

## SOĞUK SIKMA VE SOĞUK MASERASYON YÖNTEMİYLE ELDE EDİLEN BİTKİ EKSTRAKTLARININ YAYGIN PATOJENLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

**Aylin Korkut Altıntaş\*, Hakan Kuleaşan**

Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

Geliş / *Received*: 02.07.2019; Kabul / *Accepted*: 15.01.2020; Online baskı / *Published online*: 02.02.2020

Korkut Altıntaş, A., Kuleaşan, H. (2020). Soğuk sıkma ve soğuk maserasyon yöntemiyle elde edilen bitki ekstraktlarının yaygın patojenler üzerindeki etkileri. *GIDA* (2020) 45(1) 161-170 doi: 10.15237/gida.GD19118

*Korkut Altıntaş, A., Kuleaşan, H. (2020). Soğuk sıkma ve soğuk maserasyon yöntemiyle elde edilen bitki ekstraktlarının yaygın patojenler üzerindeki etkileri. GIDA (2020) 45(1) 161-170 doi: 10.15237/gida.GD19118*

### ÖZ

Çalışmada, farklı bitkilerin yapılarına göre soğuk sıkma yöntemi veya soğuk maserasyon yoluyla elde edilen ekstraktlarının antimikrobiyel etkileri, kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Sarımsak soğuk sıkma ekstraktı,  $22.00 \pm 1.73$  ile  $41.00 \pm 1.00$  mm aralığında zon çapı ile antimikrobiyel etki gösterirken, defne ekstraktı ise *S. aureus*'a karşı  $12.67 \pm 0.58$  mm zon çapı ile en düşük antimikrobiyel etki göstermiştir. En düşük Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIK), değerlerini sarımsak soğuk sıkma ekstraktı göstermiştir. Soğuk maserasyon ekstraktlarının farklı seviyelerde antimikrobiyel etki gösterdiği ve çözgen çeşidinin önemli etkileri olduğu sonucuna varılmıştır. HPLC analiz sonuçları incelendiğinde antimikrobiyel etkiden büyük ölçüde fenolik bileşenlerin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Sarımsak, biberiye, defne ve günlük ağacı ekstraktlarının birlikte kullanıldıklarında sinerjist etki göstererek antimikrobiyel etkiyi arttırabildiği, ancak bazı durumlarda ise azaltılabileceği tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Antimikrobiyel etki, bitki ekstraktı, ekstraksiyon, soğuk sıkma, maserasyon, bitki ekstraktı karışımı

### ANTIMICROBIAL EFFECTS OF PLANT EXTRACTS OBTAINED BY COLD PRESS AND COLD MACERATION METHODS ON SOME PATHOGENS

#### ABSTRACT

In this study, antimicrobial effects of plant extracts obtained by cold press or cold maceration regarding their structures on microorganisms were determined by well diffusion method. While cold pressed garlic extract showed strong antimicrobial effect with a zone diameters between  $22.00 \pm 1.73$  to  $41.00 \pm 1.00$  mm, bay extract was the lowest against *S. aureus* with  $12.67 \pm 0.58$  mm zone diameter. Besides cold pressed garlic extract showed the lowest Minimum Inhibition Concentration (MIC) levels. It can be concluded that the cold maceration extracts showed various levels of antimicrobial effect and the type of solvent employed were important factors. When HPLC analysis results were examined, it was determined that phenolics compounds are mainly responsible for the antimicrobial effect. Garlic, rosemary, bay and styrax tree extracts was found to be able to increase the antimicrobial effect by showing synergistic effects when used together, but the effect can be reduced in some cases.

**Keywords:** Antimicrobial effect, plant extract, extraction, cold press, maceration, plant extract mixture

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ korkutaylin1@gmail.com

☎ (+90) 542 208 68 88

☎ (+90) 246 211 1542

Aylin Korkut Altıntaş; ORCID no: 0000-0001-7805-8745

Hakan Kuleaşan; ORCID no: 0000-0002-0893-0689

## GİRİŞ

Bitkiler, çeşitli kullanım alanlarının yanı sıra sahip oldukları antimikrobiyel etki nedeniyle gıdaların korunmasında da kullanılabilir (Toroğlu ve Çenet, 2006; Bayramoğlu vd., 2009; Aksoy, 2010). Antimikrobiyel etkiye sahip bitkilerde, bu etkiyi sağlayan maddeler denen geniş gruba oluşturanların başında fenolik bileşenler gelmektedir (Erdoğan ve Everest, 2013). Bitkilerin sahip oldukları bu antimikrobiyel etkinin, bileşimlerinde bulunan esansiyel yağlarının içerikleri, aldehytlar, organik asitler ve fenolik bileşiklere bağlı olarak değişmekte olduğu ve çoğunluğunun patojen bakteriler başta olmak üzere mikotoksin oluşturan küfler ve mayaların gelişimini olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir (Valero ve Salmeron, 2003; Şahin, 2006). Çalışmamızda soğuk sıkma ve soğuk maserasyon

yöntemleri ile elde edilen ekstraktların, yaygın olarak rastlanan bazı patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel etkileri ve minimum inhibisyon konsantrasyonları belirlenmiştir. Çalışmada yer verilen bitki ekstraktlarının fenolik madde içerikleri ve bu ekstraktlardan bazılarının karışımlarının, patojenlere karşı antimikrobiyel etkileri belirlenmiştir.

## MATERYAL-YÖNTEM

Çalışmada kullanılan tüm bitkilere öncelikle soğuk sıkma yöntemi uygulanmış, ancak bu yöntemle ekstrakt elde edilemeyen bitkilerden soğuk maserasyon yöntemiyle ekstraktlar elde edilmiştir. Çizelge 1’de çalışmada kullanılan bitkiler ve temin edildikleri bölgeler verilmiştir.

