

Evaluation of Antibacterial Activities of *Taraxacum farinosum* Hausskn. Et Bornm and *Taraxacum mirabile* Wagenitz Extracts

Rustem Duman (Corresponding author)
Selcuk University, Faculty of Science, Department of Biology, Konya, Turkey
E-mail: rduman@selcuk.edu.tr

Nazife Eksinar Uysal
Selcuk University, Faculty of Science, Department of Biology, Konya, Turkey
E-mail: nazzz-19@hotmail.com

Mustafa Onur Aladag
Selcuk University, Vocational School of Health Services,
Department of Medicinal Laboratory, Konya, Turkey
E-mail: moaladag@selcuk.edu.tr

This work was financially supported by the Selcuk University Scientific Research Projects Coordinator ship (Project number: 10201009). This article has also been extracted from MS thesis of Nazife Eksinar Uysal.

Abstract

In this study, antimicrobial activities of endemic *Taraxacum farinosum* Hausskn. Et Bornm. and *Taraxacum mirabile* Wagenitz species belonging to genus *Taraxacum* used as medicinal plant were investigated. Chloroform, acetone and methanol extracts of plants were tested against eight bacteria strains at 25 mg/ml dose level in experiments. Disc diffusion and broth microdilution methods were performed both for two species. In experiments commercial gentamicin (10 µg/disc) and ampicillin (10 µg/disc) discs and gentamicin solution at a concentration of 10 mg/ml were used as positive control. Dimethyl sulfoxide: Phosphate Buffered Saline (DMSO:PBS; 1:1) solution were employed as negative control. In disc diffusion method it has been determined that only chloroform and acetone extracts of *Taraxacum mirabile* have a weak antibacterial activity (eight mm inhibition zone) against *Staphylococcus aureus* (MSSA) ATCC 25923, but the same activity couldn't be determined by broth microdilution method. As a result it has been concluded that none of the extracts of *Taraxacum farinosum* and *Taraxacum mirabile* have no potential antibacterial activity against bacteria strains tested.

Keywords: Antibacterial activity, Disc diffusion, Broth microdilution, *Taraxacum farinosum*, *Taraxacum mirabile*.

Taraxacum farinosum Hausskn. Et Bornm. ve *Taraxacum mirabile* Wagenitz Ekstraktlarının Antibakteriyel Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Özet

Bu çalışmada, tıbbi bitkiler olarak kullanılan *Taraxacum* cinsine ait endemik *Taraxacum farinosum* Hausskn. Et Bornm. ve *Taraxacum mirabile* Wagenitz türlerinin antimikrobiyal aktiviteleri araştırıldı.

Deneyleerde, bitkilerin kloroform, aseton ve metanol ekstraktları 25 mg/ml doz seviyesinde sekiz bakteri suşuna karşı test edildi. Her iki tür için disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon metotları uygulandı. Deneyleerde pozitif kontrol olarak ticari gentamisin (10 µg/disk) ve ampisilin (10 µg/disk) diskleri ve 10 mg/ml konsantrasyondaki gentamisin solüsyonu kullanıldı. Dimetil sülfoksit:Fosfat tamponlu tuz (DMSO:PBS; 1:1) solüsyonu negatif kontrol olarak kullanıldı. Disk difüzyon yönteminde, sadece *Taraxacum mirabile*'in kloroform ve aseton ekstraktlarının *Staphylococcus aureus* (MSSA) ATCC 25923'a karşı zayıf bir antibakteriyel aktiviteye (sekizer mm inhibisyon zonu ile) sahip olduğu belirlenmiş, ancak aynı etkinlik sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile tespit edilememiştir. Sonuç olarak, *Taraxacum farinosum* ve *Taraxacum mirabile* ekstraktlarının hiçbirinin test edilen bakteri suşlarına karşı potansiyel bir antibakteriyel aktiviteye sahip olmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyel aktivite, Disk difüzyon, Sıvı mikrodilüsyon, *Taraxacum farinosum*, *Taraxacum mirabile*

1.Giriş

Dünya üzerinde yaklaşık 500,000 bitki türü olduğu tahmin edilmektedir (Borris, 1996). Göreceli olarak bunların çok küçük bir yüzdesi (%1-10) hem insan hem de diğer hayvan türleri tarafından yiyecek olarak kullanılmaktadır. Daha fazlasının da ilaç olarak kullanılması olasıdır (Moerman, 1996). Tedavi maksadıyla kullanılan bitkilerin miktarı antik çağdan beri devamlı bir artış göstermektedir. Mezopotamya uygarlığı döneminde kullanılan bitkisel drog miktarının 250 civarında olduğu, Grekler döneminde ise 600 kadar bitkinin tanındığı bildirilmiştir. Arap-Fars uygarlığı döneminde bu miktar 4,000 civarına kadar yükselmiştir. 19. yüzyılın başlarında ise bilinen tıbbi bitki miktarı 13,000 sayısına erişmiştir (Baytop, 1999).

Modern bilimlerin gelişmesiyle birlikte biyoloji, kimya, farmakoloji, toksikoloji gibi disiplinlerin kombine çalışmasıyla halk ilacı olarak kullanılan birçok bitkinin, yapısında bulunan doğal bileşiklerin, fitokimyasal yapıları aydınlatılmakta ve biyolojik aktiviteleri saptanabilmektedir (Tadeg ve ark., 2005). Ayrıca tedavi alanında son yıllarda bitkilere olan ilginin artmasıyla alternatif tedavi arayışları, enfeksiyon etkenlerine karşı antimikrobiyal etki gösteren bitki ekstraktlarının destek tedavi amacı ile kullanımının yaygınlaşması, bitkilerin daha fazla araştırılmasına neden olmuştur (Nakipoğlu ve Otan, 1992).

