

Antibiyotik Aktivite Gösteren Bazı Tohumlu Bitkiler Üzerinde Araştırmalar*

Researches on Some Flowering Plants Producing Antibiotic Activity

Nevin TANKER**

Selahattin GÜRTÜRK***

Ünal KOL****

GİRİŞ

Yüksek bitkilerin antibiyotik etkilerini inceleyen çalışmalara 1926 yılında başlanmıştır. GLASER ve PRINZ (1926) *Gramineae* 'lerden elde edilen oksidazların ilâve edildiği kültürlerde, *E.coli*, *E.typhosa*, *B.anthraxis* ve bazı *Streptococcus* 'ların büyümelerinin inhibe edildiğini, JURDANOFF (1927) ise *Capsicum annuum* ekstrelerinin gram-negatif bakteriler üzerinde bakterisit bir etki yaptığını bildirmiştir(1).

1943 yılından sonra araştırmalar genişletilmiş ve *Angiospermae* 'nin hemen hemen bütün familyaları incelenmiştir. OSBORN, 2300 türü içeren bir dizi üzerindeki çalışmalar sonucu, 63 cinsten aktivite saptamıştır (2). SANDERS ve arkadaşları, 150 türün 15'inden elde edilen özuların *B.subtilis* ve *E.coli* 'ye etkili olduğunu, bir diğer çalışmada da 120 türün hiç birinde önemli bir aktivite bulunmadığını göstermişlerdir (3,4). HUGHES, 73 familyaya ait 295 cinsin 545 çiçekli bitki türüyle çalışmış, bunlardan 42 familyadaki 102 cinsin 151 türünün etkili olduğunu saptamıştır (5).

*Bio. Ünal KOL tarafından Farmakognozi ve Farmasötik Botanik kürsüsünde (Kürsü Başkanı Prof. Dr. Mekin TANKER) hazırlanmış olan aynı isimli doktora tezinden özetlenmiştir. Sınav tarihi: Mayıs 1979

** Farmakognozi ve Farmasötik Botanik Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi Ankara Üniversitesi,

***Viroloji Kürsüsü, Veteriner Fakültesi, Ankara Üniversitesi.

****Genel ve Farmasötik Botanik Bilim Dalı, Eczacılık Yüksek Okulu, Ankara İktisadi Ticari İlimler Akademisi.

Bugüne değin, yurdumuzda yetişmekte olan bitkiler üzerinde, antibiyotik etki yönünden geniş bir tarama yapılmamıştır. Bu çalışmada, değişik ve bilinen etken madde grupları taşıyan 22 tane bitki örneği seçtik (Tablo 1). Etken madde gruplarının antibiyotik etki ile ilişkisini araştırırken bir yandan da, antibiyotik etki gösteren yeni türler bulmaya çaba gösterdik. Bu araştırma süresince, özellikle tüketme yöntemleri bakımından, bazı teknik sorunlara çözüm getirmeğe de önem verdik.

MATERYEL VE YÖNTEM

Anadolu'nun değişik yörelerinden toplanan ve gölgede kurutulan bitki örneklerinin farklı kısımlarından yararlanıldı. Kuru bitkide çalışma gereği, birçok araştırmacı tarafından öne sürülmüştür, örneğin OSBORN (1943) kurutmanın, bazı bitkilerin inhibitör kuvvetine etkili olabildiğini saptamıştır (2). Ayrıca, çalışmamızda uygulayacağımız tüketme yöntemlerinde kuru bitkide çalışma gerektiği de açıkça belirlenmiştir.

Çalışmamızda kullanılacak kuru bitkilerin denenecek kısımları, steril bir bıçakla kesilmiş ve cam kavanozlarda ışıktan korunarak saklanmıştır.

Test bakterileri* liyofilize suşlar halinde kullanılmıştır. Çalışma materyeli olarak seçilen 22 bitki türünün bir bölümü Türkiye'de yetişmekte, bir kısmının ise kültürü yapılmaktadır. Bu bitkilerin antibiyotik özeliğinin saptanması için, çalışmalarımızı iki kısımda yürüttük. Birincisi bitkisel materyele uygulanan yöntem, diğeri ise biyolojik test yöntemidir.

Bitkisel materyele uygulanan yöntemlerin başında mase- rasyon gelmektedir. Bunun için biri su, diğeri su: gliserin (1:1) olan iki çözücü sistemden yararlanılmıştır. Havanda toz edilmiş 20 şer gram bitki örneği iki erlene alınır. Birine 100 ml distile su, diğesine 50 ml distile su + 50 ml gliserin karışımı ilâve edilir ve karıştırılır. Bu steril kaplar oda sıcaklığında, karanlık bir dolapta ve ara sıra çalkalayarak 10 gün bekletilir, ince bir tülbentten, steril ve ağzı kapaklı şişelere süzülür (6,7).

*Bu bakteriler, Etlik, Veteriner Bakteriyoloji ve Araştırma Enstitüsü'nden (Ankara) temin edilen *B.anthraxis* dışında, Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enstitüsü, Bakteriyoloji Bölümü Kültür koleksiyonundan sağlanmıştır.

Tablo I. Seçilen örnek bitkiler ve nitelikleri

BİTKİ ADI	KULLANILAN KISMI	ETKEN MADDE	TOPLANDIĞI YER
<i>Digitalis orientalis</i>	Folia	Kardiyoaktif heterozit	Işıklıdağı, Ankara
<i>Rhamnus petiolaris</i>	Cortex	Antrasen heterozit	Ankara
<i>Hypericum heterophyllum</i>	Herba	Flavonoit heterozit	Karagöl yolu Ankara
<i>Brassica nigra</i>	Semen	Senevol heterozit	Ankara
<i>Prunus laurocerasus</i>	Folia	Siyanogenetik heterozit	Pazar, Rize
<i>Salix alba</i>	Cortex	Fenol türevi heterozit	Ankara
<i>Gypsophila arrostii</i>	Radix	Triterpenik saponozit	Karaman, Konya
<i>Smilax excelsa</i>	Radix	Sterol türevi saponozit	Antalya
<i>Quercus infectoria</i>	Gallae	Tanen	Sivas
<i>Merendera attica</i>	Bulbus	Protoalkaloit	Ankara
<i>Nicotiana rustica</i>	Folia	Piridin türevi alkaloid	Pazar, Rize
<i>Atropa belladonna</i>	Folia	Tropan türevi alkaloid	Abant, Bolu
<i>Withania somnifera</i>	Folia	Tropan türevi alkaloid	Mersin
<i>Papaver somniferum ssp. anaticum</i>	Fructus	İzokinolein alkaloid	Afyon
<i>Peganum harmala</i>	Semen	Indol türevi alkaloid	Polath, Ankara
<i>Consolida orientalis</i>	Flores	Diterpenik alkaloid	Ankara
<i>Myrtus communis</i>	Folia	Asiklik mono-terpen, uçucu yağ	Muğla
<i>Mentha piperita</i>	Folia	Monosiklik mono-terpen, uçucu yağ	Ecz. Fak. Bah-çesi, Ankara
<i>Lavandula cariensis</i>	Flores	Bisiklik mono-terpen, uçucu yağ	Ödemiş, izmir
<i>Artemisia absinthium</i>	Herba	Seskiterpen, uçucu yağ,	Antalya
<i>Pinus brutia</i>	Colophonium	Diterpen, uçucu yağ	Silifke, Mersin
<i>Origanum dubium</i>	Herba	Aromatik, uçucu yağ	Alanya, Antalya

Perkolasyon yönteminde, bitki kısımları toz edilip etüvde **24** saat kurutulduktan sonra **4** cm çapında ve **30** cm boyunda cam perkolatörlere **10** ar gram olarak yerleştirilir. Perkolatör'lerden birine % **70**'lik etanol ve diğerine kloroform bulunan ayırma hunileri yerleştirilir, çözücü ile bütün materyel tamamen ıslandıktan sonra **24** saat bekletilir. Ayırma hunisine **15** ml (drogun **1.5** katı) çözücü ilâve edilir ve damlama hızı, çözücünün tümü **24** saatte akacak biçimde ayarlanır (**6,7**).

Soxhlet ile tüketme bir kez eter, bir kez de petrol eteri ile yürütülmüştür. Toz edilmiş drogun **10** gramı önce **150** ml eter, sonra petrol eteri ile **8**'er saat tüketilir (**6,7**).

Bu üç yöntemle elde edilen ekstreler ağzı kapaklı steril şişelerde, buzdolabında saklanmış ve çoğunlukla doğrudan doğruya, ya da yarı hacıma kadar yoğunlaştırıldıktan sonra denemeye alınmıştır. Buzdolabında saklanan tüketme ürünleri, denemeye geçmeden önce, Seitz filtresinden geçirilerek sterilize edilmiştir.

Biyolojik test yöntemi olarak kağıt disk yöntemi uygulanmıştır. Diskler **9** mm çapında ve kurutma kağıdından kesilerek hazırlanır ve kuru sterilizatörde, **180°** C de, **1** saat bekletilerek sterilize edilir. Steril diskler, steril petri kutularında bulunan bitki ekstrelerine batırılarak homojen bir şekilde emmesi sağlandıktan sonra, başka bir steril petri kutusuna alınır ve etüvde kurutulur.

Sh.dysenteriae ve *S.typhosa* için S.S.Agar (**B74**) besiyeri (**32 g/500** ml süspansiyon halinde), *E.coli* için E.M.B Agar (**19 g/500** ml) besiyeri, *S.aureus* için Staphylococcus Medium **110** Agar (**75 g/500** ml) besiyeri ve geri kalan bakterilerimiz için de Blood Agar Base (**20g/500** ml) besiyeri kullanılmıştır. Buyyonlar "Neutralized Bacteriological Peptone" dan hazırlanmıştır.

Besiyerleri, sterilizasyondan sonra, her biri **5** mm kalınlıkta besiyeri içeren petri kutularına dağıtılır. Liyofilize suşlar önce buyyonlara ekilir ve inkübasyona bırakılır. Steril pipetlerle, üreme olan kültürlerden alınarak besiyerlerine yüzey ekimi yapılır. Her bir petri kutusuna, hazırlanan disklerin **4** tanesi, steril penslerle yerleştirilir. İnkübasyon için **37°**C de **12-24** saat etüvde

bekletilir. İnhibisyon zonları mm cinsinden çap olarak ölçülmüştür. Ayrıca çeşitli kontroller yapılmış ve her deney en az 2 defa tekrarlanmıştır.

BULGULAR

İncelenen 22 bitkiden yalnız ikisinde hiç bir zona rastlanmamıştır. Bunlar *Mentha piperita* ile *Consolida orientalis*'dir.

Bazı bitkiler yalnız 1 mikroorganizmaya, bir tek ekstresinde inhibisyon zonu gösterirken, aynı mikroorganizmaya *Peganum harmala* 3 ayrı ekstresinde, *Papaver somniferum* 4 değişik ekstresinde etkili olmuştur (Tablo II).

Farklı 2 test mikroorganizmasma karşı etkili olan bitkiler *Digitalis orientalis*, *Gypsophila arrostii*, *Nicotiana rustica*, *Atropa belladonna*, *Artemisia absinthium* ve *Lavandula cariensis*'tir (Tablo II).

Yalnız gram-pozitif bakterilere karşı antibiyotik etki gösteren bitkiler *Salix alba* ve *Prunus laurocerasus*'dur. *Rhamnus petiolaris* gram-pozitiflerden ikisine ve gram-negatiflerden birine, *Withania somnifera* gram-pozitiflerin hepsine ve gram-negatiflerden ikisine etkili olmuştur (Tablo II).

Tüm gram-pozitif bakterilere çeşitli ekstrelerde etkili olan bitkiler *Ouercus infectoria*, *Pinus brutia* ve *Origanum dubium*'dur. Ayrıca bu bitkiler gram-negatif bakterilere de aktivite göstermişlerdir (Tablo II).

Antibiyotik etki en fazla *Hypericum heterophyllum* ve *Myrtus communis*'te görülmüştür (Şekil 1, 2, 3, 4). *H.heterophyllum E.coli* ve *Sh.dysenteriae* dışında, *M.communis* ise yalnız *Sh.dysenteriae* dışında, tüm test mikroorganizmalarına karşı etkili olmuştur (Tablo II).

TARTIŞMA VE SONUÇ

1. Yaptığımız araştırma sonucunda bazı bitki türlerinde, antibiyotik etki bulunduğu ilk kez saptanmış bulunmaktadır. Bunlar *D.orientalis*, *R.petiolaris*, *H.heterophyllum*, *P.laurocerasus*, *S.alba*, *G.arrostii*, *S.excelsa*, *Q.infectoria*, *M.attica*, *A.belladonna*, *P.somniferum spp. anatolicum*, *P.harmala*, *L.cariensis*, *A.absinthium*, *P.brutia*, *O.dubium*'dur.

2. Aktivite gösteren örnek bitkilerden (*H.heterophyllum*, *Q.infectoria*, *W.somnifera*, *M.communis*, *P.brutia*, *O.dubium*) izole edilmiş saf

Tablo II. Örnek bitkilerin aktivite değerleri.

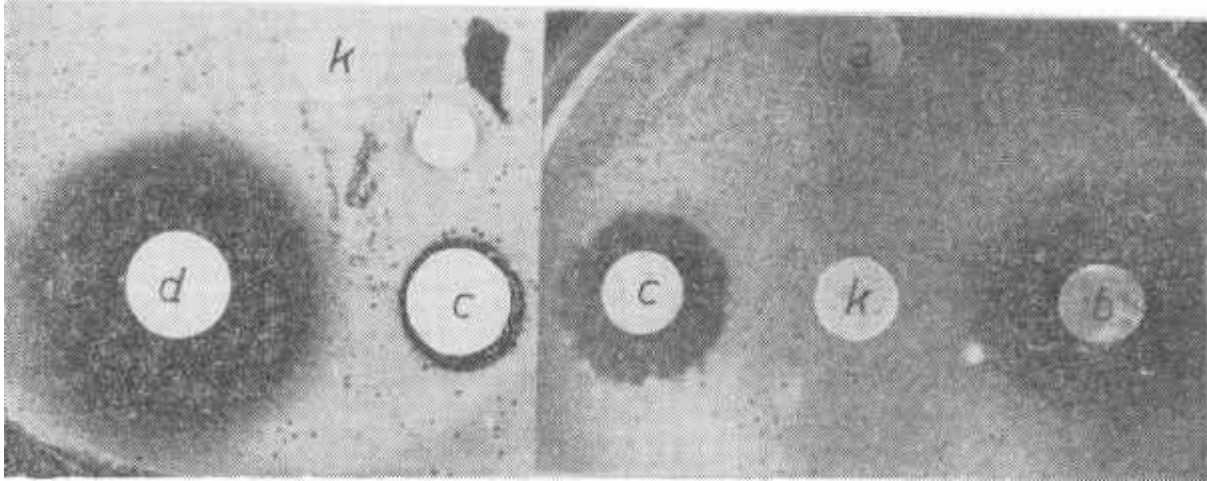
BİTKİ ADI	ETKEN MADDE	EKSTRAKSİYON ÇEŞİTLERİ					
		Su Mas.	Su-Gli. Mas.	Etanol Per.	Kloroform Per.	Eter Eks.	P.eteri Eks.
D.orientalis	Kardiyotonik heterozit	—	Ba. x St. x x	—	—	—	—
R.petiolaris	Antrazen heterozit	—	Ba. x	St. x	Ba. x	Sf. x	—
H.heterophyllum	Flavonoit heterozit	—	Sa. x X Ba. x X Ng. x X	Sf. x X Sa. x Ba. x	Sf. x x Sa. x X X Ba. x x Ng. x	Sf. x x x Sa. X X X Ba. x x x Ng. x X Pa. X X	Sf. X X X Sa. X X X Ba. x x x Ng. X x x St. x
B.nigra	Sevenol heterozit	—	—	Ba. x X	—	—	—
P.laurocerasus	Siyanogenetik heterozit	—	—	Sf. x Sa. x Ba. x X	Ba. x	—	—
S.alba	Fenol heterozit	—	Sf. x	Sf. x Sa. x Ba. x	—	—	—
G.arrostii	Triterpenik saponozit	—	—	Ba. x	—	—	St. x
S.excelsa	Sterol saponozit	—	—	Ba. x X	—	—	—
Q.infectoria	Gallik tanen	Sf. x x Sa. x Ba. x Ng. x x	Sf. Sa. x Ba. x x Ng. x x	Ba. x x Ng. x	—	Sf. x	—
M.attica	Protoalkaloit	—	—	Ba. x	—	—	—
N.rustica	Piridin türevi alkaloit	—	—	Sf. x Ba. x	—	—	—

Tablo II'nin devamı

A.belladonna	Tropan türevi alkaloit	Ec.x	—	—	Ba.x		
W.somnifera	Tropan türevi alkaloit	Ec.x	Sa.x x Ba.x St.x	Sf.X X Sa.X Ba.x	Sf.x Sa.x	Sf.X	—
P.somniferum	İzokinolein alkaloit	—	Ba.x	Ba.x X	Ba.X X X	—	Ba.x x
P.harmala	İndol türevi alkaloit	—	Ba.x	Ba.X X	Ba.x	—	—
M. communis	Asiklik monoterpen, uçucu yağ	—	Sf.X X Sa.x Ba.x x Ec.x x Ng.X Pa.x	Sf.X X Sa.x X Ba.x X Ec.x Ng.X X Pa.x St.X x	Sf.x x Sa.x X Ba.x X Ec.x Ng.x X	Sf.X X Sa.X X Ba.x X X Ng.x X Pa.x X	Sf.x x Sa.x X Ba.X X X Ng.x x St.x
L.cariensis	Bisiklik monoterpen uçucu yağ	—		Ba.X X	Ba.x	Ba.x St.x	
P.brutia	Diterpen, uçucu yağ	St.x	Sa.X Ba.X X	Sf.X Sa.X X Ba.x X Ng.x	Sa.x Ba.x X	Sa.X X Ba.X X	Sa.x Ba.x x
O.dubium	Aromatik Uçucu yağ	Sa.x	Sf.x x x Ba.x x Pa.x x	Sf.x Ec.x	Sf.x Ba.x x St.x	Sf.x Sa.x Ba.x Ng.x St.x	Sf.x Ba.x Ec.x St.x

