

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

METİSİLİN DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*' A
KARŞI FARKLI BİTKİLERİN ANTİBAKTERİYEL VE
ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ
VE FARMASÖTİK AÇIDAN ÖNEMLİ PROTEAZLARA
KARŞI BİTKİ İNHİBİTÖRÜNÜN ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MUSTAFA VURKUN

KASIM 2018

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**METİSİLİN DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'
A KARŞI FARKLI BİTKİLERİN ANTİBAKTERİYEL VE
ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ
VE FARMASÖTİK AÇIDAN ÖNEMLİ PROTEAZLARA
KARŞI BİTKİ İNHİBİTÖRÜNÜN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MUSTAFA VURKUN

KASIM 2018

MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

Mustafa VURKUN tarafından hazırlanan “Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*’ a Karşı Farklı Bitkilerin Antibakteriyel ve Antibiyofilm Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Farmasötik Açıdan Önemli Proteazlara Karşı Bitki İnhibitörünün Etkisi” başlıklı tezinin, 30/11/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ (Jüri başkanı)

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

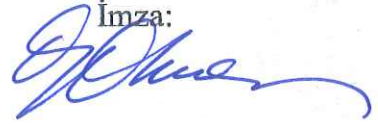
İmza:



Doç. Dr. Gülten ÖKMEN (Danışman)

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Dr. Öğr. Üyesi Neslihan BALPINAR (Üye)

Biyoloji Ana Bilim Dalı,
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Burdur

İmza:



ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Doç. Dr. Gülten ÖKMEN

Biyoloji Anabilim Dalı Başkan Vekili,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

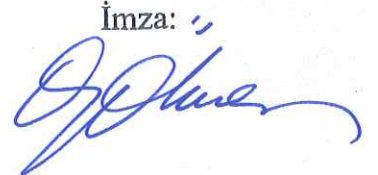
İmza:



Doç. Dr. Gülten ÖKMEN

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Savunma Tarihi: 30/11/2018

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, döküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Mustafa VURKUN

30/11/2018



ÖZET

**METİSİLİN DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*' A KARŞI FARKLI
BİTKİLERİN ANTİBAKTERİYEL VE ANTİBİYOFİLM
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE FARMASÖTİK AÇIDAN
ÖNEMLİ PROTEAZLARA KARŞI BİTKİ İNHİBİTÖRÜNÜN ETKİSİ**

Mustafa VURKUN

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gülten ÖKMEN

Kasım 2018, 54 sayfa

Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna göre, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve *S. aureus* antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiş, bu suşlardan ölüm oranı % 26 iken, dirençli olmayan suşlardan ölüm oranı ise % 17 ' dir, kadar olduğu, bununla birlikte Dünya' da ilaç direncinin tehlikeli bir boyuta ulaştığı ve yaklaşık %90 olduğu rapor edilmektedir. Bu çalışma, insan sağlığına önemli bir tehdit oluşturan metisiline dirençli *S. aureus*' a karşı yeni ve etkili bir antibakteriyel ajan geliştirmeyi amaçlamakta, ayrıca bakterinin bazı virülans faktörlerine karşı inhibitör etkisi olabilecek bitki inhibitörlerini araştırmaktadır. Bu çalışmada, 5 farklı bitkinin antibakteriyel aktivitesi belirlenmiş ve en yüksek aktivite *Vitex agnus-castus* (12 mm) bitkisinden elde edilmiştir. En düşük minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) 3250 µg/ml, en düşük minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC) ise 6500 µg/ml olarak aynı bitkiden sağlanmıştır. Anti-biyofilm çalışmaları sonucunda en yüksek anti-biyofilm aktivitesi aynı bitkiden % 79 olarak bulunmuştur. *Vitex agnus-castus*' un ayrıca proteazı, trombini ve kollajenazı inhibe ettiği de belirlenmiştir. *Vitex agnus-castus*' un fırsatçı bir patojen olan MRSA için yeni bir ilaç maddesi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Staphylococcus aureus*, Antibakteriyel Aktivite, Antibiyofilm Aktivitesi, Proteaz Aktivitesi, Bitki İnhibitörü, Anti-Trombin, Anti-Kollajenaz

ABSTRACT
DETERMINATION OF ANTIBACTERIAL AND ANTIBIOFILM
ACTIVITIES OF DIFFERENT PLANTS AGAINST METHICILLIN-
RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, AND EFFECT OF PLANT
INHIBITOR AGAINST PHARMACEUTICALLY IMPORTANT
PROTEASES

Mustafa VURKUN

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gulten OKMEN

November 2018, 54 pages

According to the World Health Organization report methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *S. aureus* have developed resistance to antibiotics, mortality rate form these strains is 26 %, while mortality rate of the other not resistant strains to antibiotics is about 17 %, however any drug resistance in World which reaches a dangerous level and it is about 90 % in the reported. This study aims to develop a new and effective antibacterial agent against methicillin resistant *S. aureus* which is a major threat to human health, in addition to investigate the plant inhibitors that may have an inhibitory effect against some virulence factors of bacterium. In this study, antibacterial activities of 5 different plants were determined and the highest activity was obtained from *Vitex agnus-castus* (12 mm) plant. The minimum inhibitory concentration (MIC) was 3250 µg/ml and the lowest minimum bactericidal concentration (MBC) was 6500 µg/ml from same plant. At the result of anti-biofilm studies, the highest anti-biofilm activity was found as 79 % from same plant. Furthermore, it was determined that *Vitex agnus-castus* also inhibited protease, thrombin and collagenase. It is thought that *Vitex agnus-castus* can be used as a new drug agent for MRSA which an opportunistic pathogen.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Antibacterial Activity, Antibiofilm Activity, Protease Activity, Plant Inhibitor, Anti-Thrombin, Anti-Collagenase



Sevgili Aileme

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilgi ve desteğini gördüğüm, hayatın her döneminde azmini ve kişiliğini örnek alacağım, çalışmalarımın yönlendirilmesinde ve sonuçlandırılmasında emeği geçen, kendimi geliştirmem için beni teşvik edip, destekleyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gülten ÖKMEN' e teşekkür ederim.

Y. Lisans eğitimim süresince destek, hoşgörü ve yardımlarını esirgemeyen Uzm. Biyolog Ali ARSLAN, Uzm. Biyolog Şükran KARDAŞ, Uzm. Biyolog Mahabbat Mammadhkanli, Uzm. Dr. Olcay CEYLAN' a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca beni destekleyen, motive eden, her zaman yanımda hissettiğim Biyolog Dilek ÖZBAY' a teşekkür ederim.

Her konuda desteklerini aldığım, bana inanan ve güvenen sevgili aileme teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Bu proje “Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 17/071 proje numarası ile desteklenmiştir.” Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi'ne desteğinden ötürü teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	IXI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XIII
1. GİRİŞ	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	2
1.2 <i>S. aureus</i> ' un Virulans Faktörleri.....	4
1.2.1 Proteazlar.....	4
1.2.2 Kollajen ve kollajenaz.....	4
1.3 Biyofilm	7
1.4 Bitkiler	10
1.4.1 <i>Trigonella foenum-graecum L.</i> (çemen otu)	10
1.4.2 <i>Capparis spinosa L.</i> (kebere).....	10
1.4.3 <i>Picnomon acarna (L.) cass.</i> (çadır diken).....	11
1.4.4 <i>Pistacia terebinthus L.</i> (menengiç)	11
1.4.5 <i>Vitex agnus-castus L.</i> (hayıt).....	12
1.4.6 <i>Momordica charantia L.</i> (acı kavun).....	13
2. MATERYAL VE YÖNTEM	14
2.1 Organizma.....	14
2.2 Bitki Materyalleri	14
2.3 Araç, Gereç ve Kimyasal Maddeler	14
2.4 Kültivasyon	15
2.4.1 Antibakteriyel aktivite için bakterinin kültivasyonu.....	15
2.4.2 Hücre dışı proteaz enziminin eldesi için bakterinin kültivasyonu	15
2.4.3 Antibakteriyel aktivite çalışmaları için bitki ekstraksiyonu.....	15
2.5 Analiz Yöntemleri	16
2.5.1 Organizmanın antibiyotik duyarlılık testi	16
2.5.2 Bitkilerden proteaz inhibitörünün ekstraksiyonu için uygun solventin seçilmesi.....	16
2.5.3 Bitkilerden inhibitörlerin kazanılması ve saflaştırılması	16
2.5.4 Bakterinin hücre dışı proteaz enziminin ekstraksiyonu	17

2.5.5	<i>In vitro</i> antibakteriyal aktivitenin saptanması.....	17
2.5.6	Bitki özütlerinin minimum inhibitör konsantrasyonlarının saptanması (MIC)	18
2.5.7	Bitki özütlerinin minimum bakterisidal konsantrasyonlarının saptanması (MBC)	18
2.5.8	Antibiyofilm denemeleri	19
2.5.9	Proteaz aktivitesinin saptanması	19
2.5.10	Bitki inhibitörlerinin proteaza inhibitör etkisinin saptanması.....	20
2.5.11	Bitki inhibitörlerinin trombine inhibitör etkisinin saptanması.....	20
2.5.12	Bitki inhibitörlerinin kollajenaza inhibitör etkisinin saptanması.....	20
2.5.13	Toplam protein tayini ve standart eğrinin hazırlanması.....	21
3.	ARAŞTIRMA BULGULARI	22
3.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> ' un Antibiyotik Direnç Profili	22
3.2.	Farklı Bitkilerin Antibakteriyel Aktiviteleri	22
3.3.	Farklı Bitkilerin Minimum İnhibitör Konsantrasyonları (MIC)	23
3.4.	Farklı Bitkilerin Minimum Bakterisidal Konsantrasyonları (MBC).....	24
3.5.	Farklı Bitkilerin Antibiyofilm Aktivitesi	24
3.6.	Bakterinin Toplam Protein ve Proteaz Aktivitelerinin Saptanması	25
3.7.	Bitki İnhibitörünün Proteaza İnhibitör Etkisinin Saptanması	27
3.8.	Bitki İnhibitörünün Trombine İnhibitör Etkisinin Saptanması	27
3.9.	Bitki İnhibitörlerinin Kollajenaza İnhibitör Etkisinin Saptanması	28
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	30
	KAYNAKÇA	36
	EKLER	51
	ÖZGEÇMİŞ	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> ' un antibiotik direnç profili	22
Çizelge 3.2. MRSA' a karşı farklı bitkilerin antibakteriyel aktiviteleri.....	23
Çizelge 3.3. Farklı bitkilerin minimum inhibitör konsantrasyonları.....	23
Çizelge 3.4. Farklı bitkilerinin minimum bakterisidal konsantrasyonları.....	24
Çizelge 3.5. Farklı bitkilerin MRSA'a karşı antibiyofilm aktiviteleri	25
Çizelge 3.6. Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> ' un yüzeye bağlanma indeksi	25
Çizelge 3.7. Bitki inhibitörünün proteaza inhibisyon etkisi.....	27
Çizelge 3.6. Bitki inhibitörünün trombin üzerine etkisi.....	28
Çizelge 3.7. Bitki inhibitörünün kollojenaza etkisi.....	29

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Fraksiyonların toplam protein sonuçları (660 nm).....	26
Şekil 3.2. Fraksiyonların toplam proteaz sonuçları (280nm).....	26
Şekil 3.3. <i>Vitex</i> bitkisine ait inhibitörün bakteri proteazına inhibitör etkisi.....	27
Şekil 3.4. Bitki inhibitörü fraksiyonlarının trombine etkisi.....	28
Şekil 3.5. Bitki inhibitörü fraksiyonlarının kollojenaza etkisi.....	29



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- WHO: Dünya Sağlık Örgütü
CDC: Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi
MRSA: Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*
CA-MRSA: Toplum kaynaklı MRSA
HA- MRSA: Hastane kaynaklı MRSA
PVL: Panton-Valentine Lökosidin
MIC: Minimum inhibitör konsantrasyonu
MBC: Minimum bakterisidal konsantrasyonu
TCA: Trikloro asetik asit
RSKK: Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
MHA: Mueller-Hinton Agar
MHB: Mueller-Hinton Broth
BHI: Brain Heart Infusion
PMSF: Fenil metil sulfonil florid
 $\mu\text{g/ml}$: mikrogram/mililitre
h: saat
U/ml: Ünite/mililitre
 $^{\circ}\text{C}$: Derece santigrat

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2014 raporuna göre, MRSA ve *Staphylococcus aureus*' un dirençli suşlarından kaynaklanan ölüm oranının %26' sından, dirençli olmayanların ise %17 kadarından sorumlu olduğu bildirilmiştir. Aynı raporda toplamda, MRSA' nın beta-laktam ilaçlara direncinin Afrika bölgesinde %100' lere, Amerika' da %90' lara, Avrupa' da ise %80' lere ulaştığı rapor edilmektedir. Bu bilgilerden de anlaşılacağı üzere raporlanmış vakalarda bile direnç oranları oldukça yüksektir. Bu verilere, raporlanmayanlar da eklendiğinde tablo oldukça vahimdir. Aynı raporda Türkiye' deki durum ise 2011-2013 yılları arasında invaziv izolatlardan yapılan çalışmalar sonucunda *S. aureus* suşlarının metisiline direnci %31,5 olarak rapor edilmiştir (Anonim, 2014).

S. aureus' a bağlı gelişen ölümcül infeksiyonlar, 1941 yılında penisilin G' nin klinikte kullanıma girmesinden sonra dramatik olarak azalma göstermiştir. Ancak bundan çok kısa bir süre sonra penisiline direnç gösteren *S. aureus*' lar ortaya çıkmış, bunu takip eden 20 yıl içinde hastane ve toplum kaynaklı *S. aureus* izolatlarının yaklaşık %80' i penisiline dirençli hale gelmiştir. Beta-laktamaz enziminin yol açtığı bu direnç sorunu, 1959 yılında beta-laktamaz enzimine dayanıklı yarı-sentetik bir penisilin olan metisilin klinikte kullanımının başlamasıyla aşılmıştır. Ancak, *S. aureus* infeksiyonlarının tedavisinde metisilin kullanımının başlamasından sadece iki yıl sonra, 1961 yılında ilk metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatı tanımlanmıştır (Jevons, 1961; Brumfitt, vd., 1989; Appelbaum, 2007). Günümüzde sadece hastane kaynaklı MRSA infeksiyonlarının değil, aynı zamanda toplum kaynaklı MRSA [community acquired MRSA (CA-MRSA)] infeksiyonlarının görülme sıklığında da önemli bir artış olmuştur (Shorr, 2007; Deurenberg, vd., 2007). MRSA, bir kez hastaneye girdikten sonra eradikasyonu oldukça zordur. Bu nedenle hastanelerde MRSA izolatlarının saptanması, yayılımının önlenmesi, özellikle hemodiyaliz ve cerrahi hastaları gibi yüksek risk taşıyan hasta gruplarında MRSA kolonizasyonunun ortadan kaldırılması büyük önem taşımaktadır (Thompson, vd., 1982; Hershov, vd., 1992; Morita, 1993).

1.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus insan ve hayvanların deri, üst solunum sistemi, alt ürogenital sistem ve sindirim sistemi mukozalarında kommensal olarak bulunabilen ve *Staphylococcus* cinsi içerisinde yer alan en önemli türdür (Akan, 2006; Peacock, 2006; Leonard, 2008).

Sporsuz, hareketsiz, küre şeklinde ve 0,5-1,5 µm boyutları arasında olabilen kok şeklinde bakterilerdir. Gram pozitif bir bakteri olan *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), katalaz ve koagülaz enzimlerine sahip olup, kültür ortamında hızlı üreyebilen ve kolonileri altın sarısı renginde olan bakterilerdir. Kanlı agarda hemoliz yapan, birçok dış unsura dayanıklı, ısıya kısmen dirençli olan ve yüksek tuz içeren ortamlarda da üreyebilmektedir. *S. aureus* suşlarının optimum üremesi 30– 37 °C’ de iken gelişme sıcaklıkları 6-46 °C arasındadır, toksin oluşturmak için ise istenen sıcaklıklar 10-48 °C arasındadır. pH olarak 7– 7,5 aralığını tercih eder ancak pH 4-9,3 aralıklarında da gelişimini sağlayabilmektedirler.

Metisiline dirençli *S. aureus* hafif cilt infeksiyonlarından, ciddi yara infeksiyonlarına ve bakteriyemiye kadar değişen genişlikte klinik tabloya neden olabilen, humanoze ve zoonoz karaktere sahip bir bakteri tipidir (Anonim, 2005; CDC, 2008; Morgan, 2008). MRSA, infeksiyon kaynağına göre hastane ya da toplum kaynaklı olabilmektedir. Toplumdan köken alan MRSA (CA-MRSA), deri ve yumuşak doku infeksiyonlarının yanı sıra, artan oranda invaziv infeksiyonların nedeni olarak da karşımıza çıkmaktadır. Hastane kaynaklı MRSA (HA-MRSA) ise yıllardır yüksek mortalite ile seyreden infeksiyonların en önemli nedenleri arasında kabul edilmekte ve son yıllarda yapılan araştırmalar bu etkenler üzerinde yoğunlaşmaktadır (Mulligan, vd. 1993; Chambers, 1997; Fey, vd. 2003).

Metisilin (2,6-dimetoksifenil penisilin), stafilokokal beta laktamaz enziminin hidrolizine dirençli penisilin grubu antibiyotikler içerisinde ilk elde edilen ve ilk klinik kullanıma giren antibiyotik olarak bilinmektedir (Jevons, 1961; Enright, vd. 2002). *S. aureus*’ da metisilin direnci, penisilinaz üretiminden farklı bir mekanizma ile olur ve bakteri tarafından beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı düşük afiniteye

sahip yeni bir penisilin bağlayan protein (PBP) olan PBP2a sentezine dayanmaktadır (Mulligan, vd. 1993; Chambers, 1997; Berger-Bachi, vd., 2002; Hiramatsu, vd., 2002).

MRSA infeksiyonlarının ciddiyetini etkileyen ve tedaviyi güçleştiren en önemli faktör, metisilin direncinin yanı sıra, suşlarda gelişen çoklu antibiyotik direncidir. HA-MRSA infeksiyonları arasında ciddi seyirli ve ölümcül pnömoni ile bakteriyemi önemli yer tutmaktadır. CA-MRSA infeksiyonlarının yaklaşık %75' i genellikle deri ve yumuşak dokularda lokalize olup, tedaviye yanıt vermekle birlikte, bu türler hızlı yayılması ve hayati önem taşıyan organ ve sistemleri etkileyebilmesi ile HA-MRSA infeksiyonlarından daha ciddi bir klinik tabloya neden olabilmektedir. Son yıllarda, Panton-Valentine Lökosidin (PVL) genleri taşıyan CA-MRSA suşlarına bağlı ciddi nekrotizan pnömoni, sepsis, haşlanmış deri sendromu ve toksik şok sendromu da bildirilmiş (Zetola, vd., 2005), PVL geni pozitif CA-MRSA' ya bağlı infeksiyonlarda ölüm oranının %35' e ulaştığı belirtilmiştir (David, vd., 2010). Uygun antibiyotik kombinasyonlarının yapılamaması, tedavide gecikme ve bireylerde viral infeksiyon varlığı CA-MRSA infeksiyonlarının prognozunu olumsuz yönde etkilemektedir (Zetola, vd., 2005; David, vd., 2010). MRSA infeksiyonları, hayvanlarda da insanlardakine benzer klinik bulgularla ortaya çıkmaktadır. Besin zinciri yolu ile bu etkenler insana taşınacağından hayvanların sağaltımı da ayrı önem taşımaktadır (Baptiste, vd., 2005; Rich, 2005; Weese, vd., 2006).

Dünya' da hastane infeksiyonu etkenleri arasında önemli olan MRSA' lar, antimikrobiallere karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları nedeniyle son yıllarda önemi giderek artmıştır. Bu yüksek direnç hastalar için büyük risk oluşturmaktadır. Bunun sonucu olarak hastalar ya daha toksik ilaç alacaklar ya da ikinci bir ilaç almak zorunda kalacaklardır. Bu da maliyeti ve yan etkileri artıracaktır. MRSA infeksiyonlarının sağaltımında uygun antibiyotik seçimi büyük önem taşımakta, özellikle bakterisid etkili antibiyotiklerin tercih edilmesi önerilmektedir. Bu kapsamda MRSA sağaltımında yeni antibiyotik arayışları büyük önem arz etmektedir. Bu çalışma konu üzerindeki eksik bilgiye katkı sağlamayı amaçlamaktadır.

1.2 *S. aureus*' un Virulans Faktörleri

S. aureus' un virulansı sadece antibiyotiklere geliştirdiği dirençten kaynaklanmaz bundan başka çok sayıda virulans faktörü bulunmaktadır. *S. aureus*' un virulansını belirleyen diğer faktörler ekzotoksin ve enzimler gibi ekzoproteinlerin bir grubunun salgılanmasıdır, bunlar nükleazlar, proteazlar, lipazlar, hiyaluronidaz ve kollajenazdır (Dinges, vd., 2000).