Dünya Sağlık Örgütü, dünya nüfusunun %60'ının sentetik ilaçları hiç kullanmadığını, 3/4'nün ise kendi geleneksel kültürlerindeki bitkisel kaynaklı olan ilaçlara güvendiğini ve bunları kullandığını saptamıştır. Amerika'da halen ticari olarak bitkilerden ekstre edilen ilaçların %75'i etnobotanik bilgiler sonucunda elde edilmiştir. Yine Amerika'da reçetelenmemiş ilaçların %25'i doğal ürünler iken, %25'i de doğal ürünlerden hareketle türetilen maddelerden oluşmaktadır (Çubukçu ve ark., 2002).

Türkiye değişik iklim ve ortam koşullarına sahip olması ve üç floristik bölgenin birleştiği bir kesimde bulunması nedeniyle, bitki türü bakımından Avrupa ülkelerinden daha zengindir. Tür sayısı yaklaşık olarak 11,000 civarındadır (Güner ve ark., 2000). Türk halkı, çoğunluğunun kırsal bölgelerde yaşaması nedeniyle yabani bitkiler ile yakından ilgilidir. Halk, yabani bitkilerin bir bölümünden gıda, baharat, boyar madde veya ilaç olarak yararlanmaktadır. Anadolu'da halkın yabani bitkileri ilaç olarak kullanımı eskilere uzanır. Tıbbi bitkilerle tedavi bir kültür ve gelenek varlığına dayanmaktadır. Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi, Türkiye'de de tıbbi açıdan önemli olan bitkiler halk arasında hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmasına rağmen bunlardan yeterince yararlanılmamaktadır (Baytop, 1999).

Taraxacum cinsi, *Asteraceae* familyasına ait Cichorioideae alt familyasından Lactuceae tribinin bir üyesidir. Kuzey yarım kürenin sıcak bölgelerinde geniş yayılış göstermektedir. *Taraxacum* (Compositae= Asteraceae) cinsinin ülkemizdeki toplam tür sayısı 49, takson sayısı ise 54'tür. Bu çok yıllık yabani ot, antik çağlardan bu yana tedavi edici özellikleri ile disepsi, mide ekşimesi, dalak ve karaciğer şikayetlerinde, hepatit ve anoraksi gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmasıyla bilinmektedir. Bununla birlikte bu bitkinin kullanımı genel olarak deneyimlere dayanmaktadır. Yapılan bazı çalışmalar ve kimyasal yapısının ortaya konması bu cinsin tıbbi bir bitki olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Schütz ve ark., 2006).

Bu çalışmada, halk hekimliğinde kullanımları ve fitokimyasal özellikleriyle ilgili önceden herhangi bir bilgiye rastlanılmayan ve Türkiye'de endemik türlerden olan *Taraxacum farinosum* Hausskn. Et Bornm. ve *Taraxacum mirabile* Wagenitz'den elde edilen kaba ekstraktların bazı Gram pozitif ve Gram negatif bakteri türlerine karşı antibakteriyel aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle, yapılan bu çalışma, yukarıda bahsedilen iki bitki türünün antibakteriyel aktivitesi üzerine ilk araştırma olarak düşünülebilir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitki Örnekleri ve Ekstraktların Hazırlanması

Araştırmada kullanılan bitki örneklerinden *Taraxacum farinosum* Hausskn. Et Bornm. Konya ili, Cihanbeyli ilçesi, Tersakan Gölü mevkiinin batı kesimlerinden; *Taraxacum mirabile* Wagenitz Aksaray ili, Eskişehir ilçesi kuzey kesimi, Küngönü mevkiinden, bitkilerin çiçekli döneminde toplandı. Bitkilerin teşhisi Doç. Dr. Evren YILDIZ TUGAY (S. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) tarafından yapıldı. Araziden toplanan bitkiler temizlenerek gölgede kurutuldu. Gölgede kurutulmuş bitki örneklerinin toprak üstü ve altı kısımları (kök, yaprak, çiçek) mekanik bir öğütücünün yardımıyla öğütüldükten sonra ekstraksiyon işlemi soxhlet cihazında yapıldı. Toz halindeki örnekler (20 g), 250 ml kloroform çözgeninin kullanıldığı soxhlet cihazında 50°C'de 8 saat süreyle ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Ekstraksiyon fazının eldesinden sonra, örneklerin kurutulmasını takiben diğer çözgenlerle (aseton ve metanol) ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen ekstraktlar Whatman No:1 filtre kağıdından geçirilerek filtre edildi ve daha sonra da indirgenmiş basınç altında 35°C'de rotary evaporatörde evapore edildi (5-10 ml hacime kadar). Ardından bu ekstraktlar liyofilizatör (Edwards Modulyo 4K Freezer) cihazında liyofilize edildi (Kaufman ve ark., 1995). Bu işlemin ardından küçük porsiyonlar halinde -20°C'de derin dondurucuda saklandı. Ekstraktlar antimikrobiyal aktiviteleri yönünden teste tabi tutulacağı zaman, disk difüzyon metodunda kullanılmak üzere her ekstre kendi çözücüsü içerisinde 25 mg/ml bir konsantrasyonda; sıvı mikrodilüsyon metodunda kullanılmak üzere ise 25 mg/ml konsantrasyonda Dimetil sülfoksit (DMSO): Phosphate Buffered Saline (PBS) (1:1) içinde çözüldü ve 0.45 µm'lik milipor filtrelerden geçirildikten sonra üzerinde ekstrakt numarası yazılı tüplerde küçük hacimlere bölünerek +4°C'de saklandı (Buruk, 2002).

