

FARKLI ÇÖZÜCÜLERLE HAZIRLANAN PROPOLİS ÖZÜTLERİNİN
MUTANS STREPTOKOKLAR ÜZERİNE *IN VITRO*
ANTİMİKROBİYAL ETKİSİ

The *in vitro* Effects of Propolis Extracts Prepared with Different
Solvents on Mutans Streptococci

Soley ARSLAN¹, Duygu PERÇİN², Sibel SİLİCİ³, A.Nedret KOÇ⁴, Özgür ER⁵

Özet : Propolis arılar tarafından üretilen reçine içeren bir maddedir. Çok sayıda biyolojik aktiviteye sahip olan propolisin diş çürüğünün kontrolünde potansiyel uygulamalarıyla ilgili araştırmalar yapılmaktadır. Bu çalışmada, Türk propolisinin mutans streptokoklardan *Streptococcus mutans* üzerine antimikrobiyal etkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.

Propolis örnekleri etanol, metanol, kloroform, hekzan, etil asetat, ve propilen glikol ile fraksiyonlarına ayrılmıştır. Propilen glikolün buharlaşma ısısı yüksek olduğu için Propilen glikol dışındaki çözücüler buharlaştırılarak uzaklaştırılmış ve propolis özütleri elde edilmiştir. Etanol, metanol, kloroform, hekzan, etil asetat özütleri % 80 etanolde çözülerek, propolis + propilen glikol karışımı ise direkt kullanılmıştır. Bu özütlerin *Streptococcus mutans* üzerine *in vitro* antimikrobiyal aktivitesi minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC) değerleri çalışılarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, *Streptococcus mutans* üzerine en iyi inhibitör etkiyi propolisin metanol ve etil setat özütleri göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, çürük, propolis, *streptococcus mutans*.

Summary: Propolis is a resinous substance made by bees. It possesses many biological activities, and many studies have reported its potential application in the control of dental caries. The aim of this study was to evaluate *in vitro* antimicrobial effects of Turkish propolis on *Streptococcus mutans* from mutans streptococci.

Propolis samples was serially fractionated into ethanol, methanol, chloroform, hexane, ethyl acetate and propylene glycol. Then, solutions were removed by evaporation and propolis extracts were obtained except propylene glycol which has high evaporation temperature. Ethanol, methanol, chloroform, hexane, ethyl acetate extracts were used after 80% of ethanol dilution and propolis + propylene glycol was used directly. *In vitro* antimicrobial activity of these extracts on *Streptococcus mutans* was examined by determining minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) As a result, the methanol and ethyl acetate extracts showed the highest antimicrobial activity on *Streptococcus mutans*.

Keywords: Antimicrobial activity, caries, propolis, *streptococcus mutans*

¹ Dr.Dt.Erc.Ün.Sağ.Bil.Ens.Diş Hast. ve Ted AD, Kayseri

² Doç.Dr.Erciyes Ün.Tıp Fak.Mikrobiyoloji AD, Kayseri

³ Doç.Dr.Erciyes Ün.Safiye Çıkrıoğlu MYO, Kayseri

⁴ Prof.Dr.Erciyes Ün.Tıp Fak.Mikrobiyoloji AD, Kayseri

⁵ Yrd.Doç.Dr.Erc.Ün.Diş Hek.Fak.Diş Has. Ted. AD, Kayseri

Geliş Tarihi : 23.11.2009 Kabul Tarihi : 25.03.2010

Dental plak periodontal hastalık ve çürük gelişiminde önemli rol oynayan, diş yüzeyinde tükürük glikoproteinleri ve ekstraselluler polisakkarid matriks içindeki bakterilerden oluşan bir film tabakasıdır (1). Mutans streptokoklar sukrozdan ekstraselluler polisakkarid sentezleyerek plak oluşumunu başlatabilir ve diş yüzeyinde kolonize ola-

*Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSD.08.328 nolu proje ile desteklenmiş olup, aynı adlı doktora tezinden özetlenmiştir.

bilirler (2). Ayrıca bu mikroorganizmaların çürük ve periodontal hastalıkların gelişmesinde yer aldığı gösterilmiştir (3). Bu nedenle, bu oral patojenlere karşı antimikrobiyal ajanların kullanılması dental çürük ve periodontal hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynayabilir.

