

Salvia verticillata ve Phlomis pungens'in in vitro Antibakteriyel Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Oktay ÖZKAN *✍ Handan AYDIN ** A. Funda BAĞCIGİL ***

* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Kars - TÜRKİYE

** İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, İstanbul - TÜRKİYE

*** İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): 2009/073-A

Özet

Bu çalışmada *Salvia verticillata* L. subsp. amasiaca (Frey & Bornm) Bornm. ve *Phlomis pungens* Willd. var. hirta Velen'in yaprak ve çiçek metanolik ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir. Metanolik ekstraktların 9 farklı bakteri türüne (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Salmonella enteritidis* KUEN 349, *Proteus mirabilis* CCM1944, *Escherichia coli* ATCC 25922) karşı antibakteriyel etkileri macro broth dilüsyon yöntemi kullanılarak tespit edildi. *Salvia verticillata* yaprak ve çiçek metanol ekstraktları *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı belirgin bir etkinlik gösterirken *Phlomis pungens* yaprak ve çiçek ekstraktları *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus subtilis*'e karşı etkili olmuştur. Sonuç olarak bu iki bitki türünün çeşitli enfeksiyöz hastalıklarda antimikrobiyallere alternatif olarak kullanılabilceğini düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: *Salvia verticillata*, *Phlomis pungens*, Antimikrobiyal etkinlik, Bitkisel ekstrakt, in vitro

In vitro Evaluation of Antimicrobial Activities of Salvia verticillata and Phlomis pungens

Summary

This study, the methanol extracts of *Salvia verticillata* L. subsp. amasiaca (Frey & Bornm) Bornm. and *Phlomis pungens* Willd. var. hirta Velen from flowers and leaves have been studied for antimicrobial activity. Antibacterial activity of the methanol extracts was determined against 9 bacterial strains (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Salmonella enteritidis* KUEN 349, *Proteus mirabilis* CCM1944, *Escherichia coli* ATCC 25922) using the macro broth dilution method. The methanol extract of the leaves and flowers of *Salvia verticillata* remarkably inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. On the other hand, the results indicate that the methanol extract of the leaves and flowers of *Phlomis pungens* remarkably inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. In conclusion, the results show that *Salvia verticillata* and *Phlomis pungens* methanol extracts might be an alternative to antimicrobials in various infectious diseases.

Keywords: : *Salvia Verticillata*, *Phlomis pungens*, Antimicrobial activity, Herbal extract, in vitro

GİRİŞ

Aromatik bitkilerin ham ekstraktlarından çok eski zamanlardan beri gıda, parfüm ve ilaç gibi farklı amaçlarla faydalanılmıştır ¹. Değişik bitki türleri benzer amaçlarla günümüzde de tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır ². Tıbbi nitelikli bitkilere güvenli ilaçlar gözüyle bakılmakta, özellikle kırsal bölgelerdeki

insanların %70'ten daha fazlası geleneksel tıp sistemi içerisinde bu bitkilerden ilk başvuru kaynağı olarak faydalanmaktadır ³. Son yıllarda bazı mikroorganizmaların antibiyotiklere direnç kazanması, gıda güvenliği ile ilgili olarak kamuoyunda tereddütlerin artması ve sentetik katkı maddelerinin insan sağlığı üzerindeki



İletişim (Correspondence)



+90 474 2426260



oktayozkan@yahoo.com

potansiyel istenmeyen etkilerinden dolayı bitkilerin çeşitli ekstraktları ve esansiyel yağları üzerine yapılan araştırmalarda ciddi bir artış olmuştur ^{1,4,5}. Bu araştırmalar göstermektedir ki tıbbi bitkiler tedavi edici etkileri olan yeni kimyasal bileşikler için önemli doğal kaynaklardır ⁶.

