

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARADUT MEYVESİNİN ANTİMİKROBİYEL AKTİVİTESİNİN VE
BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ**

TUĞÇA BİLENLER

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**MALATYA
Temmuz 2010**

Tezin Başlığı: **Karadut meyvesinin antimikrobiyel aktivitesinin ve bileşenlerinin belirlenmesi**

Tezi hazırlayan: Tuğça BİLENLER

Sınav tarihi: 6 Temmuz 2010

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Yrd.Doç.Dr.M.Şevket ÇETİN (Danışman)

Doç.Dr. İhsan KARABULUT

Doç.Dr. A.Adnan HAYALOĞLU

Prof. Dr. Asım KÜNKÜL
Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum ‘Karadut meyvesinin antimikrobiyel aktivitesinin ve bileşenlerinin belirlenmesi’ başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım tüm kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Tuğça BİLENLER

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KARADUT MEYVESİNİN ANTİMİKROBİYEL AKTİVİTESİNİN ve BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ

Tuğça BİLENLER

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

59+ xi sayfa

2010

Danışman: Yrd.Doç.Dr. M.Şevket ÇETİN

Bu çalışmanın amacı, karadutun antimikrobiyel özelliklerinin belirlenmesi, karadutta bulunan aktif bileşiklerin tanımlanmasıdır. Karadutun antimikrobiyel aktivitesi gıda endüstrisinde personel hijyen indikatörü olarak kullanılan, var olan antibiyotiklere karşı çok hızlı bir şekilde direnç geliştirdikleri bilinen, Gram pozitif; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus hominis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* spp, *MRSA* (*Meticilin resistance Staphylococcus aureus*), Gram negatif; *Enterobacter* spp, *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Shigella flexneri* ve ökaryot; *Candida albicans*'a karşı disk difüzyon tekniği ile, ampisilin ve metisilin pozitif kontrol olarak kullanımı ile belirlenmiştir. Disk difüzyon tekniği ile hassas mikroorganizmalar, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. hominis*, *B. cereus*, *S. flexneri* ve *C. albicans*, seçilmiştir. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) broth dilüsyon ve agar ekstrakt teknikleri kullanılarak tespit edilmiştir. Karadutun MIC'nu; *B. cereus* ve *S. hominis* için 16 mg/mL, *S. epidermidis*, *S. warneri* ve *S. flexneri* için 32 mg/mL ve *C. albicans* için 512 mg/mL olarak tespit edilmiştir.

Karadutun metanolik ekstraktı, silika jelin kullanıldığı kolon kromatografisi ile fraksiyonlarına ayrılmıştır. Kromatografik ayırım hacimsel olarak yapılmış ve toplamda 15 fraksiyon elde edilmiştir. Her bir fraksiyonun DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) yöntemi kullanılarak antioksidan aktivitesi, broth dilüsyon tekniği kullanılarak *S. aureus*'a karşı antimikrobiyel aktivitesi tespit edilmiştir. 8, 9 ve 10. fraksiyonlar *S. aureus*'un gelişimini etkin bir şekilde engellerken, 4. ve 5. fraksiyonların antioksidan aktivite bakımından en etkili fraksiyonlar oldukları belirlenmiştir. 8, 9. ve 10. fraksiyonlarda yüksek performans sıvı kromatografisi ve kütle spektrometresi (HPLC-MS) analizleri ile antimikrobiyel etki gösteren bileşenler tanımlanmaya çalışılmış ve siyanidin-3-glukozid, siyanidin 3-rutinosid, pelargodin-3-glukosid ve rutin'in bulunduğu tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELE: Karadut, antimikrobiyel, antioksidan etki, kolon kromatografisi

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND COMPONENTS OF BLACK MULBERRY FRUIT

Tuğça BİLENLER

Inonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

59 + xi pages

2010

Supervisor : Assist. Prof. Dr.M.Şevket ÇETİN

The aim of this study is to determine antimicrobial activity, identify active compounds in *Morus nigra*. Antimicrobial activities of *Morus nigra* were tested against several Gram positive indicator organisms such as *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus hominis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* spp, *MRSA* (Methicilin resistant *Staphylococcus aureus* and Gram negative indicator organisms such as *Enterobacter* spp, *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Shigella flexneri* and eucaryotic organism *Candida albicans* by disc diffusion method where ampicilin and meticilin used as positive control. The sensitive microorganisms, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. warneiri*, *S. hominis*, *B. cereus*, *S. flexneri* and *C. albicans*, were selected for further studies. Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) were determined by broth dilution and agar extract method. MIC of *Morus nigra* for *B. cereus*, *S. hominis* was 16mg/mL, for *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. warneiri*, *B. Cereus*, *S. flexneri* was 32mg/mL and for *C.albicans* was 512mg/ mL.

Methanolic extract of *Morus nigra* was further fractioned using a preparative silica gel-column chromatography. Chromatographic seperations were preformed volumetrically and the total of 15 fractions were collected. Every fraction was assayed for their antioxidant activity by using 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) method and for antimicrobial activity against *S.aureus* by broth dilution method. The fractions including 8,9,10th effectivelly inhibited growth of *S.aureus*, whereas 4 and 5th fractions were the most effective interms of antioxidant activity. Antimicrobially active compounds have been tried to define by High-performance liquid chromatography -mass spectrometry (HPLC -MS) analysis at the 8, 9, 10th fractions and cnidine-3-glucoside, cyanidine-3-rutinoside, pelargonidine-3-glucoside and rutine were determined.

KEYWORDS: Black mulberry, antimicrobial, antioxidant effect, column chromatography

TEŞEKKÜR

Eğitimim ve tez çalışmam süresince bana bilgi ve deneyimleri ile yardımcı olan , öneri ve desteğini esirgemeyen, beni yönlendiren danışman hocam Sayın Yrd.Doç.Dr.M. Şevket ÇETİN'e ;

Tezin LC-MS ve HPLC analizleri esnasında yardımlarından dolayı Doç.Dr.Murat KARTAL'a;

Tezin deneysel aşamalarında bana büyük yardımları olan Doç.Dr.İhsan KARABULUT'a, Yrd.Doç.Dr.Gökan DURMAZ'a, Arş.Grv.İncilay GÖKBULUT'a;

Desteğini ve gülüyüzünü hep yanımda hissettiğim saygıdeğer arkadaşım Halil ESİMEK'e;

Bu çalışmayı İnönü Üniversitesi Araştırma Fonu 2008/54 nolu proje ile maddi olarak destekleyen ve olanak sağlayan İnönü Üniversitesi Rektörlüğü'ne ;

Çalışmalarında manevi desteğini esirgemeyen hayata farklı ve pozitif bakmamı sağlayan biricik kardeşim Tuğba BİLENLER'e;

Büyük bir sabır ve emekle beni bugünlere getiren çok kıymetli AİLEM'e

En içten duygularımla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	i
ONUR SÖZÜ	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞİMGELER VE KISALTMALAR	x
EKLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Antimikrobiyel Aktivite ve Antimikrobiyaller	2
1.1.1. Antibakteriyel maddeler.....	2
1.1.2. Antibakteriyellerin etki mekanizmaları.....	3
1.1.2.1. Bakteri hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotikler.....	4
1.1.2.3. Nükleik asit sentez inhibitörleri.....	5
1.1.2.4. Ribozomun fonksiyonunu inhibe eden antibiyotikler.....	5
1.1.2.5. Metabolik fonksiyon inhibitörleri.....	5
1.1.3. Antibiyotiklere karşı direnç ve direncin evrimi.....	6
1.1.3.1. Genetiğe bağlı olmayan (doğal) direnç	7
1.1.3.2. Genetiğe bağlı olan (kazanılmış) direnç	7
1.1.3.2.1. Mutasyona bağlı kazanılmış (kromozomal) direnç	8
1.1.3.2.2. Kromozom dışı (direnç geninin alınmasına bağlı kazanılmış) direnç	8
1.1.3.3. Dış membranın varlığı.....	8
1.1.3.4. Antibiyotiklerin enzimatik inaktivasyonu.....	9
1.1.3.5. Hücre duvarının ilaca seçici geçirgenliğinin ve ilaç alımının azalması.....	9
1.1.3.6. Antibiyotiklerin dışarı atılmaları	9
1.1.3.7. İlacın hedef yapısının yeniden programlanması ve enzim substitüsyonu.....	9
1.1.4. Yeni antibiyotiklere gereksinim	12
1.1.5. Antibiyotik Ajanlar Olarak Bitkiler.....	12
1.1.6. Bitkilerin antimikrobiyel ve antioksidan özellik taşıyan bileşenlerinin önemli grupları.....	14
1.1.6.1. Fenolik bileşikler	14
1.2. Antioksidan Aktivite ve Antioksidanlar	17
1.2.1. Antioksidanlar	17
2. KAYNAK ÖZETLERİ	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Kullanılan kimyasallar ve mikroorganizmalar	23
3.1.2. Kullanılan alet ekipman ve cihazlar.....	24
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Örnek hazırlama.....	25
3.3. Analiz Metotları	25
3.3.1. Antimikrobiyel kapasite testleri.....	25
3.3.1.1. Disk difüzyon yöntemi.....	25
3.3.1.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC), Broth Dilüsyon Yöntemi.....	26
3.3.1.3. Agar ekstrakt yöntemi.....	28
3.4. Antimikrobiyel Aktiviteye Sahip Olan Bileşiklerin İzolasyonu	29

3.4.1.	Bitki ekstraktı hazırlaması.....	29
3.4.2.	Karadut metanol ekstraktının kolon kromatografisi ile fraksiyonlarına ayrılması	29
3.5.	Fraksiyonların Antimikrobiyel Kapasitelerinin İncelenmesi.....	30
3.6.	Fraksiyonların Antioksidan Kapasitelerinin İncelenmesi.....	30
3.5.1.	Radikal süpürme gücünün belirlenmesi (DPPH).....	30
3.7.	Seçilen Fraksiyonların Kromatografik Analizi	31
3.7.1.	HPLC- MS analizleri	31
3.7.1.1.	HPLC analiz koşulları.....	31
3.7.1.2.	MS Analiz koşulları	31
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	33
4.1.	Antimikrobiyel Aktivite.....	33
4.1.1.	Antimikrobiyel etkinin taranması	33
4.1.2.	Antimikrobiyel etkinin belirlenmesi (MIC)	35
4.2.	Aktif Bileşiklerin İzolasyonu	37
4.2.1.	Fraksiyonların antimikrobiyel etkileri	37
4.2.2.	Fraksiyonların antioksidan kapasiteleri	38
4.3.	Seçilen Fraksiyonların HPLC- MS Analizleri	39
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	42
6.	KAYNAKLAR.....	44
	ÖZGEÇMİŞ.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Rutin'in kimyasal yapısı.....	14
Şekil 1.2.	Flavilyum iyonunun kimyasal yapısı.....	15
Şekil 1.3.	Siyanidin-3- glukozid'in kimyasal yapısı.....	16
Şekil 1.4.	Siyanidin-3- rutinosid'in kimyasal yapısı	16
Şekil 1.5.	Pelargodin-3-glukozid'in kimyasal yapısı	16
Şekil 4.1.	Karadut fraksiyonlarının trolox eşdeğeri DPPH radikal süpürme güçleri....	39
Şekil 4.2.	Karadut meyvesinin metanol ekstraktının kromatogramı.....	40
Şekil 4.3.	Karadut meyvesinin 8. fraksiyonunun kromatogramı.....	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Antibiyotiklerin etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması.....	6
Çizelge 1.2. Antibiyotik direncin temel mekanizmaları.....	11
Çizelge 3.1. Mikroorganizmalar ve sağlandıkları yerler.....	24
Çizelge 3.2. Antimikrobiyel Aktivite belirlemelerinde kullanılan ekstrakt Konsantrasyonları.....	27
Çizelge 4.1. 100mg/ml kara dut konsantrasyonunun mikroorganizma gelişimine etkisi.....	35
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda karadutun mikroorganizma gelişimine etkisi.....	37
Çizelge 5.1. Karadutun Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC).....	42

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	: Amerikan tipi kültür koleksiyonu
ATP	: Adenozin trifosfat
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anizol
BHT	: Bütillenmiş hidroksi toluen
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
HPLC	: Yüksek performans sıvı kromatografisi
MS	: Kütle spektrometresi
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
PABA	: P-aminobenzoikasit
PBP	: Penisilin bağlayıcı proteinler
RNA	: Ribo Nükleik Asit
TBHQ	: Tersiyer bütıl hidroksiküinon
TE	: Trolox eşdeğeri
THFA	: Tetrahidrofolat
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gamma
δ	: Delta
μ	: Mikro

EKLER DİZİNİ

Ek 1. Trolox standart eğrisi (DPPH Testi)	51
Ek 2. Karadut meyvesinin antimikrobiyel tarama (disk diffüzyon yöntemi) sonuç resimleri	52
Ek 3. Karadut meyvesinin MIC (broth dilüsyon yöntemi) değerlendirme resimleri.....	53
Ek 4. Karadut meyvesinin MIC (agar ekstrakt yöntemi) sonuç resimleri.....	54
Ek 5. Kolon kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyon resimleri.....	56

1. GİRİŞ

Karadut (*Morus nigra*) Moraceae familyasından *Morus* türüne ait bir meyvedir [1]. Karadutun yetiştirildiği ülkelerin başında Hindistan ve Çin gelmektedir. Bu ülkelerde dut, yaprağı için yetiştirilir. Dut yaprağı ipek böceği yetiştiriciliğinde kullanılmaktadır [2]. Hindistan ve Çin'i, aralarında Türkiye ve Yunanistan'ın bulunduğu pek çok Avrupa ülkesi takip etmektedir ve bu ülkelerde dut, yaprağından çok meyvesi için yetiştirilir [3–4]. Anadolu'da yüksek kaliteli karadut yetiştirilmektedir [5]. Türkiye'de 400 yıldan daha uzun bir süredir dut yetiştiriciliğinin yapıldığı bilinmektedir. Türkiye'de bulunan dut ağaçlarının % 95'ini beyaz dut (*Morus alba*), % 3'ünü kırmızı dut (*Morus rubra*), % 2'sini karadut (*Morus nigra*) oluşturmaktadır [3]. Türkiye'de duttan 'dut pekmezi', 'dut pestili' ve 'dut köme' gibi geleneksel ürünlerin yanı sıra marmelat, meyve suyu ve likör yapılmaktadır. Ayrıca taze ve kuru meyve olarak ta tüketilmektedir [6]. Karadut meyvesinin toplam yağ içeriği [7], yağ asidi profili, toplam fenolik bileşikler [8], C vitamini içeriği [9] belirlenmiştir. Koyu renkli meyveler flavonoidler, antosiyaninler ve karotenoidler içeren fenolik bileşikler bakımından oldukça zengindir [10]. Karadutta fenolik bileşik miktarı oldukça yüksek olduğu belirtilmektedir [11]. Fenolik bileşikler antioksidan, antimutajenik, antikarsinojenikler gibi çeşitli biyokimyasal aktivitelere sahiptirler [12]. Dut meyvesi, laksidatif (barsak boşaltmaya yardım edici), dizanteri tedavisinde tamamlayıcı (yardım edici), odontaljik (diş ve çevresindeki dokularda ortaya çıkan ağrılara karşı), antihelmitik (barsak kurduna karşı), ekseptorant (balgam söktürücü), hipoglisemik (kan şekerini düşürücü), emetik (kusturucu) amaçlarla kullanımının yanı sıra, Türkiye'de ağız lezyonlarının tedavisinde de kullanılmaktadır [11–14].

Karadut meyvesi üzerinde yapılan çalışmalar antioksidan aktivitesi, fenolik bileşik miktarının belirlenmesi şeklinde olup, sahip olduğu antimikrobiyel aktivite üzerine herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tezin amacı karadutun antibakteriyel ve antifungal aktivitesinin belirlenmesi ve bu aktivitede rol oynayan aktif bileşiklerin tanımlanmasıdır.

1.1. Antimikrobiyel Aktivite ve Antimikrobiyaller

Mikroorganizmaların şiddetli enfeksiyonlara neden olduğu kavramı Pasteur'un germ teorisini geliştirdiği 19.yy ortalarında ortaya atılmıştır. Bu döneme kadar mikroorganizmalara karşı tedavi geliştirilememiştir. Bu konudaki gelişim, enfeksiyon hastalıklarının kontrol ve tedavisinde çok büyük katkıda bulunmuş ve medikal birimlerinin büyük başarılarından biri olarak sayılan antimikrobiyel maddelerin keşfi bu süreci takip etmiştir [15]. Antimikrobiyel bileşikler diğer mikroorganizmaların büyümelerine engel olan, mikroorganizmalar tarafından üretilen maddeler olarak tanımlanmıştır. Bu tanım günümüzde artık tam doğru değildir, çünkü antimikrobiyel maddelerin bazıları sentetik olarak (örneğin kloramfenikol) ya da yarı sentetik olarak (örneğin bazı penisilinler, sefalosporinler) üretilmektedir. Böylece antimikrobiyel madde; bir organizma tarafından üretilen ya da sentetik olarak elde edilen, mikroorganizmalar üzerine mikrobisit (öldürücü) veya mikrobiyostatik (üremelerini durdurucu) etki gösteren enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan maddeler olarak tanımlanır [16].

Kemoterapinin temel kavramının oluşturulması ve bu alanda önemli başarılarının elde edilmesi 20.yy başlarında Paul Erlich'in 1928'de Fleming'in bulaşıcı *Staphylococcus*'lara karşı *Penicillium*un eritici (lytic) etkisi olan bir madde ürettiğini şans eseri gözlemlemesiyle başlamıştır. Şans eseri gözlemle başlayan bu süreç Florey Chain, ve Amerikan Farmasötik Enstitüsü'nün bu alandaki çalışmalarıyla devam etmiş, sonunda saf, aktif bileşiğin (penisilinin) izolasyonunun ve karakterizasyonunun yapılmasıyla sonlandırılmıştır. Bu çalışma ile 1929'da ilk antimikrobiyel (antibiyotik) olarak penisilin keşfedilmiş ve 1935'de Domagk sülfonamidleri bulmuştur. Antimikrobiyel maddeler etkiledikleri patojenin cinsine göre antibakteriyel, antifungal, antivirütik, antiparazitler olarak sınıflandırılırlar [17].