Doğal ürünler yüzyıllardır çeşitli amaçlar için tıpta kullanılmaktadır. Doğal bir ürün olan propolis patojenik mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesinden dolayı günümüzde giderek artan bir önem kazanmaktadır. Propolis; bal arıları (*Apis mellifera L.*) tarafından bitki ve ağaçların yaprak ve sürgünlerinden toplanan reçine içeren bir karışımdır. Propolis üretimi için arılar tarafından kullanılan materyal, bitkilerin yara bölgelerinden salgılanan maddeler olabildiği gibi, yapraklardaki lipofilik materyaller ile reçine, müsilaaj, zambak gibi maddeler de olabilmektedir. Arılar bu salgıya daha sonra çeşitli enzimlerle polenden türevlenen maddeler katmaktadır (4).

Propolisin kaynağını oluşturan bitkiler kavak (*Populus spp.*), kayın (*Fagus sylvatica*) huş (*Betula alba*), kestane (*Castanea sativa*), at kestanesi (*Aesculus hippocastanum*), akçaağaç (*Alnus glutinosa*) ve çeşitli koniferlerdir (5).

Bal arıları propolisi, bal mumuna karıştırarak petek yapımında, kovan duvarlarındaki çatlakların kapatılmasında, kovan girişinin küçültülmesinde kullanırlar. Ayrıca bakteri, mantar ve virüslerle mücadelede etkili olan propolis, kovanda tüm arı popülasyonu için çeşitli enfeksiyonlara karşı koruyucu olarak görev yapmaktadır (4).

Propolisin rengi reçinenin kaynağına bağlı olarak sarımsı yeşilden, kırmızı ve koyu kahverengiye kadar değişmekte olabileceği gibi şeffaf da olabilmektedir. Fiziksel yapısı serttir, soğukta kırılabilir, sıcakta yapışkandır. Propolis toplamak için kullanılan bitki kaynağının bileşimi propolisin kimyasal yapısını belirlemektedir. Rengi, kokusu ve tıbbi karakteristikleri sezona ve kaynağına bağlı olarak değişebilmektedir (6).

Ham propolisin bileşimi kaynağına göre değişmekle birlikte, genellikle % 45-50 reçine, % 30 mum, % 10 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 polen ve % 5 diğer organik maddelerden oluşmaktadır (6).

Şimdiye kadar, çoğunluğu polifenoller olmak üzere 180 den fazla bileşik propolisin bileşeni olarak belirlenmiştir. Ana polifenoller, fenolik asitler (kafeik asit, sinamik asit) ve esterleri, fenolik aldehitler ve ketonlar ile beraber flavonoidlerdir (pinosembirin, pinobanksin, akasetin, krisin, rutin, kateşin, naringenin, galangin, luteolin, kamferol, apigenin, mirisetin, kuarsetin v.b.). Propolisin diğer bileşikleri uçucu yağlar ve aromatik asitler (% 10), mumlar (% 30), rezinler, esansiyel yağlar ve magnezyum, nikel, kalsiyum, demir ve çinko gibi esansiyel elementlerin zengin bir kaynağı olan polen taneleridir. Brezilya ve Çin propolis örneklerinden 3,5- difenil-4- hidroksinamik asit ve oktakonasol gibi bileşikler izole edilmiştir (4).

Propolisin tıbbi özellikleri tarihsel olarak çok eski zamanlardan beri bilinmektedir. Yıllar boyunca propolis insanlar tarafından değişik hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Çeşitli çalışmalarda propolisin antikarsinojenik, antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antifungal, antihepatotoksik ve dental çürüğü engelleyici etkisi gösterilmiştir (6). Hatta propolis *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sobrinus* gibi dental çürükle ilişkili bakterilere karşı büyük bir potansiyele sahip olabilmektedir (7).

