

Hastane İnfeksiyonlarından İzole Edilen Mikroorganizmalara Karşı Bazı Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesi

Cumhur Avşar^{1*}, Hakan Keskin², İsmet Berber¹

¹Sinop Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Sinop, Türkiye

²Sinop Atatürk Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sinop, Türkiye

*Yazışmalardan sorumlu yazar: E-posta: cavsar@sinop.edu.tr

Özet

Antibiyotikler, bakteriyel infeksiyonları önlemek için temel tedavi edici seçenektir. Ancak, bu konuda bakteriyel direncin artmasından dolayı dezavantaj da vardır. Bu yüzden bitkiler üzerine yapılan antimikrobiyal çalışmalar önemli bir alternatif olmuştur. Bu çalışmada, 24 hastadan alınan kültür örneklerinden izole edilen mikroorganizmalara karşı Sinop'tan toplanan *Jurinea kilae*, *Isatis arenaria*, *Verbascum degenii* ve *Pancremium maritimum* bitki türlerinden farklı çözücüler (metanol, etanol ve su) kullanılarak elde edilen ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Klinik örneklerden izole edilen mikroorganizmaların cins ve tür düzeyinde tanımlamaları VITEK 2 Compact (bioMérieux, Fransa) sisteminde yapılmıştır. Bitkiler, Sinop ilinde farklı noktalardan toplanmış ve tür teşhisi yapıldıktan sonra diğer işlemler için saklanmıştır. Bitki örneklerinden ekstraksiyon için metanol, etanol ve su kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite, disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Disk difüzyon sonuçlarına göre, özellikle *I. arenaria* ve *V. degenii* türlerinden elde edilen metanol ve etanol ekstraktları *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae*, *Proteus*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Kocuria* ve *Candida*'ya karşı daha yüksek aktivite (10-26±1.4 mm) göstermiştir. Ayrıca ekstraktların, Gram (-) bakteriler ve mayalara nazaran Gram (+) bakterilere karşı daha etkili oldukları saptanmıştır. Aktif ekstraktların minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri farklı organizmalara karşı 250-1000 µg mL⁻¹ aralığında bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları, *I. arenaria* ve *V. degenii* türlerinden elde edilen metanol ve etanol ekstraktlarının alternatif doğal antimikrobiyal ajanlara sahip olduğunu vurgulamaktadır. Böylece, bu sonuçlara göre *I. arenaria* ve *V. degenii* metanol ve etanol ekstraktlarının antimikrobiyal bileşikler içerdiği ve bunun yeni ilaç geliştirilmesinde kullanılabileceği önerilebilir. Bu çalışma aynı zamanda klinik kökenli infeksiyonlarla ilgili halk sağlığı risklerinin azalmasına önemli bir katkı sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal, infeksiyon, klinik, Sinop, *Verbascum degenii*

Antimicrobial Activity of Some Plant Extracts against Microorganisms Isolated from Hospital Infections

Abstract

Antibiotics are considered the main medicinal option to treat bacterial infections; however, there is a disadvantage due to the increasing bacterial resistance. Thus, the antimicrobial studies on plants have been an important alternative. This work aimed to determine the in vitro antimicrobial activity of the extracts obtained with different solvents (methanol, ethanol and aqueous) from *Jurinea kilae*, *Isatis arenaria*, *Verbascum degenii* and *Pancremium maritimum* collected in Sinop on microorganisms isolated from culture samples of the 24 patients. Microorganisms isolated from clinic samples were identified to genus and species level by VITEK 2 Compact (bioMérieux, France) system. The plants were collected from different points in Sinop and stored for further processing after species identification. Methanol, ethanol and water were used for extraction from plant samples. Antimicrobial activity was determined using disk diffusion and microdilution methods. According to disk diffusion results, especially the methanol and ethanol extracts obtained from *I. arenaria* and *V. degenii* species showed higher activity (from 10 to 26±1.4 mm) against *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae*, *Proteus*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Kocuria* and *Candida*. In addition, the extracts were more effective against Gram (+) bacteria than Gram (-) bacteria and *Candida*. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of active extracts ranged from 250 to 1000 µg mL⁻¹ against different test microorganisms. The findings of this study emphasized that the methanolic and ethanolic extracts of *I. arenaria* and *V. degenii* species have alternative natural antimicrobial agents. Thus, the results suggest that *I. arenaria* and *V. degenii* methanol and ethanol extracts possess compounds with antimicrobial properties that might be utilized for developing new drugs. This study also might be an important contribution to reduce the public health risk concerning clinical infections.

