

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BAZI BİTKİSEL EKSTRELERDE KALİTATİF ve KANTİTATİF  
YÖNTEMLERLE ANTİDERMATOFİTİK AKTİVİTE TESTLERİNİN  
KARŞILAŞTIRILMALI DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Ebru İdil SAĞLAM**

Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Berrin ÖZÇELİK

ANKARA  
Ağustos 2010

## İÇİNDEKİLER

<b>Kabul ve Onay</b>	<b>i</b>
<b>İçindekiler</b>	<b>ii</b>
<b>Simgeler, Kısaltmalar</b>	<b>iv</b>
<b>Resimler, Tablolar</b>	<b>v</b>
<b>Şekiller</b>	<b>vi</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Antidermatofitik Aktivite Testleri</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1. Dilüsyon Yöntemleri</b>	<b>3</b>
2.1.1.1. Kullanılan Malzemeler	4
2.1.1.2. Kullanılan Tamponlar	5
2.1.1.3. Kullanılan Antifungaller	5
2.1.1.4. Kullanılan Mikroorganizmalar	5
2.1.1.5. İnkübasyon Süreleri	5
<b>2.1.2. Agar Difüzyon Yöntemi</b>	<b>5</b>
<b>2.1.3. Disk difüzyon Yöntemi</b>	<b>6</b>
<b>2.1.4. E-Test</b>	<b>6</b>
<b>2.1.5. MTT yöntemi</b>	<b>7</b>
<b>2.1.6. BACTEC Otomatize Sistem</b>	<b>7</b>
<b>2.2. Sarı Kantoron, Kılıç Otu</b>	<b>8</b>
<b>2.3. Defne Yapraklı Laden, Tüylü Laden</b>	<b>9</b>
<b>3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR</b>	<b>10</b>
<b>3.1. Bitki ekstralarının Hazırlanması</b>	<b>10</b>
<b>3.2. Mikrobiyolojik Analiz</b>	<b>10</b>
<b>3.2.1. Gereç ve Yöntemler</b>	<b>10</b>
3.2.1.1. Mikroorganizmalar	10

3.2.1.2. Besiyerleri	11
3.2.1.3. Çözücüler	11
3.2.1.4. Kullanılan Kontrol Antimikrobiyaller	11
3.2.1.5. Cam Malzemeler	12
3.2.1.6. Cihazlar	12
3.2.1.7. Araştırmada Denenen Ekstreler	12
3.2.1.8. Araştırmada Denenen İndikatör Madde	12
<b>3.3. Mikroorganizmalar ve İnokulum Hazırlığı</b>	<b>13</b>
<b>3.4. Yöntem</b>	<b>14</b>
<b>4. BULGULAR</b>	<b>16</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>33</b>
<b>6. SONUÇ</b>	<b>40</b>
<b>7. ÖZET</b>	<b>42</b>
<b>8. SUMMARY</b>	<b>43</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b>	<b>44</b>
<b>10. EKLER</b>	<b>52</b>
<b>11 .ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>53</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
$\mu$	Mikron
ml	Mililitre
g	Gram

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>CFU</b>	Koloni Forming Unit (Koloni oluşturan ünite)
<b>MİK</b>	Minimum İnhibisyon Konsantresi
<b>MBC</b>	Minimum Bakterisidal Konsantre
<b>MBS</b>	Minimum Bakteriostatik Konsantre
<b>MFC</b>	Minumum Fungusidal Konsantre
<b>MFS</b>	Minumum Fungustatik Konsantre
<b>CLSI</b>	Clinical Laboratory Standard Institute
<b>NCCLS</b>	National Committee for Clinical Laboratory Standards
<b><i>Hpp</i></b>	<i>Hypericum perforatum</i>
<b><i>Cls</i></b>	<i>Cistus laurifolius</i>
<b>EtOAc</b>	Etil Asetat
<b>ButOH</b>	Butanol
<b><i>n</i>-ButOH</b>	<i>n</i> -Butanol
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Kloroform
<b>Hx</b>	Hekzan
<b>EtOH</b>	Etil Alkol
<b>PBS</b>	Fosfat Tamponu
<b>MOBS</b>	Morfolinopropan Sulfonik Asit
<b>IC<sub>50</sub></b>	%50 İnhibisyon konsantrasyonu
<b>DMSO</b>	Dimetil Sülfoksit
<b>DNF</b>	Dimetilformamid
<b>ELIZA</b>	ELiZA Mikropleyt Okuyucu

## RESİMLER ve TABLolar

<b>Resimler</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 1: <i>Hypericum perforatum</i>	8
Resim 2: <i>Cistus laurifolius</i>	9
Resim 3: Kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle <i>H. perforatum</i> (H <sub>2</sub> O, - EtOAc)'un <i>M. gypseum</i> ' a karşı MİK görüntüsü.	17
Resim 4: Kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle <i>C. laurifolius</i> (-H <sub>2</sub> O, - EtOAc)'un <i>T. rubrum</i> 'a karşı MİK görüntüsü	17
Resim 5: <i>C. laurifolius</i> (-n-ButOH)' un <i>B. subtilis</i> 'e karşı MBS/MBC görüntüsü.	17
Resim 6: <i>H. perforatum</i> (-ButOH)'un <i>E. floccosum</i> 'a karşı MFS/MFC görüntüsü.	17
<b>Tablolar</b>	<b>Sayfa</b>
Tablo 1: Dermatofitler için MİK ve IC <sub>50</sub> değerleri	18
Tablo 2: Maya Benzeri Funguslar için MİK ve IC <sub>50</sub> değerleri	19
Tablo 3: Gram Pozitif Bakteriler için MİK ve IC <sub>50</sub> değerleri	20
Tablo 4: Gram Negatif Bakteriler için MİK ve IC <sub>50</sub> değerleri	21

Şekiller	Sayfa
Şekil 1: <i>Hpp.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>T. rubrum</i> 'a karşı % inhibisyonu	26
Şekil 2: <i>Cls.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, <i>n</i> -ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>T. rubrum</i> 'a karşı % inhibisyonu	26
Şekil 3: <i>Hpp.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>E. floccosum</i> 'a karşı % inhibisyonu	26
Şekil 4: <i>Cls.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, <i>n</i> -ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>E. floccosum</i> 'a % inhibisyonu	26
Şekil 5: <i>Hpp.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>M. gypseum</i> 'a karşı % inhibisyonu	27
Şekil 6: <i>Cls.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, <i>n</i> -ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>M. gypseum</i> 'a karşı % inhibisyonu	27
Şekil 7: <i>Hpp.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>C. albicans</i> 'a karşı % inhibisyonu	27
Şekil 8: <i>Cls.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, <i>n</i> -ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>C. albicans</i> 'a karşı % inhibisyonu	27
Şekil 9: <i>Hpp.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>C. parapsilosis</i> 'a karşı % inhibisyonu	28
Şekil 10: <i>Cls.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, <i>n</i> -ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>C. parapsilosis</i> 'a karşı % inhibisyonu	28

Şekil 11: <i>Hpp.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>C. krusei</i> 'ye karşı % inhibisyonu	28
Şekil 12: <i>Cls.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, <i>n</i> -ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>C. krusei</i> 'ye karşı % inhibisyonu	28
Şekil 13: <i>Hpp.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>S. aureus</i> 'a karşı % inhibisyonu	29
Şekil 14: <i>Cls.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, <i>n</i> -ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>S. aureus</i> 'a karşı % inhibisyonu	29
Şekil 15: <i>Hpp.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>S. pyogenes</i> 'a karşı % inhibisyonu	29
Şekil 16: <i>Cls.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, <i>n</i> -ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>S. pyogenes</i> 'e karşı % inhibisyonu	29
Şekil 17: <i>Hpp.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>B. subtilis</i> 'e karşı % inhibisyonu	30
Şekil 18: <i>Cls.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, <i>n</i> -ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>B. subtilis</i> 'e karşı % inhibisyonu	30
Şekil 19: <i>Hpp.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>E. faecalis</i> 'a karşı % inhibisyonu	30
Şekil 20: <i>Cls.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, <i>n</i> -ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>E. faecalis</i> 'e karşı % inhibisyonu	30

Şekil 21: <i>Hpp.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>E. coli</i> 'ye karşı % inhibisyonu	31
Şekil 22: <i>Cls.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, <i>n</i> -ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>E. coli</i> 'ye karşı % inhibisyonu	31
Şekil 23: <i>Hpp.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>P.aeruginosa</i> 'ya karşı % inhibisyonu	31
Şekil 24: <i>Cls.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, <i>n</i> -ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>P. aeruginosa</i> 'ya karşı % inhibisyonu	31
Şekil 25: <i>Hpp.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>K. pneumonia</i> 'ya karşı % inhibisyonu	32
Şekil 26: <i>Cls.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, <i>n</i> -ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>K. pneumonia</i> 'ya karşı % inhibisyonu	32
Şekil 27: <i>Hpp.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>A. baumannii</i> 'ye karşı % inhibisyonu	32
Şekil 28: <i>Cls.</i> fraksiyonlarının (H <sub>2</sub> O, EtOAc, <i>n</i> -ButOH, CHCl <sub>3</sub> , Hx, EtOH) <i>A. baumannii</i> 'ye karşı % inhibisyonu	32



## 1. GİRİŞ

Farmasötik alanda ilaç geliştirme araştırmaları arasında yer alan yeni antifungal, antibakteriyel ve antiviral ajanların elde edilmesi için tıbbi bitkilerden izole edilen doğal bileşenler, yarı sentetik veya sentetik bileşiklerden aktif farklı moleküler yapılar hedeflenerek izole edilmekte ve antimikrobiyal aktiviteleri *in vitro* ve *in vivo* olarak değerlendirilmektedir.

Antimikrobiyal ajanların kullanılmaya başlandığı ilk yıllardan itibaren artan direnç sorunu nedeniyle birçok tedaviye cevap alınamazken aynı zamanda uygunsuz kemoterapötik kullanımı sonucu direnç gelişimi halen büyük bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle yeni antimikrobiyal maddeler geliştirme ihtiyacı günümüzde en önemli sorunlardan birini oluşturmaktadır.

Mota ve ark.'nın 2009 yılında yayımladıkları makalelerinde dermatofitlere karşı son yıllarda gelişen direnç sorunuyla birlikte antidermatofitik ajanların mikrodilüsyon tekniğinde duyarlılığının değerlendirilmesinde halen karşılaşılan güvenilirlik sorunlarının olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle dermatofitlere karşı *in vitro* duyarlılığın belirlenmesinde yeni ajanlar için standardize edilmiş metodlar geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymuşlardır. *In vitro* yöntemler arasında bulunan sıvı makrodilüsyon, sıvı mikrodilüsyon, agar dilüsyon, E-test, sensititre otomatik yöntem, kolorimetrik yöntemler bulunmakla birlikte; antimikrobiyal aktivite araştırmaları arasında yer alan disk difüzyon yönteminin çok zaman alıcı olduğu ve düşük miktardaki maddeler için uygun bir yöntem olmadığı bildirilmiştir<sup>1</sup>.

Dermatofitler, keratinize dokuları (saç, tırnak, cilt) tutan mantarlar olarak tanımlanmışlardır. Dermatofitler *Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Trichophyton* olmak üzere 3 cinse ayrılmaktadır. Bu üç

cinse ait 40 kadar dermatofit türü vardır. Ancak bu türlerden 10 tanesinin sık olarak infeksiyona neden olduğu bilinmektedir. *Microsporum* cinsi dermatofitler daha çok saç telleri, kıllar ve deride hastalık oluşturur. *Epidermophyton* ise en fazla inguinal bölge olmak üzere deri ve tırnak tutulumu yapar. *Trichophyton* türleri ise deri, tırnak ve saçlı deride tutulum yapar<sup>2</sup>. Dermatofitler keratin yapılarına, ürettikleri keratinazlar yardımıyla keratini sindirerek yerleşirler ve bunlara duyarlı kişilerde temastan hemen sonra keratin aderensi sonucunda infeksiyon gelişir. Dermatofitlerin oluşturdukları infeksiyonlarda (dermatofitoz; dermatomikoz; tinea), deri tutulumu ile deride kepeklenme, vezikül oluşumu ve bazen iltihaplanma; kıl ve saç tutulumu ile bunların kırılması, dökülmesi; tırnakların tutulumu ile şekil ve yapılarının bozulması söz konusudur. Laboratuvarlarda dermatofitler eşeysiz üreme özelliklerine göre incelenir. Dermatofitler eşeysiz olarak 2 tip konidiyum üretirler. Büyük, çok hücreli, düz ve pürtüklü, ince ve kalın duvarlı makrokonidiyum ve daha küçük, tek hücreli, düz duvarlı mikrokonidiyum şeklindedir<sup>3</sup>.

Mantar infeksiyonlarında günümüzde en yaygın kullanılan ilaçlar arasında mikonazol, ekokonazol, sulkonazol gibi imidazol türevleri, ketokonazol, itrakonazol, flukonazol gibi azol türevleri, terbinafin ve grizerofulvin gibi alilamin türevleri bulunmaktadır<sup>3</sup>.

Araştırmamıza mikrodilüsyon, kolorimetrik mikrodilüsyon ve kantitatif spektrofotometrik ölçüm olmak üzere üç farklı antimikrobiyal test yöntemi kıyaslanarak; farklı bitkilerden (*Hypericum perforatum*, *Cistus laurifolius*) elde edilen ekstre ve alt fraksiyonlarına ait antidematofitik aktivite sonuçlarının karşılaştırmalı değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda antifungal ve antibakteriyel sonuçlarla birlikte değerlendirilmeye alınması planlanmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Antidermatofitik Aktivite Testleri

Mikozların insidansının artması, antidermatofitik ajanların daha sık kullanımına neden olurken, bunun sonucu olarak mevcut ajanlara duyarlı suşların daha az duyarlı olanlar ile yer değiştirmesine yol açmıştır. Son yıllarda laboratuvarlarda antifungal duyarlılık testlerinin yapılması önemli hale gelmiştir. Clinical Laboratory Standard Institute önceki adıyla; “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS), filamentözler (*Aspergillus* türleri, *Fusarium* türleri, *Rhizopus* türleri, *Pseudallescheria boydii*, *Sporothrix schenckii*) için antifungal duyarlılık testlerinin standartlarını belirlemiş ve 2002 yılında M-38A kitabını yayınlamış ancak bunda dermatofitler bulunmamaktadır. Dermatofitlere ait duyarlılık testi CLSI M38-A2 2008 yılında yayınlanmıştır<sup>4,5</sup>.

Antidermatofit aktivite test yöntemleri (sıvı dilüsyon, agar dilüsyon, disk difüzyon) arasında farklı sonuçlar elde edildiği halen bildirilmektedir<sup>1,6-8</sup>.

Antidermatofitik aktivite testleriyle ilgili araştırmalar halen devam etmektedir<sup>9,10,11</sup>

#### 2.1.1. Dilüsyon Yöntemleri

Test, belirlenmiş koşullar altında; standardize edilmiş, mikroorganizmanın üremesini inhibe etmek için gerekli olan bir antimikrobiyal madde konsantrasyonunu belirler. Bu yöntemde, küçük hacimli sıvı içinde çözülen madde ve miktarı belirlenmiş uygun çözücüde çözülmüş antimikrobiyal kullanılarak inhibisyon konsantrasyonu ölçülür.

