu yöntem, bitki materyali kurutulduğunda ve kaynama sıcaklığında zarar görmemesi amacı ile kullanılmaktadır (Chemat vd., 2012). Hidrodiffüzyon yönteminde bitki materyalinin tepesinden buhar uygulanırken, buhar distilasyonu yönteminde bitki materyalinin alt kısmından buhar uygulanmaktadır. Prosedür ayrıca düşük basınç veya vakum altında da çalıştırılabilmekte ve buhar sıcaklığı 100°C'nin altına düşürmektedir. Hidrodiffüzyon yöntemi, daha kısa işlem süresi ve daha az buhar kullanılarak daha yüksek yağ verimi nedeniyle buharla damıtma yöntemine göre daha avantajlıdır (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

Uçucu Yağların Kompozisyonlarını Belirleme Yöntemleri

Kromatografik tekniklerin geliştirilmesi, uçucu yağların kimyasal bileşimlerinin incelenmesinde önemli ilerleme kaydedilmesine olanak sağlamıştır. Gaz Kromatografisi (GC), uçucu yağ bileşenlerinin ve bileşim varyasyonlarının hem tanımlanması hem de oranlarının belirlenmesi için basitliği, hızı ve verimliliği nedeniyle önemli bir yöntem olarak adlandırılmaktadır (Chamorro vd., 2012). Aynı zamanda, gaz kromatografi-kütle spektrometri (GC-MS) analizleri, uçucu yağlar içerisinde bulunan bileşikleri tanımlarken, spektrometre ile yüksek duyarlılık ve hızlı tarama nitelikleri sayesinde analiz edilen uçucu yağın içerisinde az miktarda bulunan bileşiklerin bile tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Spektrometrik analizlerin verileri sinyal olarak aktarılmakta ve sinyallerin monitörlerde yapmış olduğu pikler veri bankası içeren programlar ile karşılaştırılarak uçucu yağların tanımlanma işlemi gerçekleştirilmektedir (Çelen, 2006; Esen, 2005).

Çalışmada Kullanılan Bitkiler

Kekik (Origanum dubium Boiss)

Kekik, ana içeriği karvakrol (carvacrol) olan tüm bitkisel türlerin genel adıdır. karvakrol'ün izomeri olan timol ise bu türlerde çok az bir miktarda bulunmaktadır (Can Baser, 2008a). *Origanum* türleri, dünya çapında bulunan kekiklerin en büyük kısmını oluşturmaktadır (Olivier, 1997).

Kekikten elde edilen uçucu yağın içerisinde bulunan majör bileşenler; karvakrol, timol ve monoterpenik fenollerdir. Bu moleküller γ -terpinen (Davis PH vd., 1988) ve p-cymen'den sentezlenmektedirler (Güner vd., 2000). Karvakrol ve timol maddeleri, literatürde genellikle fenollerin tasvir edilmesi amacı ile kullanılmaktadır. Fakat fenollerden biyosentetik olarak üretilmeleri olanaksız olduğu için bu tasvir yanlış olmaktadır. Fenol yalnızca fosil yakıtlarda bulunan etkisiz bir moleküldür (Azcan vd., 2000). Fakat karvakrol ve timol, fenol halkası üzerinde birbirlerine para pozisyonunda bulunan metil ve izopropil fonksiyonları içeren monoterpenik yapıya sahiptirler. Bu uçucu bileşikler, aromatik bitkiler ve uçucu yağlarda bulunmaktadır. Formüldeki farklılık, sadece OH grubunun farklı pozisyonunda olmasıdır. Karvakrol her zaman sıvı formda iken, timol ve fenol kristal bir formdadır. Ortalama letal dozu gösteren letal doz (LD₅₀) değerleri, karvakrol ve timolun fenolden daha güvenilir olduğunu ortaya koymaktadır (Budavari S vd., 1997).

Origanum türü, 10 alt bölüme bağlı 43 türden oluşmaktadır (Baser KHC, 2002). Bu türlerin %75'i Akdeniz'in doğu kısmında yer almaktadır (Temel vd., 2013). Bu türlerden biri de araştırmamızda kullandığımız *Origanum dubium Boiss*'tir.

O. dubium Akdeniz'e özgü 30-100 cm uzunluğunda bir çalı türüdür. Kıbrıs'ta "rigani" isminde de adlandırılmakta olup, kendine has aroması ile yemeklerde lezzet vermesi amacı ile sıklıkla kullanılmaktadır. Kıbrıs'ta genel olarak Baf bölgesinde ormanlık alanlarda yetişmektedir. *O. dubium* yıllardır önemli bir yağ kaynağı olarak kullanılmaktadır. *Origanum* türleri üzerinde yapılan bilimsel araştırmalar sonucu bu bitkilerin önemli ölçüde peptisid, antifungal, antioksidan ve antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir (Aslim & Yucel, 2008; Koukoulitsa vd., 2008; Oke & Aslim, 2010). *O. dubium*'dan elde edilen uçucu yağlar genellikle antiromatik amaçlı

kullanılsa da, gaz giderici ve sindirimi kolaylaştırma amacıyla da kullanılmaktadır (Novak vd., 2011).

Nane (Mentha spicata Lamiceae)

Nane, *Labiatae (Lamiaceae)* familyasındaki *Mentha* türüne ait bir bitkidir (Kanatt vd., 2007). Genellikle “spearmint” veya “bahçe nanesi” olarak bilinen *Mentha spicata L.*, Hint mutfağında sıklıkla kullanılır. Lezzet amacı ile sıklıkla yemeklerde kullanılmakta olan bu *Mentha* türü, yaklaşık olarak 25-30 türden oluşmaktadır (Aviello vd., 2009). Biberiye (*Rosmarinus officinalis L.*), adaçayı (*Salvia officinalis L.*), kekik (*Thymus vulgaris L.*) ve lavanta (*Lavendula angustifolia Mill.*) Akdeniz bölgesine özgü olup, balsam (*Melissa officinalis L.*) ve nane (*Mentha spicata L.*), İngiltere ve diğer Avrupa ülkelerinde yaygın olarak bulunan bitkilerdir (H. Wang vd., 2004). *Mentha spicata* Balkan Yarımadası ve Türkiye'nin hem kuzey hem de batısına özgü olup aynı zamanda Avrupa ve Akdeniz bölgesinin birçok bölgesinde, doğuda Pakistan yanı sıra Kuzey Amerika'da da bulunmaktadır. Morfolojik olarak mızrak şekline benzemektedir (Davis vd., 1988; Soilhi vd., 2020).

M. spicata bitkileri her zaman karvon bakımından zengindir. Bu nedenle, bu bitkilerden elde edilen uçucu yağların her zaman karvon karakterize edildiği bilinmektedir (Kokkini & Vokou, 1989). Yapılan araştırmalarla karvon'un bakterilerin büyüüp gelişmesini engelleyici bir potansiyele sahip olduğu, antifungal ve pestisit özellikleri olduğu bildirilmiştir (Elmastaş vd., 2007).

Antimikrobiyal Aktivite Düzeyini Saptama Yöntemleri ve Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Bu testler *in vitro* koşullar altında antimikrobiyal materyallerin, seçilmiş bakteri türleri üzerinde incelendiği testlerdir (Gajic vd., 2022). Bunlar;

Dilüsyon Metotları: Broth Dilüsyon ve Agar Dilüsyon

Antimikrobiyal ajanlara karşı bakteriyel duyarlılık hakkında veri elde etmek için yeni teknolojiler tanıtılmasına rağmen, geleneksel teknolojiler hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Disk difüzyon duyarlılık testlerinin yanı sıra, en yaygın olarak kullanılan yöntemler; broth makro veya mikro dilüsyon ve agar dilüsyondur (Weinstein & Lewis, 2020). Broth ve agar seyreltme yöntemleri kullanılarak, antimikrobiyal ajanların minimum inhibitör konsantrasyonları (MIC) yani ajanın mikroorganizmaların büyümesini engellediği en düşük konsantrasyon

belirlenebilmektedir (Golus vd., 2016; Vasiljević vd., 2019). MIC'lerin belirlenmesinin yanı sıra, broth dilüsyon yöntemlerinin avantajı, bakterilerin %99,9'unu öldüren bir antimikrobiyal maddenin en düşük konsantrasyonu olan minimum bakterisit konsantrasyonu (MBC) elde etme olasılığıdır. Tüp içi dilüsyon testi olarak da bilinen makrodilüsyon yöntemi, ilgili ortamda antimikrobiyal maddelerin seri bir şekilde iki kat dilüsyonunu kullanmaktadır. Hazırlanan tüplere bilinen bir konsantrasyonda bakteri ilave edilmektedir. (Mounyr Balouiri vd., 2016a).

Diğer bir makro dilüsyon yöntemi, “time-kill” yöntemidir. Bu test, antimikrobiyallerin bakteri ölümüne yol açma hızını inceleyerek farklı konsantrasyonlarda antimikrobiyal maddelerin etkisinin izlenmesine olanak tanır. Antimikrobiyal ajanların bakterisidal aktivitesi konsantrasyona ve zamana bağlı olarak belirlenmektedir. Bakteriyel canlılık, 24 saat boyunca belirli zaman aralıklarında agar plakaları üzerindeki kolonileri sayarak belirlenmektedir (Ferro vd., 2015). Bakteri üreme hızı, ilk 24 saatlik zaman öldürme testi sırasında log CFU/mL'deki değişiklikler yoluyla izlenmekte ve sonuçlara dayalı olarak, büyümenin veya öldürme etkisinin yokluğunu temsil eden deneysel eğriler oluşturulabilir ve bakteri ile antimikrobiyal madde arasındaki etkileşim hakkında araştırmacıya fikir verebilmektedir. Veriler, farklı matematiksel modeller kullanılarak daha fazla analiz edilebilmektedir (Mueller vd., 2004; Olajuyigbe & Afolayan, 2012).

Broth Mikro Dilüsyon yöntemi standardize edilmiş, doğru ve ucuzdur. 96 kuyucuklu mikrotitre plakalarında gerçekleştirildiği için, birkaç antimikrobiyal maddenin art arda test edilmesine ve bir plakada sekiz seri antimikrobiyal ajanın iki kat dilüsyonuna izin vermektedir. Dilüsyon işlemi yapıldıktan sonra, her kuyuya standart bakteri inokulum aşılır ve en az 16-24 saat inkübe edilmektedir. Bu prosedür referans yöntem olarak kullanılmasına rağmen, resazurin renk redoks indikatörü eklenerek geliştirilmiştir. Resazurin, metabolik olarak aktif bakteri hücrelerinin varlığında pembe, floresan resorufine dönüşen mavi bir renktir. Resazurinin floresan resorufine indirgenmesi florimetrik olarak ölçülebilir (Mounyr Balouiri vd., 2016b; Foerster vd., 2017; Jorgensen & Ferraro, 2009; Spencer vd., 2020).

Agar dilüsyon yöntemi, katılaşmadan önce seçici olmayan ortama farklı konsantrasyonlarda antimikrobiyal maddelerin eklenmesini içermektedir (Wiegand vd., 2008). Daha sonra standart bakteri inokulum agar yüzeyinde eklenmektedir. Bir

gecelik inkübasyonun ardından, plakalar görsel olarak değerlendirilir ve ekim yapılmış alanlarda büyümenin oluşup oluşmadığı belirlenmektedir. Bakteri üremesini önleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu MIC olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem, farklı bakteri suşlarının aynı anda test edilmesini sağlamaktadır (Mirajkar & Gebhart, 2016).

Antimikrobiyal Gradyan Metodu

Gradyan şerit testi, her iki yöntemin de avantajlı özelliklerine sahip olan, disk difüzyon ve dilüsyon yönteminin bir kombinasyonudur. Basit ve kullanımı kolaydır. Yöntem, bir antibiyotiğin sürekli bir gradyan ile agar içinden difüzyonuna dayanmaktadır. Duyarlılık kategorilerinin, gradyan testi ve broth dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİC değerlerinin uyumundan dolayı, Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi (EUCAST) ve CLSI tarafından önerilen bir “altın standart” olarak kabul edilmektedir .(Weinstein & Lewis, 2020; *EUCAST: Clinical Breakpoints and Dosing of Antibiotics*, 2022).

Disk Difüzyon Yöntemi

1940'tan günümüze, disk difüzyon yöntemi, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında en yaygın kullanılan yöntem olarak bilinmektedir (Heatley, 1944). Disk difüzyon yöntemi, insan hastalıklarına neden olan en yaygın ve klinik olarak ilgili bakterilerin duyarlılığını test etmek için standart hale getirilmiştir (Weinstein & Lewis, 2020). Standardizasyon birçok mikroorganizma ve antimikrobiyal için sürekli devam eden bir süreçtir. Yöntem, daha önce bakteri süspansiyonlu agar üzerine farklı antibiyotik emdirilmiş disklerin yerleştirilmesine esasına dayanmaktadır. Antibiyotik, agar ortamından radyal olarak dışa doğru difüze olur ve bir antibiyotik konsantrasyon gradyanı üretir. $35\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saatlik inkübasyonda inhibisyon zonları oluşturulduktan sonra, test edilen her bir antibiyotiğin zon çapları çıplak gözle veya otomatik bir sistem kullanılarak ölçülmektedir (Le Page vd., 2016). Elde edilen sonuçlar, kullanımdaki standardın önerilen klinik sınır değerlerine göre yorumlanıp, kategorilere ayrılmaktadır (Weinstein & Lewis, 2020).

Antimikrobiyal Dirençli Bakterilerin Tespiti için Kromojenik Agar

Kromojenik besiyerlerinin geliştirilmesinin temel amacı, dirençli

mikroorganizmaların daha hızlı tespiti ve tanımlanmasını sağlamaktır. Hedef organizmalar, kromojeni serbest bırakmak için substratları metabolize eden spesifik enzim sistemleri ile karakterize edilmektedir. Kromojen daha sonra ortamdaki belirgin bir renk değişikliğinin doğrudan gözlemlenmesiyle görsel olarak tespit edilebilir. Böylece, bu seçici ve farklı ortamlar, hedef patojenlerin renkli koloniler olarak büyümesini sağlar. Geleneksel kültür ortamının kullanımı ile karşılaştırıldığında, kromojenik agar kullanımı genellikle maliyetleri ve çalışma süresini azaltmaktadır (Perry, 2017). Primer kullanımı, çeşitli patojenlerle enfekte olan hastaların taranması içindir. Bu nedenle enfeksiyon önlemede çok değerli bir testtir (Kekic vd., 2021).

Antimikrobiyal Dirençli Bakterilerin Tespiti için Kolorimetrik Testler

Kolorimetrik testler, antimikrobiyal rezistans tespiti için geliştirilmiş fenotipik yöntemleri temsil etmektedir. Yöntem, pH değerlerindeki ve kromojenik maddelerin rengindeki değişikliklerle tespit edilen test bileşenini hidrolize eden bakteriyel enzimlere dayanmaktadır. Kısaca, bakteriyel süspansiyon veya bakteriyel lizat süspansiyonu, fenol kırmızısı gibi antibiyotik ve pH indikatör boyaları içeren bir saptama solüsyonuna eklenir ve birkaç saatten fazla olmamak üzere kısa bir süre boyunca inkübe edilir. Tespit solüsyonunun pH'ı, antibiyotiğe dirençli bakterilerin büyümesi veya bakteriyel enzim aktivitesi nedeniyle değişir ve ardından solüsyonun rengi değişir ve bu daha sonra görsel olarak gözlemlenebilir. Bu testlerin hızlı, gerçekleştirilmesi ve yorumlaması kolay ve oldukça hassas ve spesifik olduğu gösterilmiştir. Bu tür kolorimetrik testlere iyi bir örnek, karbapenemaz üreten bakterileri saptayan Carba NP'dir (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Fransa). Test, 30 dakika ila 2 saat arasında güvenilir sonuçlar vererek, onu karbapenemaz üreticilerini kontrol etmenin hızlı ve kolay yolu haline getirir (Nordmann vd., 2012).

BÖLÜM III

Gereç ve Yöntem

Bitkiler

Çalışmada kullanılan bitkiler olan *Origanum dubium* (Kıbrıs dağ kekiği) ve *Mentha spicata* (Kıbrıs bahçe nanesi), sırasıyla 10.10.2020 ve 21.10.2020 tarihlerinde Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti (KKTC), Lefke bölgesinden, doğal ortamlarından toplanmıştır. Bu bitkilerin yaprakları dallarından ayrılarak, gün ışığı almayan karanlık, serin ve kuru bir ortamda kurutulmuştur. 120g *O. dubium* ve 40g *M. Spicata* elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan bitkiler Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can BAŞER tarafından tespit edilmiş ve NEUN6896 (*O. dubium*), NEUN10263 (*M. spicata*) kodları ile Yakın Doğu Üniversitesi Herbaryum’unda saklanmıştır.

Şekil 1

Lefke Bölgesinden Doğal Ortamlarından Elde Edilmiş Bitkilerin Kurutulmuş Görüntüleri

Origanum dubium



Mentha spicata

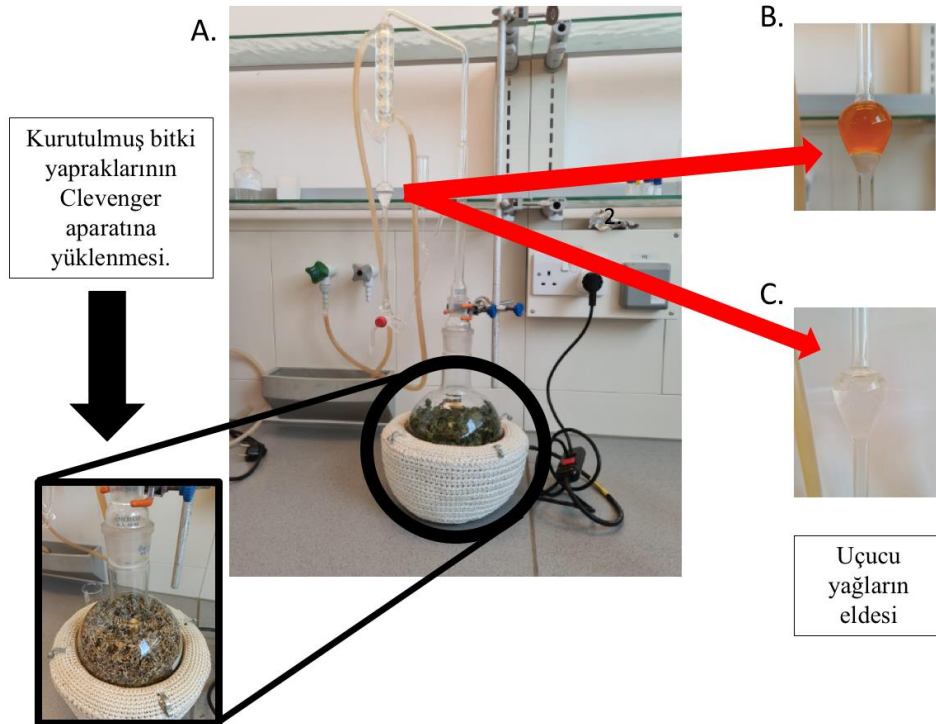
Uçucu Yağların Elde Edilmesi

O. dubium (120g) ve *M. spicata* (40g) bitkilerinin önceden kurutulmuş yaprakları, Clevenger tipi aparat kullanılarak her biri ayrı ayrı 3 saat boyunca 1 litre (L) su ile distile edilmiştir. Anhidroz sodyum sülfat (Na_2SO_4) kullanılarak sudan uzaklaştırılan ve 0.45 μm steril filtreden (Miller-HV, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) geçirilen uçucu yağlar $+4^\circ\text{C}$ 'de hava sirkülasyonu olmayan şişelerde, karanlık bir ortamda saklanmıştır. Yağ verimleri kuru ağırlık bazında v/w olarak hesaplanmıştır. Yağların verimleri *O. dubium* için 5.5%, *M. spicata* için 3.0% olarak tespit edilmiştir.

Şekil 2

A. Clevenger Tipi Aparat İle Uçucu Yağ Elde Etmek İçin Uygulanan Hidrodistilasyon Yöntemi

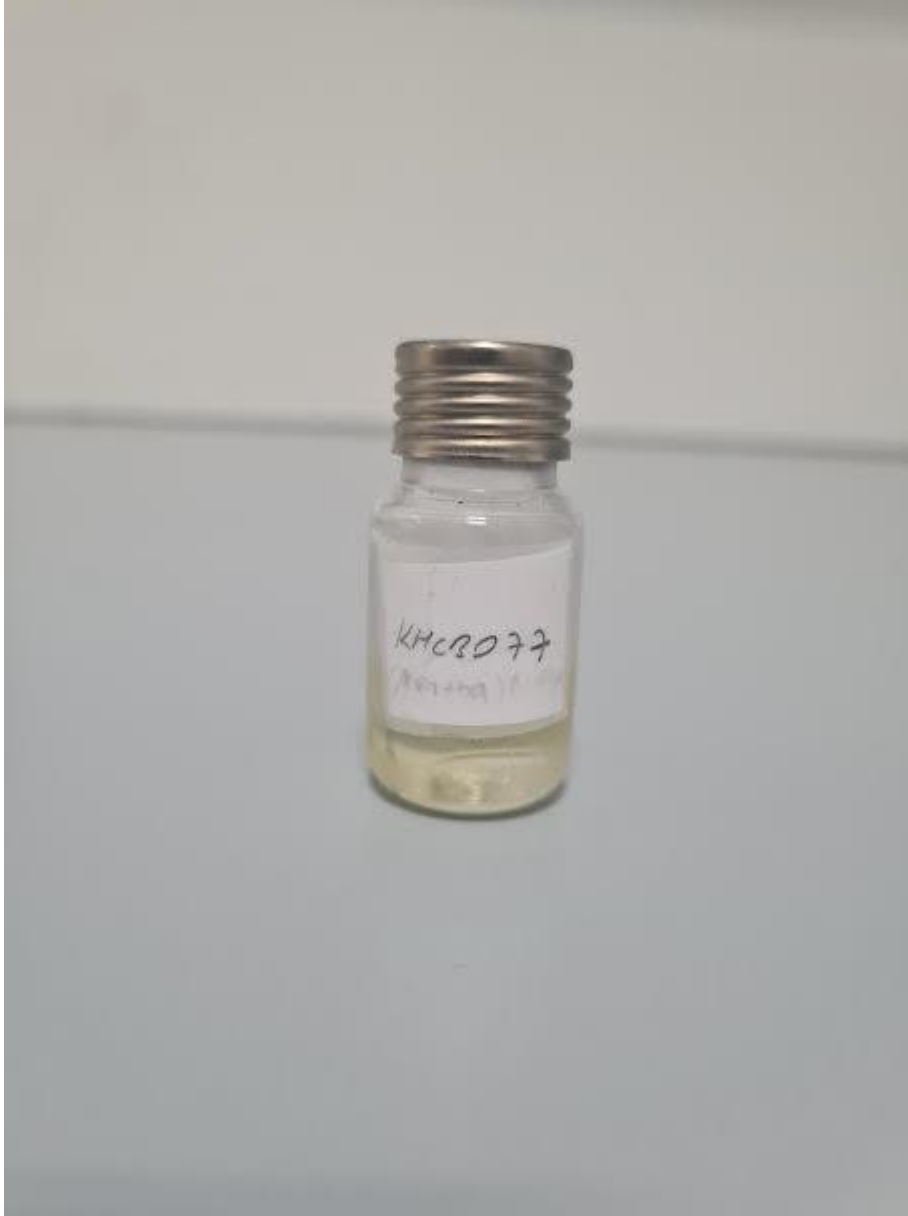
B., C. Hidrodistilasyon Yöntemi İle Kurutulmuş Yapraklardan Elde Edilen Uçucu Yağlar



Şekil 3

Elde Edilmiş Uçucu Yağların 4°C’de Saklanması İçin Hava Sirkülasyonu Olmayan Şişelerde Saklanması

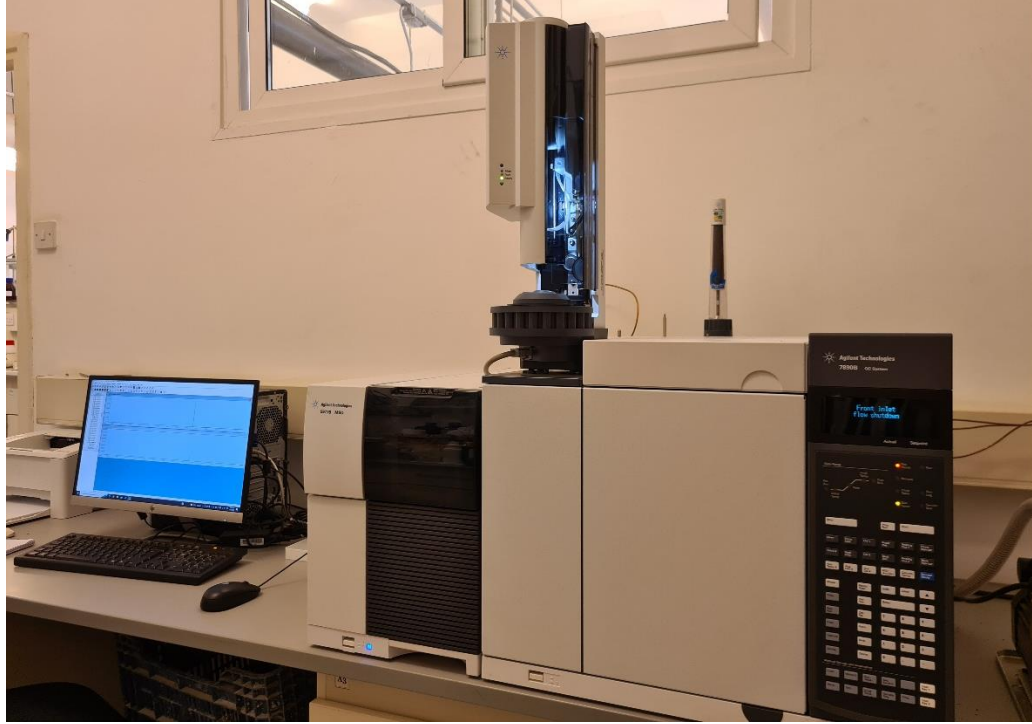




GC/MS Analizleri

GC/MS (Gaz kromatografi/ kütle spektrometre) analizleri Agilent 5975 GC-MSD sistemi ile gerçekleştirilmiştir. 60 m $\times$ 0.25 mm ebatlarında ve 0.25 mm film inceliğine sahip Innowax FSC sütünü kullanılarak gerçekleştirilen analizde taşıyıcı gaz olarak helyum (0.8 mL/dk) kullanılmıştır. GC fırını 10 dakika boyunca 60°C'de kalacak şekilde ısıtılmış ve 4°C/dk hızında 220°C'ye çıkacak şekilde ayarlanmıştır. Bölme oranları 40:1'e ayarlanmış olup, enjektör sıcaklığı 250°C'ye sabitlenmiştir. Kütle spektrumları 70 eV olarak kaydedilmiş ve kütle ağırlığı 35-450 m/z arasında belirlenmiştir.

Şekil 4

GC/MS Analiz Cihazı**GC Analizleri**

Gaz kromatografi (GC) Analizleri Agilent 6890 N sistemi kullanılarak yapılmıştır. Alev İyonizasyon Dedektörü (FID/ Flame Ionization Dedector) sıcaklığı 300°C'ye ayarlanmıştır. GC-MS ile aynı elüsyon sırasını elde etmek için, aynı çalışma koşullarını uygulayan sütunun bir kopyası üzerinde eşzamanlı otomatik enjeksiyon yapılmıştır. Ayrılmış bileşiklerin göreceli yüzde miktarları FID kromatogramları kullanılarak hesaplanma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. *M. spicata* Uçucu Yağ Bileşenleri.

	LRI	Bileşen İsmi	Bileşen Oranları (%)
1	1015	α -Pinene	1.0
2	1068	Camphene	0.1
3	1115	β -Pinene	1.2
4	1128	Sabinene	0.8
5	1168	Myrcene	0.8
6	1207	Limonene	12.5
7	1217	1,8-Cineole	3.6
8	1241	β -Terpinene	0.2
9	1256	γ -Terpinene	0.1
10	1259	(<i>E</i>)- β -Ocimene	0.1
11	1393	3-Octanol	0.2
12	1539	β -Bourbonene	0.4
13	1599	Camphor	0.1
14	1608	β -Elemene	0.4
15	1618	Terpinen-4-ol	0.2
16	1623	β -Caryophyllene	0.5
17	1635	<i>trans</i> -Dihydrocarvone	0.3
18	1663	<i>cis-iso</i> -Dihydrocarvone	0.1
19	1676	Pulegone	1.1
20	1687	Dihydrocarvyl acetate	0.6
21	1699	Bicyclosesquiphellandrene	0.4
22	1721	Borneol	0.2
23	1739	Germacrene D	0.6
24	1768	Carvone	71.3
25	1789	<i>p</i> -Vinyl anisol	0.9
26	1819	α -Cadinene	0.1
27	1828	<i>cis</i> -Carvone oxide	tr
28	1851	<i>trans</i> -Carveol	0.3
29	1863	<i>cis</i> -Calamenene	0.2

30	1867	<i>trans</i> -Calamenene	0.1
31	1882	<i>cis</i> -Carveol	1.4
32	2090	Cubenol	0.2
33	2260	Torreyol	0.1
Total			100.0

Tablo 2. *O. dubium* Uçucu Yağ Bileşenleri.