Çizelge 1. Bitkiler ve temin edildiği bölgeler

Table 1. Plants and geographic locations

Bitki /Kullanılan Kısımlar <i>Plant/ parts used</i>	Botanik Adı <i>Botanical name</i>	Familya <i>Family</i>	Temin Edildiği Yer <i>Geographic location</i>
Günlük/Yaprak	<i>Liquidambar orientalis</i>	<i>Hamamelidaceae</i>	Muğla
Biberiye/Yaprak	<i>Rosmarinus officinalis L.</i>	<i>Labiatae</i>	Muğla
Zeytin/Yaprak	<i>Olea europaea</i>	<i>Oleaceae</i>	Muğla
Muskat cevizi	<i>Myristica</i>	<i>Myristicaceae</i>	Yerel aktardan satın alınmıştır.
Sarımsak	<i>Allium sativum</i>	<i>Alliaceae</i>	Muğla
Defne/Yaprak ve çiçek	<i>Laurus nobilis L.</i>	<i>Lauraceae</i>	Muğla
Çörek otu	<i>Nigella sativa</i>	<i>Ranunculaceae</i>	Muğla
Stevia/Yaprak	<i>Stevia rebaudiana</i>	<i>Asteraceae</i>	Mersin
Turunç/Kabuk	<i>Citrus aurantium</i>	<i>Rutaceae</i>	Muğla

## Soğuk Sıkma Yöntemi ile Bitki Ekstraktlarının Elde Edilmesi

Bitkiler, öğütülme özelliklerine göre mekanik öğütücü, havan ya da laboratuvar tipi elektrikli değirmen (IKA, Almanya) yardımıyla parçalanmış ve ince gözenekli bir bezin arasına sarılarak hazırlanan pres sisteminde 8-10 kg/cm<sup>2</sup> basınç etkisiyle ekstraktların elde edilmesi sağlanmıştır. Turunç meyvesinde farklı olarak kabukları meyve etinden soyularak ayrılmış, deneylerde sadece kabuk kısımları kullanılmıştır. Pres sistemiyle elde edilen süzöntü, içerisinde bulunan bazı partiküllerin ayrılması amacıyla 20 dakika 4000 rpm’de santrifüjlenmiş ve berrak turunç ekstraktı

elde edilmiştir. Diğer ekstraktlar ise santrifüj işlemi olmaksızın sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -18 °C’de muhafaza edilmiştir. Çalışmada elde edilen tüm ekstraktlar, antimikrobiyel aktivite denemesi için 0.45 µm çaplı steril filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

## Soğuk Maserasyon Yöntemi ile Bitki Ekstraktlarının Elde Edilmesi

Presleme yöntemiyle ekstrakt elde edilemeyen bitkilerin ekstraktları, Çopuroğlu(2013) çalışmasında kullanılan maserasyon yönteminde bazı değişiklikler yapılarak elde edilmiştir. Bitkiler, öğütücü veya değirmen yardımıyla parçalandıktan

sonra, bitkilere bitki/çözgen oranı, 1:3 (w/v) olacak şekilde çeşitli çözgenler ilave edilerek oda sıcaklığında ışık almayan bir ortamda 5-7 gün bekletilmişlerdir. Maserasyon süresinin ardından karışım kaba filtre kağıdından süzöldükten sonra, çözgenler uygun sıcaklıkta, döner evaporatör (Heidolph Laborota 4000, Almanya) cihazı yardımıyla uçurularak elde edilen saf ekstraktlar, antimikrobiyel etki denemesi için 0.45 µm çaplı steril filtreden geçirilerek steril edildikten sonra -18 °C'de muhafaza edilmiştir.

### Antimikrobiyel Etkinin Belirlenmesi

Antimikrobiyel etkinin belirlenmesinde, temel bir yöntem olan kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Tagg ve McGiven, 1971). Denemede kullanılan mikroorganizmalar (*Staphylococcus aureus* (SA), *Bacillus subtilis* (BS), *Enterococcus faecalis* (EF), klinik mikrobiyolojide nadir endokarditis etmeni bir mikroorganizma olan *Micrococcus luteus* (ML), *Listeria monocytogenes* (LM), *Salmonella* Enteritidis (SE), *Salmonella* Typhi (ST), *Klebsiella pneumoniae* (KP), *Yersinia enterocolitica* (YE), *Campylobacter jejuni* (CJ), *Escherichia coli* Tip 1 (EC1), *Escherichia coli* O157:H7 (EC2), Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Kullanılan bakteriler, Mueller Hinton Broth (Merck) besiyerine aşılansak uygun sıcaklıklarda 18 saat süresince geliştirilmişlerdir. İnkübasyon sonunda aktif kültürlerin yoğunluğu, 0.5 McFarland değerine ayarlanmıştır. Bu kültürler %1 oranında 45 °C sıcaklıkta tutulan 40 ml besiyeri içerisine inoküle edilmiş ve 15 cm çaplı petri kutularına dökülerek oda sıcaklığında katılaşmaları sağlanmıştır. Katılaştıran besiyerlerine metal delgeç ile 10 mm çaplı kuyular açılmış ve bu kuyulara 80 µL bitki ekstraktı konulmuştur. Petri kutuları, içerdikleri bakteriye uygun sıcaklıkta 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan zon çapları, kumpas yardımıyla mm olarak ölçülmüştür.

### Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MIK) Belirlenmesi

Minimum inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla Celikel ve Kavas (2008) çalışmalarında kullandığı yöntemde bazı değişiklikler yapılarak ekstraktların minimum

inhibisyon konsantrasyonları belirlenmiştir. Önceki bölümde anlatıldığı şekilde hazırlanan kuyulara konulan saf ekstrakt, %100 konsantrasyon olarak kabul edilmiş ve farklı konsantrasyonların (%75, %50, %25, %18,75 ve %12,5) antimikrobiyel etkisi kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir.

### Farklı Ekstraktların Birleşik Antimikrobiyel Etkisinin Belirlenmesi

Mikroorganizmalara karşı her bir bitki ekstraktının bireysel olarak sağladıkları antimikrobiyel etkilerin değerlendirilmesi sonrasında, yüksek antimikrobiyel etkinin belirlendiği (Zon çapı >20 mm) sarımsak (soğuk sıkma), günlük yaprağı ve biberiye maserasyon (hegzan), defne yaprağı maserasyon (metanol) ekstraktları kombinasyonlar şeklinde kullanılmıştır. Seçilen bitkisel ekstraktlar, eşit oranlarda (v/v) karıştırılarak, indikatör mikroorganizmalara karşı tekrar antimikrobiyel etkileri belirlenmiştir.

### Bitki Ekstraktlarındaki Fenolik Maddelerin Belirlenmesi

En yüksek oranda antimikrobiyel etki gösteren bitki ekstraktlarının fenolik madde içerikleri, Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi tarafından HPLC cihazı (Shimadzu, Japan) ile belirlenmiştir. Analizde, C18 (Agilent XDB-C18) kolonda 30 °C sıcaklık uygulanmış ve mobil faz olarak %3 asetik asit ve metanol karışımı kullanılmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Bitki Ekstraktlarının Mikroorganizmalar Üzerindeki Antimikrobiyel Etkisi

Çalışmada, ekstraktların çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktivitesi belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir. Elde edilen zon çaplarından 11-15 mm zon çapı zayıf antimikrobiyel etkiyi, 16-20 mm arası zon çapı orta düzey antimikrobiyel etkiyi, 20 mm üzeri zon çapı ise güçlü antimikrobiyel etkiyi belirtmektedir. Sonuçlar, CLSI antimikrobiyel test standardı (Anonymous, 2019)'na göre değerlendirilmiştir. Elde edilen zon çapları değerlendirildiğinde ekstraktların, ağırlıklı olarak

Gram pozitif bakterilere karşı daha etkili olduğu görülmüş, bu durumun Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı yapısından kaynaklandığı düşünülmüştür. Benzer sonuçlar, Salar vd., (2015)

çalışmasında da elde edilmiş olup, Gram pozitif bakterilerin antimikrobiyel etkiye karşı daha hassas oldukları sonucuna varmışlardır.

Çizelge 2. Bitki ekstraktlarının mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel etkileri  
Table 2. Antimicrobial effects of plant extracts against microorganisms

Mikroorganizma Microorganism	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>S. aureus</i>	28.67 ±0.58	0	12.67 ±0.58	31.33 ±1.15	25.67 ±1.53	25.00 ±2.00	12.33 ±1.15	20.67 ±0.58	21.33 ±1.53	0	30.33 ±2.08	25.00 ±1.00	23.33 ±1.53
<i>S. Enteritidis</i>	32.67 ±2.08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Typhi</i>	28.00 ±2.00	0	0	13.33 ±1.15	0	0	11.67 ±0.58	0	0	0	0	15.00 ±1.00	0
<i>B. subtilis</i>	32.33 ±0.58	15.33 ±1.15	0	22.67 ±0.58	11.67 ±0.58	25.33 ±1.53	0	11.67 ±0.58	0	23.33 ±1.15	23.00 ±1.00	0	12.00 ±0
<i>E. faecalis</i>	25.33 ±1.15	0	0	0	0	17.00 ±0	14.33 ±0.58	11.33 ±1.15	0	0	0	0	0
<i>M. luteus</i>	41.00 ±1.00	0	17.00 ±1.53	28.00 ±0.58	24.00 ±2.00	26.00 ±2.00	0	18.00 ±1.15	0	24.00 ±0.58	18.00 ±1.00	25.00 ±2.00	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Y. enterocolitica</i>	22.00 ±1.73	0	16.67 ±0.58	22.00 ±1.73	20.67 ±0.58	0	0	18.00 ±1.00	0	22.00 ±1.73	42.00 ±2.00	22.33 ±1.53	15.33 ±1.15
<i>C. jejuni</i>	25.67 ±0.58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12.67 ±1.15	0
<i>L. monocytogenes</i>	31.67 ±1.53	0	0	14.00 ±0	13.33 ±0.58	0	0	0	0	0	0	0	12.67 ±0.58
<i>E. coli</i> Tip 1	31.33 ±1.15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> O157:H7	33.67 ±2.08	0	0	14.67 ±1.53	14.00 ±2.00	26.33 ±0.58	0	17.33 ±1.15	0	0	0	18.67 ±0.58	0

Ekstraktlar, 1: Sarımsak (soğuk sıkma), 2: Turunç kabuğu (soğuk sıkma), 3: Defne yaprağı (soğuk sıkma), 4: Defne yaprağı (metanol), 5: Defne çiçeği (metanol), 6: Biberiye yaprağı (hegzan), 7: Muskat cevizi (aseton), 8: Muskat cevizi (metanol), 9: Stevia yaprağı (hegzan), 10: Stevia yaprağı (metanol), 11: Çörek otu (hegzan), 12: Günlük yaprağı (hegzan), 13: Zeytin yaprağı (metanol)

