ŞUBAT 2016 Yüksek Lisans – Biyoloji Bölümü HÂKİ ALTUNOVA

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MENENGİÇ (*Pistacia terebinthus* L.) MEYVE EKSTRESİNİN METİSİLİNE DİRENÇLİ *Staphylococcus aureus* (MRSA) VE VANKOMİSİNE DİRENÇLİ *Enterococcus* (VRE)'a KARŞI ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİ

BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HÂKİ ALTUNOVA

ŞUBAT 2016

Menengiç (*Pistacia terebinthus* L.) Meyve Ekstresinin Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) Ve Vankomisine Dirençli *Enterococcus* (VRE)'a Karşı Antibakteriyel Aktivitesi

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

Hâki ALTUNOVA

Şubat 2016



© 2016 [Hâki ALTUNOVA]

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tezin Adı: Menengiç (*Pistacia terebinthus* L.) Meyve Ekstresinin Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) Ve Vankomisine Dirençli *Enterococcus* (VRE)'a Karşı Antibakteriyel Aktivitesi.

Öğrencinin, Adı Soyadı: Hâki ALTUNOVA

Tez Savunma Tarihi: 15.02.2016

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Metin BEDİR
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Filiz Özbaş GERÇEKER
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmzası
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN	.....
Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ	.....
Yrd. Doç. Dr. Berna BAŞ	.....
Yrd. Doç. Dr. Hüseyin TEKİN	.....
Yrd. Doç. Dr. İ. Adem BOZKURT	.....

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

Hâki ALTUNOVA

ABSTRACT

THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF TEREBINTH (*Pistacia terebinthus* L.) FRUIT EXTRACT AGAINST METHICILLIN - RESISTANT *Staphylococcus aureus* (MRSA) AND VANCOMYCIN - RESISTANT *Enterococcus* (VRE)

ALTUNOVA, Hâki

M.Sc. in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ibrahim Halil KILIÇ

February, 2016

60 pages

The objective of this study is to be investigated the antibacterial activity of terebinth fruit extracts against MRSA and VRE. Unripe and ripe terebinth fruits' extracts of hexane, ethanol and water were removed respectively by two different methods, maceration and pressure liquid extraction (PLE). The antibacterial activity of obtained extracts against MRSA and VRE was investigated by disc diffusion technique. Resulting zones of inhibition from using 2 mg/disc of the extract concentration were measured with a ruler. In the obtained unripe terebinth fruits' hexane extracts against fourteen clinical MRSA strain formed the inhibition zone 8-16 mm, ethanol extract 11-18 mm, water extract 10-35 mm. In ripe terebint fruit hexane ekstracts did not form zone but in ethanol and water extracts formed zone of inhibition 7-12 mm. In the obtained unripe terebinth fruits' hexane extracts against five clinical VRE strain formed the inhibition zone 11-14 mm. Other extracts did not show significant activity. When compared the extracts obtained by maceration and PLE for the antibacterial activity was not found significant difference according to the independent samples t test ($p > 0,05$). The antibacterial activity of unripe terebinth fruits extract against MRSA and VRE was found more effective than ripe terebinth extract ($p < 0,05$). Since unripe terebinth fruit extracts have potential to new agents particularly against MRSA, it is suggested to be remained antibacterial activity studies with compounds to be isolated from the extracts.

Keywords: MRSA, VRE, *Pistacia terebinthus*, maceration, pressure liquid extraction

ÖZET

MENENGİÇ (*Pistacia terebinthus* L.) MEYVE EKSTRESİNİN METİSİLİNE DİRENÇLİ *Staphylococcus aureus* (MRSA) VE VANKOMİSİNE DİRENÇLİ *Enterococcus* (VRE)'a KARŞI ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİ

ALTUNOVA, Hâki

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

Şubat 2016

60 sayfa

Bu çalışmanın amacı, menengiç meyve özütlerinin MRSA ve VRE'ye karşı antibakteriyel aktivitesinin araştırılmasıdır. Ham ve olgun menengiçlerin sırasıyla hekzan, etanol ve su ekstreleri, maserasyon ve basınçlı solvent ekstraksiyonu (BSE) olmak üzere iki farklı yöntemle çıkarılmıştır. Elde edilen ekstrelerin MRSA ve VRE'ye karşı antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon tekniği ile araştırılmıştır. 2 mg/disk konsantrasyonunda özüt kullanılarak oluşan inhibisyon zonları cetvelle ölçülmüştür. Ondört adet klinik MRSA suşuna karşı elde edilen ham menengiç hekzan özütleri 8-16 mm, etanol özütleri 11-18 mm ve su özütleri 10-35 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur. Olgun menengiç hekzan özütleri zon oluşturmazken etanol ve su özütleri 7-12 mm zon oluşturmuştur. Beş adet klinik VRE suşuna karşı elde edilen ham menengiç hekzan özütleri 11-14 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur. Diğer özütler anlamlı aktivite göstermemiştir. Maserasyon ve BSE ile elde edilen özütler antibakteriyel etkinlik açısından karşılaştırıldığında bağımsız örneklem t testine göre anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$). Ham menengiç meyve ekstresinin MRSA ve VRE'ye karşı antibakteriyel aktivitesinin olgun menengiç ekstresinden daha fazla olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Ham menengiç ekstraktları özellikle MRSA'ya karşı yeni etken madde ajanları taşıma potansiyeline sahip olduğundan, ekstrelerden izole edilecek bileşikler ile antibakteriyel aktivite çalışmaları devam ettirilmelidir.

Anahtar kelimeler: MRSA, VRE, *Pistacia terebinthus*, maserasyon, basınçlı solvent ekstraksiyonu.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada tez konumu belirleyen, gerekli materyallerin zamanında temini için çaba harcayan, çözümler bulan, çalışma süresince takip edip yön veren, mesai saatleri dışındaki laboratuvar çalışmalarım için aradığımda telefonu meşgule almayıp yardımcı olan, baskıcı değil esnek ve rahat çalışmamı sağlayan, çalışmalarımı takdir eden Gaziantep Üniversitesi öğretim üyelerinden danışman hocam, Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ´a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmada kullandığım klinik MRSA suşlarını temin eden Gaziantep Üniversitesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Yasemin ZER'e ve klinik VRE suşlarını temin eden Harran Üniversitesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Fadile Yıldız ZEYREK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarımda benden yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Ayşe KARADUMAN, Neşe ERDOĞAN ve Mehmet ERDEM'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ABSTRACT v
ÖZET vi
TEŞEKKÜR.....vii
İÇİNDEKİLER.....viii
ŞEKİLLER LİSTESİ…….x
TABLOLAR LİSTESİ…….xi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ xii
1. GİRİŞ 1
1.1 Bitkilerin Farmasötik Kullanımı.……...…..3
1.2 Pistacia terebinthus L. Yayılışı Ve Botanik özellikleri……...5
1.3 Ekstraksiyon Teknikleri……7
1.3.1 Maserasyon……...7
1.3.2 Soxhlet Ekstraksiyonu……..8
1.3.3 Basınçlı Solvent Ekstraksiyonu……9
1.3.4 Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon…….10
1.3.5 Ses Dalgaları Destekli Solvent Ekstraksiyonu (Ultrasonik ekstraksiyon).……11
1.3.6 Süper Kritik Akışkan Ekstraksiyonu.……12
1.3.7 Diğer Teknikler…….....13
1.4 Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA).…….13
1.4.1 *S.aureus*'un virulans faktörleri……...……... 14
1.4.2 Staphylococcus aureus'ta Antibiyotiklere Direnç Gelişimi Tarihçesi……..…15
1.4.3 MRSA' da Direnç Mekanizması……..……15
1.5 Vankomisine Dirençli *Enterococcus* (VRE).……...……..……17
1.5.1 Enterekoklarda Virulans Faktörleri……..…18
1.5.2 Enterokoklarda Antibiyotik Direncin Tarihçesi……...19
1.5.3 VRE'lerde Direnç Mekanizması……...…….19
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....21
2.1 *P. terebinthus* İle İlgili Çalışmalar……...…….21
2.2 MRSA'ya Karşı Antibakteriyel Çalışmalar……...……23
2.3 VRE' ye Karşı Antibakteriyal Çalışmalar……...……...30

3. MATERYAL-METOD 35
3.1 Bitki Materyalinin Toplanması ve Hazırlanması……...….35
3.2 Bitki Özütlerinin Çıkarılması…..……...….35
3.2.1 Maserasyon Metoduyla Özüt Çıkarılması…..…….35
3.2.2 Basınçlı Solvent Ekstraksiyonu Yöntemi İle Özüt Çıkarılması…….36
3.2.3 Özüt Verimlerinin Hesaplanması……...37
3.3 Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi…….37
3.3.1 Bakteri Suşları……37
3.3.2 Disk Difüzyon Yöntemi……...……..38
3.4 İstatiksel Analiz……...38
4. BULGULAR……...……..39
4.1 Menengiç Özütü Verimleri……..39
4.2 Menengiç Özütlerinin MRSA'ya Karşı Oluşturduğu İnhibisyon Zonları……...40
4.3 Menengiç Özütlerinin VRE'ye Karşı Oluşturduğu İnhibisyon Zonları……..45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ……..48
KAYNAKLAR.....53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Akdeniz havzasında *P. terebinthus* 'un yayılış gösterdiği ülkeler……....5
Şekil 1.2 *Pistacia terebinthus* L. yaprak, çiçek, meyve görünümü……..6
Şekil 1.3 Soxhlet cihazı…….8
Şekil 1.4 Basınçlı solvent ekstraksiyonu çalışma prensibi modellemesi….…….9
Şekil 1.5 Mikrodalga destekli Kapalı Tip Ekstraksiyon Sistemi……....11
Şekil 1.6 Ultrasonik ekstraksiyon teknolojisi modeli……12
Şekil 1.7 Süperkritik akışkan ekstraksiyonu çalışma prensibi……13
Şekil 1.8 MecA genini taşıyan SCCmec kaseti……..16
Şekil 3.1 Maserasyon metoduyla özüt çıkarılması…….36
Şekil 3.2 Basınçlı solvent ekstraksiyonu yöntemi ile özüt çıkarılması……..36
Şekil 4.1 Bir numaralı klinik MRSA suşuna karşı etanol ekst. oluşturduğu zonlar...40
Şekil 4.1 Maserasyon yöntemi ile elde edilmiş menengiç ekstrelerinin MRSA'ya karşı oluşturduğu inhibisyon zonları ortalamaları (mm)……..43
Şekil 4.2 Basınçlı sıvı ekstraksiyonu yöntemi ile elde edilmiş menengiç ekst. MRSA'ya karşı oluşturduğu inhibisyon zonları ortalamaları (mm)…….....43

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1 Vankomisin Direnç Fenotiplerinin Bazı Özellikleri……...…20
Tablo 4.1 Maserasyon Ve Soxtherm Cihazı İle Menengiç Eks. Verim Yüzdeleri….39
Tablo 4.2 Maserasyon Yöntemiyle Elde Edilen Menengiç Özütlerinin MRSA'ya Karşı Oluşturduğu İnhibisyon Zonları (mm)…….41
Tablo 4.3 Basınçlı Solvent Ekstraksiyonu Yöntemiyle Elde Edilen Menengiç Özütlerinin MRSA'ya Karşı Oluşturduğu İnhibisyon Zonları (mm)……..42
Tablo 4.4 Maserasyon Yöntemi İle Soxtherm Cihazı Özütleri İçeren Disklerin MRSA' ya Karşı Ortalama İnhibisyon Zonları ve Karşılaştırılması……..44
Tablo 4.5 Maserasyon Yöntemi İle Elde Edilen Ham ve Olgun Menengiç Ekst. MRSA 'ya Karşı Oluşturduğu İnhibisyon Zonlarının Karşılaştırılması…44
Tablo 4.6 Basınçlı Solvent Yöntemi İle Elde Edilen Ham ve Olgun Menengiç Ekst. MRSA'ya Karşı Oluşturduğu İnhb. Zonlarının Karşılaştırılması….45
Tablo 4.7 Maserasyon Yöntemi İle Elde Edilen Özütlerin VRE'ye Karşı Oluşturduğu İnhibisyon Zonları (mm)- (Konsantrasyon 2 mg/disk)…….45
Tablo 4.8 Basınçlı Solvent Ekstraksiyonu İle Elde Edilen Özütlerin VRE'ye Karşı Oluşturduğu İnhibisyon Zonları (mm)- (Konsantrasyon 2 mg/disk)….....46
Tablo 4.9 Maserasyon Yöntemi ve Soxtherm Cihazı Özütleri İçeren Disklerin VRE' ye Karşı Ortalama İnhibisyon Zonları ve Karşılaştırması……...46
Tablo 4.10 Maserasyon Yöntemi İle Elde Edilen Ham ve Olgun Menengiç Ekst. VRE 'ye Karşı Oluşturduğu İnhibisyon Zonlarının Karşılaştırılması…...47
Tablo 4.11 Basınçlı Solvent Yöntemi İle Elde Edilen Ham ve Olgun Menengiç Ekst. VRE 'ye Karşı Oluşturduğu İnhb. Zonlarının Karşılaştırılması.....47

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

A.B.D	Amerika Birleşik Devletleri
Ala	Alanin aminoasidi
Arg	Arjinin aminoasidi
Asp	Aspartat aminoasidi
ATCC	American Type Culture Collection
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical & Laboratory Standarts Institute
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
Ɛ	Dielektrik sabiti
ETA	Eksfoliatif toksin a
ETB	Eksfoliatif toksin b
Gly	Glisin aminoasidi
Hz	Hertz
IgG	Immunoglobulin G
IS	Insersion series
kb	Kilo baz çifti
kDa	Kilo dalton
L.	Linnaeus
mg	Miligram
MHA	Mueller Hinton Agar
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MÖ	Milattan Önce

MRSA	Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
MS	Milattan Sonra
Mpa	Mega pascal
PBP	Penisilin bağlayan protein
PVL	Panton Valentine Lökosidin
SCC	Stapylococcal Cassette Choromosome
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TMP-SMX	Trimetoprim-sulfometaksazol
vd.	Ve diğerleri
VRE	Vancomycin Resistant *Enterococcus*
WHO	Dünya sağlık örgütü
v/v	Hacimce yüzde derişim (volume/volume)
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

BÖLÜM 1

GİRİŞ

İnsanlar, önceleri sağlık sorunlarını çözmek için bitkileri deneme yanılma yoluyla kullanmış ve bu konuda bir geleneksel kütüphane oluşmuştur. Bu denemeler esnasında muhtemelen birçok insan zarar görmüş ancak bu sayede diğer insanlara faydalı miraslar bırakmışlardır. Bugün hala bu miras, bilimsel çalışmalara ilham vermekte ve gerçeklik paylarının olduğu ortaya çıkmaktadır. Ancak geçmişteki gibi insanların bazı bitkilerin toksik etkilerine maruz kalmalarına gerek kalmamış, kontrollü deneylerle *invitro* ortamdan başlanarak araştırmalar yapılabilmiştir. Bu tez çalışmasına konu olan menengicin de ham iken halk arsında yaralara sürülerek kullanımı mevcuttur (Keleş, 2001). Bu da menengicin antimikrobiyal etkisine işaret etmektedir.

Menengiç meyvelerinin antimikrobiyal etkisinin de araştırıldığı bir çalışmada en iyi bakteriyosit etkiyi *Staphylococcus aureus'*a (ATCC 29213) karşı gösterdiği bildirilmiştir (Tepe vd., 2012). Menengiç meyve ekstrelerinin *S. aureus'*un antibiyotiklere dirençli olan diğer suşlarına karşı da antibakteriyel etkiyi gösterip göstermeyeceği konusu bu tezin çalışmasına gerekçe olmuştur.

Bu çalışmada; ham ve olgun menengiç meyvelerinin artan polarite sırasıyla hekzan, etanol ve su ekstreleri çıkarılmıştır. Bunun için iki farklı özütleme tekniği kullanılmıştır. Geleneksel bir özütleme tekniği olan maserasyon ile gelişmiş bir yöntem olan basınçlı sıvı ekstraksiyonu metotları kullanılmıştır.

Çıkarılan ekstrelerin, Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve Vankomisine Dirençli *Enterococcus* (VRE)'a karşı antibakteriyel etkisi disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır.

Bu çalışmanın amaçları;

1. Menengiç meyve özütünün VRE ve MRSA'ya karşı antibakteriyel etkisinin araştırılması.

2. Geleneksel bir ekstraksiyon yöntemi maserasyon ile gelişmiş ekstraksiyon tekniklerinden Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu' nun verimleri ve elde edilen ekstraktların antibakteriyel etkinliklerinin karşılaştırılması.

3. Ham ve olgun menengiç meyve özütlerinin antibakteriyel etkinlik açısından karşılaştırılması,
şeklinde sıralanabilir.

Maserasyon yöntemiyle ekstre çıkarma işleminde bitki numunesi düşük sıcaklıklarda işlem görmektedir. Ekstraksiyon ve evaporasyon aşamaları dahil sıcaklık değerleri 40 ^{0}C'yi geçmemektedir. Oysa basınçlı sıvı ekstraksiyonunda sıcaklık değerleri 290 ^{0}C'ye kadar kullanılabilmektedir. Bu çalışmada bu yöntemle 180 ^{0}C'de ekstre çıkarılmıştır.

Ancak yüksek sıcaklık, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıdaki makro moleküllerin konformasyonunda değişikliklere yol açabilmekte ve bunun sonucunda bu makro moleküllerin biyolojik aktiviteleri azalmakta yada kaybolbilmektedir. Yüksek sıcaklık kovalent bağları koparabilmekte ve kimyasal tepkimeler için gerekli aktivasyonu sağlayıp yeni bileşiklerin oluşmasına yol açabilmektedir. Bu olgulardan yola çıkılarak basınçlı sıvı ekstraksiyonundan elde edilen özütün antimikrobiyal aktivitesinde bir farklılık oluşabilir mi sorusu, çalışmanın ikinci amacını belirlemiştir.

Meyvenin bitkideki fonksiyonu, tohumun su kaybını önlemek, mikroorganizmalara ve böceklere karşı onu korumak ve tohumun yayılmasını sağlamak şeklinde özetlenebilir. Meyvelerin tohumu mikroorganizmalara karşı koruması fonksiyonu, onların antimikrobiyal içerik taşımasına bağlıdır. Bu içerikten bizler etken maddeleri izole ederek faydalanabiliriz. Meyveler antimikrobiyal maddeler bakımından potansiyel taşıyor olabilir. Özellikle meyvenin perikarp kısmı dış ortamla ilk muhatap olunan yüzeydir. Bu kısımlarda yüzey dekontaminasyonu açısından daha yoğun antimikrobiyal madde içerebilir.

Ham meyvenin olgun meyveye doğru gelişimi birçok kimyasal değişimi içermektedir. Bu değişimler sonucunda meyve hayvan ve insanlar tarafından yenebilecek hale gelmektedir. Bu değişimde bitkide sentezlenen etilen hormonu büyük rol oynamaktadır (Fidan ve Söylemezoğlu, 1995). Muhtemelen bu değişimler

sonucunda meyvenin taşıdığı antimikrobiyal madde yoğunluğu da değişmektedir. Meyve olgunlaştıktan sonra çürüme oranının daha fazla olduğu gözlenmektedir. Eğer bir meyve bir hayvan tarafından tüketilmediyse ilerleyen süreçte devam eden etilen hormonu etkileri sonucu meyve mikroorganizmalara karşı daha korunmasız hale gelmektedir. Çünkü meyve çürüyerek tohum toprağa düşmelidir. Bu gözlemden yola çıkarak ham meyvenin daha çok antimikrobiyal madde taşıdığını varsayabiliriz. Meyve ham halde iken tohum henüz yeni yeni oluşmakta ve korunmaya daha çok ihtiyaç duymaktadır. Bu da ham meyvenin daha çok antimikrobiyal madde taşıdığı fikrini destekleyen bir durumdur. Literatürde ham meyve ile olgun meyvenin içerdiği antimikrobiyal aktivite bakımından karşılaştırılmasına dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasının üçüncü amacı ham meyve ile olgun meyve özütlerini antimikrobiyal potansiyel açısından karşılaştırmaktır. Bu tez ile birlikte daha birçok karşılaştırmalı çalışma yapıldığında bu fikirler varsayım ve hipotezden daha ileri bilimsel bilgilere ulaşacaktır.

1.1 Bitkilerin Farmasötik Kullanımı

Bulunan en eski yazılı belgelerde dahi ilâç olarak kullanılan bitkilerden söz edildiğini, ortaya koyan birçok araştırma bulunmaktadır. Bu konuda ilk yazılı belge olan M.Ö. 3000 yıllarına ait Ninova tabletleri, Mezopotamya'da kurulan Sümer, Akat, Asur medeniyetlerinde bitkisel ve hayvansal ilaçlarla tedavilerin mevcut olduğunu kanıtlamaktadır (Sarışen ve Çalışkan, 2005). MÖ 2500 yıllarında Çin ve Hint tıplarına ait eserlerde 1000 kadar şifalı bitkiden bahsedilmiştir. Mısır hiyerogliflerinden, tanımı güç olmakla beraber, birçok ilaç hammaddesi kullanıldığı anlaşılmaktadır. İlk hakiki farmakognozist Dioscorides Pedanios'tur. Bitkisel, hayvansal ve mineral 500 kadar ilaç hammaddesi ihtiva eden kitabı (Perihyles Latrikes = ilâç bilgisi) latinceye "Materia Medica" ismiyle tercüme edilmiştir (MS 77). Bu eser Roma ve Arap dünyasına da yayılmış ve Orta Çağın sonuna kadar etkisini korumuştur (Tanker, 1991).

İslam uygarlığı döneminde, Ebu Reyhan el Biruni (973-1051) "Kitab us Saydala fit-Tıp" isimli kitabında 200 civarında bitkisel ilaçtan bahsetmektedir. İbn-i Sina (980-1037) 'Tıp Kanunu' kitabında diğer tıp konuları ile birlikte 800 kadar bitkisel ve hayvansal ilaçtan bahsetmiş, hazırlanış ve kullanış şekillerini açıklamıştır. Bu kitap 1650'li yılara kadar tıpta standart referans kitabı olmuştur. İbn Baytar'ın (1197-1248)

başyapıtı ‘Kitab el-Cami'fi el-Adviyye el-Müfredah’ kitabında yaklaşık 300'ü tamamen kendi keşfi olan, en azından 1400 farklı bitki ve ilacın ansiklopedik tanım ve tarifleri yer almaktadır (Topdemir, 2012).