	LRI	Bileşen İsmi	Bileşen Oranları (%)
1	1015	α -Pinene	3.1
2	1019	α -Thujene	0.9
3	1067	Camphene	0.2
4	1114	β -Pinene	0.2
5	1155	δ -3-Carene	0.9
6	1167	Myrcene	1.4
7	1172	β -Terpinene	0.2
8	1187	α -Terpinene	1.2
9	1206	Limonene	0.3
10	1216	1,8-Cineole	0.2
11	1217	β -phellandrene	0.3
12	1255	γ -Terpinene	4.1
13	1283	<i>p</i> -Cymene	6.9
14	1294	Terpinolene	0.3
15	1451	1-Octen-3-ol	0.1
16	1472	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	0.4
17	1549	Linalool	0.2
18	1558	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	0.2
19	1618	Terpinen-4-ol	0.8
20	1622	β -Caryophyllene	0.4
21	1710	α -Terpineol	0.6
22	1715	γ -Terpineol	0.2
23	1720	Borneol	0.3
24	2027	<i>neo-iso</i> -Dihydro carveol	0.2
25	2151	Spathulenol	0.1

26	2199	Thymol	0.5
27	2231	Carvacrol	75.8
Total			100.0

Uçucu Yağ Bileşenlerinin Saptanması

Uçucu yağ bileşenlerinin tanımlanması, önceden tanımlanmış numunelere ait bağıl alıkonma sürelerinin karşılaştırılması veya linear alıkonma indekslerinin (LRI) bir dizi n-alkalen ile karşılaştırılması yoluyla gerçekleştirilmiştir. Tanımlama için, ana bileşikleri ve bilinen yağların bileşenlerini içeren “Başer Uçucu Yağ Kütüphanesi” (ESO 2000 - *The Complete Database of Essential Oils*; Kelsey, 1999) ile ticari kaynaklar olan “Wiley GC/MS Library, NIST Chemistry WebBook” ((McLafferty vd., 1989; Stein SE., “*Mass Spectra*” NIST Mass Spec Data Center, in NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69”, 2012) bilgisayar programları kullanılarak literatürde bulunan MS türleri ile eşleştirmeler yapılmıştır.

Bakteri ve *Candida* Kültürlerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan *E. faecalis* (ATCC 29212) ve *C. albicans* (ATCC 10231) organizmaları Yakın Doğu Üniversitesi mikrobiyoloji laboratuvarı bankasından temin edilmiştir. Çalışmada Mueller Hinton Agar besiyeri olarak kullanılmıştır. 24 saat süre ile *E. faecalis*, 48 saat süre ile *C. albicans* inkübe edilmiştir. Ardından mikroorganizmalar agarlara yayma yöntemi ile ekilmiştir.

Deney Gruplarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan grup içerikleri klinikte uygulanan rutin protokollere uygun olarak belirlenmiştir. Aköz karışım olan medikamanı hazırlamak için Ca(OH)₂'ye distile su (salin) ve gliserin, hem ayrı ayrı hem de birlikte olacak şekilde gruplara dahil edilmiştir. Yürütülen çalışmada kullanılmak üzere elde edilen *O. dubium* ve *M. spicata* uçucu yağları çalışma gruplarına dahil edilmiştir. Her bir uçucu yağın antimikrobiyal etkisini araştırmak için rutin olarak uygulanan protokol ile birlikte veya ayrı ayrı olacak şekilde toplam yedi farklı deney grubu oluşturulmuştur. *O. dubium* için Tablo 3'te ve *M. spicata* için Tablo 4'te gösterildiği gibi farklı bileşenler eşit oranlarda gruplara eklenmiştir.

Tablo 3. *O. dubium*, Kalsiyum Hidroksit, Distile Su ve Gliserin Çalışma Grupları.

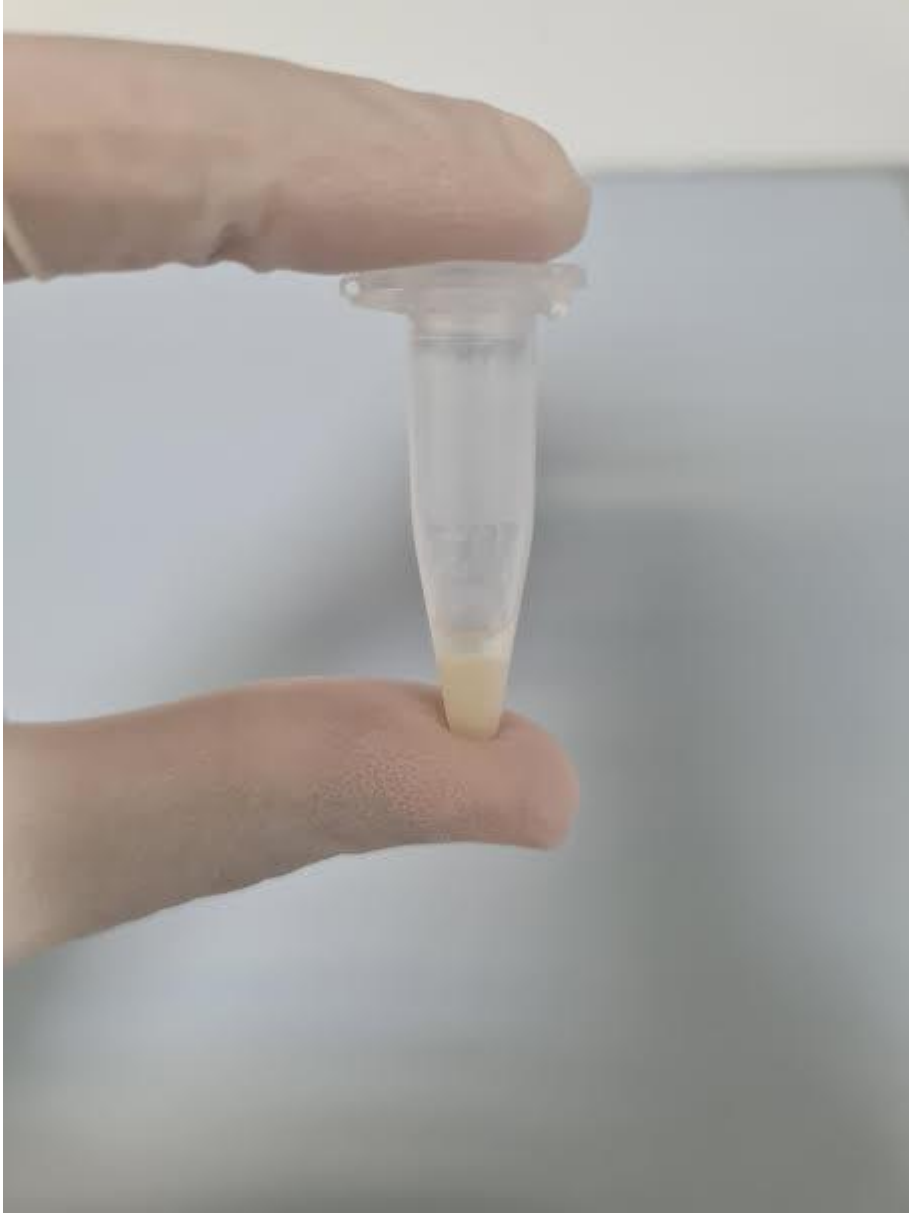
	<i>Origanum dubium</i>	Kalsiyum Hidroksit	Distile Su	Gliserin	Grup Bileşenlerinin Oranı
<i>Origanum dubium</i> ve Kalsiyum Hidroksit	100 µL	0.001 g	-	-	
<i>Origanum dubium</i> , Distile Su ve Kalsiyum Hidroksit	100 µL	0.002 g	100 µL	-	
<i>Origanum dubium</i> , Gliserin ve Kalsiyum Hidroksit	100 µL	0.002 g		100 µL	
<i>Origanum dubium</i> , Distile Su, Gliserin ve Kalsiyum Hidroksit	100 µL	0.003 g	100 µL	100 µL	
Distile Su ve Kalsiyum Hidroksit	100 µL	0.001 g	-	-	
Gliserin ve Kalsiyum Hidroksit	-	0.001 g	100 µL	-	
Distile Su, Gliserin ve Kalsiyum Hidroksit	-	0.001 g		100 µL	

Tablo 4. *M. spicata*, Kalsiyum Hidroksit, Distile Su ve Gliserin Çalışma Grupları.

	<i>Mentha spicata</i>	Kalsiyum Hidroksit	Distile Su	Gliserin	Grup Bileşenlerinin Oranı
<i>Mentha spicata</i> ve Kalsiyum Hidroksit	100 µL	0.001 g	-	-	
<i>Mentha spicata</i> , Distile Su ve Kalsiyum Hidroksit	100 µL	0.002 g	100 µL	-	
<i>Mentha spicata</i> , Gliserin ve Kalsiyum Hidroksit	100 µL	0.002 g		100 µL	
<i>Mentha spicata</i> , Distile Su, Gliserin ve Kalsiyum Hidroksit	100 µL	0.003 g	100 µL	100 µL	
Distile Su ve Kalsiyum Hidroksit	100 µL	0.001 g	-	-	
Gliserin ve Kalsiyum Hidroksit	-	0.001 g	100 µL	-	
Distile Su, Gliserin ve Kalsiyum Hidroksit	-	0.001 g		100 µL	

Şekil 5

Ependorf tüpler içerisinde hazırlanmış olan karışımlar.





Disk Diffüzyon Yöntemi

Çalışmada oluşturulan farklı grupların antimikrobiyal etkinliklerini belirlemek amacı ile disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Disk difüzyon yöntemi için 100 uL süspansiyonda 108 CFU/mL konsantrasyonda *E. faecalis* ve 100 uL süspansiyonda 106 CFU/mL konsantrasyonda *C. albicans* Mueller Hinton agar plakalarına (Biomérieux, Lyon, France) ekilmiştir (Lee S. C. vd., 2001; Nayyar vd., 2021a). Kıbrıs dağ kekiği yağı (*O. dubium*) ve Kıbrıs bahçe nanesi yağı (*M. spicata*) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ile karıştırılarak oluşturulan 7 farklı çalışma grubunun antimikrobiyal etkisi test edilmişlerdir. Bu amaçla oluşturulan yedi farklı grup test edilmek üzere steril disklerle 15 ul olacak şekilde pipet yardımı ile eklenmiştir. Her iki patojen için

negatif kontrol grubu olarak distile su kullanılmıştır. Pozitif kontrol gruplarında ise vancomycin *E. faecalis* için, nystatin *C. albicans* için kullanılmıştır.

E. faecalis ekilmiş agarlar 37°C’de 24, 48 ve 72 saat süre ile inkübe edilmiştir. *C. albicans* ekilmiş agarlar ise 37°C’de 48 ve 72 saat süre ile inkübe edilmiştir.

Önceden agarlara eklenmiş olan diskler üzerinde oluşan inhibisyon alanları, antimikrobiyal aktivitenin etkisini göstermiştir (Şekil 10). İnhibisyon alanlarının ölçümleri milimetrik cetvel ile milimetrik (mm) olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan ölçümler *E. faecalis* için 24, 48 ve 72.’inci saatte, *C. albicans* için 48 ve 72’inci saatte yapılmıştır. Güvenilir veriler elde etmek için her test üç kez tekrar edilmiştir.

Şekil 6

Disklerin Pleytlere Yüklendikten Sonra 24-48 Ve 72 Saat Boyunca İnkubatörde Bekletilmesi.

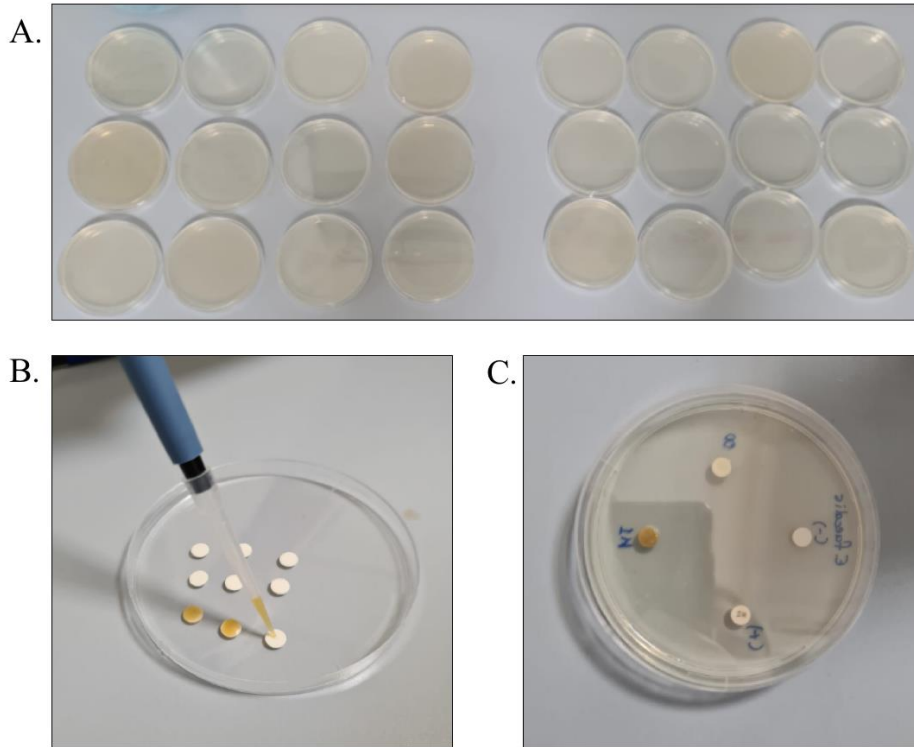


Şekil 7

(A) MH Agarlara Mikroorganizmaların Eklilmesi

(B) Deney Gruplarına Ait Karışımların Difüzyon Disklerine Eklenmesi

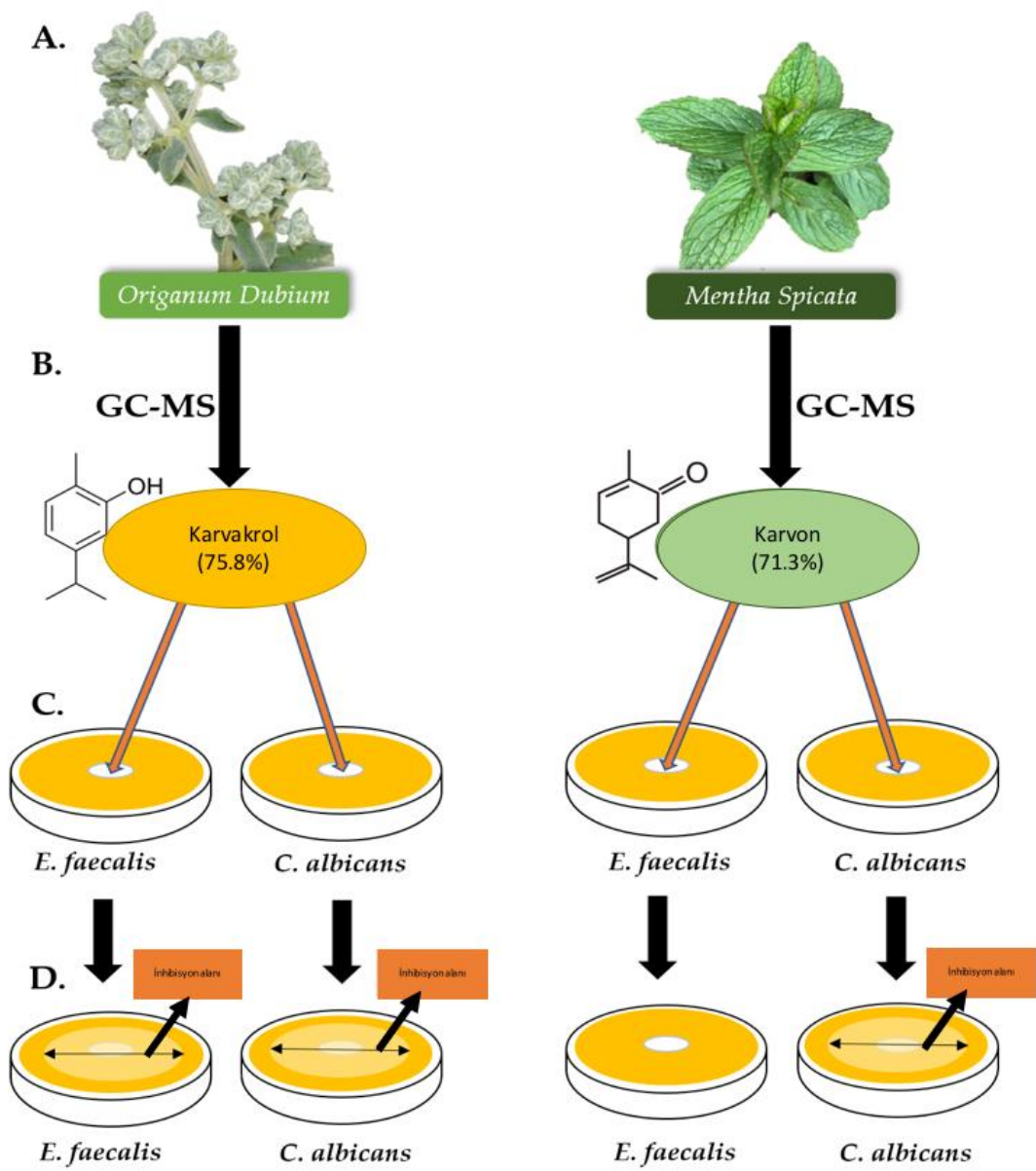
(C) Eklenen Gruplara Ait Disklerin Mikroorganizma (*Faec Cad*) Ekili Pleytlere Yüklenmesi



Şekil 8

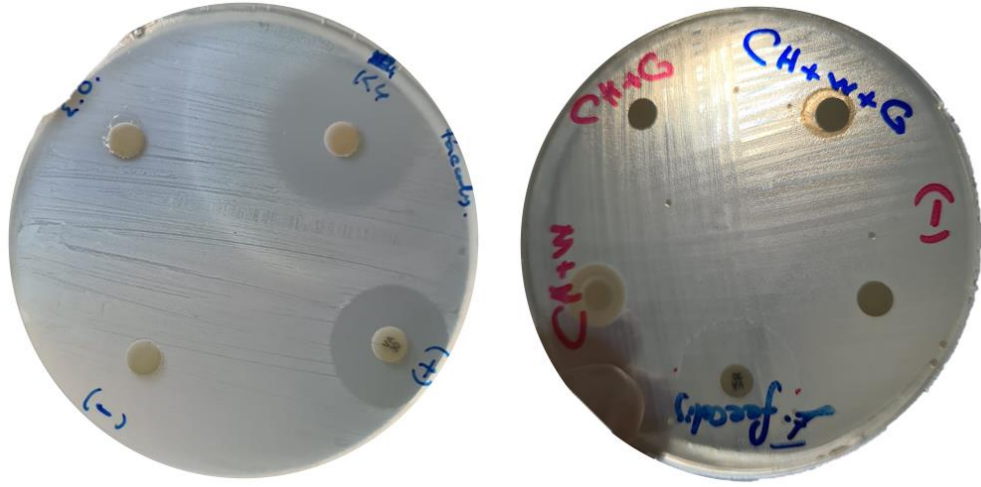
Her Bir Uçucu Yağ Bileşeninin Ayrıntılı Kompozisyonları ile Çalışmanın Grafikselsel Gösterimi.

(A) *O. dubium* ve *M. spicata* bitkileri doğadan toplandı ve bitkilerden uçucu yağ elde edildi. (B) Her iki bitkiden elde edilen uçucu yağlara GC-MS analizi yapıldı. *O. dubium* bitkisinden elde edilen uçucu yağda ana bileşen olarak %75.8 oranında Karvakrol, *M. spicata* bitkisinden elde edilen uçucu yağda ana bileşen olarak %71.3 oranında Karvon bulundu. (C) *E. faecalis* ve *C. albicans* olmak üzere iki farklı mikroorganizma üzerinde disk difüzyon testi yapıldı. (D) İnhibisyon alanları, *E. faecalis* için (24, 48 ve 72 saat) ve *C. albicans* için (48 ve 72 saat) olarak ölçüldü.



Şekil 9

Disk Diffüzyon Yöntemi Sonrası Disklerin Etrafında Gelişen İnhibisyon Alanları



İstatiksel Analiz

İnhibisyon alanı verileri, ortalama standart hatalarla ölçülmüştür. Farklılıkların istatistiksel önemi, tek yönlü ANOVA kullanılarak incelenmiştir. Çoklu grup içi karşılaştırmalar için Tukey testi, GraphPad Prism 5.0 ve Windows için SPSS kullanılarak gruplar arası karşılaştırmalar için t testi yapılmıştır. 0.05* altındaki tüm p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BÖLÜM IV

Bulgular

Gaz kromatografisi ve kütle spektrometrisi veri analizi, *M. spicata*'nın uçucu yağ bileşimi ile karakterize edilen 33 bileşiği tespit etmiştir (Tablo 1). Başlıca bileşikler karvon (%71,3), ardından limonen (%12,5) ve 1,8-sineol (%3,6) olarak tespit edilmiştir. *O. dubium* uçucu yağ bileşiminde, ana bileşiğin karvakrol (%75,8) olduğu 27 başka bileşik daha tespit edilmiştir (Tablo 2).

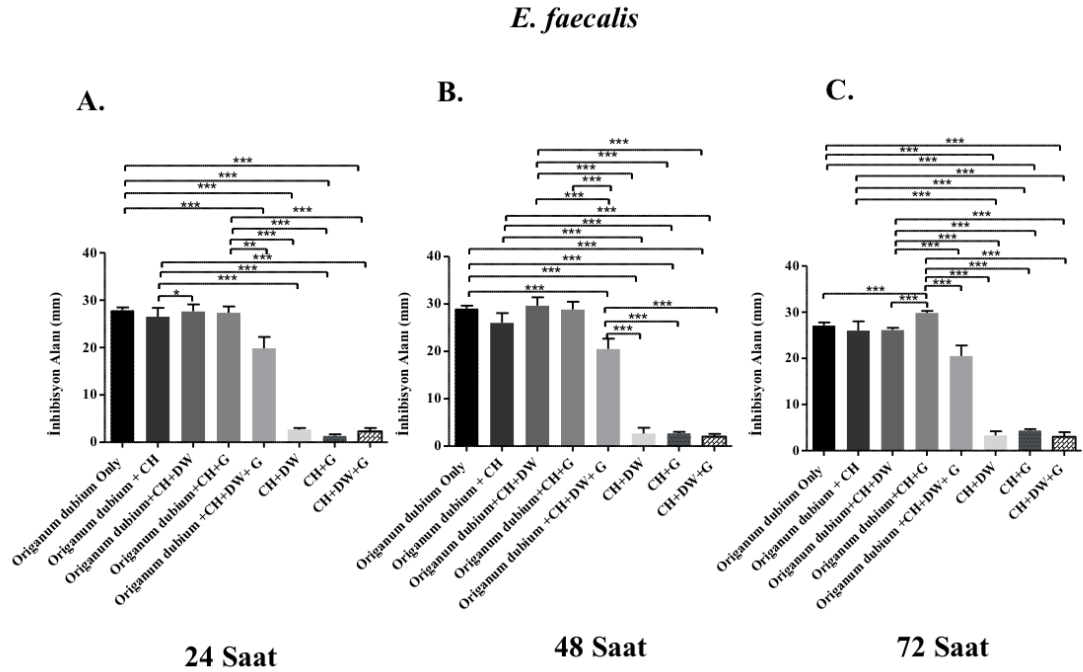
Şekil 10-12'deki veriler, farklı çalışma gruplarının inhibisyon alanı ölçümlerini (mm) tanımlamakta ve göreceli istatistiksel farklılıkları göstermektedir. Distile su veya gliserin içeren Ca(OH)_2 gruplarına *O. dubium* uçucu yağının eklenmesi hem *C. albicans* hem de *E. faecalis* üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterirken, *M. spicata* uçucu yağı sadece *C. albicans* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

E. faecalis üzerinde antimikrobiyal aktivite çalışması üç farklı zaman aralığında (24 saat, 48 saat ve 72 saat; Şekil 10) gerçekleştirilmiştir. Her üç aralıkta da, *O. dubium* uçucu yağının eklenmesi, Ca(OH)_2 'e distile su, gliserin veya her ikisinin eklenmesinden bağımsız olarak antimikrobiyal aktiviteyi önemli ölçüde artırmıştır. Tüm zaman aralıklarında tüm farklı grup içi karşılaştırmalarda aktivitede benzer eğilimler gözlenmiştir (Şekil 10). Ca(OH)_2 , gliserin ve *O. dubium* yağının kombinasyonu, 72.'inci saatte diğer tüm kombinasyonlarla karşılaştırıldığında, *E. faecalis* üzerinde 30 mm'den fazla bir inhibisyon alanı oluşturarak ($p < 0.001$), önemli ölçüde en yüksek antimikrobiyal aktivite seviyesini göstermiştir (Şekil 10C). 24 ve 48.'inci saat ölçümleri için, (1) Ca(OH)_2 , gliserin ve *O. dubium* uçucu yağı ve (2) Ca(OH)_2 , distile su ve *O. dubium* uçucu yağı üçlüsünün gruplar arası karşılaştırmaları, *E. faecalis*'e karşı aralarında önemli bir farklılık sergilememiştir (Şekil 10A,B). Ayrıca, uçucu yağ ilavesi yapılmamış Ca(OH)_2 gruplarında antimikrobiyal aktivite seviyesi, önemli bir farklılık göstermedi (Şekil 10).

Şekil 10

E. faecalis Üzerinde *O. dubium* Uçucu Yağını İçeren Farklı Çalışma Gruplarının Inhibisyon Alanı Çapları (mm). **(A)** *E. faecalis* Üzerinde Çeşitli Gruplarla İnkübasyondan 24 Saat Sonra Ölçülen Inhibisyon Alanı Çapları (mm). **(B)** *E. faecalis* Üzerinde Çeşitli Gruplarla İnkübasyondan 48 Saat Sonra Ölçülen Inhibisyon Zonu

Çapları (mm). (C) *E. faecalis* Üzerinde Çeşitli Gruplarla İnkübasyondan 72 Saat Sonra Ölçülen İnhibisyon Zonu Çapları (mm). (CH: Kalsiyum Hidroksit; G: Gliserin, DW: Distile Su). Değerler, Ortalama İnhibisyon Bölgesi $\pm$ Standart Sapmayı Temsil Eder (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

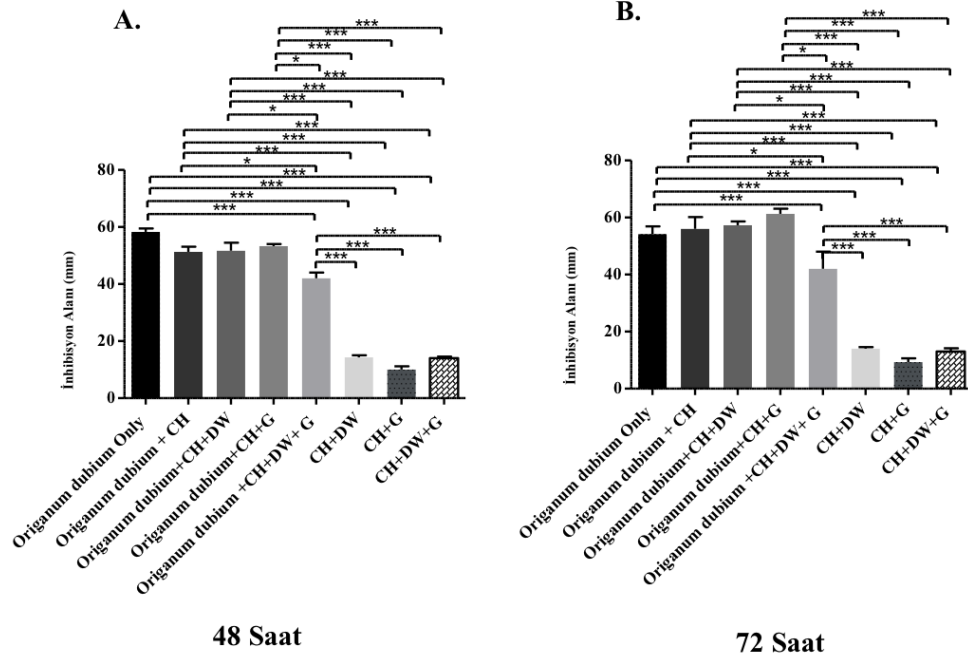


O. dubium ilave edilmiş diğer $\text{Ca}(\text{OH})_2$ gruplarının, *C. albicans* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi de araştırılmıştır. *C. albicans* üzerindeki etki, 24 saat içinde etkin bir mikroorganizma büyümesi olmadığı için 48. ve 72.'inci saat zaman aralığında incelenmiştir (Şekil 11). *O. dubium* gruplarının *C. albicans* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin, tüm farklı çalışma gruplarında *E. faecalis* üzerine karşılık gelen antimikrobiyal aktivite ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu bulunmuştur (Şekil 10 ve 11). $\text{Ca}(\text{OH})_2$ gruplarına *O. dubium* uçucu yağı eklendiğinde, antimikrobiyal

aktivite genel olarak, her iki zaman aralığında (48 saat ve 72 saat; $p < 0,001$) *O. dubium* içermeyen gruplara kıyasla önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Her iki zaman aralığında da, Ca(OH)_2 , gliserin ve *O. dubium* içeren grup dışında diğer tüm çalışma gruplarında nispeten benzer antimikrobiyal aktivite bulguları gözlemlenmiştir. 48.'inci saatte Ca(OH)_2 , gliserin ve *O. dubium* uçucu yağ grubunun oluşturduğu inhibisyon alanının, 48.'inci saatte uçucu yağ içermeyen diğer tüm gruplardan önemli ölçüde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 11B). Ayrıca elde edilen veriler, aynı zaman aralığında Ca(OH)_2 , gliserin ve *O. dubium* uçucu yağ gruplarının, diğer tüm çalışma gruplarıyla karşılaştırıldığında en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir (Şekil 11B).