Lamiaceae çok geniş tıbbi, farmakolojik ve endüstriyel özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. İsimini Latince iyileştirici anlamına gelen *salvare* sözcüğünden alan *Salvia* ⁷; Lamiaceae familyasının en önemli cinslerinden biri olup ^{1,2,4,7-9} göze çarpan özellikleri nedeniyle dünya çapında bir çok ülkenin farmakopelerinde yer almıştır ². *Salvia* cinsinde tüm dünyaya yayılmış halde yaklaşık 900 tür bulunmaktadır ^{1,9}. Bugüne kadar 500 civarında *Salvia* türü hakkında yapılmış geniş çaplı araştırmalar mevcuttur ². Çoğu *Salvia* türü ve bu türlerin esansiyel yağları ya da ekstraktları gıda, ilaç ve kozmetik sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. *Salvia* türleri genel olarak antibakteriyel, karminatif, diüretik, hemostatik ve spazmolitik aktivitelere sahip olup, tüm dünyada bitkisel çay olarak tüketilmektedir. *Salvia* türleri fitokimyasal analizlere göre fenolik asitler, fenolik glikozidler, flavonoidler, antosiyaninler, kumarinler, polisakkaritler, terpenoidler ve esansiyel yağları içermektedir ⁷. Türkiye florasında yaklaşık 90 *Salvia* türü bulunmakta olup bunların 45'i endemiktir ^{9,10}.

Salvia verticillata L. subsp. *amasiaca* (Freyne & Bornm) Bornm. (dadırak, mavi çiçekli adaçayı) ve *Phlomis pungens* Willd. var. *hirta* Velen (çalba, ballıkotu) Kars civarında yetişen bölgeye özgü türlerdir.

Salvia verticillata Avrupa-Asya kıtalarında bulunmaktadır. Yetiştirildiği bölgelerde alternatif tedavi amacıyla halk arasında kullanılmaktadır ¹¹. Antikolinesteraz ve antioksidan etkinliği olduğu daha önceden bildirilmiş olup çeşitli polifenoller, uçucu yağlar ve diterpenoidler içerdiği bilinmektedir ¹¹.

Phlomis cinsi Lamiaceae familyasına ait olup, uzun ömürlü bitki türlerini içerir ¹². Afrika, Asya ve Avrupaya yayılmış 100'den fazla tür içermektedir ^{12,13}. *Phlomis* cinsi çoğu üyesinin aromatik ve tıbbi karakteristik özellikler taşıdığı bir cinstir. Bazı türlerin yaprakları geleneksel tıpta bitkisel çay olarak stimulan, tonik, diüretik, ülser ve hemoroid tedavisinde kullanılmaktadır. Bundan da öte, bu bitkinin bazı türlerinin anti-inflamatuar, immunosupresif, antioksidan ve antimikrobiyal etkinlik gibi çeşitli aktivitelere gösterdiğine dair kanıtlar bulunmaktadır ¹³. Son yıllarda elde edilen bilgiler, Türkiye'de 6 varyete, 12 doğal hibrit ve 34

endemik taxadan oluşan 52 taxa bulunduğunu göstermektedir. Türk *Phlomis* türlerinin bitkisel çay olarak tonik, karminatif, iştah açıcı ve stimulan olarak geleneksel tıpta kullanıldığı bildirilmiştir ¹².

Bitki kaynaklı antimikrobiyal bileşikler bitkinin gövde, kök, yaprak, çiçek ve meyvelerinden elde edilebilmektedir. Tıbbi bitkilerin içeriklerinin kullanılan bitki bölümüne ve ekstraksiyon metoduna göre değiştiği bilinmektedir. Sıklıkla farklı bitki bölümleri spesifik medikal uygulamalara sahiptir ⁵.

Bu çalışmada Kars'ta yetişmekte olan *Salvia verticillata* L. subsp. *amasiaca* (Freyne & Bornm) Bornm. ve *Phlomis pungens* Willd. var. *hirta* Velen'in çiçek ve yapraklarının antimikrobiyal aktivitesini *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Proteus mirabilis* CCM 1944, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* KUEN 349, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ve *S. aureus* ATCC 29213 bakterileri üzerinde *in vitro* olarak tespit edilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bitki Materyalinin Toplanması

Çalışmada kullanılan *S. verticillata* ve *P. pungens* örnekleri Kars - Kağızman arası 30. kilometreden 2007 yılı Ağustos ayında toplandı. Bitkilerin yaprak, çiçek ve diğer bölümleri ayrı ayrı kurutuldu. Bitkilerin tanımı Dr. Hüseyin Aşkın Akpulat (Cumhuriyet Üniversitesi Eğitim Fakültesi) tarafından yapıldı, Cumhuriyet Üniversitesi Herbaryumunda muhafaza edildi.