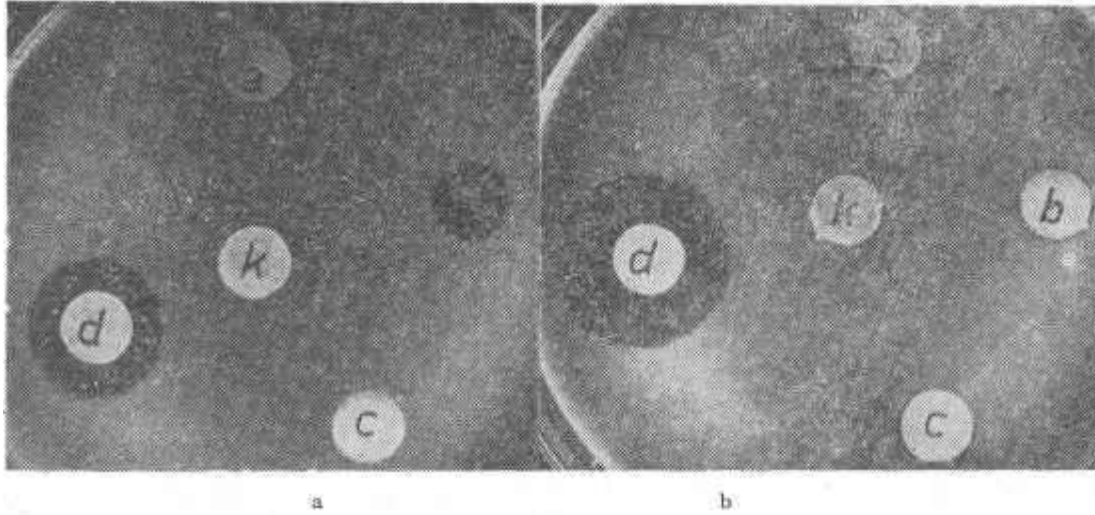
X Az aktif, 9-14 mm.
 X X Aktif, 15-20 mm.
 X X X Çok aktif, 21-25 mm.
 — aktivite yok

Sf. *Streptococcus faecalis*
 Sa. *Staphylococcus aureus*
 Ba. *Bacillus anthracis*
 Ec. *Escherichia coli*
 Ng. *Neisseria gonorrhoeae*
 Pa. *Pseudomonas aeruginosa*
 St. *Salmonella typhosa*

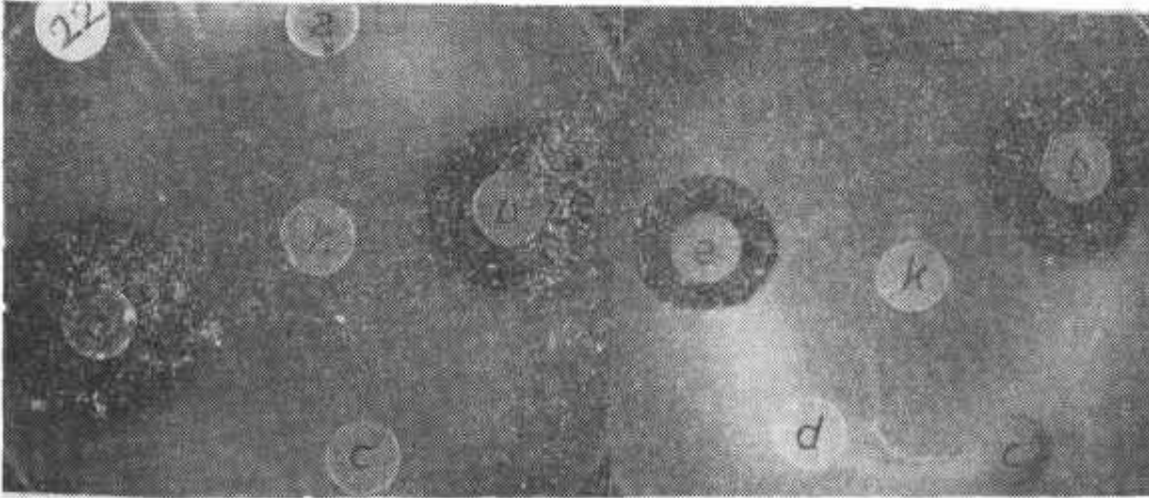


Şekil 1. *S.faecalis* ekilmiş kültürlerde inhibisyon zonları.