1.1.1. Antibakteriyel maddeler

Bakterilerin büyümesini engelleyen (bakteriostatik) ya da bakterileri öldüren (bakterisidal) düşük molekül ağırlıklı bileşiklere antibiyotik denir. İnsanların antibakteriyel olarak kullandıkları antibiyotiklerin çoğu doğal bileşiklerdir, *Streptomyces* spp ve fungi'ler başta olmak üzere mikroorganizmalar tarafından üretilirler, bu antibiyotiklerin yanı sıra sentetik ve yarı sentetik olarak elde edilen antibiyotiklerde bulunmaktadır [18]. Penisilinlerin keşfini sülfonamidler takip etmiştir [19]. 1960'larda

hem penisilin çekirdeği, 6–aminopenicillanic acid (6–APA) hem de sefalosporin çekirdeği 7–aminocephalosporanic acid (7–ACA) izole edilmiş, her iki çekirdeğin çeşitli yan zincirler oluşturma yeteneğine sahip olmaları yarı sentetik β –laktam antibiyotiklerinin üretimine izin vermiştir. [20].

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antibakteriyel maddelerin güvenle kullanılmaları için birkaç kritere sahip olmaları gerekir. En önemlisi antibiyotiğin geniş etki spektrumuna sahip olmasıdır. Etki spektrumu, bir antimikrobiyel maddenin tedavi edici dozda etkileyebileceği mikroorganizma cinslerinin tümüne denir. Eğer bir antibiyotik çok sayıda mikroorganizma üzerinde etki gösteriyorsa bu antibiyotiğe ‘*geniş spektrumlu antibiyotik*’ denir. Aynı semptomlara farklı bakteri türünün neden olabileceği ve tedaviye başlanmadan önce mikroorganizmanın izole edilmesi ve tanımlanması için beklemenin her zaman mümkün olmadığı durumlarda geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı oldukça avantaj sağlar. Avantajlara rağmen, geniş spektrumlu antibiyotikler bazı dezavantajlara da sahiptir. Bu antibiyotikler sadece patojen mikroorganizmalara etki yapmaz, aynı zamanda yerleşik mikrofloranın sayısını da azaltır. Böylece normalde mikroflora tarafından baskılanabilecek olan patojenler, aşırı ürerler ve enfeksiyona neden olurlar [21]. Bu sebeple, antibiyotikler seçici toksisiteye sahip olmalıdır. Seçici toksisite ile anlatılmak istenen ilacın patojen mikroorganizmaya zarar verip, yerleşik floraya zarar vermeme durumudur [16].

1.1.2. Antibakteriyellerin etki mekanizmaları

Bakteriler enfeksiyon odağında veya insan vücudu yüzeyinde devamlı olarak büyür ve çoğalırlar. Böylelikle sayılarını arttıırırlar. Büyümek ve çoğalmak için birçok biyomolekülün sentezlenmesi gerekir. Antibiyotikler, bakterilerin büyüme ve çoğalması aşamasında özel hedefler üzerinde etkili olurlar. Antibiyotikler hedef bölgelerine göre;

- Hücre duvarı sentezini,
- Stoplazmik membranı,
- Nükleik asit sentezini,
- Ribozom fonksiyonunu ve
- Metabolik fonksiyonu inhibe edenler olmak üzere beş grupta incelenirler [18].

1.1.2.1. Bakteri hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotikler

Mikoplazmalar hariç tüm prokaryotlarda stoplazmik zarı çevreleyen sağlam ve dirençli bir hücre duvarı bulunmaktadır. Hücre duvarının görevi, bakteri stoplazmasının içindeki yüksek ozmotik basınca direnmek suretiyle hücrenin bütünlüğünü korumaktır. Eğer bu duvar herhangi bir nedenle zayıflayacak olursa veya oluşmazsa hücre parçalanır. Bakteriler, sahip oldukları hücre duvarına bağlı olarak farklı boyanma özellikleri gösterirler ve böylece Gram pozitif ve Gram negatif olarak sınıflandırılırlar [22].

Hücre duvarı sentezini inhibe eden antibakteriyel maddeler *beta laktam* halkası taşıyanlar ve taşımayanlar olarak iki guruba ayrılır; penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar betalaktam halkası taşıyan, basitrasinler, vankomisinler, sikloserinler, teykoplaninler ve fosfomisinler ise beta laktam halkası taşımayan antibakteriyel guruba örnekler [20].

A. Beta Laktam halkası taşıyan antibiyotikler

β -Laktam antibiyotikleri yaygın kullanılan antibiyotikler arasındadır. β -laktam antibiyotikleri peptidoglikan sentezinin son basamağı olan, polisakkarit peptidoglikan omurganın peptid yan zincirini çapraz bağlayan transpeptidasyon reaksiyonunu engellerler. [20].

B. β - Laktam halkası taşımayan antibakteriyeller (Glikopeptidler)

Peptidoglikan sentez inhibitörlerinin bir diğer grubu basitrasin, vankomisin, sikloserin, teykoplanin ve fosfomisinden oluşmaktadır. Glikopeptid antibiyotikleri peptidoglikan sentezinin son iki basamağı olan, transglikolasyonu ve transpeptidasyonu inhibe ederler [21].

1.1.2.2. Stoplazmik membran fonksiyonunu inhibe eden antibiyotikler

Biyolojik membran temel olarak lipid, protein ve lipoproteinden oluşur. Stoplazmik membran su, iyon ve besinlerin difüzyonu için bir bariyer olup transport sistemi gibi görev yapar [16]. Deterjan özelliğine sahip (yüzey aktif) antibiyotikler ve bazı antiseptikler stoplazma membranının seçici geçirgenliğini arttırarak stoplazma içindeki

fonksiyonel önemi bulunan nispeten küçük moleküllü bileşiklerin (aminoasitlerin, nükleotitlerin) hücre dışına çıkmasına neden olurlar ve bakterisid etki gösterirler. Bu gruptaki antibiyotiklere örnek olarak polimiksinler, imidazoller, kolitsin, nistatin, amfoterisin- β verilebilir [22].

1.1.2.3. Nükleik asit sentez inhibitörleri

Antibiyotikler nükleik asit sentezini farklı düzeylerde etkilerler. Nükleotid (purin, pirimidin) sentezini inhibe ederler, DNA fonksiyonunu önleyebilirler. Bu grup antibiyotiklere en yaygın örnek kuinolonlar ve rifampinlerdir [21].

1.1.2.4. Ribozomun fonksiyonunu inhibe eden antibiyotikler

Prokaryotik ribozomların RNA ve proteinleri ökaryotik ribozomlardan oldukça farklıdır ve seçici antibiyotikler protein sentezinin farklı basamaklarını hedef alırlar. [22]. Protein sentezini inhibe eden klinik öneme sahip diğer antibiyotiklerin başında makrolidler (örneğin eritromisin oleandomisin), linkomisin (linkomisin, klindamisin), kloramfenikol ve fusidik asit gelir [19].

1.1.2.5. Metabolik fonksiyon inhibitörleri

Bakterilerin çoğu p-aminobenzoik asit, pteridin ve glutamik asit gibi bileşenlerden dihidrofolik asit sentezleme yeteneğine sahiptir. Dihidrofolatın kendisi bakteri metabolizmasında önemli bir rol oynamaz fakat dihidrofolat, dihidrofolat redüktaz enzimi ile tetrahidrofolik aside parçalanır, tetrahidrofolik asit, metionin, purinlerin, timin ve nükleik asit bileşenlerinin sentezinde önemli rol oynar [19].

Trimetoprim ve Sülfonamidler tetrahidrofolik asit üretimi için gerçekleşen reaksiyonlarda görev alan enzimlerin inhibitörleridir [20]. Bu antibiyotikler bakteristatik etki gösterirler [19]. Sülfonamidlerin yapısı folik asit yapısındaki esansiyel metabolit madde olan p-aminobenzoikaside (PABA) benzemektedir. Sülfonamidler, PABA yerine reaksiyona girerler folik asidin işlev görmeyen benzerlerinin oluşmasına neden olurlar. Böylece bakteri hücresinin çoğalması önlenir [16].

Çizelge 1.1. Antibiyotiklerin etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması [15]

Antibiyotiğin etki mekanizması	Antibiyotikler
	•Biyosentetik Enzimleri İnhibe Edenler
	Fosfomisinler Sikloserinler
	•Taşıyıcı Molekülle Birleşenler
	Basitrasinler
Hücre Duvar Sentezini İnhibe edenler	•Hücre Duvarı Substratları ile Birleşenler
	Vankomisinler (glikopeptid)
	•Polimerizasyonu ve yeni Peptidoglikanların Hücre Duvarına Birleşmesini İnhibe Edenler
	Penisilinler Sefalosporinler Karbapenemler B-laktam grubu Monobaktamlar
Stoplazmik Membranı İnhibe Edenler	•Stoplazmik Membran Düzenini Bozanlar
	Tirosidinler Polimiksinler
	•Membranda Porlar Oluşturanlar
	Gramisidinler
Nükleik Asit Sentezini İnhibe Edenler	•DNA Replikasyonunu İnhibe Edenler
	Kuinonlar
	•RNA Polimeraz İnhibitörleri
	Rifampisinler
Ribozom Fonksiyonunu İnhibe Edenler	•30S Birim İnhibitörleri
	Streptomisinler Kanamisinler Gentamisinler Amikasinler Spektinomisinler Tetrasiklinler
	•50S Birim İnhibitörleri
	Kloramfenikoller Klindamisin Eritromisin Fusidik Asit
Metabolik Fonksiyon İnhibitörleri	•Folat Metabolizması İnhibitörleri
	•Pteroiik Asit Sentaz İnhibitörleri
	Sülfonamidler
	•Dihidrofolat Redüktaz İnhibitörleri
	Trimetoprimler

1.1.3. Antibiyotiklere karşı direnç ve direncin evrimi

Patojen mikroorganizma veya suşunun, antibakteriyel maddenin kullanıldığı doz aralığında ilaç tarafından etkilenmemesi durumuna direnç denir [18]. Antibiyotikler hastalık semptomlarını azaltmaktan çok bu semptomları tedavi etmek amacıyla kullanıldığından tıbbi uygulamaların çoğu (yoğun bakım, kanser kemoterapi, organ nakli gibi) antibiyotiklerin koruyucu şemsiyesi altında gerçekleştirilmektedir. Hem insanlarda, hem de hayvanlarda çok düşük konsantrasyonlarda (genellikle 1 µg/mL'den daha düşük) bakteriyel büyümeyi engelleyebilen bu tür bileşiklerin çok yüksek miktarlarda (bazı

Avrupa ülkelerinde günde 1 ton'dan daha fazla) tüketimi bakteriyel popülasyonlar arasında antibiyotik direncin ortaya çıkması ve hızla yayılmasıyla sonuçlanmış, böylece bazı halk sağlığı problemleri ile karşılaşmıştır [23].

İlaça dirençli suşlar, ilk olarak çok sayıda antibiyotiğin kullanıldığı hastanelerde görülmüştür. Sülfonamidlere karşı *Streptococcus pyogenes*'in direnci 1930'larda [24], penisilinlere karşı *Staphylococcus aureus*'un direnci 1940'larda, keşfinin hemen ardından tespit edilmiştir [24]. Çoklu ilaç direnci ise ilk olarak 1960'ların başında *E.coli*, *Shigella* ve *Salmonella* gibi enterik bakteriler arasında belirlenmiştir. Bu suşlar özellikle gelişmekte olan ülkelerde ciddi klinik problemlere ve yaşam kayıplarına neden olmuştur. [24].

Bu süreçten de anlaşılacağı gibi, antibiyotiklere karşı bakteriyel direncin oluşumu yeni değildir ve çok ciddi sıkıntılara neden olabilmektedir. Antibiyotiklerin reçetesiz ve kolaylıkla temin edilmesi, yaygın kullanımı, antibiyotiklerin endüstriyel üretimi ve pazarlanması, düşük sanitasyon koşulları, dirençli fenotipin yoğunluğunda artışa, bu fenotipin hızla yayılmasına sebep olmuştur. Ayrıca sağlık bütçelerindeki yetersizlik çok pahalı fakat yeni etkileri olan antibiyotiklere ulaşmayı engellemektedir [23,24].

Mikroorganizmaların antibakteriyel ilaçlara karşı direncin genetiğe bağlı olmayan (doğal) ve genetiğe bağlı (kazanılmış) olmak üzere iki kaynağı bulunmaktadır.

1.1.3.1. Genetiğe bağlı olmayan (doğal) direnç

Antibakteriyel maddelerin mikroorganizmalara etki edebilmesi için mikroorganizmanın aktif üreme döneminde olması gerekir. Doğal direncin temelinde, mikroorganizmanın metabolizmasının inaktif fazda bulunması veya ilacın etki mekanizmasına uygun hedef yapıların mikroorganizmalarda bulunmaması yatar [18–24].

1.1.3.2. Genetiğe bağlı olan (kazanılmış) direnç

Bakterilerin antibakteriyel maddelere olan dirençlerinin çoğunu genetik değişiklikler oluşturur [25]

1.1.3.2.1. Mutasyona bağı kazanılmış (kromozomal) direnç

Bakteri kromozomunda, mutasyonla meydana gelen değişiklikler, bakterinin antibakteriyel maddelere karşı duyarlılığını değiştirir [18]. Mutasyon, bakterilerde genellikle spontan oluşmaktadır [22]. Kromozomal mutasyonlarla oluşan kazanılmış direnç tek aşamada veya çok aşamada oluşabilir. Antibakteriyel ilaçla bir veya birden fazla temasın ardından birden ve ileri derecede bir direnç oluşur [22]. Çok aşamalı mutasyonda ise direnç yavaş olarak derecesi gittikçe artan bir biçimde oluşur [18].

1.1.3.2.2. Kromozom dışı (direnç geninin alınmasına bağı kazanılmış) direnç

Kromozom dışı direnç, plazmid veya transpozonlar aracılığı ile sağlanır. Plazmidler ektrakromozomal genetik elemanlardır. Sirküler yapıda, çift zincirli DNA molekülleri olan plazmidlerin üzerine genler sıralanmıştır. Direnç genleri taşıyan plazmidlere direnç plazmidleri (R) denir. Direnç plazmidleri bulundukları mikroorganizmaları o ilaca karşı dirençli yaparlar. Transpozonlar direncin taşınmasında rol oynayan bir diğer özel DNA parçalarıdır. Hem kromozomal DNA üzerine hem de plazmidler üzerine yerleşebilen (rekombine olan) daha ufak ve daha hareketli DNA parçalarıdır [20].

Mikroorganizmaların antibakteriyel maddelere karşı geliştirdikleri direnç beş farklı mekanizma ile kendini gösterir bunlar:

- Dış membranın varlığı,
- Antibiyotiklerin enzimatik inaktivasyonu,
- Hücre çeperinin ilaca karşı seçici geçirgenliğinin azaltılması,
- Antibiyotiklerin dışarı atılması ve
- Hedef enzimin yeniden programlanması dolayısı ile ilacın hedefe bağlanmasının azaltılması ve enzim substitüsyonu [19–22] şeklinde verilebilir.

1.1.3.3. Dış membranın varlığı

Antibiyotiklerin etkili olabilmesi için öncelikle etki edecekleri hedeflere ulaşması gerekir, dolayısı ile Gram pozitif bakterilerde peptidoglikan tabakası antibiyotiklerin difüzyonu için bir sınırlama göstermezken Gram negatiflerde dış membranın varlığı

nedeniyle antibiyotikler difüzlenirken sınırlamalarla karşılaşır. Bu durum tüm Gram negatif bakterilere küçük bir direnç avantajı sağlar [21].

1.1.3.4. Antibiyotiklerin enzimatik inaktivasyonu

Antibiyotikler, enzimler ile ya parçalanarak ya da yan gurupların eklenmesi ile inaktif hale getirilir. Özellikle Gram negatif bakteriler arasında Beta laktam antibiyotiklerine karşı direnç mekanizmalarından biri β - laktam halkalarını kırarak antibiyotiği inaktif duruma getiren β -laktamaz enzimidir [21].

1.1.3.5. Hücre duvarının ilaca seçici geçirgenliğinin ve ilaç alımının azalması

Gram negatif bakterilerde önemli bir seçici geçirgenlik bariyeri dış duvardaki poruslardır. Porusları taşıyan porin proteinlerinin sentezinin bozulması ve membranda sayısının azalması seçici geçirgenlikte azalma mekanizmalarından biri olabilir [22].

1.1.3.6. Antibiyotiklerin dışarı atılmaları

Antibiyotiklerin etki göstermesi için bakteri stoplazmasında yeterli konsantrasyona ulaşması gerekir. Bakterinin direnç kazanmasını sağlayan bir diğer strateji; antibiyotiklerin bakteri stoplazmasına girişi kadar hızlı bir şekilde dışarı atılmasıdır [21].

1.1.3.7. İlacın hedef yapısının yeniden programlanması ve enzim substitüsyonu

Hedef yapının yeniden programlanmasında antibiyotiklerin parçalanması ya da uzaklaştırılmasından çok, antibiyotik hedeflerinin gizlenmesi ya da hedeflerin yeniden programlanması yönünde bir strateji izlenir [19]. Bu stratejiler:

A) Ribozomal hedeflerde yapılan değişiklik

Tetrasiklin, makrolid, linkozamid, aminoglikozid ve streptoraminler gibi bazı antibiyotiklere karşı gelişen dirençte ribozomal bağlanma yerlerinde meydana gelen değişikliklerin rolü bulunmaktadır [22]. Tetrasiklin direncinin klinik olarak ikinci önemli tipi ribozomun korunmasıdır. Koruma stoplazmik proteinler tarafından gerçekleştirilir. Bu proteinler bakteriyel stoplazmada bulunduğu zaman tetrasiklinler artık ribozoma bağlanamaz. [21].

Makrolid ve Linlozamidler; Bakteriyel ribozomun 23s r RNA'nın üstünde bulunan Adenin nükleotidine metil grubunun r RNA metilaz enzimi ile eklenmesi sonucu antibiyotiğin ribozoma bağlanması engellenir. Direncin bu tipi özellikle Gram pozitif koklarda bulunur. Gram negatiflerin, *E.coli* gurubu üyeleri doğal bir şekilde makrolidlere karşı dirençlidir çünkü makrolidler dış membrandan rahat bir şekilde geçemez [21].