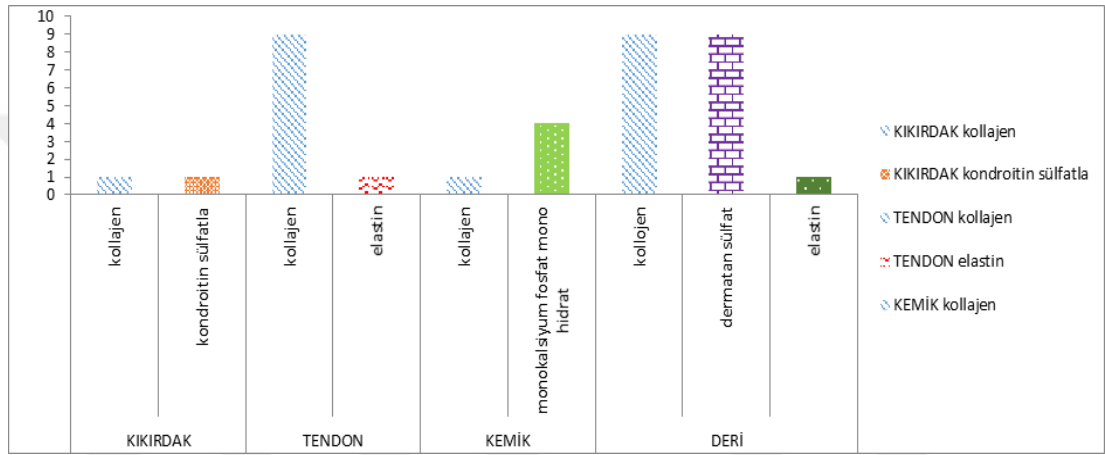
1.2.1 Proteazlar

Hidroliz reaksiyonları, hücre metabolizmasında büyük öneme sahiptir. Bu reaksiyonların katalizlenmesinden proteaz enzimi sorumludur. Proteazlar, polipeptit ve protein zincirlerinin hidrolizlenmesinden sorumlu, proteinaz veya peptidaz olarak da adlandırılabilen enzimlerdir. Proteazlar, besinlerle alınan proteinin, polipeptit zincirlerindeki amid bağlarını hidrolizleyerek parçalarlar. Proteazlar, sindirim sisteminde bol miktarda yer almasından dolayı ilk keşfedilen enzimlerdendir. Proteazlar Ekzopeptidazlar (E.C.3.4.21-99), Aminopeptidazlar (E.C.3.4.11), Dipeptidil peptidaz (E.C.3.4.14), Tripeptidil Peptidaz (E.C.3.4.14), Karboksipeptidaz (E.C. 3.4.16-3.4.18), Serin tip proteaz (E.C. 3.4.16), Metallaoproteaz (E.C. 3.4.17), Sistin tip proteaz (E.C 3.4.18), Peptidil dipeptidaz (E.C. 3.4.15), Dipeptidaz (E.C.3.4.13), Omega Peptidaz (E.C. 3.4.19) olarak sınıflandırılmaktadır (Rao, vd., 1998).

1.2.2 Kollajen ve kollajenaz

S. aureus tarafından üretilen önemli bir proteaz olan ve kollajeni degrades eden enzime kollajenaz adı verilmektedir. Ökaryot canlı hücrelerinin birbirlerine bağlanması olayına hücre adezyonu denir. Hücreler ya hücre-hücre adezyonu ya da hücre bağlantısı için fizyolojik bir çatı sağlayan hücre dışı komponentlere bağlanırlar. Bu hücre dışı komponentlere hücre dışı matriks (ekstracellular matriks-ECM) denir. Hücre adezyonu ve ECM birlikteliği, doku morfolojik ve fizyolojik gelişimi ile muhafazası için son derece elzemdir. Matrikste veya adezyonda gerçekleşen anormallikler doku işleyişini bozar ve insanda hastalıklara neden olur. Kollajen, ECM' de en çok bulunan proteindir (Anonim, 2018). Kollajen tendon, kıkırdak, kemiklerin organik matriksi ve gözün korneasında bulunan basit, fibriler skleroproteindir. Memeli hayvanların vücut ağırlığının %6' sını, tüm vücut

proteinlerinin %30' unu oluşturmaktadır. Kollajen, dokuların dayanıklılığını sağlar, şekillerini korur ve dokuya gerilme direnci sağlar. Kollajen, aynı zamanda kanın pıhtılaşmasında rol oynamaktadır. Trombin proteiniyle etkileşime girerek yarayı kapatır, kan pıhtısı zamanla büzüldüğü halde kollajen yaralı doku üzerinde yeni bir hücre tabakası oluşuncaya kadar yarayı örtmektedir. Kollajenin dokulardaki oranı Şekil 1' de özetlenmiştir (Altınışik, 2018).



Şekil 1 Kollajenin dokulardaki oranı

S. aureus' un virulans faktörlerinden bazıları protein yapıdadır ve hücre duvarı yapısını oluşturan peptidoglikana bağlı olarak bulunurlar. Bu proteinler bakterinin, IgG ve fibrinojen gibi kan proteinlerine veya fibronektin ve kollajen gibi ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanmasını sağlamaktadır. Bu tip hücre dışı matriks proteinlerine bağlanan yüzey adezinlerine, adezif matriks moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey elemanları (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules; MSCRAMM) denmektedir. *S. aureus*' un yapışkan yüzey proteinlerinin amacı için iki olası görevi olduğu düşünülmüştür. Bunlardan ilki bakterinin kan veya doku komponentleri ile kaplanarak bağışıklık sisteminden kaçmasını sağlamak, ikincisi ise dokuya bağlanmasını kolaylaştırmaktır (Langevelde,1998; Bien, vd. 2018).

Hemen hemen bütün *S. aureus* suşları, ekzotoksinler, nükleazlar, proteazlar, lipazlar, hiyalüronidaz ve kollajenaz gibi ekzoproteinler oluştururlar. Bu proteinlerin ana işlevi, lokal olarak konakçısı olduğu dokuda bakteriyel büyüme için gerekli besinler ve tutunma için yüzey oluşturmaktır (Dinges vd., 2000; Vijayakumar vd., 2017).

Kollajenazlar, matriks metalloproteinazlardan olup, fibrillar kollajenin yıkılmasından sorumlu en önemli enzimlerdir (Madlener, 1998). Matriks metalloproteinazların varlığının olduğu patolojik hastalıklar kanser ve damar sertliği başta olmak üzere artrit, nefrit, gastrointestinal ülser, peridontal hastalık, kornea ülseri, deri ülseri, multipl skleroz, nörolojik hastalık, Alzheimer, karaciğer fibrozu, fibrotik akciğer hastalığı, amfizem, kan beyin bariyerinin yıkılmasıdır (Lambert vd., 2004). Matriks metalloproteinazlar yapılarına, molekül ağırlıklarına veya substrat özgüllüğüne göre sınıflandırılmaktadır. Kollajenaz sağlam fibriler kollajeni, jelatinaz ise denatüre kollajeni (jelatin) ayrıca metalloelastaz ise elastini yıkıma uğratar. Matriks metalloproteinazlar genellikle çoklu substratları yıkar. Yeni üyelerin katılımı ile sürekli genişleyen bu enzim ailesinin bugüne kadar klonlanmış ve sekanslanmış 66' dan fazla üyesi bulunmaktadır (Jones vd., 2003). Bu üyeler substrat özgüllüklerine göre kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilizinler, membran tipi matriks metalloproteinazlar ve diğerleri olmak üzere altı alt grupta toplanmışlardır (Visse vd., 2013; Nissinen ve Kahari, 2014).

Bakteri ayrıca farmakötikal ve tarım endüstrisinde önemli rolleri olan proteazları da üretmektedir. Bunlardan bazıları trombin, kollajenaz, katepsin, elastaz ve kimotripsindir. Proteazlar çok sayıda patolojik sürecin içinde aktif rol oynamaktadırlar. Artrit, tümör oluşumu, metastaz, infeksiyonlar ve dejeneratif hastalıkların bir ya da daha fazlasının proteolitik enzim katılımı sonucunda ortaya çıktığı vurgulanmaktadır (Brown, 1994). Mikrobiyal proteazlar, en önemli hastalık oluşturma faktörlerinden biri olarak rapor edilmektedir (Jones, 1997). Çalışmada kullanacağımız *S. aureus*' un proteaz aktivitesinin olduğu bilinmekte ve büyük proteolitik enzimler salgılamaktadır, bunlar aureolisin, serin glutamil endopeptidaz (bir serin proteazdır), stafofain ve sistein proteazdır (Arvidson, 2000). Serin proteazın fibrinojen-bağlı proteini ile yüzey proteini A' yı etkili bir şekilde

parçaladığı gösterilmiştir (McGavin, vd., 1997; Karlsson, vd., 2001). Aureolisin ise yüzey ile ilişkili kümelenme faktörünün ayrılmasından sorumludur (McAleese, vd., 2001). Bakteri, insan veya hayvan kanını varfarin, heparin, hirudin veya kalsiyum şelatörleri gibi koagülasyon inhibitörlerinin varlığında pıhtılaştırabilir (Much, 1908).

Bakterinin kalp kapakçığı yüzeyinde trombositler ile etkileşimi sonucunda *in vivo* ciddi sorunlar ortaya çıkmaktadır, örneğin bakterinin hem tutunma hem de trombositleri çöktürme yeteneği ile endokarditis ortaya çıkmaktadır (Herzberg, 1983; Herzberg, 1990). Bununla birlikte son yıllarda bakteri-trombosit etkileşimleri konağın bir savunma mekanizması olarak önerilmekte, bu mekanizma kalp kapakçığı-tutunan organizmalar trombosit mikrobisidal proteinin uyardığı trombinin lokal olarak elenmesi yoluyla eradike olabilir (Dankert, 1988). Memeli trombositleri katyonik antimikrobiyal peptidlerin (CAPs) bir kısmını ayırır, bunlara trombosit mikrobisidal proteinler (PMPs) adı verilir, bunlar *S. aureus*' u da kapsayan önemli kan-bozan patojenleri öldürmektedir (Wu, vd., 1994; Yeaman, vd., 1997; Bayer, vd., 1998; Yeaman, vd., 1998; Bayer, vd., 2000). Şimdiye kadar en iyi karakterize edilen PMP trombin-uyaran PMP-1' dir, yaklaşık 8 kDa' luk peptid, zarar görmüş veya infekte olmuş endovasküler yüzeylerde fizyolojik olarak stimule olan yanıtta görülür (Koo, vd., 1996a; Koo, vd., 1996b; Yeaman, vd., 1998; Koo, vd., 1999; Xiong, vd., 1999; Xiong, vd., 2002). PMP-1 infektif endokarditis gibi endovasküler infeksiyonlara karşı konağın yanıtında anahtar rol oynamaktadır (Wu, vd., 1994; Dhawan, vd., 1997; Yeaman, 1997; Fowler, vd., 2000; Kupferwasser, vd., 2002).

1.3 Biyofilm

Biyofilm, herhangi bir canlı veya cansız materyal yüzeyine yapışarak kendisinin oluşturduğu organik bir madde olan ekzopolisakkarid matriks içine gömülü ve aynı zamanda hareketsiz bir biçimde birbirlerine, bir yüzeye veya bir ara yüzeye tutunmuş halde varlığını sürdüren mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur (Gündoğan ve Ataol, 2012). Biyofilm, mikroorganizmaları konakçısı olduğu canlının savunma hücrelerinden, antibiyotiklerden, kimyasallar ve yüzey dezenfektanlarından koruyan ekzopolisakkarit yapıda bir bariyerdir (Cucarella vd., 2004). İnfeksiyona sebep olan bu mikroorganizmaların, konakçısı olduğu canlının içerisinde veya konakçının

yaşadığı çevrelerde biyofilm üretebilmeleri de enfeksiyonun tedavisini oldukça güçleştirmektedir (Wilkins vd., 2014).

Biyofilm, bakterilerin açlık ve kuruma gibi zorlu çevresel koşullara dayanmasına sağlar ve geniş bir yelpazede kronik hastalıklara bu sayede neden olurlar. Bu nedenle, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda kalıcı nozokomiyal enfeksiyonların ana nedeninin bu olduğu düşünülmektedir (Singh vd., 2000; Davies, 2003). Nozokomiyal enfeksiyonların yaklaşık % 50' si kateter, kalp pili, eklem protezleri, protezler, prostetik kalp kapakçıkları ve kontakt lensler ve benzerleri gibi medikal tedaviler amacıyla kullanılan kalıcı cihazları kullanan hastalarla sınırlıdır (Piozzi vd., 2004; Wu vd., 2015). Bu yabancı cisimler, bakteri hücrelerinin eklenmesi için ideal bir yüzey sağlar. Böylece implantların varlığında biyofilm oluşumunda önemli bir artış gözlenmiştir (Donelli, 2001). Biyofilmler istilacı bakterileri, konakçının bağışıklık sistemine karşı, fagositlerin ve immün sistemin bozulmuş aktivasyonu yoluyla korurlar ve aynı zamanda, konvansiyonel antibiyotiklere karşı direncini de yaklaşık bin kat artırırlar (Roy vd., 2018).

Biyofilm gibi hücre dışı salgıların stafilokokların patojenitesiyle ilişkisi olduğu varsayılmakta ve stafilokokların identifikasyonunda da kullanılan virulans faktörlerinden biridir (Sneath, 1986). *Staphylococcus* cinsi bakterilerin biyofilmleri, insanlarda cerrahi operasyonlar sırasında ve implantların uygulanmasına bağlı olarak ciddi hastalıklara neden olan etkenlerdir (Cucarella vd., 2004; Schlegelova vd., 2008). Kronik enfeksiyonlarda biyofilmlerin etkisi, biyofilm oluşumunda rol oynayan genlerin karakterizasyonuna ilgiyi arttırmıştır. *S. epidermidis* ve *S. aureus*' ta bulunan bir operon olan *icaADBC* gen dizisi, lineer β -1-6- N-asetil glukozaminin uzantısına bağlanarak proteinleri kodlar ve biyofilm oluşumuna katılır (PIA / PNAG olarak adlandırılır) (Cucarella vd., 2004).

Antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra bazı doğal ürünlerin özütleri biyofilmin oluşmasını engellediği bilinmektedir. Ancak yaygın olarak kullanılmakta olan antimikrobiyal maddelere karşı biyofilm içerisinde yaşayan bakteriler, yaşamayanlara göre çok yüksek oranda direnç göstermektedir. Bu durumun nedenleri arasında şunlar bulunmaktadır; konakçısının içerisinde veya ortamında mikrobiyal kolonizasyon ile birlikte hücre dışı polimerik bileşenlerin çok yoğun bir şekilde

üretilmesi, antimikrobiyal ajanların penetrasyonunun azalması, biyofilm içerisindeki bakterilerin olası sinerjistik etkileşimleri, antimikrobiyal dirençlilik determinantlarının yatay gen aktarım mekanizmaları, genotipik ve fenotipik çeşitliliğin artmasıdır (Carson, 2009).

Enfeksiyon hastalıklarının sağaltımında biyo-filmlerin yeri çok yeni olduğundan farmakolojik olarak geliştirilmiş ve özgün bir biçimde biyo-filmleri temel alan antimikrobiyal bir ajan henüz bulunmamaktadır. Bunun dışında mevcut birçok antimikrobiyal ajana karşı mikroorganizmaların direnç göstermesi, prosedürlerden ötürü yeni antibiyotiklerin piyasaya sürülmesindeki kısıtlayıcı koşullar, antimikrobiyal moleküllerin geliştirilmesinin yanında, antibiyofilm stratejilerinin de geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır (Karaca vd., 2017).

Antimikrobiyal ajanların etkinliği nedeniyle, günümüzde çoklu ilaca direnç geliştiren patojenlerin prevalansında azalma görülmektedir (Wu, 2004). Ancak yine de direnç geliştiren bakterilerde ki bu mekanizmalardan bir diğeri de mikroorganizmanın belirli bir yüzeye bağlanmasıyla ekzopolisakkarit oluşumu ve bir matris içinde gömülü olarak katmanlar (biyofilm) oluşturmasıdır (Donlan, 2002). Günümüzde *S. aureus*' un çeşitli yüzeylere yapışabilme ve biyofilm oluşturabilme yeteneğinin olduğu bilinmektedir. Bakterinin biyofilm oluşturması *icaADBC* gen lokusunun kodladığı polisakkarit interselüler adhesin' in (PIA) en önemli rolü üstlendiği gösterilmiştir (Donlan ve Costerton, 2002; Arciola, vd., 2015). Bu nedenle, biyofilm ilişkili enfeksiyonları kontrol etmek için alternatif tedavi edici yöntemleri araştırmak büyük önem arz etmektedir.

Birçok bitki içerdiği bileşiklerden dolayı ilgi çekmekte (Liu, 2005) ancak az sayıda bitki antibiyofilm özelliği göstermektedir (Gowrishankar, 2012). Tıbbi bitkiler antimikrobiyal ajanların zengin bir kaynağı olarak bilinmekte olup, birçok bitki sentezledikleri sekonder metabolitler nedeniyle antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılmaktadır (Srivastava, vd., 1996). Yeni aktif maddelerin araştırılması, ilaç endüstri için bitkisel moleküllerin veya bitkilerin üretiminin geliştirilmesi için tıbbi bitkiler üzerindeki çalışmaların hızla artmasına neden olmuştur (Poutaraud, vd., 2005). Bitki uçucu yağları ve özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi ham ve işlenmiş olarak bazı merhemlerin, besin koruyucuların, farmasotiklerin, alternatif ilaç ve doğal terapilerin temel bileşenini oluşturmaktadır

(Hammer, vd., 1999; Digrak, vd., 2001; Poyrazoglu, vd., 2009; Karatas ve Ertekin, 2010). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tıbbi bitkilerin ilaçların en iyi kaynağı olduğunu bildirmekte, bununla birlikte bu bitkilerin güvenliği, etkileri ve özellikleri için daha fazla araştırılmasının zorunlu olduğunu bildirmektedir (Nascimento, vd., 2000). Bu çalışmada kullanacağımız bitkiler hakkında kısa bir bilgi aşağıda özetlenmektedir.

1.4 Bitkiler

1.4.1 *Trigonella foenum-graecum* L. (çemen otu)

Leguminosae (Fabaceae) familyasından olan *Trigonella foenum-graecum* L. ülkemizde Çemen otu olarak, diğer ülkelerde ise, fenugrec (Fransa), fieno greco (İtalya) alholva, feno-greco (İspanya), Helba (Arapça), Methi (Hindistan, Pakistan) olarak bilinmektedir (Suttie, 2016). Özellikle Hindistan boyunca yetiştirilmekte ve tohumları baharat, yaprakları ise sebze olarak kullanılmaktadır (Sharma, 1996; Vats, 2002). Bitkinin tohumları gitogenin ve trigogenin, A vitamini, tannik asit, sabit ve uçucu yağlar, diosjenin, alkaloidler trigonellin, trigokumarin, trigometil kumarin ve steroid saponin içermektedir (Jayaweera, 1981; Petit, 1995). Diyabet tedavisi için geleneksel bir ilaç olarak kullanılmaktadır (Basch, vd., 2003). Çemen otunun hipoglisemi (Menczel, 1963; Ribes, vd., 1986; Sharma, 1986), hiperkolesterolemi (Ajabnoor ve Tilmisany, 1988), antioksidan (Srinivasan, 2006; Khalaf, 2008) ve antimikrobiyal (Wagh, 2007) gibi birçok alanda önemi kanıtlanmıştır.

1.4.2 *Capparis spinosa* L. (kebere)

Capparidaceae, Akdeniz bölgesinin yerli bitkisidir, Kanarya Adaları Atlantik kıyıları, Fas, İspanya, Fransa, İtalya, Yunanistan, Kıbrıs, Türkiye ve İran' ın bir kısmında doğal olarak yetişmektedir (Zohary, 1960). *Capparis spinosa* Çin mutfağında yaygın olarak kullanılmakta olan aromatik bir bitki olup, aynı zamanda dondurulmuş gıda olarak ta ticari öneme sahiptir (Maria, vd., 2002). Yapılan çalışmalarda bitkinin alkaloidler, lipidler, flavonoidler ve glukozinolatlarla sahip olduğu bildirilmiştir. Doğal aroma bileşikleri, kanser önleyici maddeler olarak ve biopestisid, şişkinlik azaltmak ve anti-romatizmal olarak diüretikler, böbrek dezenfektanı ve damar sertliği

için halk terapisinde kullanılmaktadır (Brevard, 1992; Proestos, vd., 2006; Mahboubi, 2014). Bu bitkiye antioksidan özellikleri kazandıran etkili madde sayısının on kadar olduğu rapor edilmektedir. Diğer bitkiler ile karşılaştırıldığında bu sayının çokluğu kebere bitkisinin rakipsiz olduğunu göstermektedir (Söyler, 2016). 2014 yılında *S. aureus* dahil 12 bakteri ve 5 fungal mikroorganizmaya karşı inhibe edici etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Mahboubi, 2014).

