

***Streptococcus Mutans* ve *Enterococcus Faecalis* Üzerinde Propolis Ekstresi, Karadut Ekstresi, Klorheksidin Glukonat İçeren Üç Farklı Solüsyonun Antimikrobiyal Etkisinin Karşılaştırılması**

Comparison Of The Antimicrobial Effects of Three Different Solutions Containing Propolis Extract, Mulberry Extract, And Chlorhexidine Gluconate On *Streptococcus Mutans* And *Enterococcus Faecalis*

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, propolis ekstresi, karadut ekstresi ve klorheksidin glukonat'ın *Streptococcus mutans* ve *Enterococcus faecalis* üzerindeki antimikrobiyal etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntemler: Bu amaçla propolis ve *Morus nigra*'nın ekstraktları etanol ve metanol yöntemi kullanılarak hazırlandı. CHG, metanolik *Morus nigra* ekstraktı ve iki farklı etanolik propolis (ticari propolis ve yerel Pervari propolisi) ekstraktı steril ve boş antibiyotik disklerine emdirilerek *Streptococcus mutans* ve *Enterococcus faecalis* üzerine antimikrobiyal etkileri disk difüzyon yöntemiyle saptandı.

Bulgular: Çalışma da özellikle Kloreben'in hızlı ama sınırlı bir antimikrobiyal etki gösterdiği, *Morus nigra*'nın etkisiz olduğu ve propolis ekstraktlarının suşlara bağlı olarak değişen etkiler gösterdiği saptandı.

Sonuç: Sonuç olarak, propolis ekstraktlarının antimikrobiyal etkisinin propolis türüne bağlı olarak değiştiği, CHG 'nin güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği ve *M. nigra*'nın antimikrobiyal etkisinin olmadığı görüldü. Doğal kaynaklardan elde edilen bileşenlerin mikroorganizmalara etkilerini daha ayrıntılı bir şekilde anlamak ve bu bulguların klinik uygulamalara nasıl yansıtılabileceğini değerlendirmek, bakterilere karşı etkili ve güvenilir bir mücadele stratejisi geliştirmeyi hedeflemek açısından daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu sonucuna varıldı. Ayrıca, elde edilen etkinin hem bakteri suşlarına hem de kullanılan doğal ajan türlerine göre farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu durum, biyolojik çeşitliliğin antimikrobiyal potansiyel üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: *S. mutans*, *E. faecalis*, Klorheksidin Glukonat, Propolis, *Morus nigra*, Antibakteriyel Etki.

ABSTRACT

Objective: In this study, it is aimed to investigate the antimicrobial effects of propolis extract, black mulberry extract and chlorhexidine gluconate on *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*.

Materials and Method: For this purpose, extracts of propolis and *Morus nigra* were prepared using the ethanol and methanol method. Chlorobene, methanolic *Morus nigra* extract and two different ethanolic propolis (commercial propolis and local Pervari propolis) extracts were absorbed into blank papers and their antimicrobial effects on *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis* were determined by the disk diffusion method.

Results: In the study, it was determined that Chloroben showed a rapid but limited antimicrobial effect, *Morus nigra* was ineffective, and propolis extracts showed varying effects depending on the strains.

Conclusion: As a result, it was seen that the antimicrobial effect of propolis extracts varied depending on the type of propolis, chloroben had a strong antimicrobial effect, and *morus nigra* had no antimicrobial effect. It was concluded that further studies are needed to understand the effects of ingredients obtained from natural sources on microorganisms in more detail and to evaluate how these findings can be reflected in clinical practices, and to aim to develop an effective and reliable fight strategy against bacteria. Additionally, the observed antimicrobial effect varied depending on both the bacterial strains and the types of natural agents used, highlighting the role of biological diversity in antimicrobial potential.

Key Words: *S. mutans*, *E. faecalis*, Chlorhexidine Gluconate, Propolis, *Morus nigra*, Antibacterial Effect.

Mustafa TAŞKIN¹

ORCID: 0009-0006-8164-4837

Yaşar TEL¹

ORCID: 0000-0001-7848-3899

¹Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji A.D., Şanlıurfa, Türkiye



Geliş tarihi / Received: 29.03.2025

Kabul tarihi / Accepted: 04.08.2025

İletişim Adresi /Corresponding Adress:

Mustafa TAŞKIN

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji A.D., Şanlıurfa, Türkiye

E-posta/e-mail: mustafataskinturkiye1@gmail.com

Ağız sağlığı, genel sağlığın önemli bir parçası olup, diş çürükleri, kök kanal enfeksiyonları ve benzeri problemler, çoğunlukla bakteriyel etkenlerle alakalıdır. Bu kapsamda, *Streptococcus mutans* ve *Enterococcus faecalis* gibi bakteriler, diş çürükleri ve endodontik enfeksiyonlarda ve birçok sistemik hastalıkta önemli rol oynayan mikroorganizmalardır (1).