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bitki ekstraktlarının hazırlanmasında kullanılan kloroform, aseton, metanol ve DMSO çözücülerini ile bakteri kültürlerinin hazırlanmasında ve antimikrobiyal aktivite değerlendirme çalışmalarında kullanılan Mueller-Hinton Broth (MHB) ve Mueller-Hinton Agar (MHA) besiyerleri ticari olarak Merck (Darmstadt, Germany)'den temin edildi. Ekstraktların antibakteriyal aktivitelerinin araştırıldığı deneylerde kontrol amacıyla kullanılan gentamisin (Genta) ticari olarak eczaneden, ekstraktların ve kontrol antibiyotiklerinin sulandırılmalarının hazırlanmasında kullanılan PBS tabletleri ile bakterilerin canlılığını belirlemek için kullanılan 2,3,5-Trifeniltetrazolyum klorid (TTC) ticari olarak Sigma-Aldrich (Chemie GmbH, Germany) firmasından temin edildi. Disk difüzyon yönteminde kullanılan standart antibiyotik diskleri ampisilin ve gentamisin Oxoid (Unipath Ltd, Basingstoke Hampshire, England)'den temin edildi.

2.3. Test Mikroorganizmaları

Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için yapılan deneylerde insan, hayvan ve gıdalarda patojen olan mikroorganizmalar seçildi. Çalışmada, *Escherichia coli* ATCC 25922, Metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Streptococcus salivarius* RSHE 606, *Proteus mirabilis* ATCC 43071, *Listeria monocytogenes* Tip 2 Pasteur Enstitüsü 5434, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 olmak üzere sekiz adet standart bakteri suşu kullanıldı. Bu suşlar Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi.

2.4. PBS, TTC ve Stok Gentamisin Solüsyonu Hazırlanması

Ticari olarak Sigma'dan elde edilen PBS (Dulbecco's A) tabletleri 200 ml için 1 tablet olmak üzere distile suda çözüldükten sonra istenilen hacimlerde şişelere bölündü. Daha sonra da otoklavda 121°C'de, 1 atmosfer basınç altında, 15 dk tutularak steril edildi. Kapakları sıkıca kapatıldıktan sonra oda ısısında saklandı.

Toz halindeki TTC'nin 0.5 g'ı 100 ml PBS (0.1 M, pH: 7.3) içinde çözülerek %0.5'lik solüsyonu hazırlandıktan sonra, milipor filtreden (0.45 µm) geçirelerek steril edildi ve küçük porsiyonlar halinde tüplere taksim edilerek (5'er ml) +4°C'de karanlıkta saklandı.

Ekstraktların antibakteriyal aktivitelerinin araştırıldığı deneylerde kontrol amacıyla kullanılan ticari preparat halindeki gentamisin'in PBS ile 10 mg/ml konsantrasyonda stok solüsyonu hazırlandıktan sonra, küçük hacimlerde tüplere bölünerek -20°C'de saklandı.

2.5. Besiyerlerinin Hazırlanması

Antibakteriyal aktivitenin değerlendirilmesine yönelik olarak uygulanan disk difüzyon metodunda MHA, mikrodilüsyon metodunda ise MHB besiyeri kullanıldı. Ayrıca test mikroorganizmalarının gecelik taze kültürlerini hazırlamak amacı ile Brain Heart Infusion Broth (BHIB) besiyeri kullanıldı.

BHIB besiyeri 37 g/l olacak şekilde distile su içerisinde homojen biçimde çözüldükten sonra, vidalı kapaklı tüplere 10'ar ml olacak şekilde dağıtıldı ve otoklavda 121°C'de 15 dk süreyle steril edildi. MHB besiyeri (21 g/l) distile suda çözüldükten sonra, deney tüplerine 10'ar ml olacak şekilde dağıtıldı ve otoklavda 121°C'de 15 dk süreyle steril edildi.

Disk difüzyon yöntemi antibakteriyal aktivite denemelerinde kullanılmak üzere MHA besiyeri 34 g/l olacak şekilde distile suda çözüldü ve 100°C'de yaklaşık 1 saat kadar ısıtıldıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dk tutularak steril edildi. Eritilmiş besiyeri yaklaşık 45°C civarında iken 12 cm çaplı steril cam petri kutularına kalınlığı 4 mm olacak şekilde (yaklaşık 30 ml) dağıtıldı ve katılaşmaya bırakıldı.

2.6. Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

Ekstraktların antibakteriyal aktivitelerini belirlemek için bazı modifikasyonlar uygulanarak Sökmen ve ark. (1999) tarafından bildirilen disk difüzyon yöntemi ve Abbasoğlu ve ark.'nın (1995) bildirdiği sıvı mikrodilüsyon (broth mikrodilüsyon) yöntemleri kullanıldı.

2.6.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Liyofilize haldeki kültürler öncelikli olarak derin dondurucudan çıkarıldı. Steril BHIB içerisine suşlar inoküle edildi. 37°C'de 18-24 saat inkübe edilerek canlandırıldı. İnkübasyondan sonra, taze gecelik kültürlerden MHB besiyeri içerisine belirli miktar aktarıldı. Bakteriyel süspansiyon, kültürlerin yoğunluğu Mc Farland standart bulanıklık derecesine göre 0.5 olacak şekilde (yaklaşık olarak 10⁸ koloni oluşturan birim-kob/ml) Densimat (Biosan) dansitometre cihazında ayarlanarak hazırlandı.

