



## Evaluation of antifungal activity of cardamom oil against standard and clinical *Candida* isolates

İlknur DAĞ \*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Eskişehir Osmangazi University, Central Research Laboratory, Application and Research Center, Eskişehir, Turkey

### Abstract

*Candida* species are the members of the human normal flora and they may cause opportunistic fungal infections in immunocompromised patients. The available antifungal treatment regimens is quite limited due to the toxicity, high cost and presence of multidrug resistant strains. Recently, natural essential oils and their constituents have drawn attention for their antimicrobial and antibiofilm efficacies. Cardamom essential oil has strong antimicrobial effects. Cardamom can be isolated from the seeds of the ginger family *Zingiberaceae*. The aim of this study is to investigate the effects of cardamom essential oil against standard and clinical *Candida* strains. The minimum inhibitory concentration (MIC) of cardamom was determined using the broth microdilution method according to the Clinical Laboratory Standards Institute. Amphotericin B was used as a positive standard control antibiotic. Cardamom oil have shown strong antifungal activity the tested all *Candida* isolates (MIC  $\leq$  0.1% (vol/vol)). Our MIC and transmission electron microscopic (TEM) studies confirms that cardamom oil possess in vitro antifungal activity. It may be used as an alternative antifungal agent or natural food preservatives. In addition it may helpful for the discovery of new antifungal drug. However efficacy, safety and toxicity profiles of this oil will need to be addressed.

**Key words:** *Candida*, cardamom oil, antifungal, TEM, MIC

----- \* -----

## Kardamom yağının standart ve klinik *Candida* izolatlarına karşı antifungal etkinliklerinin değerlendirilmesi

### Özet

*Candida* türleri insan normal florasının üyelerinden olup, bağışıklığı baskılanmış hastalarda fırsatçı fungal enfeksiyonlara yol açabilmektedirler. Mevcut antifungal tedavi rejimleri toksisite, yüksek maliyet ve çoklu ilaç dirençli suşların bulunması sebebiyle bir hayli sınırlıdır. Son yıllarda doğal esansiyel yağlar ve bunların bileşenleri, sahip oldukları antimikrobiyal ve antibiofilm etkinliklerinden dolayı büyük dikkat çekmektedir. Kardamom esansiyel yağı da güçlü antimikrobiyal etkilere sahiptir ve *Zingiberaceae* ailesi tohumlarından izole edilebilmektedir. Çalışmamızın amacı standart ve klinik *Candida* suşlarına karşı bu yağın etkinliğini araştırmaktır. Kardamomun Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK), Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü'nün talimatlarına göre sıvı mikrodilüsyon testi ile elde edilmiştir. Çalışmada pozitif standart kontrol olarak Amfoterisin B antibiyotiği kullanılmıştır. Kardamom yağı, test edilen tüm *Candida* izolatları üzerine güçlü bir antifungal aktivite göstermiştir ((MİK  $\leq$  %0.1 (vol/vol)). MİK ve geçirimli elektron mikroskopik (TEM) çalışmamız kardamom yağının in vitro antifungal etkinliğini onaylamaktadır. Kardamom yağı alternatif bir antifungal ajan ya da doğal besin koruyucusu olarak kullanılabilir. Ayrıca yeni antifungal ilaçların keşfi için faydalı olabilir. Ancak bu yağın etkinlik, güvenlik ve toksisite profillerinin iyi bir şekilde aydınlatılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** *Candida*, kardamom yağı, antifungal, TEM, MİK

### 1. Giriş

*Candida* türleri sağlıklı insanların deri ve mukozal yüzeylerini kommensal olarak kolonize edebilen, bağışıklığın baskılandığı durumlarda ise fırsatçı enfeksiyonlara yol açabilen önemli mikroorganizmalardır (Doughari ve Naya, 2008). Özellikle *C. albicans*, gastrointestinal alan, oral kavite ya da vajinada yaygın olarak bulunur ve sıklıkla yüzeysel

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902222393750/6404; Fax.: +902222394106; E-mail: idag280@gmail.com