1.4.3 *Picnoman acarna* (L.) cass. (kılıç diken)

Ülkemizde çadır diken olarak bilinmekte olan Asteraceae familyasından olan *Picnoman acarna*, Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Orta Asya ve Avustralya dahil pek çok bölgede dağılım gösteren bir bitkidir (Sargın, 2013; ITIS, 2014). Tek yıllık, otsu formda gelişme gösteren bitki garik, çakılsı, boş alanlar ve yol kenarlarında 100 m' den 1600 m' ye kadar olan habitatlarda yetişmektedir. Yapılan fitokimyasal araştırmalarda yapısında flavonoid, glikozit, 5,4'-dihidroksi-6-metoksiflavon-7-0-a-L-ramnopiranosid-III ile birlikte pektolarin, linarin, gentisik asit 5-O-glukopiranosid, homoplantagin, hiperin, hispidulin, luteolin, kuersetin ve 6,7,8-trimetoksikoumarin bulunmuştur (Laskaris, 1995). Yapılan bir çalışmada tümör nekrosis faktör-alfa'nın (TNF-a) inhibe edilmesinde etkin olduğu, antikonvülsan etkisinin varlığı (Chauhan, 1988; Bremner, 2009) rapor edilmektedir. Yöresel olarak ise hazımsızlık, gastrit ve mide rahatsızlıklarında kullanılmaktadır (Ghasemi, 2013).

1.4.4 *Pistacia terebinthus* L. subsp. *terebinthus* (menengiç)

Pistacia terebinthus (Anacardiaceae), çitlembik ağacı, menengiç adı ile anılan, küçük bir ağaç ile bir çalı büyüklüğü arasında değişen büyüklükte (yaklaşık 2-6 m), yaygın olarak Orta Doğu ve Güney Avrupa' da yayılış gösteren bir bitkidir. Meyve küresel, panukulat veya geniş obovat şekilli, yaklaşık boyutu 5-6 × 4-6 mm'dir. Türkiye' de oldukça yaygındır (Davis, 1967). Meyve binlerce yıldır Türkiye' nin güneyinde diyetlerde ve mezelerde kullanılmıştır. Bitkinin içeriğinin tanin, reçineli maddeler ve aromatik özellikleri bakımından zengin olduğu bilinmektedir (Baytop, 1984a). Menengiç aperatif yiyecek ve kahve gibi içecek olarak tüketilir (Durmaz, 2011). Ülkemizde halk sağlığında yanıkların tedavisinde, solunum ve üriner sistem

hastalıklarında, astım tedavisinde, anti-enflamatuvar ve antipiretik olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1984b). Doymamış yağ asitleri, tokoferoller, polifenoller ve karotenoidler açısından zengin olan bir bitkidir (Durmaz, 2011). Bitkinin meyve özleri flavonoidler, apigenin, luteolin, luteolin 7-O-glukosid, kuersetin ve kaempferol bulunmuştur. Sekonder bileşikler açısından zengin olduğundan yüksek antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuvar ve sitotoksik özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir (Abdel-Rahman ve Soad, 1975; Iauk vd., 1996; Magiatis vd., 1999; Topçu vd., 2007; Kavak, 2010).

1.4.5 *Vitex agnus-castus* L. (hayıt)

Vitex agnus castus (VAC) Lamiaceae familyasından olup, Akdeniz, Avrupa ve Orta Asya'ya özgü, yaprak dökken çalı formunda bir bitkidir. Geleneksel olarak VAC meyve özü, adet bozuklukları da dahil olmak üzere, adet öncesi sendrom (PMS), corpus luteum yetmezliği, hiperprolaktinemi, kısırlık, akne, menopoz, emzirme bozukluğu tedavisinde kullanılmaktadır. Anadolu'da halk sağlığında VAC diüretik, sindirim, mantar önleyici, anksiyete, erken doğum ve karın ağrılarında kullanılmaktadır (Baytop, 1984; Honda, vd., 1996; Claudia, vd., 2005). Özellikle Akdeniz olmak üzere Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da yaygın olarak yetişir (Gardiner, 2000). VAC iridoid glikozitler (Hänsel, 1959; Gomaa, vd., 1978; Görler, 1985), flavonoidler (Sirait, 1962; Hänsel vd., 1963; Gomaa vd., 1978; Wollenweber, 1983; Hirobe, 1997; Hoberg, 2001; Arokiyaraj, 2009), fenolik bileşikler (Yaşar, vd., 2016), uçucu yağlar (Stojković vd., 2011), terpenoidler, steroidler ve karbonhidratlar (Arokiyaraj, 2009) ihtiva etmektedir. Hayıt bitkisi Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), Gram negatif karbapenem dirençli *Acetobacter baumannii*, siprofloksasin dirençli *Escherichia coli* ve *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* Typhi, *Enterococcus durans*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakteriler üzerindeki etkisi incelenmiş olup, en fazla etkiyi MRSA üzerinde göstermiştir (Ekundayo, 1990; Arokiyaraj, 2009; Ghannadi, 2012). Bitki ile yapılan antioksidan aktivite çalışmaları sonucunda olumlu sonuçlar alınmıştır (Sağlam, 2007; Makhmoor, 2010).

1.4.6 *Momordica charantia* L. (kudret narı)

Momordica charantia bitkisi acı kavun, karela, balsam armut, ya da acı kabak olarak da bilinmektedir. Asya, Güney Amerika, Hindistan, Karayip Doğu Afrika' da yerli halk arasında diyabete bağlı durumların tedavisinde kullanılan popüler bir bitkidir (Cefalu, 2008; Cousens, 2008). Cucurbitaceae familyasından olan bitki, diyabet tedavisi için yetiştiği tüm bölgelerde halk sağlığında kullanılmaktadır (Abascal, 2005). Genellikle 5 metreye kadar büyüeyebilen, tırmanıcı ve çok yıllık bir bitkidir (Lee, 2009). Bitkinin ana bileşenleri triterpen, steroid, alkaloid, inorganik maddeler, lipid ve fenolik bileşiklerdir (Budrat, 2008; Saeed, vd., 2010). Bitki alkaloidler, karantin, şarin, kriptoksantin, kukurbitin, kukurbitasinler, kukurbitan, sikloartenol, diosgenin, elaeostearik asit, eritrodiol, galakturonik asit, gentsik asit, goyaglikosidler, goyasaponinler, guanilat siklaz önleyicileri, gipsojenin, hidroksitriptaminler ve daha birçok bileşik içermektedir. Meyve pulpunda serbest pektik asidi vardır (Kumar, vd., 2010). Geleneksel olarak antidiyabetik, antikanser, anti-inflamasyon, antivirüs ve kolesterol düşürücü etkileri bilinmektedir. Ayrıca antioksidan ve antimutajen olarak potansiyele sahip olabilecek birçok fenolik bileşik ihtiva etmektedir (Budrat, 2008; John, vd., 2010; Ozusaglam, 2013). Yaprak özütlerinin geniş spektrumlu antibakteriyel etki gösterdiği yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır (Khan, vd., 1998; Bracaa, vd., 2008; Ozusaglam, 2013; Ghosh, 2014).

Bu çalışma konusunda, metisilin dirençli *S. aureus* bakterisine karşı bazı bitkilerin antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi ve yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip bitkilerden inhibitörlerin kazanılarak ve bu inhibitörlerin ilaç sektöründe rol oynayan önemli bazı proteazların farklı sınıfları ile ilişkisinin test edilmesi amaçlanmıştır. Çalışma bu konuda ki bilgi eksikliğine katkı sağlamayı amaçlamıştır. Bundan başka bitkilerin bakterinin oluşturduğu biyofilme karşı antibiyofilm etkilerinin de belirlenmesi amaçlanmış ve çok sayıda virulans faktörüne karşı elde edilen bilgi ile literatüre katkı sağlanması da hedeflenmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Organizma

Çalışmada kullanılan bakteri, Refik Saydam Hıfzısıhha Kültür Koleksiyonundan (Ankara) temin edilmiş *Staphylococcus aureus* RSKK 2392 suşudur. Bakterinin gelişimi 24 saat, 37 °C' de Nutrient Broth (NB; Merck) besiyortamında inkübe edilerek sağlanmıştır.

2.2 Bitki materyalleri

Bitki materyalleri 6 adet olup bunlar; *Trigonella foenum-graecum* Kastamonu ili Doğanyurt ilçesinden; *Capparis spinosa*, *Picnomon acarna*, *Pistacia terebinthus*, *Vitex agnus-castus*, Akyaka-Akbük hattından, *Momordica charantia* Muğla civarından Nisan 2018 tarihinde toplanmıştır. Tüm bitkilerin teşhisleri Dr. Olcay Ceylan tarafından yapılmış olup, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Türkiye herbaryumunda saklanmıştır. Bitki materyallerinin identifikasyonları Davis 'e göre yapılmıştır (Davis, 1965).

2.3 Araç, Gereç ve Kimyasal Maddeler

Araştırmada Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyal Biyoteknoloji Laboratuvarındaki araç, gereç ve kimyasal maddeler kullanılmıştır. Tüm kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, çalışmada kullanılan kimyasallar aşağıda belirtildiği gibidir. Mueller Hinton Broth (Merck), Mueller Hinton Agar (Merck), Metanol (Merck), Etanol (Sigma), Amoksisillin (Oxoid), Trimethoprim/Sulfametoksazol (Bioanalyse), Metisilin (Bioanalyse), Oksasilin (Bioanalyse), Penisilin (Bioanalyse), Tetrasiklin (Bioanalyse), Gentamisin (Bioanalyse), Eritromisin (Oxoid), Streptomisin (Oxoid), Kloramfenikol (Oxoid), Sodyum Hidroksit (Sigma), Sodyum Klorür (Sigma), Hidroklorik Asit (Merck), Amonyum Sülfat (Sigma), Trsi-Hcl (Multicell), Trikloroasetik Asit (Merck), Blank Disk (Bioanalyse), Brain Heart Infusion (LAB), Kristal Viyole (Merck), Asetik Asit (Sigma), Folin-Ciocalteau Fenolik Reaktif (Carlo Erba), Kazein (Sigma), Thrombin

(Sigma), Jelatin (Sigma), Bakır Sülfat (Merck), Sodium Karbonat (Merck), Sefadeks G-100 (Sigma).

Çalışmada kullanılan aletler ise aşağıdaki gibidir. İnkübatör (Nüve, USA), çalkalamalı inkübatör (Daihan, G. Kore), blendır (Fakir, Almanya), terazi (Seles, Türkiye), soksalet (Isotex, Hindistan), çeker ocak (Broen, Türkiye), mikroplate okuyucu (Optizen, G. Kore), spektrofotometre (Optizen, G. Kore).

2.4 Kültivasyon

2.4.1 Antibakteriyel aktivite için bakterinin kültivasyonu

Çalışmada kullanılan *S. aureus*, Mueller Hinton Broth (MHB; Merck) içeren plaklarda $37 \pm 0,1$ °C' de 24 saat kültive edilerek çalışmalar için aktif hale getirilmiştir.

2.4.2 Hücre dışı proteaz enziminin eldesi için bakterinin kültivasyonu

S. aureus aktif kültüründen 200 ml alınarak, 2 litre Mueller Hinton Broth besiyerinde aseptik şartlarda inokülasyonu yapılmış ve 37 °C sıcaklıkta 24 saat süre ile çalkalamalı inkübatörde (Daihan, G. Kore) (250 rpm) gelişimi sağlanmıştır. Hücre dışı proteaz kaynağı olarak kullanılacak bu kültür ekstraksiyon işlemi için hasat edilmiştir.

2.4.3 Antibakteriyel aktivite çalışmaları için bitki ekstraksiyonu

Çalışmada kullanılan bitkiler 2-3 kez akan suda ve bir kez de steril damıtık suda yıkanmıştır. Taze bitkinin organları havada kurutulmuş ve daha sonra kuru kısımlar blendırda (Fakir) mekaniksel olarak parçalanarak toz haline getirilmiştir. Tüm materyaller örnek hazırlanmasına kadar oda sıcaklığında ve güneş almayan alanda depolanmış, daha sonra analiz için ihtiyaç duyuluncaya kadar 4 °C' de saklanmıştır. Havada kurutulmuş ve toz haline getirilmiş bitki organları 50 g olarak tartılmış (Seles, Türkiye) ve bu bitki örnekleri soksalet aparatına (Isotex, Hindistan) yerleştirilmiş ve ayrı ayrı metanol, etanol ve su çözücülerine (250 mL) konularak 4 ila 8 saat süre ile ekstrakte edilmiştir. Çeker ocakta (Broen, Türkiye) çözücüsü uçurulan özütler her biri kendi çözücüsünde steril falkon tüpler içerisine alınmış ve

kullanılmaya kadar buzdolabı şartlarında korunmuştur. Tüm özütlerin stok konsantrasyonları 250 mg/ml olarak ayarlanmıştır.

2.5 Analiz Yöntemleri

2.5.1 Organizmanın antibiyotik duyarlılık testi

Organizmanın antibiyotik hassasiyet testi, ticari antibiyotik diskleri kullanılarak disk difüzyon metodu ile Mueller Hinton Agar (MHA) besiyetinde yapılmıştır (Bauer ve Kirby, 1966; EUCAST, 2014). Organizmanın gelişim turbiditesi 0,5 McFarland' a ayarlandıktan sonra testlere tabi tutulmuşlardır. Kullanılan ticari antibiyotikler; amoksisilin (25 µg), trimetoprim/sulfametoksazol (1,25 / 23,75 µg), metisilin (5 µg), oksasilin (1 µg), penisilin (10 µg), tetrasiklin (10 µg), gentamisin (10 µg), eritromisin (15 µg), streptomisin (10 µg) ve kloramfenikol' dür (30 µg). MHA üzerinde geliştirilen aktif kültürün üzerine ticari olarak temin edilmiş referans antibiyotikler aseptik şartlarda eklenmiş ve 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonrası her diskin etrafındaki inhibisyon zon çapları mm cinsinden kayıt altına alınmıştır.

2.5.2 Bitkilerden proteaz inhibitörünün ekstraksiyonu için uygun çözücünün seçilmesi

Proteaz inhibitörünün maksimum ekstraksiyonunu sağlayacak uygun solüsyonun belirlenmesi için, farklı solüsyonlar ile bitkilerin ham özütleri hazırlanarak optimize edilmiştir. Taze bitkilerden 25 gram alınmış ve sodyum klorürün (%15 w/v) (Wu ve Whitaker, 1990), sodyum hidroksit (0,2 w/v), hidroklorik asitin (0,05M) (Tawde, 1961), fosfat tamponunun (0,1M: pH 7) (Wu ve Whitaker, 1990) ve distile suyun 100 ml' inde çözündürülmüştür.

2.5.3 Bitkilerden inhibitörlerin kazanılması ve saflaştırılması

Bitki materyalleri yukarıda tarif edildiği şekilde uygun olarak kurutulup ve uygun çözücüsü içinde, bir elektrikli blender yardımı ile (100 mL' i içinde) bitki materyallerinin 25 gramı homojenize edilmiştir, daha sonra çalışma 500 mL' lik

erlenlere aktarılmıştır. Homojenat 30 dakika 150 rpm' de çalkalayıcı içinde oda sıcaklığında inkübe edilerek daha fazla karıştırılması sağlanmıştır. Daha sonra homojenat bir tülbent vasıtası ile filtre edilmiş ve filtrat 10000 rpm' de 15 dakika +4 °C' de santrifüj edilerek hücre artıkları uzaklaştırılmıştır. Tüm süreçler buzdolabı sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Hasat edilen süpernatant kademeli olarak amonyum sülfat (% 40, 60 ve 80) fraksiyonlarına tabi tutulmuştur. İşlem sonunda çökeltiler tekrar kazanılarak sodyum fosfat tamponu içinde tekrar süspanse edilerek proteaz inhibisyon aktivitesi belirlenmiştir. Aktivitesi olduğu bulunan fraksiyonlar daha sonra denemelerde kullanılmak üzere toplanmıştır. Toplanmış fraksiyonlar 0,2 M sodyum fosfat tamponu kullanılarak kapsamlı bir şekilde diyaliz edilmişlerdir. Diyalizatlar Sephadex G-100 kolonunda saflaştırılmıştır. Diyalizatın 10 ml' si Sephadex G-100 kolonuna yüklenmiştir. Bu işlem 0,5 M sodyum klorid içeren 0,5 M Tris-HCl tamponu ile ön-dengeleme yapıldıktan sonra 30 ml/h akış hızında aynı tampon maddesi ile elüe edilerek yapılmıştır. Daha sonra eluentler, aktivite denemelerinde kullanılmıştır (Pichare ve Kachole, 1996).

2.5.4 Bakterinin hücre dışı proteaz enziminin ekstraksiyonu

S. aureus' un hücre dışı proteazı Makino vd. (1981) tarafından tarif edilen yöntemle göre sağlanmıştır. *S. aureus* aktif kültüründen alınarak (200 ml) 2 litre Mueller Hinton Broth besiyerine inoküle edilmiş ve 37 °C sıcaklıkta 24 saat süre ile çalkalamalı inkübatörde (250 rpm) gelişimi sağlanmıştır. İnkübasyon sonunda kültür, oda sıcaklığında 10 dakika süre ile 9000 rpm' de santrifüjlenerek hasat edilmiş, daha sonra 0,22 µm' lik filtrelerden geçirilerek filtre edilmiştir. Süpernatant, +4 °C sıcaklık altında bir örnek şişesinde depolanmıştır. Çalışmalar sırasında filtre edilen bu solüsyonlardan (0,5 mL) alınarak ve 1,5 mL' lik fosfat tamponu- tuz tamponu içindeki substrat ile pH 7,2 ve 37 °C' de 2 saat inkübe edilmiştir. Trikloroasetik asit ile reaksiyon durdurulduktan sonra süpernatantların absorbans değerleri şahide karşı okunmuştur ve standart eğriden yola çıkılarak hücre dışı proteaz aktivitelerinin hesaplamaları yapılmıştır. Şahit olarak fosfat tamponu-tuz solüsyonu kullanılmıştır.

2.5.5 *In vitro* antibakteriyel aktivitenin saptanması

Antibakteriyel aktivite çalışmaları Kirby-Bauer metodu kullanılarak yapılmıştır. Bitki özütlerinin konsantrasyonları 250 mg/ml olarak ayarlanmış olup, disk difüzyon

yöntemi ile test edilmiştir. Çalışmada kullanılan organik çözücüler etanol, metanol ve sudur. Bakteri, Mueller- Hinton Agar plaklarında (MHA, Merck) 37 °C' de 24 saat inkübasyon ile geliştirilmiştir (Bauer, 1966). Çalışmalar için kültür Mueller-Hinton Broth besi ortamında 37 °C' de 24 saat geliştirildikten sonra bulanıklığı 0.5 McFarland' a ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml) ayarlanarak kullanılmıştır. Aktif test organizmasından 0,1 mL alınarak plaklara aseptik şartlarda inoküle edilmiştir. Boş disklere (6mm) (Bioanalyse) 30 µl bitki özütlerinden emdirildikten sonra plak yüzeyine aseptik şartlarda yerleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonrasında inhibisyon zon çapları mm cinsinden kayıt altına alınmıştır. Negatif kontrol olarak etanol, metanol ve su, pozitif kontrol olarak ise kloramfenikol (30 µg) ve penisilin (10 µg) antibiyotikleri kullanılmıştır. Denemeler üç tekrarlı ve paralel olarak gerçekleştirilmiş, elde edilen değerler ortalama olarak verilmiştir.

2.5.6 Bitki özütlerinin minimum inhibitör konsantrasyonlarının saptanması (MIC)

Çalışmada antibakteriyel aktivite olarak bitki özütlerinin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) değerleri saptanmıştır. MIC, sıvı dilüsyon metodu kullanılarak yapılmıştır. MIC değeri, inkübasyon sonrası gelişimi inhibe eden en düşük konsantrasyon olarak alınmıştır. Denemelerde kullanılan aktif kültürlerin bulanıklığı 0,5 McFarland' a ayarlanmıştır. Tüm denemeler 2 ml' lik Mueller-Hinton Broth besiyortamında gerçekleştirilmiştir. Antibakteriyel aktivite gösteren bitki özütlerinin minimum inhibitör konsantrasyonunu belirlemek amacı ile 13000; 6500; 3250; 1625; 812,5 µg/ml konsantrasyonlarında seri dilüsyonlar hazırlanmış ve bunların her birine aktif bakteri kültüründen eşit miktarda (100 µl) inokulasyon yapılmıştır. Tüm denemeler 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve bu süre sonunda MIC değerleri belirlenmiştir (Mazzanti vd., 2000; Devienne ve Raddi, 2002; EUCAST, 2014).

