

CEVİZ YAPRAK EKSTRELERİNİN ANTİOKSİDAN, ANTİMİKROBİYEL VE ANTİBİYOFİLM AKTİVİTESİ

Sevilay YAPICI*, Merih KIVANÇ

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir, Türkiye

Geliş/Received 25.08.2022; Kabul/ Accepted: 15.02.2023; Online baskı/Published online: 08.03.2023

Yapıcı, S., Kıvanç, M. (2023). Ceviz yaprak ekstralarının antioksidan, antimikrobiyel ve antibiyofilm aktivitesi. GIDA (2023) 48 (2) 405-421 doi: 10.15237/ gida.GD22082

Yapıcı, S., Kıvanç, M. (2023). Antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activity of leaf extracts of walnut. GIDA (2023) 48 (2) 405-421 doi: 10.15237/ gida.GD22082

ÖZ

Bu çalışmada ceviz (*Juglans regia*) yapraklarının su, etil asetat ve metanol ekstralarının antibiyofilm aktivitesi araştırılmıştır. Ekstrelerin antimikrobiyel ve antibiyofilm aktivitesi *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila* ve *Salmonella enterica*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Listeria monocytogenes* Serovar I, *L. monocytogenes* 19111, *L. monocytogenes* 4b 19115, *L. ivanovii* 19119, *L. innocua* 6a 33090, *Streptococcus mutans*, *S. anginosus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus safensis* ve *B. mojavensis*'a karşı araştırılmıştır. Bütün ekstralarının *S. mutans* (1a103), *S. mutans* (2a7) ve *S. aureus* (GMC7) üzerinde antimikrobiyel aktivitesinin olmadığı diğer bakteriler üzerinde ise farklı oranlarda etki gösterdikleri belirlenmiştir. Su ekstrelerinin %99.20 metanol ekstrelerinin %95.05 ve etil asetat ekstrelerinin ise %95.22 oranlarına varan antibiyofilm etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Ekstrelerin biyofilm oluşumunu azaltmada oluşmuş biyofilmi gideriminden daha etkili oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca en yüksek antioksidan aktiviteye etil asetat ekstrelerinin sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Ceviz, *Juglans regia*, antibiyofilm, bitki ekstraları, antibakteriyel etki

ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITY OF LEAF EXTRACTS OF WALNUT

ABSTRACT

In this study, the antibiofilm activity of water, ethyl acetate and methanol extracts of walnut (*J. regia*) leaves were investigated. Antimicrobial and antibiofilm activity of the extracts were investigated against *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. hydrophila*, *S. enterica*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* Serovar I, *L. monocytogenes* 19111, *L. monocytogenes* 4b 19115, *L. ivanovii* 19119, *L. innocua* 6a 33090, *S. mutans*, *S. anginosus*, *B. cereus*, *B. safensis* and *B. mojavensis*. It was determined that all extracts did not show antimicrobial activity on *S. mutans* (1a103), *S. mutans* (2a7) and *S. aureus* (GMC7), but showed different effects on other bacteria. It was determined that water extract had an antibiofilm effect up to 99.20%, methanol extract 95.05% and ethyl acetate extract 95.22%. It has been determined that the extracts are more effective in preventing biofilm formation than removing the formed biofilm. In addition, it was determined that ethyl acetate activity had the highest antioxidant activity.

Keywords: Walnut, *Juglans regia*, antibiofilm, plant extract, antibacterial effect

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: sevilayyapici@ogr.eskisehir.edu.tr

☎: (+90) 530 040 5725

Sevilay Yapıcı; ORCID no: 0000-0003-2298-4892

Merih Kıvanç; ORCID no: 0000-0002-8647-3428

GİRİŞ

Biyofilmler gıda endüstrisinde önemli sorun teşkil etmektedirler. Biyofilmler gıda işleme ekipmanları ve gıdalar ile temas eden yüzeylere çok kısa sürelerde tutunup giderimi zor olan olgun hallerine dönüşerek insan sağlığını tehdit etmektedirler (Bakırdere, 2015). Bakteriye biyofilmleri hedef alan etkili tedavi yok denecek kadar azdır, çünkü biyofilmler doğal olarak geleneksel antibiyotiklere direnç göstermektedirler (Gilbert ve ark., 2002). Bu durum, seçim baskısını ve buna bağlı olarak direnç gelişimini azaltmak için antibiyofilmler etkili ancak bakterisidal aktiviteye sahip olmayan ajanların keşfine olan ihtiyacı arttırmaktadır (Bakkiyaraj ve ark., 2013). Gıda endüstrisinde de kimyasal koruyucularının kullanımlarının azaltılması ve antibiyotiklere karşı artan direnç nedeniyle doğal antimikrobiyel bileşiklerin kullanımına artan bir ilgi vardır (Cowan, 1999; Oliveira ve ark., 2007).

Bitkiler yeni antimikrobiyel arayışında her zaman, mikrobiyologlar için kaçınılmaz alt yapıyı oluşturmaktadır (Cowan, 1999; Erdoğan ve Everest, 2012). Ceviz, iklim koşullarının uygunluğu nedeniyle ülkemizin tüm tarım bölgelerinde yetiştirilmekte ve özellikle kuru meyve şeklinde çok tüketilmektedir (Bayazit ve ark., 2016). Ayrıca ceviz bitkisinin ağaç, meyve kabuğu ve yaprakları ilaç ve kozmetik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Mehrabian ve ark., 2000; Stampar ve ark., 2006; Oliveira ve ark., 2008). Ceviz, terapötik olarak aktif birkaç bileşen, özellikle polifenollerini içeren, mikrobiyel enfeksiyonlar, mide ağrısı, tiroit bozuklukları, kanser, kalp hastalıkları ve sinüzit gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde geleneksel tıpta eski çağlardan beri kullanılan bir bitkidir (Bhatia ve ark., 2006). Yapılan çalışmalarda fenollerin ve/veya fenolik özütlerin antimikrobiyel aktivitesi gösterilmiş, antibiyotiklere ve kimyasal koruyuculara karşı iyi bir alternatif oldukları belirtilmiştir (Fernández ve ark., 1996; Hoult ve Payá, 1996; Rauha ve ark., 2000; Puupponen-Pimiä ve ark., 2001; Zhu ve ark., 2004; Proestos ve ark., 2005; Sousa ve ark., 2006; Pereira ve ark., 2006, 2007a,b).

Çalışmamızda, *J. regia* yapraklarının etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının günümüzün önemli

gıda hijyen problemi haline gelmiş olan biyofilm yapısının oluşumunun inhibe edilmesi ve oluşmuş biyofilmlerin giderilmesine karşı etki kapasitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Test mikroorganizmaları

P. aeruginosa, *K. pneumoniae*, *A. hydrophila* ve *S. enterica*, *S. warneri* (S22 ve KA 14.1), *S. capitis*, *E. faecium* (1d3 ve MİT 2231), *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. aureus*, GMC7, *L. monocytogenes* (Serovar I, 19111 ve 4b 19115), *L. ivanovii* 19119, *L. innocua* 6a 33090, *S. mutans* (1a21, 2a21, 1a103 ve 2a7), *S. anginosus* KA1260, *B. cereus*, *B. safensis* pca 15.3 ve *B. mojavensis* KA159 Eskişehir Teknik Üniversitesi Mikrobiyoloji biriminden sağlanarak çalışmalarda kullanılmıştır. Bakterilerin saflık kontrolü kültürel ve mikroskopik olarak kontrol edildikten sonra teste alınmıştır.

Ceviz yaprak ekstraktlarının hazırlanışı

Ceviz yaprakları Ankara Bumsuz Köyü (39.169571 enlem ve 32.687328 boylam) mevkiinden ilkbahar mevsiminde toplanıp çeşme suyu ile yıkandıktan sonra gölgede kurutulmuştur. Kuruduktan sonra küçük parçalar halinde ufalanıp 1:10 oranında etil asetat ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$), metanol (CH_3OH) ve su (H_2O) ile ayrı ayrı karıştırılmıştır. Çalkalamalı etüvde (37°C , 110 rpm) 24 saat bekletildikten sonra su ekstresi 0.22 μm milipordan direkt olarak geçirilerek, metanol ve etil asetat ekstraktları ise evaporasyon ile çözücülerini uzaklaştırıldıktan sonra uygun çözücü (DMSO (%25)) ile çözdürüldükten sonra 0.22 μm milipordan geçirilerek kullanılmıştır. Ekstreler $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır (Çizelge 1) (Umay, 2007).

Çizelge 1. Ceviz yaprağı ekstraktlarında elde edilen madde miktarları

| Table 1. Amount of substance obtained in walnut leaf extracts | |
|---|---|
| | Madde miktarı (mg/ml) (Amount of substance) (mg/ml) |
| Ceviz yaprağı ekstraktları (Walnut leaf extracts) | |
| Metanol (Methanol) | 32.50 |
| Etil asetat (Ethyl acetate) | 16.00 |
| Su (Water) | 11.00 |

Test bakterilerinin biyofilm oluşturma kapasitesinin belirlenmesi

Test bakterilerinin biyofilm oluşturma kapasitesi mikrotitrasyon plaka ve kongo kırmızısı agar (CRA) olmak üzere iki yöntemle belirlenmiştir.