- | | | | | | |
|----|------------------------|-----------------|----|------------------------|-----------------|
| c. | <i>O.dubium</i> | (eter ekstresi) | a. | <i>D.orientalis</i> | (eter ekstresi) |
| d. | <i>H.heterophyllum</i> | (" ") | b. | <i>H.heterophyllum</i> | (" ") |
| k. | Kontrol diski | | c. | <i>M.communis</i> | (" ") |
| | | | k. | Kontrol diski | |

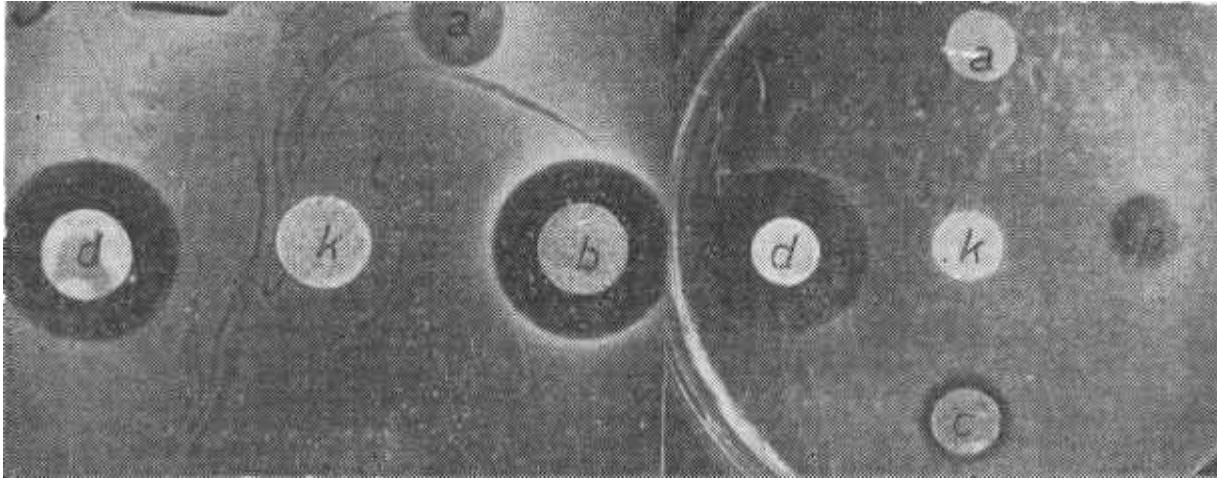


- a. *D.orientalis* (kloroform perkolati) a. *D.orientalis* (petrol eteri ekstresi)
b. *A.belladonna* (" ") b. *A.belladonna* (" ")
d. *M.commonis* (" ") d. *M.commonis* (" ")
k. Kontrol diski



Şekil 3. S.aureus ekilmiş kültürlerde inhibisyon zonları.

- | | | | | | |
|----|-----------------|------------------------|----|-----------------|------------------|
| a. | W.somnifera | (petrol eteri eksresi) | a. | D.orientalis | (eter ekstresi) |
| b. | M.communis | { " " } | b. | H.heterophyllum | (" ") |
| c. | D.orientalis | (" ") | c. | W.somnifera | (" ") |
| d. | H.heterophyllum | (" ") | e. | M.communis | (" ") |
- k. kontrol diski**



a b

Şekil 4. *N. gonorrhoeae* ekilmiş kültürlerde inhibisyon zonları.

<p>a. <i>W. somnifera</i> (eter ekstresi)</p> <p>fa. <i>M. communis</i> (" ")</p> <p>c. <i>D. orientalis</i> (" ")</p> <p>d. <i>H. heterophyllum</i> (" ")</p>	<p>a. <i>W. somnifera</i> (petrol eteri ekstresi)</p> <p>b. <i>D. stramonium</i> (" ")</p> <p>c. <i>O. dubium</i> (" ")</p> <p>d. <i>H. heterophyllum</i> (" ")</p> <p style="text-align: center;">k. Kontrol diski</p>
--	---

etken maddeler de bazı mikroorganizmalara karşı denenmiştir (Tablo III). Tanen, uçucu yağ ve oleorezin içeren bitkilerde bu etkinin doğrudan doğruya taşıdıkları etken maddelerden ileri geldiği sonucuna varılmıştır.

