

**CLEMATIS VITALBA, EQUISETUM RAMOSISSIMUM, ERYNGIUM
MARITIMUM, MELISSA OFFICINALIS subsp. ALTISSIMA, TYPHA
DOMINGENSIS ÜZERİNDE YAPILAN BİYOAKTİVİTE TAYİNLERİ**

BIOACTIVITY DETERMINATION ON *CLEMATIS VITALBA*,
EQUISETUM RAMOSISSIMUM, *ERYNGIUM MARITIMUM*,
MELISSA OFFICINALIS subsp. *ALTISSIMA*, *TYPHA DOMINGENSIS*

Elçin GÜRKAN* – Ümran SARIBOYACI* – Adile ÇEVİKBAŞ** – Koray DERİCİ** –
Ertan TUZLACI**

SUMMARY

In this study, bioactivity of *Clematis vitalba*, *Equisetum ramosissimum*, *Eryngium maritimum*, *Melissa officinalis* subsp. *altissima*, *Typha domingensis* has been investigated by the Brine shrimp (*Artemia salina*) method and also antibacterial activity of these plants has been examined by the well diffusion method.

ÖZET

Bu çalışmada, *Clematis vitalba*, *Equisetum ramosissimum*, *Eryngium maritimum*, *Melissa officinalis* subsp. *altissima*, *Typha domingensis* isimli bitkilerin Brine shrimp (*Artemia salina*) yöntemiyle biyoaktiviteleri tayin edilmiş ve ayrıca bu bitkiler oluk difüzyon yöntemiyle antibakteriyel aktivite bakımından incelenmiştir.

* Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi ABD, Haydarpaşa, İSTANBUL-TÜRKİYE.

** Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji ABD, Haydarpaşa, İSTANBUL - TÜRKİYE.

*** Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik ABD, Haydarpaşa, İSTANBUL - TÜRKİYE.

GİRİŞ

Bu çalışmada kullanılan bitkiler, *Clematis vitalba* (Ranunculaceae) (topraküstü kısımları), *Equisetum ramosissimum* (Equisetaceae) (toprakaltı ve topraküstü kısımları), *Eryngium maritimum* (Umbelliferae) (toprakaltı ve topraküstü kısımları), *Melissa officinalis* subsp. *altissima* (Labiatae) (toprakaltı ve topraküstü kısımları), *Typha domingensis* (Typhaceae) (topraküstü kısımları) 22 Temmuz 1993 tarihinde, İstanbul, Gümüşdere (Domuzdere) köyünden toplandı. Bu bitkilerin teşhisleri Prof. Dr. Ertan Tuzlacı tarafından yapıldı. Bitki örnekleri (MARE 4051, 4042, 4062, 4061, 4052) kodlarıyla Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda bulunmaktadır.

DENEYSEL BÖLÜM

Ekstrelerin hazırlanışı

Her beş bitkiden 80 g tartılarak toz edildi. Ekstraksiyon işlemi droglar üzerinde sırasıyla petrol eteri, kloroform ve etanol ile yapıldı. Her bir tüketmenin sonunda ekstreler kuruluğa kadar uçuruldu.

Biyoaktivite tayinleri

1. Brine shrimp ön tarama yöntemi (1)

20 mg ekstre hassas olarak tartıldı. 2 ml kloroformda çözüldü. (20 mg ekstre/ 2 ml solvan) 1000, 100 ve 10 ppm'lik konsantrasyonlarda çalışıldı.

Her dilüsyon için 30 karides (*Artemia salina*) kullanıldı. 24 saatin sonunda ölen karidesler sayılarak sonuçlar bilgisayarda değerlendirildi ve LD₅₀ olarak belirlendi. Bu işlemler çalışılan beş bitkinin her üç ekstresi için ayrı ayrı yapıldı (petrol eteri, kloroform, etanol ekstreleri). Sanguinarin referans madde olarak kullanıldı. Sonuçlar Tablo-1 de görülmektedir.

BİTKİ ADI	EKSTRE TİPİ	BRINE SHRIMP LD ₅₀ (ppm)
<i>Clematis vitalba</i>	PE	-
<i>Clematis vitalba</i>	K	1562.3950
<i>Clematis vitalba</i>	E	0.0699
<i>Equisetum ramosissimum</i>	PE	-
<i>Equisetum ramosissimum</i>	K	0.0063
<i>Equisetum ramosissimum</i>	E	-
<i>Eryngium maritimum</i>	PE	0.0005
<i>Eryngium maritimum</i>	K	-
<i>Eryngium maritimum</i>	E	-
<i>Melissa officinalis</i>	PE	0.4371
<i>Melissa officinalis</i>	K	4493.6490
<i>Melissa officinalis</i>	E	0.0830
<i>Typha domingensis</i>	PE	1225.9730
<i>Typha domingensis</i>	K	0.0022
<i>Typha domingensis</i>	E	1607.5320
Sanguarin (std.)		0.0001

PE; petrol eteri ekstresi, K; kloroform ekstresi, E; etanol ekstresi, -; etki görülmedi.

Tablo-1 : Brine shrimp yöntemiyle LD₅₀ değerleri.

Bu sonuçların her biri üçer çalışmanın ortalamasıdır.