Çalışmada kullanılan bitkilerin hepsine soğuk sıkma yöntemi uygulanmış, sadece sarımsak, defne, biberiye, turunç kabuğu ve zeytin yaprağından soğuk sıkma yöntemi ile ekstrakt elde edilebilmiştir. Presleme yöntemi ile elde edilen sarımsak ekstraktı, patojenlere karşı yüksek oranda ( $22,00 \pm 1,73 - 41,00 \pm 1,00$  mm) antimikrobiyel etki gösterirken, en yüksek antimikrobiyel etkiyi ( $41,00 \pm 1,00$  mm) ise klinik mikrobiyolojide nadir endokarditis etmeni olan *M. luteus*'a karşı göstermiştir. Aynı ekstrakt, *K. pneumoniae*'e karşı herhangi bir antimikrobiyel etki göstermemiştir. Sarımsak ekstraktının farklı yöntemler kullanılarak elde edildiği çalışmalarda (Abdou vd., 1972; Kıvanç ve Kunduhoğlu, 1997; Ahmad ve Beg, 2001; Nazir ve Latif, 2012), *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* ve *S. typhi* üzerinde çalışmamıza göre daha düşük antimikrobiyel etki tespit edilmiştir. Bu farklılığın, soğuk sıkma yönteminde etken

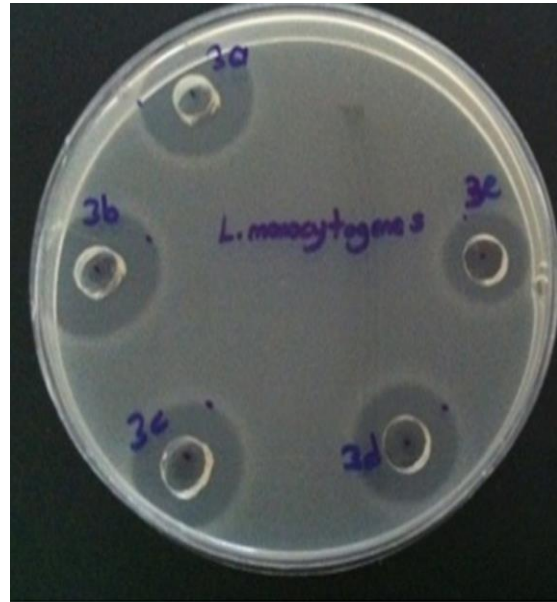
maddelere daha az zarar verilmesinden ve/veya presleme öncesi uygulanan yoğun parçalama işleminden kaynaklandığı düşünülmüştür. Benzer şekilde soğuk sıkma yöntemi ile elde edilen turunç kabuğu ve defne ekstraktları ise sarımsak ekstraktına kıyasla daha düşük antimikrobiyel etki göstermişlerdir. Çalışmamızda metanol ile elde edilen zeytin yaprağı ekstraktı, en yüksek antimikrobiyel etkiyi, *S. aureus*'a karşı ( $23,33 \pm 1,53$  mm) gösterirken, biberiye (hegzan) ekstraktı ise *M. luteus* ( $26,00 \pm 2,00$  mm) ve *E. coli* O157:H7'ye ( $26,00 \pm 0,58$  mm) karşı daha yüksek bir etki göstermiştir. Zeytin yapraklarında bulunan fenolik bileşiklerin, antimikrobiyel etkiden sorumlu oldukları ve kullanılan çözügene bağlı olarak mikroorganizmalar üzerinde farklı düzeylerde antimikrobiyel etki gösterdikleri çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (Markin vd., 2003; Pereira vd., 2007; Gülcü ve Demirci, 2008;

Sudjana vd., 2009; Yıldız ve Ulaşer, 2011; Salar, 2015). Biberiye yaprağından soğuk sıkma dışındaki yöntemler kullanılarak elde edilen ekstraktların, antimikrobiyel etkisinin incelendiği çalışmalarda (Erdogru, 2002; Sağdıç ve Özcan, 2003; Abu-Shanab vd., 2004 ; Dülger ve Gonuz, 2004; Oskay ve Sarı, 2007; Aydın, 2008; Uçar vd., 2015), *E. faecalis*, *S. aureus*, *M. luteus*, ve *B. subtilis*'e karşı mevcut çalışmamıza kıyasla daha düşük antimikrobiyel etki tespit edilmiştir. Günlük yaprağının antimikrobiyel etkisinin incelendiği çalışmalara (Oskay ve Sarı, 2007; Aydın, 2008; Okmen vd., 2014) kıyasla günlük yaprağı (hegzan) ekstraktı, *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *M. luteus*'a karşı daha güçlü bir antimikrobiyel etki göstermiştir. Çalışmamızda maserasyon yöntemi ile elde edilen ekstraktlar arasında, *C. jejuni*'ye karşı tek antimikrobiyel etkiye sahip olan ekstrakt bu olmuştur. Çözgen olarak metanolün kullanıldığı defne yaprağı ekstraktının, soğuk sıkma yöntemi ile elde edilen ekstraktlara kıyasla antimikrobiyel etki açısından daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Defne bitkisinde metanol ile elde edilen ekstraktlardan yaprak ekstraktı, çiçek ekstraktına göre daha yüksek antimikrobiyel etki göstermiştir. Çalışmamıza kıyasla bazı mikroorganizmalar üzerinde daha düşük bir antimikrobiyel etkinin elde edildiği çalışmalarda (Sağdıç vd., 2002; Sağdıç vd., 2003; Celikel ve Kavas, 2008; Al-Hussaini ve Mahasneh, 2009), kullanılan çözgenin tek başına etkili olmadığı, uygulanan yöntemin de farklılık sağladığı sonucuna varılmıştır. Gupta vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, muskat cevizi (metanol) ekstraktı, *S. aureus*'a karşı antimikrobiyel aktivite göstermezken, yaptığımız çalışmada tersi şekilde muskat cevizinden metanol ile elde edilen ekstraktı, orta düzeyde ( $20,67 \pm 0,58$  mm) etki göstermiş olup aynı bitkinin aseton ekstraktı ise metanol ekstraktına kıyasla daha zayıf bir etki göstermiştir. Çörek otu-hegzan ekstraktı, en yüksek antimikrobiyel etkiyi *Y. enterocolitica*'ya karşı ( $42,00 \pm 2,00$  mm) göstermiştir. Çörek otundan farklı yöntemler ile elde edilen ekstraktların incelendiği çeşitli çalışmalarda ise *Y. enterocolitica*'ya karşı daha düşük bir antimikrobiyel etki tespit edilmiştir (Hanafy ve Hatem., 1991; Ahmad ve Beg, 2001; Dulger ve Gonuz., 2004; Arici vd., 2005). Stevia bitkisi ekstraktları incelendiğinde, metanolün hegzana göre daha etkili olduğu