Keywords: Atimicrobial, clinical, infection, Sinop, *Verbascum degenii*

GİRİŞ

Antibiyotikler, mikrobiyal (bakteriyel ve fungal) infeksiyonlar ile mücadelede temel tedavi kaynağıdır. Antibiyotiklerin keşfi ve onların kemoterapötik ajanlar olarak kullanılmasıyla beraber özellikle sağlık kuruluşları tarafından infeksiyon hastalıklarının neredeyse tamamen sona erdiğine dair kabul görülen bir inanış vardır. Ancak, antibiyotiklerin aşırı kullanılması birçok mikroorganizma gurubunda çoklu ilaç direncine sahip suşların ortaya çıkması ve yayılması için temel faktör olmuştur (Costa ve ark., 2009; Khan ve ark., 2009). Çoklu ilaç direncine sahip bakteriyel infeksiyonlar; ölümlerin artmasına, hastanede daha uzun süreli kalmaya ve tedavi süresince daha yüksek maliyete yol açarlar. Bu infeksiyonlara neden olan en problematik bakteriler ise; geniş spektrumlu β -laktamaz üreten *Escherichia coli* (ESBL-EC), *Klebsiella pneumoniae* (ESBL-KP), karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve vankomisine dirençli *Enterococcus*'tur (VRE). Bu yüzden, Amerika İnfeksiyon Hastalıkları Birliği (Infectious Diseases Society of America) adı sık duyulan ve kötü tanınmış patojenler olarak MRSA, VRE, ESBL-EC, ESBL-KP ve *P. aeruginosa*'nın yol açtığı infeksiyonların tedavisi için acilen daha etkili ve yeni antimikrobiyallerin gerekliliğini bildirmiştir (Marasini ve ark., 2015). Antimikrobiyal ajanların geliştirilmesinde ilerleme kaydedilmesine rağmen, çoğu halk sağlığıyla ilişkili durumlarda hastalığa neden olan bilinmeyen mikroorganizmaların ortaya çıkışı ve ilaçlara dirençli mikroorganizmaların varlığı sürmektedir. Bu organizmalar arasında; solunum yolu infeksiyonlarına neden olan *Staphylococcus* ve *Streptococcus*, insanların ürogenital ve gastrointestinal sistemlerinin yaygın kommensali olan *Candida albicans* ve neredeyse eski tüm antibiyotiklere direnç kazanan ve üriner sistemde infeksiyona ve sepsise yol açan *Pseudomonas* türleri verilebilir (Mann, 2012). Tüm bu durumlar göz önünde bulundurulduğunda yeni tedavi edici ajanlara büyük talep olmaktadır. Birçok hastalığın insan uygarlığı boyunca bitkisel ilaçlarla tedavi olduğu bilinmektedir. Bugün bile, bitki materyalleri birincil sağlık hizmetlerinde büyük rol oynar ve daha

gelişmiş bitkiler yeni antimikrobiyal ajanların potansiyel kaynağı olarak bilinir. Endemik bitkiler çeşitli metabolitlerin rezervleridir ve çeşitli biyolojik özelliklere sahip önemli kimyasalların sınırsız kaynağına sahiptirler. Günümüzde modern ilaçların çoğu geleneksel tıbbi bitkilerin kökeninden gelmiştir (Cowan, 1999; Mann, 2012; Ibezim, 2015). Dünya Sağlık Örgütü tıbbi amaçlı kullanılan yaklaşık 20,000 bitki türü olduğunu bildirmektedir (Maregesi ve ark., 2008). Türkiye florası içerdiği tür sayısı ve endemik bitkiler açısından dünyada önemli bir gen merkezi konumundadır. Bütün Avrupa 12,000 bitki türü içermesine karşın, ülkemiz tek başına 9,000 civarında türe sahip olup bunları 3,000 kadarı endemiktir (Nalbantbaş ve Gölcü, 2009). Ülkemizde tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin sayısı kesin olarak bilinmemekle beraber bu sayının tahmini 500-1000 civarında olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca, yaklaşık 200 tıbbi ve aromatik bitkinin ihraç potansiyelinin olduğu da belirtilmektedir (Tarakçı, 2006; Berber ve ark., 2013).

