

Kara dut (*Morus nigra* L.)'un antikandidal aktivitesi (*)

Anticandidal activity of black mulberry (*Morus nigra* L.)

Nimet Yiğit¹, Demet Yiğit², Ufuk Özgen³, A.Esin Aktaş⁴

Atatürk Üniversitesi ¹Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvar Bölümü, ²Erzincan Eğitim Fakültesi, Fen Bilimleri Eğitimi, ³Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı ⁴ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İletişim / Correspondence: Nimet Yiğit Adres / Address: Atatürk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Tıbbi Laboratuvar Bölümü Aziziye Araştırma Hastanesi Binası Erzurum Tel: 0 442 3166333/2430 Fax: 04423156044 Gsm: 0533 4678717
E-mail: nnimyigit@e-kolay.net - nimyigit@hotmail

ÖZET

Bu çalışmada kara dut (*Morus nigra* L.) meyvelerinin su ve metanol ekstralarının antikandidal aktivitesi araştırılmıştır. Meyveler Erzincan bölgesinden toplanmıştır. Ekstrelerin antikandidal aktivitesi klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerine karşı (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida guilliermondii*, *Geotricum candidum*) disk difüzyon yöntemi ile değerlendirilmiş ve minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, su ve metanol ekstralarının *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *Geotricum candidum* izolatları üzerinde antikandidal aktiviteleri belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ekstraksiyon, *Morus nigra* L., antikandidal aktivite.

SUMMARY

In this study, aqueous and methanol extracts of the fruits of black mulberry (*Morus nigra* L.) were investigated for their *in vitro* anticandidal activities. The fruits were collected from Erzincan region. The anticandidal activity of extracts against some clinical isolates of *Candida* spp. (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida guilliermondii*, *Geotricum candidum*) were evaluated based on inhibition zone using the disc-diffusion assay, minimal inhibition concentration (MIC) values. As a result of this study, water and methanol extracts of *Morus nigra* L. demonstrated anticandidal activity against *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *Geotricum candidum* isolates.

Key Words: Extraction, *Morus nigra* L., anticandidal activity.

GİRİŞ

Dünya nüfusunun giderek artması, beslenmede dengesizlik ve endüstriyel alanların giderek gelişmesi sonucu sağlıkla ilgili sorunlar da giderek artmıştır. Günümüzde bilim ve teknolojiye büyük ilerlemelere rağmen doğal kaynakların bilinçsizce tüketimi ve karşılaşılan ekonomik güçlükler, doğal kaynakların çok amaçlı kullanımlarını zorunlu kılmıştır. Diğer taraftan enfeksiyöz hastalıklarla mücadelede bugüne kadar geliştirilen doğal ve sentetik antibiyotiklerin mikroorganizmaların direnç kazanmaları sonucu etkisiz kalmaları ve çeşitli yan etkilerinin bulunması tıp ilmini yeni ve değişik antimikrobial maddeler keşfetmek

için doğaya yöneltmiştir. Tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen bitkisel ilaç hammaddeleri üzerinde yapılan çalışmalar önem kazanmıştır. Buna bağlı olarak da günümüzde çeşitli hastalıkların tedavisinde bitkilerden elde edilen doğal kaynaklı ilaçların kullanımı da ciddi ölçüde artmıştır (1-3).

Kara dut (*Morus nigra* L.) ülkemizde çok bilinen ve hemen hemen her yerde yetişen bir meyvedir. Vatanı Türkistan olan dut, batıda İran, Irak, Türkiye, Akdeniz ülkelerinden Avrupa'ya ve doğuda Çin'e kadar çok geniş bir alana yayılmıştır (4,5).

Morus nigra L. 10-15m boyunda kalın dallı geniş tepeli bir ağaçtır. Gövdeleri esmer gri renk-

(*) XVI.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı BİHAT (Haziran 2006, Erzurum) sunulmuştur.

te sürgünleri tüylüdür. Esmer gri renkli kabuk kalın ve uzunlamasına çatlaktır. Yapraklarını döken bir ağaçtır. Yapraklar geniş yumurta biçiminde 6-12cm boyundadır. Yaprak uçları kısa damla dip kısım derin yürek şeklindedir. Kenarları kaba dişli genelde parçalıdır (4,5).