Bakteriyel süspansiyon hazırlandıktan sonra, 10⁸ kob/ml bakteri içeren kültür süspansiyonlarından 100 µl alınarak besiyerlerinin üzerine yayıldı. Besiyerlerinin yüzeyinin kurumaması için petri kutuları etüvde 5 dk süreyle bekletildi. Her ekstraktın kendi çözücüsü içinde 25 mg/ml olacak şekilde önceden hazırlanmış ve filtrasyonla steril edilmiş solüsyonları, ticari olarak elde edilen 6 mm çapındaki steril boş antibiyotik disklerine (Oxoid, Schleicher & Shüll No: 2668, Germany) 20'şer µl olacak şekilde emdirildi. Daha sonra besiyerinin yüzeyine belirli aralıklarla yerleştirildi. Pozitif kontrol olarak ampicilin (10 µg/disk) ve gentamisin (10 µg/disk) ticari diskleri, negatif kontrol olarak ekstrakt içermeyen çözücücüler (kloroform, aseton, metanol) kullanıldı. Petriyerler 37°C'de 18 saat inkübe edildikten sonra, oluşan inhibisyon zonlarının çapı ölçülerek kaydedildi. Test üç tekrarlı yapıldı.

2.6.2. Sıvı Mikrodilüsyon (Broth Dilüsyon) Yöntemi

Broth mikrodilüsyon metodunun, çok sayıda test örneğinin Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK)'unun belirlenmesinde potansiyel olarak faydalı bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Mikrobiyolojide MİK, bir gecelik inkübasyondan sonra mikroorganizmaların gözle görülebilir üremesini inhibe edecek olan antimikrobiyal maddelerin en düşük konsantrasyonudur. MİK, teşhise yönelik laboratuarlarda antimikrobiyal bir etkene karşı mikroorganizmaların direncini tespit etmede olduğu kadar, yeni antimikrobiyal etkenin aktivitesini ölçmek için de önemlidir (Dask ve ark., 2010). Mikrotitre plak metodunda, ilk önce solvent (Grierson ve Afolayan, 1999) veya DMSO (Salie ve ark., 1996; Nostro ve ark., 2000; Baris ve ark., 2006) kullanarak ekstraktın stok solüsyonu elde edilir. Pleyte stok solüsyonunun eşit bir miktarını aktarmadan önce mikrotitrasyon pleytinin gözlerinde sulandırıcı olarak sıklıkla Mueller Hinton broth veya su kullanılmaktadır. Konsantrasyon aralığı elde etmek için ilk kuyucuktan başlayan iki misli seri dilüsyonlar hazırlanır. MİK-5-8 konsantrasyonu, kullanılan antimikrobiyaller için gerçekleştirilebilir konsantrasyonları temsil edebilmektedir (Mendoza, 1998). Bu prosedür için inokulum hacmi genellikle 5×10^5 kob/ml'dir (Lourens ve ark., 2004; Basri ve Fan, 2005). Bazı araştırmacılar 620 nm'de 0.4 optik dansitesi olan mikrobiyal kültür ya da 0.5 McFarland bulanıklık standardıyla ayarlanmış 12 saatlik broth kültürü kullanmışlardır (Baris ve ark., 2006). Mikrobiyal kültür eşit bir hacimde kuyucuklara konular ve 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edilir (Lourens ve ark., 2004). İnkübasyondan sonra, pleytler üremenin göstergesi olarak bulanıklıktaki değişiklikler yönünden incelenirler. Berrak gözüken ilk kuyucuk, ekstraktın MİK'i olarak kabul edilir. Bazı araştırmacılar üremenin varlığını belirlemek için tetrazolium tuzları veya resazurin boyası (Umeh ve ark., 2005) ya da spektrofotometri (Devienne ve Raddi, 2002; Matsumoto ve ark., 2001) kullanmışlardır. Spektrofotometrik yöntemde 620 nm dalga boyundaki absorbans değeri dikkate alınır (Salie ve ark., 1996). Absorbans değerinde ani düşüş gösteren konsantrasyon (Devienne ve Raddi, 2002) ya da sıfır

absorbans değeri veren en düşük konsantrasyon, bitki ekstraktının veya test fitokimyasalının MİK'idir (Salie ve ark., 1996).

Antimikrobiyal testler için, 96 adet "U" tipi kuyucuklara sahip, steril mikrotitrasyon pleyti (Brand) kullanıldı. Hazırlanan Mueller Hinton Broth (MHB) besiyerinden 96 kuyucuklu pleytlerin her bir kuyucuğuna 100'er µl dağıtıldıktan sonra, PBS:DMSO (1:1) ile 25 mg/ml (25000 µg/ml) konsantrasyonlarında sulandırılan ekstraktlardan pleytlerin ilk kuyucuklarına 100'er µl konuldu. Sekiz kanallı pipet ile ilk kuyucuklardan 100'er µl'lik hacimler alınarak bir sonraki kuyucuklara taşımak suretiyle ekstraktların Log₂ tabanına göre sulandırmaları (12500 µg/ml - 12.20 µg/ml) hazırlandı. Pleytin son kuyucuğuna besiyeri kontrol amacıyla herhangi bir ekstrakt veya kültür konulmadı.

McFarland 0.5 bulanıklığındaki bakteri süspansiyonundan steril serum fizyolojik ile 10⁻² sulandırım yapılarak ml'sinde 10⁶ bakteri olan süspansiyon hazırlandı ve bu süspansiyonlardan her kuyucuğa 100'er µl aktararak ekstraktların 6250 µg/ml ile 6.10 µg/ml konsantrasyonları arası sulandırmaları elde edildi. Bu çalışmaya paralel olarak farklı pleytlerde negatif kontrol (DMSO:PBS), kontrol antibiyotiği gentamisin ve bakterilerin pozitif üremeleri test edildi. Gentamisin'in 10 mg/ml konsantrasyonundaki çözeltisinden, ekstrakt ilavesinde olduğu gibi ilk kuyucuklara 100 µl ilave edilerek, 1-12. kuyucuklar arasında 2500 µg/ml-1.22 µg/ml konsantrasyonlarda sulandırmaları yapıldı.