Şekil 11

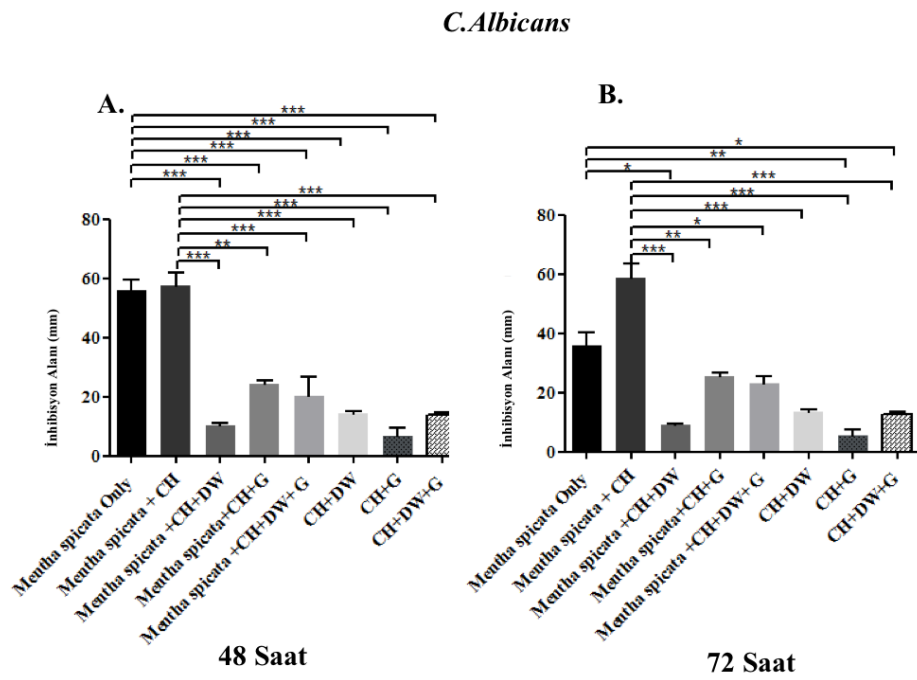
C. albicans Üzerinde *O. dubium* Uçucu Yağını İçeren Farklı Çalışma Gruplarının İnhibisyon Zon Çapları (mm). **(A)** *C. albicans* Üzerinde Çeşitli Gruplarla İnkübasyondan 48 Saat Sonra Ölçülen İnhibisyon Alanı Çapları (mm). **(B)** *C. albicans* (Ch: Kalsiyum Hidroksit; G: Gliserin, Dw: Distile Su) Üzerinde Çeşitli Gruplarla İnkübasyondan 72 Saat Sonra Ölçülen İnhibisyon Bölgesi Çapları (mm). Değerler, Ortalama İnhibisyon Bölgesi $\pm$ Standart Sapmayı Temsil Eder (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

C. Albicans

M. spicata bu çalışmada incelenen bir diğer uçucu yağdır. Çalışma, *M. spicata* uçucu yağının *E. faecalis* üzerinde herhangi bir antimikrobiyal etkisinin olmadığını ve bakteri kültüründe herhangi bir inhibisyon alanı (mm) oluşturmadığını göstermiştir. Bununla birlikte *M. spicata*, *C. albicans* üzerinde önemli ölçüde anlamlı bir inhibisyon alanı oluşturmuştur. *M. spicata* uçucu yağı ve $\text{Ca}(\text{OH})_2$ kombinasyonu, 72 saatlik inkübasyonda ($p < 0,001$) diğer kombinasyon çalışma gruplarıyla karşılaştırıldığında, önemli ölçüde en yüksek inhibisyon bölgesini oluşturmuştur (Şekil 12B). *M. spicata* uçucu yağı her iki zaman aralığında da, (1) *M. spicata* uçucu yağı, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ve gliserin ve (2) *M. spicata* uçucu yağı, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, gliserin ve distile su içeren gruplar, *M. spicata* içermeyen diğer çalışma grupları ile karşılaştırıldığında biraz daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir. (Şekil 12A,B).

Şekil 12

C. albicans Üzerinde *M. spicata* Uçucu Yağını İçeren Farklı Çalışma Gruplarının İnhibisyon Alanı Çapları (mm). **(A)** *C. albicans* Üzerinde Çeşitli Gruplarla İnkübasyondan 48 Saat Sonra Ölçülen İnhibisyon Alanı Çapları (mm). **(B)** *C. albicans* Üzerinde Çeşitli Gruplarla Kuluçkadan 72 Saat Sonra Ölçülen İnhibisyon Zonu Çapları (mm). (Ch: Kalsiyum Hidroksit; G: Gliserin, Dw: Distile Su). Değerler, Ortalama İnhibisyon Bölgesi $\pm$ Standart Sapmayı Temsil Eder (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).



Bölüm V

Tartışma

Çalışmamızda $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 'ye, *O. dubium* ve *M. spicata* uçucu yağlarının güncel klinikte kullanılan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 'e eklenerek antifungal ve antimikrobiyal özelliklerini artırması hedeflenmiştir. Hazırlanan karışımlar, kök kanallarından sıklıkla izole edilen en inatçı iki patojen olan *E. faecalis* ve *C. albicans* üzerinde test edilmiştir.

Pulpal ve periodontal hastalıkların ana nedeni patojen mikroorganizmalardır. Bu nedenden dolayı endodontik tedavide bu patojenlerin kök kanal sisteminden eliminasyonu kritik önem taşımaktadır. Kakekhashi ve ark. Patojen mikroorganizma içermeyen fareler üzerinde yapmış oldukları araştırmada, pulpal ve periodontal hastalıkların gelişebilmesi için ortamda mutlaka patojen mikroorganizma bulunması gerektiğini bildirmişlerdir (Kakekhashi vd., 1965). Benzer şekilde yapılan birçok araştırma sonucu, periapikal bölgede kemik yıkımı gerçekleşmiş olan vakaların enfekte kök kanallarında bulunan patojenlerden kaynaklandığını bildirilmiş ve böylelikle periapikal lezyonların oluşup gelişmesinde patojen bakterilerin kritik önemi olduğu ispatlanmıştır (Ehrnst & Sundqvist, 1976; Håkansson vd., 2010a, 2010b).

Fabricius ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, kök kanallarında polimorfik bir mikrobiyal yapı bulunduğunu bildirmişlerdir (Fabricius vd., 2006). Fakat buna karşın olarak Siquera ve arkadaşları, birincil endodontik enfeksiyonların kök kanallarında üstünlük sağlamış fırsatçı patojenlerden kaynaklandığını bildirmişlerdir (José F. Siqueira vd., 2002; Tang vd., 2004). Oral kavite ve kök kanallarının polimorfik mikrobiyal doğası bilinmekte ve patojenite potansiyeli olan birden çok mikroorganizma bu alanlarda bulunabilmektedir. Çalışmamızda endodontik enfeksiyonlardan sıklıkla izole edilen en dirençli iki patojen *E. faecalis* ve *C. albicans* test edilmek üzere seçilmiştir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre *O. dubium* için yapılan yokluk hipotezi reddedilmiştir. *O. dubium*'un uçucu yağı, hem *E. faecalis* hem de *C. albicans* üzerinde önemli antimikrobiyal aktivite göstermiştir. *O. dubium*, *C. albicans* üzerinde iyi bir antimikrobiyal etki gösterirken, *M. spicata* için oluşturulan yokluk hipotezi kısmen reddedilmiştir. *M. Spicata*, *E. faecalis* üzerinde herhangi bir antimikrobiyal etki göstermemiştir.

Abbaszadegan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *aloe vera* ve *Z. multiflora* uçucu yağlarının antimikrobiyal etkinliği *E. faecalis*'e karşı test edilmiştir.

Aynı çalışmada, *Z. multiflora*'dan %32,17 oranında ve *Aleo vera*'dan %50,78 oranında karvakrol elde edildiği bildirilmiştir. Bu uçucu yağlardan elde edilen oranlar bizim çalışmamızda kullandığımız *O. dubium* bitkisinden elde edilen karvakrol oranından daha düşük olsa da *Aleo vera* ve *Z. multiflora* bitkilerinin *E. faecalis*'e karşı eşit antimikrobiyal etkinlik gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca 14 gün boyunca kullanıldıklarında Ca(OH)_2 ile karşılaştırılabilir düzeyde veriler elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda 24, 48 ve 72 saatlik zaman aralıklarında Ca(OH)_2 'e özellikle *O. dubium* eklendiğinde önemli ölçüde yüksek antimikrobiyal etki sağlanmıştır (Abbaszadegan vd., 2016a).

Mikroorganizmaların kök kanal sisteminden, özellikle dentin tübüllerinden uzaklaştırılması, başarılı bir endodontik tedavinin temel anahtarıdır. Dentin tübüllerinde, oksijen konsantrasyonu düşük olduğu için mikroorganizmaların üreyip çoğalabileceği en ideal ortam olarak kabul edilmektedir. *C. albicans*, ağız boşluğunda en bol bulunan patojen mantardır ve sıklıkla endodontik tedavilerin başarısızlığına neden olmaktadır (Hargreaves vd., 2011).

E. faecalis, kanal tedavilerinde yaygın olarak bulunan en dirençli bakterilerden biridir (Nosrat vd., 2009). *C. albicans*'a benzer şekilde, *E. faecalis*, immün sistemi baskılanmış hastalarda kritik öneme sahip önemli bir fırsatçı patojendir (Krishnamoorthy vd., 2020). Spesifik olarak, Krishnamoorthy ve arkadaşları, birkaç *C. albicans* gen özelliklerinin biyofilm oluşumunu, doku penetrasyonunu ve doku istilasını indüklediğini gözlemlemişlerdir. Bu aktivitelerin *E. faecalis* varlığında önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (Krishnamoorthy vd., 2020). Pinheiro ve ark. *E. faecalis*'in daha önce endodontik tedavi görmüş vakaların kök kanal sistemlerinden en sık oranda (%45,8) izole edilen bakteri olduğunu bildirmişlerdir (Pinheiro vd., 2003). Momenijavid ve arkadaşlarının, Ca(OH)_2 ile *E. faecalis* üzerinde yapmış oldukları bir araştırmada, Ca(OH)_2 'nin *E. faecalis*'i tamamen elimine edemediğini fakat bu patojenin morfolojik yapısında birtakım değişiklikler meydana getirdiğini bildirirken, Ca(OH)_2 'de bulunan Ca^{+2} iyonu ve *E. faecalis* arasındaki etkileşimde keşfedilmemiş eksik bir bilgi olduğunu ve bunun araştırılması gerektiğini savunmuşlardır (Momenijavid vd., 2022).

Ca(OH)_2 aköz taşıyıcılar ile karıştırıldığında OH^- iyonu salınımı yaparak antimikrobiyal etkinlik göstermektedir (Ballal vd., 2007). endodontik tedavilerde kanal içi medikaman olarak kullanılmasına rağmen, antimikrobiyal aktivitesi hakkında hala daha önemli tereddütler vardır. Son yapılan çalışmalar, yeni

geliştirilen diğer kanal içi medikamanlar ile karşılaştırıldığında tek başına Ca(OH)_2 'nin daha az etkili veya yetersiz olabileceğini göstermiştir (Zancan vd., 2016). Zancan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmanın sonuçlarına göre, tek başına Ca(OH)_2 'nin bakterileri yok etmede yetersiz kaldığı tespit edilmiştir (Zancan vd., 2019).

Yürütülen çalışmalar neticesinde, Ca(OH)_2 'nin yüksek pH'ının oluşturduğu alkali ortamın tek başına bakterileri yok etmekte yetersiz kaldığı gözlemlenmektedir. Bunun nedeni ise, bakterilerin, yapısal olarak sitoplazmik aktiviteleri sonucunda oluşan alkali ortama kolaylıkla uyum sağlayabilmeleridir. Peters ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmanın sonucuna göre Ca(OH)_2 ile pansuman sonrası kök kanal sisteminde Gram pozitif bakterilerin tamamen yok olmadığını ancak sayısının azaldığı ortaya konmuştur (Peters & Wesselink, 2002). Ayrıca literatürde bildirilmiş veriler, Ca(OH)_2 'nin kök kanal sisteminden bakterileri tamamen uzaklaştırmada başarısız olduğunu göstermiştir (Sathorn vd., 2007). Başka bir çalışmada Cook ve arkadaşları, kök kanal dolumu öncesi Ca(OH)_2 uygulanan ve uygulanmayan kök kanallarının kalitesini araştırmışlardır. Bunun yanı sıra aynı çalışma içerisinde, bakteriyel enfeksiyonlarında %2 CHX'in dentin tübüllerindeki antimikrobiyal etkinliğini karşılaştırmışlardır. Veriler, %2'lik CHX kullanımının ardından yapılan kök kanal dolguları, Ca(OH)_2 ile yapılan medikasyonu takiben veya direkt yapılan kök kanal dolguları ile karşılaştırıldığında %2'lik CHX'in *E. faecalis* bakteri kolonilerini dezenfekte etmede daha etkili olduğunu göstermiştir (Cook vd., 2007).

Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, bakterilerin başarılı bir şekilde ortadan kaldırılması için, Ca(OH)_2 'yi 10 dakika boyunca uygulamak yerine, yedi günlük Ca(OH)_2 uygulamasının gerekli minimum inkübasyon süresi olduğu bildirilmiştir (Farhad & Mohammadi, 2005)(Sjögren vd., 1997). Benzer şekilde Basrani ve arkadaşlarının çalışması sonucunda da dentinde etkili bir antimikrobiyal etki sağlanabilmesi için optimal yedi günlük süre gerektiğini bildirmişlerdir (Basrani vd., 2002). Geçmiş yıllarda kök ucu açık dişlerin apeksifikasyon tedavisinde, kök ucunun kapanması için uygulanan uzun süreli Ca(OH)_2 gereksinimi günümüzde kullanılan MTA (mineral trioksit aggregate) gibi biyouyumlu materyaller ile daha kısa süreli olsa da Ca(OH)_2 hala tercih edilen bir materyaldir (Lee Y., 2013). Bununla birlikte, Ca(OH)_2 'nin kök kanallarında uzun süre bırakılması, dentinin fiziksel özelliği üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabileceği ve ilgili dişte kök kırıklarına sebep olabileceği öne sürülmüştür. Birçok *in vitro* çalışmada Ca(OH)_2 'nin kök

kanallarında 5 hafta ve üzeri bırakılması durumunda ilgili dişin köklerinde, kırılma direncinde azalma meydana geldiği bildirilmiştir (Andreasen vd., 2002; Zarei vd., 2013). Çalışmamızda $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 'ye uçucu yağ ilavesi sonucu 24, 48 ve 72.'inci saatlerde bile anlamlı antibakteriyel veriler elde edilmiştir. Bu veriler ışığında $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 'nin kök kanallarında daha kısa sürede bırakılabileceği ve bu sürenin ilgili dişteki kırılma direncinde azalmaya sebep olmayacağı düşünülmektedir. Fakat bu düşüncenin daha fazla çalışma ile desteklenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

C. albicans'ın varlığı primer kök kanal enfeksiyonlarında tespit edilmiştir ancak başarısız endodontik tedavilerde diğer mikroorganizmalara göre daha sık görülmektedir. İkincil endodontik tedavi başarısızlıklarında görülmeleri %1 ile %17 arasında değişmektedir (Baumgartner vd., 2000; Slack G., 1953). Bu durum, *C. albicans*'ın geniş bir pH aralığında yaşayabilmesinin bir sonucu olabilir ve bu da *C. albicans*'ın yüksek pH değerlerinde $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 'ye karşı direncini açıklamaktadır. Ayrıca $\text{Ca}(\text{OH})_2$, *C. albicans* büyümesini artıran Ca^{+2} iyonlarının konsantrasyonunu daha da artırarak, antifungal etkinliğinin sınırlı veya tamamen yokluğunu göstermektedir (Mohammadi vd., 2012). Bu çalışmalar rutin endodontik tedavilerde intrakanal dezenfeksiyonu sağlayan yeni alternatif materyallerin gerektiğinin önemini vurgulamaktadır.

Doğal ürünler geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak kullanımları modern diş hekimliği ve tıp alanlarında da oldukça popülerleşmeye başlamıştır. Tıbbi özelliklere sahip bitkiler, çeşitli hastalıkların tedavisi için faydalı ve etkili kaynaklardır. Kök kanalının kemomekanik olarak hazırlanması, mevcut patojenlerin sayısını azaltsa da kök kanal sisteminin dezenfeksiyonunu en üst düzeye çıkarmak için antibakteriyel etkiye sahip güçlü bir kanal içi medikaman kullanımı gereklidir (Gomes vd., 2003). Doğal ürünler olarak kabul edilen uçucu yağlara ilgi ve uçucu yağların etkinlikleri gün geçtikçe dünya çapında artış göstermektedir (Sharma vd., 2018; Silva vd., 2019; Van der Waal vd., 2016). Doğal ürünler, bazı sentetik bileşiklerden daha iyi tolere edildikleri için önemli bir ilaç kaynağı olmaya devam etmektedir. Doğal antimikrobiyal ajanlar, mikroorganizmaların farklı türlerinin kontrolünde de önemli bir rol oynamaktadır (Dias vd., 2012). Günümüz diş hekimliğinde doğal ürünlerin (Philip vd., 2019), antimikrobiyal ve antifungal etkinlik göstererek diş çürüklerini önleme potansiyeline sahip olduğu, halitozisi önlediği, osteojenik aktivite göstererek osteoblastik aktiviteyi artırırken osteoklastik aktiviteyi azalttığı ve oral squamoz hücreli karsinomlarda antitümör ajanlar ile doğal ürünlerin

karşılaştırılması sonucu doğal ürünlerin apoptozu indükleyici etkilerinin olduğu literatürde bildirilmiştir (Sakagami & Tomomura, 2018). Doğal ürünlerin sahip olduğu bu avantajlardan dolayı yapılan bu çalışmada, *O. dubium* veya *M. spicata* uçucu yağlarının endodontik tedavi sırasında kanal içi medikaman olarak kullanılma potansiyelini araştırmak amaçlanmıştır. Bunun nedeni ise, yukarıda da belirtildiği gibi güncel klinik tedavilerinde kullanılan Ca(OH)_2 gibi tek başına kullanılan materyallerin kök kanallarının dezenfeksiyonunda yetersiz olduğu rapor edilmiştir. *O. dubium* ve *M. spicata*'nın uçucu yağlarının kimyasal bileşenlerinin, tek başına veya Ca(OH)_2 ile kombine bir şekilde kullanıldığı zaman sağladığı antibakteriyel ve antifungal etkilerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamak için bu çalışma tasarlanmıştır. Yürütülen çalışmada *O. dubium* uçucu yağının ana bileşeni %75,8 oranında karvakrol, *M. spicata* uçucu yağının ana bileşeni ise %71,3 oranında karvon olarak GC ve GC-MS analizleri ile belirlenmiştir. Uçucu yağlarda majör bileşenlerin belirlenmesi konusunda GC-MS analizleri önemli bir rol oynamakta ve bu analizlerin uçucu yağlardaki majör bileşenleri belirleme kullanıldığına dair literatürde birçok araştırma mevcuttur (Abbaszadegan, Dadolahi, vd., 2016; Abbaszadegan, Sahebi, vd., 2016a; Karadağlıoğlu vd., 2019; Vasiljević vd., 2019).

Çalışmamıza benzer bir şekilde Sousa ve ark. çalışmalarında *Punica granatum* bitkisinden elde edilen uçucu yağı Ca(OH)_2 ile birlikte ve tek başına medikaman olarak kullanmışlardır. Yine bu çalışmaya benzer şekilde yaptıkları çalışmada en dirençli iki patojen olan *E. faecalis* ve *C. albicans*'ı kullanılmıştır. Bu bitkiden elde edilen uçucu yağ ile Ca(OH)_2 kombinasyonunun antimikrobiyal aktiviteyi önemli ölçüde artırdığı ayrıca gelecekte potansiyel bir kanal içi medikaman olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan *Punica granatum* bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi bitkinin yapraklarından elde edilen hidroalkolik özüte dayanmaktadır (Sousa vd., 2022).

Karvakrol, *Origanum* yağlarının ana bileşeni olarak bilinmektedir ancak elde edilme oranı, türlere ve toplandığı coğrafi bölgeye göre değişmektedir (Can Baser, 2008b). Karadağlıoğlu ve arkadaşlarının Kıbrıs'ın Yeşilirmak bölgesinden topladıkları kekiklerden GC-MS analizleri ile elde ettikleri uçucu yağlardan %88,3 oranında karvakrol elde etmişlerdir (Karadağlıoğlu vd., 2019). Bizim çalışmamızda yakın bir coğrafi bölgeden toplanan kekiklerden %75,8 oranında karvakrol elde edilmiştir. Bitki içeriğinde bulunan farklılıklar bitkinin doğadan toplanma zamanına ve toplandığı dönemde bitkinin yağ verimine dayandırılabilir. Karvakrol,

ATPaz aktivitesini engelleyerek bakteri hücre zarlarının seçici geçirgenliğini artırmaktadır. Bu durumdan dolayı geniş bir antibakteriyel potansiyele sahiptir. Karvakrolün *E. faecalis* üzerine etkisi Nosrat ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada bildirilmiştir (Nosrat vd., 2009). Karvakrol sadece bakteri hücre duvarlarını bozmakla kalmaz, aynı zamanda periapikal dokuların onarımına da yardımcı olur. Bu aktivite, hormesis olarak bilinen bir fenomende pulpa liflerini uyaran bir fenolik bileşenin varlığının bir sonucudur (Vincenzi vd., 2004; Seghatoleslami vd., 2009). Karvakrol'ün diş çürükleri, oral kandidiyazis, periodontitis ve peri-implantitis gibi çeşitli yaygın ağız hastalıklarının, patojenleri ve bakteriyel biyofilmleri üzerinde önemli antimikrobiyal etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Aynı zamanda karvakrol yüksek konsantrasyonlarında bile, düşük sitotoksiteye sahip olduğu bildirilmiştir. Ek olarak, karvakrolün osteoklastik aktiviteyi azalttığı da bildirilmiştir (Zihan vd., 2022).

Bu çalışmada, distile su, gliserin ya da her ikisini içeren Ca(OH)_2 grupları, *C. albicans* ya da *E. faecalis* suşlarında, tüm zaman aralıklarında *O. dubium* içeren uçucu yağ gruplarıyla karşılaştırıldığında önemli antimikrobiyal etkilere sahip olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 10). Tek başına Ca(OH)_2 , *E. faecalis*'e karşı sınırlı bir etki göstermiştir (Mustafa vd., 2012). Silva ve arkadaşları, steril distile su içinde %49,7 g oranında seyreltilmiş Ca(OH)_2 'nin seyreltme sonrası elde edilen konsantrasyonların hiçbirinde *E. faecalis*'e karşı etkili olmadığını bildirmişlerdir (Silva vd., 2019). Walton ve arkadaşlarına göre, Ca(OH)_2 'nin OH^- ve Ca^{+2} iyonlarına ayrılmasında taşıyıcının son derece önemli bir rolü olduğunu bildirilmiştir (Walton vd., 1995). Safavi ve Nakayama'ya göre bu taşıyıcılardan olan gliserin ve PG'nin kalsiyum hidroksit'in antimikrobiyal etkinliğini inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir (Safavi & Nakayama, 2000). Bunun tam aksine başka bir çalışmada, Ca(OH)_2 – Gliserin - CMCP patının patojenleri çok kısa sürede elimine ettiğini ve Ca(OH)_2 'nin antimikrobiyal aktivitesini artırdığını bildirmişlerdir (José F. Siqueira & Uzeda, 1998). Sjögren ve arkadaşları, Ca(OH)_2 'nin kök kanalının kemomekanik preparasyonunun arttırdığı artı kalan rezidüel artıklar ve patojenlerin eliminasyonu için, 7 günlük bir kanal içi medikasyonun güvenilir sonuçlar için etkili olabileceğini ortaya koymaktadırlar (Sjögren vd., 1991).

Yürütülen bu çalışmada, Ca(OH)_2 'nin *E. faecalis* ve *C. albicans* üzerine antimikrobiyal aktivitesi, hem 24 saat hem de 48 saat ölçümlerinde (inkübasyonlar;

Şekil 10) diğer tüm çalışma gruplarıyla karşılaştırıldığında, *O. dubium* uçucu yağının eklenmesiyle antimikrobiyal etki önemli ölçüde artış göstermiştir ($p < 0.001$). Veriler ayrıca GC-MS analizinde *O. dubium*'un ana bileşiminin %75,8 karvakrol içerdiğini göstermektedir (Tablo 2). Bu durum, Ca(OH)_2 ve *O. dubium* uçucu yağ çalışma grubunun olası artan antimikrobiyal etkisini açıklamaktadır. Benzer bir çalışmada, Nostrat ve arkadaşları, %0,6 oranında karvakrolün irrigasyon solüsyonu olarak *E. faecalis* üzerinde antimikrobiyal etkisini göstermiş ve kök kanallarını karvakrol ile dezenfekte etmenin mümkün olabileceğini bildirmişlerdir (Nosrat vd., 2009).

Araştırmamızdaki veriler ayrıca, *O. dubium* grupları ve sadece *O. dubium* içeren gruplar arasında inhibisyon bölgesi ölçümlerinde önemli bir fark olmadığını ortaya koymuştur. Bu durum, karvakrolün ana bileşeni olduğu göz önüne alındığında, *O. dubium*'un göstermiş olduğu üstün antibakteriyel etkiyi açıklamaktadır.

Diğer bir yandan Janani ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmada, Ca(OH)_2 ile kekikten elde edilen uçucu yağın fibroblast hücreleri üzerinde gösterdiği toksik etkilerini incelemişler ve araştırmadan elde ettikleri verilere göre kekikten elde edilen uçucu yağın Ca(OH)_2 'e göre daha az toksik olduğunu bildirmişlerdir (Janani vd., 2021). Çalışmamızda Ca(OH)_2 'e kekikten elde edilen *O. dubium* uçucu yağ ilavesi ile elde edilen Ca(OH)_2 patının, tek başına Ca(OH)_2 'e göre daha az toksik özellik göstereceği düşünülmektedir. *O. dubium* uçucu yağ ilavesi ile elde edilen Ca(OH)_2 'in endodontide medikaman olarak kullanımını daha avantajlı hale getirmek için sitotoksik etkisi ile ilgili yapılacak daha fazla çalışmalara da ayrıca ihtiyaç duyulmaktadır. Aynı zamanda karvakrol'ün potasyum (K^+) kanalları üzerindeki etkisi sayesinde ağrı azaltmada son derece etkili olduğu bildirilmiştir (Baser, 2008). Çalışmamızda hazırladığımız *O. dubium* ilave edilmiş Ca(OH)_2 karışımlarının endodontik hastalıklardan kaynaklı gelişen ağrı üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu görüşün desteklenmesi için ise *in vivo* çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde özellikle oldukça popüler olan ve hızla gelişim gösteren rejeneratif endodonti alanında, kök hücreler üzerinde sitotoksik etki yaratmayan kanal içi medikamana ihtiyaç duyulmaktadır. Üçlü antibiyotik patı dışında kullanılan kanal içi medikamalar, özellikle tek başına kullanılan Ca(OH)_2 medikamanının dental pulpa kök hücreleri üzerinde ciddi bir sitotoksik etkiye sahip olduğu ve pulpa dokusunun rejenerasyon sürecini olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir. Üçlü antibiyotik kullanımının ise dişlerde renklenmeye neden olma ve gelecekte antibiyotik direnci oluşumu indüklemeye gibi olumsuz etki yaratma

potansiyeli vardır (Galler vd., 2022). Uçucu yağlar ile kombine bir şekilde kullanılan Ca(OH)_2 sitotoksik etki olasılığının düşük olması ihtimali nedeniyle gelecekteki rejeneratif endodontik prosedürleri için umut verici bir kanal içi medikaman olabilir. Bu nedenle bu görüşün daha fazla çalışmalar ile desteklenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Endodonti alanında dezenfeksiyon amaçlı araştırılacak malzemeler için kullanılacak olan patojen mikroorganizmalar, ilk etapta besiyerine ekilmekte ve ardından koloni sayımı yapılmaktadır. Bu yöntem bu amaç için yaygın olarak kullanılmaktadır (Gerek vd., 2014; Pedullà vd., 2012). Bu yöntem “kültür” adı verilmekte, kök kanal medikamentleri ve irrigasyon solüsyonlarının etkinliklerini değerlendirilmesi ve mikroorganizma tesbitinde kullanılmaktadır (Sakaguchi vd., 2010). Enterokoklar, %5’lik kan içeren agarlarda üreyebiliyor olsalar da, bu tür mikroorganizmalar genel olarak beyin-kalp infüzyon, müeller hinton agar ve todd-hewitt broth’lar kullanılarak çoğaltılmaktadırlar (Atom vd., 2021; Nayyar vd., 2021b). Mantarlar bakterilere göre kıyasla pH’ı yüksek asidik ortamlarda da hayatta kalabilmektedirler. Saboraud agar gibi üremelerinde seçici ortamlar kullanılıyor olsa da literatürde hem *E. faecalis* gibi enterokoklar hem de *C. albicans* gibi mantarlar ile mueller hinton ağarlar üzerinde kolaylıkla çalışılabileceği bildirilmiştir (Viswanath vd., 2021).

