



BAZI UÇUCU YAĞLARIN ORAL BAKTERİLER ÜZERİNDE ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SOME ESSENTIAL OILS ON ORAL BACTERIA

Murat Sefa KARAASLAN^{1,2} , Nurten ALTANLAR^{1*} 

¹Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06560, Ankara, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 06110, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Ağız sağlığı ve genel sağlık arasında önemli bir ilişki bulunmaktadır. Ağızda görülen hastalıklar bireylerin günlük hayatını etkilemekte ve yaşam kalitesini düşürmektedir. Diş çürükleri ve periodontal hastalıklar ağız sağlığını bozan başlıca nedenler arasındadır. Diş fırçalarının bakterilerin kolonize olduğu bölgelere ulaşamaması, kimyasal içerikli gargara kullanımında görülen yan etki gibi nedenlerden dolayı güvenli ve etkili ürünlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada bazı uçucu yağların oral bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 11975 ve *L. casei* RSKK 06029 test bakterileri olarak kullanılmıştır. Uçucu yağların antibakteriyel aktiviteleri disk difüzyon ve agar kuyu difüzyon yöntemleriyle araştırılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Her iki yöntemde de test bakterilerine karşı en yüksek antibakteriyel aktiviteyi kekik uçucu yağı göstermiştir. Kekik uçucu yağının disk difüzyon yönteminde *L. acidophilus*'a karşı ve agar kuyu difüzyon yönteminde *S. mutans*'a karşı inhibisyon zon çapları sırasıyla 57.6 ± 0.8 ve 58 ± 0.9 mm olarak belirlenmiştir. Disk difüzyon yönteminde okaliptüs uçucu yağının *E. faecalis*, *L. acidophilus* ve *S. mutans* test bakterilerine karşı inhibisyon zon çapı saptanırken, kuyu difüzyon yönteminde zon çapı gözlemlenmemiştir. Yöntem bulguları literatürle kıyaslandığında gözlemlenen aktivite farklılıkları uçucu yağların farklı bileşenler içermesi, izole edildikleri bitkilerin toplanma zamanına göre değişkenlik gösterebilmektedir. Gözlemlenen aktivite sonuçlarındaki farklılığın daha iyi aydınlatılabilmesi için uçucu yağların karakterizasyonunun yapılması önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Ağız sağlığı, antibakteriyel aktivite, kekik, uçucu yağ

ABSTRACT

Objective: There is a significant relationship between oral health and general health. Oral diseases affect the daily lives of individuals and reduce the quality of life. Dental caries and periodontal diseases are among the primary causes that deteriorate oral health. Safe and effective products are needed due to reasons such as the inefficient of toothbrushes to reach areas where bacteria are colonized and the side effects seen when using chemical mouthwash. This study aims to investigate the antibacterial activity of the essential oils against oral bacteria.

Material and Method: In this study, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 11975 and *L. casei* RSKK 06029 were used as test

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Nurten Altanlar
e-posta / e-mail: naltanlar@ankara.edu.tr, Tel. / Phone: +905324424312

Gönderilme / Submitted : 08.08.2024

Kabul / Accepted : 13.08.2024

Yayınlanma / Published : 10.09.2024

bacteria. Antibacterial activities of the essential oils were investigated by disk diffusion and agar well diffusion methods.

Result and Discussion: *In antibacterial activity methods, thyme essential oil showed the highest activity against the test bacteria. The inhibition zone diameters of thyme essential oil against *L. acidophilus* in the disk diffusion method and against *S. mutans* in the agar well diffusion method were determined as 57.6 ± 0.8 and 58 ± 0.9 mm, respectively. While the inhibition zone diameters of eucalyptus essential oil against *E. faecalis*, *L. acidophilus* and *S. mutans* test bacteria were determined in the disk diffusion method, the zone diameters were not observed in the well diffusion method. The methods findings may differ between literatures due to reasons such as the essential oils contain different components and the difference in the collection time of the plants which they are isolated. It is important to characterize essential oils to better explain differences in observed activity results.*