Bu işlemlerden sonra pleytlerin kapakları kapatılarak 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı, inkübasyon süresi sonunda renklenme için kuyucuklara 20 µl aköz (sulu) TTC (%0.5) eklenerek 37°C'de 30 dk daha inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda pleytlerdeki üreme kontrol edilerek, gözle görülebilen bir üremenin olmadığı (renklenmeyen alanlar), dolayısıyla üremenin inhibe olduğu en düşük ekstrakt konsantrasyonu MİK olarak değerlendirildi (Sette ve ark., 2006; Morales ve ark., 2008).

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Taraxacum farinosum Hausskn. Et Bornm. ve *Taraxacum mirabile* Wagenitz'den elde edilen kloroform, aseton ve metanol ekstraktlarının antibakteriyel etkilerinin belirlenmesinde disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon metodları kullanıldı.

Rutin laboratuvarlarda antibiyotik duyarlılığının saptanmasında en sık kullanılan yöntem disk difüzyon yöntemidir. Ucuz ve uygulaması basit olan bu yöntem Kirby-Bauer tarafından geliştirilmiştir ve bu isimlerle de anılmaktadır. Bu test, kağıt disklere emdirilen antibiyotiğin, duyarlılığı araştırılan organizmanın inoküle edildiği besiyerine difüze olması temeline dayanmaktadır. Bu yöntem aynı amaçla; belli miktarlarda ekstraktların veya kimyasal maddelerin, test edilecek olan mikroorganizmalara karşı etkisini test etmek amacıyla da kullanılmaktadır. Belirli bir inkübasyon süresinden sonra ekstraktın inhibitör konsantrasyonlarının sağlandığı diskin çevresinde üreme görülmez. İnhibisyon zonunun çapı mm şeklinde ölçülerek, standart zon tablolarına göre değerlendirmeler yapılır ve mikroorganizmanın kullanılan ekstrakta ya da antibiyotiğe karşı duyarlılık durumu belirlenir (Demirpek, 2011).

Tablo 3.1: Disk difüzyon yöntemine göre bitki ekstraktlarının antibakteriyel etkileri

Test bakterileri	İnhibisyon Zonu (mm)										
	<i>T. farinosum</i>			<i>T. mirabile</i>			Pozitif Kontrol		Negatif Kontrol		
	KE	AE	ME	KE	AE	ME	G	Amp	K	A	M
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	14		-	-	-
<i>S. aureus</i> (MSSA) ATCC 25923	-	-	-	8	8	-		22	-	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	-	-	-	-	-	-		21	-	-	-
<i>S. salivarius</i> RSHE 606	-	-	-	-	-	-	13		-	-	-
<i>P. mirabilis</i> ATCC 43071	-	-	-	-	-	-		16	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> Tip 2 Past. Enst. 5434	-	-	-	-	-	-	14		-	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	-	-	-		22	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 70063	-	-	-	-	-	-	13		-	-	-

KE: Kloroform Ekstraktı; AE: Aseton Ekstraktı; ME: Metanol Ekstraktı; G: Gentamisin (10 µg/disk); Amp: Ampisilin (10 µg/disk); K: Kloroform (20 µl/disk); A: Aseton (20 µl/disk); M: Metanol (20 µl/disk)

Çalışmamızda kullanılan *Taraxacum farinosum* ve *Taraxacum mirabile* bitkilerine ait çeşitli ekstraktların disk difüzyon yönteminde, test mikroorganizmalarına karşı antibakteriyal etkileri Tablo 3.1'de verilmektedir. Tablo 3.1 incelendiğinde, *Taraxacum farinosum* ekstraktlarının, çalışmada kullanılan sekiz suş üzerinde herhangi bir inhibisyon zonu oluşturmadığı görülmektedir. Çalışmada çözücü olarak kullanılan, steril boş disklerle 20'şer µl hacimlerde emdirilmiş kloroform, aseton ve metanol çözücülerinin test edilen bakterilere karşı herhangi bir inhibitör etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan gentamisin (10 µg/disk) ve ampisilin (10 µg/disk) ticari diskleri ise, suşlar üzerinde değişen zon çaplarında antibakteriyal aktivite göstermişlerdir. *Taraxacum mirabile* bitkisinin de, aseton ve kloroform ekstraktlarının metisiline duyarlı *S. aureus* üzerinde oluşturduğu 8 mm inhibisyon zonu dışında, test edilen bakteri suşlarına karşı antibakteriyal etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 3.1 ve Şekil 3.1). Diğer taraftan *Taraxacum mirabile*'in aseton ve kloroform ekstraktlarının metisilin duyarlı *S. aureus* suşuna karşı tespit edilen antibakteriyal aktivitesi de, disklerin 6 mm'lik çapları ve kontrol olarak kullanılan antibiyotik disklerinin oluşturduğu inhibisyon zonları dikkate alındığında, oldukça zayıf antibakteriyal aktivite olarak değerlendirilebilir.



Şekil 3.1: Bitki ekstraktlarının *S. aureus* (MSSA) ATCC 25923 üzerine antibakteriyal etkisi [1: *T. mirabile* metanol ekstraktı, 2: *T. mirabile* kloroform ekstraktı, 3: *T. mirabile* aseton ekstraktı, 4: *T. farinosum* metanol ekstraktı, 5: *T. farinosum* kloroform ekstraktı, 6: *T. farinosum* aseton ekstraktı, 7: Metanol, 8: Kloroform, 9: Aseton, AM: Ampisilin]

Çalışmada kullanılan diğer bir antimikrobiyal aktivite inceleme metodu olan mikrodilüsyon metodunda ise, mikroorganizma ile etkileşen test maddesi miktarı tam olarak bellidir ve test maddesinin, hazırlanan stok çözeltisinden dilüsyonları yapılarak düzenli şekilde azalan konsantrasyonlar elde etmek, bu sayede de minimal inhibe edici konsantrasyonu belirlemek mümkün olmaktadır. Bu yöntemin diğer avantajı da çok düşük miktarlarda test maddesi ile MİK değeri belirleme imkanı sağlamasıdır (İşcan ve ark., 2002). Bu metotla elde edilen sonuçlar Tablo 3.2'de görülmektedir.

