

## Hastane Patojenlerinin Ticari Uçucu Yağlara Karşı Hassasiyetlerinin Belirlenmesi

### *Determination of Sensitivity of Hospital Pathogens Against Commercial Essential Oil*

Tuğça BİLENLER<sup>\*a</sup>, İncilay GÖKBULUT<sup>b</sup>

İnönü Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 44280, Malatya

• Geliş tarihi / Received: 08.03.2019 • Düzeltilecek geliş tarihi / Received in revised form: 03.07.2019 • Kabul tarihi / Accepted: 17.07.2019

#### Öz

Hastaneler, tanı ve tedavi amaçlı antibiyotiklerin yoğun şekilde kullanıldığı dolayısıyla bakteri ve mayaların direnç kazanımlarının ve dirençli suşların yayılımının en sık yaşandığı ortamlardır. Antibiyotik direncine sahip mikroorganizmaların sayısındaki artış, mikroorganizma kaynaklı enfeksiyon tedavilerini olumsuz etkilemekte ve ilaçlara alternatif olarak tıbbi bitkilerin (ekstrakt ve uçucu yağlarının) kullanımı gündeme gelmektedir. Çalışmada, hastane ortamında gelişen dört patojen bakteri (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* ve *Salmonella* spp.) ve bir mayaya (*Candida albicans*) karşı tıbbi amaçlı kullanılan, ticari on bir bitki uçucu yağının antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek amaçlanmıştır. Çalışmada broth dilüsyon ve oyuk agar teknikleri kullanılmıştır. Bergamot (*Citrus bergamia*) ve Isırgan otu (*Urtica dioica*) uçucu yağlarının minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MIK) Gram pozitif bakterilere karşı oldukça düşük olduğu (62.5 µL/mL), Gram negatif bakteriler üzerinde ise test edilen on bir bitki uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesinin orta düzeyde (125-500 µL/mL) kaldığı saptanmıştır. Adaçayı (*Salvia officinalis*), Bergamot, Çam terebentin (*Pinus terebenthinae*), Isırgan otu uçucu yağlarının oyuk agar test sonuçlarında Gram pozitif bakteriler üzerinde (13-30 mm) Gram negatiflere (8-18 mm) kıyasla daha etkin olmakla birlikte her iki bakteri grubu üzerinde etkili olduğu, pelesenk ve Sedir ağacı (*Cedrus libani*) uçucu yağlarının test edilen mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon zonu oluşturmadığı, diğer test edilen uçucu yağların ise sadece Gram pozitif bakteriler üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. *C. albicans* inhibisyonunun sadece Bergamot uçucu yağı ile gerçekleştiği (500 µL/mL) belirlenmiştir. Pelesenk (*Copaifera officinalis*) uçucu yağının test edilen mikroorganizmalar üzerinde herhangi bir aktivite sergilemediği saptanmıştır. Bu çalışmanın tespit edilen antimikrobiyal aktiviteler sebebi ile uçucu yağların mikroorganizmalar ile mücadele etmede tamamlayıcı ve alternatif çözümler sunacağı, ayrıca bu çalışmanın uçucu yağların antimikrobiyal etki mekanizmalarının tanımlanmasını konu alan çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Antimikrobiyal, MIK, Patojen bakteri, Tıbbi bitki, Uçucu yağ

#### Abstract

Hospitals are the places where antibiotics for diagnosis and treatment are heavily used thus bacteria and yeast resistance gains and the spread of resistant strains are the most frequent environments. The increase in the number of antibiotic resistant microorganisms adversely affects the infection treatments caused by the microorganism and for this reason, the use of medicinal plants (extracts and essential oils) as an alternative to drugs is becoming widespread.

The aim of this study is to determine the antimicrobial activity of the eleven plant essential oils against the four pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp.) and yeast (*Candida albicans*). Broth dilution and well agar techniques were used in this study. The minimum inhibitory concentration (MIC) of Bergamot (*Citrus bergamia*) and Nettle (*Urtica dioica*) essential oils was found to be low (62.5 µL/mL), against Gram positive bacteria and the antimicrobial activity of eleven plant essential oils tested on Gram negative bacteria was found to be moderate (125-500 µL/mL). In well agar test results, sage (*Salvia officinalis*), Bergamot, *Pinus terebenthinae*, *Urtica dioica* were more effective on Gram positive bacteria (13-30 mm) than Gram negative bacteria (8-18 mm) while *Copaiba* and *Cedrus libani* were not show any inhibition zone on tested microorganisms and other tested essential oils have antimicrobial activity against only Gram positive bacteria. It was determined that *C. albicans* inhibition occurred only with Bergamot essential oil (500 µL / mL). Rosewood (*Copaifera officinalis*) essential oil has not been found to exhibit any activity on the all microorganisms tested. It was thought that essential oils will provide complementary and alternative solutions to combat microorganisms due to the antimicrobial activity detected, and this study will contribute to the studies on the identification of antimicrobial action mechanisms of essential oils.