2.5.7 Bitki özütlerinin minimum bakterisidal konsantrasyonlarının saptanması (MBC)

MBC değeri, MIC değerleri belirlendikten sonra bulanıklık olmayan önceki 2. ve 3. tüplerden antibiyotiksiz besiyerine pasaj yapılmıştır ve % 99,9 üremeyi sonlandıran

en düşük özüt konsantrasyonu belirlenerek kayıt altına alınmasıyla saptanmıştır (Schwalbe, 2007; Battu, 2010; Omar, 2010).

2.5.8 Antibiyofilm denemeleri

Deneyde 96-gözlü düz dipli polistiren titre plakaları kullanılmıştır. Her oyuk 100 µl steril Brain Heart Infusion (BHI) Broth ve 50 µl gecelik kültür ile doldurulmuş ve ardından farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış bitki özütleri (13000; 6500; 3250; 1625; 812,5 µg/mL) 150 µl eklendikten sonra 37°C, 24 ile 48 saat kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda plakalar önce hafifçe fosfat tamponlu tuzlu su ile üç kez yıkanmış ve ardından iki kez distile su ile iyice yıkandıktan sonra, zayıf yapışan hücreler yapışmayan hücrelerden arındırılmıştır. Havada kurumaya bırakıldıktan sonra, yapışkan biyofilm üzerine % 0,4 (w/v) kristal viyole çözeltilisinden 200 µl eklenip 10 dakika bekletilmiştir (Saad, 2014). Mikroplate absorban okuyucusu (Optizen, G. Kore) ile 570 nm' de absorbanları (OD₅₇₀) ölçülmüştür.

Antibiyofilm sonucu hesaplaması aşağıdaki formülden yapılmıştır.

$$\text{Antibiyofilm aktivitesi} = [1 - (\text{OD}_{570} \text{ örnek} / \text{OD}_{570} \text{ kontrol})] \times 100$$

2.5.9 Proteaz aktivitesinin saptanması

0,1 ml ham enzim özütü 5 ml kazein çözeltisi (0,05 M Tris tamponu içinde pH 8'de % 0,6 w/v olacak şekilde) içine eklenerek 37 °C' de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon 0,11 M trikloroasetik asit (TCA), 0,22 M NaCl ve 0,33 M asetik asit ihtiva eden çözeltilerden (1:2:3) toplamda 5 mL ilave edilerek durdurulmuştur. Bulanık solüsyondan 5 mL alınıp filtre edildikten sonra, 1 ml alkali çözelti eklenip karıştırılmış, reaksiyon 10 dakika bekletildikten sonra Folin Ciocalteu fenolik reaktifinden 0,5 mL eklenmiştir. 30 dakika sonra 750 nm' de spektrofotometrede (Optizen, G. Kore) absorban değeri ölçülmüştür. Proteaz aktivitesi için standart olarak L-tirozin solüsyonu (0,20 mg/ml) kullanılmıştır. Proteaz aktivitesi birimi 37 °C sıcaklıkta 10 dakika içinde tirozinden 1 µmol üretmek için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanmış olup, spesifik aktivite µmol/dak/mg protein olarak ifade edilmiştir (Adeola, vd., 2012).

2.5.10 Bitki inhibitörünün proteaza inhibitör etkisinin saptanması

Bu işlem için 0,05 M Tris tamponu içinde kazein solusyonu (% 0,2-1 w/v) hazırlanmış olup, bu solusyona % 3,5' luk (w/v) bitki özütünden 0,1 ml (inhibitör olarak) ve ham proteaz ekstraktının 0,1 ml' sinin eklenmesi ile pH 8' de ve reaksiyon karışımı 10 dakika boyunca 37 °C sıcaklıkta inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon 0,11 M trikloroasetik asit (TCA), 0,22 M NaCl ve 0,33 M asetik asit ihtiva eden çözeltilerden, toplamda 5 mL ilave edilerek durdurulmuştur. Bulanık solüsyondan 5 mL alınıp filtre edildikten sonra, 1 ml alkali çözelti eklenip karıştırılmış, reaksiyon 10 dakika bekletildikten sonra Folin Ciocalteau fenolik reaktifinden 0,5 mL eklenmiştir. 30 dakika sonra 750 nm' de spektrofotometrede (Optizen, G. Kore) absorbans değeri ölçülmüştür. Çalışma inhibitörsüz olarak ta tekrarlanmıştır. Çalışmada fenilmetil sulfonil florid (PMSF) pozitif inhibitör olarak kullanılmıştır (Makino vd., 1981).

2.5.11 Bitki inhibitörünün trombine inhibitör etkisinin saptanması

Bu denemelerde 0,1 M Tris-HCl tamponu içinde (pH 7,5) 1 mg/ml trombin içeren stok solusyon hazırlanmış ve önce 10 µg/ml solusyondan 100 µl, saf inhibitor solusyonundan (0,27 mg/ml) 100 µl ile 37 °C' de 10 dakika ön-inkübasyona bırakılmıştır. Karışıma %1' lik (w/v) kazein solusyonundan 200 µl ilave edildikten sonra 37 °C' de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 2,5 ml alkali çözelti eklenip karıştırılmış, reaksiyon 10 dakika bekletildikten sonra Folin Ciocalteau fenolik reaktifinden 0,5 mL eklenmiştir. 30 dakika sonra 750 nm' de spektrofotometrede (Optizen, G. Kore) absorbans değeri ölçülmüştür.

2.5.12 Bitki inhibitörünün kollajenaza inhibitör etkisinin saptanması

Kollajenaza inhibitor aktivitesinin belirlenmesi amacı ile yapılan denemelerde, substrat olarak %1' lik jelatin kullanılmıştır. Soğuk deiyonize suda hazırlanmış 1 mg/ml kollajenaz denemeler için önceden hazırlanarak 0,27 mg/ml saf inhibitor ile kollajenazın 1 ml' si 37 °C' de 10 dakika ön- inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon karışımına %1' lik jelatinin 2 ml' si eklenmiş ve 37 °C' de 10 dakika daha inkübe

edilmiştir. Reaksiyon 0,44 M TCA kullanılarak sonlandırılmış ve ardından Folin Ciocalteau fenolik reaktifinden 0,5 mL eklenmiştir. 30 dakika sonra 750 nm' de spektrofotometrede (Optizen, G. Kore) absorbans değeri ölçülmüştür (Jan, 2001).

2.5.13 Toplam protein tayini ve standart eğrinin hazırlanması

Toplam protein miktarı Lowry ve arkadaşları (1951) tarafından tarif edilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada standart olarak bovin serum albüminin önerilen konsantrasyonları çalışılmıştır. Bu metod alkali bakır iyonu ile biüret reaksiyonu veren proteinlerin, daha ileri bir reaksiyonla içerdikleri tirozin ve triptofan kalıntılarının fosfomolibdik ve fosfotungustik asit reaktiflerini indirgemeleri esasına dayanmaktadır. Örnek ve standart tüplerine 1 ml protein çözeltisi ve standart çözeltiler, kör tüpüne de 1 ml saf su koyulmuştur. Tüm tüplere 3 ml C reaktifi eklenmiştir. Reaktiflerin içerikleri aşağıda verilmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra tüm tüplere 300 µl Folin-Fenol reaktifi vorteksenerek eklenmiştir. 45 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra absorbanslar 660 nm'de şahide karşı okutulmuştur. Şahit olarak fosfat tamponu-tuz solüsyonu kullanılmıştır.

A reaktifi	% 2 Na ₂ CO ₃	NaOH	% 0,16 Na-tartarat
B reaktifi	% 4 CuSO ₄ .5H ₂ O		
C reaktifi	100 oranında A reaktifi	1 oranında B reaktifi	

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. *Staphylococcus aureus*' un antibiyotik direnç profili

Staphylococcus aureus RSSK 2392'nin antibiyotik direnç profilini belirlemek amacı ile yaptığımız denemelerde 12 adet ticari referans antibiyotik kullanılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar incelendiğinde, bakterinin çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu saptanmıştır. Direnç belirlenen antibiyotikler; ampisilin, oksasilin ve metisilin'dir. Bu çalışma sonucunda *S. aureus* suşunun metisilin dirençli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. *Staphylococcus aureus*' un antibiyotik direnç profili

Antibiyotik	Grubu	İnhibisyon zon çapı (mm)
Nalidiksik asit	Minor	8
Tetrasiklin	Geniş spektrum	19
Ampisillin	Geniş spektrum	-
Vankomisin	Gram pozitif	20
Gentamisin	Minor	14
Penisillin	Gram pozitif	17
Kloramfenikol	Geniş spektrum	16
Novobiyosin	Gram pozitif	12
Eritromisin	Gram pozitif	20
Streptomisin	Geniş spektrum	12
Oksasillin	Geniş spektrum	-
Metisillin	Gram pozitif	-

(-): inhibisyon yok

3.2. Farklı bitkilerin antibakteriyel aktiviteleri

Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA)'a karşı farklı bitkilerin özütleri hazırlanmış ve antibakteriyel aktivite çalışmalarında kullanılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler dikkate alındığında; tüm bitkilerin sulu özütlerinin antibakteriyel aktiviteye sahip olmadığı saptanmıştır. Etanol özütleri incelendiğinde ise sadece *Vitex* cinsine ait özütlerin antibakteriyel aktivite gösterdiği (8 ve 9 mm) belirlenmiştir. Metanol özütlerine bakıldığında ise, *Pistacia* ve *Vitex* özütlerinin antibakteriyel aktiviteye

sahip olduğu saptanmıştır. En yüksek antibakteriyel aktiviteye *Vitex* bitkisinin çiçeklerinden ve metanol özütünden elde edilmiştir (12 mm) (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. MRSA' a karşı farklı bitkilerin antibakteriyel aktiviteleri

Bitki	Özütlerin inhibisyon zon çapları (mm)		
	EE	ME	SE
<i>Capparis spinosa</i> (G-Y)	-	-	-
<i>Picnomon acarna</i> (G-Y)	-	-	-
<i>Pistacia terebinthus</i> (Y)	-	8	-
<i>Trigonella foenum-graecum</i> (G-Y)	-	-	-
<i>Vitex agnus castus</i> (G-Y)	8	8	-
<i>Vitex agnus castus</i> (Ç)	9	12	-
<i>Momordica charantia</i>	-	-	-

G-Y: Gövde – Yaprak; Y: Yaprak; Ç: Çiçek; EE: Etanol özütü; ME: Metanol özütü; SE: Sulu özütü; (-): inhibisyon yok

3.3. Farklı bitkilerin minimum inhibitör konsantrasyonları (MIC)

Çalışmamızda antibakteriyel aktivite olarak ayrıca minimum inhibitör konsantrasyonları da belirlenmiştir. Antibakteriyel aktiviteye sahip bitki özütlerine MIC testi yapılmış olup, bu çalışmadan elde edilen veriler dikkate alındığında, en düşük MIC değerinin 3250 µg/µl ile *Vitex agnus-castus*'un çiçek etanol özütüne ait olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Farklı bitkilerin minimum inhibitör konsantrasyonları

Bitki	Özütler (µg/ml)		
	EE	ME	SE
<i>Capparis spinosa</i> (G-Y)	nt	nt	nt
<i>Picnomon acarna</i> (G-Y)	nt	nt	nt
<i>Pistacia terebinthus</i> (Y)	nt	6500	nt
<i>Trigonella foenum-graecum</i> (G-Y)	nt	nt	nt
<i>Vitex agnus castus</i> (G-Y)	6500	(-)	nt
<i>Vitex agnus castus</i> (Ç)	3250	6500	nt
<i>Momordica charantia</i>	nt	nt	nt

G-Y: Gövde – Yaprak; Y: Yaprak; Ç: Çiçek; nt: Test edilmedi; EE: Etanol özütü; ME: Metanol özütü; SE: Sulu özütü; (-): denenen konsantrasyonlarda inhibisyon belirlenmemiştir

3.4. Farklı bitkilerin minimum bakterisidal konsantrasyonları (MBC)

Antibakteriyel aktivite testlerinden bir diğeri de minimum bakterisidal konsantrasyonunun belirlenmesidir. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler Çizelge 3.4’ de özetlenmiştir. Buna göre MRSA kültürüne karşı MIC değeri bulunan bitkiler denenmiş ve MBC değerleri saptanmıştır. En düşük MBC değeri 6500 µg/µl ile *Vitex agnus-castus* çiçek özütünden elde edilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Farklı bitkilerinin minimum bakterisidal konsantrasyonları (MBC)

Bitki	Özütler (µg/ml)	
	EE	ME
<i>Pistacia terebinthus</i> (Y)	nt	13000
<i>Vitex agnus castus</i> (G-Y)	13000	nt
<i>Vitex agnus castus</i> (Ç)	6500	13000

G-Y: Gövde – Yaprak; Y: Yaprak; Ç: Çiçek; nt: Test edilmedi;
EE: Etanol özütü; ME: Metanol özütü

3.5. Farklı bitkilerin antibiyofilm aktivitesi

MRSA’ un biyofilm oluşturma etkisine karşı bitki özütlerinin inhibisyon etkisinin saptanması amacı ile antibiyofilm çalışmaları yapılmış ve bu çalışma için antibakteriyel aktiviteye sahip olan bitkiler seçilmiştir. Bu çalışmada kullanılan bitkilerin konsantrasyonları 26000, 13000, 6500 ve 3250 µg/ml olarak uygulanmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler dikkate alındığında, *Vitex agnus-castus* bitkisinin gövde-yaprak özütlerine ait etanol özütünün %76 inhibisyon yaptığı tespit edilmiştir. Bu çalışmadan çıkan diğeri bir sonuç ise, tüm bitki özütlerinin metisilin dirençli *S. aureus*’ un oluşturduğu biyofilm aktivitesine karşı yüksek oranda inhibisyona sahip olduğunun belirlenmesidir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Farklı bitkilerin MRSA'a karşı antibiyofilm aktiviteleri

Bitkiler	Konsantrasyonlar (µg/ml)		
	13000	6500	3250
<i>Vitex agnus castus</i> (Ç), metanol özütü	69,5	73	72,5
<i>Vitex agnus castus</i> (Ç), etanol özütü	70,5	74,5	74
<i>Vitex agnus castus</i> (G-Y), metanol özütü	77	79	75
<i>Vitex agnus castus</i> (G-Y), etanol özütü	64,5	77	76
<i>Pistacia terebinthus</i> (Y), metanol özütü	74	70,5	65

G-Y: Gövde – Yaprak; Y: Yaprak; Ç: Çiçek

Farklı bitkilerin antibiyofilm aktiviteleri belirlendikten sonra metisilin dirençli *S. aureus*' un yüzeye bağlanma indeksleri belirlenmiştir. Bu çalışma verileri incelendiğinde en düşük bağlanmanın *Vitex agnus-castus* bitkisinin gövde yapraklarına ait metanol özütünde ve bu değer 0,11 olduğu saptanmıştır. En yüksek yüzeye bağlanma indeksi ise *Pistacia terebinthus* yaprak metanol özütünde ve *Vitex agnus-castus* bitkisinin gövde yapraklarına ait etanol özütünde (0,18) bulunmuştur (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*' un yüzeye bağlanma indeksi

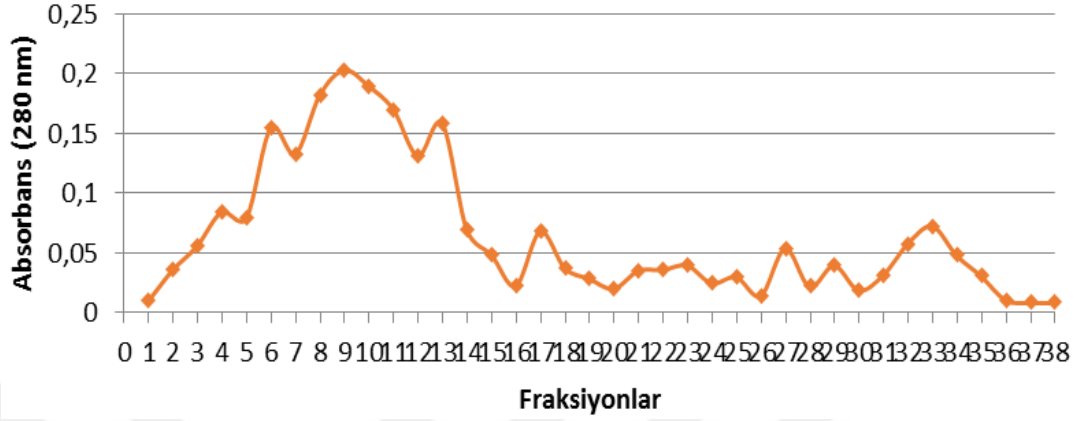
Bitki özütleri	Konsantrasyonlar (µg/ml)		
	13000	6500	3250
<i>Vitex agnus castus</i> (Ç), metanol özütü	0,15	0,14	0,14
<i>Vitex agnus castus</i> (Ç), etanol özütü	0,15	0,13	0,13
<i>Vitex agnus castus</i> (G-Y), metanol özütü	0,12	0,11	0,13
<i>Vitex agnus castus</i> (G-Y), etanol özütü	0,18	0,12	0,12
<i>Pistacia terebinthus</i> (Y), metanol özütü	0,13	0,15	0,18

Staphylococcus aureus bağlanma indeksi = 2,13

3.6. Bakterinin toplam protein ve proteaz aktivitelerinin saptanması

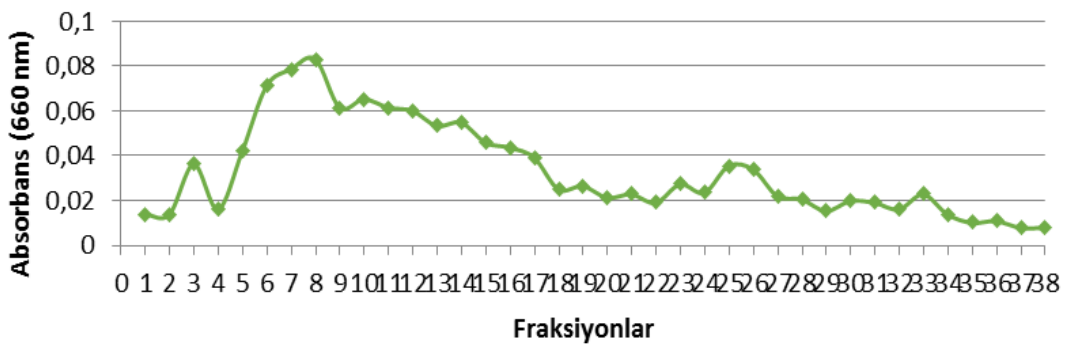
Jel filtrasyon kromatografisi çalışmaları sonucunda elde edilen veriler dikkate alındığında; tüm fraksiyonlarda toplam protein miktarı belirlenmiştir. Fraksiyon 8

ve 10 arasında yüksek toplam proteinleri saptanmıştır. Ancak en yüksek toplam protein tayini fraksiyon 9’ da belirlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Fraksiyonların toplam protein sonuçları (660 nm)

Jel filtrasyon çalışmaları sonucunda elde edilen tüm fraksiyonlara toplam proteaz aktivitesi tayini yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler dikkate alındığında yüksek proteaz sonuçlarının saptandığı fraksiyonlar 6 ila 8 fraksiyonları arasında olmuştur. En yüksek proteaz aktivitesi ise fraksiyon 8’ de saptanmıştır (Şekil 3.2).



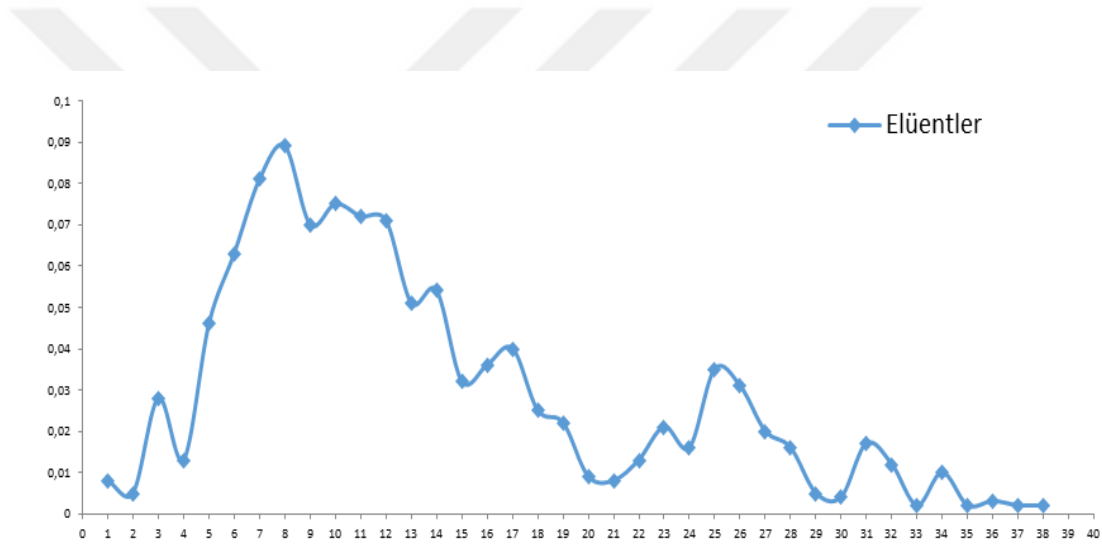
Şekil 3.2. Fraksiyonların toplam proteaz sonuçları (280 nm)

3.7. Bitki inhibitörünün proteaza inhibitör etkisinin saptanması

En yüksek biyolojik aktiviteye sahip *Vitex-agnus castus* bitkisinin inhibitörü elde edilmiş ve bu inhibitörün bakteriden elde edilen proteaza inhibisyon etkisi Çizelge 3.7 ve Şekil 3.3’ de verilmektedir. Bu çalışmalar sonucunda proteazın en fazla inhibe edildiği fraksiyonlar 2, 35, 36, 37, 38 olmuştur (Şekil 3.3).

Çizelge 3.7. Bitki inhibitörünün proteaza inhibisyon etkisi

Toplam proteaz	Bitki inhibitörü	Kontrol (PMSF)	% İnhibisyon (inhibitörlü)	% İnhibisyon (kontrol)
0,27	0,26	0,26	2,64	2,26



Şekil 3.3. *Vitex* bitkisine ait inhibitörün bakteri proteazına inhibitör etkisi

3.8. Bitki inhibitörünün trombine inhibitör etkisinin saptanması

Vitex-agnus castus’ a ait inhibitörün trombin üzerine etkisinin incelendiği çalışmalarda, bitki inhibitörü sonuçlarının pozitif kontrol olan fenilmetil sulfonil florid (PMSF)’ den daha iyi sonuç verdiği saptanmıştır (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Bitki inhibitörünün trombin üzerine etkisi (U/ml)

Aktivite	Bitki ve kontroller		
	<i>Vitex-agnus castus</i>	Pozitif kontrol (PMSF)	Negatif kontrol (inhibitörsüz)
U/ml	0,18	0,08	0,23

Vitex bitkisine ait saflaştırılmış inhibitör fraksiyonlarının trombine etkisinin incelendiği çalışmalar sonucunda ise, farklı fraksiyonlarda yüksek anti-trombin etkisi elde edilmesine rağmen, en yüksek anti-trombin etkisi fraksiyon 8' den saptanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Bitki inhibitörüne ait fraksiyonların trombin üzerine etkisi

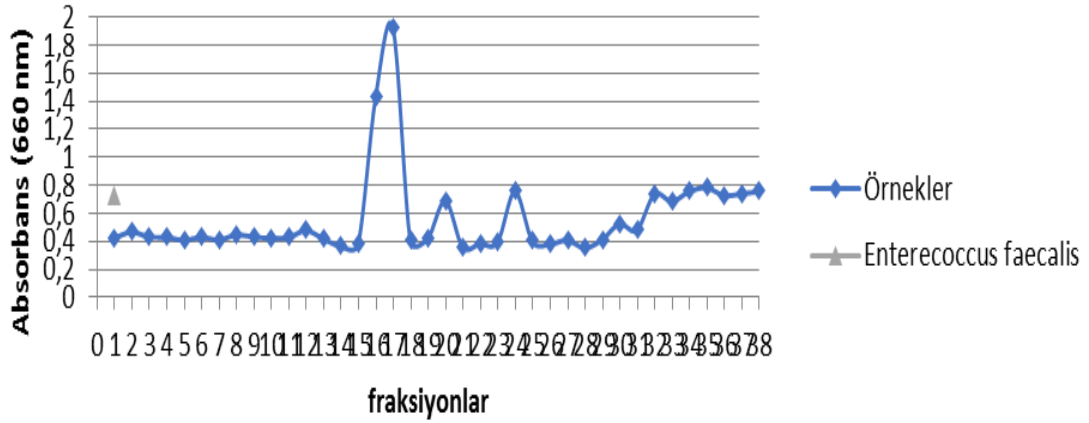
3.9. Bitki inhibitörünün kollajenaza inhibitör etkisinin saptanması

Bu çalışmada *Enterococcus faecalis* pozitif kontrol, *Vitex agnus-castus* bitki inhibitörü ve *S. aureus* ise kollejenaza karşı kullanılan kaynaklardır. Her üçü ile de kollejanaz aktiviteleri belirlenmiştir. Bitki inhibitörünün kollajenaza inhibitör etkisi karşılaştırıldığında, pozitif kontrol olan *Enterococcus faecalis*' den ve *S. aureus*' dan yüksek bulunmuştur (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Bitki inhibitörünün kollojenaza etkisi (µ/ml)

<i>Enterococcus faecalis</i> (pozitif kontrol)	<i>Vitex agnus-castus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
0,42	0,96	0,87

Vitex bitkisinden saflaştırılmış tüm fraksiyonların kollajenaza etkisini belirlemek amacıyla yürütülen çalışmalar sonucunda, elde edilen veriler incelendiğinde en yüksek inhibisyon fraksiyon 15 ve 16' dan elde edilmiştir. En yüksek anti-kollojenaz aktivitesi ise fraksiyon 16' dan elde edilen değerdir ve pozitif kontrol olarak kullandığımız *E. faecalis*' in aktivitesinden çok yüksek bulunmuştur (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Bitki inhibitörü fraksiyonlarının kollojenaza etkisi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

S. aureus, bir dizi enfeksiyöz hastalığa neden olan fırsatçı bir patojendir ve hem hastane hem de toplum sağlığı hizmetlerinde önemli bir endişe kaynağıdır. Tedavi seçenekleri ilaçlara dirençli suşların artmasıyla giderek daha sınırlı hale gelmektedir (Thati vd., 2011). Günümüzde *S. aureus* sadece metisiline değil vankomisin, sefiksimi de kapsayan çok sayıda antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirmeye başlamıştır (Hiramatsu, 1998; Tarai vd., 2013) ve tedavisi zorlaşmıştır (Machado, vd., 2003). *S. aureus* ürettiği enzimler, toksinler ve diğer bileşikler sayesinde hastalığa neden olabilir. Hücre membranının geçirgenliği ve genetik faktörleri (El-Astal, vd., 2005) sayesinde çoğu durumda canlılığını devam ettirebilir. Bazı bileşikler (örneğin flavonoidler, alkaloidler, taninler ve terpenoidler) ise etkili olabilir (Ulubelen, vd., 1994). Örneğin 1,8-cineole için hareket mekanizması; bu fenolik bileşik bakteri membranını geçtiğinde, membran enzimleri ve proteinler ile etkileşime girer, hücresel aktiviteyi etkileyen protonların ters akışına neden olabilir (Davidson, 2001). Bundan başka alfa-pinen gibi esansiyel yağ ana bileşenlerinin antimikrobiyal aktivitesi üzerine yayınlanmış çalışmalarda bulunmaktadır (Stojkovic vd., 2008). İlaveten *S. aureus*' un biyofilm oluşturması önemli bir sorundur çünkü bakteri konakçı savunma sistemlerinden ve antimikrobiyal ajanlardan kaçabilir, bu da kronik enfeksiyonlara yol açar ve tedaviyi iyice zorlaştırmaktadır (Harris vd., 2016; Sivaranjani vd., 2017).

Çoğu mikrobiyal enfeksiyonun karmaşıklığındaki artış ve konvansiyonel tedaviye karşı oluşan direnç nedeni ile araştırmacılar enfeksiyonların tedavisi için alternatifleri belirlemeyi istemişlerdir. Bitki ekstraktları ve bitkilerden izole edilen diğer biyolojik aktif bileşikler, eski çağlardan beri hastalıkların tedavisinde geniş ilgi görmüştür (Tamilvanan, vd., 2008; Ru vd., 2014). Bitkiler tarafından sentezlenen çoklu doymamış yağ asitlerinin, bakteriyel patojenlere karşı alternatif bir ilaç olarak hizmet ederek, konakçının metabolik, immünolojik fonksiyonlarını etkilediği bildirilmiştir (Praveen, vd., 2010). *V. agnus-castus*' un fitokimyasal analizi üzerine çalışmalar sonucunda, ana bileşenlerin 1,8 sineol (8.24%), propenamid (6.07%), karyofillen (5.56%), bisiklogermakren (5.51%), sabinen (5.37%), *N*-(4- florofenil)-maleimid

(5.28%), *trans*- β -farnesen (4.45%), alfa-pinen (3.98%) olarak tespit edilmiştir (Tin, vd., 2017).

Bu çalışmada, *Pistacia terebinthus* bitkisinin çiçek metanol özütü *S. aureus* ' a karşı denenmiş ve en yüksek inhibisyon zonu 12 mm olarak elde edilmiştir (Çizelge 3.2). Durak ve Uçak (2015) *Pistacia terebinthus* ile yaptıkları çalışmada antibakteriyel aktiviteyi 7-12 mm arasında bulmuştur. Ghalem ve Mohamed (2009) *Pistacia* ile yaptıkları çalışmada 100 mg/ml uçucu yağın *S. aureus* ' a karşı gösterdiği aktiviteyi 8 mm olarak bildirmiştir. Gkogkaa vd., (2013) *Pistacia* yağı ile çalışmışlar ve 16 mm inhibisyon zon çapı rapor etmişlerdir. Keleş vd., (2001) yaptıkları çalışmada *S. aureus* ' a karşı bitkinin inhibisyon zonunu 10 mm şeklinde vermişlerdir. Literatürden sağlanan bu sonuçlar bizim çalışmalarımız ile uyumludur.

Vitex bitkisi farklı özütleri ile yaptığımız antibakteriyel aktivite çalışmaları sonucunda ise, *S. aureus* ' a karşı 8 ile 12 mm arasında inhibisyon zon çapları saptanmıştır (Çizelge 3.2). Triveni vd. (2016), *Vitex negundo* ' nun farklı özütlerini MRSA' ya karşı çalışmışlar ve metanol özütünden 12 mm zon tespit ederken, n-hekzan özütünden 19 mm zon bulmuşlardır. Kamruzzaman ve ark. (2013), *Vitex negundo* bitki kısımlarının metanol ve etil asetat özütlerinin etkin antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Moghadam vd. (2010), *Vitex pseudo negundo* ile çalışmışlar ve 0,45 ve 0,35 g/ml konsantrasyonları için sırası ile 13 ve 12 mm zon bildirmişlerdir. Bazı yazarlar Gram pozitif bakterilerin Gram negatif bakteriler ile karşılaştırıldığında uçucu yağlara biraz daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir (Rabe ve Staden, 1997; Ali-Shtayeh, vd., 1998; Canillac ve Mourey, 2001; Dermetzos ve Perdetzoglou, 2001). Uçucu yağların ana etki alanı bakteriyel membran olduğu göz önüne alındığında (Di Pasqua, vd., 2007), Gram negatif bakterilerin membran yapısındaki farklılıklar nedeniyle Gram pozitiften daha dirençli olacağını varsaymak mantıklıdır (Cloete, 2003). Ancak, hücre zarının bozulması hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakteriler için gösterilmiştir (Singh, vd., 2007) ve Gram negatiflerin inhibisyonunda sadece bir zaman gecikmesinin olduğu öne sürülmüştür (Fisher ve Phillips, 2008). Buna ek olarak, uçucu yağlar birden fazla etki gösterebilir (Burt, 2004) ve Gram negatiflerin dış yapısının biyositler için çeşitli direnç mekanizmalarına sahip olduğu bilinmektedir (Cloete, 2003).

Çalışmamızda, *Pistacia* metanol özütünün MIC değeri 6500 μ g/ml olarak saptanmıştır (Çizelge 3.3). Literatüre bakıldığında, Ghalem ve Mohamed (2009)

Pistacia ile yaptıkları çalışmada *S. aureus*' a karşı MIC değerini 1-10 µg/ml olarak bildirmişlerdir. Azizian vd. (2013) yaptıkları çalışmada, *Pistacia*' nın *S. aureus*'a karşı MIC değerinin 204,67 µg/ml olarak rapor etmişlerdir. Gkogkaa vd., (2013) *Pistacia* yağı ile çalışmışlar ve MIC değerini % 0,75 (v/v) olarak bildirmişlerdir. Keleş vd. (2001) yaptıkları çalışmada, *S. aureus*' a karşı bitkinin MIC değerini 2 mg/ml olarak vermişlerdir. Haloui vd. (2015) yaptıkları çalışmada, *P. lentiscus* uçucu yağının MIC değerini % 0,5, MBC değerini ise % 2 olarak raporlamışlardır. Bazı araştırmacılar, test edilen uçucu yağın ve antimikrobiyal aktivitenin içerisinde bol bulunan kimyasal yapılar ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. *Pistacia* türleri gibi fenolik bileşikler açısından zengin olan esansiyel yağların yüksek düzeyde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu yaygın olarak bildirilmiştir (Marner vd., 1991; Kubo vd., 1993; Ben Douissa, 2005). Bu görülen aktivite farklılıklarının bitkilerin içerdiği etken maddelerin oranındaki değişimlere bağlı olabileceği ve etken maddelerin iz düzeylere kadar düşebileceği bildirilmektedir (Sivropoulou, vd., 1996). Bazı araştırmalarda da belirtildiği gibi bitki ekstrelerinin farmakolojik yönden aktivitelerinin sınırlı oluşunun nedeni soksalet ile elde edilen ekstraların saf halde bulunmaması ile ilgili olabilir. Bu durumda, saflaştırma işlemleri ile daha güçlü etkiye sahip bileşiklerin elde edilmesi gerekmektedir (Rabe ve Staden, 1997; Fabry, vd., 1998).

Vitex ile yaptığımız MIC çalışmaları sonucunda MRSA' ya karşı en düşük inhibisyon değeri etanol özütünden 3250 µg/ml olarak saptanmış, MBC değeri ise 6500 µg/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 3.3. ve 3.4). Loahaprapanon vd. (2018), *Vitex glabrata* ile çalışmışlar ve MRSA için MIC değerini 1000 µg/ml olarak raporlamışlardır. Stojkovic vd. (2011), *Vitex agnus-castus* meyve ve yaprakların uçucu yağları ile çalışmışlar ve *S.aureus* için her ikisinde de MIC değerini 219 µg/ml, MBC değerini ise 445 µg/ml olarak bildirmişlerdir. Literatürden sağlanan sonuçların bizim MIC sonuçlarımız ile karşılaştırıldığında farklı olduğu görülmektedir. Bu farklılıkların sebebi, bitkilerin kimyasal içeriklerinin değişimine bağlı olduğu ve dolayısıyla toprağın yapısı, bitki materyalinin toplanması sırasında günlük ve mevsimsel değişimler, bitkinin fizyolojik gelişim dönemi, incelenen bitki bölümü, ekstraksiyon işlemi ve kullanılan bakteri türleri gibi faktörler ile ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir (Izzo vd., 1995; Tunon vd., 1995; Martinez vd., 1996). Bununla birlikte, uçucu yağların antibakteriyel aktivitelerinin karmaşıklığından dolayı spesifik

bir bileşik ile arasında korelasyon olduğunu söylemek oldukça zordur (M lanie vd., 2009). Bu düşük antibakteriyel aktivite, nispeten düşük antibakteriyel aktiviteleriyle bilinen terpen (a-pinen, trisiken, 3-karen, trans-okimen ve d-germakren) içeriklerinin fazlalığı ile açıklanabilir (Inouye vd., 2001).

Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonları genellikle çoklu ilaç direnci nedeniyle tedavi etmek zordur, bu nedenle bakteriyel biyofilm oluşumuna karşı yeni ve etkili molekülleri tanımlamak önemlidir (Kumar, vd., 2013). Biyofilmler, bakterilerin neden olduğu insan enfeksiyonlarının çoğunda önemli bir rol oynarlar (Spoering ve Lewis, 2001). De Kievit ve arkadaşlarına (2003) göre bakteriyel biyofilmlerin oluşumu ve olgunlaşması quorum-sensing (QS) mekanizmasından etkilenmektedir. N-acil homoserin lakton' nun (AHL) aracılık ettiği QS' nin biyofilmlerin olgunlaşmasında önemli bir rol oynadığına dair artan kanıtlar vardır (Sarah, vd., 2006) ve dolayısıyla QS' nin inhibisyonu ile muhtemelen biyofilm olgunlaşması  nlenebilir. Biyofilm oluşumu, optimum altındaki ortamlarda mikroorganizmaların büyümesini destekler, antimikrobiyal tedavilere ve konak savunmasına karşı direnç artışı sağlar (Hall-Stoodley, vd., 2004). Mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilm, antimikrobiyal ajanların difüzyonunu kısıtlar ve bu nedenle klinik öneme sahip olan bu maddelere karşı direnç geliştirir (Costerton, vd., 1999; Adam, vd., 2002; Ando, vd., 2004). Bu nedenle, bakteri hücrelerinde biyofilm oluşumunu önlemek için kontrol önlemleri gereklidir (Sarah, vd., 2006).

Pistacia terebinthus bitkisi ile *S. aureus*' a karşı antibakteriyel aktivite çalışmaları bulunmasına rağmen (Pulaj vd., 2016;  oban vd., 2017), antibiyofilme çalışmalarına literatürde rastlanmamıştır. Bu da çalışmamızın özgünlüğünü ortaya koymaktadır. Antibiyofilme çalışmalarımız sonucunda *Pistacia* yaprak metanol özütlerinin MRSA' nın oluşturduğu biyofilme karşı yüksek inhibisyon aktiviteleri saptanmıştır ( izelge 3.5). Hosseini vd. (2013), *Pistacia* ile *Streptococcus*' un oluşturduğu biyofilme karşı çalışmışlar ve % 100 ekstre kullanıldığında 60 dakika sonra biyofilm içersindeki canlı hücre sayısının % 98 azaldığını rapor etmişlerdir. Bakterilerin yüzeyle yapışması, glukanın yanı sıra *in vivo* duruma aracılık eder (Koo, vd., 2003). Bu  alışmada, *S. mutans*' ların ekstresinin MIC-altı konsantrasyonları ile yapışmasının  nlenmesi, *P. athlatica*' daki flavonoidler, tanenler gibi biyoaktif bileşikler ile mümkün olduğu bildirilmektedir. Flavonoidlerin anti-glukosiltransferaz (anti-GTaz) aktivitesi olduğu bilinmektedir. Bu enzim, sukrozun yapışkan ve  z nmez glukana

dönüştürülmesinden sorumludur, bu da bakterilerin yüzeye sıkı sıkıya tutunmasını sağlar. Ghalem ve Mohamed (2009), üç bakteriye (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Proteus spp*) karşı *Pistacia vera* kök salgılarından hidrodissenlenmiş uçucu yağları kullanmış ve *P. vera* konsantrasyonunun artan uçucu yağı reçinesiyle, bakterilerin büyümesi üzerinde bariz bir inhibitör etki oluşturduğunu bulmuştur.