Mikroorganizmalara ait spesifik besiyerleri kullanılmakla birlikte; fungusların üretilmeleri ve dilüsyonlarında Sabouraud dekstroz agar (SDA), Sabouraud sıvı medium (SLM), patates dekstroz agar (PDA) ve RPMI 1640 (L-glutaminli ve sodyum bikarbonatsız) besiyerleri kullanılır<sup>7</sup>. McFarland 0.5'e göre standardize edilerek hazırlanan kültür süspansiyonları toplam hacmin 1/10'nu geçmeyecek şekilde (10 µl) 96 kuyulu mikropleytle çift katlı dilüsyonları yapılmış olan antimikrobiyal ajanlar üzerine ilave edilir. Mikrodilüsyonu yapılmış her kuyu 100 µl besiyeri ve madde dilüsyonlarını içerir. Son 2 kuyudan 1'i sadece besiyeri içeren negatif kontrol, diğeri ise sadece kültür süspansiyonu içeren besiyeridir. Antidermatofitik aktivite için önerilen 28°C'de 48-72 saat; inkübasyon sonrası minimum inhibisyon dilüsyonu (MİK) makroskopik olarak değerlendirilir. Maya benzeri funguslar için antifungal aktivite testinde önerilen 35°C'de, 48 saat inkübasyon; antibakteriyel aktivitenin belirlenmesinde önerilen 37°C'de 16-18 saat inkübasyondur. Makrodilüsyon yönteminde ise mikrodilüsyon yönteminde kullanılan mikropleytlere yerine cam tüpler kullanılır. Konsantrasyonu belli antimikrobiyal stok çözeltisi; seri tüpler içerisindeki sıvı besiyeri ile çift katlı dilüsyonları yapılır ve yine aynı şekilde dilüsyon serilerindeki her tüpe mikroorganizma süspansiyonu inoküle edilir, uygun inkübasyon süresi sonrası MİK; makroskopik olarak değerlendirilir. Agar dilüsyon yönteminde ise; petrielerde agar (42-45°C) içine antimikrobiyal maddenin belirli konsantrasyonu katılarak üzerine McFarland standartlarındaki mikroorganizmanın inoküle edilmesiyle inhibisyon konsantrasyonları belirlenebilir<sup>4,5,8,12</sup>.

#### **2.1.1.1. Kullanılan malzemeler**

80–96 kuyulu mikropleytlere, pastör pipeti, otomatik pipetler, Whatman filtre no:40 (8 µm por çaplı ), spektrofotometre

### 2.1.1.2. Kullanılan tamponlar

MOPS (morfolinopropan sulfonik asit), fosfat tamponu (PBS).

### 2.1.1.3. Kullanılan Antifungaller

Mikonazol gibi imidazol türevi, ketokonazol, itrakonazol, flukonazol gibi azol türevleri, terbinafin ve griserofulvin gibi alilamin türevleri bulunmaktadır.

### 2.1.1.4. Kullanılan Mikroorganizmalar

*Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum nanum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton violaccum*, *Trichophyton verrucosum*.

### 2.1.1.5. İnkübasyon süreleri

Mikrodilüsyon yönteminde; inkübasyon süreleri ile ilgili yapılmış araştırmalarda; *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes* için; 28°C'de 7 gün<sup>1,2</sup>, *M. canis* için agar dilüsyon yönteminde; 28-30°C'de 48 saat<sup>2</sup>, disk difüzyon testi *C. albicans* için; 37°C'de 48 saat<sup>12</sup>, E-Test yönteminde, *T. rubrum* için; 28°C'de 96 saat<sup>13</sup>, *E. floccosum* ve *M. nanum*' un denendiği bir araştırmada 28°C'de 10 gün<sup>14</sup>, agar difüzyon yönteminde *C. albicans* için; 28°C'de 48 saat inkübasyonun uygun olduğu bildirilmiştir<sup>15</sup>.

### 2.1.2. Agar Difüzyon Yöntemi

Agar difüzyon testi, agar yüzeyinde McFarland standartlarına göre inoküle edilmiş mikroorganizmalara karşı test edilecek olan antimikrobiyal madde dilüsyonlarının tatbik edildiği test sistemini

kapsamaktadır. Agar yüzeyine; inoküle edilmiş mikroorganizma bulunan petrilere belirli çapta açılan çukurlara aktivitesi ölçülecek test örneği tatbik edilir. Kullanılan maddenin yapısal özelliği, difüze olma yüzdesini veya süresini etkileyebilmektedir. İnkübasyon sonrası, denenen örnek etkili ise çukurların etrafında belirgin biçimde üremenin olmadığı inhibisyon zonları oluşmaktadır. Oluşan inhibisyon zonları bir kompas ile ölçülerek kaydedilmekte ve değerlendirilmektedir. Çukurcuklara koyulan maddenin artan ya da azalan konsantrasyonlarıyla, aktivite sonucu oluşan inhibisyon zonu çaplarının da doğru orantılı olarak artması ya da azalması beklenir. Agar difüzyon yöntemiyle elde edilen zon çapı değerleri ve buna karşılık gelen madde konsantrasyonları ile gerçek MİK değerleri arasında paralellik olduğu ancak; disk difüzyon yönteminde olduğu gibi agar difüzyon yönteminde de test örneklerinin katı besiyerindeki çözünürlüklerinin sıvı besiyerindeki çözünürlüklerinden daha az olabileceğinden elde edilen zon çaplarının ve buna bağlı MİK değerlerinin daha düşük olabileceği de bildirilmiştir<sup>6</sup>.

### **2.1.3. Disk difüzyon (Kirby-Bauer)**

Belirli konsantrasyonda antimikrobiyal madde emdirilmiş kâğıt diskler (Whatman no.1), agar yüzeyine belirli aralıklarla yerleştirilmiş ve McFarland standartlarında inoküle edilmiş mikroorganizmaya karşı oluşturdukları inhibisyon zonunun (mm) ölçülerek değerlendirilmesi esasına dayanır. Antimikrobiyal maddeler için sözü edilen zon çapları milimetre değerine göre "dirençli", "orta duyarlı" veya "duyarlı" olarak değerlendirmeye olanak vermektedir<sup>4</sup>.

### **2.1.4. E-Test**

Bu yöntemde hazır olarak alınan ve ticari olarak hazırlanan stripler (özel emici kâğıt şeritler) kullanılır. Bu şeritler üzerine bir

antimikrobiyal ajanın değişik konsantrasyonları absorbe edilmiştir. Şeritler disk difüzyon yönteminde olduğu gibi katı besiyeri üzerine standart inokülasyonu yapılan mikroorganizmalara karşı oluşan inhibisyonları değerlendirir. Oluşan zonlar antibiyotiğin inhibisyon konsantrasyonunu belirler<sup>13</sup>.

### **2.1.5. MTT yöntemi**

MTT (Metil tiyazol tetrazolyum 3-(4,5-dimetil-tiyazolil)-2,5-difeniltetrazolyumbromid) testi, canlı hücre; “mitokondriyal süksinat dehidrogenazları” aracılığıyla, çözüner bir tetrazolyum tuzu olan sarı renkli MTT indikatörünü çözüner olmayan mor renkli formazana dönüştürürler. Oluşan renk değişimi spektrofotometrik yöntemle ölçülerek kantitatif olarak ilaç duyarlılığı değerlendirilir. Testte; 96 kuyulu mikropleyde besiyeri içeren antimikrobiyal dilüsyonları üzerine mikroorganizma inokülasyonu yapıp; indikatör eklenir, 4 saat inkübasyon sonrasında dimetil formamid (DMF) konularak 12-15 saat sonra spektrofotometrik (540 nm) tampona (%45'lik DMF içinde çözülmüş %23 SDS sodyum dedosil sülfat, pH 4.7) karşı okunur<sup>16,17</sup>.

Tüm test yöntemlerinde; üç kez tekrarlanan test sonuçları değerlendirilmelidir.

### **2.1.6. BACTEC Otomatize sistem**

BACTEC radyometrik antibiyotik duyarlılık testidir. Mikobakterilerin primer izolasyonunda kullanılan temele dayanmaktadır, inokülasyon yapılmış antibiyotik içeren ve içermeyen BACTEC 12B (Middlebrook 7H12) şişelerinde inkübasyon sonrası; besiyerindeki <sup>14</sup>C işaretili substratın kullanımı ile <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> oluşturan bakterilerin verdiği sonuçlar cihazda (BACTEC 460) kantitatif okunur ve Growth Index (GI) terimiyle belirtilir<sup>18,19</sup>.

## 2.2. Sarı kantoron, Kılıç Otu (*Hypericum perforatum*)



Alem :Plantae  
Altalem :Tracheobionta  
Bölüm :Magnoliophyta  
Sınıf :Magnoliopsida  
Altsınıf :Dilleniidae  
Takım :Thales  
Familiya :Clusiacea

**Resim 1: *Hypericum perforatum***

Ülkemizde geniş bir yayılış gösteren *H. perforatum* bitkisi halk arasında dahilen soğuk algınlığında, bronşial ve ürogenital sistem yangılarında antiflojistik amaçla, safra rahatsızlıkları ve mesane irritasyonlarında, nevralji, migren ağrılarında, yatıştırıcı olarak, siyatik ve çeşitli ülserde, diyabette, dispepsinin tedavisinde, antispazmodik, kabız yapıcı, diüretik, emanagog, antimalaryal, kurt düşürücü<sup>20</sup>, bronşit, yangı, farenjit ve tuberküloz tedavisinde kullanılmaktadır, haricen ise antiseptik, egzema ve mantar hastalıklarının tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir ve yara iyi edici<sup>21</sup> amaçla yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir<sup>22,23</sup>.



### 2.3. Defne yapraklı ladan, tüylü ladan ( *Cistus laurifolius* )



Alem	: Plantae
Altalem	: Tracheobionta
Bölüm	: Magnoliophyta
Sınıf	: Magnoliopsida
Altsınıf	: Dilleniidae
Takım	: Violales
Familya	: Cistaceae

**Resim 2: *Cistus laurifolius***

Salgı tüylerinde reçineli bir salgı maddesi bulunur, bu tüyler ve salgı maddesi toplanarak ladanum isimli drog elde edilir; bu drogtan eskiden dizanteri tedavisinde ve ekspektoran olarak yararlanıldığı bilinmektedir<sup>24</sup>. Bunun yanı sıra halk arasında çay olarak kaynatılıp içilirse şekeri düşürdüğü<sup>25</sup>, sıcak su içinde bekletilerek ağrıyan yere sarılırsa bel ağrısına ve romatizmaya iyi geldiği belirlenmiştir<sup>26</sup>.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Bitki ekstralarının hazırlanması

*Hypericum perforatum* ve *Cistus laurifolius* toprak üstü kısımları kurutularak toz edilmiş; 100g/2L % 96 ile oda ısısında yarım saat/gün manyetik karıştırıcıyla karıştırmak suretiyle ekstre edilip birleştirilen etanollü ekstraları alçak basınç altında, rotavaporda 50°C sıcaklıkta yoğunlaştırılıp vakumlu desikatörde alçak basınç altında kurutulmuştur. Ekstreler; EtOH Ekstresinin BAYF yöntemine göre fraksiyonlanmıştır. Bitkisel ekstraları; Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognosi Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Esra Akkol tarafından hazırlanmıştır<sup>27</sup>.

#### 3.2. Mikrobiyolojik Analiz

##### 3.2.1. Gereç ve Yöntemler

##### 3.2.1.1. Mikroorganizmalar

*Trichophyton rubrum* RSKK 486, *Epidermophyton floccosum* RSKK3027, *Microsporum gypseum* NCPF 580, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 900 28, *Candida krusei* ATCC 6258, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 13615, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Klebsiella pneumoniae* RSKK 574, *Acinetobacter baumannii* RSKK 02026 (Mikroorganizmalar Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Kültür Koleksiyonundan sağlanmıştır).

### **3.2.1.2. Besiyeleri**

Patates Dekstroz Agar (PDA; Merck), Saboroud Dekstroz Agar (SDA; Merck), Saboroud Liquid Medium (SLM, Merck), Muller Hinton Agar (MHA, Merck), Muller Hinton Broth (MHB, Merck), RPMI -1640 (Sigma).

### **3.2.1.3. Çözücüler**

3-(*N*-morfolino)propansülfonikası; (MOPS: 34.54 g/L; pH: 7.0), Fosfat tamponu solüsyonu (PBS; pH:8.0), Etanol (Merck), Dimetilsülfoksit (DMSO, Merck). 2.1'de belirtilen bitkisel ekstrakter uygun çözücüde (%80 etanol : %20 su) çözülüp milipor filtrede (20 µm; MA 01730, USA) süzöldükten sonra araştırmada test edilmiştir.

### **3.2.1.4. Kullanılan Kontrol Antimikrobiyal Maddeler**

İtrakonazol (ITRA; sigma 16657), griseofulvin ( GRI; sigma G2664 ), terbinafin (TER; sigma G003253), umbelliferon (UMB, sigma 101K3455), ketokonazol (KET, sigma G003254), flukanozol (FLU, sigma 48F8814), ampisilin (AMP, sigma A0166), levofloksasin (LFX, sigma D1806), gentamisin (GM, sigma A8650).

Kontrol ajanlar; fosfat tamponu (AMP, pH: 8.0), su (GEN, LFX, FLU) ve dimetilsülfoksit (KET, ITRA, GRI), TERB (%5DMSO: %1Tween 80) çözücülerinde hazırlanarak deneyde test edilmiştir. Stok solüsyonlar CLSI kriterlerine göre hazırlanmıştır<sup>4,5</sup>.

### 3.2.1.5. Cam Malzemeler

Test tüpleri, petri kutuları, balon joje, erlen, beher, cam pipetler(1ml, 5ml, 10ml).

### 3.2.1.6. Cihazlar

ELISA cihazı (Molecular Devices Versamax), Otoklav (Nüve, OT 4060, ISO, 9001), pasteur fırını (NEL, NR900, Heraeus NR900), vorteks (Firlabo.sa), hassas terazi (AW320, D432410445, Shimadzu), pH metre (Appoyal), güvenlik kabini (Chemocell LRCX-UV, ClassII A-B (1'2'3') III), otomatik pipetler (Greiner, eppendorf).

### 3.2.1.7. Araştırmada Denenen Ekstreler

*Hypericum perforatum*'a ait kalan su (-H<sub>2</sub>O) fazı, etil asetat fraksiyonu (-EtOAc), butanol fraksiyonu (-ButOH), kloroform fraksiyonu (-CHCl<sub>3</sub>), hekzan fraksiyonu (-Hx) ve etanol ekstresi (-EtOH) denenmiştir. *Cistus laurifolius*'a ait kalan su (-H<sub>2</sub>O), etil asetat fraksiyonu (-EtOAc), *n*-butanol fraksiyonu (*n*-ButOH), kloroform fraksiyonu (-CHCl<sub>3</sub>), hekzan fraksiyonu (-Hx) ve etanol ekstresi (-EtOH) denenmiştir.

### 3.2.1.8. Araştırmada Denenen İndikatör Madde

Resazurin indikatör maddesi dermatofitler için; % 0.02 (w/v), *Candida* ve bakteriler için 6. mg/mL konsantrasyonda steril distile su içerisinde hazırlanmış ve milipor filtreden (0.22 µm milipore; MA 01730, USA) süzülüp kullanılmıştır.

### 3.3. Mikroorganizmalar ve İnokulum Hazırlığı

Araştırmada; American Type Culture Collection (ATCC), Culture Collection of Refik Saydam Central Hygiene Institute, Refik Saydam Kültür Koleksiyonu (RSKK), National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF)'ye ait referans suşlar kullanılmıştır.

Dermatofitlerden; *T. rubrum* (RSKK 486) *E. floccosum* (RSKK 3027) ve *M. gypseum* (NCPF 580), miselyum ve konidia gelişimi için PDA 'ya pasajlanmış ve 28°C'de 7–10 gün inkübe edilmiştir. Tüm dermatofit suşlar steril bir pastör pipeti yardımıyla 10 ml steril serum fizyolojik (% 0.9) içerisine alınmış ve 15–20 dk ağır partiküllerin çökmesi için CLSI M38-A' da önerildiği biçimde oda ısısında bekletilmiştir. Kültür süspansiyonları spektrofotometrik olarak OD<sub>90</sub> 520 nm' de %70–72 absorbansa göre hazırlanmıştır. Stok süspansiyonlar RPMI 1640+0.165 M MOPS (pH: 7,0) ile 1:50 oranında dilüe edilerek 0.4X10<sup>4</sup> ve 5X10<sup>4</sup> CFU/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan inokulum; antidermatofitik aktivite testinde denenmiştir.