**Keywords:** Antimicrobial, MIC, Pathogen bacteria, Medicinal plant, Essential oil

<sup>\*a</sup>Tuğça BİLENLER; tugca.bilenler@inonu.edu.tr; Tel: ((0544) 408 04 80); orcid.org/ 0000-0001-7831-6337

<sup>b</sup>orcid.org/ 0000-0003-4994-5788

## 1. Giriş

Enfeksiyon hastalıklarının insan ölümlerine sebep olma yüzdesi ülkelerin gelişmişlik seviyesine bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte oldukça yüksektir. Patojen mikroorganizmalar arasında antimikrobiallere karşı direncin yaygınlaşması mikrobiyal hastalıkların tedavisinde ciddi tehdit oluşturmaktadır. Gelişen bu olumsuz eğilim enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ya da önlenmesinde yeni stratejilere ihtiyaç duyulmasına neden olmuştur (Maurice vd., 1990). Dirençli olan ve/ya da olmayan mikroorganizmalar ile mücadele etmede doğal ürün kaynağı olarak bitki ekstraktlarının ve uçucu yağlarının kullanımı alternatif çözümler sunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporlarına göre dünya nüfusunun önemli bir kısmı öncelikli sağlık hizmetinde geleneksel tedavi uygulamalarını kullanmaktadır. Doğal organik bileşenlerin önemli kaynağı olan tıbbi ve aromatik bitkiler tamamlayıcı tıpta önemli bir yer tutmaktadır (Prabuseenivasan vd., 2006). İnsanlığın ilk çağlarından itibaren tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin yapılarında barındırdığı zengin biyo-moleküller sayesinde, sentetik ilaçlara kıyasla yan etkilerinin de daha az olması nedeni ile mevcut antimikrobiallere alternatif olabileceği bildirilmektedir (Faydalıoğlu ve Sürücüoğlu, 2011). Günümüzde çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan maddelerin %80'i bitkisel kökenlidir. Bitkiler, büyük bir kimyasal çeşitlilik ve biyoaktivite sağlar, bunun araştırılması yüzlerce farmasötik ilacın gelişmesine yol açmıştır (Solmaz ve Ata, 2009).

Uçucu yağ olarak da isimlendirilen esansiyel yağlar bitkilerin farklı kısımlarından (çiçek, dal, tohum, yaprak, kök ve meyve gibi) distilasyon, ekstraksiyon, ekspresyon ve fermantasyon gibi farklı tekniklerle elde edilen yağimsı sıvılardır. Yaklaşık 3000 uçucu yağ olduğu bilinmekte ve bunların 300'e yakınının ticari olarak satıldığı tahmin edilmektedir (Prabuseenivasan vd., 2006). Uçucu yağların kimyasal yapılarında birden fazla bileşen bulunduğu, fakat majör grubun terpen ve terpenlerin oksijene edilmiş türevlerinden oluştuğu ve söz konusu bu bileşenlerin esansiyel yağlara fonksiyonlute (antimikrobiyal, antioksidan, ant,-proliferatif vb.) kazandırdığı bildirilmiştir (Maurice vd., 1990; Prabuseenivasan vd., 2006).

Antibiyotik direncine karşı bir alternatif çözüm sunmak amacı ile kullanılan bitki sayısı oldukça fazladır. Söz konusu bitkiler arasında taşıdığı potansiyel antimikrobiyal aktivite bakımından öne

çıkanlar arasında *Pinus terebenthinae* (çam terebentin), *Copaifera officinalis* (pelesenk), *Salvia officinalis* (adaçayı), *Cedrus libani* (sedir ağacı), *Aesculus hippocastanum* (at kestanesi), *Hypericum perforatum* (kantaron), *Santalum album* (sandal ağacı), *Foeniculum vulgare* (rezene), *Lavandula stoechas* (karabaş otu), *Urtica dioica* (ısırgan otu) ve *Citrus bergamia* (bergamot) yer almaktadır.

Pinaceae familyası, Pinus cinsine ait olan çam terebentin (*Pinus terebenthinae*) bitkisinin yağı terebentin ya da çam odununun distilasyonundan elde edilmektedir. Uçucu yağın majör bileşeni (%90) pinendir (%60  $\alpha$ -pinen ve %30  $\beta$ -pinen). Yağın güçlü antimikrobiyal etkisinin yanı sıra romatizmal ağrılara karşı, ciltte kan toplayıcı olarak ve veteriner hekimliğinde haricen ağrı kesici, ayrıca balgam söktürücü ve göğüs yumuşatıcı olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Süzgeç-Selçuk ve Eyişan, 2012). Pelesenk (*Copaifera officinalis*), Copaifera cinsine ait ağaç gövdelerinden elde edilen şeffaf, sarı ya da açık kahverengi bir sıvıdır (Veiga-Junior ve Pinto, 2002). Pelesenk yağının antimikrobiyal, anti-enflamatuvar, anti-tetanoz, anti-tümör, anti-blenoraji ve idrar antiseptik aktivitelerinin yanı sıra bronşit, deri hastalıkları, ülser tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir (Gomes vd., 2007). Adaçayı (*Salvia officinalis*) Lamiaceae familyasına ait bir bitki olup, kurutulmuş yaprakları ve uçucu yağı birçok yiyecek ve içeceklerde aroma verici olarak kullanılmaktadır. Bitkinin antibakteriyal, fungustatik, virüstatik, damar büzücü ve antihidrotik gibi pek çok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (. Keshavarz vd., 2010). Pinaceae familyası, Cedrus cinsine ait olan Sedir ağacı (*Cedrus libani*) uçucu yağının antifungal, antibakteriyal, antiviral, anti-enflamatuvar aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Derwich vd., 2010). *Aesculus hippocastanum* L. yaygın olarak at kestanesi olarak bilinen yenilebilir kestane (*Castanea sativa* Mill) ile sadece isim benzerliği olan bit bitkidir. At kestanesi meyveleri, yaprakları ve kabukları karbonhidratlar, saponinler, tanenler, flavonoidler, fenolikler bakımından zengindir (Colak vd., 2017). At kestanesi bitki ekstraktının gıda kaynaklı bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliğini belirlemek için yapılan çalışmada test edilen tüm bakterilere, özellikle de tüm Gram-negatif bakterilere karşı yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Bonomo vd., 2004). Clusiaceae familyası, Hypericum cinsine ait olan kantaron (*Hypericum perforatum* L) ekstraktının özellikle Gram pozitif bakteriler üzerinde antibakteriyal etki sergilediği