Mikrotitrasyon plaka testi ile biyofilm oluşum kapasitesinin belirlenmesi

Test bakterilerinin %2 oranında 9 farklı karbonhidrat ilave edilmiş besiyerlerinde (glükoz, fruktoz, maltoz, laktoz, rafinoz, mannoz, sakkaroz, galaktoz ve nişasta) biyofilm oluşturma durumları belirlenmiş ve en iyi biyofilm oluşturdıkları karbonhidrat antibiyofilm deneylerinde kullanılmıştır. Bakteri kültürleri %2 karbonhidrat içeren 5 ml Triptik Soy Broth (TSB)'a ekilerek 37°C'de gece boyunca geliştirilmiş ve deney öncesi 1/40 oranında seyreltilmiştir. 200'er µl bakteri kültürleri mikrotitrasyon plakasının her bir çukuru üzerine dağıtılmıştır. TSB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyondan sonra, bakteri yoğunluğunu tespit etmek için plakalar 490 nm'de spektrofotometrede okunmuştur. Daha sonra kuyucuklar boşaltılıp serum fizyolojik (SF) ile 3'er kere yıkanmıştır. Plakalar kurutulduktan sonra kuyucuklara 200'er µl metanol ilave edilmiştir. 10 dk sonra metanol uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklar 100'er µl %0.1 kristal viyole ilave edilerek boyanmış ve oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir. Daha sonra plakalar, çeşme suyu ile yıkanmıştır. Plakalar kuruduktan sonra boyanın çözünmesi için 200'er %33'lük glasiyel asetik asit eklenmiş ve spektrofotometrede 570 nm'de absorbans belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar OD570<0.120 (-); OD570=0.120-0.240 (+); OD570=0.240-0.500 (++); OD570=0.500-1.00 (+++); OD570=1.00-2.00 (++++); OD570>2.00 (+++++) skalasına göre değerlendirilmiştir (Nyenje ve ark., 2012).

Congo red agar (CRA)'da biyofilm üretiminin fenotipik karakterizasyonu

Bakteriler %5 (a/h) sakkaroz ile takviye edilmiş %0.08 (a/h) kongo kırmızısı içeren BHI (Brain Heart Infusion) agara ekilmiştir. Mikroorganizmalar 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Biyofilm üreticisi suşlar siyah koloniler oluştururken biyofilm üreticisi olmayan suşlar

kırmızı koloniler oluşturmaktadır (Cotter ve ark., 2009). Koyu siyah koloniler güçlü, siyah-pembe koloniler orta ve pembe koloniler zayıf biyofilm üreticisi olarak derecelendirilmiştir (Şekil 1). Testler çift tekrarlı olarak yapılmıştır.

Ceviz yaprağı ekstralarının toplam fenolik madde tayini

Ceviz yaprağı ekstralarında fenolik miktarı Folin & Ciocalteu (FC) reaktifi ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Bray ve Thorpe, 1954). Toplam fenolik madde tayin edilirken Mavi ve ark.'nın (2004) kullandığı yöntem uygulanmıştır. Bu amaçla, 96 kuyulu düz tabanlı bir mikrolakada ekstraların 10 µl'si ve 10 µl FC fenol reaktifi ile karıştırılıp üzerine 30 µl %2'lik (a/h) Na₂CO₃'ün sulu çözeltisi ilave edilmiştir. Karışıma 250 µl dH₂O ilave edilip son hacim 300 µl'ye tamamlanmıştır. 30 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildikten sonra mikrolakaya okuyucuda 760 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Kontrol olarak ekstre yerine dH₂O kullanılmıştır. Aynı prosedür, standart gallik asit çözeltisi için tekrarlanmış ve kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Ekstrelerin toplam fenolik derişimi gallik asit kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Deneyler her bir ekstre ve gallik asit için 4 kez tekrarlanmıştır. Sonuçlar mg GAE/g kuru ekstre olarak ifade edilmiştir.

Ceviz yaprağı ekstralarının toplam flavonoid madde tayini

Toplam flavonoid madde tayin edilirken alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde 100 µl test materyali çözeltisi, 400 µl su ve 30 µl %5'lik NaNO₂ ile karıştırılmıştır. 5 dakika sonra 30 µl %10'luk AlCl₃ ilave edilmiştir. 6. dk'da 200 µl 1N NaOH ilave edilip distile su ile son hacim 1000 µl'ye tamamlanmıştır. Negatif kontrol için madde yerine distile su ve standart olarak da kersetin kullanılmıştır. 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 510 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Absorbans tayini yapıldıktan sonra kersetin standart eğrisi çizilmiş ve grafiğe göre ekstraların flavonoid maddeleri belirlenmiştir (Zhinsen ve ark., 1999).

Antioksidan aktivite tayini

Antioksidan aktivitesi DPPH süpürme aktivitesi ve ABTS persülfat yöntemleri olmak üzere iki ayrı yöntemle belirlenmiştir.

DPPH süpürme aktivitesi

Bu yöntemde 2,2-difenil-1 pikrilhidrazil (DPPH), radikal antioksidan kapasite ölçümleri için kullanılmaktadır. 0.39 ml metanolik DPPH çözeltisi (0.1mM), 0.1 ml ekstre ve 0.49 ml metanol ile karıştırılmıştır. Vortekslenildikten sonra 1 saat karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Absorbans değeri spektrofotometrede 515 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Kör olarak sadece DPPH çözeltisi kullanılmıştır (Singh ve ark., 2002). Absorbans değerleri belirlendikten sonra aşağıdaki formüle göre ekstrelerin % DPPH süpürme aktiviteyi belirlenmiştir.

$$\text{DPPH süpürme aktivitesi (\%)} = \frac{\text{OD kör} - \text{OD deney}}{\text{OD kör}} \times 100$$

ABTS persülfat yöntemi

ABTS radikalinin okside olarak ABTS+ radikal katyonuna yükseltgenmesi esasına dayanan elektron transfer temelli bir antioksidan kapasite tayin yöntemidir. ABTS+ radikal çözeltisi ile muhtemel antioksidan içeren bir örneğin birleştirilmesi, yükseltgenmiş mavi/yeşil renkli ABTS+ radikal katyonunun indirgenmesi ve renk şiddetinin azalmasına neden olmaktadır (Prior ve ark., 2005). 7 mM ABTS amonyum suda çözülmüş ve 1:1 oranında 2.45 nmol potasyum persülfat ile karıştırılıp oda sıcaklığında 12-16 saat süresince inkübe edilmiştir. Daha sonra elde edilen koyu mavi çözelti pH 7.4'te distile su ile 734 nm dalga boyundaki absorbans değeri 0.7'ye kadar seyreltilmiştir. 150 µl bitki ekstresi 2850 µl seyreltilmiş çözelti ile karıştırılıp 6 ve 10 dakika sonra 30°C de absorbans okunmuştur. Absorbans değerleri aşağıdaki formüle yerleştirilerek antioksidan etki tayin edilmiştir (Huang ve ark., 2005; Selçuk, 2012).

$$\text{ABTS (\%)} = \left\{ 1 - \frac{\text{OD deney}}{\text{OD kör}} \right\} \times 100$$

Ceviz yaprağı ekstrilerinin antimikrobiyel aktivitesinin belirlenmesi

Ceviz yaprağı ekstrilerinin minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) mikro dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir (CLSI, 2009). MİK analizi, CLSI kılavuz prosedürlerine göre sıvı mikro-seyreltme teknikleri ile Muller Hinton Broth (MHB) kullanılarak yapılmıştır. Bakteriler MHB'de bir gece inkübe edildikten sonra, bakteriler çift kuvvetli sıvı besi yerlerinde 0.5 Mcfarland standardına göre ayarlanmıştır. Steril 96 kuyucuklu mikro plakaların kuyucuklarına her bir ekstre için iki kat seri olarak seyreltilmiş farklı dilüsyonlarından 100'er µl ilave edilmiştir. Ardından 100 µl bakteri süspansiyonu her göze aşılmalıdır. 200'er µl MHB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 37°C'de 24 saat inkübasyonu takiben, 40 µl 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) her kuyucuğa ilave edilmiş ve 10-15 dk daha inkübe edilmiştir. Bakteri büyümesi kuyucuklarda pembe-kırmızı bir renk oluşması ile gözlemlenmiştir. Üremenin önlenmediği en düşük konsantrasyonda olan kuyucuktaki konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak vankomisin (10 mg/ml) ve kloramfenikol (10 mg/ml) kullanılmıştır.

Bakterisidal etkiden bahsedebilmek için canlı bakterilerin miktarının %99.9 azalması gerekmektedir. MİK belirlendikten sonra gözle görülür gelişmenin olmadığı kuyucuklardan Nutrient agar (NA) ekim yapılarak minimal bakterisidal konsantrasyon belirlenmiştir. 37°C'de inkübe edildikten sonra üremenin görülmediği, bakterisidal etkili ekstre konsantrasyonu belirlenmiştir (Kaygusuz ve Töreci, 1998).

Antibiyofilm aktivitenin belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda ceviz ekstrilerinin biyofilm oluşumunu azaltma ve oluşmuş biyofilmleri giderme kabiliyetleri 96 kuyucuklu polistiren düz tabanlı mikrotitre plakalar ile belirlenmiştir. Bu nedenle 2 farklı deney düzeni kurularak MİK dozlarının alt, üst ve ara dozlarının etkileri araştırılmıştır. İlk deney düzeninde ekstriler ve bakteriler aynı anda ekilmiş ve böylece ekstrilerin biyofilm oluşumunu azaltmadaki kabiliyetleri tayin edilmiştir. İkinci deney düzeninde ise öncelikle bakteriler

mikroplakalara ekilerek biyofilm oluşturmaları sağlanmış ve sonra üzerlerine ekstreler ilave edilerek oluşmuş biyofilmler üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Bakteri kültürleri %2 oranında karbonhidrat içeren 5 ml TSB'de 18 saat (37°C'de) geliştirilmiş ve deney öncesi 1/40 oranında seyreltilmiştir. Ekstrelerin her bir konsantrasyonundan kuyucuklara 100 µl dağıtılarak üzerine bakteri kültürlerinden 100'er µl aktarılmıştır. Sadece TSB (%2 şeker içeren) ve bakteri kültürü kontrol olarak kullanılmıştır. 24 saat 37°C'de inkübasyondan sonra mikrotitrasyon plaka testi ile biyofilm oluşum kapasitesinin belirlenmesi bölümünde verilen yöntemle biyofilm miktarı belirlenmiştir. İkinci deney düzenğinde ise 1/40 oranında gecelik kültürden seyreltilmiş bakteri kültüründen 200 µl olacak şekilde plaklara ekilmiş ve 24 saat 37°C inkübe edilerek biyofilm oluşturmaları sağlanmış, sonra kuyucuklardan 100 µl pipetle uzaklaştırılmıştır. Deney gruplarına 100 µl ekstre dilüsyonları, kontrol grubuna ise 100 µl taze TSB (%2 şeker içeren) plakalara aktararak 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra biyofilm mikrotitrasyon plaka testi ile biyofilm oluşum kapasitesinin belirlenmesi bölümünde verilen yöntemle belirlenmiştir. Sonuçlar mikroorganizma ve besiyeri içeren kontrol sonuçları ile kıyaslanarak %biyofilm giderimi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Sandasi ve ark., 2010).