Çiçekleri bir veya iki evcikli erkek çiçeklerin çoğu bir araya toplanmış saplı ve başak kuruluşunda, dişi çiçekler de başak kuruluşunda fakat daha kısa ve yumru görünüşünde kısa saplı ya da dal dala oturuş durumdadır. Çiçek yaprakları tüylü, yumurtalık yuvarlakça yumurta biçiminde tepelik uzun tüylüdür. Olgunlaşmaya başlayan meyve parlak kırmızı, tam olgunlaşmış meyve siyah renklidir (4,5).

Bitkinin yaprak ve kök kabuklarının çayı, meyvelerin ise reçel ve şurubu yapılırlar veya kurutulularak kurusu yenir.

Halk arasından kök kabuğu ateş düşürücü özelliğe sahip olduğundan çay olarak kullanılmaktadır. Yaprakları ve kökleri tenya düşürücü, idrar söktürücü ve kan şekeri düzenleyici olarak kullanılır. Meyve ve meyvelerden hazırlanan marmelat şurup ve pekmez özellikle bademcik iltihaplarının giderilmesinde, ağız ve diş yaralarının iyileştirilmesinde kullanılır. Özellikle de çocuklarda pamukçuk olarak bilinen ve *Candida* türü mikroorganizmaların sebep olduğu infeksiyonların iyileştirilmesinde kullanılır (4,5).

Bu çalışmada kara dut meyvelerinden elde edilen su ve metanol ekstralarının çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* türleri üzerindeki antikandidal etkisi araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada; 20 *C.albicans*, 8 *C.glabrata*, 8 *C.tropicalis*, 8 *C.Parapsilosis*, 8 *C.pseudotropicalis*, 8 *C.krusei*, 6 *C.kefyr*, 6 *C.guilliermondii* ve 4 *Geotrichum candidum* suşu olmak üzere toplam 76 *Candida* suşu kullanılmıştır. Standart suş olarak ise *C.albicans* ATCC 90028, *C.parapsilosis* ATCC 22019, *C.krusei* ATCC 6258 suşları kul-

lanılmıştır. *Candida* türlerine ait suşlar Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda değişik klinik örneklerden izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Çalışmada kullanılan *Candida* türleri ve izole edildikleri klinik örnekler Tablo 1 de gösterilmiştir.

Değişik klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin tanımlanması, germ tüp oluşturma, Tween 80'li mısır unlu jeloz besiyerinde hif, pseudo-hif, blastospor ve klamidospore araştırılması ve APİ 20C AUX identifikasyon sistemi kullanılarak yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan kara dut (*Morus nigra* L) meyveleri Erzincan yöresinden toplanmıştır. Meyveler oda ısısında kurutulmuş ve öğütülerek toz haline getirilmiştir.

Kara dut meyveleri öğütülerek toz haline getirdikten sonra su ve metanol ekstraları elde edilmiştir. Toz haline getirilen meyvelerden 20 gram tartılarak 200 cc su ve metanol içerisinde 5 saat süre ile geri çeviren soğutucuda ekstre edilmiştir. Ekstreler süzülerek evaporatörde basınç altında 40 °C de su ve metanol uçurularak yoğunlaştırılmış liyofilizasyon cihazı ile liyofilize edilmiştir. Bu ekstralar Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognosi Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Çalışmada ekstraların antikandidal aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Ekstrelerden su ve metenolle çözülerek 30 mg/ml konsantrasyon hazırlanmış ve 6 mm çaplı steril kağıt disklerle emdirilmiş ve çözgen maddelerin uzaklaştırılması sağlanarak çalışmada kullanılan diskler hazırlanmıştır.