Bu çalışmanın amacı önemli oral patojenlerden biri olan *S. mutans*'a karşı propolisin in vitro antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Propolis Örneklerinin Hazırlanması: Bu çalışmada kavak (*Populus spp.*) ağaçlarının yoğun olduğu bölgede *Apis mellifera* kolonilerinden elde toplanan ham propolis kullanılmıştır. Propolisin özütlenmesi ve farklı fraksiyonlarının elde edilmesinde Silici-Kutluca (5) ve Duarte ve ark. (8) nın önerdiği yöntemler modifiye edilerek kullanılmıştır. Ham propolis havanda dövülerek toz haline getirilmiştir. Toz propolisten 30'er gram tartılmış (0.001 hassasiyet, Sartorius, Almanya) ve beherlerin içine konmuştur. 100'er ml etanol (Merck, ABD), metanol (Merck), kloroform (Lab-scan, Polonya), hekzan

(Lab-scan), etil asetat (Lab-scan), ve propilen glikol (Carlo-Erba, İtalya) ayrı ayrı toz propolislerin üzerine ilave edilmiştir. Karanlık bir ortamda günde 2-3 kez karıştırılmak suretiyle bir hafta bekletilmiştir. Sonra her bir karışım filtre kağıdından süzülerek ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj (Therma Jovan B4i Multifunction, Thermo Scientific, ABD) edilmiştir. Propilen glikol dışında her bir çözelti vakum evaporatörde (Laborota 4000, Heidolph, Almanya) 50-60°C'de 5-10 dk'da buharlaştırılarak uzaklaştırılmıştır. Propilen glikolün buharlaşma ısısı yüksek olduğu (188°C) ve 50°C'nin üzerinde çözücü buharlaştıktan sonra propolisin yapısal özelliği bozulacağı için vakum evaporatörde işleme tabi tutulmamıştır. Kalan özüt miktarları tek tek tartılmıştır.

Daha sonra özütlerden 1'er gr alınarak 10 ml (0.1g/ml) % 80'lik etil alkolde çözülmüştür.

Duyarlılık Testi: Propolis özütlerinin antibakteriyal aktivitesi, minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC) değerlerinin makro dilüsyon yöntemi ile çalışılmasıyla belirlenmiştir (9-11). Steril tüplerde Brain Heart İnfüzyon (BHI) broth ile 0.1 g/ml şeklinde hazırlanan propolis özütlerinden 1600-12.5 µg/ml'lik dilüsyonlar oluşturulmuştur. Daha sonra üzerlerine kariyojenik (çürük oluşturucu) ekinliği kanıtlanmış, 10⁶CFU/ml *Streptococcus mutans* UA159 (lot no:3584010, ATCC no: 700610, ABD) içeren serum fizyolojiktan 1 ml eklenerek mikroorganizma sayısı 5x10⁵

CFU/ml'ye düşürülmüş ve CO₂'li etüvde bir gecelik inkübasyonda bırakılmıştır. Üremenin gözle görülür şekilde inhibe olduğu dilüsyon MIC olarak kaydedilmiş, bu dilüsyon ve üst dilüsyonlardan 100'er µl alınarak % 5 koyun kanlı agara ekim yapılarak CO₂'li ortamda bir gecelik inkübasyona bırakılmıştır. Üremenin olmadığı değerler MBC değeri olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Propolis Özütlerine Ait Bulgular: Propolis örneklerini fraksiyonlarına ayırmakta kullanılan çözücüler vakum evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra kalan özüt miktarları tartılmıştır. Farklı miktarlarda özütler elde edilmiştir. En iyi verim kloroform özütünde gözlenirken en az verim hekzan özütünde gözlenmiştir (Tablo I). Propilen glikolün buharlaşma ısısı yüksek olduğu için evaporatörde uzaklaştırılamamış ve kalan özüt miktarı tartılamamıştır.

Duyarlılık Testi Bulguları: Propolis özütlerinin *S. mutans*'a karşı, antimikrobiyal etkinliği makrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiş, MIC ve MBC değerleri Tablo II'de verilmiştir. Propolis özütlerinin hepsinin *S. mutans* üzerine antimikrobiyal etkinliği belirlenmiştir. *S. mutans* üzerine en iyi MBC değerlerini propolisin metanol ve etil asetat özütleri vermiştir. Etanol ve propilen glikolün dilüsyon aralığı belirlenemediği için MIC ve MBC değerleri çalışılmamıştır.