Maya benzeri funguslardan *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* SDA besiyerinde 35°C'de 24 saat üremiş kültürleri steril serum fizyolojik içerisine alınmıştır ve RPMI besiyeriyle 0.5X10<sup>3</sup> CFU/mL'de hazırlanmıştır.

Gram pozitif bakterilerden; *S. aureus*, *S. pyogenes*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, Gram negatif bakterilerden ise; *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *A. baumannii*, MHA'da 37°C'de 1 gecelik kültürlerinden 0.5X10<sup>3</sup> CFU/ml'de hazırlanmıştır.

### 3.4. Yöntem

Antidermatofit, antifungal ve antibakteriyel aktivite tayininde mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Besiyeri içeren 96 kuyulu mikropleyde maddelerin çift katlı dilüsyonları (128-0,125 µg/ml) yapılmıştır. Kuyulara her örnek için 10 µl dermatofit, maya benzeri, fungus ve bakteri kültür süspansiyonu ilave edilerek sırasıyla; 28°C'de 72 saat, 35°C'de 24 saat, 37°C'de 18 saat inkübasyon sonrası minimum inhibisyon dilüsyonları (MİK) belirlenmiştir<sup>4-6</sup>.

Kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle besiyeri içeren 96 kuyulu mikropleyde maddelerin çift katlı dilüsyonları (128-0,125 µg/ml) yapılmıştır. Kuyulara her örnek için 10 µl dermatofit, maya benzeri, fungus ve bakteri kültür süspansiyonu ilave edilmiştir. Resazurin solüsyonu 10 µl ilave edilmiştir. Dermatofitler için 28°C'de 72 saat, *Candida*'lar için 35°C'de 24 saat, bakteriler için 37°C'de 18 saat inkübasyon sonrası resazurinin metabolik aktivite sonunda resafurine dönüşerek oluşturduğu renk değişimi gözlemlenerek makroskobik olarak değerlendirilmiştir.

Bakterisit/ fungusit ve bakteristatik/ fungustatik konsantrasyonların belirlenmesi amacıyla MİK ve üstü dilüsyonlarında katı besiyerine ekim yapılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda üreme görülmeyen örnekler bakterisit/fungusit, üreme görülenler bakteristatik/fungustatik olarak değerlendirilmiştir.

Kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemi ile kantitatif inhibisyon konsantrasyonlarının (IC<sub>50</sub>) belirlenmesi amacıyla 600-690 nm absorbansta ELIZA mikropleyt okuyucu' da ölçüm yapılarak inhibisyon oranları denenen tüm mikroorganizmalar/test örnekleri ve

konsantrasyonları için belirlenmiştir. Grafiklerin oluşturulması ve % inhibisyon değerleri (% Inh.);  $\%Inh. = \frac{[Rezasurin + \text{çözücü} + \text{besiyeri}] - [Rezasurin + \text{mikroorganizma} + \text{besiyeri}]}{[Rezasurin + \text{mikroorganizma} + \text{besiyeri}]} \times 100$  değerlerine göre hesaplanmıştır

29, 30

#### 4. BULGULAR

*H. perforatum* ve *C. laurifolius*' un ekstre ve fraksiyonlarına ait *T. rubrum*, *E. floccosum* ve *M. gypseum*'a karşı antidermatofitik aktivite test sonuçları, sıvı mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen MİK değerleri ile birlikte MFS/MFC ve absorbansa bağlı % inhibisyon konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) değerleri Tablo-1'de görülmektedir.

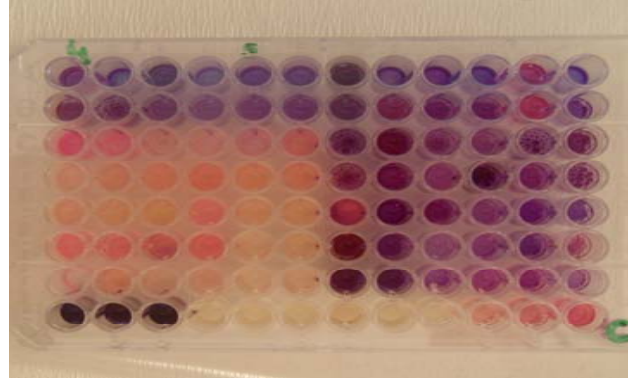
*H. perforatum* ve *C. laurifolius*' un ekstre ve fraksiyonlarına ait *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*'e karşı antifungal aktivite test sonuçları, sıvı mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen MİK değerleri ile birlikte MFS/MFC ve absorbansa bağlı % inhibisyon konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) değerleri Tablo-2'de görülmektedir.

*H. perforatum* ve *C. laurifolius*' un ekstre ve fraksiyonlarına ait antibakteriyel (Gram pozitif; *S. aureus*, *S. pyogenes*, *B. subtilis*, *E. faecalis*) aktivite test sonuçları, sıvı mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen MİK değerleri ile birlikte MBS/MBC ve absorbansa bağlı % inhibisyon konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) değerleri Tablo-3'de görülmektedir.

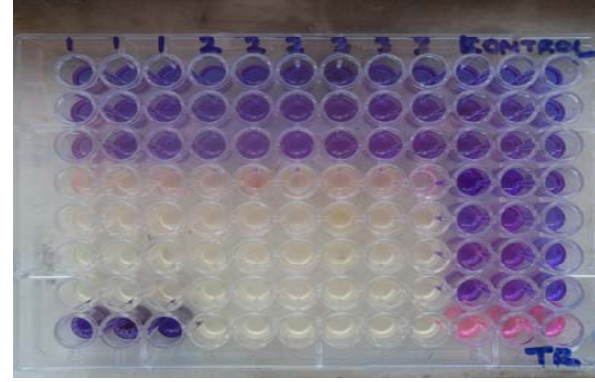
*H. perforatum* ve *C. laurifolius*' un ekstre ve fraksiyonlarına ait antibakteriyel (Gram negatif; *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*) aktivite test sonuçları, sıvı mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen MİK değerleri ile birlikte MBS/MBC ve absorbansa bağlı % inhibisyon konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) değerleri Tablo-4'de görülmektedir.

*H. perforatum* ve *C. laurifolius*' un ekstre ve fraksiyonlarına ait denenen tüm mikroorganizmalara karşı absorbansa bağlı % inhibisyon konsantrasyonları Şekil 1-28' de görülmektedir.

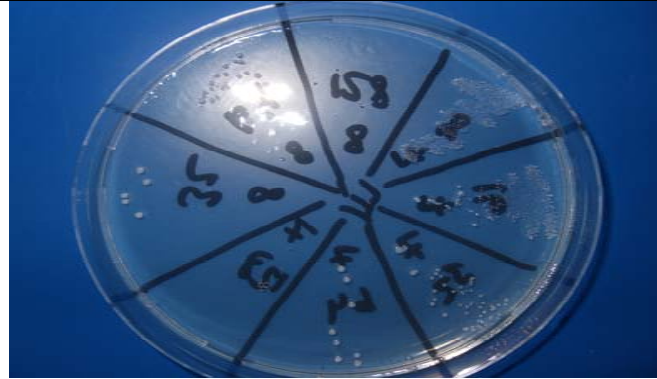




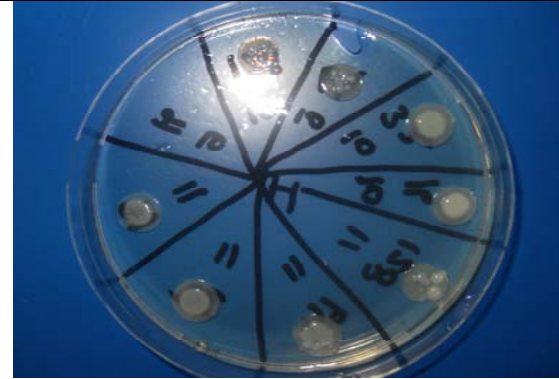
Resim 3: Kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle *H. perfortaum* (H<sub>2</sub>O, -EtOAc)'un *M. gypseum*' a karşı MİK görüntüsü.



Resim 4: Kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle *C. laurifolius* (-H<sub>2</sub>O, -EtOAc)'un *T. rubrum*'a karşı MİK görüntüsü.



Resim 5: *C. laurifolius* (-n-ButOH)' un *B. subtilis*'e karşı MBS/MBC görüntüsü.



Resim 6: *H. perfortaum* (-ButOH)'un *E. floccosum*'a karşı MFS/MFC görüntüsü.

**Tablo 1. Dermatofitlerde, denenen ekstrelerin ve kontrol maddelerin sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri ile absorbands değerlerine bağlı %50 inhibisyon konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) değerleri.**

Ekstreler	Dermatofitler											
	<i>Trycophyton rubrum</i> RSKK486				<i>Epidermophyton floccosum</i> RSKK3027				<i>Microsporum gypseum</i> NCPF 580			
	MİK <sub>a</sub>	MİK <sub>b</sub>	MFS/ MFC	IC <sub>50</sub>	MİK <sub>a</sub>	MİK <sub>b</sub>	MFS/ MFC	IC <sub>50</sub>	MİK <sub>a</sub>	MİK <sub>b</sub>	MFS/ MFC	IC <sub>50</sub>
<i>Hpp</i> -H <sub>2</sub> O	64	64	-/64	13	64	64	-/64	16	64	64	-/64	36
<i>Hpp</i> -EtOAc	32	32	-/32	16	32	64	32/64	16	64	64	-/64	35
<i>Hpp</i> -ButOH	32	64	32/64	16	128	128	128/-	17	32	64	32/64	37
<i>Hpp</i> -CHCl <sub>3</sub>	32	64	32/64	17	32	64	32/64	18	32	64	32/64	35
<i>Hpp</i> - HX.	32	64	32/64	17	128	128	128	17	32	64	32/64	35
<i>Hpp</i> -EtOH	32	64	32/64	17	32	64	32/64	17	32	64	-/64	34
<i>Cls</i> -H <sub>2</sub> O	32	64	32/64	18	32	64	32/64	19	32	64	-/64	20
<i>Cls</i> -EtOAc	32	64	32/64	16	32	64	32/64	18	32	64	32/64	17
<i>Cls</i> - <i>n</i> -ButOH	64	64	-/64	19	32	64	32/64	17	32	64	32/64	19
<i>Cls</i> -CHCl <sub>3</sub>	64	64	-/64	18	32	64	32/64	18	32	64	32/64	18
<i>Cls</i> -Hn	64	64	-/64	18	32	64	32/64	18	32	64	32/64	20
<i>Cls</i> -EtOH	32	32	-/32	17	32	64	32/64	18	32	64	32/64	18
ITRA	0.25	0.25			0.25	0.25			0.25	0.25		
GRI	0.5	0.5			0.5	0.5			0.5	0.5		
TER	0.125	0.125			0.125	0.125			0.125	0.125		
UMB	16	16			16	16			16	16		

*Hpp*: *Hypericum perforatum*, *Hpp*-H<sub>2</sub>O: Kalan su fazı, *Hpp*-EtOAc: etil asetat fraksiyonu, *Hpp*-ButOH: bütanol fraksiyonu, *Hpp*-CHCl<sub>3</sub>: kloroform fraksiyonu, *Hpp*-Hx: heksan fraksiyonu, *Hpp*-EtOH: etanol ekstresi, *Cls*: *Cistus laurifolius*, *Cls*-H<sub>2</sub>O: kalan su fazı, *Cls*-EtAc: etilasetat fraksiyonu, *Cls*-*n*-ButOH: *n*-butanol fraksiyonu, *Cls*-CHCl<sub>3</sub>: Kloroform fraksiyonu, *Cls*-Hx: heksan fraksiyonu, *Cls*-EtOH: etanollü ekstre, ITRA: itrakonazol, GRI: griseofulvin, TER: terbinafin, UMB: umbelliferon, MİK<sub>a</sub>: NCCLS kriterlerine göre, MİK<sub>b</sub>: Rezaurin-kolorimetrik yöntemle minimum inhibisyon dilüsyonu, MFS: Minimum fungustatik konsantrasyon, MFC: Minimum fungisit konsantrasyonu.

**Tablo 2. Maya benzeri funguslarda, denenen ekstrelerin ve kontrol maddelerin sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri ile absorbans değerlerine bağlı %50 inhibisyon konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) değerleri.**

Ekstreler	Maya benzeri funguslar											
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231				<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90028				<i>C. krusei</i> ATCC 6258			
	MİK <sub>a</sub>	MİK <sub>b</sub>	MFS/ MFC	IC <sub>50</sub>	MİK <sub>a</sub>	MİK <sub>b</sub>	MFS/ MFC	IC <sub>50</sub>	MİK <sub>a</sub>	MİK <sub>b</sub>	MFS/ MFC	IC <sub>50</sub>
<i>Hpp</i> -H <sub>2</sub> O	64	64	-/64	20	32	64	-/64	11	64	64	-/64	17
<i>Hpp</i> -EtOAc	32	64	32/64	21	32	32	-/32	15	64	64	-/64	15
<i>Hpp</i> -BuOH	64	64	-/64	21	32	32	-/32	15	64	64	-/64	18
<i>Hpp</i> -CHCl <sub>3</sub>	32	32	-/32	17	32	32	-/32	15	64	64	-/64	12
<i>Hpp</i> -Hx.	32	64	32/64	21	32	64	32/64	11	16	64	≥16/64	11
<i>Hpp</i> -EtOH	32	64	32/64	21	32	64	32/64	11	64	64	-/64	17
<i>Cls</i> -H <sub>2</sub> O	16	64	≥16/64	15	32	64	32/64	16	64	64	-/64	19
<i>Cls</i> -EtOAc	16	64	≥16/64	15	32	64	32/64	16	64	64	-/64	19
<i>Cls</i> - <i>n</i> -ButOH	32	64	32/64	18	64	64	-/64	18	64	64	-/64	20
<i>Cls</i> -CHCl <sub>3</sub>	32	64	32/64	11	32	64	32/64	16	64	64	-/64	17
<i>Cls</i> -Hn	32	64	32/64	11	32	64	32/64	15	64	64	-/64	19
<i>Cls</i> -EtOH	32	64	32/64	12	32	64	32/64	15	64	64	-/64	17
KET	1	1			1	1			4	4		
FLU	4	4			4	4			64	64		
UMB	8	8			8	8			8	8		

*Hpp*: *Hypericum perforatum*, *Hpp*-H<sub>2</sub>O: Kalan su fazı, *Hpp*-EtOAc: etil asetat fraksiyonu, *Hpp*-BuOH: bütanol fraksiyonu, *Hpp*-CHCl<sub>3</sub>: kloroform fraksiyonu, *Hpp*-Hx: heksan fraksiyonu, *Hpp*-EtOH: etanol ekstresi, *Cls*: *Cistus laurifolius*, *Cls*-H<sub>2</sub>O: kalan su fazı, *Cls*-EtAc: etilasetat fraksiyonu, *Cls* - *n*-ButOH: *n*-butanol fraksiyonu, *Cls*-CHCl<sub>3</sub>: Kloroform fraksiyonu, *Cls*- Hx: heksan fraksiyonu, *Cls*-EtOH: etanollü ekstre, KET: ketokonazol, FLU: flukonazol, UMB: umbelliferon, MİK<sub>a</sub>: NCCLS kriterlerine göre minimum inhibisyon dilüsyonu, MİK<sub>b</sub>: Rezasurin-kolorimetrik yöntemle minimum inhibisyon dilüsyonu, MFS: Minimum fungustatik konsantrasyon, MFC: Minimum fungusit konsantrasyonu.