Bu çalışmada, Sinop Devlet Hastanesi'ne başvuran 24 hastadan izole edilen mikroorganizmalara karşı Sinop ilinden toplanan *Jurinea kilae*, *Isatis arenaria*, *Verbascum degenii* ve *Pancreatum maritimum* bitki türlerinden farklı çözücüler (su, etanol ve metanol) kullanılarak elde edilen ekstraktların disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile antimikrobiyal etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Klinik Örneklerden Mikroorganizma İzolasyonu

Mart 2014-Mayıs 2014 tarihleri arasında Sinop Devlet Hastanesi'ne başvuran hastaların çeşitli klinik örneklerinden (kan, idrar, beyin omurilik sıvısı, trakeal aspirat, yara, kateter, vajinal sürüntü) izole edilen 24 suş çalışmaya alınmıştır. Klinik örnekler % 5 koyun kanlı agar ve Eozin Metilen Mavisi (EMB) agarda 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve üreyen kolonilerin cins ve tür düzeyinde tanımlamaları standart mikrobiyolojik yöntemleri esas alan VITEK 2 Compact (bioMérieux, Fransa) cihazıyla üreticilerin talimatlarına göre yapılmıştır. Suşların izole edildiği klinik örnekler Çizelge 1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1. Klinik örnekler, hasta yaşları, cinsiyet ve izole edilen mikroorganizmalar

No	Yaş	Cinsiyet	Örnek Yeri	Bakteri	Tarih
1	38	K	İdrar	<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp. <i>pneumoniae</i>	04.03.2014
2	1	K	İdrar	<i>Klebsiella oxytoca</i>	04.03.2014
3	6	K	İdrar	<i>Klebsiella pneumonia</i> ssp. <i>ozaenae</i>	14.04.2014
4	5	K	İdrar	<i>Escherichia coli</i>	28.05.2014
5	75	E	BOS*	<i>Enterococcus faecalis</i>	04.03.2014
6	76	E	İdrar	<i>Enterococcus faecium</i>	04.03.2014
7	68	K	İdrar	<i>Enterobacter</i>	14.04.2014
8	102 gün	E	İdrar	<i>Enterobacter aerogenes</i>	14.04.2014
9	44	E	Yara	<i>Proteus mirabilis</i>	04.03.2014
10	1	E	İdrar	<i>Proteus</i>	04.03.2014
11	52	E	Kan	<i>Acinetobacter baumannii</i>	04.03.2014
12	74	E	Yara	<i>Serratia</i> spp.	14.04.2014
13	46	K	Yara	<i>Serratia marcescens</i>	28.05.2014
14	86	E	Aspirat	<i>Staphylococcus aureus</i>	28.05.2014
15	81	K	Kan	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	28.05.2014
16	56	E	Katater	<i>Staphylococcus hominis</i> ssp. <i>hominis</i>	28.05.2014
17	80	E	İdrar	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	28.05.2014
18	47	K	Vajinal	<i>Candida</i> spp.	04.03.2014
19	82	K	Kan	<i>Candida albicans</i>	28.05.2014
20	76	E	İdrar	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	04.03.2014
21	62	K	Yara	<i>Citrobacter freundii</i>	28.05.2014
22	58	E	Yara	<i>Morganella morganii</i> spp. <i>morganii</i>	28.05.2014
23	86	K	İdrar	<i>Burkholderia cepacia</i>	14.04.2014
24	89	E	Aspirat	<i>Kocuria kristinae</i>	14.04.2014

*Beyin Omurilik Sıvısı

Bitki Örneklerinin Toplanması

Bu araştırmada kullanılan dört adet bitki türü (*Jurinea kilae*, *Isatis arenaria*, *Verbascum degenii* ve *Pancreatum maritimum*) Sinop ili civarında farklı noktalardan toplanmış ve tür teşhisi (bitkilerin tür teşhisleri Prof. Dr. İsmet BERBER tarafından yapılmıştır) yapıldıktan sonra ekstraksiyon işlemine alınmıştır. Çalışmada hazırlanacak çizelge ve grafiklerde bitkiler için kullanılan semboller Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. Bitkiler için kullanılacak rakamlar

Sembol	Bitkiler
1	<i>Jurinea kilae</i> (Kilyos moru)
2	<i>Isatis arenaria</i> (Kum çivitotu)
3	<i>Verbascum degenii</i> (Sığır kuyruğu)
4	<i>Pancreatum maritimum</i> (Kum zambağı)

Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Laboratuvara getirilen bitki örnekleri steril bir neşter kullanılarak küçük parçacıklara ayrıldıktan sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan bitki örnekleri mekanik öğütücü ile toz haline getirildikten sonra 10'ar g alınarak 100 mL % 70'lik metanol, % 70'lik etanol (Merck) ve su ile ıslatılmış ve oda sıcaklığında bir gece beklemeye alınmıştır. Çözücülerde bir gece bekletilen örnekler Whatmann No. 1 (Merck, UK) filtre kâğıdıyla süzülükten sonra elde edilen sıvı, çözücülerin tamamen uçması için oda sıcaklığında bekletilmiştir. Çözücünün uçması sonrasında elde kalan çökelti 10 ml steril serum fizyolojik ile 5 dakika (3.000 g) santrifüj edilerek yıkandıktan sonra üst faz uzaklaştırılmış ve kalıntı tekrar % 20'lik 5 mL metanolde oda sıcaklığında bir gece bekletildikten sonra filtre kâğıdıyla süzülerek ekstraksiyon işlemi tamamlanmıştır. Elde edilen materyalde kalan sıvı

uçuktan sonraki kalıntılar antimikrobiyal denemelerde kullanılmıştır (Berber ve ark., 2013).

