



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



## YÜKSEK LİSANS TEZİ

YALANCI İĞDE YAPRAK EKSTRESİNİN ANTİBAKTERİYEL  
ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Şeyma KARASOY

Biyoloji Anabilim Dalı

Botanik Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Aliye ARAS PERK

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN

Kasım, 2017

İSTANBUL

Bu çalışma, 21.11.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Botanik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi**

Prof. Dr. Aliye ARAS PERK(Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Bekir Sami KOCAZEYBEK  
İstanbul Üniversitesi  
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Dilek ŞATANA  
İstanbul Üniversitesi  
Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Reyhan ÇALIŞKAN  
İstanbul Aydın Üniversitesi  
Tıp Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2016-23184 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana danışmanlık ederek gösterdiği emek ve sabırdan dolayı tez danışmanım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Aliye ARAS PERK, bilgi ve tecrübesinden yararlanmama imkan sağlayan ikinci danışmanım Prof. Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN, deneylerim aşamasında her konuda yardımcı olan Zeynep TANER, Şüheyda GÜLŞEN ve fotoğraf için Onur YANAR, hayatımın her döneminde varlıklarıyla daima yüzümü güldüren eğitim hayatım boyunca maddi manevi her zaman yanımda olan başta canım babam, annem ve ablalarıma sonsuz teşekkür ederim.

Kasım 2017

Şeyma KARASOY



# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ .....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....	x
ÖZET .....	xi
SUMMARY .....	xiii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR.....</b>	<b>5</b>
2.1. YALANCI İĞDE TAKSONOMİK ÖZELLİKLERİ.....	5
2.2. YALANCI İĞDE BİTKİSİ GENEL ÖZELLİKLERİ .....	5
2.3. YALANCI İĞDE BİTKİSİNİN YAPRAKLARI .....	6
2.4. YALANCI İĞDE YAPRAKLARININ BAKTERİLERE KARŞI ETKİSİ .....	8
2.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i> (Metisilin Duyarlı Ve Metisilin Dirençli <i>S.aureus</i> ).....	9
2.4.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	11
2.4.3. <i>Escherichia coli</i> .....	11
2.4.4. <i>Klebsiella pneumonia</i> .....	12
2.4.5. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	12
2.5. ANTİBİYOTİKLERE KARŞI DUYARLILIĞI SAPTAMA YÖNTEMLERİ.....	13
2.5.1. Disk Difüzyon Yöntemi .....	13
2.5.2. Agar Dilüsyon Yöntemi .....	13
2.5.3. Tüp Dilüsyon Yöntemi .....	14
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM.....</b>	<b>15</b>
3.1. MALZEMELER .....	16
3.1.1. Besiyerleri.....	16
3.1.1.1. <i>Tryptic Soy Broth (TSB) Besi Yeri (BD)</i> .....	16
3.1.1.2. <i>Muller Hinton Besi Yeri (BD)</i> .....	16
3.1.1.3. <i>Çikolatamsı Agar Besi Yeri (BD)</i> .....	17
3.1.2. Standart Kökenler .....	18

3.2. YÖNTEMLER .....	20
3.2.1. Yalancı İğde Ekstraktlarının Hazırlanması .....	20
3.2.2. Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyonu .....	22
3.2.3. Hazırlanan Bitki Ekstraktlarının Disklere Emdirilmesi .....	23
3.2.4. Bakterilerin Canlandırılması .....	23
3.2.5. Disk Difüzyon Yönteminin Uygulanması .....	24
3.2.6. Dilüsyonların Hazırlanması .....	25
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>27</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>37</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>43</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>49</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Yalancı iğde bitkisi. “Fotoğraf: Onur Yanar” .....	5
Şekil 2.2: <i>Hippophae</i> sp. doğal dağılımı (Silvester, 1977). .....	6
Şekil 3.1: <i>Hippophae rhamnoides</i> işlenmiş (1) ve işlenmemiş (2) yaprak genel görünüşü. ....	15
Şekil 3.2: Muller Hinton Agar Besiyeri. ....	17
Şekil 3.3: Metisilin duyarlı <i>S. aureus</i> ATCC 25923. ....	18
Şekil 3.4: Metisilin dirençli <i>S. aureus</i> ATCC 43300. ....	18
Şekil 3.5: <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027. ....	19
Şekil 3.6: <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603. ....	19
Şekil 3.7: <i>E. coli</i> ATCC 25922. ....	20
Şekil 3.8: <i>E. faecalis</i> ATCC 29212. ....	20
Şekil 3.9: Yalancı iğde işlenmiş ve işlenmemiş bitki ekstraktları. ....	21
Şekil 3.10: Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu cihazı ile Yalancı iğde yaprak yağı eldesi. ....	22
Şekil 3.11: Bakterilerin canlandırılması işlemi. ....	24
Şekil 4.1: Steril filtreler ile dilüsyon sıvılarının hazırlanması. ....	30
Şekil 4.2: Metanolik ekstraktın <i>S. aureus</i> ATCC 43300 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu. ....	30
Şekil 4.3: Metanolik ekstraktın <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ve <i>S. aureus</i> ATCC 25923 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu. ....	31
Şekil 4.4: Etanolik ekstraktın <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ve 25923 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu. ....	32
Şekil 4.5: Saf ekstraktın farklı konsantrasyonlarının <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ve 25923 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu. ....	33
Şekil 4.6: Saf ekstraktın farklı konsantrasyonlarının <i>S. aureus</i> ATCC 43300 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu. ....	34

<b>Şekil 4.7:</b> S1 ekstraktın <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>E.coli</i> 25922, <i>K. pneumoniae</i> 700603 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu.....	35
<b>Şekil 4.8:</b> S1 ekstraktın <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>E. coli</i> 25922, <i>K. pneumoniae</i> 700603 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu.....	36





## TABLO LİSTESİ

### Sayfa No

<b>Tablo 2.1:</b> Yalancı iğde yapraklarının demleme ve metanolik ekstraksiyonundaki Fenolik profil (Aras ve diğ., 2016).....	7
<b>Tablo 2.2:</b> Toplam Fenolik, Flavonoid madde miktarı ve antioksidan kapasitesi (Aras ve diğ., 2016).....	7
<b>Tablo 2.3:</b> Yalancı iğde yaprak içeriği (Zhang, 1990).....	8
<b>Tablo 3.1:</b> Yalancı iğde yaprak saf ekstraktının süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu uygulama değerleri.....	23
<b>Tablo 3.2:</b> Yalancı iğde yaprak metanol ekstraktının süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu uygulama değerleri.....	23
<b>Tablo 4.1:</b> Yalancı iğde ekstraktlarının etkili olduğu bakteriler (Dilüsyon öncesi).....	28
<b>Tablo 4.2:</b> İşlenmemiş yaprak metanolik ekstraktının farklı konsantrasyonlarda bakterilere etkisini gösteren zon çapları.....	30
<b>Tablo 4.3:</b> İşlenmiş yaprak metanolik ekstraktının farklı konsantrasyonlarda bakterilere etkisini gösteren zon çapları.....	31
<b>Tablo 4.4:</b> İşlenmiş yaprak etanolik ekstraktının farklı konsantrasyonlarda bakterilere etkisini gösteren zon çapları.....	32
<b>Tablo 4.5:</b> İşlenmemiş yaprak saf ekstraktının farklı konsantrasyonlarda bakterilere etkisini gösteren zon çapları.....	32
<b>Tablo 4.6:</b> İşlenmiş yaprak saf ekstraktının farklı konsantrasyonlarda bakterilere etkisini gösteren zon çapları.....	33
<b>Tablo 4.7:</b> İşlenmiş yaprak S1 ekstraktının farklı konsantrasyonlarda bakterilere etkisini gösteren zon çapları.....	34
<b>Tablo 4.8:</b> İşlenmemiş yaprak S1 ekstraktının farklı konsantrasyonlarda bakterilere etkisini gösteren zon çapları.....	35

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
-----------------	-----------------

<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>K</b>	: Potasyum
<b>Mg</b>	: Magnezyum
<b>Ca</b>	: Kalsiyum
<b>pH</b>	: Hidrojenin gücü

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
--------------------	-----------------

<b>MRSA</b>	: Metisilin dirençli
<b>MSSA</b>	: Metisilin duyarlı
<b>ATCC</b>	: Amerikan tip kültür koleksiyonu
<b>PBP</b>	: Penisilin bağlayan protein
<b>MIK</b>	: Minimal inhibisyon konsantrasyonu
<b>K</b>	: Konsantrasyon
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>mg</b>	: Miligram
<b>g</b>	: Gram
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>rpm</b>	: Dakikadaki devir sayısı

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### YALANCI İĞDE YAPRAK EKSTRESİNİN ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Şeyma KARASOY

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Aliye ARAS PERK

II. Danışman : Prof. Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN

Yalancı iğde yaprak ekstrelerinin *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 bakterileri üzerindeki etkinliği disk difüzyon yöntemiyle saptanmıştır. Süperkritik CO<sub>2</sub> ekstraksiyonuyla elde edilen ekstrelerin çalışılan bakteriler üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. İşlenmemiş yaprağın etanolik ekstresi çalışılan bakterilerde etkinlik göstermemiştir. Bunların dışında kalan işlenmiş ve işlenmemiş yaprakların saf, etanolik, metanolik ve sodyum bikarbonatlı ekstrelerinin farklı bakterilerde etkinlik gösterdiği saptanmıştır.

Dilüsyon öncesi disk difüzyon deneyinde işlenmiş yaprak Sodyum bikarbonatlı ekstresi *K. pneumoniae* ATCC 700603 kökeni etrafında 12 mm lik bir zon çapı gösterirken, %50 lik dilüsyonda 10 mm, %75 lik dilüsyonda 17 mm lik zon çapı göstermiştir. Yine işlenmiş yaprak sodyum bikarbonatlı ekstresinin de *E. coli* ATCC 25922 kökeni etrafında 12 mm lik bir zon çapı gösterirken, %25 lik dilüsyonda 9 mm, %50 lik dilüsyonda 18 mm ve %75 lik dilüsyonda 20 mm zon çapları gösterdiği saptanmıştır.

Dilüsyon sonrası duyarlılık zon çaplarının, dilüsyon öncesi disk difüzyon deney sonuçlarında ölçülen zon çaplarından daha büyük olması şaşırtıcı bir sonuç oluşturmuştur.

Kasım 2017, 63 sayfa.

**Anahtar kelimeler:** *Hippophiae rhamnoides* L., Antibakteriyel aktivite, Yaprak ekstresi, Yalancı iğde



## SUMMARY

### M.Sc. THESIS

#### INVESTIGATION OF ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF SEA BUCKTHORN LEAF EXTRACT

**Şeyma KARASOY**

**İstanbul University**

**Institute of Graduate Studies in Science and Engineering**

**Department of Biology**

**Supervisor : Prof. Dr. Aliye ARAS PERK**

**Co-Supervisor : Prof. Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN**

The responsivity of sea buckthorn extracts to *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 bacteria has been observed by the disc diffusion method. It has also been analyzed that the extracts procured by supercritical CO<sub>2</sub> extraction method have no effect over analyzed bacteria. In addition, the ethanolic extract of virgin leaves has been influential over bacteria. However, apart from these, it has also been observed that the other pure, ethanolic, methanolic and sodium bicarbonated extracts of both worked and raw leaves have an effect upon different bacteria.

In the predilution diffusion experiment, although sodium bicarbonated extract has indicated a 12 mm zone diameters around *K. pneumoniae* ATCC 700603 origin, it has been identified as 10 mm in the 50% dilution and 17 mm in 75% dilution. Additionally the sodium bicarbonated extract of worked leaf has played a role of a 12 mm zone diameters around *E. coli* ATCC 25922 origin, while it has been observed as 9 mm in 25% dilution, 18 mm in 50% dilution and 20 mm in 75% dilution.

It has been a surprising result that the measured after dilution zone diameters are larger than the ones in the predilution disc diffusion experiments.

November 2017, 63 pages.

**Keywords:** *Hippophae rhamnoides* L., Antibacterial activity, Leaf extract, Sea buckthorn



## 1. GİRİŞ

Bakteriyel enfeksiyonlar tarih boyunca bitkiler, hayvanlar ve insanlarda çeşitli hastalıkların oluşmasına, insan, hayvan ve bitkilerde ciddi sağlık problemlerine, ölümlere ve ciddi ekonomik kayıplara da neden olan dünya genelinde önemli bir sorundur.

Bakteri enfeksiyonlarına karşı etkili tedavi yöntemi Alexander Fleming tarafından 1928 yılında penisilin antibiyotiğinin bulunması ile başlamıştır (Gaynes, 2017). İlerleyen dönemlerde yeni bulunan antibiyotiklerle enfeksiyon tedavileri gerçekleştirilmiştir. Antibiyotik kullanımının enfeksiyonlar için çözüm olacağı umudu, zaman içerisinde bakterilerin gösterdiği direnç, sentetik antibiyotiklerin yan etkileri gibi nedenlerle oldukça azalmıştır. Günümüzde ise antibiyotiğe dirençli bakteri sayısı artmakta ve bu durum tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Veriler dünyada dirençli bakteriler tarafından enfekte olanların sayısının arttığını ve antibiyotik direncinin birincil tehdit haline geldiğini, Amerika’da yayınlanan “Newsweek” dergisi, 18 Ekim 2013 tarihli kapak sayfasında antibiyotiklerin aşırı kullanımına bağlı olarak tedavi edilemeyen süper mikropların dünya genelinde yayılmaya başladığına değinerek “İlaçlar İşe Yaramıyor” başlığını kullanmıştır. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı akılcı antibiyotik kullanımı bilgilendirme toplantısı düzenlemekte, gereksiz ve yanlış antibiyotik kullanımına karşı bilgilendirmeler yapmaktadır <sup>1</sup>.

Uzmanlar antibiyotiklerin yoğun, yanlış ve gereksiz kullanımı sonucu çoklu dirençli bakteri enfeksiyonlarının ortaya çıkması ve önceden tedavisi mümkün olan enfeksiyonlardan insanların ölebileceği bir döneme girildiğini belirtmektedirler. Bulaşıcı ve öldürücü özelliklerinden dolayı süper bakteriler olarak adlandırılan antibiyotik dirençli bakteriler birinci sırada hastane, ikinci sırada toplum enfeksiyonu etkenleridir. İleri derecede ilaçlara dirençli süper bakterilerle oluşan enfeksiyonlar tedavi edilememekte, hastalar kaybedilmektedir (Akyar, 2010). Bu nedenle, bu bakterilere etkili olabilecek yeni antibiyotiklerin, antibakteriyel ürünlerin geliştirilmesi için büyük çaba sarf edilmektedir (Akyar, 2010).