2. Antibakteriyel ve antifungal etkilerin Oluk Difüzyon Yöntemi ile araştırılması (2)

Bu amaçla Gram (-) bakterilerden; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1539, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Proteus mirabilis* ATCC 14123, Gram (+) bakterilerden; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-p ve mayalardan da *Candida albicans* ATCC 10231 standart suşları kullanıldı.

Steril olarak hazırlanan Mueller Hinton Agar (Difco) besiyeri, petri kutularına 20 ml olacak şekilde döküldü ve steril oluk açıcı yardımı ile 6 tane oluk açıldı. Standart mikroorganizma suşları Mueller Hinton Broth (Difco) besiyerinde 37°C de 24 saat inkübe edildikten sonra PBS (Fosfat tamponlu tuzlu su pH:7.4) ile mikroorganizma sayısı Mac-Farland 0.5 standardına göre ayarlandı. Açılan oluklar içine 133 mg/ml konsantrasyondaki ekstrelerden 100 µl konuldu. Kontrol olarak ise en son oluğa aynı miktarda, ekstrenin içinde çözündüğü çözücüden konuldu.

Çözücülerin antimikrobiyal etkisinin ortadan kaldırılması için petri kutuları 37°C de bir gece etüvde bırakılarak çözücülerini uçuruldu. Mac-Farland 0.5'e göre hazırlanan 24 saatlik 0.1 ml bakteri süspansiyonu, eküvyon ile besiyeri yüzeyine yayıldı. Petri kutuları etüvde 37°C de 24 saat inkübe edildi ve oluşan inhibisyon zonları mm cinsinden ölçüldü.

Antifungal etkinin araştırılmasında *Candida albicans* ATCC 10231 suşu kullanıldı. Yukarıdaki işlemler Sabouraud Dextrose Broth ve Sabouraud Dextrose Agar besiyerleri kullanılarak aynı şekilde yapıldı.

Yapılan çalışmada *E. maritimum*, *M. officinalis* subsp. *altissima*, *T. domingensis* bitkilerinin her üçünün de etanol ekstralarının *S. aureus* ATCC 6538-p suşuna karşı etkili olduğu saptandığından bunların MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) değerleri de aynı yöntemle saptandı. Bu değerler Tablo 2 'de verilmiştir.

Başlangıçta 133 mg/ml olan etanol içindeki ekstre konsantrasyonları yine etanol içinde (133, 62.5, 31.25, 16.62, 7.81, 3.65) mg/ml olacak şekilde sulandırıldı. Bu şekilde hazırlanan ekstralardan 100 µl, 6 mm çapındaki oluklara konuldu. Mac-Farland 0.5 tüpüne göre hazırlanan 24 saatlik bakteri kültüründen 0.1 ml, petrideki besiyerlerinin yüzeyine yayıldı. Etüvde 37°C de 24 saat inkübasyona bırakıldı, bu süre sonunda oluşan inhibisyon zonları mm cinsinden ölçüldü (Tablo-2).

Tabloda sadece, çalışmadan elde edilen olumlu sonuçlar görülmektedir. Bitkiler *C. albicans* suşuna karşı aktivite göstermedikleri için bununla ilgili sonuçlara tabloda yer verilmemiştir. Standart Ampisillin sodyum referans madde olarak kullanılmıştır.

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>C. vitalba</i>	8(E)			
<i>E. maritimum</i>				9(K) 10(E) 10(133 mg/ml)MIK 7.5(62.5mg/ml)MIK
<i>M. officinalis</i>				12(PE) 14.5(E) 14.5(133mg/ml)MIK
<i>T. domingensis</i>				11(K) 14.5(E) 14.5(133mg/ml)MIK 9 (62.5mg/ml)MIK 8(31.25mg/ml)MIK
Standart Ampisillin Na		30	35	50

PE; Petrol eteri ekstresi, K; Kloroform ekstresi, E; Etanol ekstresi.

Tablo-2 : *C. vitalba*, *E. maritimum*, *M. officinalis* subsp. *altissima*, *T. domingensis* bitkilerinin petrol eteri, kloroform ve etanol ekstralarının çeşitli mikroorganizmalara karşı antibakteriyel etkileri. Standart konsantrasyon 1 mg/ml.

E. maritimum, *M. officinalis* subsp. *altissima*, *T. domingensis* bitkilerinin etanol ekstralarının çeşitli konsantrasyonlarının *S. aureus*'a karşı MIK değerleri.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Brine shrimp ön tarama yöntemiyle biyoaktif bulunan beş bitkiden *E. ramosissimum* dışındaki diğer bitkilerin hiç değilse bazı ekstraları oluk difüzyon yöntemiyle de antibakteriyel aktivite göstermektedir. Bu durumda Brine shrimp ön tarama yönteminin aktivite saptamak açısından geçerli olabileceğini ortaya çıkarmaktadır.

KAYNAKLAR

- 1.Dey, P.M. and Harborne, J.B., *Methods in Plant Biochemistry*, New York, vol.6, 9, 1991.
- 2.Çetin, E.T., *Genel ve Pratik Mikrobiyoloji*, İstanbul, 443-444, 1973.

(Received April 15, 1996)