Keywords: *Antibacterial activity, essential oil, oral health, thyme*

GİRİŞ

İnsanlarda genel sağlık ile ağız sağlığı doğrudan ilişkilidir. Ağızda görülen hastalıklar bireylerin çalışma kapasitesini ve yaşam kalitesini düşürmektedir. Ayrıca kötü ağız sağlığında görülen ağrı ve rahatsızlık hissi bireyleri fiziksel, duygusal ve sosyal olarak etkilemektedir [1]. Aynı zamanda ağız sağlığı osteoporoz, romatoid artrit ve kardiyovasküler sistemi etkileyen sistemik hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir [2].

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), dünya nüfusunun yaklaşık yarısının ağız hastalıklarından etkilendiğini bildirmektedir. 2022 Küresel Ağız Sağlığı Durum Raporu'nda, ağız sağlığını bozan hastalıkların başlıca nedenleri diş çürükleri, diş kayıpları, periodontal hastalıklar ve ağız-dudak kanserleri olarak belirtilmiştir [3].

Diş çürükleri en yaygın ağız sağlığı problemidir ve tedavi edilmeyen çürüklerin dünya genelinde 2 milyar yetişkini ve 520 milyon çocuğu etkilediği düşünülmektedir [3,4]. Biyofilm oluşturma yeteneğiyle diş çürüklerinin en önemli etiyolojik ajanı *Streptococcus mutans* kabul edilmektedir. İnsanda diğer önemli karyojenik mikroorganizma, çürük lezyonlarının gelişiminden sorumlu olan *Lactobacillus casei* ve *L. acidophilus* gibi *Lactobacillus* türleridir [5].

Ağız boşluğunda bulunan *Enterococcus faecalis* ise endodontik enfeksiyonlarla ilişkilendirilmektedir [5,6]. Endodontik tedavi sonrası yeniden enfeksiyon ve ağrıyla raporlanan vakalarda yaklaşık %90 prevalansla tespit edilmektedir [6].

Ağızdaki enfeksiyon riskinin düşürülmesinde buradaki mikroorganizma yükünün sınırlanması önemlidir. Günlük hijyenin bir parçası olan diş fırçalamayla uygulanan mekanik temizlik bakterilerin kolonize olduğu bölgelere ulaşmada yetersiz kalabilmektedir. Mekanik temizlemenin yanında kullanılan kimyasal içerikli gargaraların mukozal emilimi bunların uzun süreli kullanımını sınırlamakta ek olarak dil ve diş rengini değiştirmesi ve alerjik reaksiyonlar gibi yan etkilere neden olabilmektedir [7,8]. Ağız içi hijyenin sağlanması ve ağız sağlığının sürdürülmesinde güvenli ve etkili ürünlere ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

Binlerce yıldır hastalıkların tedavisinde bitkiler kullanılmakta ve bu bitkilerden elde edilen doğal ürünler farmasötik endüstri için temel oluşturmaktadır [9]. Uçucu yağlar bitkilerin oda sıcaklığında buharlaşabilen ve kokulu ikincil metabolitleri olarak tanımlanmaktadır [10]. Yapılan birçok çalışmada uçucu yağların antibakteriyel etkinliği bildirilmiştir [10-12].

Uçucu yağların gerek antibakteriyel etkileri gerekse hoş kokuları sayesinde ağız hijyen ürünlerinde kullanımları yaygındır. Bunların yanında ekonomik uygunluk ve düşük toksisite nedeniyle öne çıkmaktadır [9].