Çalışmamız için hazırlanan patların antimikrobiyal ve antifungal etkinliklerini değerlendirmek amacı ile “Disk Difüzyon” yöntemi kullanılmıştır. Disk difüzyon yöntemi standart, anlaşılması kolay, maliyeti düşük ve genel olarak endodonti alanında medikaman ve irrigasyon solüsyonlarının etkinlikleri hakkında araştırmacılara veri sağlayan bir yöntemdir. Fakat materyallerin pH’ı, toksisitesi, duyarlılığı gibi faktörler kullanılan materyallerin antimikrobiyal test verilerinde sapmalar meydana getirebilmektedir. Bu yöntemde inhibisyon zonunun boyutu test edilen materyalin çözünübilirlik ve yayılabilirlik kabiliyetine bağlıdır. Bu nedenle test edilecek olan materyalin en etkili konsantrasyonunu belirlemek oldukça zaman alıcı ve zor bir işlemdir (Estrela C. vd., 2001; Punathil vd., 2020).

E. faecalis’in 48 saatlik disk difüzyonunun, farklı gruplar ve zaman aralıklarından bağımsız olarak önemli ölçüde daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 1B). Benzer bir şekilde, sadece karvakrol içeren bir test grubunun 48 saatlik başarı oranı, Adel ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada %87 olarak saptanmıştır (Adel

vd., 2014). Adel ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada, karvakrolün tek başına etkili olduğu bulunmuş ve bakteri eliminasyonunda karvakrol ile Ca(OH)_2 arasında anlamlı bir fark bulunamadığından karvakrol Ca(OH)_2 'ye alternatif olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Adel vd., 2016). Bu çalışmada tüm gruplarda görüldüğü gibi (Şekil 10) *O. dubium* içeren Ca(OH)_2 gruplarının *E. faecalis* üzerindeki etkinliğini önemli ölçüde artırmaktadır.

Önceki çalışmalar, karvakrolün, *C. albicans*'ın farklı morfolojik formlarının büyümesini engelleyebileceğini göstermiştir (Inouye vd., 2009; Lima vd., 2013; Raut vd., 2013). *O. dubium* içeren gruplar, *O. dubium* içermeyen gruplarla karşılaştırıldığında daha geniş bir inhibisyon bölgesi ile *C. albicans* üzerinde iyi bir antimikrobiyal aktivite aralığı sergilediğinden, bu sonuç aynı zamanda çalışmamızın bulgularıyla da doğru orantılıdır. 72 saatlik inkübasyondan sonra alınan inhibisyon ölçümleri, *O. dubium* ilavesinin Ca(OH)_2 'nin *C. albicans*'a karşı etkisini daha da arttırdığını ortaya koydu. Cacho ve arkadaşlarının çalışmasında, karvakrolün *C. albicans* enfeksiyonlarına karşı doğal bir bileşik olarak olağanüstü bir potansiyel sergilediğini bildirdikleri için çalışmamızın sonuçlarıyla örtüşmektedir (Cacho Teixeira vd., 2020). Yürütülen bu çalışmaya bakacak olursak, elde edilen veriler ayrıca Ca(OH)_2 , gliserin, distile su ve sadece *O. dubium* içeren grubun antimikrobiyal aktivitesinin (1) Ca(OH)_2 , gliserin ve *O. dubium* (2) Ca(OH)_2 , distile su ve *O. dubium* içeren gruplardan önemli ölçüde daha düşük olduğunu ortaya koyduğu söylenebilmektedir. Bu durum, farklı gruplara ait her diske uygulanan miktar eşit olduğundan, kombinasyondaki *O. dubium*'un dilüsyonunun bir sonucu olabilir.

Yang ve arkadaşları tarafından, farklı teknikler ile kök kanallarından Ca(OH)_2 'i uzaklaştırmayı amaçlayan bir araştırma neticesinde elde ettikleri verilere göre hiçbir teknik ile Ca(OH)_2 'in kök kanallarından %100 uzaklaşmadığını bildirmişlerdir (Yang vd., 2021). Uçucu yağların kök kanallarından uzaklaştırılmasına dair literatürde henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Kök kanallarından uzaklaştırılması bakımından Ca(OH)_2 'e ilave edilmiş uçucu yağlar ile hazırlanan patların, tek başına Ca(OH)_2 ile benzer veya yakın özellik sergileyebileceği düşünülmektedir.

Moro ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmanın sonuçlarına göre, çözücü kontrolü için kullandıkları Tween 80'li veya Tween 80'siz *C. albicans* ve *Candida* türevi patojenlere karşı karvon'un önemli bir antifungal ajan olduğu bildirilmiştir (Jacob Moro vd., 2017). Çalışmamıza Tween 80, etanol, metanol, begzan, etil asetat ve

aseton gibi çözücüler organik dokular üzerindeki toksik etkileri nedeniyle dahil edilmemişlerdir (Ju vd., 2020; Rao vd., 2010; Weerakkody vd., 2011). Çalışmamızda bu toksik etkileri göz önünde bulundurarak $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ile uçucu yağlardan elde edilen karışımlara çözücü ilave edilmemiştir.

Çalışmamızda %71.3 karvon ve $\text{Ca}(\text{OH})_2$ içeren *M. spicata* uçucu yağının karıştırılması sonucunda antifungal aktivitede artış tespit edilmiştir. Ayrıca McGeady ve arkadaşları, karvon'un *C. albicans* üzerinde antifungal bir etki yaptığını ve *C. albicans*'ın patolojik formuna dönüşmesini engellediğini bildirmişlerdir (McGeady vd., 2002). Piras ve arkadaşları ise, *M. spicata*'nın ana bileşeninin toplandığı coğrafi bölgeye bağlı olarak çalışmamızda %71,3 oranında bulunan karvon'un %62.9 olduğunu bildirmişlerdir (Piras vd., 2021). Bazı araştırmalar, karvon'un *E. faecalis* dışında bir takım patojene karşı etkili olduğunu bildirmiştir (Rath & Padhy, 2014; Soković vd., 2009). Bu çalışmalardan elde edilen veriler ise bizim çalışmamızın sonuçları ile örtüşmektedir.

Yürütülen bu çalışmada, *M. spicata* ve $\text{Ca}(\text{OH})_2$ kombinasyonunun 24 saat süreyle inkübasyonu, tek başına *M. spicata* kullanımına kıyasla *C. albicans* üzerindeki antifungal etkide önemli bir fark göstermemiştir. Bununla birlikte, diğer tüm çalışma gruplarıyla karşılaştırıldığında, her iki grup da önemli ölçüde daha büyük bir inhibisyon bölgesi oluşturmuştur. Uçucu yağ, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, distile su ve gliserin içeren çalışma grupları, etkili antimikrobiyal ajanların konsantrasyonunun seyreltilmesine atfedilebilecek daha düşük bir antifungal etki göstermiştir. 72 saatlik inkübasyon verileri, *M. spicata* ve $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 'nin *C. albicans*'a karşı sinerjetik antifungal aktivite sergilediğini gözlemlenmiştir. Bu durum, uçucu yağ bileşiminde bulunan ve bu özel ortamda OH^- iyonlarının daha hızlı salınmasına neden olabilecek kimyasallardan kaynaklanabilmektedir.

Çalışmamızda $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 'nin distile su, gliserin ve her iki taşıyıcının kombinasyonun kullanımı ile *E. faecalis* ve *C. albicans* üzerine etkileri sınırlı bulunmuştur. Literatürde çalışmamızın sonuçlarını destekleyen araştırmalar mevcut olsa da (Carbajal M., 2014; Delgado vd., 2013), Mozayeni ve arkadaşları, elde edilen bulguların aksine $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 'nin özellikle *C. albicans* üzerine etkili olduğunu ve etkisinin %2'lik CHX jel ile aynı düzeyde olduğunu bildirmişleridir (Mozayeni vd., 2015). Ancak, yakın bir tarihte Thienngern ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışma neticesi Mozayeni ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmaya zıt sonuçlar vermiş, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 'nin *C. albicans* üzerinde bir etkisinin olmadığını bu sebepten

günümüzde *C. albicans*'a karşı yeni alternatif intrakanal medikamanların araştırılıp geliştirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir (Thienngern vd., 2022).

Bölüm VI

Sonuç ve Öneriler

Çalışmanın sonuçlarına göre *M. spicata* uçucu yağında bulunan ana bileşik %71.3 ile karvon, *O. dubium* uçucu yağında bulunan ana bileşik ise %75.8 ile karvakrol olmuştur. *M. spicata* uçucu yağının *E. faecalis*'e karşı etkisiz olduğu bulunurken, Ca(OH)_2 ile kombine edildiğinde 72 saatte *C. albicans* üzerinde üstün bir etki göstermiştir. *O. dubium* uçucu yağ aktivitesinin etkisi, hücre içi ATP seviyesini azaltarak ve hücre zarının proton geçirgenliğini artırarak bakteriyel zar hasarını indükleyen ve bakteri hücrelerinde zar hasarının bir göstergesi olan K^+ 'nın dışarı sızmasına neden olan muazzam miktarda karvakrol içermesine dayanabilir (Baser, 2008). *M. spicata* uçucu yağ aktivitesinin etkisi, bakteri hücrelerine nüfuz etme, hücre zarı geçirgenliğini ve dolayısıyla bütünlüğünü bozma kapasitesine sahip olan karvon'un zengin içeriğine bağlanabilir (Bouyahya vd., 2021). *O. dubium* uçucu yağ ile ilgili olarak, hem *E. faecalis* hem de *C. albicans*'a karşı çok etkili antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulundu. Toplamda, veriler bu uçucu yağların Ca(OH)_2 ile kanal içi ilaçlar olarak kullanımının iyi antimikrobiyal etkiler gösterdiğini ve gelecekte rutin klinik endodontik tedavilerde kullanım için umut verici adaylar olabileceğini ortaya koymaktadır.

Kaynakça

- Abbaszadegan, A., Dadolahi, S., Gholami, A., Moein, M. R., Hamedani, S., Ghasemi, Y. & Abbott, P. V. (2016). Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Cinnamomum zeylanicum, Calcium Hydroxide, and Triple Antibiotic Paste as Root Canal Dressing Materials. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 17(2), 105–113. <https://doi.org/10.5005/JP-JOURNALS-10024-1811>
- Abbaszadegan, A., Sahebi, S., Gholami, A., Delroba, A., Kiani, A., Iraj, A. & Abbott, P. V. (2016a). Time-dependent antibacterial effects of Aloe vera and Zataria multiflora plant essential oils compared to calcium hydroxide in teeth infected with Enterococcus faecalis. <https://doi.org/10.1111/jicd.12123>
- Adel, M., Pourrousta, P., Sharifi, M., Javadi, A., Falah-Abed, P. & Rahmani, N. (2016). Antimicrobial Effect of Carvacrol and Calcium Hydroxide against Enterococcus Faecalis in Different Layers of Dentin and Different Time Intervals.
- Adel, Mamak, Abedi, F., Mohammadi, N. & Aligholi, M. (2014). Evaluation of Inhibitory Effect of Dentin on the Antimicrobial Effect of Carvacrol and Sodium Hypochlorite on Euterococcus Faecalis: An In Vitro Study. http://jmds.mums.ac.ir/article_2846.html
- Agrawal, V. (2011). Calcium hydroxide: A miracle munition. *Indian J Dent Res Rev*, 1, 16-8.
- Alghamdi, F. & Shakir, M. (2020). The Influence of Enterococcus faecalis as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. *Cureus*, 12(3). <https://doi.org/10.7759/CUREUS.7257>
- Almas, K. (2002). The effect of Salvadora persica extract (miswak) and chlorhexidine gluconate on human dentin: a SEM study. *J Contemp Dent Pract*, 3(3), 27-35.
- Al-Otaibi, M., Al-Harthy, M., Gustafsson, A., Johansson, A., Claesson, R. & Angmar-Månsson, B. (2004). Subgingival plaque microbiota in Saudi Arabians after use of miswak chewing stick and toothbrush. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(12), 1048–1053. <https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.2004.00618.X>
- Alshanta, O. A., Albashaireh, K., McKloud, E., Delaney, C., Kean, R., McLean, W. & Ramage, G. (2022). Candida albicans and Enterococcus faecalis biofilm frenemies: When the relationship sours. *Biofilm*, 4. <https://doi.org/10.1016/J.BIOFLM.2022.100072>
- Anderson, A. C., Al-Ahmad, A., Elamin, F., Jonas, D., Mirghani, Y., Schilhabel, M., Karygianni, L., Hellwig, E. & Rehman, A. (2013). Comparison of the Bacterial Composition and Structure in Symptomatic and Asymptomatic Endodontic Infections Associated with Root-Filled Teeth Using Pyrosequencing. *PLOS ONE*, 8(12), e84960. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0084960>

- Ando, N. & Hoshino, E. (1990). Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentine. *International Endodontic Journal*, 23(1), 20–27. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.1990.TB00798.X>
- Andreasen, J. O., Farik, B. & Munksgaard, E. C. (2002). Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dental Traumatology*, 18(3), 134–137. <https://doi.org/10.1034/J.1600-9657.2002.00097.X>
- Arendorf, T. M. & Walker, D. M. (1980). The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Archives of Oral Biology*, 25(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(80\)90147-8](https://doi.org/10.1016/0003-9969(80)90147-8)
- Ashman, R. B. & Papadimitriou, J. M. (1995). Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection. *Microbiological Reviews*, 59(4), 646–672. <https://doi.org/10.1128/MR.59.4.646-672.1995>
- Aslim, B. & Yucel, N. (2008). In vitro antimicrobial activity of essential oil from endemic *Origanum minutiflorum* on ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. *Food Chemistry*, 107(2), 602–606. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2007.08.048>
- Athanassiadis, B., Abbott, P. v. & Walsh, L. J. (2007). The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Australian Dental Journal*, 52(1 SUPPL.). <https://doi.org/10.1111/J.1834-7819.2007.TB00527.X>
- Atom, J., Devi, N., Lairenlakpam, R., Dafer Al Wadei, M., Hakami, A. & Binshaya, A. (2021). Antimicrobial Efficacy of Different Pulp-Capping Materials against *Enterococcus faecalis*: An In vitro Study. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 13(Suppl 1), S608–S611. https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS_586_20
- Auddy, B., Ferreira, M., Blasina, F., Lafon, L., Arredondo, F., Dajas, F. & Mukherjee, B. (2003). Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. *Journal of ethnopharmacology*, 84(2-3), 131-138.
- Aviello, G., Abenavoli, L., F. B.-N. N. & 2009, undefined. (2009). NPC Natural Product Communications 2009. *Agencia.Cnptia.Embrapa.Br*. http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/npc1_12_2009_000gdhqu1102wx5ok0rofsmq6i5abcv.pdf#page=181
- Aydın, M., Koyuncuoğlu, C. Z., Kılboz, M. M., & Akıcı, A. (2017). Diş Hekimliğinde Akılcı Antibiyotik Kullanımı. *Türkiye Klinikleri Journal of Dental Sciences*, 23(1). 10.5336/dentalsci.2015-47189
- Azcan, N., Kara, M., Asilbekova, D. T., Ozek, T. & Baser, K. H. C. (2000). Lipids and essential oil of *Origanum onites*. *Chemistry of Natural Compounds*, 36(2), 132–136. <https://doi.org/10.1007/BF02236414>

- Babu, K. G. D. & Kaul, V. K. (2005). Variation in essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) distilled by different distillation techniques. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(2), 222–231. <https://doi.org/10.1002/FFJ.1414>
- Ba-Hattab, R., Al-Jamie, M., Aldreib, H., Alessa, L., Alonazi, M., Ba-Hattab, R., Al-Jamie, M., Aldreib, H., Alessa, L. & Alonazi, M. (2016). Calcium Hydroxide in Endodontics: An Overview. *Open Journal of Stomatology*, 6(12), 274–289. <https://doi.org/10.4236/OJST.2016.612033>
- Bajer, T., Šilha, D., Ventura, K. & Bajerová, P. (2017). Composition and antimicrobial activity of the essential oil, distilled aromatic water and herbal infusion from *Epilobium parviflorum* Schreb. *Industrial Crops and Products*, 100, 95–105. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2017.02.016>
- Bajpai, V. K., Sharma, A. & Baek, K. H. (2013). Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control*, 32(2), 582–590. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2013.01.032>
- Baker, N. E., Liewehr, F. R., Buxton, T. B., & Joyce, A. P. (2004). Antibacterial efficacy of calcium hydroxide, iodine potassium iodide, betadine, and betadine scrub with and without surfactant against *E. faecalis* in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 98(3), 359–364.
- Ballal, V., Kundabala, M., Acharya, S. & Ballal, M. (2007). Antimicrobial action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combination on endodontic pathogens. *Australian Dental Journal*, 52(2), 118–121. <https://doi.org/10.1111/J.1834-7819.2007.TB00475.X>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71–79.
- Balouiri, Mounyr, Sadiki, M. & Ibnsouda, S. K. (2016a). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2015.11.005>
- Balouiri, Mounyr, Sadiki, M. & Ibnsouda, S. K. (2016b). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2015.11.005>
- Barbosa-Ribeiro, M., De-Jesus-Soares, A., Zaia, A. A., Ferraz, C. C. R., Almeida, J. F. A. & Gomes, B. P. F. A. (2016). Quantification of Lipoteichoic Acid Contents and Cultivable Bacteria at the Different Phases of the Endodontic Retreatment. *Journal of Endodontics*, 42(4), 552–556. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2016.01.002>
- Barrett, A. W., Kingsmill, V. J. & Speight, P. M. (1998). The frequency of fungal infection in biopsies of oral mucosal lesions. *Oral Diseases*, 4(1), 26–31. <https://doi.org/10.1111/J.1601-0825.1998.TB00251.X>
- Barthel, C. R., Levin, L. G., Reisner, H. M. & Trope, M. (1997). TNF- α release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS.

International Endodontic Journal, 30(3), 155–159.
<https://doi.org/10.1046/J.1365-2591.1997.00066.X>

Baser KHC. (2002). *The Turkish origanum species, In: Oregano, The Genera Origanum and Lippia* .

Basrani, B., Santos, J. M., Tjäderhane, L., Grad, H., Gorduysus, O., Huang, J., Lawrence, H. P. & Friedman, S. (2002). Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 94(2), 240–245.
<https://doi.org/10.1067/MOE.2002.124002>

Baumgartner, J. C., Watkins, B. J., Bae, K. S. & Xia, T. (1999). Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *Journal of Endodontics*, 25(6), 413–415. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(99\)80268-4](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(99)80268-4)

Baumgartner, J. C., Watts, C. M. & Xia, T. (2000). Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *Journal of Endodontics*, 26(12), 695–698.
<https://doi.org/10.1097/00004770-200012000-00003>

Bouyahya, A., Mechchate, H., Benali, T., Ghchime, R., Charfi, S., Balahbib, A., Burkov, P., Shariati, M. A., Lorenzo, J. M. & Omari, N. el. (2021). Health Benefits and Pharmacological Properties of Carvone. *Biomolecules* 2021, Vol. 11, Page 1803, 11(12), 1803. <https://doi.org/10.3390/BIOM11121803>

Briso, A. L. F., Rahal, V., Mestrenner, S. R. & Dezan, E. (2006). Biological response of pulps submitted to different capping materials. *Brazilian Oral Research*, 20(3), 219–225. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242006000300007>

Budavari S, O'Neill M, Smith A, Heckelman P & Kinneary L Eds. (1997). *The Merck Index* (12th ed.).

Bush, K., Courvalin, P., Dantas, G., Davies, J., Eisenstein, B., Huovinen, P., Jacoby, G. A., Kishony, R., Kreiswirth, B. N., Kutter, E., Lerner, S. A., Levy, S., Lewis, K., Lomovskaya, O., Miller, J. H., Mobashery, S., Piddock, L. J. V., Projan, S., Thomas, C. M., ... Zgurskaya, H. I. (2011). Tackling antibiotic resistance. *Nature Reviews. Microbiology*, 9(12), 894–896.
<https://doi.org/10.1038/NRMICRO2693>

C. M. Ferreira, O. P. Silva, R. Aparecido, T. Flaviana, B. Andrade & F. N. Bernardinelli. (2002). Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. *Braz. Dent. J.*, 13(2).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0103-64402002000200008>

Cacho Teixeira, M., Salgueiro, L., Ren, C., Zhang, C., Jia, C., Niu, C., Wang, C., Yang, Y., Chen, R., Zhang, J., Chen, H., Zhuge, Y., Li, J., Cheng, J., Xu, K. & Chu, M. (2020). Carvacrol Induces *Candida albicans* Apoptosis Associated With Ca²⁺/Calcineurin Pathway. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* | [www.Frontiersin.Org](http://www.frontiersin.org), 1, 192.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00192>

- Calderone, R. A. & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 9(7), 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02094-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02094-7)
- Calixto, J. B. (2003). Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e cultura*, 55(3), 37-39. ISSN 2317-6660
- Can Baser, K. H. (2008a). Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. *Current Pharmaceutical Design*, 14, 3106–3120.
- Can Baser, K. H. (2008b). Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. In *Current Pharmaceutical Design* (Vol. 14).
- Canillac, N. & Mourey, A. (2001). Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology*, 18(3), 261–268. <https://doi.org/10.1006/FMIC.2000.0397>
- Carbajal M., J. B. (2014). Antimicrobial effects of calcium hydroxide, chlorhexidine, and propolis on *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 5(3), 194–200. <https://doi.org/10.1111/JICD.12041>
- Carnelio, S., Khan, S. A. & Rodrigues, G. (2008). Definite, probable or dubious: antioxidants trilogy in clinical dentistry. *British Dental Journal* 2008 204:1, 204(1), 29–32. <https://doi.org/10.1038/bdj.2007.1186>
- Çelen, S. (2006). *Türkiye’de yayılış gösteren dört Thymus türünün uçucu yağ bileşimleri, antibakteriyel ve antifungal aktivite özelliklerinin belirlenmesi*. <http://dspace.balikesir.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12462/1656>
- Chamorro, E., Sequeira, A., Velasco, G., Zambón Silvia, & Morales, W. (2012). *Study of the chemical composition of essential oils by gas chromatography*. INTECH Open Access Publisher.
- Chávez De Paz, L. E., Molander, A. & Dahlén, G. (2004). Gram-positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment. *International Endodontic Journal*, 37(9), 579–587. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.2004.00845.X>
- Chong, B. S. & Ford, T. R. P. (1992). The role of intracanal medication in root canal treatment. *International Endodontic Journal*, 25(2), 97–106. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.1992.TB00743.X>
- Chu, F. C. S., Leung, W. K., Tsang, P. C. S., Chow, T. W. & Samaranayake, L. P. (2006). Identification of Cultivable Microorganisms from Root Canals with Apical Periodontitis Following Two-Visit Endodontic Treatment with Antibiotics/Steroid or Calcium Hydroxide Dressings. *Journal of Endodontics*, 32(1), 17–23. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2005.10.014>

- Cook, J., Nandakumar, R. & Fouad, A. F. (2007). Molecular- and culture-based comparison of the effects of antimicrobial agents on bacterial survival in infected dentinal tubules. *Journal of Endodontics*, 33(6), 690–692. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2007.01.022>
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R. & Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 170–175. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2000.00943.X>
- Cruz, M. R., Graham, C. E., Gagliano, B. C., Lorenz, M. C. & Garsin, D. A. (2013). *Enterococcus faecalis* inhibits hyphal morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 81(1), 189–200. <https://doi.org/10.1128/IAI.00914-12/ASSET/E3FA2626-2CC0-4AAE-9E9F-99596925BED1/ASSETS/GRAPHIC/ZII9990999500007.JPEG>
- Cui, H., Zhang, X., Zhou, H., Zhao, C. & Lin, L. (2015). Antimicrobial activity and mechanisms of *Salvia sclarea* essential oil. *Botanical Studies*, 56(1). <https://doi.org/10.1186/S40529-015-0096-4>
- Cvek, M., Granath, L. E. & Hollender, L. (1974). Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. 3. Variation of occurrence of ankylosis of reimplanted teeth with duration of extra-alveolar period and storage environment. *Odontologisk Revy*, 25(1), 43–56. <https://europepmc.org/article/med/4522422>
- Dahlén, G., Blomqvist, S., Almståhl, A. & Carlén, A. (2012). Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections. [Http://Dx.Doi.Org/10.3402/Jom.V4i0.10855](http://Dx.Doi.Org/10.3402/Jom.V4i0.10855), 4(2012). <https://doi.org/10.3402/JOM.V4I0.10855>
- Davis PH, Mill RR, Tan K. & Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 10 (Supplement), E. U. P. (1988). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 3. *Cabdirect.Org*, 3. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19710701439>
- de Melo Maltos, S. M., Ribeiro Sobrinho, A. P., Silva, F. V., Nicoli, J. R., Roque De Carvalho, M. A., Vieira, L. Q. & Farias, L. D. M. (2003). Bacterial Concentrations Determine the Ability to Implant in the Root Canal System and Translocate to Lymph Nodes in Germ-free Mice. *Journal of Endodontics*, 29(1), 24–27. <https://doi.org/10.1097/00004770-200301000-00007>
- de Vincenzi, M., Stamatii, A., de Vincenzi, A. & Silano, M. (2004). Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*, 75(7–8), 801–804. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2004.05.002>
- Delgado, R., Helena Gasparoto, T., Renata Sipert, C., Ramos Pinheiro, C., Gomes De Moraes, I., Brandão Garcia, R., Antônio Hungaro Duarte, M., Monteiro Bramante, C., Aparecido Torres, S., Pompermaier Garlet, G., Paula Campanelli, A. & Bernardineli, N. (2013). Antimicrobial activity of calcium hydroxide and

- chlorhexidine on intratubular *Candida albicans*. *International Journal of Oral Science*, 5(1), 32–36. <https://doi.org/10.1038/IJOS.2013.12>
- Deng, D. M., Hoogenkamp, M. A., Exterkate, R. A. M., Jiang, L. M., van der Sluis, L. W. M., ten Cate, J. M. & Crielaard, W. (2009). Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *Journal of Endodontics*, 35(9), 1249–1252. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2009.05.038>
- Dias, D. A., Urban, S. & Roessner, U. (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites* 2012, Vol. 2, Pages 303–336, 2(2), 303–336. <https://doi.org/10.3390/METABO2020303>
- Dirmenci, T. (2005). A new subspecies of *Nepeta* (Lamiaceae) from Turkey. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 147(2), 229–233. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8339.2005.00355.X>
- Distel, J. W., Hatton, J. F. & Gillespie, M. J. (2002). Biofilm Formation in Medicated Root Canals. *Journal of Endodontics*, 28(10), 689–693. <https://doi.org/10.1097/00004770-200210000-00003>
- Dongari-Bagtzoglou, A., Wen, K. & Lamster, I. B. (1999). *Candida albicans* triggers interleukin-6 and interleukin-8 responses by oral fibroblasts in vitro. *Oral Microbiology and Immunology*, 14(6), 364–370. <https://doi.org/10.1034/J.1399-302X.1999.140606.X>
- Donyavi, Z., Ghahari, P., Esmaeilzadeh, M., Kharazifard, M. & Yousefi-Mashouf, R. (2016). Antibacterial Efficacy of Calcium Hydroxide and Chlorhexidine Mixture for Treatment of Teeth with Primary Endodontic Lesions: A Randomized Clinical Trial. *Iranian Endodontic Journal*, 11(4), 255–260. <https://doi.org/10.22037/IEJ.2016.1>
- Dorman, H. J. D. & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–316. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2000.00969.X>
- Drucker, D. B., Gomes, B. P. F. A. & Lilley, J. D. (1997). Role of Anaerobic Species in Endodontic Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 25(Supplement_2), S220–S221. <https://doi.org/10.1086/516217>
- Dudeja, P., Dudeja, K., Srivastava, D. & Grover, S. (2015). Microorganisms in periradicular tissues: Do they exist? A perennial controversy. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*, 19(3), 356. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.174612>
- Dupont, B., Graybill, J. R., Armstrong, D., Laroche, R., Touzé, J. E. & Wheat, L. J. (1992). Fungal infections in AIDS patients. *Medical Mycology*, 30(S1), 19–28. <https://doi.org/10.1080/02681219280000731>
- Ehrnst, A. & Sundqvist, K. G. (1976). The Mechanisms of Appearance of Viral Glycoproteins at the Cell Surface Membrane. *Pathobiology*, 44(3–6), 198–225. <https://doi.org/10.1159/000163112>