belirlenmiştir. Benzer çalışmalar ile karşılaştırıldığında (Tadhani ve Subash, 2006; Debnath, 2008; Ghosh vd., 2008; Muanda vd., 2010; Uçar vd., 2015), *B. subtilis*, *S. aureus* ve *E. faecalis*, *M. luteus*'a karşı daha düşük veya daha yüksek antimikrobiyel etkiler tespit edilmiştir.

#### Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları

Bitki ekstraktlarının antimikrobiyel etki denemesi sonucunda, 20 mm ve üzeri zon veren bitki ekstraktları için seyreltilmiş dozlardaki inhibisyon etkileri belirlenmiştir. Seyreltilmiş ekstraktlara ait sonuçlar incelendiğinde, en düşük konsantrasyonlarda etki gösteren ekstraktın soğuk sıkma ile elde edilen sarımsak ekstraktı olduğu (%12.5-%25) ve konsantrasyonunun azalmasıyla birlikte zon çaplarının belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir. Çizelge 3'te ekstraktların azaltılmış konsantrasyonlardaki inhibisyon etkileri gösterilmektedir. Şekil 1'de örnek olarak seçilen farklı konsantrasyonlardaki sarımsak ekstraktının, *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel etkisi verilmiştir.



Şekil 1. Farklı konsantrasyonlardaki soğuk sıkma sarımsak ekstraktının *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyel etkisi

Figure 1. Antimicrobial effect of cold pressed garlic extract at different concentrations against *L. monocytogenes*

Minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIK) incelendiğinde, en düşük inhibisyon konsantrasyonlarının sarımsak ekstraktında olduğu belirlenmiştir. En yüksek MIK değerini ise (%50), *S. aureus*'a karşı muskat cevizi maserasyon (metanol) ekstraktının verdiği dikkati çekmektedir. Farklı bitkiler kıyaslandığında sarımsak ekstraktının % 12.5 minimum inhibisyon konsantrasyonunda etkili olabildiği gözlenirken, defne ekstraktlarının ancak %25 seyreltilmiş konsantrasyonlarda inhibisyon etkisi

gösterebildiği belirlenmiştir. MIK değerleri açısından en zayıf etkiye, muskat cevizi metanol ekstraktının sahip olduğu gözlenmiştir. Esansiyel yağların ve ekstraktların minimum inhibisyon konsantrasyonlarının incelendiği çalışmalar (Pereira vd., 2007; Celikel ve Kavas, 2008; Sudjana vd., 2009; Ekren vd., 2013) değerlendirildiğinde, mikroorganizmaya ve ekstraksiyonda kullanılan yöntemle bağlı olarak MIK değerlerinin farklılık gösterebildiği belirlenmiştir.

Çizelge 3. Bitki ekstraktlarının minimum inhibisyon konsantrasyonları (%) ve zon çapları (mm) (delgeç çapı dâhil)

Table 3. Minimum inhibition concentrations of plant extracts (%) and zone diameters (mm) (with puncher diameter)

Mikroorganizma <i>Microorganism</i>	Bitki Ekstraktı/ Yöntem <i>Plant extract/ Method</i>	Minimum İnhibisyon
		Konsantrasyonu(%) /zon çapları (mm) <i>Minimum inhibition concentration(%) / zone diameters (mm)</i>
<i>B. subtilis</i>	Sarımsak / Soğuk sıkma	12.5 / 14
	Biberiye / Maserasyon (Hegzan)	25 / 18
	Defne çiçek / Maserasyon (Metanol)	25 / 16
	Stevia / Maserasyon (Hegzan)	25 / 16
	Çörek otu / Maserasyon (Hegzan)	18.75 / 20
<i>S. Enteritidis</i>	Sarımsak / Soğuk sıkma	12.5 / 20
<i>S. Typhi</i>	Sarımsak / Soğuk sıkma	12.5 / 18
<i>L. monocytogenes</i>	Sarımsak / Soğuk sıkma	12.5 / 14
	<i>E. faecalis</i>	Sarımsak / Soğuk sıkma
<i>Y. enterocolitica</i>	Biberiye / Maserasyon (Hegzan)	25 / 14
	Sarımsak / Soğuk sıkma	12.5 / 12
	Defne çiçek / Maserasyon (Metanol)	25 / 14
	Çörek otu / Maserasyon (Hegzan)	25 / 18
	Günlük / Maserasyon (Hegzan)	25 / 14
<i>S. aureus</i>	Defne / Maserasyon (Metanol)	25 / 14
	Sarımsak / Soğuk sıkma	12.5 / 20
	Biberiye / Maserasyon (Hegzan)	25 / 18
	Stevia / Maserasyon (Hegzan)	25 / 12
	Çörek otu / Maserasyon (Hegzan)	18.75 / 24
	Günlük / Maserasyon (Hegzan)	25 / 18
	Defne / Maserasyon (Metanol)	18.75 / 22
	Muskat cevizi / Maserasyon (Metanol)	50 / 16
	Defne çiçek / Maserasyon (Metanol)	25 / 20
<i>E. coli</i>	Sarımsak / Soğuk sıkma	18.75 / 16
O 157:H7	Biberiye / Maserasyon (Hegzan)	18.75 / 20
<i>C. jejuni</i>	Sarımsak / Soğuk sıkma	25 / 12
<i>M. luteus</i>	Sarımsak / Soğuk sıkma	25 / 26
	Defne / Maserasyon (Metanol)	25 / 18
	Stevia / Maserasyon (Metanol)	25 / 12
	Defne çiçek / Maserasyon (Metanol)	25 / 18
	Biberiye / Maserasyon (Hegzan)	25 / 18
	Günlük / Maserasyon (Hegzan)	25 / 14