Çalışmamızda toplumda sıklıkla kullanılan ve ticari olarak temin edilen *Eucalyptus globulus* Labill. (okaliptüs), *Mentha piperita* L. (tıbbi nane), *Syzygium aromaticum* L. (karanfil) ve *Thymus vulgaris* L. (kekik) uçucu yağların, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. mutans* ATCC 25175, *L. acidophilus* ATCC 11975 ve *L. casei* RSKK 06029 standart test bakterilerine karşı antibakteriyel etkinliklerinin disk difüzyon ve agar kuyu difüzyon testleriyle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kullanılan Uçucu Yağlar

Çalışmada ticari olarak temin edilen *E. globulus* (okaliptüs), *M. piperita* (tıbbi nane), *S. aromaticum* (karanfil) ve *T. vulgaris* (kekik) bitkilerinin uçucu yağları kullanılmıştır.

Test Bakterileri ve Kültür Koşulları

Çalışmada *E. faecalis* ATCC 29212, *S. mutans* ATCC 25175, *L. acidophilus* ATCC 11975 ve *L. casei* RSKK 06029 standart bakteri suşları kullanılmıştır. *S. mutans* ATCC 25175 ve *L. acidophilus* ATCC 11975, *L. casei* RSKK 06029 test bakterileri sırasıyla Brain Heart Infusion (BHI) (Merck, Almaya) agar ve De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Merck, Almanya) agar besiyerlerinde 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 24-48 saat inkübe edilmiştir. *E. faecalis* ATCC 29212 test bakterisi ise BHI agar besiyerinde 37°C'de aerob ortamda 24 saat inkübe edilmiştir.

Antibakteriyel Aktivite

Disk Difüzyon Testi

Uçucu yağların antibakteriyel aktivitesi Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre yapılmıştır. Bazı eklemeler ile çeşitli modifikasyonlar gerçekleştirilmiştir. Tüm test bakterileri uygun koşullarda üretilerek taze kültürleri hazırlanmıştır. Bu kültürler steril serum fizyolojik çözeltisi ile 0.5 McFarland yoğunluğuna ayarlanmıştır. Steril eküvyonlar ile bakteri süspansiyonları *E. faecalis* için Mueller Hinton Agar (MHA) (Merck, Almanya), *S. mutans* için BHI agar, *L. acidophilus* ve *L. casei* için ise MRS agar besiyerlerine tatbik edildikten sonra daha önce uçucu yağların 6 mm çaplı steril boş disklerle (20 µl emme kapasitesine sahip) eşit hacimde emdirilerek hazırlanmış diskleri petrilere yerleştirilmiştir. İnkübasyon süresi ardından zon çapları kumpas ile ölçülerek kaydedilmiştir [13,14]. Kontrol olarak siprofloksasin (5µg, Oxoid) ve teikoplanin (30 µg, Bioanalyse) antibiyotik diskleri kullanılmıştır.

Agar Kuyu Difüzyon Testi

Tüm test bakterileri belirtilen koşullara göre kültürlenmiş ve taze kültürler steril serum fizyolojik çözeltisi içerisinde 0.5 MacFarland yoğunluğuna göre ayarlanmıştır. Bakteri süspansiyonlarından steril eküvyonlar yardımıyla alınarak *E. faecalis* için MHA, *S. mutans* için BHI agar, *L. acidophilus* ve *L. casei* için ise MRS agar, besiyerlerine tatbik edilmiştir. Ardından petrilere 6 mm çapında kuyular açılıp, dip kısımlarına 45 dereceye kadar soğutulmuş steril besiyerlerinden 20 µl damlatılmış ve kuyulara 50 µl uçucu yağ örnekleri ilave edilmiştir. Petrilere *E. faecalis* için aerobik ortamda 18-24 saat, *S. mutans*, *L. acidophilus*, *L. casei* bakterileri için %5 CO₂'li ortamda 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyuların etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek kaydedilmiştir [15].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Antibakteriyel Aktivite Sonuçları

Uçucu yağların test bakterilerine karşı disk difüzyon test sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. İnhibisyon zon çaplarının görseli Şekil 1'de gösterilmiştir.

Disk difüzyon yönteminde en yüksek aktiviteyi kekik uçucu yağı *L. acidophilus*'a karşı 57.6±0.8 mm zon çapıyla göstermiştir. En düşük aktivite okaliptüs uçucu yağında görülmüştür.