© 2008 All rights reserved / Tüm hakları saklıdır

BioDiCon. 727-0118

enfeksiyonlara neden olurken; *Candida* türleri dışındaki enfeksiyonların sıklığı da giderek artmaktadır (Movar vd., 2005; Pfaller vd., 2003). *Candida*'ların virülansına katkıda bulunan en önemli faktörler arasında farklı hidrolitik enzimlerin üretimi, morfolojik dimorfizm, germ-tüp oluşumu ya da konakçı hücre ve dokulara yapışarak biyofilm oluşturabilme yetenekleri sayılabilir (Karkowska-Kuleta vd., 2009). Özellikle biyofilm oluşturabilen mikroorganizmaların antimikrobiyal tedaviye yüksek bir direnç gösterdikleri ve ısrarcı enfeksiyonların kaynağı olabildikleri bilinmektedir (Chandra vd., 2001). Biyofilm üretimi sırasında gerçekleşen ekzopolisakkarit (EPS) üretimi, hücrenin fizyolojik durumu, membran üzerindeki atım pompaları ve planktonik hücrelerden farklı olarak meydana gelen gen ekspresyon paternleri de biyofilm direncine katkıda bulunabilmektedir (Rabin vd., 2015). Bu direnç, aynı mikroorganizmaların planktonik formlarına göre 100-1000 kat daha fazla olabilmekte ve biyofilm bir kez oluştuktan sonra yok edilmesi de çok güçleşmektedir (Taff vd., 2013; Rabin vd., 2015). Ökaryotik özellik gösteren mantar hücrelerine etkili antifungaller, insan hücreleri üzerine de etkili olabileceklerinden toksisite riskleri fazladır ve bu sentetik bileşenler antifungal direnç gelişimine yol açabildiklerinden tedaviyi de güçleştirmektedirler (Mazu vd., 2016). Bu enfeksiyonlarla mücadelede funjisidal ve daha az yan etkili yeni alternatiflerin geliştirilmesi önem taşımaktadır. Son yıllarda bitkilerin farklı bölümlerinden çeşitli yollarla elde edilen esansiyel yağların antibakteriyel, antioksidan ve antifungal özellikleri üzerine yapılan çalışmalar çok dikkat çekmektedir (Burt, 2004; Şengün ve Yücel, 2015). Bu çalışmaların büyük çoğunluğu *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Bacillus cereus* gibi patojen bakteriler üzerine yoğunlaşmıştır fakat antifungal aktivite verileri daha sınırlıdır. *Zingiberaceae* familyasına ait *Elettaria cardamomum* bitkisinin kurutulmuş meyvesi olan kardamom, et ürünlerinde baharat olarak kullanımına ek olarak, tıpta da güçlü aromatik, antiseptik, uyarıcı, karminatif, mide için, antispazmodik ve diüretik amaçlarla kullanılmaktadır (Agaoglu vd., 2005). Ayrıca karaciğer üzerine yararlı etkileri, soğuk algınlığı, ateş ve ağız inflamasyonları üzerine de olumlu etkileri rapor edilmektedir (Al-Abdalall, 2016). Kardamom yağının yapısında bulunan en önemli bileşenler  $\alpha$ -terpinil asetat, linalol, linalil asetat, geraniol, limonen,  $\alpha$ -terpinen, safrol, metilöjanol ve öjanöldür. Bu biyoaktif bileşenlerin içeriği depolama koşulları yada prosese bağlı olarak değişiklik gösterebildiğinden, çalışma süresince dikkatle korunmalıdır (Kubo ve ark., 1991). Son yıllarda bitkisel ürünlerden alternatif terapötik moleküllerin geliştirilmesi üzerine çok fazla çalışma bulunmaktadır ancak bitkisel ürünlerin antimikrobiyal aktiviteleri ve etki mekanizmaları halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Kardamom yağının antifungal etkinliği hakkında da sınırlı sayıda veri mevcuttur. Çalışmamızın amacı kardamom yağının klinik ve standart *Candida* izolatları üzerine antifungal etkilerini mikrobiyolojik ve elektronmikroskopik yollarla araştırmaktır.

## 2. Materyal ve yöntem

### 2.1. İzolatlar ve kimyasallar

Çalışmamızda kullanılan kardamom yağı Sigma-Aldrich firmasından saf halde temin edilmiştir (W224111). Antifungal aktivite araştırmaları için ise 6 *C. albicans*, 2 *C. kefir*, 3 *C. krusei*, 2 *C. glabrata*, 2 *C. parapsilosis* ve 1 *C. tropicalis* izolatu kullanılmıştır. İzolatlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanmıştır. Klinik izolatların 10'u kan, 3'ü idrar, 1'i periton sıvısı ve 1'i de vajen örneklerinden izole edilmiştir. İzolatlar %15 gliserol içeren Yeast Pepton Dekstroz sıvı besiyerine alınarak -86°C'de stoklanmıştır. *Candida albicans* ATCC 10231 izolatu standart mikroorganizma olarak kullanılmıştır. Kullanılan *Candida* türleri ile bu türlerin elde edildiği klinik örnek ve departmanlar Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *Candida* türleri ile elde edildikleri klinik örnek ve departmanlar