Ekstraksiyon Prosedürü

Bitkilerin her biri çiçek ve yaprak olmak üzere çalışıldı. Çiçek ve yapraklar için aynı ekstraksiyon metodu uygulandı. 1 gram bitki materyali 50 ml metanol ile 1 saat çalkalayıcıda çalkalandıktan sonra Whatman No.1 filtre kağıdından geçirilerek süzüldü. Süzüntü, 35°C'de evaporatörde uçuruldu. Ekstrakt, 10 ml dimetilsülfoxid ile seyreltildikten sonra 0.45 µm steril filtreden geçirilerek kullanılıncaya kadar -25°C'de saklandı.

Test Mikroorganizmaları

Araştırmada *K. pneumoniae* ATCC 4352, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228, *B. cereus* ATCC 11778, *S. enteritidis* KUEN 349, *P. mirabilis* CCM 1944, *E. coli* ATCC 25922 suşları kullanıldı. Bakteri

suşları İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonundan sağlandı.

Besiyerleri

Araştırmada kullanılan suşların devamlılığını sağlamak amacıyla %7 kan ilave edilmiş Nutrient agar (HiMedia M001) kullanıldı. Kantitatif olarak antibakteriyel etkinin saptanması amacıyla yapılan makrodilüsyon sıvı (tüp) yönteminde de Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ katyonları ilave edilmiş katyonlu Mueller-Hinton Broth (HiMedia M391) (CAMBH) besiyeri kullanıldı.

Antibakteriyel Aktivitenin Saptanması

Bitki ekstraktlarının antibakteriyel etkisi makrodilüsyon sıvı (tüp) yöntemi ile Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, eski adı NCCLS) standartlarına uygun olarak incelendi. Bitki ekstraktlarının, CAMBH içerisinde 100 mg/ml - 0.20 mg/ml arasında olacak şekilde iki katlı seri seyreltileri yapıldı, steril tüplere her bir seyreltiden 500 µl aktarıldı. Test edilecek bakteri türlerinin 18-24 saatlik kanlı agardaki kültürlerinden, fizyolojik tuzlu su içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığına (yaklaşık 1-2 x 10⁸ cfu/ml) eş değerde süspansiyon hazırlandı. Hazırlanan süspansiyon 1:10 oranında seyreltilerek, 10⁷ cfu/ml inokulum yoğunluğu hazırlandı. Hazırlanan inokulum, içerisinde bitki ekstraktları bulunan tüplere eşit miktarda (500'er µl) aktarıldı. Test edilen her seri seyreltinin sonuna pozitif (bitki ekstraktı eklenmemiş) ve negatif (bakteri inokulumu eklenmemiş) kontroller ilave edildi. Tüm tüpler 37°C'de 24 saat inkube edildi. Bakteriyel üremeyi tamamen inhibe eden ve çıplak gözle belirlembilen en düşük bitki ekstraktı konsantrasyonu, o ekstraktın minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değeri olarak hesaplandı. Yöntemin kalite kontrolü için gentamisin sülfat kullanıldı¹⁴.

BULGULAR

Ekstraktların test bakterilerine karşı ekstraktların MİK değerleri **Tablo 1**'de gösterilmektedir.

S. verticillata tüm test bakterileri üzerinde değişen konsantrasyonlarda (25-100 mg/ml) antibakteriyel etkinlik gösterirken *P. Pungens*; *K. pneumoniae*'ya karşı etkisiz, *S. enteritidis*'e karşı ise sadece çiçek metanolik ekstraktının etkin olduğu görülmüştür. *S. verticillata*'nın çiçek ekstraktları *B. cereus* ve *B. subtilis*'e karşı yaprak ekstraktlarından daha etkinken, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* ve *S. epidermidis*'e karşı yaprak ekstraktlarının daha etkin olduğu görülmüştür.