Test Mikroorganizmalarının Üreme Şartları

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarına başlamadan önce bakteri kültürleri için Mueller Hinton Buyyonu (OXOID, Basingstoke, UK) maya kültürleri için ise Sabouraud Dextrose buyyonuna (DIFCO, Detroit, MI) ekimler yapılmış ve 18-24 saat 25-37°C'de inkübe edilerek logaritmik üreme fazında saf kültür elde edilmiştir. Antimikrobiyal denemelerde kullanılacak bakteri ve maya stok solüsyonlarını hazırlamak için taze kültürlerden 5 mL uygun sıvı besiyerlerine aşılama yapılarak 25-37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra elde edilen kültürlerden 0.5 McFarland'a karşılık gelen şekilde 1-2x10⁸ CFU mL⁻¹ hücre içeren bakteri ve maya stok solüsyonları hazırlanmıştır (Berber ve ark., 2013).

Antimikrobiyal Aktivitelerin Belirlenmesi

Dört bitki türünden elde edilen ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri suşlara karşı disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) standartlarına göre yapılmıştır.

Disk difüzyon testi için; elde edilmiş kuru ve/veya balmumsu bitki ekstraktları % 12.5 dimetil sülfoksitte (DMSO) çözüldükten sonra 6 mm çapındaki steril boş antibiyotik disklerine her bir diske 10 µL (3 mg ekstrakt) olacak şekilde aseptik şartlara uyularak emdirilmiştir. Tüm test mikroorganizmaların taze kültüründen 0.5 McFarland skalası esas alınarak mililitresinde 1-2 x 10⁸ (CFU mL⁻¹) hücre olacak şekilde bakteri ve maya stok solüsyonları hazırlandı. Süspansiyonlardan uygun besiyerlerine (bakteriler için Mueller Hinton Agar, *Candida* için sabouraud dekstroz agar) 100 µL aşılama yapılmış ve steril cam baget ile besiyeri yüzeyine yayıldıktan sonra 15-20 dk kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra bitkilerin farklı çözücü ekstraktlarını içeren diskler besiyerlerine uygun aralıklar bırakılarak yerleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanmış besiyerleri 18-24 saat 37°C'de geliştirildikten sonra oluşan inhibisyon zonları cetvel yardımı ile ölçülerek kaydedilmiştir. Negatif kontrol için metanol, etanol, su ve DMSO kullanılmıştır. Yapılan antimikrobiyal denemeler üç tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür.

Mikrodilüsyon testi için taze bakteri kültüründen 100 µL alınarak içerisinde 900 µL

Mueller Hinton buyyonu ve bir seri bitki ekstraktı (1000-500-250-125-62.5-31.25-15.6 ve 7.8 µg mL⁻¹ konsantrasyonlarda) dilüsyonu bulunan tüplere aktarılmıştır ve 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Mayalar için aynı işlemler RPMI 1640 (Sigma, UK) besiyeri ile yapılmıştır. Değerlendirme 18-24 saat inkübasyon sonrasında yapılmış ve üremenin olmadığı en küçük konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri olarak belirlenmiştir (Berber ve ark., 2009).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Farklı çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerine göre çözücülerin etkinlikleri karşılaştırıldığında su ile yapılan ekstraksiyon işleminin etkinliğinin metanol ve etanole göre daha düşük olduğu, en iyi aktivitenin ise *P. maritimum* dışında metanol ile elde edilen ekstraktta olduğu tespit edilmiştir. Disk difüzyon sonuçlarına göre, özellikle *I. arenaria* ve *V. degenii* türlerinden elde edilen metanol ve etanol ekstraktlarının *K. pneumoniae* ssp. *ozaenae*, *Proteus*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Candida* ve *Kocuria* tür ve alttürlerin bulunduğu izolatlarla karşı daha yüksek aktivite (10-26±1.4 mm aralığında zon çapı) gösterdiği belirlenmiştir. *J. kilaie* ve *P. maritimum* ekstraktlarının *Candida* türlerine karşı etkili (10-16±0.4 mm) olduğu saptanmıştır. Metanol ve etanol ekstraktlarının özellikle aspirat örneğinden izole edilen *S. aureus*'a karşı yüksek aktivite gösterdikleri buna karşın hiçbir ekstraktın kan örneğinden izole edilen *S. haemolyticus* üzerinde etkili olmadığı gözlenmiştir. Yara ve idrar örneklerinden izole edilen *Proteus* türleri üzerine *V. degeni* metanol ve etanol ekstraktlarının yüksek aktivite (16±0.5 mm-20±1.1 mm) gösterdikleri görülmüştür. Ayrıca ekstraktların, Gram (-) bakteriler ve mayalara nazaran Gram (+) bakterilere karşı daha etkili oldukları saptanmıştır (Çizelge 3). Bunlara ek olarak *P. maritimum* metanol ve etanol ekstraktlarının aktivitesi karşılaştırıldığında etanol ekstraktlarının daha iyi aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.