- Ellison, S. J. (2011). An outcome audit of three day antimicrobial prescribing for the acute dentoalveolar abscess. *British Dental Journal* 2011 211:12, 211(12), 591–594. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2011.1051>
- Elmastaş, M., Dermirtas, I., Isildak, O. & Aboul-Enein, H. Y. (2007). *Antioxidant Activity of S-Carvone Isolated from Spearmint (Mentha Spicata L. Fam Lamiaceae)*. <https://doi.org/10.1080/10826070600674893>
- Esen, G. (2005). *Origanum vulgare subsp. hirtum ietswaart'un doğal ve kültür formlarından elde edilen uçucu yağlarının kimyasal bileşimleri ve antimikrobiyal aktivite özellikleri*. <http://dspace.balikesir.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12462/1503>
- ESO 2000 - *The Complete Database of Essential Oils*. Retrieved February 8, 2022, from <http://www.leffingwell.com/baciseso.htm>
- Estrela, C., Bammann, L. L., Pimenta, F. C. & Pécora, J. D. (2001). Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. *International Endodontic Journal*, 34(5), 341–345. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2591.2001.00368.X>
- Estrela, C., & Holland, R. (2003). Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. *Journal of Applied Oral Science*, 11, 269-282.
- Estrela, C. & Pesce, H. F. (1997). *Chemical analysis of the formation of calcium carbonate and its influence on calcium hydroxide pastes in the presence connective tissue of the dog. Part II*. <https://repositorio.bc.ufg.br/handle/ri/16489>
- Estrela, C., Pimenta, F. C., Ito, I. Y. & Bammann, L. L. (1999). Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. *Journal of Endodontics*, 25(6), 416–418. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(99\)80269-6](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(99)80269-6)
- Estrela, C., Silva, J. A., Alencar, A. H. G. D., Leles, C. R., & Decurcio, D. A. (2008). Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*: a systematic review. *Journal of Applied oral science*, 16, 364-368.
- EUCAST: *Clinical breakpoints and dosing of antibiotics*. (2022). https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- Evans, M., Davies, J. K., Sundqvist, G. & Figdor, D. (2002). Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*, 35(3), 221–228. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2591.2002.00504.X>
- Fabricius, L., Dahlén, G., Sundqvist, G., Happonen, R. P. & Möller, A. J. R. (2006). Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *European Journal of Oral Sciences*, 114(4), 278–285. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0722.2006.00380.X>
- Fabricius, L., Dahlen, G., Öhman, A. E. & Möller, A. J. R. (1982). Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of

- closure. *European Journal of Oral Sciences*, 90(2), 134–144.
<https://doi.org/10.1111/J.1600-0722.1982.TB01536.X>
- Fabricius, L., Dahlén, G., Holm, S. E. & Möller, A. J. R. (1982). Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *European Journal of Oral Sciences*, 90(3), 200–206. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0722.1982.TB00728.X>
- Falzon, C. C. & Balabanova, A. (2017). Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 44(2), 217–227.
<https://doi.org/10.1016/J.POP.2017.02.001>
- Farhad, A. & Mohammadi, Z. (2005). Calcium hydroxide: a review. *International Dental Journal*, 55(5), 293–301. <https://doi.org/10.1111/J.1875-595X.2005.TB00326.X>
- Fava, L. R. G. & Saunders, W. P. (1999b). Calcium hydroxide pastes: Classification and clinical indications. *International Endodontic Journal*, 32(4), 257–282.
<https://doi.org/10.1046/J.1365-2591.1999.00232.X>
- Ferro, B. E., van Ingen, J., Wattenberg, M., van Soolingen, D. & Mouton, J. W. (2015). Time–kill kinetics of antibiotics active against rapidly growing mycobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(3), 811–817.
<https://doi.org/10.1093/JAC/DKU431>
- Figueiredo, B. P., Gomes, A., Cezar, C., Ferraz, R., Vianna, M. E., Rosalen, P. L., Zaia, A. A., Teixeira, F. B., José De Souza-Filho, F. & Gomes, B. P. F. A. (2002). In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. *SciELO Brasil*, 13(3), 155–161.
<https://www.scielo.br/pdf/bdj/v13n3/v13n3a02.pdf>
- Fisher, K. & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology*, 155(6), 1749–1757.
<https://doi.org/10.1099/MIC.0.026385-0/CITE/REFWORKS>
- Foerster, S., Desilvestro, V., Hathaway, L. J., Althaus, C. L. & Unemo, M. (2017). A new rapid resazurin-based microdilution assay for antimicrobial susceptibility testing of Neisseria gonorrhoeae. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(7), 1961–1968. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKX113>
- Murad, C. F., Sassone, L. M., Souza, M. C., Fidel, R. A. S., Fidel, S. R., & Junior, R. H. (2012). Antimicrobial activity of sodium hypochlorite, chlorhexidine and MTAD® against Enterococcus faecalis biofilm on human dentin matrix in vitro. *RSBO Revista Sul-Brasileira de Odontologia*, 9(2), 143–150.
- Franzen, R., Gutknecht, N., Falken, S., Heussen, N. & Meister, J. (2011). Bactericidal effect of a Nd:YAG laser on Enterococcus faecalis at pulse durations of 15 and 25 ms in dentine depths of 500 and 1,000 µm. *Lasers in Medical Science*, 26(1), 95–101. <https://doi.org/10.1007/S10103-010-0826-5/TABLES/4>

- Gajic, I., Kabic, J., Kekic, D., Jovicevic, M., Milenkovic, M., Culafic, D. M., Trudic, A., Ranin, L. & Opavski, N. (2022). *Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods*.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics11040427>
- Galler, K. M., Akamp, T., Knüttel, H. & Widbiller, M. (2022). A critical analysis of clinical research methods to study regenerative endodontics. *International Endodontic Journal*, 55(S2), 456–470. <https://doi.org/10.1111/IEJ.13734>
- Gerek, M., Asci, S. & Yaylali, D. I. (2014). Ex Vivo Evaluation of Antibacterial Effects of Nd:YAG and Diode Lasers in Root Canals.
Http://Mc.Manuscriptcentral.Com/Tbeq, 24(3), 2031–2034.
<https://doi.org/10.2478/V10133-010-0033-3>
- Golus, J., Sawicki, R., Widelski, J. & Ginalska, G. (2016). The agar microdilution method - a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 121(5), 1291–1299.
<https://doi.org/10.1111/JAM.13253>
- Gomes, B. P. F. de A., Ferraz, C. C. R., Vianna, M. E., Rosalen, P. L., Zaia, A. A., Teixeira, F. B. & Souza-Filho, F. J. de. (2002). In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. *Brazilian Dental Journal*, 13(3), 155–161. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402002000300002>
- Gomes, B. P.F.A., Ferraz, C. C. R., Vianna, M. E., Berber, V. B., Teixeira, F. B. & Souza-Filho, F. J. (2001). In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*, 34(6), 424–428. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2591.2001.00410.X>
- Gomes, B. P.F.A., Lilley, J. D. & Drucker, D. B. (1996). Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *International Endodontic Journal*, 29(4), 235–241.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.1996.TB01375.X>
- Gomes, B. P.F.A., Pinheiro, E. T., Gadê-Neto, C. R., Sousa, E. L. R., Ferraz, C. C. R., Zaia, A. A., Teixeira, F. B. & Souza-Filho, F. J. (2004). Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiology and Immunology*, 19(2), 71–76. <https://doi.org/10.1046/J.0902-0055.2003.00116.X>
- Gomes, Brenda P.F.A., Pinheiro, E. T., Jacinto, R. C., Zaia, A. A., Ferraz, C. C. R. & Souza-Filho, F. J. (2008). Microbial Analysis of Canals of Root-filled Teeth with Periapical Lesions Using Polymerase Chain Reaction. *Journal of Endodontics*, 34(5), 537–540. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.01.016>
- Gomes, Brenda P.F.A., Souza, S. F. C., Ferraz, C. C. R., Teixeira, F. B., Zaia, A. A., Valdrighi, L. & Souza-Filho, F. J. (2003). Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *International Endodontic Journal*, 36(4), 267–275.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2003.00634.x>

- Gordon, T. M., Ranly, D. M. & Boyan, B. D. (1985). The effects of calcium hydroxide on bovine pulp tissue: variations in pH and calcium concentration. *Journal of Endodontics*, 11(4), 156–160. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(85\)80139-4](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(85)80139-4)
- Graham, C. E., Cruz, M. R., Garsin, D. A. & Lorenz, M. C. (2017). Enterococcus faecalis bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of Candida albicans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(17), 4507–4512. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1620432114>
- Grosso, F. C., de Cássia Bergamaschi, C., Cogo, K., Franz-Montan, M., Motta, R. H. L. & de Andrade, E. D. (2008). Use of phytotherapy in dentistry. *Phytotherapy Research*, 22(8), 993–998. <https://doi.org/10.1002/PTR.2471>
- Güner, A. (Adil), Özhatay, N., Ekim, T., Başer, K. H. C. (Kemal H. C. & Hedge, I. C. (Ian C. (2000). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Volume 11, Supplement 2*.
- Guzmán-Blanco, M., Casellas, J. M. & Silva Sader, H. (2000). Bacterial Resistance To Antimicrobial Agents In Latin America: The Giant Is Awakening. *Infectious Disease Clinics of North America*, 14(1), 67–81. [https://doi.org/10.1016/S0891-5520\(05\)70218-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5520(05)70218-X)
- Haapasalo, M. & Ørstavik, D. (1987). In vitro Infection and Disinfection of Dentinal Tubules. *Journal of Dental Research*, 66(8), 1375–1379. <https://doi.org/10.1177/00220345870660081801>
- Haapasalo, Markus, Endal, U., Zandi, H. & Coil, J. M. (2005). Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endodontic Topics*, 10(1), 77–102. <https://doi.org/10.1111/J.1601-1546.2005.00135.X>
- Haapasalo, Markus, Shen, Y., Qian, W. & Gao, Y. (2010). Irrigation in endodontics. *Dental Clinics of North America*, 54(2), 291–312. <https://doi.org/10.1016/J.CDEN.2009.12.001>
- Hagihara, Y., Kaminishi, H., Cho, T., Biology, M. T.-A. of O. & 1988, undefined. Degradation of human dentine collagen by an enzyme produced by the yeast Candida albicans. *Elsevier*. Retrieved May 21, 2022, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003996988901380>
- Håkansson, S., Gösta Sundqvist, K., Hakansson, S. & Gosta Sundqvist, K. (2010a). Binding of Proteins to Mouse Blastocysts after the Attachment Stage of Implantation. *Https://Mc.Manuscriptcentral.Com/Ujms*, 81(3), 139–144. <https://doi.org/10.3109/03009737609179037>
- Håkansson, S., Gösta Sundqvist, K., Hakansson, S. & Gosta Sundqvist, K. (2010b). Binding of Proteins to Mouse Blastocysts after the Attachment Stage of Implantation. *Https://Mc.Manuscriptcentral.Com/Ujms*, 81(3), 139–144. <https://doi.org/10.3109/03009737609179037>

- Hansen, M. G. (1998). Relative efficiency of solvents used in endodontics. *Journal of Endodontics*, 24(1), 38–40. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(98\)80211-2](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(98)80211-2)
- Hargreaves, K. M., Cohen, S. & Berman, L. H. (2011). *Cohen's pathways of the pulp*. Mosby Elsevier.
- Hartke, A., Lemarinier, S., Pichereau, V. & Auffray, Y. (2002). Survival of *Enterococcus faecalis* in Seawater Microcosms Is Limited in the Presence of Bacterivorous Zooflagellates. *Current Microbiology* 2002 44:5, 44(5), 329–335. <https://doi.org/10.1007/S00284-001-0018-4>
- Haynes, K. (2001). Virulence in *Candida* species. *Trends in microbiology*, 9(12), 591-596. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02237-5](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02237-5)
- Heatley, N. G. (1944). A method for the assay of penicillin. *The Biochemical Journal*, 38(1), 61–65. <https://doi.org/10.1042/BJ0380061>
- Hermann, C., Hermann, J., Munzel, U. & Rüchel, R. (1999). Bacterial flora accompanying *Candida* yeasts in clinical specimens. *Mycoses*, 42(11–12), 619–627. <https://doi.org/10.1046/J.1439-0507.1999.00519.X>
- Hodson, J. J. & Craig, G. T. (1972). The incidence of *Candida albicans* in the plaques of teeth of children. *The Dental Practitioner and Dental Record*, 22(8), 296–301. <https://europepmc.org/article/med/4560638>
- Hojjati, M., Prof, A. & Azhdarzadeh, F. (2016). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Leaf, Ripe and Unripe Peel of Bitter Orange (*Citrus aurantium*) Essential Oils. *Nutrition and Food Sciences Research*, 3(1), 43–50. <https://doi.org/10.18869/ACADPUB.NFSR.3.1.43>
- Huang, D. F., Xu, J. G., Liu, J. X., Zhang, H. & Hu, Q. P. (2014). Chemical constituents, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Cinnamomum cassia* bark against four food-related bacteria. *Microbiology* 2014 83:4, 83(4), 357–365. <https://doi.org/10.1134/S0026261714040067>
- Hyldgaard, M., Mygind, T. & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3(JAN). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2012.00012>
- Inouye, S., Takahashi, M. & Abe, S. (2009). Inhibitory activity of hydrosols, herbal teas and related essential oils against filament formation and the growth of *Candida albicans*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi = Japanese Journal of Medical Mycology*, 50(4), 243–252. <https://doi.org/10.3314/JJMM.50.243>
- Jacob Moro, I., Demmany Gualberto Alexandre Gondo, G., Gonçalves Pierri, E., Cristina Linharis Rodrigues Pietro, R., Pienna Soares, C., Pergentino de Sousa, D. & Gonzaga dos Santos, A. (2017). Evaluation of antimicrobial, cytotoxic and chemopreventive activities of carvone and its derivatives. *J. Pharm. Sci*, 53(4), 76. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902017000400076>

- Janani, K., Teja, K. & Ajitha, P. (2021). Cytotoxicity of oregano essential oil and calcium hydroxide on L929 fibroblast cell: A molecular level study. *Journal of Conservative Dentistry : JCD*, 24(5), 457–463. https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_560_20
- Jett, B. D., Huycke, M. M. & Gilmore, M. S. (1994). Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4), 462–478. <https://doi.org/10.1128/CMR.7.4.462>
- Jorgensen, J. H. & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(11), 1749–1755. <https://doi.org/10.1086/647952>
- Ju, J., Xie, Y., Yu, H., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H. & Yao, W. (2020). Synergistic interactions of plant essential oils with antimicrobial agents: a new antimicrobial therapy. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1846494>, 62(7), 1740–1751. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1846494>
- Kaim, J., Gultz, J., L., W. S.-T. J. (1998). An in vitro investigation of the antimicrobial activity of an herbal mouthrinse. *Europepmc.Org*. Retrieved May 25, 2022, from <https://europepmc.org/article/med/10518853>
- Kakehashi, S., Stanley, H. R. & Fitzgerald, R. J. (1965). The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 20(3), 340–349. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(65\)90166-0](https://doi.org/10.1016/0030-4220(65)90166-0)
- Kanatt, S. R., Chander, R. & Sharma, A. (2007). Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chemistry*, 100(2), 451–458. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.09.066>
- Kandemir, S., journal, N. E.-I. dental & 2000, undefined. (2000). Grievances in cases using antibiotics due to orodental problems and assessment of the need for antibiotics. *Wiley Online Library*, 50(2), 73–77. <https://doi.org/10.1002/j.1875-595X.2000.tb00802.x>
- Karabay, O. (2008). Increased antimicrobial consumption following reimbursement reform in Turkey. *Citeseer*. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn055>
- Karadağlıoğlu, Ö. İ., Ulusoy, N., Başer, K. H. C., Hanoğlu, A. & Şık, İ. (2019). Antibacterial Activities of Herbal Toothpastes Combined with Essential Oils against *Streptococcus mutans*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS8010020>
- Karobari, M. I., Adil, A. H., Assiry, A. A., Basheer, S. N., Noorani, T. Y., Pawar, A. M., Marya, A., Messina, P. & Scardina, G. A. (2022). Herbal Medications in Endodontics and Its Application—A Review of Literature. *Materials* 2022, Vol. 15, Page 3111, 15(9), 3111. <https://doi.org/10.3390/MA15093111>

- Kawashima, N., Wadachi, R., Suda, H., Yeng, T. & Parashos, P. (2009). Root canal medicaments*. *International Dental Journal*, 59(1), 5–11.
https://doi.org/10.1922/IDJ_2060KAWASHIMA07
- Kayaoglu, G. & Ørstavik, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 15(5), 308–320. <https://doi.org/10.1177/154411130401500506>
- Kekic, D., Gajic, I., Opavski, N., Kojic, M., Vukotic, G., Smitran, A., Boskovic, L., Stojkovic, M. & Ranin, L. (2021). Trends in molecular characteristics and antimicrobial resistance of group B streptococci: a multicenter study in Serbia, 2015-2020. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-79354-3>
- Kelsey, R. G. (1999). The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons By D. Joulain (Robertet S. A.) and W. A. König (University of Hamburg). E. B. Verlag, Hamburg. 1998. 661 pp. 21 × 29.5 cm. \$700.0. ISBN 3-930826-48-8. *Journal of Natural Products*, 62(8), 1212–1213.
<https://doi.org/10.1021/NP990755N>
- Baser. (2008). Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Ingentaconnect.Com*, 14, 3106–3120.
<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpd/2008/00000014/00000029/art00004>
- Khemaleelakul, S., Baumgartner, J. C. & Pruksakorn, S. (2002). Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 94(6), 746–755. <https://doi.org/10.1067/MOE.2002.129535>
- Kim, D. & Kim, E. (2014). Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: a literature review - Part I. In vitro studies. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 39(4), 241.
<https://doi.org/10.5395/RDE.2014.39.4.241>
- Kim, J., Marshall, M. R., & Wei, C. I. (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of agricultural and food chemistry*, 43(11), 2839-2845.
- Kokkini, S. & Vokou, A. D. (1989). *Mentha spicata* (Lamiaceae) Chemotypes Growing Wild in Greece 1. In *Economic Botany* (Vol. 43, Issue 2).
- Kontakiotis, E., Nakou, M. & Georgopoulou, M. (1995). In vitro study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *International Endodontic Journal*, 28(6), 285–289.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.1995.TB00317.X>
- Koukoulitsa, C., Hadjipavlou-Litina, D., Geromichalos, G. & Skaltsa, H. (2008). Inhibitory effect on soybean lipoxygenase and docking studies of some secondary metabolites, isolated from *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*.

[Http://Dx.Doi.Org/10.1080/14756360600991017](http://Dx.Doi.Org/10.1080/14756360600991017), 22(1), 99–104.
<https://doi.org/10.1080/14756360600991017>

- Krishnamoorthy, A. L., Lemus, A. A., Solomon, A. P., Valm, A. M. & Neelakantan, P. (2020). Interactions between *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in an Organotypic Oral Epithelial Model. *Microorganisms*, 8(11), 1771.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8111771>
- KS, M. & Mathew, S. (2018). Review of microbiology of endodontics and molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *Journal of Otolaryngology-ENT Research, Volume 10*(Issue 6).
<https://doi.org/10.15406/JOENTR.2018.10.00394>
- Kuriyama, T., Karasawa, T., Nakagawa, K., Yamamoto, E. & Nakamura, S. (2002). Bacteriology and antimicrobial susceptibility of gram-positive cocci isolated from pus specimens of orofacial odontogenic infections. *Oral Microbiology and Immunology*, 17(2), 132–135. <https://doi.org/10.1046/J.0902-0055.2001.00098.X>
- Le Page, S., Dubourg, G. & Rolain, J. M. (2016). Evaluation of the Scan® 1200 as a rapid tool for reading antibiotic susceptibility testing by the disc diffusion technique. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(12), 3424–3431.
<https://doi.org/10.1093/JAC/DKW334>
- Lee, S. C., Fung, C. P., Lee, N., See, L. C., Huang, J. S., Tsai, C. J., Chen, K. S. & Shieh, W. B. (2001). Fluconazole disk diffusion test with methylene blue- and glucoseenriched mueller-hinton agar for determining susceptibility of *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4), 1615–1617.
<https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1615-1617.2001>
- Lee, Y. (2013). Effect of calcium hydroxide application time on dentin. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 38(3), 186.
<https://doi.org/10.5395/RDE.2013.38.3.186>
- Lakehal, S., Meliani, A., Benmimoune, S., Bensouna, S. N., Benrebiha, F. Z., & Chaouia, C. (2016). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Artemisia herba-alba* Asso grown in Algeria. *Med. Chem*, 6(6), 435–439.
- Chemat, F., Abert-Vian, M. & Fernandez, X. (2012). Microwave-Assisted Extraction of Essential Oils and Aromas. *Food Engineering Series*, 53–68.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4830-3_3
- Lima, I. O., De, F., Pereira, O., Araújo De Oliveira, W., De, E., Lima, O., Menezes, A., Cunha, F. A., De, M., Formiga, F., Diniz, M., Oliveira Lima, I., de Oliveira Pereira, F., de Oliveira Lima, E. & Menezes, E. A. (2013). Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains.
[Http://Dx.Doi.Org/10.1080/10412905.2012.754728](http://Dx.Doi.Org/10.1080/10412905.2012.754728), 25(2), 138–142.
<https://doi.org/10.1080/10412905.2012.754728>
- Love, R. M. & Jenkinson, H. F. (2002). Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 13(2), 171–183.
<https://doi.org/10.1177/154411130201300207>

- Lucas, V. S. (1993). Association of psychotropic drugs, prevalence of denture-related stomatitis and oral candidosis. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 21(5), 313–316. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0528.1993.TB00782.X>
- Lv, F., Liang, H., Yuan, Q. & Li, C. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44(9), 3057–3064. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.07.030>
- Lynch, E. & Beighton, D. (1994). A Comparison of Primary Root Caries Lesions Classified According to Colour. *Caries Research*, 28(4), 233–239. <https://doi.org/10.1159/000261971>
- Madhubala, M. M., Srinivasan, N. & Ahamed, S. (2011). Comparative evaluation of propolis and triantibiotic mixture as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*, 37(9), 1287–1289. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2011.05.028>
- Marinkovic, J., Markovic, T., Nikolic, B., Ciric, A., Mitic-Culafic, D., Dukanovic, S., Krstic, A., Pavlica, D., Vlajic, T. & Markovic, D. (2022). Biocompatibility and Antibacterial Potential of the *Cinnamomum camphora cineoliferum* (L.) J. Presl. and *Melaleuca ericifolia* Sm. Essential Oils Against Facultative and Obligate Endodontic Anaerobes. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2022.2040386>, 25(1), 111–125. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2022.2040386>
- Martinho, F. C., Gomes, C. C., Nascimento, G. G., Gomes, A. P. M. & Leite, F. R. M. (2018). *Clinical comparison of the effectiveness of 7- and 14-day intracanal medications in root canal disinfection and inflammatory cytokines*. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2143-x>
- Martos, J., Gastal, M. T., Sommer, L., Lund, R. G., del Pino, F. A. B. & Osinaga, P. W. R. (2006). Dissolving efficacy of organic solvents on root canal sealers. *Clinical Oral Investigations*, 10(1), 50–54. <https://doi.org/10.1007/S00784-005-0023-2/FIGURES/3>
- Martucci, J. F., Gende, L. B., Neira, L. M. & Ruseckaite, R. A. (2015). Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Industrial Crops and Products*, 71, 205–213. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.03.079>
- Masango, P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, 13(8), 833–839. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2004.02.039>
- McGeady, P., Wansley, D. L. & Logan, D. A. (2002). Carvone and perillaldehyde interfere with the serum-induced formation of filamentous structures in *Candida albicans* at substantially lower concentrations than those causing significant inhibition of growth. *Journal of Natural Products*, 65(7), 953–955. <https://doi.org/10.1021/NP010621L>

- McLafferty, F., Stauffer, D. B., Stenhagen, E. & Heller, S. (1989). The Wiley/NBS registry of mass spectral data.
- Mendes, C., Pereira de Mattos, J., Nini Ranoya, P., Martins de Jesus, A., Fraga Moreira Lotufo, R. & Alexandre Romito, G. (2003). Clinical effect of a herbal dentifrice on the control of plaque and gingivitis. A double-blind study Efeito clínico de um dentifrício herbal no controle de placa e gengivite. Estudo duplo-cego. *Pesqui Odontol Bras*, 17(4), 314–322.
- Menezes, S. M. S., Cordeiro, L. N. & Viana, G. S. B. (2009). Punica granatum (Pomegranate) Extract Is Active Against Dental Plaque. [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/J157v06n02_07](http://Dx.Doi.Org/10.1080/J157v06n02_07), 6(2), 79–92. https://doi.org/10.1080/J157V06N02_07
- Senet, J. M. (1998). Candida adherence phenomena, from commensalism to pathogenicity. *Int Microbiol*, 1(2), 117–122.
- Mirajkar, C. J. & Gebhart, C. J. (2016). Comparison of agar dilution and antibiotic gradient strip test with broth microdilution for susceptibility testing of swine Brachyspira species. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 28(2), 133–143. <https://doi.org/10.1177/1040638716629154>
- Modena, K. C. D. S., Casas-Apayco, L. C., Atta, M. T., Costa, C. A. D. S., Hebling, J., Sipert, C. R., & Santos, C. F. (2009). Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *Journal of Applied Oral Science*, 17, 544–554. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572009000600002>
- Mohammadi, Z. & Dummer, P. M. H. (2011). Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *International Endodontic Journal*, 44(8), 697–730. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.2011.01886.X>
- Mohammadi, Z., Shalavi, S. & Yazdizadeh, M. (2012). Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide in Endodontics: A Review. *Chonnam Medical Journal*, 48(3), 133–140. <https://doi.org/10.4068/CMJ.2012.48.3.133>
- Momenijavid, M., Salimizand, H., Korani, A., Dianat, O., Nouri, B., Ramazanzadeh, R., Ahmadi, A., Rostamipour, J. & Khosravi, M. R. (2022). Effect of calcium hydroxide on morphology and physicochemical properties of Enterococcus faecalis biofilm. *Scientific Reports 2022 12:1*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11780-x>
- Mozayeni, M., Hadian, A., Bakhshaei, P., Dianat, O. & Dianat, O. (2015). Comparison of Antifungal Activity of 2% Chlorhexidine, Calcium Hydroxide, and Nanosilver gels against Candida Albicans. *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)*, 12(2), 109. /pmc/articles/PMC4434124/
- Mueller, M., de La Peña, A. & Derendorf, H. (2004). Issues in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-Infective Agents: Kill Curves versus MIC. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(2), 369–377.