---

<sup>1</sup>[http://www.akilciilac.gov.tr/?page\\_id=1107](http://www.akilciilac.gov.tr/?page_id=1107)

Hastane enfeksiyonları tüm sağlık kuruluşlarının en önemli sorunudur. Hastane enfeksiyonları ile ilgili ilk bilgiler 1800' lü yılların ortalarında Semmelweis tarafından bildirilmiştir ve günümüzde de devam etmektedir (Bakır, 2006).

Hastane enfeksiyonları etkenleri içinde *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis* önemli klinik patojenlerdendir. Çoklu antibiyotik direnci gösteren enfeksiyonlardan sorumlu olan çoğul antibiyotik direnci ve enfeksiyonlarında yüksek ölüm oranı ile önem taşımaktadır (Arısoy, 2011).

*Staphylococcus aureus* suşlarında penisilin direnci oranı sadece %1 iken 5 yıl sonra bu oran %38'e ulaşmış, vankomisine azalmış duyarlılıktan söz edilmeye başlanmıştır (Baştürk, 2005).

*Pseudomonas aeruginosa* Gram negatif basiller içinde en sık hastane enfeksiyonu etkeni olarak yer alan bakteridir. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının önemi başlı başına ölüm ile ilişkili bir risk faktörü olmasındır (Baştürk, 2005).

Gastrointestinal sistemde doğal olarak bulunan *Enterococcus faecalis*, yakın zamanlara kadar enfeksiyon oluşturma potansiyeli düşük bakteriler olarak kabul edilmekteyken, günümüzde yüksek düzeylerdeki antibiyotik direnci ve bu patojenin yoğun antibiyotik kullanılan ortamlarda canlı kalabilmesi önemli hastane enfeksiyonu etkenleri arasında yer almasını sağlamaktadır (Schaberg ve diğ., 1991; Papanicolaou ve diğ., 1996; Eliopoulos, 1997).

*Klebsiella pneumoniae*, başta bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar olmak üzere hastane içi enfeksiyonların ana nedenidir. Karbapenemlere dirençli suşların ortaya çıkması, enfeksiyonu kritik hale getiren az tedavi seçeneği bırakmıştır (Snitkin ve diğ., 2012).

*Escherichia coli* daha çok toplum kökenli üriner sistem enfeksiyonlarından sorumlu olmakla birlikte, hastanede yatan, altta yatan ağır hastalığı olan hastalarda hastane enfeksiyonu etkeni de olabilmektedir (Baştürk, 2005).

Çoklu antibiyotik direncine sahip bakterilerin (Süper bakteriler) gösterdikleri direnç klinik ortamlarda ve toplumda hızla artmaktadır. Yeni geliştirilen antibiyotiklerin büyük bir çoğunluğunun mevcut sentetik ilaçların modifikasyonları olması ve bakterilerin hızla direnç göstermesi, yeni çözüm arayışları gerektirmektedir. Bu amaçla süper bakterilerin gösterdiği dirence etkili olabilecek çeşitli bitkisel ve hayvansal ekstratler araştırılmaktadır. Bunlardan



bazıları oldukça umut vericidir: Kanguru sütünden elde edilen ve daha deneme aşamasında olan, penisilinden yüz kat güçlü, peptid yapılı antibiyotiğin metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* spp., *Proteus vulgaris* ve *E. coli*' ye (Akyar, 2010), *Lucilia sericata* adlı sineğin kurtçuklarından elde edilmiş antibiyotiğin *Escherichia coli* ve *Clostridium difficile*' e (Bexfield ve diğ., 2004), yeşil çay tüketiminin süper bakteriler için kullanılan antibiyotiklerin etkisini üç kat arttırmasına yardımcı olabileceği (Kassem, 2008) gösterilmiştir.

Enfeksiyonları tedavi etmek için bitkiler ve bunlardan hazırlanan preparatlar kullanılması, dünya nüfusunun büyük bir kesiminde folklorik olarak halen kullanılmakta ve çalışmalar bu bitkilerin kullanımını desteklemektedir. Günümüzde çoklu antibiyotiklere direnç gösteren süper bakteriler, antibiyotik kullanımı ile ilgili mevcut sorunlar antimikrobiyal özelliklere sahip bitkiler üzerine olan ilgiyi yeniden çekmektedir. Tıbbi bitkilerde bulunan birçok bileşiğin, antimikrobiyal, allopatik, antioksidan ve biyolojik düzenleyici özellikleri ile biyolojik açıdan aktif olduğu bildirilmiştir (Smid ve Gorris, 1999). Bitkiler, sağlayabilecekleri benzersiz kimyasal çeşitlilik nedeniyle yeni ilaç keşfi için sınırsız fırsatlar sağlayan çok çeşitli bileşikler içerir (Cos ve diğ., 2006). Bu bileşikler, geniş bir biyolojik aktivite, antimikrobiyal aktivite ve antioksidan özellik sergilemektedir. Dolayısıyla son yıllarda insan sağlığında kullanılacak doğal kaynaklardan yeni biyoaktif bileşiklerin tanımlanmasına yönelik çalışmalar dikkat çekmektedir.

Yalancı iğde tohum ekstraktının *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* ve *Yersinia enterocolitica*' ya karşı antibakteriyal aktivitesi daha önce bildirilmiştir (Negi ve diğ., 2005; Chauhan ve diğ., 2007).

Yalancı iğde yaprak ekstreleri *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis* gibi bakterilere karşı engelleyici etki göstermiştir. Ayrıca, tohum yağı *Escherichia coli*' ye karşı antimikrobiyal etki göstermiştir (Kaushal, 2011).

Yalancı iğdenin tüm bölümleri çeşitli biyolojik aktif bileşikler açısından zengindir. Yaprak özleri belirgin antibakteriyel, antiviral ve antitümör etki göstermektedir (Vermenichev, 1971; Tsybikova, 1983).

Yalancı iğde bitkisinin antibakteriyel aktivitesi taninler, fenolik bileşikler, polifenoller ve flavonoidler gibi biyoaktif bitki bileşiklerinden kaynaklanmaktadır. Bu biyoaktif bileşikler arasında fenolikler bakterilere karşı en etkili aktif bileşiktir (Ouattara ve diğ., 2011).

Yalancı iğde yapraklarının sulu ve hidroalkolik ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesi, standart bir antibiyotik olan ampisilin ile karşılaştırılmasının yapıldığı bir çalışmada, her iki ekstraktın klinik patojen olan *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *E. faecalis*'e karşı belirgin antibakteriyel etki gösterdiği saptanmıştır. Gözlenen antibakteriyel aktivite, Yalancı iğde yaprak özütlerinin, özellikle de kuersetin türevlerinin fenol bileşenlerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, bu çalışmada gözlenen antibakteriyel aktivite Yalancı iğdenin yara iyileşmesi, cilt bozuklukları ve diğer bulaşıcı hastalıklar için geleneksel kullanımlarını haklı çıkarmıştır (Kaur ve Arora, 2009).

Çalışmanın amacı güçlü antiviral, antibakteriyel özelliklere sahip olan Yalancı iğde yapraklarının sulu ekstreleri ile süperkritik karbondioksit ekstraksiyonuyla elde edilen ekstrelerin klinik patojen olan *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis* bakterilerine karşı inhibe edici özelliğinin araştırılmasıdır.

## 2. GENEL KISIMLAR



Şekil 2.1: Yalancı iğde bitkisi.

“Fotoğraf: Onur Yanar”

### 2.1. YALANCI İĞDE TAKSONOMİK ÖZELLİKLERİ

**FAMİLYA:** *Elaeagnaceae*

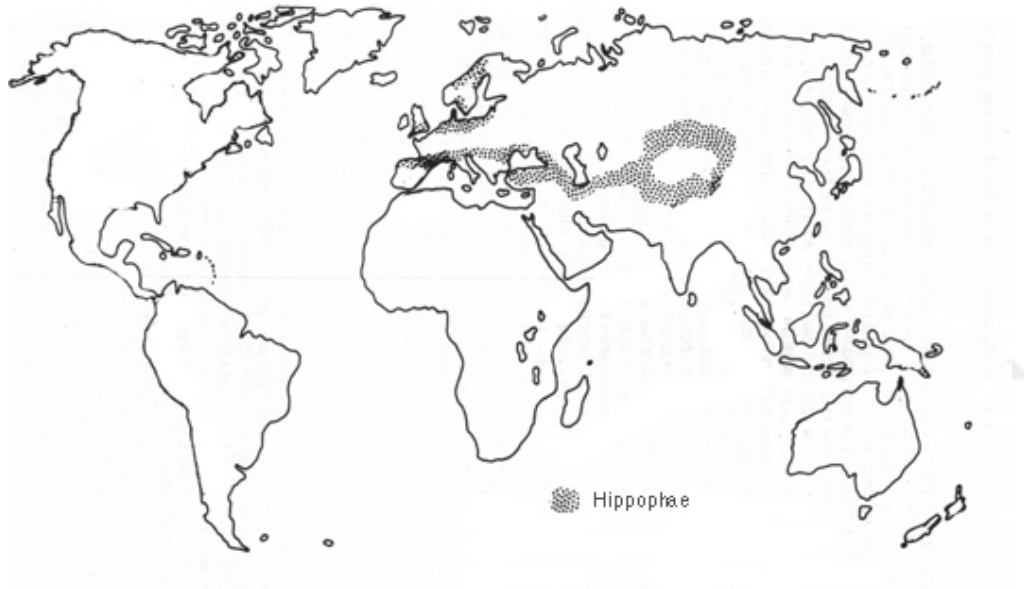
**LATİNCE ADI:** *Hippophae rhamnoides* L.

### 2.2. YALANCI İĞDE BİTKİSİ GENEL ÖZELLİKLERİ

Yalancı iğde (*Hippophae*), *Elaeagnaceae* (İğdegiller) familyasının üyesidir. Günümüzde yeni eklemelerle birlikte 7 tür ve 9 alttür sahip olan *Hippophae* cinsi (Sun ve diğ., 2003), Türkiye'de *Hippophae rhamnoides* L. ssp. *caucasica* Rousi ile temsil edilmektedir.

Yalancı iğde, Antik Yunanistan'da atların yemine eklenerek, atların gürbüzleşip, parlak tüylere sahip olmasını sağlamasından dolayı, Latince “Parlayan At” anlamına gelen ‘*Hippophae*’ adı ile temsil edilmektedir (Lu, 1992).

Yalancı iğde uzun dar yapraklara, drupa benzeri sarı-turuncu-kırmızı meyvelere sahiptir. Dikenli, azotu fikse eden, yaprak döken çalı formunda, soğuğa dayanıklı, genellikle kuru kumlu bölgelerde yetişen Avrupa ve Asya'ya özgü (Rousi, 1971) olmakla birlikte Kuzey, Güney Amerika ve Kanada'da da üretilen önemli bir tıbbi bitkidir (Suomela, 2006; Kaushal, 2011). Avrupa ve Asya'da çeşitli ülkelerde kültürü de yapılmaktadır. Nepal, Pakistan, Myanmar, Rusya, İngiltere, Almanya, Finlandiya, Romanya, Fransa (Khan ve diğ., 2010). Türkiye'de Yalancı iğde, Kuzey ve Doğu Anadolu'da yaygındır ve yerel olarak Yalancı iğde, Cıdırgan, Dijirgan, Cıdılık veya Sincan Çalısı olarak bilinmektedir (Tayhan, 1997).



Şekil 2.2: *Hippophae* sp. doğal dağılımı (Silvester, 1977).

### 2.3. YALANCI İĞDE BİTKİSİNİN YAPRAKLARI

Yalancı iğdenin tüm parçaları, karotenoidler, tokoferoller, steroller, flavonoidler, lipidler, vitaminler, taninler, mineraller vb. de dahil olmak üzere çok sayıdaki biyoaktif bileşiklerin iyi bir kaynağı olarak kabul edilmektedir. Doğal antioksidan olarak geniş kullanımına katkıda bulunmaktadır. Fenol ve flavonoid içeriği, Yalancı iğdenin meyvelerinde ve kabuklarında zengindir (Chawla ve diğ., 2007; Upendra ve diğ., 2008).

Yalancı iğde bitkisinin yaprakları da zengin fenolik içeriğe sahiptir. Yapraklardaki bu maddeler, flavonoller, lökoantosiyanidin, (-) epikateşin, (+) gallokateşin, (-) epigallokateşin ve

gallik asit ile temsil edilmektedir (Suryakumar ve Gupta, 2011; Upadhyay ve diğ., 2009). Taze Yalancı iğde yapraklarının toplam karotenoidler (26.3 mg/100g) ve toplam klorofil (98.8 mg/100g) yönünden zengin olduğu ve kurutulmuş yapraklarda biyoaktif bileşiklerin yaygın olarak tüketilen sebzelere göre daha fazla miktarlarda korunduğu tespit edilmiştir (Guan ve diğ., 2005). Yalancı iğde yaprakları protein (%20.7), amino asitler (%0.73 lizin, %0.13 metiyonin ve sistin), mineraller (Ca, Mg ve K), folik asit, kateşinler, esterifiye edilmiş steroller, triterpenoller ve isoprenoller içermektedir (Biswas ve diğ., 2010; Kumar ve diğ., 2011).

Aras ve diğ. (2016) işlenmiş Yalancı iğde yapraklarının sulu ve metanolik ekstraktlarındaki antioksidan kapasitesi ve fenolik profilini belirlemiştir (Tablo 2.1). Araştırma sonuçları işlenmiş yapraklarda bulunan fenolik madde miktarının daha fazla olduğunu ve antioksidan kapasitesinin işlenmemiş yapraklara kıyasla daha yüksek olduğunu göstermektedir.

**Tablo 2.1:** Yalancı iğde yapraklarının demleme ve metanolik ekstraksiyonundaki Fenolik profil (Aras ve diğ., 2016).

İçerik	Sulu ekstraksiyon (Demleme)	Metanolik ekstraksiyon
Rutin	2531±90 (µg/g)	5211±105 (µg/g)
Quercetin-3-O-galactoside	771±41 (µg/g)	1524±57 (µg/g)
Kaempferol	40±9 (µg/g)	128±10 (µg/g)

**Tablo 2.2:** Toplam Fenolik, Flavonoid madde miktarı ve antioksidan kapasitesi (Aras ve diğ., 2016).

Ethanolik Ekstrakt	Toplam Fenolik (mg GAE/g)	Toplam Flavonoid (mg RE/g)	DPPH (mg TE/g)	CUPRAC (mg TE/g)
Yaprak	75.9 ± 6.5	74.0± 3.0	89.6 ± 2.0	538.5 ± 34.8

Tablo 2.3: Yalancı iğde yaprak içeriği (Zhang, 1990).