Mikrodilüsyon sonuçlarına göre, yine *I. arenaria* ve *V. degenii* türlerinden elde edilen metanol ve etanol ekstraktlarının yüksek konsantrasyonlarda olsa da etkili oldukları görülmüştür. Aynı bitkilerin metanol ve etanol ekstraktlarının özellikle *Proteus* ve *S. aureus* türleri üzerinde daha düşük konsantrasyonlarda (250-500 µg mL⁻¹) etkili oldukları görülmüştür.

Çizelge 3. Disk difüzyon testi sonuçlarına göre inhibisyon zonları

Mikroorganizma No	Bitki ekstraktları												DMSO
	1M	2M	3M	4M	1E	2E	3E	4E	1S	2S	3S	4S	
1	-	-	-	8 ±0.0	-	-	8 ±0.0	-	-	-	-	8 ±0.01	-
2	-	10 ±0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	12 ±0.4	8 ±0.01	-
3	-	16 ±0.5	10 ±0.04	10 ±0.2	-	12 ±0.5	14 ±0.0	10 ±0.5	-	-	10 ±0.0	-	-
4	8 ±0.01	10 ±0.01	10 ±0.2	-	-	12 ±0.2	8 ±0.0	-	-	-	-	-	-
5	-	12 ±0.08	8 ±0.01	-	-	10 ±0.1	10 ±0.2	12 ±1.0	-	-	8 ±0.0	12 ±0.1	-
6	-	12 ±0.06	12 ±0.5	8 ±0.01	-	-	10 ±0.1	-	-	-	-	-	-
7	-	14 ±0.3	10 ±0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	14 ±0.3	14 ±0.3	-	-	10 ±0.1	12 ±0.8	-	-	-	-	-	-
9	10 ±0.1	11 ±0.1	20 ±1.1	10 ±0.04	-	11 ±0.1	16 ±0.9	11 ±0.0	-	-	9 ±0.2	-	-
10	-	14 ±0.6	17 ±0.8	12 ±0.6	-	12 ±0.8	16 ±0.5	10 ±0.2	-	-	-	8 ±0.01	-
11	-	10 ±0.2	12 ±0.03	-	-	10 ±0.0	10 ±0.0	-	-	-	10 ±0.5	8 ±0.01	-
12	-	-	14 ±0.1	10 ±0.1	-	10 ±0.2	16 ±1.2	16 ±0.6	-	-	-	-	-
13	-	15 ±1	15 ±0.4	12 ±0.4	-	14 ±0.8	15 ±0.8	13 ±0.2	-	-	12 ±0.1	-	-
14	10 ±0.2	24 ±1.2	20 ±1.6	-	10 ±0.1	26 ±1.4	21 ±1.5	15 ±0.8	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	8 ±0.0	-	-	10 ±0.0	-	-	-	-	-	-	-
17	10 ±0.2	12 ±0.8	10 ±0.02	-	-	16 ±1.3	17 ±1.4	-	-	-	-	-	-
18	14 ±0.3	-	-	-	-	10 ±0.5	14 ±0.4	10 ±0.0	-	-	12 ±0.1	-	-
19	16 ±0.4	16 ±0.1	-	12 ±0.6	-	-	-	15 ±0.8	-	-	-	-	-
20	-	12 ±0.6	12 ±0.02	-	-	10 ±0.5	12 ±0.2	-	-	-	-	-	-
21	-	10 ±0.01	14 ±0.4	-	-	10 ±0.2	-	-	-	-	-	-	-
22	-	10 ±0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	14 ±0.1	12 ±0.0	-	-	12 ±0.1	12 ±0.1	-	-	-	-	-	-
24	-	10 ±0.02	16 ±0.1	10 ±0.0	-	10 ±0.5	16 ±0.8	-	-	-	-	-	-

M: Metanol, E: Etanol, S: Su, Ortalama±standart sapma

Kandan izole edilen *C. albicans*'a karşı *J. kilae* ve *I. arenaria* metanol ekstraktlarının 500 µg mL⁻¹ konsantrasyonunda etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, mikroorganizmaların çoğunda 1000 µg mL⁻¹ konsantrasyonunda üremenin olmadığı da saptanmıştır (Çizelge 4).