**Ekstrakt Karışımlarının Antimikrobiyel Etkisi**

Çalışmada elde edilen çeşitli ekstraktlardan, bireysel olarak en yüksek etki gösteren ekstraktların farklı kombinasyonları oluşturulmuş ve antimikrobiyel etkileri belirlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, mikroorganizmaya bağlı olarak, karışımların sinerjik etki gösterdiği, bazı durumlarda ise antimikrobiyel etki gösteren bitki

ekstraktlarının birlikte kullanımının antimikrobiyel etkiyi ortadan kaldırdığı görülmüştür. Uçucu yağ bileşenlerinin karışım halinde kullanımının antimikrobiyel etkiyi arttırdığı yapılan çalışmalarda (Cerit, 2008; Lee ve Lee, 2010) belirtilmiştir. Çizelge 4'te bitki ekstrakt kombinasyonlarının mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel etki denemesi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4. Bitki ekstrakt karışımlarının antimikrobiyel etkisi

Table 4. Antimicrobial effect of plant extract combinations

Karışımlar/ Combinations	SE	ST	CJ	SA	ML	BS	LM	EF	YE	EC2	EC1
S+B	24	24	18	30	30	22	24	22	34	22	24
S+D	24	22	12	32	30	22	26	16	20	22	24
S+B+D	22	18	24	24	28	20	20	22	24	20	20
B+D	0	0	24	30	24	20	0	0	24	18	0
G+B	0	0	20	24	20	18	0	14	18	22	0
G+D	0	0	18	24	24	18	11	16	20	12	0
G+B+D	0	0	20	28	22	20	0	12	16	16	0

S: Sarımsak soğuk sıkma, D: Defne ekstraktı, B: Biberiye ekstraktı, G: Günlük ekstraktı

**Bitki Ekstraktlarındaki Fenolik Maddeler**

Bitki ekstraktlarındaki fenolik madde analiz sonuçlarına göre, sarımsak ekstraktında gallik asit, defne soğuk maserasyon (metanol) ekstraktında başta rutin olmak üzere fenolik maddeler tespit edilmiş olup, bu maddelerin antimikrobiyel

etkiden sorumlu oldukları yapılan çalışmalarda da (Pereira vd., 2007; Sudjana vd., 2009., Muanda vd., 2011) belirtilmiştir. Çizelge 5'te bazı bitki ekstraktlarındaki fenolik maddeler verilmiştir.

Çizelge 5. Bitki ekstraktlarındaki fenolik maddeler ve konsantrasyonları (mg/kg)

Table 5. Phenolic substances and their concentrations in plant extracts (mg/kg)

Bitki Ekstraktı Plant extract	Fenolik Maddeler ve Konsantrasyonları (ppm) Phenolic compounds and concentrations (ppm)
Sarımsak (soğuk sıkma)	Gallik asit (144.7 ppm)
Muskat cevizi (metanol)	Siringik asit ( 25.7 ppm), Vanilin (21.3 ppm), p-kumarik asit (3.0 ppm), Ferulik asit (14.1 ppm), Sınnamik asit ( 10.6 ppm)
Çörek otu (hegzan)	Gallik asit, Luteolin (13.8 ppm), Apigenin (3.0 ppm), Karvakrol (195.3 ppm)
Stevia (metanol)	Gallik asit ( 23.8 ppm), Protokateşik asit ( 352.6 ppm), Rosmarinik asit (623.4 ppm), Karvakrol (94.9 ppm)
Günlük yaprağı (hegzan)	Gallik asit ( 222.2 ppm), Protokateşik asit ( 27.3 ppm), Vanilin (3.3 ppm)
Biberiye yaprağı (hegzan)	Siringik asit ( 0.2 ppm), Karvakrol ( 44.3 ppm)
Defne yaprağı (metanol)	Rutin ( 455.8 ppm), Ferulik asit (210.7 ppm), Kafeik asit (239.1 ppm), Luteolin (44.1 ppm)
Defne çiçek (metanol)	Rutin (2447.0 ppm), Ferulik asit (85.5 ppm), Kafeik asit (294.9 ppm), Karvakrol (104.3 ppm)
Turunç kabuğu (soğuk sıkma)	Rutin ( 35.9 ppm), Eriodiktiol (1.8 ppm)
Zeytin yaprağı (metanol)	Oleuropein (2426.3 ppm), Hidroksitirozol (524.1 ppm), Apigenin (218.4 ppm), Kuarsetin (145.7 ppm), Luteolin (92.4 ppm)