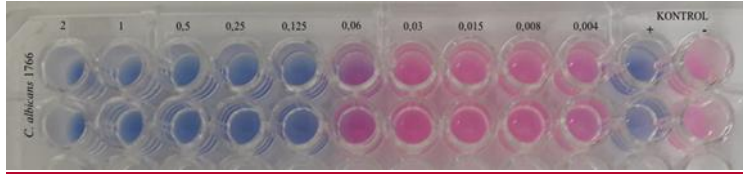
<i>C. albicans</i> 1710	(Kan-Pediatri)	<i>C. krusei</i> 1561	(Periton sıvısı-Pediatri)
<i>C. albicans</i> 1724	(Kan-Dahiliye)	<i>C. krusei</i> 1670	(Vajen-Kadın Doğum)
<i>C. albicans</i> 1766	(Kan-Nefroloji)	<i>C. glabrata</i> 1744	(Kan-Dahiliye)
<i>C. albicans</i> 1802	(Kan-Endokrin)	<i>C. glabrata</i> 1797	(Kan-Yenidoğan)
<i>C. albicans</i> 1697	(Kan-Çocuk)	<i>C. parapsilosis</i> 1806	(Kan-Onkoloji)
<i>C. kefir</i> 1620	(İdrar-Çocuk)	<i>C. parapsilosis</i> 1799	(Kan-Beyin Cerrahi)
<i>C. albicans</i> 1706	(İdrar-Göğüs Hastalıkları)	<i>C. tropicalis</i> 1678	(Kan-Hematoloji)
<i>C. krusei</i> 1675	(İdrar-Dahiliye)		

### 2.2. Maya süspansiyonları

Taze kültür eldesi için stok besiyerinden alınan maya izolatları, öncelikle RPMI 1640 sıvı besiyerinde ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Örnekler buradan 5 ml %0.85'lik serum fizyolojik içine alınmış ve süspansiyon bulanıklığı 0.5 McFarland (1-5 x 10<sup>6</sup> hücre/mL) olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan başlangıç süspansiyonları önce steril serum fizyolojik ile 1/50 oranında, daha sonra da RPMI 1640 ile 1/20 oranında sulandırılarak 1-5 x 10<sup>3</sup> hücre/mL konsantrasyonuna ulaşılmıştır.

### 2.3. Antifungal duyarlılık testleri

Kardamom yağının Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerinin belirlenmesi amacıyla Klinik ve Laboratuvar Standartlar Enstitüsü mikrodilüsyon referans yöntemi esas alınmıştır (CLSI M27-A2). Kardamom esansiyel yağı, başlangıç konsantrasyonu 40 µl/ml olacak şekilde 10 dakika süreyle sonikasyona alınarak homojen bir hale getirilmiştir. Çalışmada kardamom yağının %0.04, %0.08, %0.16, %0.31, %0.63, %0.13, %0.25, %0.5, %1 ve %2 hacim/hacim konsantrasyonlarındaki iki katlık dilüsyonları, 96 kuyulu mikropalakalarda ve RPMI 1640 besiyeri kullanılarak hazırlanmıştır (her kuyu için 100 µl). Daha önceden hazırlanan maya süspansiyonları da her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde inoküle edilmiştir. 11 ve 12. sütunlar pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Mikropalakalar 37°C de 24 saat inkübe edilmiş ve MİK değerlendirmeleri yapılmıştır. %0.01 konsantrasyonda distile su ile hazırlanan resazurin çözeltisi 0.22 µm çapındaki membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Plaklar her kuyuya 30 µl resazurin ilave edildikten sonra 1 saat bekletilmiş ve sonuçlar görsel olarak değerlendirilmiştir. MİK değeri, pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında fungal gelişimi inhibe eden en düşük yağ konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır. Minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) değerlerinin belirlenebilmesi için, temiz ve üreme gözlenmeyen MİK kuyucuklarından 0.1'er ml alınarak Yeast Pepton Dekstroz katı besiyerine ekimler yapılmıştır (Canton vd., 2004). MFK, hücrelerin %99.9'unu öldüren en düşük ilaç konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. *Candida albicans* ATCC 10231'e karşı standart antibiyotik olarak Amfoterisin B kullanılmıştır. Tüm deneyler tekrarlı olarak çalışılmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır. Uygulanan mikrodilüsyon testini gösteren ve *C. albicans* 1766 izolatına ait MİK sonuçlarını ifade eden temsili resim Şekil 1'de sunulmuştur.



Şekil 1. Kardamomun *Candida* izolatlarına karşı inhibitör etkisinin sıvı mikrodilüsyon testi değerlendirilmesi