“Fitoterapi” deyimi ilk kez 1939 yılında Fransız hekim Henri Lenclerc (1870-1953) tarafından La Presce Medical adlı tıp dergisinde kullanılmıştır. WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından 1991 de yapılan tanıma göre “bitkisel drog veya karışımlarını olduğu gibi ya da değişik preparatlar halinde taşıyan bitmiş, etiketlenmiş tıbbi ürün ya da müstahzar’ a bitkisel ilaç denir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünyada yaklaşık 4 milyar insanın sağlık sorunlarını ilk etapta bitkisel droglarla gidermeye çalıştıklarını bildirmektedir (dünya nüfusunun % 80’i). Ayrıca, gelişmiş ülkelerde reçeteli ilaçların yaklaşık % 25’ini bitkisel kökenli etken maddeler (vimbilastin, rezerpin, kinin, aspirin vb.) oluşturmaktadır (Farnsworth vd., 1985).

Taksonomik piramit metoduna göre dünyada yaklaşık üçyüzbin bitki türü olduğu öngörülmektedir (Gözcelioğlu, 2011). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) araştırmalarına göre tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin sayısı yirmibin civarındadır. Bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli olan özellikleri 1926 yılından bu yana laboratuvarlarda araştırılmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

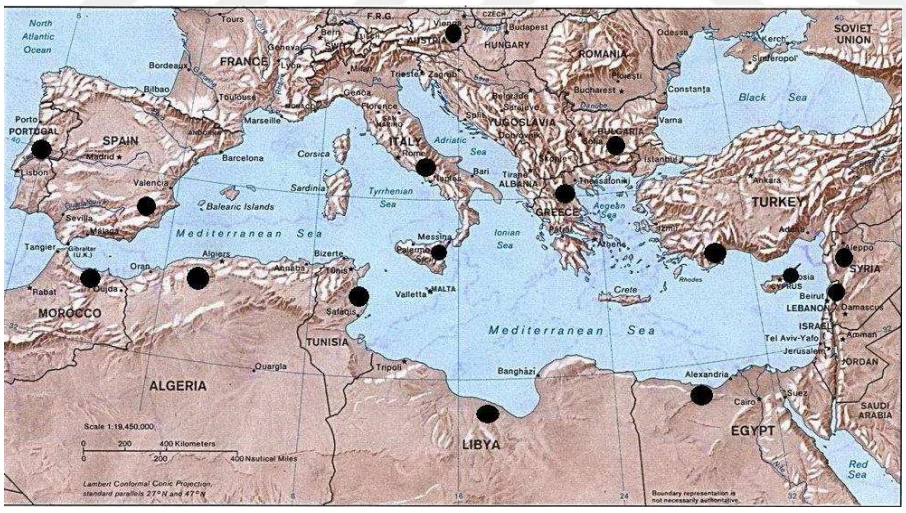
Geçmişte bilimin gelişmediği dönemlerde bitkilerin ilaç olarak kullanılması doğal karşılanabilir. Ancak günümüzde bitkilerin ilaç olarak kullanımının tekrar önem kazanması ilginç bir durumdur. Bir çeşit geriye dönüş yaşıyoruz sanki. Bu olgunun çeşitli sebepleri olabilir. Bunlar arasında; endüstrileşmeye karşı oluşan tepki, doğal olan zararsızdır düşüncesi, ilaçlarla oluşan yan etkilerin fazlalığı, tedavisi olmayan birçok kronik hastalığın varlığı sayılabilir.

Bitkiler ilaç etken maddeleri için önemli bir potansiyele sahiptir. Ancak bilimsel sandart araştırmaları yapılmadan, yan etkileri belirlenmeden bitkilerin ilaç olarak kontrolsüz bir şekilde kullanımı ölüme kadar yol açabilmektedir (Erdem ve Eren, 2009). Doğal olan zararsızdır kavramı yanlıştır. Bitkilerin doğal olması, onları kontrolsüz kullanmanın da doğal olduğu anlamına gelmez.

1.2 *Pistacia terebinthus* L. Yayılışı Ve Botanik Özellikleri

Pistacia L. *Anacardiaceae* familyasına ait olup, günümüzde 13 türü bulunmaktadır. Bunlardan *P. vera, P. atlantica, P. terebinthus, P. khinjuk,* ve *P. lentiscus* popüler olanlarıdır (Bozorgi vd., 2013). *Pistacia L.*'nın orjini, Merkezi Asya (Kuzey Doğu Hindistan, Afganistan, Tacikistan ve Özbekistan) ve Yakın Doğu, Anadolu, Kafkasya, İran ve Türkmenistan dağlarıdır (Onay, 1996). Türkiye, *Pistacia* L. için çok büyük bir gen merkezi olup, ülkemizde yaklaşık 66 milyon yabani fıstık ağacı bulunmaktadır (Kuru ve Özsabuncuoğlu, 1990).

Fitocoğrafik olarak *P. terebinthus* L. Batı Akdeniz bölgesinde, Ege havzasından batıya doğru Fas'ın Akdeniz kısmı ile Güney Portekiz ve Karadeniz'in güney kıyılarında yayılış göstermekte olup, Doğu Akdeniz fitocoğrafik bölge elementidir (Zohary, 1996; Zohary, 2000). *Pistacia terebinthus* L. Avrupa'da , İtalya' da (Pignatti, 1982), Kıbrıs'ta, İspanya'da, Kuzey Afrika'da, Lübnan 'da (Talhouk vd., 2001), Tunus'ta (Ghorbel vd., 2001), Suriye'de (Hadj-Hassan, 2001) ve Türkiye'de (Yaltırık, 1967; Atlı vd., 2001; Özuslu vd., 2005) geniş yayılış göstermektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Akdeniz havzasında *P. terebinthus* 'un yayılış gösterdiği ülkeler (Özuslu vd., 2009)

P. terebinthus L. doğal *Pistacia* L. türleri arasında en yaygın olan türdür ve Akdeniz bölgesinde sıcak iklime sahip alanlarda geniş yayılış göstermektedir (Atlı vd., 1999; Kafkas vd., 2002). *P. terebinthus* L. ülkemizin her tarafında, yerine göre genellikle düşük rakımlarda Güneydoğu Anadolu Bölgesi, Akdeniz ve Güneydoğu Ege

Bölgeleri, Ege bölgesinin kıyıya yakın ve düşük rakımlı yerleri, İç Ege-Orta Anadolu geçit bölgelerinde yayılış göstermektedir (Özuslu vd., 2009).

P. terebinthus L. Akdeniz havzasının batısı ve orta kısımlarında yaygın olarak bulunur. Akdeniz bitki örtüsünün karakteristik üyesidir ve genellikle baskın türü olan *Quercus coccifera* L. maki formasyonunda bulunur (Zohary, 1996). *P. terebinthus* L., ülkemizde özellikle Akdeniz, Güneydoğu Ege ve Ege'nin sahil kesimlerinde maki bitki örtüsü içinde bulunur. Karadeniz sahil şeridinde ve karasal iklimin görüldüğü alanlarda da bulunmaktadır. *P. terebinthus* L. Güneydoğu Anadolu Bölgesinde, Gaziantep, Adıyaman, Kahramanmaraş ve Şanlıurfa illerinde yaygın olarak bulunmakta, Akdeniz, Güneydoğu Ege Bölgesinde sahil boyunca iç kesimlerde ve Orta Anadolu geçit bölgelerinde de yayılış göstermektedir (Atlı vd., 2001).

P. terebinthus L. yaprak döken 2-3 m boyunda çalı ve 6 metreye kadar boylanabilen küçük ağaçlardır. Yaprak orta damarı kanatsız ve tüysüzdür. Yapraklar, terminalde tek yaprakçıklı (Şekil 1.2), (1-)2-4(-6) çift, yumurtamsı dikdörtgenimsi veya dikdörtgenimsi-mızraksı, 3-7(-8)x1.8-3(-4) cm tepe yaprakçığı yan yapraklar kadar geniş olmayan veya eşit, yaprakçıklar küt uçlu, sivri uçlu veya nadiren uca doğru aniden daralarak sivrilmis, daima sivri uçlu, yaprağın üst yüzü koyu yeşil, alt tarafı soluk yeşil ve tüysüzdür (Şekil 1.2). Çiçekler, ana ekseni yan dallarından uzun olan salkımlarda açar. Meyve küre seklinde veya genişçe ters yumurtamsı 5-6x4-6 mm büyüklüktedir (Özuslu vd., 2009).



Şekil 1.2 *Pistacia terebinthus* L. yaprak, çiçek, meyve görünümü.

Kırmızımsı mor renkli çiçekler Mart ve Nisan aylarında görülür. Önceleri kırmızı renkli olan meyve, olgunlaşınca mavimsi veya yeşilimsi siyah renktedir. Tohumlar Eylül-Ekim aylarında olgunlaşır.

P. terebinthus L. genellikle ocak halinde gelişir ve kuvvetli kök sistemine sahiptir. Bu sebeple, kültür arazisi yönünden en elverişsiz yer ve şartlarda yetişebilmektedir. Kuraklığa dayanıklı olduğu gibi kayalık, taşlı bölgelerde hakim bitki türü olarak görülür. Bulunduğu bölgeye uyum kabiliyeti çok yüksektir. Ülkemizde fıstık türleri arasında en yaygın anaç olması sebebiyle yağışlı bölgelerden en kurak alanlara kadar görülmektedir (Özuslu vd., 2009).

1.3 Ekstraksiyon Teknikleri

Ekstraksiyon, bir karışımdaki istenen madde veya madde grubunun karışımdan izole edilmesidir. Ekstraksiyon, ekstre edilecek maddenin özelliklerine göre çok farklı teknikler kullanarak gerçekleştirilebilir. Örneğin sıvı bir karışımda destilasyon veya ayırma hunisi teknikleri kullanılabilir. Katı maddeler için maserasyon , soxhlet, basınçlı solvent, süperkritik akışkan gibi teknikler uygulanabilir. Birçok ekstraksiyon yöntemi olmasına rağmen bu bölümde daha çok laboratuvarlarda kullanılan belli başlı tekniklere yer verilecektir.

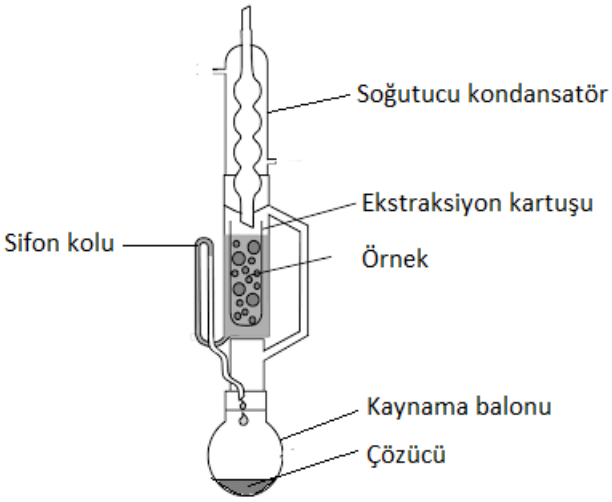
1.3.1 Maserasyon

Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden biridir. Katı maddenin çözücü içerisinde belirli bir süre bekletilmesi esasına dayanır. Genellikle madde-çözücü oranı bire ondur. Çözücü oranı artırılırsa verim de artar. Karışımın bulunduğu kap ışık almayan bir yerde oda sıcaklığında bir gün veya duruma göre daha fazla zaman bekletilir. Özütü alınacak madde küçük parçalara ayrılırsa verim artar. Ancak toz haline getirilirse çözücünün dibine çökeceği için çözücü-madde teması azalacağından sürekli karıştırma ihtiyacı doğar. Maserasyon karıştırmalı veya çalkalamalı bir sistemle desteklenirse ekstraksiyon süresi kısalır ve verim artar. Maserasyon bittikten sonra çözelti filtre kağıdında süzülür. Süzüntü evaporatörde vakum altında ısıtılarak düşük sıcaklıkta çözücü ekstraktan uzaklaştırılır.

Maserasyon yönteminde örnekler yüksek sıcaklığa ve fazla ışığa maruz kalmadıklarından aşırı ısıya karşı kararsız olan bileşiklerin eldesinde kullanılabilir. Ancak maserasyon yöntemi uzun zaman ve emek isteyen bir yöntemdir. Deneysel açıdan tekrarlanabilirliği zaman alıcıdır.

1.3.2 Soxhlet Ekstraksiyonu

1879 yılında F. Soxhlet tarafından geliştirilmiştir. Günümüzde de yaygın bir şekilde kullanılan geleneksel yöntemlerden biridir. Katı veya yarı katı nümuneler için uygundur. Ekstre edilecek maddenin bir düzenekle (Şekil 1.3) aynı çözücünün distilasyonu yoluyla birkaç kez taze solventle muamele edilmesi esasına dayanır. Tekrarlanma sayısı çözücüdeki renk değişimi gözlenerek belirlenir. Genellikle 6-24 saat arası sürmektedir.



Şekil 1.3 Soxhlet cihazı.

Ekstraksiyon boyunca balonda kaynayan çözücüden gelen buhar cam tüp içerisinde yükselmeye başlar. Yükselen buhar ekstraksiyon çemberine girer ve su ile soğutulmuş kondensatör tarafından yoğuşturulur. Yoğuşturulan sıcak çözücü ekstraksiyon çemberini doldurur ve kartuş içindeki numuneyle temas ederek çözünme gerçekleşir. Çemberin altına bağlı olan sifon tüp de yavaş yavaş çözücüyle dolar. Çözücü seviyesi çember içerisinde yükseldikçe, sifon otomatik olarak çözücüyü ve ekstrakte edilmiş olan maddeyi aşağıda bulunan balona geri akıtmaya başlar. Kaynama balonu ısıtılmaya devam edildiği için çözücü tekrar buharlaşarak numuneye ulaşır. Ekstraksiyon tekrarlı olarak devam eder. Ekstraksiyon işlemi bittikten sonra çözücü ovaporatörde distile edilerek uzaklaştırılır. Sistemde dönen maksimum sıcaklık çözücünün kaynama sıcaklığıdır.

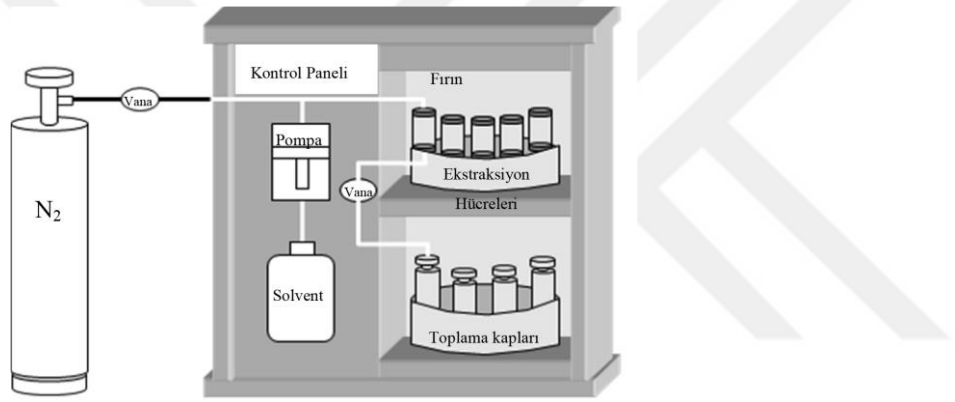
Soxhlet ekstraksiyonunun birçok avantajı vardır. Uygulaması basittir ve fazla emek gerektirmez. Fazla miktarda nümune ekstrakte edilebilir. Birkaç tekrarlı taze

solventle muamele edildiğinden verim artar. Ekstrakt çözeltisinin maserasyondaki gibi ayrıca süzülmesi gerekmez.

Soxhlet ekstraksiyonunun dezavantajları da vardır. İşlem uzun sürer. Çok miktarda solvente ihtiyaç duyulur. Ektrakt çözeltisindeki çözücünün evaporasyonla uzaklaştılması gerekir. Termal olarak kararsız hedef maddeler bozunabilir.

1.3.3 Basınçlı Solvent Ekstraksiyonu

Gelişmiş ekstraksiyon tekniklerinden biridir. Solventlerin kritik sıcaklık ve basınç noktalarına ulaşmadan yüksek basınç ve yüksek sıcaklıkta ekstraksiyon işleminin gerçekleştirildiği bir tekniktir. Bir fırın, ekstraksiyon hücresi, pompa ve basınç altında tutan sistem, birkaç vana ve solvent toplama kaplarından oluşur (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Basınçlı solvent ekstraksiyonu çalışma prensibi modelleme (Camel, 2001).

Bu sistemlerde basınç arttırıldığı için çözücülerin kaynaması noktası yükselir. Böylece çözücü atmosferik kaynama noktasının çok üstündeki sıcaklıklarda sıvı olarak kalabilir. Sıcaklığın 300 ^{0}C'ye kadar yükselebilmesi solventin viskozitesini düşürerek örneğe difüzyon gücünü arttırır. Yüksek sıcaklık karışımdaki moleküller arası kimyasal bağların (Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve dipol çekim gibi) kırılmasını kolaylaştırdığı için çözünme hızlı gerçekleşerek verim artar.

Bu yöntem oldukça zahmetsiz ve kullanımı kolay bir sistemdir. Cihaz evaparosyonu da kendisi gerçekleştirdiğinden işlem basamakları oldukça azdır. Evaporasyon dahil işlem kısa sürmektedir (toplamda 1-3 saat). Tekrarlanabilirlik özelliği vardır ve kolaydır.

Bu yöntemde en büyük avantaj su çözücüsünde görülür. Oda sıcaklığı ve atmosfer basıncı koşullarında suyun dielektrik sabiti ε = 78 dir. 300 $^{\circ}$ C ve 23 Mpa basınçta bu değer ε = 21 olur. Dielektrik sabiti 25 $^{\circ}$ C'de ve atmosfer basıncında etanol için ε = 24, aseton için ε = 20.7 ve metanol için ε = 23 dür. Bunun anlamı, yüksek basınç ve sıcaklık koşullarında suyun polaritesi ciddi şekilde düşmektedir ve ekstraksiyon işleminde etanol, aseton, metanol gibi davranabilmektedir. Bu sayede su orta polar-düşük polar bileşenlerin ekstraksiyonu işleminde organik solventler yerine kullanılabilir. Su ile yapılan ekstraksiyonun diğer bir avantajı ise organik solventlere kıyasla toksik olmaması, suyun çevre dostu ve ucuz bir solvent olmasıdır (Çam ve Hışıl, 2006).

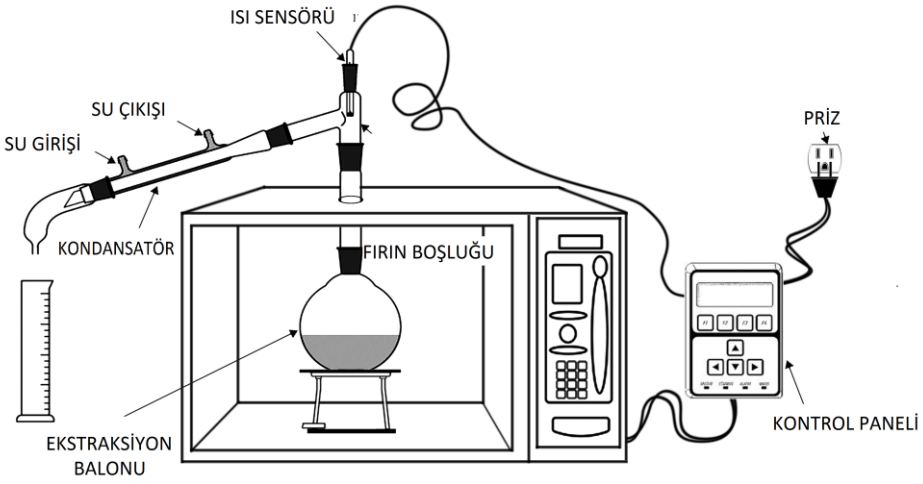
Basınçlı solvent ekstraksiyonunun tek kısıtı ısıl kararsız bileşiklerin bozulmasıdır. Termal stabilitesi düşük olan bileşikleri (örneğin karotenoidler) ekstrakte ederken sistem düşük sıcaklığa ayarlanmalıdır. Delgado ve ark. vitamin E ve izomerlerini basınçlı solvent ekstraksiyonu tekniği ile 50 ^{0}C'de ekstrakte etmişlerdir.

1.3.4 Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

Solventin fırın değilde mikrodalga ışınlar ile ısıtıldığı yöntemdir. Evlerde kullanılan mikrodalga fırın prensibine benzerdir. Mikrodalga, frekansı yüksek ışık demetinden oluşur. Isınma her yönde gerçekleşir. Fırın sisteminde ise alttan ısıtma sebebiyle konveksiyonla ısının yayılması söz konusudur.

Mikrodalga ışınlar hekzan gibi nonpolar solventleri ısıtmaz. Bu nedenle eğer hekzan kullanılacaksa polar solventler ile karışım oluşturulmalıdır. Örneğin 1:1 oranında hekzan-aseton karışımı gibi. Dipol momenti yüksek olan solventler çok hızlı ve yüksek ısılara ulaşır. Ekstre edilecek örneğin bozulmasından endişeleniliyorsa sıcaklığı düşük tutmak için dipol momenti düşük olan non polar solventlerle karıştırılabilir.

Mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemleri kapalı (Şekil 1.5) veya açık olabilir. Kapalı olan sistemlerde basınç yükseleceği için solvent kaynama noktasının çok üst sıcaklıklarına ulaşabilir. Bu yönden basınçlı solvent ekstraksiyonu sistemine benzemektedir. Kapalı sistemlerde basınç ve sıcaklığın kontrol edildiği elektronik bir panel mevcuttur. Açık sistemde ise maksimum sıcaklık solventin atmosferik kaynama sıcaklığıdır.