Tablo 3.2 incelendiğinde, *T. mirabile*'e ait her üç ekstraktın da birinci ve ikinci kuyucuklarda test bakterilerinin tamamının üremesini inhibe ettiği görülmektedir. İlk izlenimler bu ekstraktların antibakteriyal aktiviteye sahip oldukları yönünde olsa da, negatif kontrol pleytindeki DMSO:PBS karışımının (çözgenin) bakteri suşları üzerine birinci ve ikinci kuyucuklarda toksik etkiye neden olduğunun saptanması, ekstraktların antibakteriyal aktiviteye sahip olmadıkları izlenimine yol açmıştır. Ayrıca, ekstraktların en yüksek dozlarında, disk difüzyon yönteminde de inhibisyon zonu görülmemesi bu üç ekstraktın herhangi bir antibakteriyal etkiye sahip olmadığı görüşünü daha da kuvvetlendirmiştir. *Taraxacum farinosum* ekstraktlarının sıvı mikrodilüsyon yönteminde elde edilen antibakteriyal aktivite

sonuçları yine Tablo 3.2'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *T. farinosum* ekstraktları test mikroorganizmaları üzerine herhangi bir antibakteriyal aktivite göstermemiştir. Bu sonuçlar disk difüzyon metodundan elde edilen sonuçlarla uyusmaktadır. *T. mirabile* ekstraktlarında olduğu gibi, kullanılan çözücü bakteriler üzerine toksik etki göstermiştir. İlk iki kuyucukta üremenin inhibe edilmesi olası bir antibakteriyal aktivitenin varlığını düşündürülebilir. Fakat, hem bütün deneme pleytlerinde ilk iki kuyucukta üremenin inhibe edilmesi hem de negatif kontrol plağında bu durumun doğrulanması, çözücünün deneme suşları üzerine olumsuz bir etki gösterdiğinin kanıtıdır. Zaten bütün ekstraktların aynı derecede etki göstermesi düşük bir olasılık olarak düşünülebilir.

Çalışmamızda, pleytin G satırında bulunan *Enterococcus faecalis* suşu, sıvı mikrodilüsyon yönteminde üreme göstermediğinden dolayı çalışmanın bu kısmından çıkarılmıştır.

Literatürlerden elde edilen bilgilere göre *Taraxacum* cinsine ait farmakolojik çalışmalar özellikle *Taraxacum officinale* bitkisi üzerine yapılmıştır. Bu durum bitkinin çok geniş yayılış göstermesinden ve halk tarafından kullanılmasından kaynaklanmaktadır. *T. officinale*'nin insan üzerine özellikle sindirim sorunlarını tedavi etme yönündeki uygulamaları, farmakolojik çalışmalarla desteklenmiştir. Bazı çalışmalar bitkinin antioksidan, antikanserojen, antiinflamatuvar vb. sağlık düzenleyici etkilerinin, ya bitkinin çeşitli ekstraktlarından ya da kök, gövde, yaprak veya çiçek gibi herhangi kısmından elde edilen tek bir maddeden kaynaklandığını göstermiştir. Çeşitli farmakolojik etkilerin kaynağı olarak genellikle polifenolik maddelere ve seskiterpenlere işaret edilmektedir. *T. officinale* bitkisinde çok sayıda madde karakterize edilmesine rağmen, bazı maddelerin tek başına çalışılması daha sınırlı kalmıştır. Fakat bunlara daha ileri derecede ilgi gösterilmesi ve daha detaylı çalışmalar yapılması öngörülmektedir (Schütz ve ark., 2006).

Bu öngörüler doğrultusunda yapmış olduğumuz çalışmada, *Taraxacum* cinsine ait ve ülkemiz için endemik olan *T. mirabile* ve *T. farinosum* türlerinin antibakteriyal aktiviteleri disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleriyle araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre her iki türde de herhangi bir antibakteriyal aktivite tespit edilememiştir. Ayrıca bu bitkiler ile ilgili daha öncesinde yapılan herhangi farmakolojik bir çalışma tespit edilmemiştir. Dolayısı ile antibakteriyal etki tespit edilmemesi de bu türler için kaydedilen ilk bilgiler olabilir. Farklı türlerin farklı potansiyel antimikrobiyal aktiviteleri olabilir.

İran'da kullanılan bazı tıbbi bitkilerin antibakteriyal özelliklerinin değerlendirildiği bir çalışmada, *Taraxacum vulgare* (Lam.) Schinz'nin köklerinden elde edilen metanol ekstraktlarının *Klebsiella pneumoniae* ve *Bordetella bronchiseptica* bakteri türlerine karşı antibakteriyal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Bonjar, 2004).