<https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.369-377.2004/ASSET/9EA63550-81E3-4BE9-87EB-5D7E25DC6942/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0020410280001.JPEG>

- Mustafa, M., Kp, S., Jain, D., Sajjanshetty, S., Arun, A. & Uppin, L. (2012). Role of Calcium Hydroxide in Endodontics : A Review. *Undefined*.
- Revathi. & Chandra S.M, S. (2014). Merits and Demerits of Calcium Hydroxide as a Therapeutic Agent: A Review. *International Journal of Dental Sciences and Research*, 2(6B), 1–4. <https://doi.org/10.12691/IJDSR-2-6B-1>
- Narayanan, L. L. & Vaishnavi, C. (2010). Endodontic microbiology. *Journal of Conservative Dentistry : JCD*, 13(4), 233. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.73386>
- Nayyar, P., Sethi, A., Thakur, D., Khullar, S., Gayati, S. & Adarsh, K. (2021a). Antibacterial Effect of Silver Nanoparticle Gel as an Intracanal Medicament in Combination with Other Medicaments against *Enterococcus faecalis*: An In vitro Study. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 13(Suppl 1), S408. https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS_600_20
- Nayyar, P., Sethi, A., Thakur, D., Khullar, S., Gayati, S. & Adarsh, K. (2021b). Antibacterial Effect of Silver Nanoparticle Gel as an Intracanal Medicament in Combination with Other Medicaments against *Enterococcus faecalis*: An In vitro Study. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 13(Suppl 1), S408–S411. https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS_600_20
- Neelakantan, P., Cheng, C. Q., Mohanraj, R., Sriraman, P., Subbarao, C. & Sharma, S. (2015). Antibiofilm activity of three irrigation protocols activated by ultrasonic, diode laser or Er:YAG laser in vitro. *International Endodontic Journal*, 48(6), 602–610. <https://doi.org/10.1111/IEJ.12354>
- Nikolić, M., Jovanović, K. K., Marković, T., Marković, D., Gligorijević, N., Radulović, S. & Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils. *Industrial Crops and Products*, 61, 225–232. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2014.07.011>
- Nordmann, P., Poirel, L. & Dortet, L. (2012). Rapid Detection of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae - Volume 18, Number 9—September 2012 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerging Infectious Diseases*, 18(9), 1503–1507. <https://doi.org/10.3201/EID1809.120355>
- Nosrat, A., Bolhari, B., Sharifian, M. R., Aligholi, M. & Mortazavi, M. S. (2009). The effect of Carvacrol on *Enterococcus faecalis* as a final irrigant. *Iranian Endodontic Journal*, 4(3), 96. <https://doi.org/10.22037/iej.v4i3.1417>
- Novak, J., Lukas, B. & Franz, C. M. (2011). The Essential Oil Composition of Wild Growing Sweet Marjoram (*Origanum majorana* L., Lamiaceae) from Cyprus—Three Chemotypes. [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/10412905.2008.9700026](http://Dx.Doi.Org/10.1080/10412905.2008.9700026), 20(4), 339–341. <https://doi.org/10.1080/10412905.2008.9700026>
- Oke, F. & Aslim, B. (2010). Biological potentials and cytotoxicity of various extracts from endemic *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P.H. Davis. *Food and*

- Chemical Toxicology*, 48(6), 1728–1733.
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2010.03.053>
- Olajuyigbe, O. O. & Afolayan, A. J. (2012). In vitro antibacterial and time-kill evaluation of the *Erythrina caffra* Thunb. extract against bacteria associated with diarrhoea. *TheScientificWorldJournal*, 2012.
<https://doi.org/10.1100/2012/738314>
- Olivier, G. W. (1997). *The world market of oregano* (Vol. 14, pp. 142–146).
- Oncag, O., Cogulu, D., Uzel, A., & Sorkun, K. (2006). Efficacy of propolis as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. *General dentistry*, 54(5), 319–322.
- Ørstavik, D. & Haapasalo, M. (1990). Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Dental Traumatology*, 6(4), 142–149. <https://doi.org/10.1111/J.1600-9657.1990.TB00409.X>
- Orucoglu, H. & Cobankara, F. K. (2008). Effect of Unintentionally Extruded Calcium Hydroxide Paste Including Barium Sulfate as a Radiopaquing Agent in Treatment of Teeth with Periapical Lesions: Report of a Case. *Journal of Endodontics*, 34(7), 888–891. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2008.04.012>
- Oyama, K. O. N., Siqueira, E. L., & Santos, M. D. (2002). In vitro study of effect of solvent on root canal retreatment. *Brazilian dental journal*, 13, 208–211.
- Pannuti, C. S. & Grinbaum, R. S. (1995). An Overview of Nosocomial Infection Control in Brazil. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 16(3), 170–174. <https://doi.org/10.1017/S0195941700007347>
- Park, Y. K., Koo, M. H., Abreu, J. A., Ikegaki, M., Cury, J. A., & Rosalen, P. L. (1998). Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Current microbiology*, 36(1), 24–28.
- Pauli, G. F. (2011). Fitoterapia. Editorial. *Fitoterapia*, 82(1), 1–4.
<https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2010.11.019>
- Pedullà, E., Genovese, C., Campagna, E., Tempera, G. & Rapisarda, E. (2012). Decontamination efficacy of photon-initiated photoacoustic streaming (PIPS) of irrigants using low-energy laser settings: an ex vivo study. *International Endodontic Journal*, 45(9), 865–870. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.2012.02044.X>
- Perineau, F., Ganou, L. & Vilarem, G. (1992). Studying production of lovage essential oils in a hydrodistillation pilot unit equipped with a cohobation system. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 53(2), 165–171.
<https://doi.org/10.1002/JCTB.280530210>
- Perry, J. D. (2017). A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(2), 449–479. <https://doi.org/10.1128/CMR.00097-16>

- Persoon, I. F. & Özok, A. R. (2017). Definitions and Epidemiology of Endodontic Infections. *Current Oral Health Reports*, 4(4), 278–285. <https://doi.org/10.1007/S40496-017-0161-Z/TABLES/1>
- Peters, L. B., Wesselink, P. R., Buijs, J. F. & van Winkelhoff, A. J. (2001). Viable Bacteria in Root Dentinal Tubules of Teeth with Apical Periodontitis. *Journal of Endodontics*, 27(2), 76–81. <https://doi.org/10.1097/00004770-200102000-00002>
- Philip, N., Leishman, S. & Walsh, L. (2019). Potential Role for Natural Products in Dental Caries Control. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 17(5). <https://doi.org/10.3290/J.OHPD.A42741>
- Pinheiro, E. T., Gomes, B. P. F. A., Ferraz, C. C. R., Teixeira, F. B., Zaia, A. A. & Souza Filho, F. J. (2003). Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiology and Immunology*, 18(2), 100–103. <https://doi.org/10.1034/J.1399-302X.2003.00058.X>
- Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Maxia, A., Gonçalves, M., Cavaleiro, C. & Salgueiro, L. (2021). Antifungal activity of essential oil from *Mentha spicata* L. and *Mentha pulegium* L. growing wild in Sardinia island (Italy). *Natural Product Research*, 35(6), 993–999. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1610755>
- Pistorius, A., Willershausen, B., Steinmeier, E.-M. & Kreisler, M. (2003). Efficacy of Subgingival Irrigation Using Herbal Extracts on Gingival Inflammation. *Journal of Periodontology*, 74(5), 616–622. <https://doi.org/10.1902/JOP.2003.74.5.616>
- Pizzo, G., Barchiesi, F., Falconi Di Francesco, L., Giuliana, G., Arzeni, D., Milici, M. E., D'Angelo, M. & Scalise, G. (2002). Genotyping and antifungal susceptibility of human subgingival *Candida albicans* isolates. *Archives of Oral Biology*, 47(3), 189–196. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(01\)00114-5](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(01)00114-5)
- Punathil, S., Moyin, S., Bhat, S. S., Hedge, S., Pai, A. & James, J. (2020). Comparison of Antibacterial Effect of Calcium Hydroxide Combined With Chlorhexidine and Povidone-Iodine Against *Enterococcus faecalis* in Dentinal Tubules of Human Incisors: An In Vitro Comparative Study. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12(Suppl 1), S448–S452. https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS_134_20
- Ramachandran Nair, P. N. (1987). Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *Journal of Endodontics*, 13(1), 29–39. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(87\)80089-4](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(87)80089-4)
- Rao, K., Ch, B., Narasu, L. M. & Giri, A. (2010). Antibacterial activity of *Alpinia galanga* (L) wild crude extracts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(3), 871–884. <https://doi.org/10.1007/S12010-009-8900-9/TABLES/3>

- Rath, S. & Padhy, R. N. (2014). Monitoring in vitro antibacterial efficacy of 26 Indian spices against multidrug resistant urinary tract infecting bacteria. *Integrative Medicine Research*, 3(3), 133–141. <https://doi.org/10.1016/J.IMR.2014.04.002>
- Raut, J. S., Shinde, R. B., Chauhan, N. M. & Mohan Karuppayil, S. (2013). Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. *Biofouling*, 29(1), 87–96. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.749398>
- Rehman, K., Saunders, W. P., Foye, R. H. & Sharkey, S. W. (1996). Calcium ion diffusion from calcium hydroxide-containing materials in endodontically-treated teeth: an in vitro study. *International Endodontic Journal*, 29(4), 271–279. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.1996.TB01381.X>
- Reverchon, E. & Senatore, F. (1992). Isolation of rosemary oil: Comparison between hydrodistillation and supercritical CO₂ extraction. *Flavour and Fragrance Journal*, 7(4), 227–230. <https://doi.org/10.1002/FFJ.2730070411>
- Reynaud, A. H., Nygaard-Østby, B., Bøygard, G. K., Eribe, E. R., Olsen, I. & Gjermo, P. (2001). Yeasts in periodontal pockets. *Journal of Clinical Periodontology*, 28(9), 860–864. <https://doi.org/10.1034/J.1600-051X.2001.028009860.X>
- Rôças, I. N., Jung, I. Y., Lee, C. Y. & Siqueira, J. F. (2004). Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a south Korean population. *Journal of Endodontics*, 30(7), 504–508. <https://doi.org/10.1097/00004770-200407000-00011>
- Rôças, I. N. & Siqueira, J. F. (2011). In Vivo Antimicrobial Effects of Endodontic Treatment Procedures as Assessed by Molecular Microbiologic Techniques. *Journal of Endodontics*, 37(3), 304–310. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2010.11.003>
- Rôças, I. N., Siqueira, J. F. & Santos, K. R. N. (2004). Association of *Enterococcus faecalis* With Different Forms of Periradicular Diseases. *Journal of Endodontics*, 30(5), 315–320. <https://doi.org/10.1097/00004770-200405000-00004>
- Sadr Lahijani, M. S., Raoof Kateb, H. R., Heady, R. & Yazdani, D. (2006). The effect of German chamomile (*Marticaria recutita* L.) extract and tea tree (*Melaleuca alternifolia* L.) oil used as irrigants on removal of smear layer: a scanning electron microscopy study. *International Endodontic Journal*, 39(3), 190–195. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.2006.01073.X>
- Safavi & Nichols, F. C. (1993). Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Endodontics*, 19(2), 76–78. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)81199-4](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)81199-4)

- Safavi & Nichols, F. C. (1994). Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *Journal of Endodontics*, 20(3), 127–129. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80057-9](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80057-9)
- Safavi, K. & Nakayama, T. A. (2000). Influence of Mixing Vehicle on Dissociation of Calcium Hydroxide in Solution. *Journal of Endodontics*, 26(11), 649–651. <https://doi.org/10.1097/00004770-200011000-00004>
- Sakagami, H. & Tomomura, M. (2018). Dental Application of Natural Products. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 5(1), 21. <https://doi.org/10.3390/MEDICINES5010021>
- Sakaguchi, S., Saito, M., Tsuji, H., Asahara, T., Takata, O., Fujimura, J., Nagata, S., Nomoto, K. & Shimizu, T. (2010). Bacterial rRNA-targeted reverse transcription-PCR used to identify pathogens responsible for fever with neutropenia. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), 1624–1628. <https://doi.org/10.1128/JCM.01724-09/ASSET/F5B27DCF-DA5E-44F9-B0CB-49BAD9BDDD27/ASSETS/GRAPHIC/ZJM0101097740001.JPEG>
- Samir Abouelenien, S., Mohamed Ibrahim, S., Gameel Shaker, O. & Mohamed Ahmed, G. (2018). Evaluation of postoperative pain in infected root canals after using double antibiotic paste versus calcium hydroxide as intra-canal medication: A randomized controlled trial. *F1000Research*, 7. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.16820.1/DOI>
- Sastravaha, G. (2005). Adjunctive periodontal treatment with Centella asiatica and Punica granatum extracts in supportive periodontal therapy. *Researchgate.Net*. https://www.researchgate.net/profile/Grindwit-Sastravaha/publication/7722763_Adjunctive_periodontal_treatment_with_Centellaasiatica_and_Punica_granatum_extracts_in_supportive_periodontal_therapy/links/54ac082f0cf2ce2df6693fdf/Adjunctive-periodontal-treatment-with-Centellaasiatica-and-Punica-granatum-extracts-in-supportive-periodontal-therapy.pdf
- Scherer, W., Gultz, J., Lee, S., J. K.-T. J. (1998). The ability of an herbal mouthrinse to reduce gingival bleeding. *Europepmc.Org*. Retrieved May 25, 2022, from <https://europepmc.org/article/med/10518858>
- Sedgley, C. M., Lennan, S. L. & Appelbe, O. K. (2005). Survival of Enterococcus faecalis in root canals ex vivo. *International Endodontic Journal*, 38(10), 735–742. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.2005.01009.X>
- Seghatoleslami, S., Samadi, N., Salehnia, A. & Azimi, S. (2009). Antibacterial activity of endemic Satureja Khuzistanica Jamzad essential oil against oral pathogens. *Iranian Endodontic Journal*, 4(1), 5. /pmc/articles/PMC3712262/
- Segura-Egea, J. J., Gould, K., Şen, B. H., Jonasson, P., Cotti, E., Mazzoni, A., Sunay, H., Tjäderhane, L. & Dummer, P. M. H. (2017). Antibiotics in Endodontics: a review. *International Endodontic Journal*, 50(12), 1169–1184. <https://doi.org/10.1111/IEJ.12741>

- Sen, B. H., Piskin, B. & Demirci, T. (1995). Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Dental Traumatology*, 11(1), 6–9. <https://doi.org/10.1111/J.1600-9657.1995.TB00671.X>
- Şen, B. H., Safavi & Spångberg, L. S. W. (1997). Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. *Archives of Oral Biology*, 42(7), 513–520. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(97\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(97)00026-5)
- Şengezer, E., & Güngör, T. (2008). Esansiyel yağlar ve hayvanlar üzerindeki etkileri (derleme). *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 48(2), 101-110.
- Sharma, G., Ahmed, H. M. A., Zilm, P. S. & Rossi-Fedele, G. (2018). Antimicrobial properties of calcium hydroxide dressing when used for long-term application: A systematic review. In *Australian Endodontic Journal* (Vol. 44, Issue 1, pp. 60–65). Wiley-Blackwell Publishing Asia. <https://doi.org/10.1111/aej.12216>
- Silva, S., Alves, N., Silva, P., Vieira, T., Maciel, P., Ucio, L. ', Castellano, R., Bonan, P., Velozo, C., Albuquerque, D. & Carlo, P. di. (2019). *Antibacterial Activity of Rosmarinus officinalis, Zingiber officinale, Citrus aurantium bergamia, and Copaifera officinalis Alone and in Combination with Calcium Hydroxide against Enterococcus faecalis*. <https://doi.org/10.1155/2019/8129439>
- Singh, H. *Scient Open Access Exploring the World of Science Microbiology of Endodontic Infections*. Retrieved May 16, 2022, from www.scientonline.org
- Singh, K. K., Kumar, P., Das, P., Marandi, M., Panda, S., Mahajan, A. & Kumar, D. (2020). Association of specific microorganisms with endodontic signs and symptoms. A comparative study. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 9(8), 3965. https://doi.org/10.4103/JFMPC.JFMPC_523_20
- Sinha, D. & Sinha, A. (2014). Natural medicaments in dentistry. *Ayu*, 35(2), 113. <https://doi.org/10.4103/0974-8520.146198>
- Siqueira, J. F. & Lopes, H. P. (1999). Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *International Endodontic Journal*, 32(5), 361–369. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2591.1999.00275.X>
- Siqueira, J. F. & Rôçac, I. N. (2009). Critical review in oral biology and Medicine: Diversity of endodontic microbiota revisited. *Journal of Dental Research*, 88(11), 969–981. <https://doi.org/10.1177/0022034509346549>
- Siqueira, José F. & de Uzeda, M. (1998). Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *Journal of Endodontics*, 24(10), 663–665. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(98\)80151-9](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(98)80151-9)
- Siqueira Jr, J. F., De Uzeda, M., & Fonseca, M. E. (1996). A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *Journal of endodontics*, 22(6), 308-310. [https://doi.org/10.1016/s0099-2399\(96\)80265-2](https://doi.org/10.1016/s0099-2399(96)80265-2)
- Siqueira, José F. & Rôças, I. N. (2004). Polymerase chain reaction–based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surgery*,

- Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 97(1), 85–94. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(03\)00353-6](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(03)00353-6)
- Siqueira, José F., Rôças, I. N. & Lopes, H. P. (2002). Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 93(2), 174–178. <https://doi.org/10.1067/MOE.2002.119910>
- Siqueira, José F., Rôças, I. N. & Rosado, A. S. (2004). Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiology and Immunology*, 19(6), 363–370. <https://doi.org/10.1111/J.1399-302X.2004.00170.X>
- Siqueira, José F. & Sen, B. H. (2004). Fungi in endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 97(5), 632–641. <https://doi.org/10.1016/J.TRIPLEO.2003.12.022>
- Siqueira JR, R. I. (2016). *Cohen's Pathways of the Pulp - Microbiology of Endodontic Infections* (11th ed.).
- Siren, E. K., Haapasalo, M. P. P., Ranta, K., Salmi, P. & Kerosuo, E. N. J. (1997). Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *International Endodontic Journal*, 30(2), 91–95. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2591.1997.00057.X>
- Sjögren, U., Figdor, D., Persson, S., & Sundqvist, G. (1997). Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *International endodontic journal*, 30(5), 297–306.
- Sjögren, U., Figdor, D., Spångberg, L., & Sundqvist, G. (1991). The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *International endodontic journal*, 24(3), 119–125.
- Slack G. (1953). *The resistance to antibiotics of microorganisms and in vitro penicillin sensitivity*. Brazilian Dental Journal. https://scholar.google.com/scholar?hl=tr&as_sdt=0%2C5&q=Slack+G.+The+resistance+to+antibiotics+of+microorganisms+isolated+from+root+canals.+Br+Dent+J+1957%3A+18%3A+493%E2%80%933494.&btnG=
- Slaton, K. P., Huffer, M. D., Wikle, E. J., Zhang, J., Morrow, C. D., Rhodes, S. C. & Eleazer, P. D. (2017). 16S Ribosomal RNA Gene Sequencing to Evaluate the Effects of 6 Commonly Prescribed Antibiotics. *Journal of Endodontics*, 43(12), 1984–1989. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2017.07.001>
- Slots, J., Rams, T. E. & Listgarten, M. A. (1988). Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 3(2), 47–52. <https://doi.org/10.1111/J.1399-302X.1988.TB00080.X>

- Sobrinho, A. P. R. (1998). Experimental root canal infections in conventional and germ-free mice. *Journal of Endodontics*, 24(6), 405–408. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(98\)80021-6](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(98)80021-6)
- Soilhi, Z., Trindade, H., Vicente, S., Gouiaa, S., Khoudi, H. & Mekki, M. (2020). Assessment of the genetic diversity and relationships of a collection of *Mentha* spp. in Tunisia using morphological traits and ISSR markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 95(4), 483–495. <https://doi.org/10.1080/14620316.2019.1702482>
- Soković, M., Vukojević, J., Marin, P., Brkić, D., Vajs, V. & van Griensven, L. (2009). Chemical Composition of Essential Oil of Thymus and Mentha Species and Their Antifungal Activities. *Molecules*, 14(1), 238–249. <https://doi.org/10.3390/molecules14010238>
- Solak, H. & Öztan, M. D. (2003). The pH changes of four different calcium hydroxide mixtures used for intracanal medication. *Journal of Oral Rehabilitation*, 30(4), 436–439. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2842.2003.01062.X>
- Sousa, E. O., Silva, N. F., Rodrigues, F. F. G., Campos, A. R., Lima, S. G. & Costa, J. G. M. (2010). Chemical composition and resistance-modifying effect of the essential oil of *Lantana camara* Linn. *Pharmacognosy Magazine*, 6(22), 79–82. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.62890>
- Sousa, M. N. ;, Macedo, A. T. ;, Ferreira, G. F. ;, Furtado, H. L. A. ;, Pinheiro, A. J. M. C. R. ;, Lima-Neto, L. G. ;, Fontes, V. C. ;, Ferreira, R. L. P. S. ;, Monteiro, C. A. ; & Falcai, A. ; vd. (2022). *Hydroalcoholic Leaf Extract of Punica granatum, alone and in Combination with Calcium Hydroxide, Is Effective against Mono- and Polymicrobial Biofilms of Enterococcus faecalis and Candida albicans*. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050584>
- Souza-Filho, F. J. (2003). *Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions*.
- Spångberg, L. S. W. & Haapasalo, M. (2002). Rationale and efficacy of root canal medicaments and root filling materials with emphasis on treatment outcome. *Endodontic Topics*, 2(1), 35–58. <https://doi.org/10.1034/J.1601-1546.2002.20104.X>
- Spencer, D. C., Paton, T. F., Mulrone, K. T., Inglis, T. J. J., Sutton, J. M. & Morgan, H. (2020). A fast impedance-based antimicrobial susceptibility test. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-18902-X>
- Srikumar, G. P., Kumar, R. S., Bardia, S., Geojan, N. E., Nishad, G. & Bhagat, P. (2020). Antifungal Effectiveness of Various Intracanal Medicaments against *Candida albicans*: An In Vitro Study. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 21(9), 1042–1047. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-2923>

- Staniszewska, M., Bondaryk, M., Piłat, J., Siennicka, K., Magda, U. & Kurzatkowski, W. (2012). [Virulence factors of *Candida albicans*]. *Przegląd Epidemiologiczny*, 66(4), 629–633. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23484392/>
- Stein SE. “*Mass Spectra*” *NIST Mass Spec Data Center, in NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69*, Eds. P.J. Linstrom and W.G. Mallard, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899.
- Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J. & Owatz, C. B. (2006). *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *Journal of Endodontics*, 32(2), 93–98. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2005.10.049>
- Takushige, T., Cruz, E. v., Asgor Moral, A. & Hoshino, E. (2004). Endodontic treatment of primary teeth using a combination of antibacterial drugs. *International Endodontic Journal*, 37(2), 132–138. <https://doi.org/10.1111/J.0143-2885.2004.00771.X>
- Tang, G., Samaranayake, L. P. & Yip, H. K. (2004). Molecular evaluation of residual endodontic microorganisms after instrumentation, irrigation and medication with either calcium hydroxide or Septomixine. *Oral Diseases*, 10(6), 389–397. <https://doi.org/10.1111/J.1601-0825.2004.01015.X>
- Taschieri, S., del Fabbro, M., Samaranayake, L., Chang, J. W. W. & Corbella, S. (2014). Microbial invasion of dentinal tubules: a literature review and a new perspective. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 5(3), 163–170. <https://doi.org/10.1111/JICD.12109>
- Temel, M., Tokur, S., Üniversitesi, A. K., Fakültesi, F.-E., Bölümü, B., Üniversitesi, O. & Eskişehir, M. /. (2013). *Origanum Hypericifolium* Schwarz Et Davis Ve O. Sipyleum L. Üzerinde Morfolojik, Anatomik Ve Ekolojik Araştırmalar. *Dergipark.Org.Tr*, 6(2). <https://dergipark.org.tr/en/pub/akufemubid/issue/1602/19913>
- Thienngern, P., Panichuttra, A., Ratisoontorn, C., Aumnate, C. & Matangkasombut, O. (2022). *Ecacy of Chitosan Paste as Intracanal Medication Against Enterococcus Faecalis and Candida Albicans Biolm Compared with Calcium Hydroxide in an In Vitro Root Canal Infection Model*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1190318/v1>
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, 79(7), R1231-R1249.
- Upadhyaya, P. G., Umapathy, B. L., & Ravikumar, K. L. (2010). Comparative study for the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin and biofilm among clinical and commensal isolates of *Enterococcus faecalis*. *Journal of laboratory physicians*, 2(2), 100.

- Van der Waal, S. v., Connert, T., Crielaard, W. & de Soet, J. J. (2016). In mixed biofilms *Enterococcus faecalis* benefits from a calcium hydroxide challenge and culturing. *International Endodontic Journal*, 49(9), 865–873. <https://doi.org/10.1111/iej.12542>
- Vanka, A., Tandon, S., Rao, S. R., Udupa, N., & Ramkumar, P. (2001). The effect of indigenous *Neem Azadirachta indica* [correction of (*Adirachta indica*)] mouth wash on *Streptococcus mutans* and *lactobacilli* growth. *Indian journal of dental research: official publication of Indian Society for Dental Research*, 12(3), 133–144.
- Vasiljević, B., Mitić-Ćulafić, D., Djekic, I., Marković, T., Knežević-Vukčević, J., Tomasevic, I., Velebit, B. & Nikolić, B. (2019). Antibacterial effect of *Juniperus communis* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* in vitro and in wine marinated beef. *Food Control*, 100, 247–256. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2019.01.025>
- Versporten, A., Bolokhovets, G., Ghazaryan, L., Abilova, V., Pyshnik, G., Spasojevic, T., Korinteli, I., Raka, L., Kambaralieva, B., Cizmovic, L., Carp, A., Radonjic, V., Maqsudova, N., Celik, H. D., Payerl-Pal, M., Pedersen, H. B., Sautenkova, N. & Goossens, H. (2014). Antibiotic use in eastern Europe: a cross-national database study in coordination with the WHO Regional Office for Europe. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(5), 381–387. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70071-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70071-4)
- Vishnuvardhini, S., Sivakumar, A., Ravi, V., Prasad, A. S. & Sivakumar, J. S. (2018). Herbendodontics - Phytotherapy in endodontics: A review. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 11(2), 1073–1082. <https://doi.org/10.13005/BPJ/1468>
- Viswanath, G., Tilakchand, M., Naik, B., Kalabhavi, A. & Kulkarni, R. (2021). Comparative evaluation of antimicrobial and antifungal efficacy of bioactive root-end filling materials: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry : JCD*, 24(2), 148–152. https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_548_19
- Waltimo, T. M. T., Ørstavik, D., Sirén, E. K. & Haapasalo, M. P. P. (1999). In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *International Endodontic Journal*, 32(6), 421–429. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2591.1999.00237.X>
- Walton, R. E., Simon, S. T., Bhat, K. S. & Francis, R. (1995). Effect of four vehicles on the pH of calcium hydroxide and the release of calcium ion. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 80(4), 459–464. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(05\)80371-3](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(05)80371-3)
- Wang, H., Provan, G. J. & Helliwell, K. (2004). Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chemistry*, 87(2), 307–311. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2003.12.029>
- Wang, N., Ji, Y., Zhu, Y., Wu, X., Mei, L., Zhang, H., Deng, J. & Wang, S. (2020). Antibacterial effect of chitosan and its derivative on *Enterococcus faecalis*

- associated with endodontic infection. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(6), 3805–3813. <https://doi.org/10.3892/ETM.2020.8656>
- Weerakkody, N. S., Caffin, N., Lambert, L. K., Turner, M. S. & Dykes, G. A. (2011). Synergistic antimicrobial activity of galangal (*Alpinia galanga*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and lemon iron bark (*Eucalyptus staigerana*) extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(3), 461–468. <https://doi.org/10.1002/JSFA.4206>
- Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 3:2, 3(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Weinstein, M. P., & Lewis, J. S. (2020). The Clinical and Laboratory Standards Institute Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Background, organization, functions, and Processes. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(3). <https://doi.org/10.1128/jcm.01864-19>
- Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A. & Szumny, A. (2019). Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative? In *Molecules* (Vol. 24, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24112130>
- Wynn, R. L. (2005). Aloe vera gel: Update for dentistry. *Gen Dent*, 53(1), 6-9.
- Yang, Q., Liu, M., Zhu, L., Zhang, J. & Peng, B. (2021). Comparison of Needle, Ultrasonic, and Laser Irrigation for the Removal of Calcium Hydroxide from Mandibular Molar Root Canals. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, 39(5), 349–354. <https://doi.org/10.1089/PHOTOB.2019.4798>
- Yatsuda, R., Rosalen, P. L., Cury, J. A., Murata, R. M., Rehder, V. L. G., Melo, L. V., & Koo, H. (2005). Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. *Journal of ethnopharmacology*, 97(2), 183-189.
- Yoo, Y.-J., Kim, A. R., Perinpanayagam, H., Han, S. H. & Kum, K.-Y. (2020). *microorganisms Candida albicans Virulence Factors and Pathogenicity for Endodontic Infections*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091300>
- Yuca, S., Gul, M. & Caglayan, A. (2016). Investigation of the use of various plant extracts activity in ruminant. *AIP Conference Proceedings*, 1726. <https://doi.org/10.1063/1.4945932>
- Zancan, R. F., Calefi, P. H. S., Borges, M. M. B., Lopes, M. R. M., de Andrade, F. B., Vivan, R. R. & Duarte, M. A. H. (2019). Antimicrobial activity of intracanal medications against both *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm. *Microscopy Research and Technique*, 82(5), 494–500. <https://doi.org/10.1002/jemt.23192>
- Zancan, R. F., Vivan, R. R., Milanda Lopes, M. R., Weckwerth, P. H., de Andrade, F. B., Ponce, J. B. & Duarte, M. A. H. (2016). Antimicrobial Activity and

Physicochemical Properties of Calcium Hydroxide Pastes Used as Intracanal Medication. *Journal of Endodontics*, 42(12), 1822–1828.
<https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2016.08.017>

Zarei, Mina, Afkhami, F. & Malek Poor, Z. (2013). Fracture resistance of human root dentin exposed to calcium hydroxide intervisit medication at various time periods: an in vitro study. *Dental Traumatology*, 29(2), 156–160.
<https://doi.org/10.1111/J.1600-9657.2012.01158.X>

Zehnder, M. (2006). Root Canal Irrigants. *Journal of Endodontics*, 32(5), 389–398.
<https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2005.09.014>

Zihan, Z., Wenli, W., Jinnuo, L. & Yourui, L. (2022). Carvacrol: antibacterial activity, bone repair, and prevention and treatment in oral diseases. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 26(26), 4252.
<https://doi.org/10.12307/2022.831>

Zinoviadou, K. G., Koutsoumanis, K. P. & Biliaderis, C. G. (2009). Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Science*, 82(3), 338–345. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2009.02.004>



Article

Evaluation of Antibacterial and Antifungal Effects of Calcium Hydroxide Mixed with Two Different Essential Oils

Gökulp Coşkun ¹, Cenk Serhan Özveril ^{2,3}, Duygu Yigit Hanoglu ⁴, Kemal Husnu Can Baser ⁵ and Yasar Meric Tunca ^{6,*}

¹ Department of Endodontics, Faculty of Dentistry, Near East University, Nicosia 99138, Cyprus; gokulp.coskun@neu.edu.tr

² Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Dentistry, Near East University, Nicosia 99138, Cyprus; cenzserhan.ozveril@neu.edu.tr

³ Döşan Institute, Near East University, Nicosia 99138, Cyprus

⁴ Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Near East University, Nicosia 99138, Cyprus; duygu.yigit@hanoglu@neu.edu.tr

⁵ Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Near East University, Nicosia 99138, Cyprus; kemalhussnucan.baser@neu.edu.tr

⁶ Department of Endodontics, Faculty of Dentistry, University of Kyrenia, Nicosia 99138, Cyprus

* Correspondence: ymtunca@gmail.com; Tel.: +90-5428663955



Citation: Coşkun, G.; Özveril, C.S.; Yigit Hanoglu, D.; Baser, K.H.C.; Tunca, Y.M. Evaluation of Antibacterial and Antifungal Effects of Calcium Hydroxide Mixed with Two Different Essential Oils. *Molecules* **2022**, *27*, 2635. <https://doi.org/10.3390/molecules27092635>

Academic Editors: Carmen Chelaru and Ekin Öpür

Received: 17 March 2022

Accepted: 19 April 2022

Published: 20 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: Calcium hydroxide is a routinely used material for root canal disinfection during root canal treatment. Natural products have great potential in terms of their antibacterial effects. This study aimed to establish an effective alternative intracanal medicament using *Origanum dubium* (*O. dubium*) and *Menfite spicata* (*M. spicata*) essential oils. Materials and Methods: *O. dubium* and *M. spicata*, collected from Lefke, Cyprus, were separately subjected to hydrodistillation. The obtained essential oil compositions were analysed simultaneously by gas chromatography (GC) and gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS). The compositions were then divided into groups and mixed with calcium hydroxide at a 1:1 concentration; after that, the pastes were tested on *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) and *Candida albicans* (*C. albicans*), which are the most common resistant pathogenic microorganisms in the root canal. The antibacterial activity of the pastes was measured using a disk diffusion assay. Results: The GC and GC-MS analyses revealed that *O. dubium* and *M. spicata* had major compositions of carvacrol (75.8%) and carvone (71.3%), respectively. Antimicrobial activity was found to be significantly higher when study groups with *O. dubium* essential oil were applied to both *E. faecalis* and *C. albicans*. The results also show that *M. spicata*, together with calcium hydroxide, demonstrated a significant antifungal effect on *C. albicans* when incubated for 72 h. Conclusions: *M. spicata* was found to be an effective antimicrobial agent on *C. albicans*, whereas *O. dubium* was found to be very effective on both *E. faecalis* and *C. albicans*. These data demonstrate that these natural essential oils may be promising candidates for alternative intracanal medicament in future routine clinical applications.