Agar kuyu difüzyon testi sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. İnhibisyon zon çaplarının görseli Şekil 2'de gösterilmiştir.

Kuyu difüzyon yönteminde en yüksek aktiviteyi kekik uçucu yağı *S. mutans*'a karşı 58±0.9 mm zon çapıyla göstermiştir. Kuyu difüzyon yönteminde okaliptüs uçucu yağının test bakterilerine karşı zon oluşumu gözlenmemiştir.

Çalışmamızda uçucu yağların antibakteriyel etkinlikleri disk difüzyon ve agar kuyu difüzyon yöntemleriyle değerlendirilmiştir. *S. mutans*'ın MHA'da zayıf üremesi sonucu BHI agar besiyeri kullanılmıştır [16,17]. *L. acidophilus* ve *L. casei* test bakterileri için ise MRS agar besiyeri kullanılmıştır [18,19].

Tablo 1. Disk difüzyon test sonuçları (mm)

		Test Bakterileri			
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>L. acidophilus</i> ATCC 11975	<i>L. casei</i> RSKK 06029	<i>S. mutans</i> ATCC 25175
Uçucu Yağlar	<i>T. vulgaris</i> (kekik)	22±0.3	57.6±0.8	48.7±0.9	47.5±1.3
	<i>M. piperita</i> (tıbbi nane)	10.2±0.2	32.4±0.5	27±0.5	38.2±0.8
	<i>S. aromaticum</i> (karanfil)	10.3±0.3	18.9±0.2	23.2±0.4	22.8±0.7
	<i>E. globulus</i> (okaliptüs)	9.9±0.2	9.0±0.4	-	13.2±0.8
Kontrol	Siprofloksasin	18±0.2	-	26.1±0.4	20±0.4
	Teikoplanin	TE	28.7±0.3	-	TE

*TE: Test edilmedi, -:zon yok., ±Standart Sapma

Tablo 2. Agar kuyu difüzyon test sonuçları (mm)

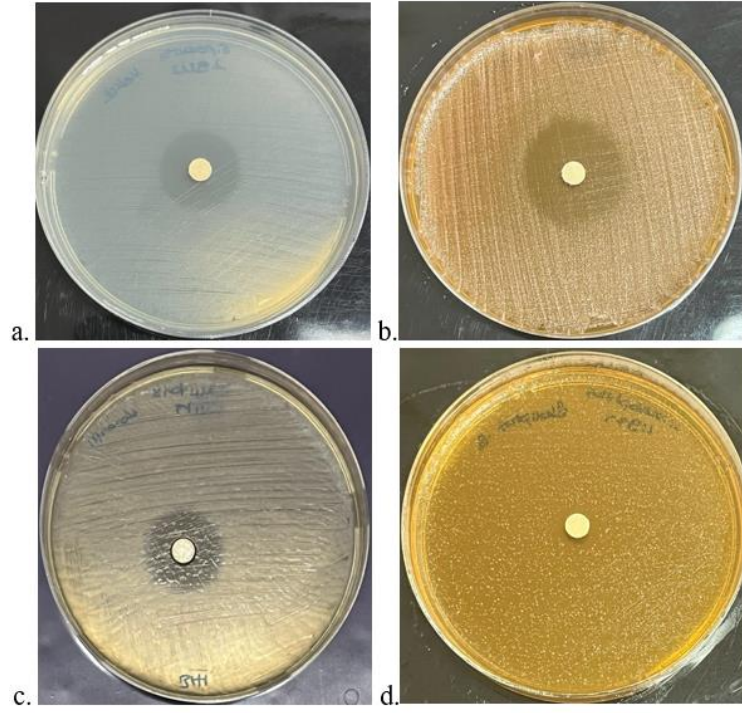
		Test Bakterileri			
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>L. acidophilus</i> ATCC 11975	<i>L. casei</i> RSKK 06029	<i>S. mutans</i> ATCC 25175
Uçucu Yağlar	<i>T. vulgaris</i> (kekik)	25±0.2	39±0.3	27±0.6	58±0.9
	<i>M. piperita</i> (tıbbi nane)	-	12±0.5	18±0.4	30±0.5
	<i>S. aromaticum</i> (karanfil)	11.5±0.5	17±0.1	16±0.3	21±0.3
	<i>E. globulus</i> (okaliptüs)	-	-	-	-