İnsan mikrobiyotasının bir parçası olarak, *S. mutans*, deri ve mukoza, ağız, boğaz, burun, sindirim ve genital sistemlerde normal flora da bulunabilmektedirler (2). *S. mutans*, diş yüzeyinde kolonize olur ve fermente edilebilir karbonhidratların varlığında sert diş yapısına zarar verir. *S. mutans*'ın, biyofilm oluşturma yeteneğinin yüksek olması nedeniyle insan diş çürüklerinden sorumlu başlıca çürük yapıcı patojen olduğu tespit edilmiştir (3). Enterokoklar, genellikle bağırsak kommensal bakterileri olarak görülse de hastane kaynaklı enfeksiyonlar arasında önemli bir role sahiptirler (4). *E. faecalis*, ağız içi enfeksiyonların başlıca etkenlerinden biridir ve immünsupresif hastalarda ve uzun süreli hastane yatışları geçirenlerde daha sık görülme eğilimindedir (5). *E. faecalis*, diş hekimliğinde bilinen en dirençli bakterilerden biri olup, ağız boşluğunda kronik periodontitiste, dişeti çekilmesi ve kemik rezorpsiyonu gibi çeşitli hastalıklara neden olabilir. Ayrıca, peri-implantitis gibi implant çevresindeki enfeksiyonlarda da sıklıkla *E. faecalis* izole edilmiştir (6).

Propolis, arıların bitkilerin filiz ve tomurcuklarından topladığı reçinemi maddeler ve bitki salgılarını, başlarındaki guddeler tarafından salgılanan enzimlerle birlikte biyokimyasal olarak değiştirerek oluşturdukları bir karışım olan doğal bir üründür, ayrıca antimikrobiyal özellikleri ile de bilinmektedir (7). Karadut, antioksidan ve antienflamatuar özelliklere sahip olup ayrıca potansiyel antimikrobiyal etkileriyle dikkat çekmektedir (8). Karadutun kanser karşıtı, mikropara karşı etkili, diyabeti önleyici, iltihapları azaltıcı ve antioksidan özellikleri bulunmaktadır (8). Yapılarında varlıklarıyla bilinen fenolik bileşiklerin, özellikle antosiyaninlerin bulunması, antioksidatif özelliklerini artırır (9). Klorheksidin glukonat ise yaygın olarak kullanılan çok önemli bir antiseptiktir (10). Klorheksidin diglukonat, anti-plak etkisiyle bilinen bir biguanid türevidir ve tıpta geniş spektrumlu antiseptik olarak kullanılmaktadır. Klorheksidin, düşük konsantrasyonlarda bakteriyostatik, yüksek konsantrasyonlarda ise bakterisid etkiye sahiptir (11). Propolis, karadut ve klorheksidin glukonat içeren solüsyonların oral mikroorganizmalar üzerindeki etkilerine dair ve bunları kıyaslayan literatürde, kapsamlı bir araştırma yapılmamıştır. Bu çalışmanın temel amacı, propolis, karadut ve klorheksidin glukonat içeren solüsyonların, *S. mutans* ve *E. faecalis* üzerindeki antimikrobiyal etkilerini araştırmaktır. Bu çalışmanın

yapılması, söz konusu bakterilere karşı etkili ve güvenilir bir mücadele stratejisi geliştirmek için önemlidir. Bu çalışmayı özgün kılan unsurlar arasında, aynı anda hem disk difüzyon hem de tüp dilüsyon yöntemlerinin kullanılmış olması, CHG ile birlikte iki farklı coğrafi bölgeden elde edilmiş propolis ekstraktlarının test edilmesi ve antimikrobiyal etkinliğin zamana bağlı olarak değerlendirilmesi yer almaktadır. Literatürde çok sayıda benzer araştırma bulunmasına rağmen, bu çalışmada kullanılan doğal ajanların çeşitliliği, coğrafi köken farkları ve metodolojik kapsamı çalışmayı benzerlerinden ayırmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen tüm analizler Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Harran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HRÜ-HADYEK) tarafından 23.05.2024 tarih, 2024-3 oturum no ve 8. karar ile “Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğin 2. Maddesinin 2. Fıkrası” gereğince “Deneysel olmayan tarımsal ve klinik Veteriner Hekimliği uygulamalarını” içerdiğinden Etik Kurul İznine tâbi olmayıp, Etik Kurul İznine gerek olmadığına karar verilmiştir. Bu çalışmada istatistiksel analiz uygulanmamış, elde edilen veriler betimsel olarak değerlendirilmiştir. Tüm ölçümler üç bağımsız tekrar halinde yapılmış ve zon çapları mm cinsinden karşılaştırmalı şekilde sunulmuştur.

Çalışmada Kullanılan Suşlar

Bu çalışmada kullanılan *S. mutans* (ATCC25175) ve *E. faecalis* (ATCC29212) suşları Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığın’dan temin edildi.

Çalışmada Kullanılan Antibakteriyel Ajanlar

Çalışmada kullanılan klorheksidin glukonat, propolis ve *M. nigra*’nın içerikleri ve özellikleri Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan antimikrobiyal solüsyon ve içerikleri.

Solüsyon	İçeriği ve Ekstraksiyon metodu	Üretici firma
Pervari propolisi	10 mg propolis 100 ml etanol %96 lık	Siirt Pervari Bölgesinden elde edilmiştir
Karadut Ekstraktı (<i>Morus nigra.</i>)	10 mg karadut meyvesi 100 ml metanol %99 luk	Bursa yöresine ait karadut tan elde edilmiştir.
Ticari Propolis ekstratı	%30 organik ham propolis, %65 etanol, %5 Su	Eğriçayır çaylı organik tarım ltd Mersin
Kloroben gargara	%0,12 klorheksidin glukonat %0,15 benzidamin HCl	Drogsan, Ankara, Türkiye