$$\% \text{Biyofilm giderim} = \frac{\text{ODkör} - \text{ODDeney}}{\text{ODkör}} \times 100$$

SONUÇ ve TARTIŞMA

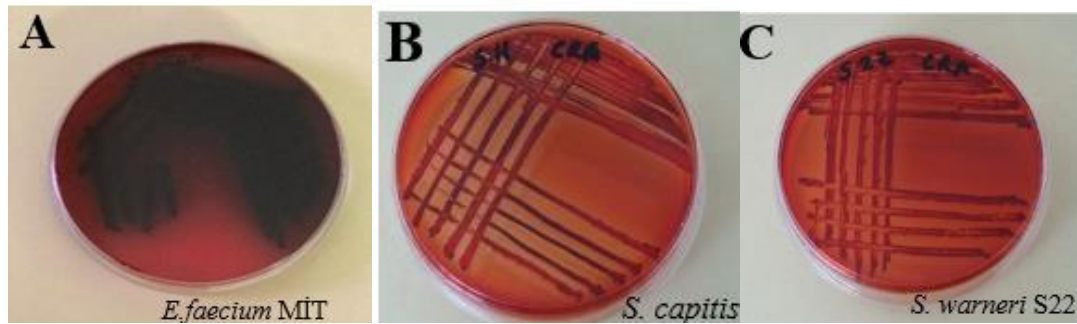
Cevizin, yeşil kabuğu, tohumu, kabuk ve yaprakları, bileşenleri ilaç ve kozmetik sanayinde, geleneksel tıpta fungal veya bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yoğun bir şekilde yaygın olarak kullanılmaktadır (Wichtl ve Anton, 1999; Stampar ve ark., 2006; Chaleshtori ve ark., 2011). Yapılan çalışmalarda ceviz ürünlerinin antimikrobiyel aktivitelerini gösterilmiştir; ancak ceviz yaprakları ve onların antibiyofilm üzerine etkileri hakkında sayılı çalışma bulunmaktadır (Qadan ve ark., 2005). Araştırmamız yaprak ekstrelerinin antibiyofilm ve antimikrobiyel etkileri ve bu etkilerin oluşma sebepleri üzerine yoğunlaştırılmıştır.

Test bakterilerinin biyofilm oluşturma kapasitesi

Farklı karbonhidratlar içeren besi yerlerinde test bakterileri farklı oranlarda biyofilm oluşturmuştur. *S. warneri* (KA 14.1 ve S22), *E. faecium* (1d3 ve mit 2231), *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. enterica*, *S. anginosus* KA1260, *S. aureus*, *S. aureus* GMC7, *L. monocytogenes* (Serovar I, 19111, ve 4b 19115), *L. innocua* 6a 33090, *S. mutans* 2a7, *B. mojavensis* KA159 ve *S. capitis* S11 laktozlu, *E. faecalis* 29212 ve *A. hydrophila* ise früktozlu, *B. cereus* ve *B. safensis* pca 15.3 maltozlu, *S. mutans* (1a21, 2a21 ve 1a103) sakkarozlu, *L. ivanovii* 19119 ise glikozlu ortamda en yüksek biyofilm oluşturmuşlardır (Çizelge 2). Antibiyofilm deneylerine bu belirlenen besiyerleri ile devam edilmiştir. Aynı skala aralığında olan sonuçlardan en yüksek absorbansa sahip olan karbonhidrat seçilmiştir. Kongo kırmızı agarda *S. aureus*, *S. aureus* GMC7, *E. faecium* ve *S. warneri* KA 14.1'in güçlü biyofilm oluşturdukları, mikrotitre testi ile de *S. warneri* KA 14.1, *S. aureus* GMC7'nin yüksek biyofilm oluşturdukları gözlenmiştir. Bu değerlere göre *S. aureus* GMC7'nin ve *S. warneri* KA 14.1'in CRA ve mikrotitre deney sonuçlarının uyumlu olduğu *S. aureus* ve *E. faecium* MİT'in ise mikrotitre testine göre orta dereceli olarak değerlendirilebilecekken CRA testine göre güçlü biyofilm oluşturdukları tayin edilmiştir. Sonuçlar mikrotitre testiyle karşılaştırıldığında genel olarak sonuçların uyumlu olduğu görülmüştür (Şekil 1).

Toplam fenolik ve flavonoid madde içeriği

Ceviz yaprağının bileşiminde fenolik asitler, tanenler, askorbik asit, kafeik asit, flavonoidler, klorogenik asit, ferulik asit, kateşin, vanilik asit, parakumarik asit ve ceviz özüğü juglon bulunmaktadır (Pereira ve ark., 2007b; Pereira ve ark., 2008; Gupta ve ark., 2019). Çeşitli çalışmalar fenollerin ve/veya fenolik ekstraktların antimikrobiyel aktivitesini göstermiştir (Proestos ve ark., 2005; Sousa ve ark., 2006), bu da onları antibiyotiklere ve kimyasal koruyuculara iyi bir alternatif haline getirmektedir. Ceviz yapraklarında bulunan fenoller ve flavonoidler muhtemelen bu bitkiden elde edilen ekstrelerin antibakteriyel aktivitelerinden sorumludur (Stampar ve ark., 2006). Sahip olduğu bu aktivite flavonoid bileşenlerin bakterilerin tutunmasını önlemesi yoluyla olabilir (Gupta vd., 2019).



Şekil 1. Biyofilm oluşumunun CRA besiyerindeki görüntüsü A: güçlü biyofilm; B: orta biyofilm; C: zayıf biyofilm

Figure 1. Image of biofilm formation in CRA medium A: strong biofilm; B: medium biofilm; C: weak biofilm

Çizelge 2. Bakterilerin farklı karbon kaynaklarında biyofilm oluşturma oranları

Table 2. Biofilm formation rates of bacteria in different carbon sources

| Bakteriler (Bacteria) | Karbonhidratlar (Carbohydrates) (%2) | | | | | | | | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------|--------------------|----------------------|-------------------|
| | Glikoz (Glucose) | Fruktoz (Fructose) | Maltoz (Maltose) | Laktöz (Lactose) | Mannoz (Mannose) | Rafinoz (Raffinose) | Sakkaroz (Sucrose) | Galaktoz (Galactose) | Niştasta (Starch) |
| <i>S. warneri</i> Ka 14.1 | - | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ |
| <i>S. warneri</i> S22 | + | - | - | +++ | - | ++ | - | + | - |
| <i>B. mojavensis</i> Ka 15.9 | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ | - |
| <i>B. safensis</i> Pca 15.3 | + | + | ++++ | ++++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ |
| <i>B. cereus</i> | + | - | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | + | + |
| <i>S. capitis</i> S11 | +++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | +++ | +++ | ++ |
| <i>S. aureus</i> | + | - | - | +++ | - | +++ | - | ++ | + |
| <i>S. aureus</i> Gmc7 | ++++ | +++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++ |
| <i>L. monocytogenes</i> 19111 | + | - | - | +++ | + | ++ | ++ | + | + |
| <i>L. monocytogenes</i> 4b 19115 | +++ | + | +++ | +++ | ++ | ++ | - | +++ | ++ |
| <i>L. innocua</i> Ga 33090 | ++ | + | + | +++ | - | + | + | + | + |
| <i>L. monocytogenes</i> Serovar I | ++ | - | - | +++ | ++ | + | ++ | ++ | + |
| <i>L. ivanovii</i> 19119 | +++ | - | - | +++ | ++ | +++ | + | + | ++ |
| <i>S. mutans</i> 1a21 | ++++ | + | ++ | ++ | ++++ | +++ | ++++ | ++ | ++ |
| <i>S. mutans</i> 1a103 | ++ | ++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++++ | ++ | ++ |
| <i>S. mutans</i> 2a21 | ++++ | ++++ | ++ | ++ | +++ | +++ | ++++ | ++ | ++ |
| <i>S. mutans</i> 2a7 | +++ | - | +++ | +++ | ++ | + | + | + | +++ |
| <i>S. anginosus</i> KA 1260 | - | ++ | - | +++ | ++ | +++ | - | ++ | +++ |
| <i>E. faecalis</i> 29212 | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ |
| <i>E. faecium</i> 1d3 | + | - | + | +++ | ++ | +++ | - | ++ | ++ |
| <i>E. faecium</i> mit 2231 | ++ | - | - | +++ | + | +++ | +++ | ++ | - |
| <i>K. pneumoniae</i> | +++ | - | + | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | +++ | +++ |
| <i>P. aeruginosa</i> | +++ | - | +++ | ++++ | ++ | +++ | ++ | + | + |
| <i>A. hydrophila</i> | +++ | +++ | +++ | +++ | ++++ | ++ | + | +++ | ++ |
| <i>S. enterica</i> | + | - | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |

OD570 <0.120 (-); OD570 = 0.120-0.240 (+); OD570 = 0.240-0.500 (++); OD570 = 0.500-1.00 (+++); OD570 = 1.00-2.00 (++++); OD570 >2.00 (+++++)

Doğan ve ark.'larının 2014'te ceviz yaprağının toplam fenolik maddelerine baktıkları bir çalışmada çoktan aza doğru sırasıyla metanol ekstralarında 73.16 ve 69.18 mg GAE/g; etanol ekstralarında 67.12 ve 63.81 mg GAE/g ve su ekstralarında 44.34 ve 48.91 mg GAE/g miktarlarında toplam fenolik bulunduğunu belirtmişlerdir. Zoral ve Turgay (2014) yaptıkları bir çalışmada ceviz yaprağının etil asetat ekstrasında 635.8 mg GAE/100g, metanol

ekstrasında 1650 mg GAE/100g, su ekstrasında 1064.3 mg GAE/100g olarak toplam fenolik maddeleri belirlenmiştir. Çalışmamızda su ekstrasının toplam fenolik içeriği 75.001±0.089 mg GAE/g; metanol ekstrasının toplam fenolik içeriği 50.085±0.121 mg GAE/g ve etil asetat ekstrasının ise 28.632±0.649 mg GAE/g olarak belirlenmiştir (Çizelge 3). Doğan ve ark.'larının çalışmasından farklı olarak çalışmamızda su ekstrasında diğer ekstralara oranla daha fazla

toplam fenolik madde bulunduğu belirlenmiştir. Bu durum çalışmamızda kullandığımız su

ekstremizin çok yoğun renkli bir çözelti olmasına bağlanmıştır.