B) Hücre duvarı prokürsörlerinde değişiklik

Glikopeptid antibiyotikler peptidoglikan prokürsörlerinin ucunda yer alan D-alanil-D-alanin 'e bağlanarak hücre duvarı prokürsörlerinin hücre duvarına katılmalarını engeller [22].

C) Hedef enzim değişikliği

β -laktamlar; β -laktam antibiyotikleri kovalent olarak stoplazmik membranda bulunan penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP) bağlanırlar, böylece peptidoglikan sentezini engellerler. Bu nedenle PBP lerde meydana gelen değişiklikler β -laktam direncini meydana getirir. β -laktam direnci olan Gram pozitif bakterilerde ya PBP lerin antibiyotiklere ilgisi azalmıştır ya da bu bakteriler az sayıda PBP üretmektedirler [22]. Bu tipin en iyi karakterize edilmiş direnç geni *S. aureus* da bulunan metisilin e karşı direnci kodlayan *mec* genidir [21].

Bakterilerin antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç mekanizmaları Çizelge1.3 de özetlenmiştir

Çizelge 1.2. Antibiyotik direncin temel mekanizmaları [25]

β-LAKTAMLAR	•β-laktam halkasının hidrolize edilmesi (β-laktamazlar)
	•Hücre duvarı biosentetik enzim hedeflerinin modifikasyonları.
	•Dış membran proteinleri olan iç akış (influx) sistemindeki değişiklikler.
	•Aktif dışlama (efflux) sistemleri.
TETRASİKLİNLER	•Aktif dışlama (efflux) sistemleri.
	•Ribozom hedef koruması.
	•Oksijen bağlı ilaç aktivasyonu.
KLORAMFENİKOLLER	•Asetiltransferazla inaktivasyon.
	•Aktif dışlama (efflux) sistemleri.
	•İçeri taşıma (influx) sistemlerinde değişiklik
MAKROLİDLER	•Ribozomal hedefleri modifiye eden metilazın aktivasyonu.
LİNKÖZAMİDLER	•Ribozomal hedeflerin mutasyonu.
	•Aktif dışlama (efflux) sistemleri.
	•Antibiyotiklerin enzimatik modifikasyonu.
AMİNOGLİKOZİDLER	•Antibiyotiklerin enzimatik modifikasyonu.
	•İçeri taşıma (influx) sistemlerinde değişiklik.
	•Ribozomal hedeflerin mutasyonu
FLOROKUİNOLONLAR	•Topoizomeraz hedeflerin mutasyonu.
	•Aktif dışlama (efflux) sistemleri.
	•İçeri taşıma (influx) sistemlerinde değişiklikler.
GLİKOPEPTİDLER	•Hücre duvarının yapısında hedef modifikasyonlar
	•İlaçların hücre duvarı sekestrasyonu (bloke olması).
SÜLFONAMİDLER	•Antibiyotik hedeflerinin aşırı üretimi
TRİMETOPRİM	•Inhibited (çekingen) reaksiyonların metabolik bypası
ISONLAZİD	•Aktif pro-drug ların başarısızlığına yol açan mutasyonlar.
RİFAMPİSİNLER	•RNA polimerazda mutasyon.
	•Antibiyotiklerin enzimatik modifikasyonu.
FOSFOMİSİN	•Glutathionylatic tarafından inaktivasyon.
	•İçeri taşıma (influx) sisteminde değişiklikler

1.1.4. Yeni antibiyotiklere gereksinim

Antibiyotiklerin bulunması, insanlığın kısa bir sürede bakteri enfeksiyonlarından tamamen kurtulacağı ümitlerini doğurmuştur. Ancak bu ümitler gerçekleşmemiş ve bugün elimizde çok değişik gruplardan, farklı etki mekanizmasına ve çok farklı spektrumlara sahip düzinelerce antibiyotik varken, bakteriler hala çok önemli bir morbidite (belirli bir nüfustaki hasta sayısının, toplam nüfusa oranı) ve mortalite (belirli bir nüfustaki ölü sayısının, toplam nüfusa oranı) kaynağı oluşturmaktadır. Bu durumun nedenleri arasında, antibiyotiklerin sağladığı güvence nedeni ile sanitasyon koşullarının ihmale uğraması, yaşam düzeni ve koşullarının değişmesi, enfeksiyon riski yüksek yeni tıbbi ve cerrahi tedavi yöntemlerinin uygulamaya konulması, ortalama yaşam süresinin uzaması sonucu doğal vücut savunmaları zafiyete uğramış kişilerin oranının yükselmesi, bakterilerin bulaşma riskini çoğaltan sonda, kateter, prostetik cihaz uygulamalarının artması, eskiden bilinmeyen veya patojen olarak tanımlanmayan birçok bakteri türünün bugün önemli patojenler arsında yer alması gibi pek çok neden sıralanabilir [26].

Elimizdeki dirençli suşların artması yeni antibiyotiklere gereksinim nedenlerinden birini ve belki de birincisini oluşturmaktadır. Bu nedenler arasında, daha geniş spektrumlu antibiyotiklerin bulunması ve yan etkileri az, yarılanma süresi daha uzun, kullanımı kolay, daha yüksek doku konsantrasyonu sağlayan, beyin omirlik sıvısı, eklem sıvısı, abse boşluğu gibi birçok antibiyotiğin nüfuz kabiliyetinin daha düşük olduğu vücut bölgelerine yeterli konsantrasyonlarda birikmesi, kısaca farmakolojik ve farmodinamik özellikleri daha uygun olan antibiyotiklerin bulunmasına olan gereksinimin temel sebepleridir.

Yeni antibiyotiklerin aranmasında 50 yıl içinde önemli strateji değişiklikleri olmuştur. İlk zamanlarda geniş çaplı taramalarda antimikrobik madde sentezleyen mantar ve bakterilerle ilgilenilirken günümüzde bakteri fizyolojisinin daha iyi anlaşılması, antibiyotiklerin yapı ve etkinlikleri arasındaki ilişkilerin ortaya konması, gibi bilgiler ışığında raştırmacılar değişik kaynaklara yönelmişlerdir [26].

1.1.5. Antibiyotik Ajanlar Olarak Bitkiler

Bitkilerde tedavi edici bileşenlerin bulunduğu eski zamanlardan beri bilinen bir gerçektir. Yeryüzünde 250.000–500.000 bitki türünün bulunduğu tahmin edilmektedir. Bu türlerin çok küçük bir yüzdesi (%1–10 gibi) hem insanlar hem de hayvanlar tarafından gıda olarak tüketilmektedir [27]. Yaklaşık 60.000 yıl önce Irak'ta yaşayan insanlar

Gülhatmiyi (*holly hock*) tedavi amacıyla kullanmışlardır [28]. Bitkilerin tıbbi değere sahip olmalarının başında, insan vücudu üzerinde önemli fizyolojik etkileri olan bazı kimyasal bileşiklere sahip olmaları gelir. Bitki ekstraktlarının antimikrobiyel özellikleri sebebi ile tedavi edici veya önleyici etkilere sahip oldukları belirlenmiştir [29]. Klinik mikrobiyologların antimikrobiyel bitki ekstraktları ile ilgilenmelerinin iki nedeni bulunmaktadır. İlki, fitokimyasalların çoğunun doktorlar tarafından önerilen antimikrobiyel ilaçlar içerisinde bulunuyor olması, ikincisi ise insanların antibiyotiklerin aşırı ve hor kullanmaları neticesinde çeşitli problemlerle karşı karşıya kalmış olmaları ve bu problemlerin dikkat çekici boyutlara ulaşmış olmasıdır. Ayrıca pek çok insan kendi tıbbi bakımları konusunda daha fazla özerkliğe sahip olmak istemişlerdir. İnsanların, bitki bileşenlerinin pek çoğuna bitkisel ürünlerin satıldığı dükkânlardan rahatlıkla ve daha ucuz fiyatlara ulaşabilmeleri bitkilere olan ilgilerinin artmasına neden olmuştur [30]. Sentetik ilaçlarla, bitkisel orijinli antimikrobiyellerin sahip oldukları yan etkiler kıyaslandığı zaman bitkisel orijinli antimikrobiyellerin bu konuda daha avantajlı oldukları görülür [31].

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporuna göre dünya nüfusunun % 80'inden fazlası, öncelikli sağlık ihtiyaçları için geleneksel tıba güvenmektedir. Tıbbi bitkiler geleneksel tıbbın temel bileşenleridir. Geleneksel tıpta kullanılan tıbbi bitkilerin etkinliği ve güvenilirliği konusunda araştırmalar devam etmektedir. Bitkilerde bulunan tıbbi bileşenler, geleneksel batı tıbbında da önemli rol oynar, 1984'te Amerika ve Kanada'da kullanılan ilaçların % 25'i doğal bitkisel ürünlerden üretilmiştir. Bitki türlerinin yaklaşık %14–28'i tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. Farmakolojik açıdan aktif olan bitkilerin % 74'ü, bu bitkilerin etnomedikal kullanımlarının ardından keşfedilmiştir [32].

Mikroorganizmaların gelişimini sınırlayan yeni antibiyotikler (benzoin, emetin gibi) bitkilerden izole edilmiştir, bitkilerden elde edilen antibiyotik bileşikler, mevcut kullanılan antibiyotiklerin izlediği etki mekanizmalarından daha farklı bir mekanizma ile mikroorganizmaları inhibe edebilir ve böylece dirençli mikrobiyel suşların tedavisinde klinik öneme sahip olabilirler. Bu sebeplerle son yıllarda antimikrobiyel özellikleri nedeniyle bitkilerin incelendiği çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır [33].

1.1.6. Bitkilerin antimikrobiyel ve antioksidan özellik taşıyan bileşenlerinin önemli grupları

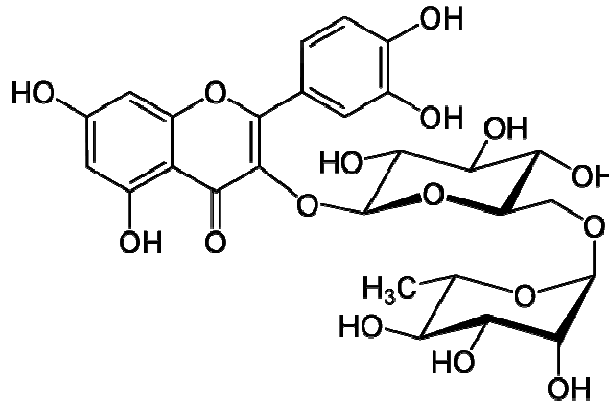
Bitkilerde bulunan fitokimyasalların çoğu antioksidan ve antimikrobiyel aktiviteye sahiptir [34]. Bitkilerin antimikrobiyel ve antioksidan özellik gösteren bileşenleri genellikle sekonder metabolitlerdir. Sekonder metabolitler; azot içeren bileşikler, terpenoidler ve fenolik bileşikler olmak üzere üç ana gruba ayrılır [35].

1.1.6.1. Fenolik bileşikler

Flavonoidler, Antosiyanidinler

Flavonoidler iki aromatik halka taşıyan, üç karbonlu alifatik karbon zinciri ile birbirine bağlanmış, C6–C3–C6 iskeletine sahip fenolik yapılardır, bitkilerde 4000 den fazla flavonoid tanımlanmıştır. Flavonoidler, antioksidan, enzim regülatörleri olarak çalıştıkları için bitki biyokimyası üzerinde önemli etkilere sahiptirler. Flavonoidlerin günlük alım miktarı 25 mg/gün olarak belirtilmektedir. Ayrıca flavonoidlerin kalp damar hastalıklarını önlemeye yardım ettiği belirlenmiştir [36].

Doğada flavonoidlerin çoğu mono ve disakkaritlerle birleşmiş durumda bulunurlar. Flavonoller genellikle glikozide olmuşlardır. Bitkilerde rutin, kesretin–3–rutinozid ve kempferol–3–rutinozid en fazla rastlanan glikozide olmuş flavonollerdir [37]. Ayrıca gıdalarda en yaygın olarak apigenin, lutealin ve rutin bulunmaktadır. Rutin, kuersetin–3–O–β rutinozid dir. Burada rutinozid ramnoz ve glukozun disakkaritidir [38].



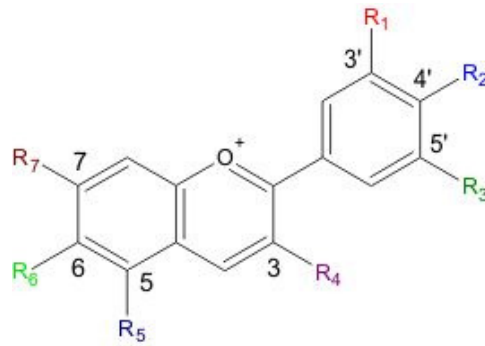
Şekil 1.1. Rutin'in kimyasal yapısı [38]

Rutin, hisperdinle (hisperdin flavanon türevidir) bağlantısı olan bir flavonoiddir. Suda çözünabilir renk pigmentleri arasında yer alan rutin antiinflamatuvar (İnflamasyonu

azaltan ya da durduran), antiallerjenik, antiviral ve antikanserojenik özelliklere sahiptir. Rutin fenolik antioksidandır ve süperoksit radikallerini süpürme özelliğine sahiptir [38].

Antosiyanidinler aglikon halde bulunur (aglikon karbonhidrattan yoksun demektir). Pek çok meyve ve sebzeye düşük pH'da kırmızı, yüksek pH'da pembe ve mor renk verir. Siyanidin en yaygın antosiyanidindir. Meyve antosiyanidinleri 3.pozisyonda oksijen köprüsü ile glukoz, arabinoz ve galaktoz ile glikozitlenmeye meyilli bir yapıya sahiptir [39].

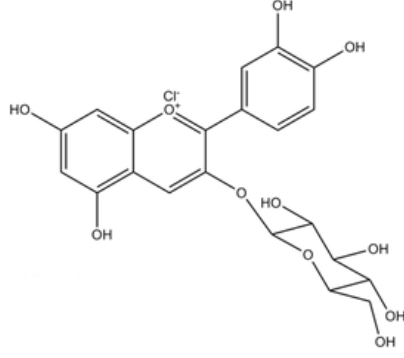
Antosiyaninler, tüm gelişmiş bitkilerde, çoğunlukla çiçeklerde ve meyvelerde fakat aynı zamanda, yapraklarda, gövdelerde ve köklerde bulunur. 500'ün üzerinde antosiyanin bitkilerden izole edilmiştir. Bunların temel yapı taşı flavilyum iyonudur.



Şekil 1.2. Flavilyum iyonunun kimyasal yapısı [39]

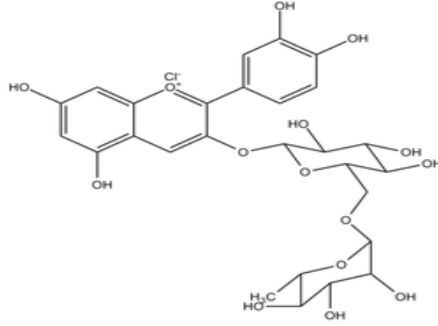
Antosiyanidinler şekerlerle birleştiğinde, antosiyaninler oluşur. Şekerler farklı yerlerden birleşebilir ve bitkilerde farklı şekerler bulunur, bu antosiyaninlerin oldukça büyük zincirler oluşturabilmesini açıklamaktadır. Örnek olarak, çileklerde ana antosiyaninler siyanidin-3-glukoside ve pelargonidin-3-glukosid, iki önemli bileşendir [40]. Antosiyaninler ayrıca kalp rahatsızlıklarına yakalanma riskini azaltır, düşük yoğunluklu lipoproteinlere (LDL) karşı doğal antioksidantlardır [41].

Siyanidin-3-glukozid $C_{21}H_{21}O_{11}Cl$ kimyasal formülüne, 484.8 g/mol molekül ağırlığına sahip olan, flavonoidlerin doğal kimyasal grubunu oluşturan antosiyaninlere dahildir. Siyanidin-3-glukozid suda iyi çözünür [41]. Antosiyaninlerin ve özellikle siyanidin glukozidlerin geniş spektrumlu biyolojik aktivitelere sahip oldukları yapılan çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir [42].



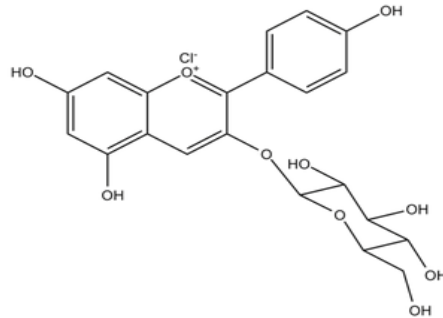
Şekil 1.3. Siyanidin-3– glukozid’in kimyasal yapısı [43]

Siyanidin-3– rutinozid, $C_{27}H_{31}O_{15}Cl$ kimyasal formülüne, 631 g/mol molekül ağırlığına sahip olan bir antosiyanindir [41]. Antosiyaninlerin en çok rastlanan üyelerinden biridir. Siyanidin-3– rutinozid, reaktif oksijen türleri ile reaksiyona girebilir ve böylece yeni serbest radikal türlerinin yayılmasını durdurabilir. Doğal bir antioksidandır [41].



Şekil 1.4. Siyanidin-3– rutinosid’in kimyasal yapısı [42]

Pelargodin-3-glukosid, $C_{21}H_{21}O_{10}Cl$ kimyasal formülüne, 468.8 g/mol molekül ağırlığına sahip olan bir antosiyanindir [44]



Şekil 1.5. Pelargodin-3-glukozid’in kimyasal yapısı [43]

1.2.Antioksidan Aktivite ve Antioksidanlar

1.2.1. Antioksidanlar

Organik maddeler ve solunum yapan organizmaların pek çok molekülü oksijen varlığında oksidasyona uğrar, bunun sonucunda ise organik maddeler ve organizma molekülleri için son derece zararlı olan serbest radikaller oluşur [45]. Serbest radikallerin neden olduğu zarardan korunmak için, insanlar ve diğer yaşayan organizmalar kompleks antioksidan savunma sistemi geliştirmişlerdir [41]. Bu savunma sisteminde farklı fonksiyonlara sahip olan çeşitli antioksidanlar önemli rol oynarlar. Böylece antioksidanlar lipitleri, karbonhidratları, proteinleri, DNA'yı ve diğer oksitlenebilir substratları oksidasyondan koruyan maddeler olarak tanımlanmaktadır [42]. Antioksidanlar enzimatik olup olmamalarına göre, vücut savunma sisteminde aldıkları görevlere göre ve vücutta sentezlenme ya da gıdalardan alınan antioksidan olmalarına göre sınıflandırılabilirler.

