

# Kayseri Propolisinin Etanolik Ekstraktının Antimikrobiyal Aktivitesi

## *Antimicrobial Activity of The Ethanolic Extract of Kayseri Propolis*

Esma Gündüz Kaya, Hatice Özbilge, Songül Albayrak

*Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji A.D., Kayseri*

### Özet

Propolis, bal arıları tarafından farklı bitki kaynaklarından toplanan bir reçine olup, çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklerinden dolayı son yıllarda araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Bu çalışmada, Kayseri ve çevresinden toplanan propolisin etanolik ekstraktının (PEE), klinik öneme sahip bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* mikroorganizmaları kullanıldı ve antimikrobiyal etkinliğinin araştırılmasında CLSI'nin önerileri doğrultusunda agar dilüsyon yöntemi uygulandı. Ayrıca bakteriyel üremenin optik dansitesindeki değişimleri sürekli izleme temeline dayanan mikrobüyyon kinetik sistem kullanılarak, bir model bakterinin (*S.aureus*), propolisin artan konsantrasyonları varlığında türbidimetrik üreme eğrileri oluşturuldu ve minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri belirlendi. Agar dilüsyon yöntemi ile PEE'nin çalışılan mikroorganizmalara karşı MİK değerleri 64 µg/ml ile 1024 µg/ml arasında bulundu. *S.aureus* için kinetik yöntemle agar dilüsyon yönteminin sonuçları benzerdi ve in vitro antimikrobiyal duyarlılık daha erken bir aşamada belirlenebildi. Kayseri propolisi, sık karşılaşılan patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite göstermekte olup, tedavide kullanılabilirliği açısından değerlendirilmesi önem arz etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Propolis, antimikrobiyal aktivite, agar dilüsyon, mikrobüyyon kinetik sistem

### Abstract

Propolis is a resin collected by honeybees from various plant sources, has attracted the attention of researchers due to its several biological and pharmacological properties in recent years. The aim of this study was to investigate the antimicrobial activity of ethanolic extract of propolis (EEP) collected in Kayseri and its surroundings against some clinically important microorganisms. In the study, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* strains were used and agar dilution method was performed to investigate of antimicrobial activity according to the CLSI. By using microbroth kinetic system based on continuous monitoring of changes in the optical density of bacterial growth, turbidimetric growth curves of a model bacteria (*S.aureus*) in the presence of increasing concentrations of EEP were also generated and determined minimum inhibitory concentration (MIC). MIC values of EEP against tested microorganisms were found between 64 and 1024 µg/ml by agar dilution method. The results in microbroth kinetic system were similar to the agar dilution method for *S.aureus* and in vitro antimicrobial susceptibility was determined in an earlier stage. Kayseri propolis have shown antimicrobial activity against common pathogens, is important to evaluate the availability of treatment.

**Key words:** Propolis, antimicrobial activity, agar dilution, microbroth kinetic system

### GİRİŞ

Propolis, bal arıları (*Apis mellifera* L.) tarafından farklı bitki kaynaklarından toplanan ve çeşitli yağlar, polenler, özel reçine ve mumlu maddelerin karışımından oluşan yapışkan bir maddedir (1). Propolis, arıların patojenik mikroorganizmalara karşı en önemli kimyasal silahı olup, çok eski zamanlardan beri halk sağlığında kullanılmaktadır (2,3). Tarihte ilk kez Yunanlılar tarafından keşfedilerek doğal bir antibiyotik olarak kullanılan propolis, sahip olduğu özelliklerinden dolayı 1960'ların sonundan itibaren bilim adamlarının dikkatini çekmiş ve günümüze kadar propolisin terapötik kullanımı, farmakolojisi, biyolojik aktiviteleri ve kimyasal yapısı üzerine pek çok araştırma yapılmıştır (1). Bu çalışmalar propolisin antimikrobiyal, antiülser, anestezik, antioksidan,