Tablo I. Propolis özütlerinin miktarları ve çözücülerin maksimum buharlaşma ısıları

| Propolis Özütleri | Miktar (gram) | Maksimum Buharlaşma Isısı (°C) |
|-------------------|---------------|--------------------------------|
| Metanol | 18.210 | 64.6 |
| Etanol | 17.159 | 50 |
| Kloroform | 21.719 | 61-62 |
| Hekzan | 1.428 | 65-70 |
| Etil Asetat | 18.490 | 77.1 |
| Propilen Glikol | - | 188 |

Tablo II. *S. mutans* 'a karşı propolis özütlerinin MIC ve MBC değerleri (Propolis özütlerinin dilüsyon aralığı 1600-12.5 µg/ml)

| | S. mutans | |
|----------------------------------|--------------------|-------------------|
| | MIC (µg/ml) | MBC(µg/ml) |
| Propolisin etanol özütü | 50 | 400 |
| Propolisin metanol özütü | 50 | 100 |
| Propolisin etil asetat özütü | 50 | 200 |
| Propolisin propilen glikol özütü | 100 | 400 |
| Propolisin kloroform özütü | 100 | 400 |
| Propolisin hekzan özütü | 100 | 400 |

TARTIŞMA

Çürük profilaksisinde koruyucu işlemlerin öneminin tartışılmaz olduğu günümüzde doğal, etkin, yan etkisi az olan ve ucuz alternatif ajan arayışları devam etmektedir. Binlerce yıldır halk ilaçlarında kullanılan ve oral patojenlere karşı antimikrobiyal etkileri kanıtlanmış doğal ürünlerin profilaksisinden yararlanılabileceği düşüncesiyle, bu çalışmada rezin benzeri bir kovan ürünü olan propolisin çürük yapıcı bakterilerden *S. mutans* üzerindeki *in vitro* antibakteriyel etkinliği araştırılmıştır.

Propolis özütlerinin elde edilmesinde farklı çözücüler kullanılmaktadır. Bu çalışmada kavak tipi propolis örnekleri 6 farklı çözücü ile farksiyonlarına ayrılmış ve çözücüler buharlaştırılarak özütleri elde edilmiştir. Elde edilen özütler etanolde çözülmüş ve bu özütlerin *S. mutans* üzerine *in vitro* antimikrobiyal etkisi MIC ve MBC değerleri çalışılarak belirlenmiştir. *S. mutans* üzerine en iyi inhibitör etkiyi metanol ve etil asetat özütleri vermiştir.

Propolisin antibakteriyel etkinliği başka *in vitro* araştırmalara da konu olmuştur. Alencer ve ark. (12) Brezilya propolisinin farklı tiplerini analiz etmişler ve bu propolisin etanol özütünün mutans grubu streptokoklar ve *S. aureus*'a karşı inhibitör etkilerinin yüksek olduğunu buna karşılık hekzan özütünün pozitif bir sonuç göstermediğini tespit etmişlerdir. Duarte ve ark. (13)'nin yaptıkları çalışmada Brezilya propolisinin hekzan, etanol ve klo-

roform özütünün *S. mutans* ve *S. sobrinus* üzerine önemli antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. İkeno ve ark. (14) Çin'de iki bölgeden ve Japonya'dan bir bölgeden toplanan üç farklı propolis numunesinin *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *S. cricetus* 'un bilinen standart suşlarına etkisini inceledikleri çalışmada bu üç farklı propolisin etanolik ekstraktlarının bakteriler üzerine benzer inhibitör etkiyi gösterdiğini belirtmişlerdir. Koo ve ark. (15) oral patojenlere karşı *Arnika montana* ve Brezilya propolisinin *in vitro* antimikrobiyal etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında propolisin etanolik ekstraktının *Arnika montana* ile karşılaştırıldığında *S. mutans* ve *S. sobrinus* üzerine yüksek antimikrobiyal etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Hayacibara ve ark. (9) iki tip Brezilya propolisinin hekzan, kloroform, etil asetat ve etanol özütleriyle yaptıkları çalışmada hekzan özütünün *S. mutans* ve *S. sobrinus* üzerine *in vitro* en yüksek anti bakteriyel aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Uzel ve ark. (7) ülkemizde dört değişik bölgeden topladıkları propolisin etanolik ekstraktlarının gram-pozitif bakterilere (*S. mutans*, *S. sobrinus*) karşı önemli oranda antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermişler ve propolisin dış çürüğünü önleyebileceği sonucuna varmışlardır.