Enzimatik antioksidanlara örnek olarak süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz verilirken enzimatik olmayan antioksidanlara tokoferoller, C vitamini, karotenoidler örnek olarak verilebilir [43]. Çeşitli antioksidanlar farklı mekanizmalarla savunma sisteminde görev alırlar. Vücut savunma sisteminde aldıkları göreve göre dört gruba ayrılırlar.

İlk grupta koruyucu antioksidanlar yer alır, bu grup antioksidanlar serbest radikal oluşumunu önlerler. Koruyucu antioksidanlar hidrojen peroksit ve hidroperoksitlerin radikal olmayan dekompozisyonu sağlayanlar (Katalaz, Glutatyon peroksidaz, Peroksidaz, Glutatyon), çelat oluşturarak metallerin sekestrasyonunu (tutanlar) sağlayanlar (transferrin, laktoferrin, haptoglobin, hemopeksin, seruloplasmin albumin) ve aktif oksijen türlerini baskılayanlar (süperoksit dismutaz, karotenoidler, vitamin E) olmak üzere üç alt gruba sahiptir [46].

Savunma sisteminin ikinci basamağında bulunan antioksidanlar ise radikal temizleyen antioksidanlardır. Zincir oluşumunu önlemek amacıyla radikalleri temizlerler ve zincir yayılmasını önlerler. Bu gruba dahil olan antioksidanlar hidrofilik (C vitamini, ürik asit, bilirubin, albumin) ve lipofilik (E vitamini, ubiquinol, karotenoidler ve flavonoidler) olmak üzere iki gruba ayrılır [46].

Savunma sisteminin üçüncü basamağında yer alan antioksidanlar, membranı yeniden yapılandıran ve zararı onaran lipaz, proteaz, DNA onaran enzimler, transferaz gibi enzimlerdir [46].

Savunmanın son (adaptasyon) basamağını ise oksidatif stresin başladığı yere doğru zaman ve miktarda uygun antioksidanın üretildiği ve transfer edildiği antioksidanlar grubu (glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz) oluşturur. Bu adaptasyon mekanizması toplam savunma sistemi için son derece önemlidir [46].

Antioksidanlar, vücutta üretilenler (endojenöz) ve gıdalardan alınan (ekzojenöz) olmak üzere ikiye ayrılır. Glutatyon, seglutaton peroksidaz, Fe-katalaz, NADPH, ubiquinol-10 (parçalayan koenzim Q 10) ürik asit, lipolik asit, antioksidan aktiviteli hormonlar (melatonin, DHEA), albumin içeren metal bağlayan proteinler (transferin, seruloplazmin) ve Fe kompleksi bağlayan proteinler (hemopeksin, heptaglobin) endojenöz antioksidanlara örnek verilebilir. Tokoferol ve tokorienoller (vitamin E), askorbat (vitamin C), vitamin A, karotenoidler (β -karoten, likopen ve lutein) (antioksidan enzimlerin fonksiyonları için esansiyel olan diğer metabolitler) antioksidan aktiviteli fitokimyasallar, gıda antioksidanları (BHA, BHT, propil galat, TBHQ) ekzojenöz antioksidanlara örnek verilebilir [46].

Antioksidanlar serbest radikallere ihtiyaç duydukları elektronu verir. Serbest radikaller antioksidanlardan aldıkları elektronla ya stabil duruma geçerler ya da daha az kararlı türlerin olduğu reaksiyonlar düzenlenir. Antioksidanlar ise bu reaksiyonların sonunda kararlı radikallere dönüşür ve oksidasyon zincir reaksiyonlarını durdururlar [47].

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Karadutun çeşitli fizikokimyasal özellikleri üzerine yapılan çalışmada, mineral içeriği N 0.92 mg/100g, P 232 mg/100g, K 922 mg/100g, Ca 132 mg/100g, Mg 106 mg/100g, Na 59 mg/100g, Fe 4.2 mg/100g, Cu 0.4 mg/100g, Mn 4.2 mg/100g, Zn 3.2 mg/100g olarak belirlenirken, yağ asidi içeriği linoleik asit miktarının %53.57-64.41 arasında, palmitik asit miktarının %11.36-64.41 arasında, miristik asit miktarının %0.87-3.41 arasında, stearik asidin %3.22-9.14 arasında, oleik asidin % 10.66- 15.98 arasında nonadekenoik asidin %0.22-1.35 arasında olduğu belirlenmiştir, toplam fenolik madde içeriği 1943-2237 mg GAE/100 g taze meyve, C vitamin içeriği ise yaklaşık 18.7mg/100mL olarak belirlenmiştir. Meyve rengi ağırlığı 4.37g, sahip olduğu nem miktarı %72.6, toplam çözünebilir katı madde miktarı % 16.7, toplam kuru ağırlık % 27.4, pH 3.52 ve toplam asitlik %1.4 olarak belirlenmiştir [6].

Karadutun antosiyanin içeriğinin belirlenmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan bazıları, dutta bulunan antosiyanin içeriğinin ve bunların antioksidan aktivitesinin belirlenmesidir. Zheng vd.'nin [48] yaptığı çalışmada, belirlenen antosiyaninler; siyanidin 3-*O*-(6"-*O*- α -ramnopiranosil- β -d-glukopiranozid) siyanidin 3-*O*-(6"-*O*- α -ramnopiranozil- β -d-galaktopiranozid), siyanidin 3-*O*- β -d-glukopiranozid, siyanidin 3-*O*- β -d-galactopiranozid ve siyanidin 7-*O*- β -d-glukopiranoziddir. Dutun antioksidan aktivitesini belirlemek amacıyla Hassimoto vd.'lerinin [49] yaptığı çalışmada ise karadutun orta seviyelerde antioksidan aktiviteye (6.8–14.4 μ g TE/gr) sahip olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca karadutla ilgili yapılan çalışmalar arasında; Takuya vd. [50] LDL antioksidant aktivite üzerinde dut yaprağından izole edilen flavonol glikozidlerin antioksidan etkisinin belirlenmesini amaçlamışlar, dut yaprağının %60 etanol ekstraktının LDL oksidasyonunu baskıladığını ve antioksidan aktivitede etkili olan üç flavonol glikozidi kuersetin 3-(6-malonilglukozid), rutin (kuersetin 3-rutinosid) ve isokuersitrini (kuersetin 3-glukozid) LC-MS ve NMR teknikleri ile tanımlamışlardır.

Pawlowska vd. [51] karadut ve beyaz dutta bulunan flavonoidlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerini yapmayı amaçlamış, kara ve beyaz dut meyvesinin metanol ekstraktının Safadeks LH-20 kolon kromatografisi ile izolasyonunu, HPLC/ PDA/ESI-MS teknikleri ile de analizlerini yapılmış ve kuersetin-3-rutinosid, kuersetin-3-glukosid, keamfenikol-3-rutinosid ve 5-*O*-caffeoilquinic asid (klorojenik asid) tanımlanmış, ayrıca

karadutta siyanidin 3-glukozid, siyanidin 3-rutinozid, pelargodin 3-*O*-glukozid ve pelargodin 3-*O*-rutinozid olarak bilinen antosiyaninlerin bulunduğunu belirtmişlerdir.

Bitkilerin sahip olduğu antimikrobiyel aktiviterin belirlenmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Literatür taramalarında antimikrobiyel aktivitenin belirlenmesi amacıyla seçilen bitkiler iki grup altında toplanabilir, bunlar meyve, sebze ya da baharat olarak tüketilen bitkiler ve gıda olarak tüketilmeyen bitkilerdir. Gıda olarak tüketilmeyen bitkiler üzerine yapılan çalışmalar arasında; Karaman vd. [52] *Juniperus oxycedrus* L.'nın (katran ardıcı) su ve metanol ekstraktının antimikrobiyel aktivitesini belirlemek amacıyla, toplamda 143 mikroorganizmaya karşı disk difüzyon tekniği kullanarak inhibisyon zon çaplarını belirlemiş, minimum inhibisyon konsatrasyonu ile su ekstraktının hiçbir mikroorganizmaya karşı etki göstermediğini, metanol ekstraktının 57 mikroorganizma üstünde etkili olduğunu belirlemişlerdir. Penna vd. [53] enfeksiyon rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılan Arjantin yöresel bitkilerin (*Sebastiania brasiliensis*, *Sebastiania klotzschiana*, *Polygonum punctatum*, *Lithraea molleoides* ve *Myrcianthes cissplatensis*) antimikrobiyel aktiviterini belirlemek amacıyla *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans*'ın aralarında bulunduğu çeşitli mikroorganizmalara karşı, bitkilerin %50 hidroalkolik ekstraktlarını test etmiş, bu ekstraktların denemelerde kullanılan mikroorganizmalar arasında Gram pozitif bakteriler üzerinde etki gösterdiğini belirtmişlerdir, *S. brasiliensis*'ın %50 hidroalkolik ekstraktında metilgallat ve protokatekuik asit olmak üzere iki antimikrobiyel bileşik tanımlamışlardır. Changwei vd. [54] *Ficus microcarpa* L.'nın etil asetat ekstraktının antioksidan ve antibakteriyel aktivitesini Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı test etmiş ve Gram pozitif bakterilerin daha hassas olduğunu tespit etmişler, HPLC ve GC-MS teknikleri ile aktivitede etkili olduğu düşünülen 12 fenolik bileşik tanımlamışlardır. Perumal Samy vd. [55] tıbbi değerlikleri nedeni ile halk arasında yaygın kullanılan 34 bitkinin metanol ekstraktının antibakteriyel etkisini *E. coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus bulgaris* ve *Pseudomonas aerogenes*'e karşı test etmiş ve 16 bitkinin test edilen bakterilere karşı önemli seviyede antimikrobiyel aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Benzer amaçlarla gıda olarak kullanılan bitkilerden özellikle baharatlar üzerine yapılan çalışmalar arasında; Rota vd. [56] farklı kekik türlerinin (*Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* ve *Thymus hyemalis*) esansiyel yağ ekstraktlarının kimyasal kompozisyonunun ve antimikrobiyel aktivitesinin belirlemeyi amaçlamış, bitki ekstraktları *Salmonella typhimurium*, *S. enteridis*, *E. coli*, *S. aureus*'un aralarında bulunduğu çeşitli mikroorganizmalara karşı test etmiş, Gram pozitif bakterilerin daha

hassas olduklarını tespit etmişlerdir. İşcan vd. [57] *Mentha piperita*'nın (İngiliz nanesi) 21 insan ve bitki patojen mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyel etkisini test etmiş, bitki patojenlerinin etkin bir biçimde inhibe oldukları belirlenirken, insan patojenlerine karşı etkisi olmadığı belirtmişlerdir. GC ve GC/MS teknikleri kullanılarak antimikrobiyel aktivitede etkili olan bileşiğin mentol olduğu tespit etmişlerdir. Goñi vd. [58] tarçın ve karanfil yağının antimikrobiyal etkisinin Gram negatif (*E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella choleraesuis*) ve Gram pozitif bakterilere (*S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *B. cereus* and *Enterococcus faecalis*) karşı test etmek amacıyla yaptıkları çalışmada, *L. monocytogenes*, *B. cereus* ve *Y. enterocolitica*'nın test edilen konsantrasyonda etkin bir şekilde inhibe olduğu belirlemiş, antimikrobiyel aktivitede etkili olan bileşiğin tanımlaması yapılmamıştır. Wilson vd. [59] iki farklı zerdeçal bitkisinin petrol eteri, hekzan, kloroform ve aseton ekstraktlarının antimikrobiyel etkisini 8 bakteri, 2 mayaya karşı test etmiş, aseton ekstraktının özellikle Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Meyve ve sebze olarak tüketilen bitkiler üzerine de benzer çalışmalar yapılmıştır. Jayaprakasha vd. [60] üzüm çekirdeğinin antimikrobiyel ve antioksidan aktivitesin belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, üzüm çekirdeği ekstraktı *B. cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginos*'aya karşı test edilmiş, Gram pozitif bakterilerin Gram negatif bakterilere kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda inhibe oldukları belirlenmiştir. Benkeblia vd. [61] çeşitli soğan (kırmızı, yeşil ve beyaz) ve sarımsak türlerinin esansiyel yağlarının antimikrobiyel aktivitelerini belirlemek amacıyla bir araştırma yapmış, bu çalışmada *S. aureus* ve *Salmonella enteridis*'in aralarında bulunduğu çeşitli mikroorganizmalar kullanılmış, *S. aureus*'un *S. enteridis*'e göre daha az hassas olduğu, test edilen konsantrasyonda *S. enteridis*'in tamamen inhibe olduğunu belirlemişlerdir. Demirci vd. [62] Balıkotu'nun (*Phlomis*) gıda patojenlerine karşı antimikrobiyel aktivitesini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *B. cereus* 'un aralarında bulunduğu mikroorganizmalar kullanılmıştır. Balıkotunun antimikrobiyel aktivitesinin Gram pozitif bakterilerin inhibisyonunda daha etkili olduğu belirlenmiştir. Eloff [63] *Marula* meyvesinin kök ve yapraklarının aseton ekstraktının antibakteriyel etkisini *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *E. Faecalis*'e karşı test etmiş, tüm ekstraktların test edilen mikroorganizmalar üzerinde aktiviteye sahip olduğunu belirlemiştir. Kırbaslar vd. [64] limon, greyfurt, bergamot, acı portakal, tatlı portakal ve mandalin kabuklarından elde ettikleri esansiyel yağların antimikrobiyel aktivitesini 9 bakteri ve 6 mayaya karşı test etmiş, narenciye kabuk

yağlarının test edilen mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyel aktiviteye sahip olduklarını belirlemiş, limon ve bergamot kabuk yağlarının diğer narenciyelere kabuk yağlarına kıyasla daha yüksek aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan karadut (*Morus nigra*) Malatya Meyvecilik Araştırma Enstitüsü'nden toplanmış ve laboratuara getirilmiştir. Karadutlar kullanılıncaya kadar -20 °C 'de muhafaza edilmiştir.

3.1.1. Kullanılan kimyasallar ve mikroorganizmalar

Kullanılan bütün kimyasallar “Sigma” firmasından temin edilmiştir. Farklı firmalardan temin edilen kimyasalların satın alındığı firma parantez içerisinde belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında; metanol, etanol, DPPH, etil asetat, hekzan, kloroform, DMSO, antibiyotik standartları olarak ampisilin, metisilin ve gentamisin kullanılmıştır. Ayrıca antimikrobiyel aktivitenin belirlenmesinde çoğu patojen, hijyen ve sanitasyon indikatörü olan, solunum ve gastrointestinal alanda rastlanma sıklığı dikkate alınarak mikroorganizmalar seçilmiş, seçilen mikroorganizmaların bir kısmı setifikalı olup bir kısmı İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. Hastane izolatlarının hızla direnç kazanmaları nedeni ile antibakteriyel denemelerde karadutun bu mikroorganizmalar üzerindeki etkisi test edilmek istenmiştir. Mikroorganizmaların sağlandıkları yerler Çizelge 3.1.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Mikroorganizmalar ve sağlandıkları yerler

Mikroorganizma	Sağlandı yer
<i>Staphylococcus aureus</i>	Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi (RSHM) No: 1021/06008 Amerikan kültür koleksiyonu (ATCC)
<i>Staphylococcus hominis</i>	RSHM No: 869, (ATCC) No: 27844
<i>Staphylococcus warneri</i>	(ATCC) No:27836, RSHM No: 95052
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	RSHM No: 95
<i>MRSA</i> (Metisilin Drençli <i>Staphylococcus aureus</i>)	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı (ML)*
<i>Bacillus cereus</i>	RSHM:869
<i>Enterococcus faecalis</i>	ML
<i>Streptococcus spp</i>	ML
<i>Enterobacter spp</i>	ML
<i>Salmonella spp</i>	ML
<i>Shigella flexneri</i>	RSHM: 184
<i>Klebsiella spp</i>	ML
<i>Escherichia coli</i>	ML
Maya <i>Candida albicans</i>	RSHM:04055, ATCC No: 90028

* Mikrobiyoloji laboratuvarından alınan bakteriler sertifikalı izolat değildir.

Bakteriler Nütrient Agar'da (Oxoid, Hampshire, İngiltere), maya ise Sabouraud Dextrose Agar'da (Merck, Darmstadt, Almanya) +4°C'de muhafaza edilmiştir. Test edilecek mikroorganizmaların aktiveleştirilmesinde besiyeri olarak Brain Heart Infusion (BHI) Broth (Merck, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır. Analiz yapılmadan bir gün önce kültürler BHI brothlara ekilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan kültürler 37°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından antimikrobiyel denemelerde kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan alet ekipman ve cihazlar

UV-VIS spektrofotometre, HPLC-MS (yüksek performanslı sıvı kromatografisi-Kütle Spektrometresi) sistemi, su banyosu, vorteks karıştırıcı, parçalayıcı, su soğutmalı ve normal santrifüj cihazı, etüv, kuru hava sterilizatörü, otoklav, otomatik pipet seti tez kapsamında kullanılan ekipman ve düzeneklerdir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örnek hazırlama

Çalışmada, kullanılacak karadut örnekleri dondurarak kurutulmuştur. Laboratuara getirilen karadut waring blender’da (Şimşek Labortechnik, Türkiye) parçalanmış, ince gözenekli bezlerden süzölmüş, alüminyum tepsilere dökölmüştür. Hazırlanan tepsiler – 20°C’de 1 gece dondurulmuş freeze–drier cihazında (Armfield, İngiltere) 5 mmHg basınçta –50°C şartlarında kurutulmuştur. Bu kurutma işlemi yaklaşık 15–18 saatte tamamlanmıştır. Tamamen kuruyan karadut tozu örnekleri kapaklı kaplar içerisinde buzdolabında –10°C’de saklanmıştır.