Keywords: endodontics; essential oils; antimicrobial; antibacterial; *E. faecalis*; *C. albicans*; calcium hydroxide

1. Introduction

The removal of microorganisms from the root canal system is a crucial step in any successful endodontic treatment [1,2]. In particular, if living microorganisms are not eliminated effectively, their presence may lead to a resistant infection and poor healing [1]. In dentistry, *E. faecalis* is a particularly common Gram-positive bacteria in root canals diagnosed with apical periodontitis, and it has been observed to be one of the main pathogens in secondary endodontic infections [2]. *E. faecalis* can survive in very harsh nutrient-deficient environments with a high alkaline pH reaching 11.5. *E. faecalis* has the

capacity to grow as a biofilm on the root canal walls and can cause a mono-infection in treated canals without any synergistic support from other pathogen species. In addition, *E. faecalis* is known for its high resistance to antimicrobial agents applied during root canal therapy [3,4]. However, *E. faecalis* is not the only pathogen known to be associated with unsuccessful root canal treatment. *C. albicans* is one of the most common commensals and pathological fungi present in the oral cavity [5]. *C. albicans* is a round/oval-shaped gram-positive yeast-like fungus that is commonly found in 7–18% of unsuccessful root canal treatments due to tenacious or secondary endodontic infections related to recurrent periradicular lesions [6].

Several procedures are applied during endodontic treatment to overcome the aforementioned problems. Instrumentation and irrigation are just some of the procedures that have been shown to have a great effect on the success of root canal treatment. It is widely known that intracanal medication provides the best canal disinfection [7]. The ideal use of intracanal medicaments can provide disinfection by significantly reducing the amount of microorganisms and their by-products in the root canal system. Disinfecting root canals is also essential for preventing tissue damage caused by microorganisms and their by-products [8,9]. For this purpose, the most commonly used disinfection material in the clinic today is calcium hydroxide [10].

Calcium hydroxide is an odourless white powder with the chemical formula $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and a molecular weight of 74.09. Chemically, it is known to be a strong base that is in contact with aqueous liquids (pH about 12.5–12.8) [11]. Calcium hydroxide exerts antimicrobial activity by dissociating into calcium and hydroxyl ions. These ions are highly oxidant anions and show extreme reactivity with several biomolecules [12]. The main effects of calcium hydroxide are attributed to the action of these ions, which raise the pH [13]. The alkaline environment detoxifies bacterial lipopolysaccharides (LPS) by removing esterified fatty acids and altering their chemical conformation. As a result, bacterial cytoplasmic membrane integrity is destroyed [14–15]. These hydroxyl ions exert an antimicrobial effect after diffusion through the entire root canal system via direct or indirect contact [16]. However, calcium hydroxide is not equally effective against all types of bacteria found in root canals [17]. For instance, the fact that *E. faecalis* is resistant to calcium hydroxide has led researchers to investigate new antimicrobial agents and their effects as alternatives [18]. Furthermore, *C. albicans*, one of the most common yeasts found in the oral cavity, has also exhibited some resistance. According to the results of a recent study conducted in 2022, calcium hydroxide has been reported to be ineffective against this most resistant fungal species of *C. albicans*. Therefore, new alternative treatment methods are required for routine endodontic treatment protocols [19,20].

Throughout history, it has been possible to treat many diseases with plants and their products collected from nature. Natural products, especially essential oils, are known for their antimicrobial activity [21]. Essential oils are very effective in opposition to both Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as many other fungal species, including *C. albicans* [22]. Some plants known to produce such oils are Cyprus mountain thyme (*Origanum dubium* Boiss., or *O. dubium*) and Cyprus garden mint (*Mentha spicata* L., or *M. spicata*). The essential oils extracted from these plants are known to have great antimicrobial potential. Carvacrol, which is found in oregano and thyme, has also been established as a great inducer of antimicrobial activity, making essential oils bearing it great candidates for future use in root disinfection procedures. Carvacrol exerts antimicrobial effects by blocking ATPase activity and increasing the permeability of bacterial cell membranes. Carvacrol not only prevents microbial colonisation but also increases the susceptibility of pathogens to antibacterial agents [23].

This research aimed to analyse the in vitro antimicrobial effects of two different essential oils (*O. dubium* and *M. spicata*) either combined with calcium hydroxide or used alone against the two most common resistant microorganisms found in the oral cavity (*E. faecalis* and *C. albicans*). This in vitro study provides preliminary data on potential intracanal drug combinations that can be used to prevent the failure of endodontic treatment. The null

hypotheses of the study were as follows: (1) *O. dubium* essential oil would not have an antimicrobial effect on either *E. faecalis* or *C. albicans* and (2) *M. spicata* essential oil would not have an antimicrobial effect on either *E. faecalis* or *C. albicans*.

2. Results

Gas chromatography and mass spectrometry data analysis revealed 33 compounds characterised by the essential oil composition of *M. spicata* (Table 1). The major compounds were carvone (71.3%), followed by limonene (12.5%) and 1,8-cineole (3.6%). Another 27 compounds were recognised in the *O. dubium* essential oil, of which the major compound was carvacrol (75.8%; Table 2).

Table 1. The essential oil composition of *M. spicata*.

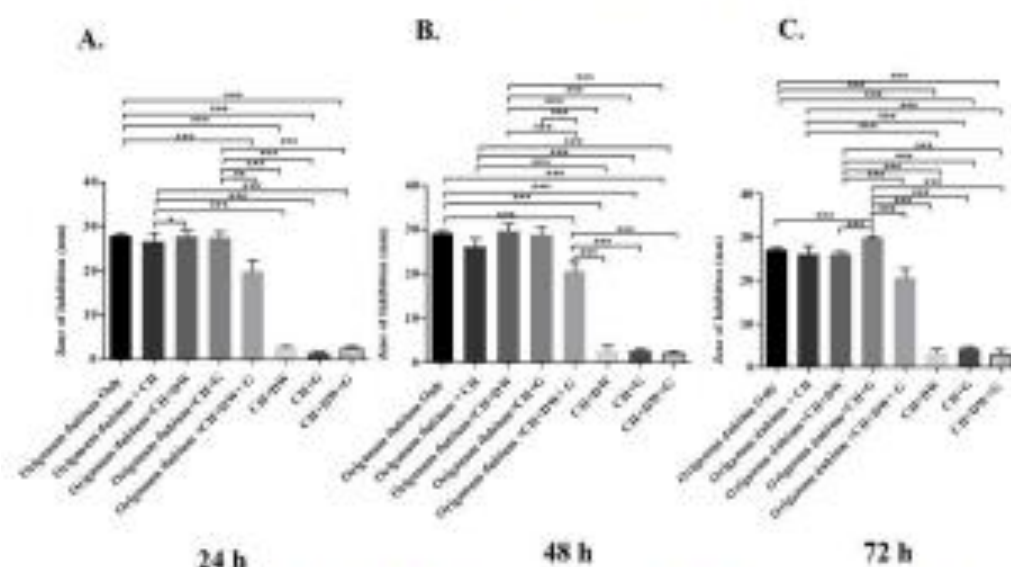
	LRI	Compound Name	Relative Percentage Amount (%)
1	1015	α -Pinene	1.0
2	1068	Camphene	0.1
3	1115	β -Pinene	1.2
4	1128	Sabinene	0.8
5	1168	Myrcene	0.8
6	1207	Limonene	12.5
7	1217	1,8-Cineole	3.6
8	1241	β -Terpinene	0.2
9	1256	γ -Terpinene	0.1
10	1259	(E)- β -Ocimene	0.1
11	1393	3-Octanol	0.2
12	1539	β -Bourbonene	0.4
13	1599	Campher	0.1
14	1608	β -Elemene	0.4
15	1618	Terpinen-4-ol	0.2
16	1623	β -Caryophyllene	0.5
17	1635	trans-Dihydrocarvone	0.3
18	1663	cis-iso-Dihydrocarvone	0.1
19	1676	Pulegone	1.1
20	1687	Dihydrocarvyl acetate	0.6
21	1699	Bicyclosesquiphellandrene	0.4
22	1721	Borneol	0.2
23	1739	Germacrene D	0.6
24	1768	Carvone	71.3
25	1789	p-Vinyl anisole	0.9
26	1819	α -Cadinene	0.1
27	1828	cis-Carvone oxide	tr
28	1851	trans-Carveol	0.3
29	1863	cis-Calamenene	0.2
30	1867	trans-Calamenene	0.1
31	1882	cis-Carveol	1.4
32	2090	Cubanol	0.2
33	2260	Termyol	0.1
Total			100.0

LRI: Linear retention indices calculated against n-alkanes. %: calculated from FID data. tr: Trace (<0.1%).

The data in Figures 1–3 describe the inhibition zone measurements (mm) of the different study groups and indicate relative statistical differences. The addition of *O. dubium* essential oil to the calcium hydroxide groups containing either distilled water or glycerin showed antimicrobial activity on both *C. albicans* and *E. faecalis*, whereas the *M. spicata* extract exerted antimicrobial activity only on *C. albicans*.

Table 2. The essential oil composition of *O. dubius*.

	LRI	Compound Name	Relative Percentage Amounts (%)
1	1015	<i>α</i> -Pinene	3.1
2	1019	<i>α</i> -Thujene	0.9
3	1067	Camphene	0.2
4	1114	<i>β</i> -Pinene	0.2
5	1155	<i>l</i> -3-Carene	0.9
6	1167	Myrcene	1.4
7	1172	<i>β</i> -Terpinene	0.2
8	1187	<i>α</i> -Terpinene	1.2
9	1206	Limonene	0.3
10	1216	1,8-Cineole	0.2
11	1217	<i>β</i> -phellandrene	0.3
12	1258	<i>γ</i> -Terpinene	4.1
13	1283	<i>p</i> -Cymene	6.9
14	1294	Terpinolene	0.3
15	1451	1-Octen-3-ol	0.1
16	1472	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	0.4
17	1549	Linalool	0.2
18	1558	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	0.2
19	1618	Terpinen-4-ol	0.8
20	1622	<i>β</i> -Caryophyllene	0.4
21	1710	<i>α</i> -Terpineol	0.6
22	1715	<i>γ</i> -Terpineol	0.2
23	1720	Borneol	0.3
24	2027	<i>neo</i> -is- <i>δ</i> -hydro carvool	0.2
25	2151	Spathulenol	0.1
26	2199	Thymol	0.5
27	2231	Carvacrol	75.8
Total			100.0

LRI: Linear retention indices calculated against *n*-alkanes. %: calculated from HRT data. n: Trace (<0.1%).**Figure 1.** Inhibition zone diameters (mm) of different study groups containing the essential oil of *O. dubius* on *E. faecalis*. (A) Inhibition zone diameters (mm) measured 24 h post-incubation with various groups on *E. faecalis*. (B) Inhibition zone diameters (mm) measured 48 h post-incubation with

various groups on *E. faecalis*. (C) Inhibition zone diameters (mm) measured 72 h post-incubation with various groups on *E. faecalis* (CH: calcium hydroxide; G: glycerin; DW: distilled water). Values represent mean zone of inhibition $\pm$ standard deviation (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

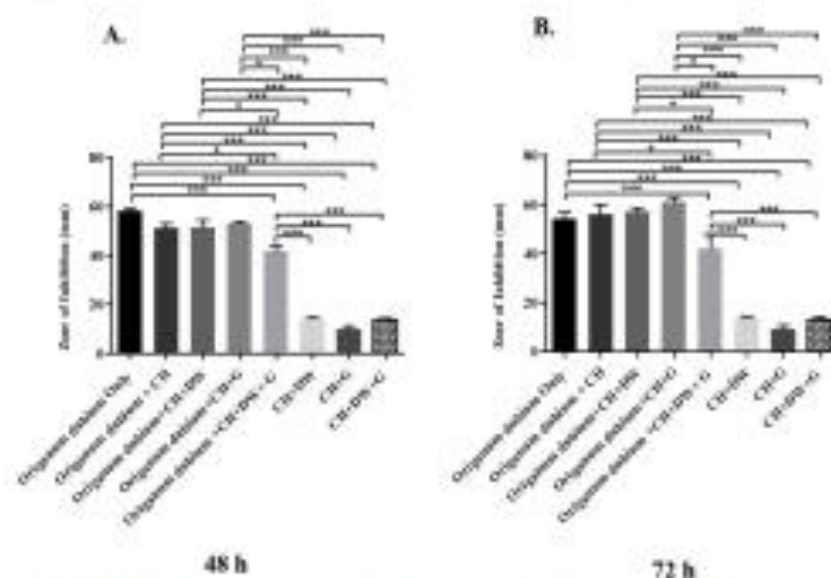


Figure 2. Inhibition zone diameters (mm) of different study groups containing the essential oil of *O. dubium* on *C. albicans*. (A) Inhibition zone diameters (mm) measured 48 h post-incubation with various groups on *C. albicans*. (B) Inhibition zone diameters (mm) measured 72 h post-incubation with various groups on *C. albicans* (CH: calcium hydroxide; G: glycerin; DW: distilled water). Values represent mean zone of inhibition $\pm$ standard deviation (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

The antimicrobial activity study on *E. faecalis* was performed at three different time intervals (24 h, 48 h, and 72 h; Figure 1). At all three intervals, the addition of *O. dubium* essential oil significantly increased the antimicrobial activity regardless of the addition of either distilled water, glycerin, or both to the calcium hydroxide. Similar trends in activity were observed in all the different intragroup comparisons at all time intervals (Figure 1). A combination of calcium hydroxide, glycerin, and *O. dubium* oil demonstrated the significantly highest level of antimicrobial activity, with the formation of more than a 30 mm inhibition zone on *E. faecalis* ($p < 0.001$) when compared with all other combination groups at 72 h (Figure 1C). For the 24 h and 48 h measurements, intergroup comparisons of the trios of (1) calcium hydroxide, glycerin, and *O. dubium* essential oil and (2) calcium hydroxide, distilled water, and *O. dubium* essential oil did not show any significant differences in antimicrobial activity against *E. faecalis* (Figure 1A,B). Furthermore, the level of antimicrobial activity did not exhibit any significant difference in the calcium hydroxide groups in the absence of any essential oil (Figure 1).

The antimicrobial effect of the essential oil of *O. dubium* added to the different calcium hydroxide study groups was further investigated with *C. albicans*. The effect on *C. albicans* was studied at two different time intervals, as there was no effective growth of microorganisms within 24 h (48 h and 72 h; Figure 2). The antimicrobial activity of the different *O. dubium* groups on *C. albicans* was found to be higher when compared with the corresponding activity on *E. faecalis* in all the different study groups (Figures 1 and 2). General trends of antimicrobial activity were found to be significantly higher when the *O. dubium* essential oil was added to the calcium hydroxide groups in comparison with the groups not containing *O. dubium* at both time intervals (48 h and 72 h; $p < 0.001$). At both time intervals, relatively similar trends of antimicrobial activity were observed in all

study groups except for the one containing calcium hydroxide, glycerin, and *O. dubium*. At 48 h, the zone of inhibition formed by the calcium hydroxide, glycerin, and *O. dubium* oil group was reported to be significantly higher than that of any other groups that did not have essential oil at 48 h (Figure 2B). Furthermore, at the same time interval, the calcium hydroxide, glycerin, and *O. dubium* essential oil groups had the highest antimicrobial activity when compared to all other study groups (Figure 2B).

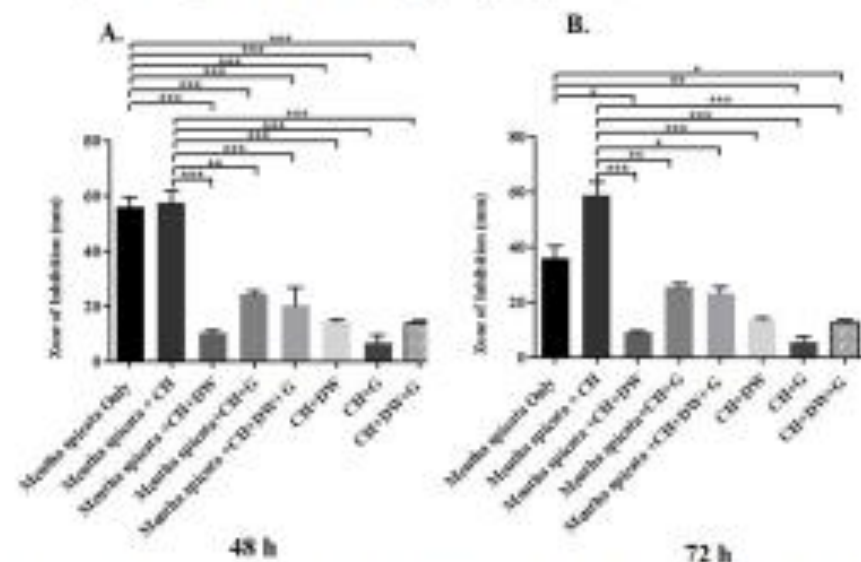


Figure 3. Inhibition zone diameters (mm) of different study groups containing the essential oil of *M. spicata* on *C. albicans*. (A) Inhibition zone diameters (mm) measured 48 h post-incubation with various groups on *C. albicans*. (B) Inhibition zone diameters (mm) measured 72 h post-incubation with various groups on *C. albicans*. (CH: calcium hydroxide; G: glycerin; DW: distilled water). Values represent mean zone of inhibition $\pm$ standard deviation (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

M. spicata is another essential oil that was investigated in this study. The study indicated that the essential oil of *M. spicata* did not have any antimicrobial effect on *E. faecalis* and that it did not show any inhibition zone (mm) in the bacteria culture. However, *M. spicata* demonstrated a remarkable zone of inhibition in the *C. albicans* culture. The combination of *M. spicata* oil and calcium hydroxide demonstrated the significantly highest zone of inhibition in comparison with other combination study groups at 72 h of incubation ($p < 0.001$; Figure 3B). The groups with (1) *M. spicata* essential oil, calcium hydroxide, and glycerin and (2) *M. spicata* essential oil, calcium hydroxide, glycerin, and distilled water induced slightly higher antimicrobial activity when compared with study groups that did not contain *M. spicata* essential oil at both time intervals (Figure 3A,B).

3. Discussion

The null hypothesis of the study for *O. dubium* was rejected. The essential oil of *O. dubium* exerted significant antimicrobial activity on both *E. faecalis* and *C. albicans*. The null hypothesis for *M. spicata* was partially rejected, as the oil showed a good antimicrobial effect on *C. albicans*; however, it did not exert any antimicrobial effect on *E. faecalis*.

The elimination of microorganisms from the root canal system, especially from dentin tubules, is key to successful endodontic therapy. These areas are considered a great niche for microorganisms, as they are low in oxygen concentration, thus promoting their growth. *C. albicans* is the most abundant fungus found in the oral cavity and often causes endodontic treatment failure [24]. The polymorphic nature of *C. albicans* gives the microorganism great superiority over neglected mucosal barriers, leading to the development of oral and

disseminated infections. *E. faecalis* is one of the most resistant bacteria commonly found in root canal treatments [25]. Similar to *C. albicans*, *E. faecalis* is a major opportunistic bacterium that is of critical concern in immunocompromised patients [26]. Pinheiro et al. emphasised that *E. faecalis* was the most commonly isolated bacteria (45.8%) from root canal systems in formerly treated cases [27].

Although calcium hydroxide is used as an intracanal medication in endodontic treatments, there is still significant concern about its antimicrobial activity. Recent studies have demonstrated that calcium hydroxide alone may be less effective or inadequate when compared with other newly developed intracanal medications [28]. According to the results of a study conducted by Zaican et al., calcium hydroxide alone was found to be insufficient for eliminating bacteria [29]. In fact, it is widely known that the alkaline environment created by the high pH of calcium hydroxide is insufficient in destroying bacteria on its own. Bacteria can easily adapt to the alkaline environment formed as a result of their cytoplasmic activity. Specifically, Krishnamoorthy et al. observed that the properties of several *C. albicans* genes induce biofilm formation, tissue penetration, and tissue invasion. These activities were reported to significantly increase in the presence of *E. faecalis* [26]. In another study, Coşk et al. investigated the quality of medications with or without calcium hydroxide application before root canal filling. They also compared the effectiveness of 2% chlorhexidine on dentinal tubules' bacterial infections. The data indicated that the use of 2% chlorhexidine, followed by root canal filling, was more effective in disinfecting the bacterial colonies of *E. faecalis* compared with calcium hydroxide or immediate canal filling [30]. In a similar way, Peters et al. claimed that the number of Gram-positive bacteria decreased in the root canal system after dressing with calcium hydroxide [31]. Data reported in the literature have also demonstrated that calcium hydroxide is unsuccessful in removing bacteria from the root canal system [32]. Studies have also reported that seven days of application of calcium hydroxide is the minimum time of incubation for the successful elimination of bacteria, rather than administering the medication for 10 min. The presence of fungi constituted by *C. albicans* has been identified in primary root canal infections but is more frequent in unsuccessful endodontic treatments in comparison with other microorganisms. Their occurrence in secondary endodontic treatment failures varies between 1% and 17% [33,34]. This could be a result of the fact that *C. albicans* can live in a wide range of pH values, which explains its resistance to calcium hydroxide at high pH values. Moreover, calcium hydroxide further increases the concentration of Ca^{2+} ions that enhance *C. albicans* growth, demonstrating the limited or complete absence of its antifungal effect [35]. Together, these studies indicate that there is a need for an alternative disinfectant material for clinical use in endodontic treatment.

Natural products have been widely applied in traditional medicine, but their use is also highly popular in the fields of modern dentistry and medicine. Herbs with medicinal properties are useful and effective sources for the treatment of various disease processes. Although chemo-mechanical preparation of the root canal decreases the number of pathogens present, intracanal medication with antibacterial action is required to maximise the disinfection of the root canal system [36]. Interest in essential oils, which are considered natural products, and their activity is increasing worldwide [14,37,38].

This research was conducted to investigate the potential of using *O. dubium* or *M. spicata* essential oils as intracanal dressings during root canal treatment, since the materials currently used have been reported to be insufficient in disinfection of root canals. The chemical components of the essential oils of *O. dubium* and *M. spicata* were used to determine their respective ingredients and to obtain a better understanding of their antibacterial and antifungal effects. In the present study, the major component of *O. dubium* essential oil was found to be carvacrol, with a ratio of 75.8%, and the major component of *M. spicata* essential oil was carvone, with a ratio of 71.3%; both of these values were determined by GC and GC-MS analysis.

Carvacrol is known as the main component in *Origanum* oils, but the ratio varies species-wise and according to the geographical region from which it is collected [39].

Carvacrol has a broad spectrum of antibacterial potential that is exerted by impeding ATPase activity and improving the nonselective permeability of bacterial cell membranes. The antibacterial effect of carvacrol against *E. faecalis* was demonstrated in a previous study carried out by Nosrat et al. [25]. This antimicrobial activity can be attributed to the disruption of bacterial cell membranes. Carvacrol not only disrupts bacterial cell walls but also assists in the repair of periapical tissues. This activity is a result of the presence of a phenolic component stimulating the pulpal fibres in a phenomenon known as hormesis [40,41].

In the present study, calcium hydroxide groups containing either distilled water, glycerin, or both did not have significant antimicrobial effects when compared with groups containing the *O. dubium* essential oil at all time intervals in either the *C. albicans* or *E. faecalis* inoculums (Figure 1). As discussed above, calcium hydroxide is known for its limited activity against *E. faecalis* and *C. albicans* [42]. In this study, the antimicrobial activity of calcium hydroxide increased significantly ($p < 0.001$) with the addition of *O. dubium* essential oil compared with all other study groups at both the 24 h and 48 h measurements (incubations; Figure 1). The data also indicate that the *O. dubium* composition contained 75.8% carvacrol upon GC-MS analysis (Table 2). This might explain the possible increased antimicrobial effect of the calcium hydroxide–*O. dubium* essential oil study group. In a similar study, Nosrat et al. demonstrated the antimicrobial effect of 0.6% carvacrol on *E. faecalis* as an irrigation solution, illustrating its possible effect of disinfecting root canals [25]. The data also revealed that there were no significant differences in the inhibition zone measurements between the groups containing *O. dubium* and *O. dubium*-only, which could be explained by the enormous antibacterial effect of *O. dubium*, given that carvacrol is its major constituent.

The 48 h disk diffusion of *E. faecalis* was reported to be significantly higher, regardless of the different groups and time intervals (Figure 1B). Similarly, the 48 h success rate of a carvacrol-only test group was reported to be 87% in a study by Adel et al. [43]. In another study by Adel et al., carvacrol was found to be effective on its own, and no significant difference was found between carvacrol and calcium hydroxide in bacterial elimination; accordingly, carvacrol was recommended as an alternative intracanal medicament [44]. In the present study, as seen in all groups (Figure 1), the use of carvacrol containing *O. dubium* significantly increased the effectiveness of calcium hydroxide on *E. faecalis*.

Previous studies have demonstrated that carvacrol can impede the growth of different morphological forms of *C. albicans* [45–47]. This outcome also correlates with the findings of our study, as groups with *O. dubium* exerted a good range of antimicrobial activity on *C. albicans*, with a larger zone of inhibition when compared with groups without *O. dubium*. The inhibition measurements taken after 72 h of incubation revealed that the addition of *O. dubium* further increased the effect of calcium hydroxide against *C. albicans*. The findings reported by Cacho et al. coincide with the results of our study, as they reported that carvacrol exhibited outstanding potential as a natural compound against *C. albicans* infections [48]. Returning to the present study, the data also revealed that the antimicrobial activity of the group containing calcium hydroxide, glycerin, distilled water, and *O. dubium* was significantly lower than the groups with (1) calcium hydroxide, glycerin, and *O. dubium* and (2) calcium hydroxide, distilled water, and *O. dubium*. This might be a result of the dilution of *O. dubium* in the combination, as the amount applied to each disk belonging to the different groups was equal.

According to the results of a study conducted by Moro et al., carvone was reported to be a significant antifungal agent against *C. albicans* and *Candida*-derived bacteria, with or without Tween 80, which they used for solvent control [49]. In our study, increased antifungal activity was detected as a result of mixing *M. spicata* essential oil, which contained 71.3% carvone and calcium hydroxide. In addition, McGeady et al. reported that carvone exerted an antifungal effect on *C. albicans*, inhibiting the transformation of *C. albicans* into its pathological form [50]. Piras et al. reported that the major component of *M. spicata* was 62.9% carvone, which was found to be 71.3% carvone in our study, depending on the

geographical region in which it was collected [51]. Some reports have indicated *M. spicata*'s antimicrobial potential on various bacteria species, excluding *E. faecalis* [52,53], which correlates with the results of this study.

Incubation of a combination of *M. spicata* and calcium hydroxide for 24 h did not show any significant difference in the antifungal effect on *C. albicans* when compared with the use of *M. spicata* alone. However, both groups demonstrated a significantly larger inhibition zone when compared with all other study groups. The study groups containing essential oil, calcium hydroxide, distilled water, and glycerin demonstrated a lower antifungal effect, which could be attributed to the dilution of the concentration of the effective antimicrobial agents. The 72 h incubation data indicate that *M. spicata* and calcium hydroxide exhibited synergistic antifungal activity against *C. albicans*. This could be attributed to the chemicals found in the essential oil composition, which might have induced a faster release of hydroxyl ions in this particular environment.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material

The plant materials of wildcrafted *Origanum dubium* and cultivated *Monarda spicata* were collected from Lefke, Northern Cyprus, on 10 October 2020 and 21 October 2020, respectively. Aerial parts of the former and the leaves of the latter were dried in shade, resulting in 120 g and 40 g of dried plant material, respectively. The study materials were identified by one of us (K.H.C.B.), and voucher specimens were deposited at the Herbarium of Near East University under voucher numbers NEUN6896 *O. dubium* and NEUN10263 *M. spicata*, respectively.

4.2. Isolation of Essential Oil

Dried aerial parts of *O. dubium* (120 g) and dried leaves of *M. spicata* (40 g) were separately hydro distilled with 1 L distilled water for 3 h using a Clevenger-type apparatus. The resulting essential oils were stored at 4 °C until analysis. The oil yields were calculated as %/w on a dry weight basis. The essential oil yield of *M. spicata* was 3%, while that of *O. dubium* was 5.5%.

4.3. Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Analysis

4.3.1. GC-MS Analysis

The obtained essential oil compositions were analysed simultaneously by GC-MS analysis. The GC-MS analysis was carried out using an Agilent 5977B GC-MSD system. An Innowax FSC column (60 m × 0.25 mm, 0.25 mm film thickness) was used with helium as the carrier gas (0.8 mL/min). The GC oven temperature was kept at 60 °C for 10 min, programmed to 220 °C at a rate of 4 °C/min, kept constant at 220 °C for 10 min, and then programmed to 240 °C at a rate of 1 °C/min. The split ratio was adjusted to 40:1. The injector temperature was set at 250 °C. Mass spectra were recorded at 70 eV. The mass range was from *m/z* 35 to 450.