Çizelge 3. Test materyallerinin toplam fenolik maddeleri

Table 3. Total phenolic contents of test materials

| | TP (mg GAE/g)±SP |
|--|------------------|
| Ceviz Yaprığı Su (<i>Walnut leaf water</i>) | 75.001±0.089 |
| Ceviz Yaprığı Metanol (<i>Walnut leaf methanol</i>) | 50.085±0.121 |
| Ceviz Yaprığı Etil asetat (<i>Walnut leaf ethyl acetate</i>) | 28.632±0.649 |

Çalışmamızda test ettiğimiz ceviz yaprağı ekstralarında flavonoid miktarı yüksekten aza doğru 54.990 mg QE/g- 11.439 mg QE/g arasında bulunmuştur (Çizelge 4). Çalışmamızda

elde edilen antimikrobiyel aktivitenin ekstradaki flavonoid miktarı ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4. Ceviz yaprağı ekstralarının toplam flavonoid (TF) maddeleri

Table 4. Total flavonoid (TF) contents of walnut leaf water extracts

| | TF mg QE/g |
|--|------------|
| Ceviz Yaprığı Su (<i>Walnut leaf water</i>) | 54.992 |
| Ceviz Yaprığı Etil asetat (<i>Walnut leaf ethyl acetate</i>) | 30.324 |
| Ceviz Yaprığı Metanol (<i>Walnut leaf methanol</i>) | 11.439 |

Antioksidan aktivite

Oksidasyon tepkimelerine neden olan moleküllerin etkilerinin azaltılması veya oksidasyonun engellenmesi işlemlerine antioksidan etki denmektedir. Oksidasyon tepkimeleri sonucunda serbest radikaller üretilmekte ve bunun devamında zincirleme tepkimeler meydana gelerek canlı hücrelere zarar vermektedir. Antioksidanlar bu zincirleme tepkimede serbest radikali ortadan kaldırarak durdurmakta ve radikal yerine kendisi okside olarak oksidasyon tepkimesini gerçekleştirmektedir (Kale ve ark., 2011). Masek ve ark. (2019) yaptıkları bir çalışmada çeşitli ceviz yapraklarının %70'lik etanol ekstralarının antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Ceviz yapraklarının DPPH indirgeme aktivitesini

%6.72±0.34 ve ABTS+ süpürme aktivitesi ise 6.94±0.35 olarak belirtilmiştir. Çalışmamızda ceviz yaprağı ekstralarının DPPH indirgeme aktivitesinin çoktan aza doğru sırasıyla etil asetat (%91.57), metanol (%39.37) ve su (%8.01) ekstralarında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 5). ABTS+ süpürme aktivitelerine bakıldığında ise yine en yüksek oranlı olanın etil asetat (%73.25) ekstresine ait olduğu bunu su ekstresi (%46.77) ve metanol ekstresi (%37.24) takip ettiği belirlenmiştir (Çizelge 6). Araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırıldığında ceviz yapraklarımızın yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durum bitkilerin toplandığı yerin, laboratuvar şartları, ekstraksiyon koşullarına bağlı olarak farklılık gösterdiği düşünülmektedir.

Çizelge 5. Ceviz yaprağı ekstralarının DPPH giderme yüzdeleri (%)

Table 5. DPPH scavenging activity (%) of walnut leaf water extracts

| | DPPH giderme yüzdeleri (%) DPPH scavenging activity (%) |
|--|--|
| Ceviz yaprağı etil asetat (<i>Walnut leaf ethyl acetate</i>) | 91.57 |
| Ceviz yaprağı metanol (<i>Walnut leaf methanol</i>) | 39.37 |
| Ceviz yaprağı su (<i>Walnut leaf water</i>) | 8.01 |

Çizelge 6. Ceviz yaprağı ekstrelerinin ABTS+ serbest radikal yakalama aktivitesi (%)
Table 6. ABTS+ free radical scavenging activity (%) of walnut leaf water extracts

| | ABTS+ serbest radikal yakalama aktivitesi (%) ABTS+ free radical scavenging activity (%) | |
|--|---|------------------|
| | 6.dk (6th min) | 10.dk (10th min) |
| Ceviz Yaprağı Etil asetat (<i>Walnut leaf ethyl acetate</i>) | 73.25 | 75.72 |
| Ceviz Yaprağı Su (<i>Walnut leaf water</i>) | 46.77 | 46.29 |
| Ceviz Yaprağı Metanol (<i>Walnut leaf methanol</i>) | 37.24 | 36.67 |

Antimikrobiyel aktivite

Ceviz yaprağı ekstreleri test mikroorganizmalarına karşı farklı oranlarda antimikrobiyel aktivite göstermiştir. Etil asetat, metanol ve su ekstrelerinin değişen miktarları test bakterilerini inhibe etmiştir. Su ve metanol ekstrelerinin test

edilen bakteriler üzerinde bakterisidal etkilerinin olmadığı belirlenmiştir. Tüm sonuçlar incelendiğinde tüm ekstrelerin ortak olarak *S. mutans* 1a103 ve *S. mutans* 2a7 bakterileri üzerinde antimikrobiyel etkilerinin bulunmadığı belirlenmiştir (Çizelge 7).

Çizelge 7. Ceviz yaprağı ekstrelerinin bakteriler üzerindeki antimikrobiyel aktivite sonuçları
Table 7. Antimicrobial activity results of walnut leaf extracts on bacteria

| Test Bakterileri (<i>Test bacteria</i>) | Ceviz Yaprağı Ekstreleri (mg/ml) (<i>Walnut Extracts</i>) | | | Antibiyotik (mg/ml) (<i>Antibiotic</i>) | | | | |
|--|--|---|-------------------------|--|------------|-------------------------------------|------------|-------|
| | Metanol* (<i>Methanol</i>) | Etil asetat (<i>Ethyl acetate</i>) | Su* (<i>Water</i>) | Kloramfenikol (<i>Chloramphenicol</i>) | | Vankomisin (<i>Vancomycin</i>) | | |
| | MİK MIC | MİK MIC | MBK MBC | MİK MIC | MBK MBC | MİK MIC | MBK MBC | |
| <i>S. capitis</i> S11 | 0.51 | 2.00 | 4.00 | 1.38 | 0.02 | 10.00 | 10.00 | 10.00 |
| <i>S. aureus</i> GMC7 | -- | -- | -- | -- | 0.26 | 0.51 | 0.13 | -- |
| <i>S. aureus</i> | -- | 1.00 | -- | -- | 0.26 | 10.00 | 0.26 | 10.00 |
| <i>S. warneri</i> KA14.1 | 2.03 | 4.00 | -- | -- | 0.02 | 0.51 | -- | -- |
| <i>S. warneri</i> S22 | 4.06 | 4.00 | 2.00 | 5.50 | 0.02 | 0.51 | 0.03 | 0.26 |
| <i>E. faecalis</i> 29212 | 8.13 | 8.00 | -- | 2.75 | 0.13 | 0.51 | 0.03 | -- |
| <i>E. faecium</i> 1d3 | -- | 2.00 | -- | 5.50 | -- | -- | 10.00 | 10.00 |
| <i>E. faecium</i> MİT 2231 | 2.03 | 4.00 | -- | 1.38 | 0.51 | 0.51 | 0.51 | 0.51 |
| <i>L. ivanovii</i> 19119 | -- | 4.00 | -- | -- | 10.00 | 10.00 | 0.13 | 0.13 |
| <i>L. innocua</i> 6a 33090 | -- | 4.00 | -- | -- | 10.00 | 10.00 | -- | -- |
| <i>L. monocytogenes</i> 4b 19115 | -- | 4.00 | -- | 5.50 | 0.26 | 0.26 | 0.02 | 0.51 |
| <i>L. monocytogenes</i> 19111 | -- | -- | -- | 2.75 | 0.01 | -- | 0.26 | -- |
| <i>L. monocytogenes</i> SerovarI | -- | -- | -- | 0.34 | K | K | K | K |
| <i>B. cereus</i> | -- | 4.00 | -- | -- | 0.26 | 10.00 | 0.02 | -- |
| <i>B. safensis</i> PCA 15.3 | 16.25 | 4.00 | -- | -- | 0.03 | 0.51 | 0.01 | -- |
| <i>B. mojavensis</i> KA15.9 | 4.06 | 4.00 | -- | -- | 0.13 | 0.51 | 0.03 | -- |
| <i>S. mutans</i> 1a103 | -- | -- | -- | -- | 0.26 | 0.26 | -- | -- |
| <i>S. mutans</i> 1A21 | -- | -- | -- | 2.75 | 0.51 | 0.51 | 0.51 | 0.51 |
| <i>S. mutans</i> 2A21 | -- | -- | -- | 1.38 | 0.51 | 0.51 | 10.00 | 10.00 |
| <i>S. mutans</i> 2A7 | -- | -- | -- | -- | 0.01 | 0.51 | 0.03 | 10.00 |
| <i>S. anginosus</i> KA1260 | 2.03 | 0.50 | -- | 2.75 | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 2.03 | 4.00 | -- | -- | 0.51 | 0.51 | 10.00 | -- |
| <i>K. pneumoniae</i> | 16.25 | -- | -- | -- | 0.26 | 10.00 | 10.00 | 10.00 |
| <i>S. enterica</i> | 16.25 | -- | -- | -- | 0.13 | 10.00 | 10.00 | -- |
| <i>A. hydrophila</i> | 16.25 | -- | -- | 1.38 | K | K | K | K |

*Bakterisidal etkisi bulunmamaktadır (*No bactericidal effect).

