
	SAKARYA UNIVERSITY JOURNAL OF SCIENCE		 SAKARYA UNIVERSITY
	e-ISSN: 2147-835X http://www.saujs.sakarya.edu.tr		
	<u>Received</u> 03.08.2017 <u>Accepted</u> 17.04.2018	<u>Doi</u> 10.16984/saufenbilder.332517	

***Salvadora Persica* (misvak) bitkisinden elde edilen uçucu yağın antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması**

Elif Apaydın*¹

Öz

Bu çalışmanın amacı; *Salvadora persica* (misvak) bitkisinden elde edilen uçucu yağın antioksidan ve antimikrobiyal etkilerini araştırmaktır. Bu bitkinin çalışılma sebebi; misvağın uzun zamandır tüm dünyada diş sağlığı ve temizliği alanında kullanılmasıdır. Bu çalışma farklı spektroskopik yöntemler ve GC-MS (gaz kromatografisi kütle spektrofotometresi) ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla 250 gram toz misvak numunesinin, hidrodistilasyon yöntemi ile yağ ekstraksiyonu yapılmıştır. Kaçak su molekülünün olabileceği ihtimaline karşın susuz Na₂SO₄ ile su uzaklaştırılmış ve yağ 4 °C buzdolabında bekletilmiştir. Uçucu yağ bileşenleri GC-MS ile tanımlanmıştır. Uçucu yağların antimikrobiyal özellikleri disk difüzyon yöntemi ile Parvathy ve arkadaşları metoduna göre yapılmıştır. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikal süpürme ve hidrojen peroksit süpürme kapasitesi spektrofotometrik yöntemler ile yapılmıştır ve farklı mineraller ile ağır metaller ICP-MS (indüktif çiftlenmiş plazma kütle spektrofotometresi) ile analiz edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Salvadora Persica*, uçucu bileşen, antioksidan aktivite, antimikrobiyal aktivite, GC-MS.

Investigation of antioxidant and antimicrobial activity of essential oil from *Salvadora Persica* (miswak)

Abstract

The purpose of this study that investigation antioxidant and antimicrobial activity by various methods of essential oil *Salvadora persica* (miswak) because the choice of this plant that have used for long time to improve dental health and to get oral hygiene, throughout the World. It was tried to be explained as follows GC-MS (gas chromatography mass spectrometry) and spectrophotometric individually and in combination. For this purpose; the essential oils of miswak (250 g) were obtained by hydrodistillation at 100 °C with a clevenger-type apparatus. The essential oils obtained were separated from water and dried over anhydrous Na₂SO₄, and stored at 4 °C. The components of the essential oil were identified by GC-MS analyses. The antimicrobial assay of the essential oils was tested by the pour plate method according to the reports of Parvathy et al. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radicals scavenging assay and superoxide anion radical scavenging activity were measured spectrophotometric method. The difference mineral and heavy metals would explain with ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer).

Keywords: *Salvadora Persica*, essential oil, antioxidant activity, antimicrobial activity, GC-MS

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author

¹ Giresun Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi, elifrenapaydin@gmail.com

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Salvadora Persica latince adıyla bilinen yanısıra misvak, sivak, arak çubuğu olarak da isimlendirilen bu bitkinin arapçadan gelen anlamı, dişlere temizlik amacıyla sürtülen çubuk olarak geçer [1-2]. Batı Hindistan'da çok geniş bir coğrafi dağılıma sahip yabancı büyüyen ağaç; Pakistan, Afganistan, Arap yarımadası, Ürdün, Mısır üzerinden batıda Moritanya'ya ve Kuzey Afrika'dan Güney Afrika'ya kadar uzanmaktadır [3].