Çalışmada kullanılan *Candida* türlerine ait suşların Sabouraud Dextrose Agar (SDA) besiyerlerinde 48 saatlik kültürlerinden serum fizyolojik içerisinde MacFarland 0.5 bulanıklık eşeline eşdeğerde süspansiyonlar hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlar SDA besiyerlerine ekilerek yayılmasını sağlamak için bir süre beklenmiş ve diskler besiyerine yerleştirilmiştir. 24 ve 48 saatlik inkü-

basyodan sonra inhibisyon zon çapı oluşup oluşmadığı kontrol edilmiş ve oluşan zon çapları ölçülerek kaydedilmiştir. Pozitif kontrol olarak amfoterisin B içeren ticari diskler ve negatif kontrol olarak da metanol ve su içeren diskler kullanılmıştır (6).

Çalışmada minimal inhibisyon konsantrasyonun (MİK) belirlenmesi için disk difüzyon yönteminde aktivite belirlenen suşların Sabouraud Dekstroz Buyyon besiyerinde (SDB) taze kültürleri ve MacFarland 0,5 bulanıklık eşeline eşdeğerde süspansiyonları hazırlanmıştır. Meyve ekstralarının SDB içerisinde bir seri dilüsyonları (0,075-10 mg/ml) hazırlanmıştır. MİK değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir (7).

BULGULAR

Çalışmada kullanılan *Candida* türleri ve izole edildikleri klinik örnekler Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *Candida* türleri ve izole edildikleri klinik örnekler.

<i>Candida</i> Türleri	Kan	İdrar	Balgam	CAPD sıvısı	Ağız	yara
<i>C.albicans</i>	10	5	-	-	2	3
<i>C.glabrata</i>	1	4	2	-	-	1
<i>C.tropicalis</i>	5	1	-	-	2	-
<i>C.pseudotropicalis</i>	2	3	-	-	-	3
<i>C.parapsilosis</i>	5	1	1	-	1	-
<i>C.krusei</i>	-	3	1	1	-	3
<i>C.guilliermondii</i>	-	5	-	1	-	-
<i>C.kefyr</i>	3	2	1	-	-	-
<i>Geotricum candidum</i>	1	-	1	-	-	2

Çalışma sonucunda kara dut (*Morus nigra* L.)’un su ve metanol ekstralarının *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C.tropicalis* ve *Geotricum candidum* türlerine ait suşlar üzerinde antikandidal aktivitesi belirlenmiştir. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda zon çaplarında değişiklik kaydedilmemiştir. Sonuçlar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kara dut ekstralarının *Candida* türlerine antifungal etkisi.

<i>Candida</i> türleri	Inhibisyon zonu (mm)		MIC (mg/ml)	
	Su ekstresi	Metanol ekstresi	Su ekstresi	Metanol ekstresi
<i>C. albicans</i>	21	25	2,5	1,25
<i>C.parapsilosis</i>	15	20	5	2,5
<i>C.tropicalis</i>	17	18	5	2,5
<i>Geotricum candidum</i>	9	9	1,25	0,625
<i>C.albicans</i> ATCC 90028	20	23	2,5	1,25

TARTIŞMA

Tıbbi bitkiler ile tedavi geleneği binlerce yıldır Anadolu’da devam etmektedir. Bu bitkilerin bir kısmı ekstre ve yağ olarak kullanılırken, bir kısmı da çiğ ve işlenmiş olarak yenilmektedir. İlaçla tedaviye alternatif olarak doğal tedavi günümüzde de süregelmektedir (4,5).

Kara dut (*Morus nigra* L) Anadolu’da oldukça yaygın olarak tüketilen bir meyvedir. Bitkinin meyveleri olgunlaştıktan sonra toplanır ya kurutulur kışa saklanır ya şurubu yapılır yada yenir. Yaprak ve kök kabukları kurutulduktan sonra porselen kaplar içinde muhafaza edilir.

Meyvelerden hazırlanan şurup gargara halinde ağız ve boğaz hastalıklarına karşı kullanılmaktadır. Kökü veya kök kabuğu müshil ve tenya düşürücü etkilere sahiptir. Yapraklar şeker hastalığına karşı kullanılır (4,5).

Meyve bileşiminde şekerler, organik asitler (tatarik ve sitrik asit), flavonoidler (isoquercetin) ve boyar maddeler bulunmaktadır.