**Tablo 3. Gram pozitif bakterilerde, denenen ekstrelerin ve kontrol maddelerin sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri ile absorbands değerlerine bağlı %50 inhibisyon konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) değerleri.**

Ekstreler	Gram- pozitif mikroorganizmalar															
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923				<i>S. pyogenes</i> ATCC 13615				<i>B. subtilis</i> ATCC 6633				<i>E. faecalis</i> ATCC 29212			
	MİK <sub>a</sub>	MİK <sub>b</sub>	MBS/ MBC	IC <sub>50</sub>	MİK <sub>a</sub>	MİK <sub>b</sub>	MBS/ MBC	IC <sub>50</sub>	MİK <sub>a</sub>	MİK <sub>b</sub>	MBS/ MBC	IC <sub>50</sub>	MİK <sub>a</sub>	MİK <sub>b</sub>	MBS/ MBC	IC <sub>50</sub>
<i>Hpp</i> -H <sub>2</sub> O	64	64	-/64	36	64	64	-/64	36	64	64	-/64	37	64	64	-/64	37
<i>Hpp</i> -EtOAc	64	64	-/64	36	64	64	-/64	35	64	64	-/64	37	64	64	-/64	36
<i>Hpp</i> -BuOH	64	128	64/128	38	64	64	-/64	37	64	128	64/128	40	64	128	64/128	36
<i>Hpp</i> -CHCl <sub>3</sub>	64	64	- /64	38	64	64	-/64	35	64	128	64/128	40	64	128	64/128	37
<i>Hpp</i> - Hx.	64	64	-/64	36	64	64	-/64	35	64	64	-/64	37	64	64	-/64	36
<i>Hpp</i> -EtOH	64	128	64/128	37	64	64	-/64	33	64	128	64/128	40	64	64	-/64	37
<i>Clis</i> -H <sub>2</sub> O	64	128	64/128	40	64	64	-/64	36	64	128	64/128	41	64	64	-/64	34
<i>Clis</i> -EtOAc	64	64	-/64	38	64	64	-/64	35	64	128	64/128	40	64	64	-/64	34
<i>Clis</i> - <i>n</i> -ButOH	64	64	-/64	37	64	64	-/64	35	64	64	-/64	30	64	64	-/64	35
<i>Clis</i> -CHCl <sub>3</sub>	64	64	-/64	38	64	128	64/128	38	64	128	64/128	41	64	64	-/64	33
<i>Clis</i> -Hx.	64	128	64/128	40	64	128	64/128	36	64	128	64/128	41	64	128	64/128	34
<i>Clis</i> -EtOH	64	64	-/64	36	64	64	-/64	35	64	128	64/128	41	64	64	-/64	35
AMP	<0.12	<0.12			<0.12	<0.12			0.12	0.12			0.5	0.5		
LFX	0.25	0.25			0.5	0.5			-	-			0.5	0.5		
UMB	8	8			8	8			8	8			8	8		

*Hpp*: *Hypericum perforatum*, *Hpp* - H<sub>2</sub>O: Kalan su fazı, *Hpp* - EtOAc: etil asetat fraksiyonu, *Hpp* - BuOH: bütanol fraksiyonu, *Hpp* - CHCl<sub>3</sub>: kloroform fraksiyonu, *Hpp*-Hx: hekzan fraksiyonu, *Hpp*-EtOH: etanol ekstresi, *Clis*: *Cistus laurifolius*, *Clis*-H<sub>2</sub>O: kalan su fazı, *Clis*-EtAc: etilasetat fraksiyonu, *Clis* - *n*-ButOH: *n*-butanol fraksiyonu, *Clis*-CHCl<sub>3</sub>: Kloroform fraksiyonu, *Clis*- Hx: hekzan fraksiyonu, *Clis*-EtOH: etanollü ekstre, AMP: ampicillin, LFX: levofloksazin, UMB: umbelliferon MİK<sub>a</sub>: NCCLS kriterlerine göre minimum inhibisyon dilüsyonu, MİK<sub>b</sub>: Rezasurin-kolorimetrik yöntemle minimum inhibisyon dilüsyonu, MBS: Minimum bakteriyostatik konsantrasyon, MBC: Minimum bakterisit konsantrasyonu.

**Tablo 4. Gram negatif bakterilerde, denenen ekstrelerin ve kontrol maddelerin sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri ile absorbands değerlerine bağlı %50 inhibisyon konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) değerleri.**

Ekstreler	Gram-negatif mikroorganizmalar															
	<i>E. coli</i> ATCC 25922				<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145				<i>K. pneumoniae</i> RSKK 574				<i>A. baumannii</i> RSKK02026			
	MİK <sub>a</sub>	MİK <sub>b</sub>	MBS/ MBC	IC <sub>50</sub>	MİK <sub>a</sub>	MİK <sub>b</sub>	MBS/ MBC	IC <sub>50</sub>	MİK <sub>a</sub>	MİK <sub>b</sub>	MBS/ MBC	IC <sub>50</sub>	MİK <sub>a</sub>	MİK <sub>b</sub>	MBS/ MBC	IC <sub>50</sub>
<i>Hpp</i> - H <sub>2</sub> O	32	64	32/64	17	32	64	32/64	15	32	64	32/64	15	32	64	32/64	19
<i>Hpp</i> -EtOAc	32	64	32/64	18	32	64	32/64	17	32	64	32/64	15	32	64	32/64	19
<i>Hpp</i> -BuOH	16	32	16/32	12	32	64	32/64	16	32	64	32/64	15	32	64	32/64	18
<i>Hpp</i> -CHCl <sub>3</sub>	16	64	≥16/64	15	32	64	32/64	20	16	32	16/32	14	32	64	32/64	18
<i>Hpp</i> - Hx.	16	64	≥16/64	16	32	64	32/64	19	16	32	16/32	14	32	64	32/64	19
<i>Hpp</i> - EtOH	16	32	16/32	10	32	64	32/64	18	32	64	32/64	15	32	64	32/64	18
<i>Cls</i> - H <sub>2</sub> O	16	64	≥16/64	12	32	64	32/64	15	32	64	32/64	19	32	64	32/64	20
<i>Cls</i> - EtOAc	16	64	≥16/64	13	32	64	32/64	15	32	64	32/64	18	32	64	32/64	18
<i>Cls</i> - <i>n</i> -ButOH	16	32	≥16/32	15	32	64	32/64	15	32	64	32/64	18	32	64	32/64	19
<i>Cls</i> -CHCl <sub>3</sub>	16	64	≥16/64	9	32	64	32/64	16	16	64	32/64	15	32	64	32/64	17
<i>Cls</i> -Hx.	16	64	≥16/64	13	32	64	32/64	15	32	64	32/64	18	32	64	32/64	19
<i>Cls</i> -EtOH	16	64	≥16/64	14	32	64	32/64	16	32	64	32/64	18	64	64	-/≥64	18
GM	-	-			0.5	0.5			-	-			-	-		
LFX	<0.12	<0.12			1	1			<0.12	<0.12			0.12	0.12		
UMB	16	16			16	16			16	16			16	16		

*Hpp*: *Hypericum perforatum*, *Hpp*-H<sub>2</sub>O: Kalan su fazı, *Hpp*-EtOAc: etil asetat fraksiyonu, *Hpp*-ButOH: bütanol fraksiyonu, *Hpp*-CHCl<sub>3</sub>: kloroform fraksiyonu, *Hpp*-Hx: hekzan fraksiyonu, *Hpp*-EtOH: etanol ekstresi, *Cls*: *Cistus laurifolius*, *Cls*-H<sub>2</sub>O: kalan su fazı, *Cls*-EtAc: etilasetat fraksiyonu, *Cls*-*n*-ButOH: *n*-butanol fraksiyonu, *Cls*-CHCl<sub>3</sub>: Kloroform fraksiyonu, *Cls*-Hx: hekzan fraksiyonu, *Cls*-EtOH: etanollü ekstre, GM: gentamisin, LFX: levofloksazin, UMB: umbelliferon, MİK<sub>a</sub>: NCCLS kriterlerine göre minimum inhibisyon dilüsyonu, MİK<sub>b</sub>: Rezasurin-kolorimetrik yöntemle minimum inhibisyon dilüsyonu, MBS: Minimum bakteriyostatik konsantrasyon, MBC: Minimum bakterisit konsantrasyonu.

Mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri sonucunda elde edilen MİK değerleri karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiğinde; her iki yöntemde *H. perforatum*'a ait bir fraksiyonda (-H<sub>2</sub>O), *C. laurifolius*'a ait üç fraksiyonda (*n*-BuOH, -CHCl<sub>3</sub>, -Hx), *T. rubrum*'a karşı 64 µg/ml'de antidermatofitik aktivite belirlenmiştir. Her iki yöntemde 32 µg/ml'de *H. perforatum* (-EtOAc) ve *C. laurifolius* (-EtOH)'a ait birer fraksiyonunda antidermatofitik aktivite görülmüştür. Farklı olarak; *Hpp*-ButOH, *Hpp*-CHCl<sub>3</sub>, *Hpp*-Hx, *Hpp*-EtOH, *Cls*-H<sub>2</sub>O ve *Cls*-EtOAc mikrodilüsyon yöntemiyle; 32 µg/ml'de MİK değeri verirken kolorimetrik mikrodilüsyon yönteminde 64 µg/ml'de MİK değeri vermiştir. MFS/MFC değerleri ise 32-64 µg/ml'de belirlenmiştir. IC<sub>50</sub> değerleri; 13-19 µg/ml'de belirlenmiştir (Tablo-1, Şekil 1-2).

Her iki yöntemde; *E. floccosum*'a karşı 64 µg/ml'de mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri 128 µg/ml'de *Hpp*-ButOH ve *Hpp*-Hx aynı konsantrasyonda minimum inhibisyonları belirlenirken farklı olarak *Hpp*-EtOAc, *Hpp*-CHCl<sub>3</sub>, *Hpp*-EtOH ve *Cls*'nin denenen tüm fraksiyonlarında 32-64 µg/ml'de belirlenmiştir. MFS/MFC 32-128 µg/ml'de görülmüştür. IC<sub>50</sub> değerleri 16-19 µg/ml'de belirlenmiştir (Tablo-1, Şekil 3-4).

*Hpp*-H<sub>2</sub>O, *Hpp*-EtOAc; *M. gypseum*'a karşı mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemlerinde 64 µg/ml'de MİK'u belirlenirken, *H. perforatum*'a ait denenen diğer fraksiyonlarında (*Hpp*-ButOH, *Hpp*-CHCl<sub>3</sub>, *Hpp*-Hx, *Hpp*-EtOH) mikrodilüsyon yöntemiyle 32 µg/ml, kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle 64 µg/ml'de MİK belirlenmiştir. MFS/MFC ise; 32-64 µg/ml'de, IC<sub>50</sub> değerleri 17-36 µg/ml'de görülmüştür (Tablo-1, Şekil 5-6).

Maya benzeri funguslarda her iki yöntem kıyaslandığında; *C. albicans*'a karşı *Hpp*-H<sub>2</sub>O, *Hpp*-ButOH 64 µg/ml'de, *Hpp*-CHCl<sub>3</sub> 32

$\mu\text{g/ml}$ 'de aynı MİK değerindeyken, test edilen diğer örneklerde (*Hpp*-EtOAc, *Hpp*-Hx, *Hpp*-EtOH, *Cls*-*n*-ButOH, *Cls*-CHCl<sub>3</sub>, *Cls*-Hx, *Cls*-EtOH) mikrodilüsyon yönteminde MİK: 32  $\mu\text{g/ml}$ , kolorimetrik mikrodilüsyon yönteminde ise 64  $\mu\text{g/ml}$ 'de MİK belirlenmiştir. MFS/MFC ise;  $\geq 16$ -64  $\mu\text{g/ml}$ 'de, IC<sub>50</sub> değerleri 11-21  $\mu\text{g/ml}$ 'de belirlenmiştir (Tablo-2, Şekil 7-8).

Her iki yöntemle, *C. parapsilosis* için; *Hpp*-EtOAc, *Hpp*-ButOH ve *Hpp*-CHCl<sub>3</sub>, 32  $\mu\text{g/ml}$ 'de, *Cls*-*n*-ButOH 64  $\mu\text{g/ml}$  aynı MİK değerini vermiştir. Denenen diğer tüm test örneklerinde ise mikrodilüsyon yöntemiyle 32  $\mu\text{g/ml}$ , kolorimetrik mikrodilüsyon yönteminde ise 64  $\mu\text{g/ml}$ 'de MİK gözlemlenmiştir. MFS/MFC ise; 32-64  $\mu\text{g/ml}$ 'de, IC<sub>50</sub> değerleri 11-16  $\mu\text{g/ml}$ 'de belirlenmiştir (Tablo-2, Şekil 9-10).

Tüm test örneklerinde *C.krusei*' ye karşı her iki yöntemle de MİK değeri *Hpp*-Hx hariç (16-64  $\mu\text{g/ml}$ ) 64  $\mu\text{g/ml}$ 'de belirlenmiştir. MFS/MFC ise;  $\geq 16$ -64  $\mu\text{g/ml}$ 'de, IC<sub>50</sub> değerleri 11-20  $\mu\text{g/ml}$ 'de belirlenmiştir (Tablo-2, Şekil 11-12).

Mikrodilüsyon yöntemiyle tüm test örneklerinde; *S. aureus*'a 64  $\mu\text{g/ml}$ ' de antibakteriyel aktivite belirlenirken, kolorimetrik mikrodilüsyon yönteminde; farklı olarak *Hpp*-ButOH, *Hpp*-EtOH, *Cls*-H<sub>2</sub>O, *Cls*-Hx 128  $\mu\text{g/ml}$ 'de MİK değeri belirlenmiştir. MBS/MBC ise; 64-128  $\mu\text{g/ml}$ 'de, IC<sub>50</sub> değerleri 36-40  $\mu\text{g/ml}$ 'de belirlenmiştir (Tablo-3, Şekil 13-14).

*S. pyogenes*' e karşı her iki yöntemde *Cls*-CHCl<sub>3</sub> ve *Cls*-Hx hariç (128  $\mu\text{g/ml}$ ) denenen tüm örnekler; 64  $\mu\text{g/ml}$ 'de MİK belirlenmiştir. MBS/MBC ise; 64-128  $\mu\text{g/ml}$ 'de, IC<sub>50</sub> değerleri 33-38  $\mu\text{g/ml}$ 'de belirlenmiştir (Tablo-3, Şekil 15-16).

*B. subtilis*' e karşı, her iki yöntemde *Hpp*-H<sub>2</sub>O, *Hpp*-EtOAc, *Hpp*-Hx, *Cls*-*n*-ButOH 64  $\mu\text{g/ml}$ 'de MİK değeri vermiştir. Mikrodilüsyon

yönteminde; 64 µg/ml kolorimetrik mikrodilüsyon yönteminde ise 128 µg/ml'de diğer test örneklerinde (*Hpp*-ButOH, *Hpp*-CHCl<sub>3</sub>, *Hpp*-EtOAc, *Cl*s-H<sub>2</sub>O, *Cl*s-EtOAc, *Cl*s-CHCl<sub>3</sub>, *Cl*s-Hx, *Cl*s-EtOH) antibakteriyel aktivite belirlenmiştir. MBS/MBC ise; 64-128 µg/ml'de, IC<sub>50</sub> değerleri 30-41 µg/ml'de belirlenmiştir (Tablo-3, Şekil 17-18).

Mikrodilüsyon yöntemiyle antibakteriyel aktivite *E. faecalis*'e karşı denenen tüm test örneklerinde 64 µg/ml'de; kolorimetrik mikrodilüsyon yönteminde ise farklı olarak *Hpp*-ButOH, *Hpp*-CHCl<sub>3</sub> ve *Cl*s-Hx'da 128 µg/ml'de belirlenmiştir. MBS/MBC ise; 64-128 µg/ml'de, IC<sub>50</sub> değerleri 33-37 µg/ml'de belirlenmiştir (Tablo-3, Şekil 19-20).