Bu bitkinin dalları, asırlardır doğal diş fırçası olarak kullanılır ve bunun ağız hijyeninde özellikle diş plağını engellemede kullanımı Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından desteklenmektedir [4]. Diş plağı; diş kayıplarının ve periodontal hastalıkların başlıca nedenidir [5]. Maalesef bu durumların biri ya da herbiri her yaşta görülebilmektedir. Periodontal hastalıklar diş eti ve dişleri destekleyen diğer dokuları etkileyen iltihabi hastalıklardır. Diş kayıplarının % 70' i periodontal hastalık temellidir [4].



Şekil 1. Misvak (miswak)

Bir çalışmaya göre misvak analizinde; salvadorin, klorür, florür, silis, kükürt, hardal yağı, reçine, kalsiyum, fosfor, flavonidler ve sterol bileşenleri mevcuttur [6-7]. Bu bileşenlerin ağız sağlığı üzerinde etkili özellikleri vardır [6,8,9].

Misvağın oral bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkileri üzerine yapılan son in vitro çalışmalar, ham ekstraktın *Bacteroides gingivalis*'e ve diğer siyah pigmentli *Bacteroides*'e [11], ayrıca *Streptococcus mutans*'a, salivarilere ve mitis'e ve *Staphylococcus aureus*'a karşı etkili olduğunu göstermiştir [10].

Tıbbi kullanımlarına göz önüne alındığında; arak (misvak) ağacı diüretik, antigastrit olarak kullanılmaktadır. Romatizma, öksürük ve astım, düşük kolesterol plazma seviyeleri, gastrik mukozanın bileşenlerini yeniden oluşturma ve laksatif olarak dişhekimliğinde solunum hastalıkları ve diş temizliğinde kullanım alanları sıralanmaktadır [12,13].

Tüm bu bilgilerin ışığında misvak ve misvak ürünleri kullanımının diş sağlığı açısından önemi bilimsel olarak sunulmak istenmiştir. Bunun yanısıra çalışmanın orijinalliği; direkt bitkinin uçucu yağında biyoaktivitenin incelenmiş olmasından ileri gelmektedir.

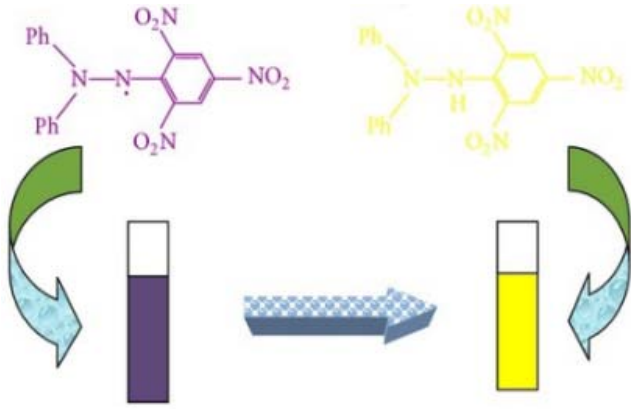
2. MATERYAL VE METOT (MATERIALS AND METHOD)

Ekstraksiyon Hazırlama (Extraction)

Clevenger aparatı kullanılarak 250 gram toz misvak numunesinin, hidrodistilasyon yöntemi ile yağ ekstraksiyonu yapılmıştır. Kaçak su molekülünün olabilme ihtimaline karşın susuz Na₂SO₄ ile su uzaklaştırılmış olup ve yağ 4 °C buzdolabında bekletilmiştir.

2.1. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Tayini (Determination of DPPH Free Radical Scavenging Activity)

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) kararlı yapıda bir azot radikalidir. Etanol içindeki mor renkli DPPH çözeltisine antioksidanların ilave edildikten sonra DPPH, antioksidan tarafından indirgenir ve solarak çözeltinin rengi sarıya doğru kayar. Bunun sonucu olarak reaksiyonun ilerleyişi spektrofotometre ile izlenir [14]. DPPH'in renginin solması antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır.