Vitex agnus-castus ile yaptığımız antibiyofilm çalışmalarımız sonucunda, MRSA'nın oluşturduğu biyofilme karşı bitkinin tüm organlarına ait özütlerinin antibiyofilm aktiviteleri yüksek bulunmuştur (Çizelge 3.5). Dineshabu vd. (2015a), *Streptococcus pyogenes* biyofilmine karşı *Vitex negundo*' nunda bulunduğu 3 bitkinin karışımını (1 mg/ml) elde etmişler ve biyofilm oluşumunda % 94 inhibisyon tespit etmişlerdir. Dineshabu vd. (2015b) yaptıkları diğer çalışmada ise, *Streptococcus pyogenes* biyofilmine karşı *Vitex negundo* metanol özütünün % 44,59 ve % 89,81 inhibisyon sağladığını raporlamışlar, petrol eter özütünün ise % 25,86 ve % 83,97, hekzan özütünün ise % 36,82 ve % 89,67 oranında biyofilm inhibisyonu belirlemişlerdir. Navasivayam vd. (2013), *Vitex negundo* ile *Escherichia coli* biyofilmine karşı çalışmışlar ve farklı konsantrasyonların antibiyofilm etkisini farklı bulmuşlardır. Bu çalışmaya göre biyofilme karşı 25 µg/ml' de % 32, 50 µg/ml' de % 43, 75 µg/ml' de % 51 ve 100 µg/ml' de % 65 inhibisyonu rapor etmişlerdir. Mary vd. (2015), *Vitex trifolia* ile *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmine karşı çalışmışlar ve 100 µg/ml' de % 98 inhibisyon belirlemişlerdir. Das vd. (2016), viteksin maddesini *Pseudomonas aeruginosa*' ya karşı denemişler ve 110 µg/ml' de % 56 inhibisyon saptamışlardır. Mary ve Banu (2012) *Vitex trifolia* metanol özütü ile *Serratia marcescens* biyofilmine karşı çalışmışlar, 100 µg/ml' de biyofilmin maksimum inhibe olduğunu rapor etmişlerdir. Loahaprapanon vd. (2018), *Vitex glabrata* ile MRSA'nın oluşturduğu biyofilme karşı çalışmışlar ve 1000 µg/ml' de önemli antibiyofilm etkisi bildirmişlerdir. Biyofilmin inhibisyonu, yüzeye yapışmış bakteriyel popülasyonun büyümesini kontrol eden ilk savunma mekanizmasıdır ve viteksinin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Upadhyay, vd., 2013). Viteksin, tüm yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunan bir sekonder metabolit olup, bir polifenolik flavon sınıfıdır. Bitkilerde, polifenolik sekonder metabolitler çeşitli patojenlere karşı savunma aracı olarak rol oynarlar (Cushnie, vd., 2003). *Vitex trifolia* özleri ile bakteriyel patojenlerin tedavisinin, muhtemelen yüzey yapışmasını ve bunu izleyen mikro koloni oluşumunu azaltarak zayıf biyofilm oluşumuna neden

olduğu düşünölmektedir. Bunu doğrulayan çeşitli çalışmalar mevcuttur (Skindersoe, vd., 2008; Packiavathy, vd., 2011; Packiavathy, vd., 2012). Yapılan bir çalışmada, bakteriyel patojenler *Vitex trifolia* özütü ile muamele edildiğinde, toplam ekzopolisakkarit (EPS) miktarında azalma saptanmıştır. *Vitex trifolia* özü, EPS sentezini inhibe ederek biyofilmin yapısını gevşetir, biyofilm içindeki bakterilerin antibiyotiklere direnci böylece azaltılabilir. QS-bağımlı flagella ile hareket biyofilm gelişimi sırasında hücre/yüzey bağlantısının kurulabilmesi için şarttır (Kumar ve Zhirong, 2004; Annapoorani, vd., 2012). Bazı alışmalarda, *Vitex trifolia* dolaylı olarak, substratuma ulaşma kabiliyetine ve daha sonra AHL aracılı QS sistemini bozarak biyofilm oluşumuna müdahale etmesi sonucunda patojenin biyofilm oluşturmasını inhibe ettiği bildirilmektedir (You, vd., 2007; Packiavathy, vd., 2011; Packiavathy, vd., 2012).

Sonuç olarak, bitkiler ilginç biyolojik aktiviteleri olan zengin sekonder metabolitlerin kaynağıdırlar. Bu sekonder metabolitler, farklı hastalıkları tedavi etmek için alternatif bir ilaç olarak kullanılabilen farklı yapısal konfigürasyon ve özelliklere sahiptir. Bu çalışmada, kullandığımız bitkilerden ikisi yüksek antibakteriyel aktivite göstermiş ve antibakteriyel aktivite sahibi olan bu bitkilerin aynı zamanda biyofilm gelişimini önemli ölçüde azalttığı ve *Vitex agnus-castus* ' un yüksek anti-trombin ile anti-kollajenaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Bundan sonra, bu bitkilerin anti-biyofilm özelliklerinin moleküler düzeyde saptanmasına ve biyolojik fonksiyonlarının değerlendirilmesine, ayrıca kimyasal fraksiyonlarının saflaştırılarak etken maddelerin belirlenmesi yönündeki ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKÇA

- Abascal, K., Yarnell, E. (2005) Using bitter melon to treat diabetes, *J Altern Complement Med*, 1: 179-184.
- Abdel-Rahman, A.H.Y., Soad, A.M.Y. (1975) Mastic as antioxidant, *J Am Oil Chem Soc*, 52: 423.
- Adam, B., Baillie, G.S., Douglas, L.J. (2002) Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*, *J Med Microbiol*, 51: 344-349.
- Adeola, S.A., Folorunso, O.S. ve Amisu, K.O. (2012) Antimicrobial activity of *Ocimum basilicum* and its inhibition on the characterized and partially purified extracellular protease of *Salmonella Typhimurium*, *Res J Biol*, 2(5): 138-144.
- Ajabnoor, M.A., Tilmisany, A.K. (1988) Effect of *Trigonella foenum-graecum* on blood glucose levels in normal and alloxan-diabetic mice, *J Ethnopharmacol*, 22 (1): 45-49.
- Akan, M. (2006) *Staphylococcus infeksiyonları*. 5-13. İlke-Emek Yayınları, Ankara. 332.
- Ali-Shtayeh, M.S., Yaghmour, R.M-R., Faidi, Y.R., Salem, K. ve Al-Nuri, M.A. (1998) Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area, *J Ethnopharmacol*, 60: 265-271.
- Altınışik, M. (E.T. 15.09.2018) Veteriner Fakültesi 2. Sınıf Biyokimya, Tıp Fakültesi 1. Sınıf Organik Kimya ve Biyokimya Dersleri Ders Notları. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-23.pdf>.
- Ando, E., Monden, K., Mitsuata, R., Kariyama, R., Kumon, H. (2004) Biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with urinary tract infection, *Acta Med Okayama*, 58: 207-214.
- Annapoorani, A., Jabar, A.K.K.A., Musthafa, S.K., Pandian, S.K., Ravi, A.V. (2012) Inhibition of Quorum sensing mediated virulence factors production in urinary pathogen *Serratia marcescens* PS1 by Marine sponges, *Indian J Microbiol*, 52: 160-166.
- Anonim, (2014) <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/> (E.T.12.08.2016).
- Anonim, (E.T. 16.09.2018) İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi ders notları. http://istanbultip.istanbul.edu.tr/ogrenci/wpcontent/uploads/attachments/079_EC.pdf.
- Anonim, (2005) Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), Guidance for nursing staff, 1-20.
- Appelbaum, P.C. (2007) Microbiology of antibiotic resistance in *S. aureus*, *Clin Infect Dis*, 45 (Suppl 3): 165-70.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Ravaoli, S., Montanaro, L. (2015) Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects, *Frontiers Cellular Infect Microbiol*, 5: 7.
- Arokiyaraj, S., Perinbam, K., Agastian, P. ve Kumar, R.M. (2009) Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Vitex agnus-castus*, *IJGP*, 3 (2):162-164.

- Arvidson, S. (2000) Extracellular enzymes. In Gram-Positive Pathogens, Edited by V. A. Fischetti. Washington, DC: American Society for Microbiology. pp. 379-385.
- Azizian, M., Pakzad, I., Azizian, R., Jalilian, F.A., Taherikalani, M., Sadeghifard, N., Kartalaie, M.M., Shirani, R., Delpisheh, A., Abassi, N., Havasian, R., Panahi J, and Hasanvand, A. (2013) Antibacterial effect of hydro-extract of *Pistacia atlantica* on bacteria in *In vitro*, *Biomed Pharmacol J*, 6 (2): 133-136.
- Bailey, L.H. (1950) The Standard Cyclopedia of Horticulture, MacMillan Company New York-USA Vol:1, pp. 658.
- Baptiste, K.E., Williams, K., Williams, N.J., Wattret, A., Clegg, P.D., Dawson, S., Corkill, J.E., O'Neill, T., Hart, C.A. (2005) Methicillin-resistant *Staphylococci* in Companion Animals, *Emerg Infect Dis*, 11: 1942-1944.
- Basch, E., Ulbricht, C., Kuo, G., Szapary, P., Smith, M. (2003) Therapeutic applications of fenugreek, *Alternative Medicinal Review*, 8 (1): 20-27.
- Battu, G.R., Kumar, B.M. (2010) Phytochemical and antimicrobial activity of leaf extract of *Asparagus racemosus* Willd, *Pharmacognosy J*, 13 (12): 456-463.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. ve Turck, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *Am J Clin Pathol*, 45 (4): 493-496.
- Bayer, A.S., Cheng, D., Yeaman, M.R., Corey, G.R., McClelland, R.S., Harrel, L.J., ve Fowler, V.G. (1998) *In vitro* resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein among clinical bacteremic isolates of *Staphylococcus aureus* correlates with an endovascular infectious source, *Antimicrob Agents Chemother*, 42:3169-3172.
- Bayer, A.S., Prasad, R., Chandra, J., Koul, A., Smriti, M., Varma, A., Skurray, R.A., Firth, N., Brown, M.H. (2000) *In vitro* resistance of *Staphylococcus aureus* to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with alterations in cytoplasmic membrane fluidity, *Infect Immun*, 68: 3548-3553.
- Baytop, T. (1984) Therapy with Medicinal Plants (Past and Present), İstanbul University Publications, İstanbul. pp. 252.
- Baytop, T. (1984b) Therapy with medicinal plants in Turkey, İstanbul University Publications Pub. No: 3255, Faculty of Pharmacy Pub. No: 40, İstanbul. pp. 520.
- Baytop, T. 1984a. Phytotherapy in Turkey, İstanbul Univ. Publ. No. 2355, İstanbul, Turkey (in Turkish).
- Ben Douissa, F., Hayder, N., Chekir-Ghedira, L., Hammami, M., Ghedira, K., Mariotte, A.M., Dijoux-Franca, M.G. (2005) New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) from Tunisia, *Flav Fragr J*, 20: 410-414.
- Berger-Bachi, B., Rohrer, S. (2002) Factor influencing methicillin resistance in *Staphylococci*, *Arch Microbiol*, 178: 165-171.
- Bien, J., Sokolova, O., ve Bozko, P. (2011) Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response, *J Pathogens*, vol. 2011, Article ID 601905, 13 pages, <https://doi.org/10.4061/2011/601905>.
- Bracaa, A., Sicilianoa, T., D'Arrigob, M., Germanòb, M.P. (2008) Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil, *Fitoterapia*, 79 (2): 123-125.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm Wiss Technology*, 28: 25-30.
- Bremner, P., Rivera, D., Calzado, M.A., Obón, C., Inocencio, C., Beckwith, C., ve Heinrich, M. (2009) Assessing medicinal plants from South-Eastern Spain for potential anti-inflammatory effects targeting nuclear factor-Kappa B and other pro-inflammatory mediators, *J Ethnopharmacol*, 124 (2): 295-305.
- Brevard, H., Brambilla, M., Chaintreau, A., Marion, J.P., ve Diserens, H. (1992) Occurrence of elemental sulphur in capers (*Capparis spinosa* L.) and first investigation of the flavour profile, *Flav Fragr J*, 7 (6): 313-321.
- Brown, P.D. (1994) Clinical trial of a low molecular weight matrix metalloproteinase inhibitors in cancer, *Ann NY Acad Sci*, 732: 217-221.
- Brumfitt, W., Hamilton-Miller, J. (1989) Methicillin-resistant *S. aureus*, *N Engl J Med*, 320: 1188-1196.
- Budrat, P., Shotipruk, A. (2008) Extraction of phenolic compounds from fruits of bitter melon (*Momordica charantia*) with subcritical water extraction and antioxidant activities of these extracts, *Chiang Mai J Sci*, 35 (1): 123-130.
- Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review, *Intern J Food Microbiol*, 94: 223-253.
- Canillac, N., Mourey, A. (2001) Antimicrobial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria, *Food Microbiol*, 18: 261-268.
- Carson, L., Chau, P.K., Earle, M.J., Gilea, M.A., Gilmore, B.F., Gorman, S.P. ve Seddon, K.R. (2009) Antibiofilm activities of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids, *Green Chem*, 11 (4): 492-497.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2008) Environmental Management of *Staphylococcus* and MRSA in Community Settings, Erisim: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_mrsa_Enviro_Manage.html.
- Cefalu, W.T., Ye, J., Wang, Z.Q. (2008) Efficacy of dietary supplementation with botanicals on carbohydrate metabolism in humans, *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 8: 78-81.
- Chambers, H.F. (1997) Methicillin resistance in *Staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications, *Clin Microbiol Rev*, 10: 781-791.
- Chauhan, A.K., Dobhal, M.P., Joshi, BC. (1988) A review of medicinal plants showing anticonvulsant activity, *J Ethnopharmacol*, 22: 11-23.
- Cloete, T.E. (2003) Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds, *Int Biodeter Biodegr*, 51: 277-282.
- Cohen, A.C. (1993) Organization of digestion and preliminary characterization of salivary trypsin-like enzymes in a pre-daceous heteropteran, *Zelus renardii*, *J Insect Physiol*, 39 (10): 823-829.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *FASEB J*, 17: 1195-1214.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science*, 284: 1318- 1322.
- Cousens, G. (2008) There is a cure for diabetes: the tree of life 21 day program, California: North Atlantic Books. pp. 191-192.
- Cucarella, C., Tormo, M.A., Ubeda, C., Trotonda, M.P., Monzon, M., Peris, C., ve ark. (2004) Role of biofilm associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*, *Infect Immun*, 72: 2177-2185.

- Cushnie, T.P.T., Hamilton, V.E.S. ve Lamb, A.J. (2003) Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports, *Microbiol Res*, 158: 281-289.
- Çoban, E.P., Biyik, H.H., Törün, B., Yaman, F. (2017) Evaluation the antimicrobial effects of *Pistacia terebinthus* L. and *Papaver rhoeas* L. extracts against some pathogen microorganisms, *IJPER*, 51 (3): 377-380.
- Daniele, C., Thompson, C.J., Pittler, M.H., Ernst, E. (2005) *Vitex agnus castus*, A Systematic Review of Adverse Events, *Drug Safety*, 28 (4): 319-332.
- Dankert, J. (1988) Role of platelets in early pathogenesis of viridans group *Streptococcal* endocarditis: a study on thrombodefensins, Doktora tezi, University of Groningen, Groningen, The Netherlands.
- Das, M.C., Sandhu, P., Gupta, P., Rudrapaul, P., De, U.C., Tribedi, P., Akhter, Y., ve Bhattacharjee, S. (2016) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by vitexin: A combinatorial study with azithromycin and gentamicin, *Scientific Reports*, 22 (6): 1-13.
- David, M.Z., Daum, R.S. (2010) Community-associated methicillin-resistant *S. aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic, *Clin Microbiol Rev*, 23: 616-687.
- Davidson, P.M. (2001) Chemical preservatives and naturally antimicrobial compounds. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T.J. Montville (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, ASM Press, Washington DC, pp. 593–628.
- Davies, D. (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents, *Nat Rev Drug Discov*, 2: 114-122.
- Davis, P.H. (1965) Flora of Turkey and East Aegean Islands, Edinburgh University Press, Vol. 1-9, Edinburgh.
- Davis, P.H. (1967) Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 2. University Press, Edinburgh, pp546 -547.
- De Kievit, T.R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., ve Iglewski, B.H. (2003) Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Their role and expression patterns, *App Env Microbiol*, 67: 1865-1873.
- Dermetzos, C., Perdetzoglou, D.K. (2001) Composition and antimicrobial studies of the essential oils of *Origanum calcaratum* Juss. and *O. scabrum* Boiss. et Heldr. from Greece, *J Essent Oil Res*, 3: 460-462.
- Deurenberg, R.H., Vink, C., Kalenic, S., Friedrich, A.W., Bruggeman, C.A., Stobberingh, E.E. (2007) The molecular evolution of methicillin-resistant *S. aureus*, *Clin Microbiol Infect*, 13: 222-235.
- Devienne, K.F. ve Raddi, M.S.G. (2002) Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer, *Braz J Microbiol*, 33: 166-168.
- Dhawan, V.K., Yeaman, M.R., Cheung, A.L., Kim, E., Sullam, P.M. ve Bayer, A.S. (1997) Phenotypic resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein *in vitro* is correlated with enhanced virulence in experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus*, *Infect Immun*, 65: 3293-3299.
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D. ve Mauriello, G. (2007) Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils, *J Agric Food Chem*, 55: 4863-4870.
- Digrak, M., Alma, H., İlçim, A. (2001) Antibacterial and antifungal activities of Turkish medicinal plants, *Pharmaceutical Biol*, 39: 346-350.
- Dineshbabu, J., Darsini, D.T.P., Srinivasan, P., Everlyne, I.M., Manimekalai, K. (2015a) Synergistic anti-biofilm activity of medicinal plants against biofilm

- forming *Streptococcus pyogenes* from pharyngitis patients, *Int J Pharm Bio Sci*, 5 (8): 2598-2606.
- Dineshbabu, J., Srinivasan, P., Manimekalai, K., Guna, G., ve Darsini, D.T.P. (2015b) Use of traditional medicinal plants against the biofilm forming *Streptococcus pyogenes* isolated from upper respiratory tract, *Int J Pharma Bio Sci*, 6 (2)(B): 464-479.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M. ve Schlievert, P.M. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*, *Clin Microbiol Rev*, 13 (1): 16-34.
- Donelli, G., Francolini, I. (2001) Efficacy of antiadhesive, antibiotic and antiseptic coatings in preventing catheter-related infections, *J Chemotherapy*, 13: 595-606.
- Donlan, R.M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces, *Emerg Infect Dis*, 8(9): 881-890.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clin Microbiol Rev*, 15: 167-193.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. ve Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal Chem*, 28 (3): 350-356.
- Durak, M.Z., Uçak, G. (2015) Solvent optimization and characterization of fatty acid profile and antimicrobial and antioxidant activities of Turkish *Pistacia terebinthus* L. extracts, *Turk J Agric For*, 39: 10-19.
- Durmaz, G. ve Gökmen, V. (2011) Changes in oxidative stability, antioxidant capacity and phytochemical composition of *Pistacia terebinthus* oil with roasting, *Food Chem*, 128 (2): 410-414.
- Ekundayo, O., Laakso, I., Holopainen, M., Hiltunen, R., Oguntimein, B. ve Kauppinen, V. (1990) The chemical composition and antimicrobial activity of the leaf oil of *Vitex agnus-castus* L., *J Essent Oil Res*, 2 (3): 115-119.
- El-Astal, Z.Y., Ashour, A., Kerrit, A.A. (2005) Antimicrobial activity of some medicinal plant extracts in Palestine, *Pak J Med Sci*, 21: 187-193.
- Emerit, I., Packer, L., Auclair, C. (1990) Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine. Springer US. Plenum Press, New York, ISSN 0065-2598.
- Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H., Spratt, B.G. (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), *PNAS*, 99: 7687-7692.
- EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). (2014) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, <http://www.eucast.org/>.
- Fabry, W., Okemo, P.O. ve Ansorg, R. (1998) Antibacterial activity of East African medicinal plants, *J Ethnopharmacol*, 60: 79-84.
- Ferrasson, E., Quillien, L., Gueguen, J. (1997) Proteinase inhibitors from pea seeds, purification and characterization, *J Agric Food Chem*, 45 (1): 127-131.
- Fey, P.D., Said-Salim, B., Rupp, M.E., Hinrichs, S.H., Boxrud, D.J., Davis, C.C., Kreiswirth, B.N., Schlievert, P.M. (2003) Comparative molecular analysis of community- or hospital-acquired methicillin resistant *S. aureus*, *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 196-203.
- Fisher, K. ve Phillips, C.A. (2008) Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends Food Sci Technol*, 19: 156-164.
- Fowler, V.G., McIntyre, L.M., Yeaman, M.R., Peterson, G.E., Barth Reller, L., Corey, G.R., Wray, D. ve Bayer, A.S. (2000) *In vitro* resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein in isolates of *Staphylococcus aureus* from