Gram negatif bakterilerden; *E. coli*'ye karşı, mikrodilüsyon yöntemiyle MİK: 32 µg/ml'de iki fraksiyonda (*Hpp*-H<sub>2</sub>O, *Hpp*-EtOAc) ve denenen diğer test örneklerinde (*Hpp*-ButOH, *Hpp*-CHCl<sub>3</sub>, *Hpp*-Hx, *Hpp*-EtOH, *Cl*s-H<sub>2</sub>O, *Cl*s-EtOAc, *Cl*s-*n*-ButOH, *Cl*s-CHCl<sub>3</sub>, *Cl*s-Hx, *Cl*s-EtOH) 16 µg/ml'de belirlenmiştir. Kolorimetrik mikrodilüsyon yönteminde ise farklı olarak MİK 64 µg/ml'de; *Hpp*-H<sub>2</sub>O, *Hpp*-EtOAc, *Hpp*-CHCl<sub>3</sub>, *Hpp*-Hx, *Cl*s-H<sub>2</sub>O, *Cl*s-EtOAc, *Cl*s-Hx, *Cl*s-EtOH'de belirlenmiştir. MBS/MBC ise; ≥16-64 µg/ml'de, IC<sub>50</sub> değerleri 9-18 µg/ml'de belirlenmiştir (Tablo-4, Şekil 21-22).

Mikrodilüsyon yöntemiyle *P. aeruginosa*'ya karşı tüm test örneklerinde 32 µg/ml' de belirlenirken, kolorimetrik mikrodilüsyon yönteminle 64 µg/ml'de belirlenmiştir. MBS/MBC ise; 32-64 µg/ml'de, IC<sub>50</sub> değerleri 15-20 µg/ml'de belirlenmiştir (Tablo-4, Şekil 23-24).

*K. pneumonia*'ya karşı mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen 32 µg/ml' deki MİK değeri test örneklerinde (*Hpp*-H<sub>2</sub>O, *Hpp*- EtOAc, *Hpp*-ButOH, *Hpp*-EtOH, *Cl*s-H<sub>2</sub>O, *Cl*s-EtOAc, *Cl*s-*n*-ButOH, *Cl*s-Hx, *Cl*s-EtOH) belirlenirken kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle 64 µg/ml'de tespit

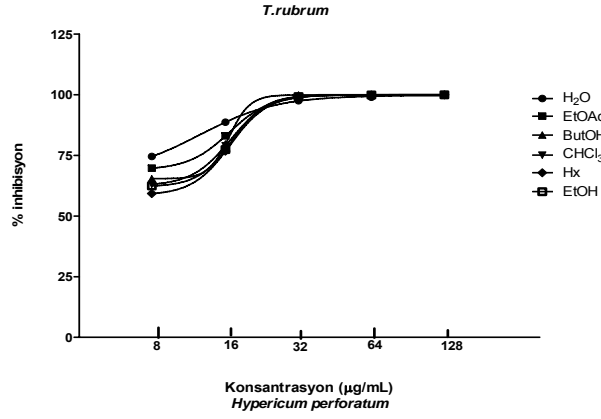


edilmiştir. Bunlardan farklı olarak mikrodilüsyon yöntemiyle; *Hpp*-CHCl<sub>3</sub>, *Hpp*-Hx, *Cls*-CHCl<sub>3</sub>'da MİK 16 µg/mL'de tespit edilirken kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle *Cls*-CHCl<sub>3</sub> hariç (64 µg/ml) 32 µg/ml'de tespit edilmiştir. MBS/MBC ise; 16-64 µg/ml'de, IC<sub>50</sub> değerleri 14-19 µg/ml'de belirlenmiştir (Tablo-4, Şekil 25-26).

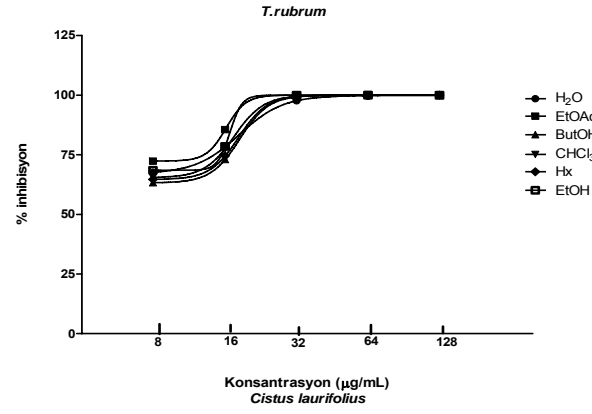
Antibakteriyel aktivite; *A. baumannii*'ye karşı tüm test örneklerinde; *Cls*-EtOH hariç mikrodilüsyon yöntemiyle MİK: 32 µg/ml'de kolorimetrik dilüsyon yöntemiyle ise MİK: 64 µg/ml'de tespit edilmiştir. *Cls*-EtOH ise her iki yöntemde de 64 µg/ml'de aktivite göstermiştir (Tablo-4, Şekil 27-28).

Mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen MİK değerleri ile kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen MİK değerleri; bakterisit/fungusit konsantrasyonları ile birlikte değerlendirildiğinde; kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen MİK değerlerinin bakterisit/fungusit konsantrasyonları ile aynı değerlerde olduğu görülmüştür, kontrol ajanlar için denenen tüm dozlarda % 99.99 inhibisyon belirlenmiştir.

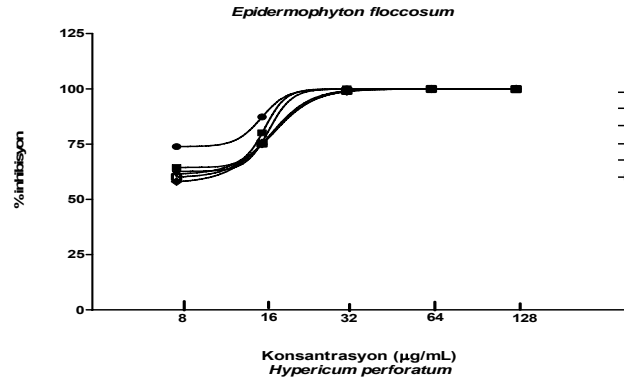
## ŞEKİLLER



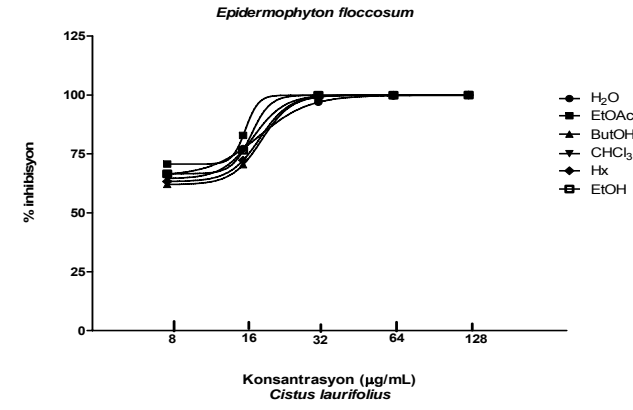
Şekil 1: *Hpp.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *T. rubrum* 'a karşı % inhibisyonu



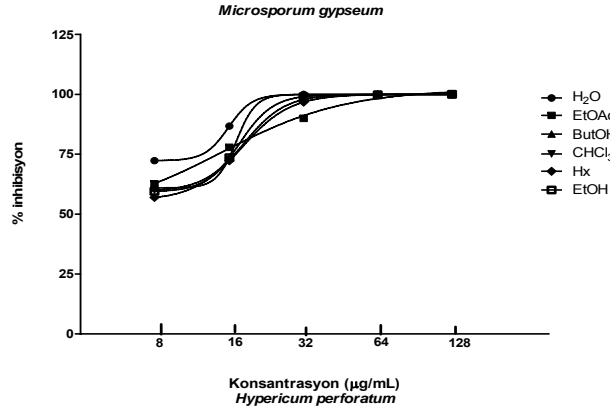
Şekil 2: *Cls.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, *n*-ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *T. rubrum*'a karşı % inhibisyonu



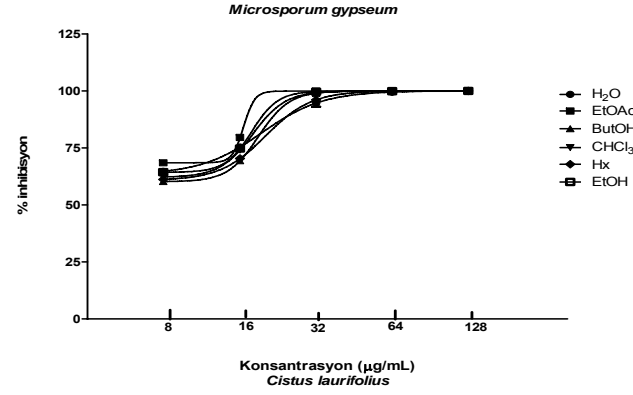
Şekil 3: *Hpp.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *E. floccosum*'a % inhibisyonu



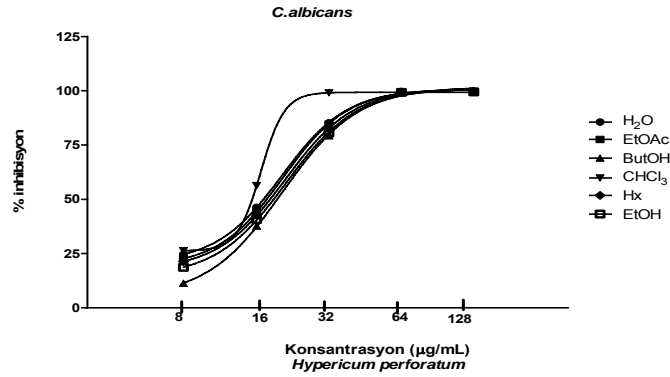
Şekil 4: *Cls.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, *n*-ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *E. floccosum*'a karşı % inhibisyonu



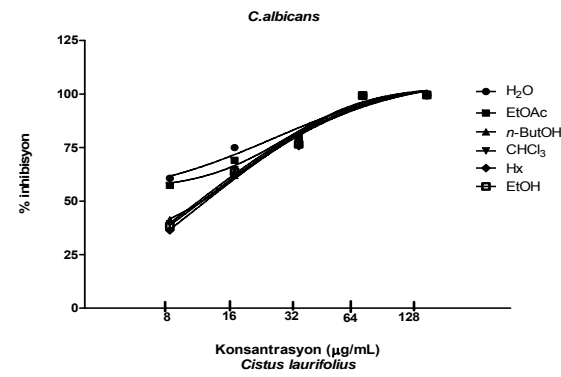
Şekil 5: *Hpp.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *M. gypseum*'a karşı % inhibisyonu



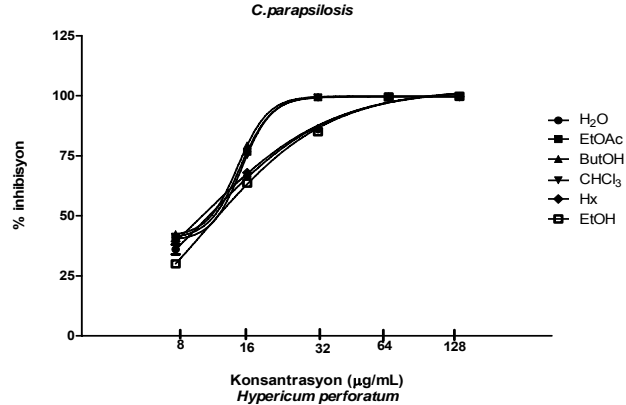
Şekil 6: *Cls.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, *n*-ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *M. gypseum*'a karşı % inhibisyonu



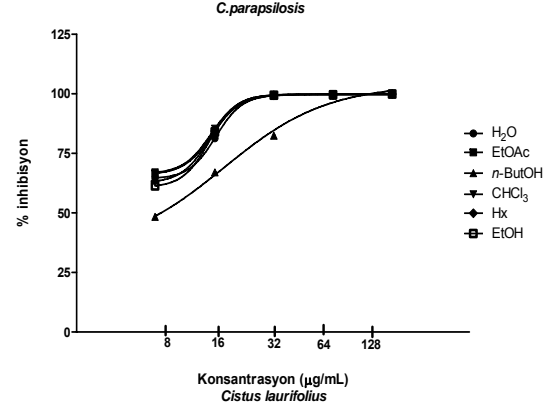
Şekil 7: *Hpp.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *C. albicans*'a karşı % inhibisyonu



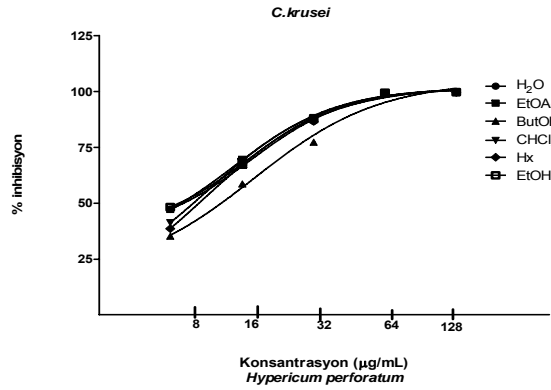
Şekil 8: *Cls.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, *n*-ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *C. albicans*'a karşı % inhibisyonu



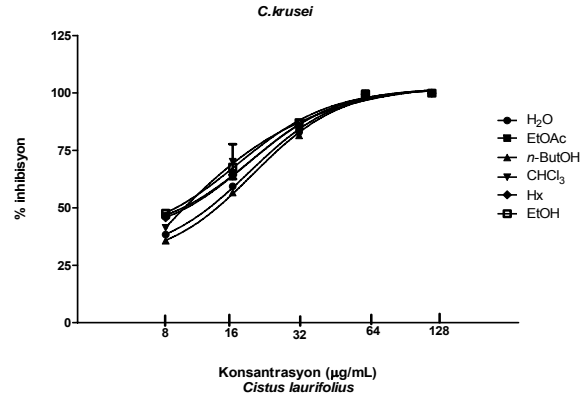
Şekil 9: *Hpp.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *C. parapsilosis*'a karşı % inhibisyonu



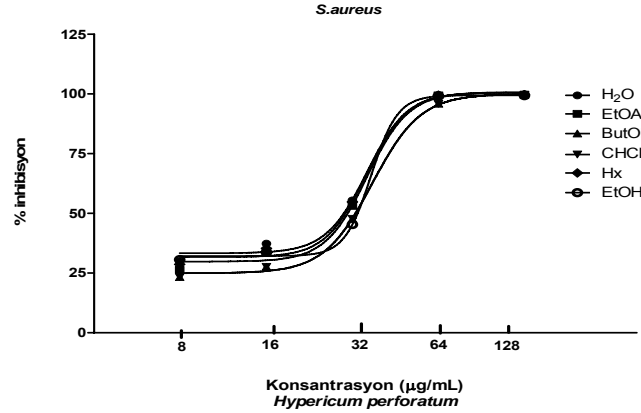
Şekil 10: *Cl.s.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, n-ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *C. parapsilosis*'a karşı % inhibisyonu



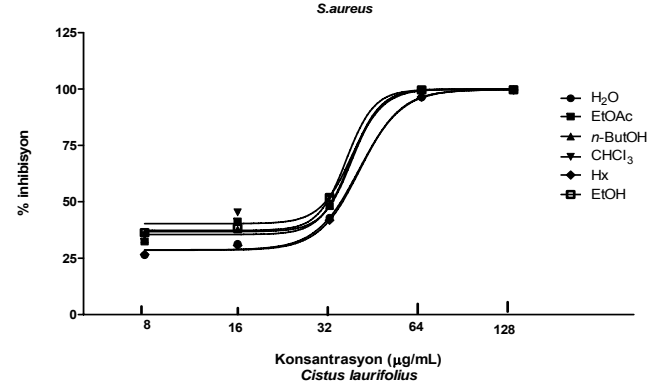
Şekil 11: *Hpp.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *C. krusei*'ye karşı % inhibisyonu