K: Çalışmalar devam ederken pandemi kısıtlamaları sırasında 2 bakterimiz kontaminasyon nedeniyle deney çalışmalarından çıkarılmıştır (K: While the studies continue, 2 of our bacteria were excluded from the experimental studies due to contamination during the pandemic restrictions).

E. coli, *B. subtilis*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus* üzerine ceviz yeşil gövdesinin etanol, su ve etil asetat ekstralarının inhibitör etkili olduğu ve etanolik özüt, etil asetat ve su özütleriyle karşılaştırıldığında çok iyi aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Sharma ve ark., 2013). Bu farklılık ekstraksiyon yöntemlerinin farklılığından olabileceği gibi bakterilerin suş farklılığı nedeniyle de olabilmektedir. Çalışmamızda aynı türün bakterilerinin duyarlılığının farklı olduğunu gözlenmiştir.

Darmani ve ark. (2006) ceviz yaprağı su ekstresinin *S. mutans*, *S. salivarius*, *Lactobacillus casei* ve *Actinomyces viscosus*'un gelişmesini inhibe ettiğini bildirmiştir. Çalışmamızda bazı *S. mutans* (1a21 ve 2a21) ve *L. monocytogenes* (Serovar I ve 19111) türlerine karşı sadece su ekstresi etki gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 7).

J. regia'nın petrol eter, kloroform, etil asetat ve metanol özütlerinin 15 mg/ml'sinin *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus salivarius* ve *S. mutans* üzerinde önemli bir etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Asma ve Yasmine, 2021). Çalışmamızda etil asetat ekstresinin *S. capitis*, *S. warneri* S22 üzerinde daha düşük oranlarda antimikrobiyel etkisinin iyi olduğu belirlenmiştir. Metanol ekstresinin *S. capitis* üzerindeki MİK değerinin diğer ekstrelelere oranla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Yine Asma ve Yasmine tarafından yapılan çalışmada elde edilen değerden daha düşük oranlarda metanol ekstresinin *P. aeruginosa* üzerinde etil asetat ekstresine oranla daha iyi antimikrobiyel etkisinin olduğu belirlenmiştir (Çizelge 7). Sonuçlar arasında, cevizin toplandığı bölge, toplanma zamanı, deney koşulları gibi birçok etkenden dolayı farklılık görülebilmesi mümkün olabilmektedir.

P. aeruginosa'nın metanol ve etil asetat ekstralarına karşı duyarlı iken su ekstresine dirençli olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 7). Bulgularımıza benzer veriler Dolatabadi ve ark., (2018) ve Asma ve Yasmine (2021) tarafından da rapor edilmiştir.

Yiğit ve ark. (2009) ceviz yaprağının metanol (0.625 mg/ml) ve su (1.25 mg/ml) ekstresinin *S. aureus* ve *P. aeruginosa* üzerine antimikrobiyel etki

gösterdiğini belirlemişlerdir. Pereira ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada ceviz yaprağı su ekstresinin *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* türlerine karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Pereira ve ark., 2007). Ancak çalışmamızda su ekstralarının söz konusu bakterilere karşı etkisiz kaldığı, metanol ekstresinin *P. aeruginosa* (2.03 mg/ml) üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

Mehrabian ve ark. (2000) ceviz yaprağı metanol ekstresinin daha etkili antimikrobiyel özelliğe sahip olduğunu, bunun aktif maddelerin alkolde farklı maddelerin çözünmesinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Bu sonuç bizim çalışmamızla da örtüşmektedir.

Kocaçalışkan ve ark. (2018) *Pseudomonas gingivi*, *P. syringae*, *S. aureus*, *B. cereus* ve *Y. enterocolitica*'nın ceviz yaprağının alkol ve su ekstralarına duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar alkol ekstralarının su ekstralarından daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da genel olarak etil asetat ve metanol ekstralarının su ekstresine oranla daha iyi antimikrobiyel aktivite gösterdikleri belirlenmekle birlikte türlere göre bazı farklılıkların olabileceği tayin edilmiştir. Örneğin *B. cereus* üzerinde metanol ekstresi daha etkili iken *L. monocytogenes* türleri üzerinde su ekstresinin daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Ceviz yaprağı ekstralarının antimikrobiyel etkilerinin karşılaştırılabilmesi adına kloramfenikol ve vankomisin antibiyotiklerinin aktiviteleri de araştırılmıştır. Antibiyotiklerin bazı bakteriler üzerinde farklı etkiler gösterebildikleri, her üç yaprak ekstresinin de etkisiz kaldığı *S. aureus* GMC7'e karşı etkili oldukları ancak vankomisin *L. innocua* ve *S. mutans* 1a103 üzerinde antimikrobiyel aktivitesinin olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 7).

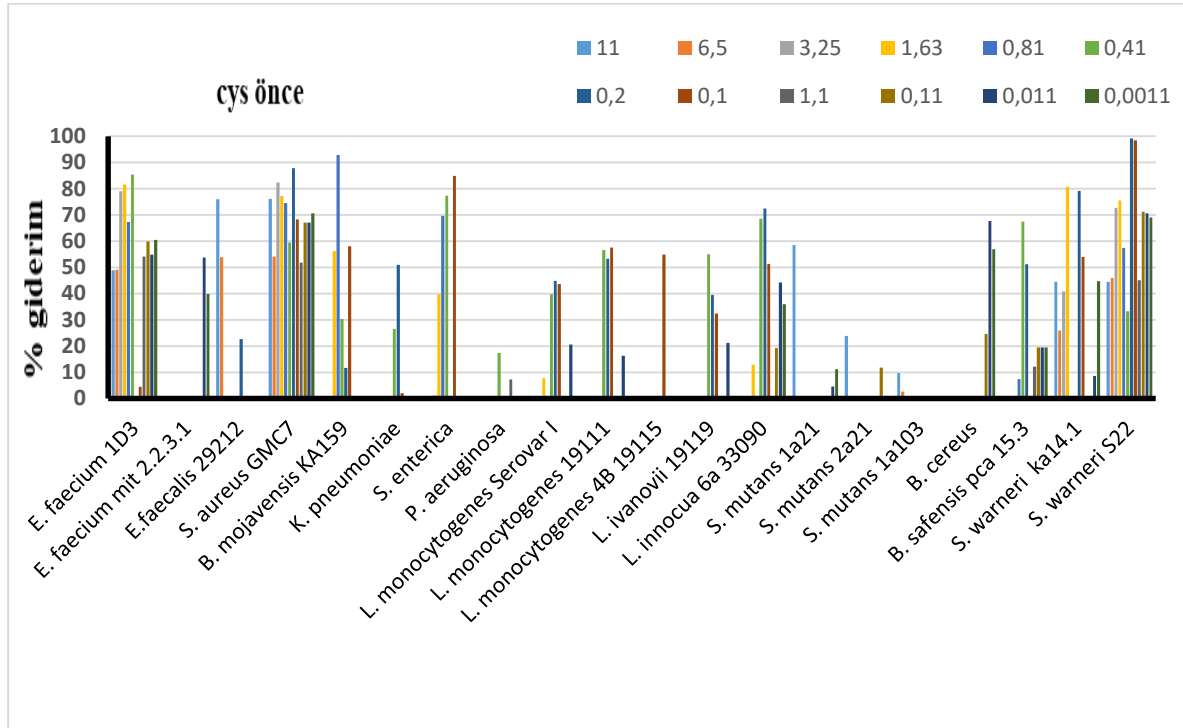
Antibiyofilm aktivite

Gıda kaynaklı patojenler biyofilm oluşturmakta ve gıda endüstrisi için önemli bir gıda güvenliği sorunu olmaya devam etmektedirler (Gürlük ve ark., 2022). Araştırmamızda dünya çapında hâlâ bir halk sağlığı sorunu olan biyofilm oluşumunun inhibe edilmesi ve giderilmesi üzerine ceviz yaprağı ekstralarının etkileri araştırılmış ve

ekstrelerinin oluşmuş biyofilm gideriminde biyofilm oluşumunun inhibe edilmesine oranla daha az etki gösterdikleri belirlenmiştir. Ekstreler biyofilm oluşumundan önce ilave edildiğinde *Staphylococcus* türlerine karşı konsantrasyona bağlı olarak farklı oranlarda inhibisyon etkisi göstermiştir.

CYS (ceviz yaprağı su) ekstresinin aynı türün farklı suşları üzerinde farklı oranlarda etkili olduğu

görülmüştür. *S. aureus*'un biyofilminin oluşumunu azaltmazken oluşmuş biyofilmi üzerinde %94.33 oranında inhibisyon sağladığı belirlenmiştir. *S. aureus* GMC7 için en yüksek inhibisyon %87.84 oranında yine CYS ekstresi ile elde edilmiştir. *S. warneri* ka14.1 üzerinde %80.69 oranında, *S. warneri* S22 üzerinde ise %99.20 oranında biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir (Şekil 2).