3.3. Analiz Metotları

3.3.1. Antimikrobiyel kapasite testleri

3.3.1.1. Disk difüzyon yöntemi

Karadutun antimikrobiyel aktiviteye sahip olup olmadığının anlaşılması için yapılan testlerde disk difüzyon yöntemi [65] kullanılmıştır. Disk difüzyon tekniğı örneğın mikroorganizma üremesini inhibe ettiğini açıklamak için kullanılmaktadır. Bu teknik bakterilerin üremesini inhibe eden ilacın etkisinin ne kadar olduğunu ölçölmesinde ve standartlarla karşılaştırılmasında da kullanılmaktadır [66]. Antimikrobiyel etki taramasına, steril petri kaplarına bakteriler için Müler Hinton agar, (Merck, Darmstadt, Almanya), maya için Potato Dextrose agar (Merck, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır. Döküm yapılan petri kapları yüzeylerinin kuruması ve olası bir kontaminasyonun belirlenmesi için 2 gün oda sıcaklığında ters çevrili bir şekilde bekletilmiştir. Dondurularak kurutulmuş kara dut tozu steril kap ve steril saf su kullanılarak aseptik koşullar altında son konsantrasyon 100 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan karadut örneğı önceden steril edilen filtre kağıtlarına (Whatman No :1 , 5 mm çapında) 15 µL’lik miktarlarda emdirilmiştir. Katılaşıan agar üzerine analizden bir gece öncesinden ekimi yapılip aktifleştirilen mikroorganizma kültürlerinden 100 µL alınmış, yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Bakteri ve maya ekiminin yapıldığı petri kutularına bitki özütü emdirilen diskler hafifçe bastırılarak yerleştirilmiş, 2 saat ön dinlendirme

yapıldıktan sonra bakteri ekimi yapılan petri kapları 37°C’de 24 saat, maya ekimi yapılan petri kapları ise 25°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu deney her bir mikroorganizma için tekrarlanmış, pozitif kontrol olarak ampisilin ve gentamisin diskler kullanılmıştır.

3.3.1.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC), Broth Dilüsyon Yöntemi

MIC, mikroorganizma büyümesinin görülmediği en düşük bitki ekstraktı miktarı olarak tanımlanır [67]. Karadutun MIC’ nu Andrews’e [67] göre ve deney şartlarının gerektirdiği bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir.

Disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılan deneylerde Gram negatif bakterilere karşı, *Shigella flexneri* hariç, karadutun antibakteriyel etkisinin oldukça zayıf olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle MIC’nu belirlemede kullanılan test organizmaları aşağıda belirtilmiştir.

<i>Staphylococcus aureus</i>	(RSHM No: 1021/06008),
<i>Staphylococcus warneri</i>	(RSHM No: 95052, ATCC 27836),
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(RSHM No: 95),
<i>Staphylococcus hominis</i>	(RSHM No: 95055, ATCC 27844),
<i>Bacillus cereus</i>	(RSHM No: 863),
<i>Shigella flexneri</i>	(RSHM No: 184),
<i>Candida albicans</i>	(RSHM No: 04055, ATCC 90028)

Disk difüzyon tekniğinde de anlatıldığı gibi +4°C’de saklanan mikroorganizma kültürleri analizden bir gece önce bakteriler için BHI Broth, maya için Saborout Dextrose Broth kullanılarak aktiveleştirilmiştir. MIC’nun belirlenmesinde Broth–dilüsyon metodu kullanılmıştır. Broth–dilüsyon metodunda MH Broth kullanılmıştır. Hazırlanan besiyeri 2.9 mL’lik hacimlerde tüplere dağıtılmış, tüpler 121°C’ de 15 dakika otoklavda tutularak steril edilmiştir.

Dondurularak kurutulan karadut tozundan dimetil sülfoksit (DMSO) ile steril kaplar kullanılarak aseptik koşullar altında stok solüsyon (2048 mg/mL) hazırlanmıştır. Bu stok solüsyondan steril MH Broth kullanarak iki kat seri dilüsyonlar hazırlanmıştır ve dilüsyon oranları Çizelge 3.2.’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Antimikrobiyel aktivite belirlemelerinde kullanılan ekstrakt konsantrasyonları

2048 mg/mL DMSO

Stok solüsyon

A solüsyonu (4 mL)

B solüsyonu

3 mL steril MH broth

Steril MH broth

1 mL Stok Solüsyon

A solüsyonu	B solüsyonu	Tüpteki son konsantrasyon
3.88 µL	996.12 µL	0.5 mg/mL
7.76 µL	992.24 µL	1 mg/mL
15.52 µL	984.48 µL	2 mg/mL
31.25 µL	968.75 µL	4 mg/mL
62.5 µL	937.5 µL	8 mg/mL
125 µL	875 µL	16 mg/mL
250 µL	750 µL	32 mg/mL
500 µL	500 µL	64 mg/mL
1000 µL	–	128 mg/mL

2.9 mL MH bulunduran tüplere bir gece öncesinden aktiveleştirilen mikroorganizma kültürlerinden 100 µL ekim yapılmış ve son konsantrasyon 0.5 mg/mL'den başlayarak 128 mg/mL'ye kadar hazırlanan bitki ekstraktlarından gerekli miktarda tüplere ilave edildikten sonra tüpler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda bakteriyel büyüme indikatörü olarak p-iodonitrotetrazolium, 0.2 mg/mL'lik konsantrasyondan 40 µL solüsyonu her bir tüpe ilave edilmiş ve 37°C'de 30 dakika inkübasyonun ardından tüplerde gerçekleşen renk değişimleri izlenmiştir. Renksiz olan tetrazolium tuzları organizmanın biyolojik aktivitesi sonucunda parçalanmakta ve kırmızı renkli ürün, formazan, açığa çıkmaktadır. Böylece mikroorganizma gelişmesinin olduğu tüpler kırmızı, gelişmenin olmadığı tüpler renksiz (bitkinin kendi renginde) görülmektedir [68].

Deneyde pozitif kontrol olarak gentamisin (100 µg/mL'den 1.5 µg/mL'ye) kullanılmıştır. Gentamisin konsantrasyonları aşağıdaki şekilde belirlenmiştir;

Pozitif kontrol olan antibakteriyelden 5600 µg tartılmış üzerine 14 mL % 0.8' lik Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) ilave edilmiştir. 100 µL mikroorganizma bulunduran 3 mL MH broth'a 1 mL gentamisin solüsyonundan ilave edilerek son konsantrasyonun 100 µg/mL gentamisin olması sağlanmıştır.

Dilüsyon yapmak amacıyla, 5600 µg/14 mL' lik konsantrasyondan 7 mL alınmış ve 7 mL steril FTS ile 14 mL'ye tamamlanmış ve hazırlanan bu stoktan 100 µL mikroorganizma bulunduran 3 mL MH broth'a 1 mL ekim yapılmıştır. Böylece son konsantrasyonun 50 µg/mL gentamisin olması sağlanmıştır.

Belirtilen şekilde seri dilüsyonlar yapılmış, son konsantrasyon 100, 50, 25, 12.5, 6.2, 3.1 ve 1.5 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır.

Negatif kontrol olarak bitki ekstraktı bulundurmeyen (sadece mikroorganizma bulunduran) tüpler kullanılmıştır.

3.3.1.3. Agar ekstrakt yöntemi

Agar ekstrakt yöntemi Sahm ve arkadaşlarının [69] çalıştığı yöntemle göre deney şartlarının gerektirdiği değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Karadutun antimikrobiyel aktivitesinin ısı ile kaybolmadığı yapılan ön çalışmalar ile belirlenmiştir. MH Agar belirtilen şekilde hazırlanmıştır. Kara dut tozu son konsantrasyon 512 mg/mL'den 0.5 mg/mL olacak şekilde gerekli miktarda tartılmış ve hazırlanan MH Agara eklenmiştir. 121°C'de 15 dakika otoklav da steril edilen karadut bulunduran besiyerleri 45°C'ye soğutulmuş ve steril petri plakalarına dökülmüştür. Böylece son konsantrasyon 512 mg/mL'den başlayarak 0.5 mg/mL olacak şekilde iki kat seri dut dilüsyonları içeren besiyerleri elde edilmiştir. Agar yüzeylerinin kurumaları beklendikten sonra, yaklaşık iki gün, bir gece öncesinden aktiveleştirilen mikroorganizma kültürlerinden 100 µL alınarak yayma yöntemi ile hazırlanan besiyerlerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petri plakası 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Negatif kontrol olarak içinde dut bulundurmeyen MH Agar kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda üremenin görülmediği en düşük dut miktarının bulunduğu petri plakası tespit edilmiştir.

3.4. Antimikrobiyel Aktiviteye Sahip Olan Bileşiklerin İzolasyonu

3.4.1. Bitki ekstraktı hazırlaması

Dondurarak kurutulmuş karadut tozunun ön çalışmalar esnasında metanol, etanol, etilasetat, hekzan–kloroform (%50–50), solventleri ile ayrı ayrı ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstraksiyon da karadut tozu (20 gr) belirtilen solventler ile (200 mL) çalkalayıcısı bulunan su banyosunda 24 saat, 24°C’de bekletilmiş, sürenin sonunda 4000 rpm’de 10 dk (MSE MISTRAL 1000, İngiltere) santrifüj edilen örnekler filtre edilmiştir (whatman no: 1). Elde edilen örneklerin solventi rotary evaporatörde 40°C’de (BUCHI, İsviçre) uzaklaştırılmıştır. Metanol ekstraktı 13.471 gr, etanol ekstraktı 6.940 gr, etilasetat ekstraktı 2.212 gr, hekzan kloroform ekstraktı 0.060 gr olarak belirlenmiştir. Elde edilen ekstraktlar belirtilen şekilde hazırlanan MH Agara katılmış 121°C’de 15 dakika otoklav edildikten sonra 45°C’ye soğutulmuş, steril petri plakalarına dökülmüştür. Hazırlanan besiyerlerinin yüzeylerinin kurumalarına izin verilmesinin ardından aktiveleştirilen mikroorganizma kültüründen 100 µL alınmış yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. 37°C’de 24 saat inkübasyonun ardından metanol ekstraktının diğer solvent ekstraktlarına kıyasla daha güçlü bir aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle daha ileri analizlerde çözücü olarak metanol kullanılmıştır.

3.4.2. Karadut metanol ekstraktının kolon kromatografisi ile fraksiyonlarına ayrılması

Antibakteriyel aktivitesi denenen karadutun sahip olduğu etken maddelerinin izolasyonu kolon kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir.

Deney için kara dutun metanol ekstraktı elde edilmiştir. Bunun için dondurarak kurutulan kara dut tozundan 20 gr tartılmış, 200 mL metanol ile 24°C’ye ayarlı su banyosunda 24 saat bekletilmiş, 4000 rpm’de 10 dakika santrifüjün ardından filtre edilmiştir.

Kolon kromatografisi için cam kolona (5 cm x 40 cm) 200 mL metanolde bulamaç haline getirilen 85 gr silika jel (70–230 mesh) kullanılmıştır. Kolonda bulunan silika jelin metanolle doyurulması sağlandıktan sonra hazırlanan metanol ekstraktı kolona verilmiş ve kolonda yürümesi beklenmiştir. Elüsyon sıvısı olarak metanol kullanılmıştır. Metanolle elüe edilen ve kolonda ayrılan ekstrakt 10 mL hacimlerde 15 fraksiyona ayrılarak toplanmış, fraksiyonlarda bulunan çözücüler rotary evaporatorde vakum altında

uzaklaştırılmıştır. Kalan çözücünün tamamen uzaklaşması amacıyla, fraksiyonların bulunduğu balonlar 80 °C’de 1 saat tutulmuş, desikatöre alınıp 30 dakika bekletildikten sonra tartılarak elde edilen ekstrakt miktarı belirlenmiştir.

3.5. Fraksiyonların Antimikrobiyel Kapasitelerinin İncelenmesi

Elde edilen 15 fraksiyonun solventleri 40 °C de rotary evaporatör kullanarak uzaklaştırılmış, kalıntılar steril saf su kullanarak (10 mL) çözülmüş ve steril tüplere alınmıştır. 15 fraksiyonun antimikrobiyel aktivitesini tespit etmek için 2.9 mL steril MH Broth bulunduran tüplere 100 µL aktifleştirilen *S. aureus* kültürünün ilavesinin ardından karadut fraksiyonlarından 1000 µL, 500 µL ve 250 µL tüplere ilave edilmiştir. 37 °C’de 24 saat inkübasyonun ardından p–iodonitrotetrazolium (INT) indikatöründen, 0.2 mg/mL, 40 µL ilave edilmiş 37 °C’de 30 dakika inkübasyonun ardından renk değişimi takip edilmiştir.

3.6. Fraksiyonların Antioksidan Kapasitelerinin İncelenmesi

3.5.1. Radikal süpürme gücünün belirlenmesi (DPPH)

DPPH testi Brand–Williams vd. [70] çalıştığı yöntemle göre deney şartlarının gerektirdiği değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. DPPH çözeltisi % 70’lik metanolde hazırlanmış ve çözeltinin absorbanşı 520 nm’de 0.700 ± 0.20 olacak şekilde seyreltilmiştir.

DPPH yöntemi ile yapılan analizde karadut metanol ekstraktının kolon kromatografisinden elde edilen 15 fraksiyonu su ve metanol (50:50) kullanılarak çözülmüş belirli bir hacme tamamlanarak kullanılmıştır. Gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra her bir örnekten 100 µL deney tüplerine alınmış ve 2.4 mL DPPH eklenmiştir (25 mg/L metanolde hazırlanmış). Karanlıkta 30 dakika’lık inkübasyon süresi sonunda örneklerin absorbanşı metanole karşı kuvarts küvetlerde 520 nm’de çift ışın yollu UV–Vis spektrofotometrede (Shimadzu 1700) metanole karşı okunmuştur. Referans bileşik olarak Trolox kullanılmış ve örneklerin antioksidan kapasiteleri Trolox cinsinden ifade edilmiştir.

Bu amaçla Trolox un 100 mg/mL stok çözeltisi metanol içinde hazırlanmıştır. Daha sonra bu stoklardan alınan 100, 200, 300, 400, 500 µL çözeltiler metanol ile 10 mL’ye tamamlanmıştır. Bu çözeltilerden alınan 100’er µL üzerine 2.5 mL DPPH çözeltisi konulmuş ve aynen örneklerde olduğu gibi 30 dakika inkübasyonun ardından çift ışın

yollu UV–Vis spektrofotometrede ölçüm alınmıştır. Elde edilen absorbans değerlerine karşı deney derişimindeki Trolox miktarı grafiğe geçirilmiş ve standart çalışma eğrisi elde edilmiştir (EK 1). Daha sonra gerekli seyreltme faktörleri ile çarpılarak antioksidan kapasite, gram yağda µg Trolox eşdeğeri olarak hesaplanmıştır.

3.7. Seçilen Fraksiyonların Kromatografik Analizi

Kromatografik analizler HPLC-MS sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HPLC sistemi ve MS dedektörünün çalışma koşulları aşağıda belirtilmiştir.

3.7.1. HPLC- MS analizleri

Kolon kromatografisi ile elde edilen 8. fraksiyon ve karadut metanol ekstraktı 0.45 µm filtrelerden geçirilerek aşağıda tanımlanan koşullarda analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.7.1.1. HPLC analiz koşulları

HPLC: Agilent Technologies 1200 seri (Binary pompa, vakum degazer, autosampler, diyod array dedektör)

Kolon: Eclipse XDB–C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm)

Mobil Faz: Aşağıda belirtilen mobil faz kullanılmıştır.

Solvent A: Formik asidin suda ki % 0.1’lik konsantrasyonu

Solvent B: Formik asidin asetonyitrilde ki % 0.1’lik konsantrasyonu

Zaman	Solvent A(%)	Solvent B(%)
0	8	92
50	40	60

Akış Hızı : 0.4 mL/dakika

Dedektör: UV 254 nm, 520 nm, 330 nm, 515 nm

Enjeksiyon Miktarı: 5µL

3.7.1.2. MS Analiz koşulları

MS Cihazı :Agilent 1200 VL kütle spektrometresi (MM–ES+APLC)

MS Modu: SIM

MS Polaritesi: Pozitif

MS İyonizasyonu :

Sım İyonları : m/z 433 (M^+H) , m/z 449 (M^+H) , m/z 579 (M^+H), m/z 595 (M^+H).

Fragmentor Voltajı :50 volt

Gaz Sıcaklığı: 350 °C

Buharlaştırıcı Sıcaklığı: 200 °C

Nebülizör Basıncı: 60 psi

Kapiler Voltaj: 2000 volt

Akış Hızı : 0.5 mL/dakika

Enjeksiyon Miktarı : 5 µL

Solvent A: Asetonitril

Solvent B: Formik asit + Su

Zaman	Solvent A(%)	Solvent B(%)
0	5	95
55	50	50

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Antimikrobiyel Aktivite

Karadutun antimikrobiyel etkisi bölüm 3.1.1.'de tanımlanan mikroorganizmalara karşı bölüm 3.3.1.'de belirtilen yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.

4.1.1. Antimikrobiyel etkinin taranması

Karadutun 100 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan solüsyonunun Gram pozitif, Gram negatif ve mayaya karşı antimikrobiyel etkisi Çizelge 4.1.'de ve disklerin görüntüsü Ek 2.'de verilmiştir. Karadutun test edilen konsantrasyonda *S. aureus*'un 11 mm, *S. hominis*'in 14 mm, *S. warneri*'nin 13 mm, *S. epidermidis*'in 10 mm *B. cereus*'un 15 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenirken, denemelerde kullanılan diğer mikroorganizmaların inhibisyon zonu oluşturmadıkları tespit edilmiştir. Böylece disk difüzyon tekniği ile karadutun Gram pozitif bakterilere karşı, *E. feacalis* ve *Streptococcus* spp hariç, antibakteriyel etkisi saptanırken, Gram negatif bakterilere ve *Candida albicans*'a karşı denenen konsantrasyonda antimikrobiyel etkinin olmadığı belirlenmiştir. Disk difüzyon tekniğinde ampisilin ve gentamisin standart antimikrobiyel diskler kullanılmış, bu antibiyotiklerin inhibisyon zon çapları Şekil 1.4'te belirtilmiştir.