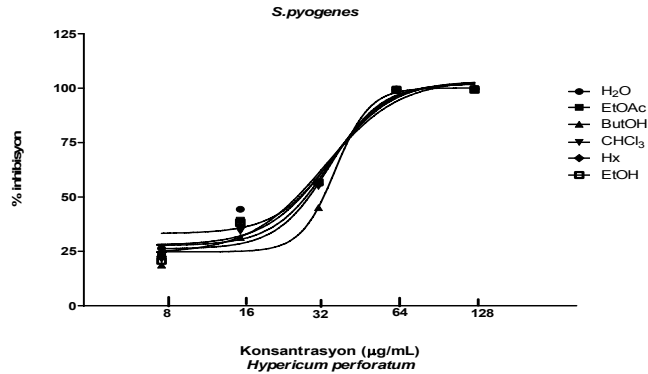
Şekil 12: *Cl.s.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, n-ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *C. krusei*'ye karşı % inhibisyonu



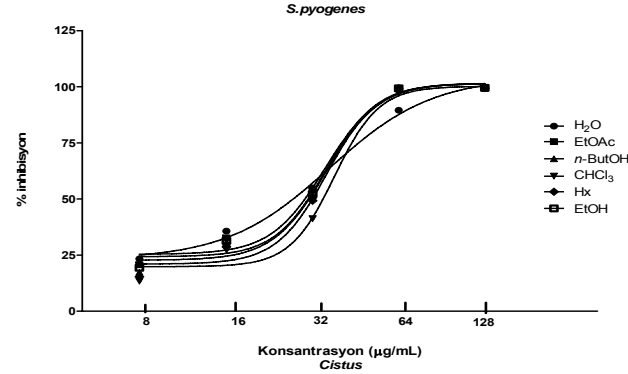
Şekil 13: *Hpp.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *S. aureus* 'a karşı % inhibisyonu



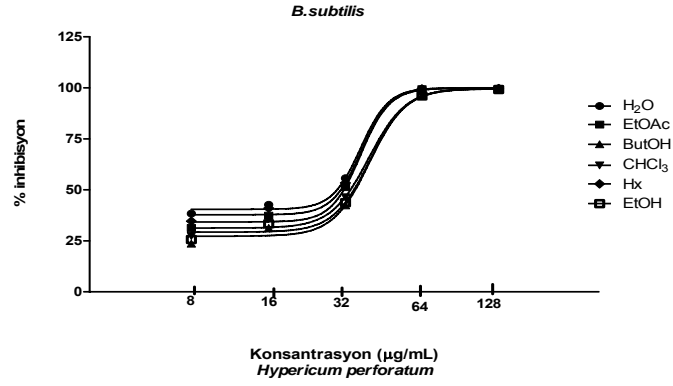
Şekil 14: *Cl.s.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, *n*-ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *S. aureus* 'a karşı % inhibisyonu



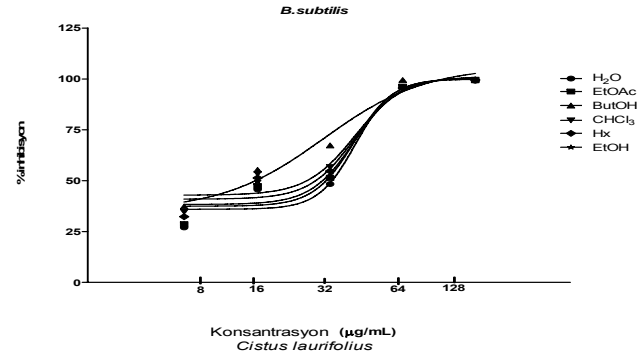
Şekil 15: *Hpp.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *S. pyogenes*'e karşı % inhibisyonu



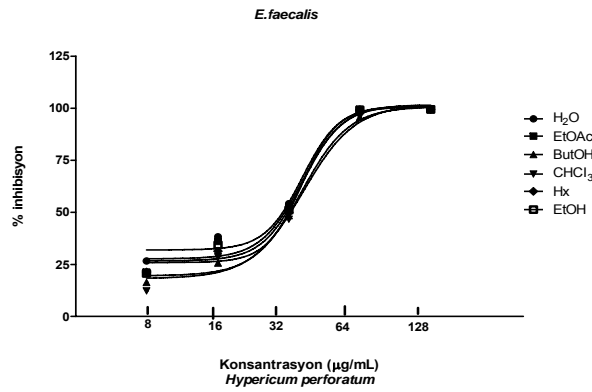
Şekil 16: *Cl.s.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, *n*-ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *S. pyogenes*'a karşı % inhibisyonu



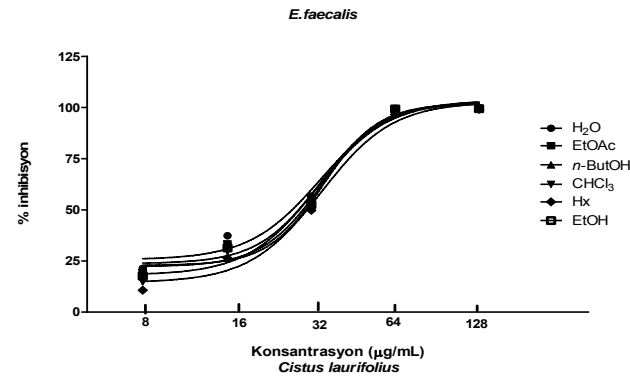
Şekil 17: *Hpp.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *B. subtilis*'e karşı % inhibisyonu



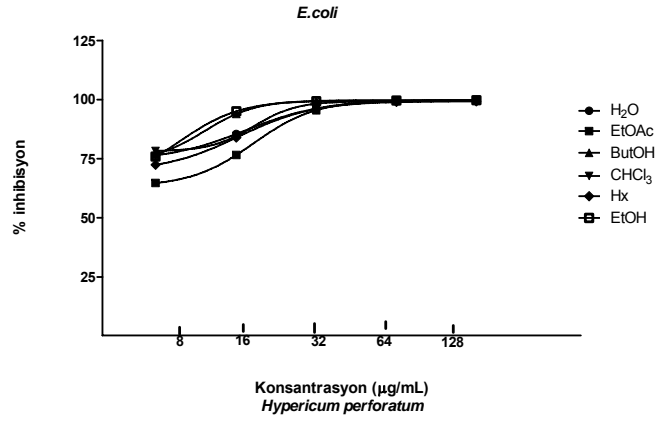
Şekil 18: *Cl.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, *n*-ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *B. subtilis*'e karşı % inhibisyonu



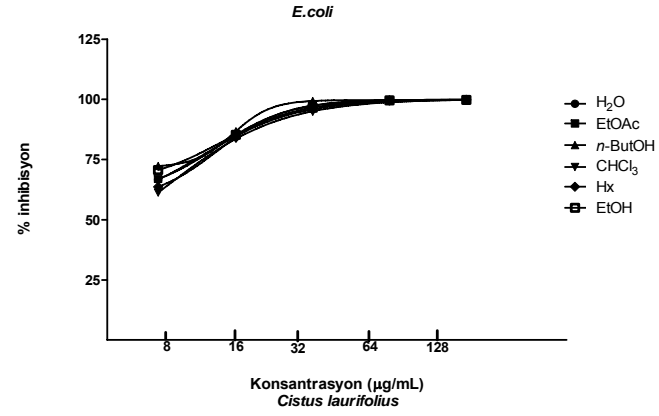
Şekil 19: *Hpp.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *E. faecalis*'e karşı % inhibisyonu



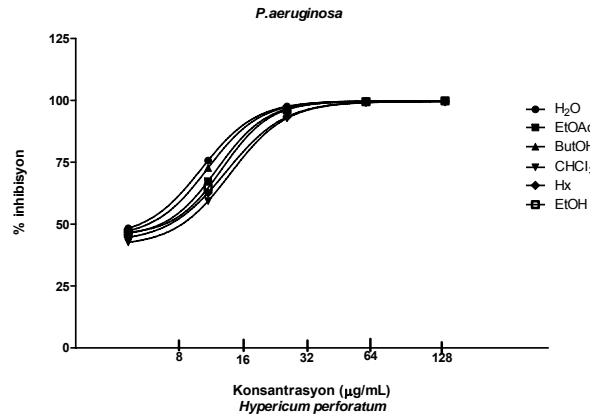
Şekil 20: *Cl.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, *n*-ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *E. faecalis*'e karşı % inhibisyonu



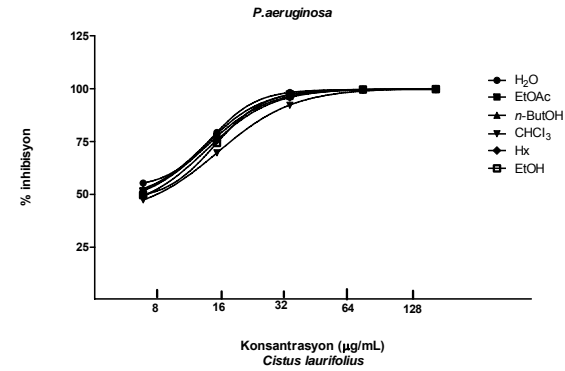
Şekil 21: *Hpp.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *E. coli*'ye karşı % inhibisyonu



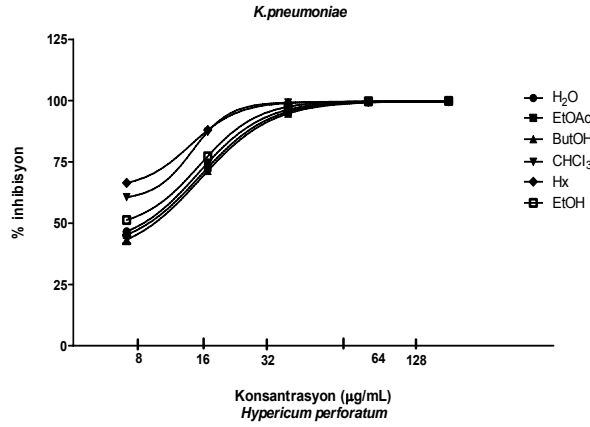
Şekil 22: *Cl.s.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, *n*-ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *E. coli*'ye karşı % inhibisyonu



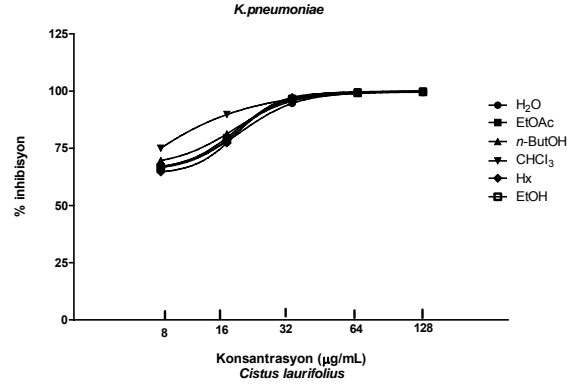
Şekil 23: *Hpp.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *P. aeruginosa*'ya karşı % inhibisyonu



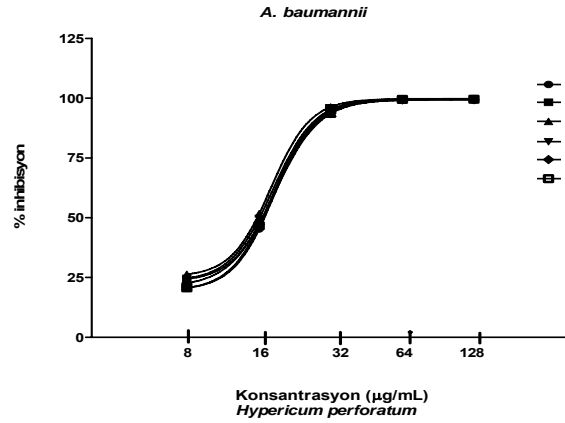
Şekil 24: *Cl.s.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, *n*-ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *P. aeruginosa*'ya karşı % inhibisyonu



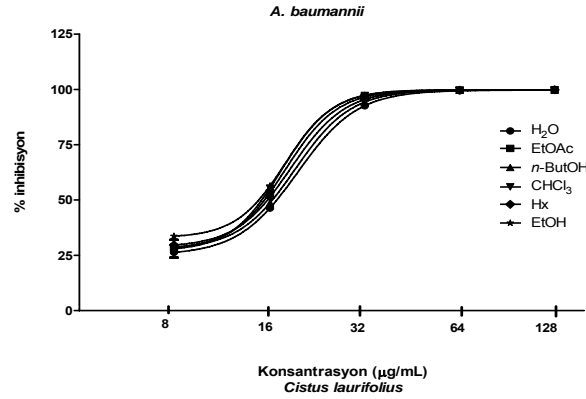
Şekil 25: *Hpp.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *K. pneumoniae*'ya karşı % inhibisyonu



Şekil 26: *Cl.s.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, *n*-ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *K. pneumoniae* 'ya karşı % inhibisyonu



Şekil 27: *Hpp.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *A. baumannii*'ye karşı % inhibisyonu



Şekil 28: *Cl.s.* fraksiyonlarının (H<sub>2</sub>O, EtOAc, *n*-ButOH, CHCl<sub>3</sub>, Hx, EtOH) *A. baumannii*'ye karşı % inhibisyonu.



## 5. TARTIŞMA

Araştırmamıza mikrodilüsyon, kolorimetrik mikrodilüsyon ve kantitatif spektrofotometrik ölçüm olmak üzere *Hypericum perforatum* (*Hpp*) ve *Cistus laurifolius* (*Cls*)'a ait ekstre ve alt fraksiyonlarına ait test örneklerinde; antidepatofitik aktivite sonuçlarıyla birlikte antifungal ve antibakteriyel aktiviteleri belirlenmiştir (Tablo 1-4, Şekil 1-28).

Şu anda mevcut olan referans yöntemlerden; CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute; önceki adıyla NCCLS) tarafından maya (CLSI, M27-A2), küfler (CLSI, M38-A) ve dermatofitler için (CLSI, M38-A2) için geliştirilen mikrodilüsyon yöntemi, *Candida* (flukonazol, vorikonazol) için geliştirilen disk difüzyon yöntemi EUCAST (European Confederation of Antifungal Susceptibility Testing) tarafından CLSI yöntemi modifiye edilerek mayalar için geliştirilen mikrodilüsyon yöntemidir 4-6,31,32

Referans mikrodilüsyon yöntemlerinin, uzun sürede sonuç vermesi, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK; µg/ml) sonuçlarının okunmasının zor olması ve bazı izole suşlar için MİK direnç sınır değerlerinin mevcut antimikrobiyal ajanlar için henüz kesin olarak bilinmemesi gibi bazı dezavantajları halen bulunmaktadır. Antimikrobiyal ajanlara duyarlılıkların belirlenmesinde standart yöntemlerin geliştirilmesiyle birlikte halen duyarlılık standartlarının; daha kısa sürede, daha güvenilir ve pratik yöntemlerin geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir 32-38.