antiinflamatuvar, antihepatotoksik, immünstimülan etkilerini ortaya koymuştur (4-7). Arılar propolisi kovan içerisinde, duvarlardaki delik ve çatlakları kapatmak, petekleri tamir etmek, kovan içinde ölen ancak kovan dışına taşınamayan arı ve diğer canlıların vücutlarının mumyalanmasını sağlamak, bunların çürüyüp mikroorganizma üretmelerini engellemek, yavru yetiştirme dönemlerinde yarı ve çatlaklardan suyun buharlaşımını engelleyerek kovan içi olması gereken nem oranını koruyabilmek, kovan giriş deliğini küçültmek, kovanın dezenfekte edilmesini sağlamak amaçlarıyla kullanılmaktadırlar (3). Propolisin rengi bitki kaynağına bağlı olarak sarı, yeşil ve koyu kahverengiye kadar değişim gösterir. Propolis, eter, kloroform, aseton ve diğer organik çözücülerde kısmen, % 95'lik alkolde büyük ölçüde erimekte,

suda çok az veya hiç erime göstermemektedir. Propolis, tıbbi alanda % 70'lik alkolde erimiş çözelti olarak kullanılmaktadır (3). Yapısında birçok ilacın aktif maddesi olan flavonoidler, antioksidanlar, antibiyotik, antimikotik, antiviral etkili maddeler bulundurmaktadır. Bu maddelerin miktar ve dağılımları ile farmakolojik özellikleri çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (1,3). Propolisin kimyasal bileşimi; toplandığı bitki, coğrafik bölge, mevsim ve arıların cinsi gibi koşullardan etkilenmekte ve buna bağlı olarak biyolojik aktivitesi değişmektedir (8). Bu çalışmada, Kayseri ve çevresinden toplanan propolisin etanolik ekstraktının (PEE) çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Propolis Ekstraksiyonu

Kayseri bölgesinden toplanan ve toz haline getirilen 30 g propolis, % 80'lik 100 ml etanol içerisinde karanlık bir ortamda ve günde 2-3 kez karıştırmak suretiyle bir hafta boyunca bekletildi. Daha sonra Whatman A4 filtre kağıdından süzülerek vakum evaporatör (Laborota 4000, Heidolph, Almanya) ile alkolü buharlaştırıldı. Oluşan propolis ekstresi deney aşamasına kadar koyu renkli plastik kutularda buzdolabında saklandı.

### Propolis Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Propolisin etanolü ekstresinden 820 mg tartılarak 1 ml absölu etanolde çözüldü. Etanolde çözülmüş olan bu propolis çözeltisi, çapı 0,2 µm olan steril membran filtreden süzülerek steril hale getirildi. Bu ana stok solüsyonundan önce % 10 etanol içeren distile suda 2048 µg/ml propolis konsantrasyonu hazırlandı. Propolisin bu konsantrasyondan itibaren dilüe edilerek, 16-1024 µg/ml arasında ikişer kat konsantrasyonları kullanıldı. Sonuçta elde edilen konsantrasyonlardaki etanol içeriği % 0.07-5 arasına düşürülmüş oldu.

### Mikroorganizmaların Üretilmesi

Çalışmada *Staphylococcus aureus* [American Type Culture Collection (ATCC) 25923], *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (klinik izolat), *Helicobacter pylori* [Refik Saydam Kültür Koleksiyonu (RSKK) 10004], *Candida albicans* (ATCC 90028) ve *Candida glabrata* (RSKK 04019) suşları kullanıldı. Bakteriler (*H.pylori* hariç) kanlı agar (Merck, Almanya), kandida türleri Sabouraud dextrose agar (Acumedia, USA) ve *H.pylori* % 5 defibrine koyun kanlı brusella agar (Merck, Almanya) besiyerlerinde uygun inkübasyon koşullarında üretildi.