belirtilmiştir (Reichling vd., 2001). Santalaceae familyasından olan sandal ağacı (*Arbutus andrachne*), hoş kokulu ve tropik bir ağaçtır. Bitkinin kuvvetli antioksidan etkisinin yanı sıra, çeşitli mikroorganizmalar üzerinde oldukça güçlü antimikrobiyal aktivite sergilediği saptanmıştır (Faydahoğlu ve Sürücüoğlu, 2011). Rezene (*Foeniculum vulgare* Miller), Apiaceae familyasına ait bir bitki olup, geleneksel tıpta uzun bir bitkisel kullanım geçmişine sahiptir. Geleneksel olarak rezene tohumu anti-inflamatuar, analjezik, karminatif, diüretik ve spazm önleyici ajanlar olarak kullanılır (Anwara vd., 2009). Lamiaceae familyasından olan karabaş otu (*Lavandula stoechas*) L., aromatik bir bitkidir. Antiseptik, antimikrobiyal ve yara iyileştirici etkilerinin yanı sıra bir çak hastalığının tedavisinde yüzyıllardır kullanılmaktadır (Öztürk, 2005). Urticaceae familyasına ait olan ısırgan otu (*Urtica dioica*) farmakolojik açıdan çok önemli aktiverler (antioksidan, antiinflamatuvar, antiülser, anti kolit, antiviral, antikanser, antibakteriyel ve antifungal) sergilemektedir (Bhuwan, 2014). Rutaceae familyasına ait olan bergamot (*Citrus bergamia*) uçucu yağının güçlü antimikrobiyal etki sergilediği rapor edilmiştir (Pessini, 2003).

## 2. Amaç

Patojen mikroorganizmaların direnç kazanımları ve direncin yaygınlaşmasındaki hız nedenleri ile mikroorganizmalar ile mücadele etmede zorlu bir süreç başlamıştır. Tıbbi değeri olan bitkiler bu süreçte alternatif ve tamamlayıcı roller üstlenmeleri bakımından dikkat çekmektedir. Bitkilerin sekonder metaboliti olan uçucu yağların antimikrobiyal etkileri geçmişten günümüze yaygın bir uygulama alanına sahiptir. Uçucu yağların üretimi evsel ölçekte oldukça zor bir işlem olduğundan, elde edimlerinde genellikle ticari olarak satın alma yolu izlenmektedir. Bu nedenlerle çalışmadaki amacımız, ticari olarak satılan ve pek çok kişinin rahatlıkla erişebileceği tıbbi değeri olan uçucu yağların hastane patojenleri üzerindeki etkilerini belirlemek ve dolayısı ile kontrollü koşullarda alınan bilgiler ışığında söz konusu yağların daha güvenli ve etkin kullanımlarını sağlamaktır.

## 3. Gereç ve Yöntem

### 3.1. Kimyasallar

Aksi belirtilmedikçe çalışmada kullanılan tüm kimyasal standart ve solventler Sigma-Aldrich'ten (Steinheim, Germany) temin edilmiştir.

### 3.2. Uçucu Yağlar

On bir farklı uçucu yağ Malatya'da yöresel bir marketten temin edilmiştir. Söz konusu uçucu yağlar literatür taraması ve geleneksel tıpta kullanımları temelinde seçilmiştir. Kullanılan yağların saflık derecesi %98'den daha fazladır.

### 3.4. Test organizmaları ve büyüme koşulları

Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılacak mikroorganizmalar Malatya, İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi (TÖTM), Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. İki Gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*), iki Gram negatif (*Escherichia coli*, *Salmonella spp.*) bir maya *Candida albicans*) kullanılmıştır. Mikroorganizmalar testlerde kullanılacağı kadar uygun agar ortamlarında (Bakteriler için, Brain Heart Infusion Agar (Merck Darmstadt, Germany), maya için Potato Dextrose Agar (Merck Darmstadt, Germany) +4°C'de bekletilmiş, antimikrobiyal testlerde stok kültür olarak kullanılmıştır.

Testlerde kullanılacak mikroorganizmaların aktif taze kültürleri (gece kültürü) hazırlanmıştır. Bu amaçla bakteriler için Mueller Hinton Broth (Merck Darmstadt, Germany), maya için Sabouraud Dextrose Broth (Merck Darmstadt, Germany) 10 mL içeren tüplere mikroorganizma ekimleri yapılmış ve bakteriler +37°C'de 24 saat, maya +27°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda mikroorganizma yükü steril fizyolojik tuzlu su (FTS) yardımı ile 10<sup>6</sup> koloni oluşturma birimi (KOB)/mL olacak şekilde seyreltilmiştir.

### 3.5. Antimikrobiyal aktivite testleri

#### 3.5.1. Broth Dilüsyon yöntemi

Uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesi Pessini vd., (2003) tarafından önerilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmış ve antimikrobiyal aktivite mikroorganizma gelişiminin olmadığı en düşük uçucu yağ miktarı (minimum inhibisyon konsantrasyon, MİK) olarak belirlenmiştir. Uçucu yağların broth ortamında homojen dağılımını sağlamak amacı ile dimetil sulfoksit (DMSO), %10 (v/v) kullanılmıştır. Böylece %10 DMSO'lu broth (bakteriler için Mueller Hinton Broth, maya için Sabouraud Dextrose Broth) içeren tüplere her bir uçucu yağın ayrı ayrı iki katı seri dilüsyonlar 1000'den 3.9 µL/mL eklenmiştir. Taze aktif kültürleri hazırlanan bakteri ve maya kültürleri her bir test

tüpüne ayrı ayrı ( $10^6$  kob/mL) 50 µL hacimlerde inoküle edilmiştir. İnokülasyon işlemleri tamamlanan tüpler bakteriler için  $+37^\circ\text{C}$ 'de 24 saat, maya  $+27^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Antimikrobiyal testlerle eş zamanlı olarak pozitif ve negatif kontroller yapılmıştır. Bu amaçla negatif kontrol olarak broth ortamına ilgili mikroorganizma ekimleri yapılmıştır, herhangi bir antimikrobiyal ajan ilavesi yapılmadan inkübasyona bırakılan test tüplerinde mikroorganizmaların sağlıklı gelişebildiği belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak standart antimikrobiyal ajanlar (tetrasiklin, ampisilin, gentamisin ve flukonazol) ( $100 \mu\text{g/mL}$ 'den  $1.56 \mu\text{g/mL}$ 'ye değişen konsantrasyonlarda) kullanılarak mikroorganizmaların herhangi bir dirence sahip olmadığı, antimikrobiyal ajanlar ile inhibe edilebileceği belirlenmiştir.

Antimikrobiyal aktivitenin broth dilüsyon yöntemi ile tespit edilmesinde indikatör olarak  $\rho$ -iodonitrotetrazolium violet (INT) mikrobiyal gelişim indikatörü olarak kullanılmıştır. Test ortamında yaşamına devam eden mikroorganizma tetrazolium violeti, violet formazana indirgemekte ve renksiz olan test tüpünde bu kimyasal reaksiyon nedeni ile kırmızı renk açığa çıkmaktadır (Eloff, 2001). İnokülasyon süresini tamamlayan test tüplerine 50 µL hacminde ( $0.2 \text{ mg/mL}$  olacak konsantrasyonda steril suda hazırlanan) INT indikatörü ilave edilmiş ve tüpler 30 dk daha inkübasyona bırakılmıştır. İleri inkübasyon süresi sonunda bakteri gelişimi INT d-formazan üretimine bağlı olarak açığa çıkan kırmızı renk değerlendirmesi ile belirlenmiş, bakteri gelişiminin olmadığı en düşük uçucu yağ konsantrasyonu MİK ( $\mu\text{L/mL}$ ) olarak belirlenmiştir.

### 3.5.2. Oyuk Agar yöntemi

Oyuk agar testi Irshad vd., (2012) tarafından kullanılan yöntemde hafif modifikasyonlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Aktif taze kültürleri hazırlanan ( $10^6$  kob/mL) mikroorganizmalar ( $250 \mu\text{L}$ ) içerisinde Mueller Hinton Agar (bakteriler için) ve Sabouraud Dextrose Agar (maya için) bulduran petri plaklarına steril swap yardımı ile yayma plaka yöntemi ile yayılmıştır. Yüzeyin mikroorganizma solüsyonunu emmesine izin verildikten sonra (15 dk) steril oyuk açıcı kullanılarak ( $4\text{mm}$  çapında) oyuklar açılmış, açılan oyuklar uçucu yağ ile ( $50 \mu\text{L}$ ) doldurulmuştur. Pozitif kontrol olarak tetrasiklin, ampisilin, gentamisin ve flukonazol ( $1\text{mg/mL}$  konsantrasyonunda steril suda hazırlanan) kullanılmış, uçucu yağ ile aynı

adımlar takip edilerek,  $50 \mu\text{L}$  tetrasiklin açılan oyuklara doldurulmuştur. Hazırlanan petri kutuları 2 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra yüzü yukarı doğru inkübatöre yerleştirilmiş, bakteriler için  $+37^\circ\text{C}$ 'de 24 saat, maya  $+27^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır, süre sonunda oluşan inhibisyon zon çapları milimetre birimi ile ölçülmüştür.

## 4. Bulgular

On bir bitki uçucu yağının 5 mikroorganizmaya karşı belirlenen antimikrobiyal aktivitesi Tablo 1 ve 2'de verilmiştir. Seçilen uçucu yağların oldukça geniş bir aralıkta antimikrobiyal aktivite sergilediği görülmektedir. Pessini vd., (2003) yaptıkları çalışmalarında, antimikrobiyal ajanın MİK değeri  $100 \mu\text{g/mL}$  den düşükse iyi bir antimikrobiyal,  $100\text{-}500 \mu\text{g/mL}$  aralığında ise orta dereceli bir ajan,  $500\text{-}1000 \mu\text{g/mL}$  aralığında ise zayıf bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu,  $1000 \mu\text{g/mL}$ 'den yüksek ise herhangi bir antimikrobiyal etkiye sahip olmadığını rapor etmişlerdir. Test edilen uçucu yağlar arasında bergamot ve ısırgan otu uçucu yağının Gram pozitif bakterilere karşı ( $62.5 \mu\text{L/mL}$ , MİK) iyi; Gram negatif bakterilere karşı ise orta dereceli ( $250\text{-}500 \mu\text{L/mL}$ , MİK) bir antimikrobiyal etki sergilediği ifade edilebilir. Adaçayı, çam terebentin, rezene, sedir ağacı uçucu yağları test edilen tüm mikroorganizmalara karşı orta dereceli ( $125\text{-}500 \mu\text{L/mL}$ , MİK) bir antimikrobiyal etki sergilerken, pelesenk uçucu yağının test edilen beş mikroorganizmaya karşı herhangi bir etki göstermediği ( $>1000 \mu\text{g/mL}$ , MİK) belirlenmiştir.

On bir bitki uçucu yağına karşı yapılan hassasiyet sıralamasında ilk sırada Gram pozitif bakteriler, ikinci sırada Gram negatif bakteriler ve son sırada maya yer almaktadır. Mayanın bergamot uçucu yağı dışında diğer uçucu yağlara karşı oldukça dirençli olduğu Tablo 1'de görülmektedir. Ayrıca karabaş otu uçucu yağı dışında test edilen tüm uçucu yağlara karşı en hassas mikroorganizmanın *B.cereus* olduğu görülmektedir.

Testte negatif kontrol olarak yer alan tüplerde mikroorganizmaların, %10 DMSO'dan etkilenmeden rahatlıkla yaşayıp çoğaldığı, pozitif kontrol olarak kullanılan üç farklı standart antibakteriyel ve bir antifungal ajanın test edilen bakteriler ve maya üzerinde farklı konsantrasyonlarda ( $1.56\text{-}12.25 \mu\text{g/mL}$ ) inhibitör etkiye sahip olduğu bir başka deyişle test edilen mikroorganizmaların her hangi bir dirence sahip olmadığı belirlenmiştir.

**Tablo 1.** On bir bitki uçucu yağının ve standart antimikrobiallerin broth dilüsyon yöntemi ile minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIK)

Bitki Uçucu Yağı (µL/mL)	Mikroorganizmalar					
	Gram pozitif		Gram negatif		Maya	
	<i>S.aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>C.albicans</i>	
Ada çayı	125	125	250	500	1000	
At kestanesi	125	62.5	500	500	1000	
Bergamot	62.5	62.5	500	250	500	
Çam terebentin	250	125	500	500	1000	
Isırgan otu	62.5	62.5	125	250	1000	
Kantaron	500	250	1000	1000	>1000	
Karabaş otu	62.5	500	500	500	>1000	
Pelesenek Yağı	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	
Rezene	250	250	500	500	1000	
Sandal ağacı	500	62.5	1000	>1000	>1000	
Sedir Ağacı	500	250	500	500	>1000	
Negatif Kontrol	+	+	+	+	+	
Pozitif Kontrol (µg/mL)	Tetrasiklin	1.56	1.56	1.56	1.56	-.**
	Ampisilin	3.12	6.25	12.25	6.25	-.**
	Gentamisin	1.56	1.56	6.25	3.12	-.**
	Flukonazol	-.**	-.**	-.**	-.**	12.25

\*: mikroorganizma gelişmesi var; \*\*: test edilmedi

Testte negatif kontrol olarak yer alan tüplerde mikroorganizmaların, %10 DMSO'dan etkilenmeden rahatlıkla yaşayıp çoğaldığı, pozitif kontrol olarak kullanılan üç farklı standart antibakteriyel ve bir antifungal ajanın test edilen bakteriler ve maya üzerinde farklı konsantrasyonlarda (1.56-12.25 µg/ml) inhibitör etkiye sahip olduğu bir başka deyişle test edilen mikroorganizmaların herhangi bir dirence sahip olmadığı belirlenmiştir.

Prabuseenivasan vd., (2006) yaptıkları çalışmada 7 mm ve yukarısında belirlenen zon ölçümlerini pozitif sonuç olarak tanımlamıştır. Oyuk agar test sonuçlarında on bir bitki uçucu yağının ikisi

(pelesenek ve sedir ağacı) dışında kalan tüm bitki uçucu yağlarının en azından bir mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal etki sergilediği belirlenmiştir (Tablo 2). Adaçayı, bergamot, çam terebentin ve ısırgan otu hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel etki göstermiş olup, kantaron, karabaş otu, rezene ve sandal ağacı uçucu yağlarının sadece Gram pozitif bakteriler üzerinde etkili olduğu, Gram negatifler üzerinde herhangi bir etki göstermediği belirlenmiştir. Diğer taraftan, oyuk agar yönteminde test edilen on bir bitki uçucu yağının hiç birinde *C.albicans*'a karşı antifungal etki saptanamamıştır.

**Tablo 2.** Uçucu yağlar ve standart antimikrobiyalın oyuk agar yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi

Bitki Uçucu Yağı (mm)	Mikroorganizmalar					
	Gram pozitif		Gram negatif		Maya	
	<i>S.aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>C.albicans</i>	
Ada çayı	28	30	18	13	-.*	
At kestanesi	12	20	-	-	-	
Bergamot	21	20	8	14	-	
Çam terebentin	13	21	8	8	-	
Isırgan otu	15	17	10	9	-	
Kantaron	7	8	-	-	-	
Karabaş otu	21	8	-	-	-	
Pelesenek Yağı	-	-	-	-	-	
Rezene	13	15	-	-	-	
Sandal ağacı	8	37	-	-	-	
Sedir Ağacı	-	-	-	-	-	
Negatif Kontrol	+	+	+	+	+***	
Pozitif Kontrol	Tetrasiklin	40	34	30	20	-.***

\*:inhibisyon zonu oluşmamıştır; \*\*: mikroorganizma gelişmesi var,\*\*\*: test edilmemiştir

Broth dilüsyon yönteminde elde edilen sonuçlara benzer olarak, oyuk agar testinde, bitki uçucu yağlarına karşı Gram pozitif bakterilerden Gram negatiflere kıyasla daha yüksek hassasiyet

gösterdiği, Gram pozitif bakterilerden *S.aureus*'un (7-28 mm) *B.cereus*'dan (8-37mm) daha dirençli olduğu belirlenmiştir. Oyuk agar test koşullarında da negatif ve pozitif kontrol sonuçlarından test

edilen mikroorganizmaların yarı katı besiyeri ortamında sırası ile sağlıklı yaşadığı ve farklı zon çaplarına (20-40 mm) sahip olmaları nedeni ile herhangi bir dirence sahip olmadıkları bulgusu elde edilmiştir.

## 5. Tartışma ve Sonuçlar

Bitki uçucu yağları yüzyıllardır gıdaların korunması, eczacılık, tıp ve doğal tedavi edici olarak farklı alanlarda yaygın kullanılmaktadır. Sağlık alanında kaliteyi arttırmak için geleneksel tıpta kullanılan uçucu yağların bilimsel olarak incelenmesi oldukça elzemdir. Esansiyel yağlar yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi noktasında (özellikle patojen bakterilere karşı) yüksek potansiyele sahiptir. Çalışmamızda, on bir bitki uçucu yağın (pelesenk uçucu yağı hariç) beş hastane patojenine karşı farklı oranlarda antimikrobiyal aktivite sergilediği belirlenmiştir.

Literatürde yer alan çalışmada söz konusu uçucu yağların farklı mikroorganizmalara karşı değişken skalada antimikrobiyal aktivite sergilediği rapor edilmiştir. Araştırma bulgularımız ile uyumlu olarak; [Pesavento vd., \(2015\)](#) yaptığı bir çalışmada adaçayı uçucu yağına karşı *S.aureus* 'un en hassas (22.7 mm zon çapı) bakteri olduğu, *Campylobacter jejuni*'nin ise test edilen grup içinde en dirençli (9 mm) bakteri olduğu bildirilmiştir. [Al-Howiriny vd., \(2003\)](#) adaçayı uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesinin Gram negatif bakterilere kıyasla Gram pozitif bakteriler üzerinde çok daha yüksek olduğunu bildirmiştir. sekiz mikroorganizmaya karşı at kestanesinin antimikrobiyal etkisinin incelendiği çalışmada, *S.aureus* ve *B.cereus*'un inhibisyon zonunun *E.coli*'den daha yüksek olduğunu ve en yüksek hassasiyetin *L. monocytogenes*'e ait olduğu bildirilmiştir ([Öztürk 2017](#)). At kestanesinin sergilediği antimikrobiyal aktivitenin bileşiminde yer alan flavonoidlerden kaynaklandığı rapor edilmiştir ([Harborne ve Baxter, 1993](#)).

Bergamot uçucu yağının farklı *Listeria* türleri üzerindeki antimikrobiyal etkisini disk difüzyon metodu ile inceleyen [Marotta vd., \(2016\)](#) 3 suşun hassasiyetinin zayıf, 4 suşun ise yağa karşı hassasiyetinin oldukça yüksek (14-20 mm) olduğunu, [Keskin ve Toroğlu \(2011\)](#) bergamot yağının patojen bakteriler üzerinde oldukça yüksek antimikrobiyal etki sergilediğini, disk difüzyon metodu ile bergamot, uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesini test eden [Fisher ve Phillips, \(2006\)](#) bergamot uçucu yağının Gram pozitif bakteriler üzerinde (*S.aureus* 46, *B.cereus* 36 mm), Gram negatif bakterilere (*E.coli* 24,

*C.jejuni* 23 mm) kıyasla daha yüksek inhibisyon zon çapı oluşturduğu bildirilmiş, ve bu aktivitenin bileşiminde yer alan Limonen (%45) ve Linaloolden (%15) kaynaklandığını rapor etmişlerdir. [Aumeeruddy-Elalfi vd., \(2015\)](#) çam terebentin uçucu yağı MİK değerini *S.aureus*'a karşı 0.25 mg/mL *Acinetobacter*'e karşı 16 mg/mL olarak bildirmiş ve bitkinin Gram pozitif bakteriler üzerinde aktivitesinin daha kuvvetli olduğunu ifade etmişlerdir. [Saenz vd., \(2004\)](#) çam terebentin uçucu yağının Gram negatif bakterilere kıyasla Gram pozitif bakteriler üzerinde daha etkili olduğunu ve ayrıca potansiyel antiseptik ajan olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Sedir ağacı yağının antimikrobiyal aktivitesini inceleyen [Eryılmaz vd., \(2016\)](#) test edilen 7 mikroorganizmaya karşı bitkinin etki göstermediğini bildirmiş, [Kızıl vd., \(2002\)](#) ise konsantrasyona bağlı olarak etki gösterdiğini ayrıca Gram pozitif bakterilerin Gram negatif bakterilere kıyasla daha hassas olduğunu rapor etmiştir. Kantaron ekstraktının Gram pozitif bakteriler üzerinde (0.1-1.0 µg/mL) Gram negatiflere (400 µg/mL) göre daha yüksek aktivite gösterdiği bildirilmiştir ([Reichling vd., 2014](#)). [Dall Agnol vd., \(2003\)](#) altı farklı kantaron türünün antimikrobiyal aktivitesini inceledikleri çalışmalarında, *S.aureus*'un *E.coli* ve *S.cerevisiae*'a kıyasla daha hassas olduğunu ve ayrıca söz konusu antimikrobiyal etkinin bileşimde önemli yüzdelerle alana sahip olan tanin, flavonoid ve fenolik asitlerden kaynaklandığı rapor etmişlerdir. [Gülçin vd., \(2004\)](#) ısırgan otunun 9 bakteri, 1 mayaya karşı güçlü antimikrobiyal aktivite sergilediğini, [Behbahani vd., \(2013\)](#), karabaş otu ekstraktının Gram pozitif bir bakteri olan *S. aureus* üzerinde güçlü bir antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu, [Kırmızıbekmez vd., \(2009\)](#) karabaş otu antimikrobiyal aktivitesinde etkili olan bileşenlerinin alfa-fenkon(%41.9), 1.8-sineol (%15.6) ve kamfor (%12.1) olduğunu bildirmişlerdir. [Jirovetz vd., \(2006\)](#) üç farklı sandal ağacı türünün antimikrobiyal aktivitesini incelemiş ve Gram pozitif bakteriler üzerinde daha etkili olduğunu vurgulamıştır.

Ayrıca, çalışmamızda test edilen mikroorganizma grupları arasında bitki uçucu yağlarına karşı Gram pozitif bakterilerin hassasiyetlerin, Gram negatiflerden daha fazla olduğu belirlenmiştir. [Şengün ve Öztürk \(2018\)](#) bu durumu Gram pozitif bakterilerin hücre duvar yapısında bulunan lipoteikoik asitlerin lipofilik yapıdaki uçucu yağların hücreye girişini kolaylaştırmasından ve ayrıca Gram negatif bakterilerin hücre duvar

bileşeni olan lipopolisakkarit tabakasının lipofilik karakterdeki yapıların hücre girişini sınırlaması ile açıklamıştır.

Tıbbi değeri olan uçucu yağların mikroorganizmalarla mücadele etmede yaygın kullanımlarına rağmen antimikrobiyal etki mekanizmaları tam olarak tanımlanmamıştır. Yapılan çalışmalarda bahsi geçen etki mekanizması ile ilgili farklı yaklaşımlar ileri sürülmüştür; bakteri inhibisyonunun membran bütünlüğünün bozulmasından, membranın seçici geçirgen yapısının zarar görmesi nedeni ile hücre içeriğinde (molekül ve iyonlar) kayıpların yaşanmasından, uçucu yağ bileşiminde yer alan sekonder metabolitlerin (fenolik bileşikler) hücre zarında hasara neden olmasından, hücrenin yaşamsal faaliyetlerinin (enerji üretimi, protein sentezi) yağdan zarar görmesinden kaynaklanabileceği iddia edilmektedir (Beyza, 2014; Şengün ve Öztürk, 2018).

Sonuç olarak, bu çalışmada antimikrobiyal maddelere karşı kazanılan ve yaygınlaşan direnç sebebi ile daha da zorlaşan patojen mikroorganizma inhibisyonuna alternatif çözümler sunan uçucu yağlardan bazılarının antimikrobiyal kapasiteleri değerlendirilmiştir. Söz konusu çalışmanın moleküler yöntemler ile yapılacak olan uçucu yağ antimikrobiyal etki mekanizmalarının tanımlanmasını konu alan diğer çalışmalara katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

### Teşekkür

Bu çalışma İnönü Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından 1468 ID numarası ve FBA-2018-1468 proje kodu ile desteklenmiştir.

### Kaynaklar

- Al-Howiriny, T.A., 2003. Composition and antimicrobial activity of Essential oil of *Salvia lanigera*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 6, 133-135.
- Anwara, F., Alia, M., Hussaina, A.I., Shahida, M., 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. Flavour Fragrance Journal, 24, 170-176.
- Aumeeruddy-Elalfi, Z., Gurib-Fakim, A., Mahomoodally, F., 2015. Antimicrobial, antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essential oils from exotic and endemic medicinal plants of

Mauritius. Industrial Crops and Production, 71, 197-204

- Behbahani, B.A., Tabatabaei-Yazdi, F., Shahidi, F., Mortazavi, A., 2013. Antimicrobial effects of *Lavandula stoechas* L. and *Rosmarinus officinalis* L. extracts on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Science Journal of Microbiology, 2, 15-22.
- Beyaz, M., 2014. Esansiyel yağlar: Antimikrobiyal, antioksidan ve antimutajenik aktiviteleri, Akademik Gıda, 12, 45-53.
- Bhuwan, C.J., Minky, M., Ajudhia, N.K., 2014. Pharmacognostical review of *Urtica dioica* L. International Journal of Green Pharmacy, 1, 201-209.
- Bonomo, M.G., Cafaro, C., Russo, D., Calabrone, L., Milella, L., Saturnino, C., Capasso, A., Salzano, G., 2004. Antimicrobial activity, antioxidant properties and phytochemical screening of *Aesculus Hippocastanum* mother tincture against food-borne bacteria. Letters in Drug Des Discovery, 12, 16-21.
- Colak, H., Karaköse, E., Duman, F., 2017. High optoelectronic and antimicrobial performances of green synthesized ZnO nanoparticles using *Aesculus hippocastanum*. Environmental Chemical Letter, 15, 547-552.
- Dall Agnol, R., Ferraz, A., Bernardi, A.P., Albring, D., Nör, C., Sermento, L., Lamb, L., Hass, M., von Poser, G., Schapoval, E.E.S., 2003. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species, Phytomedicine, 10, 511-516.
- Derwich, E., Benziane, Z., Bozkır, A., 2010. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Cedrus atlantica*. International Journal of Agriculture Biology, 12, 381-385.
- Eloff, J.N., 2001. Antibacterial activity of *Marula* (*Sclerocarya birrea* (A. Rich.) Hochst. subsp. *caffra* (Sond.) Kokwaro) (*Anacardiaceae*) bark and leaves. Journal of Ethnopharmacology, 76, 305-308.
- Eryılmaz, M., Tosun, A., Tümen, İ., 2016. Antimicrobial activity of some species from Pinaceae and Cupressaceae, Türk Journal Pharmacy Science, 13, 35-40.
- Faydalıoğlu, E., Sürücüoğlu, M.S., 2011. Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. Kastamonu University Journal of Forestry Faculty, 11, 52 - 67.
- Fisher, K., Phillips, C.A., 2006. The effect of lemon, orange and bergamot Essential oils and their