Antimikrobiyal Ekstrakların Hazırlanması

Propolis Ekstratı Hazırlanması

Propolis ekstraksiyonu klasik maserasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Örnekler, -18°C'den çıkarılan derin dondurucudan alındıktan sonra bir blender yardımıyla toz haline getirildi. Ekstraksiyon için 1:10 (g/v) oranında propolis örneği ile %96 etanol karışımı kullanıldı. Karışım, 24 saat boyunca 200 rpm sabit hızda manyetik karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra Whatman no 1 süzgeç kâğıdından süzüldü. Daha sonra, 4 gün boyunca etüvde inkübe edildi. Propolis çözeltisinde kalan etanol hacmi hesaplanarak örnekler -20 derecede saklandı. Son olarak, süzüntü etanol ekstraktı olarak etiketlendi (12,13,14). Kurutma işlemi sonrası çözücüler gravimetrik olarak hesaplandı. Etüv sonrası uçucu çözücü miktarı %95'in üzerinde buharlaştırılmış olup, kalan miktarın %1'in altında olduğu belirlenmiştir.

Karadut Ekstraktının Hazırlanması

Karadut meyveleri toplandı. Buzla paketi. Ekstraksiyona kadar donduruldu. Uygun ortam ve sıcaklıkta dondurulmuş karadut örnekleri havan yardımıyla labaratuvar ortamında ezildi. Çözücü olarak 10 gr karaduta 100 ml metanol kullanılarak hazırlandı. 4 gün boyunca etüvde inkübe edildi. Bu süre sonunda örnekler Whatman (no:1) filtre kâğıdıyla süzüldü ve çözücüler etüvde uçuruldu. Metanol döner buharlaştırıcıyla buharlaştırıldı. Önce ve sonra yapılan tartımların ardından, meyve ekstratının çözücüsü uçurulmuş ve 0,01 gramlık porsiyonlara ayrılarak eppendorflara konulmuştur. Bu örnekler, analiz işlemleri için kullanılmak üzere -20°C derin dondurucuda saklandı (15,16,17). Kurutma işlemi sonrası çözücüler gravimetrik olarak hesaplandı. Etüv sonrası uçucu çözücü miktarı

%95'in üzerinde buharlaştırılmış olup, kalan miktarın %1'in altında olduğu belirlenmiştir.

Antibiyotik Duyarlılık Testi (Disk Difüzyon Yöntemi)

Bu çalışmada Antimikrobiyal solüsyonlar Tıpkimsan medikal ürünler ltd. Şti. den elde edilen Bioanalyse marka boş 5 mm çapındaki antibiyogram disklerine emdirilerek, besiyerlerine yerleştirildi. Her bir diske ticari propolis 10 mg, Pervari propolis 10 mg, CHG 100 µl, karadut 10 mg, %96'lık etanol 100 µl, %99'luk metanol 100 µl emdirildi. Oda ısısında kuruyan diskler antibiyogram amacıyla kullanıldı. *S. mutans* ve *E. faecalis*'in kanlı agardaki taze kültüründen fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde 0.5 McFarland yoğunluğunda süspansiyonları hazırlanarak swapla MHA (*E. faecalis*) ve KA (*S. mutans*) besiyerlerine inoküle edildi. Hazırlanan diskler pensle uygun aralıklarla besiyerlerine yerleştirildi. Besiyerleri etüvde inkübe edilerek 24, 48 ve 72 saat sonra oluşan inhibisyon zonları milimetre cinsinden ölçüldü ve analiz edildi. Kontrol için gentamisin diski (Bioanalyse marka) emdirilmiş hazır diskler (Bioanalyse- Ankara) kullanıldı.

Antibiyotik Duyarlılık Testi (Tüp Dilusyon Yöntemi)

E. faecalis suşunun CHG'a MIC ve minimal bakteriyosidal konsantrasyonunun (MBC) tespiti tüp dilusyon tekniği ile gerçekleştirildi. Bu amaçla MHB besiyerinde CHG'nin ilk konsantrasyonu %5 olacak şekilde %0,39'a kadar iki katlı dilue edildi. *E. faecalis*'in kanlı agardaki taze kültüründen fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde 0.5 McFarland yoğunluğunda süspansiyonları hazırlanarak her tüpe

0.1 ml olacak şekilde inoküle edildi. Akabinde tüpler 37 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda tüplerde gözle üremenin (bulanıklık) görülmediği son dilüsyon MIC değeri olarak kabul edildi. Üremenin görülmediği tüplerden alınan 0.1 ml inokulum kanlı agar ekilerek 37 °C'de aerobik olarak 18-24 saat inkübe edildi. Kolonilerin görülmediği son dilüsyon MBC olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak 2 ml MHB besiyerine 0.1 ml 0.5 McFarland yoğunluğundaki *E. faecalis* süspansiyonu, negatif kontrol olarak 2 ml MHB besiyeri aynı şartlarda inkübe edildi (18,19).