### 2.4. Geçirimli elektron mikroskopi (TEM)

Çalışmamızda, kardamom yağının *Candida* türleri üzerinde gösterdiği morfolojik değişiklikleri değerlendirmek amacıyla TEM kullanılmıştır. Bu amaçla, standart referans mikroorganizma olarak kullanılan *Candida albicans* ATCC 10231, 10 mL hücre süspansiyonları halinde, 2xMIC, MIC ve ½ MIC konsantrasyonda kardamoma maruz bırakılmış ve daha sonra 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Kardamom yağı içermeyen kontrol grubu da çalışmaya dahil edilmiştir. Hücre süspansiyonları steril plastik santrifüj tüpleri içerisinde 5000 g'de 15 dakika süreyle santrifüje tabi tutulmuş ve PBS (fosfat tamponlu salin tamponu) ile üç kez (10'ar dakika) ardışık olarak yıkanmıştır. Süpernatantı atılıp pelet haline getirilen hücresel içerik, bir gece boyunca +4°C' de ve %2.5 glutaraldehit içeren PBS tamponunda primer fiksasyona alınmıştır. Numuneler daha sonra oda sıcaklığında PBS tamponunda çözündürülmüş ve sekonder fiksasyon amacıyla %1 osmiyum tetrokside içerisine alınarak 2 saat bekletilmiş ve PBS içinde yıkanmıştır (üç kez ve her biri 15 dakika). Fikse olan hücreler %5 agar içerisine gömülmüş ve %1 uranil asetat ile blok boyamaları yapılmıştır. Daha sonra da her biri 15'er dakika süreyle ve dereceli olarak artan etanol serilerinden (%40, %60, %75, %80 ve %95) geçirilerek dehidrate edilmiştir. Son dehidrasyon basamağı ise %100 etanol içinde, 1 saat boyunca ve her 30 dakikada bir değiştirilerek gerçekleştirilmiştir. Örnekler Epoksi resin içerisine gömülerek 48 saat boyunca ve 60°C'de polimerize edilmişlerdir. Blok haline getirilen numunelerin 60 nm kalınlığındaki tam ince kesitleri bir ultramikrotom (Leica Ultracut R) yardımıyla bakır gridler üzerine alınmıştır. Kesitler son olarak uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanmıştır (Dag vd., 2012). Örnekler JEOL JEM 1220 marka/model geçirimli elektron mikroskopi ile analiz edilmiştir..

## 3. Bulgular

Kardamom için sıvı mikrodilüsyon testi ile elde edilen MİK değerleri çalışılan tüm izolatlarda MİK ≤ 0.1% (vol/vol) şeklinde elde edilmiş ve sonuçlar Tablo 2' de özetlenmiştir. Amfoterisin B için elde edilen MİK değeri ise 0.08 olarak bulunmuştur. Çalışmada elde ettiğimiz verilere göre kardamom yağı fungal hastalıklarının tedavisinde yaygın biçimde kullanılan Amfoterisin B ile karşılaştırıldığında, *Candida* izolatları üzerine oldukça etkili sonuçlar vermiştir. Standart ve klinik izolatların duyarlılıkları arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Çalışılan 6 farklı türe ait izolatın kardamoma duyarlılıkları da benzer oranlarda bulunmuştur. En etkili sonuç 0.031 MİK değeri gösteren *C. albicans* 1802 izolatında tespit edilmiştir. İzolatların MFK değerleri ise MİK değerlerinden iki kat daha yüksek bulunmuştur.

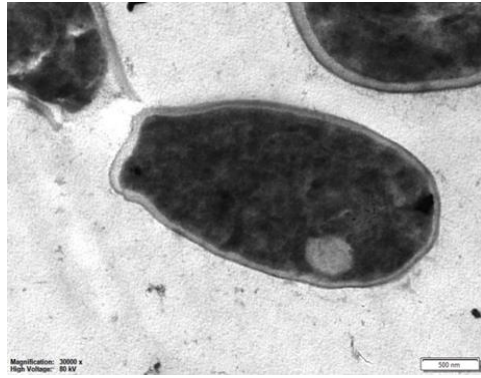
*C. albicans* ATCC 10231 izolatının TEM ile elde edilen kontrol grubuna ait incelemelerinde tipik *Candida* morfolojisine sahip sağlıklı yapıda hücreler tespit edilmiştir; çekirdek belirgin ve merkezi yerleşimli, stoplazma düzenli, hücre duvarı ve stoplazmik membran yapısı bütün olarak izlenmiştir (Şekil 1a). Hücreler subinhibitör konsantrasyonda (1/2 MİK) ve 24 saat kardamom yağına maruz bırakıldıklarında ise stoplazmanın plazma membranından ayrılarak içe çekildiği, hacminin azaldığı ve bazı hücrelerde hücrenin belirli bir kutbuna doğru yer değiştirdiği tespit edilmiştir. Az

sayıda hücrede ise stoplazmada çok belirgin bir organizasyon bozukluğu izlenmiştir. Hücrelerin çoğunda hücre duvar yapısı anormal şişmeler göstermekle beraber yırtılma olmamıştır ancak stoplazma yer değiştirmesi ile birlikte bleb oluşumu gözlenmiştir (Şekil 1b, c, d). Örnekler MİK ve 2xMİK konsantrasyonlarda kardamom maruz bırakıldıklarında ise hücreler tamamen parçalandığı için görüntü alınamamıştır.