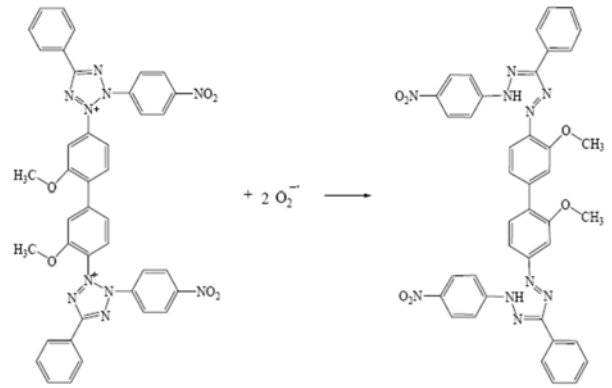


Şekil 2. DPPH Molekülünün Antioksidan Madde ile Reaksiyonu (Reaction of DPPH Molecule with Antioxidant Substance)

2.2. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi Tayini (Determination of Superoxide Anion Radical Scavenging Activity)

Bitki yağında hidrojen peroksit giderme yeteneği Ruch ve ark. metotuna göre çalışılmıştır [15]. Bu yöntemde, reaksiyon ortamına eklenen belirli miktardaki hidrojen peroksit çözeltisinin bitki ekstraktı tarafından yıkılması 230 nm'deki absorbans değişimiyle izlenmiştir. Standart reaktif olarak BHT ve C vitamini kullanılmıştır.

Bu yöntem pH=8'e ayarlanmış tampon ortamında nikotinamitadenin dinükleotit (NADH) ile fenazinmetasülfat (PMS) arasındaki tepkime sonucu açığa çıkan süperoksit anyon radikalının ($O_2^{\cdot-}$), nitroblütetrazolyum (NBT) boyasının rengini gidermesine dayanır. Süperoksit, NBT ile reaksiyona girdiğinde önce monoformazon sonra diformazon oluşur. NBT boyası 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermezken diformazon bu dalga boyunda yüksek absorbans vermektedir. Antioksidanlar oluşan $O_2^{\cdot-}$ 'i gidererek NBT boyasının 560 nm'deki absorbansında azalma sağlarlar. Absorbanstaki düşüşün fazla olması antioksidanın $O_2^{\cdot-}$ 'i çok iyi giderdiğini göstermektedir [16].



Şekil 3. NBT'den diformazon oluşumu (Diformazon formation from NBT)

GC-MS Analizi (GC-MS Analysis)

Misvak yağında uçucu bileşenlerin analizi Agilent marka ve model olarak 7890A - (5975C inert MSD) GC-MS cihazı kullanılarak yapılmıştır. 1 dk/mL He gaz akışı, 1 µL enjeksiyon hacmi ve Agilent HP-5MS (30 m x 0,250 mm, 0,25 µm film kalınlığı) kapiler kolon ile 0-2 dk 50 °C, 2-10 dk 120 °C, 15-34. dk. 280 °C sıcaklık programı kullanılmıştır [16]. Sonuçlar Wiley ve NIST kütüphanesi kullanılarak yorumlanmıştır.

Antimikrobiyal Aktivite (Antimicrobial Activity)

Antibiyotiğe dirençli patojenik mikroorganizma etkilerindeki artış, pek çok bitki sekonder metabolitin antimikrobiyal aktivite konusunda araştırılması için merak uyandırmıştır. Bitkiler sahip oldukları fitokimyasallardan dolayı önemli birer araştırma kaynağı haline gelmişlerdir.

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* ATCC 25923 *Escherichia coli* ATCC 35218 Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden temin edilmiştir.