Elde edilen bulgular göz önüne alındığında karadutun test edilen mikroorganizmalar arasında Gram pozitif bakteriler üzerinde Gram negatiflere kıyasla daha etkili olduğu görülmüştür. Bu durumun nedenleri Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin hücre duvar yapıları arasındaki farklılıklar olduğu düşünülmektedir. Gram pozitif bakteriler Gram negatif bakterilerle aynı yapıda peptidoglikan tabakasına sahip olmalarına rağmen bu tabakanın kalınlığı farklılık göstermektedir. Gram pozitif bakteriler daha kalın peptidoglikan tabakasına sahiptirler. Gram negatif bakterilerde lipopolisakkarit (LPS) tabakası bulunmaktadır ve bu tabaka hidrofobik karakterlidir, polar bileşiklerin bu tabakadar geçmesi oldukça zordur. LPS tabakasının Gram pozitiflerde bulunmaması Gram pozitif bakterilerin antimikrobiyel maddelere karşı duyarlı olmasının nedenlerinden biridir. [71–73]. Ayrıca, Gram negatif bakterilerde periplazmik boşluk bulunmaktadır, periplazmik boşlukta yer alan hidrolitik enzimler antibakteriyel maddeleri parçalama özelliğine sahiptir [74]. Dolayısıyla Gram negatif bakteriler Gram pozitif bakterilere kıyasla antibakteriyel maddelere daha dirençlidir. Ekstraksiyon aşamasında yapılan ön

denemelerde karadut çeşitli polar (metanol, etanol, etilasetat) ve apolar (hekzan, kloroform) çözücüler ile ekstrakte edilmiş, elde edilen ekstraktlar mikrobiyel denemelere tabi tutulmuştur. Mikrobiyel denemelerde karadutun farklı solventlerle elde edilen ekstraktları *S.aureus*'a karşı test edilmiş, özellikle metanol ekstraktının *S.aureus*' un gelişimini etkin bir biçimde inhibe ettiği belirlenirken, etanol ekstraktında inhibisyon seviyesinin metanol ekstraktına göre çok daha düşük olduğu, etilasetat, hekzan ve kloroform ekstraktlarında *S.aureus*' un gelişiminin inhibe edilemediği belirlenmiştir. Böylece, karadutun apolar solventlere göre polar solventlerle daha iyi ekstrakte edildiği belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, dut içerisinde bulunan polar bileşiklerin antimikrobiyel aktivitede rol oynadığı düşünülmektedir.

Antimikrobiyel aktivitenin taranmasında elde edilen sonuçlarda karadutun Gram negatiflere kıyasla Gram pozitif bakterilere karşı etkili olması literatür bilgileri dikkate alındığında kabul edilebilir bir durumdur. Grierson vd. [75] Güney Afrika da ağız yaralarının tedavisinde kullanılan yöresel bitkilerin antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler kullanılmış, Gram pozitif bakterilerin (*B. cereus*, *S. aureus*) Gram negatiflere (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*) kıyasla daha hassas oldukları, Gram negatif bakteriler üzerinde bitkilerin etkili olmadığını tespit etmişlerdir. Greisiele vd.'nin [76] Piper regnelli bitkisi neolignanlarının ve ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesinin tespiti için yaptıkları çalışmada kullanılan Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerden Gram pozitif bakterilerin, (*S. aureus*, *B. subtilis*) Gram negatiflere (*E. coli*, *P. aeruginosa*) kıyasla daha hassas olduklarını tespit etmişlerdir. Alzoreky vd.'nin [77] Asya da yaygın tüketilen yenilebilir bitki ekstraktlarının antibakteriyel aktivitelerinin taranması konulu çalışmasında test edilen bitkiler ve bakteriler değerlendirildiğinde benzer şekilde, Gram pozitif bakterilerin (*S. aureus*, *B. cereus*) Gram negatif bakterilere (*E. coli*) kıyasla daha hassas oldukları belirlenmiştir. Holetz vd.'nin [78] Brezilya'da tıbbi değeri olan 13 bitki ekstarktının antimikrobiyel etkisini *P.aeruginosa*, *B. Subtilis*, *S. aureus*, *C. albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* ve *Candida tropicalis*' e karşı test etmiş, toplamda 10 bitkide değişen oranlarda antibakteriyel aktivitenin bulunduğunu ve test edilen mikroorganizmalar arasında Gram pozitif bakterilerin bitki ekstraktlarına karşı daha hassas olduğunu belirlemişlerdir.

Çizelge 4.1. 100 mg/mL kara dut konsantrasyonunun mikroorganizma gelişimine etkisi

Mikroorganizma	Kara dut	Ampisilin	Gentamisin
Gram Pozitif Bakteriler	<i>Staphylococcus aureus</i>	11	21
	<i>Staphylococcus hominis</i>	14	23
	<i>Staphylococcus warneri</i>	13	32
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	26
	MRSA (Metisilin Drençli <i>Staphylococcus aureus</i>)	–	–
	<i>Bacillus cereus</i>	15	22
	<i>Enterococcus faecalis</i>	–	29
	<i>Streptococcus spp</i>	–	35
	<i>Enterobacter spp</i>	–	–
	<i>Salmonella spp</i>	–	15
Gram Negatif Bakteriler	<i>Shigella flexneri</i>	–	15
	<i>Klebsiella spp</i>	–	–
	<i>Escherichia coli</i>	–	–
Maya	<i>Candida albicans</i>	–	–

M: *Morus nigra* (Karadut)

A: Ampisilin

G: Gentamisin

İnhibisyon zon çapı : mm

4.1.2. Antimikrobiyel etkinin belirlenmesi (MIC)

Karadutun farklı konsantrasyonlarda hazırlanan solüsyonunun disk difüzyon denemelerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda karar verilen Gram pozitif bakteriler, *Shigella flexneri* ve *Candida albicans*'a karşı etkisi broth dilüsyon ve agar ekstrakt yöntemleri kullanılarak test edilmiş, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2.'de belirtilmiştir. Broth dilüsyon yöntemi değerlendirme resimleri Ek 3.'de verilmiştir, INT indikatörü değerlendirmede kullanılmış, sıvı besiyeri ortamında görülen kırmızı halka mikroorganizmanın canlı olduğunu, test edilen bitkiden etkilenmediğini ifade etmektedir. Özellikle *C.albicas* için yapılan testlerde karadut konsantrasyonunun oldukça yüksek olması nedeni ile karadut sıvı besiyeri ortamını indikatörün renginde boyamış, sıvı besiyeri ortamında MIC'a karar vermek mümkün olmamıştır.Bu nedenle Agar ekstrakt yöntemi kullanılmıştır. Agar ekstrakt yöntemi değerlendirme resimleri Ek 4.'de verilmiştir.

Bu sonuçlarla, karadutun Gram pozitif bakterilere ve *S.flexneri*'ye etkisinin *C.albicans*'a kıyasla daha yüksek seviyelerde olduğu belirlenmiştir. Karadutun *B. cereus* ve *S. hominis*'in gelişmelerini inhibe etmek için 16 mg/mL, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. warneri* ve *S. flexneri*'nin gelişimlerini inhibe etmek için 32 mg/mL konsantrasyonu yeterli olurken, *C. albicans*'in gelişiminin engellenmesi ancak 512 mg/mL lık konsantrasyon ile mümkün olmuştur.

Elde edilen bulgulara göre, Gram pozitif bakterilerden *B. cereus* ve *S. hominis* karaduta karşı en hassas bakteriler olarak belirlenirken, Gram negatif bir bakteri olmasına rağmen *S. flexneri*'nin hassasiyetlik derecesinin *S. aureus* *S. epidermidis*, *S. warneri* gibi Gram pozitif bakterilerle aynı seviyede olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç bize karadutun bakteriyel hedefinin yalnızca hücre duvarı olmadığını, nükleik asit sentezi, ribozom fonksiyonu ya da metabolik fonksiyon gibi farklı hedeflere yönelme ihtimalinin bulunduğunu düşündürmektedir.

C. albicans mücadele etmesi oldukça zor olan patojen bir mikroorganizmadır. Halk arasında pamukçuk olarak bilinen, özellikle bebeklerde rastlanan aftların etkeni *Candida albicans*'dır [79]. Karadutun antifungal etkisi *Candida albicans*'a karşı denenmiş oldukça yüksek, 512 mg/mL, konsantrasyonda *Candida albicans*'ın gelişimi engellenmiştir. Karadutun yüksek konsantrasyonda da olsa *Candida albicans*'a etki etmesi, halk arasında pamukçuğun tedavisinde karadutun yaygın kullanımının nedenlerinden biridir. *C. albicans*'ın inhibisyonunun deneyde kullanılan diğer mikroorganizmalara kıyasla daha yüksek dut konsantrasyonunda sağlanmıştır, bu durumun muhtemel nedenleri arasında, *C. albicans*'ın ökaryotik bir mikroorganizma olması, prokaryotik mikroorganizmalardan farklı fizyolojik yapılara sahip olmasının yer aldığı düşünülmektedir. Karadutun antifungal etkisi dut bileşimindeki belirlenen bileşenlerden ve/ veya bulunan bileşenlerin ortak etkisi sonucunda oluşabilir.

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda karadutun mikroorganizma gelişimine etkisi

Kara dut konsantrasyonu (mg/mL)	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5
Gram Pozitif ve Negatif Bakteriler	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus hominis</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus warneri</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	<i>Shigella flexneri</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Maya	<i>Candida albicans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+): Etkisi var

(-): Etkisi yok

4.2. Aktif Bileşiklerin İzolasyonu

Aktif bileşiklerin izolasyonunda kolon dolgu maddesi olarak silika jel kullanılmıştır. Benzer çalışmalarda dolgu maddesi olarak polar – apolar özellikleri temelinde bileşikleri ayıran silika jel tercih edilmiştir [82,83]. Karadut metanol ekstraktı silika jelin kolon dolgu maddesi olarak kullanıldığı kolon kromatografisi ile 15 fraksiyona ayrılmış, kolon ve fraksiyon resimleri Ek 5.'de verilmiştir. Her bir fraksiyonda bulunan kuru madde miktarı tespit edilmiştir. Buna göre, 6. (1.61.68 gr) ve 7. (1.5456 gr) fraksiyonların kuru madde miktarının en yüksek seviyede olduğu, 1. (0.3439 gr), 14. (0.3732 gr) ve 15. (0.2870 gr) fraksiyonların kuru madde miktarlarının en düşük seviyede olduğu belirlenmiştir. 15 fraksiyonun antioksidan ve antimikrobiyel aktiviteleri belirlenmiştir.

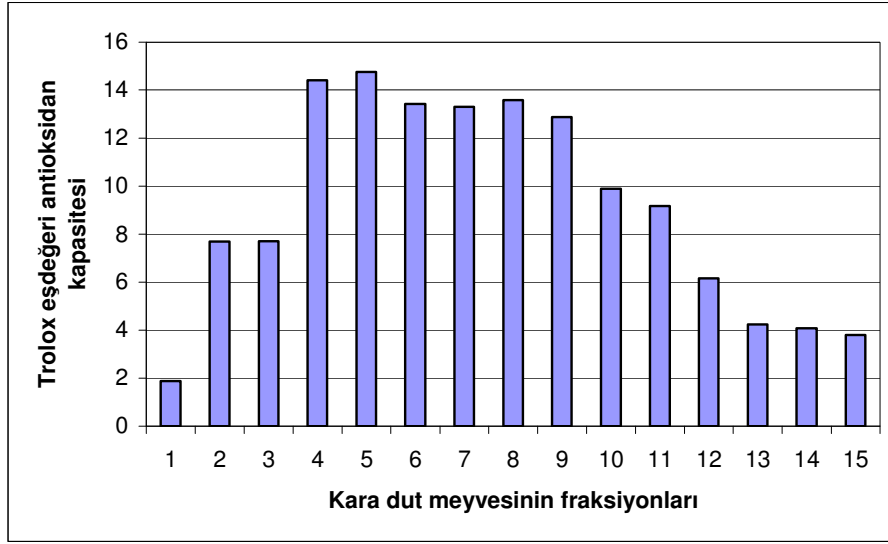
4.2.1. Fraksiyonların antimikrobiyel etkileri

Kolon kromatografisi sonucunda elde edilen 15 fraksiyonun antimikrobiyel aktivite taraması bölüm 3.5.'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. *S aureus*' a karşı test edilen fraksiyonlardan 8., 9. ve 10. fraksiyonlarda aktif bileşik(ler) bulunduğu tespit edilmiştir. Antimikrobiyel denemeler sonucunda aktif bileşik(ler) bulunduğu düşünülen fraksiyonlar HPLC- MS tekniği ile incelenmiştir.

4.2.2. Fraksiyonların antioksidan kapasiteleri

Kolon kromatografisi ile elde edilen, 15 fraksiyonun antioksidan kapasiteleri DPPH reaktifi ile belirlenmiş ve elde edilen antioksidan kapasiteler Trolox Eşdeğeri(TE) olarak hesaplanmış ($\mu\text{g Trolox/gr}$) ve sonuçlar Şekil 4.1.'de verilmiştir. Düşük absorbands değeri yüksek radikal süpürme kapasitesinin göstergesidir [84]. Buna göre 15 fraksiyon içinde ilk fraksiyonun antioksidan kapasitesinin ($1,8 \mu\text{g Trolox/gr}$) en düşük seviyede olduğu, 2. fraksiyondan 5. fraksiyona kadar antioksidan kapasite seviyesinin yükseldiği, en yüksek aktivitenin 4. ($14,4 \mu\text{g Trolox/gr}$) ve 5. ($14,7 \mu\text{g Trolox/gr}$) fraksiyonda olduğu, 6. fraksiyondan sonra antioksidan kapasite seviyesinin düştüğü tespit edilmiştir.

Antioksidan aktivite testleri stabil sentetik radikal olan DPPH kullanarak yapılmıştır. Bu testte Trolox standart antioksidan olarak kullanılmıştır. E vitamininin suda çözünür formu olan Troloxun [83] farklı konsantrasyonlarda hazırlanıp radikallerle karıştırılması sonucu gerçekleşen absorbands değişimine karşı, reaksiyon karışımında bulunan Troloxun konsantrasyonu grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Bu eğrinin denkleminde, absorbands yerine örnekler için bulunan değerler yazılarak antioksidan aktivite TE cinsinden hesaplanmıştır, böylece yüksek antioksidan aktivite gösteren fraksiyonların 4. ($14,4 \mu\text{g TE/gr}$) ve 5. ($14,7 \mu\text{g TE/gr}$) fraksiyonlar olduğu belirlenmiştir. Karadutun antioksidan kapasitesinin belirlenmesi amacıyla farklı yöntemler kullanarak çeşitli çalışmalar yapılmış, bu çalışmalarda karadutun orta seviyelerde antioksidan aktivite ($6,8\text{--}14,4 \mu\text{g TE/gr}$) gösterdiği belirlenmiştir [49]. Bu amaçla yapılan çeşitli çalışmalarda kara dutun toplam fenolik içeriği ve antioksidan kapasitesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu düşünülmüş, bitkisel ürünlerin toplam fenolik içeriği ile antioksidan kapasitesi arasında güçlü bir ilişki bulunduğunu tespit eden daha önceki çalışmalarla bu görüş desteklenmiştir [8,80].



Şekil 4.1. Kara dut fraksiyonlarının trolox eşdeğeri DPPH radikal süpürme güçleri.

4.3. Seçilen Fraksiyonların HPLC- MS Analizleri

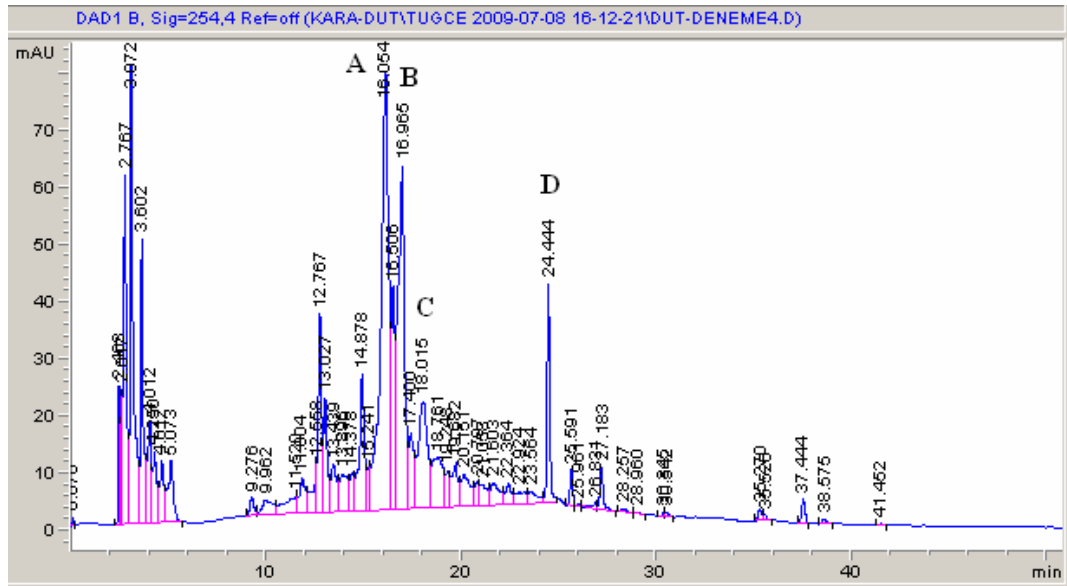
Antimikrobiyel deneyler sonucunda karar verilen 8, 9 ve 10. faraksiyonlar ile karadut metanol ekstraktı, HPLC-MS tekniği ile analizi edilmiş ve elde edilen kromatogram Şekil 4.2.'de, 8. fraksiyonun kromatogramı ise Şekil 4.3.'de verilmiştir. Ankara Üniversitesinde bitkisel kökenli fenolik bileşikler temelinde oluşturulan, bitkisel bileşikler kütüphanesi kullanılarak tanımlama yapılmıştır. Analiz sonucunda 4 majör bileşik olarak siyanidin-3-glukozid (A), siyanidin-3-rutinozid (B), pelargodin-3-glukozid (C) ve rutin (D) tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin, rutin hariç, antosiyanin gurubunda yer aldığı belirlenmiştir.

Elde edilen kromatogramlar karşılaştırıldığında, siyanidin-3-glukozidin ve siyanidin-3-rutinozidin karadut kromatogramında daha yüksek miktarlarda bulunduğu, pelargodin-3-glukozidin kara dut kromatogramında ve 8. fraksiyonun kromatogramında yakın miktarda bulunduğu, rutin ise 8. fraksiyondan elde edilen kromatogramda karaduttan elde edilen kromatograma kıyasla daha yüksek miktarda bulunduğu belirlenmiştir.