Mutans streptokoklar dışında diğer mikroorganizmalar üzerine propolisin etkinliği değişik çalışmalarda gösterilmiştir. Keskin ve ark. (16) propolisin kimyasal kompozisyonu ve antibakteriyel etkisini incelemişlerdir. İncelenen propolis örnekleri gram-

pozitif koklara (*Staphylococcus aureus* ve *beta hem.Streptococcus*) antibakteriyel etki gösterirken, gram-negatif bakterilere (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) karşı etkili olmadığı tespit edilmiştir. Kujumgiev ve ark. (17)'nin yaptıkları araştırmada, çalışılan propolis örneklerinin *S. aureus*'a önemli antibakteriyel etki gösterirken, gram-negatif test suşuna (*E.coli*) karşı etkili olmadığı tespit edilmiştir. Kuru ve ark. (18) Türkiye'den (Kazan, Rize, Muğla, tahtaköprü) dört bölgeden ve Brezilya'nın bir bölgesinden alınan propolis örneklerinin dokuz anaerobik oral bakteriye karşı etkinliğini değerlendirdikleri çalışmada; propolis örneklerinin gram-pozitif anaerobik bakterilere gram-negatif anaerobik bakterilerden çok daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Farklı çözücülerle elde edilen propolis özütlerinin antimikrobiyal etkinliği değişebildiği gibi değişik coğrafik kökene sahip propolislerin antimikrobiyal etkinliği de değişebilmektedir. Avrupanın değişik bölgelerinden (Almanya, Avusturya, Fransa) toplanan propolis örneklerinin antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirildiği çalışmada, Alman propolisi *S. aureus* ve *E.coli*'ye karşı en yüksek antimikrobiyal etki gösterirken, Fransız propolisi en düşük antimikrobiyal etkiyi göstermiştir (19). Değişik coğrafik ve iklim bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirildiği diğer bir çalışmada nemli tropikal iklim bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin antimikrobiyal etkinliğinin daha yüksek olduğu görülmüştür (20).

Farklı propolis orijinlerinin ve propolis özütlerin elde edilmesinde farklı çözücülerin kullanılması propolisin antimikrobiyal aktivitesini etkileyebilmektedir (21). Sonuç olarak bu araştırmada propolisin *S. mutans* üzerine antimikrobiyal etkisi in vitro olarak tespit edilmiş, farklı özütlerin aktivite üzerine değişik etki gösterebileceği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Quirynen M, Teughels W, Haake SK, Newmann MG. Microbiology of Periodontal Diseases. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA (eds.), Carranza's Clinical Periodontology, Tenth Edition, Saunders Elsevier, St. Louis-Missoure, 2006, pp: 134-169.
2. van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. J Dent Res 1994, 73: 672-681.
3. Hardie JM. Oral microbiology: current concept in the microbiology of dental caries and periodontal disease. Br Dent J 1992, 172: 271-278.
4. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia 2002, 73: 1-6.
5. Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. J Ethnopharmacol 2005, 99: 69-73.
6. Burdock GA. Review of the Biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem Toxicol 1998, 36: 347-363.
7. Uzel A, Sorkun K, Onçağ O, et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. Microbiol Res 2005, 160: 189-195.
8. Duarte S, Koo H, Bowen WH, et al. Effect of novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferase and growth and adherence of mutans streptococci. Biol Pharm Bull 2003, 26: 527-53.
9. Hayacibara MF, Koo H, Rosalen PL, et al. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. J Ethnopharmacol 2005, 101: 110-115.

10. Bowen WH, Madison KM, Pearson SK. Influence of desalivation in rats on incidence of caries in intact cagemates. *J Dent Res* 1988, 67: 1316-1318.
11. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, et al. Effect of anew variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. *Curr Microbiol* 2000, 41: 192-196.
12. 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.
13. Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, et al. The influence of a novel propolis on mutans streptococcus biofilms and caries development in rats. *Arch Oral Biol* 2006, 51: 15-22.
14. İkeno K, İkeno T, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Res* 1991, 25: 347-351.
15. Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol* 2000, 45: 141-148.
16. Keskin N, Hazir S, Baser KH, Kürkçüoğlu M. Antibacterial activity and chemical composition of Turkish propolis. *Z Naturforsch* 2001, 56: 1112-1115.
17. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Yu, et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999, 64: 235-240.
18. Koru O, Toksoy F, Acikel CH, et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different anatolian propolis samples. *Microbiol Res*, 2005, 160: 189-195.
19. Hegazi AG, Abd El Hady FK, Abd Allah FA. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z Naturforsch* 2000, 55: 70-75.
20. 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.
21. Tosi B, Donini A, Romagnoli C, Bruni A. Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytother Res* 1996, 10: 335-336.