<b>Hippophae Yaprak İçeriği</b>			
<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>	<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Protein	18.39%	Kateşin	0.362 % (w/w)
Yağ	3.94%	Epikateşin	0.233 % (w/w)
Lif	12.50%	Epigallokateşin-3-gallat	< 0.001 % (w/w)
Karbonhidratlar	65.31%	Gallokateşin gallat	< 0.001 % (w/w)
		Epikateşin-3-gallat	0.243 % (w/w)
Folic Asit, Total	0.372 mg/100 g	Kateşin gallat	0.0308 % (w/w)
B3 (Niasin)	5.96 mg/100 g	<b>Total Kateşin</b>	<b>1.16 % (w/w)</b>
Vitamin B1 (Tiamine Hidroklorit)	0.0623 mg/100 g	Kateşingallat	0.0308 % (w/w)
Vitamin B2 (riboflavin)	0.285 mg/100 g	<b>Kampesterol</b>	<b>0.00206 % (w/w)</b>
Vitamin B5 (Pantotenik asit)	4.86 mg/100 g	Stigmasterol	0.0404 % (w/w)
$\alpha$ -Tocopherol	64.3 mg/100 g	$\beta$ -sitosterol	0.177 % (w/w)
$\beta$ -Tocopherol	<1.00 mg/100 g	<b>Total Phytosterols</b>	<b>0.219 % (w/w)</b>
$\gamma$ -Tocopherol	5.07 mg/100 g	Kalsiyum	0.64%
$\delta$ -Tocopherol	<1.00 mg/100 g	Bakır	7ppm
<b>Total Vitamin E (Tocopheroller)</b>	<b>69.4 mg/100 g</b>	Demir	0.01%
Epigallokateşin	0.292 % (w/w)	Magnezyum	0.19%

#### 2.4. YALANCI İĞDE YAPRAKLARININ BAKTERİLERE KARŞI ETKİSİ

*Hippophae* yapraklarında bulunan flavonoidler, fenolik asit ve tanin gibi fenolik bileşikler, güçlü antioksidan ve antibakteriyel aktivite gösteren önemli bir fitokimyasal gruptur (Pietta, 2000; Mayer ve diğ., 2008; Saleem ve diğ., 2010).

Bitki esansiyel yağlarının ve özütlerinin, çok yönlü bileşimi ve düşük toksisitesine bağlı olarak, sahip oldukları geniş antimikrobiyal spektrum, onları gıda muhafazasında yararlanılabilecek potansiyel doğal ajanlar haline getirmiştir (Conner, 1993). Yalancı iğde tohum ekstraktının *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* ve *Yersinia enterocolitica*' ya karşı antimikrobiyal aktivitesi olduğu ayrıca Yalancı iğde meyve ve yapraklarının metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*' a karşı antibakteriyel etkinlik gösterdiği saptanmıştır (Negi ve diğ., 2005; Muhammad ve diğ., 2016).

Tıbbi açıdan önemli bakteri türlerine karşı test edilen Yalancı iğde yaprakları *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus*' un üremesini durdurarak antibakteriyel etki gösterdiği belirtilmiş, bitkinin güçlü antioksidan ve geniş spektrumlu antibakteriyel özelliklere sahip olduğu saptanmıştır (Kumar ve diğ., 2013). Yalancı iğde yapraklarının, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis*' i inhibe edici özelliği yanı sıra tohum yağının da *E. coli* üzerinde antibakteriyel özelliği olduğu belirtilmiştir (Suryakumar ve Gupta, 2011; Kaushal ve Sharma, 2011).

*H. rhamnoides* yaprak ve kabuğunun petrol eteri ekstresi, mikroorganizmalara karşı hiçbir aktivite göstermezken, tohumuyla yapılan çalışmalar sonucunda metanolik ekstraktların *S. aureus* ve *E. aerogenes* için çok iyi bir etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Bunun yanısıra, yaprak ve kabuğun diğer ekstraktları *E. coli*' yi etkilememiştir. *rhamnoides* türü yanısıra diğer *Hippophae* türlerinin de antibakteriyel özellikleri belirlenerek daha kapsamlı bulgular elde edilmek istenmiş ve bu amaçla *H. salicifolia* yaprak, tohum, kabuk ve posasının metanol, aseton, kloroform ve petrol eteri ekstraktlarının, *S. aureus*, *E. aerogenes*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *E. coli*' yi değişik derecelerde inhibe ettiği görülmüştür (Negi ve diğ., 2005).

*H. rhamnoides* yapraklarının klinik izolatlarla karşı etkinliğini araştıran çalışmalar sınırlı sayıdadır. Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA), Metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA), *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* klinikte enfeksiyon etkeni olarak en sık izole edilen bakteriler olarak bilinmektedir.

#### **2.4.1. *Staphylococcus aureus* (Metisilin Duyarlı Ve Metisilin Dirençli *S.aureus*)**

Doğada yaygın olarak bulunan hareketsiz, sporsuz, fakültatif anaerob Gram pozitif bakterilerdir (Aktener ve Bilkay, 1993; Amalaradjou ve diğ., 2009). Doğal kaynağı insan olan *S. aureus*, ağız, üst solunum yolları, intestinal sistem ve genitoüriner sistemin normal florasında bulunur (Alacam, 2000). Deride, burun mukozasında kolonize olan bu bakteri doku yaralanmalarında kana ve doku içine karışarak virülans etki gösterebilmekte ve enfeksiyona yol açabilmektedir (Blackburn ve diğ., 2000; Athanassiadis ve diğ., 2007).

Stafilokoklardan sadece *S. aureus* koagülaz enzimi salgılar ve bu özellik tür ayrımında önemli rol oynar. Koagülaz enzimi plazmada bulunan protrombini aktive ederek trombin ve fibrin oluşumuna yol açan önemli bir virülans faktörüdür (Amireddy ve diğ., 2011; Ari ve diğ., 2004). Bunun yanısıra, lipaz, hyalüronidaz, stafilokinaz, penisilinaz, katalaz, koagülaz ve deoksiribonükleaz gibi birçok enzim salarak *S. aureus* komşu dokulara yayılımı kolaylaştırır (Ari ve Erdemir, 2005; Arias ve diğ., 2010). Yoğun bakım ünitelerinde gözlemlenen hasta sayılarının ve invazif işlemlerin artması, protez materyallerinin, geniş spektrumlu antibiyotiklerin ve immünosupresif ajanların yaygın kullanımına bağlı olarak *S. aureus* nazokomiyal ve toplumdan edinilmiş enfeksiyonların önemli etkenleri arasında yerini almıştır (Aamdal ve Petersen, 2004; Accorsi ve diğ., 2008). Bakteri toksinleriyle toksik şok sendromu, haşlanmış deri sendromu, yara enfeksiyonları, bakteriyemi, endokardit, pnömoni, osteomyelit ve septik artrite sebep olmaktadır (Ari ve Erdemir, 2005; Amireddy ve diğ., 2011).

*S. aureus*' un en belirgin özelliği ise antibiyotiklere karşı kısa sürede direnç geliştirmesidir. Metisilin direnci *S. aureus*' un geliştirdiği en önemli dirençtir. Metisilin dirençli *S. aureus* türleri kısaca MRSA olarak belirtilmektedir. Bu dirençten sorumlu olan mecA genidir. Suşların özelliği çoklu ilaç direnci göstermesi ve hastane ortamında bulunmasıdır. Bakteride mecA geninin kodladığı PBP2a, hücre membranına bağlı ve transpeptidasyon reaksiyonunu kataliz ederek metisiline karşı direnç kazandırır. Beta-laktam antibiyotiklerin varlığında PBP2a fonksiyonunu sürdürür ve bakteri yaşamını devam ettirir (Breeuwer ve Abee, 2000; Ari ve Erdemir, 2005).

Metisiline direnç gösteren *S. aureus* bakterilerinin yanı sıra metisiline duyarlı olan ve MSSA olarak belirtilen *S. aureus*' lar da bulunmaktadır. MSSA izolatlarında beş adet penisilin bağlayan protein (PBP) bulunmaktadır. MRSA izolatlarında ise bunlara ek olarak "PBP2a" olarak adlandırılan farklı bir PBP vardır. PBP2a, diğerlerinden farklı olarak beta-laktam yapısındaki antibiyotiklere karşı oldukça düşük afinite gösterir ve böylece beta-laktam grubu antibiyotiklerin varlığında, yüksek afiniteli PBP'lerin fonksiyonunu görerek peptidoglikan sentezini devam ettirir (Deurenberg ve diğ., 2007; Deurenberg ve Stobberingh, 2008).



Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300 ve metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA) ATCC 25923 standart kökenleri klinik araştırmalarda en sık kullanılan standart klinik kökenlerdir.

#### 2.4.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Doğada, toprakta, sularda ve hastane ortamlarında insan için fırsatçı patojen olan, sporsuz, zorunlu aerob, Gram negatif bir organizmadır. En iyi 37 °C'de üreyebilir. Farklı koşullara karşı kolay adapte olabilmelerinden dolayı üremeleri oldukça kolaydır. Hastane ortamında cerrahi ve yanık servislerinde organik kalıntıların bulunmasına bağlı olarak uzun süre canlı kalabilen organizmalardır. Diğer patojenlere kıyasla kimyasal dezenfektanlara karşı daha dirençlidir. *P. aeruginosa*, proteolitik enzim, letal ekzotoksin ve enterotoksin özellikli hücre dışı salgılarının olması ve fırsatçı patojen bir bakteri olmasından dolayı endokardit, bakteriyemi, menenjit, solunum sistemi enfeksiyonları, yanık ve yara enfeksiyonları, kulak ve göz enfeksiyonları gibi birçok hastalığa neden olmaktadır (Frobisher, 1968). Merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarından menenjit veya beyin absesine, nadir olarak gastrointestinal sistem enfeksiyonlarına, kemik eklem enfeksiyonlarına, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına özellikle kistik fibrozularda solunum sistemi enfeksiyonlarına ve sepsise neden olduğu bilinmektedir (Erdem, 1999; Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

#### 2.4.3. *Escherichia coli*

*E. coli* sağlıklı bireylerin bağırsak florasının daimi üyesidir. Gram negatif, sporsuz, fakültatif anaerob bir bakteridir. 37 °C'de nötral pH varlığında üreme göstermektedir (Bilgehan, 2000). *E. coli* sağlıklı insanların normal bağırsak florasında bulunmasının yanı sıra bazı türleri bağırsak ve bağırsak dışında enfeksiyonlara neden olabilmekte ve hastalık oluşturmaktadır. Canlının savunma gücünün azaldığı durumlarda doku ve kana yayılarak enfeksiyona neden olmaktadır. Enterotoksijenik *E. coli*, özellikle 2 yaş altı çocuklarda bakteriyel diyarenin sebebidir ayrıca Enteroinvazif *E. coli*, çocuklarda ve yetişkinlerde dizanteriform sürgünlere, Enterohemorajik *E. coli*, çocuklarda akut kanlı ishal devamında böbrek yetmezliğine sebep olur. Enteropatojenik *E. coli*'nin çocuklarda salgın yapma potansiyeli görülmektedir. Enteroaggregatif *E. coli* ise enterotoksin ya da invazyon yapmayan kronik diyare sebebi olabilen bir virotiptir (Erdem, 1999; Bilgehan, 2000). *E. coli*, bağırsak dışına çıkarak dokulara

geçmesiyle birlikte çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bunların; üriner sistem enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, yeni doğan menenjit, bakteriyemi, sepsis, dizanteri, hastane kaynaklı pnömoni gibi hastalıklar olduğu görülmektedir (Robins ve Hartland, 2002; Murray ve diğ., 2009).

#### **2.4.4. *Klebsiella pneumonia***

Bu bakteri *Enterobacteriaceae* ailesinden olup bağırsak mikrobiyotasında yer almakta ve vücudun her yerinde değişik enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Hastane enfeksiyonlarına sebep olan fırsatçı patojenlerin başında gelmektedir. Gram negatif, kapsüllü, fakültatif, anaerobik hareketsiz bir bakteridir. Üremesi için en uygun sıcaklık 37°C' de olan (Erdem, 1999; Bilgehan, 2000) ve pH 7 de iyi üreyen bakterilerdir (Bilgehan, 2000). *K. pneumonia*' nın polisakkarit yapısında kapsül ve somatik antijenleri bulunur. Serolojik tiplendirmeleri bu antijenlere göre yapılmaktadır. *K. pneumonia*, üst solunum enfeksiyonlarının sonrasında pnömoniyeye yol açmaktadır. *K. pneumoniae* ile lobar pnömoni, alkoliklerde ve diabetiklerde genellikle üst solunum yollarında kolonize olmuş bakterilerin aspirasyonu sonucu oluşmaktadır (Bilgehan, 2000). Menenjit, safra kesesi enfeksiyonu, çeşitli organlarda abse oluşumu görülmektedir (Eisenstein ve diğ., 2000, Toreci, 2002; Akalın, 2003). *K. pneumonia*' nın özellikle hastane suşları antibiyotiklere çok duyarlı bakterilerdir. *K. pneumonia*' de aminoglikozidleri modifiye eden enzimler bulunur. Bu enzimler gentamisin, tobramisin, hatta amikasin gibi aminoglikozidlere de yüksek oranda direnç göstermektedir (Arman, 2001; Toreci, 2002; Akalın, 2003). Bu durum tedavide güçlükler neden olmaktadır.

#### **2.4.5. *Enterococcus faecalis***

Gram pozitif, fakültatif anaerop koklardan olup oksijen varlığında ya da yokluğunda varlığını sürdürebilmektedir (Roças ve diğ., 2004). Karbonhidrat, alijinin, laktat, sitrat ve keto asit türevini parçalayabilir, yüksek pH (9.6) ve tuz konsantrasyonlarında canlılığını koruyabildiği görülmektedir (Gilmore, 2002; Tendolkar ve diğ., 2003). 10-45 °C arasındaki sıcaklıklarda çoğalabilmekte ve 60 °C'de 30 dakika boyunca hayatta kalabilmektedir (Tendolkar ve diğ., 2003). Bu yüzden zor çevresel koşullara dayanıklılık gösterir. *E. faecalis* insan bağırsak mikrobiyotasının normal bir üyesidir. Kadınların genital bölgesinde ve ağız boşluğunda da düşük oranda bulunmaktadır (Koch ve diğ., 2004). Bakteriyemi, bakteriyel menenjit ve idrar yolları gibi birçok hastalığa yol açan *E. faecalis* hastane enfeksiyonlarının en büyük

sebeplerinden biridir (Jett ve diğ., 1994). *E. faecalis*' in lenfositlerin fonksiyonlarını baskılayarak endodontik başarısızlıklara neden olduğu düşünülmektedir (Lee ve diğ., 2004). Bu yüzden kanal tedavisi yapılmış dişlerde görülen başarısızlıktan sorumlu bakteriler arasında en iyi bilinenidir (Molander ve diğ., 1998). Ortamda besin yokluğunda dahi *E. faecalis* canlılığını sürdürebilmekte ve antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirmektedir.

İnsanda oluşturdukları enfeksiyonlarla bilinen ancak geliştirdikleri antimikrobiyal direnç nedeniyle son yıllarda klinikte büyük sorun haline gelen bu bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıkları birçok yöntemle saptanabilmektedir. Bu yöntemler hakkında aşağıda kısaca bilgiler verilmiştir.