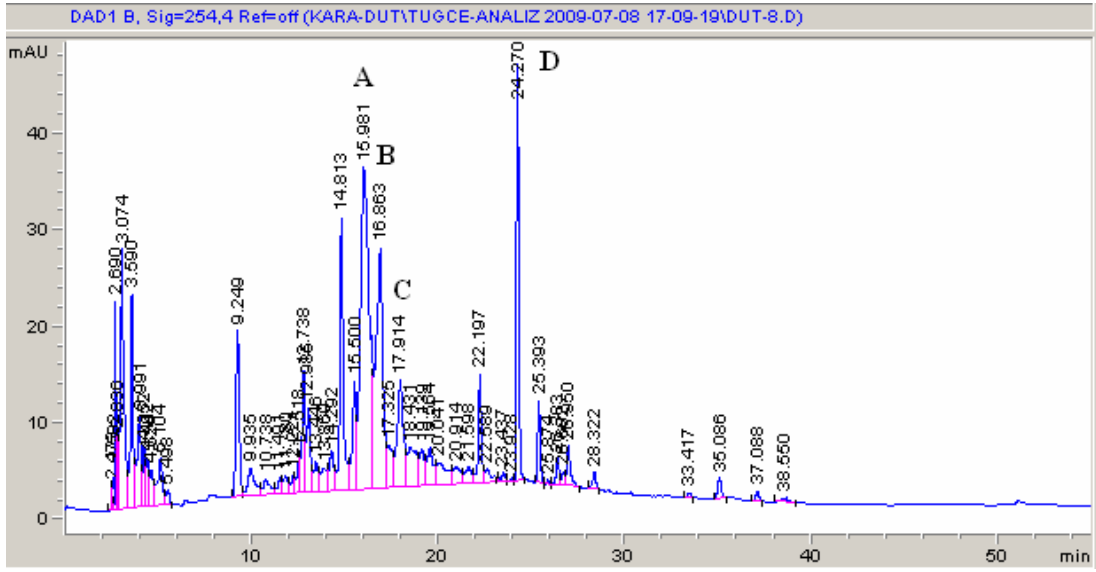
Karadutun antosiyaninlerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular ve bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz majör bileşikler, rutin haricinde, paralellik göstermektedir [51]. Bir başka çalışmada çeşitli meyve ve sebzelerin toplam

antioksidan aktiviteleri incelenmiştir ve fenolik bileşiklerin bulunduğu örnekte antioksidan aktivitenin daha yüksek olduğu belirtilmiştir [80].

Bitkisel kökenli fenolik bileşiklerin antioksidan özelliklerinin bilinmesine [8,49] rağmen, bu bileşiklerin antimikrobiyel aktiviteleri hakkında yapılan çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Mor çayır yoncasının, etanolde çözünebilir fraksiyonunun petalostemumol olarak isimlendirilen *B. subtilis* ve *S. aureus*'a karşı mükemmel bir aktivite, *C. albicans* 'ın yanı sıra Gram negatif bakterilere karşı daha düşük bir aktivite gösterdiği belirlenen bir terpenoid bulunmuştur [80]. Ayrıca, bitkilerinden izole edilen diterpenoid alkaloidlerin antimikrobiyel özelliklere sahip olduğu kanıtlanmıştır [81]. Bu amaçla yapılan çalışmalar arasında, bitkilerden izole edilen fenolik bileşikler olan kafeik ve sinamik asidin mikroorganizmalara karşı etkili olduğu belirlenmiştir [81].



Şekil 4.2. Kara dut meyvesinin metanol ekstraktının kromatogramı



Şekil 4.3. Kara dut meyvesinin 8. fraksiyonunun kromatogramı

- A: Siyanidin-3- glukozid
B: Siyanidin-3-rutinozid
C: Pelargonidin-3-glukosid
D: Rutin

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma *Morus nigra*'nın antimikrobiyel aktivitesini belirlemek, aktif bileşiklerin izolasyonunu ve yapı tanımlamalarını gerçekleştirmek amacıyla yapılmıştır. Antimikrobiyel denemelerden elde edilen sonuçlar Çizelge 5.1'de belirtilmiştir. Yapılan çalışmada, negatif kontrolde sorunsuz gelişimi tespit edilen mikroorganizmaların karaduttan ve pozitif kontrol olan gentamisinden farklı konsantrasyonlarda etkilendiği belirlenmiştir. Test edilen konsantrasyonda karadutun Gram negatif bakterilerden (*S. flexneri* hariç) daha çok Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 5.1. Karadutun Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC)

Mikroorganizma	Kara dut (mg/mL)	Pozitif kontrol (Gentamisin) (µg/mL)	Negatif kontrol	
Gram Pozitif Bakteriler	<i>Staphylococcus aureus</i>	32	1.5	Gelişme var
	<i>Staphylococcus hominis</i>	16	1.5	Gelişme var
	<i>Staphylococcus warneri</i>	32	> 100	Gelişme var
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	32	3.1	Gelişme var
	<i>MRSA(Metisilin Drençli Staphylococcus aureus)</i>	> 512	100	Gelişme var
	<i>Bacillus cereus</i>	16	1.5	Gelişme var
	<i>Enterococcus feacalis</i>	> 512	> 100	Gelişme var
	<i>Streptococcus</i>	> 512	25	Gelişme var
Gram Negatif Bakteriler	<i>Enterobacter</i>	> 512	6.2	Gelişme var
	<i>Salmonella</i>	> 512	50	Gelişme var
	<i>Shigella flexneri</i>	32	12.5	Gelişme var
	<i>Klebsiella</i>	> 512	12.5	Gelişme var
	<i>Escherichia coli</i>	> 512	12.5	Gelişme var
Maya	<i>Candida albicans</i>	512	Test edilmedi	Gelişme var

Aktif bileşiğin izolasyonu amacıyla yapılan, kolon kromatografisinden elde edilen 15 fraksiyonun *S. aureus*'a karşı test edilmesi ile antimikrobiyel aktivite bakımından 3 fraksiyonun (8.,9. ve 10. fraksiyon), antioksidan aktivite bakımından ise 2 fraksiyonun (4. ve 5.fraksiyon) önemli olduğu belirlenmiştir. Antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğuna karar verilen fraksiyonların bileşimi hakkında fikir sahibi olmak için denemelerde öne çıkan fraksiyonların HPLC-MS tekniği ile analizleri yapılmış ve 4 önemli bileşik;

siyanidin-3-glukozid, siyanidin-3-rutinozid, pelargodin-3-glukozid ve rutin varlığı tespit edilmiştir.

Gıda endüstrisinde ve enfeksiyon hastalıklarında mikroorganizmalarla mücadele son derece önemlidir. Gıda endüstrisinde personel hijyen indikatörü olan, enfeksiyon hastalıkları bakımından ciddi tehdit oluşturan, hastanelerde mevcut antibiyotiklere karşı oldukça hızlı direnç kazanan *Staphylococcus*'lara karşı tanımlanan bileşiklerin etkili olması bu bileşiklerin muhtemel antimikrobiyel madde olarak kullanılma ihtimalini doğurmuştur. Ayrıca mücadele edilmesi zor ve patojen bir mikroorganizma olan *C. albicans*'a karşı karadutun yüksek konsantrasyonda da olsa etkili olduğunun belirlenmesiyle, karadutun potansiyel antifungal etkisi tespit edilmiştir.

Bitkilerden izole edilen, antimikrobiyel aktiviteye sahip oldukları belirlenen bileşiklerin gıda endüstrisinde hem oksidatif hem de mikrobiyel bozulmalara karşı kullanılabilmeleri endüstriyel ürünlerin bozulmalarının önlenmesinde, bu ürünlerin raf ömürlerinin uzatılmasında, dolayısıyla kalitenin arttırılmasında etkili olabilir. Ayrıca, ciddi enfeksiyon hastalıklarına ve ölümlere yol açan mikroorganizmalarla mücadelede de bu bileşikler son derece önemlidir.

Candidiasis ile mücadele oldukça zor koşullarda gerçekleştirilmektedir, bu nedenle karadut meyvesi Candidiasis tedavisinde alternatif oluşturabilir.

Ayrıca karadutun antiviral etkisinin bulunduğu düşünülmektedir; fakat mevcut laboratuvar şartlarında bu etkinin araştırılması mümkün olmadığından bir deney düzeneği kurulamamış, analizler gerçekleştirilememiştir. Bu nedenle karadutun antiviral etkisi araştırmaya açık bir konudur, bu konu üzerine yapılacak araştırmalar ile karadutun antiviral etkisi belirlenebilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] C.F. Boschini, *Nutritional quality of mulberry cultivated for ruminant feeding* In: Mulberry for animal production, FAO animal production and health papers, 147 (2002).
- [2] K. Vijayan, S. Chauhan, K.N. Das, P.S.Chakrakarti, N.B.Ray, *Leaf yield component combining abilities in mulberry*, **Central Sericultural Research** , 98 (1997) 47–52.
- [3] S.Ercisli, *A short review of the fruit germplasm resources of Turkey*, **Genetic Resources and Crop Evaluation**. 51 (2004) 419–435.
- [4] D.Gerasopoulos, G.Stavroulakis, *Quality characteristics of four mulberry (*Morus* spp) cultivars in the area of Chania, Greece*, **J Sci. Food Agr.** 73 (1997) 261–264.
- [5] F.Yaltık,P.H.Davis (Ed) *Morus flora of Turkey*, UK.Edinburgh: Edinburgh University Pres.Vol 7 (1982) 641–642.
- [6] S. Ercisli, E. Orhan, *Natural mulberry production in Erzurum region in Turkey*, in Proceeding of the International Scientific Conference ‘environmentally friendly fruit growing’ (2005) 129–136.
- [7] S. Ercisli, E. Orhan, *Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits*, **J. Agric. Food Chem.**, 103 (2007) 1380–1384.
- [8] S. Ercisli, E. Orhan, *Some physico–chemical characteristic of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey*,**Scientia Horticulturae**, 116 (2008) 41–46.
- [9] H. Lale, R. Ozcagiran, *A study on pomological, phenologic and fruit quality characteristic of mulberry (*Morus* spp) species Derim*, **Food Technol. Biotechnol.** 13 (1996) 177–182 .
- [10]] E. Cieslik, A. Grade, W. Adams, *Content of polyphenols in fruit and vegetables*, **Food Chem.**, 94 (2002) 132–142.
- [11] J.Y. Lin, C.Y. Tang, *Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as wellas their stimulatory effects on mause splenocyte proliferation*, **J. Agric. Food Chem.**,101 (2007) 140–147.
- [12] H. Tapieco, K.D. Tew, G.M. Ba, G. Mathe, *Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies*, **Biomed. Pharmacother**, 56 (2002) 200–207 .
- [13] T. Baytop, *Türkiye’ de bitkilerle tedavi*, *İstanbul Üniversitesi yayınları*, Türkiye, 40–42.

- [14] M. Ozgen, S. Serce, C. Kaya, *Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin rich Morus nigra and Morus rubra fruits*, **Scientia Horticulturae**, 119 (2009) 275–279.
- [15] C. G. Proper, *Antimicrobial therapy*. In A.M. Rudolph (eds) Rudolph's Pediatrics. 19th. Nrowalk. Appleton–Lange 1991. p. 524–538.
- [16] M.Akman, *Bakteri genetiği*, **Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fak.Yayını** No:8, Sivas,1983.
- [17] A.L. Shelef, *Antimicrobial effects of spices*, **J. Food Safety**, 6 (1994) 29–44.
- [18] C. Walsh, *Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance*, Boston, Massachusetts, 2000 775–780.
- [19] B.L.Quesnet, *Antibiotics: Assessment of antimicrobial activity and resistance*, **J. Pharm.Sci.**, 18 (2006) 1–11.
- [20] A.A. Salyers, D.D. Whitt, *Bacterial Pathogenesis, a molecular approach*, Washington, D.C. (2005) 97–109.
- [21] S.O. Kayaalp, *Tıbbi Farmakoloji*, Hacettepe Taş, 8.Basım,(1998) 175–200.
- [22] K.H. Mayer, S.M. Opal, A.A. Medeiros, *Mechanism of antibiotic resistance*, *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious disease* Aug, **J. Infectious Disease**, 27 (1998) 5–11.
- [23] S.B. Levy, B. Marshall, *Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses*, **Nature Medicine**, 12: (2004) 122–126.
- [24] T.D. Gootz, *Discovery and development of new antimicrobial agents*, **Clin. Microbial.**, 23 (1990) 3–13.
- [25] F. Baquero and J. Blázquez, *Evolution of antibiotic resistance*, **J. Hosp. Infect.** 12 (1997) 482–486.
- [26] K.Töreci, *Yeni antibiyotiklere gereksinim ve yeni antibiyotiklerin antibakteriyel özellikleri*, Ulusal Klinik Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Diyarbakır, Eylül 18–20, (1990), pp99–102.
- [27] D. E. Moerman, *An analysis of the food plants and drug plants of native North America*, **J. Ethnopharmacol.**, 52 (1996) 165–169.

- [28] H. D. Tabb, R.S.Chang, K. M. Smith, *Isolation putrifaction and partial characterization of prunellin, an antiviral component from aqueous extracts of Prunella vulgaris*, **J. Antiviral Res.**, 11 (1989) 263–273.
- [29] N. Akkoç, M. Akçelik, İ. C. Haznedaroğlu, H.Göçer, S.Aksu, S.Kirazlı, H.C.Fırat, *In vitro anti-bacterial activities of ankaferd medicinal plant extract*, **Türkiye Klinikleri J. Med Sci.**, 29 (2009) 2–9.
- [30] B. Klinik, *Alternative medicines: is natural really better? Drug Top.* **Int.Health News.** 141 (1997) 99–100.
- [31] A .M. Mahasnah, A.A.Oqlah, *Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in traditional of Jorda*, **J. Ethnopharmacol.**, 64 (1999) 271–276.
- [32] N.R.Farnsworth, D.D.Soejarto, Global impotance of medicinal plant, O.Akerele, V.Heywood, H.Synge (Eds) *The concervation of medicinal plants* .Cambridge University Pres.Cambridge (1991) pp25–52 .
- [33] J.N. Eloff, *Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants*, **J. Ethnopharmacol.**, 60 (1998) 1–8.
- [34] RI–S. Lin, *Phytochemicals and antioxidants in functional foods*, New York 1995, 904-908.
- [35] S. A. Aydın, F. Üstün, *Yeni antibiyotiklere gereksinim ve yeni antibiyotiklerin antibakteriyel özellikleri*, **İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 33 (2007) 21–31.
- [36] E. Middleton, C. Kandas, *The impact of plant flavonoids on mammalian biology implications for immunity inflammation and cancer*, **Food Chem.Toxicol.**, 86 (1994) 619–652.
- [37] C. Santos–Buelga and A. Scalbert, *Proanthocyanidins and tannin–like compound nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health*, **J. Food Sci. Agric.**, 80 (2000) 1094–1117.
- [38] <http://www.polyphenols.com/cyanidin-products>.(Erişim Tarihi; 05.04.2010)
- [39] R.G. Beecher, ‘*Antioxidant food supplements in human health*’ in L.Packer, M. Hiramatsu T. Yoshikawa (ed) , *Flavonoid in foods*, Vol. 102 (1999) 272–273.
- [40] M.J. Salvador, L.A.D. Zucchi, R.C.Candido, I.Y. Ito, and D.A Dias, *In vitro antimicrobial activity of crude extract and Isolated Constituents of Alternanthera maritima*, **Pharm. Biol.**, 42 (2004) 138–148

- [41] <http://www.vitamins supplements.org/biolavonoids>, Erişim Tarihi; 08.04.2010.
- [42] <http://tr.wikipedia.org/wiki/cyanidine>, Erişim Tarihi; 12.04.2010.
- [43] M. Branka, P. Treb, H. Janez, *Determination and quantitation of anthocyanins and hydroxycinnamic acids in different cultivars of sweet cherries (Prunus avium L.) from Nova Gorica Region*, **Food Technol. Biotechnol.** 40 (2002) 207–212.
- [44] G. Goel, A.. Puniya, K .Aguilar, K .Singh: *Interaction of gut microflora with tannins feeds*, **Noturwissenschaften**, 92 (2005) 497–503.
- [45] N.I. Krinsky, *Mechnism of action biological antioxidants*, **Proc. Sac. Exp. Biol. Med.**, 20 (1992) 248–254.
- [46] H. Sies, *Strategies of antioxidant defens*, **Eur J. Biochem.**, 215 (1993) 213–219.
- [47] N. Noguchi, and N. Etsuo, *Chemistry of reactive oxygen species and antioxidants*, **J. Sci. Food. Agric.**, 23 (1996) 1–14.
- [48] Du.Q., Zheng J., Xu Y., *Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity*, **J. Food Comp. Anal.** 21 (2008) 390–395.
- [49] N. M. A. Hassimotto, M.I.Genoverse, F. M. Lajolo, *Antioxidant Activity of Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps*. **J. Agric. Food Chem.**53 (2005) 2928–2935.
- [50] K. Takuya, I. Naoto, K. Yasuhiro, Y. Yoshimitsu, S. Kuninori, Y. Yosuke, *Antioxidant flavonol glycosides in mulberry leaves isolated based on LDL antioxidant activity*, **Food Chemistry**, 97 (2005) 25–31.
- [51] P. Agata–Maria., O.Wieslaw., and B.Alessandra., *Quali–quantitative Analyses of Flavonoids of Morus nigra L.and L.(Moraceae)Fruits*, **J. Agric. Food Chem.**, 56 (2008) 3377–3380.
- [52] İ. Karaman, F.şahin, M. Gülüce, H. Öğütçü, M. şengül, A.Adıgüzel, *Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of Juniperus oxycedrus*, **J. Ethnopharmacol.**, 85 (2003) 231–235.
- [53] C. Penna, S. Marino, E.Vivot, M. C. Cruanes, J. De D.Munoz, J. Cruanes, G. Ferraro,G. Gutkind, V. Martino, *Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from Sebastiania brasiliensis*, **J. Ethnopharmacol.**, 77 (2001) 37–40.
- [54] A. Changwei, L. Anping, A. Abdelnaser, T. D. Elzaawely, T. Shinkichi, *Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of Ficus microcarpa L. fil. Extract*, **Food Control** 19 (2008) 940–948.