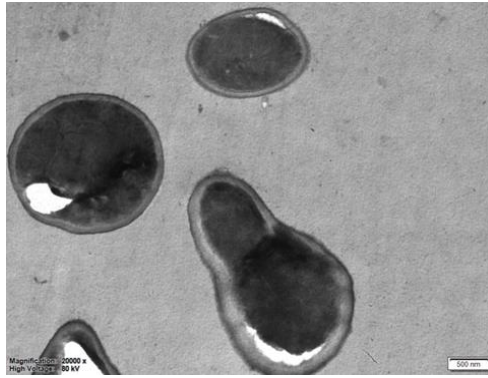
Tablo 2. Kardamom yağının *Candida* izolatlarına karşı sıvı mikrodilüsyon testi ile elde edilen MİK ve MFK değerleri(vol/vol)

<i>Candida</i> türü	*MİK (v/v)	*MFK (v/v)
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0.06	0.1
<i>C. albicans</i> 1710	0.1	0.2
<i>C. albicans</i> 1724	0.1	0.2
<i>C. albicans</i> 1766	0.06	0.1
<i>C. albicans</i> 1802	0.031	0.06
<i>C. albicans</i> 1697	0.1	0.2
<i>C. kefir</i> 1620	0.1	0.2
<i>C. kefir</i> 1706	0.06	0.1
<i>C. krusei</i> 1675	0.06	0.1
<i>C. krusei</i> 1561	0.1	0.2
<i>C. krusei</i> 1670	0.1	0.2
<i>C. glabrata</i> 1744	0.06	0.1
<i>C. glabrata</i> 1797	0.1	0.2
<i>C. parapsilosis</i> 1806	0.1	0.2
<i>C. parapsilosis</i> 1799	0.1	0.2
<i>C. tropicalis</i> 1678	0.1	0.2

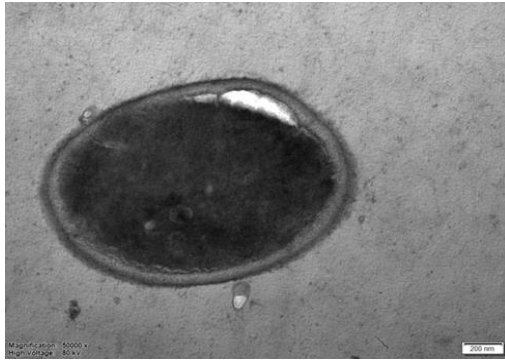
\*MİK: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu, \*MFK: Minimum Fungisidal Konsantrasyon



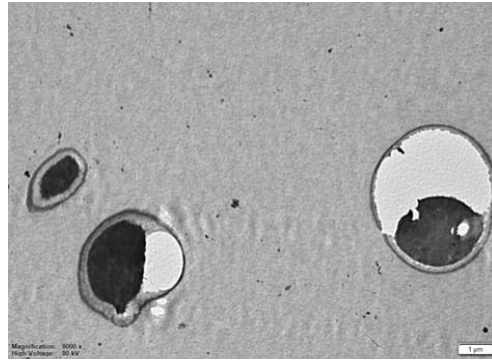
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 2. *C. albicans* ATCC 10231 izolatının kontrol (a) ve kardamom yağıyla muamele sonrası (b, c ve d) elde edilen TEM görüntüleri

#### 4. Sonuçlar ve tartışma

*Candida* türleri hastane kaynaklı enfeksiyonların temel sebeplerinden olup, kan akımı enfeksiyonlarından da en sık izole edilen fungal patojenler arasındadır (Wenzel ve Gennings, 2005). Sebep oldukları yüzeysel ya da invaziv enfeksiyonlar insan sağlığı açısından büyük bir problem teşkil etmektedir (Sardi vd., 2013). Tedavide kullanılan antifungal ilaçlar oldukça sınırlıdır ve bunların yaygın biçimde kullanılması ilaç direnci gelişimine yol açarak hastalığın şiddetini iyice artırmaktadır (Morace vd., 2014). Diğer yandan, konakçıdaki düşük immünite ya da biyofilm ilişkili ilaç direnci gelişimi de hayatı tehdit eden fungal enfeksiyonları artırmaktadır. Örneğin biyofilm oluşturan *Candida* türlerinin tedavide çok sık kullanılan azollere karşı direnç geliştirme yetenekleri bulunmaktadır (Silva vd., 2017). Diğer yandan antifungal ilaçların daha yüksek dozlarda kullanımı toksisiteye de yol açabilmektedir. Tüm bu sebeplerden dolayı araştırmacılar yeni moleküller araştırmakta ve bitki esansiyel yağları da bu konuda yoğun ilgi görmektedir.