- endocarditis patients correlates with an intravascular device source, *J Infect Dis*, 182: 1251-1254.
- Gardiner, P.J. (2000) Longwood Herbal Task Force: <http://www.mcp.edu/herbal/default.htm> Revised May 11.
- Germano, M.P., De Pasquale, R., D'Angelo, V., ve ark. (2002) Evaluation of extracts and isolated fraction from *Capparis spinosa* L. buds as an antioxidant source, *J Agric Food Chem*, 50 (5): 1168–1171.
- Ghalem, B.R. ve Mohamed, B. (2009) Essential oil from gum of *Pistacia atlantica* Desf.: screening of antimicrobial activity, *Afr J Pharm Pharmacol*, 3 (3): 87-91.
- Ghannadi, A., Bagherinejad, M.R., Abedi, D., ve ark. (2012) Antibacterial activity and composition of essential oils from *Pelargonium graveolens* L'Her and *Vitex agnus-castus* L., *Iranian J Microbiol*, 4 (4): 171-176.
- Ghasemi, P.A., Momeni, M., Bahmani, M. (2012) Ethnobotanical study of medicinal plants used by Kurd Tribe in Dehloran and Abdanan districts, Ilam Province, Iran, *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 10(2): 368-385.
- Ghosh, D. (2014) Does bitter melon (*Momordica charantia*) have antibacterial property? *J Food Process Technol*, 5 (7): 1-5.
- Gkogkaa, E., Hazelegera, W.C., Posthumusb, M.A. ve Beumera, R.R. (2013) The antimicrobial activity of the essential oil of *Pistacia lentiscus* var. Chia, *J Essent Oil Bear Pl*, 16 (6): 714-729.
- Gomaa, C.S., El-Mokhazy, M.A., Halim, F.A., El-Sayyad, A.E. (1978) Flavonoids and iridoids from *Vitex agnus-castus*, *Planta Med*, 33: 277.
- Gowrishankar, S., Duncun Mosioma, N. ve Karutha Pandian, S. (2012) Coral-associated bacteria as a promising antibiofilm agent against methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* biofilms, *J Evid Based Complementary Altern Med*, Article ID 862374, 16 pages.
- Görler, K., Oehlke, B., Soicke, H. (1985) Iridoidführung von *Vitex agnus-castus*, *Planta Med*, 51: 530-531.
- Gregory, G. Laskaris, D. Gourneus, C. ve Eugene K. (1995) Phenolics of *Picnoman acarna*, *J Natural Products*, 58: 1248-1250.
- Gündoğan, N., Ataol, Ö. (2012) Determination of biofilm production and DNase activity of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococci* isolated from meat samples, *Turk Hij Den Biyol Derg*, 69 (3): 135-142.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, *Nat Rev Microbiol*, 2: 95-108.
- Haloui, T., Farah, A., Balouiri, M., Chraibi, M., Fadil, M., Benbrahim, K.F., Alaoui, A.B. (2015) Bacteriostatic and bactericidal profile of leaves and twigs essential oils of Moroccan *Pistacia lentiscus* L., *J Appl Pharm Sci*, 5 (6): 50-53.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *J Appl Microbiol*, 86: 985-990.
- Hänsel, R., Rimpler, H. (1963) Isolierung von Homo-Orientin aus den Blättern von *Vitex agnus-castus* L., *Arch Pharm Chem Life Sci*, 296: 598.
- Hänsel, R., Winde, E. (1959) Agnosid, ein neues Glycosid aus *Vitex agnus-castus* L., *Arzneimittel Forschung*, 9: 189-190.
- Han-Seung, J., Ganesh, Kumar, C., Gun-Chun, P., Ki Tae, K., Seung, R.P., Chung-Soon, C. (2002) Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*, *Process Biochem*, 38: 155-159.
- Harris, L.G., Murray, S., Pascoe, B., Bray, J., Meric, G., Magerios, L., ve de Lencastre, H. (2016) Biofilm morphotypes and population structure among

- Staphylococcus epidermidis* from commensal and clinical samples, *Plos One*, 11 (3): 1-15.
- Hershow, R.C., Khayr, W.F., Smith, N.L. (1992) A comparison of clinical virulence of nosocomially acquired methicillin-resistant and methicillin-sensitive *S. aureus* infections in a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 13: 587-93.
- Herzberg, M.C., Brintzenhofe, K.L., ve Clawson, C.C. (1983) Aggregation of human platelets and adhesion of *Streptococcus sanguis*, *Infect Immun*, 39: 1457-1469.
- Herzberg, M.C., Gong, K., MacFarlane, G.D., Erickson, P.R., Soberay, A.H., Krebsbach, P., Gopalraj, H., Schilling, M. ve Bowen, W.H. (1990) Phenotypic characterization of *Streptococcus sanguis* virulence factors associated with bacterial endocarditis, *Infect Immun*, 58: 515-522.
- Hiramatsu, K. (1998) Vancomycin resistance in *Staphylococci*, *Drug Resist Update*, 1: 135-150.
- Hiramatsu, K., Katayama, Y., Yuzawa, H., Ito, T. (2002) Molecular genetics of methicillin-resistant *S. aureus*, *Int J Med Microbiol*, 292: 67-74.
- Hirobe, C., Qiao Z.S., Takeya, K., Itokawa, H. (1997) Cytotoxic flavonoids from *Vitex agnus-castus*, *Phytochemistry*, 46: 521-524.
- Hoberg, E., Meier, B., Sticher, O. (2001) Quantitative high performance liquid chromatographic analysis of casticin in the fruits of *Vitex agnus-castus*, *Pharm Biol*, 39: 57-61.
- Honda G. Yeşilada E., Tabata M., ve ark. (1996) Traditional medicine in Turkey VI. Folk medicine in West Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın provinces, *J Ethnopharmacol*, 53 (2): 75-87.
- Hosseini, F., Adlgostar, A., ve Sharifnia, F. (2013) Antibacterial activity of *Pistacia atlantica* extracts on *Streptococcus mutans* biofilm, *Int Res J Biol Sci*, 2 (2): 1-7.
- Ian, M.C. (2001) Matrix metallo proteinases protocols. In: John M.W., editor. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; UK: pp. 392.
- Iauk, L., Ragusa, S., Rapisarda, A., Franco, S., Nicolosi V.M. (1996) *In vitro* antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. extracts: preliminary report, *J Chemotherapy*, 8: 207-209.
- Inouye, S., Takizawa, T., Yamaguchi, H. (2001) Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact, *J Antimicrob Chemother*, 47: 565-573.
- ITIS. (2014) <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/n39f57e0cb27f796fb05e27d29f69e5b2> (Erişim tarihi 08.08.2016).
- Izzo, A.A., Di Carlo, G., Bicardi, D., De Fusco, R., Mascolo, N., Borrelli, F. ve Capasso, F. (1995) Biological screening of Italian medicinal plants for antibacterial activity, *Phytotherapy*, 9: 281-286.
- Izzotti, A., Saccà, S.C., Cartiglia, C., De Flora, S. (2003) Oxidative deoxyribonucleic acid damage in the eyes of glaucoma patients, *Am J Med*, 114: 638-646.
- Jayaweera, D.M.A. (1981) Medicinal plant: Part III, Royal Botanic Garden, Peradeniya, Sri Lanka pp. 255.
- Jevons, M.P. (1961) Celbenin resistant *Staphylococci*, *BMJ*, 1: 124-125.
- John, J.K., Simon, P.W., Staub, J.E. (2010) Bitter gourd: Botany, horticulture, breeding, *Horticulture Rev*, 37: 101-141.
- Jones, C.B., Sane, D.C., Herrington, D.M. (2003) Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome, *Cardiovasc Res*, 59: 812-23.

- Jones, N.L., Shabib, S., ve Sherman, P.M. (1997) Capsaicin as an inhibitor of the growth of gastric pathogen, *Helicobacter pylori*, *FEMS Microbiol Lett*, 146 (2): 223-227.
- Kamruzzaman, M., Bari, S.M., Faruque, S.M. (2013) *In vitro* and *in vivo* bactericidal activity of *Vitex negundo* leaf extract against diverse multidrug resistant enteric bacterial pathogens, *Asian Pac J Trop Med*, 16 (5): 352-359.
- Karaca, B., Akata, I, Cihan, A.Ç. (2017) *Lentinus edodes*, *Lactarius delicious* ve *Ganoderma lucidum*'ün antibiyofilm ve antimikrobiyal etkinlikleri, *J Kast Forf*, 17 (4): 660-668.
- Karatas, H., Ertekin, S. (2010) Antimicrobial activities of the essential oils of four *Salvia* species from Turkey, *J Med Plants Res*, 4: 1238-1240.
- Karlsson, A., Saravia-Otten, P., Tegmark, K., Morfeldt, E., ve Arvidson, S. (2001) Decreased amounts of cell wall-associated protein A and fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* sarA mutants due to up-regulation of extracellular proteases, *Infect Immun*, 69: 4742-4748.
- Kavak, D.D., Altıok, E., Bayraktar, O., ve Ülkü, S. (2010) *Pistacia terebinthus* extract: As a potential antioxidant, antimicrobial and possible β -glucuronidase inhibitör, *J Mol Catal B-Enzym*, 64 (3): 167-171.
- Keleş, O., Ak, S., Bakırel, T., Alpınar, K. (2001) Türkiyede yetişen bazı bitkilerin antibakteriyel etkisinin incelenmesi, *Turk J Vet Anim Sci*, 25: 559-565.
- Khalaf, N.A., Shakya, A.K., Al-Othman, A., El-Agbar, Z., ve Farah, H. (2008) Antioxidant activity of some common plants, *Turkish J Biol*, 32 (1): 51-55.
- Khan, M.R., Omoloso A.D. (1998) *Momordica charantia* and *Allium sativum*: broad-spectrum antibacterial activity, *Korean J Pharmacogn*, 29: 155-158.
- Koo, H., Hayacibara, M.F., Schobel, B.D., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Park, Y.K., Vacca-Smith, A.M. ve Bowen, W.H. (2003) Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol, *J Antimicrob Chem*, 52: 782-789.
- Koo, S.P., Bayer, A.S., Sahl, H.G., Proctor, R.A., ve Yeaman, M.R. (1996a) Staphylocidal action of thrombin-induced platelet microbicidal protein is not solely dependent on transmembrane potential, *Infect Immun*, 64: 1070-1074.
- Koo, S.P., Kagan, B.L., Bayer, A.S., ve Yeaman, M.R. (1999) Membrane permeabilization by thrombin-induced platelet microbicidal protein-1 is modulated by transmembrane voltage orientation and magnitude, *Infect Immun*, 67: 2475-2481.
- Koo, S.P., Yeaman, M.R. ve Bayer, A.S. (1996b) Staphylocidal action of thrombin-induced platelet microbicidal protein is influenced by microenvironment and target cell growth phase, *Infect Immun*, 64: 3758-3764.
- Kubo, I., Muroi, H., Kubo, A. (1993) Antimicrobial activity of long-chain alcohol's against *Streptococcus mutans*, *J Agric Food Chem*, 48: 2143-2145.
- Kumar, D.S., Sharathnath, V.K., Yogeswaran, P., Harani, A., Sudhakar, K., Sudha, P., ve ark. (2010) A medicinal potency of *Momordica charantia*, *Int J Pharm Sci Rev Res*, 1 (2): 95-99.
- Kumar, L., Chhibber, S., ve Harjai, K. (2013) Zingerone inhibit biofilm formation and improve antibiofilm efficacy of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Fitoterapia*, 90: 73-78.
- Kumar, R.J., Zi-rong, X. (2004) Biomedical compounds from marine organisms, *Mar Drugs*, 2: 123-146.
- Kunitz, M. (1946) Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor, *J Gen Physiol*, 29 (3): 149-154.

- Kupferwasser, L.I., Yeaman, M.R., Shapiro, S.M., Nast, C.C., ve Bayer, A.S. (2002) *In vitro* susceptibility to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with reduced disease progression and complication rates in experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis: microbiological, histopathologic, and echocardiographic analyses, *Circulation*, 105: 746-752.
- Lambert, E., Dasse, E., Haye, B., Petitfrere, E. (2004) TIMPs as multifacial proteins, *Crit Rev Oncol Hematol*, 49: 187-198.
- Langevelde, P., Dissel, J.T., Ravensbergen, E., Appelmeik, B.J., ve ark. (1998) Antibiotic-induced release of lipoteicoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*; quantitative measurements and biological reactivities, *Antimicrob Agents and Chemother*, 42: 3073-3078.
- Lee, S.Y., Eom, S.H., Kim, Y.K., Park, N.I., Park, S.U. (2009) Cucurbitane-type triterpenoids in *Momordica charantia* Linn, *J Med Plants Res*, 3 (13): 1264-1269.
- Leonard, F.C., ve Markey, B.K. (2008) Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals, *Vet J*, 175 (1): 27-36.
- Liu, J. (2005) Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives, *J Ethnopharmacol*, 100 (1-2): 92-94.
- Loahaprapanon, S., Yincharoen, K., Nukong, J., ve Chanwun, T. (2018) An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of a traditional Thai Herbal Recipe (THR 01) against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Staphylococcus epidermidis*, *Inter J Agricul Technol*, 14 (3): 325-332.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., ve Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 193: 265-275.
- Machado, T.B., Pinto, A.V., Pinto, M.C., Leal, I.C., Silva, M.G., Amaral, A.C., ve ark. (2003) *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Int J Antimicrob Agents*, 21: 279-284.
- Madlener, M. (1998) Differential expression of matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors in acute murine skin wounds, *Arch Der Res*, 290: 24-29.
- Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounis, A.L., Chinou, I.B., Mitaku, S. (1999) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Pistacia lentiscus* var. Chia, *Planta Medica*, 65: 749-752.
- Mahboubi, M., Mahboubi, A. (2014) Antimicrobial activity of *Capparis spinosa* as its usages in traditional medicine, *Herba Pol*, 60 (1):1-10.
- Makhmoor, T., ve Choudhary, M.I. (2010) Radical scavenging potential of compounds isolated from *Vitex agnus-castus*, *Turk J Chem*, 34 (1): 119-126.
- Makino, K., Tomihiko, K., Tsutomu, N., Tomio, I., ve Masaomi K. (1981) Characteristics studies of the extracellular protease of *Listeria monocytogenes*, *J Biol Chem*, 133: 1-5.
- Marner, F.J., Freyer, A., Lex, J. (1991) Triterpenoids from gum mastic, the resin of *Pistacia lentiscus*, *Phytochemistry*, 30: 3709-3712.
- Martinez, M.J., Betancourt, J., Alonso-Gonzales, N., ve Jauregui, A. (1996) Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity, *J Ethnopharmacol*, 52: 171-174.
- Mary, R.N.I., Banu, N. (2012) Inhibition of antibiofilm mediated virulence factors production in urinary pathogen *Serratia marcescens* by *Vitex trifolia*, *Int J Sci Res*, 3 (8): 1972-1974.

- Mary, R.N.I., Banu, N. (2015) Screening of antibiofilm and anti-quorum sensing potential of *Vitex trifolia* in *Pseudomonas aeruginosa*, *Int J Pharm Pharm Sci*, 7 (8): 242-245.
- Mazzanti, G., Mascellino, M.T., Battinelli, L., Coluccia, D., Manganaro, M., ve Saso L. (2000) Antimicrobial investigation of semipurified fractions of *Ginkgo biloba* leaves, *J Ethnopharmacol*, 71: 83-88.
- McAleese, F., Walsh, E., Sieprawska, M., Potempa, J., ve Foster, T. (2001) Loss of clumping factor B fibrinogen binding activity by *Staphylococcus aureus* involves cessation of transcription, shedding and cleavage by metalloprotease, *J Biol Chem*, 276: 29969-29978.
- McGavin, M., Zahradka, C., Rice, K., ve Scott, J. (1997) Modification of the *Staphylococcus aureus* fibronectin binding phenotype by V8 protease, *Infect Immun*, 65: 2621-2628.
- Melanie, T., Jaejoon, H., Stephane, C., ve Monique, L. (2009) Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhi, *Food Control*, 20 (12): 1073-1079.
- Menczel, E. (1963) Hypoglycemic substances, *Bull Res Council Israel Sector*, 102: 235-236.
- Migliore, L., Coppedè, F. (2002) Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases, *Mutat Res*, 512: 135-153.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., ve Milner, A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin Sci* (London, England: 1979), 84 (4): 407-412.
- Moghadam, M.S., Maleki, S., Darabpour, E., Motamedi, H., Nejad, S.M.S. (2010) Antibacterial activity of eight Iranian plant extracts against methicillin and cefixime resistant *Staphylococcus aureus* strains, *Asian Pac J Trop Biomed*, 3 (4): 262-265.
- Morgan, M. (2008) Methicillin-resistant *S. aureus* and animals: zoonosis or humanosis? *J Antimicrob Chemother*, 62: 1181-1187.
- Morita, M.M. (1993) Methicillin-resistant *S. aureus*: past, present and future, *Nurs Clin North Am*, 28: 625-637.
- Much, H. (1908) Uber eine vorstufe des fibrinfermentes in kulturen von *Staphylokokkus aureus*, *Biochem*, 14: 143-155.
- Mulligan, M.E., Murray, K.A., Standiford, H.C., John, J.F., Kauffman, C.A., Yu, V.L. (1993) Methicillin-Resistant *S. aureus*: A consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management, *Am J Med*, 94: 313-328.
- Namasivayam, S.K.R. ve Roy E.A. (2013) Antibiofilm effect of medicinal plant extracts against clinical isolate of biofilm of *Escherichia coli*, *Int J Pharm Pharm Sci*, 5 (2): 486-489.
- Nascimento, G.G.F., Lacatelli, J., Freitas, P.C., ve Silva, G.L. (2000) Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria, *Braz J Microbiol*, 31 (4): 247-256.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (1997) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved Standard M7-A4, Wayne PA.
- Nissinen, L., Kahari, V.M. (2014) Matrix metalloproteinases in inflammation, *Biochim Biophys Acta*, 1840: 2571-2580.

- Omar, S.H. (2010) Oleuropein in olive and its pharmacological effects, *Sci Pharm*, 13: 133-154.
- Ozusaglam, M.A., ve Karakoca, K. (2013) Antimicrobial and antioxidant activities of *Momordica charantia* from Turkey, *Afr J Biotechnol*, 12 (13): 1548-1558.
- Packiavathy, I.A.S.V., Agilandeswari, P., Ramaswamy, R.P., Pandian, S.K., Ravi, A.V. (2011) Antiquorum sensing and antibiofilm potential of *Capparis spinosa*, *Arch Med Res*, 45: 85-92.
- Packiavathy, I.A.S.V., Agilandeswari, P., Musthafa, K.S., Pandian, S.K., Ravi, A.V. (2012) Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens, *Food Res Int*, 45: 85-92.
- Patra, J.M., Panda, S.S. Pattanayak B., ve ark. (2015) Validations of tribal claims on *Vanda tessellate* (Roxb.) Hook. Ex G. Don., *Vitex negundo* L. and *Holarrhena antidysenterica* Wall.Ex.A.Dc. through phytochemical screening and antibacterial activity, *Int J Pharm Biol Sci*, 6 (8): 593-599.
- Peacock, S. (2006) *S. aureus*, 73-98, John Wiley & Sons Ltd, England. 605.
- Petit, P.R., Sauviaire, Y.D., Hillaire-Buys, D.M., Leconte, O.M., Baissac, Y.G., ve ark. (1995) Steroid saponins from fenugreek seeds: extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol, *Steroids*, 60(10): 674–680.
- Pichare M.M., ve Kachole M.S. (1996) Protease inhibitors of Pigeon pea (*Cajanus cajan*) and its wild derivatives, *Physiol plantarum*, 98: 845-851.
- Piozzi, A., Francolini, I., Occhiaperti, L., Di Rosa, R., Ruggeri, V., Donelli, G. (2004) Polyurethanes loaded with antibiotics: influence of polymer-antibiotic interactions on *in vitro* activity against *Staphylococcus epidermidis*, *J Chemotherapy*, 16: 446-452.
- Poutaraud, A., ve Girardin, P. (2005) Improvement of medicinal plant quality: a *Hypericum perforatum* literature review as an example, *Plant Genet Resour*, 3 (2): 178-189.
- Poyrazoglu, E., Biyik, H., Uzun, C. (2009) Investigation of antimicrobial activity of some natural plants which are not-cultivated and are sold at bazaars in Aydin vicinity, *Int J Nat Eng Sci*, 3: 54-57.
- Praveen K.P., Kumaravel, S., ve Lalitha, C. (2010) Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negundo*, *Afr J Biochemistry Res*, 4 (7): 191-195.
- Proestos, C., Boziaris I.S., Nychas J.E., ve ark. (2006) Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity, *Food Chem*, 95 (4): 664-671.
- Pulaj, B., Mustafa, B., Nelson, K., Quave, C.L., ve Hajdari, A. (2016) Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of *Pistacia terebinthus* essential oils derived from wild populations in Kosovo, *BMC Complem Altern M*, 16 (147): 1-9.
- Rabe, T., ve Staden, J. (1997) Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes, *J Ethnopharmacol*, 56: 81-87.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Desphande, V.V. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 62: 597-635.
- Ribes, G., Sauvaire, Y., Da-Costa, C., Baccou, J.C., Loubatieres, M.M. (1986) Antidiabetic effects of subfractions from fenugreek seeds in diabetic dogs, *P Soc Exp Biol Med*, 182 (2): 159-166.