## **2.5. ANTİBİYOTİKLERE KARŞI DUYARLILIĞI SAPTAMA YÖNTEMLERİ**

Klinik örneklerden üretilen patojen bakterilerin bir maddeye karşı duyarlılığını saptamak için başta disk difüzyon yöntemi olmak üzere, agar dilüsyon yöntemi veya sıvıda mikrodilüsyon yöntemi tercih edilmektedir.

### **2.5.1. Disk Difüzyon Yöntemi**

Antibiyotiklere duyarlılığın saptanmasında sıklıkla disk difüzyon yöntemi kullanılmaktadır. KirbyBauer tarafından geliştirilmiş olan bu yöntemde duyarlılığı araştırılan organizma besiyerine inoküle edilir. Bu amaçla; belli miktarlarda antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler, test edilecek olan mikroorganizmanın inoküle edildiği katı besiyerlerine yerleştirilir. Disklerde bulunan antibiyotik kısa süre içinde sonra çözünüp agara difüze olurken, inoküle edilen mikroorganizma da üremeye başlar. 18-24 saatlik inkübasyon süresinden sonra ilacın inhibitör konsantrasyonlarının sağlandığı diskin çevresinde üreme görülmez. Mikroorganizma ilaca ne kadar duyarlı ise, diskin etrafında oluşan inhibisyon zonu o kadar geniş olacaktır. İnhibisyon zonunun çapı mm şeklinde ölçülerek, standart zon tablolarına göre değerlendirmeler yapılır ve mikroorganizmanın kullanılan antimikrobik ajanlara karşı duyarlılık durumu belirlenir (Gür, 2016).

### **2.5.2. Agar Dilüsyon Yöntemi**

Bu yöntem, test edilen antibiyotiğin bakteriyi inhibe eden en düşük konsantrasyonu saptamak için kullanılır. Değişik konsantrasyonlarda sulandırılan antibiyotikler agar içine eklenerek petri

kutularına dökülür. Mueller-Hinton agar ile hazırlanan petrilere antibiyotiğin farklı konsantrasyonları bulunur. 0.5 McFarland bulanıklığında bir bakteri süspansiyonu hazırlanır ve steril öze ile 1-2 ml petrilere inoküle edilir. İnoküle edilen plaklar 35 °C de 18-24 saat süreyle inkübe edilir. MİK değeri üremenin inhibe olduğu en düşük antibiyotik konsantrasyonudur (Mahon ve diğ., 2014).

### 2.5.3. Tüp Dilüsyon Yöntemi

Tüp dilüsyon "makro" ve "mikro" olmak üzere iki şekilde uygulanabilmektedir. Her iki yöntemin prensibi aynıdır. Makrodilüsyonda test tüpleri, mikrodilüsyonda ise "U" ya da "V" tabanlı mikropatlar kullanılmaktadır. Tüp dilüsyon metodunda besiyeri olarak katyon (kalsiyum ve magnezyum) eklenmiş Mueller Hinton besiyeri kullanılır. Test edilecek olan antibiyotikler önce özel çözücülerinde içinde hazırlanır, devamında bu sıvı besiyerinde iki kat azalan sulandırılmaları yapılır. Mikroorganizmanın standart bir inokulumu ( $1 \times 10^6$  CFU / ml) hazırlanıp, antimikrobiyal ajanın çeşitli dilüsyonlarını içeren her bir tüpe eşit miktarlarda eklenir. Ayrıca antibiyotik içermeyen, üremenin göstergesi olan kontrol tüpüne de eklenir. Bakteri inoküle edilmemiş, sadece besiyeri konmuş bir tüp veya çukurda besiyeri kontrolü olarak hazırlanır. Besiyerlerinin bir gecelik 35°C de inkübasyonundan sonra bakteri üremesini gösteren bulanıklık yönünden incelenir. Bakterinin üremesini engelleyen, gözle görünür bir bulanıklığın olmadığı en düşük ilaç konsantrasyonu, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak değerlendirilmektedir (Gürgün ve Halkman, 1990).

Yukarıda anlatılan bakterilerin Yalancı iğde yapraklarından hazırlanan ekstraktlara karşı duyarlılıklarını araştıran bir çok çalışmada disk difüzyon yönteminin kullanıldığı görülmüştür (Gupta ve diğ., 2011).

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

2016/2017 yılları arasında prospektif ve deneysel olarak planlanmış ve invitro olarak yürütülmüş olan araştırmamız, Yalancı iğde yaprak ekstraktları ile “Microbiologics (Fransa)” marka *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 25923, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212 standart kökenleri ile yapıldı. Antimikrobiyal duyarlılık testlerinde Thermo Scientific™ Oxoid™ (ABD) marka boş diskler ayrıca, pozitif ve negatif kontrol olarak, Thermo Scientific™ Oxoid™ marka (ABD) imipenem ve vankomisin diskleri kullanıldı. Yalancı iğde yaprak örnekleri, ülkemizde bu bitkinin yoğun olarak bulunduğu bölgeler arasında yer alan Erzincan–Refahiye ve Sivas-Hafik’ den temin edildi.

Bu çalışmada, iğde yapraklarının ekstraksiyon işlemleri İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi botanik laboratuvarında, yalancı iğdenin bakterilere etkinliğini saptama testleri ise İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında, danışman hocalarımın gözetiminde, bizzat tarafımdan yapılmıştır.

Bitki materyali ve hazırlanması: Çalışmada Yalancı iğde yapraklarının iki ayrı formu kullanılmıştır: Erzincan - Refahiye yolu 39.88575, 38.769646 koordinatlarından Ağustos 2016 da toplanıp, güneşte kurutulan (işlenmemiş) yaprak; Sivas-Hafik 39.713093, 37.4664513,17 2015 yılı Ağustos ayında toplanan örnekler ise TR 2013/09782 no.lu patent başvurusunda kullanılan yöntemle hazırlanmış olan (işlenmiş) yaprak (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: *Hippophae rhamnoides* işlenmiş (1) ve işlenmemiş (2) yaprak genel görünüşü.

### 3.1. MALZEMELER

#### 3.1.1. Besiyerleri

##### 3.1.1.1. *Tryptic Soy Broth (TSB) Besi Yeri (BD)*

Kazein pepton	17 g
Soy pepton	3 g D(+)
Glucose	2,5 g
NaCl	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g

3 g triptic soy broth 100 cc distile suya 100 lük balonda hazırlandı ve cam tüplere koyuldu. 121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. 4 mm kalınlıkta olacak şekilde petri kutularına dağıtıldı.

Bu besiyeri bakterilerin sıvı ortamda üretilmesi için kullanıldı.

##### 3.1.1.2. *Muller Hinton Besi Yeri (BD)*

Sığır Eti Ekstraktı	2,0 g
Kazein Asit Hidrolizatı	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Agar	17,0 g

19 g besi yeri 500 cc distile su ile bir balon hazırlandı. 121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. 4 mm kalınlıkta olacak şekilde petri kutularına dağıtıldı. Bu besiyeri duyarlılık deneyleri için kullanıldı.

### 3.1.1.3. Çikolatamsı Agar Besi Yeri (BD)

Mueller Hinton besiyeri	37 g
Agar agar	15 g
Defibrine koyun kanı	50 ml
Distile su	1000 ml

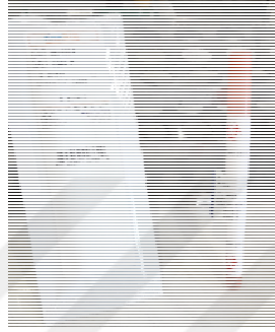
Mueller Hinton besiyeri, su ve agar karıştırılıp, ısıtılarak erimesi sağlandı. 121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi, 45 °C ye kadar soğutulduktan sonra içine % 5 oranında defibrine koyun kanı ilave edildi. Kaynar suda 2 dakika tutuldu. İyice karıştırılıp 4 mm kalınlıkta olacak şekilde petri kutularına dağıtıldı. Çikolatamsı besiyeri, Triptik soy broth ile canlandırılan standart kökenlerin pasajı için kullanıldı.



Şekil 3.2: Muller Hinton Agar Besiyeri.

### 3.1.2. Standart Kökenler

Araştırmamızda, Metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) ATCC 25923, Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 standart kökenleri kullanıldı.



Şekil 3.3: Metisilin duyarlı *S. aureus* ATCC 25923.



Şekil 3.4: Metisilin dirençli *S. aureus* ATCC 43300.





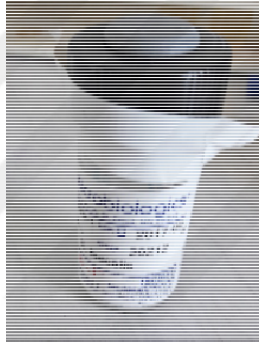
Şekil 3.5: *P. aeruginosa* ATCC 9027.



Şekil 3.6: *K. pneumoniae* ATCC 700603.



**Şekil 3.7:** *E. coli* ATCC 25922.



**Şekil 3.8:** *E. faecalis* ATCC 29212.

## 3.2. YÖNTEMLER

### 3.2.1. Yalancı İğde Ekstraktlarının Hazırlanması

İşlenmiş ve işlenmemiş Yalancı iğde yapraklarının saf distile su, etanolik, metanolik ve sodyum bikarbonat kimyasalları ile ekstraksiyonları hazırlanmıştır (Şekil 3.9).

**İşlenmiş ve işlenmemiş Yalancı iğde yapraklarının etanol ile ekstraksiyonu;** 500 ml %70 lik (350 ml etanol 150 ml distile su) etanol hazırlandı. İşlenmiş ve işlenmemiş Yalancı iğde yaprakları 2 şer gram tartıldı ve bir falkon tüpüne koyuldu. Üzerine %70 lik 20 ml hazırlanmış olan etanol eklendi. Ultrasonik banyoda 15 dk bekletildi. Daha sonra çalkalayıcı karıştırıcı cihazına koyuldu ve 24 saat bırakıldı. 24 saatin sonunda 10 dk 4000 rpm 4 °C de santrifüj edildi. Sıvı faz başka falkona aktarıldı. Altta kalana 15 ml eklendi ve 15 dk ultrasonik banyoda

bekletilerek, 10 dk santrifüj edildi (bu işlem 2 defa tekrar edilmiştir). Toplamda 50 ml'ye tamamlandı.

**İşlenmiş ve işlenmemiş Yalancı iğde yapraklarının metanol ile ekstraksiyonu;** 500 ml %70 lik (350 ml metanol 150 ml distile su) etanol hazırlandı. İşlenmiş ve işlenmemiş Yalancı iğde yaprakları 2 şer gram tartıldı bir falkon tüpüne koyuldu. Üzerine %70 lik 20 ml hazırlanmış olan metanol eklendi. Ultrasonik banyoda 15 dk bekletildi. Daha sonra çalkalayıcı karıştırıcı cihazına koyuldu ve 24 saat bırakıldı. 24 saatin sonunda 10 dk 4000 rpm 4 °C de santrifüj edildi. Sıvı faz başka falkona aktarıldı. Altta kalana 15 ml eklendi ve 15 dk ultrasonik banyoda bekletildi. 10 dk santrifüj edildi (işlem 2 defa tekrar). Toplamda 50 ml'ye tamamlandı.

**İşlenmiş ve işlenmemiş Yalancı iğde yapraklarının sulu ekstraktının hazırlanması;** Distile suyu 90 °C ye ısıtıldı ve termometre ile ölçüldü. 2 gram Yalancı iğde işlenmiş ve işlenmemiş yaprakları tartılarak, üzerine 200 ml distile su eklendi ve 15 dk bekletildi. Daha sonra süzgece pamuk ya da maske yerleştirerek süzüldü. Sıvı kısım falkon tüpüne alınarak soğutulduktan sonra -20 °C de saklandı.

**İşlenmiş ve işlenmemiş Yalancı iğde yapraklarının sodyum bikarbonat ekstraktlarının hazırlanması;** 2 gram Yalancı iğde işlenmiş ve işlenmemiş yaprakları tartıldı. Üzerine 200 ml distile su eklenerek 15 dk bekletildi. Daha sonra filtre edilerek süzüldü. Sıvı kısım falkon tüpüne alınarak soğutulduktan sonra -20 °C de saklandı. Bu kısımda oluşan ekstraktlar S1 olarak adlandırılmıştır.



**Şekil 3.9:** Yalancı iğde işlenmiş ve işlenmemiş bitki ekstraktları.

### 3.2.2. Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyonu

İşlenmiş ve işlenmemiş Yalancı iğde yapraklarının saf, etanol ve metanol kimyasallarıyla süperkritik karbondioksit ekstraksiyon cihazıyla ekstreleri çıkarılmıştır (Şekil 3.10).

**Saf ekstraksiyon;** ilk önce işlenmiş ve işlenmemiş yapraklar tek tek özel öğütücü makine ile toz haline getirildi. Daha sonra darası alınarak hassas terazide tartılıp numunenin ağırlığı belirlendi. Cihazın vessel ünitesinde ağırlığı belirlenen öğütülmüş yaprak tozları yerleştirilip cihaza verildi. Tablo 3.1 de verilen sıcaklık, basınç ve sürede CO<sub>2</sub> yardımıyla saf ekstratlar elde edildi.

**Metanolik ekstraksiyon;** İşlenmiş ve işlenmemiş yaprak örneği toz haline getirilip, ağırlığı belirlendikten sonra metanol ile muamele edilerek Tablo 3.2 de belirtilen sıcaklık, basınç ve sürede cihaza verildi ve metanol solventiyle işlenmiş ve işlenmemiş yaprakların ekstraksiyonu gerçekleşti.



Şekil 3.10: Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu cihazı ile Yalancı iğde yaprak yağı eldesi.

**Tablo 3.1:** Yalancı iğde yaprak saf ekstraktının süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu uygulama değerleri.

Materyal	Sıcaklık °C	Basınç
Yalancı iğde işlenmiş yaprak saf ekstraktı	60 °C	200 bar
Yalancı iğde işlenmemiş yaprak saf ekstrakt	60 °C	350 bar

**Tablo 3.2:** Yalancı iğde yaprak metanol ekstraktının süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu uygulama değerleri.

Materyal adı	Sıcaklık °C	Basınç
Yalancı iğde işlenmiş yaprak metanol ekstraktı	60 °C	200 bar
Yalancı iğde işlenmemiş yaprak metanol ekstraktı	60 °C	350 bar

### 3.2.3. Hazırlanan Bitki Ekstraktlarının Disklere Emdirilmesi

OXOID marka steril boş diskler steril edilmiş bir pens aracılığıyla petri kabına alındı. Hazırlanan işlenmiş ve işlenmemiş Yalancı iğde yapraklarının farklı kimyasallarla hazırlanmış sulu ekstraksiyonları ve 5 farklı süperkritik ekstresi otoklavda 15 dk steril edildikten sonra, boş disklere, steril enjektör filtresinden geçirilerek diskler doyacak şekilde emdirildi. Emdirilen diskler steril petri kaplarında iki gün boyunca kurumaya bırakıldı.