*:-:zon yok, ± Standard Sapma

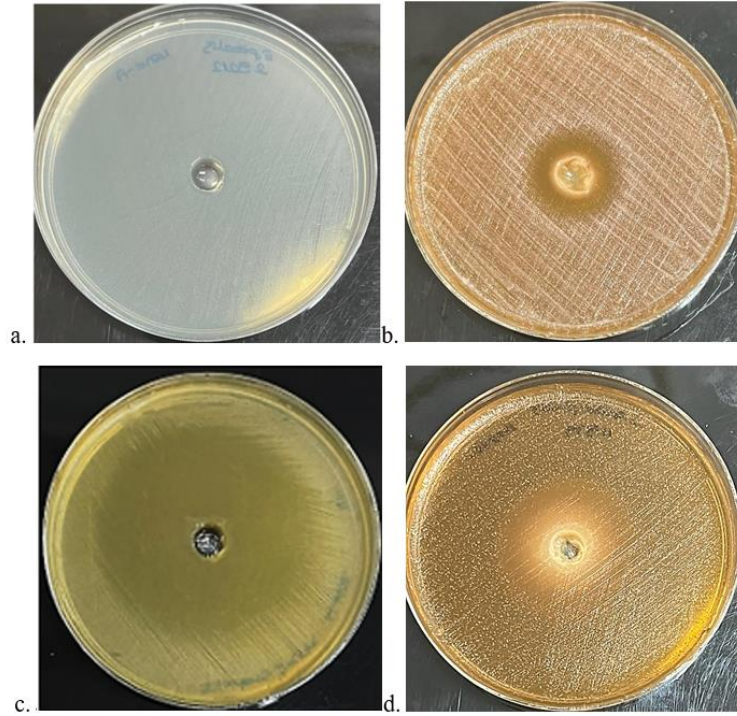
Maddelerin antimikrobiyal aktivite açısından taranmasında disk difüzyon yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Yöntem basit uygulama şekli ve düşük maliyetli olmasıyla avantaj sağlamaktadır. Ancak kullanılacak besiyeri seçimi, ortam pH'sı, agar derinliği, nem içeriği ve inkübasyon koşulları gibi parametreler önemlidir. Yöntemde test edilen maddenin çözünürlüğü, difüzyon özellikleri, buharlaşma ya da maddenin disk üzerinde çökmesi inhibisyon çapını etkileyebilmektedir [20,21]. Farklı difüzyon hızlarına sahip bileşenleri içeren karışımların incelenmesi yöntemi sınırlandırılmaktadır [20].

Agar kuyu difüzyon testi bitki kaynaklı maddelerin aktivitesinin test edilmesinde sıklıkla kullanılan tarama testlerinden biridir [20]. Özellikle katyonik özelliklere sahip maddelerin diske adsorbsiyonu sonucu ortama yayılamaması nedeniyle agar kuyu difüzyonu yöntemi tercih edilmektedir [22].