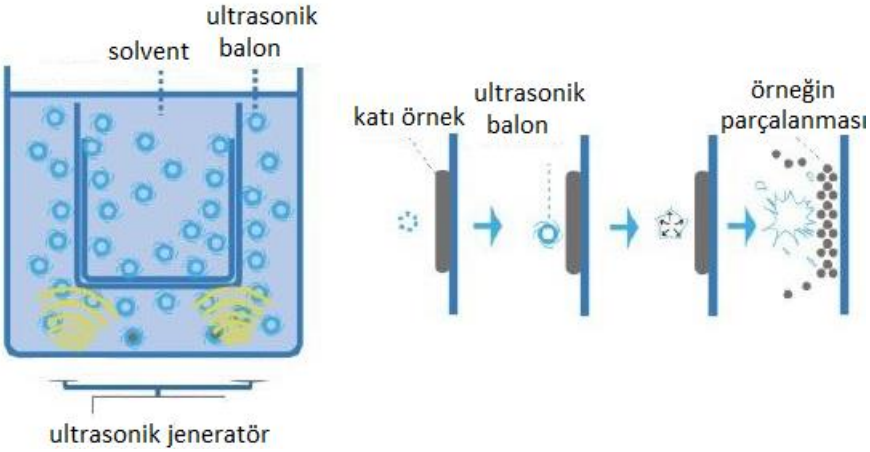
Şekil 1.5 Mikrodalga destekli Kapalı Tip Ekstraksiyon Sistemi.

Bu sistemin avantajları basınçlı solvent ekstraksiyonu ile benzerdir. İşlem süresi kısa olmasına rağmen kullanımı biraz daha emek istemektedir. Nonpolar solventlerin saf olarak ısıtılamaması dezavantajıdır. Ekstraksiyon işleminde tüm madde ekstre edildiğinden seçiciliği düşüktür. Hemen her ekstraksiyon sonrası temizleme basamağı gereklidir.

1.3.5 Ses Dalgaları Destekli Solvent Ekstraksiyonu (Ultrasonik ekstraksiyon)

Frekansı 20.000 Hz den yüksek olan ses dalgalarına ultrason denir. Bir sıvıya ultrasonik ses dalgaları gönderildiğinde çeşitli fiziksel değişimler meydana gelir. Ses dalgaları moleküllerin sıkışması ve gevşemesi şeklinde ilerleyen bir enerjidir. Yani bir bakıma pozitif basınç ve vakum şeklinde ilerler. Bunun sonucunda solventte ve nümunede mikro düzeyde bir titreşim ve çalkalama meydana gelir. Bu titreşimler solvent ile katı arasındaki etkileşimi arttırır. Moleküllerin gevşemesi esnasında oluşan boşlukta baloncuklar oluşur (kavitasyon) ve sıkışma esnasında patlar. Bu sırada açığa çıkan enerji solventi ısıtır. Oluşan bu küçük baloncuklar ve patlamalar katıların mekanik olarak sarsılmasına neden olarak partiküllerin kopmasını sağlar. (Şekil 1.6). Ses dalgaları genellikle analitin iyi geri kazanımıyla sonuçlanan katı ve solvent arasında etkin bir temas sağlar (Capelo ve Mota, 2005).

Ses dalgaları, hem katı hem de sıvı örnek hazırlamada kullanılır. Katı örneklerin ekstraksiyonu, digesyonu ve bulamaç oluşumu işlemini destekler. Sıvı örneklerde ise, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, homojenizasyonu veya emulsiyon haline getirmeyi desteklemek için kullanılır (Tadeo vd., 2010).



Şekil 1.6 Ultrasonik ekstraksiyon teknolojisi modeli.

Ultrason destekli ekstraksiyon sistemi ucuz, basit ve verimli olması nedeniyle geleneksel ekstraksiyon tekniklerine iyi bir alternatiftir. Ultrasonun katı-sıvı ekstraksiyonunda kullanılmasının başlıca yararları hızlı kinetik ve verim artışıdır. Ayrıca ultrason, düşük sıcaklıklarda da etkin olarak uygulanabildiğinden sıcaklığa duyarlı maddelerin ekstrakte edilmesini mümkün kılar (Tavman vd., 2009).

Bu yöntemin dezavantajları ise büyük miktarda solvent kullanılması ve filtrasyon gerektirmesidir (Büyüktuncel, 2012).

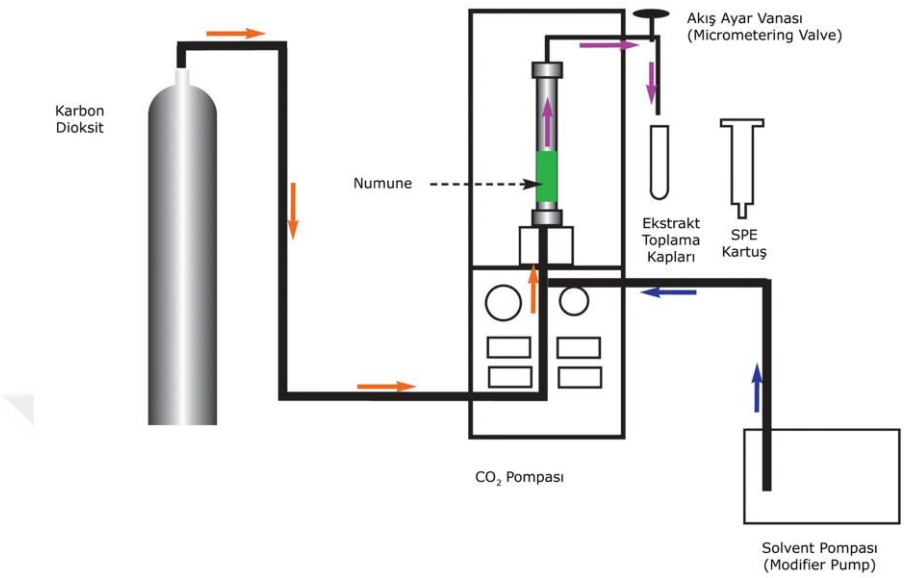
1.3.6. Süper Kritik Akışkan Ekstraksiyonu

Saf bir madde üzerinde basınç ve sıcaklık sürekli arttırılırsa bir noktadan sonra basınç ve sıcaklık ne kadar artarsa artsın madde kritik faz denen sıvı ve gaz arasında fiziksel bir halde kalır. Bu sıcaklık noktasına kritik sıcaklık , basınç miktarına da kritik basınç denir. Maddenin bu haline süperkritik akışkan fazı denir. Madde hem sıvı hem de gaz özelliklerini taşır. Bir gaz gibi katı maddenin içine nüfuz edip sıvı gibi çözer.

Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda karbondioksit kullanılır (Şekil 1.7). Diğer çözgenler süperkritik hale geldiğinde patlayıcı ve zehirli özellikler taşırlar. Ancak karbondioksit hem güvenli, hem zehirsiz, hem de ucuzdur. Ekstraktan hızlıca gaz halinde uzaklaştırılabilir.

Karbondioksitin süperkritik hale gelmesi için gerekli olan sıcaklık 31,3 ^{o}C dir. Gerekli olan basınç ise 5 Mpa'dır. Bu basınç ve sıcaklığın altına düşmedikçe

karbondioksit süperkritik akışkan fazındadır. Gerekli sıcaklığın düşük olması ısıl kararsız bileşiklerin ekstraksiyonunu da mümkün kılar.



Şekil 1.7 Süperkritik akışkan ekstraksiyonu çalışma prensibi.

Süperkritik karbondioksit polar olmayan ve orta polar organik bileşikler için yüksek çözme gücü gösterir. Ancak polaritesi yüksek maddeleri ekstre etmek için karbondioksite belirli oranlarda madifikatörler katılmak zorundadır (Örneğin metanol). Bu sistemin maliyeti nisbeten yüksektir.

1.3.7 Diğer Teknikler

Bu sayılan tekniklerin dışında da laboratuvar ve endüstride kullanılan yöntemler mevcuttur. Katı ve sıvı faz mikroekstraksiyon, stirbar sorptif ekstraksiyonu , membran ekstraksiyonu, matriks katı-faz dispersiyonu, poroplast ekstraksiyonu, katı destek üzerine adsorpsiyon, tepe boşluğu yakalama ve mekanik yöntem (presleme) gibi daha birçok kullanım alanına spesifik teknikler mevcuttur.

1.4 Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Stafilokoklar, Eubacteria alemi, Firmicutes şubesi, Bacilli sınıfı, Bacillales takımı, Staphylococcaceae ailesi, *Staphylococcus* cinsi içerisinde yer alırlar. Günümüze kadar *Staphylococcus* genusunda 30'u aşkın tür bulunmasına karşın en patojen tür *S. aureus* olarak bilinmektedir (Akan, 2006).

S. aureus'lar gram pozitif, 0,5-1,5 µm çapında yuvarlak şekilli, hareketsiz, sporsuz, bazı suşları kapsüllü, fakültatif anaerobik özellikte, hem oksidatif hem fermentatif metabolizmaya sahip etkenlerdir. Mikroskopik olarak tekli, ikili, dörtlü koklar halinde bulunabilir, üç veya dört koktan oluşan kısa zincirler yapabilir veya düzensiz üzüm salkımı benzeri şekiller oluştururlar. Etkenler, nutrient agar ve kanlı agar gibi genel besiyerleri ile mannitol salt agar gibi selektif besiyerlerinde 37 °C'de 24 saat içerisinde gözle görülebilir büyüklükte, hafif konveks ve S-tipli koloniler oluşturarak ürerler. Koyun kanlı agarda altın sarısı renginde, genellikle hemolitik özellikte, mannitol salt agarda mannitolün fermentasyonuna bağlı olarak sarı renkte koloniler görülürken, buyyonda homojen bulanıklık oluştururlar. Aerobik koşullarda optimal üreme ısısı 37 °C, optimal üreme pH'sı ise 7,4 olmakla birlikte, 7,0 °C ile 48,5 °C'ler arasında ve pH 4,2 ile 9,3 arasında da üreyebilmektedirler (Garipçin ve Şeker, 2013). Katalaz ve koagulaz pozitif, oksidaz negatifdirler.

1.4.1 *S. aureus*'un Virulans Faktörleri

S.aureus'un virulans faktörlerini yapısal elemanlar, enzimler ve toksinler olarak üç gruba ayırabiliriz.

Yapısal elemanlardan kapsül, kemotaksis, fagositoz ve mononükleer hücrelerin proliferasyonunu inhibe eder, yabancı cisimlere yapışmayı kolaylaştırır. Peotidoglikan tabaka osmotik stabiliteyi sağlar, endotoksin benzeri aktiviteyle endojen pirojenlerin üretimini uyarır, fagositozu inhibe eder, lökosit kemotaksisini uyarır (apse formu). Teikoik asit, hücre membranındaki katyonik konsantrasyonu regüle eder, fibronektine bağlanır. Protein A, IgG1, IgG2 ve IgG4'lerin Fc bölgelerine bağlanarak antikor bağımlı klirensi inhibe eder, lökosit kemotaksisini uyarır, anti-kompleman özelliktedir. Sitoplazmik membran osmotik bariyer özelliğindedir, hücre içi ve dışı arasındaki alışverişi düzenler, hücrenin beslenmesi için gerekli enzimleri üretir.

Enzimlerinden koagülaz, fibrinojeni fibrine çevirir. Katalaz, hidrojen peroksidi suya ve oksijene parçalar. Hyaluronidaz, bağ dokusundaki hyaluronik asidi parçalayarak stafilokokların dokuda yayılmasına yardımcı olur. Fibrinolizin, fibrin pıhtılarını eritir. Lipaz, lipidleri hidrolize eder. Nükleaz, DNA'yı hidrolize eder. Penisilinaz, penisilinleri hidrolize eder.

Toksinleri ise; sitotoksinler (alfa, beta, gama,delta, PVL), lökosit, eritrosit, fibroblast, makrofaj ve trombosit gibi birçok hücre için toksik özelliktedirler. Eksfoliatif toksinler (ETA, ETB), serin proteaz aktivitesiyle epidermisin stratum granülosum tabakasındaki hücreler arası desmosom köprülerini parçalar. Enterotoksinler, T-hücrelerinin proliferasyonunu ve sitokin salgılamalarını arttırıcı etki (süperantijen), mast hücrelerinden inflamatuar mediatörlerin salınımını stimüle eder, intestinal periztaltizmi ve su kaybını arttırır, mide bulantısı ve kusmaya neden olur. Toksik şok sendromu toksini-1, T-hücrelerinin proliferasyonunu ve sitokin salgılamalarını arttırıcı etki (süperantijen), endotel hücrelerinin parçalanmasına neden olur (Boz, 2009)

1.4.2 *Staphylococcus aureus*' ta Antibiyotiklere Direnç Gelişimi Tarihçesi

*****1878. Robert Koch Stafilokokları tanımladı.

*1881. Alexander Ongston Stafilokokların hastalık yaptığını gösterdi.

*1928. Alexander Fleming penisilini buldu.

*1940. Penisilin klinik kullanıma girdi. Enfeksiyona bağlı ölümler azaldı (Chambers, 2001)

*1940. Penisiline dirençli *S. aureus* hastane epidemileri ortaya çıktı. Direnç mekanizması bakterinin ürettiği penisilinaz enziminin penisilini hidrolize etmesi idi.

*1951. Penisilinin yanısıra tetrasiklin, eritromisin, streptomisin ve novobiosin gibi diğer antibiyotiklere de direnç gelişimine tanık olunmuştur (Çoklu antibiyotik direnci).

*1960. Penisilinaz enzimine dirençli olan metisilin antibiyotiği üretildi.

*1961. İngiltere'de ilk metisiline dirençli suş izole edildi (Jevons, 1961).

*1970. Gentamisine dirençli suşlar izole edildi.

*2002. İlk vankomisin dirençli *S.aureus* (VRSA) A.B.D.'de tanımlanmıştır (CDC, 2002). Vankomisin direncinin yaygınlaşmasından tüm dünyada korkulmaktadır.

Günümüze kadar gelen süreçte direnç oranı giderek artmış, penisilinle başlayan direnç artık çoklu antibiyotik direnci olarak gelişimini devam ettirmektedir.

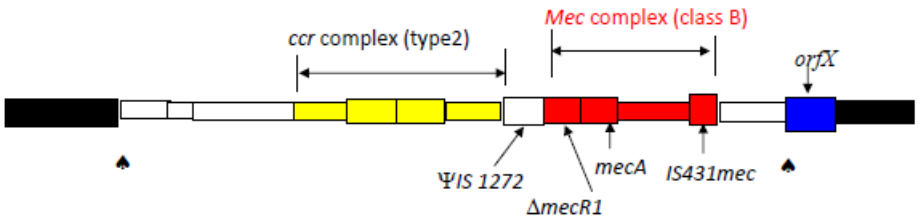
1.4.3 MRSA'da Direnç Mekanizması

Metisiline duyarlı *S. aureus*'larda beş adet penisilin bağlayan protein (PBP) bulunmaktadır. Bu proteinlerin görevi hücre duvarındaki peptidoglikan tabaka elemanlarının taşınmasıdır. Metisilin bu proteinlere bağlanarak duvar oluşumunu

inhibe edip bakteri ölümüne sebep olmaktadır. Ancak MRSA'larda bu beş proteine ek olarak 78 kDa ağırlıkta PBP2a adında ek bir protein mevcuttur. PBP2a metisiline (bütün beta laktam antibiyotiklere) düşük afinite göstermektedir. Diğer PBP'ler metisilin tarafından bağlansa da PBP2a diğerlerinin boşluğunu doldurarak peptidoglikan sentezini devam ettirir. Üreme devam eder. Metisilin direnci oluşmuş olur.

PBP2a, 2.1 kb büyüklüğünde olan ***mecA*** geni tarafından kodlanır. *mecA* geninin ekspresyonu ***mecR1*** ve ***mecI*** genleri ile kontrol edilir. *mecR1* geni, sinyal dönüştürücü (signal transducer) bir protein olan MecR1'i, *mecI* geni de represör bir protein olan MecI'yı kodlamaktadır. Beta-laktam grubu antibiyotik ortamda yokken MecI, hem *mecA* hem de *mecR1* genlerinin transkripsiyonunu inhibe eder (Deurenberg ve Stobberingh, 2008).

MecR1, transmembran yerleşim gösteren bir proteindir. Ortamda bulunan beta-laktam yapısındaki antibiyotikleri hücre dışı yerleşim gösteren penisilin bağlayan domaini sayesinde algılar ve otomatik olarak parçalanır. Bunun sonucunda sitoplazmik yerleşim gösteren metalloproteaz domaini aktif hale dönüşür. Metalloproteaz, *mecA* geninin operatör bölgesine bağlı bulunan MecI'yı parçaladıktan sonra *mecA* geninin operatör bölgesine bağlanarak *mecA*'nın transkripsiyonuna yol açar. Hem *mecR1* ve *mecI* geni, IS*1272* veya IS*431* insersiyon dizileri nedeniyle delesyona uğrayabilirler ki bu da *mecA* geni üzerindeki baskının ortadan kalkması ile sonuçlanır (Sancak, 2012).



Şekil 1.8 MecA genini taşıyan SCCmec kaseti.

MecA geni, bakteri kromozomunda stafilokokal kaset kromozomu *mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome mec; *SCCmec*) üzerinde yer alır (Şekil 1.8). *SCCmec* kasetinin büyüklükleri 20 kb'dan, 67 kb'a kadar değişkenlik gösterir. *mecA* ise yaklaşık olarak 2kb büyüklüğünde olup *SCCmec* elementinin küçük bir bölümünü

oluşturur (Woodford ve Livermore, 2009). Bugün için tanımlanmış 11 farklı (Tip I-XI) *SCCmec* tipi bulunmaktadır.

Günümüzde SCC*mec* kaynağı hâlâ bilinmemektedir. *S. aureus'*un *S. sciuri*'den veya *S. fleuretti*'den bu elementi kazandığı düşünülmektedir (Tsubakishita vd, 2010).

Bir *S. aureus*'ta *mecA* geninin bulunması onun mutlaka metisilin dirençli olduğunu göstermez. Metisilin direncinin fenotipik olarak ortaya konması bakteriler arasında değişkenlik göstermektedir. MRSA suşlarının hepsi PBP2a oluşturmalarına rağmen, metisilin direnci değişik derecelerde ortaya çıkmaktadır ya da bir başka şekilde ifade etmek gerekirse, metisilin direnci, homojen ve heterojen olmak üzere iki farklı fenotip olarak görülmektedir. Homojen dirençte, hücrelerin hepsi yüksek konsantrasyondaki metisilin varlığında üreyebilme özelliği göstererek yüksek düzeyde direnç ortaya koyarlar. Heterojen dirençte ise, o bakteri topluluğunda bulunan tüm hücreler *mecA* genini taşımalarına rağmen bu topluluğun sadece belirli bir kısmında metisilin direnci görülür. Heterojen direnç gösteren MRSA topluluğunda, hücrelerin çoğunluğu (% 99.9 veya daha fazlası) düşük metisilin konsantrasyonlarına (1-5 μg/ml) duyarlı iken, 102 ile 108'de bir sıklıkta olmak üzere hücrelerin bir kısmı yüksek metisilin konsantrasyonlarına (≥50μg/ml) direnç göstermektedir (Sancak, 2000).

1.5 Vankomisine Dirençli *Enterococcus* (VRE)

Enterokoklar tekli, ikili, ya da kısa zincirler halinde görülebilen, fakültatif anaerob, gram pozitif koklardır. Mikroskopik olarak streptokok türlerinden ayrılamazlar. Agarda üreyen kolonilerden yapılan gram boyamada bazen gram pozitif kokobasil şeklinde görülebilirler. İdeal üreme ısıları 35 ^{o}C olmakla birlikte 10 ‑ 45 ^{o}C arasında değişen bir üreme aralığına sahiplerdir. %6,5 NaCl' de ürer, %40 safra varlığında eskulini hidrolize ederler. 60 ^{o}C' ye 30 dakika dayanıklıdır. Kanlı agarda 0,5 - 1,5 mm boyutunda, (streptokoklardan daha büyük) kabarık, gri - beyaz renkte koloniler yaparlar. Alfa, beta veya gama hemoliz yapabilirler.

İnsanda enfeksiyonlardan başlıca iki türü sorumludur. Enfeksiyonların %80-90'nından *Enterococcus faecalis*, %5-10'undan ise *Enterococcus faecium* sorumludur. *E.gallinorum, E.casseliflavus, E. avium* ve *E. raffinosus* gibi diğer enterokok türleri klinik örneklerin %5'inden izole edilmiştir. VRE'ların %98'ini *E.*

faecium oluşturmaktadır. Enterokoklardaki vankomisin direnci streptokok ve stafilokoklara aktarılabilmektedir (English ve Shenep, 2004).

Enterokoklar, insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinin üyeleridir. Doğada; toprak, su, bitki, kuşlar böcekler ve memelilerde yaygın olarak bulunurlar. İnsanlarda, esas olarak gastrointestinal florada bulunmaları nedeni ile gerek hastane gerekse hastane dışı ortamda endojen kaynaklı infeksiyonlara yol açmaktadırlar. *E.faecalis* diğer enterokok türlerine göre dışkıda daha yüksek oranda bulunur (Gültekin, 2004).

Enterekok enfeksiyonları arasında; üriner enfeksiyon, yara enfeksiyonları, bakteriyemi, enfektif endokardit, abdominal enfeksiyonlar ve menenjit sayılabilir.

1.5.1 Enterekoklarda Virulans Faktörleri

Enterokoklar, düşük virülanslı bakterilerdir. Bilinen virülans faktörleri, sitolizin, lipoteikoik asit, foremonlar, agregasyon maddesi, jelatinaz, ekstraselüler süperoksit ve ekstraselüler yüzey proteini şeklinde sıralanabilir.

Sitolizin; *E. faecalis* ve *E. faecium*'un bazı suşları tarafından üretilir. Eritrositler için hemolizin aktivitesi gösterir. Bazı ökaryotik hücreler için toksiktir (Moellering, 1992).

Lipoteikoik asit, Enterokokların D grubu antijenini oluşturur. Tümör nekroz faktör ve interferon salınmasına neden olarak, immun cevabın düzenlenmesini sağlar (Koneman vd., 2005).

Feromonlar, *E. faecalis'*de bulunur. Suşlar arasında plazmid DNA'sının konjugatif transferini kolaylaştıran ve organizma tarafından salınan küçük peptitlerdir. Nötrofiller için kimyasal olarak çekici olduklarından infeksiyonlarda inflamatuvar cevabı artırırlar (Koneman vd., 2005).

Agregasyon faktörü, *E.faecalis ve E. faecium*'da bulunur. Feromonlarla sentezi ve salınımı indüklenen yüzey proteinidir. Alıcı ve verici hücrelerin birleşmesini sağlayarak plazmid transferini kolaylaştırır. Arg-Gly-Asp motifleri üzerinden etki ederek renal tübüler hücrelere bağlanmayı güçlendirir (Moellering, 1992).

1.5.2 Enterokoklarda Antibiyotik Direncin Tarihçesi

Direnç genlerinin bir enterokoktan diğerine transferi ilk olarak 1964 yılında gösterilmiştir (kloramfenikol direnci). Betalaktamaz oluşturan suş ilk olarak 1981 yılında ABD'de tanımlanmıştır. Vankomisin dirençli enterokok ilk olarak 1986' da Avrupa' da ve 1987' de Amerika' da rapor edilmiştir (Coque ve Tomayko, 1996). Toplumdaki VRE rezervuarının hastaneler için bir tehdit oluşturabileceği endişesi ile 1997 yılında Avrupa Birliği ülkelerinde hayvan yemlerine avoparsin eklenmesi yasaklanmıştır (Gültekin, 2004).

Türkiye' de vankomisin dirençli ilk *E. faecium* suşu 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi' nden Vural ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Son yıllarda hastanelerden izole edilen enterekoklar içerisinde VRE oranı % 10 ları bulmuştur. Son yıllar içindeki bu gelişmeler, enterokoklarda glikopeptid direncinin yakın bir gelecekte ülkemizde de ciddi bir sorun olarak karşımıza çıkabileceğinin habercisidir.

1.5.3 VRE'lerde Direnç Mekanizması

Genel olarak enterekoklardaki direnç mekanizmaları doğal (kromozomal) ve kazanılmış direnç olrak iki kısımda ele alınabilir. Doğal direnç özellikleri türe özgüdür, enterokok türlerinin tümünde bulunan kromozomal direnci ifade eder. Enterokok türleri penisilinlere, sefalosporinlere, linkozomidlere, trimetoprim-sulfometaksazol (TMP-SMX)'e ve aminoglikozidlere (düşük düzeyde), kinopristindalfopristin'e karşı kalıtsal olarak dirençlidirler (Şardan, 2004).

Kazanılmış direnç, genellikle bir DNA mutasyonu ya da yeni bir DNA segmentinin transferi sonucunda gelişir. Enterokoklarda yeni DNA segmenti transferinden en sık sorumlu olan mekanizma konjugasyondur (Şardan, 2004).

Vankomisin glikopeptid antibiyotik grubundadır. Glikopeptid antibiyotikler, hücre duvarı sentezinde peptidoglikan polimerlerini oluşturacak öncül maddelerden olan D-ala-D-ala terminal ucuna bağlanır ve hücre duvarı sentezini bozarlar. VRE ise ligaz enzimi ile D-ala-D-ala ucunun yapısını değiştirir ve D-ala-D-ala-laktat veya Dala-D-ala-serin meydana getirir. Böylece bu uca vankomisin bağlanma yeteneği çok azalır ve hücre duvarı sentezi devam eder.

Direncin sınıflandırılması günümüzde spesifik ligaz genlerinin varlığına göre yapılmaktadır. VanA, VanB, ve VanD tipi direnç; D-ala-D-ala-laktat, VanC ve VanE tipi direnç ise D-ala-D-ala-serin üretimi ile ilişkilidir (Başustaoğlu, 2004). Enterekoklarda vankomisine karşı oluşan direnç VanC tipi zayıf direnç hariç kazanılmış dirençtir (Tablo 1.1).

Tablo 1.1 Vankomisin Direnç Fenotiplerinin Bazı Özellikleri.

Özellik	**Van A**	**Van B**	**Van C**	**Van D**	**Van E**
Vankomisn Teikoplanin	64 -1000 16 - 512	4 - 1000 0.5 - 32	2 - 32 0.5 -1	64 - 256 4 -32	16 0.5
Gen	Edinsel Tn 1546	Edinsel Tn 1547	Yapısal Kromozom	Edinsel Kromozom	Edinsel Kromozom
Peptidoglikan	D ala-D lac	D ala-D lac	Dala-D ser	Dala-D lac	DalaDser
Aktarılabilme	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
Mikroorg.	*E.faecium* *E.faecalis* *E.gallinarum* *E.casseiflavus* *E.durans*	*E.faecium* *E.faecalis* *E.gallinarum* *E.casseiflavus*	*E.gallinarum* *E.casseiflavus*	*E.faecium*	*E.faecium*

BÖLÜM 2

KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *P. terebinthus* L. İle İlgili Çalışmalar

Hacıbekiroğlu ve ark. (2014), *P. terebinthus* meyvesinin hekzan, diklorometan, etanol ve etanol-su ekstraktlarının 100 mg/ml konsantrasyonda broth dilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında hekzan ve diklorometan özütleri hiç aktivite göstermemiştir. Etanol ve su-etanol ekstrelerinden en yüksek antimikrobiyal etkiyi etanol ekstresi *E. coli*'ye karşı göstermiştir (25 mg/ml).

Durak ve Uçak (2014), *P. terebinthus* meyvesinin aseton-su ekstresini çıkararak , *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* O157:H7 bakterilerine karşı aktivitesini disk difüzyon yöntemi ile araştırmışlardır. 0.5 mg/disk ekstre konsantrasyonun *S. aureus*'a karşı (12 örnek) oluşan zon çapını 9-13 mm, *L. monocytogenes*' e karşı 11,25-14,25 mm , *S. typhimurium'* a karşı 11,67-15,25 mm, *Escherichia coli* O157:H7 ye karşı 8,75-11,5 mm olarak ölçmüşlerdir.

Tepe ve ark. (2012), *P.terebinthus* meyve perikarbının metanol ekstraktının antimikrobiyal aktivitesini yedi bakteri ve bir maya türüne karşı sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile ölçmüşlerdir. Bitkinin meyve perikarpında en iyi bakteriosit etkiyi *Staphylococcus aureus ATCC 29213* suşunda gösterdiğini bildirmişlerdir.

Ulukanlı ve ark. (2012), *P. terebinthus* meyvelerinden elde ettikleri uçucu yağların antimikrobiyal etkinliğini disk difüzyon metoduna göre araştırmışlardır. Uçucu yağların gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu bir aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

İsmail ve ark. (2013), *P. terebinthus* yaprak extresinden elde edilen uçucu yağların antifungal aktivitesini araştırmışlardır. *Fusarium culmorum, F. avenaceum, F.*

oxysporum, *F. subglutinans*, *F. verticillioides*, *F. nygamai*, *F. nygamai*, *Botrytis cinerea*, *Microdochium nivale* ve *Alternaria* spp. olmak üzere on bitki patojeni mantara karşı önemli bir antifungal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kordalı ve ark. (2003), *P. terebinthus* , *P. vera* ve *P. lentiscus* ham ekstrelerinin antifungal aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında *Phythium ultimum* ve *Rhizoctania solani* karşısında antifungal aktivite gösterirken *Fusarium sambucinum* karşısında aktivite göstermediğini bildirmişlerdir.

Erecevit (2007)'in yaptığı çalışmada, *Pistacia terebinthus* , kloroform ekstraktı hazırlanarak disk difüzyon metoduna göre; *Staphylococcus aureus* COWAN 1, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Klebsiella pneumoniae* FMC 66032, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* FMC 17, *Candida globrata* ATCC 66032, *Candida ttropicalis ATCC 13803, Trichophyton sp., ve Epidermophyton sp.* üzerinde antimikrobiyal etkilerini test etmiştir. Çalışmalar sonucunda, kloroform ile hazırlanan ekstraktların bakterilerin, mayaların ve dermofitlerin gelişmelerini değişen oranlarda engellediğini tespit etmiştir.

Clark ve ark. (2013), Mısır Firavunlarının mezarlarındaki gıda mumyalarından et mumyalarında yaptıkları çalışmada bir sığır kaburgasında koruyucu madde olarak *Pistacia* reçinesi tespit etmişlerdir. Clark ve arkadaşları bu reçinenin *P. terebinthus* veya *P. lenticus*'a ait olma olasılığının daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Keleş ve ark. (2001), *P. terebinthus* meyvesinin etanol ekstraktının, *Staphylococcus aureus* (Cowan I suşu), *Streptococcus agalactia* (ATCC 7077), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Salmonella gallinarum* (ATCC 9184), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumonia* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa'*ya (ATCC 9027) karşı antibakteriyel etkilerini disk difüzyon ve dilüsyon tekniklerini kullanarak araştırmışlardır. Bu araştırmanın sonucunda *S. aureus'*a karşı 10 mm , *S. enteritidis*'e karşı 8 mm, *S. gallinarum*'a karşı 10 mm inhibisyon zonu ölçmüşlerdir. Diğer mikroorganizmalara karşı inhibisyon zonu oluşmadığını bildirmişlerdir. *S. aureus'*a karşı MİK değerini 2 mg/ml, *S. gallinarum*'a karşı 2 mg/ml olarak bulurlarken diğer mikroorganizmalara karşı 4 mg/ml konsantrasyonu dahil bir MİK değeri oluşmamıştır.

2.2 MRSA'ya Karşı Antibakteriyel Çalışmalar

Addo-Mensah ve ark. (2015), *Artemisia vulgaris* kök ekstresinin MRSA'nın da içinde olduğu bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesini araştırmak için disk difüzyon yöntemini kullanmışlardır. Sırasıyla petrol eteri, aseton ve etanol (%90'lık) ekstraklarını çıkararak MRSA'ya karşı antibakteriyel aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında sadece aseton ekstresinin MRSA'ya karşı 25 mg/ml konsantrasyondan başlamak üzere inhibisyon zonu oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Ramadan ve ark. (2015), nar, portakal ve limon kabuklarının metanol ve etanol ekstraktlarının MRSA'nın da bulunduğu beş patojen bakteriye karşı antibakteriyel aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmalarını *invitro* ve *insitu* (tavuk derisinde) olarak gerçekleştirmişlerdir. *İnvitro* çalışmalarında disk difüzyon ve dilüsyon yöntemlerini kullanmışlardır. Buna göre 100 mg/ml konsantrasyonda, nar kabuğu etanol ekstresi hariç 12,27-14.2 mm arası inhibisyon zonu oluşmuştur. 10 mg/ml ekstre konsantrasyonunda nar kabuğu etanol ekstresi hariç 9,13-10,4 mm arası inhibisyon zonu oluştuğunu ölçmüşlerdir. 1 mg/ml konsantrasyonunda ise zon oluşmadığını gözlemlemişlerdir. MİK değerleri ise narkabuğu etanol ekstresi hariç 2,5 - 5 mg/ml arasında gerçekleşmiştir. Tavuk derisinin 1 cm^2 sine uygulanan 2,5 ve 5 mg/ml konsantrasyonlarındaki ekstreler, 10^8 cfu/ml miktarındaki MRSA bakterilerini 24 saatte önemli oranda azalttığını bildirmişlerdir.

İbrahim ve Lim (2015), *Enteromorpha intestinalis* alginin metanol ekstresinin antimikrobiyal aktivitesini disk difüzyon ve broth dilüsyon tekniklerini kullanarak çalışmışlardır. MRSA' ya karşı 9-15 mm arası inhibisyon zonu oluşmuş, MİK değerini ise 6,25 mg/ml olarak belirlemişlerdir.

Kamble ve Moon (2015), *Tridax procumbens* kökünün metanol ekstraktının 134 klinik MRSA izolatına karşı antibakteriyel aktivitesini disk difüzyon yöntemine göre araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda 300 mg/ml konsantrasyonunda kullandıkları ekstraktın 17-25 mm arasında inhibisyon zonu oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Okamura ve ark. (2015), *Nuphar japonicum* ekstresinden izole 6,6′-dihydroxythiobinupharidin bileşiğinin yirmi adet MRSA suşunun da olduğu bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesini mikrodilüsyon yöntemi ile çalışmışlardır. Çalışma sonucunda MİK değerlerini 2-4 μg/ml arasında bulmuşlardır.

Cha ve ark. (2015), *Cinnamomum camphora* yaprakları etanol (%80) ekstraktını oksasilin ve amphisilinle birlikte kullanarak 15 adet klinik MRSA suşuna karşı sinerjistik etkisini mikrodilüsyon yöntemi ile araştırmışlardır. Çalışma sonucunda özütün bu antibiyotiklerle birlikte kullanıldığında hem antibiyotiklerin hem de ekstraktın MİK değerlerinin düştüğü, önemli derecede sinerjistik etki oluşturduğu bildirilmiştir.

Razmavar ve ark. (2014), *Baeckea frutescens* yaprakları etilasetat ve hekzan ekstraklarının 10 adet klinik MRSA suşuna karşı aktivitesinin disk difüzyon yöntemine göre 6-20 mm arası zon oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Kıran ve ark. (2013), bazı liken örneklerinin antimikrobiyal aktivitesini disk difüzyon yöntemi ile araştırmışlardır. Araştırmalarında *Evernia divaricata, Evernia prunastri, Lobaria pulmonaria* ve *Pseudevernia furfuracea* likenlerinin kloroform-aseton ekstresi çıkarılmıştır. 20 mg/ml konsantrasyonundaki özütlerden disklere 100 µl emdirilerek MRSA'nın da içinde olduğu onüç mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. *Evernia divaricata* özütü 18±1.41 mm, *Evernia prunastri* özütü 12±0.54 mm, *Lobaria pulmanaria* özütü 11±2.05 mm MRSA ya karşı zon oluşturmuş *Pseudovernia furfuracea* özütünün ise etkisiz olduğu gözlemlenmiştir.

Özpınar ve ark. (2013), şeftali (*Persica vulgaris*) yaprak metanol ekstraktının antibakteriyel etkisini arştırdıkları çalışmalarında MRSA'ya karşı bir aktivite gözlememişlerdir.

You ve ark. (2013), *Ulmus pumila* (Sibirya Karaağacı) kök kabuğu etanol ekstraktının oniki klinik MRSA suşuna karşı antibakteriyel aktivitesini araştırmışlardır. Buldukları MİK değerleri 125-250 µg/ml arasındadır. 1mg/disk ekstraktın oluşturduğu inhibisyon zonlarını ise 14-19 mm arasında bulmuşlardır.

Mun ve ark. (2013), kurkumin ($C_{21}O_{20}H_1$) pigmentinin standart MRSA suşlarına karşı (ATCC 33591 ve ATCC 25923) antibiyotiklerle birlikte kullanımında sinerjistik aktivitesini araştırmışlardır. ATCC 33591 suşuna karşı kurkumin; oksasilin veya ampisilin ile birlikte kısmi sinerji oluştururken ATCC 25923 suşuna karşı sinerjistik etki göstermiştir. ATCC 33591 suşuna karşı kurkumin; ciproflaksin

veya norflaksin ile birlikte sinerji oluştururken ATCC 25923 suşuna karşı kısmi sinerjistik etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Nayak ve ark. (2013), karasal bir eğrelti olan *Lygodium flexuosum* ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesini agar kuyucuk difüzyon tekniği ile araştırmışlardır. Elde ettikleri ekstrelerin 100 µg/ml dozunu DMSO ile hazırlayarak kullanmışlardır. Çalışmaları sonucunda kullandıkları klinik MRSA suşuna karşı petrol eteri ekstresinde 10 mm, kloroform ekstresinde 21 mm, metanol ekstresinde 23 mm ve su ekstresinde 29 mm inhibisyon zonu oluştuğunu bildirmişlerdir.

Takhi ve ark. (2011), *Datura stramonium* (Boru çiçeği), *Peganum harmala* (Üzerlik), *Ricinus communis* (Hint yağı bitkisi), *Nerium oleander* (Zakkum), *Citrullus colocynthis* (Ebu Cehil karpuzu) , *Cleome arabica, Pistacia atlantica* ve *Pistacia lentiscus* (Sakızağacı) bitkilerinden elde edilen sekonder metabolitleri ATCC 43300 MRSA standart suşunun da bulunduğu mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesini çalışmışlardır. Elde ettikleri fenolik bileşikler ve alkoloidler MRSA ya karşı aktivite sergilememiştir. *Pistacia lentiscus* ve *Pistacia atlantica*'dan elde edilen uçucu yağların MRSA suşuna karşı aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Jiamboonsri ve ark. (2011), mango (*Mangifera indica*) tohum çekirdeği etanol ekstresinin 19 adet klinik MRSA ve bir adet standart MSSA (ATCC 25923) suşuna karşı antibakteriyel aktivitesini ölçmüşlerdir. Mango, tez çalışmamızın bitkisi olan menengiç ile aynı familya olan *Anacardiace* familyasındandır. Jiamboonsri ve ark. disk difüzyon testinde kullandıkları konsantrasyonlar 0,625 mg/disk, 1,25 mg/disk, 2,5 mg/disk ve 5 mg/disktir. Bu konsantrasyonlarda MRSA'ya karşı elde ettikleri ortalama inhibisyon zonları sırasıyla, 10.61 ± 1.25 mm, 12.87 ± 1.82 mm, 14.00 ±1.21 mm, 16.85 ± 1.94 mm şeklindedir. Tüm izolatlara karşı MİK değerini ise 0,47 mg/ml olarak bulmuşlardır. Yine mango tohumu çekirdeği etanol ekstraktı fenolik bileşiklerinden izole ettikleri pentagalloyl glukopiranoz, metil gallat ve gallik asitin de antibakteriyel aktivitesini çalışmışlar, MİK değerleri ortalamasını ise sırası ile 0.16 ± 0.03 mg/ml, 1.33 ± 0.34 mm, >1.07 ± 1.19 olarak bulmuşlardır. Pentagalloyl glukopiranozun MİK değerinin ham etanol ekstraktının MİK değerinden düşük bulunması dikkat çekicidir.

Parasa ve ark. (2011) kaju (*Anacardium occidentale*) fıstık kabuğu aseton, aseton (%70) ve metanol ekstrelerinin onbeş klinik MRSA suşuna karşı antibakteriyel aktivitesini agar kuyucuk difüzyon ve broth dilüsyon yöntemlerine göre araştırmışlardır. Kaju ağacı, menengiç ile aynı familyadan (*Anacardiace*) bir bitkidir.Yapılan çalışmada 100 mg/ml konsantrasyondaki ekstrelerden her kuyucuğa 10 µl eklenerek oluşan zonlar ölçülmüştür. Aseton ekstresi 21-22 mm zon oluşturmuş, aseton (%70) 23-24 mm zon oluşturmuş ve metanol ekstresi ise 19-21 mm zon oluşturmuştur.

Al-Habib ve ark. (2010), üzüm (*Vitis vinifera*) çekirdeği metanol ekstresinin 43 adet klinik kökenli MRSA suşuna karşı antibakteriyel aktivitesini agar jel difüzyon tekniği ile araştırmışlardır. Oluşan zon çaplarını 11-17 mm arasında bulmuşlardır.

Park ve ark. (2010), sinek kurtçuğu (*Musca domestica*) etanol ekstresini ve bu ekstreden franksiyonlandırdıkları hekzan, eilasetat, bütanol ve su ekstrelerinin MRSA ve VRE suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesini disk difüzyon ve broth mikrodilüsyon teknikleri ile araştırmışlardır. 4 mg/ml konsantrasyondaki ekstrakttan 50 µl çözeltiyi 8 mm çapındaki disklere emdirerek oluşan inhibisyon zonlarını ölçmüşlerdir. 4 ^{0}C' de 24 saat etanolde bekletilerek elde edilen ekstrede altı adet MRSA suşuna karşı kayda değer bir inhibisyon zonu ölçmemişlerdir. Fraksiyon solventlerde ise 200 µg/disk uygulanmasıyla hekzan ve etilasetat ekstrelerinde zon oluşmamış, bütanol ekstresinde 9-15,3 mm, su ekstresinde ise dört suşda zon oluşmamış iki suşda 10 ve 10,5 mm inhibisyon zonu oluştuğunu bildirmişlerdir. Öte yandan etanol ekstraktının MİK değerlerini ise 40-60 µg/ml olarak açıklamışlardır.

Wahab ve ark. (2009), *Pereskia bleo* yapraklarının hekzan, diklorometan, etil asetat ve metanol ekstraktlarının MRSA üzerinde disk difüzyon tekniği ile antibakteriyel aktivitesini çalışmışlardır. Çalışmalarında 100 mg/ml konsantrasyonunda ekstrelerden 50 µl disklere emdirmişler ve bunun sonucunda sadece etil asetat ekstresinde 11 mm zonlu bir aktivite ölçmüşlerdir. Diğer ekstrelerde zon oluşmamıştır.

Mattana ve ark. (2009), *Acacıa aroma* yaprak ekstraktının 20 adet klinik MRSA izolatına karşı aktivitesini agar kuyucuk difüzyon ve agar mikrodilüsyon yöntemleri ile çalışmışlardır. Etil asetat ve etanol ekstrelerinin oluşturduğu zon çaplarını 14-16

mm arasında bulmuşlar, MİK değerlerini ise sırasıyla 2,5 ± 1,7 mg/ml ve 2,5 ± 1,4 mg/ml olarak bulmuşlardır.

Mojab ve ark. (2008), *Thymus daenensis* metanol ekstresinin on adet klinik MRSA izolatı ve bir adet MRSA ATCC 33591 standart suşuna karşı antibakteriyel aktivitesini disk difüzyon metoduyla araştırmışlardır. Araştırmada 100 mg/ml konsantrasyondaki özütten 40 µl disklere emdirmiş, sonuçta 18-29 mm arası zon oluşumu gözlemişlerdir.

Eom ve ark. (2008), *Ecklonia stolonifera* alginin metanol ekstresini çıkararak daha sonra sıvı-sıvı ekstraksiyonu yöntemi ile fraksiyonlandırmaya gitmişlerdir. Fraksiyonlandırmada sırasıyla hekzan, dimetilklorit, etil asetat ve bütanol kullanılmıştır. Bu özütlerden MRSA'ya karşı en yüksek antibakteriyel aktiviteyi hekzan ekstresinin gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmalarında 100 mg/ml konsanrasyondaki özütlerden 8 mm' lik disklere 10 mg emdirerek iki adet MRSA suşuna (KCCM40510, KCCM40511) karşı disk difüzyon yöntemi ile inhibisyon zonlarını ölçmüşlerdir. Hekzan fraksiyonu bu suşlarda sırasıyla 20 ve 10 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur. Ayrıca aynı mikroorganizmalara broth dilüsyon tekniğini uygumış ve MİK değerlerini sırasıyla 600 ve 500 µg/ml olarak bulmuşlardır. Eom ve arkadaşlarının bu çalışmasında disk difüzyon değerleri ile MİK değerlerinin çeliştiği görülmektedir.

Otsuka ve ark. (2008), *Laurus nobilis* (Akdeniz defnesi) yapraklarından izole edilmiş iki flavonoidin (kaempferol 3-*O*-a-L-rhamnosidler) MRSA karşısında antibakteriyel aktivitesini mikrodilüsyon tekniği ile araştırmışlardır. Kullandıkları MRSA suşları OM481, OM505, OM584, OM623 ve N315'dir. Bu sujlara karşı MİK değerlerini 1-2 µg/ml arasında bildirmişlerdir. Bu bileşiklerin MRSA'ya karşı güçlü bir antibakteriyel aktivite gösterdiğini değerlendirmişlerdir.

Namba ve ark. (2008), sentezleyip dizayn ettikleri benzen sülfo nanilidlerin VRE ve MRSA'ya karşı antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda MRSA'ya karşı MİK değerini 0,5 µg/ml olarak bulmuşlardır.

Mehrgan ve ark. (2008), *Thymus pubescens* metanol ekstraktının antibakteriyel aktivitesini MRSA suşlarının da içinde olduğu bakterilere karşı çalışmışlardır. 100

mg/ml konsantrasyondaki ekstraktı disk difüzyon yöntemi ile kullanmışlar ve çalışma sonucunda 8-16 mm arasında inhibisyon zonu oluştuğunu bildirmişlerdir.

Horıuchi ve ark. (2007), *Salvia officinalis* (Adaçayı)'den izole ettikleri , oleonolik asit, ursolik asit, uvaol, betülinik asit ve betülin gibi triterpenoidlerin iki adet MRSA suşunun da içinde bulunduğu bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesini araştırmışlardır. Bu bileşiklerden oleonolik asit ve ursolik asit MRSA'ya karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Bu bileşiklerin MİK değerlerini sırasıyla 16 ve 8 µg/ml olarak vermişlerdir. Uvaol, betülinik asit ve betülinin ise önemli bir aktivite gösteremediklerini (MİK > 128 µg/ml) bildirmişlerdir.

Abu-Shanab ve ark. (2006), *Mentha longifolia* (İt nanesi, tüylü nane), *Melissa officinalis* (Limon otu), *Rosa damascena* (Isparta gülü) ve *Althaea officinalis* (Hatmi çiçeği) bitkilerinin etanol ve su ekstrelerinin 20 adet klinikal MRSA suşu üzerinde antibakteriyel aktivitesini kuyucuk agar difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile araştırmışlardır. En yüksek aktiviteyi *Rosa damascena* gösterirken *Althaea officinalis* hiç aktivite göstermemiştir. Agar difüzyon yöntemi için 100 mg/ml konsantrasyondaki ekstrelerden kuyucuklara 50 µl eklemişlerdir. Sonuçta oluşan inhibisyon zonlarını su ekstresi için sırasıyla, 8, 12 ve 18 mm ve etanol ekstresi için 14, 15 ve 34 mm olarak ölçmüşlerdir. MİK değerlerini ise etanol ektresi için sırasıyla 3, 125-12,5 mg/ml ile 3,125-12,5 mg/ml ve 0,3951-0,780 mg/ml olarak ölçmüşlerdir.

Gökbulut ve ark. (2006), *Thymelaea passerina* tek yıllık bitkisinin petrol eteri, n-hekzan, etil asetat ve metanol ile hazırlanan ekstrelerinin, bir adet MRSA hasta suşunun da içinde olduğu bakterilere karşı disk difüzyon tekniği ile antibakteriyel aktivitesini çalışmışlardır. Çalışmalarında 100 mg/ml konsantrasyondaki özütten 20 µl disklere emdirmişler ve oluşan inhibisyon zonlarını ölçmüşlerdir. Çalışmanın sonucunda hekzan ve etil asetat eksteresinde 9 mm, petrol eteri ekstresinde 10 mm inhibisyon zonu oluştuğunu bildirmişlerdir.

Voravuthikunchai ve Kitpipit (2005), dokuz medikal bitkinin su ve etanol ekstrelerinin 35 adet klinik MRSA suşuna karşı antibakteriyel aktivitesini disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemleri ile araştırmışlardır. 250 mg/ml konsantrasyondaki ekstrelerden disk başına 10 µl emdirmişler ve oluşan inhibisyon zonlarını ölçmüşlerdir. Su ekstreleri için oluşan zonlarını, *Acacia catechu* 8.83 ± 0.35

mm, *Psidium guajava* 14.42 ± 0.55 mm, *Punica granatum* 15.75 ± 0.43 mm, *Quercus infectoria* 18.50 ± 0.57 mm, *Uncaria gambir* 13.08 ± 0.53 mm olarak ölçmüşlerdir. *Garcinia mangostana, Impatiens balsamina, Peltophorum ptercarpum, Tamarindus indica* ve *Walsura robusta* sulu ekstreleri ise aktivite göstermemişlerdir. Etanol ekstreleri için oluşan zonları, *Acacia catechu* 10.67 ± 0.19 mm, *Garcinia mangostana* 10.43 ± 0.20 mm, *Impatiens balsamina* 9.42 ± 0.19 mm, *Peltophorum ptercarpum* 11.00 ± 0.24 mm, *Psidium guajava* 9.75 ± 0.18 mm, *Punica granatum* 16.70 ± 0.17 mm, *Quercus infectoria* 17.97 ± 0.24 mm, *Uncaria gambir* 19.33 ± 0.26 mm ve *Walsura robusta* 10.25 ± 0.28 mm olarak ölçmüşlerdir. *Tamarindus indica* etanol ekstresi ise aktivite göstermemiştir. Bahsi geçen bitkilerin su ekstreleri için MİK değerlerini sırasıyla; 6.3-12.5 mg/ml, 0.8-1.6 mg/ml, 0.4-1.6 mg/ml , 0.2-0.4 mg/ml , 6.3-12.5 mg/ml şeklindedir. Etanol ekstreleri için MİK değerleri ise 1.6-3.2 mg/ml, 0.05-0.4 mg/ml, 6.3 mg/ml, 0.1-0.8 mg/ml, 0.2-1.6 mg/ml , 0.2-0.4 mg/ml, 0.2-0.4 mg/ml, 0.4-0.8 mg/ml, 1.6-3.2 mg/ml olarak ölçmüşlerdir.

Shibata ve ark. (2005), *Caesalpinia spinosa* (Tara)'dan elde edikleri alkil gallat bileşiklerini MRSA'ya karşı agar mikrodilüsyon yöntemi ile araştırmışlardır. Bu bileşikler içerisinde en yüksek aktiviteyi MİK değerini 15,6 µg/ml olarak buldukları nonil ve desil gallatın gösterdiğini bildirmişlerdir.

Chen ve ark. (2005), *Sophora flavescens*'den izole ettikleri biyoaktif bir flavonoid olan 'kurarinone' bileşiğini MRSA'nın da içerisinde olduğu bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında MİK değerinin 2 µg/ml olduğunu aktarmışlardır.

Tanaka ve ark. (2002), *Erythrina variegata*'dan izole ettikleri 16 adet izoflavonoidi ondört adet klinik MRSA üzerinde antibakteriyel aktivitesini agar dilüsyon yöntemi ile belirlemişlerdir. Çalıştıkları izoflavonoidler içerisinde en yüksek aktiviteyi, erycristagallin ve orientanol B göstermiştir. Bu bileşiklerin MİK değerlerini 3,13–6,25 µg/ml olarak bildirmişlerdir.

Shımızu ve ark. (2001), *Arctostaphylos uva-ursi* ekstresinden elde ettikleri fenolik bileşik corilaginin beta laktam antibiyotikler ile sinerjistik aktivitesini çalışmışlardır. Corilaginin oksasillin ile sinerjistik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Osmanağaoğlu ve ark. (1999), *Letaria vulpina, Pseudoevernia furfuraceae var. furfuraceae* ve *Evernia divericata* liken örneklerinden elde edilen aseton ve kloroform ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini ATCC 4300 MRSA suşunun da dahil olduğu bakterilere karşı araştırmışlardır. 20 mg/ml konsantrasyondaki ekstreleri 6mm çaplı steril disklere 100, 75 ve 50 µl emdirerek disk difüzyon yöntemine göre antibakteriyel aktivitesini ölçmüşlerdir. Aseton ekstrelerinde 12-13 mm, kloroform ekstrelerinde ise 8-10 mm inhibisyon zonu oluşumu gözlemişlerdir.

Kono ve ark. (1994), kateşinlerin büyük bir bölümünü oluşturan epigallokateşin flavonoidlerinin 53 adet klinik MRSA suşuna karşı antibakteriyel aktivitesini agar mikrodilüsyon tekniği ile araştırmışlardır. Araştırmaları sonucunda MİK değerlerini 64-126 µg/ml olarak bildirmişlerdir.

2.3 VRE'ye Karşı Antibakteriyel Çalışmalar

Singh ve ark. (2015), *Arnebia euchroma* hekzan ekstresinden elde ettikleri butiril alkanin izolatının VRE'ye karşı antibakteriyel etkisini agar dilüsyon yöntemi ile ölçmüşlerdir. Bu çalışmaları sonucunda MİK değerlerini 3.13-6.26 µg/ml arasında bulmuşlardır.

Okamura ve ark. (2015), *Nuphar japonicum* ekstresinden izole 6,6′-dihydroxythiobinupharidin bileşiğinin dört adet VRE suşunun da olduğu bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesini mikrodilüsyon yöntemi ile çalışmışlardır. Çalışma sonucunda MİK değerlerini 2-4 µg/ml arasında bulmuşlardır.

Abdullahi ve ark. (2015), *Vernonia glaberrima* yaprakları metanol ekstresinin VRE suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesini agar kuyucuk difüzyon tekniğine göre araştırmışlardır. 40 mg/ml konsantrasyonundaki ekstreden kuyucuklara 0,1 ml doldurarak oluşan inhibisyon zonlarını ölçmüşlerdir. Çalışmaları sonucunda oluşan inhibisyon zonunu 25 mm olarak ölçmüşlerdir.

Valle ve ark. (2015), on iki adet medikal bitkiyi VRE suşlarının da içerisinde bulunduğu mikroorganizmalara karşı antibakteriyel aktivitesini disk difüzyon ve broth mikrodilüsyon yöntemleri ile araştırmışlardır. Bu bitkilerden *Psidium guajava, Phyllanthus niruri, Ehretia microphylla* ve *Piper betle* bu suşlara karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Disk difüzyon yöntemine göre VRE suşlarında oluşan inhibisyon zonlarını sırasıyla 12mm, 13mm, 12mm ve 28 mm şeklinde ölçmüşlerdir.

Mikrodilüsyon tekniğine göre MİK değerlerini ise sırasıyla 5000, 1250, 1250 ve 19 µg/ml olarak bulmuşlardır.

Soleimani ve ark. (2015), kitosan nanopartiküllerini VRE klinik suşlarınında bulunduğu bakterilere karşı agar kuyucuk difüzyon tekniği ile çalışmışlardır. Çalışmaları sonucunda 6 adet klinik suşa karşı 13-15 mm inhibisyon zonu oluştuğunu gözlemişlerdir.

Eerdunbayaer ve ark. (2014), *Glycyrrhiza uralensis'*den izole ettikleri 32 adet fenolik bileşiğin VRE suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesini broth mikrodilüsyon yöntemi ile araştırmışlardır. Çalışmalarında, 3-arylcoumarins, licoarylcoumarin, glycycoumarin, 2-arylcoumarones ve gancaonin fenoliklerinin orta seviyede aktivite sergilediklerini bildirmişlerdir.

Chandrasekaran ve ark. (2014), *Caulerpa chemnitzia, Caulerpa racemosa, Caulerpa scalpelliformis, Ulva lactuca* (Su yosunu), *Ulva fasciata, Ulva reticulata, Stoechospermum marginatum, Sargassum wightii, Gracilaria verrucosa* ve *Gracilaria edulis* alglerinin hekzan, kloroform, etilasetat, aseton ve metanol ekstrelerini çıkararak bu ekstrelerin klinik VRE suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitelerini disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemleri ile araştırmışlardır. 500, 250 ve 125 µg/disk dozlarında oluşan inhibisyon zonlarını, 7,1 - 14 mm arasında ölçmüşlerdir. MİK değerlerini ise 250-500 µg/ml arasında bulmuşlardır. En yüksek aktiviteyi etil asetat ekstresinin gösterdiğini bildirmişlerdir.

Ahmet ve ark. (2014), *Ivesia gordonii* ekstraktından izole ettikleri aktif dimerik izobutiril floroglukinol bileşiklerinin antimikrobiyal aktivitesini çalışmışlardır. Çalıştıkları bakterilerden VRE suşuna karşı elde ettikleri en güçlü MİK değerini 1,25 µg/ml olarak bildirmişlerdir.

Nayak ve ark. (2013) karasal bir eğrelti olan *Lygodium flexuosum* ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesini agar kuyucuk difüzyon tekniği ile araştırmışlardır. Elde ettikleri ekstrelerin 100 µg/ml dozunu DMSO ile hazırlayarak kullanmışlardır. Çalışmaları sonucunda kullandıkları klinik VRE suşuna karşı petrol eteri ekstresinde 10 mm, kloroform ekstresinde 15 mm, metanol ekstresinde 19 mm ve su ekstresinde 25 mm inhibisyon zonu oluştuğunu bildirmişlerdir.

Dubey ve Padhy (2012), Hindistan aborjinleri tarafından kullanılan otuz adet etnomedikal bitkinin su ve etanol ekstrelerinin toplum ve hastane kökenli VRE ve MRSA suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesini agar kuyucuk difüzyon yöntemine göre araştırmışlardır. Bu bitki ekstraktları arasında en yüksek aktiviteyi *Diospyrous melanoxylon, Woodfordia fruticosa, Oroxylum indicum, Pterocarpus santalinus, Tectona grandis, Aspidopterys tomentosa ve Lantana camara'*nın gösterdiğini (inhibisyon zon aralığı 19-27 mm) bildirmişlerdir.

Samy Selim (2010), okaliptüs, ardıç, nane, biberiye, adaçayı, kekik ve karanfil yağının VRE ve *E. coli'*ye karşı antibakteriyel aktivitesini araştırmıştır. Çalışması sonucunda en güçlü etkiyi kekik yağının gösterdiğini bildirmiştir.

Park ve ark. (2010), sinek kurtçuğu (*Musca domestica*) etanol ekstresini ve bu ekstreden franksiyonlandırdıkları hekzan, etilasetat, bütanol ve su ekstrelerinin MRSA ve VRE suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesini disk difüzyon ve broth mikrodilüsyon teknikleri ile araştırmışlardır. 4 mg/ml konsantrasyondaki ekstrakttan 50 µl çözeltiyi 8 mm çapındaki disklere emdirerek oluşan inhibisyon zonlarını ölçmüşlerdir. 4 ^{0}C'de 24 saat etanolde bekletilerek elde edilen ekstrede VRE 5117 suşuna karşı 13,5 mm inhibisyon zonu ölçmüşlerdir. Fraksiyon solventlerde ise 200 µg/disk uygulanmasıyla hekzan ve etilasetat ekstrelerinde zon oluşmamış, bütanol ekstresinde 14,3 mm, su ekstresinde ise 11.5 mm inhibisyon zonu ölçtüklerini bildirmişlerdir.

Fisher ve Philips (2009), limon, portakal ve bergamot uçucu yağlarının VRE'ye karşı antibakteriyel aktivitesini MİK değerlerini belirleyerek çalışmışlardır. Çalışmalarında en yüksek aktiviteyi portakal ve bergamot yağları birebir karışımlarının oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. MİK değerlerini ise 25 ^{0}C'de pH 5,5 ortamda 0,25-0,5 % (v/v) olarak bildirmişlerdir.

Mehrgan ve ark. (2008), *Thymus pubescens* metanol ekstraktının antibakteriyel aktivitesini VRE suşlarının da içinde olduğu bakterilere karşı çalışmışlardır. 100 mg/ml konsantrasyondaki ekstraktı disk difüzyon yöntemi ile kullanmışlar ve 8-16 mm arasında inhibisyon zonu oluştuğunu bildirmişlerdir.

Mojab ve ark. (2008), *Thymus daenensis* metanol ekstraktının antibakteriyel aktivitesini VRE suşunun da bulunduğu bakterilere karşı disk difüzyon yöntemine

göre araştırmışlardır. 100 mg/ml konsantrasyonda kullandıkları ekstraktın 40 µl'sini disklere emdirmişler ve çalışmaları sonucunda VRE suşuna karşı 13 mm inhibisyon zonu oluştuğunu bildirmişlerdir.

Namba ve ark. (2008), sentezleyip dizayn ettikleri benzen sülfo nanilidlerin VRE ve MRSA'ya karşı antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda VRE'ye karşı MİK değerini 1 µg/ml olarak bulmuşlardır.

Horıuchi ve ark. (2007), *Salvia officinalis* (Adaçayı)'den izole ettikleri , oleonolik asit, ursolik asit, uvaol, betülinik asit ve betülin gibi triterpenoidlerin VRE'ye karşı antibakteriyel aktivitesini araştırmışlardır. Bu bileşiklerden oleonolik asit ve ursolik asit VRE'ye karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Bu bileşiklerin MİK değerlerini sırasıyla 8 ve 4 µg/ml olarak vermişlerdir. Uvaol, betülinik asit ve betülinin ise önemli bir aktivite gösteremediklerini (MİK > 128 µg/ml) bildirmişlerdir.

Nagoshi ve ark. (2006), zencefil hekzan ekstraktından izole ettikleri [10]-gingerol bileşiğini aminoglikozidlerle birlikte VRE'ye karşı sinerjistik etkisini araştırmışlardır. Kendi MİK değerinin onda biri konsantrasyonunda [10]-gingerol, arbekasin antibiyotiği ile birlikte kullanıldığında, dört adet VRE suşlarına karşı MİK değerlerinin 128, 64, 32 ve 16 µg/ml den 1 µg/ml'ye düştüğünü bildirmişlerdir.

Fukai ve ark. (2005), *Cudrania cochinchinensis* köklerinden izole ettikleri ksanton türevlerinin beş adet VRE suşuna karşı antibakteriyel aktivitesini araştırmışlardır. En yüksek aktiviteyi gerontoksanton H göstermiştir (MİK 1,56 µg/ml). 1,3,7-trihidroksi-2-prenilksanton, gerontoksanton I, alvaksanton ve izoalvaksanton'un ise zayıf antibakteriyel aktivite gösterdiklerini bildirmişlerdir (MİK 3,13-6,25 µg/ml).

Chen ve ark. (2005), *Sophora flavescens*'den izole ettikleri biyoaktif bir flavonoid olan 'kurarinone' bileşiğini VRE'nin de içerisinde olduğu bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında VRE'ye karşı MİK değerinin 2 µg/ml olduğunu aktarmışlardır.

Xing ve ark. (2003), vankomisine Pt^{+2} metalini bağlayarak Van A tipi VRE'ye karşı antibakteriyel aktivitesinin 720 kat arttığını göstermişlerdir (MİK değeri yaklaşık 0.8 µg/ml).

Sakagami ve ark. (2002), *Calophyllum moonii* bitkisinden izole edilen kalozeyloksanton molekülünün VRE suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesini agar dilüsyon tekniği ile araştırmışlardır. MİK değerini 6,25 µg/ml olarak gözlemişlerdir. Ayrıca vankomisinhidroklorit ile birlikte kullanıldığında sinerjistik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Rhee (2002), *Streptomyces sp*. KH-614 suşundan izole ettiği siklik dipeptitlerden cyclo (L-leucyl-L-prolyl) bileşiğini oniki farklı VRE suşuna karşı antibakteriyel aktivitesini araştırmıştır. Araştırması sonucunda on adet standart VRE suşuna karşı MİK değerlerini 12,5-50 µg/ml arasında bulurken iki suşta ise 100 µg/ml'nin üzerinde bulmuştur.

BÖLÜM 3

MATERYAL-METOD

3.1 Bitki Materyalinin Toplanması ve Hazırlanması

P. terebinthus olgun meyveleri Gaziantep merkez Aydınlar mahallesinde Eylül 2014'de, ham meyveleri ise Gaziantep merkez Aydınlar mahallesinde Haziran 2015'de toplanmıştır. Toplanan meyveler bir hafta süresince gölgede, rutubetsiz, havalandırılan bir ortamda oda sıcaklığında kurutulmuştur.

3.2 Bitki Özütlerinin Çıkarılması

Kurutulan meyveler blender yardımıyla parçalanarak toz haline getirilmiştir. Ekstre çıkarma işlemi için maserasyon ve basınçlı solvent olmak üzere iki farklı teknik kullanılmıştır. Bu yöntemler için şu araç-gereçler kullanılmıştır:

Soxtherm ekstraktörü (Gerhardt, Almanya), Evaporatör (Heidolph, Almanya), Filtre kağıdı (Biotech, ABD), Çalkalayıcı inkübatör (Thermo scientific, ABD), Hassas terazi (Shımadzu, Filipin), Etanol (Sigma-Aldrich, Almanya), n-Hekzan (Merc, Almanya).

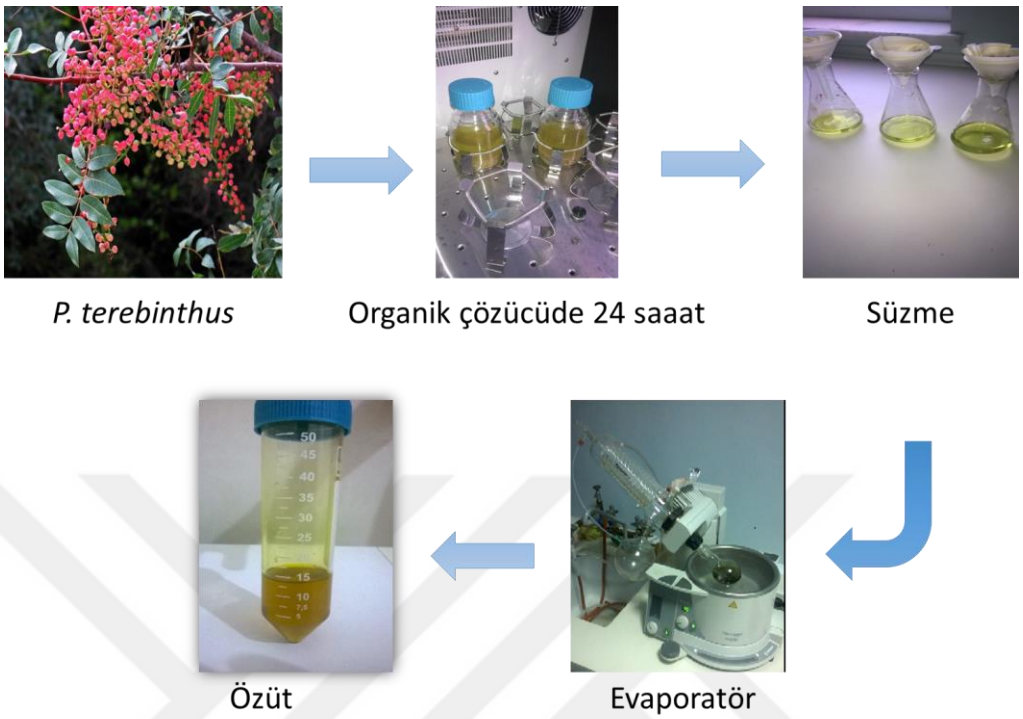
3.2.1. Maserasyon Metoduyla Özüt Çıkarılması

Bu çalışmada ham ve olgun menengiç meyvelerinin sırasıyla hekzan, etanol ve su ekstreleri çıkarılmıştır. Ardışık ekstre çıkarmaktaki amaç kısmi seperasyon sağlamaktır.

Steril şişede 100 gram kurutulup parçalanmış menengiç meyvesi üzerine 500 ml hekzan eklenerek çalkalamalı inkübatöre yerleştirilmiştir. 35 ^{o}C'de 175 rpm çalkalama hızında 24 saat bekletilmiştir. Karışım filtre kağıdı ile süzülmüştür. Elde edilen çözelti evaparatörde düşük basınçta (vakum) 40 ^{o}C sıcaklıkda buharlaştırılarak çözücü, ekstraktan uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.1).

Süzüntüden geriye kalan menengiç parçaları kurutulduktan sonra üzerine etanol eklenerek aynı prosedürle etanol ekstresi elde edilmiştir.

Etanol süzüntüsünden geriye kalan menengiç parçaları kurutulduktan sonra distile su eklenerek aynı yolla su ekstresi elde edilmiştir.

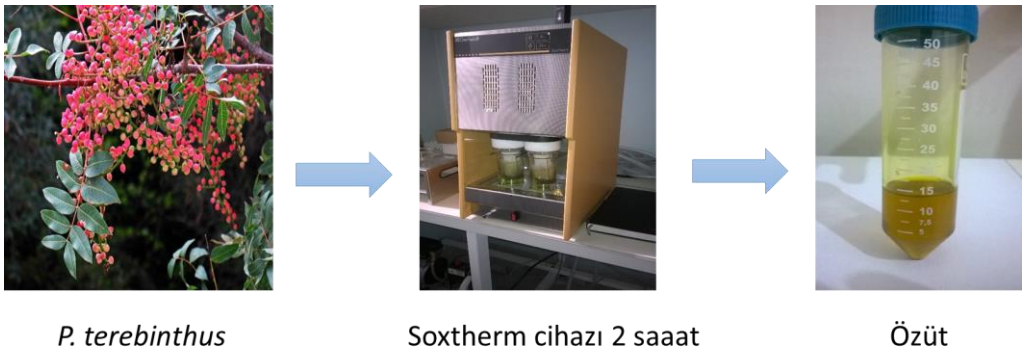


Şekil 3.1 Maserasyon metoduyla özüt çıkarılması.

3.2.2 Basınçlı Solvent Ekstraksiyonu Yöntemi İle Özüt Çıkarılması

Ham ve olgun, kurutulup parçalanmış menengiç meyvelerinin sırasıyla hekzan, etanol ve su ekstreleri soxtherm cihazıyla çıkarılmıştır (Şekil 3.2).

Soxtherm cihazının iki bölmesinin herbirine 10 gram menengiç ve üzerine 150 ml hekzan eklenerek 5.1 bar basınçta, 180 ^{0}C sıcaklıkta, 2 saat ekstrakte edilmiştir.



Şekil 3.2 Basınçlı solvent ekstraksiyonu yöntemi ile özüt çıkarılması.

Hekzan özütü alındıktan sonra geriye kalan menengiç parçaları kurutularak üzerine etanol eklendi ve 5 bar basınçta, 150 ^{o}C sıcaklıkta, 2 saat ekstrakte edilmiştir.

Etanol özütü alındıktan sonra geriye kalan menengiç parçaları kurutularak üzerine distile su eklendi ve 4.8 bar basınçta 170 ^{o}C sıcaklıkta, 2 saat süreyle ekstrakte edilmiştir.

3.2.3 Özüt Verimlerinin Hesaplanması

Maserasyon yöntemi ve basınçlı solvent ekstraksiyonu ile elde edilen özütlerin verimleri şu formülle hesaplanmıştır:

% Verim = (Özüt kütlesi / Bitki örneği kütlesi). 100

3.3 Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

Hazırlanan ham ve olgun menengiç ekstrelerinin MRSA ve VRE bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitesini belirlemek amacıyla disk difüzyon metodu kullanılmıştır (Bauer vd., 1966). Bu metod için şu araç-gereçler kullanılmıştır:

MHA besiyeri (Merck, Almanya), Kanlı agar besiyeri (Oxoid, İngiltere), İnkübatör (Memmert, Almanya), Vorteks cihazı (IKA, Almanya), Mcfarland cihazı (Biomerieux, Fransa), Petri kapları (İsolab, Almanya), Steril eküvyon çubuklar (Citotest, Çin), Sefoksitin disk 30 µg (Oxoid, İngiltere), Vankomisin disk 30 µg (Oxoid, İngiltere), Boş disk 6 mm (Oxoid, İngiltere), Otoklav (Hirayama, Japonya), Hassas terazi (Shımadzu, Filipin), Steril kabin (Thermo Scientific, ABD).

3.3.1 Bakteri Suşları

MRSA bakteri suşları Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarından temin edilmiştir (14 adet suş kullanılmıştır).

VRE bakteri suşları Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarından temin edilmiştir (5 adet suş kullanılmıştır).

Stoklanmış olan klinik MRSA suşlarını canlandırmak için MHA (Mueller Hinton Agar) besiyeri, VRE bakteri suşlarını canlandırmak için kanlı agar besiyeri (Blood Agar Base) kullanılmıştır. İnokülasyondan sonra besiyerleri 35 ^{o}C de 24 saat

inkübasyona bırakılmıştır. Canlandırma işleminden sonra MRSA suşlarına sefoksitin testi, VRE suşlarına ise vankomisin testi uygulanarak direnç doğrulaması yapılmıştır.

3.3.2 Disk Difüzyon Yöntemi

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon testi CLSI kriterleri göz önünde bulundurularak uygulanmıştır (CLSI, 2012).

Elde edilen özütler kendi çözücülerinde çözündürüldü. 100 mg ekstre için 1 ml çözücüsü kullanılmıştır. Çözeltiler vorteks cihazında homojenize edildikten sonra 6 mm çapındaki steril disklere 20 µl emdirilmiştir. Ekstre emdirilmiş disklerden çözücünün uzaklaşması için bir gün süreyle oda sıcaklığında kurutulmuştur. Negatif kontrol olarak 20 µl saf çözücü disklere emdirilerek aynı şekilde kurutulmuştur.

Direnç kontrolleri yapılan MRSA ve VRE suşlarından bir miktar alınarak ayrı ayrı serum fizyolojik içinde densitometrede 0.5 mcFarland standardına (Baryum Sülfat Bulanıklık Standardı) ayarlanmıştır. Bu süspansiyonlar vortekslendikten sonra MHA besiyerlerine 100 µl inoküle edilerek steril eküvyon çubuk ile yayılmıştır. On dakika süreyle kurumaya bırakılmıştır.

Bir gün önceden hazırlanıp kurutulmuş diskler steril bir penset yardımıyla besiyeri üzerine yerleştirilmiştir. Petri kapları inkübatöre yerleştirilerek 24 saat süreyle 35 ºC' de bekletilmiştir. Bu süre sonunda diskler çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının çapları diskleri de kapsayacak şekilde cetvel ile ölçülmüştür.

3.4 İstatiksel Analiz

İnhibisyon zonları ölçümünden sonra ham menengiç ile olgun menengiç ekstrelerinin antibakteriyel aktivitelerinin karşılaştırılması, hekzan, etanol ve su ekstrelerinin antibakteriyel aktivitelerinin karşılaştırılması ve farklı ekstraksiyon tekniklerinden elde edilen ekstrelerin (maserasyon ile basınçlı solvent tekniği) antibakteriyel etkinliklerinin karşılaştırılması amacıyla SPSS 16.0 programı (IBM, ABD) kullanılarak bağımsız örneklem t testi uygulanmıştır. Uygulanan testte $p < 0,05$ değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

BÖLÜM 4

BULGULAR

4.1 Menengiç Özütü Verimleri

Maserasyon yöntemi için 100 gram ham ve 100 gram olgun menengicin sırasıyla hekzan, etanol ve su özütleri çıkarılmıştır. Bu özütler 24 saat 35 ^{o}C de 175 rpm hızda 250'şer ml çözücü kullanarak çalkalamalı inkübatörde elde edilmiştir. Ham menengiç için elde edilen hekzan özütü 1.34 gram , etanol özütü 2,63 gram, su özütü 1 gramdır. Olgun menengiç için elde edilen hekzan özütü 29,7 gram, etanol özütü 0,65 gram, su özütü 0,12 gramdır.

Soxtherm cihazında ekstre çıkarmak için 20 gram ham ve 20 gram olgun menengiç kullanılmıştır. Bu özütler hekzan için 180 derece 1 saat, etanol için 150 derece 2 saat ve su için 170 derece 2 saat süresince 300'er ml çözücü kullanarak elde edilmiştir. Ham menengiç için elde edilen hekzan özütü 0,665 gram, etanol özütü 0,072 gram, su özütü 0,03 gramdır. Olgun menengiç için elde edilen hekzan özütü 5,44 gram, etanol özütü 0,27 gram, su özütü 0,9 gramdır.

Maserasyon ve basınçlı solvent yöntemleri ile elde edilen özütlere ait verimlerin yüzdesi Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Maserasyon Ve Soxtherm Cihazı İle Menengiç Ekstresi Verim Yüzdeleri.

Organik Çözücü	Maserasyon % verim	Soxtherm % verim
Hekzan (Ham menengiç)	1,34	3,33
Etanol (Ham menengiç)	2,71	0,37
Su (Ham menengiç)	1,05	0,16
Hekzan (Olgun Menengiç)	29,7	27,2
Etanol (Olgun Menengiç)	1,08	2,21
Su (Olgun Menengiç)	0,22	3,7

4.2 Menengiç Özütlerinin MRSA'ya Karşı Oluşturduğu İnhibisyon Zonları

Bu çalışmada klinik MRSA suşlarına karşı menengiç hekzan, etanol ve su ekstreleri kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak vankomisin, negatif kontrol olarak saf çözücü emdirilmiş disk kullanılmıştır. 100 mg/ml konsantrasyonundaki özütlerden her diske 20 µl emdirilip kurutulunca disk başına 2 mg özüt kullanılmış oldu. Bir nolu klinik MRSA suşuna karşı ham ve olgun menengiç etanol ekstrelerinin oluşturduğu inhibisyon zonları örnek olarak Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Bir numaralı klinik MRSA suşuna karşı etanol ekstrelerinin oluşturduğu zonlar.

A: Ham menengiç maserasyon yöntemi ile etanol ekstresi, **B**: Ham menengiç soxtherm cihazıyla elde edilmiş etanol ekstresi, **C:** Olgun menengiç maserasyon yöntemi ile elde edilmiş etanol ekstresi, **D**: Olgun menengiç soxtherm cihazıyla elde edilmiş etanol ekstresi. **E:** Vankomisin (30 µg), F: Saf etanol emdirilip kurutulmuş disk. **G**: Sefoksitin (30 µg).

Şekil 4.1'deki MRSA suşunun sefoksitine karşı dirençli olduğu görülmektedir. Aynı şekilde saf çözücünün emdirilip kurutulduğu diskin de zon oluşturmadığı görülmektedir. Vankomisin ise günümüzde MRSA'ya etkili olan az sayıda antibiyotiklerden biridir.

Ham ve olgun menengiçlerin maserasyon yoluyla elde edilen hekzan, etanol ve su ekstrelerinin 14 adet klinik MRSA suşuna karşı oluşturduğu inhibisyon zonları Tablo 4.2' de gösterilmiştir.

Tablo 4.2 Maserasyon Yöntemiyle Elde Edilen Menengiç Özütlerinin MRSA'ya Karşı Oluşturduğu İnhibisyon Zonları (mm).

Örnek No	Hekzan Ham Menengiç (2 mg/disk)	Hekzan Olgun Menengiç (2 mg/disk)	Etanol Ham Menengiç (2 mg/disk)	Etanol Olgun Menengiç (2 mg/disk)	Su Ham Menengiç (2 mg/disk)	Su Olgun Menengiç (2 mg/disk)
1	16	0	12	12	12	9
2	15	0	15	10	15	11
3	11	0	12	9	10	7
4	16	0	16	9	12	10
5	9	0	13	9	27	7
6	14	0	15	7	11,5	7
7	12	0	18	9	35	7
8	11	0	16	7	10	7
9	9	0	12	7	17	12
10	8	0	15	7	16	7
11	14	0	15	9	30	9
12	16	0	14	10	11	21
13	14	0	11	11	10	9
14	9,5	0	11	7	28	7,5

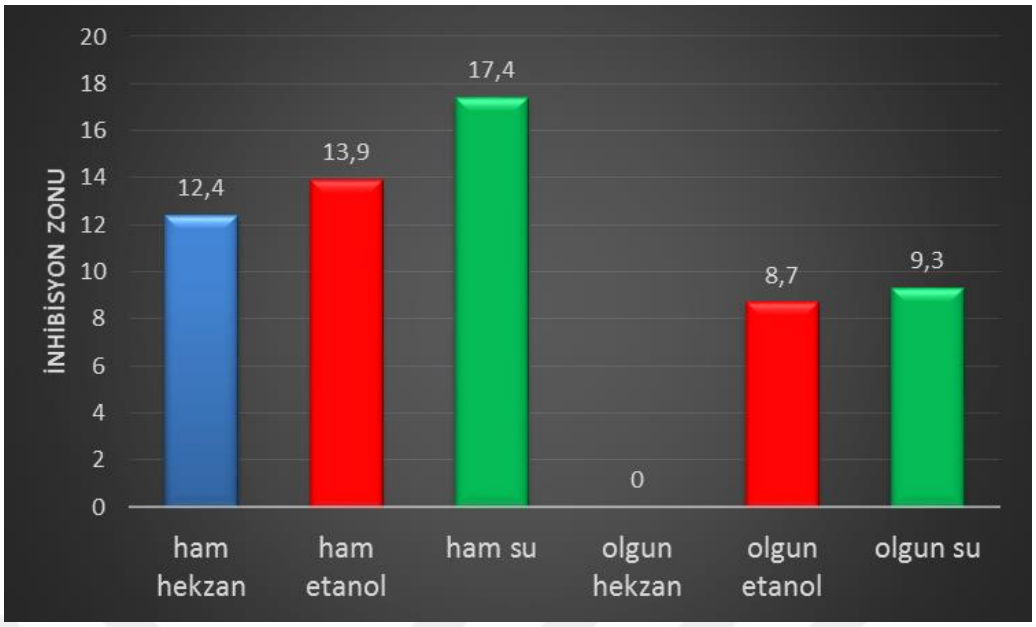
Ham ve olgun menengiçlerin basınçlı solvent ekstraksiyonu yöntemi ile elde edilen hekzan, etanol ve su ekstrelerinin 14 adet klinik MRSA suşuna karşı oluşturduğu inhibisyon zonları ise Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3 Basınçlı Solvent Ekstraksiyonu Yöntemiyle Elde Edilen Menengiç Özütlerinin MRSA'ya Karşı Oluşturduğu İnhibisyon Zonları (mm).

Örnek No	Hekzan Ham Menengiç (2 mg/disk)	Hekzan Olgun Menengiç (2 mg/disk)	Etanol Ham Menengiç (2 mg/disk)	Etanol Olgun Menengiç (2 mg/disk)	Su Ham Menengiç (2 mg/disk)	Su Olgun Menengiç (2 mg/disk)
1	16	7	16	11	14	9
2	15	7	16	11	13	11
3	16	7	11	8	8	0
4	15	7	16	14	11	9
5	9	8,5	15	11	25	17
6	14	0	16	7	11	7
7	12	0	18	15	32	17
8	10	0	16	7,5	8	0
9	8,5	0	11,5	9	16	8
10	8	0	14	7	22	11
11	14	7	15	12	29	20
12	15	0	11	10	12	12
13	14	7	14	9	9	7
14	9	0	13	8	25	15

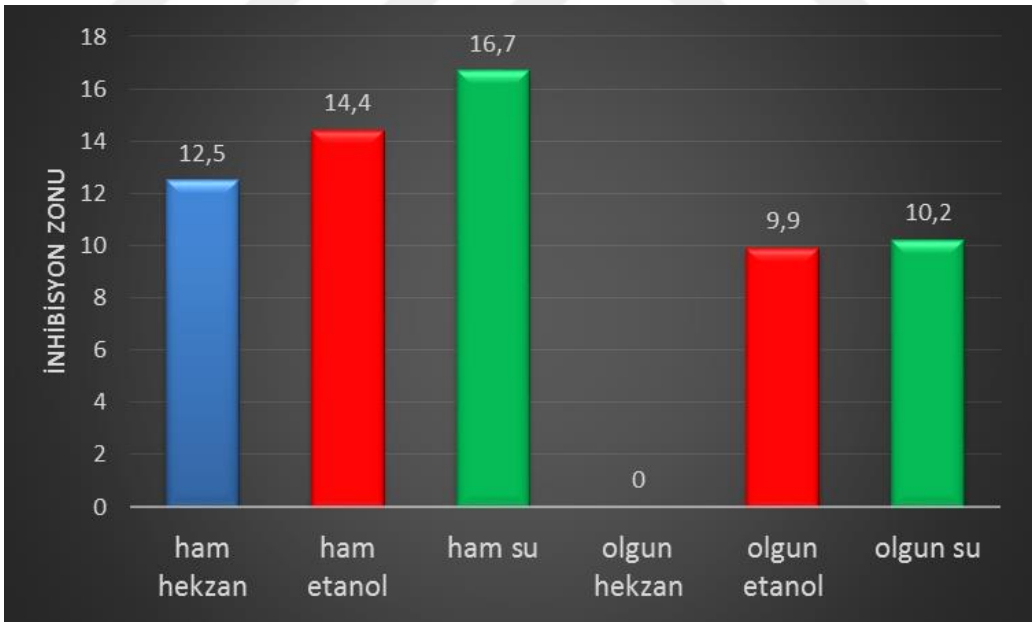
Tablo 4.2 ve tablo 4.3'de bulunan inhibisyon zonları değerlerinden yola çıkarak maserasyon yöntemi ile basınçlı solvent ekstraksiyonu sonucu elde edilen özütlerin MRSA'ya karşı antibakteriyel etkinlik karşılaştırması bağımsız örneklem t testine göre yapılmıştır. Elde edilen ortalamalar ve p değeri tablo 4.4' de gösterilmiştir.

Bağımsız örneklem t testine göre maserasyon yöntemi ile elde edilen menengiç ekstrelerinin MRSA'ya karşı oluşturduğu inhibisyon zonu ortalamaları grafik olarak şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Maserasyon yöntemi ile elde edilmiş menengiç ekstrelerinin MRSA'ya karşı oluşturduğu inhibisyon zonları ortalamaları (mm).

Basınçlı sıvı ekstraktı yöntemi ile elde edilen menengiç özütlerinin MRSA'ya karşı oluşturduğu inhibisyon zonu ortalamaları grafik olarak şekil 4.2 de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 Basınçlı sıvı ekstraksiyonu yöntemi ile elde edilmiş menengiç ekstrelerinin MRSA'ya karşı oluşturduğu inhibisyon zonları ortalamaları (mm).

Ham menengiç ile olgun menengiç ekstresinin MRSA'ya karşı antibakteriyel aktivitelerinin karşılaştırmalı değerleri bağımsız örneklem t testine göre Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.4 Maserasyon Yöntemi İle Soxtherm Cihazı Özütleri İçeren Disklerin MRSA'ya Karşı Ortalama İnhibisyon Zonları ve Karşılaştırılması.

Özütler	Maserasyon Yöntemi (mm)	Soxtherm Cihazı (mm)	Bağımsız Örneklem t Testi 'p' Değeri
Ham Menengiç Hekzan Özütü	12,4 ± 2,8	12,5 ± 3	p > 0,05
Olgun Menengiç Hekzan özütü	0	0	-
Ham Menengiç Etanol Özütü	13,9 ± 2,1	14,4 ± 2,1	p > 0,05
Olgun Menengiç Etanol özütü	8,7 ± 1,6	9,9 ± 2,5	p > 0,05
Ham Menengiç Su Özütü	17,4 ± 8,6	16,7 ± 8,1	p > 0,05
Olgun Menengiç Su özütü	9,3 ± 3,7	10,2 ± 5,8	p > 0,05

Maserasyon yöntemi ve basınçlı sıvı tekniğinden elde edilen özütlerin MRSA üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları karşılaştırmasında; bağımsız örneklem t testine göre tüm gruplarda $p > 0,05$ olduğundan antimikrobiyal aktivite açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Tablo 4.5 Maserasyon Yöntemi İle Elde Edilen Ham ve Olgun Menengiç Ekstrelerinin MRSA 'ya Karşı Oluşturduğu İnhibisyon Zonlarının Karşılaştırılması.

Özütler	Ham Menengiç (mm)	Olgun Menengiç (mm)	Bağımsız Örneklem t Testi 'p' Değeri
Hekzan Özütü	12,4 ± 2,8	0	p < 0,05
Etanol Özütü	13,9 ± 2,1	8,7 ± 1,6	p < 0,05
Su Özütü	17,4 ± 8,6	9,3 ± 3,7	p < 0,05

Tablo 4.6 Basınçlı Solvent Yöntemi İle Elde Edilen Ham ve Olgun Menengiç Ekstrelerinin MRSA'ya Karşı Oluşturduğu İnhibisyon Zonlarının Karşılaştırılması.