### Antimikrobiyal aktivite

#### a. Agar dilüsyon testi:

Antimikrobiyal etkinliğinin araştırılmasında Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'nin önerileri doğrultusunda agar dilüsyon yöntemi uygulandı (9). Bu amaçla otoklavda steril edilen Mueller Hinton Agar (MHA) besiyerine (Merck, Almanya) 45-50°C'ye soğuyunca, hazırlanan PEE'den plaklarda son konsantrasyonları 16-1024 µg/ml aralığında ikişer kat olacak şekilde ve her bir konsantrasyon için ayrı ayrı olmak üzere eklendi ve kalınlığı 4 mm olacak şekilde petrilere döküldü. *H.pylori* için bu amaçla % 5 oranında steril defibrine ve ≥ 2 haftalık koyun kanı eklenmiş MHA kullanıldı. Ayrıca üreme kontrolü amacıyla propolis içermeyen MHA ve *H.pylori* için koyun kanlı MHA besiyerleri hazırlandı. Besiyerlerine, çalışılan mikroorganizmaların 0.5 McFarland (*H.pylori* için 2.0 McFarland) standart bulanıklıkta hazırlanan inokulumlarından seyreltmeler yapılarak, son konsantrasyonları 104 CFU/damla olacak şekilde 1-3 µl/damla nokta ekimi yapıldı. Ayrıca propolis çözücüsünün mikroorganizma üzerine inhibisyon etkisini belirlemek amacı ile her bir propolis konsantrasyonunda bulunan çözücü oranını (% 0.07-5

arasındaki her bir dilüsyon için ayrı plak) içeren MHA ve koyun kanlı MHA besiyerleri hazırlandı ve ekim yapıldı. Plaklar 37°C' de 24 saat süreyle -*H.pylori* için mikroaerofilik ortamda 3 gün- inkübe edildi. Inkübasyon sonunda üremenin inhibe edildiği en düşük konsantrasyon minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak belirlendi.

#### b. Mikrobuyyon kinetik sistem:

Bakteriyel üremenin optik dansitesindeki (OD) değişimleri sürekli izleme temeline dayanan mikrobuyyon kinetik sistem kullanılarak, *S.aureus*'un propolisin artan konsantrasyonları varlığında türbidimetrik üreme eğrileri oluşturuldu ve MİK değeri belirlendi. Bu amaçla Mueller Hinton sıvı besiyerinde (Fluka, BioChemica, Germany) üretilen *S.aureus*, son inokulum konsantrasyonu 5x10<sup>5</sup> CFU/ml olacak şekilde ayarlandı ve 96 kuyucuklu düz tabanlı mikropipların kuyucuklarına dağıtıldı. Üzerine PEE'nin hazırlanan konsantrasyonları eklendi. Her bir kuyucuğun OD'si 600 nm'de, "multi-detection" mikropiplak okuyucu (Bio-Tek-Synergy HT Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Winooski, Vt, USA) yardımıyla 37°C'de 24 saat süreyle ve 15 dakika aralıklarla otomatik olarak ölçüldü ve kaydedildi. PEE'nin her bir konsantrasyonunu içeren kuyucuklar ve propolis içermeyen üreme kontrol kuyucuklarındaki bakteriyel üremenin OD'sindeki değişiklikler kullanılarak türbidimetrik üreme eğrileri elde edildi. PEE'nin MİK değeri Microplate Data Collection & Analysis Software (Bio-Tek Instruments, Gen5, Winooski, USA) programı kullanılarak hesaplandı.