Bu konu ile ilgili yapılan bazı çalışmalar, E test (AB BioDisk) ve ticari olarak mevcut olan kolorimetrik bir sistem olan sensititre yeast one'ı (TREK Diagnostic Systems) referans yöntem ile karşılaştırmalı olarak araştırılmış ve sonuçları, referans yöntem ile bu yöntemler

arasındaki uyum oranlarının genelde iyi düzeyde olduğunu bildirilmekle birlikte bazı izole suşlar için duyarlılık ya da direncin MİK değeri sınır değerlere yakın olabilen türlere ait suşlarda uyum oranlarının düşük olabileceği bildirilmiştir<sup>34,35</sup>. Bir başka yöntem olan; tetrazolyum tuzunun (XTT) indirgenmesi esasına dayanan ve bir kolorimetrik metabolik test olan XTT testi ise, *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* ve *Zygomycetes* sınıfındaki mantarların antifungal ilaçlara duyarlılığını belirlemek amacıyla denenilen testlerden biridir<sup>36, 37</sup>. XTT testi, standart yöneme göre daha kısa sürede sonuç verme avantajını sunmakta ise de, bu konu ile ilgili veriler henüz sınırlı ve araştırma aşamasında olup, daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim olduğu bildirilmektedir. Flow sitometre ile antifungal ilaçlara duyarlılığın belirlenmesinde araştırılan diğer yöntemlerdir. Flowsitometre özel donanım gerektirmesi nedeniyle, yaygın kullanımı sınırlandırdığı bildirilmektedir<sup>39,40</sup>.

Antidermatofitik aktivite testleri arasında yer alan; inhibisyon zonu (mm) belirlemeye yönelik oluk yöntemi ve disk difüzyon yöntemi ile mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak aktif konsantrasyonun; minimum inhibisyon konsantrasyonunu (MİK; µg/ml) belirlenmesi amacıyla farklı bitki türlerine ait ekstrelerde daha önceden yapılmış araştırmalar bulunmaktadır<sup>41-55</sup>.

Araştırmamıza benzer şekilde; Santos ve ark.'larının mikrodilüsyon yöntemiyle araştırdıkları çalışmalarında; *Copaiba* türlerinden elde edilen yağlarda Gram pozitif bakterilerden; *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* ve *E. faecalis*'e 31,3-62,5 µg/ml'de aktivite bildirilmişlerdir. Bitkinin diğer türlerinde (*C. cearensis*, *C. langsdorffii*, *C. multijuga*) ise; *T. mentagrophytes*, *M. canis* ve *T. rubrum*'a karşı 250-500 µg/ml'de aktivite saptamışlardır<sup>41</sup>. Araştırmamızda; *T. rubrum*'a karşı mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyonda yöntemi ile *H. perforatum* (*Hpp*) ve *C. laurifolius* (*Cls*)'a ait ekstre ve fraksiyonlarında; 32-64 µg/ml'de

antidermatofitik aktivite belirlenmiştir (Tablo 1). Denenen örneklerde; *Hpp*-EtOAc ve *Cls*-EtOH (32 µg/ml) hariç tüm test örneklerinde; 64 µg/ml'de fungusit etki görülmüştür. *T. rubrum*'a karşı her iki yöntemde; *Hpp* ve *Cls* için belirlenen MİK değerinin MFC ile aynı değerde olduğu dolayısıyla; kolorimetrik mikrodilüsyon testinde elde edilen veriler değerlendirildiğinde; kalitatif olarak fungusidal değeri verdiği görülmüştür (Tablo-1, Şekil: 1-2 ).

Stein ve ark.'ları *Pterocaulon* (Asteraceae) türlerinde; mikrodilüsyon yöntemiyle yaptıkları araştırmada, *P. polystachyum* ait hekzan ekstralarında; *Cryptococcus neoformans*'a karşı 125 µg/ml'de, *T. rubrum*'a karşı 62,5 µg/ml'de, *M. gypseum* ve *T. mentagrophytes*'e karşı 31,25 µg/ml'de antifungal ve antidermatofitik aktivite rapor etmişlerdir<sup>42</sup>. Araştırmamızda; *E. floccosum*'a karşı; mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemi ile *Hpp* ve *Cls*'ye ait ekstre ve fraksiyonlarında 32-128 µg/ml'de antidermatofitik aktivite belirlenmiştir (Tablo 1). Farklı olarak, mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleriyle; *Hpp*-ButOH'de; *E. floccosum*'a karşı aynı MİK (128 µg/ml) değeri belirlenirken; MFS değerinin 128 µg/ml olduğu görülmüştür. Dolayısıyla; denenen en yüksek dozda, kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen MİK değerinin MFS değerini verebileceği görülmüştür (Tablo-1, Şekil: 3-4).

Bir başka araştırmada ise; Premkumar ve Shyamsundar mikrodilüsyon yöntemiyle; *Pistia stratiotes* ekstelerinde; *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* ve *E. floccosum*'a karşı; 250 µg/ml'de, *M. gypseum* ve *M. nanum*'a karşı ise 125 µg/ml'de antidermatofitik aktivite göstermişlerdir<sup>15</sup>. Benzer bir araştırmada; Koroishi ve ark.'ları *Piper regnelli* yapraklarının ekstralarında MİK değerlerini, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* ve *M. canis* için; 15,62 µg/ml, *M. gypseum* için 62,5 µg/ml'de belirlemişlerdir<sup>43</sup>. Araştırmamızda; *M. gypseum*'a karşı; mikrodilüsyon yöntemi ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemi ile *Hpp* ve *Cls*'ye ait ekstre ve fraksiyonlarında; 32-64 µg/ml'de antidermatofitik aktivite belirlenmiştir

(Tablo 1). Antidermatofitik aktivite testinde; 13–36 µg/ml arlığında belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerinin kantitatif sonuç vermesi önemli görülmüştür (Tablo-1, Şekil: 5-6 ).

Natarajan ve ark.'ları tüpte makrodilüsyon yöntemiyle yaptıkları araştırmada; *Azadirachta indica* yapraklarının dermatofitler üzerine etkisini enatoll ekstrelerde *T. rubrum* ve *T. nanum*'a karşı MİK; 250 µg/ml'de, *T. mentagrophytes*'de ise 125 µg/ml'de belirlemişlerdir<sup>44</sup>. Benzer Şekilde; Fontelle ve ark.'ları *Croton*'a ait türlerde en yüksek antidermatofitik aktiviteyi *Croton argyrophyloides*' de MİK 9-19 µg/ml ve MFC' u ise; 39-78 µg/ml' de belirlemişlerdir<sup>16</sup>. Markin ve ark.'ları inkübasyon sürelerini de karşılaştırarak yaptıkları çalışmada; zeytin yaprağının %1.25' lik ekstresinin 3 günlük inkübasyonu sonunda; *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*'i; %15 lik ekstresinin ise, 24 saatlik inkübasyon sonrasında; *C. albicans* 'ı inhibe ettiğini göstermişlerdir<sup>45</sup>. Araştırmamızda; kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemi ile paralel mikrodilüsyon yöntemi *C. albicans*'a karşı en yüksek MİK; 64 µg/ml' de; *H. perforatum*' a ait *Hpp*-H<sub>2</sub>O/ButOH'de belirlenmiştir. en düşük MİK değeri ise mikrodilüsyon yönteminde 16 µg/ml' de; *C/s*-H<sub>2</sub>O/EtOAc farksiyonlarında görülmüştür, bu değerler kolorimetrik mikrodilüsyon için MİK; 64 µg/ml olarak belirlenmiştir. *C/s*-H<sub>2</sub>O/EtOAc farksiyonları için ≥16/64 konsantrasyon aralığında belirlenen; MFS/MFC göz önüne alındığıında; kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemi ile fungisid konsantrasyonun aynı değerde olduğu görülmüştür (Tablo-2, Şekil: 7-8 ).

Heisey ve ark.'ları, *T. rubrum*'a karşı bitkisel ekstrelerde disk difüzyon yöntemiyle inhibisyon zon çaplarını araştırdıkları çalışmalarında; antidermatofitik aktiviteyi; *Chenopodium ambrosioides* ekstrelerinde 8 mm'de, *Juglans nigra* eksteleri için 15 mm'de, *J. Virginiana* için 24 mm'de oluşturdukları inhibisyon zonlarına göre değerlendirmişlerdir<sup>13</sup>. Aynı yöntem ile; Prasad ve ark.'ları, *Psoralea corylifolia* metanol ekstresinde; *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum* ve *M. gypseum*'a karşı; 28

mm'lik inhibisyon zonu oluşturduğunu göstermişlerdir<sup>11</sup>. Benzer şekilde; Shamim ve ark.'ları agar difüzyon yöntemiyle *Allium sativum*, *Aloe barbadensis* ve *Solanum nigrum* türlerinin sulu ve etanolü ekstrelerinin antifungal ve antidermatofitik aktivitesini; inhibisyon zon çaplarına göre araştırmış ve etanolü ekstrelerin sulu ekstrele göre daha etkin olduğunu rapor etmişlerdir. Ekstrelerin; *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *T. mentagrophytes*'e karşı 41-50 mm'de, *T. rubrum*'u karşı; 31-40 mm'de inhibisyon zonu oluştururken, *E. floccosum*'a karşı aktivite olmadığını belirlemişlerdir<sup>46</sup>. Batinelli ve ark.'ları *Olea europaea* meyvesindeki alifatik aldehitlerin *M. canis* ve *T. mentagrophytes* karşı MİK <1.9-125 µg/ml aralığında belirlemişlerdir<sup>47</sup>. Cavaliero ve ark.'ları *Juniperus* uçucu yağlarında yaptıkları araştırmada; *Aspergillus*, *Candida* ve dermatofitlere karşı MİK değerini; *J. oxycedrus ssp. oxycedrus*'da 0.08–0.16 µl/ml'de göstermişlerdir<sup>48</sup>. Araştırmamıza; *C. parapsilosis*'e karşı mikrodilüsyon yöntemi ile *Cl*s-*n*-ButOH hariç tüm ekstre ve fraksiyonlarda; MİK; 32 µg/ml kolorimetrik mikrodilüsyon yönteminde ise; MİK; 64 µg/ml'de *Hpp*-etilasetat, butanol ve kloroform ekstreleri hariç tümünde belirlenmiştir (Tablo-2, Şekil: 9-10 ).

Garcia ve ark.'ları farklı bitki ekstreleriyle yaptıkları çalışmalarında, *Eupatorium aschenbornianum* (Asteraceae) yapraklarının hekzanlı ekstrelerinin *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* ve *C. albicans*'a karşı sırasıyla; 0.3, 0.03, 8.0 mg/ml'de, *Sedum oxypetalum* (Crassulaceae)'un ise her mikroorganizmaya 8.0 mg/ml'de antidermatofitik ve antifungal etkisini belirlemişlerdir<sup>49</sup>. Tosun ve ark.'ları *C. albicans* ve *C. krusei*' ye karşı disk difüzyon yöntemi ile yaptıkları araştırmada; *Allium rotundum*'un 15 ve 10 mm, *Anthemis tinctoria*'nın ise 11 ve 12 mm inhibisyon çapı oluşturduğunu göstermişlerdir<sup>50</sup>. Aynı yöntem ile yaptıkları araştırmada; Uzel ve ark.'ları *Anthemis xylopoda* temel yağlarının *C. albicans*, *C. krusei* ve *C. tropicalis* için sırasıyla; 7.8, 7.5, 8.3 mm'de inhibisyon zonu oluşturdukları belirlemişlerdir<sup>51</sup>. Araştırmamızda; *H. perforatum*, *C. laurifolis* ekstre ve fraksiyonlarının *C. krusei*' ye karşı

antifungal aktivitesi mikrodilüsyon yöntemi ile; *Hpp*-hekzan (MİK;16 µg/ml) ekstresi hariç tümü için; 64, kolorimetrik mikrodilüsyon testi için ise tüm ekstre örneklerinde; 64 µg/ml'de belirlenmiştir (Tablo-2, Şekil: 11-12 ).

Rojas ve ark.'ları agar dilüsyon yöntemiyle; *Distictis buccinatori* ekstrelerinde Gram pozitif bakterilere; 8 mg/ml'de antibakteriyel, *T. mentagrophytes* ve *T. rubrum*'a 4 mg/ml'de antidermatofitik aktivite belirlemişlerdir<sup>52</sup>. İşcan ve ark.'ları mikrodilüsyon yöntemiyle bazı Umbelliferae türlerinden elde edilen uçucu yağların antifungal ve antibakteriyel aktiviteleri araştırdıkları çalışmalarında, araştırdıkları tüm uçucu yağların 31,25–1000 µg/ml'ye konsantrasyon aralığında antibakteriyel aktiviteyi; *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'ya karşı ise 62,5 µg/ml' de belirlemişlerdir<sup>53</sup>. Araştırmamızda; her iki yöntemle; *S. aureus*'a karşı MİK; 64'de, farklı olarak kolorimetrik mikrodilüsyon yönteminde MİK; 128 µg/ml'olan *Hpp* butanol ve etanol ekstreleri, *Cls*'ye ait su ve hekzan ekstreleri; MBS konsantrasyonlarıda; 64 µg/ml'de belirlenmiştir. Denenen ekstrelerde; *S. pyogenes*'e karşı her iki mikrodilüsyon yönteminde de MİK; 64 µg/ml'de olmak üzere MBC konsantrasyonları; 64 µg/ml olan bitkisel ekstrelerde belirlenmiştir. *B. subtilis* ve *E. faecalis*'e karşı ise MBC değeri 64 µg/ml olan bitkisel ekstreler her iki mikrodilüsyon yöntemi ile 64 µg/ml'de antibakteriyel aktivite belirlenmiştir(Tablo 3, Şekil 13-20). *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *A. baumannii* için mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen 16-64 µg/ml'deki MİK değerlerinin  $\geq 16/64$  µg/ml'deki MBS oranları ile paralel olduğu, kolorimetrik mikrodilüsyon yönteminde ise MİK; 32-64 µg/ml'de, MBC konsantrasyonları (32-64 µg/ml) ile paralel sonuçlar verdiği görülmüştür (Tablo-4, Şekil: 21-28 ).

Yapılmış araştırmalarda; antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesi için, standart antimikrobiyaller denenerek disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemlerine odaklanarak çalışılmıştır. Bunlardan kontrol ajanlar ile çalışılanlar iyi korelasyon verirken, bitkisel ekstrelerle çalışılan

araştırmalarda çözünürlük ve dolayısıyla agarda difüzyon yeteneğine bağlı farklı sonuçlar alındığı rapor edilmiştir. Mota ve ark.'ları sıvı Mikrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemiyle yaptıkları araştırmada agar dilüsyon yönteminde daha düşük aktivite belirlemişlerdir<sup>1</sup>. Liu ve ark.'ları özellikle bitkisel ekstraların antifungal aktivitelerinin belirlenmesinde birçok güçlükle karşılaşıldığını belirtmişler ve kolorimetrik mikrodilüsyon yönteminin *Candida*'larda net tanımlanabilen MİK değerlerini verdiğini ve aynı zamanda IC<sub>50</sub> değerinin saptanmasında uygun bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir<sup>1,7,8,54,55</sup>.

## 6. SONUÇ

Antidermatofit testinde; *T. rubrum*, *E. floccosum*, *M. gypseum*'a karşı *Hypericum perforatum*'a ait kalan su (H<sub>2</sub>O) fazı, etil asetat fraksiyonu (EtOAc), butanol fraksiyonu (ButOH), kloroform fraksiyonu (CHCl<sub>3</sub>), hekzan fraksiyonu (Hx) ve etanol ekstresi (EtOH), *Cistus laurifolius*'a ait kalan su (H<sub>2</sub>O), etil asetat fraksiyonu (EtOAc), *n*-butanol fraksiyonu (*n*-ButOH), kloroform fraksiyonu (CHCl<sub>3</sub>), hekzan fraksiyonu (Hx) ve etanol (EtOH) ekstralarında sıvı mikrodilüsyon testinde, kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemine göre MİK; 32-128 µg/ml' de, MFS/MFC değerleri; 32-128 µg/ml' de, IC<sub>50</sub> değerleri 13-19 µg/ml' de belirlenmiştir.