- Rich, M. (2005) *Staphylococci* in animals: prevalence, identification and antimicrobial susceptibility, with an emphasis on methicillin-resistant *S. aureus*, *Brit J Biomed Sci*, 62: 98-105.
- Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., ve Tiwari V. (2018) Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action, *Virulence*, 9 (1): 522–554.
- Ru, J., Li, P., Wang, J., Zhou, W., Li, B., Huang, C., Li, P., Guo, Z., Tao, W., Yang, Y., Xu, X., Li, Y., Wang, Y., ve Yang, L. (2014) TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines, *J Cheminformatics*, 6: 13.
- Saad, M.A., Rahmad, O., Salman, I., ve ark. (2014) Antibiofilm activity, compound characterization, and acute toxicity of extract from a novel bacterial species of *Paenibacillus*, *Int J Microbiol*, Volume 2014, Article ID 649420, 11 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/649420>.
- Saeed, M.K., Shahzadi, I., Ahmad, I., ve ark. (2010) Nutritional analysis and antioxidant activity of bitter melon (*Momordica charantia*) from Pakistan, *Pharmacology Online*, 1: 252-260.
- Sağlam, H., Pabuçcuoğlu, A., ve Kıvçak, B. (2007) Antioxidant activity of *Vitex agnus-castus* L. extracts, *Phytother Res*, 21 (11): 1059-1060.
- Sarah, J.C., Neil, R.W., Abigail, K.P.H., David, R.S., George, P.C.S. (2006) Metabolic and regulatory engineering of *Serratia marcescens* mimicking phage-mediated horizontal acquisition of antibiotic biosynthesis and quorum-sensing capacities, *Microbiology*, 152: 1899-1911.
- Sargin, S.A., Akçiçek, E., Selvi, S. (2013) An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Alaşehir (Manisa) in Turkey, *J Ethnopharmacol*, 150 (3): 860-874.
- Schlegelova, J., Babak, V., Holasova, M., Dendis, M. (2008) The biofilm-positive *Staphylococcus epidermidis* isolates in raw materials, foodstuffs and on contact surfaces in processing plants, *Folia Microbiol*, 53 (6): 500-504.
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin, A.C. (2007) Macro- and microdilution methods of antimicrobial susceptibility testing. In: Schwalbe R, editor. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*, Florida, Fla, USA: AC: CRC Press Taylor and Francis Group. pp. 76-9.
- Sharma, R.D, Sarkar, A., Hazra, D.K. (1996) Hypolipidaemic effect of fenugreek seeds: a chronic study in non-insulin dependent diabetic patient, *Phytother Res*, 10: 332-334.
- Sharma, R.D. (1986) Effect of fenugreek seeds and leaves on blood glucose and serum insulin responses in human subject, *Nutr Res*, 6: 1353-1364.
- Shorr, AF. (2007) Epidemiology of staphylococcal resistance, *Clin Infect Dis*, 45 (3): 171-176.
- Singh, G., Marimuthu, P., Heluani, D.S.C., ve Catalan, A.N.C. (2007) Chemical constituents, antioxidative and antimicrobial activities of essential oil and oleoresin of tailed pepper (*Piper cubeba* L), *Int J Food Eng*, 3 (11): 1-22.
- Singh, P.K., Schaefer, A.L., Parsek, M.R., Moninger, T.O., Welsh, M.J., Greenberg, E.P. (2000) Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms, *Nature*, 407:762-764.
- Sirait, M., Rimpler, H., Hänsel, R. (1962) Flavonoide aus *Vitex agnus-castus* L., *Experientia*, 18: 72.
- Sivaranjani, M., Prakash, M., Gowrishankar, S., Rathna, J., Pandian, S.K. ve Ravi, A.V. (2017) *In vitro* activity of alpha-mangostin in killing and eradicating

- Staphylococcus epidermidis* RP62A biofilms, *Appl Microbiol Biotechnol*, 101: 3349-3359.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., ve Arsenakis, M. (1996) Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils, *J Agric Food Chem*, 44: 1202-1205.
- Skindersoe, M., Epstein, E.P., Rasmussen, T.B., Bjarnsholt, T., de Rocky N., Givskov, M. (2008) Quorum sensing antagonism from marine organisms, *Mar Biotechnol*, 10: 56-63.
- Słoczyńska K., Powroźnik, B., Pękala, E., Waszkielewicz, A.M. (2014) Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action, *J Appl Genet*, 55 (2): 273-285.
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (1986) (Ed): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore USA, 1000-1080.
- Söyler D. (2016) <http://www.kebere.com/> (Erişim tarihi. 21.07.2016).
- Spoering, A.L., ve Lewis, K. (2001) Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials, *J Bacteriol*, 183: 6746-6751.
- Srinivasan, K. (2006) Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): A review of health beneficial physiological effects, *Food Rev Int*, 22 (2): 203-224.
- Srivastava, J., Lambert, J., Vietmeyer, N. (1996) Medicinal plants. An expanding role in development, World Bank Technical Paper, 320: Washington.
- Stark, A., ve Madar. Z. (1993) The effect of an ethanol extract derived from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) on bile acid absorption and cholesterol levels in rats, *Brit J Nutr*, 69 (1): 277-287.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., SvabicVlahovic, M. (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation, *J Microbiol Meth*, 40: 175-179.
- Stojkovic, D., Sokovic, M., Glamoclija, J., Dzamic, A., Ciric, A., Ristic, M., Grubisic, D. (2011) Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils, *Food Chemistry*, 128: 1017-1022.
- Stojkovic, D., Sokovic, M.D., Glamoclija, J., Dzamic, A., Ristic, M., Fahal, A., Khalid, S., Djujic, I., ve Petrovic, S. (2008) Susceptibility of three clinical isolates of *Actinomodura madurae* to alpha-pinene, the bioactive agent of *Pinus pinaster* turpentine oil, *Arch Biol Sci*, 60: 697-701.
- Suttie, J.M. (2016) <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/Gbase/data/pf000412.htm> (Erişim Tarihi 09.08.2016).
- Tamilvanan, S., Venkateshan, N., Ludwig, A. (2008) The potential of lipid- and polymer-based drug delivery carriers for eradicating biofilm consortia on device-related nosocomial infections, *J Control Release*, 128: 2-22.
- Tarai, B., Das, P., ve Kumar, D. (2013) Recurrent challenges for clinicians: emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin resistance, and current treatment options, *J Lab Physicians*, 5 (2): 71-78.
- Tawde, S. (1961) Isolation and partial characterisation of red gram (*Cajanus cajan*) trypsin inhibitor, *Ann Biochem Exp Med*, 21: 359-366.
- Thati, V., Shivannavar, C.T., Gaddad, S.M. (2011) Vancomycin resistance among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from intensive care units of tertiary care hospitals in Hyderabad, *Indian J Med Res*, 134: 704-708.

- Thompson, R.L., Cabezudo, I., Wenzel, R.P. (1982) Epidemiology of nosocomial Infections caused by Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Ann Intern Med*, 97: 309-317.
- Tin, B., Kurtoğlu, C., Sevindik, E. (2017) Evaluation of Chemical Composition of *Vitex agnus-castus* (Verbenaceae) Fruits Essential Oils Grown in Aydın/Turkey, *Turk J Life Sci*, 2 (2): 171-174.
- Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkçü, C., Öztürk, M., Ulubelen, A. (2007) A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*, *Food Chem*, 103: 816-822.
- Triveni, A.G., Mendem, S.K., Shivnavar, C.T., ve Gaddad, S.M. (2016) The antibacterial activity of *Vitex negundo* leave extract against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Int J Pharma Bio Sci*, 6 (3): 55-59.
- Tubives. (2016) http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=5276 (Erişim Tarihi 08.08.2016).
- Tunon, H., Olavsdotter, C., ve Bohlin, L. (1995) Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF- induced exocytosis, *J Ethnopharmacol*, 48: 61-76.
- Turkcan, O. (2013) *Bazı siyanobakteriyel türlerin ve pigmentlerinin biyolojik aktivitelerinin saptanması*, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Muğla.
- Ulubelen, A., Topcu, G., Eris, C., ve ark. (1994) Terpenoids from *Salvia sclarea*, *Phytochemistry*, 36: 971-974.
- Upadhyay, A., Upadhyay, I., Kollanoor-Johny, A., ve Venkitanarayanan, K. (2013) Antibiofilm effect of plant derived antimicrobials on *Listeria monocytogenes*, *Food Microbiol*, 36: 79-89.
- Vats, V., Grover, J.K., ve Rath, S.S. (2002) Evaluation of anti-hyperglycemic and hypoglycemic effect of *Trigonella foenum-graecum* Linn, *Ocimum sanctum* Linn and *Pterocarpus marsupium* Linn. in normal and alloxanized diabetic rats, *J Ethnopharmacol*, 79 (1): 95-100.
- Vijayakumar, R., Gani, S.S.A., Mokhtar, N.F. (2017) Anti-elastase, anti-collagenase and antimicrobial activities of the underutilized red pitaya peel: an *in vitro* study for anti-aging applications, *Asian J Pharm Clin Res*, 10 (8): 251-255.
- Visse, R., Nagase, H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry, *Circ Res*, 92: 827-39.
- Wagh, P., Rai, M., Deshmukh, S.K., ve Durate, M.C.T. (2007) Bio-activity of oils of *Trigonella foenum-graecum* and *Pongamia pinnata*, *Afr J Biotechnol*, 6 (13): 1592-1596.
- Weese, J.S., Caldwell, F., Willey, B.M., Kreiswirth, B.N., McGeer, A., Rousseau, J., Low, D.E. (2006) An outbreak of methicillin-resistant *S. aureus* skin infections resulting from horse to human transmission in a veterinary hospital, *Vet Microbiol*, 114: 160-164.
- Wertheim, H., Melles, D., Vos, M., Leeuwen, W., Belkum, A., Verbrugh, H., Nouwe, J. (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections, *Lancet Infect Dis*, 5: 751-762.
- Wilkins, M., Hall-Stoodley, L., Allan, R.N., ve Faust, S.N. (2014) New approaches to the treatment of biofilm-related infections, *J Infect*, 69: 47-52.
- Wollenweber E., Mann, K. (1983) Flavonols from fruits of *Vitex agnus-castus*, *Planta Med*, 47: 126-127.

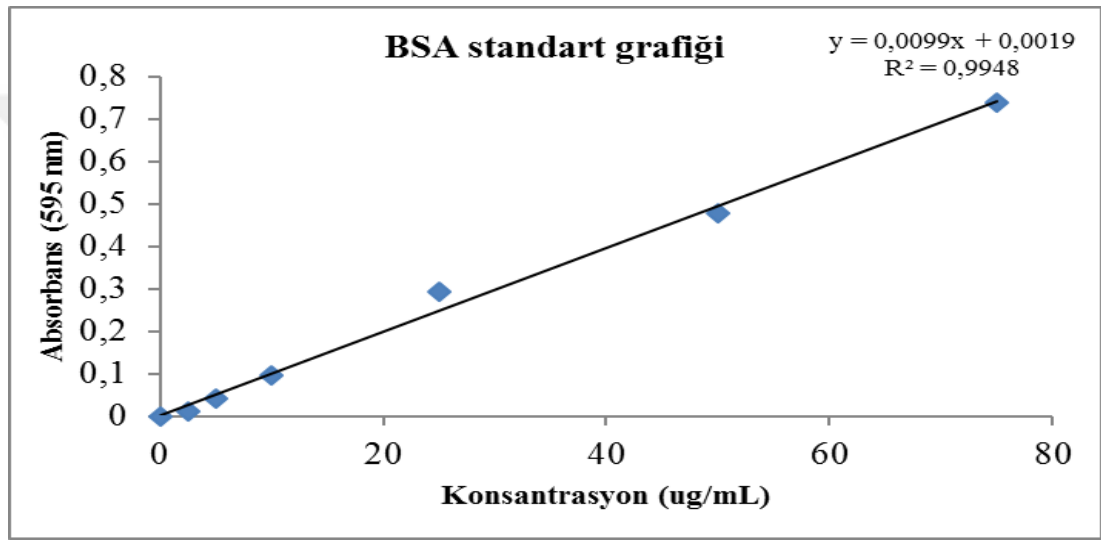
- Wu, C., ve Whitaker, J.R. (1990) Purification and partial characterization of four trypsin/chymotrypsin inhibitors from red kidney beanst *Phaseolus vulgaris var. Linden*, *J Agric Food Chem*, 38: 1523-1529.
- Wu, H., Moser, C., Wang, H.Z., Hoiby, N., Song, Z.J. (2015) Strategies for combating bacterial biofilm infections, *Int J Oral Sci*, 7: 1-7.
- Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., ve ark. (2004) Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice, *J Antimicrob Chem*, 53 (6): 1054-1061.
- Wu, T., Yeaman, M.R., ve Bayer, A.S., (1994) *In vitro* resistance to platelet microbicidal protein correlates with endocarditis source among bacteremic *Staphylococcal* and *Streptococcal* isolates, *Antimicrob Agents Chemother*, 38: 729-732.
- Xiong, Y.Q., Bayer, A.S., ve Yeaman, M.R. (2002) Inhibition of intracellular macromolecular synthesis in *Staphylococcus aureus* by thrombin-induced platelet microbicidal proteins, *J Infect Dis*, 185: 348-356.
- Xiong, Y.Q., Yeaman, M.R., ve Bayer, A.S. (1999) *In vitro* antibacterial activities of platelet microbicidal protein and neutrophil defensin against *Staphylococcus aureus* are influenced by antibiotics differing in mechanism of action, *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 1111-1117.
- Yaşar, S., Ceviz, A.U., ve Karatepe, Y. (2016) *Laurus nobilis*, *Vitex agnus-castus* ve *Tamarix parviflora* türlerinin kimyasal içeriği ve fenolik ekstraktiflerinin incelenmesi. *SDÜ Fen Bil Enst Der*, 20 (2): 182-187.
- Yeaman, M.R., Bayer, A.S., Koo, S.P., Foss, W., ve Sullam, P.M. (1998) Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the *Staphylococcus aureus* cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action, *J Clin Invest*, 101: 178-187.
- Yeaman, M.R., Tang, Y.Q., Shen, A.J., Bayer, A.S., ve Selsted, M.E. (1997) Purification and *in vitro* activities of rabbit platelet microbicidal proteins, *Infect Immun*, 65: 1023-1031.
- You, J., Xue, X., Cao, L., ve ark. (2007) Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66, *Appl Microbiol Biotechnol*, 76: 1137-1144.
- Zetola, N., Francis, J.S., Nuermberger, E.L., Bishal, W.R. (2005) Community acquired meticillin-resistant *S. aureus*: an emerging threat, *Lancet Infect Dis*, 5: 275-286.
- Zohary, M., (1960) The spesces of *Capparis* in the Mediterranean and the Near Eastern Countries, *Bull Res Coun Israel*, 8: 49-64.

EKLER

EK A

BSA standart eğrisinin hazırlanması

Protein miktarının belirlenmesinde standart olarak BSA kullanılmıştır. BSA stok solüsyonu 0,2 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Protein miktar tayini için kullanılmıştır.

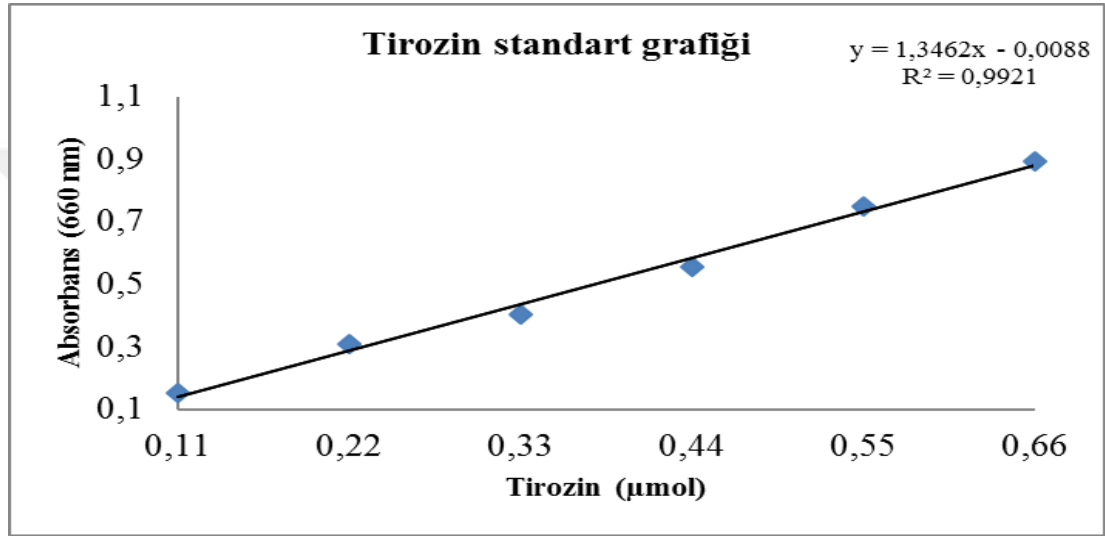


Şekil 2.6. BSA standart eğrisi

EK B

Tirozin standart eğrisinin hazırlanması

1,1 mM L-Tirozin çözeltisi için, 100 mL steril distile suya 0,0199 g L-Tirozin eklendikten sonra hafifçe ısıtılarak çözünmesi sağlanmıştır. Protein miktar tayini için kullanılmaktadır.



Şekil 2.7. Tirozin standart eğrisi

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı : Mustafa VURKUN
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul -02.08.1991
Medeni Hali : Bekar
Telefon : 5455379837
E-posta : mustafavurkun91@gmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Türk Kızılayı Kartal Lisesi	2010
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2015
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2018

Bilimsel Faaliyetler

A. MAKALELER

A-1. Gulden Okmen, **Mustafa Vurkun**, Ali Arslan, Olcay Ceylan. 2017. The antibacterial activities of *Piper nigrum* L. against mastitis pathogens and its antioxidant activities. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. 51(3):170-175. (SCI-E)

A-2. Ahmet Sadan Okmen, Gulden Okmen, Ali Arslan, **Mustafa Vurkun**. 2017. Antibacterial activities of *Mentha piperita* L. extracts against bacteria isolated from soccer player's shoes and its antioxidant activities. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. 51(3):163-169. (SCI-E)

A-3. Gülten Ökmen, Ali Arslan, **Mustafa Vurkun**, Mahabbat Mammadkhanli, Olcay Ceylan. 2017. Farklı baharatların antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi. (15)1: 16-28.

A-4. Gulden Okmen, Mahabbat Mammadkhanli and **Mustafa Vurkun**. 2018. The antibacterial activities of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry against oral bacteria and its antioxidant and antimutagenic activities. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 9(11): 4634-4641. (E-SCI)

B. BİLDİRİLER

B-1. Gülten Ökmen, Haldun Çakar, Ali Arslan, **Mustafa Vurkun**, Mehebbet Memmedhanlı. *Ribes nigrum* L' in biyolojik aktiviteleri üzerine bir çalışma. III Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu. Antalya, 4-6 Ekim 2016 (*poster sunum*).

B-2. Gulden Ökmen. Haldun Çakar, Ali Arslan, **Mustafa Vurkun**, Mehebbet Memmedhanlı. *Mentha piperita'* nin oral patojenlere karşı antibakteriyel ve antioksidan aktivitesi. III Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu. Antalya, 4-6 Ekim 2016 (*poster sunum*).

B-3. Gulden Ökmen, Haldun Çakar, Ali Arslan, **Mustafa Vurkun**, Mehebbet Memmedhanlı. *Origanum majorana* L.' nin mastitis patojenlerine karşı antibakteriyel aktivitesi ve antioksidan aktivitesi. III Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu. Antalya, 4-6 Ekim 2016 (*sözlü sunum*).

B-4. Gulden Ökmen, Haldun Çakar, Ali Arslan, **Mustafa Vurkun**, Mehebbet Memmedhanlı. Oral patojenlere Karşı *Lavandula angustifolia* Mill' in *in vitro* antibakteriyel aktivitesi ve antioksidan aktivitesi. III Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu. Antalya, 4-6 Ekim 2016 (*sözlü sunum*).

B-5. Gulden Okmen, **Mustafa Vurkun**, Ali Arslan, Olcay Ceylan. The antibacterial activities of *Piper nigrum* L. against mastitis pathogens and its antioxidant activities. 3rd Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. April, 13-16, 2017 / Girne – T.R.N.C. (*poster sunum*).

B-6. Ahmet Sadan Okmen, **Mustafa Vurkun**, Gulden Okmen, Ali Arslan. Antibacterial activities of *Mentha piperita* L. extracts against bacteria isolated from soccer player's shoes and its antioxidant activities. 3rd Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. April, 13-16, 2017 / Girne – T.R.N.C. (*poster sunum*).

B-7. Duygu Bayrak, Gülten Ökmen, Ali Arslan, **Mustafa Vurkun**. The biological activities of *Lavandula stoechas* L. against food pathogens. 1st International Congress on Medicinal and Aromatic Plants. 10-12 May 2017, Konya. (*poster sunum*).

B-15. Neslihan Balpınar, Gulden Okmen, **Mustafa Vurkun**. Antibacterial and antioxidant activities of *Vitex agnus-castus* L. against mastitis pathogens. International Conference on Science and Technology. 5-9 Eylül 2018, Prizren – Kosova (*sözlü sunum*).

B-16. Neslihan Balpınar, Gulden Okmen, **Mustafa Vurkun**. The antimicrobial activities of *Ocimum basilicum* L. against mastitis bacteria and its antioxidant activity. International Conference on Science and Technology. 5-9 Eylül 2018, Prizren – Kosova (*sözlü sunum*).

C. PROJELER

C-1. Gulden Okmen, **Mustafa Vurkun** (Araştırmacı) Metisilin dirençli *S. aureus'* a karşı farklı bitkilerin antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitelerinin belirlenmesi ve farmasötik açıdan önemli proteazlara karşı bitki inhibitörlerinin etkileri. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, Proje No: 17/071 (*biten proje*).