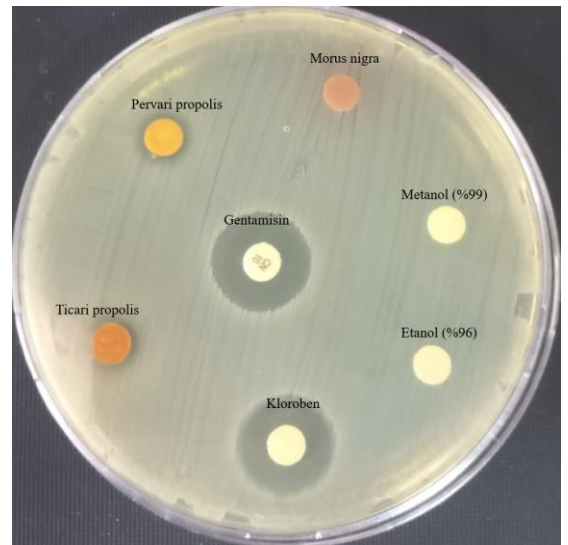
S. mutans suşunun CHG'a karşı MIC ve minimal bakteriyosidal MBC tespiti tüp dilüsyon tekniği ile gerçekleştirildi. Bu amaçla BHI besiyerinde CHG'nin ilk konsantrasyonu %5 olacak şekilde %0,39'a kadar iki katlı dilüe edildi. *S. mutans*'ın kanlı agardaki taze kültüründen FTS içerisinde 0.5 McFarland yoğunluğunda süspansiyonları hazırlanarak her tüpe 0.1 ml olacak şekilde inoküle edildi. Akabinde 37 °C'de 24 saat inkübasyon yapıldı. Tüplerde gözle üremenin (bulanıklık) görülmediği son dilüsyon MIC değeri olarak kabul edildi. Üremenin görülmediği tüplerden alınan 0.1 ml inokulum kanlı agar ekilerek 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Kolonilerin görülmediği son dilüsyon MBC olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak 2 ml BHI besiyerine 0.1 ml 0.5 McFarland yoğunluğundaki *S. mutans* süspansiyonu, negatif kontrol olarak 2 ml BHI besiyeri aynı şartlarda inkübe edildi (18,20). Not: CHG için minimal bakterisidal konsantrasyon (MBC) değeri belirlenememiştir çünkü test edilen konsantrasyon aralığında (%5'ten başlayarak %0,39'a kadar iki katlı dilüsyonlarla) bakterisidal etki gözlenmemiştir. Bu durum, CHG'nin *E. faecalis* suşu üzerinde bakteriyostatik etki göstermesine rağmen, kullanılan aralıkta bakterisidal dozun altında kaldığını göstermektedir. Daha yüksek veya daha ince aralıklı konsantrasyon dilüsyonları test edilmemiştir; bu durum çalışma tasarımı ve laboratuvar koşulları çerçevesinde sınırlandırılmıştır. Ölçümler üç bağımsız araştırmacı tarafından, her biri üç teknik tekrar ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar bu tekrarların ortalaması olarak sunulmuştur.

BULGULAR

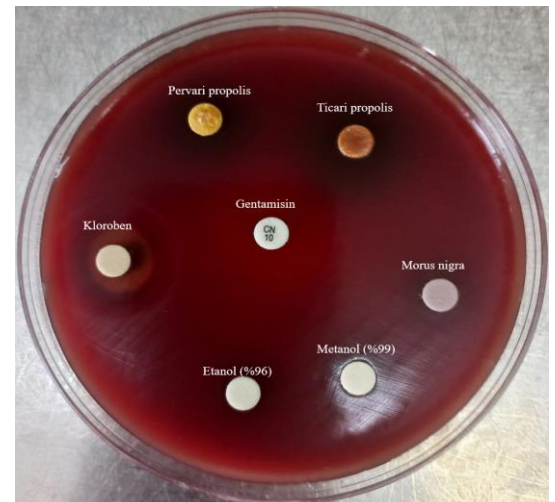
Bu çalışma da CHG, metanolik *M. nigra* ekstraktı ve iki farklı etanolik propolis (ticari propolis ve yerel Pervari propolisi) ekstraktı ile disk difüzyon yöntemi ile *E. faecalis* (ATCC 29212) ve *S. mutans* (ATCC 25175) suşları üzerindeki antimikrobiyal etkinlikleri araştırıldı. Ayrıca çalışmaya dahil edilen suşların klorobene karşı MIC ve MBC değerleri tüp dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlendi.

Disk Difüzyon Bulguları

CHG, *M. nigra* ve propolis ekstraktları ile hazırlanan disklerin *E. faecalis* ve *S. mutans* suşları üzerindeki inhibisyon etkileri Şekil 1 ve Şekil 2'de verilmiştir. *E. faecalis* suşu propolis ekstraktları ile hazırlanan disklerle dar bir inhibisyon zonu (Pervari propolis 7.5 mm, ticari propolis 8 mm) meydana getirirken *M. nigra* ekstraktı ve çalışmada çözücü olarak kullanılan etanol ve metanolü diskler inhibisyon zonu meydana getirmediği belirlendi. CHG (100 µl) emdirilen disk ilk 24 saatte 18 mm çapında inhibisyon zonu meydana getirirken, 48. ve 72. saatlerde zon çapları 16 mm olarak ölçüldü. Kontrol olarak kullanılan gentamisin 24 saat sonra oluşturduğu zon çapı 19 mm idi.



Şekil 1. *E. faecalis* suşunun çalışmada hazırlanan disklerle gerçekleştirilen antibiyogram test sonucu.



Şekil 2. *S. mutans* suşunun çalışmada hazırlanan disklerle gerçekleştirilen antibiyogram test sonucu.

S. mutans suşu *E. faecalis* suşuna benzer şekilde *M. nigra* ve çözücülerin emdirildiği disklerle inhibisyon zonu meydana getirmediği belirlendi. Suş ticari propolis diski ile 13 mm çapında bir zon meydana getirirken Pervari propolisi ile hazırlana disk ile 12 mm çapında bir inhibisyon zonu meydana getirdi. *S. mutans* suşu gentamisinle 21 mm çapında inhibisyon zonu meydana getirirken CHG ile hazırlanan diskler ile 23 mm çapında bir inhibisyon zonu meydana getirdiği belirlendi. CHG ile meydana gelen inhibisyon zonu 48 ve 72. saatlerin sonunda 22 mm olarak ölçüldü.