## BULGULAR

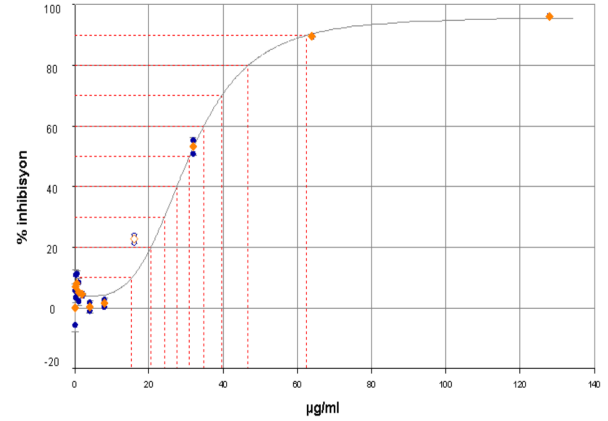
PEE'nin çalışılan mikroorganizmalara karşı agar dilüsyon yöntemine göre MİK değerleri 64 µg/ml ile 1024 µg/ml arasında bulundu (Tablo 1). Üreme kontrolü amacıyla hazırlanan propolis içermeyen besiyerlerinde belirtilen inkübasyon sonunda üreme gözlemlendi. Ayrıca çözücünün kullanılan oranlarda mikroorganizmalar üzerine inhibitör etkisi gözlemlenmedi. Mikrobuyyon kinetik sistemle, *S.aureus*'un PEE'nin artan konsantrasyonları varlığında üremesinin optik dansitesindeki değişiklikler kullanılarak elde edilen türbidimetrik üreme eğrileri Şekil 1'de verilmiştir. PEE'nin konsantrasyonlarının artması ile bakteriyel üremede artan inhibisyon gözlemlendi. Her bir kuyucuktaki *S.aureus*'un üreme eğrileri inkübasyonun başından itibaren istenilen her an görüntülenebildi. PEE'nin *S.aureus*'a karşı MİK değeri agar dilüsyon yöntemi ile 64 µg/ml, mikrobuyyon kinetik sistemle 62.5 µg/ml olarak bulundu ve bu yöntemle MİK değeri inkübasyon periyodunun ilk yarısında (yaklaşık 12 saatte) belirlenebildi (Şekil 2). Sonuçların çok yakın olduğu görüldü.

**Tablo 1.** PEE'nin çalışılan mikroorganizmalara karşı MİK değerleri

Mikroorganizma	Propolis Etanolik Ekstraktı MİK (µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	64
<i>Enterococcus faecalis</i>	128
<i>Escherichia coli</i>	1024
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	512
<i>Helicobacter pylori</i>	128
<i>Candida albicans</i>	128
<i>Candida glabrata</i>	128

	1	2	3
A			
B			
C			
D			
E			
F			
G			
H			

**Şekil 1.** S.aureus'un PEE varlığında üreme eğrileri. A1-B1, bakteri içermeyen besiyeri; C1-D1, üreme kontrolü için PEE içermeyen kuyucuklar; E1-F1, 0,25 µg/ml; G1-H1, 0,5 µg/ml; A2-B2, 1 µg/ml; C2-D2, 2 µg/ml; E2-F2, 4 µg/ml; G2-H2, 8 µg/ml; A3-B3, 16 µg/ml; C3-D3, 32 µg/ml; E3-F3, 64 µg/ml; G3-H3, 128 µg/ml PEE konsantrasyonları ve bakteri içeren kuyucuklar