### 3.2.4. Bakterilerin Canlandırılması

Elde edilen 5 bakteri suşu kullanma talimatına uygun olarak canlandırıldı. Açılmamış KWIK-STIK kesesi oda ısısına getirildi. Kese açılarak KWIK-STIK ünitesi çıkarıldı. Hidratasyon sıvısını serbest bırakmak için başlığın içinde bulunan KWIK-STIK tepesindeki ampülü sıkıp sıvının milin içinden geçip peleti içeren ünitenin dibine akması sağlandı. Pelet süspansiyonu homojen oluncaya kadar ezildi. Swab çubuğu derhal hidratasyon malzemesiyle iyice ıslatılıp 2

ayrı çikolata agara aktarıldı. Swab çubuğu agarın üzerinde birinci bölgeye yavaşça yuvarlandı daha sonra azaltma yöntemi ile ekime devam edildi. Besiyerleri 35 (+ 2) °C de 24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda bakterinin saf kolonileri elde edildi.

Liyofilize *E. coli* standart kökeni şişe içinde misket şeklinde olmasından dolayı öncelikle oda ısısına alındı. Steril pens ile şişeden çıkarıldı ve steril ependorf tüpüne koyuldu. Üzerine 0.5 ml' lik Tryptic soy broth konuldu. Süspansiyon homojen hale gelinceye kadar steril bir swab ile ezildi. Aynı çubuk derhal hidrasyon malzemesiyle iyice ıslatılıp 2 çikolatamsı agara ekildi. Bu agarlardan birine ekim, azaltma yöntemiyle yapıldı. Besiyerleri 35 (+ 2) °C de 24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda bakterinin saf kolonileri elde edildi.



Şekil 3.11: Bakterilerin canlandırılması işlemi.

### 3.2.5. Disk Difüzyon Yönteminin Uygulanması

*Staphylococcus aureus* (MSSA) ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 kökenlerine karşı ekstraktlarımızın etkinliği Kirby Bauer disk difüzyon yöntemiyle araştırıldı. Vankomisin ve imipenem diskleri kontrol olarak kullanıldı.

Disk difüzyonu için, 18-24 saatlik çikolatamsı agar besiyerindeki tek düşmüş bakteri kolonilerden steril serum fizyolojik içinde süspansiyon yapıldı. Süspansiyonun bulanıklığı 0.5 McFarland olarak ayarlandı. Steril bir standart öze ile bakteri süspansiyonundan üç öze alınarak Mueller Hinton agar besiyerinin yüzeyine sürüldü. Her bakteri için bu işlem ayrı ayrı

gerçekleştirildi. Diskler uygulanmadan önce, fazla nemin kaybolması için besiyerleri 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bitki ekstraktları emdirilmiş diskler, agar yüzeyine tam temas edecek şekilde ve aralarında en az 24 mm boşluk olacak şekilde steril bir pens yardımıyla yerleştirildi ve 24 saat 37 derece santigratta inkübe edildi.

Bu işlem, işlenmiş ve işlenmemiş Yalancı iğde yaprak ekstralarının dilüsyona tabi tutulmadan önce, etkili oldukları bakterileri belirlemek için kullanıldı.

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 43300 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 kökenlerinin duyarlılık deneylerine pozitif kontrol olarak vankomisin negatif kontrol olarak imipenem diski yerleştirildi.

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 kökenlerinin duyarlılık deneylerine pozitif kontrol olarak imipenem negatif kontrol olarak vankomisin diski yerleştirildi.

Vankomisin duyarlılığı E test yöntemiyle Mueller Hinton agar besiyerinde saptandı, imipenem duyarlılığı ise disk difüzyon yöntemiyle saptandı. Sonuçlar EUCAST kriterleri doğrultusunda değerlendirildi.

### **3.2.6. Dilüsyonların Hazırlanması**

Yapılan disk difüzyon yönteminden alınan sonuçlar doğrultusunda, işlenmiş ve işlenmemiş Yalancı iğde yaprak ekstralarının etkili olduğu bakteriler belirlendi ve bu ekstraktların farklı dilüsyonlarının bu bakterilere ayrı ayrı etkisini araştırmak için yukarıda anlatılan disk difüzyon yöntemi tekrar edildi.

Dilüsyon için ekstraktlarda kullandığımız distile su seçildi ve otoklavda steril edilerek hazır hale getirildi. Buzdolabında muhafaza ettiğimiz ve bakteriler üzerinde başarılı sonuç aldığımız sulu ekstraktlar ve etki ettiği bakteriler belirlendikten sonra her bir bakteri için işlenmiş ve işlenmemiş sekiz farklı bitki ekstraktının her birinden 3 farklı dilüsyon hazırlandı. Bu işlem için steril ependorf tüplerine steril enjektör filtreleriyle eklenen bitki ekstraktlarının miktarı ve steril distile su miktarları aşağıda belirtildi.

Yalancı iğde işlenmiş ve işlenmemiş yaprağı etanolik ekstraktı yüzdelerik dilüsyonları;

%25'lik dilüsyon için 2,5 ml bitki ekstraktı 7,5 ml distile su

%50'lik dilüsyon için 5 ml bitki ekstraktı 5 ml distile su

%75'lik dilüsyon için 7,5 ml bitki ekstraktı 2,5 ml distile su

Yalancı iğde işlenmiş ve işlenmemiş yaprağı metanolik ekstraktı yüzdelerik dilüsyonları;

%25'lik dilüsyon için 2,5 ml bitki ekstraktı 7,5 ml distile su

%50'lik dilüsyon için 5 ml bitki ekstraktı 5 ml distile su

%75'lik dilüsyon için 7,5 ml bitki ekstraktı 2,5 ml distile su

İşlenmiş yaprak ve işlenmemiş yaprak S1. ekstraktı yüzdelerik dilüsyonları;

%25'lik dilüsyon için 1 ml bitki ekstraktı 3 ml distile su

%50'lik dilüsyon için 1 ml bitki ekstraktı 1 ml distile su

%75'lik dilüsyon için 3 ml bitki ekstraktı 1 ml distile su

İşlenmiş ve işlenmemiş yaprak saf ekstraksiyonu için;

%25'lik dilüsyon için 0,5 ml bitki ekstraktı 1,5 ml distile su

%50'lik dilüsyon için 0,5 ml bitki ekstraktı 0,5 ml distile su

%75'lik dilüsyon için 1,5 ml bitki ekstraktı 0,5 ml distile su

Otoklavda steril hale getirilen boş disklere steril enjektörlerle emdirilen dilüe bitki ekstraktları petri kutuları içinde, 24 saat, steril oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Çikolatamsı agarda üreyen bakterilerle hazırlanan 0.5 MacFarland bulanıklığındaki süspansiyonundan steril öze ile 3 öze, Mueller Hinton agar besiyeri yüzeyine yayıldı. Üzerine yukarıda hazırlanan diskler yerleştirilerek 24 saat etüvde üremeye bırakıldı.



#### 4. BULGULAR

**DeneYlerimiz sonucunda aşağıda listelediğimiz ekstraktlar en az bir bakteriye etkili bulunmuştur.**

- Yalancı iğde işlenmiş yaprak etanolik ekstrakt,
- Yalancı iğde işlenmiş yaprak metanolik ekstrakt,
- Yalancı iğde işlenmemiş yaprak metanolik ekstrakt,
- Yalancı iğde işlenmiş yaprak sulu ekstrakt,
- Yalancı iğde işlenmemiş yaprak sulu ekstrakt,
- Yalancı iğde işlenmiş yaprak S1 ekstrakt,
- Yalancı iğde işlenmemiş yaprak S1 ekstrakt.

**DeneYlerimiz sonucunda aşağıda listelediğimiz yağlar bakterilere etkisiz bulunmuştur.**

- Yalancı iğde işlenmemiş yaprak saf yağ
- Yalancı iğde işlenmiş yaprak saf yağ
- Yalancı iğde işlenmemiş yaprak metanolik yağ
- Yalancı iğde işlenmiş yaprak metanolik yağ

**Tablo 4.1:** Yalancı iğde ekstraktlarının etkili olduğu bakteriler (Dilüsyon öncesi).

ÜRÜNLER	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922
İşlenmemiş yaprak etanolik ekstraktı	-	-	-	-	-	-
İşlenmemiş yaprak metanolik ekstraktı	+	-	-	-	-	-
İşlenmemiş yaprak saf ekstrakt	+	+	-	-	-	-
İşlenmiş yaprak metanolik ekstrakt	+	+	-	-	-	-
İşlenmiş yaprak etanolik ekstrakt	+	+	-	-	-	-
İşlenmiş yaprak saf ekstrakt	+	-	-	-	-	-
İşlenmiş yaprak S1* ekstraktı	-	+	+	-	-	+
İşlenmemiş yaprak S1* ekstraktı	-	+	+	-	-	+
İşlenmiş yaprak saf yağı	-	-	-	-	-	-
İşlenmemiş yaprak saf yağı	-	-	-	-	-	-
İşlenmiş yaprak metanolik yağı	-	-	-	-	-	-
İşlenmemiş yaprak metanolik yağı	-	-	-	-	-	-

S1.....+ : Bakteriye etkili , - : Bakteriye etkisiz

***Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300**

Kullanılan Yalancı iğde yaprak ekstraktları arasından 1. işlenmemiş yaprak metanolik ekstraktı, 2. işlenmiş yaprak metanolik ekstraktı, 3. işlenmiş yaprak etanolik ekstraktı, 4. işlenmiş yaprak saf ekstraktı ve 5. işlenmemiş yaprak saf ekstraktına *S. aureus* duyarlılık, diğer sulu ekstraktlar ve yağlara direnç göstermiştir (Tablo 4.1).

***Staphylococcus aureus* (MSSA) ATCC 25923**

Kullanılan Yalancı iğde yaprak ekstraktları arasından 1. işlenmiş yaprak metanolik ekstraktı, 2. işlenmiş yaprak etanolik ekstraktı, 3. İşlenmiş yaprak S1 ekstraktı 4. işlenmemiş yaprak S1 ekstraktı ve 5. işlenmemiş yaprak saf ekstraktına *S. aureus* duyarlılık göstermiştir. Diğer sulu ekstraktlar ve yağlara direnç göstermiştir (Tablo 4.1).

***Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603**

Kullanılan Yalancı iğde yaprak ekstraktları arasında 1. işlenmiş yaprak S1 ekstraktı ve 2. işlenmemiş yaprak S1 sulu ekstraktına *K. pneumoniae* duyarlılık göstermiştir. Diğer sulu ekstraktlar ve yağlara direnç göstermiştir (Tablo 4.1).

***Escherichia coli* ATCC 25922**

Kullanılan Yalancı iğde yaprak ekstraktları 1. işlenmiş yaprak S1 ekstraktı ve 2. işlenmemiş yaprak S1 ekstraktına *E. coli* duyarlılık göstermiş, Diğer sulu ekstraktlar ve yağlara direnç göstermiştir (Tablo 4.1).

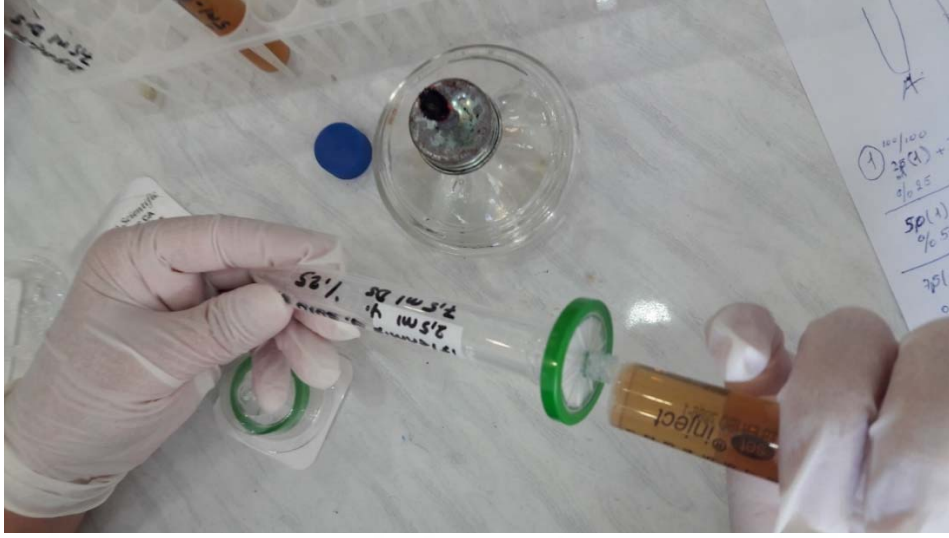
***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027**

*P. aeruginosa* Yalancı iğde sulu ekstraktlarına ve yağlara direnç göstermiştir (Tablo 4.1).

***Enterococcus faecalis* ATCC 29212**

*E. faecalis* Yalancı iğde tüm yaprak ekstraktlarına ve yağlarına direnç göstermiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 de belirtilen bakterilerin duyarlı bulunduğu ekstraktlardan %25, %50 ve %75'lik hazırlanan konsantrasyonlardaki bakteri duyarlılıkları Tablo 4.2 – 4.8 de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: Steril filtreler ile dilüsyon sıvılarının hazırlanması.

**Tablo 4.2:** İşlenmemiş yaprak metanolik ekstraktının farklı konsantrasyonlarda bakterilere etkisini gösteren zon çapları.

STANDART BAKTERİ SUŞLARI	EKSTRAKTIN DEĞİŞİK KONSANTRASYONLARDAKİ ZON ÇAPLARI			Vankomisin MIC
	%25 K*	%50 K*	%75 K*	
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	-	10 mm	11 mm	<4mg/L

\*K:Konsantrasyon, MIC: Minimal inhibisyon konsantrasyonu



Şekil 4.2: Metanolik ekstraktın *S. aureus* ATCC 43300 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu.

Tablo 4.2 ve Şekil 4.2 de de görüleceği gibi, işlenmemiş yaprak metanolik ekstraktının %25'lik konsantrasyonuna *S.aureus* ATCC 43300 dirençli bulunmuştur. %50 ve %75'lik konsantrasyonlara ise sırası ile 10 mm ve 11 mm'lik zon çapları ile duyarlı bulunmuştur.

**Tablo 4.3:** İşlenmiş yaprak metanolik ekstraktının farklı konsantrasyonlarda bakterilere etkisini gösteren zon çapları.