Disk difüzyon yönteminde boş kağıda emdirilmiş örneğin agar ortamına difüzyonu olurken agar kuyu difüzyon yönteminde örnek doğrudan ortama temas ederek difüze olmaktadır. Her iki yöntemde de görülen difüzyon süreci moleküllerin yüksek konsantrasyon alanından düşük konsantrasyon alanına geçmesidir. Bu süreç moleküllerin sayısı, ağırlığı, yüzey alanı ve şekli gibi çok sayıda faktöre bağlı olarak değişmektedir [22]



Şekil 1. Uçucu yağların disk difüzyon yöntemiyle test bakterilerine karşı etkisi
 a- *T. vulgaris* (kekik) uçucu yağı ve *E. faecalis*, b- *M. piperita* (tıbbi nane) uçucu yağı ve *L. casei*,
 c- *S. aromaticum* (karanfil) uçucu yağı ve *S. mutans*, d- *E. globulus* (okaliptüs) uçucu yağı ve *L. acidophilus*



Şekil 2. Uçucu yağların agar kuyu difüzyon yöntemiyle test bakterilerine karşı etkisi
 a- *M. piperita* (tıbbi nane) ve *E. faecalis*, b- *S. aromaticum* (karanfil) uçucu yağı ve *L. casei*,
 c- *T. vulgaris* (kekik) uçucu yağı ve *S. mutans*, d- *T. vulgaris* (kekik) uçucu yağı ve *L. acidophilus*

Bir bitki ekstresinin antimikrobiyal aktivitesinin disk difüzyon ve agar kuyu difüzyon yöntemleri kullanılarak karşılaştırıldığı bir çalışmada ölçülen zon çaplarında farklılık olduğu gözlemlenmiştir [23]. Kawhena ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada uçucu yağın antifungal aktivitesi disk difüzyon ve agar kuyu difüzyon yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Zon çapları arasındaki değişkenlik uçucu yağın diske emdirilen hacmi ile ve kuyuya eklenen hacminin farklı olmasına dayandırılmıştır [24].

Çalışmamızda kullanılan her iki yöntemde test bakterilerine karşı en yüksek aktiviteyi kekik uçucu yağı göstermiştir. Disk difüzyon yönteminde *L. acidophilus*'a karşı 57.6 ± 0.8 mm zon çapı kaydedilirken, agar kuyu difüzyon yönteminde *S. mutans*'a karşı 58 ± 0.9 mm zon çapı belirlenmiştir. Disk difüzyon yönteminde okaliptüs uçucu yağının *E. faecalis*, *L. acidophilus* ve *S. mutans* test bakterilerine karşı zon çapı belirlenebilirken kuyu difüzyon yönteminde zon çapı gözlemlenmemiştir.

Park ve Yoon (2018) uçucu yağların oral patojen bakterilere karşı aktivitelerini disk difüzyon yöntemiyle değerlendirdikleri bir çalışmada nane ve okaliptüs uçucu yağının *S. mutans*'a karşı inhibisyon çaplarını sırasıyla; 16.10 ± 0.44 ve 14.75 ± 1.25 mm olarak bildirmişlerdir [25]. Çalışmamızda bu değerler 38.2 ± 0.8 ve 13.2 ± 0.8 mm olarak saptanmıştır.

Galovičová ve ark. (2021) kekik uçucu yağının çeşitli bakterilere karşı etkinliğini değerlendirdiği bir çalışmada uçucu yağın *E. faecalis*'e karşı disk difüzyon yönteminde 10.22 ± 1.30 mm zon çapı bildirilmiştir [26]. Çalışmamızda bu değer 22 ± 0.3 mm olarak bulunmuştur.

Çalışmamız sonucunda test edilen uçucu yağların oral patojen bakterilere karşı antibakteriyel etki gösterdiği saptanmıştır. Yöntem bulguları literatürle kıyaslandığında değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenlik, uçucu yağların çok bileşenli karışımlar olmasına, uçucu yağların izole edildiği bitkilerin coğrafyası ve toplanma zamanına göre değişkenlik gösterebileceğine dayandırılabilir. Etkiden sorumlu bileşenler ve bu bileşenlerin miktarlarının tespit edilebilmesi ve içerdiği maddelerin fizikokimyasal özelliklerinin saptanabilmesi için yağların karakterizasyonunun yapılması aktivite sonuçlarındaki değişkenliğin daha iyi aydınlatılabilmesi açısından önem taşımaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TYL-2023-2776 proje kodu ile Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Çalışmanın yürütülmesi için proje desteği sunan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederiz.