Özütler	Ham Menengiç (mm)	Olgun Menengiç (mm)	Bağımsız Örneklem t Testi 'p' Değeri
Hekzan Özütü	12,5 ± 3	0	$p < 0,05$
Etanol Özütü	14,4 ± 2,1	9,9 ± 2,5	$p < 0,05$
Su Özütü	16,7 ± 8,1	10,2 ± 5,8	$p < 0,05$

Tablo 4.5 ve Tablo 4.6 da ham menengiç ile olgun menengicin MRSA'ya karşı antibakteriyel aktiviteleri arasında bağımsız örneklem t testine göre tüm gruplarda $p < 0,05$ olduğundan ham menengiç ekstresinin aktivitesi olgun menengiçten fazla bulunmuştur.

4.3 Menengiç Özütlerinin VRE'ye Karşı Oluşturduğu İnhibisyon Zonları

Ham ve olgun menengiçlerin maserasyon yoluyla elde edilen hekzan, etanol ve su ekstrelerinin 5 adet klinik VRE suşlarına karşı oluşturduğu inhibisyon zonları Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7 Maserasyon Yöntemi İle Elde Edilen Özütlerin VRE'ye Karşı Oluşturduğu İnhibisyon Zonları (mm) - (Konsantrasyon 2 mg/disk)

Örnek No	Hekzan Ham Menengiç	Hekzan Olgun Menengiç	Etanol Ham Menengiç	Etanol Olgun Menengiç	Su Ham Menengiç	Su Olgun Menengiç
1	13,5	7	8,5	7,5	7	7
2	12	8	8	7	0	0
3	13	7	8,5	7	7	7
4	14	8	8	7	0	0
5	12	7	9	7	0	0

Ham ve olgun menengiçlerin basınçlı solvent ekstraksiyonu yoluyla elde edilen hekzan, etanol ve su özütlerinin 5 adet klinik VRE suşuna karşı oluşturduğu inhibisyon zonları Tablo 4.8'de gösterilmiştir.

Tablo 4.8 Basınçlı Solvent Ekstraksiyonu İle Elde Edilen Özütlerin VRE'ye Karşı Oluşturduğu İnhibisyon Zonları (mm) - (Konsantrasyon 2 mg/disk)

Örnek No	Hekzan Ham Menengiç	Hekzan Olgun Menengiç	Etanol Ham Menengiç	Etanol Olgun Menengiç	Su Ham Menengiç	Su Olgun Menengiç
1	12	7	8,5	7,5	7	7
2	11	8	7	7	0	0
3	13	7	8,5	7	7	7
4	14	8	8	7	0	0
5	11	7	8	7	0	0

Tablo 4.7 ve tablo 4.8'de bulunan inhibisyon zonları değerlerinden yola çıkarak maserasyon yöntemi ile basınçlı solvent ekstraksiyonu sonucu elde edilen özütlerin VRE'ye karşı antibakteriyel etkinlik karşılaştırması bağımsız örneklem t testine göre yapılmıştır. Elde edilen ortalamalar ve p değeri tablo 4.9'da gösterilmiştir.

Tablo 4.9 Maserasyon Yöntemi ve Soxtherm Cihazı Özütleri İçeren Disklerin VRE' ye Karşı Oluşturduğu Ortalama İnhibisyon Zonları ve Karşılaştırması

Özütler	Maserasyon Yöntemi (mm)	Soxtherm Cihazı (mm)	Bağımsız Örneklem T Testi 'p' Değeri
Ham Menengiç Hekzan Özütü	12,9 ± 0,89	12,2 ± 1,3	p > 0,05
Olgun Menengiç Hekzan özütü	7,4 ± 0,5	7,4 ± 0,5	p > 0,05
Ham Menengiç Etanol Özütü	8,4 ± 0,4	8 ± 0,6	p > 0,05
Olgun Menengiç Etanol özütü	7,1 ± 0,2	7,1 ± 0,2	p > 0,05
Ham Menengiç Su Özütü	0	0	-
Olgun Menengiç Su özütü	0	0	-

Maserasyon yöntemi ve basınçlı solvent tekniğinden elde edilen özütlerin VRE üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları karşılaştırmasında, bağımsız örneklem t testine göre zon oluşan tüm gruplarda $p > 0,05$ olduğundan antimikrobiyal aktivite açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Ham menengiç ile olgun menengiç ekstresinin VRE'ye karşı antibakteriyel aktivitelerinin karşılaştırmalı değerleri bağımsız örneklem t testine göre Tablo 4.10 ve Tablo 4.11'de gösterilmiştir.

Tablo 4.10 Maserasyon Yöntemi İle Elde Edilen Ham ve Olgun Menengiç Ekstrelerinin VRE'ye Karşı Oluşturduğu İnhibisyon Zonlarının Karşılaştırılması.

Özütler	Ham Menengiç (mm)	Olgun Menengiç (mm)	Bağımsız Örneklem t Testi ' p' Değeri
Hekzan Özütü	12,9 ± 0,8	7,4 ± 0,5	$p < 0,05$
Etanol Özütü	8,4 ± 0,4	7,1 ± 0,2	$p < 0,05$
Su Özütü	0	0	-

Tablo 4.11 Basınçlı Solvent Yöntemi İle Elde Edilen Ham ve Olgun Menengiç Ekstrelerinin VRE'ye Karşı Oluşturduğu İnhibisyon Zonlarının Karşılaştırılması.

Özütler	Ham Menengiç (mm)	Olgun Menengiç (mm)	Bağımsız Örneklem t Testi p Değeri
Hekzan Özütü	12,2 ± 1,3	7,4 ± 0,5	$p < 0,05$
Etanol Özütü	7,9 ± 0,5	7 ± 0	$p < 0,05$
Su Özütü	0	0	-

Tablo 4.10 ve Tablo 4,11'de ham menengiç ile olgun menengicin VRE'ye karşı antibakteriyel aktiviteleri arasında bağımsız örneklem t testine göre zon oluşan tüm gruplarda $p < 0,05$ olduğundan ham menengiç ekstresinin aktivitesi olgun menengiçten fazla bulunmuştur.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bakteriler, diğer tüm canlılar gibi doğası gereği yaşamlarını tehdit eden bütün dış faktörlere karşı yaşam savaşı vermektedirler. Hayatlarını tehdit eden yeni bir etken ile karşılaştıklarında bu etkene duyarlı olan bakteriler popülasyondan silinirken duyarlı olmayanlar popülasyondaki varlıklarını artırmaktadır. Direnç geliştirme adını verdiğimiz bu durum aslında doğal seçilimin bir diğer ifadesidir. Antibiyotiklere karşı direnç gelişimi de bu olgudan kaynaklanmaktadır. Bakterilerde direnç çeşitli mekanizmalarla gerçekleşebilmektedir. Antibiyotiğin hedefi olan molekülün değişmesi sonucu afinitenin yok olması ya da zayıflaması, hücre duvarı geçirgenliğinin azalması, antibiyotiği hidrolize eden enzim varlığı, antibiyotiğin engel koyduğu metabolik yolaklara alternatif yolaklar oluşması temel direnç mekanizmalarıdır. Ancak tüm bunların oluşabilmesi için mutasyonlar ya da bakteriler arası genetik transferler sonucu oluşan genetik varyasyonlar gereklidir. Eğer oluşan varyasyonlar içerisinde bir kimyasal ajana ya da antibiyotiğe karşı duyarsızlık söz konusu değil ise direnç de meydana gelmeyecektir. Nitekim bütün antibiyotiklere karşı bir direnç söz konusu değildir. Direnç oluşumu olayını etki-tepki prensibi bağlamında bakteriler açısından bilinçli aktif bir karşı saldırı geliştirme şeklinde açıklamanın yanlış olduğu düşüncesindeyim. Direnç oluşumu ve gelişimi mutasyonlar, doğal seçilim ve adaptasyon sonucu meydana gelen defakto bir durumdur.

Antibiyotikler kullanıldıkça direnç gelişimi potansiyeli de her zaman var olacaktır ve kaçınılmazdır. Ancak bu süreç ‘akıllı antibiyotik kullanımı’ gibi tedbirler ile yok edilemese bile yavaşlatılabilir. Bu süreçte yeni antibiyotikler geliştirilmeli ve bu mücadele sürdürülebilir hale getirilmelidir. Ne varki bu sorun sürdürülemez olmanın sınırına doğru yaklaşmaktadır. Çünkü direnç gelişim hızı yeni antibiyotikleri geliştirme hızından daha fazladır.

Bu çalışmada antibiyotiklere çoklu direnç geliştirmiş olan MRSA ile VRE suşlarına karşı menengiç özütlerinin antibakteriyel aktiviteleri araştırılmıştır. Özüt çıkarırken maserasyon ve basınçlı solvent ekstraksiyonu olmak üzere iki farklı teknik kullanılmıştır. Sırasıyla hekzan, etanol ve su ekstreleri çıkarılmıştır. Bu çözücüleri kullanmadaki amaç apolardan polara doğru kapsayıcı ortalama oluşturacak birer örnek seçmekti.

Ekstraksiyon için kullanılan iki farklı yöntemde çözücüye göre farklı oranlarda verimler elde edilmiştir. Ham menengiç için maserasyon yönteminde hekzan, etanol ve su için verim yüzdeleri sırasıyla 1,34 - 2,71 - 1,05 dir. Basınçlı solvent sisteminden elde edilen özütlerde ise 3,33 - 0,37 - 0,16 dır. Toplam çıkarılan özütler karşılaştırıldığında ham menengiç için maserasyondan elde edilen toplam verim % 4,97 iken soxtherm cihazından elde edilen verim %3,84 dür.

Olgun menengiç için maserasyon yöntemiyle elde edilen hekzan, etanol ve su ekstreleri için verim yüzdeleri sırasıyla 29,7 – 1,08 – 0,22 dir. Basınçlı solvent sisteminden elde edilen özütlerde ise 27,2 – 2,21 – 3,7 dir. Toplam çıkarılan özütler karşılaştırıldığında olgun menengiç için maserasyondan elde edilen toplam verim % 31 iken soxtherm cihazından elde edilen verim % 33 dür.

Ham menengiç toplam veriminde maserasyon daha fazla verimli iken olgun menengiç özüt çıkarmada soxtherm cihazının daha verimli olduğu görülmektedir. Ancak maserasyonda kullanılan süre evaparasyon hariç 24 saat iken soxtherm cihazında 1-2 saatdir. Bu nedenle zaman problemi olan araştırmacılar için soxtherm cihazı kısa sürede, çalışmaya yetecek oranda özüt vermesi açısından daha avantajlı gözükmektedir.

Maserasyon ve basınçlı solvent ekstraktlarının MRSA'ya karşı oluşturdukları inhibisyon zonlarının karşılaştırması tablo 4.4'de verilmişti. Çoğunlukla soxtherm cihazı özütlerinin oluşturduğu inhibisyon zonları daha büyük gözükmesine rağmen bağımsız örneklem t testine göre $p > 0,05$ olduğundan istatistiksel anlamda aralarında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir.

Çalışmanın başlangıcında maserasyon özütlerinin daha etkin olacağı hipotezi ile yola çıkılmıştır. Çünkü maserasyon tekniğinde, gerek ekstraksiyon sürecinde gerekse evaporasyon sürecinde uygulanan ısı seviyesi 40 ^{o}C'yi geçmemektedir. Oysa basınçlı

solvent sisteminde 150-180 ^{o}C sıcaklıklarda işlem yapılmıştır. Sıcaklık artışının fenolik maddeler , antosiyaninler, çeşitli antioksidan moleküllerde vb. degradasyona ve yeni bileşiklerin oluşumuna yol açtığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Sadilova ve ark., 2006; Kırca ve ark., 2007; Özkan, 2009; Akpoyraz ve Durak, 1995). Yüksek sıcaklıkta ekstraksiyon işleminden dolayı antimikrobiyal etken maddelerde degredasyon sonucu bir inaktivasyonun söz konusu olabileceği düşünülmüştü. Ancak bu çalışmadaki sonuçlar, yüksek sıcaklıklarda elde edilen özütlerin antibakteriyel aktivitesinde düşük sıcaklıklardaki ekstraksiyona göre anlamlı bir farklılık olmadığını göstermiştir.

Bu durumun çeşitli sebepleri olabilir. Sıcaklığın degredasyon etkisi süreye de bağlı bir olaydır. Ekstraksiyon süresinin kısa olması bozunma miktarını kısıtlamış olabilir. Ayrıca ekstraksiyon sonrasında sıcaklık seviyesi hızla oda sıcaklığına düşürülmektedir. Bu da bozunmuş moleküllerin bir kısmının tekrar geridönüşümüne sebep olmuş olabilir. Yüksek sıcaklıkta, düşük sıcaklıkta çıkarılamayan yeni etken maddeler elde edilmiş olabilir. Yüksek sıcaklık ve basıncın avantajıyla elde edilen etken madde miktarının çok yüksek olması, degredasyon miktarını telafi etmiş gözükmektedir.

Ju ve Howard (2003), kurutulmuş kırmızı üzüm kabuğunu basınçlı solvent tekniği ve soxhlet cihazı ile ekstrakte ettikleri çalışmalarında aynı sıcaklıklarda (60 ve 100 ^{o}C'de) elde edilen özütlerdeki toplam fenolik madde ve toplam antosiyanin miktarlarını karşılaştırdıklarında, su özütü için basınçlı solvent sistemiyle elde edilen fenolik ve antosiyanin miktarının soxhlet cihazına göre iki kat fazla olduğunu göstermişlerdir. Metanol özütünde ise yine bir miktar fazla bulmuşlardır. Aynı çalışmalarında basınçlı solvent sisteminde 20 ^{o}C, 40 ^{o}C, 60 ^{o}C, 80 ^{o}C, 100 ^{o}C, 120 ^{o}C ve 140 ^{o}C'de çıkarılan su ve metanol özütlerindeki toplam fenolik madde ve antosiyanin madde miktarlarını karşılaştırmışlardır.

Bu çalışmalarını, basınçlı sıvı ekstraksiyonu için 10 Mpa basınçta 15 dakika ekstraksiyon sonucunda, sokslette ise 15 dakikalık ekstraksiyon sonucunda elde ettikleri özütlerden ölçmüşlerdir. Ekstraksiyondan sonra özütleri hızlıca 5 ^{o}C'ye indirerek çalışmışlardır.

Ju ve Howard'ın bu çalışmalarında su ekstraktı için elde edilen fenolik madde ve antosiyaninler açısından 80-100 ^{o}C sıcaklıkta maksimum verime ulaştığı, sıcaklık yükseldikçe verimin düştüğü görülmektedir. Ancak yinede 140 ^{o}C sıcaklıktaki verimin 20 ^{o}C den hala fazla olduğu dikkat çekicidir. Yine metanol ekstresinde de fenolik maddeler için 120 ^{o}C, antosiyaninler için 60 ^{o}C'de maksimum verim elde edilmiştir.

Bir çok fenolik bileşiğin antimikrobiyal aktiviteleri bulunmaktadır. Ju ve Howard'ın çalışmalarında da görüldüğü gibi ekstraksiyonda belli bir noktaya kadar yüksek sıcaklıklar özüt içindeki fenolik madde miktarını artırmaktadır. Bu veriler bizim çalışmamızda yüksek basınç ve sıcaklıklarda elde ettiğimiz özütlerin, antimikrobiyal aktivitesinde, neden maserasyona göre düşüş olmadığına dair bir fikir vermektedir.

Menengiç için her iki yöntemle elde edilen özütlerden VRE'ye karşı sadece ham hekzan ekstresi antibakteriyel aktivite göstermiştir. Çapı 9mm'den küçük olan inhibisyon zonları sadece karşılaştırma amaçlı olarak tablo 4.7 ve 4.8'de verilmiştir. Anlamlı bir antibakteriyel etkinlik olarak ele alınmamıştır. Maserasyon ve basınçlı solvent ekstraktlarının VRE'ye karşı oluşturdukları inhibisyon zonlarının karşılaştırması tablo 4.9'da verilmiştir. Bağımsız örneklem t testine göre $p > 0,05$ olduğundan istatistiksel anlamda aralarında antibakteriyel etkinlik bakımından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Ham menengiç özütlerinin olgun menengiç özütlerine göre daha fazla antimikrobiyal ajan içerebileceği tahmini giriş bölümünde belirtilmiştir. Çalışma öncesinde ham menengiç ekstrelerinin daha yüksek antimikrobiyal aktivite sergilemesi bekleniyordu. Bu beklentinin sebebi, genel olarak ham meyveler ile olgun meyvelerin gözlemine dayanmaktaydı. Olgun meyvelerin ham olanlarına göre daha çabuk çürümesi, ham haldeyken yeni oluşan tohumun mikroorganizmalara karşı korunma ihtiyacı, dalından koparılmayan yada hayvanlar tarafından yenmeyen meyvelerin tohumlarını toprağa ulaştırma amacı gibi varsayım ve gözlemler ham meyvelerin daha fazla antimikrobiyal ajan taşıdığı fikrini oluşturmuştur. Literatürde ham ve olgun meyvenin antibakteriyel aktivitesi için karşılaştırmalı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın sonucunda ise beklentiler doğrultusunda MRSA ve VRE'ye karşı ham menengiç özütleri olgun menengiç özütlerine göre önemli derecede daha yüksek oranda antibakteriyel etkinlik göstermiştir ($p < 0,05$).

Bu çalışmada MRSA'ya karşı elde edilen veriler, bu tezin literatür taraması bölümünde belirtilen farklı bitkilerin benzer dozda yapılan daha önceki çalışmalarıyla karşılaştırıldığında ham menengiç su ekstraktının yüksek seviyede antibakteriyel aktivite sergilediği, ham menengiç hekzan ve etanol ekstrelerinin ise daha önceki çalışmalara kıyasla orta derecede aktivite gösterdiği görülmektedir. Olgun menengiç ekstreleri ise literatüre kıyasla alt seviyede aktivite göstermiştir. Bu çalışmada VRE'ye karşı elde edilen veriler literatürdeki farklı bitkilerin benzer dozda yapılan çalışmaları ile karşılaştırıldığında ham menengiç hekzan ekstraktının ortalama seviyede antibakteriyel aktivite sergilediği görülmektedir. Etanol ve su ekstraktları ise VRE'ye karşı antibakteriyel aktivite göstermemişlerdir.

Antibiyotik direncinin hız kazandığı günümüzde antibakteriyel aktivite çalışmaları daha çok önem kazanmaktadır. Özellikle dirençli bakterilere karşı çalışmalar artırılmalı, yeni antibakteriyel ajanlar geliştirilmelidir. Ham menengiç ekstraktları özellikle MRSA'ya karşı yeni etken madde ajanları taşıma potansiyeline sahip olduğundan, muhtemel antibakteriyel bileşiklerin izolasyonu için çalışmalar devam ettirilmelidir.

KAYNAKLAR

Abdullahi, M. I., Uba, A., Alebiosu, C. O., Alhassan, A. M., Mode, S., Umar, A., Nasir, I., Bello, S. S., Ibrahim, Z. Y. Y., Yunusa, A., Yusuf, A. J. (2015). Antimicrobial properties of the methanol leaf extract of *Vernonia glaberrima* Welw. Ex O. Hoffm (*Asteraceae*). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **9**(37), 914-918.

Abu-Shanab, B., Adwan, G., Jarrar, N., Abu-Hıjleh, A., Adwan, K. (2006). Palestine in Folkloric Medicine against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Turk J Biol.* **30**, 195-198.

Addo-Mensah, A., Garcia, G., Maldonado, I. A., Anaya, E., Cadena, G., Lee, L. G. (2015). Evaluation of Antibacterial Activity of *Artemisia vulgaris* Extracts. *Research Journal of Medicinal Plant.* **9**(5), 234-240.

Ahmed, M. H., Ibrahim, M. A., Zhang, J., Melek, F. R., El-Hawary, S. S., Jacob, M. R., Muhammad, I. (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* active Dimeric Isobutyrylphloroglucinol from Ivesia gordonii. *Nat Prod Commun*. **9**(2), 221-224.

Akan, M. (2006). *Staphylococcus* İnfeksiyonları. 5-13. *İlke-Emek Yayınları*. Ankara. 332.

Akpoyraz, M., Durak, İ. (1995). Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri. *Ankara Tıp Mecmuası The Journal Of The Faculty Of Medıcıne*. **48**, 253-262.

Al-Habib, A., Al-Saleh, E., Safer, A., Afzal, M. (2010). Bacdericidal effect of grape seed extrakt on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Toxicol. Sci*. **35**(3), 357-364.

Atlı, H. S., Arpacı, S., Ayanoğlu, H., Ak, B. E. (1999). Comparison of seedling characteristics of some *Pistacia* species. *XI GREMPA seminar on pistachios and almonds, Cahiers Options Mediterraneennes (France)*. **56**, 1022-1379.

Atlı, H. S., Arpacı, S., Kaska, N., Ayanoğlu, H. (2001). Willd *Pistacia* Species in Turkey, *Pistacia* towards a comprehensive documentation of distributipn and use its genetic diveristy in Central & West Asia, North Africa and mediterranean Europe, *Report of The IPGRI Workshop*, 14-17 December 1998, Irbid, Jordan.

Başustaoğlu, A. (2004). Enterokoklarda antibakteriyel direnç mekanizmaları ve direnç sorunu. Ed: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. *Bilimsel Tıp Yayınevi* Ankara. s. 141-158.

Bauer, A. W., Kirby, W., Sherris, J. C., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standartized simple disc method. *Am J Clin Pathol.* **45**, 493.

Boz, E. S. (2009). Toplum Kaynaklı Ve Nozokomiyal Deri Ve Yumuşak Doku İnfeksiyonlarından İzole Edilen *Staphylococcus aureus*'ların Mlsb Direnci Ve

Antimikrobiyal Duyarlılıkları. *Uzmanlık Tezi, Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Bölümü*, İstanbul.

Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Surmaghi, M. H. S., Ardekani, M. R. S., Rahimi, R. (2013). Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk* and *P. lentiscus*): A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. *Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal*. **2013**, 1-33.

Büyüktuncel, E. (2012). Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi.* **32**(2), 233.

Camel, V. (2001). Recent extraction techniques for solid matrices - Supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: Their potential and pitfalls. *The Analyst*. **126**(7), 3.