STANDART BAKTERİ SUŞLARI	EKSTRAKTIN DEĞİŞİK KONSANTRASYONLARDAKİ ZON ÇAPLARI			Vankomisin MİK
	%25 K*	%50 K*	%75 K*	
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	-	-	8 mm	<4mg/L
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	-	-	12 mm	<4mg/L

\*K:Konsantrasyon, MİK: Minimal inhibisyon konsantrasyonu



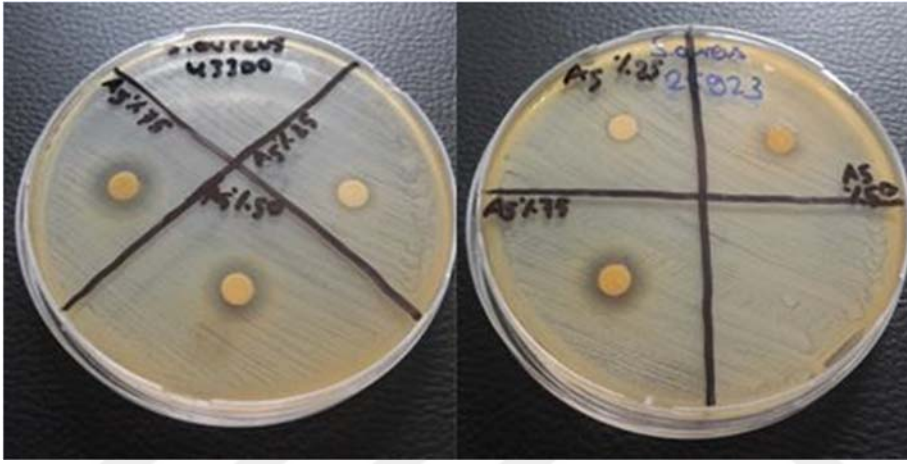
**Şekil 4.3:** Metanolik ekstraktın *S. aureus* ATCC 43300 ve *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu.

Tablo 4.3 ve Şekil 4.3 de de görüleceği gibi İşlenmiş yaprak metanolik ekstraktının %25 ve %50 lik konsantrasyonuna *S. aureus* ATCC 43300 hem de *S. aureus* ATCC 25923 kökeni dirençli bulunmuştur. %75'lik konsantrasyonlara ise sırası ile 8 mm ve 12 mm'lik zon çapları ile duyarlı bulunmuştur.

**Tablo 4.4:** İşlenmiş yaprak etanolik ekstraktının farklı konsantrasyonlarda bakterilere etkisini gösteren zon çapları.

STANDART BAKTERİ SUŞLARI	EKSTRAKTIN DEĞİŞİK KONSANTRASYONLARDAKİ ZON ÇAPLARI			Vankomisin MİK
	%25 K*	%50 K*	%75 K*	
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	-	-	11 mm	<4mg/L
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	-	-	9 mm	<4mg/L

\*K:Konsantrasyon, MİK: Minimal inhibisyon konsantrasyonu



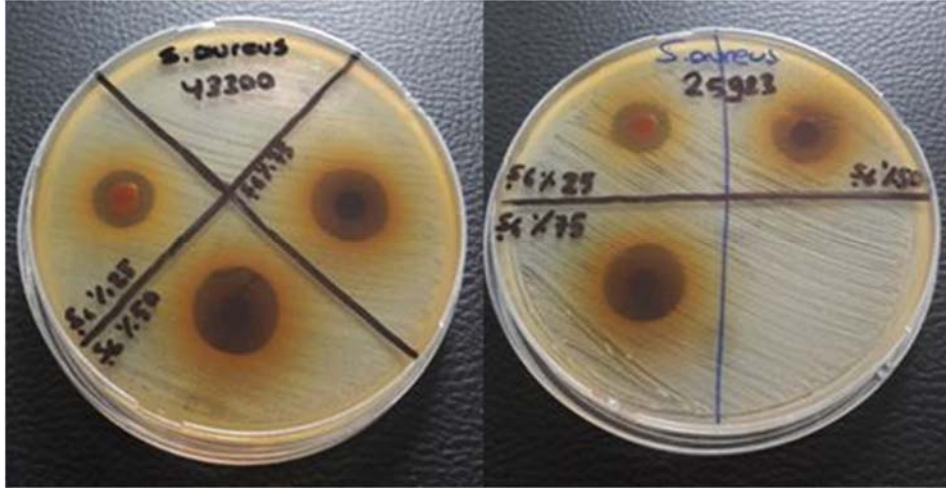
**Şekil 4.4:** Etanolik ekstraktın *S. aureus* ATCC 43300 ve 25923 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu.

Tablo 4.4 ve Şekil 4.4 de de görüleceği gibi, işlenmiş yaprak etanolik ekstraktının %25 ve %50'lik konsantrasyonuna *S. aureus* ATCC 43300 hem de *S. aureus* ATCC 25923 kökeni dirençli bulunmuştur. % 75'lik konsantrasyonlara ise sırası ile 11 mm ve 9 mm'lik zon çapları ile duyarlı bulunmuştur.

**Tablo 4.5:** İşlenmemiş yaprak saf ekstraktının farklı konsantrasyonlarda bakterilere etkisini gösteren zon çapları.

STANDART BAKTERİ SUŞLARI	EKSTRAKTIN DEĞİŞİK KONSANTRASYONLARDAKİ ZON ÇAPLARI			Vankomisin MİK
	%25 K*	%50 K*	%75 K*	
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	12 mm	16 mm	16 mm	<4mg/L
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	13 mm	14 mm	15 mm	<4mg/L

\*K:Konsantrasyon, MİK: Minimal inhibisyon konsantrasyonu



**Şekil 4.5:** Saf ekstraktın farklı konsantrasyonlarının *S. aureus* ATCC 43300 ve *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu.

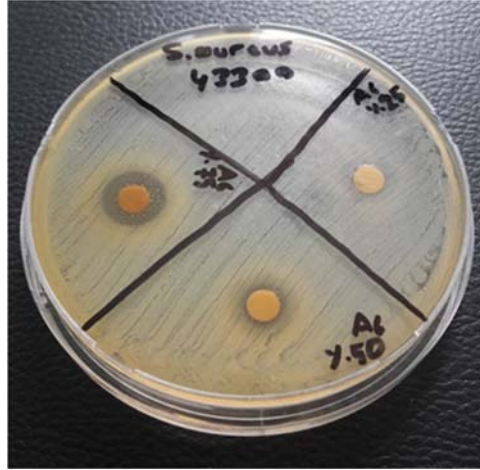
Tablo 4.5 ve Şekil 4.5 de görüleceği gibi, işlenmemiş yaprak saf ekstraktının %25 lik, %50 lik ve %75 lik konsantrasyonuna *S.aureus* ATCC 43300 sırası ile 12 mm, 16 mm, 16 mm lik zon çapları ile duyarlı bulunmuştur.

İşlenmemiş yaprak saf ekstraktının %25, %50 ve %75'lik konsantrasyonuna *S.aureus* ATCC 25923 sırası ile 13 mm, 14 mm, 15 mm'lik zon çapları ile duyarlı bulunmuştur.

**Tablo 4.6:** İşlenmiş yaprak saf ekstraktının farklı konsantrasyonlarda bakterilere etkisini gösteren zon çapları.

STANDART BAKTERİ SUŞLARI	EKSTRAKTIN DEĞİŞİK KONSANTRASYONLARDAKİ ZON ÇAPLARI			Vankomisin MİK
	%25 K*	%50 K*	%75 K*	
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	-	-	13 mm	<4mg/L

\*K:Konsantrasyon, MİK: Minimal inhibisyon konsantrasyonu



**Şekil 4.6:** Saf ekstraktın farklı konsantrasyonlarının *S. aureus* ATCC 43300 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu.

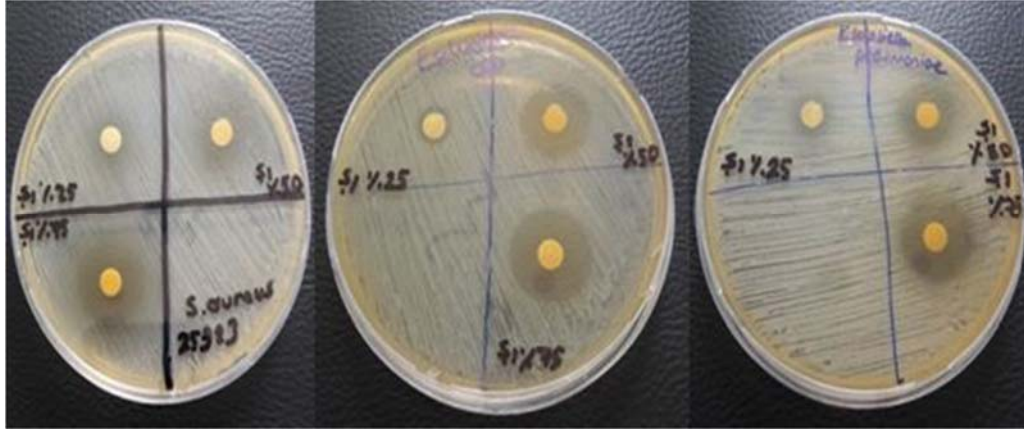
Tablo 4.6 ve Şekil 4.6 da görüldüğü gibi, işlenmiş yaprak saf ekstraktının %25 ve %50'lik konsantrasyonuna *S.aureus* ATCC 43300 dirençli bulunmuştur. %75'lik konsantrasyonlara ise 13 mm'lik zon çapları ile duyarlı bulunmuştur.

**Tablo 4.7:** İşlenmiş yaprak S1 ekstraktının farklı konsantrasyonlarda bakterilere etkisini gösteren zon çapları.

STANDART BAKTERİ SUŞLARI	EKSTRAKTIN DEĞİŞİK KONSANTRASYONLARDAKİ ZON ÇAPLARI			Vankomisin MİK	İmipenem ZON ÇAPI
	%25 K*	%50 K*	%75 K*		
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	-	10 mm	17 mm	<4mg/L	1 mm
<i>E.coli</i> ATCC 25922	9 mm	18 mm	20 mm	32mg/L	26 mm
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	10 mm	16 mm	20 mm	32mg/L	30 mm

\*K:Konsantrasyon, MİK: Minimal inhibisyon konsantrasyonu





**Şekil 4.7:** S1 ekstraktın *S. aureus* ATCC 25923, *E.coli* 25922, *K. pneumoniae* 700603 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu.

Tablo 4.7 ve Şekil 4.7 de de görüleceği gibi, işlenmiş yaprak S1 ekstraktının %25'lik konsantrasyonuna *S. aureus* ATCC 25923 dirençli bulunmuştur. %50 ve %75'lik konsantrasyonuna ise 10 mm, 17 mm'lik zon çapları ile duyarlı bulunmuştur.

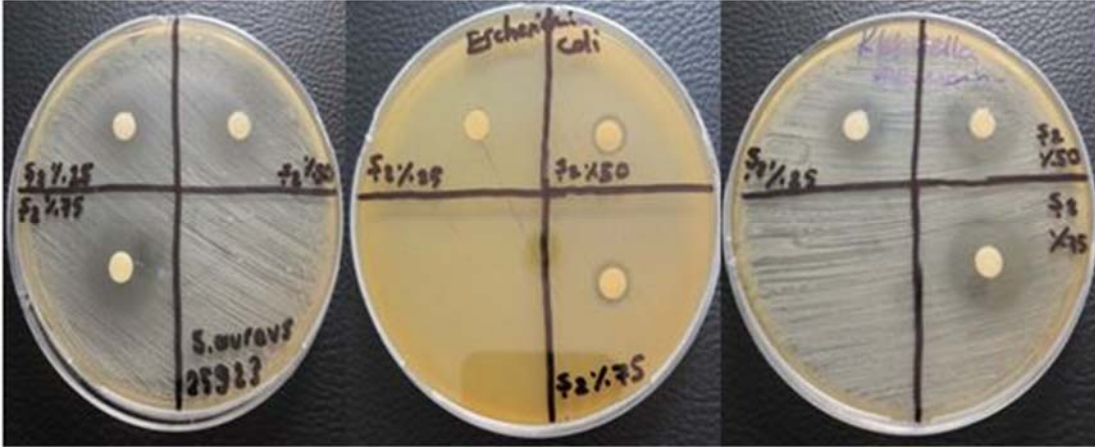
İşlenmiş yaprak saf ekstraktının %25, %50 ve %75 lik konsantrasyonuna *E. coli* ATCC 25922 sırası ile 9 mm, 18 mm, 20 mm'lik zon çapları ile duyarlı bulunmuştur.

İşlenmiş yaprak saf ekstraktının %25, %50 ve %75'lik konsantrasyonuna *K. pneumoniae* ATCC 700603 sırası ile 10 mm, 16 mm, 20 mm'lik zon çapları ile duyarlı bulunmuştur.

**Tablo 4.8:** İşlenmemiş yaprak S1 ekstraktının farklı konsantrasyonlarda bakterilere etkisini gösteren zon çapları.

STANDART BAKTERİ SUŞLARI	EKSTRAKTIN DEĞİŞİK KONSANTRASYONLARDAKİ ZON ÇAPLARI			Vankomisin MIK	İmipenem ZON ÇAPI
	%25 K*	%50 K*	%75 K*		
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	-	15 mm	17 mm	<4mg/L	1 mm
<i>E.coli</i> ATCC 25922	-	8 mm	9 mm	32mg/L	26 mm
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	14 mm	19 mm	20 mm	32mg/L	30 mm

\*K:Konsantrasyon, MIK: Minimal inhibisyon konsantrasyonu



**Şekil 4.8:** S1 ekstraktın *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* 25922, *K. pneumoniae* 700603 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu.

Tablo 4.8 ve Şekil 4.8 de görüldüğü gibi, işlenmemiş yaprak S1 ekstraktının %25'lik, konsantrasyonuna *S. aureus* ATCC 25923 dirençli bulunmuştur. %50 ve %75'lik konsantrasyonuna ise 15 mm, 17 mm'lik, zon çapları ile duyarlı bulunmuştur.

İşlenmiş yaprak saf ekstraktının %25'lik konsantrasyonuna *E. coli* ATCC 25922 dirençli bulunmuştur. %50 ve %75'lik konsantrasyonuna *E. coli* ATCC 25922 sırası ile 8 mm, 9 mm'lik zon çapları ile duyarlı bulunmuştur.

İşlenmiş yaprak saf ekstraktının %25, %50 ve %75'lik konsantrasyonuna *K. pneumoniae* ATCC 700603 sırası ile 14 mm, 19 mm, 20 mm'lik zon çapları ile duyarlı bulunmuştur.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

*Hippophae* yapraklarında bulunan flavonoidler, fenolik asit ve tanin gibi fenolik bileşikler, güçlü antioksidan ve antibakteriyel aktivite gösteren önemli bir fitokimyasal grup olarak kabul edilmektedir (Pietta, 2000; Mayer ve diğ., 2008; Saleem ve diğ., 2010). Literatürler incelendiğinde, gölge ya da güneşte kurutulan Yalancı iğde yaprakların çoğunlukla sulu, etanolik, metanolik ekstralarının kullanıldığı görülmektedir. Aras ve diğ. (2016) işlenmiş Yalancı iğde yapraklarının sulu ve metanolik ekstralarında antioksidan kapasitesi ve fenolik profilini belirledikleri çalışmalarında işlenmiş yapraklarda bulunan fenolik madde miktarının daha fazla olduğunu ve antioksidan kapasitesinin işlenmemiş yapraklara kıyasla daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu yüzden çalışmamızda işlenmiş ve işlenmemiş yaprakların antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Literatürlerde sulu, etanolik, metanolik ekstreksiyonun ağırlıklı olması ve karşılaştırma yapmaya olanak vermesi nedeni ile bu ekstraksiyon tipleri çalışmamızda kullanılmıştır.