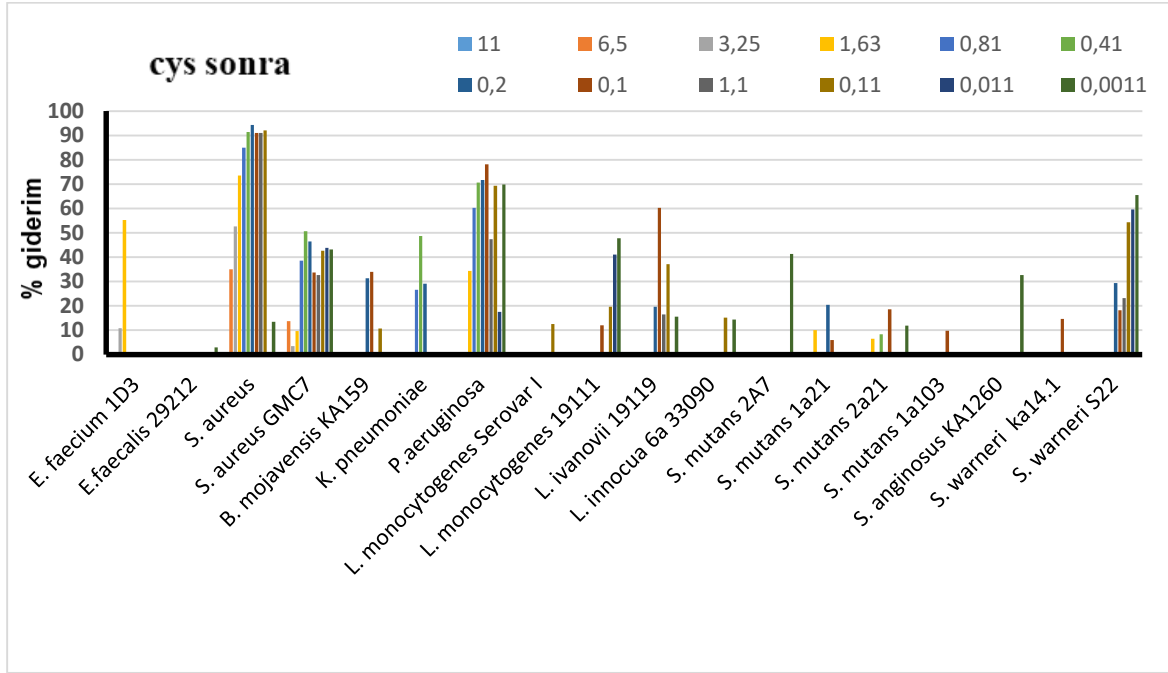


Şekil 2. Ceviz yaprağı su ekstresinin biyofilm oluşmadan önce ortama ilave edilmesi durumunda yüzde biyofilm giderimi

Figure 2. Percent biofilm removal if walnut leaf water extract is added to the medium before biofilm formation

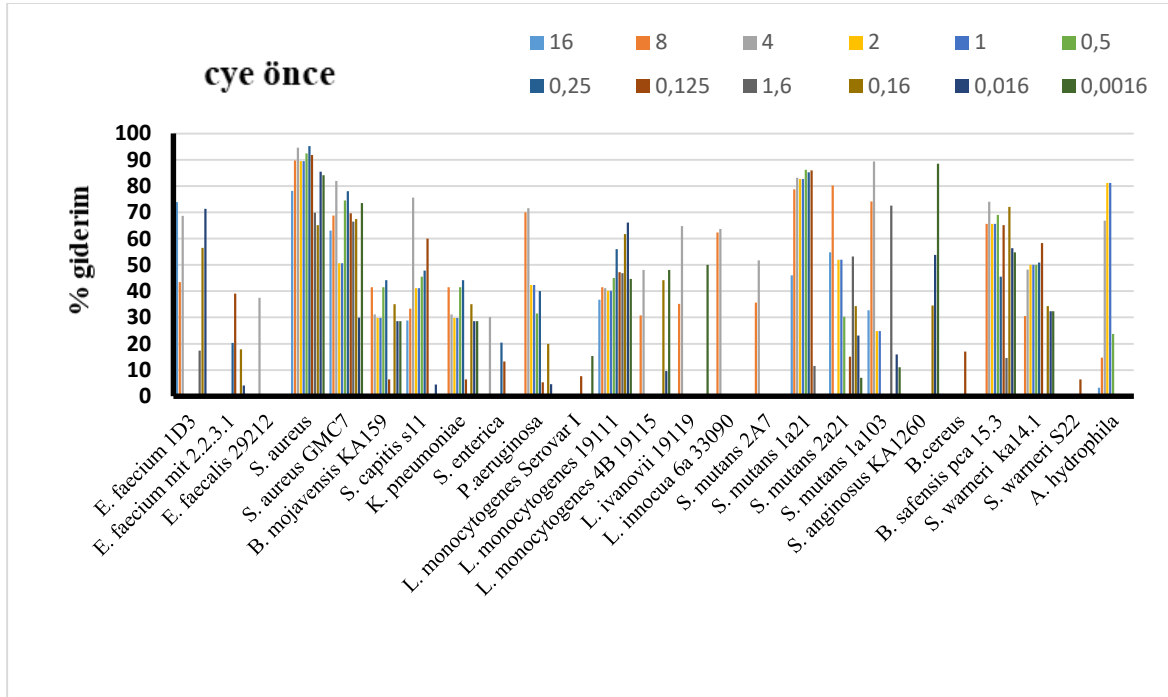
CYS ekstresinin *B. cereus* ve *S. enterica*'nın biyofilm oluşumunu azalttığı ancak oluşmuş biyofilmlerinin gideriminde etkili olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3). Bitkilerde bulunan fenolik maddeler arasında en fazla oranda bulunan kersetin ve bazı diğer bileşiklerin bakterilerin DNA replikasyonu için gerekli enzim DNA girazı inhibe ederek etki gösterdiği rapor edilmiştir (Cushnie ve Lamb, 2005). Ekstrelerin biyofilm oluşmadan önce ilave edildiğinde oluşmuş biyofilme karşı daha fazla etkili olmalarının sebeplerinden biri olduğu düşünülmektedir.

CYE (ceviz yaprağı etil asetat) ekstresinin aynı tür üzerinde farklı oranlarda etkili ya da etkisiz olduğu belirlenmiştir. *S. mutans* 1a103'ün biyofilm oluşumunu engellerken (% 89.34), *S. mutans* 2a7 üzerinde etkisiz olduğu belirlenmiştir. *E. faecium* 1d3 üzerinde (%73.91) etkili olduğu tespit edilirken *E. faecium* mit 2231 ve *E. faecalis* 29212'nin oluşan biyofilmleri üzerine etkisi olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4-5).



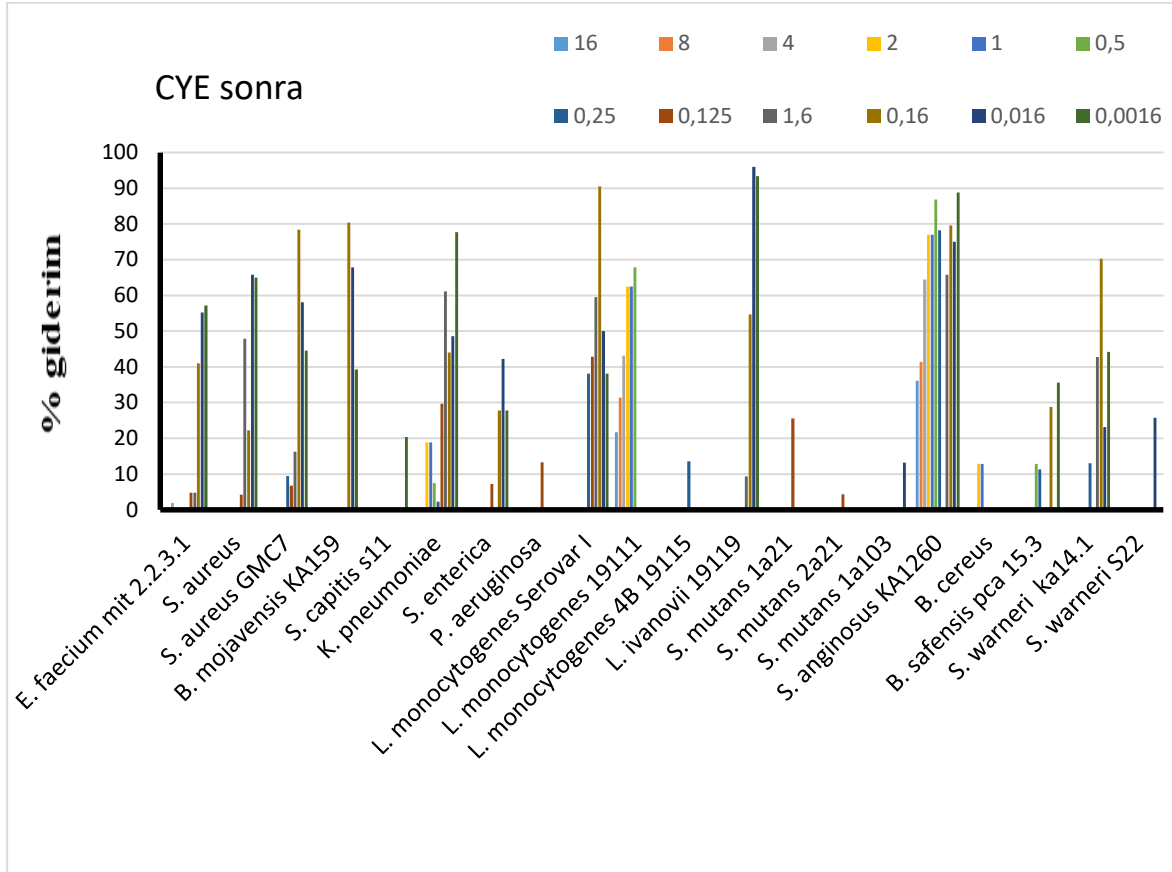
Şekil 3. Ceviz yaprağı su ekstresinin biyofilm oluştuktan sonra ortama ilave edilmesi durumunda yüzde biyofilm giderimi

Figure 3. Percent biofilm removal when walnut leaf water extract is added to the medium after biofilm formation



Şekil 4. Ceviz yaprağı etil asetat ekstresinin biyofilm oluşmadan önce ortama ilave edilmesi durumunda yüzde biyofilm giderimi

Figure 4. Percent biofilm removal if walnut leaf ethyl acetate extract is added to the medium before biofilm formation



Şekil 5. Ceviz yaprağı etil asetat ekstresinin biyofilm oluştuktan sonra ortama ilave edilmesi durumunda yüzde biyofilm giderimi