Tüm antimikrobiyal ajanlar 5 mm çapındaki standart antibiyogram disklerine eş hacimde (100 µl) veya eş kütlede (10 mg) emdirilerek uygulanmıştır. Uygulanan çözeltilerdeki aktif madde miktarı önceden hesaplanmış ve tüm gruplar arasında karşılaştırılabilir standart miktarda test uygulanmasına dikkat edilmiştir. Ölçüm birimleri (mg, µl) kullanılan materyalin fiziksel formuna göre belirtilmiştir; inhibisyon zonları ise mm cinsinden rapor edilmiştir.

Tablo 2. *E. faecalis* ve *S. mutans* suşlarının gentamisin (10 mcg) CHG, *M. nigra*, ticari propolis ve Pervari propolisi ile hazırlanan disklerle elde edilen zon çapları (değerlendirmeye disk çaplarında dahil edilmiştir).

	<u><i>Streptococcus mutans</i></u>			<u><i>Enterococcus faecalis</i></u>		
	24 saat	48 saat	72 saat	24 saat	48 saat	72 saat
Gentamisin	21 mm	21 mm	21 mm	19 mm	16 mm	16 mm
CHG	23 mm	22 mm	22 mm	18 mm	16 mm	16 mm
Pervari propolis	12 mm	12 mm	12 mm	7,5 mm	7,5 mm	7,5 mm
Ticari propolis	13 mm	13 m	13 mm	8 mm	8 mm	8 mm
<i>Morus nigra</i>	-	-	-	-	-	-
Kontrol (etanol)	-	-	-	-	-	-
Kontrol (metanol)	-	-	-	-	-	-

-: Disk çevresinde zon oluşumunun gözlenmediğini belirtmektedir.

Tablo 3. Karşılaştırmalı Antimikrobiyal Etki Tablosu. Ajanların *Streptococcus mutans* ve *Enterococcus faecalis* üzerindeki inhibisyon zon çaplarının zamana bağlı olarak karşılaştırmalı sunumu.

Ajan	Bakteri Türü	24 saat (mm)	48 saat (mm)	72 saat (mm)
Ticari Propolis	<i>S. mutans</i>	11.3 ± 0.5	12.0 ± 0.6	12.4 ± 0.4
Ticari Propolis	<i>E. faecalis</i>	10.1 ± 0.6	10.5 ± 0.4	10.7 ± 0.5
Yerel Propolis (Pervari)	<i>S. mutans</i>	12.1 ± 0.3	12.8 ± 0.5	13.2 ± 0.4
Yerel Propolis (Pervari)	<i>E. faecalis</i>	10.8 ± 0.5	11.3 ± 0.4	11.6 ± 0.6
CHG (Pozitif kontrol)	<i>S. mutans</i>	20.4 ± 0.7	20.1 ± 0.8	19.9 ± 0.9
CHG (Pozitif kontrol)	<i>E. faecalis</i>	18.5 ± 0.6	18.3 ± 0.5	18.1 ± 0.5
<i>Morus nigra</i>	<i>S. mutans</i>	—	—	—
<i>Morus nigra</i>	<i>E. faecalis</i>	—	—	—

-: Disk çevresinde zon oluşumunun gözlenmediğini belirtmektedir.

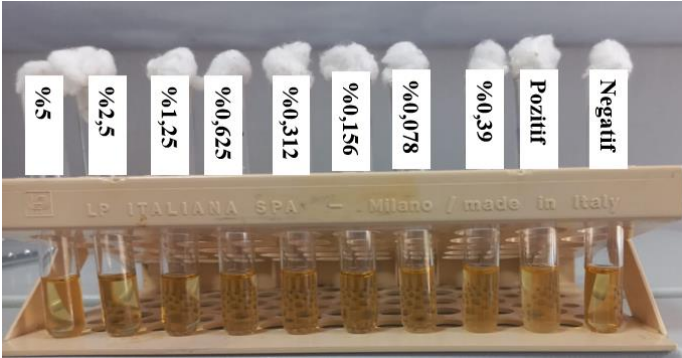
Tüp Dilüsyon Bulguları

Bu çalışmada *E. faecalis* ve *S. mutans* suşlarının CHG'e karşı MIC ve MBC konsantrasyonları tüp dilüsyon yöntemiyle değerlendirildi. Yapılan analizde Mueller-Hinton buyyonda %5'ten başlayarak iki katlı sulandırılması yapılan CHG'in *E. faecalis* suşu için MIC değerinin %0,625 olduğu belirlendi (Şekil 3). MBC değerinin belirlenmesi amacıyla her tüpten 0,1 ml alınarak Mueller-Hinton agara yapılan ekimlerin tamamında üremenin görülmesi nedeniyle bakteriyosidal konsantrasyonu hesaplanamadı.



Şekil 3. *E. faecalis* suşunun MIC değeri.

S. mutans suşunun CHG'e karşı *E. faecalis*'e göre daha duyarlı olduğu belirlendi. *S. mutans* suşunun MIC değeri %0,078 olduğu tespit edilirken, MBC değerinin %0,3125 olarak hesaplandı.



Şekil 4. *S. mutans* suşunun MIC değeri.