3- Tüketme yöntemlerimiz arasında, özellikle etanol perkolasyonu diğerlerine göre daha iyi sonuç vermiştir. Etanollü perkolatlarda farklı 18 bitki inhibisyon zonları gösterirken, kloroform perkolatında farklı 11 bitki, eter ile tüketmede farklı 9 bitki, petrol eteri ile tüketmede farklı 6 bitki, sulu maseratta farklı 5 bitki inhibisyon zonları göstermiştir.

4- Sulu maserat ile iyi sonuçlar alınmadığı için yeni bir çözücü araştırıldı. Su: gliserin (1:1) karışımı kullanılarak yapılan maserasyon ile su maserasyonundan çok daha iyi sonuçlar alınmıştır. Bu çözücü ile soğukta maserasyonun, özellikle herbaryum örnekleri için iyi bir tüketme yöntemi olduğu ileri sürülebilir.

ÖZET

Bu çalışmada 22 bitki türü antibiyotik etki yönünden incelenmiştir. *S.faecalis*, *S.aureus*, *B.anthraxis*, *E.coli*, *N.gonorrhoeae*, *P.aeruginosa*, *Sh.dysenteriae* ve *S.typhosa* isimli mikroorganizmalar üzerinde yapılan denemeler sonucu 16 türün antibiyotik etki göstermediği ilk kez saptanmıştır. En kuvvetli etki *H.heterophyllum* ve *M.communis*'te görülmüştür.

Tablo III. Aktivite göstermiş bazı etken madde gruplarının etki değerleri.

ETKEN MADDE GRUPLARI	BAKTERİLER				
	S.faecalis	S.aureus	B.anthraxis	E.coli	S.typhosa
Diantron, hiperisin	—	—	—	—	—
Gallik tanen	xx	xx	x	—	x
Tropan türevi alkaloid, hiyosiyamin sülfat	—	—	—	—	—
Asiklik monoteren, uçucu yağ	x	xx	x	xx	xx
Diterpen, oleorezin	x	xx	xx	xx	xx
Aromatik, uçucu yağ	xx	—	x	xxx	xx

x Az aktif, 9-14 mm
 xx Aktif, 15-20 mm
 xxx Çok aktif, 21-25 mm
 — Aktivite yok

İnceleme sırasında maserasyon için en elverişli çözücü sistem aranmıştır. Su:gliserin (1:1) çözücüsü ile en uygun sonuçlar alındığı saptanmıştır ve böylece herbaryum örnekleri için daha uygun ve yeni bir tüketme yöntemi geliştirilmiştir.

SUMMARY

In this paper, 22 species were studied for determining antibiotic activity. As a result of the assays on the microorganisms called *S.faecalis*, *S.aureus*, *B.anthraxis*, *E.coli*, *N.gonorrhoeae*, *P.aeruginosa*, *Sh.dysenteriae* and *S.typhosa*, it was found that antibiotic activity of 16 species is observed for the first time. The most strong activity was observed in *H.heterophyllum* and *M.communis*.

During the study, the most suitable solvent system for maseration has been looked for. It was found that the best results are taken by the water: glycerin (1:1) solvent and therefore more suitable and a new method of extraction for herbarium specimens was progressed.

LİTERATÜR

1. Paech, K., Tracey, M.V.: **Modern Methods of Plant Analysis III**, Springer-Verlag, Berlin (1955)-
2. Osborn, E.M.: *Brit. Jour Exp. Pat.* 24 (6), 227-231 (1943).
3. Sanders, D.W., Weatherwax, P.W., Mc Clung, L.S.: *J. Bad.* 49, 206 (1945).
4. *Ibid* 49, 611-615 (1945).
5. Hughes, J.E.: *Antibiotics and Chemotherapy* 2, 487-491 (1952).
6. İzgü, E.: **Genel ve Endüstriyel Farmasi II**, Ayyıldız Matbaası A.Ş., Ankara (1974).
7. Yalçındağ, O.N.: **Eczacılıkta Ekstraksiyon Metodları**, Berksoy Matbaası, İstanbul (1965)-