Barbour ve ark. (2004) çalışmalarında, 27 doğal bitkinin farklı kısımlarından elde edilen 39 su ve 39 metanol ekstraktlarını *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteria*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, ve *Candida albicans* üzerinde denemişlerdir. *Taraxacum*'un gövde ve yapraklarından elde edilen ekstrakt ile çiçeklerinden elde edilen ekstrakt karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Gövde ve yaprak ekstraktı birlikte kullanıldığında 10 µl konsantrasyonlu ekstrakt test mikroorganizmaları üzerinde %22 oranında; 20 µl'lik ekstrakt ise %66 oranında inhibisyona neden olmuştur. Çiçek ekstraktında ise 10 µl'lik ekstrakt herhangi bir etkiye neden olmazken 20 µl'lik ekstrakt %55.5'lik bir inhibisyon oranı göstermiştir. Buradan da anlaşılacağı üzere bitkinin farklı kısımlarında farklı etken maddeler, değişen oranlarda inhibisyona neden olmuştur. Bizim türlerimizde ise 20 µl'lik ekstraktlar aktivite göstermemiştir.

Elazığ yöresinde tıbbi amaçlarla kullanılan bazı bitki türlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirildiği bir çalışmada, *Taraxacum revertens* G. Hagl.'den elde edilen kloroform ekstraktlarının test edilen mikroorganizmaların hiçbirine karşı antimikrobiyal etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Kırbağ, 2006). Çalışmamızda kullanılan kloroform ekstraktı da benzer şekilde antibakteriyal aktivite göstermemiştir.

Kang ve ark. (2008), *Compositae* familyasına ait, aralarında *Taraxacum platycarpum*'unda bulunduğu altı farklı bitkinin metanol, hekzan, etil asetat, bütanol, kloroform ve su ekstraktlarının antimikrobiyal, antioksidan ve tirozinaz inhibisyon aktivitesini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada *T. platycarpum* bitkisinin etil asetat ve hekzan ekstraktları, *E.coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *Candida albicans* üzerine önemli derecede antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Çalışmamızda kullanılan bitkilerin kloroform, aseton ve metanol ekstraktları, benzer mikroorganizmalara karşı herhangi bir etki göstermemiştir. Buna rağmen bizim çalışmamızda hekzan ve etilasetat ekstraktları kullanılmamıştır. *T. vulgare*, *T. revertens* ve *T. platycarpum*'un bizim türlerimizden farklı olması, antibakteriyal aktivitenin türlere göre farklılık gösterebileceği (sahip oldukları farklı bileşiklerden dolayı) görüşünü desteklemiştir (Cowan, 1999).

Şengül ve ark. (2009), içlerinde *T. officinale*'nin de bulunduğu sekiz bitkinin *in vitro* antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesini toplam 32 mikroorganizma üzerinde test etmişlerdir. Disk difüzyon metodunun kullanıldığı bu çalışmada, *Viscum album* ve *Alkanna tinctoria*'nın metanol ekstraktları 23

mikroorganizma üzerinde etkili olurken, *T. officinale*'nin kayda değer herhangi bir antimikrobiyal aktivitesi tespit edilmemiştir. Araştırmacıların *Taraxacum* ile ilgili elde ettikleri veriler, bizim türlerimizden elde edilenlerle uyusmaktadır.

Zaouia ve ark. (2010), Cezayir'de halk tıbbında kullanılan dokuz bitkinin su ve metanol ekstraktlarını disk difüzyon yöntemi ile bazı mikroorganizmalar üzerinde denemişlerdir. *T. officinale* ekstraktı *E coli*'ye karşı sırasıyla 12 mm ve 14 mm, *P. aeruginosa*'ya karşı 12 mm ve 14 mm, *K. pneumoniae*'ye karşı 8 mm ve 12 mm, *E. aerogenes*'e karşı 13 mm ve 15 mm, *S aureus*'a karşı ise 12'şer mm çapında inhibisyon göstermiştir. Bitkinin bulunduğu bölgeye göre içeriğindeki etken maddelerin oranı ve aktiviteleri değişiklik gösterebilir. Çalışmamızda benzer bakteriler kullanmamıza rağmen, farklı tür bitki kullanılmasından dolayı aktivite gözlenmemiştir. Bu durum bize yine farklı türlerin farklı maddeler ihtiva ederek aktivitelerde de bu farkı ortaya koyduklarını göstermektedir.

Voss-Rech ve ark. (2011) çalışmalarında, *in vitro* olarak 21 farklı bitkinin etanol ekstraktlarını, 20 farklı *Salmonella* serovarı üzerinde antimikrobiyal etki yönünden test etmişlerdir. Araştırmacılar içlerinde *T. officinale*'nin de bulunduğu bu bitkilerden, en fazla inhibisyon etkisi yapan altı bitki olarak *Punica granatum* (%100), *Eugenia jambolana* (%90), *Eugenia uniflora* (%90), *Caryophyllus aromaticus* (%75), *Psidium araca* (%75) ve *Achyrocline satuireioides* (%70)'i belirlemişlerdir. *T. officinale* ise kullanılan serovarların sadece %5'ine etkili olmuştur. Bu çalışmadan da anlaşılacağı üzere denenen bitkilerde, en az antibakteriyal aktivite *T. officinale*'de görülmüştür.