**Şekil 2.** S.aureus'a karşı PEE'nin MİK eğrisi (Y, % inhibisyon; X, PEE konsantrasyonları)

## TARTIŞMA

Doğal ürünler insanlar arasında binlerce yıldır birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Doğal bir ürün olan propolis de, toksik etkisinin olmaması, kolay elde edilebilir olması ve geniş biyolojik aktiviteye sahip olması gibi nedenlerden dolayı tedavi amacıyla kullanımı açısından giderek önem kazanmaktadır (1). Propolisin antimikrobiyal etkileri üzerine yapılmış pek çok bilimsel araştırma bulunmaktadır. Ancak propolisin, toplandığı bitkiye, coğrafik bölgeye, mevsime ve toplayan arı türüne bağlı olarak kimyasal bileşimi ve buna bağlı olarak biyolojik aktivitesi değiştiğinden bildirilen antimikrobiyal aktivite sonuçları da farklı olmaktadır (4-8). Türkiye'den Kazan ve Marmaris bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin etanolik ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, Kazan yöresi örneklerinin içerdiği kafeik asit esterlerine bağlı olarak daha güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (10). Uzel ve ark., Anadolu'nun dört farklı bölgesinden (Bursa-Orhangazi, Bartın, Ankara-Mamak, Trabzon) toplanan propolisin etanolik ekstraktlarının, Gram pozitif bakteri ve mayalara karşı oldukça etkili olduklarını ve tüm propolis örneklerinin ana bileşiminin flavanoidler olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Bursa-Orhangazi yöresi propolisinin MİK değerlerini Streptococcus sobrinus ve E.faecalis için 2 µg/ml, C.albicans ve Candida krusei için 4 µg/ml, E.coli ve Candida tropicalis için 16 µg/ml, Salmonella typhimurium ve Pseudomonas aeruginosa için 32 µg/ml, Streptococcus mutans, S. aureus, Staphylococcus epidermidis ve Enterobacter aerogenes için 8 µg/ml olarak belirlemişler ve diğer propolis örneklerine göre daha güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir (11). İzmir, Yozgat, Kayseri, Adana, Artvin ve Erzurum'dan toplanan propolis örneklerinin S.aureus ve E.coli'ye karşı çok düşük konsantrasyonlarda antibakteriyel etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (12). Muğla çevresi propolis örneklerinin ise başta S.mutans olmak üzere birçok Gram pozitif bakteriye etkili iken antifungal aktivitesinin daha az olduğu bildirilmiştir (13). Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda propolis örneklerinin MİK düzeyleri değişmekle birlikte birçok bakteri ve mantar türüne etkili olduğu ve bu etkinin daha çok

propolis örneklerinin içeriğindeki flavonoid ve kafeik asit türevleri ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (14,15). Çalışmamızda değerlendirilen Kayseri ve çevresinden elde edilen propolisin etanolik ekstresinin, özellikle S.aureus'a olmak üzere çalışılan Gram pozitif bakteri ve kandida türlerine karşı dikkate değer antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ortaya konmuştur. Bu propolisin Silici ve Koç tarafından GC-MS ile kimyasal analizi yapılmış ve ana bileşenlerinin flavonoidler ile aromatik ve yağ asitlerinden oluştuğu gösterilmiştir (16). H.pylori, prevalansı yüksek ve prekanseröz bir bakteri olması nedeniyle tanı ve tedavisi zorunlu bir bakteridir. Günümüzde kullanılan antibiyotiklere direnç geliştirmeye başlaması nedeniyle tedavide güçlükler yaşanmaktadır (17). H. pylori infeksiyonlarının tedavisinde antibiyotikler desteklemek ya da alternatif bir tedavi oluşturmak amacıyla Nostro ve ark., PEE'nin etkinliğini araştırmışlar ve MİK değerini 75 µg/ml olarak rapor etmişlerdir. Bu ürünün in vitro etkilerinin H. pylori infeksiyonlarının tedavisinde yeni ve güvenilir tedavi rejimleri oluşturulmasında dikkate alınması gerektiğini ve bu amaçla klinik çalışmalara ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir (18). Yapılan çalışmalarda değişik bölgelere ait propolisin H.pylori'ye karşı 10-300 µg/ml arasında MİK değerlerinin değiştiği ve etkinliğinin doza bağımlı olarak arttığı rapor edilmiştir (18,19). Bizim çalışmamızda Kayseri propolisinin de düşük dozda antihelikobakter aktiviteye sahip olduğu (MİK: 128 µg/ml) gösterilmiş olup, bu sonucun ileri deneysel ve klinik çalışmaların önünü açacağı düşünülmektedir. Mikrobuyyon kinetik sistem, antimikrobiyal ajan varlığında mikroorganizma üremesinin OD'indeki değişimleri sürekli kaydetme temeline dayanır ve inkübasyon periyodunun ihtiyaç duyulan herhangi bir zamanında antimikrobiyal ajanın mikrobiyal üremedeki inhibisyon etkisinin derecesini görmemize olanak sağlar. Böylece tedavi rejimi konvansiyonel yöntemlere göre daha erken planlanabilir (20,21). Bu çalışmada mikrobuyyon kinetik sistem kullanılarak, bir model bakterinin (S.aureus), propolisin artan konsantrasyonları varlığında türbidimetrik üreme eğrileri oluşturulmuş ve inkübasyon süresi boyunca kinetik veri elde edilmiştir. Bu sistem ile agar dilüsyon yönteminin sonuçları benzer bulunmuş ve in vitro antimikrobiyal