Disk difüzyon yöntemi ile misvak yağı, çalışılan bakteriler üzerinde denendi. MHB içerisinde test mikroorganizmalarının gece kültürleri hazırlandı. Gece kültüründen 108 CFU/mL bakteri içeren (108 CFU/mL bakteri yoğunluğu 0.5 McFarland standard konsantrasyonuna göre spektrometrede ölçüldü) 300 µL süspansiyon MHA üzerine yayıldı. MHA üzerine 5 mm çapındaki steril diskler bırakıldı. Petri üzerindeki disklerle sırayla 20'şer µL bakteri solüsyonları ekildi. Steril su (negatif kontrol) ve standart antibiyotik diskleri (pozitif kontrol) ilave edildi. Petriler 2 saat buzdolabında bekletildikten sonra 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnhibisyon zonları milimetrik olarak

ölçüldü. Tüm testler iki tekrarlı olarak yürütüldü [17].

3. BULGULAR (RESULTS)

DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Tayin Sonucu (Determination of DPPH Free Radical Scavenging Activity)

DPPH serbest radikali giderim aktivitesi 1000 µg/mL konsantrasyon değerinde tayin edildi. Standart olarak kullanılan BHT ve troloksa göre aktivite karşılaştırmaları yapıldı.

Standart olarak kullanılan; troloks % 87,69 (±0,19) BHT % 74,44 (±0,15) şeklinde DPPH serbest radikali süpürme yüzdesi hesaplanmıştır.

DPPH serbest radikali süpürme aktivitesi misvak yağı için; % 9,167 ± 0,013 değerindedir. Analizler 3'er tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.1. H₂O₂ Giderme Aktivitesi Tayin Sonuçları (Determination Results of H₂O₂ Removal Activity)

Bitki yağının H₂O₂ giderim aktivitesi Ruch vd.'nin (1989) metoduna göre yapıldı [15]. Reaksiyon ortamındaki H₂O₂ % 100 uzaklaştırılmamasına rağmen, standart ve numune analizleri sonucu aşağıdaki gibidir.

Standart olarak BHT ve C vitamini kullanıldı ve misvak yağı, bu iki standart madde ile karşılaştırıldı.

BHT % inhibisyon sonucu=62,80 ± 0,10

C vitamini % inhibisyon sonucu=49,93 ± 0,20

Misvak yağı % inhibisyon =24,12 ± 0,10

şeklindedir.

Analizler 3'er tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Misvak yağının GC-MS ile uçucu bileşen analizi (Volatile component analysis of misvak oil by GC-MS)

Uçucu yağın GC-MS analizi sonucunda Wiley kütüphanesine göre belirlenen bileşenler şöyledir;

- % 87 benzerlikle benzeneethanamine,
- % 96 benzerlikle 1,4-methanol azulene ve
- % 87 benzerlikle tetracosane

Yüzde olarak en çok açığa çıkan bileşenler olarak sıralanmıştır.

Tablo.1' de gösterildiği üzere; bileşenlerin alıkonma zamanı ve yüzde bulunurluğu verilmiştir.

Tablo 1. Uçucu bileşenlerin GC-MS sonucu (GC-MS result of volatile components)

Bileşen	Yüzde bulunurluğu %	Alıkonma zamanı (dk)
benzeneethanamine	87	9,830
1,4-methanol azulene	96	12,407
tetracosane	87	28,263



Şekil 4. Misvak yağının GC-MS analiz kromatogramı (GC-MS analysis chromatogram of misvak oil)

Antimikrobiyal Aktivite Tayin Sonuçları (Antimicrobial Activity Determination Results)

Antimikrobiyal aktivite tayininde kontrol grubu olarak gentamicin antibiyotiği kullanılmıştır. Tablo 2'de de görüldüğü gibi misvak yağı S. Aureous ve E. Coli bakterilerine karşı sırasıyla; 4 ve 18 mm çaplarında zon oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Tablo 2. Salvadora persica yağının disk difüzyon testi sonucu (Disk diffusion test result of salvadora persica oil)

Mikroorganizma	Salvadora persica uçucu yağı	Pozitif kontrol GM*	Negatif kontrol Steril su

Staphylococcus aureus	4	15	-
Escherichiae coli	18	19	-

*İnhibisyon zonları mm'dir. Petri kapları 6 mm'dir. GM (gentamicin)