Tablo 1. *Salvia verticillata* ve *Phlomis pungens*'in MİK değerleri
Table 1. MIC values of *Salvia verticillata* and *Phlomis pungens*

Mikroorganizma	MİK (mg/ml)			
	<i>Salvia verticillata</i>		<i>Phlomis pungens</i>	
	Çiçek	Yaprak	Çiçek	Yaprak
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	50	50	50	50
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 4352)	100	50	NA	NA
<i>S. enteritidis</i> (KUEN 349)	50	50	50	NA
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	50	50	50	100
<i>P. mirabilis</i> (CCM 1944)	100	50	100	50
<i>B. cereus</i> (ATCC 11778)	25	50	50	100
<i>B. subtilis</i> (ATCC 6633)	25	50	50	50
<i>Staph. epidermidis</i> (ATCC 12228)	100	50	100	50
<i>Staphy. aureus</i> (ATCC 29213)	50	50	100	100

NA: Antibakteriyel etkinlik saptanmamıştır

P. aeruginosa, *S. enteritidis*, *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı ise hem yaprak hem de çiçek ekstraktlarının eşit MİK değerlerine sahip olduğu görülmüştür. *P. pungens*'in ise *E. coli* ve *B. cereus*'a karşı çiçek ekstraktları daha etkinken, *P. mirabilis* ve *S. epidermidis*'e karşı yaprak ekstraktları daha etkin bulunmuştur. *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis* ve *S. aureus*'a karşı ise yaprak ve çiçek ekstraktları için aynı MİK değerleri tespit edilmiştir. Tüm ekstraktlar içerisinde en yüksek antibakteriyel etkinliği 25 mg/ml MİK değeri ile *B. cereus* ve *B. subtilis*'e karşı *S. verticillata*'nın çiçeklerinden elde edilen metanolik ekstraktlar göstermiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Lamiaceae familyasına ait olan *Salvia* ve *Phlomis* cinsleri çok sayıda farmakolojik etkinliğe sahip türü bünyesinde barındırmaktadırlar. Türlerin gösterdiği etkinliğin, bitkinin yetiştiği coğrafyaya, bitki bölümüne ve ekstraksiyon metoduna göre değişiklik gösterdiği bildirilmektedir⁵. Bu çalışmada *S. verticillata* ve *P. pungens*'in yaprak ve çiçeklerinden elde edilen metanolik ekstraktlar 9 bakteri türüne karşı MİK değerleri yönünden test edilmiştir. Ekstraktların MİK değerleri (**Tablo 1**) incelendiğinde antibakteriyel etkinlik yönünden *S. verticillata*'nın *P. pungens*'ten daha etkili olduğu görülmektedir. *Salvia* türlerinin antibakteriyel etkinliklerine ilişkin yapılmış çalışmalar farklı türlerin farklı düzeyde etkiye sahip olduklarını göstermektedirler. Al-Howiriny'nin *S. palaestina*'nın esansiyel yağını antibakteriyel yönden test ettiği çalışmada, *S. palaestina*'nın MİK değerleri, *Bacillus subtilis* için 500 µg/ml, *S.*

aureus ve *S. epidermidis* için 400 µg/ml, *P. mirabilis* ve *Myco. smegmatis* için 550 µg/ml bulunurken *E. coli* ve *P. aeruginosa* için etkisiz bulunmuştur¹⁵. Ögütücü ve ark. *S. limbata* ve *S. sclarea* esansiyel yağlarının antibakteriyel etkinliklerini test etmişlerdir. *S. sclarea* test mikroorganizmaları için etkisiz bulunurken *S. limbata*'nın MİK değerleri *Bacillus macerans* için 31.25 µg/ml, *B. subtilis* için 31.25 µg/ml, *P. vulgaris* için 250 µg/ml, *S. aureus* için 250 µg/ml bulunmuştur¹⁶. Lotfipour ve ark.¹⁷ ise *S. aureus*, *M. luteus*, *S. epidermidis* ve *B. cereus*'a karşı *S. sahendica* için sırasıyla 1.25, 2.5, 2.5, 2.5 mg/ml, *Phlomis caucasica* için 1.25, 0, 0, 2.5 mg/ml MİK değerleri elde etmişlerdir. Duman ise *Salvia officinalis* ekstraktının *L. monocytogenes* ve *S. aureus* üzerinde sayısal redüksiyon oluşturduğunu bildirmiştir¹⁸.