## SONUÇ

Bitkilerde bulunan pek çok aktif bileşenin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan ve ekstraksiyon ortamına ısı verilmesini gerektiren geleneksel damıtma ve ekstraksiyon yöntemleri, sıcaklık artışlarında kararsız yapıdaki bileşiklerin kaybına sebep olabilmektedir (Büyüktuncel, 2012; Yaman ve Kuleaşan, 2016). Benzer bulgular yapılan farklı araştırmalarda bildirilmiştir (Dülger ve Gönüz, 2004; Sağdıç ve Özcan, 2003; Benkeblia vd., 2014; Belguith vd., 2010). Söz konusu araştırmalarda, hidrodistilasyon ve sokslet gibi ısı işlem uygulanarak elde edilen ekstraktların antimikrobiyel etki yeteneklerinin, ısı işlem uygulanmadan elde edilen ekstraktlara kıyasla daha düşük sonuçlar verdiği görülmüştür. Isı işlemin bitkilerdeki etken maddelere zarar verebildiği (Kaya ve Ergönül, 2015; Siger vd., 2008), ayrıca uçucu bileşenlerin uzaklaşabileceği, bu nedenle sıcaklık ve kimyasal uygulama içermeyen ve uçucu olan bileşenlerin kaybolmamasını sağlayan soğuk sıkma yönteminin, ekstrakt elde edilebilen bitkiler için daha avantajlı olabileceği düşünülmüştür.

Biberiye, defne gibi bitki ekstraktlarının karışım halinde uygulanmasının antimikrobiyel etkiyi arttırılabildiği belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, bazı bitki ekstraktlarının karışım halinde kullanılması durumunda antimikrobiyel etkinin azalmasının sebebi olarak, karışım halinde uygulandıklarında bireysel kullanım durumlarındaki MIK değerlerinin altındaki değerlere düşmüş olması ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca bitki ekstrakt karışımlarındaki etken bileşenlerin, birbirleriyle biyokimyasal etkileşime girerek yapılarının değişmesi ve ekstraktların birbirlerinin pH'sını değiştirebilecekleri, dolayısıyla mikroorganizmalar üzerinde bireysel kullanımına göre bazı durumlarda antimikrobiyel etkilerinin azalabileceği düşünülmektedir.

Soğuk ekstraksiyon uygulamaları incelendiğinde, kullanılan çözgenin çeşitinin de antimikrobiyel etki üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bitkilerdeki hedef etken maddelerin polarite (polar, apolar) özelliklerine göre, yöntemlerde kullanılan çözgenlerin polaritelerinin uygun

olmasının, ekstraksiyonda bu maddelerin eldesi ve dolayısıyla antimikrobiyel etkinin eldesinde önemli bir kriter olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No: 4441-YLI-15) tarafından desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

Abdou, I. A., Abou-Zeid, A. A., El-Sherbeeney, M. R., Abou-El-Gheat, Z. H. (1972). Antimicrobial activities of *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Raphanus sativus*, *Capsicum frutescens*, *Eruca sativa*, *Allium kurrat* on bacteria. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles*, 22(1), 29-35.

Abu-Shanab, B., Adwan, G. M., Abu-Safiya, D., Jarrar, N., Adwan, K. (2004). Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Utilized in Popular Medicine in Palestine. *Turk J Biol*, 28(2-4), 99-102.

Ahmad, I., Beg, A. Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J ethnopharmacol*, 74(2), 113-123.

Aksoy, A. (2010). Bazı bitki ekstraktlarının kanatlı etlerinin raf ömrü üzerine etkisinin araştırılması. Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Ana bilim Dalı Doktora tezi, Kars, Türkiye, 161 s.

Al-Hussaini, R., Mahasneh, A. (2009). Microbial growth and quorum sensing antagonist activities of herbal plants extracts. *Molecules*, 14(9), 3425-3435, doi:10.3390/molecules14093425

Anonymous, (2019). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute M100. Wayne, USA.

Arici, M., Sagdic, O., Gecgel, U. (2005). Antibacterial effect of Turkish black cumin (*Nigella sativa* L.) oils. *Grasas Aceites*, 56(4), 259-262.

Aydın, B. D. (2008). Bazı tıbbi bitki ve baharatların gıda patojenleri üzerine antibakteriyel etkisinin araştırılması. Kafkas Üniversitesi



- Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 14(1), 83-87, doi:10.9775/kvfd.2008.11-A
- Bayramoğlu, M. M., Toksoy, D., Şen, G. (2009). Türkiye’de Tıbbi Bitki Ticareti.2.Ormancılıkta Sosyo-ekonomik Sorunlar Kongresi,19-21 Şubat 2009, Isparta, Türkiye, 89-98.
- Belguith, H., Kthiri, F., Chati, A., Sofah, A. A., Hamida, J. B., Ladoulsi, A. (2010). Inhibitory effect of aqueous garlic extract (*Allium sativum*) on some isolated *Salmonella* serovars. *Afr J Microbiol Res*, 4(5), 328-338.
- Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT-Food Sci Techno*, 37(2), 263-268.
- Büyüktünel, E. (2012). Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri I. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 32(2), 209-242.
- Celikel, N., Kavas, G. (2008). Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech J Food Sci-UZPI (Czech Republic)*, 26 (3), 174-181.
- Cerit, L. S. (2008). Bazı baharat uçucu yağlarının antimikrobiyel özellikleri, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Denizli, Türkiye, 45 s.
- Çopuroğlu, Ö. (2013). Niğde yöresindeki bazı endemik bitki türlerinin antimikrobiyel aktiviteleri. Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Niğde, Türkiye, 67 s.
- Debnath, M. (2008). Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *J Med Plants Res*, 2(2), 45-51.
- Dulger, B.,Gonuz, A. (2004). Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. *Asian J Plant Sci*, 3(1), 104-107.
- Ekren, S., Yerlikaya, O., Tokul, H. E., Akpınar, A., Accedil, M. (2013). Chemical composition, antimicrobial activity and antioxidant capacity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Afr J Microbiol Res*, 7(5), 383-388, doi:10.5897/AJMR12.1765.
- Erdoğan, A. E., Everest, A. (2013). Antimikrobiyel ajan olarak bitki bileşenleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (2), 27-32.
- Erdogru, Ö. T. (2002). Antibacterial activities of some plant extracts used in folk medicine. *Pharm Biol*, 40(4), 269-273.
- Ghosh, S., Subudhi, E., Nayak, S. (2008). Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extracts against 10 pathogens. *Int J Integr Biol*, 2(1), 1-5.
- Gupta, A. D., Bansal, V. K., Babu, V., Maithil, N. (2013). Chemistry, antioxidant and antimicrobial potential of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.). *J Genet Eng and Biotechnol*, 11(1), 25-31.
- Gülcü, M., Demirci, A. Ş. (2008). Zeytin ve Yaprağındaki Biyoaktif Bileşenler ve Sağlık Üzerine Etkileri. 1.Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi, 17-18 Mayıs 2008 / Edremit-Balıkesir, Türkiye, 198 s.
- Hanafy, M. S. M., Hatem, M. E. (1991). Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *J ethnopharmacol*, 34(2-3), 275-278.
- Kaya, D., Ergönül, P. G. (2015). Uçucu Yağları Elde Etme Yöntemleri. *Gıda/The J Food*, 40(5), 1-8, doi: 10.15237/gida.GD15014
- Kıvanç, M., Kunduhoglu, B. (1997). Antimicrobial Activity of Fresh Plant Juice on The Growth of Bacteria and Yeasts. *J Qafqaz University*, 1(1), 27-35.
- Lee, O. H., Lee, B. Y. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresour Technol*, 101(10), 3751-3754.
- Markin, D., Duek, L., Berdicevsky, I. (2003). In Vitro Antimicrobial Activity of Olive Leaves. *Mycoses*, 46:132-136.
- Muanda, F. N., Soulimani, R., Diop, B., Dicko, A. (2011). Study on Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil and Extracts From *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaves. *LWT-Food Sci Technol*, 44(9), 1865-1872.

- Nazir, S., Latif, Z. (2012). Screening of Natural Extracts for Their Antibacterial Activity Against Different Enteric Pathogens Isolated From Soil, Water and Rotten Fruit Samples. *Afr J Biotechnol*, 11(73), 13814-13820, doi: 10.5897/AJMR12.2249
- Oskay, M., Sarı, D. (2007). Antimicrobial Screening of Some Turkish Medicinal Plants. *Pharm Biol*, 45(3), 176-181.
- Okmen, G., Turkcan, O., Ceylan, O., Gork, G. (2014). The Antimicrobial Activity of *Aliquidambar orientalis* mill. Against Food Pathogens and Antioxidant Capacity of Leaf Extracts. *Afr J Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(5), 28-32.
- Pereira, A., Ferreira, I., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Mol*, 12(5), 1153-1162.
- Sağdıç, O., Kuşçu, A., Özcan, M., Özçelik, S. (2002). Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157: H7. *Food Microbiol*, 19(5), 473-480, doi:10.1006/yfmic.494.
- Sağdıç, O., Karahan, A. G., Ozcan, M., Ozkan, G. (2003). Note: effect of some spice extracts on bacterial inhibition. *Food Sci Technol Int*, 9(5), 353-358.
- Sağdıç, O., Özcan, M. (2003). Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control*, 14(3), 141-143.
- Salar, M. O., Yardımcı, H., Diker, K. S. (2015). Bazı endüstriyel bitkilerin *Salmonella* Serotipleri üzerindeki antimikrobiyel etkileri. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 86(2), 9-18.
- Siger, A., Nogala-Kalucka, M., Lampart-Szczapa, E. (2008). The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *J Food Lipids*, 15(2), 137-149.
- Sudjana, A. N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Riley, T.V., Hammer, K. A. (2009). Antimicrobial Activity of Commercial *Olea europaea* (olive) Leaf Extract. *Int J Antimicrob Agents*, 33(5), 461-463.
- Şahin, E. (2006). Bitkisel Kaynaklı Antimikrobiyellerin Gıda Kaynaklı Bazı Patojen Mikroorganizmalar Üzerinde Etkileri. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 57s, İstanbul.
- Tadhani, M. B., Subhash, R. (2006). In Vitro Antimicrobial Activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaves. *Trop J Pharm Res*, 5(1), 557-560.
- Tagg, J., McGiven, A. R. (1971). Assay System for Bacteriocins. *Appl Microbiol*, 21(5), 943.
- Toroğlu, S., Çenet, M. (2006). Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyel Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(2), 12-19.
- Uçar, E., Odabaş Köse, E., Özyiğit, Y., Turgut, K. (2015). Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitkilerde Esansiyel Yağların Antimikrobiyel Aktivitelerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Dergisi, 10(2), 118-124.
- Valero, M. and Salmeron, M.C. (2003). Antibacterial Activity of 11 Essential Oils Against *Bacillus cereus* in Tyndallized Carrot Broth. *Int J Food Microbiol*, 85, 73-81.
- Yaman, T., Kuleaşan, Ş. (2016). Uçucu Yağ Elde Etmede Gelişmiş Ekstraksiyon Yöntemleri. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, (1), 78-83.
- Yıldız, G., Uylaşer, V. (2011). Doğal Bir Antimikrobiyel: Oleuropein. Uludağ Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Dergisi, 25(1).