Ekstraktların oluşturdukları zon çapları 14 mm'den küçük ise mikroorganizma dirençlidir, zon çapı 14-17 mm arasında ise az duyarlı ve 17 mm'den büyük ise duyarlı olarak kabul edilmiştir [20]. Bu ifadeye göre; misvak yağı, E.Coli bakterisi üzerinde kullanılan antibiyotik kadar duyarlıdır ve aktivite göstermiştir. Yağ; her iki bakteri üzerinde de pozitif kontrol grubu olarak kullanılan antibiyotiğe kıyasla daha büyük zon oluşturmamıştır. Bu durum, kontrol olarak kullanılan antibiyotikten daha fazla aktif antimikrobiyal özellik göstermediğini ifade etmektedir.

3.3. ICP-MS ile Ağır metal analizi (Heavy metal analysis with ICP-MS)

Misvak yağının ICP-MS analiz sonuçları ve mikrodalga yakma işlemi ile sıvılaştırılmış toz halindeki misvak numunesinin ICP-MS analiz sonuçları Tablo 3' de verildiği gibidir ve toz haldeki misvak numunesinin ICP-MS ile ağır metal analiz sonucunun, yağ numunesine göre daha fazla olduğu görülmektedir.

Tablo 3. ICP-MS ile Ağır metal analiz sonuçları (Results of heavy metal analysis with ICP-MS)

	Misvak yağ numunesi (ppm)	Misvak toz numunesi (ppm)
Co	212,46± 0,008	262,86± 0,009
Ni	2375,76± 0,007	3396,16± 0,014
Cu	4581,78± 0,012	5595,38± 0,010
Zn	5712,41± 0,011	7012,11± 0,009
Ag	15,43± 0,010	17,33± 0,012
Pb	856,77± 0,014	931,97± 0,011

4. TARTIŞMA (DISCUSSIONS)

Başlangıç olarak uçucu yağın ekstraksiyonu işlemi çalışmanın en önemli basamağını teşkil etmektedir. Defaatle yenilenen ekstraksiyon

sonuçları; en iyi sonuçları sağlamıştır. Tüm bu analitik ölçümler sonucunda misvak yağının DPPH aktif olduğu ve hidrojen peroksit süpürme kapasitesine sahip olduğu; dolayısı ile antioksidan aktivitesi gösterdiği sonucuna varılmıştır. Uçucu yağın literatürde yer alan misvak bitkisinin alkol ve sulu ekstraktına oranla çalışmamızda kullanılan bakterilere karşı daha fazla antimikrobiyal aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır [19]. Bu sonuç da yine çalışmanın özneliği ve önemini teşkil etmektedir. GC-MS analizi ile kalitatif bir ayırım yapılmış ve ağız hijyeninde etkili olan, literatürle paralel maddelerin varlığına rastlanmıştır. Bu maddelere örnek olarak literatürde yer alan ve misvak yağında da karşılaşılan; 1,4-methanol azulene, thymol verilebilir [18]. ICP-MS ile uçucu yağın ağır metal tayin sonuçlarının kuru misvak sonuçları ile farkı sergilenmiştir. Ağır metal sonuçları arasında çok büyük fark olmamasına rağmen; toksik etkisi bilinen çinkonun, toz kuru misvak bitkisinde 2 ppm değerinde fazla olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bilimsel çalışmada; misvak bitkisinin yağ olarak bazı antioksidan aktivite testleri kuru haldeki numunenin antioksidan aktivite testlerine göre daha fazla sayısal sonuç göstermiştir. Bu sonuç; bu bitkinin, toz ve katı halde kullanımının yanı sıra yağ olarak da kullanımının önemini sergilemektedir.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- [1] V. O. Rotimi and H. A. Mosadomi, "The Effect of Crude Extracts of nine African Chewing Sticks on Oral Anaerobes, *Journal of Medicinal Microbiology*", 23, 55–60, 1987.
- [2] O. O. Odebiyi and E. A. Sofowara, "Antimicrobial Alkaloids from a Nigerian Chewing Stick (*Fagara zanthoxyloides*)", *Planta Medica*, 36: (7), 204–207, 1979.
- [3] O. O. Odebiyi and E. A. Sofowara, "Antimicrobial Alkaloids from a Nigerian Chewing Stick (*Fagara zanthoxyloides*)", *Planta Medica*, 36: (7), 204–207, 1979.
- [4] W.H.O., Prevention of Oral Diseases. Geneva, 1987.
- [5] WHO., Concensus Statement on Oral Hygiene, *Int Dentist Journal*. 2000;50, 139.