YAZAR KATKILARI

Kavram: M.S.K., N.A.; Tasarım: M.S.K., N.A.; Denetim: M.S.K., N.A.; Kaynaklar: M.S.K., N.A.; Malzemeler: M.S.K., N.A.; Veri Toplama ve/veya İşleme: M.S.K., N.A.; Analiz ve/veya Yorumlama: M.S.K., N.A.; Literatür Taraması: M.S.K., N.A.; Makalenin Yazılması: M.S.K., N.A.; Kritik İnceleme: M.S.K., N.A.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

ETİK KURUL ONAYI

Yazarlar bu çalışma için etik kurul onayının zorunlu olmadığını beyan etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Peres, M.A., Macpherson, L.M.D., Weyant, R.J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M.R., Listl, S., Celeste, R.K., Guarnizo-Herreño, C.C., Kearns, C., Benizian, H., Allison, P., Watt, R.G. (2019). Oral diseases: A global public health challenge. *The Lancet*, 394(10194), 249-260. [CrossRef]
2. Palombo, E.A. (2011). Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: Potential application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2011, 15. [CrossRef]
3. Jain, N., Dutt, U., Radenkov, I., Jain, S. (2024). WHO's global oral health status report 2022: Actions,

- discussion and implementation. *Oral Diseases*, 30(2), 73-79. [\[CrossRef\]](#)
4. Kassebaum, N.J., Smith, A.G.C., Bernabé, E., Fleming, T.D., Reynolds, A.E., Vos, T., Murray, C.J.L., Marcenes, W., Abyu, G.Y., Alsharif, U., Asayesh, H., Benzian, H., Dandona, L., Dandona, R., Kasaeian, A., Khader, Y.S., Khang, Y.H., Kokubo, Y., Kotsakis, G.A., Yonemoto, N. (2017). Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990-2015: A systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. *Journal of Dental Research*, 96(4), 380-387. [\[CrossRef\]](#)
 5. Wen, Z.T., Huang, X., Ellepola, K., Liao, S., Li, Y. (2022). Lactobacilli and human dental caries: More than mechanical retention. *Microbiology (United Kingdom)*, 168(6), 001196. [\[CrossRef\]](#)
 6. Alghamdi, F., Shakir, M. (2020). The Influence of *Enterococcus faecalis* as a dental root canal pathogen on endodontic treatment: A systematic review. *Cureus*, 12(3), e7257. [\[CrossRef\]](#)
 7. Balappanavar, A., Sardana, V., Singh, M. (2013). Comparison of the effectiveness of 0.5% tea, 2% neem and 0.2% chlorhexidine mouthwashes on oral health: A randomized control trial. *Indian Journal of Dental Research*, 24(1), 26. [\[CrossRef\]](#)
 8. Batista, A.L.A., Diógenes Alves Uchôa Lins, R., de Souza Coelho, R., do Nascimento Barbosa, D., Moura Belém, N., Alves Celestino, F.J. (2014). Clinical efficacy analysis of the mouth rinsing with pomegranate and chamomile plant extracts in the gingival bleeding reduction. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 20(1), 93-98. [\[CrossRef\]](#)
 9. Nagy-Bota, M.C., Man, A., Santacroce, L., Brinzaniuc, K., Pap, Z., Pacurar, M., Pribac, M., Ciurea, C.N., Pinteá-Simon, I.A., Kovacs, M. (2021). Essential Oils as alternatives for root-canal treatment and infection control against *Enterococcus faecalis*-A Preliminary Study. *Applied Sciences*, 11(4), 1422. [\[CrossRef\]](#)
 10. Bunse, M., Daniels, R., Gründemann, C., Heilmann, J., Kammerer, D.R., Keusgen, M., Lindequist, U., Melzig, M.F., Morlock, G.E., Schulz, H., Schweiggert, R., Simon, M., Stintzing, F.C., Wink, M. (2022). Essential Oils as multicomponent mixtures and their potential for human health and well-being. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 956541. [\[CrossRef\]](#)