4.3.2. GC Analysis

The GC analysis was carried out using an Agilent 7890B GC system. The FID detector temperature was 300 °C. To obtain the same elution order used with GC-MS, simultaneous auto-injection was performed on a duplicate of the same column by applying the same operational conditions. The relative percentage amounts of the separated compounds were calculated from the FID chromatograms (Figure 4).

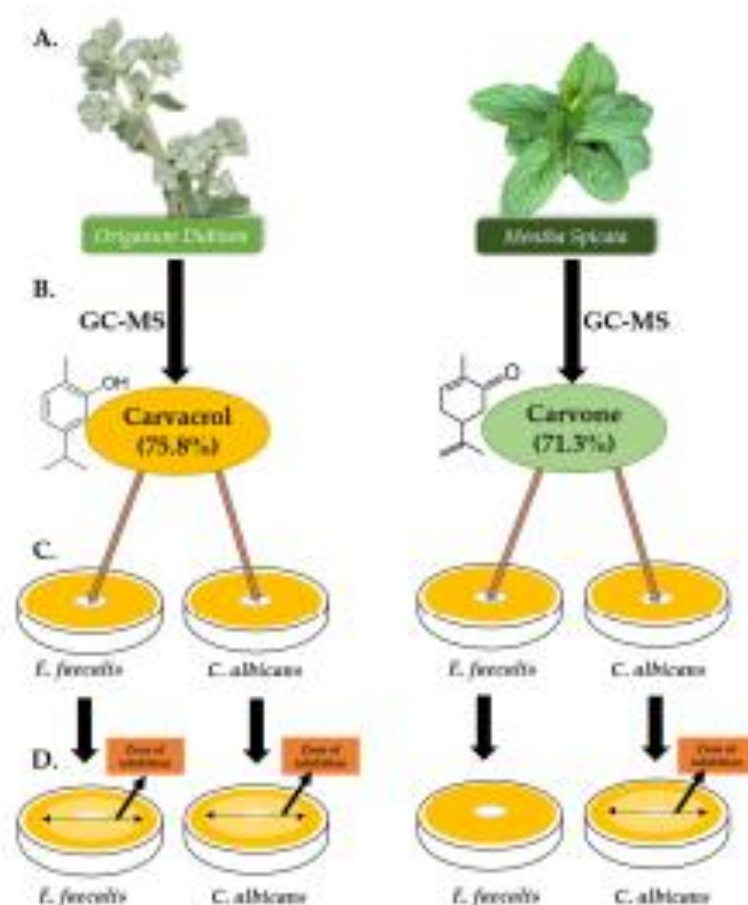


Figure 4. Graphical illustration of the study, with detailed compositions of the most abundant component of each essential oil. (A) *O. dubium* and *M. spicata* were collected, and their essential oils were extracted. (B) GC-MS analysis of both essential oils were participated. Carvacrol (75.8%) was found to be the most abundant component of *O. dubium* essential oil, whereas carvone (71.3%) was found to be the most abundant component of *M. spicata*. (C) Disk diffusion assay was carried out on 2 different microorganisms (*E. faecalis* and *C. albicans*). (D) The inhibition zones were measured for *E. faecalis* (24, 48, and 72 h) and for *C. albicans* (48 and 72 h).

4.3.3. Identification of Compounds

Identification of the essential oil components was carried out by comparison of their relative retention times with those of authentic samples or by comparison of their linear retention index (LRI) with a series of *n*-alkanes. Computer matching against commercial sources (Wiley GC/MS Library, NIST Chemistry WebBook) [54,55] and the in-house “Bayer Library of Essential Oil Constituents”, comprising genuine compounds and components of known oils, as well as MS literature data, were used for the identification [56,57].

4.4. Preparation of Bacterial and Fungal Cultures

The standard reference of *E. faecalis* used in this study was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC 29212) in the microbiology laboratory at Near East University, and the standard reference of *C. albicans* was acquired from the American Type Culture Collection (ATCC 10231) in the same microbiology laboratory (Figure 4).

4.5. Preparation of Experimental Groups

In the present study, seven different study groups were formed. The groups' ingredients were determined according to the routine protocols applied in the clinic while disinfecting root canals. Calcium hydroxide and distilled water (or saline), together with or separately from glycerin, were added to the powder chemical to prepare the aqueous mixture for washing the canals. In this study, the routine mixtures used in the clinic were also combined with *M. spicata* and *O. dubium* essential oils. A total of seven different experimental groups were formed to investigate the antimicrobial effect of each essential oil together or separately with the routinely applied protocol. For this purpose, equal proportions of different ingredients were combined, as shown in Table 3 for *O. dubium*, and Table 4 for *M. spicata*.

Table 3. Composition of *O. dubium*, calcium hydroxide, distilled water, and glycerin between different study groups.

	<i>O. dubium</i> E.O.	Calcium Hydroxide	Distilled Water	Glycerin	
<i>Origanum dubium</i> EO and Calcium Hydroxide	100 µL	0.001 g	-	-	The proportion of group ingredients
<i>Origanum dubium</i> EO and Distilled water and Calcium Hydroxide	100 µL	0.002 g	100 µL	-	
<i>Origanum dubium</i> EO and Glycerin and Calcium Hydroxide	100 µL	0.002 g		100 µL	
<i>Origanum dubium</i> EO and Distilled water and Glycerin and Calcium Hydroxide	100 µL	0.003 g	100 µL	100 µL	
Distilled water and Calcium Hydroxide	100 µL	0.001 g	-	-	
Glycerin and Calcium Hydroxide	-	0.001 g	100 µL	-	
Distilled water and Glycerin and Calcium Hydroxide	-	0.001 g		100 µL	

Table 4. Composition of *M. spicata*, calcium hydroxide, distilled water, and glycerin between different study groups.

	<i>Mentha spicata</i> EO	Calcium Hydroxide	Distilled Water	Glycerin	
<i>Mentha spicata</i> EO and Calcium Hydroxide	100 µL	0.001 g	-	-	The proportion of group ingredients
<i>Mentha spicata</i> EO and Distilled water and Calcium Hydroxide	100 µL	0.002 g	100 µL	-	
<i>Mentha spicata</i> EO and Glycerin and Calcium Hydroxide	100 µL	0.002 g		100 µL	
<i>Mentha spicata</i> EO and Distilled water and Glycerin and Calcium Hydroxide	100 µL	0.003 g	100 µL	100 µL	
Distilled water and Calcium Hydroxide	100 µL	0.001 g	-	-	
Glycerin and Calcium Hydroxide	-	0.001 g	100 µL	-	
Distilled water and Glycerin and Calcium Hydroxide	-	0.001 g		100 µL	

4.6. Disk Diffusion Assay

For the disk diffusion test, *E. faecalis* at a concentration of 10^8 CFU/mL in 100 µL suspension and *C. albicans* at a concentration of 10^8 CFU/mL in 100 µL suspension were seeded on Mueller Hinton agar plates (Biomérieux, Lyon, France) [58,59].

Seven different study groups containing calcium hydroxide and Cyprus mountain thyme oil (*O. dubium* EO) or garden mint oil (*M. spicata* EO) were tested for antimicrobial activity. For this purpose, the different groups formed were added to the sterile disks to be tested. Distilled water was chosen as a negative control for both microorganisms. Vancomycin was chosen as a positive control for *E. faecalis* and nystatin for *C. albicans*.

Agar plates for *E. faecalis* were incubated at 37 °C for 24, 48, and 72 h. *C. albicans* was incubated at 37 °C for 48 and 72 h. The inhibition zones formed around the disks on the agar plates indicated the degree of antimicrobial activity (Figure 4). Inhibition zone measurements (mm) were taken at 24, 48, and 72 h for *E. faecalis* and 48 and 72 h for *C. albicans*. Each test was repeated in triplicate to obtain reliable data.

4.7. Statistical Analysis

The inhibition zone diameter data were measured with mean standard errors. The statistical significance of the differences was examined using one-way ANOVA. Tukey's test was performed for multiple intragroup comparisons, and a *t*-test was performed for intergroup comparisons using GraphPad Prism 5.0 and SPSS for Windows. All *p* values of less than 0.05* were considered statistically significant.

5. Conclusions

According to the results of the study, the major compound found in *M. spicata* essential oil was carvone at 71.3%, whereas the major compound found in *O. dubium* essential oil was carvacrol at 75.8%. *M. spicata* essential oil was found to be ineffective against *E. faecalis*, whereas it demonstrated a superior effect on *C. albicans* at 72 h when combined with calcium hydroxide. The effect of *O. dubium* essential oil activity could be based on the enormous amount of carvacrol it contains, which induces bacterial membrane damage by decreasing the intracellular ATP level and increasing the proton permeability of the membrane, which results in the leakage of K⁺ out of the bacterial cell as an indicator of membrane damage [60]. The effect of *M. spicata* could be attributed to the rich content of carvone, which has the capacity to penetrate bacterial cells, disturbing cell membrane permeability and hence its integrity [61]. With respect to *O. dubium* oil, it was found to have very effective antimicrobial activity against both *E. faecalis* and *C. albicans*. Altogether, the data reveal that the usage of these essential oils with calcium hydroxide as intracanal medicaments exerted good antimicrobial effects and that they could be promising candidates for use in routine clinical endodontic treatments in the future.

Author Contributions: G.C. conducted the experiments and wrote the manuscript. C.S.O. carried out and supervised microbiology experiments. D.Y.H. and K.H.C.B. carried out plant identification, the GC/MS experiments, and analysis. Y.M.T. created the concept of the study, revised the manuscript and supervised the experiments. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Alghamdi, F.; Shakir, M. The Influence of *Enterococcus Faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. *Curr. Microbiol.* **2020**, *12*, e7257. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Barbosa-Ribeiro, M.; De-Jesus-Souza, A.; Zata, A.A.; Ferraz, C.C.R.; Almeida, J.F.A.; Gomes, B.P.F.A. Quantification of Lipoteichoic Acid Contents and Cultivable Bacteria at the Different Phases of the Endodontic Retreatment. *J. Endod.* **2004**, *42*, 552–556. [\[CrossRef\]](#)
- Estrela, C.; Silva, J.A.; Alencar, A.H.G.D.; Loles, C.R.; Decunzio, D.A. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*: A systematic review. *J. Appl. Oral Sci.* **2008**, *16*, 364–368. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Murad, C.F.; Sassone, L.M.; Souza, M.C.; Fidel, R.A.S.; Fidel, S.R.; Junior, R.H. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite, chlorhexidine and MTAD against *Enterococcus faecalis* biofilm on human dentin matrix in vitro. *KSBO* **2012**, *3*, 143–150.
- Barnett, A.W.; Kingsmill, V.J.; Speight, P.M. The Frequency of Fungal Infection in Biopsies of Oral Mucosal Lesions. *Oral Dis.* **1998**, *4*, 26–31. [\[CrossRef\]](#)
- Srikumar, G.P.; Kumar, R.S.; Bandia, S.; Geerjan, N.E.; Nishad, G.; Bhagat, P. Antifungal Effectiveness of Various Intracanal Medicaments against *Candida Albicans*: An In Vitro Study. *J. Contemp. Dent. Pract.* **2020**, *21*, 1042–1047. [\[CrossRef\]](#)
- Martinho, F.C.; Gomes, C.C.; Nascimento, G.G.; Gomes, A.; Leite, F. Clinical comparison of the effectiveness of 7- and 14-day intracanal medications in root canal disinfection and inflammatory cytokines. *Clin. Oral Implants.* **2018**, *22*, 523–530. [\[CrossRef\]](#)
- Donyavi, Z.; Ghaheri, P.; Esmailzadeh, M.; Kharazifard, M.; Yousefi-Mashouf, R. Antibacterial Efficacy of Calcium Hydroxide and Chlorhexidine Mixture for Treatment of Teeth with Primary Endodontic Lesions: A Randomized Clinical Trial. *Iran. Endod. J.* **2016**, *11*, 255–260. [\[CrossRef\]](#)
- Takushige, T.; Cruz, E.V.; Moral, A.A.; Hoshino, E. Endodontic Treatment of Primary Teeth Using a Combination of Antibacterial Drugs. *Int. Endod. J.* **2004**, *37*, 132–138. [\[CrossRef\]](#)
- Abouelenen, S.S.; Ibrahim, S.M.; Shaker, O.G.; Ahmed, G.M. Evaluation of Postoperative Pain in Infected Root Canals after Using Double Antibiotic Paste versus Calcium Hydroxide as Intra-Canal Medication: A Randomized Controlled Trial. *F1000Research* **2018**, *7*, 1768. [\[CrossRef\]](#)
- Ba-Hattab, R.; Al-Jamali, M.; Aldorb, H.; Alessa, L.; Alonazi, M. Calcium Hydroxide in Endodontics: An Overview. *Open J. Stomatol.* **2016**, *6*, 274–289. [\[CrossRef\]](#)
- Rehman, K.; Saunders, W.P.; Foye, R.H.; Sharkey, S.W. Calcium Ion Diffusion from Calcium Hydroxide-Containing Materials in Endodontically-Treated Teeth: An In Vitro Study. *Int. Endod. J.* **1996**, *23*, 271–279. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Estrela, C.; Holland, R. Calcium hydroxide: Study based on scientific evidences. *J. Appl. Oral Sci. Rev. FOB* **2003**, *11*, 269–282. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sharma, G.; Ahmed, H.M.A.; Zilm, P.S.; Rossi-Fedele, G. Antimicrobial Properties of Calcium Hydroxide Dressing When Used for Long-Term Application: A Systematic Review. *Aust. Endod. J.* **2018**, *44*, 40–45. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Safari, K.E.; Nichols, F.C. Effect of Calcium Hydroxide on Bacterial Lipopolysaccharide. *J. Endod.* **1993**, *19*, 76–78. [\[CrossRef\]](#)
- Solak, H.; Öztan, M.D. The pH Changes of Four Different Calcium Hydroxide Mixtures Used for Intracanal Medication. *J. Oral Rehabil.* **2003**, *30*, 436–439. [\[CrossRef\]](#)
- Gomes, B.P.F.D.A.; Ferraz, C.C.R.; Vianna, M.E.; Rosalen, P.L.; Zata, A.A.; Teixeira, F.B.; De Souza-Filho, F.J. In Vitro Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide Pastes and Their Vehicles against Selected Microorganisms. *Rev. Dent.* **2002**, *13*, 155–161. [\[CrossRef\]](#)
- Madhubala, M.M.; Srinivasan, N.; Ahmed, S. Comparative Evaluation of Propolis and Triantibiotic Mixture as an Intracanal Medicament against *Enterococcus faecalis*. *J. Endod.* **2011**, *37*, 1287–1289. [\[CrossRef\]](#)
- Yoo, Y.J.; Kim, A.R.; Perinpanayagam, H.; Han, S.H.; Kim, K.Y. *Candida albicans* Virulence Factors and Pathogenicity for Endodontic Infections. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1300. [\[CrossRef\]](#)
- Thienngern, P.; Parichattha, A.; Rattasorn, C.; Aumrute, C.; Matangkasombut, O. Efficacy of Chitosan Paste as Intracanal Medication Against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* Biofilm Compared with Calcium Hydroxide in an In Vitro Root Canal Infection Model. *Res. Sq.* **2022**. [\[CrossRef\]](#)
- Whitka, K.; Maczka, W.; Lyczko, J.; Grabarczyk, M.; Czabaszek, A.; Szumny, A. Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? *Molecules* **2019**, *24*, 2130. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Park, Y.K.; Koo, M.H.; Abreu, J.A.; Bogaki, M.; Cary, J.A.; Rosalen, P.L. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr. Microbiol.* **1998**, *36*, 24–28. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sinha, D.; Sinha, A. Natural Medicaments in Dentistry. *Ayu* **2014**, *35*, 113–118. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hargreaves, K.M.; Cohen, S.; Berman, L.H. *Cohen's Pathways of the Pulp*; Mosby Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2011; ISBN 9780323064807.
- Nosrat, A.; Behrari, B.; Sharifan, M.R.; Aligholi, M.; Mortazavi, M.S. The Effect of Carvacrol on *Enterococcus faecalis* as a Final Irrigant. *Iran. Endod. J.* **2009**, *4*, 96–100. [\[CrossRef\]](#)
- Krishnamoorthy, A.L.; Lemus, A.A.; Solomon, A.P.; Valm, A.M.; Neelakantan, P. Interactions between *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in an Organotypic Oral Epithelial Model. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1771. [\[CrossRef\]](#)
- Pinto, E.T.; Gomes, B.P.F.A.; Ferraz, C.C.R.; Teixeira, F.B.; Zata, A.A.; Souza-Filho, F.J. Evaluation of Root Canal Microorganisms Isolated from Teeth with Endodontic Failure and Their Antimicrobial Susceptibility. *Oral Microbiol. Immunol.* **2003**, *18*, 100–103. [\[CrossRef\]](#)

28. Zancan, R.F.; Vivian, R.R.; Lopes, M.R.M.; Wickwerth, P.H.; de Andrade, F.B.; Ponce, J.B.; Duarte, M.A.H. Antimicrobial Activity and Physicochemical Properties of Calcium Hydroxide Pastes Used as Intracanal Medication. *J. Endod.* **2016**, *42*, 1822–1828. [\[CrossRef\]](#)
29. Zancan, R.F.; Calefi, P.H.S.; Borges, M.M.B.; Lopes, M.R.M.; de Andrade, F.B.; Vivian, R.R.; Duarte, M.A.H. Antimicrobial Activity of Intracanal Medications against Both *Enterococcus Faecalis* and *Candida Albicans* Biofilm. *Microsc. Res. Tech.* **2019**, *82*, 494–501. [\[CrossRef\]](#)
30. Cook, J.; Nandakumar, R.; Fouad, A.F. Molecular- and Culture-Based Comparison of the Effects of Antimicrobial Agents on Bacterial Survival in Infected Dental Tubules. *J. Endod.* **2007**, *33*, 690–692. [\[CrossRef\]](#)
31. Peters, L.B.; Wesselink, P.R. Periapical Healing of Endodontically Treated Teeth in One and Two Visits Obtained in the Presence or Absence of Detectable Microorganisms. *Int. Endod. J.* **2002**, *35*, 660–667. [\[CrossRef\]](#)
32. Sathorn, C.; Parashos, P.; Messer, H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: A systematic review and meta-analysis. *Int. Endod. J.* **2007**, *40*, 2–10. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Baumgartner, J.C.; Watts, C.M.; Xia, T. Occurrence of *Candida Albicans* in Infections of Endodontic Origin. *J. Endod.* **2000**, *26*, 695–698. [\[CrossRef\]](#)
34. Slack, G. The bacteriology of infected root canals and in vitro penicillin sensitivity. *Br. Dent. J.* **1953**, *3*, 211–214.
35. Mohammadi, Z.; Shalavi, S.; Yazdizadeh, M. Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide in Endodontics: A Review. *Chonnam Med. J.* **2012**, *48*, 133–140. [\[CrossRef\]](#)
36. Gomes, B.P.F.A.; Souza, S.F.C.; Ferraz, C.C.R.; Teixeira, F.B.; Zaia, A.A.; Valdrighi, L.; Souza-Filho, F.J. Effectiveness of 2% Chlorhexidine Gel and Calcium Hydroxide against *Enterococcus Faecalis* in Bovine Root Dentine in Vitro. *Int. Endod. J.* **2003**, *36*, 267–275. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Van Der Waal, S.V.; Conrart, T.; Crieleard, W.; De Soet, J.J. In Mixed Biofilms *Enterococcus Faecalis* Benefits from a Calcium Hydroxide Challenge and Culturing. *Int. Endod. J.* **2016**, *49*, 865–873. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Silva, S.; Alves, N.; Silva, P.; Vieira, T.; Maciel, P.; Castellano, R.; Romari, P.; Veloso, C.; Albuquerque, D. Antibacterial Activity of *Rosmarinus Officinalis*, *Zingiber Officinale*, *Citrus Aurantium Bergamia*, and *Copaifera Officinalis* Alone and in Combination with Calcium Hydroxide against *Enterococcus Faecalis*. *BioMed Res. Int.* **2019**, *2019*, 8129439. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Basar, K.H.C. The Turkish *Origanum* Species. In *Oreganum: The Genus Origanum and Lippia*; Kirtizian, S.E., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2002.
40. De Vincenzi, M.; Stammati, A.; De Vincenzi, A.; Silano, M. Constituents of Aromatic Plants: Carvacrol. *FitoTerapia* **2004**, *73*, 801–804. [\[CrossRef\]](#)
41. Seghatolleslami, S.; Samadi, N.; Salehnia, A.; Azimi, S. Antibacterial Activity of Endemic *Satureja Khuzestanica* Jamzad Essential Oil against Oral Pathogens. *Iran. Endod. J.* **2009**, *4*, 5–9. [\[CrossRef\]](#)
42. Mustafa, M.; Kp, S.; Jain, D.; Sathyanarayana, S.; Arun, A.; Uppin, L. Role of Calcium Hydroxide in Endodontics: A Review. *Glob. J. Med. Public Health* **2012**, *1*, 66–70.
43. Adel, M.; Abedi, F.; Mohammadi, N.; Aligholi, M. Evaluation of Inhibitory Effect of Dentin on the Antimicrobial Effect of Carvacrol and Sodium Hypochlorite on *Enterococcus Faecalis*: An In Vitro Study. *J. Medit Dent. Sci.* **2014**, *35*, 233–242.
44. Adel, M.; Pouroushi, P.; Sharihi, M.; Javadi, A.; Falah-Abed, P.; Rahmani, N. Antimicrobial Effect of Carvacrol and Calcium Hydroxide against *Enterococcus Faecalis* in Different Layers of Dentin and Different Time Intervals. *J. Maz. Univ. Med. Sci.* **2016**, *26*, 35–43.
45. Inoue, S.; Takahashi, M.; Abe, S. Inhibitory Activity of Hydroxide, Herbal Tea and Related Essential Oils against Filament Formation and the Growth of *Candida Albicans*. *Nihon Ishikyo Gakkaishi Zasshi* **2009**, *50*, 243–252. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Lima, I.O.; Pereira, F.D.O.; Oliveira, W.A.D.; Lima, E.D.O.; Menezes, E.A.; Cunha, F.A.; Diriz, M.D.F.F.M. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *J. Essent. Oil Res.* **2013**, *25*, 138–142. [\[CrossRef\]](#)
47. Rust, J.S.; Shinde, R.B.; Chauhan, N.M.; Karuppayil, S.M. Terpenoids of Plant Origin Inhibit Morphogenesis, Adhesion, and Biofilm Formation by *Candida Albicans*. *Biofiling* **2012**, *28*, 87–96. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Teixeira, M.C.; Salgueiro, L.; Ren, C.; Zhang, C.; Jia, C.; Niu, C.; Wang, C.; Yang, Y.; Chen, R.; Zhang, J.; et al. Carvacrol Induces *Candida Albicans* Apoptosis Associated With Ca²⁺/Calcineurin Pathway. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 192. [\[CrossRef\]](#)
49. Moro, I.J.; Gondo, G.D.G.A.; Pieri, E.G.; Pietro, R.C.L.R.; Soares, C.P.; de Sousa, D.; dos Santos, A.G. Evaluation of Antimicrobial, Cytotoxic and Chemopreventive Activities of Carvone and Its Derivatives. *J. Pharm. Sci.* **2017**, *53*, 76. [\[CrossRef\]](#)
50. McGeady, P.; Wansley, D.L.; Logan, D.A. Carvone and Perillaldehyde Interfere with the Serum-Induced Formation of Filamentous Structures in *Candida Albicans* at Substantially Lower Concentrations than Those Causing Significant Inhibition of Growth. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 953–955. [\[CrossRef\]](#)
51. Piras, A.; Porceddu, S.; Falconieri, D.; Mania, A.; Gonçalves, M.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L. Antifungal Activity of Essential Oil from *Mentha Spicata* L. and *Mentha Pulegium* L. Growing Wild in Sardinia Island (Italy). *Nat. Prod. Res.* **2021**, *35*, 993–999. [\[CrossRef\]](#)
52. Soković, M.; Vukojević, J.; Marin, P.; Bekić, D.; Vajs, V.; van Griensven, L. Chemical Composition of Essential Oils of Thymus and Mentha Species and Their Antifungal Activities. *Molecules* **2009**, *14*, 238. [\[CrossRef\]](#)
53. Rath, S.; Padhy, R.N. Monitoring in Vitro Antibacterial Efficacy of 26 Indian Spices against Multidrug Resistant Urinary Tract Infecting Bacteria. *Integr. Med. Res.* **2014**, *3*, 135–141. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. McLafferty, F.W.; Stauffer, D.B. *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*; Wiley: New York, NY, USA, 1989; Volume 1.

55. Stein, S.E. "Mass Spectra" NIST Mass Spec Data Center. In *NIST Chemistry WebBook*; Linstrom, P.J.P., Ed.; National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, MD, USA, 1998; Volume 9, pp. 1–1951.
56. Kelsey, R.G. The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons By D. Joulain (Robertet S. A.) and W. A. König (University of Hamburg). E. B. Verlag, Hamburg, 1998. 661 Pp. 21 × 29.5 Cm. \$700.0. ISBN 3-930826-48-8. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1212–1213. [\[CrossRef\]](#)
57. ESO 2000—The Complete Database of Essential Oils. Available online: <http://www.leffingwell.com/bactasoc.htm> (accessed on 8 February 2022).
58. Lee, S.C.; Fung, C.P.; Lee, N.; See, L.C.; Huang, J.S.; Tsai, C.J.; Chen, K.S.; Shieh, W.B. Fluconazole Disk Diffusion Test with Methylene Blue- and Glucose-enriched Mueller-Hinton Agar for Determining Susceptibility of *Candida* Species. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 1615–1617. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Nayyar, P.; Sethi, A.; Thakur, D.; Khullar, S.; Gayat, S.; Adash, K. Antibacterial Effect of Silver Nanoparticle Gel as an Intracanal Medicament in Combination with Other Medicaments against *Enterococcus Faecalis*: An In Vitro Study. *J. Pharm. Biomed. Sci.* **2021**, *13*, S408. [\[CrossRef\]](#)
60. Baser, K.H.C. Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. *Curr. Pharm. Desing* **2008**, *14*, 3106–3120. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Bouyahya, A.; Mechchate, H.; Berrai, T.; Ghchime, R.; Charfi, S.; Salahbibi, A.; Burkov, P.; Shariati, M.A.; Lomen, J.M.; Omari, N.; et al. Biomolecules Health Benefits and Pharmacological Properties of Carvone. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1803. [\[CrossRef\]](#)

Ek 2. İntihal Raporu

İKİ FARKLI UÇUCU YAĞ İLE KARIŞTIRILMIŞ KALSİYUM HİDROKSİTİN ANTİMİKROBİYAL VE ANTİFUNGAL ETKİNLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

%5	%4	%2	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	docs.neu.edu.tr İnternet Kaynağı	%2
2	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
3	Submitted to Adnan Menderes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
4	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	www.gecekitapligi.com İnternet Kaynağı	<%1
6	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<%1
7	Phillip G. Turner. "Simulation of high- and low- resolution mass spectra for assessment of calibration methods", Rapid Communications in Mass Spectrometry, 02/15/2007 Yayın	<%1

8	acikerisim.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
9	BAYAZ, Mehmet. "Esansiyel Yağlar: Antimikrobiyal, Antioksidan ve Antimutajenik Aktiviteleri", Sidas Medya Limited Şirketi, 2014. Yayın	<%1
10	Francisco Carlos Groppo. "Use of phytotherapy in dentistry", Phytotherapy Research, 08/2008 Yayın	<%1
11	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	<%1
12	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
13	YILMAZ, Gülşen, NUR, Bilge Gülsüm, TANRIVER, Mehmet, ALTUNSOY, Mustafa and OK, Evren. "Revaskülarizasyon ve Uygulama Yöntemleri", Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, 2016. Yayın	<%1
14	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
15	www.ubaksymposium.org İnternet Kaynağı	<%1

- | | | |
|-------|---|-----|
| 16 | ALTUNER, Ergin Murat, ÇETİN, Barbaros and ÇÖKMÜŞ, Cumhur. "Tortella tortulosa (Hedw.) Limpr. özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi", Kastamonu Üniversitesi, 2010.
<small>Yayın</small> | <%1 |
| <hr/> | | |
| 17 | KAYAOĞLU, Güven, AKÇA, Gülçin and ERTEN, Hülya. "Geleneksel endodontik dezenfektanların Enterococcus faecalis üzerinde antibakteriyel etkinliğinin incelenmesi", Gazi Üniversitesi, 2010.
<small>Yayın</small> | <%1 |
| <hr/> | | |
| 18 | livros01.livrosgratis.com.br
<small>İnternet Kaynağı</small> | <%1 |
| <hr/> | | |
| 19 | pubmed.ncbi.nlm.nih.gov
<small>İnternet Kaynağı</small> | <%1 |
| <hr/> | | |

[Alıntılar çıkart](#)

[Kapat](#)

[Eşleşmeleri çıkar](#)

[Kapat](#)

[Bibliyografyayı Çıkart](#)

[Kapat](#)

Özgeçmiş

Adı	Gökalp	Soyadı	COŞAN
Doğum Yeri	Lefkoşa	Doğum Tarihi	17/07/1995
Uyruğu	KKTC	Tel	+905338448481
Email	gokalp.cosan@neu.edu.tr		

Eğitim Düzeyi	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Yakın Doğu Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi	2018
Lise	Lefke Gazi Lisesi	2013

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Araştırma Görevlisi	Yakın Doğu Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi	2018-Halen

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok İyi	Çok İyi	Çok İyi

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
MICROSOFT Office Programları	Çok İyi