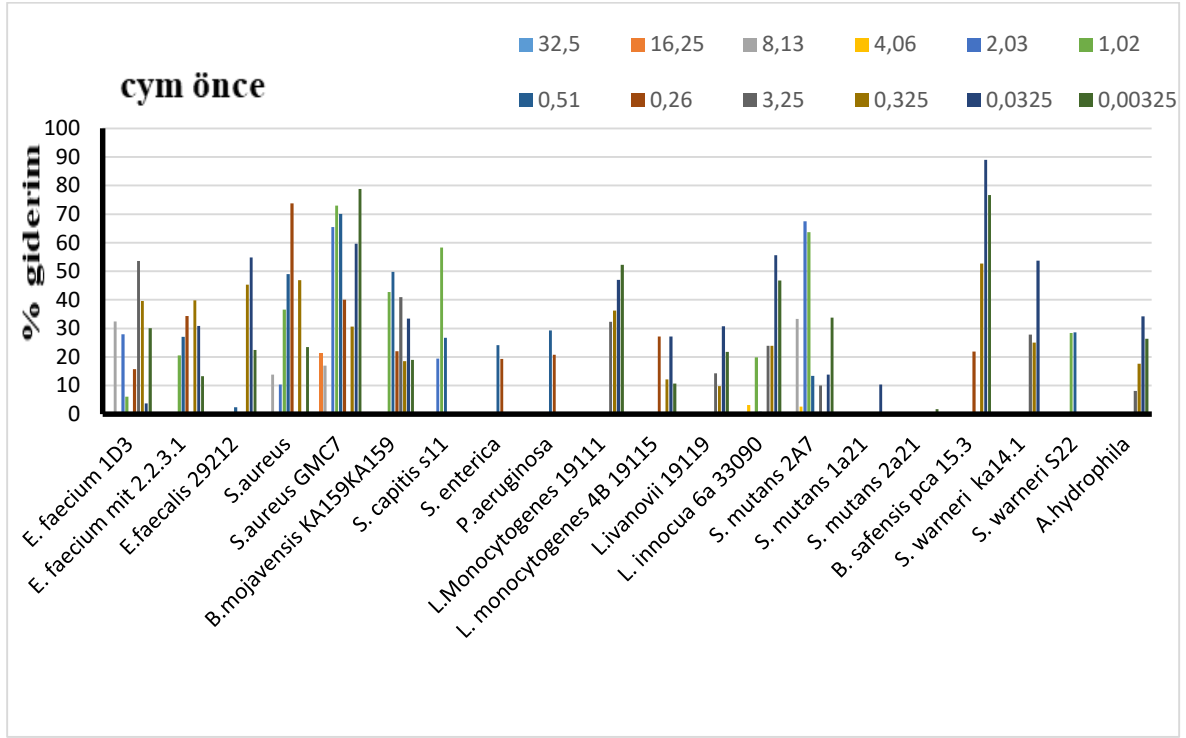
Figure 5. Percent biofilm removal if walnut leaf ethyl acetate extract is added to the medium after biofilm formation

CYM (ceviz yaprağı metanol) ekstresi biyofilm oluşmadan önce ilave edildiğinde *B. cereus* üzerinde etkisiz bulunurken, CYM en yüksek etkiyi %89.04 oranında *B. safensis* üzerinde göstermiştir (Şekil 6). Dirençlerdeki bu farklılık kazanılmış direnç sebebiyle veya çevresel koşullara bağlı olarak gelişmiş olabilir.

CYM ekstresinin *K. pneumoniae* üzerinde antibakteriyel aktivitesi gözlenirken biyofilm oluşumunu engelleyemediği tespit edilmiştir. Sonuçlara genel olarak bakıldığında ise çoğunlukla MİK altı dozlarda antibiyofilm etki gösterdikleri görülmüştür. Bu ve benzeri elde edilen sonuçlar antibakteriyel aktivite ile antibiyofilm aktivite arasında birebir korelasyon bulunmadığını göstermiştir.

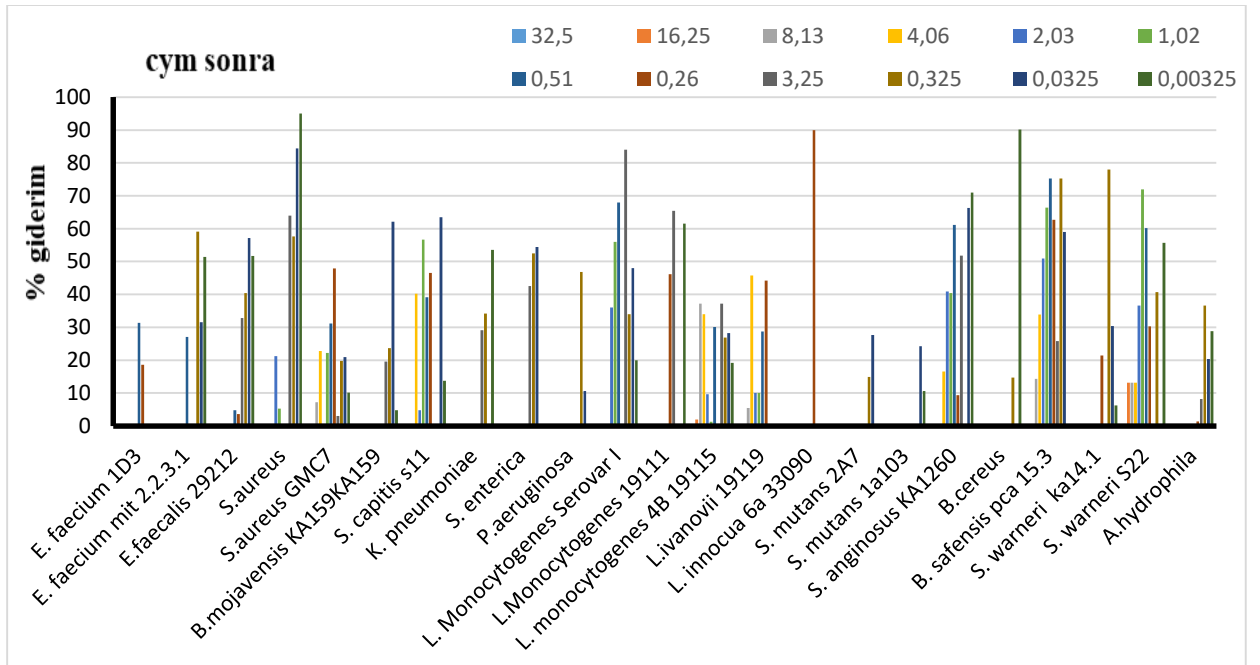
CYS ekstresi enterokoklarda biyofilm oluşumunu türlere göre değişen oranlarda inhibe etmiştir. Enterokoklarda CYM ve CYE ekstresinin antibiyofilm aktivitesi daha düşük olmuştur. Oluşan biyofilm üzerine ise her üç özütünde etkisinin yüksek olmadığı belirlenmiştir (Şekil 2-3).

CYS ve CYM ekstresinin *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu azaltması çok düşük olduğu oluşmuş biyofilmi oluşumunu daha yüksek oranlarda inhibe ettikleri belirlenmiştir (Şekil 2- Şekil 7). Dolatabadi ve ark. (2018) İran ceviz yaprağı su ve metanolik ekstresinin *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu engellediği bildirilmiştir (%60). Metanol ekstresinin su ekstresinden daha etkili olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda su ve metanol ekstreslerinden hangisinin daha etkili olduğu bakterilere göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 6. Ceviz yaprağı metanol ekstresinin biyofilm oluşmadan önce ortama ilave edilmesi durumunda yüzde biyofilm giderimi

Figure 6. Percent biofilm removal if walnut leaf methanol extract is added to the medium before biofilm formation



Şekil 7. Ceviz yaprağı metanol ekstresinin biyofilm oluşuktan sonra ortama ilave edilmesi durumunda yüzde biyofilm giderimi

Figure 7. Percent biofilm removal if walnut leaf methanol extract is added to the medium after biofilm formation

Kocaçalışkan ve ark. (2018) alkol ekstralarının su ekstralarına oranla daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda biyofilm oluşmadan önce ekstraların ilave edildiği deney düzenekleri sonuçlarına göre sırasıyla etil asetat, su ve metanol ekstralarının etkili oldukları, oluşmuş biyofilm üzerinde ise sırasıyla etil asetat, metanol ve su ekstralarının etkinlik gösterdikleri belirlenmiştir.

Ekstrelerimizin genel olarak antimikrobiyel aktivitesinin olduğu tespit edilmiştir. İstisnalar bulunmakla birlikte Gram (-) bakterilerine oranla Gram (+) bakteriler üzerinde daha iyi antimikrobiyel aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Metanol ve su ekstresinin bakterisidal aktivitesinin bulunmadığı farklı bakteri grupları üzerine etkilerinin farklı olduğu belirlenmiştir. Örneğin *S. mutans* türlerine karşı su ekstresinin antibakteriyel aktivitesi daha etkiliyken *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. hydrophila* bakterilerine karşı metanol ekstresinin daha etkili olduğu belirlenmiştir. Antibiyofilm sonuçları genel olarak karşılaştırıldığında test maddelerimizin biyofilm gideriminden ziyade biyofilm oluşumunu azaltmada daha etkili olduğu görülmüştür. Ekstrelerin biyofilm üzerindeki etki dereceleri kıyaslandığında etki sırasının biyofilm oluşumundan önce ilave edildiklerinde etil asetat, su ve metanol ekstraları şeklinde iken biyofilm oluşumundan sonra ilave edildiklerinde ise etil asetat, metanol ve su ekstraları şeklinde oldukları görülmüştür. Ceviz yapraklarında bulunan ve antimikrobiyel etkiden sorumlu olduğu düşünülen flavonoidlerden, β -halkasında hidroksil grubu olmayan flavonoidlerin, hidroksil grubuna sahip olanlara göre mikroorganizmalara karşı daha aktif oldukları belirtilmiştir (Chabot vd., 1992). Bu bulgu, mikrobiyal hedeflerinin zar olduğu fikrini desteklemektedir. Bu durumun ekstraların biyofilm oluşumunu inhibe etmede oluşmuş biyofilmlerin gideriminden daha etkili olmasına neden olabileceğini düşündürmektedir.