Bitki ekstraktları flavonoid, polifenolik bileşikler, taninler ve terpenler gibi çok sayıda fitokimyasal maddeyi içermektedir. Araştırmalarda, mikroorganizmalara karşı yüksek düzeyde antimikrobiyal aktiviteden bu tür bileşiklerin sorumlu olduğu rapor edilmektedir (Mojob ve ark., 2008). Bu bileşikleri ekstrakte etme amaçlı kullanılan çözücüler arasında; suyun metanol, etanol ve n-hegzan gibi çözücülere göre daha düşük aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu durumun organik çözücülerden elde edilen ekstraktların aromatik veya doyurulmuş organik bileşikleri daha yüksek miktarlarda içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Stefanovic ve ark., 2009; Berber ve ark., 2013; Mohd ve ark., 2011). Elde ettiğimiz bulgulara göre, organik çözücülerin sudan daha

etkili olduğu saptanmış ve sonuçlar yapılan çalışmalarla paralellik göstermiştir.

Öztürk ve ark. (2011), *Jurinae consanguinea*'dan hazırladıkları kloroform, petrol eter ve metanol ekstraktlarının *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33495, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterilerine karşı antibakteriyel etkisini araştırmış ve kloroform ekstraktlarının en yüksek antibakteriyel etkiyi gösterdiği ve en etkili olduğu bakterinin *S. aureus* olduğunu rapor etmişlerdir. Dwivedi ve Wagay (2014), *Jurinea dolomiaea* yapraklarının su, metanol, etanol, etil asetat ve kloroform ekstraktlarının, klinik bakteriler (*E. coli* ve *S. aureus*) ve fitopatogenik bakterilere (*Xanthomonas vesicatoria* ve *Ralstonia solanacearum*) karşı antibakteriyel etkisini çalışmışlar ve disk difüzyon sonucuna göre su, etanol ve etil asetat ekstraktlarının bakterilere karşı etkili olmadıklarını rapor etmişlerdir.

Çizelge 4. Mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen MİK değerleri (µg mL⁻¹)

Mikroorganizma No	Bitki ekstraktları											
	1M	2M	3M	4M	1E	2E	3E	4E	1S	2S	3S	4S
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	-
3	-	1000	1000	1000	-	1000	1000	1000	-	-	1000	-
4	-	1000	1000	-	-	1000	-	-	-	-	-	-
5	-	1000	1000	-	-	1000	1000	1000	-	-	1000	1000
6	-	1000	1000	1000	-	-	1000	-	-	-	-	-
7	-	1000	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	1000	1000	-	-	1000	1000	-	-	-	-	-
9	1000	1000	250	1000	-	1000	500	1000	-	-	1000	-
10	-	1000	500	1000	-	1000	500	1000	-	-	-	-
11	-	-	1000	-	-	1000	1000	-	-	-	1000	-
12	-	-	1000	-	-	-	1000	1000	-	-	-	-
13	-	1000	1000	1000	-	1000	1000	1000	-	-	1000	-
14	1000	250	250	-	1000	250	250	1000	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	1000	-	-	-	1000	1000	-	-	-	-	-
18	1000	-	-	-	-	1000	1000	-	-	-	-	-
19	500	500	-	1000	-	-	-	1000	-	-	-	-
20	-	1000	1000	-	-	1000	1000	-	-	-	-	-
21	-	-	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	1000	1000	-	-	1000	1000	-	-	-	-	-
24	-	1000	1000	-	-	1000	1000	-	-	-	-	-

M: Metanol, E: Etanol, S: Su, (-): Üreme var

Metanol ve kloroformun ise *E. coli*, *S. aureus*, *X. vesicatoria* ve *R. solanacearum* karşı sırasıyla 10, 9, 12, 12 mm ve 12, 11, 7, 9 mm olarak tespit edilmiş ve MİK değerlerinin ise dört bakteriye karşı 2500-4000 µg mL⁻¹ aralığında olduğunu rapor etmişler. Çalışmamızda *J. kilaie*, metanol ekstraktlarıyla yapılan antimikrobiyal aktivite denemelerinde 8-16 mm, 500-1000 µg mL⁻¹ konsantrasyonlarında etki tespit edilmiş ve *Jurinae*'nin diğer türleriyle yapılan çalışmalara paralellik göstermiştir.