- [55] R. P. Samy, I. A. Sen, *Screening of 34 Indian medicinal plants for antibacterial properties*, **J. Ethnopharmacol.**, 62 (1998) 173–182.
- [56] C. M. Rota, A. Herrera, R. M. Martinez, J. A. Sotomayor, M. J. Joran, *Antimicrobial activity and chemical composition of Thymus vulgaris, Thymus zygis and Thymus hyemalis essential oils*, **Food Control** 19 (2008) 681–687.
- [57] G. İşcan, N. Krimer, M. Kürkcüoglu, K. Hüsnü, C. Başer, F. Demirci, *Antimicrobial screening of Mentha piperita essential oils*, **Agric. Food Chem.** 50 (2002) 3943–3946.
- [58] P. Goñi, P. López b, C. Sánchez, R. Gómez-Lus, R. Becerril, C. Nerín, *Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils*, **Food Chemistry** 116 (2009) 982–989.
- [59] B. Wilson, G. Abraham, V.S. Manju, M. Mathew, B. Vimala, S. Sundaresan, B. Nambisan, *Antimicrobial activity of Curcuma zedoaria and Curcuma malabarica tubers*, **J. Ethnopharmacol.**, 99 (2005) 147–151.
- [60] G. K. Jayaprakasha, T. Selvi, K. K. Sakariah, *Antibacterial and antioxidant activities of grape (Vitis vinifera) seed extracts*, **Food Res. Int.**, 36 (2003) 117–122.
- [61] N. Benkeblia, *Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (Allium cepa) and garlic (Allium sativum)*, **Lebensm. Wiss. Technol.** 37 (2004) 263–268.
- [62] F. Demirci, K. Guven, B. Demirci, M.Y. Dadandi, K.H.C. Baser, *Antibacterial activity of two Phlomis essential oils against food pathogens*, **Food Control** 19 (2008) 1159–1164.
- [63] J. N. Eloff, *Antibacterial activity of Marula (Sclerocarya birrea (A. rich.) Hochst. subsp. caffra (Sond.) Kokwaro (Anacardiaceae) bark and leaves*, **J. Ethnopharmacol.**, 76 (2001) 305–308.
- [64] F.G. Kirbaslar, A. Tavman B. Dülger, G. Türker, *Antimicrobial activity of Turkish citrus peel oils*, **Pak. J. Bot.**, 41 (2009) 3207–3212.
- [65] G. L. Pessini, B. P. Dias Filho, C. V. Nakamura, D. A. Garcia Cortez, *Antibacterial activity of extract and neolignans from piper regnellii (Miq.) C.DC. var. pallescens (C.DC.) Yunk.* **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 198 (2003) 1115–1120.
- [66] N.S. Alzoreky, K. Nakahara, *Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia*, **Int. J. Food Microbiol.**, 180 (2003) 223–230.
- [67] F. B. Holetz, G. L. Pessini, N. R. Sanches, D. A. Garcia Cortez, C. V. Nakamura, B. P. D. Filho, *Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious disease*, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 97 (2002) 115–120.
- [68] N.J.Eloff, *A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria*, **Planta Medica**, 64 (1998) 711–713.

[69] D.F. Sahn, J.A. WassingtonII, Antibacterial susceptibility tests: dilution methods In Balowa, A. (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1991 1105–1116.

[70] W. Brand–Williams, M.E. Cuvelier C Berset, *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*, **Food Sci. Tech.**, 28 (1995) 25–30.

[71] A. D. Russell, *Mechanisms of bacterial– resistance to non–antibiotics food–additives and food and pharmaceutical preservatives*, **J. Applied Bacteriol.**, 71 (1991) 191–201.

[72] H. Nikaido, *Prevention of drug access to bacterial targets permeability barriers and active efflux*, **Science**, 264 (1994) 382–388.

[73] Y. Gao, M.J. Stiles, *The outer membrane of gram negative bacteria inhibits antibacterial activity of brochocin–C.*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 65 (1994) 329–4333.

[74] D. Kalemba, , A. Kunicka, *Antibacterial and antifungal properties of essential oils*, **Curr. Med. Chem.**, 10 (2003) 813–829.

[75] D.S.Grierson, A. J. Afolayan, *Antibacterial activity of some indigenous plants used for the treatment of wounds in the Eastern Cape, South Africa*, **J. Ethnopharmacol.**, 66 (1999) 103–106.

[76] G.L. Pessini, B.P. Dias Filho, C.V. Nakamura, D.A. Garcia Cortez, *Antibacterial Activity of Extract and Neolignans from piper regnellii (Miq.)C.DC.var.pallescens (C.DC.)Yunck .* **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 198 (2003) 1115–1120.

[77] N.S. Alzoreky, K. Nakahara, *Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia*, **Int. J. Food Microbiol.**, 180 (2003) 223–230.

[78] F. B. Holetz, G.L. Pessini, N.R. Sanches, D.A. Garcia Cortez, C.V. Nakamura, B.P.D. Filho, *Screening of some plans used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious disease*, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 97 (2002) 115–120.

[79] <http://tr.wikipedia.org/wik/pamukçuk>, E T ; 02.04.2010.

[80] C.D. Hufford, Y. Jia, E. M. Croom, Jr. I. Muhammed, A.L. Okunade, A.M. Clark and R.D. Rogers, *Antimicrobial compound from Petalostemum*, **J. Nat. Prod.**, 56 (1993) 1878–1889.

[81] M.C. Marjorie, *Plant products as Antimicrobial Agents*, **Clin. Microbiol.**, 12 (1999) 564–582.

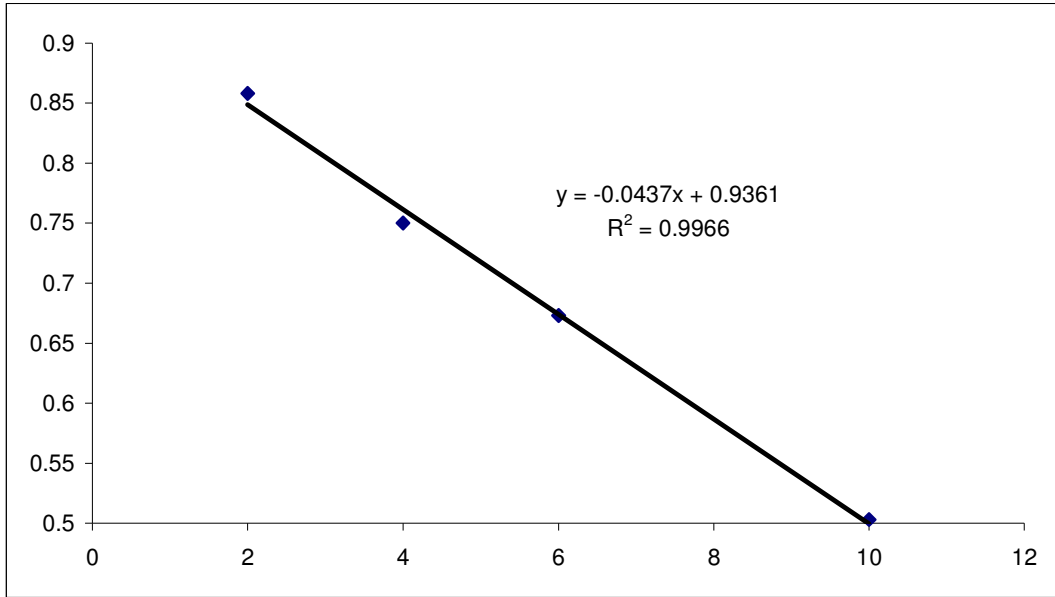
[82] M.S. Mokbel, T. Suganuma, *Antioxidant and antimicrobial activities of the methanol extracts from pummelo (Citrus grandis Osbeck) fruit albedo tissues*, **Eur Food Res. Technol.**, 224 (2006) 39–47.

[83] M. Lúcio, C. Nunes, D. Gaspar, H. Ferreira, J.L.F.C. Lima, S. Reis, *Antioxidant activity of vitamin E and trolox: undersatanding of the factors that grown lipid peroxidation studies In vitro*, **Food Biophysic.**, 4 (2009) 312–320.

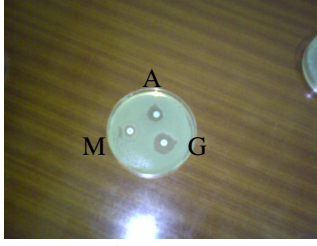
[84] K. Shimada, K. Fujikawa, K. Yahara, T. Nakamura, *Antioxidative properties of xantin on autoxidation of soybean oil rich cyclodextrin emulsion*, **J. Agric. Food Chem.**, 40 (1992) 945–948.

7.EKLER

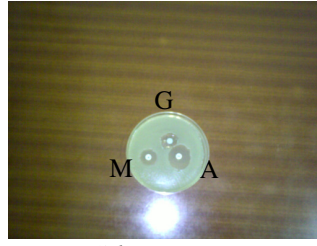
EK 1. Trolox standart eğrisi (DPPH Testi)



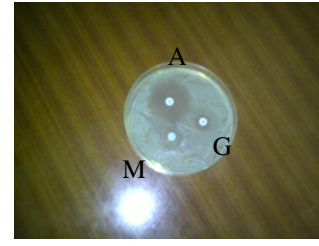
Ek 2. Kara dut meyvesinin antimikrobiyel tarama (disk difüzyon yöntemi) sonuç resimleri.



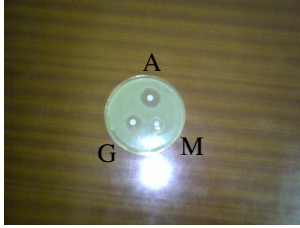
S.aureus



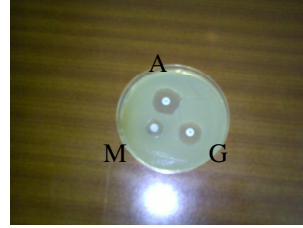
S.hominis



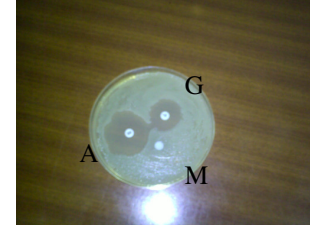
S.warneri



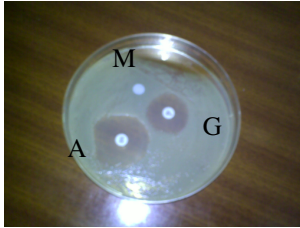
S.epidermidis



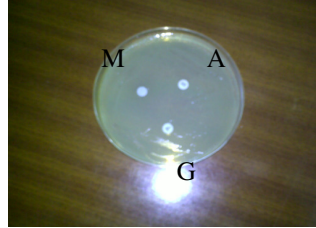
B.cereus



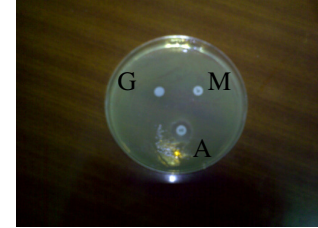
Streptococcus



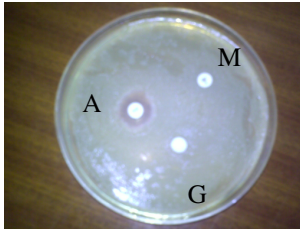
Enterococcus



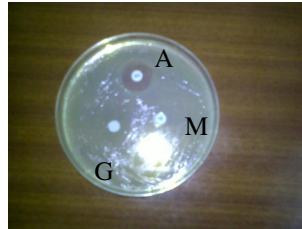
Enterobacter



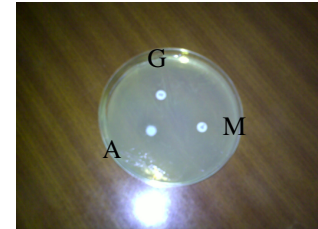
Salmonella



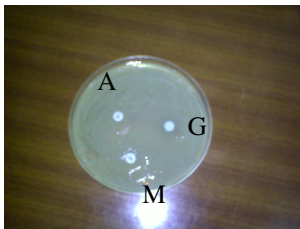
Shigella flexneri



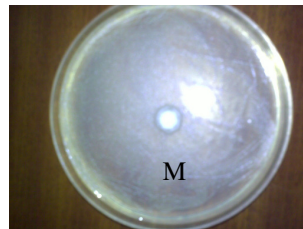
E.coli



MRSA



Klebsiella



Candida albicans

M: *Morus nigra* (Kara dut)

A: Ampisilin

G: Gentamisin

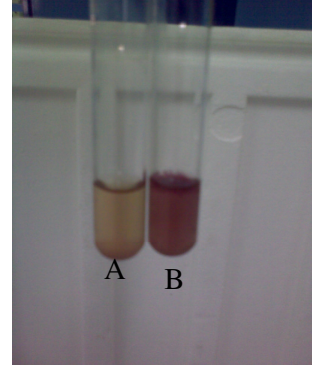
Ek 3. Kara dut meyvesinin MIC (broth dilüsyon yöntemi) değerlendirme resimleri



Pozitif Kontrol



Negatif Kontrol



A: bakteri büyümesinin olmadığı kara dut içeren tüp.

B: Bakteri büyümesinin olduğu kara dut içeren tüp.

Ek 4. Kara dut meyvesinin MIC (agar ekstrakt yöntemi) sonuç resimleri



S.aureus kontrol



S.aureus 4 mg/mL



S.aureus 32 mg/mL



S.epidermidis kontrol



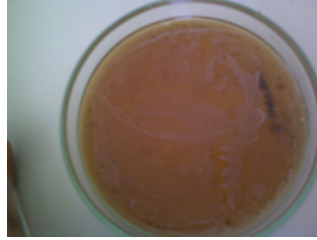
S.epidermidis 16 mg/mL



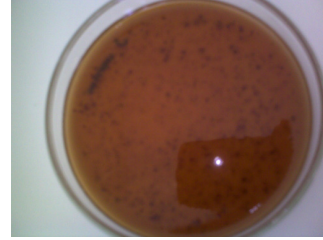
S.epidermidis 32mg/ mL



S .warneri kontrol



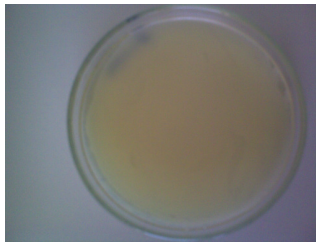
S.warneri 8mg/mL



S.warneri 32 mg/mL



S.hominis kontrol



S.hominis 2mg/mL



S.hominis 16mg/mL

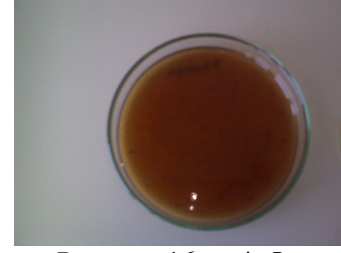
Ek 4. Kara dut meyvesinin MIC (agar ekstrakt yöntemi) sonuç resimleri, devamı



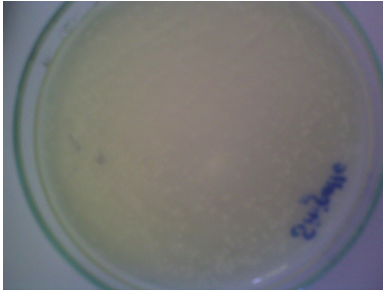
B.cereus kontrol



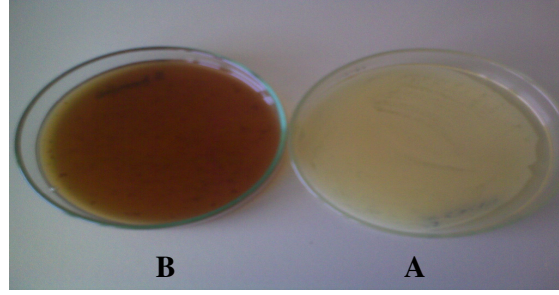
B.cereus 2mg/mL



B.cereus 16 mg/mL



Shigella flexneri kontrol



B ; *Shigella flexneri* 32mg/mL
A ; *Shigella flexneri* 2mg/mL



C. albicans kontrol



C. albicans 16mg/mL



C. albicans 32mg/mL



C.albicans 128 mg/ml

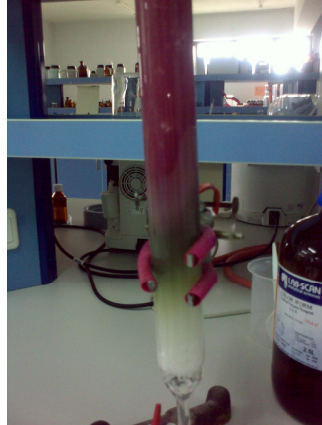


C. albicans 256 mg/mL



C. albicans 512 mg/mL

Ek.5. Kolon kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyon resimleri



Ek.5. Kolon kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyon resimleri, devamı



1.fraksiyon, kuru madde miktarı : 0.3439 gr



2.fraksiyon, kuru madde miktarı : 0.6398 gr



3. fraksiyon, kuru madde miktarı : 1.3016 gr



4.fraksiyon, kuru madde miktarı : 1.5927 gr



5.fraksiyon, kuru madde miktarı : 0.6510 gr



6.fraksiyon, kuru madde miktarı: 1.6168 gr



7. fraksiyon, kuru madde miktarı: 1.5456 gr



8. fraksiyon, kuru madde miktarı: 1.3877 gr



9. fraksiyon, kuru madde miktarı : 1.0709 gr



10. fraksiyon, kuru madde miktarı : 0.7615 gr



11. fraksiyon, kuru madde miktarı : 0.7289 gr



12. fraksiyon, kuru madde miktarı : 0.6372 gr

Ek.5. Kolon kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyon resimleri, devamı



13. fraksiyon, kuru madde
miktarı : 0.5332 gr



14. fraksiyon, kuru madde
miktarı : 0.3732 gr



15. fraksiyon, kuru madde
miktarı : 0.2870gr

ÖZGEÇMİŞ

Tuğça BİLENLER,

1983 yılında Malatya ‘ da doğdu. İlköğrenimini Sümer İlköğretim okulunda, lise öğrenimini Sümer Lisesi’nde ve 2002 yılında başladığı lisans öğrenimini Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde 2006 yılında tamamladı. 2007 yılı Eylül ayında İnönü Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde Yüksek Lisans eğitimine başladı.02.01.2008 tarihinde İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı.