

Origanum minutiflorum O. Schwarz et P.H. Davis Uçucu Yağının Bileşimi ve Antimikrobiyal Aktivitesi

Chemical Composition and Antimicrobial Properties of the Essential Oil of *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et P.H. Davis

Engin ŞARER*, Selver PANÇALI*, Sulhiye YILDIZ**

ÖZET

Ülkemizde 21 *Origanum* türü doğal olarak yetişmektedir. Bu çalışmada, Güney Anadolu'da endemik bir tür olan *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et P.H. Davis uçucu yağ örneklerinin kimyasal bileşimleri ve antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Farklı yüksekliklerden toplanan bitkilerden elde edilen iki uçucu yağ örneği, CC ve GC tekniklerinden yararlanarak analiz edilmiştir. Her iki uçucu yağ örneğinin ana bileşeni karvakrol'dür (%90.78 ve 92.95). Uçucu yağ örneklerinin antimikrobiyal aktivitesi de incelenmiştir. Uçucu yağlar, dört test bakterisi ve iki mantarın gelişimini önemli ölçüde inhibe etmişlerdir.

Anahtar Kelimeler: Lamiaceae, *Origanum minutiflorum*, Uçucu Yağ, Karvakrol, Antimikrobiyal Etki.

SUMMARY

There are 21 *Origanum* species growing wild in Anatolia. in this study, the chemical composition and antimicrobial properties of the essential oil samples of *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et P.H. Davis, endemic plant of Southern Anatolia, were examined.

The essential oils from different altitudes were analysed by using CC and GC. The main component of the both essential oil samples is carvac-

Redaksiyonun veriliş tarihi: 11.7.96

* A.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı

** A.Ü. Eczacılık Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.

rol (90.78 and 92.95%). Essential oils showed high antimicrobial activity against four test bacteria and two fungi.

Key Words: Lamiaceae, *Origanum minutiflorum*, Essential Oils, Carvacrol, Antimicrobial Properties.

GİRİŞ

Lamiaceae familyası baharat, halk ilacı ve koku kaynağı olarak kullanılan pek çok aromatik bitkiyi içeren bir familyadır. Bu familyada 200 cins ve 3300 tür bitki yer alır (1).

Origanum türleri Lamiaceae familyasının karakteristik özelliklerine sahip, yan çalimsı ya da otsu çok yıllık bitkilerdir (2). Bu türler özellikle Akdeniz ülkelerinde, Avrupa, İran, Anadolu, Kuzey Amerika, Asya'nın bir bölümü ve Sibiryada yetişir. Ayrıca *Origanum* türlerinin pek çok ülkede kültürü yapılmaktadır (3, 4).

Origanum türleri 10 seksiyonda toplanan 38 tür ve 17 hibritten oluşmaktadır (3). Ülkemizde 8 seksiyona ait 21 *Origanum* türü doğal olarak yetişmektedir (2).

Anadolu'da "Mercanköşk" adıyla bilinen *Origanum* türleri, tüm dünyada eski çağlardan beri ilaç ve baharat olarak kullanılan bitkilerdir. Dünya piyasasında önemli bir yere sahip olan "Türk Oreganosu" Batı ve Güney Anadolu'da yaygın olarak yetişen *Origanum onites* L.'den elde edilmektedir (5-7). "Kekik" olarak belirtilen drog, ülkemizde *Origanum*'lar dahil "Kekik" olarak tanınan tüm bitkileri içine almaktadır.

İç piyasaya bakıldığında, iki *Origanum* türünün; *O. vulgare ssp. viride* (İstanbul kekiği) ve *O. onites'in* (İzmir kekiği) kullanıldığı görülür (8, 9). Bu türlerin dışında ülkemizde yetişen diğer *Origanum* türleri de yetiştikleri bölgelerde halk tarafından gerek uçucu yağı elde edilerek, gerekse doğrudan herbasi kurutulularak, çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır (10).

Origanum türleri uçucu yağlarında ana bileşenler olarak genellikle karvakrol ve timol taşırlar (5, 11-17). Ancak karvakrol ve timolü az içeren/içermeyen *Origanum* uçucu yağları da vardır (18-20).

Origanum türlerinden elde edilen uçucu yağlar, başta koleretik ve antimikrobiyal etki olmak üzere bazı terapötik etkilere sahiptirler. Ayrıca ilaç, kozmetik, parfüm, likör ve sabun endüstrisinde de kullanılırlar (21-23).

Bu çalışmada bulunduğu bölgede halk tarafından "Yayla kekiği" olarak tanınan, soğuk algınlığı ve gastrointestinal hastalıklarda kullanılan ve

endemik bir tür olan *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et P.H. Davis' in uçucu yağ bileşiminin aydınlatılması ve antimikrobiyal etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

DENEL KISIM

MATERYAL:

Üzerinde çalışma yapılan *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et P.H. Davis (Lamiaceae) 1991 yılı Haziran ayında, Antalya çevresinden farklı iki yükseklikten toplanmıştır.

Lokalite 1: Tahtalı Dağ, Yayla Kuzdere, 1100 m.

Lokalite 2: Tahtalı Dağ, Yayla Kuzdere, 1500 m.

Uçucu yağ miktarı bitkinin çiçekli olduğu durumda en yüksek orandadır. Bu nedenle örnekler, bitki çiçekliyken toplanmış, yapraklı ve çiçekli dal uçları 3-4 gün gölgede kurutularak distilasyona hazırlanmıştır.

YÖNTEM:

Uçucu yağ İzolasyonu: Bitki örneklerindeki uçucu yağ miktarı volumetrik yöntemle belirlenmiştir (USP XXII, 1990). Clevenger cihazında yapılan distilasyonun süresi 3 saattir. Örneklerdeki nem miktarı da belirlenerek, kuru drogdaki uçucu yağ yüzdesi hesaplanmıştır. İzole edilen yağlar susuz sodyum sülfat üzerinde kurutulduktan sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Uçucu Yağın Fiziksel Özellikleri: Elde edilen uçucu yağların renk, yoğunluk, kırılma indeksi, %70'lik etanolde çözünürlük gibi fiziksel özellikleri saptanmıştır.

Kırılma indeksi "Abbe Refractometer Model G" ile belirlenmiştir.

Kolon Kromatografisi (CC): Uçucu yağ monoterpenik hidrokarbonlar ve oksijenli monoterpenleri ayırabilmek amacıyla, silikajel 7734 (70-230 mesh, Merck) kolona uygulanmıştır. Elüent olarak n-pentan ve etil asetat kullanılmıştır (24).

Gaz Kromatografisi (GC): Analizde "Packard Gas Chromatograph 419'dan yararlanılmıştır. Dedektör olarak FID kullanılmış ve analizler farklı polaritedeki kapiller kolonlarda yapılmıştır. Kullanılan kolonlar 25mx0.32mm fused silica. CP Sil 5 cb (5.16 mm) ve 25mx0.32mm fused silica, CP Wax 52cb (0.20 mm)dir. Monoterpenik hidrokarbonlar için 60°C'de (izotermal), oksijenli bileşikler için 120°C ve 160°C'de (izotermal) çalışılmıştır. Split oranı:1/100, taşıyıcı gaz: He'dur.

Uçucu yağ örnekleri bir kez de doğrudan verilerek ve elektronik integratör kullanılarak uçucu yağ içerisindeki bileşenlerin % miktarları saptanmıştır.

Uçucu yağ içerisindeki maddelerin teşhisi; gaz kromatogramlarında ki bağıl tutuş zamanlarının, önceden analizi yapılan uçucu yağlardaki maddelerin ve standart maddelerin bağıl tutuş zamanlarıyla karşılaştırılmasıyla yapılmıştır.

Uçucu yağ örneklerindeki maddelerin yüzde miktarları "Waters 745 B" elektronik integratörle saptanmıştır.

Antimikrobiyal Aktivite Tayini: Farklı yükseklikte yetişen *O. minutiflorum* örneklerinden elde edilen uçucu yağların bakterilere (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus faecalis* ATCC 19433, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922) ve mantarlara (*Candida albicans* KUEN 977 ve *Candida tropicalis* CBS 94) karşı antibakteriyel ve antifungal etkileri Disk Difüzyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir (25).

Bakteriler için besi yeri olarak Müller Hinton Agar (Oxoid), mantarlar için Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid) besi yerleri kullanılmıştır.

Sıvı emme kapasitesi 0.02 ml olan 0.5 cm çapındaki standart kağıt diskler sterilize edilmiştir. Uçucu yağların saf etilalkolle hazırlanan 1/1,1/5 ve 1/10'luk steril dilüsyonlan emdirilerek diskler hazırlanmıştır.

Mikroorganizma kültürleri besi yerinin yüzeyine steril eküvyonla yayılmıştır. Daha sonra, hazırlanan diskler uygun aralıklarla yerleştirilmiştir. Kontrol olarak etil alkolle hazırlanan diskler ve standart olarak trimetoprim+sülfometaksazol (+Baktrim) (25 mg) (Oxoid) ve ketokonazol (50 mg) (Diagnostics Pasteur) hazır diskleri kullanılmıştır.

Oluşan inhibisyon zonları milimetrik olarak ölçülmüştür.

SONUÇ VE TARTIŞMA

O. minutiflorum O. Schwarz et P.H.Davis örneklerinde belirlenen uçucu yağ yüzdesi Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: *O. minutiflorum* örneklerinin uçucu yağ yüzdesi

	% uçucu yağ miktarı (kuru drog a/h)
örnek 1	4.3
örnek 2	5.3

Örnek 1 ve 2'den elde edilen uçucu yağların fiziksel özellikleri Tablo 2'de yer almaktadır.

Tablo 2: *O. minutiflorum* uçucu yağ örneklerinin fiziksel özellikleri

	örnek 1	örnek 2
Renk	açık sarı	açık sarı
Koku	keskin kekiksi	keskin kekiksi
Yoğunluk (20°C)	0.9650	0.9602
Kırılma indeksi	1.6743	1.6671
%70 Etanolde çözünürlük	3k	3k

O. minutiflorum örneklerinden elde edilen uçucu yağların gaz kromatografik analiz sonucu belirlenen bileşimi Tablo 3'de görülmektedir.

Aynı bölgede farklı iki yükseklikten (1100 m ve 1500 m) toplanan *O. minutiflorum* O. Schwarz et P.H.Davis Örneklerinin uçucu yağ verimleri karşılaştırıldığında; aralarında belirgin bir farklılık bulunduğu saptanmıştır. 1500m'den toplanan örneğin uçucu yağ verimi, 1100m'den toplanan örneğinkinden %1 fazladır.

Örnekler fiziksel özellikleri bakımından küçük farklılıklar göstermiştir.

Kimyasal analiz sonuçları incelendiğinde; bitki örneklerinden elde edilen uçucu yağların yaklaşık %91-93 karvakrol içerdikleri, her iki örnekteki timol miktarının ise yaklaşık %0.2 olduğu belirlenmiştir.

Karvakrol'un çeşitli farmakolojik etkilere sahip bir bileşik olduğu bilinmektedir. Bu etkiler antiviral, analjezik, antiinflamatuvar, ekspektoran, antiastmatik, tonik, antihelmentik olarak sıralanabilir (7, 26-34).

Bunun yanı sıra koku notunu değiştirmek için parfümeride, oda spreylelerinin hazırlanmasında da karvakrol'den yararlanılmaktadır.

Üzerinde araştırma yapılan *O. minutiflorum* bitkisi uçucu yağ bakımından da zengin (%4.3-5.3) bir bitki olduğundan, karvakrol yönünden iyi bir kaynak teşkil etmektedir.

Bu araştırmaların yürütülmesi sırasında, diğer bir araştırma grubunun da Isparta ve Antalya'nın Saklıkent bölgesinden toplanan örnekler üzerinde çalıştıkları saptanmıştır (35). Ancak bulguları, üzerinde araştırma yaptığımız örneklere ait bulgulardan farklıdır.

Tablo 3:0. *minutiflorum* örneklerinden elde edilen uçucu yağların bileşimi

Bileşikler	Örnek 1	Örnek 2
trisiklen	% 0.002	% 0.002
α -pinen+ α -tuyen	0.341	0.294
kamfen	0.067	0.052
β -pinen	0.044	0.035
sabinen	0.004	eser
Δ^4 -karen	0.003	0.0013
Δ^3 -karen	0.015	0.013
mirsen+ α -fellandren	0.377	0.312
α -terpinen	<u>0.078</u>	0.108
limonen	0.050	0.039
β -fellandren	0.048	0.040
cis- β -osimen	eser	eser
γ -terpinen	0.614	0.445
trans- β -osimen	eser	0.004
p-simen	1.254	1.001
terpinolen	0.026	<u>0.001</u>
ökaliptol	<u>0.508</u>	<u>0.229</u>
3-oktanon	eser	eser
3-oktanol	0.012	0.034
fenkon	0.124	0.159
trans-sabinen hidrat	0.965	0.758
linalol	0.063	0.040
cis-sabinen hidrat	0.258	0.234
cis-p-memen-1-ol	0.049	0.024
bornil asetat	eser	-
terpinen-4-ol	1.150	0.529
trans-p-menten-1-ol	0.108	0.067
borneol	0.389	0.200
α -terpineol	1.100	0.716
karvon	<u>0.075</u>	<u>0.080</u>
geraniol	eser	eser
timol	0.248	0.216
karvakrol	90.784	92.950
bilinmeyen	1.224	1.388

Her iki örnekte de uçucu yağ verimi (sırasıyla %2.24 ve %2.44) incelediğimiz örneklerdekinden (%4.3 ve %5.3) çok daha azdır. Yağların fiziksel özelliklerinde de farklılık vardır.

Örnekler kimyasal bileşim açısından karşılaştırıldığında; araştırma konumuzu oluşturan *O. minutiflorum* uçucu yağ örneklerinin karvakrol bakımından (%91-93), incelenen diğer örneklerden (%75-82) daha zengin olduğu belirlenmiştir. Sözü edilen örneklerin toplandığı yükseklikler belirtilmediğinden, örnekler arasındaki bileşim farklılığı üzerinde net bir görüş bildirmek olası değildir.

Bu çalışmada, *O. minutiflorum* örneklerinden elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal etkileri de araştırılmıştır. Bu amaçla, uçucu yağ örnekleri gram (+) (*S. aureus*, *S. faecalis*, *B. subtilis*) ve gram (-) (*E. coli*) bakterilere ve mantarlara (*C. albicans*, *C. tropicalis*) karşı denenmiştir.

Örnek 1 ve 2 uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivite denemelerinin sonuçları Tablo 4'de verilmektedir.

Tablo 4: *O. minutiflorum* uçucu yağ örneklerinin (Örnek 1 ve 2) antimikrobiyal aktiviteleri

Mikroorganizma	örnek 1 dilüsyonlar ve inhibisyon zon çapları (mm)			örnek 2 dilüsyonlar ve inhibisyon zon çapları (mm)			Standartlar
	1/1	1/5	1/10	1/1	1/5	1/10	
							Baktrim (25 mg)
<i>Staphylococcus aureus</i>	26.0	22.0	20.0	26.5	22.0	19.0	23.0 mm
<i>Streptococcus faecalis</i>	26.0	20.0	17.0	26.0	19.5	17.0	25.0 mm
<i>Bacillus subtilis</i>	31.5	26.0	22.0	32.5	26.5	24.0	23.5 mm
<i>Escherichia coli</i>	29.0	26.0	22.5	27.5	23.5	21.5	25.3 mm
							Ketokonazol (50 mg)
<i>Candida albicans</i>	46.0	40.0	33.0	50.0	40.0	33.0	30.0 mm
<i>Candida tropicalis</i>	45.0	35.0	31.5	47.0	32.5	30.0	28.0 mm

O. minutiflorum uçucu yağ örnekleri sözü edilen mikroorganizmalar üzerinde, Baktrim ve Ketokonazol ile karşılaştırıldıklarında, kuvvetli antibakteriyel ve antifungal etki göstermişlerdir. Uçucu yağların antifungal etkisi, antibakteriyel etkiye oranla daha güçlüdür.

TEŞEKKÜR

Bitkisel materyalin tayinindeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Mecit Vural'a (Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü) ve malî desteği nedeniyle A.Ü. Araştırma Fonu'na teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Werker, E., Ravid, U. et al., Structure of Glandular Hairs and Identification of the Main Components of Their Secreted Material in Some Species of the Labiateae, *Israel Journal of Botany* 34 (1) 31-45 (1985).
2. Davis, P.H., Flora of Turkey, Vol VII, University Press, Edinburgh, (1982).
3. Ietswaart, J.H., A Taxonomic Revision of the
Origanum (Labiatae), Leiden
University Press, The Hague, (1980).
4. Putievsky, E., Ravid, U., Variations in Yield Parameters in a Wild Population of Origanum vulgare L., *World Crops. Prod., Util, Descr.*, 7 (Aromat. Plants), 237-248, (1982).
5. Ravid, U., Putievsky, E., Carvacrol and Thymol Chemotypes of East Mediterranean Wild Labiateae Herbs, *Progress in Ess. Oil Res.*, Ed: Brunke, E.J., Walter de Gruyter & Co., Germany, (1986).
6. Fleisher, A., Fleisher, Z., Identification of Biblical Hyssop and Origin of the Traditional Use of Oregano-group Herbs in the Mediterranean Region, *Econ. Bot.*, 42 (2), 232-241, (1988).
7. Lawrence, B.M., The Botanical and Chemical Aspects of Oregano, *Perfum. Flavouur.* 9(5)41-44,49-41 (1984).
8. Baytop, A., Farmasötik Botanik Ders Kitabı, İstanbul Üniversitesi Basımevi, İst., (1991).
9. Tanker, M., Türkiye'de Kekik Olarak Kullanılan Origanum heracleoticum L., Majorana onites (L.) Benth., Satureia spicigera (C. Koch) Boiss. Üzerinde Araştırmalar, Tıp Fakültesi Eczacı Okulu, Doktora Tezi, İstanbul (1962).
10. Baytop, T., Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, İstanbul Üniversitesi, Yayın no:3255, İstanbul, (1984).
11. Şarer, E., Scheffer, J.J.C. et al., Composition of the Essential Oil of Origanum majorana Grown in Different Localities in Turkey, *Aromat. Plants, Proc. Int. Symp.* 15th, 209-212, (1984) (Pub. 1985).
12. Khanna, R.K., Shouma, O.S. et al., The Essential Oil of Origanum majorana Raised on Saline Alkali Soils, *Indian Perfumer* 29 (3-4) 171-176 (1985).
13. Nykanen, I., High Resolution Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Determination of the Flavor Composition of Marjoram (Origanum majorana L.) Cultivated in Finland, *Z. Lebensm. -Unters. Forsch.* 183 (4) 267-272 (1986).