Capelo, J. L., Mota, A. M. (2005). Ultrasonication for analytical chemistry. *Current Analytical Chemistry*. **1**, 193.

CDC. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States, *MMWR* (2002). **51**(26), 565-567.

Cha, J., Choi, M., Ko, E., Hwang, E., Kang, J., Oh, J., Park, Y., Jung, Y., Jeon, A., Choi1, K. (2015). Synergistic Effects of *Cinnamomum camphora* Leaves Extract against Clinical Isolated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus. Korean J. Plant Res*. **28**(1), 009-015.

Chambers, H. F. (2001). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus? Emerg. Infect. Dis.* **7**, 178-182.

Chandrasekaran, M., Venkatesalu, V., Raj, G. A. (2014). Antibacterial activity of selected marine macro algae against vancomycin resistant *Enterococcus faecalis*. *Journal of Coastal Life Medicine.* **2**(12), 940-946.

Chen, L., Cheng, X., Shi, W., Lu, Q., Go, V. L., Heber, D., Ma, L. (2005). Inhibition of Growth of *Streptococcus* mutans, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, and Vancomycin-Resistant Enterococci by Kurarinone, a Bioactive Flavonoid Isolated from Sophora flavescens. *Journal Of Clınıcal Mıcrobıology*. **43**(7), 3574-3575.

Clark, A. K., Ikram, S., Evershed, R. P. (2013). Organic chemistry of balms used in the preparation of pharaonic meat mummies. *PNAS*. **110**(51), 20392-20395.

CLSI (Clinical and Laboratory Standarts Institute). (2012). Performance Standarts For Antimicrobial Susceptibility Testing. **32**(3), 126-134.

Coque, T. M., Tomayko, J. F. (1996). Vancomycin resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **40**(11), 2605-2609.

Çam, M., Hışıl, Y. (2006). Basınçlı Solvent Ekstraksiyonu Ve Uygulamaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi.* **3**, 82.

Delgado-Zamarreno, M. M., Bustamante-Rangel, M., Sanchez-Perez, A., Carabias-Martinez, R. (2004). Pressurized liquid extraction prior to liquid chromatography with electrochemical detection for the analysis of vitamin E isomers in seeds and nuts. *Journal of Chromatography A.* **1056**, 249-252.

Deurenberg, R. H., Stobberingh, E. E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.* **8**(6), 747-763.

Dubey, D., Padhy, R. N. (2012). Surveillance of multidrug resistance of two Gram-positive pathogenic bacteria in a teaching hospital and in vitro efficacy of 30 ethnomedicinal plants used by an aborigine of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease.* **2**(4), 273-281.

Durak, M. Z., Uçak, G. (2014). Solvent optimization and characterization of fatty acid profile and antimicrobial and antioxidant activities of Turkish *Pistacia terebinthus* L. extracts. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry.* **39**, 10-19.

Eerdunbayaer, M. A., Aoyama, H., Kuroda, T., Hatano, T. (2014). Structures of Two New Flavonoids and Effects of Licorice Phenolics on Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Species. *Molecules*. **19**, 3883-3897.

English, B. K., Shenep, J. L. (2004). Enterococcal and Viridans Streptococcal infections. In:Feigin RD, Cherry JD (eds). *Textbook of Pediatric Infectious Diseases. 5th edition.* Philedelphia: WB Saunders Company. 1175-92.

Eom, S., Kang, M., Kim, Y. (2008). Antibacterial Activity Of The Phaeophyta *Ecklonia stolonifera* On Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Fish. Sci. Technol.* **11**(1), 1-6.

Erdem, S., Eren, P. (2009). Tedavi Amacıyla Kullanılan Bitkiler Ve Bitkisel Ürünlerin Yan Etkileri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. **66**(3), 133-141.

Erecevit, P. (2007). Tıbbi amaçlar için kullanılan bazı bitki türlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,* 30s. Elazığ.

Farnsworth, N. R., Akerev, O., Bingel, A. S. (1985). The Bullettion of WHO. **63**, 9865-987.

Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu, M. S. (2011). Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi. *Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi*. **11**(1), 52-67.

Fidan, Y., Söylemezoğlu, G. (1995). Bahçe Bitkilerinin Hasat Sonrası Fizyolojisi Açısından Etilenin Önemi, Biyosentezi Ve İşleyiş Mekanizması. *Gıda*. **20**(1), 27-32.

Fisher, K., Philips, C. (2009). In vitro inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterecoccus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. *British Journal and Biomedical Since.* **66**(4), 180.

Fukai, T., Oku, Y., Hou, A. J., Yonekawa, M., Terada, S. (2005). Antimicrobial activity of isoprenoid-substituted xanthones from *Cudrania cochinchinensis* against vancomycin-resistant enterococci. *Phytomedicine.* **12**(6-7), 510-513.

Garipçin, M., Şeker, E. (2013). İnsanlarda Ve Hayvanlarda Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) İnfeksiyonlar. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*. **11**(1), 44-60.

Ghorbel, A., Salem-Fnayou, A., Ben-Chatibi, A., Twey, M. (2001). Genetic Resources of *Pistacia* in Tunisia, *Pistacia* towards a comprehensive documentation of distributipn and use its genetic diveristy in Central & West Asia, North Africa and mediterranean Europe, *Report of The IPGRI Workshop*, 14-17 December 1998, Irbid, Jordan.

Gökbulut, A., Özkal, N., Yıldız, S. (2006). *Thymelaea passerina* L. Cosson & Germ. Üzerinde Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları. *Ankara Ecz. Fak. Derg*. **35**(3), 171-176.

Gözcelioğlu, B. (2011). Dünya'da Ne Kadar Tür Var? *Bilim Ve Teknik Eylül 2011*. s. 5.

Gültekin, M. (2004). Enterokoklar: Ed: Ulusoy, S., Usluer, G., Ünal, S. Mikrobiyoloji, epidemiyoloji ve patogenez. Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. *Bilimsel Tıp Yayınları*. Ankara. 121-140.

Hacıbekiroğlu, I., Yılmaz, P. K., Haşimi, N., Kılınç, E., Tolan, V., Kolak, U. (2015). In vitro biological activities and fatty acid profiles of *Pistacia terebinthus* fruits and *Pistacia khinjuk* seeds. *Natural Product Research.* **29**(5), 444-446.

Hadj-Hassan, A. (2001). Cultivated Syrian Pistachio Varieties. *Pistacia* towards a comprehensive documentation of distributipn and use its genetic diveristy in Central & West Asia, North Africa and mediterranean Europe, *Report of The IPGRI Workshop*, 14-17 December 1998, Irbid, Jordan.

Horıuchı, K., Shıota, S., Hatano, T., Yoshıda, T., Kuroda, T., Tsuchıya, T. (2007). Antimicrobial Activity of Oleanolic Acid from *Salvia officinalis* and Related Compounds on Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE). *Biol. Pharm. Bull*. **30**(6), 1147-1149.

Ibrahim, D., Lim, S. H. (2015). In vitro antimicrobial activities of methanolic extract from marine alga *Enteromorpha intestinalis*. Asian Pac J Trop Biomed. **5**(9), 785-788.

İsmail, A., Lamia, H., Mohsen, H., Samia, G., Bassem, J. (2013). Chemical Composition and Antifungal Activity of Three *Anacardiaceae* Species Grown in Tunisia. *Science International.* **1**(5), 148-154.

Jevons, M. P. (1961). Celbenin-resistant staphylococci. *BMJ.* **1**(5219), 124-125.

Jiamboonsri, P., Pithayanukul, P., Bavovada, R., Chomnawang, M. T. (2011). The Inhibitory Potential of Thai Mango Seed Kernel Extract against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules.* **16**, 6255-6270.

Ju, Z. Y., Howard, L. R. (2003). Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. *J. Agric. Food Chem.* **51**(18), 5207-5213.

Kamble, A. V., Moon, A. H. (2015). Bıoassay-Guıded Fractıonal Isolatıon And Identification Of Anti-MRSA Compounds By Gc-Ms From *Trıdax procumbens* L. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutıcal Scıences*. **4**(06), 1022-1031.

Kafkas, S., Perl-Treves, R. (2001). Morphological and molecular phylogeny of *Pistacia* species in Turkey. *Theor Appl Genet.* **102**, 908-915.

Keleş, O., Ak, S., Bakırel, T., Alpınar, K. (2001). Türkiye'de Yetişen Bazı Bitkilerin Antibakteriyel Etkisinin İncelenmesi. *Turk J Vet Anim Sci*. **25**, 559-565.

Kıran, F., Yıldız, A., Osmanağaoğlu, Ö. (2013). Bazı Liken Örneklerinin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* **43**(3), 97-103.

Kırca, A., Özkan, M. (2007). Değişik amaçlı bazı test ve analiz yöntemleri. Gıda Analizleri, Cemeroğlu, B. (ed.), s. 463-486, Bizim Büro Basımevi, Ankara.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., Winn, W. C., Procop, G., Woods, G. (2005). Color Atlas and Textbook of Diagnostik Microbiology. Sixth edition. Philadelphia*: Lippincott Co*. 700-711.

Kono, K., Tataran, I., Takeda, S., Arakawa, K., Hara, Y. (1994). Antibacterial Activity of Epigallocatechin Gallate against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Enfeksiyon Hastalıkları Dergisi. **68**(12), 1518-1522.

Kordalı, S., Çakır, A., Zengin, H., Duru, M. E. (2003). Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia.* **74**, 164-167.

Kuru, C., Özsabuncuoğlu, I. H. (1990). Yabani *Pistacia* türlerinin aşılanmasında sorunlar ve çözüm yolları. *Türkiye I. Antepfıstığı Sempozyumu*, 11-12 Sept., Gaziantep, Türkiye, s. 51-57.

Mattana, C. M., Satorres, S. E., Sosa, A., Fusco, M., Alcaráz, L. E. (2009). Antibacterial Activity Of Extracts Of *Acacıa aroma* Against Methicillin-Resistant And Methicillin-Sensitive *Staphylococcus*. *Brazilian Journal of Microbiology*. **41**, 581-587.

Mehrgan, H., Mojab, F., Pakdaman, S., Poursaeed, M. (2008). Antibacterial Activity of *Thymus pubescens* Methanolic Extract. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. **7**(4), 291-295.

Moellering, R. C. (1992). Emergence of enterococcus as a significant pathogen. *Clin Infect Dis*. **14**, 1173-1178.

Mojab, F., Poursaeed, M., Mehrgan, H., Pakdaman, S. (2008). Antibacterial Activity Of *Thymus daenensis* Methanolic Extract. *Pakıstan Journal Of Pharmaceutıcal Sciences.* **21**(3), 210-213.

Mun, S., Joung, D., Kim, Y., Kang, O., Kim, S., Seo, Y., Kim, Y., Lee, D., Shin, D., Kweon, K., Kwon, D. (2013). Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine.* **20**, 714-718.

Nagoshı, C., Shıota, S., Kuroda, T., Hatano, T., Yoshida, T., Kariyama, R., Tsuchiya, T. (2006). Synergistic Effect of [10]-Gingerol and Aminoglycosides against Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE). *Biol. Pharm. Bull*. **29**(3), 443-447.

Namba, K., Zheng, X., Motoshima, K., Kobayashi, H., Tai, A., Takahashi, E., Sasaki, K., Okamoto, K., Kakuta, H. (2008). Design and synthesis of benzenesulfonanilides active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant Enterococcus. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* **16**(11), 6131-6144.

Nayak, N., Rath, S., Mishra, M. P., Ghosh, G., Padhy, R. N. (2013). Antibacterial activity of the terrestrial fern *Lygodium flexuosum* L. Sw. against multidrug resistant enteric- and uro-pathogenic bacteria. *Journal of Acute Disease.* **2**(4), 270-276.

Okamura, S., Nishiyama, E., Yamazaki, T., Otsuka, N., Taniguchi, S., Ogawa, W., Hatano, T., Tsuchiya, T., Kuroda, T. (2015). Action mechanism of 6, 6′-dihydroxythiobinupharidine from *Nuphar japonicum*, which showed anti-MRSA and anti-VRE activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* **1850**(6), 1245-1252.

Onay, A. (1996). In-Vitro Organogenesis and Embryogenesis of Pistachio, *Pistacia vera* L. Institute of Cell and Molecular Biology, *Daniel Rutherford Building*, University of Edinburg, Edinburgh. p. 4-5.

Osmanağaoğlu, Ö., Yıldız, A., Sacılık, S. C. (1999). Türkiyede'ki Farklı Bölgelerden İzole Edilen Likenlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* **30**, 17-19.

Otsuka, N., Lıu, M., Shıota, S., Ogawa, W., Kuroda, T., Hatano, T., Tsuchıya, T. (2008). Anti-methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Compounds Isolated from *Laurus nobilis. Biol. Pharm. Bull.* **31**(9), 1794-1797.

Özkan, M. (2009). Siyah Havuç Suyu Konsantresi Üretimi ve Depolanması Sürecinde Fenolik Maddeler ve Antosiyaninlerdeki Değişimler ve Bu Değişimlerin Antioksidan Aktivite ile İlişkisi. *Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri*. s. 57.

Özpınar, H., Dağ, Ş., Yiğit, E. (2013). Şeftali (*Persica vulgaris* Miller) yaprak ekstraktının antibakteriyel etkisi. *Cumhuriyet Tıp Dergisi.* **35**, 172-178.

Özuslu, E., İskender, E., Özaslan, M., Zeynalov, Y. (2005). The Investigation of the Flora Sof Mountain (Gaziantep, Turkey). *Flora Mediterranea*. **15**, 359-391.

Özuslu, E., İskender, E., Tel, A. Z., İlçim, A. (2009). Taxonomic situations of two subspecies of *Pistacia* (*P. terebinthus* subsp. *terebinthus* and *P. terebinthus* subsp. *palaestina*) by morphological and area remarks. *BioDiCon*. **2**(2), 100-109.

Parasa, L. S., Tumatı, S. R., Kumar, C. A., Chıgurupatı, S. P., Rao, G. S. (2011). In Vıtro – Antimıcrobial Activity Of Cashew (*Anacardium occıdentale* L.*)* Nuts Shell Liquid Against Methicıllin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Clinical Isolates. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **3**(4), 436-440.

Park, S. O., Shin, J. H., Choi, W. K., Park, B. S., Oh, J. S., Jang, A. (2010). Antibacterial activity of house fly-maggot extracts against MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) and VRE (Vancomycin-resistant *Enterococci*). *Journal of Environmental Biology.* **31**(5), 865-871.

Pignatti, S. (1982). Flora D'Italia, Vol. 2, *Edagricole* Bologna, Italy.

Ramadan, H., Min, B., Tiwari, A. K., Reddy, G., Adesiyun, A., Hinton, A., Abdela, W. (2015). Antibacterial Activity of Pomegranate, Orange and Lemon Peel Extracts Against Food-Borne Pathogens and Spoilage Bacteria *In vitro* and on Poultry Skin. *International Journal of Poultry Science.* **14**(4), 229-239.

Razmavar, S., Abdulla, M. A., İsmail, S. B., Hassandarvish, P. (2014). Antibacterial Activity of Leaf Extracts of *Baeckea frutescens* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International.* Volume 2014, Article ID 521287, 5 pages.

Rhee, K. (2002). Isolation and characterization of Streptomyces sp. KH-614 producing anti-VRE (vancomycin-resistant *Enterococci*) antibiotics. *J. Gen. Appl. Microbiol*. **48**, 321-327.

Sadilova, E., Stintzing, E. C., Carle, R. (2006). Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins. *Journal of Food Science***. 71**(8), 504-512.

Sakagami, Y., Kajimura, K., Wijesinghe, W. M., Dharmaratne, H. R. (2002). Antibacterial activity of calozeyloxanthone isolated from Calophyllum species against vancomycin-resistant Enterococci (VRE) and synergism with antibiotics. *Planta Medica*. **68**(6), 541-543.

Samy, S. (2010). Antimicrobial Activity Of Essential Oils Against Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) And *Escherıchıa coli* O157:H7 In Feta Soft Cheese And Mınced Beef Meat. *Brazilian Journal of Microbiology*. **42**, 187-196.

Sancak, B. (2000). *Staphylococcus aureus*'da metisilin direnç mekanizmaları. *Mikrobiyol Bul*. **34**(3-4), 381-390.

Sancak, B. (2012). MRSA Direnç Mekanizmaları: Dünyada Ve Türkiye'de Epidemiyolojisi. *ANKEM Derg.* **26**(Ek 2), 38-47.

Sarışen, Ö., Çalışkan, D. (2005). Fitoterapi: Bitkilerle Tedaviye Dikkat. *Ttb*. **14**, 183.

Shımızu, M., Shıota, S., Mızushıma, T., Ito, H., Hatano, T., Yoshıda, T., Tsuchıya, T. (2001). Marked Potentiation of Activity of β-Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Corilagin. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. **45**(11), 3198-3201.

Shibata, H., Kondo, K., Katsuyama, R., Kawazoe, K., Sato, Y., Murakami, K., Takaishi, Y., Arakaki, N., Higuti, T. (2005). Alkyl Gallates, Intensifiers of β-Lactam Susceptibility in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* **49**(2), 549-555.

Singh, L. K., Maheshwari, D. K., Shukla, S. (2015). Antibacterial effect of butyryl alkannin from *Arnebia euchroma* against vancomycin-resistant pathogens of *Enterococcus faecalis* causing urinary tract infections. *Natural Product Research.* **29**(24), 2299-2301.

Soleimani, N., Mobarez, A. M., Olia, M. S. J., Atyabi, F. (2015). Synthesis, Characterization and Effect of the Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles on Vancomycin-Resistant *Enterococcus* and Other Gram Negative or Gram Positive Bacteria. *Int. J. Pure Appl. Sci. Technol.* **26**(1), 14-23.

Şardan, Y. Ç. (2004). Enterokoklarda direnç sorunu. Ed: Şardan, Y. Ç. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. *Bilimsel Tıp Yayınevi*. Ankara. s. 10-16.

Tadeo, J. L., Sanchez-Brunete, C., Albero, B., Garcia-Valcarcel, A. I. (2010). Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Journal of Chromatography A*. **1217**, 2415.

Takhi, D., Ouinten, M., Yousfi, M. (2011). Study of Antimicrobial Activity of Secondary Metabolites Extracted Fromspontaneous Plants from the Area of Laghouat, Algeria. *Advances in Environmental Biology*. **5**(2), 469-476.

Talhouk, S. N., Nehme, G. A., Baalbaki, R., Zurayk, R., Adham, Y. (2001). Ecogeographic characterization of *Pistacia* spp. In Lebanon, *Pistacia* towards a comprehensive documentation of distributipn and use its genetic diveristy in Central & West Asia, North Africa and mediterranean Europe. *Report of The IPGRI Workshop*. 14-17 December 1998, Irbid, Jordan.

Tanaka, H., Sato, M., Fujiwara, S., Hirata, M., Etoh, H., Takeuchi, H. (2002). Antibacterial activity of isoflavonoids isolated from Erythrina variegata against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus. Letters in Applied Microbiology*. **35**, 494-498.

Tanker, M., Tanker, N. (1991). Farmakognozi. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*. **1**, 1-3.

Tavman, Ş., Kumcuoğlu, S., Akkaya, Z. (2009). Bitkisel Ürünlerin Atıklarından Antioksidan Maddelerin Ultrason Destekli Ekstraksiyonu. *Gıda*. **34**, 179.

Tepe, B., Kılıç, İ. H., Özaslan, M., Karagöz, D. I., Güzel, Ç. B., Cilkız, M., Hüsunet, M. T., Çevikbaş, S., Koruk, M., Akgül, H. (2012). *Pistacia terebinthus* Bitkisinin Meyve Perikarpının Fitokimyasal İçeriği, Antimikrobiyal, Antioksidan ve DNA Koruyucu Aktivitesinin Belirlenmesi. *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*. s. 736.

Topdemir, H. G. (2012). İslam Dünyasında Farmakoloji. *Bilim Ve Teknik Aralık 2012*. s. 90-93.

Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Sasaki, T., Hiramatsu, K. (2010). Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*. **54**(10), 4352-9.

Ulukanli, Z., Karaborklu, S., Öztürk, B., Cenet, M., Balcılar, M. (2012). Chemical composition, antibacterial, and insecticidal activities of the essential oil from the *Pistacia terebinthus* L. spp. Palaestina (Boiss) (Anacardiaceae). *J Food Process Pres*. **38**, 815-822.

Valle, D. L., Andrade, I., Puzon, J. J. M., Cabrera, E. C., Rivera, W. L. (2015). Antibacterial activities of ethanol extracts of Philippine medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* **5**(7), 532-540.

Voravuthikunchai, S. P., Kitpipit, L. (2005). Activity of medicinal plant extracts against hospital isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus. Clinical Microbiology and Infection.* **11**, 510-512.

Wahab, S. I. A., Abdul, A. B., Mohan, S. M., Al-Zubairi, A. S., El-Hassan, M. M., İbrahim, M. Y. (2009). Biological activities of *Pereskia bleo* Extrakts. *International Journal Of Pharmacology*. **5**(1), 71-75.

Woodford, N., Livermore, D. M. (2009). Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J Infect*. **59**(Suppl 1), 4-16.

Xing, B., Yu, C., Ho, P., Chow, K., Cheung, T., Gu, H., Cai, Z., Xu, B. (2003). Multivalent Antibiotics via Metal Complexes: Potent Divalent Vancomycins against Vancomycin-Resistant Enterococci. *J. Med. Chem.* **46**(23), 4904-4909.

Yaltırık, F. (1967). Türkiye Florası İçin Yeni Bir Tür. *İ. Ü. Orman Fakültesi Dergisi*, Seri A, Cilt XVII, 1.

You, Y., Choi, N., Kim, K. (2013). Ethanol Extract of *Ulmus pumila* Root Bark Inhibits Clinically Isolated Antibiotic-Resistant Bacteria. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* Volume 2013, A. ID 269874, 7 pages.

Zohary, D. (1996). The Genus *Pistacia* L. In: S. Padulosii T. Caruso and E. Barone (eds.). Taxonomy, distribution, conservation and uses of *Pistacia* genetic resources. *IPGRI*. p. 1-11, Palermo, Italy.

Zohary, D. (2000). The Taxonomic ranking of *Pistacia terebinthus* and *P. palaestina*. *Fao-Ciheam- Nucis- Newsletter*. **9**, 39-40.