Bileşiminde bulunan papyriflavonol A, kuraridin, saphoraflavanone D ve saphoraiso flavanone A iyi bir antifungal ve güçlü antimikrobiyal aktivite göstermektedir. *Candida* türlerinden özellikle *C.albicans* üzerinde antifungal aktivite göstermektedir (8,9).

Yine yapısında bulunan 2-arylbenzofurans metisilin dirençli stafilokoklar üzerinde antimikrobiyal etki göstermektedir (10).

Kara dut meyvelerinden elde edilen morin flavanoid yapısında bir maddedir ve bu maddenin makrofajlar üzerinde antiinflamator aktivitesi belirlenmiştir. Yine meyvelerden elde edilen cyclosporin (CsA) maddesi ise otoimmün hastalıkların tedavisinde ve organ transplantasyonu sırasında potansiyel immunsupresif ajan olarak kullanılabilir (11).

Morus genusuna ait türlerin (*Morus alba* L., *Morus nigra* L.) anti-HIV, antioksidatif, antihipotansiv ve sitotoksik aktivitesi bilinmektedir. Bu türler flavonoidler açısından zengindir ve potansiyel olarak herpes simplex virus, rhinovirus, rotavirus ve HIV (Human Immunodeficiency Virus) üzerinde antiviral aktiviteleri mevcuttur (12,13).

Özellikle bitkinin kök kabuklarından elde edilen morabanone, kuwanon S, mulberroside C, cyclo-morusin A, eudraflavone B hidroperoxide gibi maddeler bu antiviral etkiyi oluşturmaktadır(12). *Morus* türlerinin kök kabukları özellikle Asya ülkelerinde halk hekimliğinde antiinflamator, hipoglisemik ve antibakteriyel etkisinden dolayı kullanılmaktadır. Kök kabuklarından elde edilen kloroform ekstralarının güçlü antimikrobiyal etkisi bulunmuştur (14).

Bitkinin kök kabuklarından elde edilen etil asetat fraksiyonundaki kuwanin G maddesi ağız patojeni olan *Streptococcus mutans* üzerinde güçlü antibakteriyel özelliğe sahip olarak bulunmuştur. Yine aynı molekül oral-karsinojenik ağız patojenleri *S.sobrinus* *S.sanguis* ve peridontal patojen *P.gingivalis* üzerine antimikrobiyal etkisi belirlenmiş fakat *C.albicans*, *A.actinomycetemcomitans*, *L.acidophilus* ve *L.casei* üzerinde etkisi belirlenmemiştir (15).

Bonjar ve ark. (16) Yaptıkları çalışmada *Morus alba* ve *Morus nigra* bitkilerinin yaprak metanol ekstralarının *C.albicans*, *C.utilis* ve *Saccharomyces cerevisiae* üzerinde anticandidal aktivitesini

belirleyememişlerdir.

Çalışmamız sırasında yaptığımız detaylı literatür araştırmasında *Morus nigra* bitkisinin özellikle kök kabuk ve yaprak aksamaları üzerinde antioksidatif, antiinflamator, hipoglisemik, hiptansif ve sitotoksik çalışmaların, meyve aksamında ise fraksiyon çalışmaları ve meyve içerik tayin çalışmaları olduğu belirlenmiştir. Bitkinin meyve aksamında ekstraksiyon ve antimikrobiyal çalışma sayısı az ve kapsamlı antifungal çalışma ise bulunamamıştır.

Bizim çalışmamızda bitkinin meyve aksamının su ve metanol olmak üzere iki ekstraksiyonu hazırlanmış ve bu ekstraksiyonlar klinik *Candida* izolatlarının 9 farklı türüne ait toplam 76 farklı maya suşu üzerinde antikandidal aktivite açısından araştırılmıştır. Bu çalışmada yöntem olarak disk difüzyon yöntemi ve MİK değerlerinin belirlenmesi için mikrodilüsyon dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Çalışmamız sonucunda klinik örneklerden izole edilen 11 *C.albicans* suşu üzerinde *Morus nigra* metanol ve su ekstralarının antikandidal aktivitesi belirlenmiştir. Su ekstresi için ortalama zon çapı olarak 21 mm, metanol ekstresi için 25 mm, 3 *C.parapsilosis* suşu için ortalama zon çapı olarak su ekstresinde 15 mm, metanol ekstresinde 20 mm, 5 *C.tropicalis* suşu için ortalama zon çapı olarak su ekstresinde 17 mm, metanol ekstresinde 18 mm, 3 *Geotricum candidum* suşu için ortalama zon çapı olarak su ekstresinde 9 mm, metanol ekstresinde 9 mm zon çapı kaydedilmiştir. Kullanılan referans suşlardan *C.albicans* ATCC 90028 suşu üzerinde su ekstresi 20 mm, metanol ekstresi ise 23 mm zon çapı oluşturmuştur.