Karakoca ve ark. (2013), *Isatis floribunda* kök ve çiçek kısımlarının metanol, su ve etanol ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesini gıda ve insan patojeni bakterilere karşı çalışmış ve sonuçta bizim bulgularımızla paralel olacak şekilde su ekstraktlarında herhangi bir aktivite saptamamışlar, ancak rapor ettikleri metanol ve etanol ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesinin bizim kullandığımız *I. arenaria*'nın kullanılan aynı çözücü aktivitesine göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Heo ve ark. (2012), *Isatis tinctoria*'nın kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarının metanol ve etanol ekstraktlarının patojen bazı bakterilere karşı antibakteriyel etkisini çalışmış ve bizim bulgularımıza göre disklere 1000 µg mL⁻¹ yüklemelerine rağmen metanol ve etanol ekstraktlarının düşük olduğu gözlenmiştir.

Şengül ve ark. (2005), *Verbascum georgicum* metanol ekstraktının antimikrobiyal özelliğini 143 mikroorganizmaya karşı denemişler, çalışmamızla ortak olan bakterileri karşılaştırdığımızda araştırmacılar *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter* ve *Staphylococcus* türlerine karşı etki tespit edememiş ve sonuçlarının *Verbascum degenii* metanol ekstraktı bulgularımızla uyuşmadığı görülmüştür. Bu durumun nedeni, farklı bölgelerden toplanan aynı bitki türünden elde edilen hatta aynı türün farklı kısımları kullanılarak hazırlanan ekstraktların farklı antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları şeklinde ifade edilebilir. Kahraman ve ark. (2011), yedi *Verbascum* (*Verbascum dudleyanum*, *V. latisepalum*, *V. mucronatum*, *V. olympicum*, *V. stachydifolium*, *V. uschackense* ve *V. lasianthum*) türünün metanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini test etmişler ve elde ettikleri sonuçlar; çalışmamızda ki *V. degenii*'nin metanol ve etanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi ile kıyaslandığında, *V. degenii*'nin diğer yedi *Verbascum* türüne göre daha etkili olduğu görülmüştür.

Hetta ve ark. (2013), *Panocratium maritimum* ethanol ekstraktlarının antimikrobiyal etkisini

çalışmış ve *K. pneumoniae*'ya karşı bizim bulgularımızdan daha yüksek etki bulmuşken, *E. faecalis*'e karşı etkinin olmadığını bildirmişlerdir. Hâlbuki bizim verilerimizde 12 mm zon çapı tespit edilmiştir. Ayrıca *Candida* suşlarına karşı elde ettikleri zon çapları çalışmamızla paralellik göstermiştir. Kaya ve ark. (2003), *P. maritimum* bitkisinin n-hegzan, etanol, etil asetat ve su ekstraktlarının bazı patojen bakteriler ve *C. albicans*'a karşı aktivitesini incelemiş ve belirli Gram (+) ve (-)'lerin gelişimini inhibe ettiğini ve sadece etanol ve su ekstraktlarının *C. albicans*'ı etkilediğini bildirmişler, bu çalışmanın verilerimizle uyumlu olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda Sinop'ta toplanan dört bitkiye ait metanol ve etanol ekstraktlarının, hastaneye başvuran hastalardan izole edilen mikroorganizmalar üzerine önemli düzeyde antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu bitkilerden özellikle *Isatis arenaria* ve *Verbascum degenii* metanol ve etanol ekstraktlarının yüksek antimikrobiyal etkiye sahip oldukları kaydedilmiştir. Bu türlerin içerdiği etken maddelerin neler olduğu ve molekül yapıları hakkında daha detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Bununla birlikte, antimikrobiyal etkisi incelenen bitkilerden elde edilen ekstraktların önemli düzeyde antimikrobiyal etkiye sahip olması, bu bitkilerin içerdiği etken maddelerin infeksiyon hastalıklarının tedavisinde bazı sentetik antibiyotiklere alternatif olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, sentetik kökenli maddelerin yan etkilerinin daha fazla olması nedeniyle bitki ve bitkisel ürünlerin kullanılmasının daha avantajlı olabileceğini söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Berber, İ., Özgökçe, F., Şeker, A.,** 2009. Van yöresinde yetişen bazı bitkilerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi. *Y.Y.Ü Fen Bil. Derg.*, 14(2):117-121.
- Berber, İ., Avşar, C., Çine, N., Bozkurt, N., Elmas, E.,** 2013. Sinop'da yetişen bazı bitkilerin metanolik ekstraktlarının antibakteriyel ve antifungal aktivitesinin belirlenmesi. *Karaelmas Fen Müh. Derg.*, 3(1):10-6.
- CLSI,** 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-second Informational Supplement M100-S22. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Costa, A.C.D., Santos, B.H.C.D., Santos Filho, L., Lima, E.D.O.,** 2009. Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*)