Yalancı iğde yapraklarının farklı yöntemlerle hazırlanmış ekstralarının antibakteriyel etkisini gösteren çalışmalar mevcut olmakla birlikte, klinik patojen bakterilerle ilgili çalışmalar kısıtlıdır (Kumar ve diğ., 2013). Yalancı iğde yapraklarının *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus*'un üremesini durdurarak antibakteriyel etki gösterdiği belirtilmiş, bitkinin güçlü antioksidan ve geniş spektrumlu antibakteriyel özelliklere sahip olduğu saptanmıştır. Yalancı iğde yapraklarının, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis*' i inhibe edici özelliği yanı sıra tohum yağının da *E. coli* üzerinde antibakteriyel özelliği olduğu belirtilmiştir (Kaushal ve Sharma, 2011; Suryakumar ve Gupta, 2011).

Çoklu antibiyotik direncine sahip bakterilerin gösterdikleri direnç günümüzde hızla artmaktadır. Hastane ve toplum enfeksiyonu etkeni olarak kabul edilen bu bakterilerle oluşan enfeksiyonlar tedavi edilemediğinden hastalar kaybedilmektedir. Bu nedenle bu bakterilere etkili olabilecek yeni antibiyotiklerin, antibakteriyel ürünlerin geliştirilmesi için büyük çaba sarf edilmektedir (Akyar, 2010). Çalışmamıza klinik patojenlerden olan *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *E. faecalis* ATCC 29212 bakterileri dahil edilmiştir.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *E. faecalis* ATCC 29212 bakterilerinin *H. rhamnoides*'e duyarlılığını disk difüzyon yöntemiyle saptanmıştır. Bu yöntemi Gupta ve diğerleri (2011) *H. salicifolia* D. Don yapraklarının *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Acinetobacter junii* etkisini saptamak için kullanılmışlardır. Benzer şekilde Qadir ve diğerleri (2016), *H. rhamnoides* L. MRSA suşlarına etkinliğini disk difüzyon yöntemiyle saptamışlardır. Biz araştırmamızda benzer şekilde disk difüzyon yöntemini kullandık. Klinikte patojen olan bakterilerin *H. rhamnoides*'e duyarlı olup olmadığını belirli standartlar bulunmadığından kesin şekilde saptamak mümkün değildir. Disk difüzyon yöntemi sonucunda elde edilen üreme zonlarının çapları duyarlılık ve dirençlilik için standart zon çapları bilinmediğinden elde edilen veriler yalnızca ileri çalışmalara gidilip gidilmeyeceği konusunda bir ön fikir verecektir. Araştırmamız sonucunda bakterilerimizin etrafında gördüğümüz zon çaplarını ölçtüğkten sonra Gupta ve diğerlerinin (2011) yaptığı çalışmada, belirttikleri zon çapları kriter olarak alındı. Her ne kadar bu zon çapları standart rehberlerde belirtilmemiş olsa da yayınlanmış bir makalede yer almaları sonuçlarımız hakkında fikir yürütmemize yardımcı olmuştur. Bu araştırmacılar bakterilerin ekildiği petrielerde *H. salicifolia*'nın etkisini oluşturan zon çaplarıyla belirlemişlerdir. 7 mm'den küçük olan inhibisyon zonunda bakterinin dirençli, 7- 9 mm arasındaki inhibisyon zonunda bakterinin orta duyarlı ve 10 mm'den daha yüksek inhibisyon zonunda bakterinin duyarlı olduğunu belirtmişlerdir.

Bizim araştırmamızda *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300 kökeni etrafında işlenmemiş yaprak metanolik ekstraktının %50 ve %75'lik konsantrasyonlarında sırasıyla 10 mm ve 11 mm'lik zonlar oluşmuştur. Gupta ve diğerlerinin (2011) kabul ettiği zon çaplarına göre bakterimizin işlenmemiş yaprak metanolik ekstraktının %50 ve %75'lik konsantrasyonlarına duyarlı olabileceği öngörülmüştür.

*S. aureus* (MRSA) ATCC 43300 ve *S. aureus* ATCC (MSSA) 25923 kökenleri etrafında işlenmiş yaprak metanolik ekstraktlarının %75'lik konsantrasyonunda sırasıyla 8 mm ve 12 mm zon çapları oluşmuştur. Gupta ve diğerlerinin (2011) verilerine dayanarak, 8 mm'lik zon çapı bakterinin ekstraktımıza orta duyarlı olduğunu, 12 mm zon çapı ise bakterimizin

ekstraktımıza duyarlı olduğunu düşündürmüştür. Bu bulgularımız Gupta ve diğerlerinin (2011) bulgularıyla uyumuştur.

*S. aureus* (MRSA) ATCC 43300 ve *S. aureus* (MSSA) ATCC 25923 kökenleri etrafında işlenmiş yaprak etanolik ekstraktının %75'lik konsantrasyonunda sırasıyla 11 mm ve 9 mm'lik zon çapları oluşmuştur. 11 mm lik zon çapı bakterinin %75'lik bakteri konsantrasyonundaki ekstrakta duyarlı olabileceğini, 9 mm zon çapı ise orta duyarlı olabileceğini düşündürmüştür.

*S. aureus* (MRSA) ATCC 43300 kökeni etrafında, işlenmemiş yaprak saf ekstraktının %25, %50 ve %75'lik konsantrasyonlarında sırasıyla 12 mm, 16 mm ve 16 mm zonları oluşmuştur. Bu sonuçlara benzer şekilde *S. aureus* (MSSA) ATCC 25923 kökenimizin etrafında da aynı ekstraktın %25, %50 ve %75 konsantrasyonlarında sırasıyla 13 mm, 14 mm ve 15 mm zonlar oluşmuştur. Gupta ve diğerlerinin (2011) sonuçlarına göre bizde *S. aureus* kökenlerimizi bu ekstrakta duyarlı olduğunu öngördük.

*S. aureus* (MRSA) ATCC 43300 kökeninin etrafında işlenmiş yaprak saf ekstraktının yalnızca %75 lik konsantrasyonunun etrafında 13 mm'lik bir inhibisyon zonu oluşmuştur. Bu zon çapı bakterimizin ancak %75'lik konsantrasyonundaki ekstrakta duyarlı olabileceğini düşündürmüştür.

*S. aureus* (MSSA) ATCC 25923 kökeni etrafında işlenmemiş yaprak S1 ekstraktının %50 ve %75' lik konsantrasyonlarında sırasıyla 15 mm ve 17 mm'lik zon çapları oluşmuştur. Bu sonuç bakterinin bu konsantrasyonlardaki ekstra duyarlı olabileceğini düşündürmüştür.

*S. aureus* (MSSA) ATCC 25923 kökeninin etrafında işlenmiş yaprak S1 ekstraktının %50 ve %75' lik konsantrasyonlarında sırasıyla 10 mm ve 17 mm'lik zon çapları oluşmuştur. Bu verilerimiz bakterimizin bu konsantrasyonlarındaki ekstrakta duyarlı olabileceğini düşündürmüştür.

Bu sonuçlara göre MRSA ve MSSA *S. aureus* arasında ki zon çapı farklılıklarının Pb2a geni ile alakalı olabileceği düşünülmektedir.

Upadhyay ve diğeri (2010) *H. rhamnoides* L.'nin antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlar ve *S. aureus*'un etrafında bu bitki yaprağının 250 mikrogramlık sulu ekstraktında 10 mm lik bir zon çapı saptamışlardır. 500 mikrogramlık sulu ekstraktta ise zon çapı 14 mm'e yükselmiştir. Araştırmacıların bulduğu zon çapları bizim bulduğumuz zon çaplarıyla uyumaktadır.

*E. coli* ATCC 25922 kökeni etrafında işlenmiş yaprak S1 ekstraktının %25, %50 ve %75'lik konsantrasyonları arasında sırasıyla 9 mm, 18 mm ve 20 mm'lik zon çapları oluşmuştur. Bu sonuçlar bakterimizin %25'lik konsantrasyonu orta duyarlı, %50 ve %75'lik konsantrasyonlara duyarlı olduğunu düşündürmüştür. Gupta ve diğeri (2011) çalışmalarında bu çaptaki zonları duyarlı kabul etmişlerdir. Aynı *E. coli* kökenimiz etrafında işlenmemiş yaprak S1 ekstraktının %50 ve %75'lik konsantrasyonları arasında sırasıyla 8 mm ve 9 mm'lik zon çapları oluşmuştur. Bu sonuç bakterimizin ekstrakta orta duyarlı olabileceğini düşündürmüştür.

*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 kökeni etrafında işlenmiş yaprak S1 ekstraktının %25, %50 ve %75 lik konsantrasyonları arasında sırasıyla 10 mm, 16 mm ve 20 mm'lik zon çapları oluşmuştur. Aynı bakterimizin etrafında işlenmemiş yaprak S1 ekstraktının %25, %50 ve %75'lik konsantrasyonlarında sırasıyla 14 mm, 19 mm ve 20 mm'lik zon çapları oluşmuştur. Bu bulgular *K. pneumoniae* kökeninin işlenmiş ve işlenmemiş yaprak S1 ekstraktının her üç konsantrasyonunda duyarlı olduğunu düşündürmüştür.

Araştırmamızda *S. aureus* ATCC 25923 kökeni etrafında en yüksek zon çapı 17 mm ile işlenmiş ve işlenmemiş yaprak S1 ekstraktının %75'lik konsantrasyonunda bulunmuştur. *S. aureus* ATCC 43300 etrafında ise en yüksek zon çapı 16 mm ile işlenmemiş yaprak saf ekstraktının %75'lik konsantrasyonunda görölmüştür.

Saikia ve Handique (2012) çalışmalarında *H. salicifolia* yaprak metanolik ekstraktında *S. aureus*'un 24 mm'lik bir zon gösterdiğini bulmuşlardır. Bu sonuçla kıyasladığımızda bizim zon çaplarımızın biraz daha küçük olduğu görölmüştür.

*E. coli* ATCC 25922 kökenlerimizde en yüksek zon çapını 20 mm ile işlenmiş yaprak S1 ekstraktının %75'lik konsantrasyonunda göstermiştir. Saika ve Handique (2012), *H. salicifolia* yapraklarının metanolik kloroform, aseton ve eter ekstraktlarının *E. coli*'ye

etkisini araştırmışlar ve en fazla 10 mm'lik bir zon çapı oluşturduğunu saptamışlardır. Bu sonuçla kıyasladığımızda zon apımız oldukça büyük, ekstraktımız oldukça etkilidir.

*K. pneumoniae* ATCC 700603 kkenimizde en yüksek zon çapını işlenmiş ve işlenmemiş yaprak S1 ekstraktlarının %75'lik konsantrasyonlarında 20 mm olarak bulunmuştur. Saika ve Handique (2012) *H. salicifolia* yapraklarının metanol, kloroform, aseton ve eter ekstraktlarının *K. pneumoniae*' ya etkisini araştırmışlar ve en fazla 12 mm'lik bir zon çapı saptamışlardır. Bu sonuçla kıyasladığımızda zon apımız oldukça büyük, ekstraktımız oldukça etkilidir.

Çalışmamızda dilüsyon öncesi disk difüzyon deneylerinde, hazırladığımız tüm yaprak ekstraktlarına *P. aeruginosa* ATCC 9027 ve *E. faecalis* ATCC 29212 kökenleri dirençli bulunmuştur. Araştırmamız kapsamında olan tüm bakteri kökenleri işlenmemiş yaprak etanolik ekstraktına karşı direnç göstermiştir. İşlenmemiş yaprak saf ekstrakt, işlenmiş yaprak metanolik ekstrakt ve işlenmiş yaprak etanolik ekstraktların *S. aureus* ATCC 43300 ve *S. aureus* ATCC 25923 kökenlerine benzer etki göstermiştir. *S. aureus* ATCC 25923, *K. pneumoniae* ATCC 700603 ve *E. coli* ATCC 25922 kökenlerinin İşlenmiş ve işlenmemiş yaprak S1 ekstraktına karşı duyarlılık gösterdiği saptanmıştır. S1 ekstraktının diğer ekstraktlardan farklı olarak *K. pneumoniae* ATCC 700603 ve *E. coli* ATCC 25922 kökenlerinde etkili olması ayrıcalık oluşturmuştur.

Dilüsyon sonrasına ait sonuçlar işlenmemiş yaprak saf ekstraktının farklı konsantrasyonlardaki etkinliği ve zon çaplarının işlenmiş yaprağa oranla daha etkilik sonuç verdiğini göstermektedir. İşlenmiş yaprak S1 ekstraktının farklı konsantrasyonlarının *E. coli* ATCC 25922 kökeni üzerinde (9 mm, 18 mm ve 20 mm); İşlenmemiş yaprak S1 ekstraktının ise *S. aureus* ATCC 25923 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 üzerinde daha etkili olduğu görülmektedir. İşlenmiş ve işlenmemiş S1 ekstraktlarının %75'lik konsantrasyonlarının *K. pneumoniae* ATCC 700603 kökeninde 20 mm'lik büyük bir zon çapı oluşturmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar S1 ekstraktı ve bunun %75'lik konsantrasyonunun *E. coli* ATCC 25922, ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 kökenleri üzerinde oldukça etkili olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak çalışmalarda Yalancı iğde işlenmiş yaprağının antibakteriyel özelliğinin işlenmemişe göre fazla olduğu belirtilsede çalışmamız sonucunda işlenmemiş yaprağın

bakterilere daha etkili olduğu görülmüştür. Yapılan dilüsyonlar sonucunda ise Yalancı iğdenin %75 lik konsantrasyonlarının breakpoint olarak alınmasının daha uygun olduğu saptanmıştır. Sonuçlarımız, S1 ekstraktının *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 kökenlerinde oldukça etkili olduğunu göstermektedir. Günümüzde antibiyotiğe dirençli bakterilere karşı, bitki ekstraktları gibi doğal kaynaklar umut kaynağı olarak görülmektedir. Çalışma sonucunda elde edilen verilere dayanarak deney hayvanları üzerinde invivo çalışmalar yaparak ilaç keşfi için daha ileri çalışmalar yapılması toplum sağlığı için faydalı olacaktır.