KAYNAKLAR

- 1- Duman R, Doğan H.H, Ateş A. *Morchella conica* (Pers.) Boudier ve *Suillus luteus* (L.) S.F. Gray Makrofungusunun Antimikrobiyal Aktiviteleri. S.Ü.Fen Edebiyat Fakültesi Dergisi 2003; 22:19-24.
- 2- Dulger B, Gonuz A. Antimicrobial Activity of Certain Plants Used in Turkish Traditional Medicine. Asian Plant Sci 2004; 3: 104-107.

- 3-Dıgrak M, Alma.M.H., Ilcim A., Şen S. Antibacterial and Antifungal Effects of Various Commerical Plants Extracts. *Pharm Biol* 1999;37:216-220.
- 4- Baytop T. Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi. 2.Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 1999 : 200.
- 5-Davis P.H. Flora of Turkey and The East Agean Island. p: 642 Edinburgh University Pres , Edinburgh, 1982.
- 6-Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover R.H. Manual of Clinical Microbiology Vol 6, ASM Washington DC, 1995.
- 7-Zgoda J.R., Porter J.R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi: *Pharma Biol* 2001;39:221-225.
- 8-H.Y. Sohn, K.H.Son, C-S Kwon, G-S Kwon, S.S. Kong. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of 18 Prenylated Flavonoids Isolated From Medicinal Plants: *Morus Alba* L., *Morus Mongolica Schneider*, *Broussonetia Papyrifera* (L) Vent, *Sapindus Flavesces Ait* And *Echinophora Koreensis* Nakai. *Phytomedicine* 2004;11: 666-672.
- 9-Barron D, Ibrahim R.K. Isoprenylated Flavonoids-A Survey. *Phytochemistry* 1996; 43, 921-982.
- 10-Toshio Fukai, Kiyoshi Kaitou, Sumio Terada. Antimicrobial Activity of 2-Arylbenzofurans From *Morus* Species Against Methicillin-Resistance *Staphylococcus Aureus*. *Fitoterapia* 2005; 76:708-711.
- 11-Fang S.H, Hou Y.C, Chao P.D. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Interactions of Morin and Cyclosporin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;15: 205;65-70.
- 12- Du J, He Z-D, Jiang R-W, Ye W-C, Xu H-X, But P P-H. Antiviral Flavonoids From Root Bark of *Morus Alba* L. *Phytochemistry* 2003; 62: 1235-1238.
- 13-Ma S.C, Du J, But P.P.H, Deng X.L, Zhang Y.W, Doi V.E.C, Xu H.X, Lee S.H.S, Lee S.F. Antiviral Chinese Medicinal Herbs Against Respiratory Syncytial Virus. *J Ethnopharmacol* 2002; 79:205-211.
- 14-Park Uy, Kim Y.M, Kim S.H And Chang D.S. Investigation of Optimum Extracting Condition and Antimicrobial Activity of The Extract From Root Bark of *Morus Alba*. *Food Hyg Saf* 1995; 10:139-145.
- 15-K.M Park, J.S You, H.Y Lee, N.I Baek and J.K Hwang. Kuwanon G. An Antibacterial Agent From The Root Bark Of *Morus Alba* Against Oral Pathogens. *J Ethnopharmacol* 2003; 84: 2-3;181-185.
- 16-G.H Shahidi Bonjar, S. Aghighi And A.Karimi Nik. Antibacterial And Antifungal Survey In Plants Used In Indigenous Herbal-Medicine of South East Region of Iran. *J Biol Sci* 2004; 4:405-412.