14. Putievsky, E., Ravid, U. et al., Phenological and Seasonal Influences on Essential Oil of a Cultivated Clone of *Origanum vulgare* L., *J. Sci. Food Agric.* 43, 225-228 (1988).
15. Carmo, M.M., Frazao, S. et al., The Chemical Composition of Portuguese *Origanum vulgare* Oils, *J. Essent. Oil Res.* 1(2) 69-71 (1989).
16. Sezik, E., Başaran, A., Phytochemical Investigations on the Plants Used as Folk Medicine and Herbal Tea in Turkey. IV. The Volatile Oil of *Origanum saccatum* L., *G.Ü. Eczacılık Fakültesi Dergisi* 3(2) 177-184 (1986).
17. Farag, R.S., Daw, Z.Y. et al., Influence of Some Spice Essential Oils on *Aspergillus parasiticus* Growth and Production of Aflatoxins in a Synthetic Medium, *J. Food Science* 54 (1) 74-76 (1989).
18. Oberdieck, R., Ein Beitrag zur Kenntnis und Analytik von Majoran (*Majorana hortensis* Moench.), *Dtsch. Lebensm. -Rundsch-11* (2) 63-74 (1981).
19. Şarer, E., Scheffer, J.J.C. et al., Monoterpenes in the Essential Oil of *Origanum majorana*, *Planta Med.* 46, 236-239 (1982).
20. Berrada, M., İgri, M.A. et al., Results of the Analysis of the Essential Oil of *Origanum majorana* L. Grown in Morocco, *Biruniya* 4 (1), 27-33, (1988).
21. Farag, R.S., Badei A.Z.M.A. et al., Antioxidant Activity of Some Spice Essential Oils on Linoleic Acid Oxidation in aqueous Media, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66 (6) 792-799 (1989).
22. Leung, A.Y., *Encyclopedia of Common Natural Ingredients*, John Wiley & Sons Inc., USA, (1980)
23. Souleles, J., Volatile Constituent of *Origanum dubium* Leaves and Stem Bark, *Planta Med.* 57 (1), 77-78, (1991).
24. Şarer, E., Anadolu *Salvia*'larının Uçucu Yağları Üzerinde Araştırmalar II. *Salvia recognita* Fisch. et Mey., *A.Ü. Eczacılık Fakültesi Dergisi* 14(1) 94-98 (1984).
25. Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., et al., Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method, *American Journal of Clinical Pathology* 45, 493-496 (1966).
26. Hinou, J.B., Harvala, C.E., et al., Antimicrobial Activity Screening of 32 Common Constituents of Essential Oils, *Pharmazie* 44 (4) 302-303 (1989).
27. Ghos, A., Chakravarti, D. et al., Action of Thymol, Carvacrol (isothymol) and p-cymene on the Synthesis of Macromolecules of *V. parahemolyticus* and *V. Cholerae*, *J. Inst. Chem.* (India) 5813, 101-102 (1986).
28. Pauli, A., Knobloch, K., Inhibitory Effects of Essential Oil Components on Growth of Food-Contaminating Fungi, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 185 (1) 10-13 (1987).
29. Thompson, D.P., Fungitoxic Activity of Essential Oil Components on Food Storage Fungi, *Mycologia* 81 (1) 151-153 (1989).

30. **Shaaya, E., Ravid U. et al.**, Fumigant Toxicity of Oils Against Four Major Stored Product Insect, *J. Chem. Ecol.* 17 (3) 499-504 (1991).
31. **Akimato, K.**, Studies on Local Anesthetic Effect of Phenol derivatives. 111. Cresatin and Thymol., *Shigaku* 73 (5) 1815-1833 (1985).
32. **Anamura, S., Dahi, T. et al.**, Effects of Phenolic Dental Medicaments on Prostaglandin Synthesis by Microsomes of Bovine Tooth Pulp and Rabbit Kidney Medulla, *Arch. OralBiol.* 33(8) 555-560 (1988).
33. **Wagner, H., Wierer, M. et al.**, In Vitro-Hemmung der Prostaglandin-Biosynthese Durch Aetherische Öle und Phenolische Verbindungen, *Planla Med.* 3, 184-187 (1986).
34. **Bláquez, M.A., Zafra-Polo, M.C. et al.**, The Volatile Oil of Thymus leptophyllus Growing in Spain, *Planla Med.* 55 (2) 198 (1989).
35. **Başer, K.H.C., Tümen, G. et al.**, The Essential Oil of Origanum minutiflorum O. Schwarz and Davis, *J. Ess. Oil Res.* 3, 445-446 (1991).