Candidalarda (*C.albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*) *Hypericum perforatum*'a ait kalan su (H<sub>2</sub>O) fazı, etil asetat fraksiyonu (EtOAc), butanol fraksiyonu (ButOH), kloroform fraksiyonu (CHCl<sub>3</sub>), hekzan fraksiyonu (Hx) ve etanol ekstresi (EtOH), *Cistus laurifolius*'a ait kalan su (H<sub>2</sub>O), etil asetat fraksiyonu (EtOAc), *n*-butanol fraksiyonu (*n*-ButOH), kloroform fraksiyonu (CHCl<sub>3</sub>), hekzan fraksiyonu (Hx) ve etanol ekstralarında sıvı mikrodilüsyon testinde, kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemine göre MİK; 16-64 µg/ml' de, MFS/MFC değerleri; 16-64 µg/ml' de, IC<sub>50</sub> değerleri 16-21 µg/ml' de belirlenmiştir.

Gram pozitif bakterilerde *Hypericum perforatum*'a ait kalan su (H<sub>2</sub>O) fazı, etil asetat fraksiyonu (EtOAc), butanol fraksiyonu (ButOH), kloroform fraksiyonu (CHCl<sub>3</sub>), hekzan fraksiyonu (Hx) ve etanol ekstresi (EtOH), *Cistus laurifolius*'a ait kalan su (H<sub>2</sub>O), etil asetat fraksiyonu (EtOAc), *n*-butanol fraksiyonu (*n*-ButOH), kloroform fraksiyonu (CHCl<sub>3</sub>), hekzan fraksiyonu (Hx) ve etanol ekstralarında sıvı mikrodilüsyon testinde, kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemine göre MİK; 64-128 µg/ml' de,



MBS/MBC değerleri; 64-128 µg/ml' de, IC<sub>50</sub> değerleri 33-41 µg/ml' de belirlenmiştir.

Gram negatif bakterilerde *Hypericum perforatum*'a ait kalan su (H<sub>2</sub>O) fazı, etil asetat fraksiyonu (EtOAc), butanol fraksiyonu (ButOH), kloroform fraksiyonu (CHCl<sub>3</sub>), Hekzan fraksiyonu (Hx) ve etanol ekstresi (EtOH), *Cistus laurifolius*'a ait kalan su (H<sub>2</sub>O), etil asetat fraksiyonu (EtOAc), *n*-butanol fraksiyonu (*n*-ButOH), kloroform fraksiyonu (CHCl<sub>3</sub>), hekzan fraksiyonu (Hx) ve etanol ekstrlerinde sıvı mikrodilüsyon testinde, kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemine göre MİK; 16-64 µg/ml' de, MBS/MBC değerleri; 16-64 µg/ml' de, IC<sub>50</sub> değerleri 9-20 µg/ml' de belirlenmiştir.

## 7. ÖZET

Araştırmada mikrodilüsyon, kolorimetrik mikrodilüsyon ve kantitatif spektrofotometrik ölçüm olmak üzere üç farklı antimikrobiyal test yöntemi kıyaslanarak; farklı bitkilerden (*Hypericum perforatum*, *Cistus laurifolius*) elde edilen ekstre ve alt fraksiyonlarına ait antidermatofitik aktivite sonuçları karşılaştırmalı değerlendirilmiştir.

Mikrodilüsyon tekniğiyle alınan sonuçlarda dermatofitler (*T.rubrum*, *E. floccosum*, *M. gypseum*) için inkübasyon süresi 7 gün iken, kolorimetrik mikrodilüsyon yönteminde 72 saat gibi kısa sürede sonuç alınmıştır. Spektrofotometrik ölçüm ile elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri ise kantitatif sonuç vermiştir. Bu üç yöntem karşılaştırıldığında kolorimetrik mikrodilüsyon yönteminin en kısa sürede sonuç vermesi nedeniyle avantajlı olduğunu göstermektedir. Spektrofotometrik yöntem ise aynı şekilde kısa sürede sonuç vermekle birlikte, tüm mikroorganizma, madde ve konsantrasyonları için ölçüm yapılan absorbansta verilerin detaylı hesaplanması gerekliliği zaman alıcı olarak belirlenmiştir.

Mikrodilüsyon ile kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemi kıyaslandığında genel olarak metabolik aktivasyonun antimikrobiyal tarafından engellenmiş olduğu konsantrasyonlarda renk değişimine bağlı olarak kısa sürede alınan sonuçlar daha avantajlıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Mikrodilüsyon, Kolorimetrik Mikrodilüsyon, Dermatofit, Resazurin

## 8. SUMMARY

In this research; with comparing three different antimicrobial test methods (microdilution, colormetric microdilution and quantitative spectrofotometric), antidermatophytic activity results of extract and subfractions gathered by different plants (*H. perforatum*, *C. laurifolius*) are evaluated comparatively.

In the microdilution method the incubation time for dermatophytes (*T. rubrum*, *E. floccosum*, *M. gypseum*) is 7 days otherhand in the colormetric microdilution method it is a short time period like 72 hours. IC<sub>50</sub> values gathered by the spectrofotometric method gave quantitative results. When these three methods are compared, the colormetric microdilution shows an advantage as giving results in a short time. The spectrofotometric method is same as giving quick results but also in need of a detailed evaluation of data absorbance of all microorganisms, samples and concentrates is determined as time consuming.

When the microdilution and colormetric microdilution is compared, the metabolic activation generally that is blocked by the concentration of antimicrobial gives an more advantage of short time results due to colour change.

**Key Words:** Microdilution, Colorimetric Microdilution, Dermatophytes, Resazurin

## 9. KAYNAKLAR

1. Mota CRA, Miranda KC, Lemos JA, Costa CR, Souza LKH. Comparison of *in vitro* activity of five antifungal agents against dermatophytes, using the agar dilution and broth microdilution methods. Rev Soc Bras Med Trop 2009; 42 (3): 250 -254.
2. Markin D, Duek L. Berdicevsky I. *In vitro* antimicrobial activity of olive leaves Antimikrobielle wirksamkeit von olivenblättern *in vitro*. Mycoses 2003; 46: 132–136.
3. İmir S. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Ders Notları. Ankara: Nobel Tıp Kitapevi; 1993.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; formerly NCCLS) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing filamentous fungi; approved standard, M38-A2, Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; formerly NCCLS) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard, M27-A3, Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; formerly NCCLS) National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference methods for dilution antimicrobial susceptibility tests bacteria that grow aerobically; approved standard, M100-S12, Wayne, Pennsylvania, USA, 2002.

7. Rabanal RM, Arias A, Prado B, Hernández-Pérez M, Sánchez-Mateo CC. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. *J Ethnopharmacol* 2002; 81: 287–292.
8. Liu M, Seidel V, Katerere D, Gray A. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods* 2007; 42: 325–329.
9. Sarker S, Nahar L. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 2007; 42: 321- 324.
10. Vivek KB, Yoon JI, Kang SC. Antioxidant and antidermatophytic activities of essential oil and extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 2606–2612.
11. Prasad NR, Anandi C, Balasubramanian S, Pugalendi KV. Antidermatophytic activity of extracts from *Psoralea corylifolia* (Fabaceae) correlated with the presence of a flavonoid compound. *J Ethnopharmacol* 2004; 91: 21–24.
12. Kuate JR, Mouokeu S, Wabo HK, Tane P. Antidermatophytic triterpenoids from *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *Phyther Res* 2007; 21: 149–152.
13. Heisey RM, Gorham BK. Antimicrobial effects of plant extracts on *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* and other micro-organisms. *Lett Appl Microbiol* 1992; 14: 136–139.

14. Barros MES, Santos DA, Hamdan JS. Antifungal susceptibility testing of *Trichophyton rubrum* by E-test. Arch Dermatol Res 2007; 299: 107–109.
15. Premkumar VM, Shyamsundar D. Antidermatophytic activity of *Pistia stratiotes*. Indian J Pharm 2005; 37(2): 126 -128.
16. Fontenelle ROS, Morais SM, Brito EHS, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Nascimento NRF. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian *Caatinga* biome. J Appl Microbiol 2008; 104: 1383–1390.
17. Meletiadis J, Mouton JW, Meis JFGM, Bouman BA, Jp Donnelly. Verweij PE. Colorimetric Assay for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* Species. J Clin Microbiol 2001; 39 (9): 3402–3408.
18. Tavares AC, Goncalves MJ, Cavaleirob C, Cruzc MT, Lopesc MC, Canhotoa J, Salgueiro LR. Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: composition, antifungal activity and cytotoxicity. J Ethnopharmacol 2008; 119: 129–134.
19. [http://www.klimik.org.tr/pdfs/tuberkuloz/Hakan\\_Ozturkeri%202.pdf](http://www.klimik.org.tr/pdfs/tuberkuloz/Hakan_Ozturkeri%202.pdf)
20. Özkütük A, Çoban H, Esen N. *Mycobacterium tuberculosis*'in izolasyonunda lowenstein-Jensen besiyeri ile BACTEC 460TB sisteminin karşılaştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2007; 37: 69–70.
21. World Health Organization. WHO monographs on selected medicinal plants, Vol. 2, Geneva: World Health Organization; 1999.

22. Baytop T. Türkiye'de Bitkiler ile tedavi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları; 25-28, 1999.
23. Honda G, Yeşilada E, Tabata M, Sezik E, Fujita T, Takeda Y, Tanaka T, Takaishi Y. Traditional medicine in Turkey VI. Folk medicine in West Anatolia. J Ethnopharmacol 1996; 53, 75–87.
24. Yeşilada E, Honda G, Sezik E, Tabat M, Fujita T, Tanaka T, Takeda Y, Takaishi Y. Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. J Ethnopharmacol 1995; 46: 133–52.
25. Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. Farmasötik Botanik. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 93, 2007, 266-267.
26. Ertuğ F. Bodrum Yöresinde Halk Tıbbında Yararlanılan Bitkiler. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı; Eskişehir, Mayıs 29-31; 2002.
27. Şimşek I, Aytekin F, Yeşilada E, Yıldırım Ş. Anadolu'da Halk Arasında Bitkilerin Kullanılış Amaçları Üzerinde Etnobotanik Bir Çalışma. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı; Eskişehir, Mayıs 29-31; 2002.
28. Peşin İ. *Hypericum perforatum* L. ve *Hypericum scabrum* L. Bitkilerinin yara iyileştirici ve antienflamatuvar aktiviteleri üzerinde çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2007.
29. Sarker S, Nahar L. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. Methods 2007; 42: 321- 324.

30. Ruzicka F, Hola V, Tejkalova M. Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method. *Folia Microbiol* 2007; 52: 209-214.
31. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, Rodriguez-Tudela JL, Barchiesi F, et al. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. EUCAST Discussion Document E. Dis 7.1. Munich, Germany: European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases; June 2002.
32. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved Guideline M44-A. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004.
33. Arikian S, Yurdakul P, Hascelik G. Comparison of two methods and three end points in determination of *in-vitro* activity of micafungin against *Aspergillus* spp. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2003, 47 (8): 2640-2643.
34. Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: Analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 819-826.
35. Pfaller MA, Diekema DJ, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ. Evaluation of the E-test and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole and voriconazole. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1875-1880.



36. Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, et al. Comparative evaluation of E-test and Sensititre YeastOne Panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. J Clin Microbiol 2007; 45: 698-706.
37. Antachopoulos C, Meletiadis J, Roilides E, Sein T, Walsh TJ. Rapid susceptibility testing of medically important *Zygomycetes* by XTT assay. J Clin Microbiol 2006; 44: 553-560.
38. Hawser SP, Jessup C, Vitullo J, Ghannoum MA. Utility of 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) and minimum effective concentration assays in the determination of antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to the lipopeptide class of compounds. J Clin Microbiol 2001; 39: 2738-2741.
39. Vale-Silva LA, Buchta V. Antifungal susceptibility testing by flow cytometry: Is it the future? Mycoses 2006; 49(4): 261-273.
40. Rudensky B, Broidie E, Yinnon AM, et al. Rapid flow-cytometric susceptibility testing of *Candida* species. J Antimicrobiol Chemother 2005; 55: 106-109.
41. Santos AD, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Junior VV, Pinto A, Nakamura CV. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. Mem I Oswaldo Cruz 2008; 103(3): 277-281.

42. Stein AC, Alvarez S, Avancini C, Zacchino S, Poser G. Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). J Ethnopharmacol 2006; 107: 95–98.
43. Koroishi AM, Simone F, Cortez AGD, Nakamura TU, Nakamura CV, Filho BPD. *In vitro* antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. J Ethnopharmacol 2008; 117: 270–277.
44. Natarajan V, Venuogopal PV, Menon T. Effects of *Azadirachta indica* (neem) on the growth pattern of dermatophytes. Indian J Med Microbiol 2003; 21 (2): 98 -101.
45. Markin D, Duek L, Berdicevsky I. *In vitro* antimicrobial activity of olive leaves antimikrobielle wirksamkeit von olivenblättern *in vitro*. Blackwell Publishing Ltd 2003; Mycoses 46: 132–136.
46. Shamim S, Ahmed SV, Azhar I. Antifungal activity of *Allium*, *Aloe*, and *Solanum* species. Pharm Biol 2004; 42(7): 491–498.
47. Battinellia L, Danielea C, Cristiani M, Bisignanob G, Saijab A. *In vitro* antifungal and anti-elastase activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. Fruit. Phytomedicine 2006; 13: 558–563.
48. Cavaleiro C, Pinto E, Goncalves MJ, Salgueiro L. Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. J Appl Microbiol 2006; 100: 1333–1338.
49. B Garc'ia VMN, Gonzalez A, Fuentes M, Aviles M, Rios. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. J Ethnopharmacol 2003; 87: 85–88.

50. Tosun A, Bahadır Ö, Altanlar N. Antimikrobiyal activity of some plants used in folk medicine in Turkey. Turk J Pharm Sci 2006; 3(3): 167 - 176.
51. Uzel A, Guvensena A, Çetin E. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Anthemis xylopoda* O. Schwarz from Turkey. J Ethnopharmacol 2004; 95: 51–154.
52. Rojas MG, Navarro V, Alonso D, Rios MY, Tortoriello J, Ramos R. Antibacterial, Antifungal, and Cytotoxic Activities of *Distictis buccinatoria*. Pharm Biol 2007; 45(4): 289–294.
53. İşcan G, Demirci F, Kırimer N, Kürkçüoğlu M, Başer KHC, Kıvanç M. Bazı Umbelliferae Türlerinden Elde Edilen Uçucu Yağların Antimikrobiyal Etkileri. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı; Eskişehir, Mayıs 29-31; 2002.
54. Rubio MC, Gil J, Ocariz IR, Benito R, Rezusta A. Comparison of results obtained by testing with three different agar media and by the NCCLS M27-A method for *in vitro* testing of fluconazole against *Candida* ssp. J Clin Microbiol 2003; 41: 2665-68
55. Barry AL, Pfaller MA, Rennie RP, Fuchs PC, Brown SD. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, E-test and disk diffusion methods. Antimicrob Chemother 2002; 46: 1781–84.

## 10. EKLER

Yüksek lisans eğitimim süresince çalışmamın tüm aşamalarındaki desteği ve yol göstericiliği için değerli hocam Doç. Dr. Berrin ÖZÇELİK' e, çalışmama katkılarından dolayı değerli hocalarım Doç. Dr. Mustafa ARK' a, Arş. Gör. İpek SÜNTAR ve Selda ÖZGEN'e, bu zorlu süreçte beni her zaman destekleyen ve yüreklendiren sevgili eşim Fatih GERMEYANOĞLU' na teşekkür ederim.

## 11. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Ebru İdil Sağlam

**Doğum Yeri ve Tarihi** : Hatay / 1983

**Eğitimi** : 2008, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri  
Enstitüsü

Farmasötik Mikrobiyoloji Yüksek Lisans.

2001-2005, Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat  
Fakültesi, Biyoloji Bölümü.

1994-2001, İstiklal Makzume Anadolu Lisesi  
İskenderun/ Hatay

1989-1994, Mithat Paşa İlkokulu  
İskenderun/ Hatay

**Yabancı Dili** : Orta düzeyde İngilizce