Kaynaklar

- Abbasoğlu, U., Tosun, F., Aydınoglu, A. (1995). Antimicrobial activity of *Gonocytisus angulus* (L.) Spach. *FABAD J Pharm Sci*, 20, 125-127.
- Barbour, E.K., Al Sharif, M., Sagherian, V.K., Habre, A.N., Talhouk, R.S., Talhouk, S.N. (2004). Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity, *J Ethnopharmacol*, 93, 1-7.
- Baris, O., Gulluce, M., Sahin, F., Ozer, H., Kilic, H., Ozkan, H., Sokmen, M., Ozbek, T. (2006). Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). *Turkish J Biol*, 30, 65-73.
- Basri, D.F., Fan, S.H. (2005). The potential of aqueous and acetone extracts of galls of *Quercus infectoria* as antibacterial agents, *Indian J Pharmacol*, 37 (1), 26-29.
- Baytop, T. (1999). Türkiye'de bitkiler ile tedavi geçmişte ve bugün, 2. Baskı, *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 1-10.
- Bonjar, S. (2004). Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran. *J Ethnopharmacol*, 94, 301-305.
- Borris, R. P. (1996). Natural products research perspectives from a major pharmaceutical company. *J Ethnopharmacol*, 51, 29-38.
- Buruk, C. K. (2002). Doğu karadeniz bölgesi'nde yetişen bazı endemik bitkilerin antimikrobiyal etkilerinin araştırılması, Doktora Tezi, *Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Trabzon.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, 12 (4), 564-582.
- Çubukçu, B., Meriçli, A.H., Mat, A., Sarıyar, G., Sütülpınar, N., Meriçli, F. (2002). Fitoterapi. *İ. Ü. Basım ve Yayınevi*, İ. Ü. Eczacılık Fak. Yay. No. 4311, İstanbul.
- Dask, K., Tiwari, R.K.S., Shrivastava, D.K.. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *J Med Plants Res*, 4 (2), 104-111.
- Demirpek, U. (2011). Antibiyotik duyarlılık testleri [online], Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği, <http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf> [Ziyaret tarihi: 01.03.2016].
- Devienne, K.F., Raddi, M.S.G. (2002). Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. *Braz. J. Microbiol*, 33 (2), 97-105.
- Grierson, D.S., Afolayan, A.J. (1999). Antibacterial activity of some indigenous plants used for the treatment of wounds in the Eastern Cape, South Africa. *J Ethnopharmacol*, 66, 103-106.
- Güner A., Özhatay, N., Ekim, T., Başer, K.H.C. (2000). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Supplement 2, 11, *Edinburgh University Press*, Edinburgh, 618-619.
- İşcan, G., Demirci, F., Kırimer, N., Kürküoğlu, M., Başer, K.H.C., Kıvanç, M. (2002). Bazı *Umbelliferae* türlerinden elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal etkileri. *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Eskişehir, 355-356.

- Kang, J.R., Lee, M.K., Kang, S.M. (2008). Anti-oxidant property and tyrosinase inhibition activity of various extracts from plants in compositae plants. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 51 (4), 321-328.
- Kaufman, P.B., Wu, W., Kim, D., Cseke, L.J. (1995). Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine. *CRC Press Inc.*, Corporate Blvd., N.W., Boca Raton, Florida 33431, p. 438.
- Kırbağ, S. (2006). Elazığ yöresindeki bazı tıbbi bitkilerin antimikrobiyal aktiviteleri. *J Agric Sci*, 16 (2), 77-80.
- Lourens, A.C.U., Reddy, D., Baser, K.H.C., Viljoen, A.M., Van Vuuren, S.F. (2004). *In vitro* biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species, *J Ethnopharmacol*, 9, 253-258.
- Matsumoto, M., Ishida, K., Konagai, A., Maebashi, K., Asaoka, T. (2001). Strong antifungal activity of SS750, a new Triazole derivative, is based on its selective binding affinity to cytochrome P450 of fungi. *Antimicrob. Agents Chemother*, 46 (2), 308-314.
- Mendoza, M.T. (1998). What's new in antimicrobial susceptibility testing? *Philipp J Microbiol Infect Dis*, 27 (3), 113-115.
- Moerman, D.E. (1996). An analysis of the food plants and drug plants of native North America. *J Ethnopharmacol*, 52, 1-22.
- Morales, G., Paredes, A., Sierra, P., Loyola, L.A. (2008). Antimicrobial activity of three *Baccharis* species used in the traditional medicine of Northern Chile. *Molecules*, 13 (4), 790-794.
- Nakipoğlu, M., Otan, H. (1992). Tıbbi bitkilerin flavonoidleri. *Anadolu*, 4 (1), 70-93.
- Nostro, A., Germano, M.P., D'Angelo, V., Marino, A., Cannatelli, M.A. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett Appl Microbiol*, 30 (1), 379-384.
- Salie, F., Eagles, P. F. K., Lens, H. M. J., 1996, Preliminary antimicrobial screening of four South African *Asteraceae* species, *J Ethnopharmacol*, 52 (1), 27-33.
- Schütz, K., Carle, R., Schieber, A. (2006). *Taraxacum* – A review on its phytochemical and pharmacological profile. *J Ethnopharmacol*, 107, 313-323.
- Şengül, M., Yıldız, H., Güngör, N., Çetin, B., Eser, Z., Ercişli, S. (2009). Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak J Pharm Sci*, 22 (1), 102-106.
- Sette, L.D., Passarini, M.R.Z., Delarmelina, C., Salati, F., Duarte, M.C.T. (2006). Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World J Microb Biot*, 22, 1185-1195.
- Sökmen, A., Jones, B.M., Ertürk, M. (1999). The *in vitro* antibacterial activity of Turkish medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, 67, 79-86.
- Tadeg, H., Mohammed, E., Asres, K., Mariam, T.G. (2005). Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *J Ethnopharmacol*, 100 (1), 168-175.
- Umeh, E.U., Oluma, H.O.A., Igoli, O. (2005). Antibacterial screening of four local plants using an indicator-based microdilution technique. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2 (3), 238-243.
- Voss-Rech, D., Klein, C.S., Techio, V.H., Scheuermann, G.N., Rech, G., Fiorentin, L. (2011). Antibacterial activity of vegetal extracts against serovars of *Salmonella*, *Cienc Rural*, 41 (2), 314-320.
- Zaouia, K., Segni, L., Noureddine, G., Redha, O.M. (2010). Antimicrobial activity of nine medicinal plants growing in the south of Algeria. *Ann Biol Res*, 1 (4), 145-147.