- against bacterial multiresistant strains isolated from nosocomial patients. *Rev. Brasil. Farma.*, 19(1B):236-41.
- Cowan, M.M.**, 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12(4):564-82.
- Dwivedi, S.D., Sheeraz, W.**, 2014. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Jurinea dolomiaea* plant against clinical and phytopathogenic bacteria. *Chem. Proc. Engin. Res.*, 24(1):9-13.
- Heo, B.G., Park, Y., Lee, S.J., Kim, K.S., Cho, J.Y., Boo, H.O.**, 2012. Antioxidant enzyme activity and antimicrobial activity of *Isatis tinctoria* extract. *Korean. J. Plant. Res.*, 25(5):543-49.
- Hetta, M.H., Shafei, A.A.**, 2013. Comparative cytotoxic and antimicrobial activities of the alkaloid content of Egyptian *Pancreatum maritimum* L. fruits and flowers. *J. American Sci.*, 9(7):104-9.
- Ibezim, E.C.**, 2005. Microbial resistance to antibiotics. *Afr. J. Biotech.*, 4(13):1606-11.
- Kahraman, C., Ekizoglu, M., Kart, D., Akdemir, Z.Ş., Tatli, İ.**, 2011. Antimicrobial activity of some *Verbascum* species growing in Turkey. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 36:11-5.
- Karakoca, K., Ozusaglam, M.A., Cakmak, Y.S., Erkul, S.K.**, 2013. Antioxidative, antimicrobial and cytotoxic proper-ties of *Isatis floribunda* Boiss. Ex Bornm. extracts. *Excli. J.*, 12:150-67.
- Kaya, G., Irem, O., Tansel, H., Nehir, U.**, 2003. Antimicrobial activity of *Pancreatum maritimum*. *J. Fac. Pharma. Gazi Uni.*, 20(2):65-70.
- Khan, R., Islam, B., Akram, M., Shakil, S., Ahmad, A.A., Ali, S.M., Khan, A.U.**, 2009. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules*, 14(2):586-97.
- Mann, A.**, 2012. Evaluation of antimicrobial activity of *Anogeissus leiocarpus* and *Terminalia avicennioides* against infectious diseases prevalent in hospital environments in Nigeria. *J. Microbiol. Res.*, 2(1):6-10.
- Marasini, B.P., Baral, P., Aryal, P.**, 2015. Evaluation of antibacterial activity of some traditionally used medicinal plants against human pathogenic bacteria. *Bio. Med. Res. Int.*, 1-6.
- Maregesi, S.M., Pieters, L., Ngassapa, O.D.**, 2008. Screening of some Tanzanian medicinal plants from bunds district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. *J. Ethnopharmacol.*, 119:58-66.
- Mohd Nazri, N.A.A., Ahmat, N., Adnan, A., Syed, S.A., Syaripah, S.A.**, 2011. In vitro antibacterial and radical scavenging activities of Malaysian table salad. *Afr. J. Biotech.*, 10(30):5728-35.
- Mojab, F., Poursaeed, M., Mehrgan, H., Pakdaman, S.**, 2008. Antibacterial activity of *Thymus daenensis* methanolic extract. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 21(10):210-3.
- Nalbantbaş, Z., Gölcü, A.**, 2009. Kahramanmaraş yöresine ait şifalı bitkilerin antimikrobiyal aktiviteleri. *KSU. J. Nat. Sci.*, 12:1-8.
- Öztürk, H., Kolak, U., Meric, C.**, 2011. Antioxidant, anticholinesterase and antibacterial activities of *Jurinea consanguinea* DC. *Rec. Nat. Pr.*, 5(1):43-51.
- Stefanovic, O., Comic, L., Stanojevic, D., Solujic, S.**, 2009. Antibacterial activity of *Aegopodium podagraria* L. extracts and interaction between extracts and antibiotics. *Turk. J. Biol.*, 33(2):145-50.
- Şengül, M., Ögütçü, H., Adigüzel, A., Şahin, F., Kara, A.A., Karaman, İ., Güllüce, M.**, 2005. Antimicrobial effects of *Verbascum georgicum* Bentham extract. *Turk. J. Biol.*, 29(2):105-10.
- Tarakçı, S.**, 2006. Beykoz civarındaki tıbbi özellik taşıyan bitkiler üzerine araştırmalar. Fen Bilimleri Enstitüsü, *Doktora Tezi*, Biyoloji, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 148s.