Esansiyel yağların antimikrobiyal etkilerini araştıran pek çok çalışma bulunmasına rağmen, literatürdeki sonuçlar nispeten çelişkilidir ve genelde esansiyel yağın etki spektrumu hakkında çok detaylı bilgi vermemektedir. Çünkü bitkilerdeki esansiyel yağların kimyasal bileşenleri türler arasında farklılık göstermektedir (Swamy vd., 2016). Ayrıca coğrafi lokasyon, çevre koşulları ya da olgunluk safhası gibi parametreler de bu bileşenleri etkilemektedir (Swamy vd., 2015). Böylece çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı gösterilen antimikrobiyal etki de farklı olabilmektedir. Antimikrobiyal aktiviteyi tayin etmede kullanılan metod, mikrobiyal gelişimdeki farklılıklar, mikroorganizmanın bitkisel yağa maruziyet süresi, esansiyel yağ ya da komponentinin çözünürlüğü ya da bazen farklı bitki türlerinden türevlenebilen ve aynı yaygın isme sahip yağların etkinlikleri de farklı olabilmektedir (Swamy vd., 2016). Çalışmamızdan elde edilen bulgular, kardamom yağının standart ve klinik *Candida* izolatları üzerine güçlü bir inhibitör etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bulgularımıza benzer bir çalışmada Vijalayalakshmi ve arkadaşları, 202 klinik *Candida* izolatına karşı *Elettaria cardamomum*'un antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmaya alınan izolatlar, çoklu ilaç direnci gösteren biyofilm pozitif izolatları kapsamıştır. Araştırma sonucunda *E. cardamomum*'un etanolik ve asetonik ekstraktları tarafından patojenik *Candida* türlerinin inhibe edildiği rapor edilmiştir. Ayrıca asetonik ekstrakt ile 125 µl (56.25 µg) konsantrasyondaki biyofilm üretimi tamamen inhibe edilmiştir (Vijalayalakshmi vd., 2016). Bizim çalışmamızda da biyofilm pozitif izolatlar deneylere alınmış ve kardamom yağının güçlü etkileri ortaya konmuştur. Diğer bir araştırmada Radhakrishnan ve arkadaşları, klinik *C. albicans* izolatlarına karşı kardamom ve hindistan cevizinin antifungal etkinliklerini araştırmışlardır. Yazarlar her iki bitki ekstraktının da *Candida* izolatlarına karşı güçlü inhibitör etkisini göstermiş ve hücrelerde ergosterol içeriğinin de azaldığını rapor etmişlerdir. Ayrıca elektron mikroskopla da hücrelerde duvar kalınlaşması, membran düzensizlikleri ve stoplazmanın yer değiştirmesi gibi bulgular elde etmişlerdir (Radhakrishnan vd., 2015). Bizim sonuçlarımızda da stoplazmanın yer değiştirmesi belirgin bir bulgu olarak gözlemlenmiş ve hücre duvarındaki kalınlaşma çok net olarak tespit edilememiştir. Hücre duvarındaki ileri derece şişmeler ve stoplazmada büzüşmeler çok belirgin bulgular olarak izlenmiştir. Badei ve arkadaşları bazı bakteri ve küfler üzerine kardamom yağının antimikrobiyal aktivitelerini araştırmış ve MİK değerini 0,5-0,9 mg/mL arasındaki oranlarda bulmuşlardır (Badei vd., 1991a, b). Aneja ve Sharma'nın araştırmalarında 6 farklı tür kulak patojeni üzerine *E. cardamomum* meyve ekstraktlarının etkileri araştırılmış ve en yüksek antimikrobiyal aktivite *S. aureus*'a karşı ve 25 mg/ml lik bir MİK ile elde edilmiştir (Aneja ve Sharma, 2010). Genel olarak esansiyel yağlarla ilgili yapılan benzer antimikrobiyal aktivite çalışmalarını değerlendirildiğinde bakterilerin çok daha yoğun olarak araştırıldığı görülmektedir. Bu çalışmalarda gram pozitif bakterilerin gram negatiflere oranla esansiyel yağlara daha duyarlı oldukları rapor edilmekte ve bu farklılığın hücre duvar yapısından kaynaklanabileceği ifade edilmektedir. Esansiyel yağların mantarlar üzerine olan etkileri ile ilgili çalışmalar ise daha sınırlıdır. Bnasod ve Rai, *Aspergillus fumigatus* ve *A. niger* küflerine karşı kardamom yağının agar dilüsyon metodu ile MİK tayinini gerçekleştirmişlerdir (%v/v). Elde edilen MİK değerleri %2'den büyük bulunmuş; minimal fungisidal konsantrasyon ve MİK değerleri birbirine eşit olarak elde edilmiştir (Bnasod ve Rai, 2008). Mejdı ve arkadaşları yeşil kardamomdan su distilasyonu ile ekstrakte ettikleri esansiyel yağı önce kimyasal kompozisyonu bakımından GC-MS ile karakterize etmişler, sonra da çeşitli bakteri ve mantar izolatlarına karşı disk difüzyon ve mikrodilüsyon testleri yaparak antibakteriyel aktivite bakımından karşılaştırmışlardır. Elde edilen sonuçlar bu esansiyel yağın yüksek ve geniş spektrumlu bir antibakteriyel aktivitesi olduğunu ortaya koymaktadır. Araştırmacılar aynı çalışmada kardamom yağının 16 maya türü üzerine (15 *Candida* türü ve 1 *Saccharomyces cerevisiae*) antifungal etkilerini de araştırmışlardır. Kardamom yağı için elde edilen MİK değerleri 0.023-0.046 mg/ml aralığında bulunmuş ve standart kontrol antibiyotigi olarak kullanılan Amfoterisin B'ye göre (MİK 0.015-0.39 mg/ml) belirgin bir antifungal etkisi olduğu rapor edilmiştir (Mejdı vd., 2015). Çalışılan izolatların MFC değerlerinin tespiti yapıldığında ise maya izolatları kardamom için 3-12 aralığında bir değer göstermiştir. Aynı izolatlar amfoterisin B kullanıldığında ise 0.39-3.125 arasında bir MFC aralığına sahip olmuşlardır. Bu sonuçlardan yola çıkılarak kariyojenik mantarların gelişimini inhibe edebilmek için esansiyel yağ konsantrasyonunun 3-12 mg/ml (MFC değerleri) aralığında olması gerektiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri düşük MİK değerleri (0.023-0.046) ile bu yağın besin kaynaklı patojenlerin inhibe edilmesi ve kariyojenik bakteri ve mantarlar tarafından oluşturulan diş çürüklerinin kontrolünde katkı sağlayabileceğini rapor etmişlerdir (Mejdı vd., 2015). Bizim çalışmamızda da kardamom yağı amfoterisin B'ye oranla oldukça güçlü bir etki sergilemiş, MFC değerlerimiz MİK değerlerimizden iki kat daha yüksek bulunmuştur. Elgayyar ve arkadaşları kardamomu da içeren 8 farklı esansiyel yağın patojenik ve saprofitik mikroorganizmalar üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, kekik, reyhan ve kişnişten ekstrakte edilen esansiyel yağların 4000 ppm konsantrasyonda *Pseudomonas*

*aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Yersinia enterocolitica* üzerine inhibitör etkileri olduğunu göstermişlerdir (Elgayyar vd., 2001). Al- Abdalall tarafından yapılan bir çalışmada da kardamom, tarçın, zencefil, karanfil ve mür ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *C. albicans* ve *S. aureus* üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar baharatların sulu ekstraktlarının test edilem mikroorganizmaların gelişimi üzerine inhibitör etki yapmadığını, sadece mür sulu ekstraktının iki tipinin inhibitör etki gösterdiğini açıklamışlar ve endüstriyel antibiyotik kullanımı yerine mür kullanımının daha etkili olabileceğini belirtmişlerdir (Al-Abdalall, 2016). Tüm bu çalışmalarda da görüldüğü gibi esansiyel yağlarla yapılan invitro çalışmaların karşılaştırılması oldukça güçtür. Çünkü bitkisel yağ ve ekstraktlarının kompozisyonları yerel iklimsel ya da çevre durumlarına göre değişiklikler göstermektedir ya da antimikrobiyal aktiviteyi değerlendirmede seçilen metod ve kullanılan mikroorganizmalar büyük değişkenlikler gösterebilmektedir. Ancak esansiyel yağların medikal amaçlarla kullanımı için etki, güvenlik ve toksisitesinin çok iyi şekilde belirlenmesi gerekmektedir.

Esansiyel yağların hücre membranını tahrip ederek etki gösterdikleri belirtilmektedir ancak ilgili mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. Bu konuda ileri sürülen en önemli görüşlerden biri esansiyel yağların sahip olduğu hidrofobisitenin, hücre membranı lipidlerinde parçalanmaya yol açarak, onu daha geçirgen bir hale getirdiği ve hücre içeriğinin zayıflamasına yol açtığı şeklindedir (Trombetta vd., 2005).

Son yıllarda antifungallerin uygunsuz şekillerde kullanımları sonucu çoklu-ilaç direnci sorunu ortaya çıkmıştır. Diğer yandan antifungal ilaçlar antibakteriyellere göre çok daha sınırlıdır; tedavide sıkça kullanılan amfoterisin B çok etkili olmakla beraber, yüksek toksisitesi kullanımını sınırlamaktadır. Araştırmamızda elde ettiğimiz sonuçlar kardamomun *Candida* izolatları üzerine düşük MİK değerleri ile güçlü bir antifungal etkinlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. TEM analizlerinde ise etkisini özellikle stoplazma ve membran ayrılması ile başlayarak, ileri derecede stoplazmik hasarla gösterdiği tespit edilmiştir. Kardamom yağı antifungal tedavide kullanım için umut verici olabilir ancak etki mekanizmaları, toksisite ve stabilite üzerine ayrıntılı çalışmalara ve in vivo etkinliğin değerlendirilmesine de ihtiyaç bulunmaktadır.