S. verticillata ve *P. pungens*'in MİK değerlerinin diğer *Salvia* türlerine oranla daha yüksek olduğu görülmekle beraber, daha fazla mikroorganizma türüne karşı etkin olduğu saptanmıştır. Yüksek MİK değerlerinin ise metanolik ekstraktların kullanılmasına ve türlerin yetiştiği bölgeye bağlı olabileceği düşünülmektedir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde gerek *S. verticillata*'nın gerekse *P. pungens*'in sahip olduğu antibakteriyel etkinlik potansiyeli ile özellikle test edilen bakteri türlerinde olmak üzere doğal ve ekonomik antibakteriyel madde kaynakları olarak kullanılabilirleri düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Delamare APL, Moschen-Pistorello IT, Artico L, Atti-Serafini L, Echeverrigaray S: Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chem*, 100, 603-608, 2007.
2. Mayekiso B, Magwa ML, Cooposamy RM: The chemical composition and antibacterial activity of the leaf extract of *Salvia repens* burch. ex benth. *JMPR*, 2 (7): 159-162, 2008.
3. Khalil A, Hassawi DS, Kharma A: Genetic relationship among *Salvia* species and antimicrobial activity of their crude extract against pathogenic bacteria. *Asian J Plant Sci*, 4 (5): 544-549, 2005.
4. Tepe B, Dönmez E, Ünlü M, Candan F, Daferera D, Vardar-Ünlü G, Polissiou M, Sökmen A: Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (montbret et aucher ex benth.) and *Salvia multicaulis* (vahl). *Food Chem*, 84, 519-525, 2004.
5. Borchardt JR, Wyse DL, Sheaffer CC, Kauppi KL, Fulcher RG, Ehle NJ, Biesboer DD, Bey RF: Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. *JMPR*, 2 (5): 98-110, 2008.
6. Sarkhail P, Abdollahi M, Shafiee A: Antinociceptive effect of *Phlomis olivieri* Benth., *Phlomis anisodonta* Boiss. and *Phlomis persica* Boiss. total extracts. *Pharm Res*, 48, 263-266, 2003.
7. Amiri H: Quantative and qualative changes of essential oil of *Salvia bracteata* Bank et Sol. in different growth stages. *DARU*, 15 (2): 79-82, 2007.
8. Ulubelen A: Cardioactive and antibacterial terpenoids from some *Salvia* species. *Phytochem*, 64, 395-399, 2003.
9. Kotan R, Kordalı Ş, Çakır A, Kesdek M, Kaya Y, Kılıç H: Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. *Biochem Sys Eco*, 36, 360-368, 2008.
10. Tepe B, Daferera D, Sökmen M, Polissiou M: Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem*, 90, 333-340, 2005.
11. Matkowski A, Zielins S, Oszmians J, Lamer-Zarawska E: Antioxidant activity of extracts from leaves and roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *S. przewalskii* Maxim., and *S. verticillata* L., *Bio Tech* 99, 7892-7896, 2008.
12. Demirci F, Güven K, Demirci B, Dadandı MY, Başer KHC: Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. *Food Cont*, 19, 1159-1164, 2008
13. Zhang Y, Wan ZZ: Comparative analysis of essential oil components of three *Phlomis* species in Qinling Mountains of China. *J Pharm Biomed Anal*, 47, 213-217, 2008.
14. NCCLS: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Fourth ed., Approved Standart. NCCLS document M7-A4 (ISBN 1-56238-309-4) NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 19087, 1997
15. Al-Howiriny TA: Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Salvia palaestina* Benth growing in Saudi Arabia. *Pharm J*, 15, 218-223, 2007.
16. Ögütücü H, Sökmen A, Sökmen M, Polissiou M, Serkedjjeva J, Daferera D, Şahin F, Barış Ö, Güllüce M: Bioactivities of the various extracts and essential oils of *Salvia limbata* C.A. Mey. and *Salvia sclarea* L., *Turk J Biol*, 32, 181-192, 2008.
17. Lotfipour F, Nazemiyeh H, Fathi-Azad F, Garaei N, Arami S, Talat S, Sadegpour F, Hasanpour R: Evaluation of antibacterial activities of some medicinal plants from North-West Iran. *IJBMS*, 11 (2): 80-85, 2008.
18. Aydın BD: Bazı tıbbi bitki ve baharatların gıda patojenleri üzerine antibakteriyel etkisinin araştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 14 (1): 83-87, 2008.