- [6] M. I. H. Farooqui, and J.G. Srivastava, “The tooth brush tree”, *Quarterly Journal of Crude Drug Research*, 8:1297-1299, 1968.
- [7] S. T. Ezmirly, M. S. El-Nasr, “Isolation of Glucotropaeolin from *Salvadora Persica L.*”, *Chemical Society Pakistan*, 3:9-12, 1981.
- [8] L. E. Wolinsky and E. O. Sote, “Isolation of Natural Plaque-Inhibiting Substances from ‘Nigerian Chewing Sticks’”, *Caries Research*, 18, 216–225, 1984
- [9] D. N. Chen, A. V. Dogan and M. M. Dogan, *Journal Elec.Micro.Tech.*, 5, 145, 1987.
- [10] F. N. Hattab, “Meswak: The Natural Toothbrush”, *Journal Clinical Dentist*, 8:125–129, 1997; *Conference on Computers & Industrial Engineering*, pp. 623–628, 2009.
- [11] A. M. Jansen, J. C. Schaffer and A. Bergheim-Svendsen, “Antimicrobial Activity of Essential Oils”, *a-Literature Review*, 1976-1986. Aspects of the test methods, *Planta Medica*, 53:(5) 395–408, 1987.
- [12] B. H. El-Tawil, “Chemical Constituents of Indigenous Plants Used in Native Medicine of Suidi Arabia”, II. *Arab Gulf Journal Scient Res.*; 1:395–419, 1983.
- [13] E. M. Gallati, A. M. Forestieri, M. T. Monforted Aquino and A. Rossitto Second *International Symposium on Natural Drugs, Abstracts*, Maratea, September 28–October 1, 1997.
- [14] M. S. Blois, “Antioxidant determinations by the use of a stable free radical”, *Nature*, 181: 1199–1200, 1958.
- [15] R. J. Ruch, S. J. Cheng, J. E. Klaunig, “Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea” *Carcinogenesis*, 10 (6), 1003-1008, 1989.
- [16] S. S. Chu, Q. R. Liu, Z. L. Liu, “Insecticidal Activity and Chemical Composition of the Essential oil of *Artemisia Vestita* from China Against *Sitophilus Zeamais*”, *Biochemical Systematics and Ecology*, 38: 489–492, 2010.
- [17] C. L. Saris, S. I. Tabarkapa, M. B. Beljkas, C. A. Misan, B. M. SAKAT, V.D. Plavsis, “Antimicrobial Activity of Plant Extracts from Serbia”, *Food Processing, Quality and Safety*, 1(2): 1-5, 2009.
- [18] F. Alali, T. Al-Lafi, “GC-MS Analysis and Bioactivity Testing of the Volatile Oil from the Leaves of the Toothbrush Tree *Salvadora persica L.*”, *Natural Product Research*, 17:3, 189-194, 2010.
- [19] Al-Bagieh, N., Almas, K., “In vitro antibacterial effects of aqueous and alcohol extracts of miswak (chewing sticks)” *Cairo Dentist Journal*, 13, 221–224, 1997.
- [20] Albayrak, A. “Ceviz Yaprakları Özütleri ve Juglonun Bazı Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi” *Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kütahya* pp. 35, 2006.