## Kaynaklar

- Agaoglu, S., Dostbil, N., Alemdar, S. (2005). Antimicrobial effect of seed extracts of cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton) Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 16(2), 99–101. Al-Abdalall, A. (2016). Effect of plants extracts on the growth of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 10(16), 337-345.
- Aneja, K.R., Sharma, C. (2010). Antimicrobial potential of fruit extracts of *Elettaria cardamomum* maton (chhoti elaichi) against the pathogens Causing ear infection. PharmacologyOnline. 3,750-6.
- Badei, A.Z.M., El-Akel, A.T.M., Morsi, H.H.H. (1991). Evaluation of chemical, physical and antimicrobial properties of cardamom essential oil. Bulletin of Faculty of Agriculture, Cairo University, 42(1), 183-197.
- Badei, A.Z.M., Morsi, H.H.H., El-Akel, A.T.M. (1991). Chemical composition and antioxidant properties of cardamom essential oil. Bulletin of Faculty of Agriculture, Cairo University, 42(1), 199-215.
- Bansod S., Rai. M. (2008). Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. World Journal of Medical Sciences, 3, 81-88.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology, 94(3), 223–253.
- Canton, E., Peman J., Gobernado, M., Viudes, A., Espinel-Ingroff A. (2004). Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48(7), 2477-2482.
- Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, M.A. (2001) Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. Journal of Bacteriology, 183(18), 5385–5394.
- Clinical Laboratory Standards Institute (2002). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard M27-A2. Wayne PA.
- Dag, I., Oz, Y., Kiraz, N. (2012). Effect of disinfectants on biofilm development by five species of *Candida*. African Journal of Microbiology Research, 6(10), 2380-2386.
- Doughari, J.H. ve Naya, P. (2008). In vitro antifungal activity of *determium microcarpum*. Pakistan Journal of Medical Sciences, 24(1), 91-95.
- Elgayyar, M., Draughon, F.A., Golden D.A., Mount J.R. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. Journal of Food Protection, 64(7), 1019–1024.
- Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., Kozik, A. (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. Acta Biochimica Polonica, 56(2), 211–224.
- Kubo, İ., Himejima, M., Muroi H. 1991. Antimicrobial activity of flavor components of Cardamom *Elettaria cardamomum* (Zingiberaceae) Seed. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39, 1984-1986.
- Mazu, T.K., Bricker, B.A. Flores-Rozas, H., Ablordeppey, S.Y. (2016). The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 16(7), 555–578.



- Mejdi, A., Emira, N., Ameni, D., Guido, F., Mahjoub, A., Madiha, A., Abdulbasit, A. (2015). Chemical Composition and Antimicrobial Activities of *Elettaria Cardamomum* L. (Manton) Essential Oil: A High Activity against a Wide Range of Food Borne and Medically Important Bacteria and Fungi. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 6(1), 248-259.
- Morace, G., Perdoni, F., Borghi, E. (2014). Antifungal drug resistance in *Candida* species. *The American Journal of Medicine*, 2(4), 254-259.
- Movar, A., Thewes, S., ve Hube, B. (2005). Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Current Drug Targets*, 6(8), 863-874 .
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Messer, S.A., Boyken, L., Hollis, R.J., Jones, R.N. (2003). In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 78-83.
- Rabini, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., ve Sintim. H.O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing anti-biofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(3), 493–512.
- Radhakrishnan, V.S., Kurub, A., ve Dwivedi, S.P., Prasad, T. (2015). Multidisciplinary approach for studying and combating microbial pathogens, Chapter: Formulated natural plant extracts from nutmeg and cardamom show antifungal activity against clinical isolates of *Candida albicans* and affect cellular morphology and ergosterol, Publisher: BrownWalker Press, Editors: Antonio Méndez-Vilas, pp.85-90.
- Sardi, J.C.O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A.M., Giannini, M.M. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62(1), 10-24.
- Silva, S., Rodrigues, C., Araújo, D., Rodrigues, M. ve Henriques, (2017). *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. *Journal of Fungi*, 3(1)-8.
- Swamy M.K., Akhtar M.S., ve Sinniah U.R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3012462. p. 21 ID 3012462
- Swamy, M.K., Sinniah, U.R., Akhtar, M.S. (2015). In vitro pharmacological activities and GC-MS analysis of different solvent extracts of *Lantana camara* leaves collected from tropical region of Malaysia. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1–9.
- Şengün İ.Y., Yücel, E. (2015). Antimicrobial properties of wild fruits. *Biological Diversity and Conversation* 8(1), 69-77.
- Taff, H.T., Mitchell, K.F., Edward, J.A., Andes, D.R. (2013) Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiology*, 8(10),1325–1337.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2474–2478.
- Vijalalayakshmi, P., Thenmoshi, S., ve Rajeswari, P. (2016). The evaluation of the virulence factors of clinical *Candida* isolates and the antibiofilm activity of *Elettaria cardamomum* against multidrug resistant *Candida albicans*. *Current Medical Mycology*, 2(2), 8-15.
- Wenzel, R.P., Gennings, C. (2005). Bloodstream infection due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. *Current Medical Mycology*, 41(6), 5389–93.

(Received for publication 05 January 2018; The date of publication 15 December 2018)