 11. Elangovan, S., Mudgil, P. (2023). Antibacterial properties of *Eucalyptus globulus* essential oil against MRSA: A systematic review. *Antibiotics*, 12(3), 474. [\[CrossRef\]](#)
 12. Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G.C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M.R., Oluwaseun Ademiluyi, A., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi, S.A., Iriti, M. (2017). Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules*, 22(1), 70. [\[CrossRef\]](#)
 13. Gurgan, S., Vural, U.K., Atalay, C., Tassery, H., Miletic, I., Gurpinar, S.S. (2022). Antibacterial activity and biofilm inhibition of new-generation hybrid/fluoride-releasing restorative materials. *Applied Sciences*, 12(5), 2434. [\[CrossRef\]](#)
 14. Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society for Microbiology*, 1-23.
 15. Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71. [\[CrossRef\]](#)
 16. Galvão, L.C.D.C., Furletti, V.F., Bersan, S.M.F., Da Cunha, M.G., Ruiz, A.L.T.G., de Carvalho, J.E., Sartoratto, A., Rehder, V.L.G., Figueira, G.M., Teixeira Duarte, M.C., Ikegaki, M., De Alencar, S.M., Rosalen, P.L. (2012). Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012(1), 751435. [\[CrossRef\]](#)
 17. Wassel, M.O., Khattab, M.A. (2017). Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and inhibition of bacterial induced enamel demineralization of propolis, miswak, and chitosan nanoparticles based dental varnishes. *Journal of Advanced Research*, 8(4), 387. [\[CrossRef\]](#)
 18. Anisimova, E.A., Yarullina, D.R. (2019). Antibiotic resistance of lactobacillus strains. *Current Microbiology*, 76(12), 1407-1416. [\[CrossRef\]](#)
 19. Dunn, L.L., Davidson, P.M., Critzer, F.J. (2016). Antimicrobial efficacy of an array of essential oils against lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, 81(2), 438-444. [\[CrossRef\]](#)
 20. Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J., Abram, M. (2011). Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127(4), 1821-1827. [\[CrossRef\]](#)
 21. King, T., Dykes, G., Kristianti, R. (2008). Comparative evaluation of methods commonly used to determine antimicrobial susceptibility to plant extracts and phenolic compounds. *Journal Of AOAC International*, 91(6), 1423-1429. [\[CrossRef\]](#)
 22. Valgas, C., De Souza, S.M., Smânia, E.F.A., Smânia, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 369-380. [\[CrossRef\]](#)
 23. Mirtaghi, S.M., Nejad, P.T., Masoumeh Mazandarani, M., Livani, F., Bagheri, H. (2016). Evaluation of

- antibacterial activity of *Urtica dioica* L. leaf ethanolic extract using agar well diffusion and disc diffusion methods. *Medical Laboratory Journal*, 10(5), 15-21. [\[CrossRef\]](#)
24. Kawhena, T.G., Opara, U.L., Fawole, O.A. (2021). A Comparative Study of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Plant Essential Oils and Extracts as Candidate Ingredients for Edible Coatings to Control Decay in 'Wonderful' Pomegranate. *Molecules*, 26(11), 3367. [\[CrossRef\]](#)
 25. Park, C., Yoon, H. (2018). Antimicrobial activity of Essential oil against oral strain. *International Journal of Clinical Preventive Dentistry*, 14(4), 216-221. [\[CrossRef\]](#)
 26. Galovičová, L., Borotová, P., Valková, V., Vukovic, N.L., Vukic, M., Štefániková, J., Ďúranová, H., Kowalczewski, P.L., Čmiková, N., Kačániová, M. (2021). *Thymus vulgaris* essential oil and its biological activity, 10(9), 1959. [\[CrossRef\]](#)