TARTIŞMA

Bu araştırma, CHG, *M. nigra* ekstraktı ve propolis ekstraktlarının *E. faecalis* ve *S. mutans* suşlarına karşı antimikrobiyal etkilerini değerlendirerek, doğal kaynaklardan elde edilen maddelerin potansiyel antimikrobiyal etkilerini ortaya koymayı amaçlamaktadır. Elde edilen sonuçlar, bu maddelerin farklı derecelerde antimikrobiyal aktivite gösterdiğini ve çeşitli faktörlerin bu etkileri nasıl değiştirebileceğini açıklamaktadır.

CHG, geniş spektrumlu antimikrobiyal etkisiyle diş hekimliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır (21). Araştırmamızda, CHG'nin *E. faecalis* suşunda 18 mm çapında bir inhibisyon zonu oluşturduğu ve bu etkinin zamanla azaldığı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, *S. mutans* suşunda 23 mm çapında inhibisyon zonu oluştururken 48. ve 72. saatlerde zon çapı 22 olarak ölçüldü. Klorheksidin'in diş plağı üzerindeki etkisi, Ainamo ve ark (1990)'larının çalışmasıyla desteklenmektedir; klorheksidin asetat içeren sakızın diş plağını tamamen inhibe ettiği gösterilmiştir (22). Ayrıca, CHG'nin %1'lik jel ve vernik formlarının diş restorasyonları üzerinde *S. mutans* seviyelerinde belirgin azalma sağladığı da Heintze ve Twetman tarafından rapor edilmiştir (23). Schaecken ve arkadaşlarının çalışması da klorheksidin içeren cilaların uzun süreli antimikrobiyal etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (24). Düzyol ve arkadaşları, çocuklarda CHG içerikli kavite dezenfektanı kullanarak plak tutulumunu engellediklerini ve *Lactobacillus*, *S. mutans* ve *Enterococcus* üzerinde etkili olduğunu bulmuşlardır (25). Ayrıca, CHG'nin diğer maddelerle karşılaştırıldığında *E. faecalis* 'e karşı etkili olduğu da gösterilmiştir (26). Çalışmamızda, *E. faecalis* ve *S. mutans* suşlarının CHG karşısındaki MIC ve MBC değerleri belirlendi. *E. faecalis* için MIC %0,625 olup, MBC hesaplanamadı; bu, CHG'in büyümeyi durdurduğunu ancak bakteriyosidal etkisinin olmadığını veya çok yüksek konsantrasyonlarda gerçekleştiğini göstermektedir. *S. mutans* için MIC %0,078, MBC %0,3125 olarak tespit edildi; bu, CHG'in *S. mutans* üzerinde daha etkili olduğunu göstermektedir. *E. faecalis*'in dirençli yapısı, bu bakterinin klinik tedavisinde zorluk yaratırken, *S. mutans*'ın daha duyarlı olması, CHG'in bu patojen üzerinde daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Antiseptik kullanımında, farklı bakterilerin bu tür farklılıkları dikkate alınmalıdır.

Propolis, doğal bir antimikrobiyal ajan olarak dikkat çekmektedir. Çalışmamızda, propolis'in *E. faecalis* suşunda dar bir inhibisyon zonu oluşturduğu gözlemlenmiştir (Pervari propolis 7.5 mm, ticari propolis 8 mm). *S. mutans* suşunda ise ticari propolis 13 mm, Pervari propolisi 12 mm çapında inhibisyon zonu oluşturmuştur. Propolis'in antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda genel olarak hedef mikroorganizma, propolis kaynakları ve ekstraksiyon yönteminin antimikrobiyal aktivite üzerinde önemli bir etkisi bulunduğu ortaya koyulmuştur (27,28,29). Sunulan çalışmada iki farklı kaynaktan elde edilen etanolik propolis ekstraksiyonlarının aynı mikroorganizma üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinde istatistiksel analiz yapılmadığı için farkın anlamlılığı değerlendirilemedi. Ancak *E. faecalis* ve *S. mutans*

suşları üzerinde aynı propolis disklerinin meydana getirmiş olduğu inhibisyon zon çaplarında önemli farklılık olduğu belirlendi.

Aslan ve ark., metanol ekstraktlı propolisin en iyi inhibitör etkiyi gösterdiğini saptarken, Alencar ve ark. Brezilya propolisinin etanol ekstraktının yüksek inhibitör etkilerini rapor etmiştir (30,31). Uzel ve ark. (2005) Türkiye'nin farklı bölgelerden alınan propolis örneklerinin Gram-pozitif bakterilere karşı daha etkili olduğunu bildirmiştir (32). Mevcut çalışmada propolis ekstraksiyonları iki farklı Gram pozitif kok üzerindeki antimikrobiyal etkisi değerlendirildi. Bu bulgular, propolisin antimikrobiyal etkilerinin coğrafi köken ve bileşime bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir. Propolisin *S. mutans*'ın büyümesini inhibe ettiği ve glukoziltransferaz enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir (33). Apigenin ve trans-trans farnesol gibi bileşenlerin antibiyofilm ve antikaryojenik etkileri olduğu kanıtlanmıştır (34). Almanya, Avusturya ve Fransa'dan toplanan propolis örneklerinin antimikrobiyal etkinlikleri de bu bulguları desteklemektedir (35). Seidel ve arkadaşları, propolisin coğrafi ve iklimsel faktörlere bağlı olarak antimikrobiyal potansiyelinin değişebileceğini belirtmiştir (36).