## KAYNAKLAR

- Aamdal, S.A., Petersen, F.C., 2004, The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral disease, *Crit rev oral biol me*, 15, 4–12.
- Accorsi, M. T., Paiva, K.B., Zambuzzi, W.F., Cestari, T.M., Lara, V.S., Sogayar, M.C., Taga, R., Granjeiro, J.M., 2008, Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat, *J mol histol*, 39, 201-8.
- Akalın, H., 2003, *Çoğul dirençli Gram negatif bakteriler*, Hastane enfeksiyonları, In: Doğanay M, Unal S. (ed.), Bölüm 2, Bilimsel tıp yayınevi, Ankara, 269-287.
- Aktener, B.O., Bilkay, U., 1993 Smear layer removal with different concentrations of EDTA ethylenediamine mixtures, *J Endod*, 195, 228-31.
- Akyar, I., 2010, Süper bakteriler için antibiyotik arayışı, *Acıbadem üniversitesi sağlık bilimleri dergisi*, 1 (2), 62-66.
- Alacam, T., 2000, *Kök kanallarının irrigasyonu*, Barış yayınları, Ankara.
- Amalaradjou, M.A., Norris, C.E., 2009, Venkitanarayanan k. effect of octenidine hydrochloride on planktonic cells and biofilms of *Listeria monocytogenes*, *Appl environ microbiology*, 75, 4089-92.
- Amireddy, R., Rangarao, S., Lavu, V., Madapusi, B.T., 2011, Efficacy of a root conditioning agent on fibrin network formation in periodontal regeneration: A SEM evaluation, *J Indian soc periodontol*, 15, 228-34.
- Aras, A., Ceylan, F.D., Yanar, O., Boztas, K., Capanoglu, E., 2016, Investigating the antioxidant properties and rutin content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves and branches, *African Journal of Biotechnology*, 15 (5), 118-124.
- Arısoy, E.S., 2011, Gram negatif hastane enfeksiyonlarının sağaltımı, *Journal of pediatric infection*, 5 (1), 152-156.
- Ari., H, Erdemir, A., Belli, S., 2004, Evaluation of the effect of endodontic irrigation solutions on the microhardness and the roughness of root canal dentin, *Oral surg oral med oral pathol oral radiol endod*, 30, 792-5.
- Ari, H., Erdemir, A., 2005, Effects of endodontic irrigation solutions on mineral content of root canal dentin using ICP-AES technique, *J endod*, 31, 187-9.
- Arias, M.T., Ferrer-Luque, C.M., González-Rodríguez, M.P., Valderrama, M.J., Baca, P., 2010, Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by cetrime and chlorhexidine, *J endod*, 36, 87-90.
- Arman, D., 2001, Gram negatif çomak enfeksiyonlarında güncel tedavi yaklaşımları, *Ankem* 15 (3), 421-424.

- Athanassiadis, B., Abbott, P.V., Walsh, L.J., 2007, The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics, *Aust dent j.*, 52, S64-82.
- Bakır, M., 2006, Yoğun bakım ünitesinde enfeksiyon kontrolü, Türkiye klinikleri *Journal of internal medical sciences*, 2 (46), 57.
- Baştürk, S., 2005, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında çeşitli kinolon grubu antibiyotiklerin duyarlılıklarının araştırılması, Uzmanlık tezi, T.C. sağlık bakanlığı haseki eğitim ve araştırma hastanesi enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji kliniği.
- Bexfield, A., Nigam, Y., Thomas, S., Ratcliffe, N.A., 2004, Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Microbes Infect*, 16 (4), 1297-304.
- Bilgehan, H., 2000, klinik mikrobiyoloji özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları, *Barış yayınları*, İzmir, 3-17.
- Biswas, A., Bharti, V.K., Acharya, Pawar, D.D., Singh, S.B., 2010, Sea buckthorn: new feed opportunity for poultry in cold arid Ladakh region of India, *World's poultry sci j.*, 707-714.
- Blackburn, C.W., McCarthy, J.D., 2000, Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods, *Int j food microbiology*, 55, 285-90.
- Breeuwer, P., Abee, T., 2000 Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques, *Int j food microbiol*, 55, 193-200.
- Browne, R.M., Hartland, E.L., 2002, *Escherichia coli* as a cause of diarrhea, *J Gastroenterol Hepatol*, 17 (4), 467-75.
- Chauhan, A.S., Negi, P.S., Ramteke, R.S., 2007, Antioxidant and antibacterial activities of aqueous extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) seeds, *Fitoterapia*, 78, 590-592.
- Chawla, R., Arora, R., Singh, S., Sagar, R. K., Sharma, R. K., Kumar, R., Sharma, A., Gupta, M.L., Singh, S., Prasad, J., Khan, H.A., Swaroop, A., Sinha, A.K., Gupta, A.K., Tripathi, R.P., Ahuja, P.S., 2007, Radioprotective and antioxidant activity of fractionated extracts of berries of *Hippophae rhamnoides*, *Journal of Medicinal Food*, 10, 101–109.
- Conner, D.E., 1993, *Naturally occurring compounds*, antimicrobials in foods, In: Davidson, P.M., Branen, A.L. (ed.), Marcel Dekker, New York, 441-468.
- Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., Maes, L., 2006, Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro proof-of-concept, *J. Ethnopharmacol*, 106, 290–302.

- Deurenberg, R.H., Vink, C., Kalenic, S., Friedrich, A.W., Bruggeman, C.A., Stobberingh, E.E., 2007, The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *clinic microbiol infection*, 13 (3), 222-35.
- Deurenberg, R.H., Stobberingh, E.E., 2008, The evolution of *Staphylococcus aureus*, *Infect genet evol*, 8 (6), 747-63.
- Eliopoulos, G.M., 1997, Vancomycin-resistant enterococci mechanism and clinical relevance, *Infectious disease clinics of North America*, 11 (4), 851–865.
- Eisenstein, I.B., Zaleznik, F.D., 2000, Principles and Practice of Infectious Diseases, Churchill Livingstone, *fifth edition*, 2294- 2310.
- Erdem, B., 1999, Temel ve klinik mikrobiyoloji, Güneş kitabevi, Ankara.
- Erkkola, R., Yang, B. 2003, sea buckthorn oils: towards healthy mucous membranes, *Agro Food Ind. Hi-tech*, 3, 53-57.
- Frobisher, M., 1968, Fundamentals of microbiology, *W. B. Saunders Company*, USA, 457.
- Ganju, L., Padwad, Y., Singh, R., Karan, D., Chandaa, S., Chopra, M.K., Bhatnagarb, P., Kashyap, R., Sawhneya, R.C., 2005, Anti-inflammatory activity of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves, *International immunopharmacology*, 1675-1684.
- Gaynes, R., (2017), The discovery of penicillin—New insights after more than 75 years of clinical use, *Emerging infectious diseases*, 23 (5), 849.
- Gilmore, M.S., 2002, *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance*, ASM Press, Washington.
- Guan, T.T.Y., Cenkowski, S., Hydamaka, A., 2005, Effect of drying on the nutraceutical quality of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. Sinensis) leaves, *J Food Science*, 70, E514-E518.
- Gür, D., 2016, Antibiyotik duyarlılık testleri, EUCAST: uygulama, yorum ve uzman kurallar, *Türk biyoloji cemiyeti dergisi*, 206.
- Gürgün, V., Halkman, K., 1990, *Mikrobiyolojide sayım yöntemleri*, Gıda teknolojisi derneği, Ankara.
- Jett, B.D, Huycke, M.M., Gilmore, M.S., 1994, Virulence of Enterococci, *Clin Microbiol Rev.*, 7, 462–78.
- Kassem, M., 2008, Battling the superbugs with green tea, <http://www.medicalnewstoday.com/articles/102312.php>, [Ziyaret tarihi: 4 Ekim 2017].
- Kaur, G., Arora, D.S., 2009. Antibacterial and phytochemical screening of *Anythum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*, *BMC Complement. Altern. Med.*, 9, 30–39.

- Kaushal, M., Sharma, P.C., 2011, Nutritional and antimicrobial property of sea buckthorn (*Hippophae sp.*) seed oil, *J Sci Indust Res*, 70, 1033-1036.
- Khan, B.A., Akhtar, N., Mahmood, T., 2010, A Comprehensive review of a magic plant, *Hippophae rhamnoides*, *pharmacogen*, J., 2. 65-68.
- Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C., Huebner, J., 2004, Enterococcal infections: host response, therapeutic and prophylactic possibilities, *Vaccine*, 22, 822–30.
- Kumar, R., Kumar, G.P., Chaurasia, O.P., Singh, S.B., 2011, Phytochemical and pharmacological profile of sea buckthorn oil: a review, *Res J Med Plant*, 5, 491-499.
- Kumar, M.Y., Tirpude, R.J., Maheshwari, D.T., Bansal, A. And Misra, K., 2013, Antioxidant and antimicrobial properties of phenolic rich fraction of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves in vitro, *Food chemistry*, 141 (4), 3443-3450.
- Lee, W., Lim, S., Son, H., Bae, K., 2004, Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes, *J Endod.*, 30, 209– 12.
- Lu, R., 1992, Sea buckthorn: A multipurpose plant species for fragile mountain areas, *Intl. Centre for integrated mountain development*, Katmandu, Nepal.
- Mahon, C.R., Lehman, D.C., Manuselis, G., 2014, *Diagnostic microbiology*, Elsevier health sciences, China, ISBN: 978-0-323-08989-0.
- Mayer, R., Stecher, G., Wuerzner, R., Silva, R. C., Sultana, T., Trojer, L., ve diğ., 2008, Proanthocyanidins: Target compounds as antibacterial agents, *Journal of agricultural and food chemistry*, 56 (16), 6959–6966.
- Molander, A., Reit, C., Dahlén, G., Kvis, T., 1998, Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis, *Int Endod J.*, 31, 1-7.
- Muhammad, I.Q., Khizar, A.A.Y, Rehan, S.S., 2016, Antibacterial activity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pak. J. Pharm. Sci.*, 29 (5), 1711-1713.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A., 2009, *Klinik mikrobiyoloji*, Atlas kitapçılık, Ankara.
- Negi, P.S., Chauhan, A.S., Sadia, G.A., Rohinishree, Y.S., Ramteke, R.S., 2005, Antioxidant and antibacterial activities of various sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed extracts, *Food Chem.*, 92, 119-124.
- Ouattara, L., Koudou, J., Karou, D.S., Giaco, L., Capelli, G., 2011, In vitro anti *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv activity of *Lannea acida* a. rich from Burkina Faso, *Pak. J. Biol. Sci.*, 14 (1), 47-52.
- Papanicolaou, G.A., Meyers, B.R., Meyers, J., Mendelson, M.H., Lou, W., Sukru, E., Sheiner, P., Miller, C., 1996, Nosocomial infections with vancomycin-resistant *Enterococcus*

- faecium* in liver transplant recipients: Risk factors for acquisition and mortality, *Clin Infect Dis* 23, 760-764.
- Pietta, P.G., 2000, Flavonoids as antioxidants, *Journal of natural products*, 63 (7), 1035–1042.
- Rôças, I.N., Siqueira, J.F., Santos, K.R.N., 2004, Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases, *J Endod*, 30, 315–20.
- Rousi, A., 1971, The genus *Hippophae* L., a taxonomic study, *Ann. Bot.*, 8, 177–227.
- Saleem, M., Nazir, M., Ali, M.S., Hussain, H., Lee, Y.S., Riaz, N., Jabbar, A., 2010, Antimicrobial natural products: An update on future antibiotic drug candidates, *Natural product reports*, 27 (2), 238-54.
- Schaberg, D.R., Culver D.H., Gaynes R.P., 1991, Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection, *The American journal of medicine*, 91 (3B), 725-8.
- Silvester, W.B., 1997, *Dinitrogen fixation by plant associations excluding legumes*, A treatise on dinitrogen fixation IV. agronomy and ecology, In: Hardy, R.W.F., Gibson, A.H., (ed.), Wiley Interscience, New York, 141-190.
- Smid, E.J., Gorris, L.G.M., 1999, *Handbook of food preservation*, Marcel Dekker, New York, 285-308.
- Snitkin, E.S., Zelazny, A.M., Thomas, P.J., Stock, F., Henderson, D.K., Palmore, T.N., 2012, NISC Comparative Sequencing Program.. Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *bh* with whole-genome sequencing, *Science translational medicine*, 4 (148), 148ra116-148ra116.
- Suomela , J.P., Ahotupa, M., Yang, B., Vasankari, T., Kallio, H., 2006, Absorption of flavonoids derived from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) and their effect on emerging risk factors for cardiovascular disease in humans, *J Agric Food Chem.*, 54, 7364-7369.
- Sun, K., Ma, R., Chen, X., Li, C., Ge, S., 2003, Hybrid origin of the diploid species *Hippophae goniocarpa* evidenced by the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear rDNA. *Belgian Journal of botany*, 136 (1), 91-96.
- Suryakumar, G., Gupta, A., 2011, Medicinal and therapeutic potential of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.), *J Ethnopharmac*, 138, 268-278.
- Tayhan, A., A., 1997, Türkiye'nin *Hippophae rhamnoides* L. taksonu üzerinde ksilolojik ve palinolojik araştırmalar, PhD Thesis, İstanbul üniversitesi fen bilimleri.
- Tendolkar, P.M., Baghdayan, A.S., Shankar, N., 2003, Pathogenic Enterococci: new developments in the 21st century, *Cell Mol Life Sci*, 60, 2622–36.
- Tsybikova, D.T.S., Rasputina, D.B., Zalykeeva, D.N., Darzhapova, G.Z.H., Khundanova, L.L., 1983, A study of leaves and the oil cake of sea buckthorn, *Biology chemistry and pharmacology of sea buckthorn*, 107– 9.

- Toreci, K., 2002, İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi, *Nobel tıp kitapçevleri*, İstanbul, 575-1608.
- Upadhyay, N.K., Kumar, R., Mandotra, S.K., Meena, R.N., Siddiqui, M.S., Sawhney, R.C., Gupta, A., 2009, Safety and healing efficacy of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil on burn wounds in rats, *Food chem toxicol*, 47, 1146-1153.
- Upendra, K.S., Sharma, K., Sharma, N., Sharma, A., Singh, H.P., Sinha, A.K., 2008, Microwave-assisted efficient extraction of different parts of *Hippophae rhamnoides* for the comparative evaluation of antioxidant activity and quantification of its phenolic constituents by reversephase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 374–379.
- Vahaboğlu, H., Akhan, S. C., 2002, *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* turleri, İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, In: Topcu, A.W. (ed.), Soyletir, G., Doğanay, M., Nobel Tıp Kitapevleri, 1608- 1616.
- Zhang, Z., 1990, Advances and counter measures on research and use of sea buckthorn in Russia, *Seabuckthorn*, 3 (3), 42-46.

## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Şeyma KARASOY
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	01.01.1990
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	0 535 675 79 56
E-Posta Adresi	seyma.karasoy@hotmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	17.06.2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Botanik Anabilim Dalı
Mezuniyet Tarihi	11.12.2017