Bitki sekonder metabolitlerinin umut verici özellikleri, mikrobiyal dirence karşı mücadelede alternatif kaynaklar olabile potansiyellerini artırmaktadır (Hussain ve ark., 2012). Alkoloitler, flavonoidler, polifenoller, tanenler gibi fito-bileşenlerin antimikrobiyel ajan olarak

kullanılabilmeleri onların önemini artırmaktadır (Gupta ve Birdi, 2017). Araştırmamız sonucu toplanan deney sonuçlarının ileriki çalışmalarla desteklenmesi ile yeni antimikrobiyel maddelerin elde edilmesi için kullanılabileceklerini göstermektedir. Ancak ceviz yaprağı ekstralarının hangi oranlarda hangi bileşimi içerdiği tam olarak bilinmediğinden öncelikle içeriklerin tayin edilmesi ve sonrasında tek tek ve sinerjistik etkileri tayin edilmesi de tavsiye edilmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar, bu araştırma makalesiyle ilgili olarak başka kişiler ve/veya kurumlar arasında çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

YAZAR KATKILARI

Bu çalışmanın hazırlanması ve yayımlanmasında ismi geçen yazarlar dışında hiç kimsenin ya da hiçbir kuruluşun herhangi bir katkısı olmamıştır. Her iki yazar da makalenin yazılmasında ve düzenlenmesinde eşit katkı sağlamıştır.

KAYNAKLAR

Asma K.A., Yasmine C. (2021). In vitro antimicrobial activity of *Salvadora persica* and *Juglans regia* extracts against microbial strains from oral cavity. *Biocatalysis agricultural biotechnology*, 33, 102003. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102003>.

Bakkiyaraj, D., Nandhinia, J.R., Malathya, B., Pandiana, S.K. (2013). The antibiofilm potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) extract against human bacterial and fungal pathogens Biofouling: *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, Vol. 29, No. 8, 929–937, <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2013.820825>

Bakirdere, S., Yılmaz, M. T., Tornuk, F., Keyf, S., Yılmaz, A., Sagdic, O., Kocabas, B. (2015). Molecular characterization of silver–stearate nanoparticles (AgStNPs): A hydrophobic and antimicrobial material against foodborne pathogens. *Food Research International*, 76, 439–448.

Bayazit, S., Tefek, H., Çalışkan, O. (2016). Türkiye’de ceviz (*Juglans regia* L.) araştırmaları. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11(1), 169–179.

- Bhatia, K., Rahman, S., Ali, M., Raisuddin, S. (2006). In vitro antioxidant activity of *Juglans regia* L. bark extract and its protective effect on cyclophosphamide-induced urotoxicity in mice, *Redox Report*, vol. 11, no. 6, pp. 273–279.
- Bray, H.G., Thorpe, W.V., (1954). Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism *Meth. Biochem. Anal.* 1, 27-52.
- Chabot, S., Bel-Rhliid, R., Chenevert, R., Piché, Y. (1992). Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker and Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂ -enriched conditions. *New Phytol* 122(3): 461-467.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (2009) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically. *Approved Standard*, 29, 1-65.
- Cotter, J.J., O'gara, J.P., Mack, D., Casey E. (2009) Oxygen-mediated regulation of biofilm development is controlled by the alternative sigma factor $\sigma\beta$ in *Staphylococcus epidermidis* *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (1):261-264.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., (2005). Antimicrobial activity of flavonoids, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343–356.
- Darmani, H., Nusayr, T., Al-Hiyasat, A.S. (2006). Effects of extracts of miswak and derum on proliferation of Balb/C 3T3 fibroblasts and viability of cariogenic bacteria. *International journal of dental hygiene*, 4: 62-6.
- Doğan, C., Doğan, N., Çelik, Ş. (2014). Farklı Solventlerle Ekstrakte Edilen Ceviz Dış Kabuklarının Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 18 (3), 41-47.
- Dolatabadi, S., Moghadam, H.N., Mahdavi-Ourtakand, M., (2018). Evaluating the antibiofilm and antibacterial effects of *Juglans regia* L. extracts against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*. 118: 285–289. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.055>.
- Erdoğan, A.E., Everest, A. (2013). Antimikrobiyel Ajan Olarak Bitki Bileşenleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (2), 27-32.
- Fernández, M., Garcia, M., Sáenz, M., (1996). Antibacterial activity of the phenolic acid fraction of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*. 53, 11–14.
- Gilbert, P., Allison, D.G., McBain, A.J. (2002). Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *Journal of Applied Microbiology*, 92 Suppl:98S-110S. PMID: 12000619.
- Gupta, P.D., Birdi, T.J. (2017) Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. 8, 266–275.
- Gupta, A., Behl, T., Panichayupakaranan, P. (2019). A review of phytochemistry and pharmacology profile of *Juglans regia*. *Obesity Medicine*. 16:100142. <https://doi.org/10.1016/j.jobmed.2019.100142>.
- Gürlük, N., Koluman A., Kahraman T. (2022). Gıda İşletmelerinde Biyofilm Sorunu ve Gümüş Nanopartikül Uygulamaları, *Aydın Gastronomy*, cilt.6, 1:51-63.
- Hoult, J., Payá, M., (1996). Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology*. 27, 713–722.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Hussain, M.S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M.A., Ahmad, I.Z., Saeed, M. (2012) Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 4, 10–20.
- Kale, A.A., Torane, R.C., Deshpande, N.R., Salvekar, J.P. (2011). Antioxidant potential from stem bark of *Juglans regia* L, *Annals of Biological Sciences*. 2 (1) 176–180.
- Kaygusuz, A., Töreci, K., (1998). Antibiyotik Tedavisinde Önemli Olabilecek Parametreler, *Flora*, 3(3):143-164

- Kocaçalışkan İ., Albayrak A., İlhan S., Terzi İ. (2018). Varietal Differences in Antimicrobial Activities of Walnut (*Juglans regia* L.) Leaf Extracts. *Gağiosmanpaşa Journal of Scientific Research*. 7(3):173-180. <http://dergipark.gov.tr/gbad>
- Masek, A., Latos-Brozio, M., Chrzescijanska E., Podsedek, A., (2019). Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of *Juglans regia* L. Leaves and Husk Extracts, *Forests*, 10, 988.
- Mavi, A., Terzi, Z., Ozgen, U., Yildirim, A., Coşkun, M. (2004). Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum semperivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. May;27(5):702-5. doi: 10.1248/bpb.27.702. PMID: 15133249.
- Mehrabian, S., Majd, A., Majd, I. (2000). Antimicrobial effects of three plants (*Rubai tinctorum*, *Carthamus tinctorius* and *Juglans regia*) on some airborne microorganisms. *Aerobiologia*; 16:455-58.
- Nyenje, M.E., Green, E., Ndip, R.N. (2012). Biofilm formation and adherence characteristics of *Listeria ivanovii* strains isolated from ready-to-eat foods in Alice, South Africa. *Science World Journal*. 873909. Doi:10.1100/ 2012/873909.
- Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P., Ferreira, I.C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L., Pereira, J.A., (2007). Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds. *Food Chemistry*. 105, 1018– 1025.
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J.A., (2008). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *J. Food and Chemical Toxicology*. 46, 2326–2331. 10.1016/j.fct.2008.03.017.
- Pereira, J.A., Pereira, A.P.G., Ferreira, I.C.F.R., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., (2006). Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 8425– 8431.
- Pereira, A.P., Ferreira, I.C.F.R., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, F., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J.A., (2007a). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrancosa) leaves. *Molecules* 12, 1153–1162.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P.B., Ferreira, I.C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L., (2007b). Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antimicrobial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. 45, 2287–2295.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., (2008). Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. 46, 2103–2111.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K.M., (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*. 90, 494–507.
- Prior, R.L., Wu, X., Scaich, K., (2005). Standardized methods for the determination antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3110-3113.
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J.E., Komaitis, M., (2005). RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1190– 1195.
- Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P., (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*. 56, 3–12.
- Qadan, F., Thewaini, A.J., Ali, D.A., Afifi, R., Elkhawad, A., Matalka, K.Z. (2005). The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to acne developing organisms. *The American Journal of Chinese Medicine*.

- 33(2): 197-204. doi: 10.1142/S0192415X05002783.
- Sandasi, M., Leonard, C.M., Viljoen, A.M. (2010). The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 30-35.
- Selçuk, A.R. (2012). Galvinoksil radikali bazlı spektrofotometrik antioksidan aktivite tayin yöntemi ve yaygın olarak kullanılan diğer yöntemlerle kıyaslanması, *Yüksek Lisans Tezi*, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Chaleshtori, R.S, Chaleshtori, F.S., Rafieian, M. (2011). Biological characterization of Iranian walnut (*Juglans regia*) leaves. *Turkish Journal of Biology*, 35:5, Article 13. <https://doi.org/10.3906/biy-1005-1>
- Sharma, P., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., Gomathi, D., Uma, C. (2013). In vitro antibacterial and free radical scavenging activity of green hull of *Juglans regia*. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Aug;3(4):298-302. doi: 10.1016/j.jpha.2013.01.006.
- Singh, R.P., Chidambara Murthy, K.N., Jayaprakasha, G.K. (2002) Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(1):81–86
- Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Calhelha, R., Andrade, P.B., Valentão, P., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J.A., (2006). Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives “alcaparra”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 14, 8533– 8538.
- Stampar, F., Solar, A., Hudina, M., Veberic, R., Colari, M. (2006). Traditional walnut liqueur-coctail oil phenolics. *Food Chemistry*. 95:627-31.
- Umay, A. (2007). *Lavandula stoechas*, *Melissa officinalis* ve *Tribulus terrestris* bitkilerinin kimyasal içeriklerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, ADANA.
- Wichtl, M., Anton, R. (1999). *Plantes Thérapeutiques. Technique et Documentation*. Paris.
- Yiğit, D., Yiğit, N., Aktaş, E., Özgen, U. (2009). Ceviz (*Juglans regia* L.)’in antimikrobiyel aktivitesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 39(1-2), 7-11.
- Zhinsen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 64, 555-559.
- Zhu, X., Zhang, H., Lo, R., (2004). Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 7272–7278.
- Zoral, F.B., Turgay, Ö., (2014) Çeşitli Gıda Atıklarının Toplam Fenolik Madde İçeriğinin, Antioksidan ve Antimikrobiyel Aktivitelerinin Araştırılması, *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*. 17(2).