M. nigra meyve ekstraktı, çalışmamızda beklenen antimikrobiyal etkiyi göstermemiştir. Disk difüzyon sonuçlarında belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır. Bu durum, Yiğit ve arkadaşlarının çalışmasıyla çelişmektedir; onlar, *M. nigra* 'nın çeşitli bakterilere karşı antibakteriyel etki gösterdiğini rapor etmiştir (37). Salem ve arkadaşları, *M. nigra* 'nın *E. faecalis* 'e karşı en yüksek etkiyi gösterdiğini bildirmiştir (38). Başka çalışmalarda, *M. alba*'dan izole edilen Kuwanon G'nin, diş çürüklerine neden olan *S. mutans* 'a karşı güçlü antibakteriyel etki gösterdiği belirtilmiştir (39). *M. nigra* 'nın etanollü solüsyonunun da bakteri hücre duvarına zarar veren antibakteriyel aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (40). Ancak, bizim çalışmamızda *M. nigra* 'nın beklenen antimikrobiyal etkiyi göstermemesi, kullanılan ekstraksiyon yöntemi, test edilen bakteri suşları ve *M. nigra* örneklerinin coğrafi kökeni gibi faktörlerle açıklanabilir.

SONUÇ

Bu çalışma da CHG, metanolik *M. nigra* ekstraktı ve iki farklı etanolik propolis (ticari propolis ve yerel Pervari propolisi) ekstraktının *E. faecalis* ve *S. mutans* suşları üzerindeki antimikrobiyal etkilerini disk difüzyon yöntemi ile değerlendirmiştir. Çalışma sonucunda, özellikle CHG 'nin hızlı ama sınırlı bir antimikrobiyal etki gösterdiği, *M. nigra* 'nın etkisiz olduğu ve propolis ekstraktlarının suşlara bağlı olarak değişen etkiler gösterdiği sonucunu ortaya koymaktadır. Gelecekteki çalışmalar, bu doğal kaynaklardan elde edilen

bileşenlerin mikroorganizmalara etkilerini daha ayrıntılı bir şekilde anlamak ve bu bulguların klinik uygulamalara nasıl yansıtılabileceğini değerlendirmek açısından önemli olacaktır. *Morus nigra* 'nın bu çalışmada antimikrobiyal etki göstermemesi, kullanılan çözücü tipi, ekstrakt konsantrasyonu ve suş farklılıklarına bağlı olarak literatürle olan uyumsuzluğu açıklayabilir. Ticari ve yerel propolis ekstraktları arasında zon çapı bakımından gözle görülür farklar izlenmiş olsa da, istatistiksel analiz yapılmadığı için bu farkların anlamlı olup olmadığı değerlendirilmemiştir. Çalışmanın Sınırlamaları: Bu çalışmanın bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Öncelikle çalışmada yalnızca ATCC referans suşları kullanılmış olup, klinik isolatlar ile karşılaştırma yapılmamıştır. Ek olarak, ekstraktların içerdiği fenolik ve flavonoid bileşenlerin kantitatif analizi yapılmamıştır. Bu durum ekstraktların içerik standardizasyonunun yapılamamasına neden olmuştur. Ekstraksiyon işlemi sırasında tek bir çözücü ve yöntem (maserasyon) tercih edilmiş, farklı yöntemlerin karşılaştırması yapılmamıştır. Ayrıca in vitro ortamda yapılan bu çalışmanın sonuçları klinik uygulamalara doğrudan genellenemez; bu nedenle ileri çalışmalar, klinik örneklerle ve farklı mikroorganizmalarla desteklenmelidir. Ayrıca bu çalışmada yalnızca referans suşlar kullanılmış olup, kompleks oral floranın yansıtılmadığı göz önünde bulundurulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Jain I, Jain P, Bisht D, Sharma A, Srivastava B, Gupta N. Use of traditional Indian plants in the inhibition of caries-causing bacteria–Streptococcus mutans. Braz Dent J. 2015;26(2):110-115.
2. de Soet JJ, van Loveren C, Lammens AJ, Pavicić MJ, Homburg CH, ten Cate JM, de Graaff J. Differences in cariogenicity between fresh isolates of Streptococcus sobrinus and Streptococcus mutans. Caries Res. 1991;25(2):116-122.
3. Clarke JK. On the bacterial factor in the etiology of dental caries. Br J Exp Pathol. 1924;5:141-147.
4. Kırmusaoğlu S. Streptokoklar ve Enterokoklar. In: Us AD, Başustaoğlu A, eds. Sherris Tıbbi Mikrobiyoloji. Ankara: Hipokrat Yayıncılık; 2019:473-499.
5. Moellering RC Jr. Enterococcus species, Streptococcus bovis and Leuconostoc species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005:2411-2421.