duyarlılık daha erken bir aşamada belirlenebilmiştir (yaklaşık 12 saatte). Doğal bir ürün olan propolisin, önemli klinik patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi ve bu aktivitenin kimyasal bileşenleri ile ilişkisinin belirlenmesi amacıyla kapsamlı çalışmaların yapılması tıp alanında kullanılabilirliği açısından önem arz etmektedir.

#### KAYNAKLAR

- Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem Toxicol* 1998;36:347-63.
- Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutical activity. *Apidologie* 2005;26:83-99.
- Kumova U, Korkmaz A, Avcı BC, Güney C. Önemli bir arı ürünü: Propolis. *Uludağ Arıcılık Dergisi* 2002;23:10-23.
- Bankova V, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000;31:3-15.
- Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999;64:235-40.
- Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, Shimiziu MT. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses* 2001;44:375-8.
- Fuliang HU, Hepburn HR, Xuan H, Chen M, Daya S, Radloff SE. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. *Pharmacol Res* 2005;51:147-52.
- Sforcin JM, Fernandes JA, Lopes CAM, Bankova V, Funari SRC. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2000;73:243-9.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement. CLSI document M100-S18, Wayne, PA, USA, 2008.
- Kartal M, Yıldız S, Kaya S, Kurucu S, Topçu G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *J Ethnopharmacol* 2003;86:69-73.
- Uzel A, Sorkun K, Önçağ Ö, Çoğulu D, Gençay Ö, Salih B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res* 2005;160:189-95.
- Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, Bankova V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine* 2005;12:221-8.
- Uğur A, Arslan T. An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Muğla province of Turkey. *J Med Food* 2004;7(1):90-4.
- Salomao K, Dantas AP, Borba CM, Campos LC, Machado DG, Aquino Neto FR, et al. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Lett Appl Microbiol* 2004;38:87-92.
- Sawaya ACHF, Palma AM, Caetano FM, Marcucci MC, Cunha IBS, Arau CEP, et al. Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Lett Appl Microbiol* 2002;35:203-7.
- Silici S, Koc AN. Comparative study of in vitro methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Lett Appl Microbiol* 2006;43:318-24.
- Duck WM, Sobel J, Pruckler JM, Song Q, Swerdlow D, Friedman C, et al. Antimicrobial resistance incidence and risk factors among *Helicobacter pylori* infected persons, United States. *Emerg Infect Dis* 2004;10(6):1088-94.
- Nostro A, Cellini L, Di Bartolomeo S, Di Campli E, Grande R, Cannatelli MA, et al. Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytother Res* 2005;19(3):198-202.
- Boyanova L, Gergova G, Nikolov R, Derejian S, Lazarova E, Katsarov N, et al. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *J Med Microbiol* 2005;54:481-3.
- Kaya EG, Özbilge H, Albayrak S. Determination of the effect of gentamicin against *Staphylococcus aureus* by using microbroth kinetic system. *ANKEM Dergisi* 2009;23(3):110-4.
- Lehtinen J, Jarvinen S, Virta M, Lilius EM. Real-time monitoring of antimicrobial activity with the multiparameter microplate assay. *J Microbiol Methods* 2006;66(3):381-9.