- components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems, *Journal of Applied Microbiology*, 3, 1232-1239.
- Gomes, N.M., Rezende, C.M., Fontes, S.P., Matheus, M.E., Fernandes, P.D., 2007. Antinociceptive activity of Amazonian copaiba oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 12, 486-492.
- Gülçin, G., Küfrevioğlu, I., Oktay, M., Büyükkuroğlu, M.E., 2004. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and Analgesic Activities of Nettle (*Urtica dioica*). *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 205- 215.
- Harborne J.B., Baxter H. 1993. *Phytochemical dictionary. a handbook of bioactive compounds from plants*. Taylor and Francis, London].
- Irshad, S., Mahmood, M., Perveen, F., 2012. In-vitro anti-bacterial activities of three medicinal plants using agar well diffusion method. *Research of Journal Biology*, 02, 1-8.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Denkova, Z., Stoyanova, A., Murgov, I., Gearon, V., Birkbeck, S., Schmidt, E., Geissler, M., 2006. Comparative study on the antimicrobial activities of different sandalwood essential oils of various origin. *Flavour and Fragrance Journal*, 21,16-21.
- Keshavarz, M., Mostafaie, A., Mansouri, K., Bidmeshkipour, A., Motlagh H.R.M., Parvaneh, S., 2010. In vitro and ex vivo antiangiogenic activity of *Salvia officinalis*. *Phytotherapy Research*, 24, 1526–1531.
- Keskin, D., Toroğlu, S., 2011. Gıda Kaynaklı Bazı Patojen Bakterilerin Gelişmesini Engelleyen Tıbbi Bitkiler ile Bunların Ekstraktları ve Uçucu Yağları. *Academic Food Journal*, 8, 53-60.
- Kırmızıbekmez, H., Demirci, B., Yeşilada, E., Beşer, K.H., Demirci, F. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the Essential oils of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas* growing in Turkey. *Natural Product Communication*, 4, 1001-1006.
- Kizil, M., Kizil G., Yavuz, M., Aytekin, Ç., 2002. Antimicrobial activity of resins obtained from the roots and stems of *Cedrus libani* and *Abies cilicia*, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2, 144-146.
- Marotta S.M., Giarratana, F., Parco, A., Neri D., Zilino, G., Gluffride, A., Panebianco, A., 2016. Evaluation of the antibacterial activity of bergamot essential oil on different *Listeria monocytogenes* strains, *Italian Journal of Food Safety*, 5, 6176-6182.
- Maurice, M.I., Angela, R.D., Chiris, O.O., 1990. New antimicrobials of plant origin. Perspectives on new crops and new uses, 8, 457-460.
- Öztürk, B., Konyalıoğlu, S., Kantarcı, G., Çetinkol, D., 2005. İzmir yöresindeki yabani *Lavandula stoechas* L. subsp. *stoechas* taksonundan elde edilen uçucu yağın bileşimi, antibakteriyel, antifungal ve antioksidan kapasitesi', *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1, 61-72.
- Öztürk, Ö., 2016. Antibacterial and antifungal effects of the leaf, seed, seed coat and fruit capsule of *Aesculus hippocastanum* (Sapindaceae) extracts, *Acta Biologica Turcica*, 30, 20-23.
- Pesavento, G., Calónico, C., Bilia, A.R., Barnabei, M., Calesini, F., Addona, R., Mencarelli, L., Carmagnini, L., Di Martino, M.C., Lo Nostro, A., 2015. Antibacterial activity of *Oregano*, *Rosmarinus* and *Thymus* essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs, *Food Control*, 54:188-199.
- Pessini, G.L., Filho, B.P.D., Nakamura, C.V., Cortez, D.A.G., 2003. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq) C.DC.var.pallescens (C. DC.) Yunck. *Memo 'rias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 1115–1120.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S., 2006. In vitro antibacterial activity of some plant Essential oils. *Biomedical Central*, 6, 39-45.
- Reichling, J., Weseler, A., Saller, R., 2001. A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum*. *Pharmacopsychiatry* 34, 116-118.
- Saenez, P., Tornos, M.P., Alvarez, A., Fernandez, M.A., Garcia, M.D., 2004. Antibacterial activity of essential oils of *Pimenta racemosa* var. *terebinthina* and *Pimenta racemosa* var. *grisea*, *Fitoterapia*, 75, 599-602.
- Solmaz, E.S., Ata, E.P., 2009. Adverse Effects of Herbal Medicines and Products. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 66, 133-141.
- Süzgeç-Selçuk, S., Eyisan, S., 2012. Review: Türkiye'deki eczanelerde bulunan bitkisel ilaçlar. *Journal of Marmara Pharmacy*, 16, 164-180.
- Şengün, İ.Y., Öztürk, B., 2018. Bitkisel kaynaklı bazı doğal antimikrobikler, *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi C-Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji*, 7, 256-276.
- Veiga-Junior, V.F., Pinto, A.C., 2002. The *Copaifera* L. genus. *Quim Nova*, 25, 273-286.