6. Çetinkaya Sardan Y. Enterokoklarla Gelişen Enfeksiyonlar. *Infeks Hast Ser.* 2002;5:61-67.
7. Dığrak M, Yılmaz Ö, Çelik S, Yıldız S. Propolisteki yağ asitleri ve antimikrobiyal etkisi üzerinde in vitro araştırmalar. *Gıda.* 1995;20(4):249-255.
8. Chen H, Pu J, Liu D, Yu W, Shao Y, Yang G, He N. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of flavonoids from the fruits of black mulberry (*Morus nigra* L.). *PLoS One.* 2016;11(4):e0153080.
9. Çelik Y. Karadut (*Morus Nigra*) İçeriği ve Oral Mukozit Bakımı. *Anadolu Tıbbı Dergisi,* 2023;2(2):13-17.
10. Davies G, Francis J, Martin A, Rose F, Swain G. 1:6-di-4'-chlorophenyldiguanidohexane ("hibitane"). *Br J Pharmacol Chemother.* 1954;9(2):192-196.
11. Budtz-Jørgensen E, Løe H. Chlorhexidine as a denture disinfectant in the treatment of denture stomatitis. *Eur J Oral Sci.* 1972;80(6):457-464.
12. Erođlu HE, Tatlışen A, Özkul Y. Mesane kanserli doku kültürlerindeki mikronükleus üzerine propolis ve mitomisin-C'nin etkileri. *Erciyes Univ Sağlık Bilim Derg.* 2004;13(2):15-20.
13. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol.* 1998;36:347-363.
14. Uzel A, Sorkun K, Önçağ Ö, Çoğulu D, Gençay Ö, Salih B. Chemical composition and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res.* 2005;160:189-195.
15. Park KM, et al. Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. *J Ethnopharmacol.* 2003;84(2-3):181-185.
16. Yiğit D, Yiğit N. Antibacterial activity of black mulberry (*Morus nigra*) fruits and leaves. *Erzincan Univ J Sci Technol.* 2008;1(1):39-48.
17. Budiman A, Aulifa DL. Antibacterial activity and mode of action of Black Mulberry (*Morus nigra*) fruits extract against *Streptococcus mutans*. *Pharmacogn J.* 2020;12(6s).
18. Arda M. Temel Mikrobiyoloji. Ankara: Medisan Yayınları; 2015.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard—twelfth edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: CLSI; 2015.
20. Salman HA, Senthilkumar R, Imran K, Selvam KP. Isolation and typing of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* from caries-active subjects. *Contemp Clin Dent.* 2017;8(4):587-593.
21. Scheie AA. The role of antimicrobials. In: Fejerskov O, Kidd EAM, eds. *Dental caries: the disease and its clinical management.* Oxford: Blackwell Munksgaard; 2003:179-188.
22. Ainamo J, Nieminen A, Westerlund U. Optimal dosage of chlorhexidine acetate in chewing gum. *J Clin Periodontol.* 1990;17(10):729-733.
23. Heintze SD, Twetman S. Interdental mutans streptococci suppression in vivo: a comparison of different chlorhexidine regimens in relation to restorative material. *Am J Dent.* 2002;15:103-108.
24. Schaeken MJM, De Haan P. Effects of sustained-release chlorhexidine acetate on the human dental plaque flora. *J Dent Res.* 1989;68(2):119-123.
25. Düzyol E, Gürbüz T, Barış Ö. Antimicrobial efficacy of ozone therapy on cariogenic bacteria. *Meandros Med Dent J.* 2021;22:1-7.
26. Ekim ŞNA, Erdemir A, Kaya OE, Çiftçi H. Alternatif irrigasyon solüsyonu olarak gümüş nanoparçacıkların *E. faecalis* üzerine antibakteriyel etkisi. *Atatürk Univ Diş Hek Fak Derg.* 2016;26(2).
27. Stepanović S, Antić N, Dakić I, Švabić-Vlahović M. Propolisin in vitro antimikrobiyal aktivitesi ve propolis ile antimikrobiyal ilaçlar arasındaki sinerji. *Mikrobiyol Arařt.* 2003;158(4):353-357.
28. Kartal M, Yıldız S, Kaya S, Kurucu S, Topçu G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *J Ethnopharmacol.* 2003;86(1):69-73.
29. Kubiliene L, Laugaliene V, Pavilonis A, Maruska A, Majiene D, Barauskaite K, et al. Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15:1-7.

30. Arslan S, Perçin D, Silici S, Özgür ER. Farklı çözücülerle hazırlanan propolis özütlerinin mutans streptokoklar üzerine in vitro antimikrobiyal etkisi. *Sağlık Bilim Derg.* 2010;19(1):68-73.
31. Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J Ethnopharmacol.* 2007;113:278-283.
32. Uzel A, Sorkun K, Önçağ Ö, Çoğulu D, Gençay Ö, Salih B. Chemical composition and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res.* 2005;160:189-195.
33. Hayacibara MF, et al. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *J Ethnopharmacol.* 2005;101(1-3):110-115.
34. Koo H, Pearson SK, Scott-Anne K, et al. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17(6):337-343.
35. Hegazi AG, Abd El Hady FK, Abd Allah FA. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z Naturforsch C.* 2000;55:70-75.
36. Seidel V, Peyfoon E, Watson DG, Fearnley J. Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. *Phytother Res.* 2008;22:1256-1263.
37. Yiğit D, Yiğit N. Antibacterial activity of black mulberry (*Morus nigra*) fruits and leaves. *Erzincan Univ J Sci Technol.* 2008;1(1):39-48.
38. Salem MA, Salama MM, Ezzat SM, Hashem YA. Comparative metabolite profiling of four polyphenol rich *Morus* leaves extracts in relation to their antibiofilm activity against *Enterococcus faecalis*. *Sci Rep.* 2022;12(1):20168.
39. Park KM, et al. Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. *J Ethnopharmacol.* 2003;84(2-3):181-185.
40. Budiman A, Aulifa DL. Antibacterial activity and mode of action of Black Mulberry (*Morus nigra*) fruits extract against *Streptococcus mutans*. *Pharmacogn J.* 2020;12(6s).